

目录

液相色谱应用技术

酰胺型硅胶基质纳米粒子的制备及其在毛细管电泳中的应用.....	张俊磊, 包建民, 丁国生 1
电渗驱动在线单滴液液微萃取-毛细管电泳联用新技术研究.....	张俊磊, 包建民, 丁国生 3
HPLC-WBE 二维联用系统的研究.....	李优鑫, 方欣, 翟婷婷, 赵世斌, 包建民 5
大管电泳-毛细管电泳多功能系统的研究.....	李优鑫, 但勇波, 方欣, 包建民 9
大管电泳样品在线转移可行性研究.....	李优鑫, 方欣, 但勇波, 包建民 13
一种新型紫杉醇纳米制剂在小鼠体内的药代动力学研究.....	孟素蕊, 焦建杰, 高洋, 李芹, 韩晓文, 何景华, 牛瑞芳 17
HPLC 法对甲钴胺注射液有关物质方法学研究.....	李瑾, 于润芳 21
柱前衍生 HPLC 法测定生物样品中甲醛的浓度.....	张梦晓, 董伟林 24
灯盏花素对细胞色素 P4502D6 酶活性影响.....	李芹, 韩晓文, 孟素蕊, 焦建杰, 娄建石 29
跌打红药片的质量标准研究.....	周德英, 刘志华 33
高效液相色谱-蒸发光检测法分离蚕沙中的生物碱.....	亓晖, 张业云, 刘新来, 赵辉, 王鹏, 花同, 朱元元 35
液相色谱测定食品中的七种添加剂.....	张静, 于洁, 高秀谦, 寇登民 37
应用可逆加成-链转移聚合法合成四环素分子印迹聚合物微球及表征.....	韩建坊, 董襄朝 40
快速亲和毛细管电泳法测定普罗帕酮和牛血清白蛋白之结合常数.....	张勃, 包建民 42
无机-有机聚合物整体柱的制备及其在蛋白分离方面的应用.....	杨更亮, 程佳, 白立改 45
柱前衍生 RP-HPLC 法检测血浆中 ADMA 浓度的研究及临床应用.....	董茜, 张和顺 48
高效液相色谱法-蒸发光散射检测器测定保健食品中人参皂甙主要成分的含量.....	渠志华, 马永民, 李建平 52
灯盏花素对细胞色素 P4503A4 酶活性的影响.....	韩晓文, 李芹, 焦建杰, 高思楠, 孟素蕊, 刘艳霞, 娄建石 56
快速响应温敏性 PNIPAAm 整体柱的制备及其应用.....	杨更亮, 刘名权, 刘海燕 60
固相萃取盘-高效液相色谱法测定自来水中丙烯酰胺.....	张勃, 祁悦, 高赫男, 包建民 64
中空纤维膜液液微萃取法测定盐酸普罗帕酮-蛋白质结合率.....	宝贵荣, 梁清刚, 闫晨, 包建民 68
HPLC 法初探酶解对黄芪总皂苷组成的影响.....	钟丹丹, 张金红 71
柱前衍生-高效液相色谱法测定饮用水中草甘膦残留量的研究.....	夏义平, 李建平, 马永民 74
大管区带电泳-在线紫外检测技术对有机酸分析方法的建立.....	孙小春, 包建民 76
酒石酸托特罗定有关物质检查方法研究.....	靳朝东, 许瑞征, 薛津 80
基质固相分散-分子印迹固相萃取联用测定土壤和葡萄中三唑类杀菌剂.....	刘维娟, 张玲, 郭亚萍, 张智超 82
拉莫三嗪片有关物质测定方法研究.....	夏锦辉, 王琳 86
离子交换树脂固相萃取-离子对色谱法检测稻田水样中的春雷霉素.....	张春涛, 郭亚萍, 张玲, 张智超 88
高效毛细管电泳法用于沃尼妙林的药代动力学研究.....	李志伟, 赵云超, 齐建敏 91
CH8 培养液中球毛壳甲素的检测和分离.....	陈煌, 郝晓冉, 牛学良, 毕建男, 吕宪禹, 朱旭东 94
HPLC 法测定镇咳药 TY 的含量.....	薛津, 许瑞征, 靳朝东 96

HPLC 法筛选 10- Deacetyl Baccatin III 产生菌及其萃取方法的选择.....	牛学良, 毕建男, 郝晓冉, 吕宪禹, 朱旭东	98
反相高效液相色谱法检测辛伐他汀的血药浓度.....	毕丹, 董伟林	102
发酵液中紫杉醇的高效液相色谱分离条件的优化.....	毕建男, 牛学良, 郝晓冉, 陈煌, 潘皎, 吕宪禹, 朱旭东	105
蚕沙中 1-脱氧野尻霉素三种含量测定方法的比较.....	亓晖, 赵辉, 朱元元	107
分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定火腿肠制品中的四种苏丹红含量.....	乔晋东, 闫宏远, 王慧, 杨更亮	109
原子转移自由基聚合 (ATRP) 法制备聚苯乙烯-2 乙烯苯高分子包覆硅胶固定相.....	徐丹, 张海燕, 董襄朝	111
毛细管电泳分离手性类氨基酸药物.....	李保会 ¹ , 田宝娟	112
大田软海绵酸的高效液相色谱荧光检测方法.....	王丽, 王向红, 桑亚新, 周群标, 吉爽爽, 叶婧	114
对硫磷分子印迹聚合物固相萃取材料的合成及其应用.....	苏晓倩, 高瑞霞, 孙祥丽, 林冬, 陈朗星	118
HPLC 法在 PDS 靶标酶除草剂筛选中的应用.....	戎清清, 马荣, 朱晔荣, 吕宪禹, 王勇	119
高效毛细管电泳法用于麻保沙星的测定.....	李志伟, 崔哲, 赵云超	121
毛细管区带电泳法拆分匹伐他汀钙对映体.....	杨更亮, 程晓昆, 王利娟	124
基于原子转移自由基聚合和点击化学方法制备手性色谱固定相.....	王怀松, 姜萍, 张敏, 董襄朝	126
利用 UHPLC 技术优化药典 2010 版甘草的含量测定方法.....	肖尧	128
液相色谱法同时测定 3 种 B 族维生素的研究.....	李建平, 党亚敏, 夏义平, 渠志华, 马永民	132
按照美国药典对地塞米松磷酸钠注射液含量测定的方法学探讨.....	于润芳, 李瑾, 王虹	135
高效液相色谱法对咪塞米注射液含量检测的方法学验证.....	于润芳, 唐洪	138
反相高效液相色谱法分离九种精神类药物.....	程明, 王芳, 李广庆	143
茶饮料中咖啡因检测存在问题的探讨和研究.....	张明月, 夏义平	145
高效液相法测定比卡鲁胺含量.....	张莹, 张建柱, 李博, 周丽, 汪群杰	149
紫杉醇真菌未知代谢产物的研究.....	吴迪, 王伟, 曹淑珍, 吕宪禹	152
高效液相色谱-示差检测法分离蚕沙中的生物碱.....	亓晖, 张业云, 刘新来, 赵辉, 王鹏, 花同, 朱元元	155
紫云喷雾剂制备及其阿魏酸含量测定.....	李瑾	157

气相色谱应用技术

空气中异丁烷气体标准物质的研制.....	袁岭	161
室内环境空气中 TVOC 测定注意要点.....	闫卿卿, 苏广志, 杨绍康	165
氮中甲烷、乙烷、丙烷和正丁烷混合气体标准物质的研制.....	袁岭	167
高纯 CO ₂ 中微量气体分析气相色谱仪的改装.....	张令甲, 吕宪禹, 张钰浩	171
Prediction of retention times in multiple-ramp temperature programmed gas chromatography using non-linear plate theory.....	Huang-fu Xu-dan, Li Xiao-wei, Li Wen-chen	173
The hold-up time has no effect on the prediction of retention times in temperature- programmed		

gas chromatography using plate theory.....	Huang-fu Xu-dan, Ao Min, Lan Che	177
The effect of temperature on the entropy and enthalpy in the prediction of temperature programmed retention times.....	Huang-fu Xu-dan, Li Deng-ke	180
Using Plate Theory for the prediction of retention times in programmed temperature analyses.....	ZHANG Lan-lan, Li Deng-ke	182
塔板理论预测恒流模式下变化柱长毛细管色谱程序升温保留时间..	张兰兰, 敖敏, 张仲荣	185
塔板理论对毛细管色谱程序温度流量模式下保留时间预测的研究.....	张兰兰, 李笑玮, 颜昊, 孙志豪, 王伟	189
气相色谱法测定涂料中挥发性卤代烃.....	张克贤	192
气相色谱法测定烃中环丁砜的研究.....	徐忠贤	195
气相色谱法测定原油高温模拟蒸馏.....	徐忠贤	197
基质固相分散-气相色谱法测定水产品中痕量菊酯类药物含量.....	刘宝蜜, 闫宏远, 杜精精, 褚春霞, 杨更亮	201
硫化氢分析浅析.....	纪玉金, 马秀, 唐太平	203
顶空气相色谱法测定 DT 中有机溶剂残留量.....	蔡振华, 李月鹏, 蒋庆峰	206
顶空气相色谱法测定 HHL 中大孔树脂有机溶剂残留量.....	金松子, 胡佰艳, 蔡振华, 蒋庆峰	209

质谱应用技术

GC-MS 法评估陈皮原料品质.....	周德英, 刘志华	213
超临界 CO ₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取陈皮挥发油的化学成分比较.....	周德英, 刘志华	216
超临界 CO ₂ 萃取法与蒸馏法提取连翘挥发油的成分比较.....	周德英, 刘志华	219
Nano-LC/MS/MS 鉴定组蛋白翻译后修饰.....	陈英, 张锴	222
青翘与老翘挥发油的化学成分比较.....	周德英, 刘志华	224
TSQ Quantum 液相色谱-串联质谱法测定十种全氟烷基化合物.....	刘飞, 王勇为, 刘婷	227
高效液相色谱 - 串联质谱法测定五种微囊藻毒素.....	刘飞, 王勇为	230
高效液相色谱串联质谱法筛选 10-脱乙酰基巴卡丁 III 产生菌.....	郝晓冉, 牛学良, 陈煌, 吕宪禹, 朱旭东	232
熊果酸脂质体人体药代动力学研究.....	黄月珍, 阎昭, 董伟林	235
海洋生物体中的多环芳烃的检测方法探讨.....	降升平	239
用固相萃取和色谱联用技术分析柴油组成.....	袁维	242
超声提取-GC/MS 测定贝类产品中的多氯联.....	周群标, 王向红, 桑亚新, 王丽, 吉爽爽, 叶静	245
药物中杂质鉴定新技术——MassWorks.....	顾鸣, 李卫建, 李宗华	250
聚丙烯酸高级酯的裂解色谱质谱分析研究.....	张红玲, 范国樑, 徐海红, 贾子麒, 李春漫, 李国平	252
聚丙烯酸十八酯的热裂解规律的研究.....	张红玲, 范国樑, 徐海红, 贾子麒, 李春漫, 李国平	254
GC-MS 法测定抑尘剂中的甲醛、乙醛含量.....	李静, 何秀坤, 那顺	256
利用 GC-MS 鉴别蜂胶提取物中化学成分.....	高振中, 降升平, 杨志岩	260
二维液相色谱质谱联用方法分析人血清中的磷脂类化合物.....	李珉, 聂洪港, 白玉, 刘虎威	263
分子蒸馏提取紫苏油蒸出物的 GC-MS 分析.....	杨志岩, 降升平, 高振中	264

应用 QTRAP™ 串联质谱仪分析和鉴定中药有效成分.....	张克荣 266
质谱鉴定激酶中低丰度蛋白修饰的研究.....	朱金蕾, 张锴 269
利用固相萃取和色谱联用技术分析柴油组成.....	袁维 271

基础理论研究及其它

离子液体辅助诺氟沙星分子印迹整体柱的制备及性能考察.....	孙祥丽, 刘烜, 何锡文, 陈朗星, 张玉奎 274
磺胺甲噁唑印迹纳米硅球的制备及其与传统分子印迹聚合物的比较.....	高瑞霞, 苏晓倩, 陈朗星, 何锡文, 张玉奎 275
氯霉素分子印迹整体柱的制备及其在色谱分离中的应用.....	林冬, 孙祥丽, 苏晓倩, 陈朗星 276
制备大孔硼酸亲和整体柱用于糖蛋白分离.....	杨帆, 何锡文, 张玉奎, 陈朗星 277
苯硼酸修饰阳离子交换整体柱的制备及在蛋白质分离复性中的应用.....	孙祥丽, 林冬, 何锡文, 张玉奎, 陈朗星 278
点击化学修饰疏水有机聚合物整体柱的制备及其在蛋白质分离中的应用.....	孙祥丽, 林冬, 何锡文, 陈朗星, 张玉奎 279
转铁蛋白分子印迹颗粒的制备及应用.....	李沁然, 刘晋湘, 杨开广, 张丽华, 梁振, 单亦初, 张玉奎 280
蛋白质印迹材料制备及其识别性能研究.....	邓启良, 刘晋湘, 梁振, 张丽华, 张玉奎 281
一种新的非平衡传质模型对柱内外色谱峰形的描述.....	张兴华, 李笑玮, 孙志豪 283
非平衡塔板理论和经典塔板理论在描述色谱峰形方面的定性比较.....	张兴华, 李登科, 王伟 287
非平衡塔板理论和经典塔板理论在描述色谱峰形方面的数学关系的定量研究.....	张兴华, 敖敏 290
在线速度改变的条件下塔板理论对柱内外色谱峰形的描述.....	张兴华 293
有机无机复合聚合物整体柱的制备及其在分离蛋白中的应用.....	杨更亮, 白立改 296
ELSD 简介及在生物碱成分分析中的应用.....	赵辉, 元晖, 朱元元 299
离子液体在色谱领域的应用.....	张静, 寇登民 301
色谱技术在阿莫西林中有关物质的分析和鉴定中的应用.....	雷勇胜, 金松子, 姜喜成, 宋丽明, 王琳, 蒋庆峰 303
球型高分子共聚物 GDX 型气相色谱填料即固定相的结构特征.....	张策 307
几类固相萃取柱使用的填料产品概述.....	张策 308
蜂胶活性成分及质量控制的研究.....	张明月 310
植物激素茉莉酸的“短端进样”快速 CE 手性分离.....	韩晔华, 白玉, 刘虎威 314
免疫亲和色谱 LC-QTOF MS 联用分离分析植物多肽系统素的研究.....	杜甫佑, 白玉, 刘虎威 315
动物信息素的分离检测方法研究进展.....	翁瑞, 张晓丽, 刘虎威 316
磁性分离在植物类转基因食品检测中的应用.....	王爱迪, 冉晓华, 万谦宏, 赵卫东, 陈磊 317
原子层沉积法制备键合相硅胶.....	肖得力, 万谦宏, 陈磊 320
谈谈同一物质色谱分析方法的多样性.....	张令甲, 朱瑞林, 吕宪禹 323
TCF7L2、AKT2、FOXO1 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究.....	张婕, 刘德敏 327

新配方汽油分析仪 M3 的应用.....	袁维	328
含硫化合物类蔬菜中农药多残留快速分析方法的研究.....	陈子雷	329
农兽药残留检测中串联质谱方法优化策略.....	牛增元	330
饮用水中痕量有机污染物色谱联用快速筛查技术研究.....	贾瑞宝, 赵清华, 孙韶华	331
气质联用技术在非食品消费品安全中的的应用.....	高崔玲	332
食品中富马酸二甲酯的气相色谱测定.....	陈旭艳, 葛宝坤, 赵孔祥	333
废水及高纯三甲胺中痕量一、二甲胺的气相色谱分析.....	李洪宽	336
化妆品中残留右美沙芬的高效液相色谱检测方法.....	吴延晖, 许泓, 何佳, 肖亚兵, 张骏	338
光引发 Fe(III)-柠檬酸钠配合物对环境内分泌干扰物的降解及羟基自由基的测定.....	张长波, 王蕾, 唐世荣, 宋宁宁, 王芳丽	341
液相色谱-质谱/质谱法测定肉及肉制品中 2, 4-滴残留量.....	何佳, 许泓, 林安清, 张曼, 吴延晖, 张骏	345
DMI-GCMS 快速测定土壤中 16 种多环芳烃.....	孙碧霞, 郭德华, 丁卓平, 冀峰, 董吉川, 姚劲挺	348
离子阱-飞行时间串联质谱快速筛查蔬菜中 189 种农药残留.....	孙碧霞, 郭德华, 丁卓平, 冀峰, 董吉川, 姚劲挺	352

酰胺型硅胶基质纳米粒子的制备及其在毛细管电泳中的应用

张俊磊¹ 丁国生² 包建民¹

(1. 天津大学药学院, 天津 300072; 2. 天津大学分析测试中心, 天津 300072)

本文合成了新型的辛基-酰胺型纳米粒子(OA-NPs)并研究了其在色谱分离方面的优越性。在硅胶纳米粒子(20 nm)表面成功键合了辛基-酰胺基团,实现了反向电渗流条件下对四种酸性化合物的快速分离;键合基团中的辛基可参与到中性化合物的分配和保留中去,从而起到改善分离度、提高柱效的作用^[1]。同常规的电色谱^[2]相比,使用纳米粒子作为假固定相的纳米粒子电色谱技术因无需填充和柱塞制备等步骤而更加方便,易于实现。此外,该技术可以实现良好的柱更换,避免了进行复杂样品分析时所造成的柱污染。

1 试验部分

1.1 仪器和试剂

UV3000 可变波长紫外/可见分光检测器(北京创新通恒科技有限公司), HB-F203-1AC 直流高压电源(天津恒搏高压电源厂), 配备 N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司); 四乙氧基硅烷(TEOS, 分析纯, 天津大学科威公司), 氨丙基三乙氧基硅烷(APTES, 99%, 百灵威), 正辛基酰氯(分析纯, Sigma 公司), 所用水为 Barnstead Nanopure II 超纯水, 其它试剂皆为分析纯试剂。

1.2 酰胺型纳米粒子的制备

制备过程参考文献^[2]。

2 试验结果

2.1 对酸性化合物的分离

研究发现所制备 OA-NPs 在缓冲中作为假固定相时,在低 pH 值的弱酸性条件下产生反向电渗流,与酸性化合物的离子迁移方向一致,所以可实现酸性化合物的快速分离。酸性化合物在柱上进行分离时,除了与纳米粒子表面键合的辛基发生疏水作用,电泳机理也会参与其中。图 1 为四种常见有机酸在 pH 值 3.0 的流动相条件下的分离结果。在流动相 pH 值为 3 时,由于大部分酸的解离受到抑制,其疏水性较强,所以此时主要依据疏水性增大的顺序而依次被洗脱,实现了四种酸的快速分离。计算四种酸保留时间的 RSD% (n=4) 在 5-8%,证明其重复性良好。

2.2 对中性化合物的分离

如图 2 所示,对 DMP、DEP 和 硫脲 进行分离时, a 图为未加入纳米粒子的电泳分离结果图; b 图在同样色谱条件下加入 OA-NPs 纳米粒子后结果图,三种中性样品达到了基线分离,且峰形改善,柱效明显提高。这是由于 OA-NPs 作为假固定相,表面键合的辛基-酰胺基团中的辛基,参与了中性化合物的分配和保留的结果。

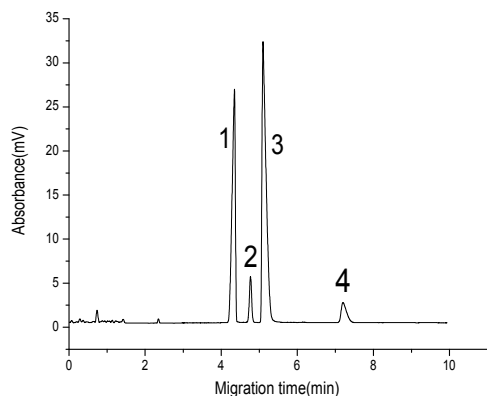


图1 纳米粒子电色谱对四种酸的分离结果图

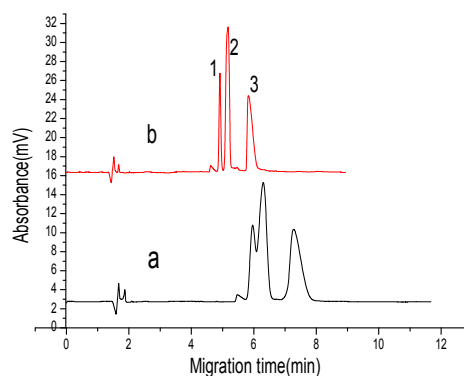


图2 加入纳米粒子前后对三种中性化合物分离结果比较图

3 结论

OA-NPs 在电泳缓冲溶液中作为假固定相, 在 pH 2.0-5.7 的范围可形成从负极到正极的电渗流, 和酸性化合物的电泳方向一致, 所以可实现酸性化合物的快速高效分离。在对中性化合物分离的实验中, OA-NPs 的加入明显改善了分离的效果。

参考文献

- [1] Nilsson C, Nilsson S, Nanoparticle-based pseudostationary phases in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 2006, 27: 76-83.
- [2] Ding GS, Zhang JL, Bao JJ. Preparation and evaluation of amphilic silica-based monolithic column having surface-bound octanoyl-aminopropyl moieties for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 2010, 31(12): 1983-1990.

Preparation and Evaluation of Amphilic Silica-based Nanoparticles

Having Surface-bound Octanoyl-aminopropyl Moieties for Capillary

Electrochromatography

ZHANG Junlei¹ DING Guosheng^{1,2} BAO James J²

(1, School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2, Analysis Center, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

In this thesis, novel amphiphilic silica-based nanoparticles having surface-bound octanoyl-aminopropyl moieties (OA-NPs) were successfully prepared. The potential use of OA-NPs as a pseudostationary phase (PSP) in CE for the separation of different kinds of compounds was investigated. As expected, fast and efficient separation of four aromatic acids was obtained with high column efficiency, because they could migrate in the same direction with the EOF under optimum experimental conditions. Since the existence of octyl groups on the surface, OA-NPs could participate in the distribution and retention of neutral compounds resulting in improved column performance and resolution. In comparison with classical capillary electrochromatography (CEC) technique, this technique is much easier to be realized because it does not need some steps such as preparation of the frits, packing of the stationary phases.

Keywords: Capillary Electrophoresis, Nanoparticles; Capillary Electrochromatography

电渗驱动在线单滴液液微萃取-毛细管电泳联用新技术研究

张俊磊¹, 包建民¹, 丁国生²

(1. 天津大学药学院, 天津 300072; 2. 天津大学分析测试中心, 天津 300072)

借助无歧视电动进样技术^[1], 通过电极的切换实现了单滴液液微萃取 (SDME) 与毛细管电泳 (CE) 的在线联用。使用该技术, 实现了对酸性化合物 (布洛芬和水杨酸)、碱性化合物 (麻黄碱) 和中性化合物 (邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯) 的高倍富集, 大大降低了样品的检测限, 提高了检测灵敏度。与压力驱动在线 SDME^[2] 技术相比, 该技术依靠高压电源控制, 无需外加的压力装置, 更加简单、经济和易于控制。

1 试验部分

1.1 仪器

UV3000 可变波长紫外/可见分光检测器 (北京创新通恒科技有限公司), HB-F203-1AC 直流高压电源 (天津恒搏高压电源厂), 配备 N2000 双通道色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司)。

1.2 试验原理

本实验根据电渗驱动原理^[1], 通过电极反转在毛细管入口处形成三相和两相液滴, 从而实现目标化合物的高效富集和分离。

2 试验结果

2.1 对酸性化合物的富集

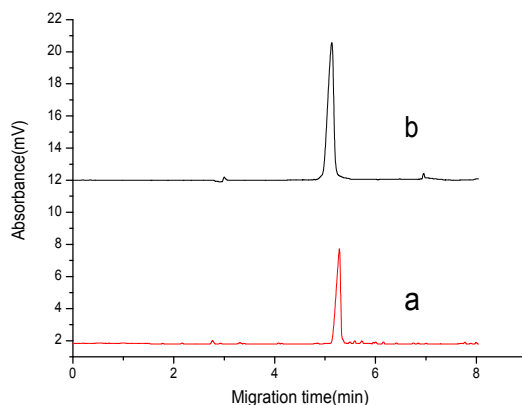


图1 布洛芬富集前后的比较图

在优化实验条件下, 利用三相的 SDME 实现了对布洛芬的富集和分离, 结果见图 1。其中 a 为布洛芬样品的电泳图; b 为该样品液用 pH 为 2.0 的磷酸盐缓冲 (20 mM) 稀释 300 倍, 经过 15 min 富集后进样的电泳图。经过计算, 布洛芬的富集倍率可达到 585 倍, 达到了较为理想的富集效果。

2.2 对碱性化合物的富集

同样利用三相 SDME 的原理, 在以 0.1 M 的盐酸水溶液作为接收相, 含 5% 磷酸钠的 0.2 M 氢氧化钠水溶液作为给出相, pH 值为 4.90 的磷酸盐缓冲作为分离缓冲液的条件对麻黄

碱进行富集,达到了理想的富集效果,富集倍率 145 倍。实验结果表明给出相中磷酸盐的存在,降低了麻黄碱在给出相中的溶解度,从而促进了 SDME 过程。

2.3 对中性化合物的富集

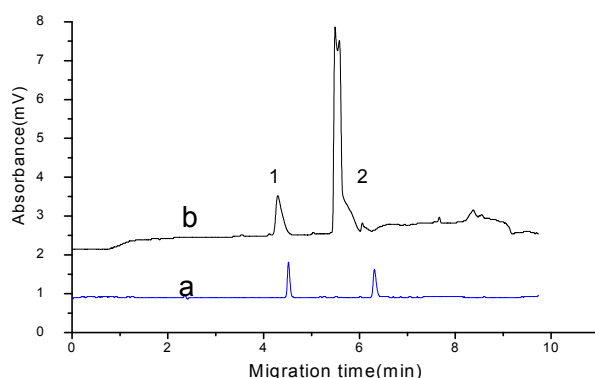


图2 对DMP和DEP富集前后的比较图

运用胶束电动色谱分离模式,采用两相 SDME 富集方法,对 DMP 和 DEP 的混合样同时进行了富集和分离,试验结果如图 2 所示。经过计算,对 DMP 和 DEP 的平均富集倍率分别为 121 倍和 511 倍。

3 结论

在课题组前期研究的基础上,通过电极的切换实现了 SDME 与 CE 的在线联用并将其用于不同性质样品的高倍富集和快速分离。

参考文献

- [1] Yang Y, Bao JJ, An electrical pumping approach to eliminate sample bias in capillary electrokinetic injection, *Electrophoresis*, 2007, 28: 1063~1071.
- [2] Choi K, Kim S J, Jin Y G, *et al.* Single drop microextraction using commercial capillary electrophoresis, *Anal Chem*, 2009, 81(1): 225~230.

On-line Hyphenation of Single Drop Microextraction with Capillary Electrophoresis Separation by Using an Electrical Pumping Approach

ZHANG Jun-lei¹ DING Guo-sheng^{1,2} BAO James J²

(1,School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072,China

2,Analysis Center, Tianjin University, Tianjin 300072,China)

Abstract: In this thesis, a unique on-line single drop microextraction (SDME)-CE technique was developed by using an electroosmotic pump pumping process. High enrichment factors for ionic and neutral samples were realized by using three-phase and two-phase SDME processes separately. New techniques was more economical ,convenient and easier to be implemented comparing with previously reported pressure-driven online SDME-CE technique for it does not need any external pressure device.

Keywords: Capillary Electrophoresis; Single Drop Microextraction; Hyphenation.

HPLC-WBE 二维联用系统的研究

李优鑫, 方欣, 翟婷婷, 赵世斌, 包建民

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

随着人类基因测序的基本完成, 一个以蛋白质为研究对象的后基因组时代已经拉开序幕^[1-2]。但由于蛋白质本身存在形式和活动规律的不同, 如翻译后修饰、蛋白质间相互作用以及蛋白质的构象等, 导致每个个体包含的蛋白质的种类和数量都存在着差异, 即使是同一细胞, 不同的活动周期也产生着千变万化, 因此蛋白质研究更复杂^[3-5]。在蛋白质研究中, 分析技术是关键。近年来, 高效液相色谱(HPLC)和毛细管电泳(CE)的发展为蛋白质的分离分析提供新的手段。然而一维分离模式所能提供的分辨率和峰容量往往十分有限。反相液相色谱-毛细管区带电泳(2D-RPLC-CZE) 二维系统, 凭借着以下优势成为目前研究最多、最受欢迎的二维联用系统^[6-9]: (1)RPLC 与 CZE 具有完全不同的分离机制: 在 RPLC 中, 各组分根据疏水性的不同得到分离, 而在 CZE 中, 各组分根据质荷比的差异而分开; (2)这两种分离模式的缓冲液具有兼容性; (3)CZE 分离速度快, 操作简单。由于 CE 分析速度快, 且与 LC 具有较好的互补性, 因此, LC 与 CE 是非常理想的结合, 可能会实现各种复杂样品, 特别是生物样品中不同性质组分的高效、高分辨率、快速分离。但由于毛细管的微观尺度和低载样量的限制, 使得这一技术仍需不断的改进探索。

针对这一问题, 本文提出了高效液相色谱-大管电泳(HPLC-WBE)二维联用系统。大管电泳是我实验室独创的一种半制备毛细管电泳技术, 通过引入内制冷机制, 克服了传统大内径毛细管电泳焦耳热的局限, 极大地提高了 CE 的载样量和检测灵敏度。因此, 在 HPLC-WBE 离线联用系统中, WBE 具有直接检测 HPLC 流出物的潜力和实力。同时, 由于大管电泳具有独立于分离通道的进样系统, 故 HPLC-WBE 在线联用既不需要构造 LC-CE 联用所需的复杂接口, 又不需要多元件辅助, 直接以简单的多通阀连接即可, 这一简化设计将为复杂样品分析提供极大的便捷。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

自组装大管电泳系统: 包括 Spectra 100 UV 检测器(美国 Thermo Electron 公司), 分离通道石英管(辽宁锦州石英光源厂), 内制冷毛细管(河北永年锐沣色谱器件有限公司), 大管电泳 cartridge(自制), MODEL 2350 制备液相泵(美国 ISCO INC 公司)数据采集卡(浙江大学智能信息工程研究所), N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); Waters 486 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ConstaMetric 3000 型分析液相泵(美国 Milton Roy 公司) Baulo 120-5 ODS 250*4.6mm 色谱柱(天津奥秘科技有限公司); 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司); 微量移液器(Finnpipette); DELTA-320 酸度计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); AL104 分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 真空过滤系统(上海申东)。

氢氧化钠、浓盐酸(36%-38%)、36%冰醋酸、无水乙酸钠、苯甲酸、苯乙酸均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 均购自天津大学科威公司; 羟乙基纤维素(HEC)为医用纯, 购自中国(天津)医药集团; 蒸馏水购自永源纯水开发中心。

1.2 大管 cartridge 前处理

每天使用大管 cartridge 前用 1.0 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl、H₂O 溶液冲洗 15 min,

基金项目: 天津市科委重点培育项目(08ZCKFSH00500)

第一作者: 李优鑫(1981-), 女, 天津大学博士。

通讯作者: 包建民(1961-), 男, 天津大学博士生导师, 主要从事药物分析研究。

再用大管电泳缓冲液冲洗 5 min, 最后用大管缓冲液平衡 20 min。每天实验结束后, 用 1.0 mol/L NaOH 溶液冲洗 15 min, 再用水洗。

2 结果与讨论

2.1 大管电泳系统构造

大管电泳的分离机理与传统毛细管电泳相同, 也主要包括高压电源、分离管道及检测器等。但由于大管电泳系统引入了内制冷元件, 因此在构造上有着独具的体征, 详细结构如图 1 (a) 所示。图 1 (b) 描绘了分离通道横截面的构造, 其中内外两管间的环状夹层即为实际有效的分离通道。

2.2 HPLC-WBE 离线联用研究

由于 HPLC 流动相对样品的稀释作用, 目前所报道的 HPLC-CE 离线联用, 多为收集含目标组分的 HPLC 流出液, 经过蒸干、复溶等样品处理过程, 使其浓缩, 再进行 CE 分析。但这些复杂的处理过程易使蛋白质等生物样品因受热和长时间暴露而失活, 因此难以应用于生物样品的分析上。相比之下, 大管电泳采用大内径的石英管作为分离通道, 载样量可达到 800 nL, 大大提高了检测的灵敏度, 故 HPLC 上流出的目标组分, 无需经过处理, 即可直接进行大管电泳分析。苯甲酸、苯乙酸结构相似、极性相近, 在高效液相色谱上两峰重叠, 无法进行进一步的分析, 故选用此二种化合物作为分离模型, 以证明 HPLC-WBE 联用的意义。

对比图 2 (A) 和 2 (B) 可以看出, 在 HPLC 上, 苯甲酸、苯乙酸两峰重叠在一起, 完全不能分离。收集含目标组分的 HPLC 流出液, 取 400 nL, 进行大管电泳分析, 结果表明苯甲酸、苯乙酸获得了良好的分离。HPLC-WBE 的离线联用不仅省去了耗时、费力的样品处理过程, 更扩大了其应用范围, 为分析复杂生物样品提供了一种新方法。

2.3 HPLC-WBE 在线联用研究

2.3.1 HPLC-WBE 连接接口的设计

由于大管电泳具有独立的进样毛细管, 因此可以利用液相手动进样阀方便的建立 HPLC-WBE 连接桥梁, 详见图 3。其中 1、4 间连接一段容积为 400 nL 的毛细管定量环, 2 连接液相色谱柱, 3 接废液池, 6 接大管进样毛细管。进样阀的进样口在 inject 状态下与 5 口相连, load 状态下与 4 口相连。液相运行时, 连接阀至于 load 状态, 当载有目标组分的流动相流出色谱柱时, 将连接阀切换至 inject 状态, 待目标组分流经定量环后, 再切换至 load 状态。随后, 利用进样针自连接阀外部进样口推送一定量缓冲液, 确保将定量环中的所有目标组份推进大管中进行电泳分离。结果表明, 连接阀不但成功实现了向大管中进

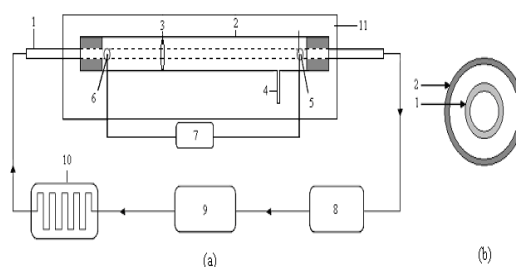


图 1 大管电泳体系构造示意图 (a) 大管电泳体系 (b) 分离通道横截面积

(1) 内制冷毛细管; (2) 石英大管; (3) 检测窗口; (4) 进样毛细管; (5) 缓冲液槽; (6) 缓冲液槽; (7) 高压电源; (8) 制冷液; (9) 输液泵; (10) 散热盘管; (11) 底座

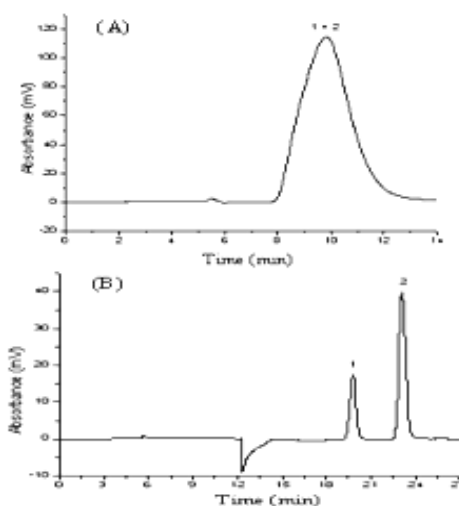


图 2 HPLC-WBE 离线联用分析苯甲酸和苯乙酸 (A) 色谱图 (B) 电泳图

实验条件: 色谱条件: 色谱柱: C₁₈; 流动相: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH 5.0) - 甲醇 (v/v: 50/50); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 214 nm; 样品 1: 0.1 mg/mL 苯甲酸, 样品 2: 1.0 mg/mL 苯乙酸; 混合样品: 0.1 mg/mL 的苯甲酸和苯乙酸; 进样量: 20 μ L; 电泳条件: 大管总长/有效长度: 40/32 cm, 分离电压: 6.0 kV, 缓冲液: 20 mmol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.0, 含 0.6% HEC), 检测波长: 214 nm, 进样量: 400 nL; 内制冷水流速: 18 mL/min, 约 10 $^{\circ}$ C。1. 苯甲酸; 2. 苯乙酸。

样,而且通过此阀进样与直接进样的电泳结果几乎没有差异,由此证明了进样连接阀可以用于 HPLC-WBE 在线联用。

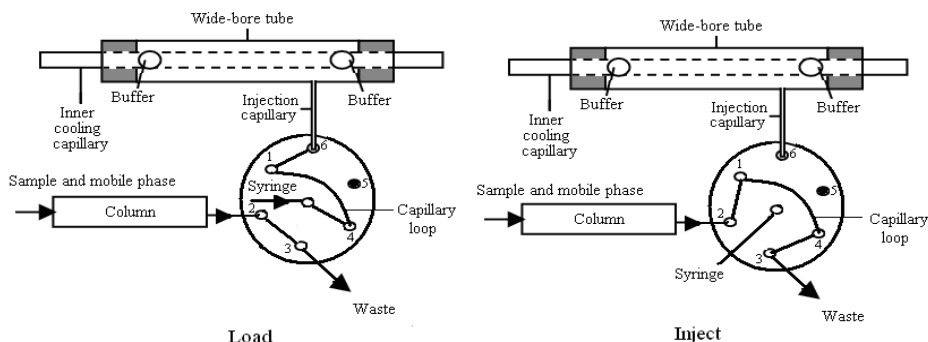


图3 高效液相色谱-大管电泳接口示意图

2.3.2 HPLC-WBE 在线联用可行性验证

与二维 LC 或 CE 不同,在 HPLC-CE 联用分析中,并非 HPLC 全部流出液均需注入 CE 系统分析,而只分析感兴趣的目标组分。在 HPLC-WBE 中也采用同样的方式,首先检测流出物在 HPLC 柱上保留行为,然后确定流出液中目标组分达到最高浓度的时间,在前述设计的接口连接下,切换连接阀至 inject 状态,持续 6 s,确保流出液充满定量环后,再切换至 load 状态。同时,由进样口推送缓冲液,将目标组分推进大管中进行电泳(图 4)。

2.3.3 HPLC-WBE 在线连续联用系统可行性验证

在二维在线联用分离系统中,为达到最大的分离效率,要求高维的分离速度快于低维的分离速度,从而可以避免已经分开组分在高维分离中再混合。同时为了避免组分丢失,通常在离线 HPLC-CE 分析中,要求高维至少连续 4 次分析低维同一目标峰但不同时间点的流出物,对于在线 HPLC-CE,也要至少连续检测 3 次,为此我们仍以苯甲酸和苯乙酸为模型混合物,通过增大二者浓度,促使色谱峰展宽,以此提供模拟连续分析的样品。实验结果表明:(1) HPLC-WBE 能够实现连续进样,此系统最短进样间隔为 120 s;(2) 通过对比连续联用获得的电泳图得知,随着色谱峰出峰时间的延长,苯甲酸相对含量在逐渐增加,而苯乙酸的相对含量在逐渐下降。尽管苯甲酸和苯乙酸的混合物在 HPLC 上表现出单一的重叠峰,但依据 HPLC-WBE 连续样品分析图,可以反推在 HPLC 中苯乙酸的出峰时间较苯甲酸稍早,这符合反相液相色谱分离机制。

2.3.4 HPLC-WBE 在线联用系统的改进

二维分离通常要求第二维的分离速度远高于第一维的分离速度,才能满足快速连续取样分析的要求。在前述 HPLC-WBE 联用接口设计中,由于大管只有一个进样口,为了防止峰的重叠,连续进样受到一定时间间隔的限制。在实际样品分析中,若想获得更多的样品信息,需进一步缩短连续进样间隔。为此,我们利用石英管与毛细管内外径存在差异,通过设置多根进样毛细管,以空间间距缩短连续进样所需要的时间间隔。实验结果表明,最短时间间隔可缩短至 60 s。

3 结论

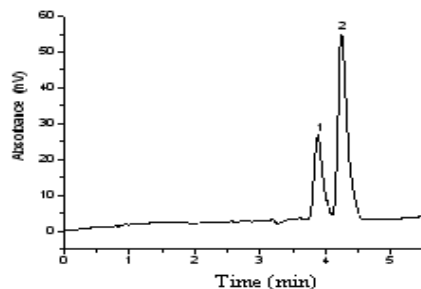


图4 HPLC-WBE 在线联用分离苯甲酸、苯乙酸电泳图
实验条件:除流动相为 0.5 mL/min 外,大管电泳总长/有效长:15/8 cm;大管电泳:3.0 kV,其它条件与图 2 相同。

通过以上 HPLC-WBE 在线联用系统的初步研究,发现此系统具有如下优势:首先,当前 HPLC-CE 多限于离线联用,即将高效液相色谱流出的目标组份经收集、蒸干、复溶等处理后,再进行 CE 分析。这种做法费时、耗力,且难以应用于生物样品的分析。由于大管电泳以大内径石英管作为分离通道,具有较高的载样量和灵敏度,可直接用于 HPLC 流出物的再分离。其次,大管电泳还具有独立的进样毛细管,通过简单的进样阀即可连接高效液相色谱和大管电泳系统,实验证实了 HPLC-WBE 在线联用的可行性。同时,以空间缩短时间的连续进样模式,实现了 HPLC-WBE 的快速连续分析,由此可以获得更多的峰信息。另外,若在 HPLC-WBE 系统后设置质谱鉴定系统,将极大地提高样品的分析能力,从而为复杂生物样品分析提供简单、快速的新方法。

参考文献:

- [1] Brunner E, Ahrens CH, Mohanty S, Baetschmann H, Loevenich S, Potthast F, Deutsch EW, Panse C, Lichtenberg UD, Rinner O, Lee H, Pedrioli PGA, Malmstrom J, Koehler K, Schrimpf S, Krijgsveld J, Kregenow F, J R Heck A, Hafen E, Schlapbach R, Aebersold R. [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25: 576-583.
- [2] Kuruma H, Egawa S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T. [J]. Prostate Cancer and P. D., 2005, 8: 14-21.
- [3] Veenstra TD, Prieto DA, Conrads TP. [J]. Drug Discov Today, 2004, 9 (20): 889-897.
- [4] Cho WCS. [J]. Proteomics & Bioinformatics, 2007, 5 (2): 77-85.
- [5] Licker V, Kövari E, Hochstrasser DF, Burkhard PR. [J]. J Proteomics, 2009, 73 (1): 10-29.
- [6] Raikos V, Hansen R, Campbell L, Euston SR. [J]. Food Chem, 2006, 99 (4): 702-710.
- [7] Krieg RC, Dong Y, Schwamborn K, Knuechel R. [J]. J Biochem Bioph Methods, 2005, 65 (1): 13-19.
- [8] van der Klift EJC, Vivó-Truyols G, Claassen FW, Holthoon FLV, Beek TAV. [J]. J Chromatogr A, 2008, 1178 (1-2): 43-55.
- [9] Cao P, Stults JT. [J]. Mass Spectrom, 2000, 141 (17): 1600-1606.

Study on a novel two-dimensional HPLC-WBE system

LI You-xin, FANG Xin, ZHAI Ting-ting, ZHAO Shi-bin, BAO Jian-min

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, P. R. China)

Abstract: For its high separation efficiency, multidimensional chromatography technology has become an effective means for the analysis of complex samples. With the complementary advantages and the rapid analysis of CE, high performance liquid chromatography-capillary electrophoresis (HPLC-CE) showed great potential in complex bioassays. However, due to the micro-scale of capillary, the construction of two-dimensional HPLC-CE system is facing great difficulties. A novel two-dimensional hybrid of high performance liquid chromatography (HPLC) and wide bore electrophoresis (WBE), HPLC-WBE, was introduced in this paper. The effluent from HPLC could be directly separated and detected in WBE without the sample treatment such as collection, dried, or reconstitution in offline HPLC-CE. Moreover, by using an injection valve, the online 2D HPLC-WBE was built and showed significant improvement in separation of two model compounds. Furthermore, the idea of multi-position injection was adopted to shorten the interval between two consecutive WBE injections. This powerful system has overcome several limitations of traditional HPLC-CE and offers much potential for broad applications.

Key words: Multidimensional chromatography; Capillary electrophoresis; Wide bore electrophoresis; High performance liquid chromatography-wide bore electrophoresis.

大管电泳-毛细管电泳多功能系统的研究

李优鑫, 但勇波, 方欣, 包建民

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

随着科学的进步,对目标组分进一步分析研究已成为大势所趋。但由于毛细管电泳存在着分离通道内径小,载样量低的缺陷,其目前还局限于分析水平,主要以高效快速分离、在柱检测为目标,对于各分离组分的进一步转移、收集、鉴定、离线及在柱酶反应、再分离等还存在一定的困难。为了增加人们对纷繁复杂样品的认知,进一步分析特定的组分已成为进一步研究的瓶颈。针对毛细管电泳的缺陷,我们实验室首创了大管电泳(WBE),其显著提高了毛细管电泳的载样量和检测灵敏度^[1-3]。本文在此基础上,设计了大管电泳-毛细管电泳多功能系统。该系统有如下优点:(1)具有内制冷管的大管系统可以解决电泳过程中产生的焦耳热问题;(2)大横截面的大管系统可以解决载样量小和灵敏度低的难题;(3)该系统可实现大管电泳-毛细管电泳零死体积连接,可实现样品连续在线转移,不会引入样品区带展宽、组分稀释、柱效降低等问题;(4)该系统具有较高的集成性。

酶组成复杂,但广泛存在于生物样品中,是具有生物活性的特殊蛋白质,具有反应条件温和、高的空间和立体专一选择性及高效催化的优点,其不但会随着身体情况的变化而随时自动对机体产生调节作用,而且当身体发生异常时,酶自身的活性、浓度、分布等也会随之进行精密地调节,亦即酶在生物体内起着举足轻重的作用^[4-5]。因此对酶的研究,有助于了解酶在代谢中的作用或某些药物作用的机理等。另外,酶的研究又是现代药物筛选的基础之一,许多药物的筛选都是借助于酶作为筛选的生物靶子而实现的,因此对酶的研究具有重要的理论意义和实践意义。本文以碱性磷酸酶可催化的底物对硝基苯磷酸二钠为酶反应模型,以此研究大管电泳-毛细管电泳多功能分析系统的可行性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

自组装大管电泳系统:包括 Spectra 100 UV 检测器(美国 Thermo Electron 公司),分离通道石英管(辽宁锦州石英光源厂),101U 蠕动泵(美国 Watson-Marlow 公司),APTC-1 制冷器(天津 Auto-Science 公司),HPE100 高效毛细管电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)/高压电源(天津市恒博高压电源厂),XCDY 微流控芯片智能高压电源(山东省化工研究所仪器仪表研究所),毛细管(530/690 μm i.d./o.d.,75/375 μm i.d./o.d.,河北永年锐沅色谱器件有限公司),大管电泳 cartridge(自制),MODEL 2350 制备液相泵(美国 ISCO INC 公司)数据采集卡(浙江大学智能信息工程研究所),N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所);微量进样器(上海高鸽工贸有限公司);微量移液器(Finnpipette);DELTA-320 酸度计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);AL104 分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);真空过滤系统(上海申东)。

碱性磷酸酶标准品购自 Toyobo 公司,对硝基苯磷酸二钠(pNPP)标准品购自美国 Amresco 公司;氢氧化钠、浓盐酸(36%-38%)、硼砂、硼酸、对硝基苯酚均为分析纯,均购自天津大学科威公司;羟乙基纤维素(HEC)为医用纯,购自中国(天津)医药集团;蒸馏水购自永源纯水开发中心。

1.2 大管 cartridge 前处理

每天使用大管-毛细管系统使用前用 1.0 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl、H₂O 溶液冲洗

基金项目:天津市科委重点培育项目(08ZCKFSH00500)

第一作者:李优鑫(1981-),女,天津大学博士。

通讯作者:包建民(1961-),男,天津大学博士生导师,主要从事药物分析研究。

15 min, 再用大管电泳缓冲液冲洗 5 min, 最后用大管缓冲液平衡 20 min。每天实验结束后, 用 1.0 mol/L NaOH 溶液冲洗 15 min, 再用水洗。

2 结果与讨论

2.1 大管电泳-毛细管电泳离线酶反应多功能系统构造

为便于了解大管电泳-毛细管电泳 (WBE-CE) 多功能系统的工作机理, 首先介绍一下此系统的物理构造。WBE-CE 多功能系统的基本机理与传统毛细管电泳相同, 借鉴了电泳微芯片集成性思想, 将大管电泳与多个毛细管电泳有机的结合到一起, 具体构造见图 1。样品自进样毛细管

(5) 进入到 大管分离通道内, 在缓冲液槽 (3) 和 (4) 处所施加的高压作用下, 在大管电泳内实现初次分离; 当样品迁移至转移毛细管与大管电泳接口处时, 部分样品在转移电压的牵引下, 进入毛细管, 并被收集于样品收集器 (7) 处; 通过引入一定量的酶及反应试剂, 当耗时较长的生物反应进行一定时间后, 再在一定电压作用下, 将离线酶反应的底物与生成的产物引入到分离毛细管内, 实现再分离、检测, 由此实现对复杂样品的一次分析。另外, 由于大管电泳的载样量较毛细管电泳高, 且只需部分样品转移至转移毛细管内, 因此可以在大管电泳分离通道上设置不同的转移再分析系统, 由此可以实现样品实时多功能多角度分析。

2.2 大管电泳-毛细管电泳离线酶反应可行性验证

图 2 为 WBE-CE 离线酶反应电泳图, 此结果表明, (1) pNPP 可以自大管电泳迁移至转移毛细管内; (2) WBE-CE 转移出来的, 样品可以被收集于样品收集器内, 尽管收集过程中造成了很大程度上的稀释, 但所收集的量完全满足了再次检测需求, 这充分体现了大管电泳和转移的优势; (3) 离线酶反应是可行的; (4) CE 法可以有效实现底物和产物的分离, 避免互相干扰, 从而达到监测离线酶反应的目的。与常规的酶联免疫等方法相比^[6], 该法具有更高的检测灵敏度。

对于催化速度慢的酶反应来说, 将分离底物收集后, 在离线状态下加入酶, 可以使之能与底

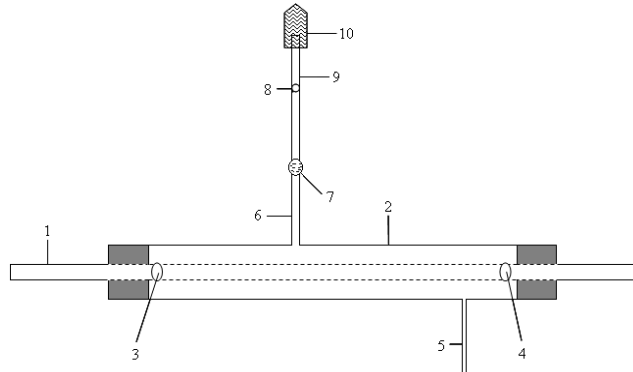


图 1 大管电泳-毛细管电泳离线酶反应多功能系统示意图

- (1) 内制冷毛细管; (2) 石英大管; (3) 大管缓冲液槽; (4) 大管缓冲液槽; (5) 进样毛细管; (6) 转移毛细管; (7) 样品收集器、离线酶反应点; (8) 检测窗口; (9) 分离毛细管; (10) 毛细管缓冲液槽

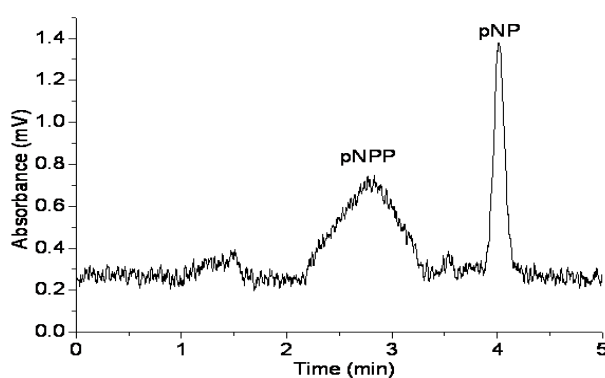


图 2 大管电泳转移 pNPP 离线酶解毛细管电泳图

电泳条件: 大管电泳: 大管总长/有效长度: 15/8 cm; 缓冲液: 20 mmol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.4, 含 0.6% HEC), 分离电压: 2.0 kV; 样品: 1.0 mg/mL pNPP, 600 nL; 负极进样; 内制冷水流速: 4 mL/min, 约 10°C。转移毛细管: 转移毛细管长度: 20 cm; 转移电压: 8.0 kV; 离线酶反应点: 10 μL 60 mmol/L 硼酸缓冲液 (pH 8.4); 分离毛细管: 总长/有效长度: 20/10 cm; 缓冲液: 60 mM 硼酸缓冲液 (pH 8.4); 进样: -8.0 kV, 25 s; 分离电压: -8.0 kV; 检测波长: 405 nm。

物充分接触反应。总之,该离线酶反应为将来临床等实际样品的分离、分析、转移、储存、离线反应、鉴定及再检测奠定了理论基础和实验数据。

2.3 大管电泳-毛细管电泳在柱酶反应系统构造

对于那些反应速度较快的酶反应来说,若依然采用离线酶反应会引来一系列的问题,首先,分离组分的离线收集在很大程度上会将其稀释,降低了底物的浓度,这会给后续的毛细管电泳再检测带来隐患。其次,酶反应瞬间发生,与电泳检测所需时间有一定的差异。若想实时监控酶促反应,需多次重复收集底物并进行多次酶反应,这不仅会造成时间、经济等的极大浪费,而且多次重复可能会引起较大误差。在柱酶反应既可以避免底物稀释,又可以降低重复误差。另外,在优化的条件下,通过一步 EMMA 反应,可以快速测定酶促反应动力学参数,该法为我们课题组专利方法,已在毛细管电泳中成功验证。

为便于了解大管转移在柱酶反应系统的工作机理,首先介绍一下该装置的物理构造。该装置中大管电泳及转移部分与图 1 所示装置完全相同,在转移毛细管出口处设置了独特的四通,其作用有二:一是将四根毛细管连接在一起,二是底物在四通中心与酶溶液相遇,为酶反应的发生提供固定场所。这四根毛细管分别为转移毛细管、酶溶液进样毛细管、酶溶液出样毛细管、分离毛细管,详细结构如图 3 所示。

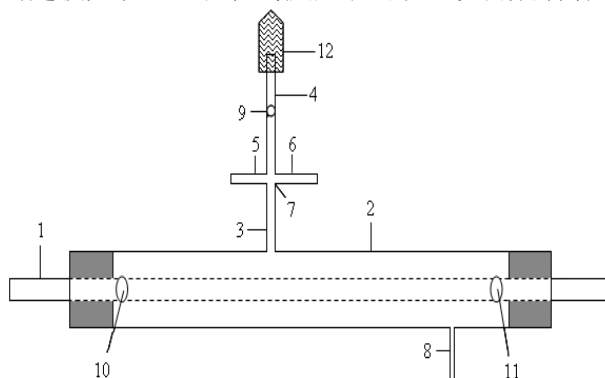


图 3 大管电泳-毛细管电泳在柱酶反应多功能系统示意图
(1) 内制冷毛细管;(2) 石英大管;(3) 转移毛细管;(4) 分离毛细管;(5) 酶溶液进样毛细管;(6) 废液毛细管;(7) 在柱酶反应点;(8) 进样毛细管;(9) 检测窗口;(10) 大管缓冲液槽;(11) 大管缓冲液槽;(12) 毛细管缓冲液槽

2.4 大管电泳-毛细管电泳在柱酶反应可行性验证

实验结果表明, WBE-CE 在柱酶反应是完全可行的。通过在柱检测 pNPP 及生成的 pNP, 可以证明对于反应较快的酶促反应来说, 完全可以通过在线分离转移底物及在柱酶反应一步完成检测。当然, 对于纷繁复杂的生物样品来说, 大管分离和转移各种生物酶将会更有意义, 从前述大管分离转移蛋白质的实验可以证明, 此系统具备在线转移生物样品的能力, 但是受到样品供应和检测的限制, 在此未进行确认。

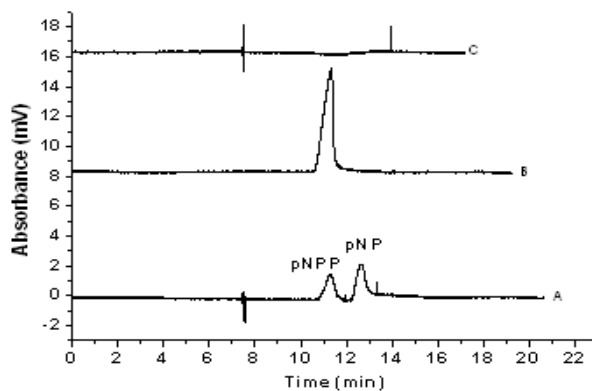


图 4 大管电泳-毛细管电泳在柱酶反应电泳图(A)405nm 下检测 ALP; (B) 大管电泳在线转移 pNPP; (C) 在柱酶解大管电泳在线转移的 pNPP.电泳条件: 大管电泳条件与图 2 相同。转移系统: 转移毛细管长 10 cm; 酶进样毛细管: 10 cm; 废液毛细管: 5 cm; 分离毛细管: 30/20 cm; 在电泳进行 7.5 min 后手动将

200 nL 浓度为 9 U/mL 的 ALP 从酶进样毛细管推入, 此酶将多余的酶溶液会从废液毛细管流出, 保证四通交叉点处充满酶; 转移和分离毛细管缓冲液: pH 8.4 的 60 mmol/L 硼酸缓冲液; 转移电压: +8.0 kV; 检测波长: 405 nm。

3 结论

对于纷繁复杂的未知生物样品来说, 欲了解其各种性质, 将其逐一分离再进行分析至关重要。所开发的大管电泳-毛细管电泳多维分析系统, 具有较强的分离能力, 具备较大的样品载样量, 我们以碱性磷酸酶在碱性条件下催化 pNPP 生成 pNP 这一典型酶反应, 实现了将感兴趣样品在线转移、收集储存、再检测, 并通过离线及在柱酶反应鉴定底物与酶相互作用的研究, 这为后续大管微芯片的发展奠定了强有力的基础。同时通过控制电泳等条件来研究酶的性质, 并用质谱等离线或在线鉴定未知物将是将来的研究方向之一。

参考文献:

- [1] Guo, Y. G., Liu, D. N., Wang, H. F., Yuan, R. J., Bao, J. J., Chem. Lett. 2006, 35, 1386-1387.
- [2] Yuan R, Ding G, Guo Y, Liu D, Bao JJ. [J]. Electrophoresis, 2007, 28: 1674-1680.
- [3] Liu DN, Wang J, Guo YG, Yuan RJ, Wang HF, Bao J J. [J]. Electrophoresis, 2008, 29 (4): 863-870.
- [4] Latini R, Tognoni G, Maggioni A P, Baigent C, Braunwald E, Chen ZM, Collins R, Flather M, Franzosi M, Kjekshus J, Køber L, Liu LS, Peto R, Pfeffer M, Pizzetti F, Santoro E, Sleight P, Swedberg K, Tavazzi L, Wang W, Yusuf S. [J]. J Am Cardiol, 2000, 35 (7): 1801-1807.
- [5] Fernandes SS, Furriel RPM, Petenusci SO, Leone FA. [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58 (5): 841-849.
- [6] Chen CC, Tai YC, Shen SC, Tu YY, Wu MC, Chang HM. [J]. Food Chem, 2006, 95 (2): 213-220.

Study on a multifunctional system integrated wide-bore and capillary electrophoresis

LI You-xin, DAN Yong-bo, FANG Xin, BAO Jian-min

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, P. R. China)

Abstract: This paper presents the results obtained from a novel multifunctional analysis platform established on the basis of a wide bore electrophoresis (WBE) and a CE. The WBE-CE system integrated various analytical steps including separation, transfer, reaction, detection, and storage into a single system. The results indicated that the resolution achieved on this WBE-CE system was better than either the WBE or the CE alone. Further, samples transferred out of the WBE system could participate in online reaction, such as enzymatic reaction in the CE. Alternatively, samples from the WBE system could be transferred out and stored offline in a vial for post transfer reaction. The results demonstrated that this WBE-CE system has the potential to be a multifunctional platform for a range of applications.

Key words: Capillary electrophoresis; Wide bore electrophoresis; Multifunctional system.

大管电泳样品在线转移可行性研究

李优鑫, 方欣, 但勇波, 包建民

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

在常规毛细管电泳中, 为实现柱后馏分的转移收集, 或用半透膜或砂芯接头使分离电压在毛细管出口构成回路或采取停滞后再更换出口电极瓶收集^[1], 留下出口用作在线收集^[2]。由于毛细管电泳本身载样量的局限, 致使两者所转移的样品都十分有限, 另外前者操作复杂, 且稀释馏分; 后者装置复杂, 容易引入死体积而影响分离效率。同时, 由于毛细管电泳存在着分离通道内径小, 载样量低的缺陷, 其目前还局限于分析水平, 这就更增加了各分离组分的进一步转移分析的难度。针对此问题, 本文在本实验室发展的大管电泳系统基础上^[3-4], 设计、制作并发展了大管电泳样品在线转移系统。该系统是利用毛细管外径(375 μm o.d.)和石英大管内径(1000 μm i.d.)之间的差异, 将毛细管按90°方向直接引入并固定于石英大管内表面, 样品首先在大管上实现初步分离, 随后在转移电压作用下, 进入与之垂直的转移毛细管中, 以实现在线转移、进一步分离及在柱检测。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

自组装大管电泳系统: 包括 Spectra 100 UV 检测器(美国 Thermo Electron 公司), 分离通道石英管(辽宁锦州石英光源厂), 101U 蠕动泵(美国 Watson-Marlow 公司), APTC-1 制冷器(天津 Auto-Science 公司), HPE100 高效毛细管电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)/高压电源(天津市恒博高压电源厂), XCDY 微流控芯片智能高压电源(山东省化工研究所仪器仪表研究所), 毛细管(530/690 μm i.d./o.d., 75/375 μm i.d./o.d., 河北永年锐沱色谱器件有限公司), 大管电泳 cartridge(自制), MODEL 2350 制备液相泵(美国 ISCO INC 公司)数据采集卡(浙江大学智能信息工程研究所), N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司); 微量移液器(Finnpipette); DELTA-320 酸度计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); AL104 分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 真空过滤系统(上海申东)。

氢氧化钠、浓盐酸(36%–38%)、36%醋酸、无水乙酸钠、磷酸、磷酸二氢钠、乙腈、对甲基苯磺酸、苯甲酸、肉桂酸、1-萘胺、对甲氧基苯胺均为分析纯, 乙醇为色谱纯, 以上材料均购自天津大学科威公司; 羟乙基纤维素(HEC)为医用纯, 购自中国(天津)医药集团; 溶菌酶、细胞色素 C 和核糖核酸酶 A 标准品购自 Sigma 公司; 蒸馏水购自永源纯水开发中心。

1.2 大管转移系统前处理

每天使用大管系统前依次用 1.0 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl、H₂O 溶液冲洗 15 min, 再用大管电泳缓冲液冲洗 5 min, 最后用大管缓冲液平衡 20 min。每天实验结束后, 用 1.0 mol/L NaOH 溶液冲洗 15 min, 再用水洗。

2 结果与讨论

2.1 大管转移系统构造

基金项目: 天津市科委重点培育项目(08ZCKFSH00500)

第一作者: 李优鑫(1981-), 女, 天津大学博士。

通讯作者: 包建民(1961-), 男, 天津大学博士生导师, 主要从事药物分析研究。

为便于了解大管-毛细管转移系统的工作机理,首先介绍一下大管转移装置的物理构造。大管转移装置中大管电泳的分离机理与传统毛细管电泳相同,电泳装置也主要包括高压电源、分离管道及检测器等。但由于大管电泳分离系统内部引入了内制冷部件,表面引入了单独的进样毛细管和转移毛细管,因此在构造上有着独具的体征,详细结构如上图1(a)所示。图1(b)描绘了分离通道与转移毛细管横截面的构造,其中内外两管间的环状夹层即为实际有效的分离通道,转移毛细管与大管分离通道表面的接口为第二维分离的进样口,检测窗口位于转移毛细管上。

通常,对于多组分样品的毛细管二维分离,需要摸索并精确计算第一维样品到达接口处的时间,或间断或交叉在不同维度加电,使得样品逐个进入第二维。为了避免推断转移电压起始施加时间带来的误差、间歇供电造成的样品区带展宽、电泳重现性差等问题的干扰,本大管电泳转移系统采取独特的连续电泳模式,即样品在多通道电源中两个通道连续输出的电压共同作用下电泳。被分析样品自进样毛细管进入大管分离通道,在两电源共同作用下分离,第一个组分到达转移毛细管入口处时,一部分样品被另一电源电牵引入转移毛细管完成进一步分离,剩余部分样品仍在在大管中继续向前运行,后续组分也按照相同原理转移。

2.2 大管转移系统可行性验证

为了证明此系统具有更好的分离能力,我们以对甲苯磺酸、苯甲酸、肉桂酸的混合物为样品,并在相同条件下与大管系统、毛细管系统的分离效果作对比。同时,有些有机酸也是常用的药用化合物,因此选择有机酸作为多组分分析样品具有一定的代表性和相应的实际效用。实验结果见图2。

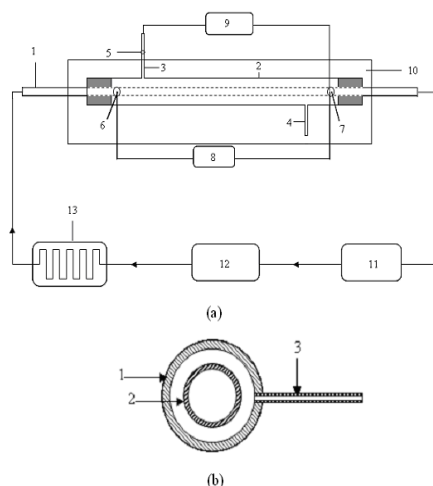


图1 大管电泳转移体系构造示意图

(1) 内制冷毛细管; (2) 石英大管; (3) 转移毛细管; (4) 进样毛细管; (5) 检测窗口; (6) 缓冲液槽; (7) 缓冲液槽; (8) 电源1; (9) 电源2; (10) 底座; (11) 制冷液; (12) 输液泵; (13) 散热盘管

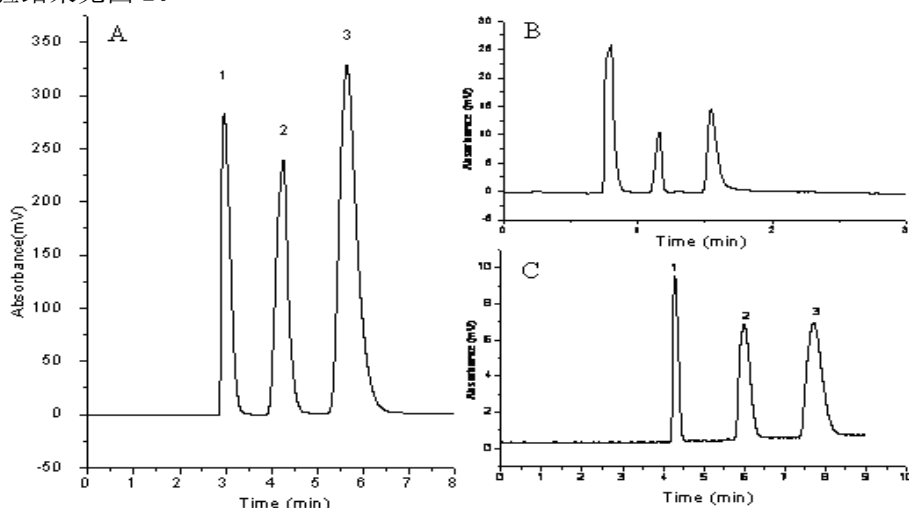


图2 三种酸性化合物在不同体系内分离电泳图 (A) 大管 (B) 毛细管 (C) 大管转移系统

实验条件: (A) 大管系统: 大管总长/有效长度: 15/8 cm; 缓冲液: pH 4.0的20 mmol/L 醋酸缓冲液(含0.6% HEC和10% 乙腈); 样品: 1.0 mg/mL 三种芳香酸; 负极进样; 进样量: 600 nL; 检测波长: 214 nm; 大管电压: 2.0 kV; 内制冷水流速: 4 mL/min, 约10℃。(B) 毛细管系统: 总长/有效长度: 20/10 cm; pH 4.0的40 mmol/L 醋酸缓冲液; 样品: 1.0 mg/mL 三种芳香酸; 负极进样: 8.0 kV, 3s; 检测波长: 214 nm;

分离电压: 8.0 kV; (C) 转移系统: 大管系统和转移系统的物理叠加。

从图 2 可以看出, 转移系统具有较单独的毛细管和大管系统均好的分离效率, 说明样品在完成转移之后又得到了进一步的分离, 这对复杂化合物尤其有利, 并为后续真正的二维分离奠定了基础。

2.3 大管转移系统转移碱性化合物

为考察大管转移系统的普适性, 我们又分离转移了碱性化合物。通常情况下, 许多碱性小分子中含胺基, 在酸性电泳缓冲液中会与氢离子结合呈正电性, 电泳过程中电泳流和电渗流方向相同, 故需要转换加电模式。若仍用酸性化合物大管转移装置就需要采用下列加电模式之一。(1) 正极加于大管进样端, 零极加于转移端, 转移口处将呈现正电势, 若想顺利将样品转移, 需在转移毛细管出口端施加一负压, 即该电源能提供真正的正极到负极的电压; (2) 将零电极置于大管进样端, 在大管出液口及转移毛细管出口端分别施加不同的负压。考虑到电源设备实际供应问题, 我们重新设计了大管转移系统, 将转移毛细管置于大管电泳出口端, 以对甲氧基苯胺和 1-萘胺混合物为样品, 并在相同条件下与大管系统、毛细管系统的分离效果作对比。图 3 所示结果表明, 所建立的大管转移系统不但可以转移酸性物质, 还可以转移碱性物质, 具有一定的适用性。

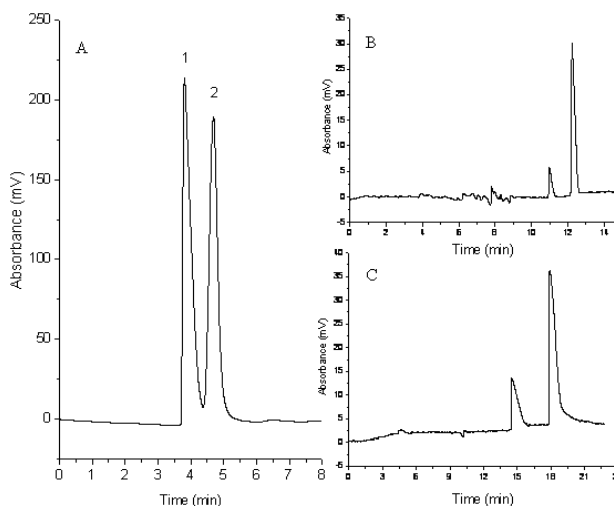


图 3 两种碱性化合物在不同体系内分离电泳图

(A) 毛细管 (B) 大管 (C) 大管转移系统。实验条件: 毛细管: 总长/有效长度: 40/30 cm; 进样: -8.0 kV, 3 s; 样品: 对甲氧基苯胺和 1-萘胺; 零极进样; 分离电压: -8.0 kV; 大管转移系统毛细管总长/有效长度: 40/30 cm; 其它条件与图 2 相同。

2.4 大管转移系统转移蛋白质

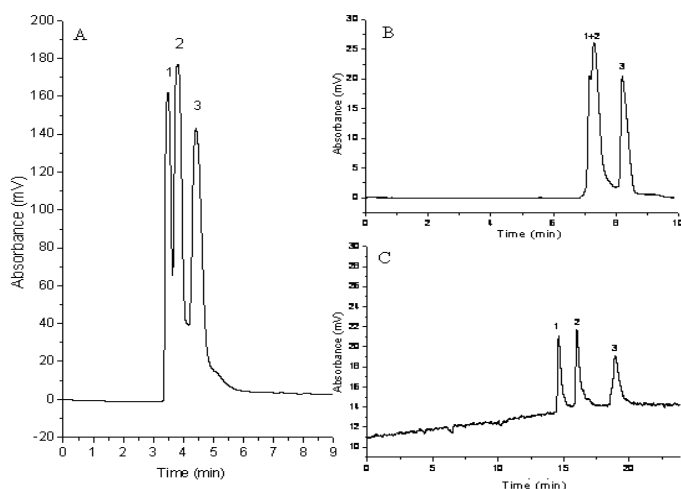


图 4 三种碱性蛋白质在不同体系下分离电泳图 (A) 毛细管 (B) 大管 (C) 大管转移系统。实验条件: 样品: 1.0 mg/mL 的溶菌酶、细胞色素 C 和核糖核酸酶 A; (A) 大管系统: 缓冲液: pH 2.3 的 10 mM 磷酸缓冲液 (含 0.6% HEC); (B) 毛细管: pH 2.3 的 30 mM 磷酸缓冲液; (C) 转移系统: 大管系统和转移系统的叠加。其它条件与图 3 相同。

前面转移的化合物中, 无论是酸性化合物还是碱性化合物, 其分子量均较小, 转移相对容易。而电泳相对于其它分离分析技术 (如高效液相色谱) 而言, 其突出优势之一能分离分子量达几万甚至几十万的生物大分子 (如蛋白质), 且分离效率较高。为了进一步考察转移系统的普适性, 充分发挥电泳在分离蛋白质方面的优势, 我们以三种碱性蛋白质为模型化合物, 在大管上将其分离后再将其转移至毛细管内进行检测, 以此来探讨该系统转移分子量较大的蛋白质的可行性。为了进一步体现转移系统在

分离方面的优势,我们又分别在大管电泳系统和毛细管系统中分离了三种碱性蛋白,并将其结果与转移系统所得结果进行对比,考察转移系统的分离能力。显而易见,单独使用大管电泳系统和单独使用毛细管系统在所选的电泳条件下,均不能将三种碱性蛋白完全分开。而我们建立的转移系统不但能顺利将分子量较大的蛋白质转移出来,且能将其完全分离,说明我们的转移系统具有普适性。

3 结论

我们在大管电泳系统基础上,设计、制作了大管电泳样品在线转移系统,并分别以有机酸、有机碱及蛋白质作为负电荷、正电荷及生物大分子样品,证明了转移系统具有广泛的转移分离能力,可实现零死体积连接及在线转移,不会引入样品区带展宽、组分稀释、柱效降低等问题,为将来临床药物筛选,药物作用靶点作用机制的研究、疾病生物靶标物的探寻等带来新的希望,也为大管转移体系高通量筛选平台的建立和实际应用奠定了基础。同时,有机酸碱和蛋白质在药物研发、食品安全、临床疾病研究等领域有着广泛的应用,但由于带有这些组分的实际样品在分离条件下的带电状况,即使在传统的毛细管电泳体系中实现彻底的分离也是有一定难度的。为此我们选定的样品也是具有一定的实际功效和意义的。

参考文献:

- [1] Burggraf N, Manz A, Verpoorte E, Effenhauser CS, Widmer HM, Rooij NF. [J]. Sens Actuators B, 1994, 20 (2-3): 103-110.
- [2] Manz A, Verpoorte E, Effenhauser C S, Burggraf N, Raymond DE, Widmer HM. [J]. Fresenius J Anal Chem, 1994, 348: 567-571.
- [3] Yuan R, Ding G, Guo Y, Liu D, Bao JJ. [J]. Electrophoresis, 2007, 28: 1674-1680.
- [4] Guo Y, Liu D, Wang H, Yuan R, Bao JJ. [J]. Anal Sci, 2008, 24: 1025-1030.

The feasibility study on online sample transfer between wide-bore and capillary electrophoretic systems

LI You-xin, FANG Xin, DAN Yongbo, BAO Jian-min

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, P. R. China)

Abstract: This paper presents the results obtained from a novel multidimensional analysis platform established on the basis of wide bore electrophoresis (WBE) and capillary electrophoresis (CE). The WBE-CE system integrates the various steps involved in a typical multidimensional separation system ranging from sample injection, separation and transfer into one single system. A distinct three-electrode format was adopted to continuously transfer samples from WBE without the interruption of switching on and off the power suppliers. This continuous potential also could avoid the transfer failure because of the timing mismatching from WBE to CE. Samples representing mixtures of acids, bases and even proteins were analyzed on this system for evaluating its feasibility and applicability. Resolution achieved in this WBE-CE system was better than either WBE or CE alone. This WBE-CE system has proven to be an efficient platform for carrying out various tasks. It has large sample loading capacity, high separation efficiency and speed, zero dead volume connection between WBE and CE.

Key words: Capillary electrophoresis; Wide-bore electrophoresis; Sample transfer.

一种新型紫杉醇纳米制剂在小鼠体内的药代动力学研究

孟素蕊¹, 焦建杰¹, 高洋¹, 李芹¹, 韩晓文¹, 何景华^{1*}, 牛瑞芳²

(1. 天津医科大学药理教研室, 天津 300070; 2. 天津医科大学附属肿瘤医院, 天津 300060)

紫杉醇(Paclitaxel)是由红豆杉属植物中提取的一种天然抗癌药,它能够与细胞微管蛋白结合,在癌细胞分裂时诱导和促进微管蛋白的聚合,抑制其解聚,使细胞有丝分裂受到阻断,起到微管装配和微管稳定作用,从而阻止肿瘤细胞的生长,目前已广泛用于卵巢癌,乳腺癌,非小细胞肺癌和食管癌等的治疗。

紫杉醇虽具有良好的抗肿瘤活性,但在水中的溶解度很小,故临床使用时需在注射剂中加入表面活性剂聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL)以提高紫杉醇在水中的溶解度,但是聚氧乙烯蓖麻油在体内降解时释放组胺,可导致严重的过敏反应;还可在血液中形成细小微粒,包裹紫杉醇分子,从而干扰药物分子向组织间扩散,影响抗肿瘤效应^[1]。为解决紫杉醇的水溶性问题,许多研究在探索其构效关系的同时,许多紫杉醇的新剂型也相继开发应用,例如紫杉醇脂质体,纳米紫杉醇,紫杉醇聚合物胶束剂型等。本实验对一种新型紫杉醇脂质体的药代动力学进行研究,分析其随时间变化在小鼠体内的代谢特点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC 工作系统; AB 135—S 电子分析天平; ORION 520ApH 计; K—550—GE 漩涡混合器; TGL—16G 离心机; 紫杉醇标准品(天津市肿瘤医院提供); 紫杉醇注射液; 多西紫杉醇; 地西洋原料药; 甲醇, 乙腈为色谱纯; 石油醚, 磷酸为分析纯。

1.2 动物: 小鼠, 昆明种, 体重 20-25g, 批号: 2005-0001.

1.3 色谱条件

色谱柱: Intertex C₁₈ 柱; 流动相: 磷酸水溶液: 乙腈 (50:50 V/V); 检测波长: 227 nm; 柱温: 25℃; 流速: 1.0 ml·min⁻¹

1.4 血清样品采集

取昆明种小鼠 90 只, 随机分为 6 组, 每组 15 只, 称重, 按照 9.0mg/Kg 的剂量, 以 0.15ml/10g 的标准给小鼠尾静脉注射紫杉醇纳米制剂, 取血时间为: 给药前, 给药后立即, 10s, 20s, 30s, 45s, 1min, 2min, 3min, 5min, 9min, 20min, 40min, 60min, 120min。各时间点摘眼球取血, 置于离心管中, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清。

1.5 血清样品的预处理

依次加入 2ml 甲醇和 2ml 水重力滤过平衡萃取柱, 加入 200μl 血清, 100μl 多西紫杉醇, 100μl 安定和 500μl 醋酸盐缓冲液混匀后上样, 用 2ml 水重力滤过后, 加入 1ml 石油醚重力滤过, 注入空气, 换收集管, 加入 2ml 乙腈滤过后, 将洗脱液用氮气吹干, 残留物用 200μl 流动相复溶。

1 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2007AA021802)

作者简介: 孟素蕊(1984—), 女, 河北人, 硕士研究生, E-mail: mengsurui@163.com

通讯联系人: 何景华, 女, 教授, E-mail: hejinghuatj@yahoo.com.cn

1.6 标准曲线的建立

精密称取 1.0mg 紫杉醇标准品, 用甲醇溶解, 置于 10mL 容量瓶中, 定容, 配制成 $100.00\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 用倍半稀释原则分别得出 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, $0.39\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。加入 200 μL 标准储备液, 200 μL 小鼠空白血清, 100 μL 安定, 100 μL 多西紫杉醇, 500 μL 醋酸盐缓冲液(pH=5)混匀后上样, 按照“血清样品预处理”的方案进行, 洗脱液用氮气吹干, 200 μL 流动相复溶, 20 μL 进样。

1.7 准确度与精密度

按“血清标准曲线制备”预处理方法制备 0.78、6.25 和 $50.00\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三个浓度的紫杉醇血清样品, 进行测定, 测定值与真实值的相对误差为方法的准确度; 相同条件下 5 次测定结果的符合程度为精密度。

1.8 稳定性考察

考察了高 ($50.00\mu\text{g}/\text{mL}$) 中 ($6.25\mu\text{g}/\text{mL}$) 低 ($0.78\mu\text{g}/\text{mL}$) 三个浓度的紫杉醇血清样品 -20°C 保存 20 天, 反复冻融 3 次以及预处理后 4°C 保存 10 天的稳定性。

2 结果和讨论

2.1 方法的专属性

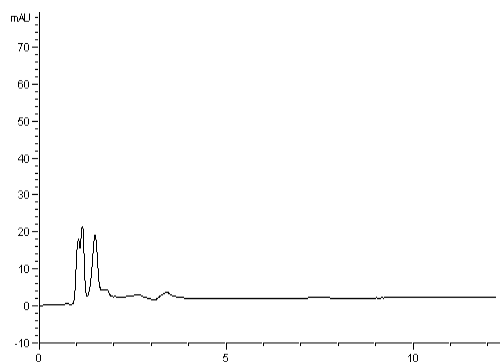


图 1 小鼠空白血清的色谱图

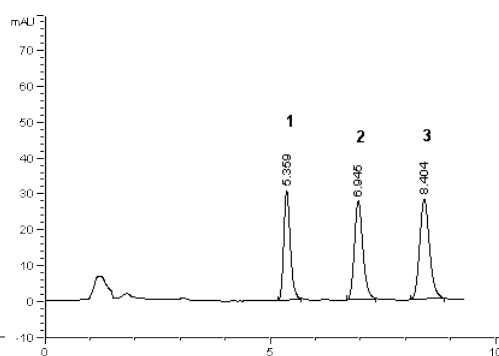


图 2 三者混合的标准溶液的色谱图 (1 为安定, 2 为多西紫杉醇, 3 为紫杉醇)

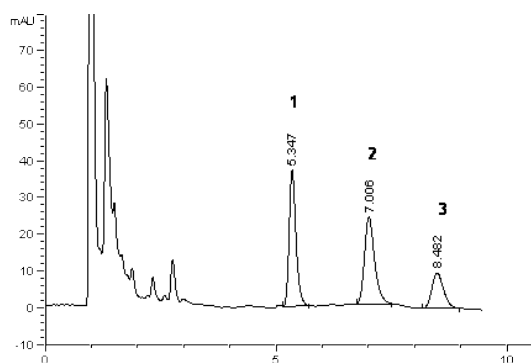


图 3 小鼠尾静脉注射紫杉醇纳米制剂后的血清色谱图

2.2 标准曲线

以紫杉醇标准溶液浓度为横坐标, 药品测定峰面积与内标峰面积比值为纵坐标, 绘制标准曲线进行线性回归, 在 $0.39\text{--}100.00\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内, 药物浓度与峰面积比值呈良好的线性关系。按照加权的最小二乘法得出紫杉醇与内标峰面积比值与紫杉醇浓度的线性关系式为: $y=13.325x+0.8519$ ($R^2=0.9993$)

2.3 准确度与精密度

0.78、6.25 和 50.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三个浓度的准确度均在 85%-115%之间，精密度值均小于 15%。

2.4 稳定性考察

高 (50.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中 (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 低 (0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 三个浓度不同条件下保存的稳定性见下表，均符合方法学要求。

表 1 紫杉醇血清样品保存的稳定性

concentration $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%		
	4 $^{\circ}\text{C}$,10d	-20 $^{\circ}\text{C}$,20d	冻融三次
0.78	9.32	9.27	5.31
6.25	6.94	11.69	2.08
50.00	7.36	7.97	4.94

2.5 小鼠尾静脉注射紫杉醇纳米制剂后的血药浓度-时间曲线及药代参数

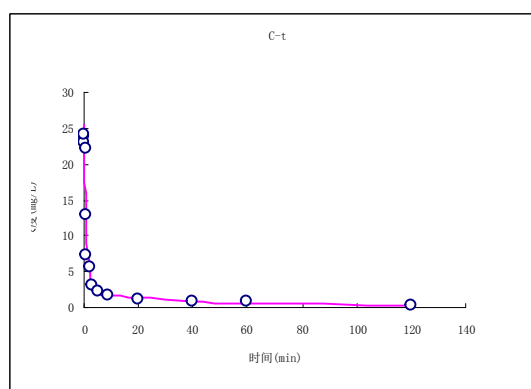


图 4 小鼠静脉注射紫杉醇纳米制剂 (9.0mg/Kg) 后均值血药浓度-时间曲线

表 2 小鼠静脉注射紫杉醇纳米制剂 (9.0mg/Kg) 后均值药代参数

参数	单位	数值
Tmax	min	0.30 \pm 0.19
Cmax	mg /L	31.76 \pm 3.45
T1/2z	min	94.50 \pm 102.84
CLz	L/min/Kg	0.09 \pm 0.09
AUC _(0-∞)	mg /L*min	254.03 \pm 216.45
AUC _(0-t)	mg /L*min	104.27 \pm 49.92
AUMC _(0-t)		2725.01 \pm 2987.24
AUMC _(0-∞)		59550.87 \pm 75958.13
MRT _(0-∞)	min	139.93 \pm 134.20
MRT _(0-t)	min	20.18 \pm 16.34
VRT _(0-∞)	min ²	36850.75 \pm 53027.41
VRT _(0-t)	min ²	521.99 \pm 636.73

目前，紫杉醇血清样品的预处理有液液萃取和固相萃取两种，国内较常采用液液萃取的方法，但是萃取后血清样品杂质较多，国外有使用固相萃取的方法，内标大多为 baccatin III 和 3'-p-hydroxypaclitaxel，测定时多采用梯度洗脱的方式，样品分析周期较长，本实验采取以安定和多西紫杉醇为内标的固相萃取^[3-5]的方案，以乙腈-磷酸水溶液为流动相，血清样品杂质较少，三者分离度高。

前面已提到,本实验以安定和多西紫杉醇为内标,可以推出,按照本实验提出的预处理方案和色谱条件^[7-9],以安定和紫杉醇为内标,可以测定血清中多西紫杉醇的含量,也为紫杉醇和多西紫杉醇的同时测定奠定基础。

根据不同时间点小鼠血清中的药物浓度^[6]得出的药代参数可知,这种新型紫杉醇纳米制剂在小鼠体内的代谢符合二房室模型,至于其在代谢与组织分布方面的优点还需与紫杉醇注射液在体内的分布代谢做进一步比较。

参考文献:

- [1] Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, et al. Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemo therapy [J]. Clin Pharmacokinet, 2003, 42 (7): 665.
- [2] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(13): 1590-1598.
- [3] Mohammadi A, Esmaeili F, Dinarvand R, et al. Development and validation of a stability-indicating method for the quantitation of Paclitaxel in pharmaceutical dosage forms [J]. J Chromatogr Sci, 2009, 47(7): 599-604.
- [4] Soma D, Kitayama J, Ishigami H, et al. Different tissue distribution of paclitaxel with intravenous and intraperitoneal administration [J]. J Surg Res, 2009, 155 (1): 142-146.
- [5] Sharma A, Mayhew E, Bolcsak L, et al. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts [J]. Int J Cancer, 1997, 71(1): 103-107.
- [6] LIANG Yong-ju, WU Hai-ying, SU Xiao-dong, et al. Determination concentration of paclitaxel by RP-HPLC in mice plasma [J]. Chin J Clin pharmacol(中国临床药理学杂志), 2008, 24(3): 249-252.
- [7] Ze Lu, Max Tsai, Dan Lu, et al. Tumor-penetrating microparticles for intraperitoneal therapy of ovarian cancer [J]. J Pharmacol Ther, 2008, 327(3): 673-682.
- [8] Koshkina NV, Waldrep JC, Roberts LE, et al. Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(10): 3258-3262.
- [9] Xinghe Wang, Gang Zhao, Sang Van, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of PGG-paclitaxel a novel macromolecular formulation of paclitaxel in nu/nu mice bearing NCI-460 lung cancer xenografts [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2010, 65: 515-526.

Studies on the pharmacokinetics of a new kind of paclitaxel preparation nanometer in mice

MENG Su-rui¹, JIAO Jian-jie¹, NIU Rui-fang²,
GAO Yang¹, LI Qin¹, HAN Xiao-wen¹, HE Jing-hua^{1*}

(1 Department of Pharmacology, Tinjin Medical University, Tianjin 300070;

2 Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060)

Abstract: Objective: To establish an RP-HPLC method for the determination of paclitaxel in mice serum. Method: The C₁₈ column was used, the detection was carried out at 227nm with UV detector, the solid phase extraction (SPE) was used to extract the sample, the mobile phase consisted of phosphoric acid: acetonitrile (50:50 V/V) delivered at a flow rate of 1mL·min⁻¹. Results: The calibration curves were linear in the rang of 0.39-100.00μg·mL⁻¹ for paclitaxel. Regression equation: Y=13.325X+0.8519(R²=0.9993); the experimental data showed that the concentration-time curve of paclitaxel preparation nanometer in mice serum could be fitted to two-compartmentmodel (W=1).

Key words: paclitaxel; RP-HPLC; pharmacokinetics; paclitaxel preparation nanometer

HPLC 法对甲钴胺注射液有关物质 方法学研究

李瑾，于润芳

(天津金耀氨基酸有限公司)

在本实验中,参照中国药典附录《药品质量标准分析方法验证指导原则》的要求,用 HPLC 法对有关物质测定项目进行了甲钴胺注射液检验方法的方法学验证。

1 仪器、试剂与仪器设备

1.1 试剂

注射用水(天津金耀氨基酸有限公司)

甲醇(色谱纯, TEDIA COMPANY, INC)

1.2 仪器设备

岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪、CLASS VP 工作站

METTLER AE240 电子天平;

2 地塞米松磷酸钠含量测定方法

2.1 色谱条件:

色谱柱: 艾杰尔 C₈(4.6mm × 200mm, 5 μm)

流动相: 甲醇-水(35:65)溶液

流速: 1.0 ml/min

柱温: 25℃

检测波长: 266nm

在中国药典 2005 年版规定的条件下, 甲钴胺峰与相邻杂质峰的分度应符合要求。

2.2 线性范围的考察

精密称取原料约 50mg, 置 50ml 量瓶中, 然后分别精密量取 2、3、4、5、6ml 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。即 40%、60%、80%、100%、120% 供试品溶液(见表 1)。按上述色谱条件, 分别吸取供试品溶液 10 μl 进样, 测定峰面积积分值(y)(见图 1), 结果见表 1。用峰面积积分值对浓度(x)进行回归, 得直线回归方程(见式(1)) 和标准曲线(见图 1)。

表 1 甲钴胺线性范围考察

组号	浓度/(%)	峰面积
1	40	2620241
2	60	3499886
3	80	4361451
4	100	5228414
5	120	6101166

每次进样 10 μl, 对峰面积 y 进行线性回归, 得回归方程:

$$y = 869037.80 x + 1755118.20 \quad (R = 1.0000) \text{ ----- (1)}$$

线性范围: 40%~120% 范围内成良好的线性关系。

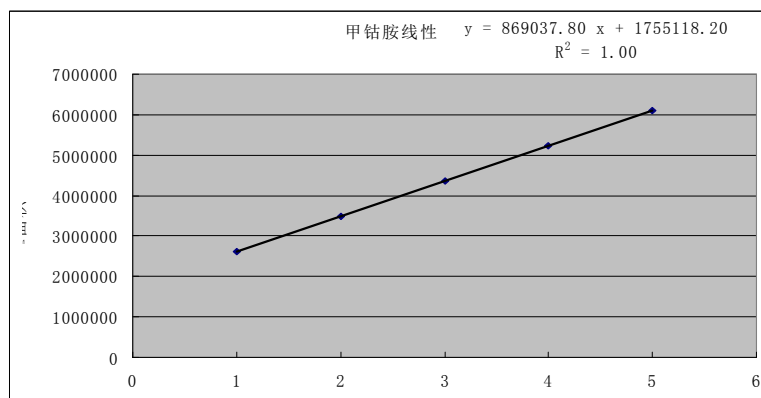


图1 甲钴胺标准曲线

2.3 重复性试验

取甲钴胺注射液 10 μ l 进样，重复 6 次，记录所测定甲钴胺的峰面积积分值，计算甲钴胺的 RSD 为 0.03%。结果见表 2。

表2 重复性实验结果

次数	甲钴胺峰面积	RSD/%
1	4525435	
2	4523319	
3	4522489	0.03
4	4523222	
5	4521692	
6	4523338	

2.4 稳定性试验

取甲钴胺注射液，按 0, 2, 4, 8, 12, 24h 不同时间间隔 10 μ l 进样，测定甲钴胺的峰面积积分值，计算 RSD 为 0.11%，结果表明样品测定液中甲钴胺在 24h 内稳定。见表 3。

表3 稳定性试验结果

测定时间/h	甲钴胺峰面积	RSD/%
0	4478236	
2	4489792	
4	4486905	
8	4484884	0.11
12	4484777	
24	4491962	

2.5 专属性试验

2.5.1 未经破坏的供试品 取甲钴胺注射液 10 μ l 进样。

2.5.2 酸破坏的供试品 取甲钴胺注射液 10ml 加入 0.1mol/L 的盐酸溶液 1.0ml，放置 30min 后 10 μ l 进样。

2.5.3 碱破坏的供试品 取甲钴胺注射液 10ml 加入 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液 1.0ml，放置 30min 后 10 μ l 进样。

2.5.4 氧化破坏的供试品 取甲钴胺注射液 10ml 加入过氧化氢溶液 1.0ml，放置 30min 后 10 μ l

进样。

2.5.5 光照破坏的供试品 取甲钴胺注射液 10ml 于 4500±500LX 照度下, 放置 4min 后 10μl 进样。

2.5.6 加热破坏的供试品 取甲钴胺注射液 10ml 于 80℃ 条件下加热 4 小时, 放置 4min 后 10μl 进样。

照有关物质项下色谱条件分析, 记录色谱图, 分析结果。根据色谱图分析, 本品在酸、碱、氧化、加热条件下稳定, 在光照条件下极不稳定, 应避光操作。

2.6 样品有关物质测定

取 3 批甲钴胺注射液样品, 10μl 进样, 按有关物质方法测定, 结果见表 4

表 4 样品测定结果.

批号	单一杂质峰<1.0%	各杂质峰面积的和<3.0%
0910211	0.5	0.9
0912281	0.1	0.5
1002121	0.4	0.9

结果符合药典规定。

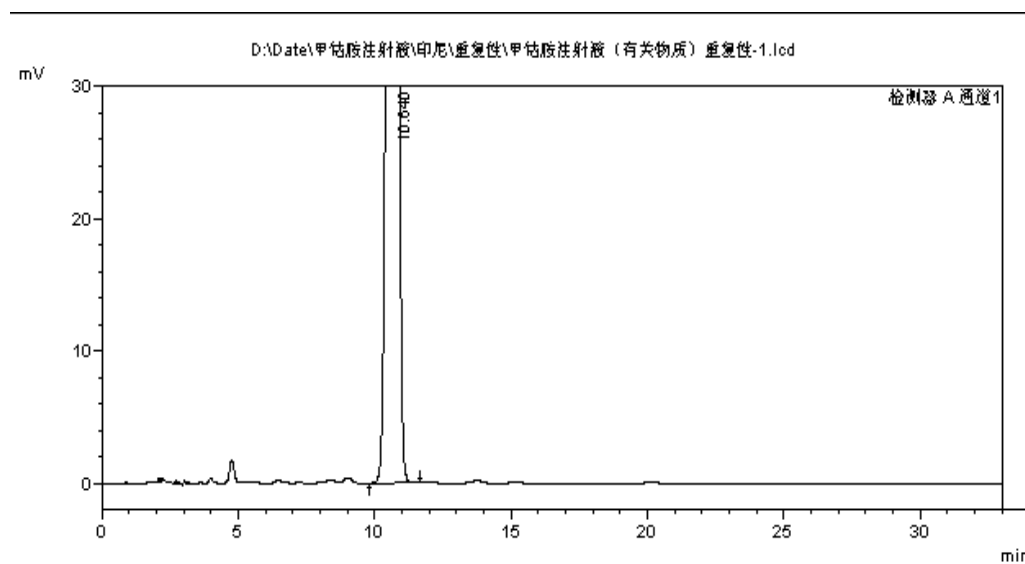


图 2 甲钴胺注射液 HPLC 图谱

3 结论

在此色谱条件下, 甲钴胺的最小检测浓度为 0.05μg/ml。并且经验证, 本产品各项指标均符合国家食品药品监督管理局标准。

参考文献:

- [1] 中国药典 2005 版
- [2] 国家食品药品监督管理局标准

柱前衍生 HPLC 法测定生物样品中 甲醛的浓度

张梦晓¹, 董伟林²

(1.天津医科大学药学院, 天津 300070; 2.天津医科大学基础医学院, 天津 300070)

甲醛是室内环境的主要污染物之一, 其污染来源多, 浓度也较高^[1]。甲醛对人体有较大毒性, 已被世卫组织确认为致畸、致癌物质^[2], 并被认为是导致不良建筑物综合症的主要因素之一^[3]。发展和建立快速准确测定微量甲醛的方法日益显得重要。

目前, 对甲醛的测定主要应用于环境监测^[4]、纺织品^[5]、皮革^[6]、食品^[7]、药品^[8]等方面, 而对于生物样品中甲醛的测定鲜有报道。因此, 结合本实验室专长, 采用 HPLC 法测定甲醛染毒 SD 大鼠血浆及脑、肾、脾等重要脏器中甲醛的浓度, 旨在为有长期甲醛暴露人群体内甲醛浓度的测定提供方法。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器

美国科美特高效液相色谱仪(包括: 6000LDI 精密恒流泵, 6000PVW 紫外/可见检测器, Rheodyne7725i 型进样阀, Anastar 色谱工作站); Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 天津市色谱科学技术公司); MSB010.CX2.5 型台式高速离心机(SANYO); 三环牌 YKH-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); PB153-S 型电子分析天平(瑞典梅特勒-托利多); 8302 型恒温水浴(北京市长风仪器仪表公司); 20-200 μL 微量加样器(上海大龙医疗有限公司); 100 μL 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司)。

1.1.2 药品与试剂

甲醛溶液(37%-40%, 天津威晨化学试剂科贸有限公司, 批号: 20090709); 2,4-二硝基苯肼(DNPH, 分析纯, 华东师范大学化工厂, 批号: 20090305, 用乙腈配制成 3 mg·mL⁻¹ 的 DNPH 溶液); 乙腈(色谱纯, 天津市协和昊鹏色谱科技有限公司, 批号: 20090316); 蒸馏水; 85%磷酸; 空白血浆(天津市血液中心提供); 生物样品为新鲜的、经低温速冻的甲醛染毒 SD 大鼠的血浆和脑、肾、脾, 由天津医科大学生理教研室提供。

1.2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(55:45); 流速: 1 mL·min⁻¹; 紫外检测波长: 350 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

1.3 衍生化

1.3.1 对照品溶液的衍生化

取甲醛溶液 1 mL, 加入乙腈 1 mL、DNPH 溶液 0.5 mL、1%磷酸 3 滴, 涡旋混匀, 置 50 °C 水浴中反应 15 min, 取出后迅速冷却至室温。

1.3.2 血样的衍生化

取血样 100 μL, 加入乙腈 0.1 mL、DNPH 溶液 0.05 mL、0.5%磷酸 1 滴, 涡旋混匀, 置 50 °C 水浴中反应 15 min, 取出后迅速冷却至室温, 13000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取上清液进样。

1.3.3 器官样品的衍生化

器官匀浆后称重, 加蒸馏水至 0.1 mL, 加入乙腈 0.1 mL、DNPH 溶液 0.05 mL、0.5%磷

作者简介: 张梦晓 (1988-), 女, 天津医科大学药学院 2010 级硕士研究生;

董伟林 (1954-), 男, 天津医科大学基础医学院, 高级实验师, E-mail:dongwll19@163.com

酸 1 滴, 涡旋混匀, 50 °C 水浴中反应 15 min, 13000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取上清液进样。

2 结果

2.1 系统适用性试验

取衍生后的空白溶液、对照品溶液、血样溶液和器官样品溶液分别进样, 在上述色谱条件下进行测定。结果见图 1。各图中所标示峰 1 为甲醛衍生物色谱峰。

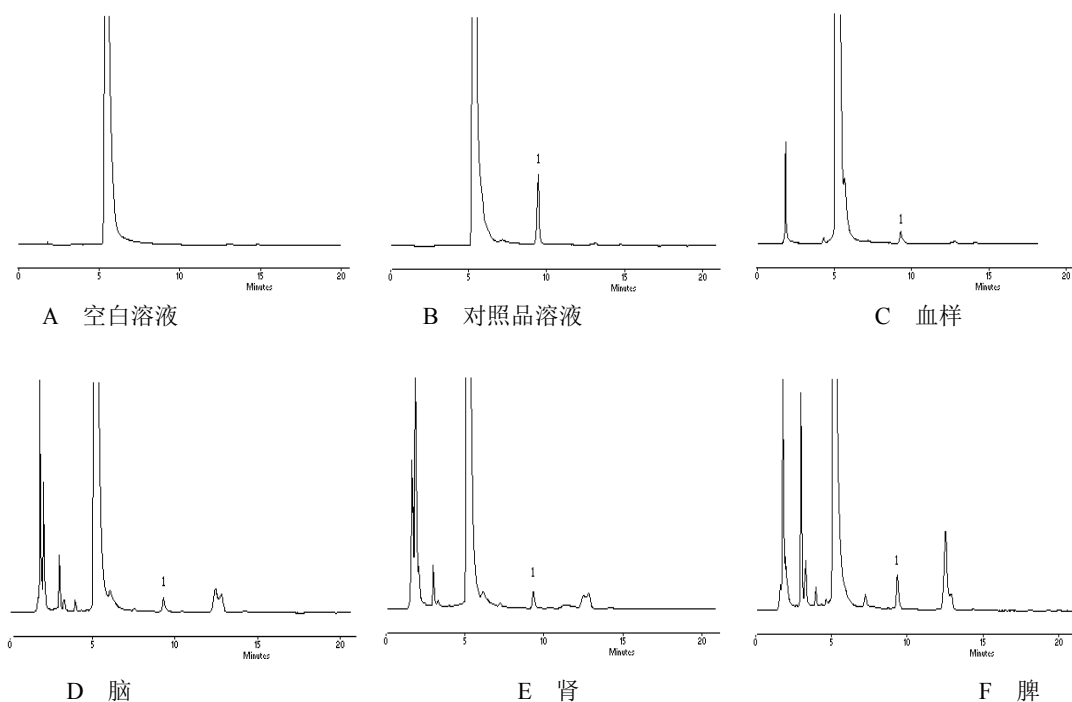


图 1 系统适用性试验

由色谱图可以看出, 在本实验色谱条件下, 甲醛衍生物峰的保留时间约为 9.5 min, 且峰形较好。各样品中甲醛衍生物峰与各杂质峰分离度良好。

2.2 标准曲线的绘制

取 0.5 mL 甲醛溶液加蒸馏水至 200 mL, 得甲醛储备液。取 0.5 mL 甲醛储备液, 加蒸馏水至 250 mL, 得 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醛标准工作液。取甲醛标准工作液 50 μL 、100 μL 、0.25 mL、0.5 mL、1 mL、2.5 mL、5 mL 以及 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甲醛储备液 50 μL , 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释并定容, 配制成甲醛浓度为 10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 的系列标准溶液。分别取上述系列标准溶液, 衍生后精密进样 20 μL , 在上述色谱条件下测定。以甲醛系列浓度衍生物峰面积为纵坐标、甲醛系列溶液的浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 得出线性回归方程, 结果见图 2。由图可知, 甲醛衍生物峰面积与甲醛浓度呈线性关系, 线性回归方程为 $y = 161.63x + 15414$, 相关系数 $r = 0.9999$, 二者线性关系良好, 线性范围为 10~5000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 方法回收率试验

取浓度为 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、2000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醛标准溶液, 衍生后进样, 每一浓度测定 3 次, 得低、中、高浓度的方法回收率分别为 101.3%、100.1% 和 101.2%, 且 RSD 均小于 5%, 方法准确度满足分析要求。

2.4 精密度试验

取浓度为 20、200、2000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醛标准溶液, 衍生后进样, 于同一天内每一浓度

测定5次, 得平均日内RSD为1.40%; 连续5天同法操作, 每一浓度每天进样3次, 得平均日间RSD为2.69%。

2.5 萃取回收率试验

取已知浓度血浆1 mL, 各加入低、中、高浓度甲醛标准溶液1 mL, 衍生后进样, 每一浓度测定3次, 得低、中、高浓度萃取回收率分别为83.6%, 95.7%和99.6%, 均大于75%, 萃取回收率满足生物样品分析要求。

2.6 定量限

按 $S/N=10$ 计算, 本方法定量限为 $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 样品的测定

2.7.1 血样的测定

血样测定结果见表1。

表1 血样测定结果

编号	峰面积	浓度 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	28361	80.10
2	29966	90.03
3	33261	110.42
4	31255	98.01

2.7.2 器官样本的测定

器官样本测定结果见表2。

表2 器官样品测定结果

样品类型	编号	样品重量 (mg)	峰面积	浓度 ($\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$)
脑	1	81	24936	0.73
	2	77	41369	2.09
	3	117	54598	2.07
	4	67	24848	0.87
	5	73	21125	0.48
肾脏	1	148	100523	3.56
	2	169	60734	1.66
	3	116	221147	10.97
	4	123	81588	3.33
	5	109	142793	7.23
脾脏	1	85	287779	19.82
	2	118	332090	16.60
	3	151	771547	30.98
	4	134	261345	11.35
	5	96	196785	11.69

3 讨论

3.1 方法原理

甲醛本身的分子结构简单, 在紫外区的吸收较低, 直接用紫外检测器检测灵敏度低, 通常需要衍生后才能用于色谱分析。甲醛与DNPH在酸性介质中发生高度特异性化学反应, 生成衍生物2,4-二硝基苯腙^[8]。衍生产物性质较稳定, 且引入了共轭体系, 色谱行为改善、

紫外吸收大大增强，可直接用 HPLC 法测定。

3.2 衍生条件的选择

3.2.1 衍生时间的选择

取 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醛标准溶液 1 mL ，加入 1 mL 乙腈和 0.5 mL LDNPH 溶液，加入 1% 磷酸 3 滴，在 50°C 恒温水浴中分别加热 0 、 5 、 15 、 30 、 45 、 60 min 后，迅速冷却至室温，取 $20 \mu\text{L}$ 进样，记录衍生物峰面积。如图 2 所示，甲醛溶液加热 15 min 后，衍生物的峰面积不再增加，遂采用 15 min 作为本实验的衍生时间。

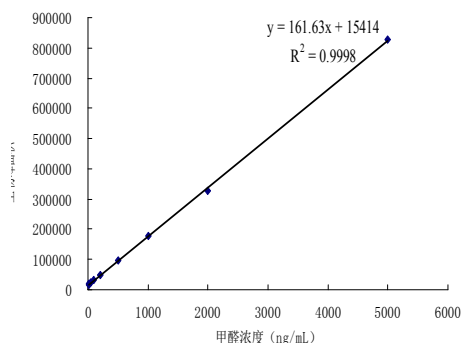


图 2 甲醛标准曲线

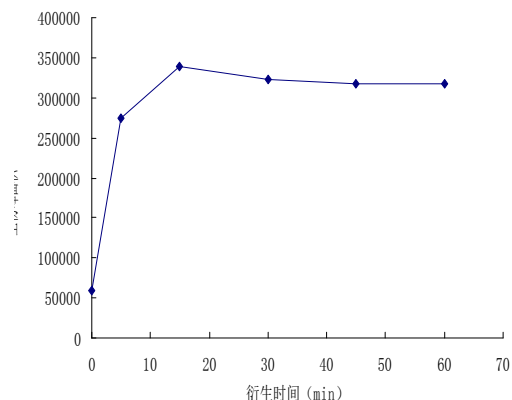


图 2 衍生时间对衍生物峰面积的影响

3.2.2 衍生 pH 的选择

取 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醛标准溶液 1 mL ，加入 1 mL 乙腈和 0.5 mL LDNPH 溶液，分别加入 5% 、 2% 、 1% 、 0.5% 磷酸及蒸馏水，调 pH 为 3 、 4 、 5 、 6 、 7 ，在 50°C 恒温水浴中加热 15 min 后，迅速冷却至室温，取 $20 \mu\text{L}$ 进样，如图 3 所示，衍生 pH 为 5 时，衍生物的峰面积最大，因此选择本实验的衍生 pH 为 5 。

3.2.3 衍生温度的选择

取 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲醛标准溶液 1 mL ，加入 1 mL 乙腈和 0.5 mL LDNPH 溶液，加入 1% 磷酸 3 滴，在室温 (20°C)、 30°C 、 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 下分别衍生 15 min 后，迅速冷却至室温，取 $20 \mu\text{L}$ 进样。如图 4 所示，水浴温度超过 50°C 时，衍生物峰面积最大，因此选择 50°C 作为本实验的衍生温度。

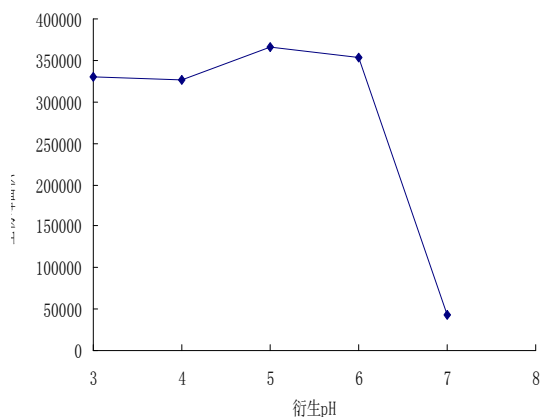


图 3 衍生 pH 对衍生物峰面积的影响

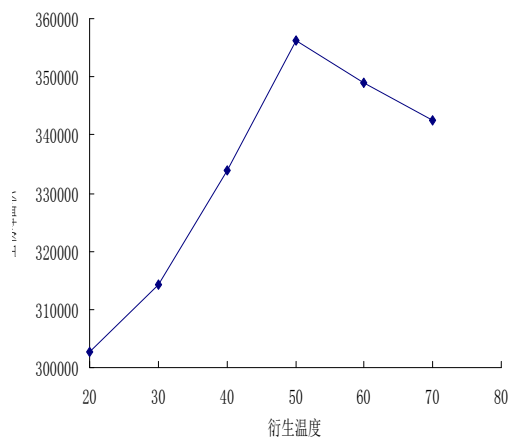


图 4 衍生温度对衍生物峰面积的影响

4 小结

本实验采用柱前衍生化与 HPLC 相结合的方法检测了甲醛染毒 SD 大鼠血浆及脑、肾、脾等器官中甲醛的浓度。方法操作快速、简便、成本低；方法专属性强、准确度高、精密度良好，完全满足分析要求，对于血浆及器官样本中甲醛浓度可准确测定，可为有长期甲醛暴露人群体内甲醛浓度的测定提供方法依据。

参考文献：

- [1] 俞凌云, 曹凤梅, 张新申. 甲醛测定方法研究[J]. 西部皮革, 2009, 31 (23): 33-36.
- [2] 徐婉. 微量甲醛测试方法及研究进展[J]. 中国西部科技, 2009, 8 (29): 46-48.
- [3] Donggeun Sul, Hyunsook Kim, Eunha Oh, *et al.* Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde[J]. Arch Toxicol, 2007, 81 (8): 589-597.
- [4] 罗靖, 蒲荣登, 张玉美, 等. 酚试剂-示波极谱法测定公共场所空气中甲醛[J]. 预防医学情报杂志, 2010, 26 (3): 239-240.
- [5] 赵婷, 赵梅, 吴德清, 等. 柱前衍生/HPLC 法测定纺织品中的游离水解甲醛[J]. 印染助剂, 2009, 26 (3): 48-50.
- [6] 杨春梅, 王瑞, 黄彬, 等. 皮革中甲醛含量的 HPLC 检测方法研究[J]. 计量与测试技术, 2009, 36 (12): 37-38.
- [7] 张秀尧, 陈栋. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定食品中甲醛[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (1): 75-76.
- [8] 王冕, 张珉娜. 反相 HPLC 法测定青霉素 V 钾中甲醛残留量[J]. 河北医药, 2007, 29 (2): 176-177.

Determination of Formaldehyde in Bio-samples

by Pre-column Derivation HPLC

Abstract: Objectives: To establish and validate a high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine the formaldehyde levels in bio-samples. **Methods:** 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) was used as derivating agent. Formaldehyde was mixed with derivating agent, and then derived under acid condition. Then the mixture was centrifuged and the supernatant was used for injection. Chromatographic conditions were as follows: Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with room temperature as column temperature. The mobile phase consisted of acetonitrile and distilled water (55:45) in a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The ultraviolet detection wavelength was set at 350 nm and injection volume was 20 μL. **Results:** Under our chromatographic conditions, the peak of derivation product was well separated from peaks of impurities in all samples. The peak area of derivation product was plotted to the corresponding formaldehyde concentration to obtain the standard curve. The equation of linear regression was $y = 161.63x + 15414$ ($r = 0.9999$, $n = 3$), with linear range of 10~5000 ng·mL⁻¹. The method recovery was 100.1~101.3% and the extraction recovery was 83.6%~99.6%. The intraday and interday precisions and repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD), were 1.40%, 2.69% and 1.54%, respectively. The detection limit was 5 ng·mL⁻¹ and the formaldehyde concentrations in all samples could be accurately measured. **Conclusions:** Our method is specific, accurate and precise, which perfectly met the analytical demand. The formaldehyde concentrations in all bio-samples could be well measured.

Key words: Formaldehyde; Pre-column derivation; HPLC; Bio-samples

灯盏花素对细胞色素 P4502D6 酶活性影响

李芹, 韩晓文, 孟素蕊, 焦建杰, 娄建石

(天津医科大学基础医学院药理教研室, 天津 300070)

细胞色素 P450 2D6 (CYP2D6) 是人体中重要的药物代谢酶, 参与临床近百种药物的代谢, 包括多种抗心律失常药、 β 受体阻滞剂、抗高血压药、抗抑郁药以及抗精神病药等^[1]。CYP2D6 是最具有基因多态性的药物代谢酶, 目前已发现有七十多个变异位点^[2]。基因突变可以引起酶活性及数量的差异^[3], 从而造成人类对药物反应的显著个体差异。CYP2D6 酶的活性可影响药物的代谢过程, 从而影响药物的疗效; 而且药物对 CYP2D6 可以产生诱导或抑制作用, 从而影响其他经此酶代谢的药物而发生药物相互作用和不良反应^[4]。因此, 研究药物对 CYP2D6 活性的影响具有重要意义。中药的成分比较复杂, 中西药联合应用时, 容易出现药物相互作用, 因此研究中草药对 CYP2D6 酶活性的影响, 不但可以了解中药的体内代谢过程, 而且可以为临床中西药物的合理搭配使用提供依据^[5]。

灯盏花素粉针剂由菊科植物灯盏花经提取酚酸类成分制成的灭菌水溶液, 其主要成分为灯盏花素和总咖啡酸酯等, 具有活血化瘀、通络止痛之功效。灯盏花素粉针剂具有明显的血管扩张作用, 并能抑制血小板、红细胞聚集, 促进纤溶酶活性, 具有良好的溶栓防栓作用和清除自由基、对抗脂质过度氧化作用^[6]。临床常用于脑梗塞、冠心病、心绞痛等心脑血管疾病的治疗, 是目前临床上较广泛使用的治疗心脑血管疾病的有效药物之一。

由于大多数心血管病患者需要联合用药, 因此造成心血管病患者用药过程中容易出现明显的个体差异和药物相互作用, 本研究拟使用美托洛尔作为探针药物研究灯盏花素注射液对大鼠 CYP2D6 体内代谢活性的影响, 为预测药物相互作用, 指导临床合理用药提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 $200 \pm 20\text{g}$, 由中国人民解放军军事医学科学院放射研究所实验动物中心提供, 动物生产合格证号: ASCSK (津) 2005-0001。

1.2 药品与试剂

灯盏花素粉针剂 (25mg/支, 批号: 20091223-1, 昆明龙津药业股份有限公司生产); 美托洛尔原料药 (metoprolol, 批号 20090305, 上海定康生物医药材料有限公司); 地西洋原料药 (diazepam, 批号 20071124, 大同制药厂); 无水乙醇、磷酸氢二铵、磷酸、氯仿均为市售分析纯, 甲醇为色谱纯。

1.3 实验仪器

Agilent 1100 HPLC 工作系统 (Agilent 公司, 美国), CAY-1 型液体快速混合器 (北京长安仪器厂, 中国), B600 型低速自动平衡离心机 (白洋离心机厂, 美国), K-550-GE 漩渦混合器 (Scientific Industries Inc, 美国), PB153-S 精密分析天平 (METTLER TOLEDO, 瑞士)

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent zorbax SB-C18 (250mm \times 4.6mm, 5 μm) (Agilent 公司, 美国); 流动相: 0.05mol/L 磷酸氢二铵缓冲溶液 (用磷酸调 pH 至 3.4)-甲醇 (40: 60, v:v); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 230nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μl 。

基金项目：天津市自然科学基金重点项目（09JCZDJC21500）；高等学校博士学科点专项科研基金（新教师基金）资助课题（20091202120012）

作者简介：李芹（1971-），女，山东人，副教授，TEL:022-23542523, E-mail: carolin1006@gmail.com

1.5 溶液配制

1.5.1 磷酸氢二铵缓冲液的配制：称取磷酸氢二铵 2.64g，以 400ml 双蒸水溶解，加 85% 磷酸 1.4ml，调节 pH 值为 3.4。

1.5.2 地西洋内标溶液（IS）的配制：精密称取地西洋 10mg，以无水甲醇溶解并定容至 10ml 容量瓶中，得 1mg/ml 内标储备液。分别精密吸取适量内标储备液，以无水甲醇定容为浓度 100 μ g/ml 和 200 μ g/ml 的内标工作液，置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.5.3 探针药溶液配置：以甲醇作为溶剂，制备浓度为 1mg/ml 的美托洛尔储备溶液，4 $^{\circ}$ C 冷藏，用时加水稀释至适宜浓度。

1.6 样品预处理

准确吸取空白血浆 200 μ l，加入含浓度为 100 μ g/ml 的地西洋内标溶液 20 μ l，涡旋振荡 30s，加入 2ml 提取溶剂氯仿，于快速液体混合器混匀 2min 后 2200 \times g，离心 10min。取下层有机相置玻璃离心管中，置 40 $^{\circ}$ C 水浴中以氮气吹干。残渣用 100 μ l 流动相复溶，20 μ l 进样，记录色谱图。

1.7 给药方法及样本采集

1.7.1 实验分组及给药方法

将 Wistar 大鼠随机分为两组，对照组和实验组，每组 30 只大鼠。实验组大鼠每日尾静脉注射灯盏花素粉针剂 0.45mg/100g，每日 1 次，共 10d；第 11d 于尾静脉缓慢注射美托洛尔探针药物溶液 1mg/100g。对照组大鼠每日尾静脉注射生理盐水 0.5ml/100g，每日 1 次，共 10d；第 11d 于尾静脉缓慢注射美托洛尔探针药物溶液 1mg/100g。

1.7.2 血浆样品采集

分别于注射美托洛尔探针溶液前及给药后 5、10、15、20、30min 和 1、2、4、8、12、24h 股静脉取血 0.8ml 至肝素化离心管中，3500rpm 离心 10min，分离血浆，按文中“样品预处理”程序操作，测定。

1.8 数据处理方法及药代动力学分析

使用 DAS2.0 软件的非房室模型计算美托洛尔的主要药代动力学参数。

1.9 统计学处理

结果以“均值 \pm 标准差”（Mean values \pm SD）表示，应用 DAS 软件进行统计分析，采用方差分析进行组间比较，Dunnett's 检验进行两两比较。P<0.05 表示有显著差异。

2 结果

2.1 HPLC 的方法学验证

上述条件下，美托洛尔内标峰峰形良好，分离完全，无杂质峰干扰。血浆色谱图见图 1。

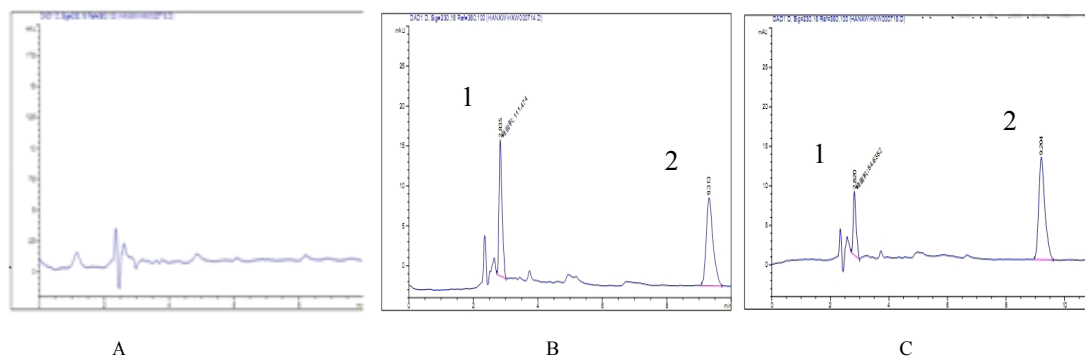


图 1 血浆色谱图

A: 空白血浆 B: 空白血浆+美托洛尔+内标 C: 血浆样本 1. 美托洛尔 2. 内标(地西洋)

以美托洛尔与内标峰面积比值为横坐标, 药物浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得标准曲线方程为 $Y=44.421X+2.4745$, $r=0.9992$ 。

血浆中低、中、高三浓度的美托洛尔的日内及日间精密度均小于 9%, 绝对回收率均大于 80%, 相对回收率为 91%—107%。血浆样本冷冻一个月后其浓度变化均在 $\pm 8\%$ 以内。

2.2 药代动力学研究

使用 DAS2.0 软件的非房室模型计算美托洛尔的主要药代动力学参数, 结果见表 1, 对照组和实验组的血药浓度均值—时间曲线见图 2。

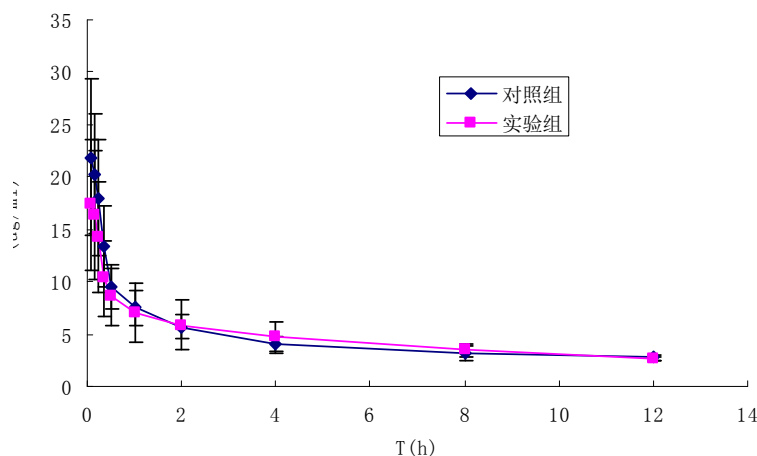


图 2 对照组和实验组的血药浓度均值—时间曲线

表 1 大鼠静脉注射美托洛尔 (1mg/100g) 后的主要药动力学参数 ($\bar{X} \pm SD$, n=6)

药代参数	对照组	实验组
AUC ₍₀₋₄₎ (mg/L·h)	49.72±13.07	69.48±14.00*
AUC _(0-∞) (mg/L·h)	66.72±22.78	92.60±11.96*
MRT ₍₀₋₄₎ (h)	3.60±1.00	5.04±2.00
MRT _(0-∞) (h)	8.28±2.91	11.47±4.82
t _{1/2} (h)	5.31±2.42	7.46±2.07
CL(L/h/kg)	0.16±0.05	0.11±0.01*

*P<0.05

3 讨论

美托洛尔 (metoprolol) 为选择性 β_1 受体阻滞剂, 临床上主要用于治疗抗该血压和心绞痛, 具有良好的抗高血压、抗心肌缺血及保护心脏的作用。该药口服 1.5h 达峰值, 消除半衰期为 3—4h。口服剂量的 70%—80% 通过 CYP2D6 代谢。美托洛尔主要经两条代谢途径: O-去甲基代谢和 α -羟基化代谢。其中 α -羟基化代谢生成 α -羟基美托洛尔, 几乎是由 CYP2D6 单一途径代谢而成, 因此美托洛尔是 CYP2D6 的特异性底物, 可以作为研究该酶活性的探针药物^[7-10]。

表 1 数据表明, 与对照组相比, 实验组美托洛尔的 AUC 明显升高, CL 明显降低 ($P<0.05$), 说明给予大鼠灯盏花素注射液 10d 后, 美托洛尔在体内的代谢减慢, 提示使用灯盏花素注射液后大鼠体内 CYP2D6 活性降低。

目前心血管疾病已经成为危害人类健康的第一大疾病, 其发病率、死亡率逐年上升, 患

者需要长期治疗,或者终生服药。由于遗传和个体差异,再加上疾病本身引起的生理变化,使得大多数心血管病患者需要联合用药,造成心血管病患者用药过程中出现明显的个体差异和药物相互作用,因此,研究联合用药时,药物对于药物代谢酶活性的影响,可以估计传统用药剂量可能引起的毒性反应以及联合用药时产生的药物相互作用,对于调整临床用药方案,提高治疗效果,减少药物不良反应,最终实现个体化给药,具有极其重要的意义。

参考文献

- [1] 李芹,王睿. 细胞色素 P4502D6 基因多态性和药物相互作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(4): 369-374
- [2] Benny K., Adithan C. Genetic polymorphism of CYP2D6 [J]. Indian Journal of Pharmacology, 2001, 33: 147-169
- [3] Ulrich MZ, Joachim F, Sebastian R, Thomas S, Bernd OF, Matthias S, Michel E. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6 [J]. Pharmacogenetics, 2001, 11: 573-585
- [4] Benny K., Adithan C. Genetic polymorphism of CYP2D6 [J]. Indian Journal of Pharmacology, 2001, 33: 147-169
- [5] 贾晋生, 李芹, 王睿. 细胞色素 P4502D6 氧化酶研究的表型分析及探针药物[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(12): 948-51
- [6] 盛净,徐济民,杨菊贤,等. 灯盏花素对急性心肌缺血时血小板聚集率 TXA2 和 6-酮 PGF1 的影响. 中华心血管病杂志, 1995, 23: 53-55
- [7] Kaila N, Straka RJ, Brundage RC. Mixture models and subpopulation classification: a pharmacokinetic simulation study and application to metoprolol CYP2D6 phenotype [J]. J Pharmacokinetic Pharmacodyn, 2007, 34(2): 141-156
- [8] Taguchi M, Nozawa T, Kameyama T, Inoue H, Takesono C, Mizukami A, et al. Effect of CYP2D6*10 on pharmacokinetic variability of routinely administered metoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2003, 59: 385-388
- [9] Wang Y, Zhou L, Dutreix C, et al. Effects of imatinib (Glivec) on the pharmacokinetics of metoprolol, a CYP2D6 substrate, in Chinese patients with chronic myelogenous leukaemia [J]. Br J Clin Pharmacol, 2008, 65(6): 885-892
- [10] 李芹, 王睿, 郭雅, 等. 中国人群 CYP2D6 基因多态性对美托洛尔药代动力学的影响. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13 (7): 796-802

Effect of Breviscapine on the activity of cytochrome P4502D6

LI Qin, HAN Xiao-wen, MENG Su-rui, JIAO Jian-jie, LOU Jian-shi*

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Breviscapine on the activity of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) by metoprolol as a probe. **Methods:** Wistar rats were divided into test group and control group randomly. The rats in the test group were injected breviscapine for 10 days and the rats in the control group were injected normal saline. On d11, all the rats were injected metoprolol. Blood sample were collected for different time and the concentrations of metoprolol were determined by HPLC. **Results:** Compared with control group, AUC was significantly higher and CL was significantly lower in test group. **Conclusion:** The activity of CYP2D6 can be inhibited by breviscapine.

Key Words: breviscapine, midazolam, CYP2D6, activity

跌打红药片的质量标准研究

周德英¹, 刘志华²

(1. 天津中新药业隆顺榕制药厂, 天津 300457; 2. 河北工业大学化工学院, 天津 300130)

跌打红药片是由三七、白芷、川芎和当归等6味中药组成的复方制剂, 具有活血止痛, 去瘀生新的功效, 主要用于治疗跌打损伤, 筋骨瘀血肿痛, 风湿麻木等症。方中三七为君药, 能散瘀止血, 消肿定痛; 辅以活血化瘀的川芎、当归等共奏活血止痛、去瘀生新的功效。为控制产品质量, 确保临床疗效, 建立了三七、白芷、川芎和当归的薄层色谱鉴别方法, 并采用高效液相色谱法对三七的有效成分人参皂苷 Rg1 进行含量测定。

1 仪器与试剂

SP8800 高效液相色谱输液泵, 紫外 FOCUS 检测器。数据处理: 分析之星色谱工作站。

人参皂苷 Rg1 对照品购自中国药品生物制品检定所。样品由天津中新药业隆顺榕制药厂提供。乙腈为色谱纯, 水为纯净水。

2 人参皂苷 Rg1 的 HPLC 法测定

2.1 色谱条件: 色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 乙腈-水 (20:80) 为流动相; 检测波长为 203nm; 流速: 1.0ml/min; 柱温: 30℃。

2.2 溶液的制备: 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg1 对照品适量, 加甲醇制成每 1ml 含 0.2mg 的溶液, 即得。供试品溶液的制备: 取本品 20 片, 除去包衣, 研细, 取 0.5g, 精密称定, 置 25ml 具塞锥形瓶中, 精密加入 25ml 甲醇, 称定重量, 超声处理 40 分钟, 放冷, 再称定重量, 加甲醇补足减失的重量, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液即得。

2.3 标准曲线的绘制: 取人参皂苷 Rg1 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1ml 含 0.502mg 的溶液, 作为储备液, 分别精密量取 0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml, 置 5ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 分别精密吸取上述 5 种浓度的对照品溶液各 10 μl, 注入液相色谱仪, 测定色谱峰面积。以对照品浓度 (ug/mL) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=2939X-325.69$, $r=0.9997$ 。结果表明人参皂苷 Rg1 在 50.2~401.6 μg/mL 范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.4 专属性试验: 取人参皂苷 Rg1 对照品溶液、供试品溶液和三七阴性对照液各 10μl, 注入高效液相色谱仪, 测定结果见图 2。表明阴性对照没有任何干扰。

2.5 重复性试验: 分别精密吸取同一份供试品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 测定人参皂苷 Rg1 峰面积, 其 RSD 为 0.73%。

2.6 稳定性试验: 精密吸取同一份供试品溶液 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 小时进样, 测定色谱峰面积, 峰面积值的 RSD 为 1.40%, 表明溶液内待测组分在 10 小时化学性质稳定。

2.7 重现性试验: 取本品共 6 份, 按供试品溶液制备操作, 分别进样 10 μL, 按前述色谱条件进样, 测定每份样品中人参皂苷 Rg1 含量, 结果 RSD 为 1.58%。

2.8 加样回收率试验: 取样品中人参皂苷 Rg1 含量为 11.022mg/g 的细粉 0.25g, 精密称定, 精密加入人参皂苷 Rg1 对照品溶液 25ml(0.0921mg/ml), 按供试品溶液方法制备, 按上述色谱条件分析, 计算回收率, 结果人参皂苷 Rg1 平均回收率为 98.28%, RSD 为 1.04%。

作者简介: 周德英 (1974-), 女, 天津人, 高级工程师, Tel: 022-25291184, E-mail: zhoudeying7477@eyou.com

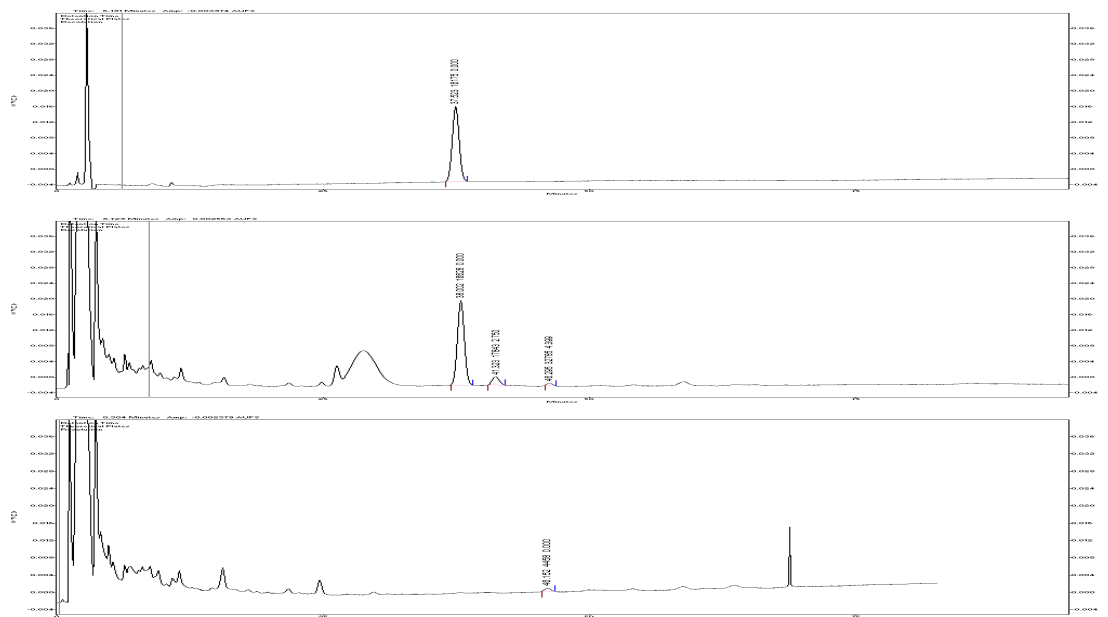


图2 人参皂苷 Rg1 对照品 (A)、供试品(B)和三七空白对照(C)的 HPLC 图 (从上往下依次为图 A, B, C)

2.9 样品的测定: 取 3 批样品, 分别制备供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10ul, 注入液相色谱仪, 测定, 计算人参皂苷 Rg1 含量, 结果见表 1。

表 1 跌打红药片中人参皂苷 Rg1 的测定结果 (n=3)

批号	人参皂苷 Rg1 含量 (mg/片)	RSD/%
0406001	2.66	1.24
0406003	2.78	0.98
0406004	2.87	1.55

3 讨论

薄层色谱鉴别中采用的方法清晰、准确、重现性好。人参皂苷 Rg1 含量测定中采用的方法均为经过实验筛选的最佳条件, 且色谱峰分离度好, 建立的方法能起到控制本品内在质量的目的。

参考文献:

中国药典[S].一部.2005.

Quality Standard Research of Dieda-Hongyao Tablet

ZHOU De-ying¹, LIU Zhi-hua²

(1.Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Longshunrong Manufactory,Tianjin 300457,China;

2. School of Chemical Engineering, Hebei Industrial University, Tianjin 300130,China)

Abstract: [Objective] To establish the quality standard of Dieda-Hongyao Tablet. [Method] Determin the quantity of ginsenoside Rg-1 in preparation with HPLC method. [Result] Ginsenoside Rg-1 have Good linear relationship with peak area between 50.2~401.6 μ g/ mL with average recovery 97.28% and RSD 1.04%. [Conclusion] The method is simple, accurate, reliable and reproducible enough to be the the formulation of quality standards.

Key words: Dieda-Hongyao tablet; HPLC; ginsenoside Rg-1

高效液相色谱-蒸发光检测法 分离蚕沙中的生物碱

亓晖, 张业云, 刘新来, 赵辉, 王鹏, 花同, 朱元元*

(南开大学药学院, 天津 300000)

蚕沙为蚕蛾科家蚕属昆虫家蚕幼虫的粪便, 具有较高营养成分, 药用价值很高。近年来研究发现, 蚕沙生物碱成分能抑制 α -糖苷酶活性, 改善糖尿病动物的糖、脂代谢异常, 有益于早期糖尿病及其慢性并发症的防治^[1-2]。对蚕沙中生物碱成分做 HPLC 分析, 实验数据显示, 至少含有八种化合物, 周元雄^[3]等人已分离鉴定出其中三种化合物, 而另外至少五种化合物还未见报道。因此, 有必要对蚕沙生物碱成分进行较深入的研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SHIMADZU 系列高效液相色谱仪; Hypersil SCX 色谱柱(250 mm×10.0 mm, 5 μ m); Varian-Mercury V×300 型高分辨核磁共振谱仪; Thermofinnigan LCQ 质谱仪; 生药蚕沙由天津市中新药业提供; HPLC 用水均为娃哈哈纯净水; 其它试剂均为分析纯。

1.2 HPLC 法分离蚕沙中生物碱成分

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil SCX 柱(250 mm×10.0 mm, 5 μ m); 流动相: 水-冰醋酸-氨水(1000:0.25:0.25; V/V/V); 流速: 3.0ml/min; 检测器: 蒸发光检测器(SC:30 $^{\circ}$ C,DT:60 $^{\circ}$ C, 气体压力: 48.6psi); 柱温: 室温。

1.2.2 供试品溶液的制备

2kg 蚕沙用离子水 6L, 调 pH3.0, 40~50 $^{\circ}$ C 保温 3 小时, 过滤; 滤渣同法再提取两次, 合并三次滤液, 减压浓缩至约 2.4L, 静置过夜, 10000rpm 离心 20min, 保留上清液。取上清液过 001×7 阳离子交换树脂柱, 以 50%乙醇和去离子水依次洗尽不吸附的杂质, 再采用 0.5mol/L 氨水溶液洗脱, 收集 α -糖苷酶抑制活性检测阳性部分, 减压蒸去氨水, 得到 9.7g 深棕色浸膏。取 9.3g 浸膏经 70g 硅胶吸附脱色, 无水乙醇洗脱, 减压蒸干后, 得蚕沙总生物碱提取物 3.2g (0.30%), 将其溶解, 做制备用。

1.2.3 蚕沙提取液中生物碱成分的 HPLC 法分离纯化

将上述供试品溶液以所选色谱条件进行分离, 谱图如图 1: 分离得到干燥固体物质: 化合物 A (119.5mg) 和化合物 B (20mg)。

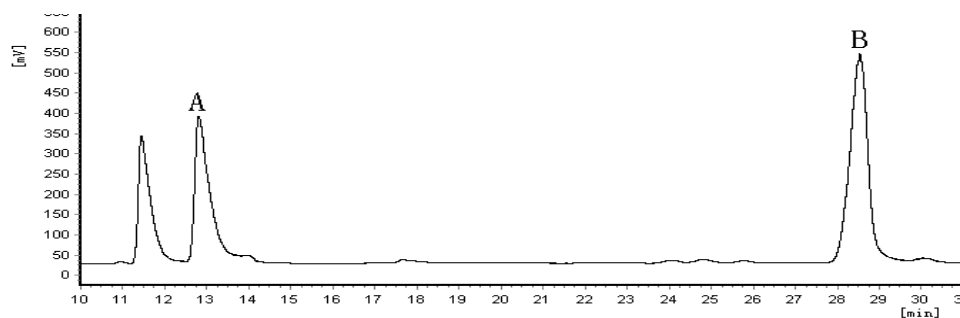


图 1 供试品溶液 HPLC 图谱

基金项目: 国家科技重大专项项目(2009zx09103)

作者简介: 亓晖(1985-), 女, 山东人, 硕士研究生, E-mail: qihui1985@126.com

通讯联系人: 朱元元, 女, 副教授, E-mail: zhuyy@nankai.edu.cn

1.3 结构鉴定

对化合物 A 和 B 做 MS、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 分析:

化合物 A: 白色固体; ESI-MS m/z 118.0873 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, D_2O) δ 3.236 (9H, s), 3.877 (2H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, D_2O): δ 171.827 (C=O), 68.907 (CH_2), 55.077 ($\text{CH}_3 \times 3$). 碳谱及氢谱数据与文献报道的甜菜碱数据一致^[4], 故确定结构为 1-羧基-*N,N,N*-三甲基乙内酯, 亦称甜菜碱, 结构如图 2 所示。

化合物 B: 白色晶体, mp 178°C; ESI-MS m/z : 164 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz) δ : 3.86-3.63 (3H, m, 2H-6; H-3), 3.52-3.36 (3H, m, H-2; H-4; H-1e), 3.09 (1H, dd, H-1a), 2.86 (1H, t, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 75MHz) δ : 76.2 (C-3), 67.7 (C-4), 66.9 (C-2), 59.9 (C-6), 57.7 (C-5), 45.8 (C-1)。以上数据与 DNJ 标准品及其文献值相符^[5], 确认该化合物为 DNJ, 结构如图 3 所示。

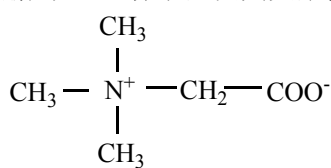


图 2

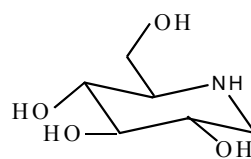


图 3

2 讨论

2.1 色谱柱的选择 蚕沙生物碱成分分子极性较大, 采用常规的反相 C18 色谱柱无法分析。为此选择了磺酸基柱, 效果较好, 且有合理的保留时间 (<15min)。

2.2 色谱条件的选择 实验探索得知当流动相为水-冰醋酸-三乙胺 (1000: 1: 1, V/V/V) 时, 分离效果较好且峰形对称, 但三乙胺的后处理困难, 难以得到纯净化合物, 因此改用有挥发性的氨水。对流动相 (水-冰醋酸-氨水) 配比进行考察, 发现配比为水-冰醋酸-氨水 (1000: 0.25: 0.25) 时保留时间、分离效果、重复性均较理想。

2.3 检测器的选择 对蚕沙生物碱成分进行紫外扫描, 发现紫外吸收很弱, 同时考虑实验室条件, 采用通用型检测器-蒸发光检测器 (ELSD)。

参考文献:

- [1] Bollen M, Vandebreck A, Stalmans W, *etal.* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(5): 905-909
- [2] Arai M, Minatoguchi S, Takemure G, *etal.* [J]. *Circulation*, 1998, 97(13): 1290-1297.
- [3] 周光雄, 阮杰武, 黄关燕等. [J]. *中药材*. 2007, 30 (11): 1384-1385
- [4] 刘新亚, 马龙, 堵年生等. [J]. *西北药学杂志*. 2004, 19 (2): 63-64
- [5] Asano N, Tomioka E, Kizu H, *etal.* [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 253: 235-245

Alkaloid Constituents from Silkworm Dropping by HPLC-ELSD

Qi Hui, Zhang Ye-yun, Liu Xin-lai, Zhao Hui, Wang Peng, Hua Tong, Zhu Yuan-yuan*

(College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300000, China)

Abstract: Objective: To extract and isolate chemical constituents from the total alkaloids of silkworm dropping (Can Sha). Methods: Chemical constituents were isolated by HPLC-ELSD, ion-exchange resin. The structures of the isolated compounds were determined by spectral means. Results: Two compounds were isolated and identified as Betaine (A), DNJ (B).

Key words: Silkworm dropping (Can Sha); Alkaloid; Betaine; DNJ; HPLC-ELSD.

液相色谱测定食品中的七种添加剂

张静¹, 于洁¹, 高秀谦¹, 寇登民²

(1.天津市北辰区产品质量监督检验所, 天津 300400 2.南开大学, 天津 300071)

建立了七种食品添加剂的液相色谱检测方法, 确立了分析测试条件, 确定了每种添加剂的检出限、线性相关系数、线性范围、添加回收率及精密度。

食品添加剂作为食品工业中不可或缺的重要辅料, 作为食品工业中不能缺少的重要部分, 食品安全问题越来越受到重视, 但影响人们健康问题的食品事件频发, 尤其是食品添加剂的违法超标超范围使用问题仍很突出, 因此对食品添加剂进行定性、定量检测便显得尤为重要。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (配紫外检测器): LC-10A, 岛津 (苏州) 仪器有限公司

电子分析天平: FA2004, 上海精科天平厂

酸度计: PHS-3C, 上海精密科学仪器有限公司

超声波: HS3120, 天津恒奥科技有限公司

组织捣碎匀浆机: A-88, 江苏省金坛市医疗仪器厂

苯甲酸、山梨酸、糖精钠、柠檬黄、日落黄、胭脂红、苋菜红标准物质均购于国家标准物质中心; 甲醇 (色谱纯)、乙酸铵 (分析纯)、溴化四丁胺 (分析纯)、氨水 (分析纯)、乙酸 (分析纯)

1.2 分析条件

色谱柱: Luna C18(2), 5 μ m, 250 \times 4.6mm, 广州菲罗门科学仪器有限公司

流动相: 甲醇: 乙酸铵: 溴化四丁胺=35: 65: 4; 流速: 1ml/min

检测波长: 230nm

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样体积: 10 μ l

1.3 样品处理

液体样品: 准确吸取摇匀后的样品 10ml, 用氨水或乙酸调 PH 值为 6, 用 PH 值为 6 的水定容至 100ml (必要时进行离心分离), 经 0.45 μ m 水膜过滤, 滤液备用。

固体样品: 取一定量混合均匀后的样品在组织捣碎匀浆机中捣碎, 准确称取捣碎后的样品 5g (精确至 0.1mg), 用 PH 值为 6 的水定容至 100ml, 超声提取 5min, 经 0.45 μ m 水膜过滤, 滤液备用。

1.4 标准溶液配制

七种添加剂分别准确称取 0.1000g 标准品, 分别定容于 100ml 容量瓶中 (山梨酸用 20g/L 碳酸氢钠溶液 5ml 加热溶解), 加水定容至刻度, 配成 1mg/ml 的标准储备液。分别吸取各标准储备液 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 于 100ml 容量瓶中, 加水定容至刻度, 制成浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05mg/ml 系列混合标准溶液。

2 结果与讨论

2.1 工作曲线的绘制、线性范围和检出限

本方法采用外标法进行定量, 在选定色谱条件下, 将 1.4 中配制的标准系列标准溶液分别进样 10 μ l 于液相色谱仪中, 以浓度 (mg/ml) 为横坐标, 以其相应的峰面积 (μ V \cdot s)

为纵坐标，作标准工作曲线。七种添加剂谱图如图1。

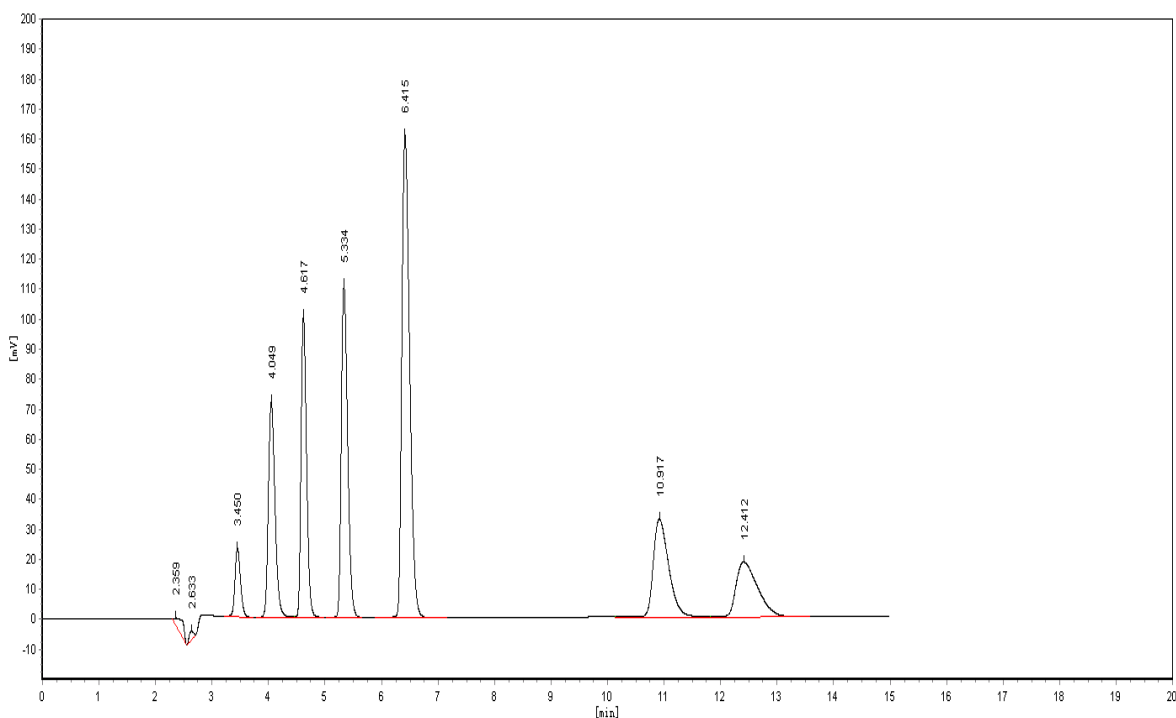


图1 七种添加剂分离色谱图

表1 各标准物质的保留时间、检出限及线性相关系数

序号	标准物质名称	保留时间 (min)	检出限(mg/ml)	线性相关系数
1	柠檬黄	3.450	0.00002	0.99967
2	苋菜红	4.049	0.00001	0.99984
3	糖精钠	4.617	0.000008	0.99984
4	苯甲酸	5.334	0.000009	0.99983
5	山梨酸	6.415	0.000006	0.99976
6	日落黄	10.917	0.00003	0.99989
7	胭脂红	12.412	0.00005	0.99613

注：检出限为信噪比即 S:N=3:1 时的检出限

2.2 回收率及精确度的测定

检测方法的一项重要指标就是添加回收率和精密度。添加回收率的计算方法有多种，本文采用的计算方法是，以添加量作为分母，以添加后检测到的量减去空白样品检测到的量为分子。其计算公式如下： $R = (Da - Db) / Ca$

R-添加回收率

Da-添加标样后所检测到的添加剂的量

Db-样品本底检测到的添加剂的量

Ca-添加标样的量

表2 样品添加回收率及精确度

序号	标准物质名称	回收率 (%)					平均回收率 (%)	精密度 (%)
		1	2	3	4	5		
1	柠檬黄	82.39	79.58	84.62	85.16	82.47	82.84	2.67
2	苋菜红	89.56	87.43	88.02	84.15	83.39	86.51	3.04
3	糖精钠	85.23	80.36	86.12	85.93	82.09	83.95	3.07
4	苯甲酸	98.23	95.78	98.69	99.02	101.09	98.56	1.93
5	山梨酸	90.36	89.72	96.73	92.68	98.37	93.57	4.10
6	日落黄	73.25	79.81	74.60	79.58	75.94	76.64	3.85
7	胭脂红	76.87	76.28	70.31	74.72	72.98	74.23	3.59

2.3 实际样品的检测

我们选用实验室已有的样品进行实际检测，主要选择食醋、话梅、火腿肠、桃汁饮料、玉米糖（凝胶糖果）五种样品进行了检测，每种样品准确称取混合均匀的样品 5g，样品处理方法参照 1.3。

表3 实际样品的检测结果（按本课题实验方法检测）

样品名	柠檬黄	苋菜红	糖精钠	苯甲酸	山梨酸	日落黄	胭脂红
食醋	未检出	未检出	未检出	0.45	未检出	未检出	未检出
话梅	未检出	未检出	0.016	未检出	未检出	未检出	未检出
火腿肠	未检出	未检出	未检出	0.14	未检出	未检出	未检出
桃汁饮料	未检出	未检出	未检出	未检出	0.010	未检出	未检出
玉米糖	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	0.040	未检出

3 结论

本实验利用高效液相色谱仪测定了食品中添加剂，主要包括柠檬黄、苋菜红、日落黄、胭脂红、糖精钠、苯甲酸、山梨酸等七种食品添加剂。通过实验，确立了本课题的分析测试条件；确定了每种添加剂的检出限、线性相关系数、线性范围、添加回收率及精密度。

本项目检测方法较国家标准方法，在检测时间上节省了 60% 以上，有机溶剂的使用量也节省了大约 60%。因此，这种检测方法不但提高了检测效率，节省检测费用；另一方面，有机溶剂的减少使用，减低了废液处理的压力和费用，对改善环境、保护环境也将有一定的促进作用。

应用可逆加成-链转移聚合法合成四环素分子印迹聚合物微球及表征

韩建坊¹, 董襄朝²

(1. 西安电子科技大学理学院, 西安 710071; 2. 南开大学化学学院, 天津 300071)

1 引言

四环素类(tetracyclines, TCs)为广谱抗菌药^[1],在促进畜禽生长、疾病防治等方面有着重要作用,因此被广泛用于预防和治疗畜禽疾病。由于该类药物的使用不合理及滥用容易导致在食品中存在四环素类药物的残留,人类长期摄入含四环素类抗生素残留的食品后,会对健康构成潜在危害,对于其在食品中的残留进行检测及控制非常必要。

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)^[2]是指制备对某一特定的目标分子(也称模板分子或印迹分子)具有特异预定选择性的高分子化合物—分子印迹聚合物,在复杂体系固相分离提取中显示了巨大的优越性。

可逆加成-链转移(reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT)聚合法^[3]是一种活性/可控自由基聚合法。应用这种方法可以对于聚合产物的分子量、分子量分布、序列结构进行很好的控制,另外,聚合链具有活性末端,在补加同种或异种单体时还能进一步反应,因而能够制备嵌段、接枝、星形或超枝化聚合物。将RAFT聚合法应用于分子印迹微球的制备,有利于提高粒径均匀性,也有利于微球表面的进一步修饰。

本实验用RAFT方法合成了以四环素为模板分子的分子印迹聚合物微球,并对其吸附性及选择性进行了研究。

2 实验部分

链转移试剂二硫代苯甲酸苯乙基酯(Cumyl dithiobenzoate, CDB)的合成^[4]:先用格氏试剂与二硫化碳在四氢呋喃中反应,产物酸化后制得双硫代羧酸;用合成的双硫代羧酸与 α -甲基苯乙烯在四氯化碳中反应,产物经多次提纯后制得链转移试剂CDB。

四环素分子印迹聚合物微球合成:称取0.2 mmol的四环素溶于一定体积乙腈中,定量加入功能单体甲基丙烯酸(methacrylic acid, MAA)超声震荡5 min,定量加入交联剂甲基丙烯酸乙二醇酯(ethylene dimethacrylate, EDMA)、引发剂AIBN和链转移剂CDB。氮气除氧后接在旋转蒸发仪上,转速20 rpm,60℃下聚合24 h。用乙酸/甲醇溶液索式提取除去模板分子,再用甲醇提取后真空干燥,得到TC-MIP。非印迹聚合物(non-imprinted polymer, NIP)以相同的条件(除了不加模板分子)下合成。

分别将TC-MIP和NIP以干法填入液相色谱柱(100×4.6 mm)中,进行色谱测定。流动相:甲醇;流速:1.0 mL/min;检测波长:350 nm。以丙酮测定死时间,分别测定四环素、土霉素、金霉素、强力霉素的保留因子。

3 结果与讨论

四环素类药物的结构见图1。

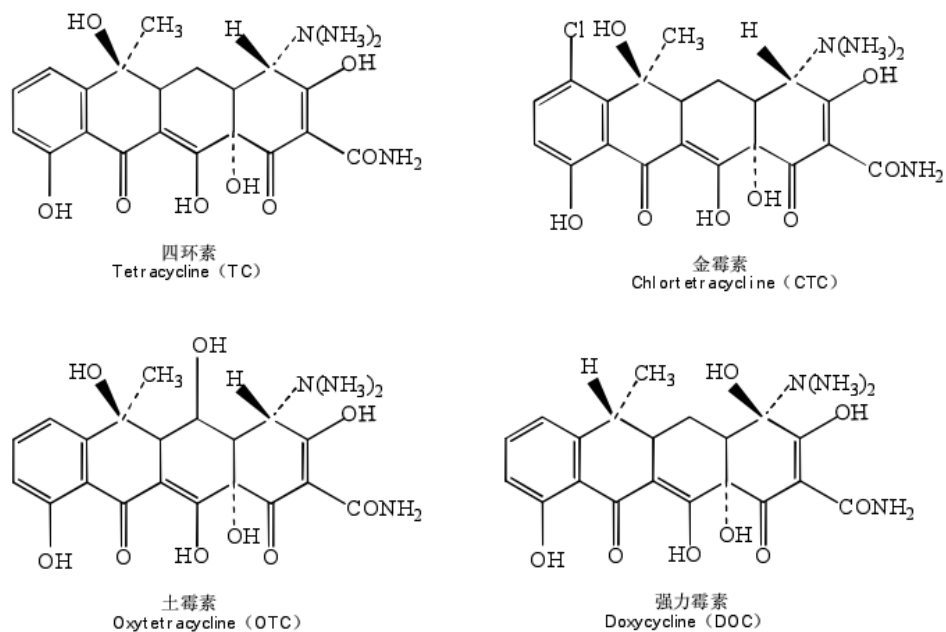


图1 四环素及其类似物结构

用色谱法测得的保留因子和印迹因子 (IF) 列于表 1。

表 1. 印迹聚合物和非印迹聚合物对四环素及其类似物的结合能力比较

化合物	保留因子 (k')		IF (k'_{TC-MIP} / k'_{NIP})
	TC-MIP	NIP	
四环素	16.4	3.7	4.5
土霉素	9.6	8.1	1.2
强力霉素	21.9	13.9	1.6
金霉素	18.8	9.4	2.0

从表中可以看出, 相对于非印迹聚合物 (NIP), 印迹聚合物 (TC-MIP) 对四环素类药物保留较强, 模板分子的印迹因子最大, 说明印迹聚合物有明显印迹效果。另外, 在 TC-MIP 和 NIP 上, 强力霉素和金霉素的保留都强于四环素, 而土霉素的保留较弱, 这种趋势相同的现象说明非特异性结合在印迹聚合物中也有一定作用, 而非特异性结合的强弱和药物结构及其与 poly(MAA-EDMA) 骨架作用力有关。

参考文献:

- [1] 仇文升, 李安良. 《药物化学(三)》[M]. 高等教育出版社. 1999, pp191-195
- [2] Mosbach K, Mayes A G. 213th ACS National Meeting & Exposition Programme. 1997, pp48-61
- [3] Farmer S C, Patten T E. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem., 2000(40): 555-563
- [4] Le T P, Moad G, Rizzardo E. PCT Int Appl[p]. WO: 9801478 A1, 1998, pp01-15

快速亲和毛细管电泳法测定普罗帕酮 和牛血清白蛋白之结合常数

张勃, 包建民*

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

亲和毛细管电泳法(Affinity Capillary Electrophoresis, ACE)^[1-3]是研究蛋白质和药物结合的一种常用模式。它主要包括两种研究方法^[4]:一种称为“L_R”法,是以蛋白为缓冲液添加剂,以药物为进样样品,测定药物在含有不同浓度蛋白的缓冲液中的迁移时间变化;另一种称为“R_L”法,是以药物为缓冲液添加剂,以蛋白为进样样品,测定蛋白在含有不同浓度药物的缓冲液中的迁移时间变化。

迁移时间的变化是判断药物与蛋白是否发生结合作用,以及计算结合常数的依据。但是迁移时间往往受到毛细管使用的时间、内表面的化学性质、使用前的预处理、毛细管柱温等因素的影响^[5],每次测定都可能有较大差异。Williams和Vigh^[6]提出的快速测定淌度法可以减少这些影响,它可以准确、快速地测定电渗淌度和样品的电泳淌度。目前该法广泛用于涂层毛细管电泳^[7]、非水毛细管电泳^[8]的电渗流测定、pK_a值^[9]测定等。在此,我们把这种快速测定淌度法应用到ACE中来,并以抗心律失常药普罗帕酮和牛血清白蛋白(BSA)为研究对象,分别采用“L_R”和“R_L”法,研究药物(蛋白)在含有不同浓度蛋白(药物)中电泳淌度的变化,从而计算出二者的结合常数。再通过与传统紫外分光光度法的测定结果作对比,得出此法的准确度和可靠性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE 2050型毛细管电泳仪(美国Beckman公司),配置紫外检测器,P/ACE Station数据采集工作站,未涂层熔融石英毛细管柱(内径75 μm,外径360 μm,河北永年锐洋色谱器件有限公司),紫外分光光度计(天津市普瑞斯仪器有限公司);

BSA(长沙欧迈生物科技有限公司),普罗帕酮(常州制药厂有限公司)、*N,N*-二甲基甲酰胺,磷酸盐、氢氧化钠等化学药品均为分析纯,去离子水。

1.2 毛细管电泳条件和实验方法

毛细管柱总长27 cm,有效长度20 cm,电泳缓冲液为20 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4),紫外检测波长为214 nm,采用气压进样方式。

测定电泳淌度时以“L_R”法为例,以含不同浓度蛋白的缓冲液作为运行缓冲液,先进样含DMF的药物样品3 s,气压推15 s,加8 KV电压运行一段时间,最后再进样0.1% DMF 3 s,进完样直接气压推出。每个缓冲液条件下平行测定三次。每次进样之前用0.1 M NaOH和缓冲液冲洗毛细管各2 min。

2 结果与讨论

2.1 快速测定淌度法的重现性

我们对快速测定淌度法和传统计算淌度的方法,新方法测定的电渗淌度相对标准偏差(RSD%=0.46, n=4)明显优于传统方法(RSD%=1.17, n=4)。普罗帕酮(RSD%=1.06, n=4)和BSA(RSD%=1.25, n=4)的电泳淌度值也有较高的重现性。

基金项目:天津市科技发展计划项目(08CZKFSH00500)

通讯作者:包建民, E-mail: jbao007@gmail.com

2.2 快速测定淌度法测定普罗帕酮和BSA结合常数

(1) “L_R”法

普罗帕酮是一种弱碱性药物，在 pH 7.4 缓冲液体系中带正电。因此，在正电场中电泳速度最快，第一个出峰。第二和第三个峰均是 DMF。当缓冲液中加入 BSA 后，随着 BSA 浓度的增加，缓冲液粘度增加，样品出峰时间推后。由于药物本身与结合物的电泳淌度不一样，造成普罗帕酮峰形变矮，展宽。根据每组三个峰的出现时间，计算出待测样品的电泳淌度，由 Scatchard 方程，计算得到待测物质的电泳淌度。药物和蛋白质的结合曲线 $y = -1.041x - 1475$ ，根据所得直线的截距和斜率，即可求出普罗帕酮与 BSA 的结合常数 K_b 为 1.41×10^3 。

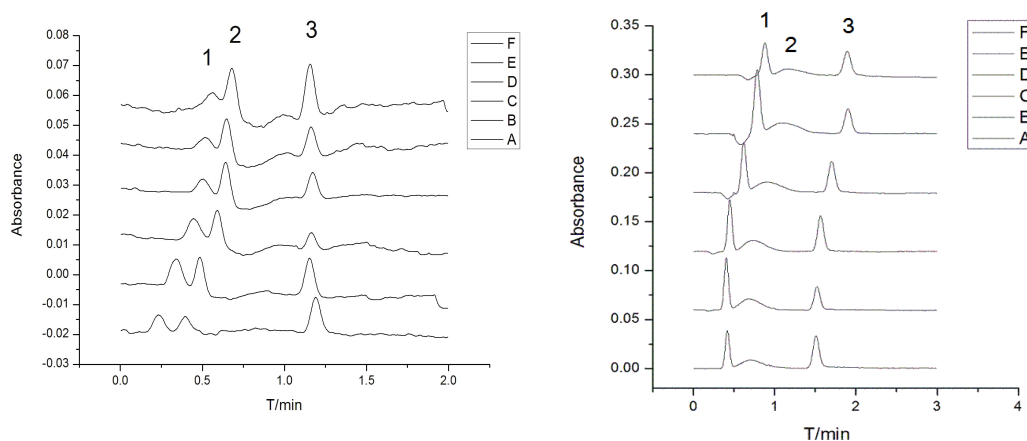


图1 普罗帕酮和 BSA 结合图，左图“L_R”法，图中三个峰 1. 普罗帕酮，2. 3. DMF；右图“R_L”法，图中 3 个峰分别为 1. 3. DMF，2. BSA。

(2) “R_L”法

类似的，“R_L”法中以 BSA 和 DMF 为样品，也出现三个峰。由于 BSA 在该缓冲液条件下带负电，因此出峰位于两个 DMF 峰之间。随着缓冲液中普罗帕酮浓度增加，电渗流减小，出峰时间延长。但是 BSA 受到缓冲液中普罗帕酮作用，出峰时间相对提前，与峰一距离缩短。由于和结合物淌度的差异，BSA 峰高变低，峰变宽。由 Scatchard 方程，得到药物和蛋白质的结合曲线 $y = -4.212x - 4811$ ，普罗帕酮与 BSA 的结合常数 K_b 为 1.14×10^3 。

2.3 紫外光谱法测定普罗帕酮和BSA的结合常数

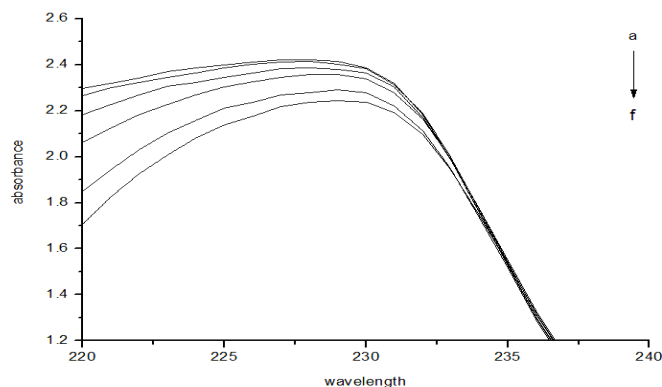


图2 普罗帕酮和 BSA 结合的紫外光谱图，样品为 BSA 与不同浓度的普罗帕酮的混合溶液，从 a 到 f 普罗帕酮浓度依次为 34.99, 55.98, 93.3, 139.95, 186.6 和 233.25 μM 。

为了验证新方法的测试结果,我们同时采用紫外分光光度法考察了药物对 BSA 主要特征吸收带 228 nm 处吸收峰的影响,并测定了普罗帕酮与 BSA 的结合常数。当固定 BSA 浓度时,加入一系列不同浓度的普罗帕酮溶液,37℃条件下孵育半小时。BSA 在 228 nm 处的吸收峰随着药物浓度的增加,体系的吸收光谱呈现明显的减色效应。普罗帕酮和 BSA 的结合常数为 1.075×10^3 ,与亲和毛细管电泳法测定的结合常数非常吻合,充分验证了新方法。

3 结论

快速测定淌度法消除了毛细管内温度不均一,以及电渗流变化对淌度测定的影响,可以准确的、精确的测定电渗流和阳离子、阴离子的有效电泳淌度。与常规方法相比,大大缩短了测定时间^[6]。将快速测定淌度法应用在亲和毛细管电泳中,不仅能够准确测定出含有不同添加剂浓度的缓冲液中样品的电泳淌度,分析时间也大大缩短。通过对比亲和毛细管电泳的两种方法(“L_R”法和“R_L”法),以及传统测定结合常数的紫外光谱法,三种方法下测定的普罗帕酮和牛血清白蛋白结合常数非常接近,充分验证了新方法的可行性和准确性。准确的实验结果、快速的分析过程,使得快速测定淌度法能够成为测定蛋白结合的有效工具。

参考文献:

- [1] Gomez FA, Chen JK, Tanaka A, Schreiber SL, Whitesides GM. [J]. J Org Chem, 1994, 59(10): 2885-2886
- [2] Avila LZ, Chu Y, Whitesides GM. [J]. J Med Chem, 1993, 36(1): 126-133
- [3] Chu Y, Avila LZ, Biebuyck HA, Whitesides GM. [J]. J Med Chem, 1992, 35(15): 2915-2917
- [4] Chu YH, Avila LZ, Biebuyck HA. [J]. J Med Chem, 1992, 35: 2915-2917
- [5] Xie Y, Lin M, Zhang ZX, An DK. [J]. Progress of China Pharmaceutical Sciences, 1999, 23(5): 261-264
- [6] Williams BA, Vigh G. [J]. Fast Anal Chem, 1996, 68: 1174-1180
- [7] Doherty E, Meagher RJ, Albarghouthi MN, Barron AE. [J]. Electrophoresis, 2003, 24(1-2): 34-54
- [8] Porras SP, Riekkola ML, Kenndler E. [J]. Journal of chromatography A, 2001, 905(1-2): 259-268
- [9] Cantu MD, Hillebrand S, Carrilho E. [J]. Journal of chromatography A, 2005, 1068: 99-105

A Fast Means of Determining the Protein Binding Constant by Affinity Capillary Electrophoresis

ZHANG Bo, BAO James J.*

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The fast means of mobility determination has been applied to affinity capillary electrophoresis (ACE) and used to determine protein-drug binding constant. Based on the principle of ACE, the binding constant between propafenone and bovine serum albumin (BSA) was determined by using a fast and accurate mobility determination method. The constants were 1.41×10^3 and 1.14×10^3 in the cases of “L_R” and “R_L”, respectively. By using the traditional ultraviolet absorption method as a comparison (1.08×10^3), the feasibility and accuracy of this method is verified. It has resolved the inaccuracy problem in traditional ACE methods, in which the electrophoretic mobility was calculated by measuring the migration time directly.

Key words: Affinity capillary electrophoresis; Fast and accurate mobility determination method; Binding constant; Propafenone; Bovine serum albumin.

无机-有机聚合物整体柱的制备及其在蛋白分离方面的应用

杨更亮^{1, 2}, 程佳^{1, 2}, 白立改^{1, 2}

(1. 河北省药物质量研究与控制重点实验室, 河北, 保定 071002; 2. 河北大学药学院, 河北, 保定 071002)

色谱分析是目前最为活跃的分析化学分支学科之一, 无论从技术到理论, 到各种分离模式, 还是在各个科学领域内的应用都得到了突飞猛进的进展。高效液相色谱作为一种有效的分离手段, 在生物技术产品的制备中发挥着十分重要的作用。在整个高校液相色谱分析体系中, 色谱柱是整个色谱系统的核心。而聚合物整体柱制备方法简单, 具有高机械强度, 高渗透性, 可以对生物大分子进行快速、高效、高通量分离分析, 作为一种新型分离介质, 正朝着品种多样化、性能高效化的方向发展。在本研究中, 一个基于原子转移自由基聚合^[1-2]的新的无机-有机聚合物整体柱被成功研制, 并且成功用于蛋清中卵白蛋白的分离。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统(美国 Agilent 1100): UV-1100 紫外可变波长检测器, 真空在线脱气机, 四元泵, 进样器; Agilent 化学工作站; SZ-97 自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂); HH-601 超级恒温水浴(江苏荣华仪器制造有限公司)。FTIR-8400S 红外光谱仪(SHIMADZU)。

甲基丙烯酸缩水甘油酯, 乙二醇二甲基丙烯酸酯, 十二醇、甲醇、氯化亚铁、四氯化碳(天津市科密欧化学试剂有限公司); 所有试剂均为分析纯, 实验中所用水均为三次蒸馏水。所有溶液及流动相进入色谱系统前均经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.2 聚合物整体柱的制备

将甲基丙烯酸缩水甘油酯、乙二醇二甲基丙烯酸酯、四氯化碳、十二醇、氯化亚铁按一定比例加入试管中, 超声 30 分钟使之混匀, 装入不锈钢空色谱柱管, 两端密封, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 的超级恒温水浴中加热 24 h。反应结束后除去密封端, 连接上柱头将其接于高效液相色谱泵上, 用甲醇将致孔剂和未反应的试剂冲出即得到无机-有机复合物整体柱。

1.3 样品的制备

1.3.1 标准品的制备

精密称取 1.0 mg 卵白蛋白, 用超纯水溶解使标准品浓度达到 1.0mg/ml。

1.3.2 实际样品的制备

选用从超市购买的新鲜鸡蛋, 从中得到鸡卵清。将鸡蛋清用磷酸缓冲液以1:4的体积比稀释, 然后超声波处理, 并不断加入氯化钠至其浓度达到0.5 mol/L。最后将该溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以10000 rpm离心30 min, 上清液冷藏保存备用。

1.4 整体柱的柱效

色谱介质的柱效和柱体均匀性可以用理论塔板高度(HETP)来评价。实验分别选用 BSA(2 mg/mL)作为探针分子, 10 mM Tris-HCl, pH=7.6 的缓冲液作为流动相, 将色谱柱平衡后, 用 20 μL 的进样器进样。利用探针分子在非保留条件下进样, 通过积分法计算得到 HETP 值。

理论塔板高度(HETP)计算公式^[3]:

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20375010, 20675084)

作者简介: 杨更亮(1963), 男, 河北人, 教授, 博士生导师, tel: 0312-5971108; email: ygl@hbu.edu.cn

$$HETP = \frac{L \times \sigma^2}{\mu_1} \quad (1)$$

其中, HETP--色谱柱的板高(mm); L--色谱柱长(mm); σ^2 --二阶中心矩; μ_1 --一阶原点矩。

$$\sigma^2 = \frac{\int t^2 c(t) dt}{\int c(t) dt} \quad (2)$$

$$\mu_1 = \frac{\int t c(t) dt}{\int c(t) dt} \quad (3)$$

其中, t--时间(s); c(t)--色谱柱出口端洗脱液浓度(mg/mL)。

1.5 色谱条件的确定

通过实验来确定分离卵白蛋白的富集流动相与洗脱流动相, 然后通过改变洗脱流动相的浓度及酸碱度来优化色谱条件。

2 结果

2.1 聚合物整体柱制备条件的优化

以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 十二醇为制孔剂, 甲醇为溶剂, 通过自由基聚合制备整体柱。控制合适的聚合条件, 如交联剂及致孔剂的比例、致孔剂的组成、引发剂及催化剂的量等, 可以得到较理想的孔径。

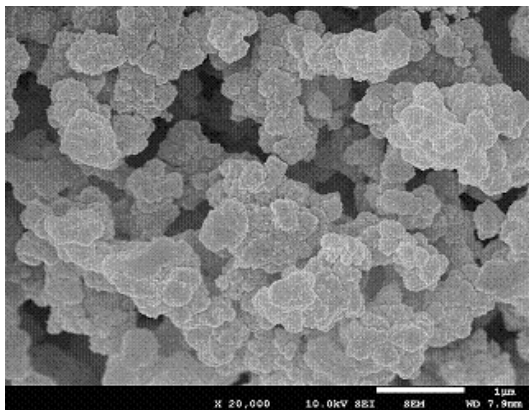


图1 无机-有机聚合物整体柱的扫描电镜图

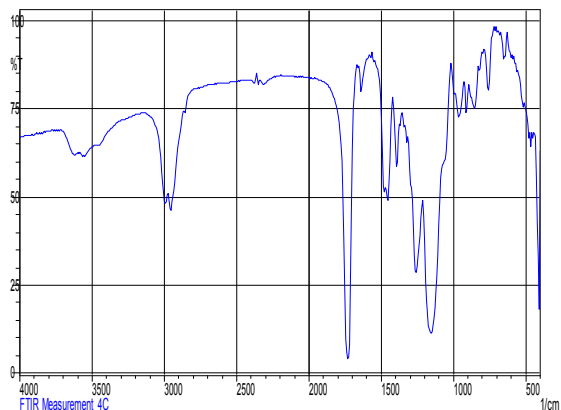


图2 无机-有机聚合物整体柱的红外扫描图

2.2 样品分离的色谱图

用所制备的聚合物整体柱 (50×4.6mm i.d.), 在检测波长: 280nm; 流速: 1.0mL/min, 的条件对标准进行分析, 所得色谱图如图 3:

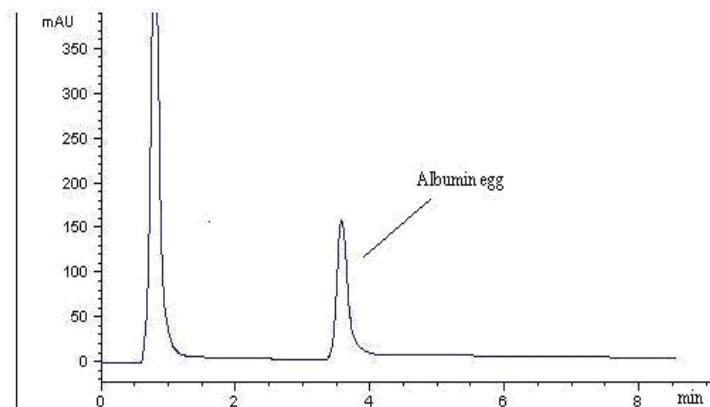


图 3 标准品的色谱图

3 讨论

该无机-有机聚合物整体柱的制备利用了原子转移自由基聚合的原理, 并首次采用四氯化碳与氯化亚铁为联合引发剂, 改善了传统的原位自由基聚合的链转移链终止所导致的分子量分布范围宽、聚合物不均匀等缺点, 所得柱体结构均匀, 机械强度良好, 经浸泡与高温干燥后柱体没有膨胀与收缩现象, 且该聚合物整体可对蛋白进行快速高效的分离分析。有一定的继续研究与应用价值。

参考文献:

- [1] F. Svec, J. Chromatography A, 1217 (2010) 902
- [2] L. F. Zhang, Z. P. Cheng, S. P. Shi, Q. H. Li, X. L. Zhu, Polymer 49, (2008) 3054
- [3] K. F. Du, D. Yang, Y. Sun, J. Chromatography A, 1163 (2007) 212.

Preparation of a novel organic-inorganic hybrid monolithic column and application in the separating of proteins

Yang Geng-Liang^{1,2}, Cheng Jia^{1,2}, Bai Li-Gai^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China

2. Hebei Province Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control, Baoding 071002, China)

Abstract: As one effective separation method, the high performance liquid chromatography is playing the very vital role in the preparation of biological product. In the entire analysis system of HPLC, the chromatographic column is the core of the system. The preparation method of polymeric monolithic column is simple, and it has the characteristic of high mechanical strength, high permeability and fast separation of biological macromolecules. As a new separation medium, the developing direction of the polymeric monolithic is variety diversification and performance highly effective. In this study, a novel organic-inorganic rod-shape hydrophobic interaction monolithic column has been prepared by atom transfer radical polymerization. Meanwhile, Albumin egg was separated from egg white by the organic-inorganic monolithic column.

Keywords: organic-inorganic; ATRP; monolithic column; HPLC; separation protein

柱前衍生 RP-HPLC 法检测血浆中 ADMA 浓度的研究及临床应用

董茜, 张和顺

(天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

建立一种反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 检测血浆中不对称二甲基精氨酸的浓度。采用 Kromail C18 ($5\ \mu\text{m}$, $250\text{mm}\times 4.6\text{mm}$), 流动相 A 液为 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.5, 含 11% 的乙腈), B 液为 50% 的乙腈的柱子, 邻苯二甲醛柱前衍生, 柱温 40°C , 流速 $1\ \text{ml/min}$ 。荧光检测波长为 EX 340nm, EM 455nm。研究结果显示 ADMA 在 $0.1\sim 8\ \mu\text{mol/L}$ 范围内有良好的线性关系, 高中低浓度平均回收率均大于 90%, 日内、日间 RSD 小于 6%。本方法准确、灵敏, 适用于血浆及其他生物样本中 ADMA 浓度的检测。

不对称性二甲基精氨酸 (asymmetric dimethylarginine, ADMA) 在体内的生理作用是通过抑制内源性一氧化氮合酶 (NOS) 的活性, 阻止内皮细胞一氧化氮 (NO) 的合成, 导致血管内皮功能降低。血浆 ADMA 浓度的变化与血管内皮功能损害、动脉粥样硬化、脑梗死、高血压、高脂蛋白异常、糖尿病、肾功能衰竭等血管性病变的严重程度密切相关, 是目前临床研究的重点课题之一, 倍受重视。检测血浆中 ADMA, 多采用邻苯二甲醛 (OPA) 柱前衍生的高效液相色谱法, LC-MS 和 ELISA 等方法^[1,2]。LC-MS 法成本过高不适用于临床广泛使用, 而 ELISA 法灵敏度过低, 因此我们选用了 OPA 柱前衍生 HPLC 法, 并改进原有色谱条件, 建立了一种操作简便、灵敏度高、重复性好的检测人血浆中 ADMA 浓度的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters-600E 型高效液相色谱仪 (Waters 公司, 美国), CTO-2A 柱温箱, RF-10Ax1 荧光检测器 (岛津公司, 日本), Anastar 色谱工作站, AL104 电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器公司) 等。

1.2 试剂

ADMA 标准品、OPA 衍生试剂购自 Avocado 公司; 阳离子交换树脂 (CT-20, $75\ \mu\text{m}$) 购自天津南开大学化工厂; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 硼砂、硼酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化铵等均为分析纯, 购自天津市化学试剂公司; Milli-Q50 制无离子水。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 ADMA 标准液的配制: 称取 ADMA 10mg 用 10mmol/L HCl 定容至 10ml, 置棕色瓶 -20°C 保存作为贮备液。吸取 ADMA 贮液 $25\ \mu\text{l}$, 用水定容至 10ml, 置棕色瓶 4°C 保存作为工作液。

2.1.2 衍生试剂的配制:

称取 $10\ \text{mg}$ 邻苯二甲醛至棕色容量瓶中, 加入甲醇 $0.2\ \text{mL}$ 使其溶解, 依次加入硼酸缓冲液 $1.8\ \text{mL}$ ($200\ \text{mmol/L}$, pH=8.5) 和 3-巯基丙酸 $10\ \mu\text{l}$, 混合摇匀, 置 4°C 下作为贮备

液可保存 48 h。将贮备液稀释 5 倍作为衍生工作液，现配先用。

2.2 色谱分析条件

色谱分析柱：Kromail C18 (5 μ m, 250mm \times 4.6mm)。流动相 A 液为 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.5, 含 11%的乙腈)，B 液为 50%的乙腈；分析流程：0~25min 为 100%A, 25~27min 为 50%B, 27min 之后再改为 100%A。柱温 40 $^{\circ}$ C。流速 1 ml/min。荧光检测波长：EX 340nm, EM 455nm。

2.3 样品预处理

抽取空腹 12 h 静脉血 (1ml) 置肝素抗凝管，混匀后立即于 3000 r/min，离心 10min, 吸取上清置 -70 $^{\circ}$ C 保存待测。取血浆样品 200 μ l, 加入磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH8.5) 800 μ l, 漩涡混匀后，过阳离子交换树脂富集柱 (CT-20, 75 μ m, 100mg)，依次用磷酸缓冲液 1ml、0.1mmol/L HCl 1ml、甲醇 1ml 冲洗富集柱并弃掉洗脱液，最后用氢氧化铵/水/甲醇 (10/40/50) 混合液 3ml 冲洗富集柱，并收集此洗脱液置 40 $^{\circ}$ C 水浴下 N₂ 吹干，得到样品残渣。

2.4 样品柱前衍生

将上述残渣用 0.1ml 无离子溶解，加入 0.1ml OPA 衍生试剂工作液，混匀后置 50 $^{\circ}$ C 水浴放置 5min，过 0.45 μ m 滤膜后立即取 20 μ l 进行色谱分析。HPLC 色谱图见图 1，ADMA 均得到完全的基线分离。

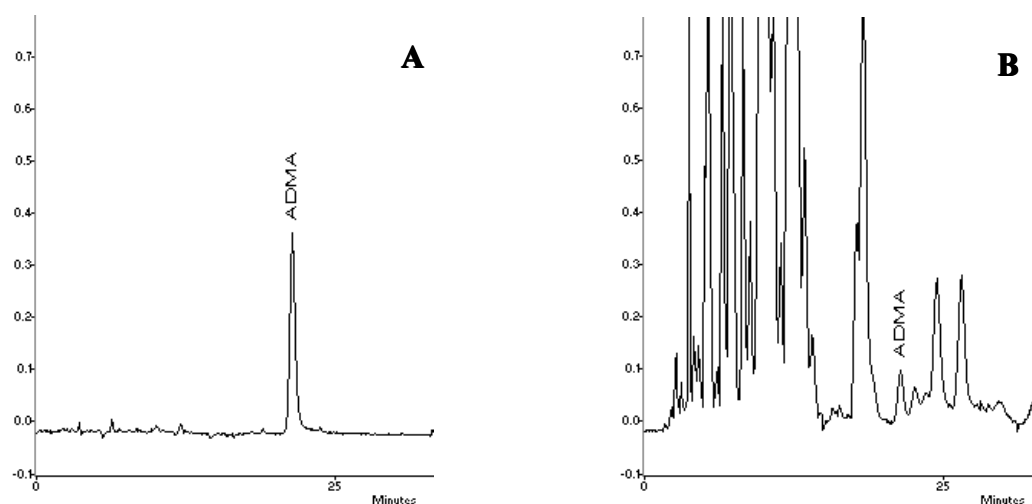


图 1 ADMA 的 HPLC 分离谱图

A、ADMA 标准物色谱分离谱图 B、人血浆样品色谱分离谱图

2.5 标准曲线的制备

用经肝素抗凝的血浆内加 ADMA 标准液，配成终浓度依次为 0.1 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.5 μ mol/L、1.0 μ mol/L、2.0 μ mol/L、4.0 μ mol/L、8.0 μ mol/L 的血浆标准品溶液。按照上述样品预处理和衍生的方法处理，进行色谱分析。结果以峰面积对 ADMA 浓度作线性回归，所得标准曲线方程为 $A = 204457.17 C - 47842.98$, $r = 0.997$, 表明 ADMA 浓度在 0.1~8 μ mol/L 范围内有良好的线性关系。ADMA 的最低检测浓度为 0.01 μ mol/L。

2.6 回收率实验

正常人血浆中分别加入已知不同浓度的 ADMA 标准液，按

回收率 (%) = ((血浆样品 + 标准) - 血浆样品) / 标准 \times 100% 计算回收率，结果见表 1。

表1 ADMA 的回收率实验结果

加入 ADMA 浓度 ($\mu\text{ mol/L}$)	测定 ADMA 浓度 ($\mu\text{ mol/L}$, $\bar{x} \pm S$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0	0.46 \pm 0.03	-	
2	2.32 \pm 0.15	93	92.83
4	4.08 \pm 0.09	90.5	
8	8.06 \pm 0.12	95	

2.7 精密度实验

取同一血浆样品加入 ADMA 标准溶液配成浓度为 2、4、8 $\mu\text{ mol/L}$ 的血浆标准溶液，一天内重复测定 6 次和分别在不同的 6 天检测，计算日内、日间差异。见表 2。

表2 ADMA 的精密度实验结果

加入 ADMA 浓度 ($\mu\text{ mol/L}$)	日内		日间	
	测定 ADMA 浓度 ($\mu\text{ mol/L}$, $\bar{x} \pm S$)	RSD (%)	测定 ADMA 浓度 ($\mu\text{ mol/L}$, $\bar{x} \pm S$)	RSD (%)
2	2.25 \pm 0.05	2.24	2.27 \pm 0.12	5.29
4	4.06 \pm 0.10	2.36	4.09 \pm 0.09	2.2
8	8.02 \pm 0.12	1.5	8.05 \pm 0.15	1.86

2.8 样品含量测定

利用“2.2、2.3、2.4”中的方法对收集的样本进行检测，健康人的血液标本 30 例（年龄 22~56 岁），ADMA 的浓度为 0.43 \pm 0.08 $\mu\text{ mol/L}$ ；高血压患者 42 例，ADMA 浓度为 0.72 \pm 0.16 $\mu\text{ mol/L}$ ；肾衰竭患者 35 例，ADMA 浓度为 1.14 \pm 0.22 $\mu\text{ mol/L}$ 。利用此种富集和衍生的方法，我们还检测了腹透病人的腹透液 15 例，ADMA 浓度为 0.54 \pm 0.12 $\mu\text{ mol/L}$ 。

3 讨论

3.1 衍生试剂的选择

以 3-巯基丙酸代替 β -巯基乙醇与 OPA 反应能生成稳定的衍生剂^[3,4,5]。OPA 与 3-巯基丙酸配置的衍生试剂贮备液可连续使用 48h，衍生试剂工作液在 12 小时内 OPA 的浓度下降约 10%，衍生试剂工作液必须现配现用。将 ADMA 标准品按照分析步骤进行衍生后，分别置室温、30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 5min 后进行检测。为保证衍生化反应的完全和稳定选择 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 5min 作为最终衍生条件。见图 2。

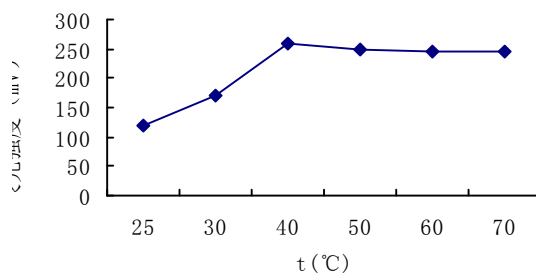


图2 温度对衍生化反应程度的影响

3.2 流动相的选择

流动相 A 液采用 50mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.5, 含 11%的乙腈), 我们曾试用含乙腈 8.7%、10%、12%的比例^[3,4], 但 8.7%和 10 比例%时 ADMA 出峰晚于 30min, 而 12%时 ADMA 出峰与杂质峰过于紧凑。由此最终确定乙腈含量为 11%, 使 ADMA 得到完全的基线分离, 合适的保留时间并能够准确地定性、定量分析。

3.3 样品预处理的改进

我们曾试用血浆样品经磺基水杨酸直接除蛋白后^[6], 离心取上清进行衍生, 但经 HPLC 分析后, 色谱图中 ADMA 组分与杂质峰重叠无法完全分离, 因而难以准确定性、定量分析。可能是由于血浆样品中 ADMA 微量和血浆内源性物质干扰所致, 因此我们选用阳离子交换树脂富集柱来预处理样品, 以排除血浆中内源性物质的干扰, ADMA 可得到完全基线分离, 定性、定量分析结果可靠。

3.4 阳离子交换树脂的选择

我们对两种不同的阳离子富集柱进行过比较实验, 将同一浓度的 ADMA 标准品分为两份, 分别使用美国 Waters 公司的 PRS 富集柱与 CT-20 国产富集柱进行样品预处理, 并与未经富集的 ADMA 标准品检测结果相比较, 得到两种富集柱对 ADMA 的富集回收率。结果表明, 国产 CT-20 富集柱回收率 (92.83%) 优于进口 Waters 富集柱回收率 (86.25%), 且国产富集柱价格低廉值得推广使用。

本方法检测人血浆及其他生物样本中 ADMA 浓度操作简便、快速、灵敏、准确, 适用于基础医学研究和临床常规批量样品检测。

参考文献:

- [1] Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine(ADMA) using a novel ELISA assay[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42: 1377-1383.
- [2] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. [J] *J Chromatogr B*, 2007, 851: 30-41
- [3] Blackwell S, O'Reilly DS, Talwar DK. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 401: 14-19
- [4] Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, et al. Determination of arginine, asymmetric dimethylearginine, and asymmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-Performance liquid chromatography[J]. *Anal Biochem*, 2002, 303(2): 131-7
- [5] 江 丽, 杭太俊, 张婷婷等. 柱前衍生化 HPLC 法测定复方布洛芬片中精氨酸的含量[J]. *实验与研究*, 2006, 30(5): 221-224
- [6] 陈本美, 夏令伟, 梁绍先, 等. 尿中 L-精氨酸及其甲基化产物的高效液相色谱法测定[J]. *分析化学*, 2002, 30(5): 611-614

高效液相色谱法-蒸发光散射检测器测定 保健食品中人参皂甙主要成分的含量

渠志华, 马永民, 李建平

(天津市疾病预防控制中心, 天津 300011)

随着保健食品发展迅速, 含有人参的保健食品种类很多, 因此准确检测其功效成分的含量很重要。人参皂甙的测定方法有比色法, 高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱法等。我们在参考相关文献资料^[1-15]和对皂甙类主要成分的化学分析的基础上, 采用高效液相色谱法-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 对保健食品中皂甙类主要成分 Rg1、Re、Rb1、Rf、Rc、Rb2、Rd、Rh2 进行了含量测定的研究, 对方法的线性范围、精密性、准确度及检出限等方法指标进行了试验, 该方法可同时测定保健食品中主要皂甙元成分, 并且对八种主要皂甙成分达到良好分离, 准确检测。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

乙腈、甲醇, 乙醇, 水, D-101 大孔吸附树脂, Rg1、Re、Rb1、Rf、Rb2、Rh2 Rc、Rd 标准储备液: 制备 Rg1、Re、Rb1、Rf、Rc、Rb2、Rd、Rh2 浓度分别为 1.00、1.03、1.00、0.96、1.00、1.06、1.00、1.01 mg/mL。

分析天平 (LIBROR AEL-160), 水浴锅 (天津市中环实验电炉有限公司) Waters 600 高效液相色谱仪 (美国 Waters), 蒸发光散射检测器 (ALLTECH), KQ3200E 超声波萃取仪 (昆山市超声仪器有限公司), 5mL 层析管, 0.45 μ m 有机滤膜。

1.2 样品前处理:

称取研磨过后的样品 m (g), 加水适量于超声波萃取仪中超声提取 30min, 取出放置室温后, 用水定容至 25mL。精密吸取 1.00 mL 样品液经内装 D-101 大孔树脂的层析管过柱, 用 70% 乙醇 30mL 洗脱, 收集洗脱液于蒸发皿中, 75 $^{\circ}$ C 水浴烘干, 用色谱甲醇溶解残渣并定容至 2.00mL。样品处理液经 0.45 μ m 滤膜过滤后待测。根据保留时间定性, 峰面积定量。

1.3 仪器条件

色谱柱: C₁₈, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm 不锈钢柱; 流动相: 水和乙腈按照一定比例梯度洗脱; 流速: 1.0mL/min; 蒸发光散射检测器; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 载气流量: 2.9L/min; 漂移管温度: 106 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

1.4 计算公式: $X_i = (C \times 25 \times 2.00 \times 100) / (m \times 1.00 \times 1000)$

$$X = \sum X_i$$

其中 X_i 为待测样品 Rg1、Re、Rb1、Rf、Rc、Rb2、Rd 或 Rh2 含量,

X 为各种皂甙含量之和即为待测样品中总皂甙含量,

C 为由标准曲线方程计算得到的样品中各种皂甙的含量,

V_1 为样品处理总体积, V_2 为样品溶液过柱净化后定容体积,。

2 结果与讨论

2.1 流动相选择

选择使用纯水和乙腈梯度洗脱作为该试验的流动相体系。八种皂甙在该洗脱程序下在 55min 内得到良好分离。乙腈在梯度洗脱过程中的比例直接影响皂甙类的分离效果, 故可根

据选择的不同色谱柱适当对乙腈的比例进行微调,可达到良好的分离效果。梯度洗脱比例参见表1,分离色谱图参见图2。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	乙腈	水	曲线
—	1.0	20	80	—
15	1.0	20	80	6
28	1.0	21	79	6
35	1.0	42	58	6
42	1.0	42	58	6
100	1.0	100	0	1
110	1.0	20	80	1

2.2 检测器选择

文献中多以紫外检测器作为测定皂甙类功能因子的检测器,测定波长为203nm,而人参皂甙显色基团不活泼,该波长接近紫外线的极限,容易造成测定不稳定,影响测定结果,并且高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-UV)梯度洗脱困难,在实验过程中,当洗脱程序结束时,有大量的干扰峰产生(参见图1),而众多类型的皂甙在一次洗脱分离时,靠常规检测方法是困难的。而蒸发光散射检测器(ELSD)是一种质量型检测器,通过将样品蒸发后粒子雾化的原理进行检测,并且ELSD的响应取决于被分析质粒的数量和大小,仅对不挥发被分析物产生响应,即使在梯度洗脱时也能提供平衡的基线(参见图2)。

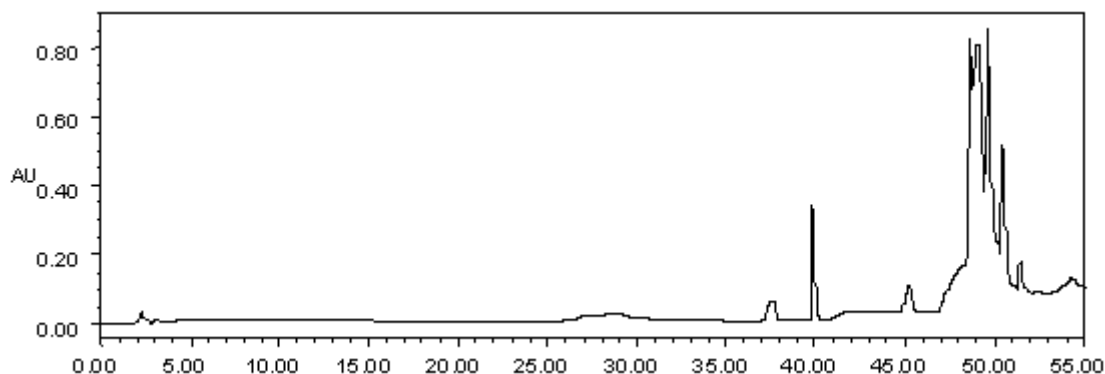


图1 高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-UV)梯度洗脱色谱图

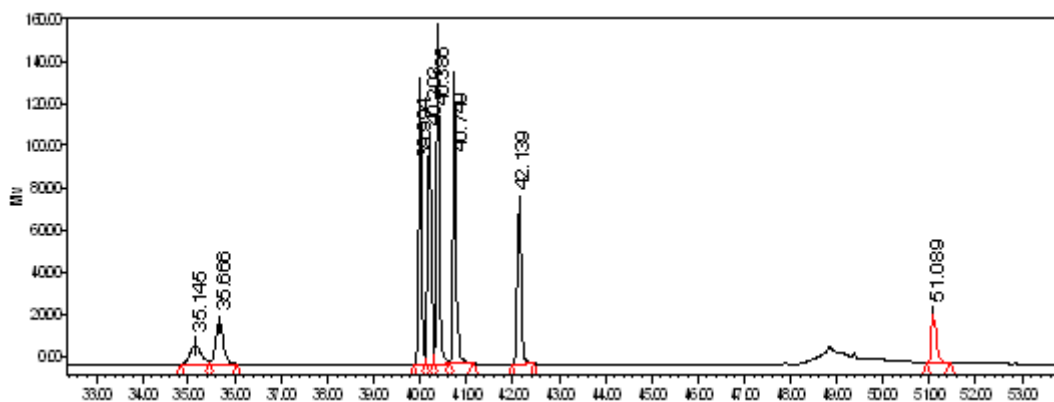


图2 高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)梯度洗脱八种皂甙分离色谱图

2.3 样品过柱净化中洗脱液的选择:

参考文献中对于样品净化大多采用过 D-101 净化柱,但是洗脱液有采用 70%甲醇和 70%乙醇的区别,我们根据自己购买的 D-101 净化柱分别采用这两种洗脱液对标准混合溶液进行了吸附洗脱的试验,试验证明采用 70%乙醇洗脱效果较理想。

2.4 标准曲线

吸取各种皂甙标准储备溶液,配制成混合标准溶液,配制标准系列,制备标准曲线。蒸发光散射检测器定量时采用浓度和峰面积成正比时则可以使用浓度和峰面积直接计算标准曲线方程,不成正比时则以含量的对数和峰面积的对数计算标准曲线方程。在高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)测定各种皂甙中,基于各种皂甙浓度和峰面积的线性良好和计算简便的基础,我们采用浓度和峰面积直接计算标准曲线方程,各种皂甙在 0.06 mg/mL--0.26 mg/mL 浓度范围内线性良好。结果见表 2。

表 2 八种人参皂甙测定标准曲线

名称	标准曲线方程	相关系数 r
Rg1	$y=1.959 \times 10^6 x + 9.660 \times 10^4$	0.9995
Re	$y=2.776 \times 10^6 x + 1.334 \times 10^5$	0.9996
Rb1	$y=6.256 \times 10^6 x + 1.738 \times 10^5$	1.000
Rf	$y=5.121 \times 10^6 x + 1.205 \times 10^5$	0.9998
Rc	$y=7.409 \times 10^6 x + 1.691 \times 10^5$	0.9995
Rb2	$y=6.704 \times 10^6 x + 2.112 \times 10^5$	0.9999
Rd	$y=5.370 \times 10^6 x + 1.874 \times 10^5$	0.9996
Rh2	$y=1.735 \times 10^6 x + 8.061 \times 10^4$	0.9967

2.5 精密度试验

对混合标准溶液重复操作测定 6 次测定。结果见表 3。在重复性条件下获得的测定结果的标准相对相差小于 10%。

表 3 精密度试验

名称	Rg1、	Re、	Rb1、	Rf、	Rc	Rb2、	Rd	Rh2
浓度 (mg/mL)	0.125	0.129	0.125	0.120	0.125	0.132	0.125	0.126
峰面积 1	141465	216264	610459	504049	768760	662454	466817	153434
峰面积 2	157748	225855	646965	540081	758528	704611	500305	167416
峰面积 3	131652	263676	694732	552582	809662	739537	511264	170752
峰面积 4	137062	230450	732484	538656	817687	691868	498353	162058
峰面积 5	136545	260227	692421	579183	785287	716629	533774	157948
峰面积 6	145751	248156	684751	554813	775183	694821	517494	164855
平均值	141704	240771	676969	544894	785851	701653	504668	162744
RSD(%)	6.49	8.07	6.27	4.54	2.98	3.69	4.47	3.89

2.6 检出浓度

当取样量为 5.0g,进样量为 20 μ L 时,Rg1、Re、Rb1、Rf、Rc、Rb2、Rd、Rh2 最低检出浓度分别为:1.5 μ g/mL、1.5 μ g/mL、0.15 μ g/mL、0.15 μ g/mL,0.15 μ g/mL、0.15 μ g/mL、0.15 μ g/mL、1.5 μ g/mL,最低定量浓度分别为 4.5mg/kg,4.5mg/kg,0.45 mg/kg,0.45 mg/kg,0.45 mg/kg,0.45 mg/kg,0.45 mg/kg,4.5mg/kg。

2.7 测定样品:

利用 HPLC-ELSD 分别准确测定保健食品中单个皂甙成分的含量,然后计算总含量的测定结果则相对较准确,并且还有利于区分不同的人参制品。测定结果参见表 4。

表4 两种测定方法测定样品进行比较

样品名称	提取方法	比色法测定结果平均值	HPLC-ELSD 测定结果平均值
南山雪保健饮品	直接	0.806mg/mL	0.093mg/mL
华药神草红五参胶囊	水—超声 30min	7.63g/100g	2.28g/100g
天狮参原蜂胶片	水—60℃40min	1.55×10 ³ mg/100g	387mg/100g
天狮降脂茶	甲醇浸提 4h	267mg/100g	59.0mg/100g

3 小结

本试验对利用 HPLC-ELSD 对保健食品中八种皂甙类因子进行测定的方法进行了研究,并在流动相选择、检测器选择、样品前处理等方面进行了一些探索,充分发挥 HPLC-ELSD 这种特殊的通用型质量检测器在检测工作中的作用。

参考文献:

- [1] 保健食品中人参皂甙的高效液相色谱测定.《保健食品检验与评价技术规范》.中华人民共和国卫生部.2003:271-273.
- [2] 保健食品中总皂甙的测定.《保健食品检验与评价技术规范》.中华人民共和国卫生部.2003:306-307.
- [3] 韩宏伟,王竹天,杨祖英等.人参皂甙和褪黑素分析的质量控制.中国食品卫生杂志.2001,13(3):11-15.
- [4] 江英桥,王强,魏国等.高效液相色谱蒸发激光散射检测器分析西洋参中的人参皂甙.中国药科大学学报.2001,32(1):41~43.
- [5] 杨祖英,马兰,苏菊.人参皂甙的测定方法.中国食品卫生杂志.1999,11(1):14~15.
- [6] 陈薇,胡广林,王翊如等.高效液相色谱法分离测定人参中的6种人参皂甙.色谱,2000,18(5):429~441.
- [7] 陈波,潘振球,赖天兵.人参类保健食品中人参皂甙的高效液相色谱分析.中华预防医学杂志,1996,30(5):307-308.
- [8] Zhiguo Yu, Xiaoxia Gao, Yunli Zhao. et al. Determination of Safflor Yellow A, Puerarin, Ferulic Acid, Ginsenoside Rg1, and Rb1 in the Traditional Chinese Medicinal Preparation Naodesheng Injection by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science. 2006,44:272-275.
- [9] Chunhua Xia, Guangji Wang, Jianguo Suna. et al. Simultaneous determination of ginsenoside Rg1, Re, Rd, Rb1 and ophiopogonin D in rat plasma by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric method and its application to pharmacokinetic study of 'SHENMAI' injection. Journal of Chromatography B. 2008,862:72-78.
- [10] Gui-feng Deng, Ding-li Wang, Ming-xin Meng. et al. Simultaneous determination of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Re, Rb1 and icariin in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2009,877:2113-2122.
- [11] Han TW, But PP, Cheng SW. et al. Differentiation and authentication of Panax ginseng, Panax quinquefolius and ginseng products by using HPLC/MS. Anal Chem, 2000,72(6):1281-1287.
- [12] 沈向红,任一平,陈翊.HPLC法与香草醛比色法测定保健品中的人参皂甙.中国卫生检验杂志.2004,14(6):682-683.
- [13] 王占良,王弘,陈世忠.高效液相色谱-二极管阵列检测/质谱法分析生脉饮煎剂中的人参皂甙类成分.2006,24(4):325-330.
- [14] 赖天兵,陈波,潘振球等.高效液相色谱法用于保健食品中人参原料鉴定.实用预防医学.2004,11(5):1004-1005.
- [15] 徐智秀,肖红斌,王加宁等.高效液相色谱-质谱-质谱法分析人参皂甙.2000,18(6):521-524.

灯盏花素对细胞色素 P4503A4 酶活性的影响

韩晓文, 李芹*, 焦建杰, 高思楠, 孟素蕊, 刘艳霞, 姜建石

(天津医科大学基础医学院药理教研室, 天津 300070)

细胞色素 P450 3A 亚家族在肝脏和小肠中含量丰富, 对临床药物有广泛的代谢作用, 是细胞色素 P450 超家族中最重要的亚家族成员。细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 是人体中重要的药物代谢酶, 参与临床 150 多种药物的代谢^[1]。CYP3A4 具有基因多态性, 基因突变可以引起酶活性及数量的差异, 从而造成人类对药物反应的显著个体差异。CYP3A4 的活性可影响药物的代谢过程, 从而影响药物的疗效; 而且药物对 CYP3A4 可以产生诱导或抑制作用, 从而影响其他经此酶代谢的药物而发生药物相互作用和不良反应^[2]。因此, 研究药物对 CYP3A4 活性的影响具有重要意义。中药的成分比较复杂, 中西药联合应用时, 容易出现药物相互作用, 因此研究中草药对 CYP3A4 活性的影响, 不但可以了解中药的体内代谢过程, 而且可以为临床中西药物的合理搭配使用提供依据。

灯盏花素粉针剂由中药灯盏花提取物总黄酮精制而成, 主要成分为灯盏花乙素 (4-羟基-7-O-葡萄糖醛酸苷), 另含少量灯盏甲素 (芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷)。其具有明显的血管扩张作用, 并能抑制血小板、红细胞聚集, 促进纤溶酶活性, 具有良好的溶栓防栓作用和清除自由基、对抗脂质过度氧化作用, 研究表明灯盏花素注射液还具有改善糖尿病患者左心室舒张功能的作用^[3]。临床常用于脑梗塞、冠心病、心绞痛等心脑血管疾病的治疗, 是目前临床上较广泛使用的治疗心脑血管疾病的有效药物之一。研究其对 CYP3A4 酶活性的影响, 对于优化临床给药方案, 提高临床用药的安全性和有效性具有重要的意义。本研究以咪达唑仑作为 CYP3A4 的探针药物, 通过研究给予灯盏花素粉针剂前后, 咪达唑仑药代动力学的差异, 探讨灯盏花素对大鼠体内 CYP3A4 活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

灯盏花素粉针剂 (25mg/支, 批号: 20091223-1, 昆明龙津药业股份有限公司生产), 咪达唑仑注射剂 (10mg/2ml/支, 批号 20081213, 江苏恩华药业股份有限公司生产), 地西洋原料药(大同制药厂, 批号 20071124), 磷酸氢二铵, 磷酸及氯仿均为分析纯。甲醇为色谱纯。

1.2 实验仪器

Agilent 1100 HPLC 工作系统 (Agilent 公司, 美国), CAY-1 型液体快速混合器 (北京长安仪器厂, 中国), B600 型低速自动平衡离心机 (白洋离心机厂, 美国), K-550-GE 漩涡混合器 (Scientific Industries Inc, 美国), PB153-S 精密分析天平 (METTLER TOLEDO, 瑞士)

1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent zorbax SB-C18 (250mm×4.6mm, 5 μ m) (Agilent 公司, 美国); 流动相: 0.05mol/L 磷酸氢二铵缓冲溶液 (用磷酸调 pH 至 3.4) - 甲醇 (28:72, v:v); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 230nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ l。

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目 (09JCZDJC21500); 高等学校博士学科点专项科研基金 (新教师基金) 资助课题 (20091202120012)

作者简介: 韩晓文, 女, 硕士研究生。

通讯作者: 李芹, 副教授, 主要研究方向: 临床药理学与药物代谢动力学 carolin1006@gmail.com

1.4 实验动物

Wistar 大鼠，雌雄各半，体重 $200\pm 20\text{g}$ ，由中国人民解放军军事医学科学院放射研究所实验动物中心提供，动物生产合格证号：ASCSK（津）2005-0001。

1.5 给药方法及样本采集

1.5.1 实验分组及给药

将 Wistar 大鼠随机分为两组，对照组和实验组，每组 30 只大鼠。实验组大鼠每日尾静脉注射灯盏花素粉针剂 $0.45\text{mg}/100\text{g}$ ，每日 1 次，共 10d；第 11d 于尾静脉缓慢注射美托洛尔探针药物溶液 $1\text{mg}/100\text{g}$ 。对照组大鼠每日尾静脉注射生理盐水 $0.5\text{ml}/100\text{g}$ ，每日 1 次，共 10d；第 11d 各组大鼠均于尾静脉缓慢注射咪达唑仑溶液 $5\text{mg}/\text{kg}$ ($0.1\text{ml}/100\text{g}$)。

1.5.2 血浆样品采集

分别于注射咪达唑仑溶液前及给药后 5、10、15、20、30min 和 1、2、4、8、12、24h 眼内眦静脉取血 0.8ml 至肝素化离心管中，离心 $3500\text{rpm}\times 10\text{min}$ ，分离血浆，按文中“样品预处理”程序操作，测定。

1.6 样品预处理

准确吸取血浆样本 $200\mu\text{l}$ ，加入 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 的地西洋内标溶液 $100\mu\text{l}$ ，涡旋振荡 30s，加入 2ml 提取溶剂氯仿，于快速液体混合器混匀 5min 后 3500rpm 离心 10min。取下层有机相置玻璃离心管中，于 40°C 水浴中以氮气吹干。残渣用 $100\mu\text{l}$ 流动相复溶， $20\mu\text{l}$ 进样，记录色谱图^[4]。

1.7 数据处理方法及药代动力学分析

使用 DAS2.0 软件的非房室模型计算咪达唑仑的主要药代动力学参数。

1.8 统计学处理

结果以“ $\bar{x}\pm\text{SD}$ ” (Mean values \pm SD) 表示，应用 SPSS13.0 软件进行统计分析，采用方差分析进行组间比较，Dunnnett's 检验进行两两比较。P<0.05 表示有显著差异。

2 结果

2.1 HPLC 的方法学验证

在上述分析条件下，咪达唑仑与内标峰峰形良好，分离完全，无杂质峰干扰。血浆色谱图见图 1。

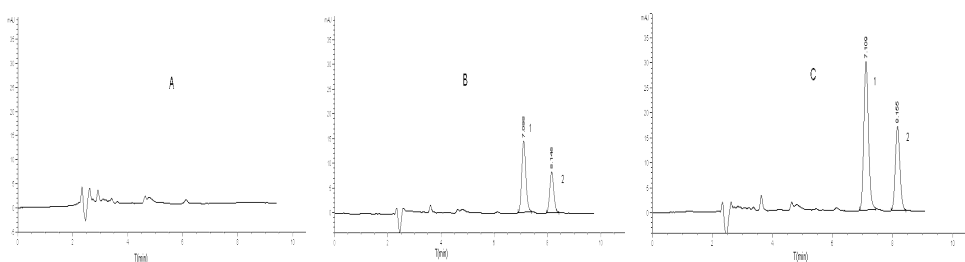


图 1 色谱图

A-空白血浆；B-空白血浆+咪达唑仑+内标；C-血浆样本+内标；

1-咪达唑仑；2-安定（内标）

以咪达唑仑与内标峰面积比值为横坐标，咪达唑仑浓度为纵坐标，绘制标准曲线，求得直线回归方程为 $Y=2.0225X+0.7345$ ， $r=0.9998$ ，线性范围： $0.19\sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

血浆中低、中、高三种浓度的咪达唑仑绝对回收率均大于 77%，相对回收率为 96%~99%，日内、日间精密度均<9%。血浆样本冷冻一个月后其浓度变化均在 $\pm 8\%$ 以内。

2.2 咪达唑仑的药代动力学研究

使用 DAS2.0 软件的非房室模型计算对照组和实验组组中咪达唑仑的主要药代动力学参

数, 结果见表 1。对照组和实验组大鼠静脉注射咪达唑仑 5mg/kg 后咪达唑仑的血药浓度均值-时间曲线见图 2。

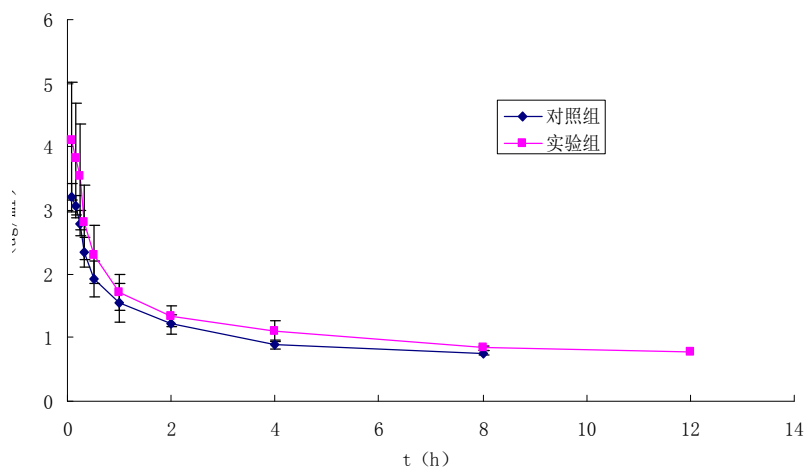


图 2 对照组和实验组咪达唑仑的血药浓度均值-时间曲线

表 1 大鼠静脉注射咪达唑仑 (5mg/kg) 后咪达唑仑的主要药动学参数 ($\bar{X} \pm SD$, n=6)

药代参数	对照组	高剂量组
AUC _(0-t) (mg/L*h)	8.95±0.72	12.68±2.35*
AUC _(0-∞) (mg/L*h)	11.57±1.04	18.73±4.90*
MRT _(0-t) (h)	3.13±0.06	4.14±0.82*
MRT _(0-∞) (h)	7.93±2.07	11.83±4.08*
t _{1/2} (h)	4.11±1.53	7.15±3.03*
CL(L/h/kg)	0.43±0.04	0.29±0.09*

* P<0.05

3 讨论

CYP3A4 是人体含量最丰富的 P450 酶, 大约占人肝 CYP450 总含量的 30%, 占肠道 CYP450 总含量的 70%, 参与市场上 50% 以上的药物代谢^[5,6]。咪达唑仑具有 T_{1/2} 短, 既可静脉用药, 也可口服给药, 吸收快速且完全, 不良反应轻微, 并已明确不经转运等特点, 满足安全、快速、特异性强等检测要求, 而且与众多的 CYP3A4 底物有着良好的相关性, 从而成为评价 CYP3A4 代谢活性的常用探针药物^[7]。目前, 已有很多研究使用咪达唑仑作为探针药物评价药物对于 CYP3A4 的作用^[8-10]。

表 1 数据表明静脉给予大鼠灯盏花素粉针剂 10d 后, 与对照组相比, 实验组咪达唑仑的 AUC、MRT 和 t_{1/2} 均显著高于对照组, 其中 AUC_(0-t) 提高 41.6%; AUC_(0-∞) 提高 61.9%; 而 MRT_(0-t) 提高 32.3%; MRT_(0-∞) 提高了 49.2%; t_{1/2} 延长了 74.0%; 但是 CL 显著低于对照组 (P<0.05), 说明静脉给予大鼠灯盏花素粉针剂 10d 后, 咪达唑仑在体内的代谢明显减慢, 提示使用灯盏花素粉针剂可明显降低大鼠体内 CYP3A4 的活性。

目前心血管疾病已经成为危害人类健康的第一大疾病, 其发病率、死亡率逐年上升, 患者需要长期治疗, 或者终生服药。由于遗传和个体差异, 再加上疾病本身引起的生理变化,

使得大多数心血管病患者需要联合用药,造成心血管病患者用药过程中出现明显的个体差异和药物相互作用,因此,研究联合用药时,药物对于药物代谢酶活性的影响,可以估计传统用药剂量可能引起的毒性反应以及联合用药时产生的药物相互作用,对于调整临床用药方案,提高治疗效果,减少药物不良反应,最终实现个体化给药,具有极其重要的意义。

参考文献:

- [1] 朱学慧, 娄建石. 细胞色素 P450 3A 选择性探针药物的评价[J]. 综述与讲座, 2004,9(4):365-369.
- [2] 王安. CYP3A4、CYP2C9 酶和 HMG-CoA 还原酶遗传多态性及其对 simvastatin 降脂疗效的影响[D]. 湖南: 中南大学, 2005
- [3] 赵何汉. 灯盏花素注射液对糖尿病患者左心室舒张功能的影响[J], 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(1):31-2
- [4] Ying Liu, Jianjie Jiao, Caili Zhang, Jianshi Lou. A Simplified Method to Determine Five Cytochrome P450 Probe Drugs by HPLC in a Single Run [J]. *Bio Pharm*, 2009,32(4):717-720.
- [5] Liu Y T, Hao H P, Liu C X, et al. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors[J]. *Drug Metab Rev*, 2007,39(4):699-721.
- [6] Michalets E L. Update: clinically significant cytochrome P450 drug interactions[J]. *Pharmacotherapy*, 1998, 18(1): 84-112
- [7] DU Y, ZHU R H, SU F L. Effect of oleanolic acid on CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 activity in healthy subjects[J]. *Chin Pharm*, 2008, 43 (14):300-303.
- [8] Takanohashi T, Isaka M, Ubukata K, Mihara R, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XIII: inhibitory effects of capsaicin and capsinoids on cytochrome P450 3A4 in human liver microsomes[J]. *Int J Toxicol*. 2010, 29(2 Suppl):22S-6S.
- [9] Qiu F, Wang G, Zhang R, Sun J, Jiang J, Ma Y. Effect of danshen extract on the activity of CYP3A4 in healthy volunteers[J]. *Br J Clin Pharmacol*. 2010, 69(6):656-62.
- [10] Chang SY, Fancher RM, Zhang H, Gan J. Mechanism-based inhibition of human cytochrome P4503A4 by domperidone[J]. *Xenobiotica*. 2010, 40(2):138-45.

Effect of Breviscapine on the activity of cytochrome P4503A4

HAN Xiao-wen, LI Qin, JIAO Jian-jie, GAO Si-nan, MENG Su-rui, LIU Yan-xia, LOU Jian-shi
(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Breviscapine on the activity of cytochrome P4503A4(CYP3A4) by Midazolam as a probe. **Methods:** Wistar rats were divided into test group and control group randomly. The rats in the test group were injected breviscapine for 10 days and the rats in the control group were injected normal saline. On d11, all the rats were injected midazolam. Blood sample were collected for different time and the concentrations of midazolam were determined by HPLC. **Results:** Compared with control group, AUC, MRT and $t_{1/2}$ were significantly higher and CL was significantly lower in test group. **Conclusion:** The activity of CYP3A4 can be inhibited by breviscapine.

Key Words: breviscapine; midazolam; CYP3A4; activity

快速响应温敏性 PNIPAAm 整体柱的制备及其应用

杨更亮, 刘名权, 刘海燕

(河北大学药学院, 河北省药物质量研究与控制重点实验室, 河北 保定 071002)

整体柱具有通透性能良好和传质速度快等特点, 可实现快速、高效、高通量的分离, 近年来已引起高效液相色谱和毛细管电色谱研究者的热切关注。聚合物整体柱是其中应用最为广泛的一种, 它是由单体、交联剂、致孔剂和引发剂等通过原位聚合得到的连续均一的棒状聚合物, 具有使用 pH 范围较宽, 生物兼容性好等特点^[1-3]。N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)是一种研究颇为广泛的典型温敏性高分子, 其温敏特性得到了广大研究者的青睐^[4-6]。本文以 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)为单体, 采用自由基氧化还原冰冻聚合的方法, 制备了快速响应温敏性聚 N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)整体柱, 并将其应用于类固醇类药物的分离。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

PU-1586 高液相色谱仪(日本, JASCO 公司), UV-1575 紫外可变波长检测器 (日本, JASCO 公司), HW-2000 色谱工作站(南京千谱软件有限公司); Waters 柱温箱(美国, Waters 公司); N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm) (东京, TCI 公司); N,N-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)、甲醇(天津市科密欧化学试剂开发中心); 过硫酸铵(APS) (天津市天大化工实验厂); 四甲基已二胺(TEMED)(北京市兴福精细化工研究所); 聚乙二醇(PEG-20000)(国药集团化学试剂有限公司); 以上试剂均为分析纯, 实验中所用水均为超纯水; 类固醇类药物(氢化可的松、醋酸可的松、醋酸氢化泼尼松、氟轻松、醋酸倍他米松、丙酸倍氯米松)均购自中国药品生物制品检定所; 所有溶液及流动相在进入液相色谱仪前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.2 PNIPAAm 整体柱的制备

将 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)、过硫酸铵(APS)、聚乙二醇(PEG-20000)、四甲基已二胺(TEMED)和水按一定比例分别加入试管中, 超声混匀后, 将其倾入不锈钢色谱柱管中(100 \times 4.6 mm i.d.), 于 -12 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 24 小时, 反应完全后, 将其连接于高效液相色谱仪上, 以超纯水在线冲洗 24 小时以除去致孔剂 PEG-20000 和其他未反应完全的可溶物即得所需聚合物整体柱。

1.3 PNIPAAm 整体柱的吸水率

将“1.2”项下制备的 PNIPAAm 整体柱烘干至恒重并精密称重后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 的水中, 每隔一段时间取出并用滤纸擦干表面水分, 称重, 计算其吸水率(WU)。计算公式为: $WU = (W_t - W_d) / W_{\infty} \times 100\%$ 。其中, W_d 为干燥 PNIPAAm 整体柱的质量, W_t 为某时刻 PNIPAAm 整体柱溶胀后的质量, W_{∞} 为 25 $^{\circ}\text{C}$ 时达溶胀平衡时 PNIPAAm 整体柱中水的质量。

1.4 PNIPAAm 整体柱对类固醇类药物分离

本实验采用 PNIPAAm 整体柱作为 HPLC 固定相, 在不同柱温下对类固醇类药物进行了分离, 以考察该固定相的温敏特性。色谱条件为: 自制整体柱: 100 \times 4.6 mm i.d.; 流动相: 水; 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 1 μL 。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20375010, 20675084)

作者简介: 杨更亮 (1963-), 男, 河北人, 教授, 博士生导师, Ttel: 0312-5971108; E-mail: ygl@hbu.edu.cn

2 结果

2.1 PNIPAAm 整体柱制备条件的优化

通过改变单体、交联剂、致孔剂和引发剂的比例，制得一系列不同条件下的聚合物整体柱，并分别利用傅里叶变换红外光谱和扫描电子显微镜对上述聚合物进行了官能团的确定及聚合物微观形态结构的表征。红外吸收谱图如图1所示，结果表明：改变单体、交联剂、致孔剂和引发剂的比例对聚合物的官能团基本无影响，且在 1375.15 cm^{-1} 处出现了异丙基的耦合分裂峰，在 1645.39 cm^{-1} 处出现了酰胺的羰基收缩振动峰，在 2972.36 cm^{-1} 处出现了甲基的碳氢键振动峰。

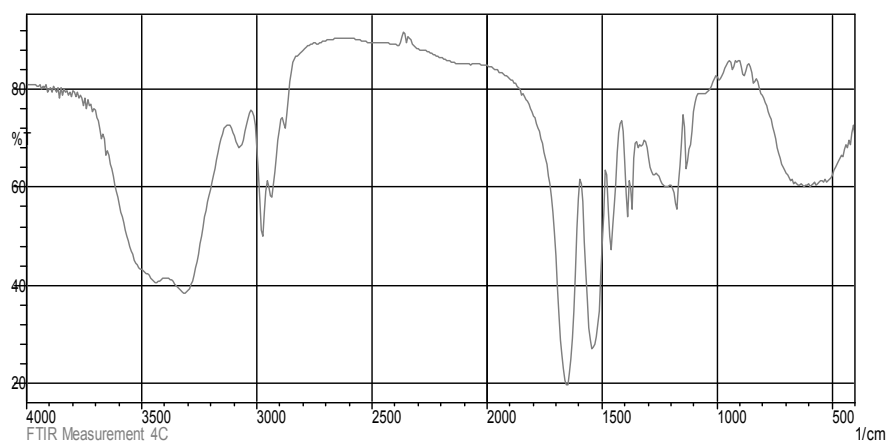


图1 聚合物整体柱的红外光谱图

然而，所得一系列不同条件下的聚合物整体柱的扫描电子显微镜结果则表明：改变单体、交联剂、致孔剂和引发剂的比例对聚合物的形态结构则影响较大，按照经大量前期单因素实验优化所得最佳工艺条件而聚合制备的整体柱扫描电镜图如图2所示。从电镜图中可见：按照最佳工艺条件而聚合制备的整体柱，成孔性较好，具有较好的渗透性和亚微米骨架结构。

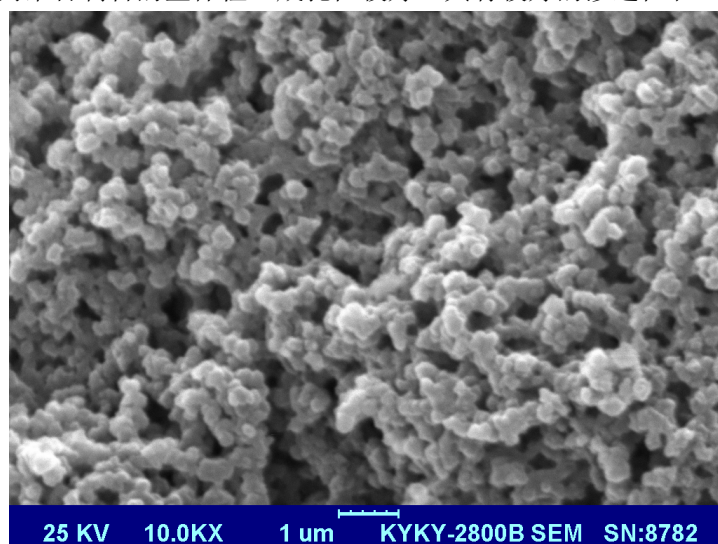


图2 聚合物整体柱的 SEM 微观结构表征图

2.2 PNIPAAm 整体柱的吸水率

致孔剂PEG-20000对PNIPAAm 整体柱不同时间下吸水率的影响如图3所示。由图中可看出，相对于未加入致孔剂的小孔整体柱，在致孔剂PEG-20000的成孔作用下得到的大孔整体

柱因为有孔结构的存在,水分子较快地进入了整体柱的网络结构,从而使聚集的高分子链松弛、松散,最后使网络舒展,从而表现出了比较快的吸水速率和快速响应的温敏性能。

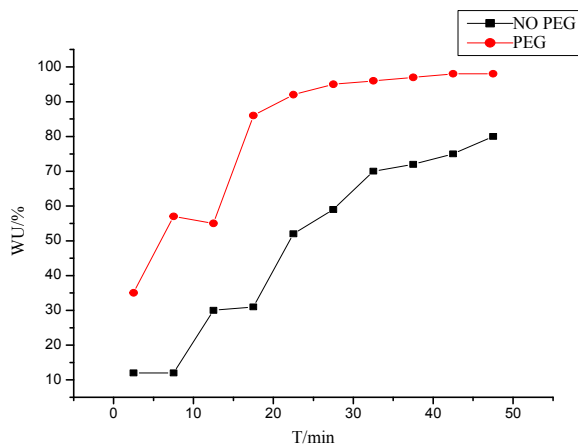


图3 致孔剂PEG-20000对PNIPAAm 整体柱不同时间下吸水率的影响

2.3 PNIPAAm 整体柱对类固醇类药物分离

本实验选用六种不同疏水性的类固醇类药物为探针药物,其疏水性分别以 $\log P$ 表示,且疏水性由强到弱的顺序依次为:氢化可的松($\log P=1.61$)、醋酸可的松($\log P=2.10$)、醋酸氢化泼尼松($\log P=2.40$)、氟轻松($\log P=2.50$)、醋酸倍他米松($\log P=2.80$)、丙酸倍氯米松($\log P=3.10$)。将整体柱置于柱温箱中,并在不同的温度($15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$)下,分别将 $1\text{ }\mu\text{L}$ 标准品混合溶液注入高液相色谱仪中,不同柱温下探针药物在 PNIPAAm 整体柱上的分离色谱图如图 4 所示。

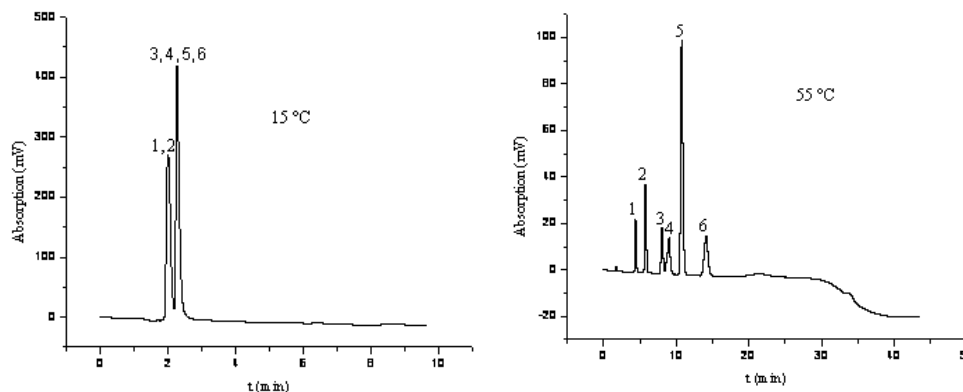


图4 不同温度下整体柱对六种类固醇类药物的分离色谱图

1、氢化可的松 2、醋酸可的松 3、醋酸氢化泼尼松 4、氟轻松 5、醋酸倍他米松 6、丙酸倍氯米松

从图中可以看出,探针药物在该整体柱上的保留行为与通常的反相色谱柱恰好相反:保留组分在反相色谱柱上的保留时间随温度的增加而减小,而类固醇类药物在本实验制备的 PNIPAAm 整体柱上的保留时间却随温度的升高而延长。由图中可以看出:当柱温为 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,探针药物不能完全分离;而当柱温升至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,类固醇类药物实现较好分离。这主要源于 PNIPAAm 整体柱表面的疏水性会因温度变化导致的柱体表面 PNIPAAm 分子链的构象转变而随之发生变化。在 PNIPAAm 体系中, $-\text{NHCO}-$ 为亲水性基团,而 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 为疏水性基团,在临界相变温度 LCST($32\text{ }^{\circ}\text{C}$)以下时, PNIPAAm 分子链成伸展状态,高分子链中的亲水基团通过氢键与水分子结合,使柱体表面呈亲水性因而对药物分子保留较弱;当温度升高时,分子链卷曲,这种氢键作用减弱,而高分子链中的疏水基团间的相互作用增强,使柱

体表面的疏水性增强, 转而, 疏水作用取代亲水作用成为主要作用力, 整体柱固定相与被分离药物分子疏水基团间的疏水相互作用加强, 使其对类固醇类药物的保留时间增大。因此, 基于 PNIPAAm 柱体的温敏特性, 以纯水为流动相, 仅仅依靠调节柱温便实现了六种类固醇类药物的良好分离。

3 讨论

本文以具有温敏特性的 *N*-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm)为单体, 采用自由基氧化还原冰冻聚合的方法(-12 °C), 制备了聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)整体柱, 其快速响应温敏性通过较高的吸水速率及其不同温度下对类固醇类药物的分离应用得以充分验证。值得一提的是, 本实验在利用自制整体柱对探针药物进行色谱分离过程中, 仅使用超纯水作为流动相, 避免了色谱分离领域乙腈、甲醇等有机溶剂的使用, 有利于对自然资源和生态环境的保护。

参考文献

- [1] Wang, Q. C, F. Svec, Frechetj. M. J. *Anal Chem*, 1995, 67: 670-674.
- [2] 刘海燕, 白立改, 杨更亮, 杨冠群, 封晓娟. [J]. 河北大学学报, 2009, 29: 503-506.
- [3] G. L. Yang, H. Y. Liu, L. G. Bai etc. *Microporous Mesoporous Mater*, 2008, 112: 351-356.
- [4] 秦爱香, 吕满庚, 刘群峰, 张平. [J]. 应用化学, 2006, 23:581-585.
- [5] 宋江莉, 王秀芬. [J]. 化工学报, 2003, 54: 1787-1789.
- [6] 秦爱香, 刘群峰, 张平, 兰延勋, 吕满庚. [J]. 化学通报, 2006, 9: 680-684.

The Preparation and Application of Fast Response Temperature Sensitive PNIPAAm Monolithic Column

YANG Geng-liang, LIU Ming-quan, LIU Hai-yan

(Pharmaceutical Sciences college of Hebei University; Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Baoding, Hebei, 071002, China)

Abstract: One of the recent major improvements of HPLC was the introduction of monolithic columns, which have the advantages of faster separation and lower back pressure as compared to traditional packed columns. Here, we investigated temperature responsive polymer, poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm), which was the basis of an HPLC stationary phase. In this study, a novel PNIPAAm polymer monolith was polymerized via a free-radical polymerization technique using an aqueous redox initiator in solution. Furthermore, the new PNIPAAm monolith was prepared by decreasing the temperature of polymerization reaction below the freezing point (-12 °C). A temperature-dependent resolution of steroids was achieved using only water as a mobile phase on the ultimately optimal PNIPAAm monolithic column. A good separation performance could be achieved with a single aqueous mobile phase just by changing the temperature during chromatographic runs, instead of changing the mobile phase composition. This system should be highly useful to control the function and property of the stationary phase for HPLC only by changing the temperature with an aqueous mobile phase.

Key words: Monolithic column; Temperature sensitivity; NIPAAm; HPLC

固相萃取盘-高效液相色谱法测定 自来水中丙烯酰胺

张勃, 祁悦, 高赫男, 包建民*

(天津大学药物科学与技术学院, 天津, 300072)

聚丙烯酰胺是一种应用广泛的水处理絮凝剂,其合成过程中常常会残留一定量的丙烯酰胺单体^[1]。丙烯酰胺是公认的致癌物质和神经性致毒剂,人体通过饮水会接触到这种有毒物质。世界卫生组织(WHO)对聚丙烯酰胺使用时的投加量做出了严格限制,经絮凝沉淀处理后水体中的丙烯酰胺的含量应低于 $0.5\ \mu\text{g/L}$ ^[2]。测定水中微量的丙烯酰胺较困难,往往需要采用昂贵的仪器设备^[3-5],或者较为繁琐的操作步骤^[6,7]。

固相萃取盘是90年代发展起来的一种新型的固相萃取(SPE, Solid Phase Extraction)技术。对于相同质量的填料,固相萃取盘的横截面积约是固相萃取柱的10倍,可以采用很高的流量,从而缩短了样品前处理时间,提高了效率。这种新型的固相萃取技术广泛用于较大体积的环境水样中有机污染物的萃取和检测^[8-10]。

本文采用固相萃取盘技术,无需样品衍生步骤,实现了对自来水中微量丙烯酰胺的快速富集,减少了样品处理时间,同时采用高效液相色谱-紫外检测法,对自来水中的富集的丙烯酰胺进行定量分析,建立起一种简便快速的测定自来水中丙烯酰胺单体浓度的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

ConstaMetric 3000 高效液相色谱泵(美国 Milton Roy 公司),紫外检测器(美国 waters 公司),Baulo 120-5 ODS 色谱柱($250\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)(天津奥秘科技有限公司)循环水式真空泵(美国 Cole Parmer 公司),真空过滤系统(上海申东仪器有限公司),空气泵(天津 HSENG 公司), $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔有机滤膜(北洋膜技术公司)。固相萃取柱和固相萃取盘由天津奥秘科技有限公司提供。

丙烯酰胺(99%)、浓盐酸(36-38%)、甲醇、乙醇(天津大学科威公司),水为去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制

配制 $1\ \text{mg/mL}$ 丙烯酰胺储备液, $500\ \text{mL}\ 0.5\ \mu\text{g/L}$ 丙烯酰胺溶液,以及加入 $0.25\ \mu\text{g}$ 丙烯酰胺标准品的 $500\ \text{mL}$ 自来水加标溶液。所有溶液经过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

1.2.2 固相萃取柱对丙烯酰胺的吸附

用 $2\ \text{mL}$ 甲醇、 $2\ \text{mL}$ 水对SPE小柱($100\ \text{mg}$ 规格)进行活化。上样 $1\ \text{mL}\ 1\ \mu\text{g/mL}$ 的丙烯酰胺溶液,收集流出液。加入 $1\ \text{mL}$ 洗脱剂,对固相萃取小柱进行洗脱,收集洗脱液。

1.2.3 固相萃取盘对丙烯酰胺的吸附

将直径为 $47\ \text{mm}$,重 $0.5\ \text{g}$ 左右的固相萃取盘安装在真空抽滤装置上,依次用 $10\ \text{mL}$ 甲醇、 $10\ \text{mL}$ 水进行活化。上样 $10\ \text{mL}$ 或 $500\ \text{mL}$ 样品溶液,收集流出液。用 $10\ \text{mL}$ 甲醇洗脱,收集洗脱液。对于 $500\ \text{mL}$ 的样品,将洗脱液吹干,然后用 $1\ \text{mL}$ 甲醇复溶。

2 结果与讨论

2.1 萃取条件的考察

丙烯酰胺是一种极性化合物,文献中提到有很多种填料都可以用于食品中的丙烯酰胺的萃取,因此我们考察了几种常见填料对丙烯酰胺的吸附情况。图1显示了C₁₈、石墨化炭、活性炭、硅胶、苯乙烯聚乙炔基苯五种填料对丙烯酰胺的吸附能力。活性炭的多孔结构使其具有很大的比表面积,对丙烯酰胺的吸附能力明显强于其他几种填料,是丙烯酰胺的理想吸附剂。

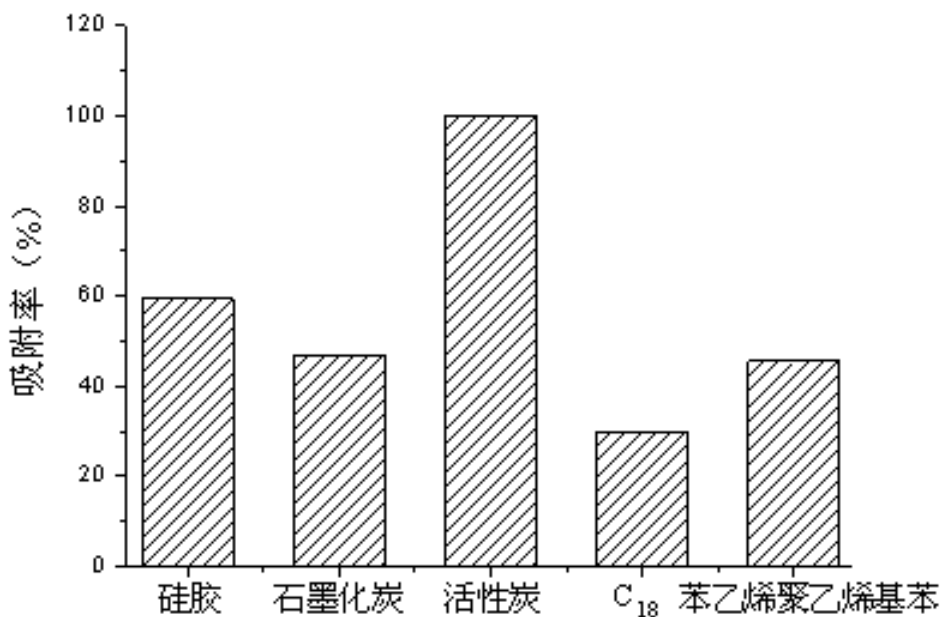


图1 不同填料对丙烯酰胺吸附情况

丙烯酰胺极性较强,一般采用水或者极性强的有机物进行洗脱。通过比较甲醇、甲醇/水(50:50)、水、乙醇几种溶剂对丙烯酰胺的洗脱效果,发现水和乙醇无法将吸附在活性炭中的丙烯酰胺洗脱下来,甲醇对丙烯酰胺的洗脱效果最好,回收率可以达到100%,50%甲醇洗脱能力介于水和甲醇之间。故选择甲醇作为最佳洗脱溶剂。

2.2 色谱条件的选择

自来水中成分复杂,经过固相萃取盘萃取后,较多杂质被富集在膜上,并由甲醇洗脱下来。因此需要选择一种合适的色谱条件,使得丙烯酰胺与杂质有效分离,不影响对丙烯酰胺的定性和定量。实验中考察了流动相的比例和流速对分离的影响,最终选择5%甲醇,0.5 mL/min流速的色谱条件为分离检测丙烯酰胺的最佳色谱条件。

2.3 标准曲线和最低检测限

将1 mg/mL的丙烯酰胺储备液稀释成0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.3 μg/mL、0.4 μg/mL的丙烯酰胺溶液,HPLC液相色谱检测。以质量浓度(μg/mL)为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。峰面积与质量浓度成良好的线性关系,由标准曲线可以得到线性关系 $y = 232834x + 4829.7$, $R^2 = 0.9992$,方法最低检测限为0.01 μg/mL。

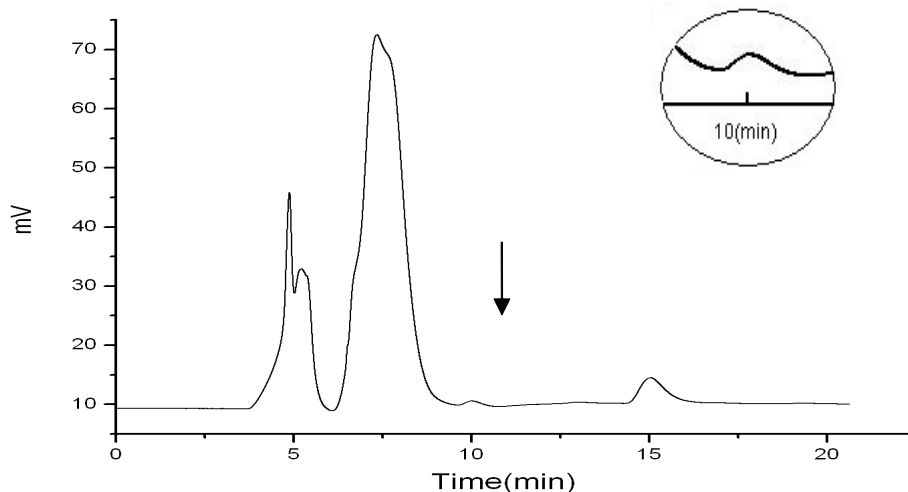


图2 自来水加标样品的液相色谱图色谱条件,流动相甲醇/水(5:95),流速 0.5 mL/min,检测波长:210 nm,进样量:20 μ L,箭头所示位置为丙烯酰胺峰。

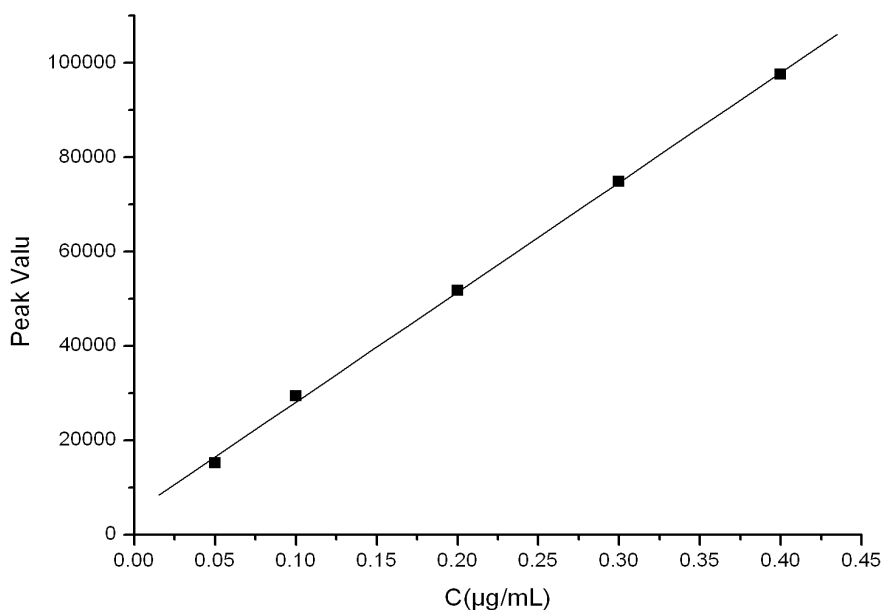


图3 丙烯酰胺标准曲线图

2.4 固相萃取盘技术方法回收率和精密度

将 10 mL 0.4 μ g/mL 丙烯酰胺溶液 (小体积) 和 500 mL 0.5 μ g/L 丙烯酰胺模拟水样 (大体积) 作为样品,按照 2.2.3 方法处理,平行测定三组。结果表明不同体积的样品经过萃取盘富集,均可达到较高的回收率,具有较好的重现性和可靠性。小体积样品的回收率为 101.6% (RSD% = 0.95),大体积样品的回收率为 102.2% (RSD% = 2.09)。当丙烯酰胺加标浓度为 0.5 μ g/L,自来水样体积为 500 mL 时,加标回收率达到 79.96%。

2.5 自来水中丙烯酰胺的测定

取某地方的自来水 500 mL,经过 0.45 μ m 滤膜过滤后上样,测定该水中丙烯酰胺的含量,平行测定三次。三次取样测定的自来水中丙烯酰胺浓度均小于 WHO 标准中的 0.5 μ g/L,

其平均值为 0.2302 $\mu\text{g/L}$ ，说明自来水中丙烯酰胺的含量能够达标。

表 1 自来水中丙烯酰胺含量测定

编号	峰面积	洗脱液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	水样浓度 ($\mu\text{g/L}$)
1	27997	0.0995	0.199
2	33204	0.1219	0.2438
3	33672	0.1239	0.2478
平均值	31624	0.1151	0.2302
RSD (%)	9.96	11.76	11.76

参考文献:

- [1] 张瑾, 张书香, 李春生, 顾尧. [J]. 化学世界, 1999, 12: 652-655.
- [2] World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking water quality, Vol. 1: Recommendations, 2nd ed.; WHO: Geneva, 1993; p72.
- [3] Marín JM, Pozo OJ, Sancho JV, Pitarch E, López FJ, Hernández F. [J]. Journal of mass spectrometry, 2006, 41: 1041-1048.
- [4] Kawata K, Ibaraki T, Tanabe A, Yagoh H, Shinoda A, Suzuki H, Yasuhara A. [J]. Chromatography A, 2001, 911: 75-83.
- [5] Cavalli S, Polesello S, Sacconi G. [J]. Chromatography A, 2004, 1039: 155-159.
- [6] 傅永霖, 杨文君. [J]. 环境与健康杂志, 1985, 2(4): 24-25.
- [7] Alpmann A, Morlock G. [J]. Journal of Separation Science, 2007, 31(1): 71-77.
- [8] 于红霞, 林志芬, 杨怡, 徐铁莲, 冯建芳, 王连生. [J]. 膜科学与技术, 2002, 22(3): 35-38.
- [9] 汤颀, 汪霄, 汪浩, 鲁宝权. [J]. 环境与预警, 2009, 1(2): 22-24.
- [10] Nordhaus RS, Nair LM, Anderson JM. [J]. Journal of Chromatography A, 1994, 671(1-2): 159-163.

Solid Phase Extraction Disk-High Performance Liquid

Chromatography Determination of Acrylamide in Tap Water

ZHANG Bo, QI Yue, GAO He-nan, BAO James J.*

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Acrylamide is recognized as a carcinogen. According to the rules of WHO, the concentration of acrylamide in the tap water should under the 0.5 $\mu\text{g/L}$. In this paper, using SPE disk, HPLC and UV-Vis, we established a method of rapid enrichment and determination of the residual acrylamide in tap water. Compared with the absorption rate and recovery rate, we chose activated carbon as the adsorbent and pure methanol as the eluant. Under the chromatographic conditions of 5% methanol, flow rate: 0.5 mL/min, we realized the separation between acrylamide and other impurities. We enriched the acrylamide rapidly in 500 mL tap water via activated carbon-SPE disk, and the recovery rate of water sample is 100.2%, recoveries of spiked samples is 79.96%, the concentration of acrylamide in one tap water sample is 0.2302 $\mu\text{g/L}$, which is corresponded with the WHO's standard.

Keywords: Acrylamid; Solid Phase Extraction disk; Activated carbon; Tap water; High performance liquid chromatography.

中空纤维膜液液微萃取法测定 盐酸普罗帕酮-蛋白质结合率

宝贵荣*, 梁清刚, 闫晨, 包建民²

(天津市南开区卫津路 92 号天津大学药物科学与技术学院, 邮编 300072)

血清是血浆中除去纤维蛋白后分离出的淡黄色透明液体, 即纤维蛋白已被除去的血浆。其主要作用是提供基本营养物质、提供激素和各种生长因子、提供结合蛋白。盐酸普罗帕酮化学名为 3-苯基-1-[2-[3-(丙氨基)-2-羟基丙氧基]苯基]-1-丙酮盐酸盐, 是一种临床常用的预防和治疗室上性心律的 I 类抗心律失常药物^[1], 为达到抗心律失常效果, 有时服药剂量较大, 这样有可能会引起相关临床不良反应^[2]。因此研究盐酸普罗帕酮与牛血清 (BSA) 之间的相互作用, 对于提高用药的科学性, 了解药物分子在体内的转运和代谢等具有重要意义。

1 实验部分

1.1 计算公式如下:

$$\text{蛋白结合率的计算公式}^{[3]}: r = \frac{C_b}{C_p} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i c_f}{1 + k_i c_f}$$

C_b 为结合药物的浓度、 C_p 为蛋白的总浓度、 C_f 为有利药物浓度、 n_i 为每个蛋白分子结合的药物分子数、 K_i 为平衡常数、 m 为蛋白分子上结合位点的数。

$$\text{富集倍数计算公式}^{[4]} \text{如下: } E = \frac{C_{a.\text{final}}}{C_{s.\text{initial}}}$$

式中 $C_{a.\text{final}}$ 为萃取后有机相中药物的浓度; $C_{s.\text{initial}}$ 为样品中初始药物浓度。

$$\text{logP 的计算公式}^{[5]}: p = \frac{C_o}{C_w}$$

式中 C_o 为有机相中的药物浓度 C_w 为水相中药物浓度

1.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (岛津)、紫外检测器、486 泵、紫外分光光度计 (岛津)、偏氟乙烯中空纤维膜 (PT101207D Porosity:62% O.D: 1.82 mm ID: 1.50mm Markel corporation USA)、振荡器 (太仓市教科器材厂 HZ-9212S 恒温振荡器)、牛血清 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)、盐酸普罗帕酮 (山东省平原制药厂)、水浴锅、实验用水 Milli-Q 系统 (美国 Millipore 公司)、pH 计 (雷磁 PHS-3C); 甲醇、乙腈为色谱纯、其他试剂均为分析纯; 三乙胺、正辛醇、碳酸氢钠、碳酸钠、乙醇、磷酸。

1.3 色谱条件与溶液的配制及萃取方法

按照药典 (2005) 的方法提取盐酸普罗帕酮溶液。0.1M 碳酸钠和碳酸氢钠溶液按不同体积比来配置不同 pH 溶液。液相条件: C_{18} HPLC 柱子 ODS Hypersil Thermo Dim (250×4.6mm, 5 μ m) 流动相: 甲醇: 乙腈: 1%三乙胺的体积比为 50:7.5:42.5 pH 为 3, 用磷酸调节; 流速: 0.8mL/min; 进样量为 20 μ L; 检测波长: 240nm; 柱温: 37 $^{\circ}$ C

²通讯联系人: 包建民, 男, 天津大学特聘教授, 长江学者, 从事药物分析研究, Tel: (022) 87401575
天津市科技发展计划项目 编号: 08CZKFSH00500 和 05YFGHHZ01600

*第一作者: 宝贵荣, 女, 博士研究生 Email: baoguirong32@yahoo.com.cn

中空纤维膜截成约3 cm 的小段,用甲醇超声清洗15min,以除去表面杂质,晾干。中空纤维膜的一段封死,注入25 μ L的正辛醇。在室温下将装有正辛醇的中空纤维膜置于盐酸普罗帕酮溶液中,在振荡器上震荡3小时,震荡速度为120rpm/min。把萃取液用高效液相色谱进行分析。

1.4 蛋白结合率

在2mL的瓶子中加入0.5mL BSA和一定体积的盐酸普罗帕酮的储备液,在37 $^{\circ}$ C的水浴锅中恒温2小时,然后加入pH=10的碳酸钠和碳酸氢钠缓冲液。加入正辛醇的中空纤维膜放入此溶液当中进行萃取。振动3小时后用高效液相色谱测定正辛醇和样品溶液中的游离药物浓度,进一步计算蛋白结合率。

2 结果

2.1 膜之间的对比

本实验选择:Porosity:23%、50%、62%三种偏氟乙烯中空纤维作为液膜载体,考查其对萃取效率随时间变化的效应。实验结果表明,萃取时间相同时,62%的富集倍数最好,因此在以后的实验中选择62%中空纤维膜为液膜载体。

2.2 pH值的选择

中空纤维膜萃取中,水溶液的pH值对富集倍数影响极大,因此在萃取前样品溶液通常被调节到合适的pH值,以减少分析物的离解并保持中性分子的状态,增大分析物在萃取剂中的溶解度,从而增大萃取效率^[9]。盐酸普罗帕酮的pKa值为9.62,水溶液pH值高于pKa值时,盐酸普罗帕酮以中性分子的形式被萃取到萃取剂中,如果水溶液pH值比10大就在高效液相中检测不出来。图(1)和综合考虑,在后续实验中样品溶液的pH值调节到10。

2.3 盐效应的影响

加入无机盐类(如NaCl等)的目的是利用盐析作用降低药物在水溶液中的溶解度,提高萃取效率。实际上,盐析作用与药物的性质有关,对某些药物不起作用甚至有抑制作用^[6],因为电解质的存在改变了萃取膜的物理特性,从而改变了分析物在有机溶剂中的扩散速率^[6]。在本实验中,通过向样品溶液中加入0-20%(w/v)的氯化钠来研究离子强度对盐酸普罗帕酮的萃取效果影响。从图(2)我们可以看出盐酸普罗帕酮的萃取效果随氯化钠浓度的增加而明显增强。因此,萃取过程中样品溶液中添加20%氯化钠最佳萃取条件。

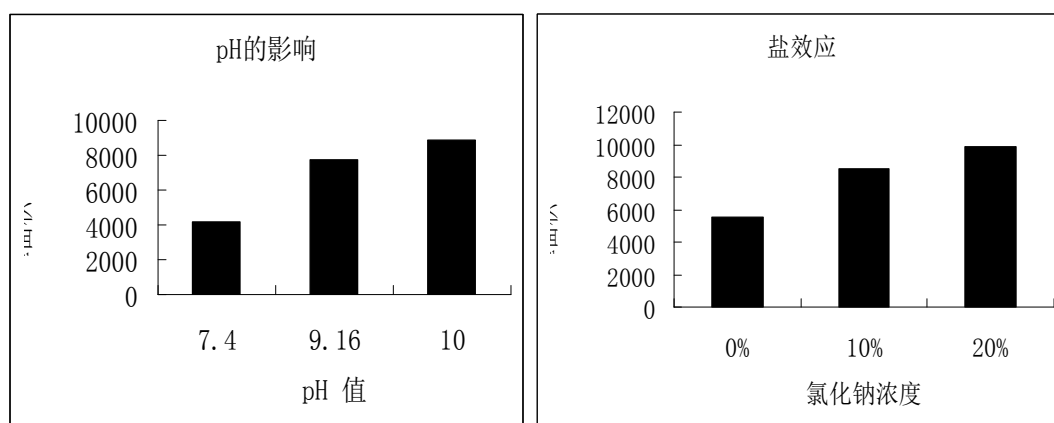


图1 pH对萃取效率影响

图2 盐对萃取效率影响

2.4 体积的选择

实验中样品体积也会对分析物的富集倍数产生影响。本文考察了 1.8-4 mL 样品体积对萃取效率的影响。实验结果如表 1, 萃取样品体积的增加而富集倍数增加。

表 1 样品体积对萃取效率的影响

	4 mL 溶液用 25 μ L 装正辛醇中空纤维膜萃取		1.8 mL 溶液用 25 μ L 装正辛醇中空纤维膜萃取	
浓度 μ g/mL	1.8865	1.5092	1.8865	1.5092
膜内峰面积	67773.75	45475.25	62931.3	42564.3
膜外峰面积	6113	4270	4146	4025.3
LogP	2.75	2.82	2.85	2.76
最大富集倍数	347	353	291	296

2.5 工作曲线

盐酸普罗帕酮的乙醇提取液, 稀释成一系列不同浓度的溶液。以峰面积对相应的盐酸普罗帕酮浓度做工作曲线。工作曲线的线性回归方程为: $Y=935X+829$, $R^2=0.999$ 其中 Y 为峰面积, X 为浓度(μ g/mL)。结果表明, 在 15-100 μ g/mL 范围内, 盐酸普罗帕酮浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密取 0.5 mL 样品溶液, 用碳酸缓冲溶液 (0.1mol/L) 定溶于 100 mL 容量瓶中, 取于 1.8mL 分别装入小瓶中, 分别放入 25 μ L 正辛醇的中空纤维膜。萃取 3 小时, 萃取后取 10 μ L 样品稀释 50 倍后直接进液相分析, RSD 为 2.3%。从该结果可以看出良好的精密度。

2.7 重复性试验

取一份盐酸普罗帕酮的溶液, 稀释至 25 mL, 重复进样 5 次, 测得峰面积值的 RSD 为 0.28%。说明该色谱方法具有良好的重现性。

3 讨论

随着社会的不断发展进步, 绿色、低碳、环保的样品前处理工作得到了很多分析研究者的关注。分析化学发展方的主要方向是少量或不用溶剂的样品处理方法。液相微萃取技术以其自身独特的优点备受关注, 中空纤维膜液-液微萃取与高效液相色谱 (HPLC) 联用直接测定盐酸普罗帕酮与蛋白质结合率新方法, 对影响微萃取的各种因素进行了优化。该方法操作简单、快速、成本低, 而且克服了传统方法的很多缺点。这种微萃取技术在生物样品分析应用中具有很大潜力。

参考文献

- [1] 周大炜, 李发美. [J]. 色谱, 2003, 21(2): 143-146.
- [2] 倪宏刚, 宁满霞, 郑建斌 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(2): 61-63
- [3] 傅献彩. 物理化学[M]. 高等教育出版社. 2006.01.
- [4] Anett Bjørhovde, Trine Grønhaug Halvorsen et al [J]. Analytica Chimica Acta 2003 (491) 155-161
- [5] 付华峰, 关继禹, 等. [J]. 色谱. 2006, 24(6): 566-569.
- [6] 陶俑. 博士论文[M]. 中国科学技术大学. 2009

(下转第 73 页)

HPLC 法初探酶解对黄芪总皂苷组成的影响

钟丹丹, 张金红

(天津医科大学药学院, 天津 300070)

已报道的黄芪中有效成分的常规提取工艺大多采用水提法和醇提法等^[1], 伴随现代工业工程技术的迅猛发展, 一些现代高新技术不断被应用到中药生产中, 但这些方法对仪器设备有特殊要求, 有的仅限于实验室使用, 目前还没有广泛推广到工业生产中, 而酶解辅助提取法不需要特殊设备, 易操作。但酶解是否会破坏中药有效成分的组成仍有争议^[2]。本研究用 HPLC 对酶解和非酶解提取的黄芪总皂苷进行比较。

1 实验部分

1.1 材料与方法

1.1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器; XWK-3A 空气泵 (天津市华生分析仪器厂); AT-330 柱温箱 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); SZ-93 自动双重纯水蒸馏水器 (上海强运科技有限公司); W2-100 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 电热恒温水浴锅 (北京科伟永鑫实验仪器设备厂); KS-600D 超声清洗机 (宁波科生仪器厂); BP-211D 电子分析天平 (德国赛多利斯公司); HITACHI UV-3310 紫外可见分光光度计; HQ-60 涡旋混合器 (北京同正生物技术发展公司)

1.1.2 药品与试剂

黄芪 (购自天津市药材公司, 批号: Y0805261、Y0805264、Y0805267); 硫酸 (固安县清远化工厂, 分析纯); 无水乙醇 (天津市康科德科技有限公司, 分析纯); 75%乙醇 (天津基准化学试剂有限公司, 分析纯); 正丁醇 (天津基准化学试剂有限公司, 分析纯); 甲醇 (天津康科德科技有限公司, 色谱纯); 流动相用水为重蒸水。

1.2 黄芪总皂苷的提取

1.2.1 酶法辅助提取

称取干燥黄芪药材 (1~2cm) 各约 10g 于 10mL 圆底烧瓶中, 每份中加入纤维素酶 0.10g (占药材干重 0.7%), 并分别加入经 0.3% H₂SO₄ 调至的 pH 为 5.0、的蒸馏水 30mL, 于 50℃ 水浴中酶解 2.5h, 过滤, 酶解液用 NaOH 溶液调至中性, 备用。

于药材中加入 70%乙醇溶液 80mL, 于 90℃ 水浴中回流 1h, 过滤, 滤液与上述酶解液合并, 浓缩至近干, 用 10mL 蒸馏水溶解, 再用 30mL 水饱和正丁醇溶液萃取 4 次, 正丁醇液减压浓缩至近干, 减压真空干燥, 得黄芪粗皂苷。

1.2.2 常规提取

称取干燥黄芪药材 (1~2cm) 各约 10g 于 10mL 圆底烧瓶中, 加入经 0.3% H₂SO₄ 调至的 pH 为 5.0、的蒸馏水 30mL, 于 50℃ 水浴中酶解 2.5h, 过滤, 酶解液用 NaOH 溶液调至中性, 备用。以下操作同 1.2.1。

1.3 样品溶液的配制

称取适量粗皂苷, 用无水乙醇超声溶解并定容于 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得黄芪总皂苷供试品液。

1.4 黄芪甲苷标品溶液的配制

精密称取真空干燥至恒重的黄芪甲苷对照品 12.53 mg, 置于干燥的 25 mL 容量瓶中, 加无水乙醇超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 得黄芪甲苷对照品溶液 (0.501 mg/mL)。

1.5 色谱条件

Diamonsil C₁₈ (250mm×4.6mm, 5μm) 色谱柱; 流动相乙腈-水 (32:68); 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL; 检测器漂移管温度 105 °C; 载气流速为 2.5 L·min⁻¹; 柱温 35 °C。

2 结果

取黄芪甲苷标准品溶液、常规法提取的黄芪总皂苷溶液和酶法辅助提取的黄芪总皂苷溶液分别进样, 在以上色谱条件下进行测定。结果如下:

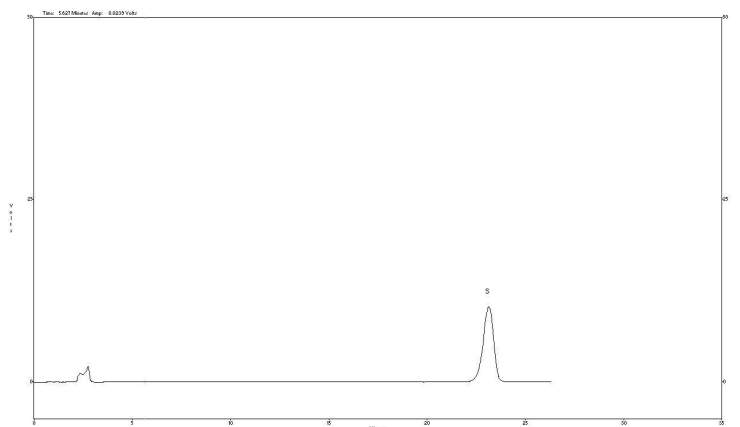


图 3-15 黄芪甲苷对照品的 HPLC 图

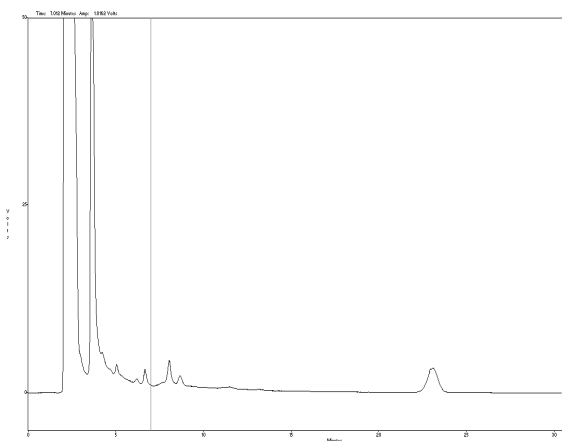


图 3-16 常规法提取黄芪皂苷的 HPLC 图

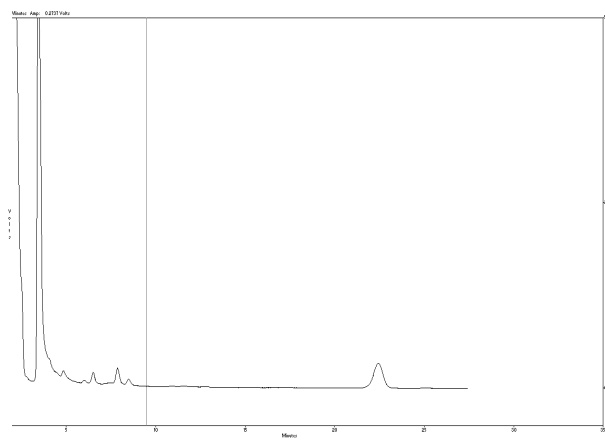


图 3-17 纤维素酶法提取黄芪皂苷的 HPLC 图

由图 3-15~3-17 可知, 酶对照法提取及酶解提取的黄芪总皂苷, HPLC 图谱的峰位及峰数基本一致, 说明酶法提取黄芪总皂苷并不会破坏其原来的组成成分。

3 讨论

文献已报道的黄芪皂苷测定方法有: 比色法、薄层扫描法、HPLC 法 (反相、紫外)、HPLC-示差折光检测器法、HPLC-ELSD 法 [3]。由于中药组分复杂, 干扰严重, 采用比色法只能检测总皂苷的含量, 无法反映各种皂苷的变化; 薄层扫描法具有分离快速、操作方便, 但重现性较差。HPLC-紫外检测器测定, 溶剂背景难以消除, 且杂质噪音大, 皂苷仅有末端吸收, 检测灵敏度低, 误差较大。HPLC-示差折光检测法受流动相组成、温度、压力变化的影响较大, 应用受到一定限制。HPLC-ELSD 法为通用型质量检测器, 其信号响应与被测物

的质量成正比,不依赖于被测物的光学特性及官能团,理论上可用于挥发性低于流动相的任何组分的检测,对无紫外吸收或紫外末端吸收的物质有较好的响应。该法灵敏度高,干扰少,所以对酶辅助提取后黄芪皂苷的分析采用 HPLC-ELSD 法。

4 结论

本文考察了酶解法提取的黄芪中有效组分的结构是否发生变化,对酶解与未经酶解提取的黄芪总皂苷进行比较分析,两组皂苷样品的 HPLC 色谱图的峰位及峰数基本一致。说明酶法提取不会对黄芪中主要药效组分黄芪总皂苷成分的结构造成影响。

参考文献:

- [1] Lin L Z,He X G,Lindenmaier M,*et al*.Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of Astragalus mongholicus and A.membranaceus[J].J Chromatogr A,2000,876 (1/2):87-95.
- [2] 韩 颂,朱飞,李晓晖.纤维素酶在黄芩提取工艺中应用的初步探索[J].黑龙江医药学报.1997,10 (6):13-16.
- [3] 李 翔,娄子洋,柴逸峰.黄芪药材中有效成分定量分析方法研究进展[J].药物分析杂志,2005,25:999-1002.

(上接第 70 页)

Determination of protein- propafenone hydrochloride binding by Hollow Fiber Membrane Liquid-Liquid Microextraction

Guirong.Bao James J.Bao

School of pharmaceutical science and technology, Tianjin University, 92 Weijin Road, Tianjin 300072

Abstract: To correctly and efficiently analyze propafenone hydrochloride, a new method has been created using hollow fiber solvent micro extraction. This method is able to determine the partition coefficient of an organic compound between the water phase and the *n*-octanol phase. Some advantages to this method include increased speed, easier maneuvering, and a lack of large volume sample consuming. Several factors effecting the extraction enrichment factor are greatly optimized, such as the salt out effect and the pH value of the aqueous. Overall, this method is an improvement over previous techniques because it has enhanced the speed, simplified the process, and lessened the negative impact on the environment.

Key words: hollow fiber membrane ; high performance liquid chromatography (HPLC) ; propafenone hydrochloride; Bovine Serum Albumin(BSA).

柱前衍生-高效液相色谱法测定饮用水中 草甘膦残留量的研究

夏义平¹, 李建平², 马永民³

(天津市疾病预防控制中心, 300011)

草甘膦 (glyphosate), 化学名为N-(膦酰基甲基)甘氨酸, 属于弱有机酸, 是一种常用的水溶性除草剂。近年来, 随着转基因抗草甘膦作物的发展, 草甘膦用量逐年增加, 已成为世界上应用最广、产量最大的农药品种^[1]。GB 5749-2006《生活饮用水卫生标准》规定, 草甘膦在饮用水中的含量不得超过0.700mg/L^[2]。目前, 水中草甘膦的检测方法主要有液相色谱法^[3]、离子色谱法^[4]和气相色谱质谱联用法^[5], 采用质谱检测, 仪器设备昂贵, 不易推广。GB 5750-2006《生活饮用水标准检验方法》^[6]中草甘膦的检测采用的是柱后衍生离子交换色谱法, 在色谱柱后增加自动衍生设备, 操作繁琐且不易掌握。本实验采用柱前衍生高效液相色谱法测定饮用水中草甘膦含量, 试验结果表明, 该法简便快速, 稳定可靠。

1 材料与方方法

1.1 仪器与试剂

1200型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司, 配荧光检测器), 200 μ L微量加样器。

试剂除另有说明外, 均为分析纯。甲醇 (色谱纯), 磷酸二氢钾, 硼酸, 氯化钠, 氢氧化钠, 次氯酸钠溶液 (有效氯 ≥ 10.9), 草甘膦标准溶液 [ρ (草甘膦)=10.0 μ g/mL] (农业部环境保护科研检测所)。

氧化剂配制: 取次氯酸钠溶液 (2.1.6) 3.5mL 加水稀释定容至 50mL, 取 2.0mL 该溶液, 0.348gK₂HPO₄, 2.32gNaCl, 0.08gNaOH, 加 100mL 水溶解混匀。

衍生剂配制: 称取邻苯二甲醛 100mg, 加 2mL 甲醇溶解, 加硼酸缓冲液 (PH=9.6) 20mL, 再加入 2-巯基乙醇 0.16mL, 混匀。

1.2 标准系列溶液的配制

准确移取草甘膦标准溶液1mL于10mL容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成浓度为1.0 μ g/mL的草甘膦标准使用溶液, 分别移取0.25、0.5、1.0、2.0、5.0mL标准使用液至10mL容量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成浓度为0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ g/mL标准系列溶液。依次从标准系列溶液中取200 μ L, 氧化、衍生后注入高效液相色谱仪, 记录各次色谱峰面积, 并绘制峰面积—浓度 (μ g/mL) 曲线。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: DIMA C18 柱, 250mm \times 4.6mm, 5 μ m; 流动相: 甲醇+0.05mol/L 磷酸二氢钾 (PH=6.0)+四氢呋喃=45+55+2; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 50 μ L; 检测器: 荧光检测器, Ex: 230nm, Em: 450nm。

1.3.2 标准曲线绘制

分别准确吸取0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μ g/mL的草甘膦标准系列各200 μ L, 氧化、衍生后注入高效液相色谱仪, 记录各次色谱峰面积, 并绘制峰面积—浓度 (μ g/mL) 曲线。

1.3.3 样品测定

1.3.3.1 氧化

取水样 200 μL 于自动进样瓶中, 加入 200 氧化剂, 振摇混匀。

1.3.3.2 衍生

氧化后, 样品瓶中加入 200 μL 衍生剂, 混匀, 迅速进样, 测定其峰面积。

1.3.3.3 定量分析

注入同体积的标准溶液和水样, 分别测定峰面积响应值, 以草甘膦的保留时间定性, 根据峰面积, 通过标准曲线的回归分析计算水样中草甘膦的浓度。

2 结果与讨论

2.1 流动相选择

本实验以甲醇-磷酸盐缓冲液为流动相, 以甲醇与磷酸盐缓冲液混合溶液的不同体积比 (分别为 35:650、45:55、55:45) 为条件进行测试, 结果表明甲醇-磷酸盐缓冲液体积比为 45:55 时, 样品的出峰时间、灵敏度较适宜。流动相中加入少量四氢呋喃后峰形较好。

2.2 检测波长选择

本实验采用检测器的光源为氙灯, 依据 GB 5750-2006《生活饮用水标准检验方法》^[6] 规定, 选择激发波长为 230nm, 发射波长选择 450nm, 测定灵敏度好。图 1 为草甘膦标准色谱图。

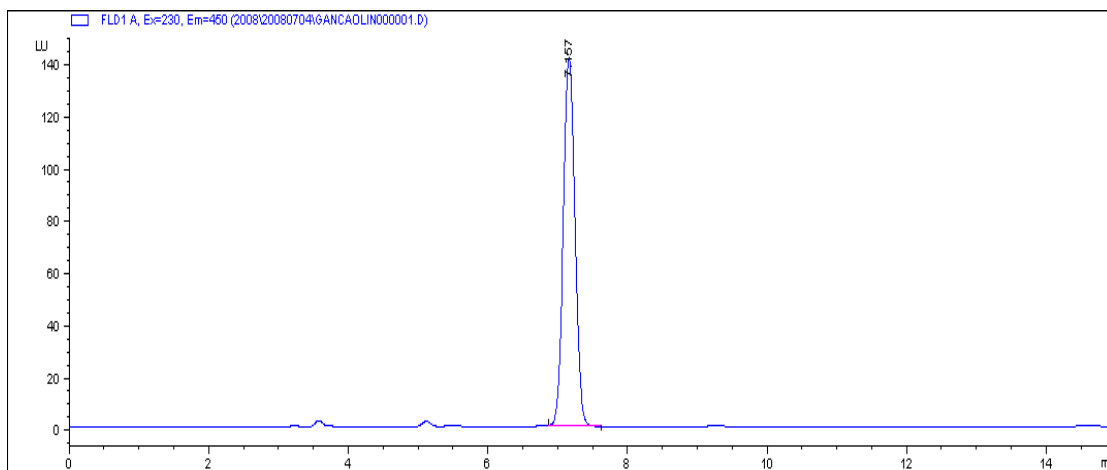


图 1 草甘膦标准色谱图

2.3 标准曲线及检出限

配制 0.025~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列溶液, 分别取 200 μL , 氧化、衍生后进样分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 其线性方程为 $y=1571.69x+60.789$, 相关系数 $r=0.9992$ 。方法最小检测浓度为 25 $\mu\text{g/L}$, 满足 GB 5750-2006《生活饮用水标准检验方法》^[6] 要求。

2.4 方法准确度及精密度实验

取 6 份水样添加不同量的草甘膦标准溶液, 按上述氧化、衍生步骤进行实验, 计算回收率和标准偏差, 水样中草甘膦添加浓度分别 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。结果见表 1。

表 1 草甘膦准确度与精密度实验结果 (n=6)

加入量 ($\mu\text{g/mL}$)	测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	RSD (%)
0.050	0.051、0.054、0.050、0.047、0.043、0.053	86~108	8.2
0.50	0.49、0.48、0.46、0.51、0.52、0.53	92~106	5.3

2.5 样品测定

采用本方法检测出厂水共 40 余份样品, 均未检出草甘膦。

(下转第 79 页)

大管区带电泳-在线紫外检测技术对 有机酸分析方法的建立

孙小春, 包建民*

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

有机酸按结构可分为3大类, 即脂肪族类、芳香族类和萜类, 中草药的叶、根、特别是果实中广泛分布着大量的有机酸。近年来发现许多有机酸都具有生理活性, 如抗癌、抑菌、止血、镇咳和祛痰等作用, 所以对有机酸类化合物的分离分析显得尤为重要^[1]。

毛细管电泳技术因其具有高效、快速、分离模式多样化等一系列的优势在分离分析领域发挥着重要作用, 目前毛细管区带电泳在有机酸的分离分析研究中得到广泛应用^[2-5]。

传统的毛细管电泳技术, 由于细内径毛细管的采用(常用50 μm 和75 μm), 使得该技术存在载样量少、检测灵敏度相对较小的问题, 本实验中, 采用内径为1000 μm 的石英管来作为分离通道, 同时为了及时、有效的消除焦耳热的影响, 以外径为690 μm 的毛细管来作为内制冷通道, 实验中将毛细管区带电泳模式转移至大管电泳系统中, 通过实验条件的摸索和优化, 建立了大管区带电泳技术对有机酸的分离方法, 成功分离了六种有机酸, 并将该方法应用于市售酱油中防腐剂的检测, 进一步证明了大管区带电泳可作为一种新型的分离分析技术应用于有机酸化合物的研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

大管电泳系统(实验室自组装), DL-180A 超声波清洗仪(上海之信仪器有限公司); 未涂层熔融石英毛细管柱(河北永年锐沅色谱器件有限公司); AL 104电子天平、Delta-320-S pH计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司), S21-2恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)。

对甲苯磺酸、苯甲酸、邻碘苯甲酸、苯乙酸、肉桂酸、烟酸(天津大学科威公司); 羟乙基纤维素(HEC, 郑州诚信化工有限公司), 醋酸(36%)、无水乙酸钠(天津大学科威公司), 以上所有试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

实验条件: 分离通道总长度: 15 cm; 有效长度: 8 cm; 检测波长: 214 nm; 进样量: 200 nL; 进样方式: 负极压力进样; 20 mmol/L pH=4.0醋酸缓冲溶液(含0.6% HEC); 内制冷水流速: 15 mL/min; 约11 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 实验装置示意图

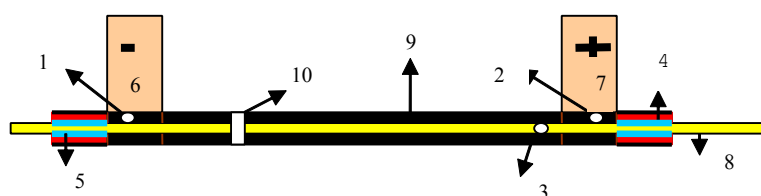


图1 cartridge 示意图

1,2-缓冲液进口, 3-进样毛细管, 4,5-中空纤维膜, 6,7-缓冲槽, 8-内制冷毛细管, 9-石英管, 10-检测窗口

2 结果

2.1 缓冲液pH的考察

缓冲溶液的 pH 值直接影响到分离物质的解离程度,从而会对分离效果产生不同程度的影响,实验中分别配制了 pH=3.6、pH=4.0、pH=4.5 和 pH=5.0 的醋酸缓冲溶液(20 mmol/L),对这一因素进行了考察,由图 2 可知,当 pH 值为 4.0 时可以得到最好的分离效果。

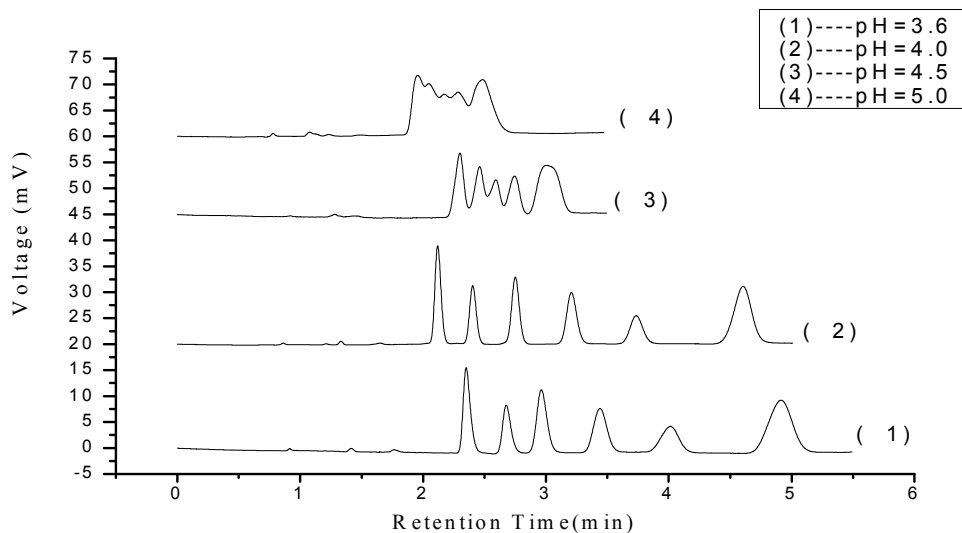


图 2 缓冲液 pH 对结果的影响

2.2 缓冲液浓度的考察

缓冲溶液浓度的变化也是影响分离结果的因素之一,溶液浓度过低,其缓冲能力较小,不易维持缓冲液 pH 值的稳定,而当浓度过高时,会导致体系中产生大量的焦耳热,两种情况下均会影响柱效。实验中配制了 10 mmol/L、20 mmol/L 和 30 mmol/L 三个浓度的缓冲液,考察了浓度的变化对有机酸混合物分离结果的影响,由图 3 可以看出在 20 mmol/L 醋酸盐缓冲液体系中可以得到较为满意的分离结果,所以选择缓冲液最佳浓度为 20 mmol/L。

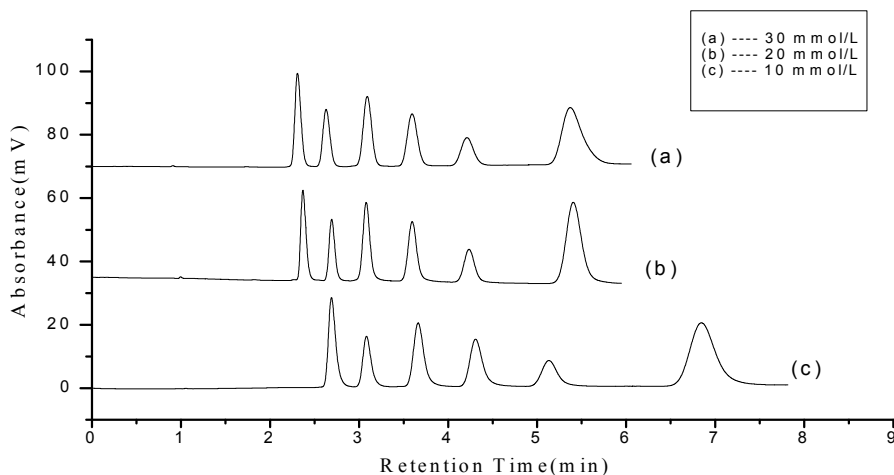


图 3 缓冲液浓度对结果的影响

2.3 分离电压的考察

一般而言在毛细管电泳时,若电泳时产生的焦耳热可以忽略,目标组分的柱效和分离度是随着外加电压的升高而增加的,但是如果分离电压过分增大,会在电泳过程中产生较大的焦耳热从而降低分离效率,在本实验中,分别选取 1500 V, 2000 V, 2500 V, 3000V, 3500 V, 4000 V 作为分离电压来考察其对分离效果的影响,从而选取适宜的施加电压范围,实验结果见图 4。根据图 4 中的数据,依次求算每个分离电压下六种组分的平均理论塔板数,然后以平均理论塔板数对电压作图,结果如图 5 所示,在 3000 V 电压时,体系的分离效率最高,原因在于高电压时导致焦耳热的积累,导致分离效率下降。

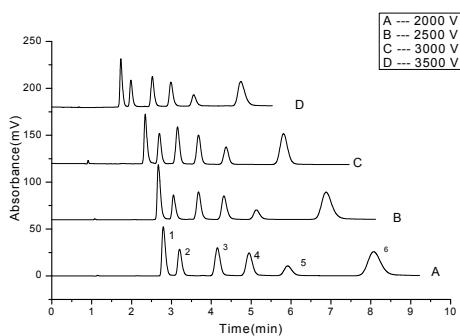


图 4 分离电压对结果的影响

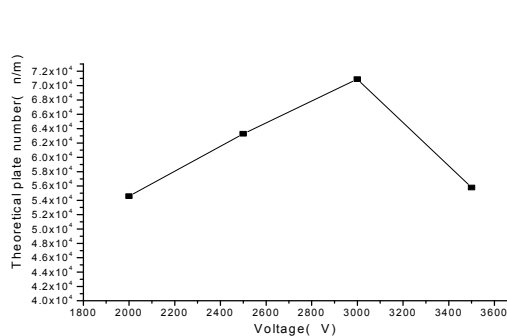


图 5 不同电压下柱效计算

2.5 酱油中防腐剂的检测

苯甲酸作为防腐剂广泛应用于酱油、水果汁、果酱等食品中,国家有关标准规定酱油中苯甲酸的量不得超过 1 g/kg。本实验中利用大管区带电泳模式对市售某一品牌酱油中防腐剂的种类及含量做了研究。

2.5.1 酱油中苯甲酸的测定原理

苯甲酸不易溶于水,一般以盐的形式存在于食品中,本实验中将样品酸化后,用乙醚提取纯化苯甲酸,利用大管区带电泳对提取样品进行分离测定。

2.5.2 标准曲线的建立

将 1.0 mg/mL 的苯甲酸储备液稀释成浓度分别为 0.04 mg/mL、0.08 mg/mL、0.12 mg/mL、0.16 mg/mL、0.20 mg/mL、0.24 mg/mL 的标准使用液,取各浓度溶液 200 nL 依次进行分析,每个浓度平行测定三次,以质量浓度 (mg/mL) 为横坐标,峰面积为纵坐标求出回归方程和相关系数,其线性方程为 $y = 2.0 \times 10^6 x + 2652.6$, $R^2 = 0.9997$,结果表明在 0.04~0.24 mg/mL 范围内浓度与其相应的峰面积成良好的线性关系。

2.5.3 酱油中苯甲酸浓度的测定

进样酱油提取液样品,每次进样 200 nL,连续进样三次,求取平均峰面积,计算酱油中苯甲酸浓度。

表 1 酱油样品进样峰面积

编号	1	2	3	平均
峰面积	211675	214921	209244	211946.7

通过计算,本实验测得所选用的酱油样品中苯甲酸添加量为 0.397 g/kg,防腐剂含量符合国家标准规定。

3 讨论

本研究利用大管区带电泳技术同时分离了对甲苯磺酸、苯甲酸、苯乙酸、邻碘苯甲酸、肉桂酸和烟酸六种有机酸,在优化的实验条件下,10 min 内即可完成分离,实验操作简单,分离快速,最后又将建立的分析方法应用于实际样品中有机酸的分析,结果表明该方法可作为一种新型的常规的分析技术用于有机酸的分离研究中。

参考文献

- [1] 马海乐, 杨恒星, 代春华. [J]. 食品科学, 2005, 26(2): 189-192.
- [2] Rivasseau C, Boisson AM. [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1129(2): 283-290.
- [3] He J, Chen SW, Yu ZN. [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 973(1-2): 197-202.
- [4] Li W, Gong SX, Wen DW. [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1049(1-2): 211-217.
- [5] Mardones C, Hitschfeld A, Contreras A. [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1085(2): 285-29.

Analysis of Organic Acids by Wide-bore Zone Electrophoresis with UV Detection

SUN Xiao-chun, James J. Bao*

School of pharmaceutical science and technology, Tianjin University, 92 Weijin Road, Tianjin 300072

Abstract: Biological activity of many organic acids have been found in recent years, and capillary electrophoresis plays an important role in the analysis of organic acids. In this paper, we established a method to analyze organic acids using wide-bore zone electrophoresis (WBZE) with UV Detection. Six kinds of organic acids are separated successfully under the optimized conditions, and the process can be completed within 10 min. Then, the established method was used to analyze real samples. The results show that this new method can be used to analyze organic acids.

Key words: Capillary zone electrophoresis; Wide-bore zone electrophoresis; Organic Acid.

(上接第 75 页)

3 结论

采用柱前衍生, 高效液相色谱-荧光检测器测定水中草甘膦, 方法简便、快速、准确, 检出限符合要求。无需特殊设备, 适于基层检测机构普及开展相关检测项目。该方法适用于饮用水中草甘膦残留量的检测。

参考文献:

- [1] 顾友多, 范宾, 董学胜, 等. 草甘膦的危险性分类研究. 职业卫生与应急救援, 2008, 26(2): 80-83.
- [2] GB 5749—2006 生活饮用水卫生标准.
- [3] 侯占伟, 王朝虹. 高效液相色谱法测定水中草甘膦. 刑事技术, 2003 (6): 9-10.
- [4] 方黎, 苏宇亮, 吴杰, 等. 离子色谱法测定饮用水中的草甘膦. 现代科学仪器, 2008 (2): 54-55.
- [5] 程雪梅, 周敏. 气相色谱法-质谱法测定香蕉和灌溉水中的草甘膦及其代谢物的残留量. 色谱, 2004, 22(3): 288-289.
- [6] GB/T 5750.9—2006 生活饮用水标准检验方法.

酒石酸托特罗定有关物质检查方法研究

靳朝东, 许瑞征, 薛津

(天津药物研究院分析测试中心, 天津 300193)

酒石酸托特罗定作为一种毒蕈碱受体拮抗剂新药, 目前已在包括美国、英德国在内的多个国家上市, 临床上用于治疗膀胱活动过度引起的尿急、尿频、急迫性尿失禁等症状。为控制药品的内在质量, 建立有关物质检查方法很有必要。本文采用反相高效液相色谱法, 建立了酒石酸托特罗定原料药的有关物质检查方法, 获得了良好的分离效果, 可达到有效控制药品质量的目的。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统: Rainin SD-200 泵, Rainin UV-C 紫外检测器, SP-4600 积分仪, HP1100 液相系统。磷酸氢二铵 分析纯, 甲醇 色谱纯, 去离子水。酒石酸托特罗定原料药六批, 均为本院合成室合成并制备。

1.2 溶液制备

1.2.1 供试品溶液的制备

取酒石酸托特罗定样品, 加流动相适量, 振摇使溶解, 加流动相制成每 1mL 中约含 0.4mg 的酒石酸托特罗定溶液, 摇匀, 作为供试品溶液。

1.2.2 对照溶液的制备

精密量取酒石酸托特罗定溶液供试品溶液 1mL, 置 100mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀即得。

1.3 测定方法

取本品, 加流动相适量, 振摇使溶解, 加流动相制成每 1mL 中约含 0.4mg 的酒石酸托特罗定溶液, 作为供试品溶液, 精密量取供试品溶液 1mL, 置 100mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为对照溶液。量取对照溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪, 调节检测器灵敏度, 使主成分峰为满量程的 10~20%, 量取供试品溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍, 供试品溶液的色谱图中如有杂质峰, 各杂质峰的峰面积不得大于对照液主峰的峰面积的一半 (0.5%); 各杂质峰峰面积的和, 不得大于对照溶液主峰的峰面积 (1.0%)。

2 结果

2.1 色谱条件的选定

色谱柱为 Kromasil C₁₈(5 μ m) 200mm \times 4.6mm I.D. 不锈钢柱(天津市三维色谱仪器配件厂)。流动相为甲醇-0.025mol/L 磷酸氢二铵溶液 (pH3.0 \pm 0.1) —52:48; 检测波长 220nm; 流速为 1mL/min; 进样量 20 μ L; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测器灵敏度 0.2AUFS。在选定的色谱条件下, 酒石酸约在 2 分钟出峰, 托特罗定约在 15 分左右出峰, 在托特罗定主峰前有两个未知杂质峰。托特罗定与杂质峰可达到基线分离。

2.2 方法专属性试验

2.2.1 检测波长的选择

以流动相为溶剂,制成含酒石酸托特罗定 0.02mg/mL 的溶液,测定其紫外吸收光谱图,测得酒石酸托特罗定在 283nm 有一紫外吸收峰,但吸收值较小,而本品在末端的吸收值比较高,所以选择 220nm 为测定波长。

2.2.2 破坏性试验

对酒石酸托特罗定进行了酸性、碱性、氧化、光照以及加热破坏性实验,结果表明:本品经苛性破坏性试验后,杂质含量均有所增加,但托特罗定主峰与杂质峰能很好的分离,说明该色谱条件对样品的降解产物能够很好的检出。

2.3 线性关系

取本品约 25mg,精密称定,置 25mL 量瓶中,加流动相配制成每 1mL 约含酒石酸托特罗定 1.0mg 的溶液,分别精密吸取 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 和 7.5mL 置 10mL 量瓶中,分别加流动相稀释至刻度,相应的浓度为 0.0484、0.0968、0.194、0.484、0.726 和 0.968mg/mL,分别取 20 μ L 注入液相色谱仪,以酒石酸托特罗定浓度为纵坐标,以相应的峰面积为横坐标 (A) 进行线性回归,其回归方程为 $Y(\text{mg/mL})=0.000066A+0.00096$, $r=0.99999$ ($n=7$),线性范围为 0.0242~0.968mg/mL,线性关系良好。

2.4 精密度试验

取 1.2.1 项下供试品溶液照上述色谱条件连续进样测定 6 次,结果酒石酸托特罗定有关物质含量为 0.083%,相对标准偏差 (RSD) 为 1.90% ($n=6$)。

2.5 最小检出限

取对照溶液稀释至不同浓度,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,以能准确积分的浓度作为最小检出限,最小检出限为 0.061ng (0.076%),峰面积为 1.96。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,在室温下放置 24 小时后测定,结果表明样品的有关物质含量没有变化,表明样品溶液在室温下 24 小时内稳定。

2.7 样品测定

取酒石酸托特罗定样品,照 1.2.1 项下溶液制备方法制备供试品溶液,照 1.3 项下方法测定,结果见表 1,色谱图见图 1。

表 1 酒石酸托特罗定 6 批样品有关物质检查结果

批号	000218	000222	000226	000701	000705	000708
有关物质含量 (%)	0.08	0.12	未检出	0.51	未检出	0.15

3 讨论

酒石酸托特罗定在 283nm 处有一小的吸收峰,但吸收系数较小,所以未选用。选用波长 220nm 测定,灵敏度约为 283nm 的 4 倍,但当加大进样量时,用 283nm 检测有关物质结果与用 220nm 检测的结果一致。另外,在 220nm 检测,酒石酸有一定的吸收,所以可以用来同时做本品中的酒石酸和托特罗定的鉴别,而在高波长情况下,酒石酸几乎无吸收,无法做鉴别。

对流动相的选择,分别试验了甲醇-0.05mol/L 醋酸铵,甲醇-0.025mol/L 磷酸二氢铵,甲醇-0.01~0.05mol/L 磷酸氢二铵等流动相系统,均可分离酒石酸托特罗定及其有关物质,但醋酸铵在 220nm 的吸收较大;0.025mol/L 磷酸二氢铵和 0.01mol/L 磷酸氢二铵稍有拖尾现象。

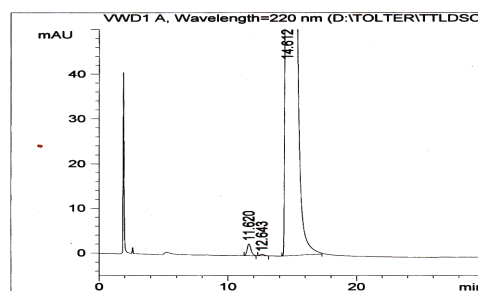


图1 酒石酸托特罗定有关物质HPLC图 (220nm)

(下转第 85 页)

基质固相分散—分子印迹固相萃取联用 测定土壤和葡萄中三唑类杀菌剂

刘维娟, 张玲, 郭亚萍, 张智超*

(南开大学元素有机化学国家重点实验室, 南开大学天津市农药科学重点实验室, 天津 300071)

基质固相分散(MSPD)集提取和净化于一个简单的步骤中完成,不需要昂贵的仪器,具有操作简单、耗时少等诸多优点,但由于所用的分散剂不具有选择性,因而在色谱分析之前常需对MSPD提取液作进一步净化^[1]。本研究利用分子印迹固相萃取(MISPE)具有高选择性的特点,运用MISPE对MSPD提取液进行净化,建立了复杂基质(土壤和葡萄)中7种三唑类农药的多残留分析方法。该方法将MSPD的快速提取的特点和MISPE的高选择性的特点结合起来。目前,三唑类杀菌剂分子印迹聚合物用于固相萃取的研究尚未见报道,MSPD/MISPE联用的研究仅有2篇报道^[2,3]。

1 实验部分

1.1 土壤和葡萄

3种类型的农田土壤(A, B和C)的主要物理化学参数见表1,其中土壤A采自天津,土壤B和C采自湖南,风干后过20目筛。葡萄购自本地菜市场。上述土壤和葡萄用本研究建立的方法均未检出分析物。

表1 三种土壤的性质

土壤	pH	有机质 (%)	砂粒 (%)	粉粒 (%)	粘粒 (%)
A	8.1	1.9	16	68	16
B	7.8	0.9	14	28	58
C	6.1	3.1	24	46	30

1.2 分子印迹聚合物(MIP)的合成

准确称取0.05916 g三唑醇,加0.4 mmol MAA和0.6 ml 甲苯,将混合液放在冰水中超声,然后放在冰箱中冷藏一夜;将2 mmol EGDMA和40 mg AIBN加入上述混合液后超声,通氮气5 min,密封,于60 °C水浴中加热24 h。研磨,过100~400目筛(38~165 μm),用甲醇/乙酸(9/1 v/v)溶液索氏提取除去模板后,用丙酮沉降一夜后,用红外灯烘干,备用。

1.3 MSPD-MISPE 联用

MSPD: 称取20.0 g样品壤置于研钵中,加入1.00 ml上述七种三唑类杀菌剂的甲醇混合标准溶液,混合均匀置于通风橱中,至溶剂挥发干。加入16 g硅胶,8 ml水,研磨均匀。在层析柱下端放小块脱脂棉,依次填入5 g无水硫酸钠、上述研磨混合物,加盖滤纸,敲实。用30 ml乙酸乙酯加压淋洗层析柱,收集洗脱液,旋蒸浓缩至近干后用氮气吹干,用5 ml甲苯超声溶解,待MISPE净化。

MISPE: 依次用甲醇/乙酸(4/1 v/v)、二氯甲烷、甲醇、甲苯各5 ml将MISPE柱(17×150 mm,具有C筛板的玻璃柱,湿法装填250 mg MIP)条件化后,将上述MSPD提取液上样,用6 ml甲苯淋洗。用8 ml乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干洗脱液,加入1.00 ml甲苯超声溶解,待GC-ECD检测。

2 结果与讨论

2.1 MISPE 条件的优化

通过考察功能单体（甲基丙烯酸、丙烯酰胺、苯乙烯、4-乙烯基吡啶）、模板/功能单体/交联剂的比例、致孔剂（甲苯、 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 、乙腈、二甲基甲酰胺、异丙醇、乙酸乙酯）及用量等聚合条件对 MIP 选择性吸附能力的影响，确定了 MIP 合成条件（1.2 节）。

对 MISPE，优化了淋洗溶剂的类型（甲苯和 CH_2Cl_2 ），结果表明，用致孔剂甲苯淋洗时，不仅能破坏 MIP 对分析物的非特异性吸附，而且不影响 MIP 的特异性吸附，而 CH_2Cl_2 破坏 MIP 的特异性吸附，故确定甲苯为淋洗溶剂。进一步优化了洗脱溶剂的类型（二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮和甲醇），结果表明这 4 种溶剂均能将分析物从 MISPE 柱上洗脱下来，考虑到乙酸乙酯毒性最小，故确定乙酸乙酯为洗脱溶剂。

2.2 MSPD-MISPE 用于土壤样品的前处理

制备 3 种土壤的添加样品，设置 3 个添加水平：0.05、0.25 mg/kg 和各种分析物最低定量限浓度（三唑酮 0.01 mg/kg，三唑醇、多效唑 0.025 mg/kg，烯效唑 0.02 mg/kg，烯唑醇 0.01 mg/kg，戊唑醇、双苯三唑醇 0.04 mg/kg）。经过 MSPD 一步前处理后的 3 种土壤样品中各分析物的回收率和相对标准偏差分别为 104~524%和 6~16%，杂质干扰特别严重，但经 MISPE 进一步净化后，各分析物的回收率和相对标准偏差分别为 79~113%和 1~5%。典型色谱图见图 1，从图中可看出 MISPE 的净化效果十分明显，并且在样品出峰处没有杂质峰干扰。

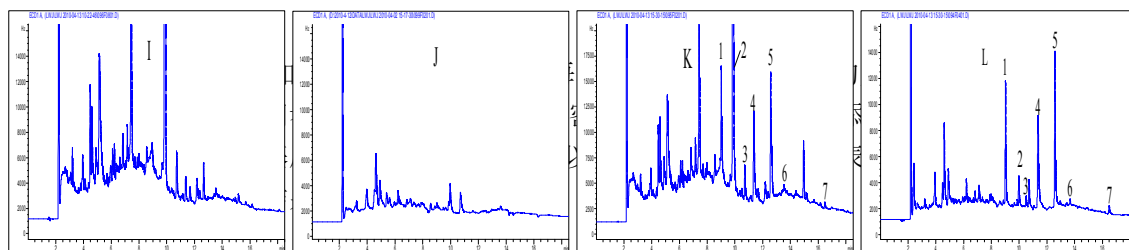


Fig. 1 GC- ECD chromatograms of (I) MSPD extraction and (J) MSPD-MISPE extraction from blank soil C sample, (K) MSPD extraction and (L) MSPD-MISPE extraction from soil C sample spiked at 0.05 mg/kg. Peak identification: 1-triadimefon, 2-triadimenol, 3-paclobutrazol, 4-uniconazole, 5-diniconazole, 6-tebuconazole, 7-bitertanol.

考虑到新鲜的添加样品中分析物和土壤基质没有充分作用，将土壤 A 样品进行老化，在不同的老化时间时，取样分析，测定结果见表 2。不同老化时间时各分析物的回收率没有显著性的差异，这说明所建立的分析方法可用于实际样品的测定。

表 2 土壤 A 添加样品（0.05 mg/kg）不同老化时间是分析方法对三唑类分析物的回收率(%) \pm RSD(%)

分析物	老化时间				
	1h	7天	14天	21天	28天
三唑酮	88.9 \pm 1.4	86.2 \pm 0.6	83.6 \pm 1.2	83.2 \pm 2.3	82.8 \pm 1.7
三唑醇	89.4 \pm 2.1	86.4 \pm 1.4	85.9 \pm 3.4	85.6 \pm 2.7	85.1 \pm 1.9
多效唑	93.6 \pm 2.5	89.6 \pm 3.2	89.3 \pm 2.1	88.6 \pm 2.9	88.1 \pm 1.4
烯效唑	92.2 \pm 1.2	89.4 \pm 2.1	88.5 \pm 1.8	88.3 \pm 3.2	87.9 \pm 2.5
烯唑醇	81.6 \pm 2.8	77.8 \pm 3.5	78.3 \pm 4.2	77 \pm 2.7	77.2 \pm 1.3
戊唑醇	113.7 \pm 4.9	93.1 \pm 3.4	92.2 \pm 1.4	92.1 \pm 2.3	91.9 \pm 3.6
双苯三唑醇	81.2 \pm 2.7	80.5 \pm 1.6	80.2 \pm 2.9	80 \pm 3.9	78 \pm 4.7

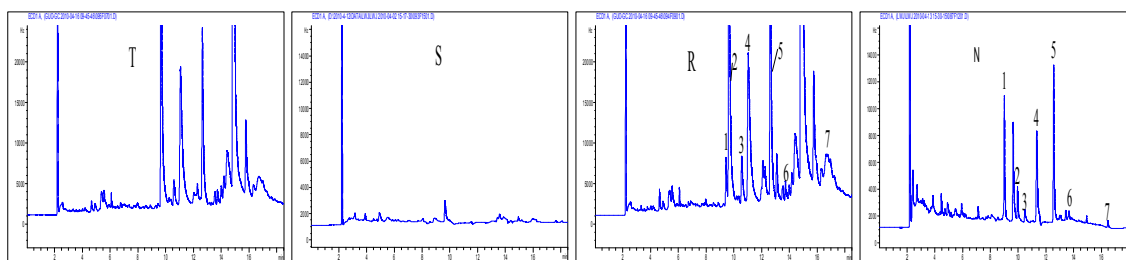


Fig. 2 GC-ECD chromatograms of (I) MSPD extraction and (J) MSPD-MISPE extraction from the blank grape sample, (K) MSPD extraction and (L) MSPD-MISPE extraction from the grape sample spiked at 0.05 mg/kg. Peak identification as in Fig. 1.

2.3 MSPD-MISPE 用于葡萄样品的前处理

制备葡萄的添加样品, 设置 3 个添加水平: 0.05、0.25 mg/kg 和各种分析物最低定量限 (三唑酮 0.01 mg/kg, 三唑醇、多效唑 0.025 mg/kg, 烯效唑 0.02 mg/kg, 烯唑醇 0.01 mg/kg, 戊唑醇、双苯三唑醇 0.04 mg/kg)。经过 MSPD 一步前处理后的葡萄样品中各分析物的回收率和相对标准偏差分别为 85~825%和 4~25%, 杂质干扰特别严重, 但经 MISPE 进一步净化后, 各分析物的回收率和相对标准偏差分别为 83~100%和 1~6%, 符合农药残留分析的要求。典型色谱图见图 2, 从图中可看出 MISPE 的净化效果十分明显, 并且在样品出峰处没有杂质峰干扰。7 种三唑类杀菌剂的定量限均低于欧盟规定的最大残留量^[4], 因此该方法可用于葡萄中这 7 种杀菌剂的残留量的监测。

表 3 不同添加水平下葡萄中 MSPD 和 MSPS-MISPE 的提取液中三唑类分析物的回收率(%)和 RSD(%)

分析物	添加水平(mg/kg)					
	LOQ*		0.05		0.25	
	MSPD	MSPD-MISPE	MSPD	MSPD-MISPE	MSPD	MSPD-MISPE
三唑酮	85.7±4.1	83.2±1.7	112.9±7.4	99.1±1.5	102.9±2.8	88.7±1.1
三唑醇	342.5±10.2	90.1±5.4	824.8±9.3	94.3±4.9	195.3±7.8	86.8±3.7
多效唑	133.1±12.9	96.1±3.3	247.4±19	93.2±3.2	117.6±24.5	89.8±1.9
烯效唑	150.5±13.5	82.3±4.6	110±3.5	96.8±3.9	99.5±4.1	85.9±2.9
烯唑醇	163.5±15.1	99.6±3.2	112.6±6.2	89.8±2	98.3±1.5	95.4±1.3
戊唑醇	238.6±8.4	84.3±3.4	435.4±9.1	89.8±1.9	304.9±14	95.8±3.5
双苯三唑醇	166.1±17.6	87.2±2.6	190.8±16.2	96.9±2.1	346.2±10.6	86.1±2.1

*三唑酮 0.01 mg/kg, 三唑醇 0.025 mg/kg, 多效唑 0.025 mg/kg, 烯效唑 0.02 mg/kg, 烯唑醇 0.01 mg/kg, 戊唑醇 0.04 mg/kg, 双苯三唑醇 0.04 mg/kg

参考文献

- [1] Yan H., Qiao F., Row H. R. Anal. Chem.[J], 2007, 79: 8242—8248
- [2] Crescenzi C., Bayouh S., Cormack P. A. G. et al.. Anal. Chem.[J], 2001, 73: 2 171—2 177
- [3] 彭畅, 刘维娟, 张春涛, 张玲, 张春涛. 高等学校化学学报[J], 2009, 30(11):2159—2164
- [4] EU Pesticides database, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.

Determination of Triazole Fungicides in Soil and Grape by Matrix

Solid-Phase Dispersion and Molecularly Imprinted

Solid-Phase Extraction

LIU Wei-juan, ZHANG Ling, GUO Ya-ping, ZHANG Zhi-chao

(State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Tianjin Key Laboratory of Pesticide Science,
Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract : A novel and simple strategy for determination of seven triazole fungicides (triadimefon, triadimenol, paclobutrazol, uniconazole, diniconazole, tebuconazole and bitertanol) in soil and grape using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) followed by gas chromatography with electron capture detection was developed and validated. Synthesis conditions of the molecularly imprinted polymer were investigated. The MIP, which had the best ability to recognize the seven triazole fungicides, was employed as the sorbent of solid-phase extraction to clean up the MSPD extracts. Under the optimized MISPE conditions, all analytes in MSPD extracts were selectively isolated while matrix interferences were eliminated simultaneously. The proposed method was validated using spiking recovery tests. Recoveries of the seven analytes from 3 soils and grape spiked at 3 levels of 0.05, 0.25 mg/kg and the concentrations corresponding to the limits of quantification (LOQ) for each analyte ranged from 79 ~ 113% with relative standard deviations of 1 ~ 6%. For grape, LOQs of all analytes were lower than maximum residue limits established by European Union. The method also was further validated using aged soil A samples. This study highlights the potential of the novel method combining the simplicity of MSPD with the high selectivity of MISPE for extraction of trace compounds from complex matrices.

Key words: Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD); Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction (MISPE); triazole fungicides

(上接第 81 页)

HPLC simultaneous determination of antitussive Tolterodine Tartrate

JIN Chao-dong, XU Rui-zheng, XUE Jin

(Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193)

Abstract : Objective The HPLC for determination of tolterodine tartrate was established. **Method** Kromasil C18 Column and the UV detector were used, with the mobile phase of methanol-0.025mol/L di-Ammonium hydrogen phosphate(pH3.0±0.1)(52:48), the detective wavelength was 220nm. **Results** There was a good linear relationship in the range of 0.0242~0.968mg/mL with this method, $r=0.99999$. **Conclusion** The method was founded to eliminate interference of compound and validated for repeatability and respectively.

Key words: Tolterodine Tartrate ; Impurities; RP-HPLC

拉莫三嗪片有关物质测定方法研究

夏锦辉¹, 王琳²

(1.天津药物研究院分析测试中心, 天津 300193; 2.河南大学药学院, 开封 475000)

拉莫三嗪是一种电压性的钠离子通道阻滞剂, 可抑制戊四氮和电刺激所致的惊厥, 缩短病灶、皮层和海马区兴奋后的放电时间, 对抗部分和全身性癫痫发作。由于在其合成过程中可能带进原料、中间体、副产物等杂质, 因此其质量需要加以控制。本文采用高效液相色谱法, 对本品的有关物质进行了测定方法研究。

1 实验材料

甲醇为色谱纯, 三乙胺、磷酸均为分析纯。拉莫三嗪片样品由天津药物研究院提供。

2 色谱条件

仪器: Angilent HP1100; 色谱柱: ODS 柱 (Kromasil C18 5 μ 4.6mm \times 200mm); 流动相: 0.5%三乙胺 (稀磷酸调 PH4): 甲醇=55:45; 流速: 1.0ml/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 265nm。

3 实验方法与结果

3.1 方法研究

3.1.1 空白辅料的测定

取空白辅料适量用流动相溶解, 滤过后按上述色谱条件测定。试验结果表明, 空白辅料不干扰样品测定。色谱图见图 1。

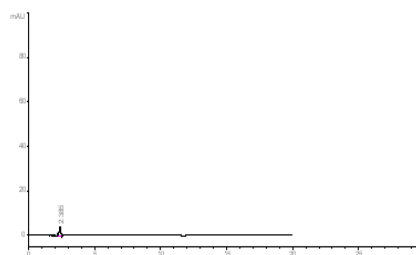


图 1 空白辅料色谱图

3.1.2 检测限试验

取拉莫三嗪片粉适量滤过, 加流动相稀释成低浓度, 按上述色谱条件测定。试验结果: 拉莫三嗪最小检出限量: 0.2 μ g, 峰面积 8.9。

3.1.3 线性关系试验

精密量取供试品溶液 (同 3.2.1) 适量, 加流动相稀释成 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ g/ml 的溶液。分别取此液 20 μ l 进样, 测定峰面积 A, 作 C-A 线性方程, 试验结果见表 1。

表 1 拉莫三嗪峰面积 A 和浓度 C 的线性关系

浓度 C(μ g/ml)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
峰面积 A	46.1	90.3	137.1	180.9	221.8

试验结果表明: 在 265nm 波长处, 拉莫三嗪溶液在 1.0~5.0 μ g/ml 范围内, 峰面积 A 与浓度 C 成线性关系, 线性方程为 $A=26.4+442 \cdot C$, 相关系数 0.9997。

3.1.4 拉莫三嗪片酸、碱、氧化破坏性试验

取空白辅料和本品适量, 研磨成细粉; 取细粉适量, 分别加入 0.1mol/L 盐酸溶液、0.1mol/L 氢氧化钠溶液、过氧化氢溶液, 加热煮沸 2 小时, 放冷至室温, 调 PH 至中性, 滤过后按上述色谱条件进样测定。

试验结果表明: 空白辅料和样品溶液均有分 (降) 解产物生成, 在此色谱条件下能与主成份色谱峰分开。

3.1.5 供试品溶液重现性试验

取 090826 批供试品溶液 (制备同 3.2.1), 连续进样 5 次, 依法进行杂质含量检查, 试验结果见表 2。

表2 供试品溶液的重现性试验 (n=5)

1	2	3	4	5	平均杂质含量%	RSD%
0.32	0.31	0.31	0.32	0.31	0.31	1.7

3.1.6 供试品溶液稳定性试验

取 090826 批供试品溶液 (制备同 3.2.1), 在不同时间进样测定, 试验结果见表 3。

表3 供试品溶液的稳定性试验

放置时间 (小时)	0	2	4	8	24
杂质含量%	0.31	0.30	0.31	0.32	0.32

试验结果表明: 样品溶液在 24 小时内稳定。

3.2 拉莫三嗪的有关物质测定

3.2.1 供试品溶液的制备

取本品适量, 置乳钵中, 研细。称取片粉适量, 加流动相, 超声溶解, 并制成 1ml 中含拉莫三嗪 0.2mg 的样品溶液, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液作为供试品溶液。

3.2.2 对照溶液的制备

精密量取供试品溶液适量, 加流动相稀释成 0.003mg/ml 的溶液作为对照溶液 (1.5%)。

3.2.3 样品测定

取对照溶液 20 μl , 注入液相色谱仪, 调节检测器灵敏度, 使主成分色谱峰约为记录仪满量程的 10~20%。再取供试品溶液 20 μl 进样, 记录色谱图至主成分色谱峰保留时间的 3 倍, 按自身对照法计算, 各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主成分峰面积。试验结果见表 4, 1.5%对照溶液色谱图见图 2, 供试品溶液色谱图见图 3。

表4 拉莫三嗪片有关物质检查

批号	090826	090827	090828
有关物质%	0.31	0.30	0.31

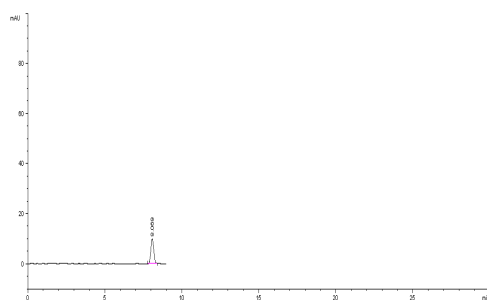


图2 1.5%对照溶液色谱图

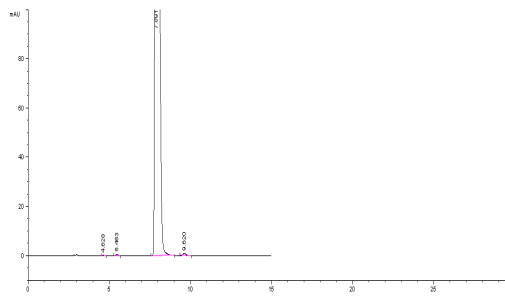


图3 供试品溶液色谱图

4 讨论:

4.1 片剂测定时所取片粉含辅料

所以片粉需要过滤。通过对滤过方式的考察, 选用 0.8 μm 滤膜, 0.45 μm 滤膜, 以及离心 10min。结果表明, 0.45 μm 滤膜滤过效果较好, 其他滤过方式有干扰。

4.2 比较本品在酸、碱、氧化破坏前后

空白辅料和供试品溶液均有分(降)解产物生成, 在此色谱条件下能与主成份色谱峰分开。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会编.[S].中国药典·二部, 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录: 28
- [2] R.Macrae.[J].现代实用高效液相色谱分析法, 天则出版社, 1992
- [3] 孙毓庆, 王延琮.[M].现代色谱法及其在药物分析中的应用, 科学出版社, 2005.

(下转第90页)

离子交换树脂固相萃取—离子对色谱法检测稻田水样中的春雷霉素

张春涛, 郭亚萍, 张玲, 张智超

(南开大学元素有机化学国家重点实验室, 南开大学天津市农药科学重点实验室, 天津 300071)

春雷霉素是一种农用抗菌素类杀菌剂, 它属于微生物农药, 是以生物体如细菌、真菌、病毒等微生物为原料制成的, 是当前农作物病虫害防治中具有广阔发展前景的一种农药。春雷霉素具有很强的内吸渗透性, 同时具有预防和治疗作用, 其作用机理是干扰病原菌氨基酸代谢的酯酶系统, 破坏病原菌蛋白质的生物合成, 抑制菌丝的生长并造成细胞颗粒化, 使病原菌失去繁殖和侵染能力, 从而达到杀菌防害的目的^[1]。春雷霉素在农业生产中得到了广泛的应用, 但目前尚未见关于春雷霉素残留的仪器分析方法的报道。春雷霉素是碱性物质, 极性大, 易溶于水, 微溶于甲醇, 不溶于有机溶剂, 无特征紫外吸收, 这些特点使得该物质的分离分析十分困难。本研究建立了混合型阳离子交换树脂为吸附剂的固相萃取前处理(MCX-SPE)和以庚烷磺酸钠为离子对试剂的离子对液相色谱法(IP-HPLC)检测环境水样中的春雷霉素的分析方法, 方法具有简单、快速、准确可靠等优点。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器; 固相萃取柱(10×150 mm, 具有C筛板的玻璃柱)。

春雷霉素标样, 纯度81.1%; 庚烷磺酸钠为色谱纯; 混合型阳离子交换树脂(MCX), waters产品, 以聚乙烯吡咯烷酮/二乙烯基苯为基质, 粒度40-60 μm, 交换强度1.0 meq/g。冰醋酸为分析纯; 氨水和磷酸为优级纯; 甲醇和乙腈均为色谱纯; 二次蒸馏水等。

1.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C18, 5 μm, 250 mm×4.6 mm i.d.(迪马科技有限公司); 保护柱: HP C18(20 mm×4 mm i.d., 5 μm); 流动相: 乙腈—缓冲溶液(5 mmol/L庚烷磺酸钠水溶液, H₃PO₄调节pH=3)(15:85, v/v); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长230 nm; 进样量20 μL。

1.3 样品前处理

100 mL稻田水经0.45 μm滤膜过滤, 取10.0 mL, 用CH₃COOH调节pH至1.5后, 用MCX-SPE净化。对于添加样品, 在调节pH值前向空白水样中加入1.00 mL春雷霉素标准溶液。

称取0.30 g MCX填料置于约5 mL甲醇中, 湿法装入固相萃取柱, 上面加上垫片, 用空气加压泵吹干甲醇, 压紧。依次用10 mL甲醇、10 mL水活化固相萃取柱后, 将样品上样, 依次用5 mL pH1.5的醋酸水溶液、5 mL甲醇预淋洗, 最后用10 mL氨水/水/甲醇(1/4/15, v/v/v)混合液洗脱, 收集洗脱液。上述过程中通过空气泵加压控制流速约为2 mL/min。洗脱液用氮气吹扫浓缩, 定容至1.00 mL, 经0.45 μm滤膜过滤, 保存于4 °C冰箱中, 待HPLC分析。

2. 结果与讨论

2.1 HPLC 模式的选择

春雷霉素是碱性化合物(春雷霉素盐酸盐的pK_{a1}=3.23), 在C18柱上没有保留, 因此本研究采用以庚烷磺酸钠为离子对试剂的离子对液相色谱法。在1.2节所述的色谱条件下, 可很好地将春雷霉素和杂质分离开。

2.2 MCX-SPE 条件的优化

文献报道^[2]中通常用酸性水溶液和甲醇依次预淋洗ion-exchange SPE柱, 以除去一些非极性和弱极性杂质的干扰。本研究考察了pH=1.5的醋酸水溶液和甲醇这两种预淋洗剂的体积对春雷霉素回收率的影响。将10.0 mL空白稻田水的添加样品(0.4 μg/g)上样后, 用pH=1.5的醋酸水溶液预淋洗SPE柱, 以每2 mL为一段分段收集淋洗液, 共收集5段(总体积为10 mL), 用HPLC对每段淋洗液进行检测。检测结果表明, 每段收集液中均未检出春雷霉素, 表明10 mL pH=1.5的醋酸水溶液不会将春雷霉素从SPE柱上洗脱下来。另外, 第3~5段收集液的HPLC

谱图中没有明显的色谱峰。因此,后面的实验中用5 mL pH=1.5的醋酸水溶液预淋洗。

继续考察甲醇体积对春雷霉素回收率的影响。将10.0 mL空白稻田水添加样品(0.4 μ g/g)上样,用5 mL pH=1.5的醋酸水溶液预淋洗SPE柱后,用甲醇继续预淋洗,以每2 mL为一段分段收集甲醇淋洗液,共收集5段(总体积为10 mL),用HPLC对每段淋洗液进行检测。检测结果表明,每段收集液中均未检出春雷霉素。另外,第3~5段收集液的HPLC谱图中没有明显的色谱峰;另从感官看,第3~5段收集液为透明无色。因此,后面的实验中选用5 mL甲醇作为第二布预淋洗液。

最后考察洗脱液条件。在酸性条件下,春雷霉素与强阳离子交换吸附剂之间存在很强的离子相互作用,欲将春雷霉素洗脱下来,洗脱液必须满足三个条件:一是足够的碱性,以中和被分析物的电荷;二是良好的洗脱能力;三是对春雷霉素良好的溶解能力。氨水、甲醇和水三个不可或缺的重要因素。在优化洗脱液组成和体积的实验中,按照前面确定的实验条件,上样和预淋洗后,分别研究了氨水/甲醇(1/19, v/v)和氨水/水/甲醇(1/4/15, v/v/v)两种混合溶液作洗脱液时对春雷霉素回收率的影响,实验结果如图1所示。适当增加氨水/甲醇(1/19, v/v)洗脱溶液中水的含量,对春雷霉素起到了良好的洗脱效果,这应归因于春雷霉素易溶于水。洗脱液体积为6 mL时回收率达到78.8%,9 mL时回收率(82.9%)接近于最大值(84.7%),继续增加洗脱剂体积,回收率提高很小,并且会增加洗脱液浓缩难度。因此,确定以10 mL氨水/水/甲醇(1/4/15)作洗脱溶剂。

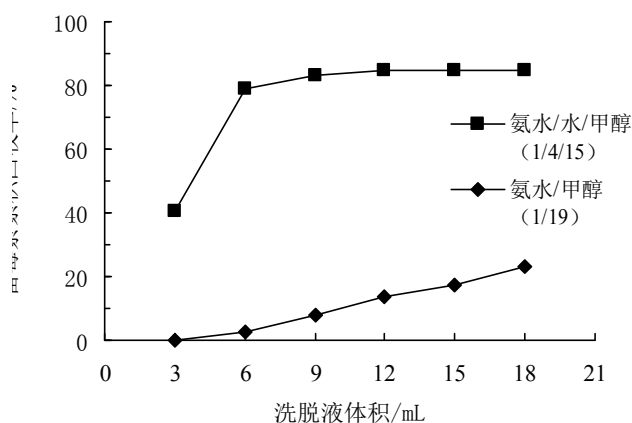


图1 MCX-SPE洗脱条件的优化

2.3 方法评价

表1 稻田水中春雷霉素在三个添加水平下的平均回收率和相对标准偏差(n=5)

基质	添加水平 (μ g/g)	回收率(%)	RSD (%)
湖北稻田水	0.04	88.7	3.3
	0.40	81.2	6.8
	4.00	80.0	7.4
天津稻田水	0.04	83.9	1.3
	0.40	84.9	3.2
	4.00	93.3	8.0

以湖北、天津两地稻田水分别制备3种浓度(0.04、0.4和4 μ g/g)的添加样品,考察分析方法的准确度和精密度,结果见表1。所建立的分析方法对春雷霉素的回收率为80.0~93.3%,相对标准偏差(n=5)分别为1.3~8.0%。方法的检出限(S/N=3)为0.01 μ g/g。实验结果表明所建立的方法符合残留分析的要求。典型色谱图如图2所示。该方法已成功用于实际样

品的测定。

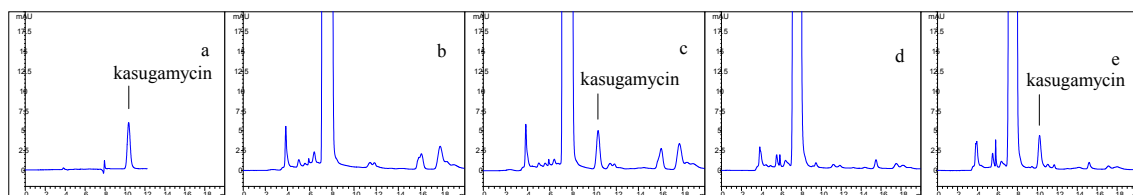


图2 春雷霉素的HPLC色谱图: (a) 春雷霉素标样 (4.0 µg/mL); (b) 湖北稻田水空白样; (c)湖北稻田水添加样 (0.40 µg/g); (d) 天津稻田水空白样; (e) 天津稻田水添加样 (0.40 µg/g)。

参考文献

- [1] 单正军,石利利,朱忠林等. 农药残留量实用检测方法手册,第三卷. 北京:中国农业出版社, 2005:304-306
[2] Lavéna M., Alsberga T., Yu Y., et al.. J. Chromatogr. A, 2009, 1216: 49-62

Determination of Kasugamycin in Paddy Field Water Using Ion-Exchange Solid Phase Extraction Followed by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Chun-tao, GUO Ya-ping, ZHANG Ling, ZHANG Zhichao*

(State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Tianjin Key Laboratory of Pesticide Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

A new method using MCX-based ion-exchange solid phase extraction followed by ion-pair high performance liquid chromatography has been developed for determination of kasugamycin in paddy water. SPE conditions including washing and eluting conditions were optimized. The proposed method was validated. Recoveries of kasugamycin for paddy field water samples fortified at three levels (0.04、0.4、4 µg/g) ranged from 80.0% to 93.3%, with relative standard deviations of 1.3 ~ 8.0%. The lowest detection limit (S/N=3) was 0.01 µg/g. The method is simple, rapid, sensitive, accurate and applicable.

(上接第87页)

HPLC Determination of Relater Substances in Lamotrigine

XIA Jin-hui¹, WANG Lin²

(1.Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193

2.Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475000 China)

Abstract: OBJECTIVE: To establish the HPLC method for the determination of related substances in Lamotrigine. **METHOD:** The HPLC system consisted of a Kromasil C₁₈ column(5µ,4.6mm×200mm). The mobile phase was 0.5% TEA (PH4) : Methanol=55 : 45 The flow rate was 1.0mL·min⁻¹ with detection wave length at 265nm. **RESULT:** Lamotrigine could be completely separated from other impurities. The lowest detectable of Lamotrigine is 0.2 µg/ml.

CONCLUSION:The method is simple, accurate, convenience.It can be well the quality control Lamotrigine.

Key words: Lamotrigine.; related substances ; HPLC

高效毛细管电泳法用于沃尼妙林的药代动力学研究

李志伟, 赵云超, 齐建敏

(河北科技大学化学与制药工程学院 河北石家庄 050018)

沃尼妙林 (Valnemulin) 是新一代截短侧耳素类抗生素, 国外主要用于防治猪、牛、羊及家禽的支原体病和革兰氏阳性菌感染, 具有广谱、抗菌活性强、药动学特征优良、残留低、安全等特点。目前该药在国内尚未上市, 研究其药代动力学, 获取药代动力学参数对于国内该制剂的生产及应用具有重要意义。

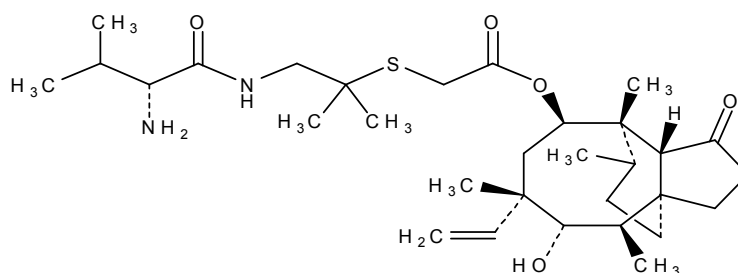


图1 沃尼妙林的结构

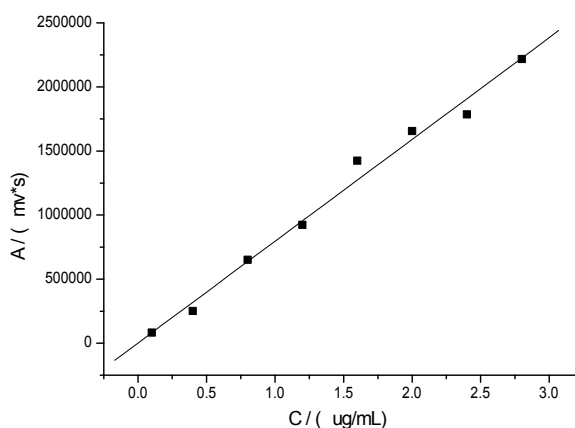


图2 线性关系

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司), CL102型紫外检测器, HW-2000型色谱工作站, 石英毛细管(河北永年锐沣色谱器件公司)。

四硼酸钠, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 磷酸均为分析纯, 水为重蒸水, 所有样品及缓冲

液均经 0.45 μm 滤膜过滤。

沃尼妙林样品(批号 2010301、20100302、20100303)为实验室自制。

毛细管柱为未涂层石英毛细管柱(75 μm ×70cm),电泳介质为30mmol/L的硼砂缓冲液(pH=6.0),高度差进样5s,分离电压15kV,检测波长210nm,室温下操作。

1.2 实验方案

采用随机交叉试验,6只大鼠分别编号,随机分成2组,每组3只,禁食24小时后,统一灌胃给药。采用大鼠尾部取血约0.5mL,置1.5mL离心管中,静置1h,挑/出血饼后,处理后,立即于5000r/min条件下离心10min,吸取上清液,于-20℃下保存,待分析。

1.3 线性范围

取空白血清0.2mL,准确加入沃尼妙林溶液,配制一系列浓度溶液,考察其线性关系。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,回归方程为 $A=2.29\times 10^3+7.91\times 10^5C$, $R=0.9941$ 。沃尼妙林在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好,标准曲线如图2示。

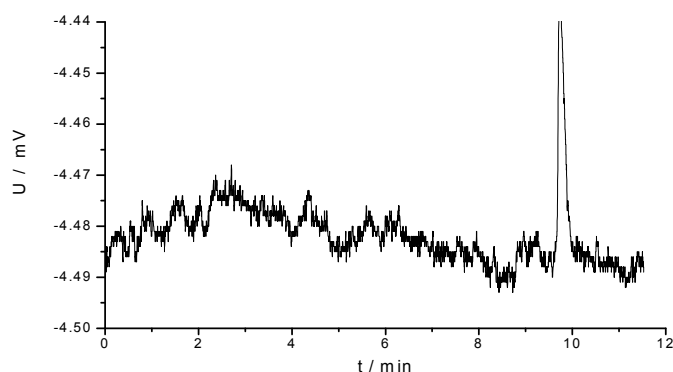


图3定量限电泳图

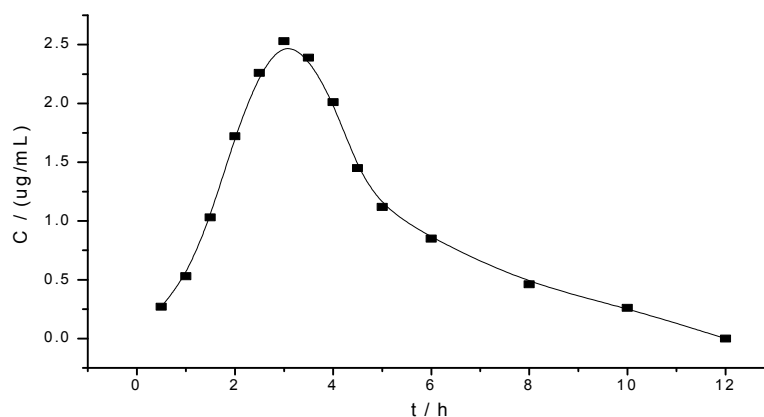


图4 沃尼妙林的药时曲线

1.4 定量限

在实验条件下,稀释加药血样至0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,得到电泳图谱如3所示,信噪比为10:1,表明在实验条件下,能够定量检测出血清中沃尼妙林的浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2 结果与讨论

2.1 药时曲线

2.2 药代动力学参数的计算

利用用 3P97 实验药代动力学计算机程序及 Excel 函数, 对沃尼妙林的药时曲线数据进行双室模型计算, 结果见表 1。

表 1 沃尼妙林的药动学参数表

参数	1	2	3	\bar{X}	SD
$C_{\max}/(\mu\text{g}/\text{mL})$	2.54	2.45	2.60	2.53	0.075
T_{\max}/h	3	3	3	3	0
$t_{1/2}/\text{h}$	3.2	3.0	2.8	2.97	0.153
$AUC_{0-12}/(\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL})$	9.85	9.74	9.85	9.81	0.136
$AUMC_{0-12}/(\mu\text{g}\times\text{h}^2/\text{mL})$	1921.9	1966.6	2003.3	1963.93	40.765
MRT/h	3.3	3.4	3.4	3.37	0.058
Vd/(L/kg)	27.520	26.326	24.417	26.088	1.565

3 结论

通过条件优化确定了较优的条件—检测波长为 210nm 工作电压为 15kV, 缓冲体系为 30mmol/L 硼砂缓冲盐 (pH=6.0); 经方法学验证表明, 在选定的色谱条件下, 血液中内源性物质几乎不干扰沃尼妙林的含量测定。将实验建立的分析方法用于 SD 大鼠的药代动力学研究, 得到其药代动力学参数, 半衰期为 2.97h, 达峰时间 3h, 达峰浓度 2.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 药时曲线下面积 9.81 $\mu\text{g}\times\text{h}/\text{mL}$, 平均滞留时间 3.37h, 一阶距-时间曲线下面积为 1963.96 $\mu\text{g}\times\text{h}^2/\text{mL}$, 表观分布容积 26.088L/kg。

参考文献:

- [1] 何凤艳, 王德忠, 刘国斌. 新兽药沃尼妙林的研究进展及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 164-165
- [2] Jordan F, Forrester C, Rip ley P H, et al. In V itro and V ivo Comparisons of Valnemulin, Tiamulin, Tylosin, Enrofloxacin and Lincomycin / spectinomycin against Mycoplasma gallisepticum [J]. Avian Dis, 1998, 42 (4) : 738 - 745.
- [3] KarlssonM, Gunnarsson A, Franklin A. Suscep tibility to Pleuromutilins in B rachyspira (serpulina) hyodysenteriae [J]. Anim Health Rev, 2001, 2 (1) : 59 - 65.
- [4] KarlssonM, Oxberry S, Hamp son D. Antimicrobiol Suscep tibility Testing of Australian Isolates of B rachyspira hyodysenteriae Usinga New Broth Dilution Method [J]. Vet Microbiol, 2002, 84(1/2) : 123 - 133.

The pharmacokinetic study of Valnemulin with High Performance capillary Electrophoresis

LI Zhi-wei, ZHAO Yun-chao, Qi Jian-min

(College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018 China)

ABSTRACT: An HPCE method for determination of Valnemulin in mouse plasma was established to study the pharmacokinetics of Valnemulin after oral administration of one dose. The optimized conditions were fused silica capillary tube(75cm \times 75 μm), 30mmol/L sodium phosphate buffer(pH=6.0), voltage(15kV). Then, the parameters of pharmacokinetics of Valnemulin in SD-mouse were studied. The elimination half life was 2.97h. The time to peak (t_{\max}) was 3h. The mean residence time(MRT) in mice was 3.37h. The apparent volume of distribution (Vd) was 26.088L/kg.

Key Words: Valnemulin; HPCE; pharmacokinetics

CH8 培养液中球毛壳甲素的检测和分离

陈煌, 郝晓冉, 牛学良, 毕建男, 吕宪禹, 朱旭东

(南开大学生命科学院分子真菌学实验室, 天津 300071)

当今世界癌症是威胁人类健康的最大敌人, 对于抗癌药物的研究对于人类健康有着重要的意义。球毛壳甲素是 Sekita 等^[1-2]于 1983 年新发现的抗癌化合物, 为细胞分裂抑制剂, 影响细胞中的收缩蛋白并能阻止细胞骨架中球肌动蛋白的盐诱导聚合。利用发酵方法生产球毛壳甲素具有很高的经济价值和社会价值。本文就是利用高效液相色谱法从环境中筛选出一株产球毛壳甲素的真菌。本文对 CH8 培养液中球毛壳甲素的高效液相色谱检测和分离方法进行了探讨, 并就实验结果进行讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: CH8 菌种 (自主分离得到) 在南开大学校园采集的菌种。

主要的仪器设备: Spectra-physics 高效液相色谱仪; 采用 C-18 ODS 分析型色谱柱(4.6×250 mm, Kromasil); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); 甲醇 (色谱纯); 氯仿 (色谱纯)。球毛壳甲素 (Alexis 公司)

1.2 方法

1.2.1 液体发酵培养基: 马铃薯 200g, 蔗糖 20g, 水 1000mL, pH 自然, 每个 500mL 的锥形瓶中分装 200mL 培养基, 121℃, 20min 高压灭菌, 冷却后接入 CH8, 28℃培养 9 天。

1.2.2 发酵液的预处理: 发酵液先经过抽滤除去菌体, 然后通过旋蒸将 200mL 滤液浓缩到 20-30mL。然后用氯仿或乙酸乙酯萃取浓缩液三次, 每次萃取取其下层液体, 上层液体继续用来萃取, 直到萃取三次后弃掉。将收集的下层液体再次进行旋蒸, 将体积浓缩到 2mL 左右。然后加等体积的甲醇混匀以后离心, 上清液通过有机膜过滤。

1.2.3 高效液相色谱检测: 柱温调节为室温, 流动相 (甲醇: 水=7: 3) 流速为 1 mL/min, 检测波长为 227 nm 处检测, 进样量 20 μL。流动相使用之前先进行膜过滤, 再用超声除气泡。用流动相冲洗分析柱 30 分钟左右, 基线平稳后, 进标准品球毛壳甲素 (甲醇溶解浓度为 0.1mg/mL)。14 分钟左右会出现一个明显的大峰。然后进样品, 在同一时间附近也出现一个峰 (图 1)。标准品和样品按 1:1 比例混合, 进混合样, 在 14 分钟的位置出现的是一个峰, 不是两个峰, 说明这是同一个物质。

1.2.4 高效液相色谱分离: 柱温调节为室温, 流动相 (甲醇: 水=7: 3) 流速为 3mL/min, 检测波长为 227 nm 处检测, 进样量 500 μL。流动相使用之前先进行膜过滤, 再用超声除气泡。用流动相冲洗制备柱 30 分钟左右, 等基线走平。然后进标准品, 知道出峰时间以后, 再进样品, 对同一出峰时间的物质进行收集。

2 实验结果与讨论

2.1 实验结果

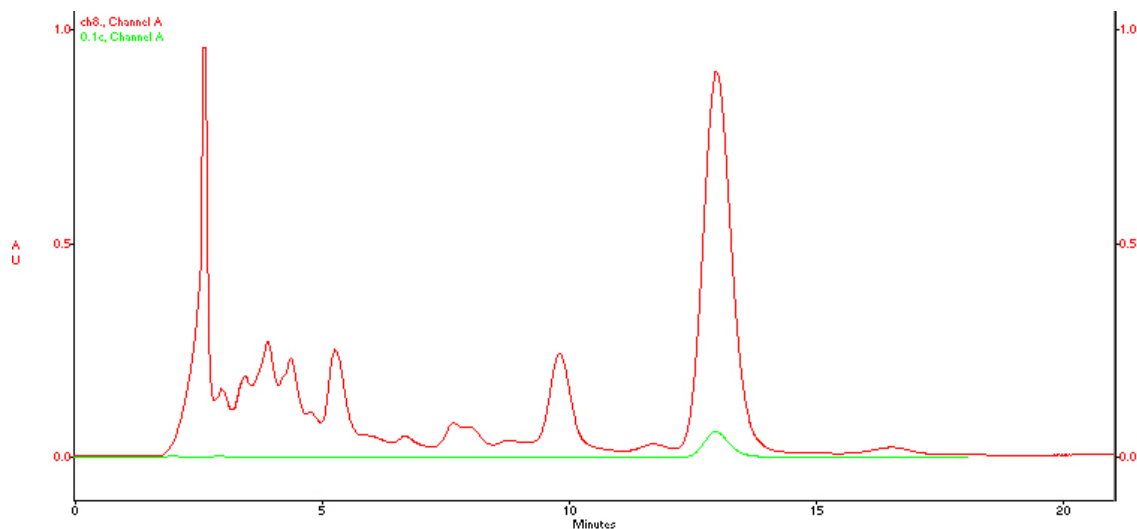


图1 样品液相色谱图谱 (0.1c代表球毛壳甲素标准品; CH8代表样品)

2.2 讨论

由图1可知标样出峰的时间, 14分钟左右会出现一个明显的大峰。然后进样品, 在同一时间附近也出现一个峰(图1)。标准品和样品按1:1比例混合, 进混合样, 在14分钟的位置未出现另外的峰, 说明两者为同一个物质。峰形很好, 周围没有明显的干扰, 说明样品的前处理方法和流动相的配比选择是恰当的。这也为后期收集样品奠定了基础。

参考文献:

- [1] Sektia S, Yoshihira K, Natori S, et al, Chaetoglobosin, cytotoxic 10-(Indo-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp. I production, isolation and some cytological effects of chaetoglobosins A-J[J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(5):1609.
- [2] Sektia S, Yoshihira K, Natori S, et al, Chaetoglobosin, cytotoxic 10-(Indo-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp.IV ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectra and their application to a biosynthetic study[J]. *Chem Pharm Bull*, 1983,31(2):490.

Detection and Separation of ChaetoglobosinA from CH8

Culture Medium

Chen Huang Hao Xiao-ran Niu Xue-liang Lv Xian-yu Zhu Xu-dong

(Nankai University, College of life science, Tianjin 300071, China)

Abstract: In this paper the method of detecting and separating of chaetoglobosinA from CH8 culture medium using HPLC is established and the experiment results are discussed.

Key words: CH8; ChaetoglobosinA; HPLC

HPLC 法测定镇咳药 TY 的含量

薛津, 许瑞征, 靳朝东

(天津药物研究院分析测试中心, 天津 300193)

镇咳药 TY 是一个化学结构与以往任何一类镇咳药均不相同的化合物, 主要用于治疗由于感染、刺激、炎症及肿瘤引起的急慢性呼吸系统疾病所致的咳嗽。本文采用 HPLC 法, 以甲醇作为有机调节剂建立了镇咳药 TY 的含量测定方法。本方法色谱分离效果好、分析时间短、定量准确可靠, 可控制镇咳药 TY 的质量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统: 安捷伦 HP1100 液相系统紫外检测器: G1314A, 自动进样器: G1313A, 超声仪: AS3120; 甲醇 色谱纯, 去离子水。色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈(5μm), 250mm×4.6mm I.D. 不锈钢柱(迪马公司); 流动相为色谱纯甲醇-水(70:30); 检测波长 275nm; 柱温: 30℃; 流速为 1ml/min。样品由天津药物研究院提供, 批号为 050616、050620、050626。

2 结果

2.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以甲醇-水溶液(70:30)为流动相, 检测波长 275nm, 理论板数按 TY 峰计算应不低于 4000。

2.2 线性试验

精密量取 TY 标准溶液(1.5226mg/ml)0.01ml、0.1ml、0.2ml、0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 20μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定 TY 的峰面积, 计算进样量和峰面积之间的线性关系, 结果表明: TY 进样量在 0.030~15.226μg 范围内和峰面积之间的线性关系良好。

2.3 精密度试验

取供试品溶液连续进样 6 针, 按峰面积计算, 莫吉司坦峰面积的 RSD 为 0.07%, 结果表明, 本法具有良好的精密度。

2.4 重现性试验

取本品(050616 批)按含量测定方法, 精密称取 9 份样品, 平行测定其相应的含量, 结果表明: TY 含量测定的精密度良好。

2.5 测定溶液的稳定性试验

取供试品溶液(050616 批), 每隔一定时间进样一次, 考察测定溶液的稳定性, 测定结果表明: 含量测定溶液 24 小时内稳定。

2.6 定量限测定试验

精密称取供试品(050616 批)适量, 加流动相溶解制成每 1ml 中含 TY 1.5226μg/ml 的溶液, 精密吸取 20μl 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 结果表明: TY 在浓度较低的情况下测定, 精密度良好。

2.7 含量测定

分别精密称取三批本品 75mg, 精密称定, 置 50ml 量瓶中, 加流动相适量, 超声震荡

约 10 分钟, 以流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。另取减压干燥至恒重的 TY 对照品适量, 加流动相制成每 1ml 含 TY 1.5mg 的溶液, 作为对照品溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液各 5ml, 分别置 50ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取各 20 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法计算 TY 的含量。含量限度为 98.0%~102.0%, 三批样品的测定结果见表 1。

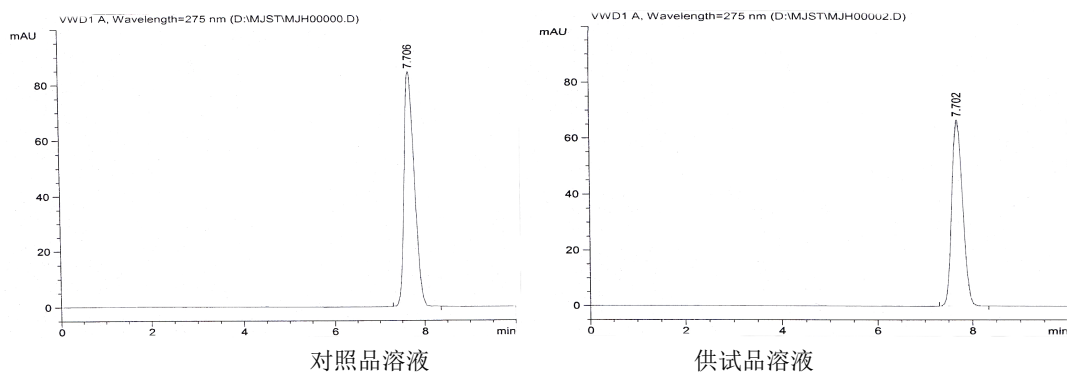


图 1 对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 色谱图

表 1 TY 三批样品含量测定结果

批号	050616	050620	050626
含量 (%)	99.97、99.99	99.96、99.92	99.96、99.98
平均值 (%)	99.98	99.94	99.97

3 讨论

对流动相的选择, 分别试验了甲醇-水, 甲醇-0.01%磷酸水, 甲醇-0.01M 磷酸氢二铵 (pH 分别为 3、4、5、6 和 7) 等流动相系统, TY 峰以甲醇-水流动相最好, 所以选用。分析时间短, 结果精确可靠。在选定的流动相条件下, 主峰的保留时间约为 8 分。

HPLC simultaneous determination of antitussive TY

XUE Jin, XU Riu-zheng, JIN Chao-dong

(¹ Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193)

Abstract: **Objective** The HPLC for determination of TY was established. **Method** C18 Column and the UV detector were used, with the mobile phase of methanol-water (70:30), the detective wavelength was 275nm. **Results** There was a good linear relationship in the range of 0.030 ~ 15.226 μ g with this method, $r=0.9999$. **Conclusion** The method was founded to eliminate interference of compound and validated for repeatability and respectively.

Key words: antitussive TY; HPLC; determination.

HPLC 法筛选 10- Deacetyl Baccatin III 产生菌及其萃取方法的选择

牛学良, 毕建男, 郝晓冉, 吕宪禹, 朱旭东

(南开大学 生命科学学院 分子真菌学实验室, 天津 300071)

建立了HPLC筛选10- Deacetyl Baccatin III产生菌的方法。并考察了三种不同萃取系统对发酵液中10- Deacetyl Baccatin III回收的影响。

紫杉醇(Paclitaxel, 商品名 Taxol)是从红豆杉属植物中提取的一种重要的次生代谢产物, 最早由 Wani 等人从太平洋短叶红豆杉(*Taxus brevifolia nuttall*)的树皮中提取得到^[1]。目前已从红豆杉属植物中分离出 350 多种紫杉烷类化合物^[2], 紫杉醇是紫杉烷类中一种四环二萜类化合物。由于紫杉醇独特的抗癌机理和很高的抗癌活性, 它已成为应用最广泛的天然抗癌药物之一, 应用于耐药性卵巢癌、乳腺癌以及其他癌症。

目前, 国内外学者在人工栽培红豆杉树、红豆杉细胞培养及紫杉醇的化学全合成等方面进行了大量研究。但由于上述方法生产的紫杉醇成本昂贵, 目前还没有被广泛应用。

10-Deacetyl Baccatin III(10-DAB), 是紫杉醇半合成^[3]的前体, 分子式: $C_{29}H_{36}O_{10}$, 分子量: 544.597, 纯品为白色粉末结晶, 熔点: 230-233℃, 溶于乙醇、二氯甲烷等, 微溶于乙腈。目前最有前途的生产紫杉醇的方法就是以10-DAB为原料进行紫杉醇的半合成, 因为10-DAB在多种红豆杉中含量较紫杉醇要高的多。作者以产紫杉醇的内生真菌作为研究对象, 对菌株的培养、10-DAB的提取及检验等方法进行了探索。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), Spectra-physics 高效液相色谱仪, Beckman 质谱仪; 10-脱乙酰巴卡亭 III (0.1 mg/ml, Sigma 公司), 甲醇(色谱级), 氯仿(色谱级); 土豆培养基: 200g 土豆煮沸 30 分钟, 三层纱布过滤后加入 20g 乳糖, 蒸馏水定容至 1L, pH 自然。

1.2 样品制备

实验室所筛选的菌株摇瓶培养 7 天, 减压抽滤, 分离菌丝和发酵液。弃菌丝, 发酵液分别用等体积氯仿: 甲醇(v/v, 10:1)、等体积氯仿、等体积乙酸乙酯萃取过夜。随后分别收集氯仿相和乙酸乙酯相, 进行 35℃减压旋蒸, 旋干后加入甲醇重溶数次后, 再次进行减压旋蒸, 体积减至 1mL 左右取出, 离心去除杂质, 上清液用有机微孔滤膜(0.22μm)过滤后进行 HPLC 分析。

1.3 样品分析方法

HPLC条件: 色谱柱为Kromasil C-18 5μm 250mm×4.6mm, 流动相为: 甲醇: 水溶液=70:30 (v/v), 流速为1 mL/min, 进样量: 20μL, 柱温: 30℃, 检测波长λ=227 nm, 重复3次。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法鉴定发酵液中的 10-DAB

分别对 10-DAB 标样, 发酵液进行 HPLC 检测, 然后进行两者的混合上样, 结果如图 1, 图 2 所示:

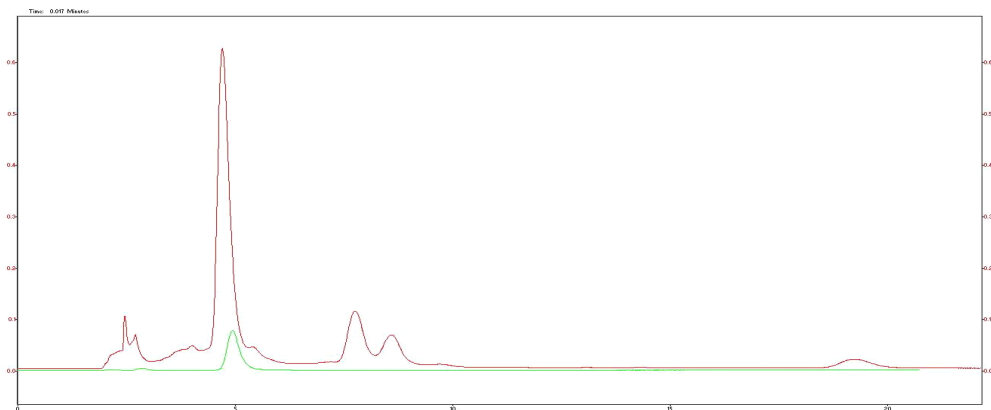


图1 10-DAB (0.1 mg/ml) 标准品与经氯仿萃取的发酵液的 HPLC 重叠图 (红线为发酵液, 绿线为 10-DAB)

图2 10-DAB (0.1 mg/ml) 标准品与经氯仿萃取的发酵液混合样 HPLC 图

由图1可以看出, 10-DAB 标准品与发酵液中物质的保留时间相近, 均在 4.7min 附近, 由图2中可以看出, 二者的混合样在 4.7min 处为单一的峰, 进一步证明样品中可能含有 10-DAB。

2.2 HPLC 法选择发酵液的萃取方法

通过萃取, 可以有效去除发酵液中的色素, 但考虑到萃取效率, 溶剂毒性等因素, 作者在用氯仿萃取发酵液后, 又分别尝试用等体积氯仿: 甲醇 (v/v, 10:1)、等体积乙酸乙酯萃取发酵液过夜, 实验结果如下:

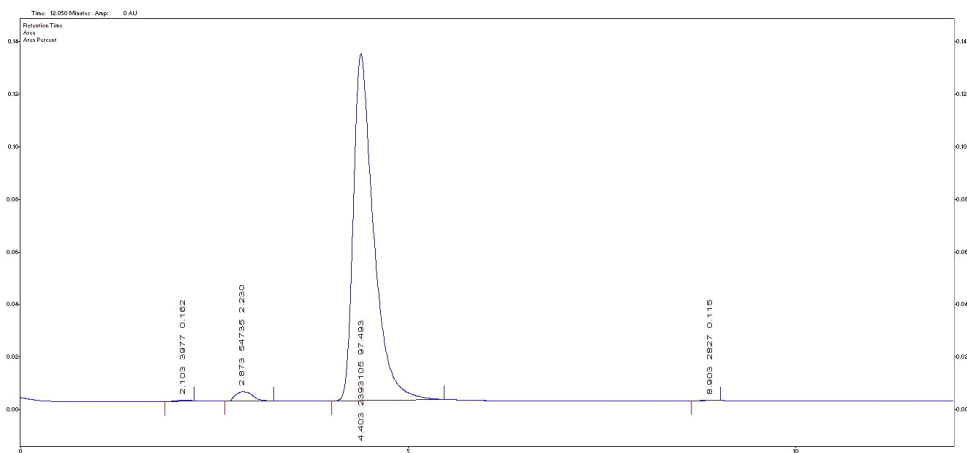


图3. 10-DAB (0.1 mg/ml) 标准品 HPLC 图

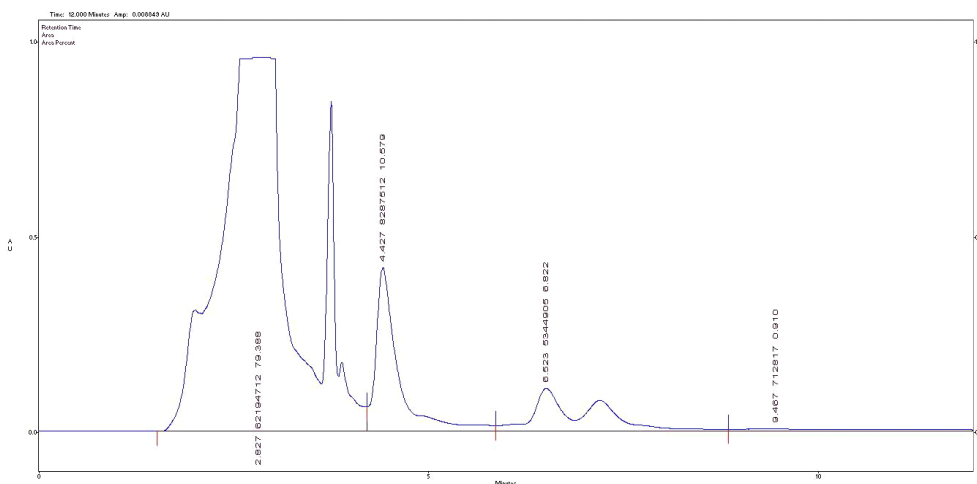


图4 未经萃取处理的发酵液 HPLC 图

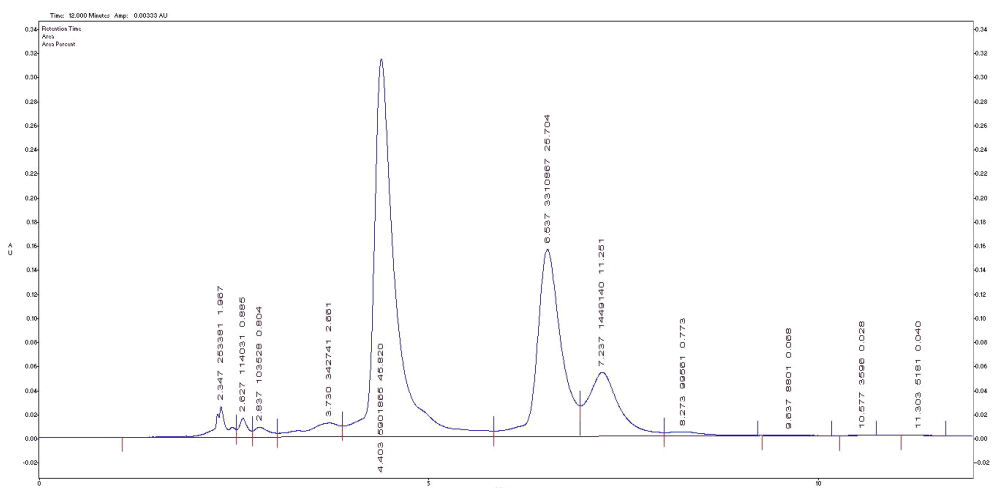


图5 经氯仿萃取的发酵液 HPLC 图

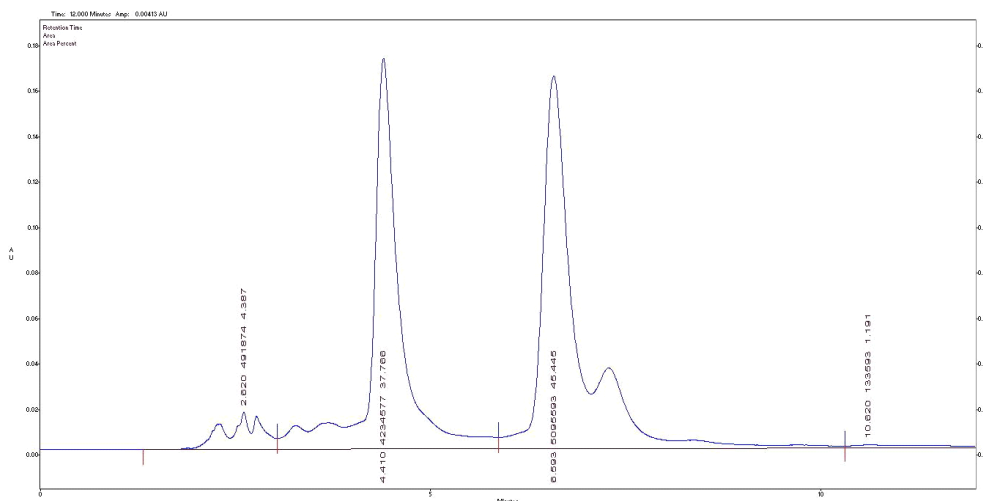


图6 经氯仿:甲醇 (v/v, 10:1) 萃取的发酵液 HPLC 图

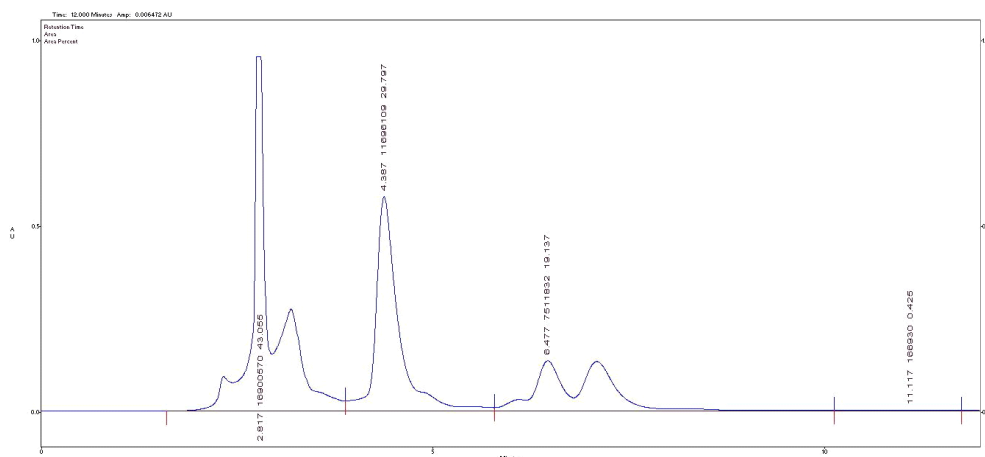


图7 经乙酸乙酯萃取的发酵液 HPLC 图

由图3——图6可知，三种萃取方法都可以把发酵液中大部分的色素物质（色谱图中保留时间小于4分钟左右），三者相比，氯仿或氯仿:甲醇系统的去色素效果比乙酸乙酯好，但10-DAB的丢失率较高（前两者的10-DAB峰面积比乙酸乙酯的10-DAB峰面积要小），值得注意的是，氯仿:甲醇系统在萃取时会产生严重的乳化现象，且氯仿与乙酸乙酯相比，对人体毒性较大。由此可知，用乙酸乙酯萃取发酵液中的10-DAB比较合适。

参考文献

- [1] Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., et al. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia* [J]. *Journal of American Chemistry*, 1971, 27(7): 433-437.
- [2] Jennewein S., Rithner C.D., Williams R.M., et al. Taxol biosynthesis: Taxane 13- α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 13595-13600.
- [3] Patel RN. Tour De Paclitaxel: biosynthesis for semisynthesis. *Annu. Rev. Microbiol*, 1998, 98: 361~395.

Screening Fungi that Produce 10- Deacetyl BaccatinIII by HPLC and the choice of extraction methods

NIU Xue-liang, HAO Xiao-ran, BI Jian-nan, LV Xian-yu, ZHU Xu-dong

(Nankai University College of Life Science Molecular Mycology Laboratory, Tianjin 300071, China)

Abstract: Established a method screening fungi which produce 10- Deacetyl BaccatinIII by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). And three different extraction systems was investigated in the separation of 10- Deacetyl BaccatinIII from the fermentation liquor.

Key words: HPLC; 10-Deacetyl Baccatin III; Extraction

反相高效液相色谱法检测 辛伐他汀的血药浓度

毕丹¹, 董伟林²

(1. 天津中医药大学中药学院 2010 届临床药学本科毕业生; 2. 天津医科大学)

辛伐他汀片是由美国默克公司研发的他汀类降血脂药, 国内商品名为舒降之, 剂型为片剂, 规格有 5、10、20mg。辛伐他汀能抑制内源性胆固醇的合成而降低低密度脂蛋白(LDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)胆固醇的血清浓度, 中等程度地升高高密度脂蛋白(HD-C)水平和降低甘油三酯的水平, 从而降低胆固醇。对高胆固醇、冠心病等有明显的疗效, 具有降脂作用且效果显著、安全、副作用少, 是治疗高血脂首选药物之一。

目前已有用高效液相色谱-质谱联用测定血浆中辛伐他汀的浓度和高效液相色谱测定辛伐他汀的含量^[1]。但对于血浆中辛伐他汀的浓度的测定研究较少。本实验致力于建立一种易于推广的简便、准确、敏感的检测方法, 以检测辛伐他汀在血浆中的浓度。以便进一步用于遗传药理学研究和日常用药监测。

1 实验部分

1.1 实验材料

1.1.1 仪器

日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪(包括 SPD-6AV 紫外检测器, LC-6A 输液泵, SCL-6A 色谱系统控制器, ANSTAR 色谱工作站); 色谱分析柱 Inertex.C₁₈(5 μm.150×4.6 mm, 天津市琛航科学仪器有限公司); GM-50 型隔膜真空泵(天津市腾达过滤器器件厂, 抽气速度 30 L·min⁻¹); 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司); PB153-S 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司); C-9860A 超声波清洗器(天津市科贝尔光电技术有限责任公司); YKH-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

1.1.2 试剂

人体血液样品(天津第一中心医院)、空白血浆(中心血站提供)、辛伐他汀对照品(中国药品生物制品检定所, 产品批号: 100601-200502)、内标洛伐他汀(扬子江药业集团有限公司, 产品批号: 09012302)、乙腈(色谱纯, 天津市协和昊鹏色谱科技有限公司, 产品批号: 091230)、甲醇(色谱纯, 天津市协和昊鹏色谱科技有限公司, 产品批号: 090812)、无水甲醇(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司, 产品批号: 20090828)、水(二次蒸馏水)。

2 结果

2.1 方法

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Inertex.C₁₈.5μm.150×4.6 mm; 内标物为洛伐他汀; 流动相为乙腈-甲醇-水(50:10:40); 紫外检测波长 238 nm; 流速 1ml·min⁻¹; 进样量 20μl; 柱温室温。

2.1.2 对照品溶液及内标液的配制

精密称取辛伐他汀 10mg, 用流动相(乙腈-甲醇-水(50:10:40))稀释至 10ml 的容量瓶,

作者简介: 毕丹(1987-), 女, 天津中医药大学中药学院 2010 届本科毕业生。

董伟林(1954-), 男, 天津医科大学, 高级实验师, Tel:13920989981, E-mail: dongwll119@163.com

摇匀, 即得 $1.0\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度的对照品溶液, 以此储备液为母液配制系列浓度的对照品溶液。

精密称取内标洛伐他汀 10mg , 用流动相溶解, 超声 10min 助溶, 再定容于 10ml 的容量瓶, 为内标液 ($1.0\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)。

2.1.3 血浆样品的处理

冷冻保存的血浆样品在暗处自然熔融, 混匀后取 $200\mu\text{l}$ 于带盖离心管中, 准确加入 $200\mu\text{l}$ 含洛伐他汀浓度为 $700\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 乙腈溶液。充分混匀, 静置 5min , 再次充分混匀, 离心, $13000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10min 。将上清液移于一带盖离心管中, 60°C 水浴上氮气吹干。再用 $200\mu\text{l}$ 流动相复溶, 离心 $13000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 3min , 取上清液 $20\mu\text{l}$ 进样。

2.2 结果

2.2.1 血浆标准曲线的制备

取空白血浆 $200\mu\text{l}$ 于带盖离心管中, 加入“1.2.2”项下溶液适量, 使之成为含辛伐他汀 5 、 10 、 50 、 100 、 200 、 500 、 $1000\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 系列浓度。再按“1.2.3”项下方法操作进样。记录色谱, 计算辛伐他汀峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)的比值, 并以峰面积比值(F)对血药浓度(C)进行线性回归, 绘制标准曲线(略去)。

血浆中辛伐他汀在 $5\sim 1000\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 有良好的线性。回归方程为 $y=0.001x+0.0931$, $r=0.9997$ 。

由图 1 可知, 内标洛伐他汀在 7 分左右出峰, 辛伐他汀在 9 分左右出峰, 分离良好。血浆中的杂质对其没有干扰。

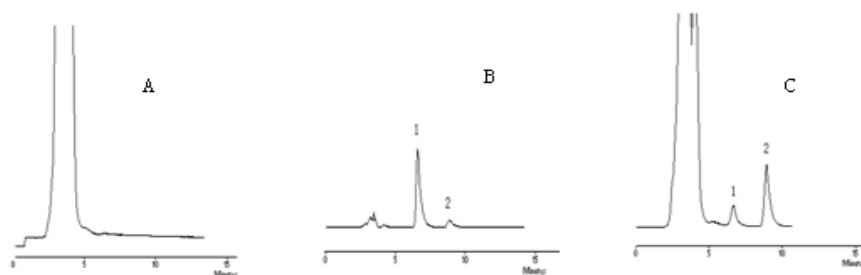


图 1 色谱图
A. 空白血浆色谱图 B. 辛伐他汀色谱图 C. 血浆中辛伐他汀色谱图
1. 内标 2. 辛伐他汀

2.2.2 回收率试验

取空白血浆 $200\mu\text{l}$ 于带盖离心管中, 加入“1.2.2”项下溶液适量, 使之成为含辛伐他汀 10 、 100 、 $500\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。再按“1.2.3”项下方法操作进样。测得峰面积之比代入回归方程, 计算相对平均回收率。

回收率在 $90\%\sim 102\%$ 之间, 符合《中国药典》2010 版要求。

2.2.3 精密度试验

取空白血浆 $200\mu\text{l}$ 于带盖离心管中, 加入“1.2.2”项下溶液适量, 使之成为含辛伐他汀 10 、 100 、 $500\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。再按“1.2.3”项下方法操分别进低、中、高 3 个浓度的辛伐他汀标准品供试液。各浓度一日内重复测定 3 次, 得日内精密度。各浓度三日测定 1 次, 连续 7 天, 测得日间精密度。RSD($n=3$) $<5\%$, 符合要求。

2.2.4 重复性试验

24 小时内连续进同一浓度标准品 6 针, 计算相对标准偏差。RSD($n=6$) $<5\%$, 符合要求。

2.2.5 样品测定

冷冻保存的血浆样品按“1.2.3”项下处理, 取上清液 $20\mu\text{l}$ 进样。测得峰面积, 代入回归方程, 结果(略去)。

3 讨论

3.1 标准品的储存

辛伐他汀遇光易分解,在临床应用中,辛伐他汀的分析应及时完成,对不能及时测定的样品,应置于冰箱里避光保存。

3.2 流动相的确定

本文曾参考有关文献选用乙腈-水(55:45),但未达到完全分离。改为乙腈-水(45:55)出峰时间:洛 $t_R=24.523$;辛 $t_R=33.027$ 。二者间分离度尚可,但保留时间过长,为了缩短样品分析时间,故又加入适量甲醇,对流动相进行了微调,采用乙腈-甲醇-水(50:10:40),出峰时间:洛 $t_R=7.133$;辛 $t_R=8.900$ 。

3.3 最佳检测波长的选择

采用紫外检测器进行检测,需要寻找一个最佳的检测波长,经过紫外全波长扫描 238nm 时为辛伐他汀的最大吸收波长,且洛伐他汀也为最大吸收波长,同时信噪比 $S/N \geq 3^{[2]}$,不会对样品的检测产生干扰。

3.4 样品提取方法的确定

①萃取法:(略去)。②乙腈沉淀法:(略去)。③(略去)。

通过实验和综合考虑,发现乙腈沉淀法经济、适用、简便,且进样后发现沉淀较完全,回收率高,而且除杂质峰能力较好,药峰得到良好的分离。最后选用这种方法作为样品提取的方法。

4 结论

本实验是运用反相高效液相色谱测定人体血浆中辛伐他汀的浓度,该方法简便、快速、线性范围宽、重现性好、精密度高、准确度高。对样品的测定与众多文献基本相符。结果表明:此分析方法可行性好,可作为临床人体血浆中辛伐他汀浓度的测定方法。

参考文献:

- [1] 王菁,刘史佳,居文政.高效液相色谱-质谱联用测定人血浆中辛伐他汀浓度[J].中国药房,2007,18(5):347-348.
- [2] 刘文英主编.药物分析[M].北京:人民卫生出版社 2007,6(5):83.

Determination of Human Plasma Simvastatin by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography

Bi Dan¹, Dong Wei-lin²

(1. University graduate in 2010, college of herbal pharmacy, Tianjin Chinese Medical University

2. college of basic medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective: To determine simvastatin in human plasma by RP-HPLC. **Method:** Chromatography column was Inertex.C₁₈.5 μ m.150 \times 4.6mm with UV detector Internal standard was lovastatin. The mobile phase was composed of CH₃CN-H₂O-CH₃OH (50:10:40). UV detection wavelength was 238nm. The flow rate was 1.0ml·min⁻¹. **Results:** The calibration curve of simvastatin was linear between 5-1000ng·ml⁻¹ ($r=0.9997$). Absolute recovery was more than 95%, within-day and between-day RSD were less than 5%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, highly accurate and precise. It can be used for the quantitative determination of simvastatin.

Key words: RP-HPLC; simvastatin; lovastatin

发酵液中紫杉醇的高效液相色谱 分离条件的优化

毕建男, 牛学良, 郝晓冉, 陈煌, 潘皎, 吕宪禹, 朱旭东

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

紫杉醇是一类高效抗肿瘤药物, 为了满足日益增长的癌症患者需求, 真菌发酵法生产紫杉醇已经引起科学界广泛关注, 本文对紫杉醇的色谱分离条件进行了优化, 具有重要意义。

紫杉醇是一种二萜生物碱, 为细胞抑制剂类抗肿瘤药物, 它对大多数实体瘤有强力抑制作用, 尤其对晚期卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和卡波济氏肉瘤的疗效确切、副作用较小。同时, 紫杉醇还能克服细胞的耐药性, 在临床上可以长期使用, 是近年来新抗肿瘤药物中受到广泛重视的一类。它也用于风湿性关节炎、皮肤病症的治疗。

目前, 紫杉醇已被广泛应用, 成为抗肿瘤的一线药物。但是由于原料和生产技术的限制, 全球紫杉醇产量严重不足, 远远不能满足市场需求, 因此价格昂贵。

1993年, Stierle等从太平洋红豆杉的韧皮部分离到一株内生真菌-安德烈紫杉菌(*Taxomyces sandreanae*), 经过各种实验证实该菌的发酵液中存在紫杉醇^[1,2]。这一发现, 为紫杉醇的工业生产提供了一条新的思路——利用真菌发酵生产紫杉醇^[3]。

然而, 真菌发酵产物成分复杂, 尤其是某些与紫杉醇极性相似的化合物, 保留时间相近, 给后续提取纯化带来很大困难。本文对发酵产物中紫杉醇的提取纯化方法进行了初步研究。

1 材料与方法

土豆培养基: 200g土豆煮沸30分钟, 三层纱布过滤后加入20g蔗糖, 蒸馏水定容至1L, pH自然。

将实验室自主分离得到的产紫杉醇菌株接种到土豆培养基中进行培养, 6天后取出, 加入等体积甲醇, 过滤掉菌丝及其他不溶物后进行55℃减压旋蒸, 悬干后加入甲醇重溶数次后, 再次进行减压旋蒸, 体积减至1mL左右取出待测。

高效液相色谱检测样品中紫杉醇含量, 流动相为甲醇:NH₄H₂PO₄水溶液=7:3, pH7.0, 流速1mL/min, 检测波长227nm, 使用C-18 ODS分析型色谱柱(4.6×250 mm, Kromasil)进行检测, 进样量20μl, 重复3次。

2 结果与讨论

实验结果如图1所示, 通过同标准品比较, 发现样品中紫杉醇疑似物与紫杉醇具有相同的保留时间, 两者可能为同一物质。

此外, 根据上述实验结果我们发现, 通过本实验流程及色谱条件, 样品中紫杉醇出峰时间前后不存在其他杂质, 为后续紫杉醇的分离纯化提供了便利, 极大程度上降低了成本, 具有重要的应用价值。

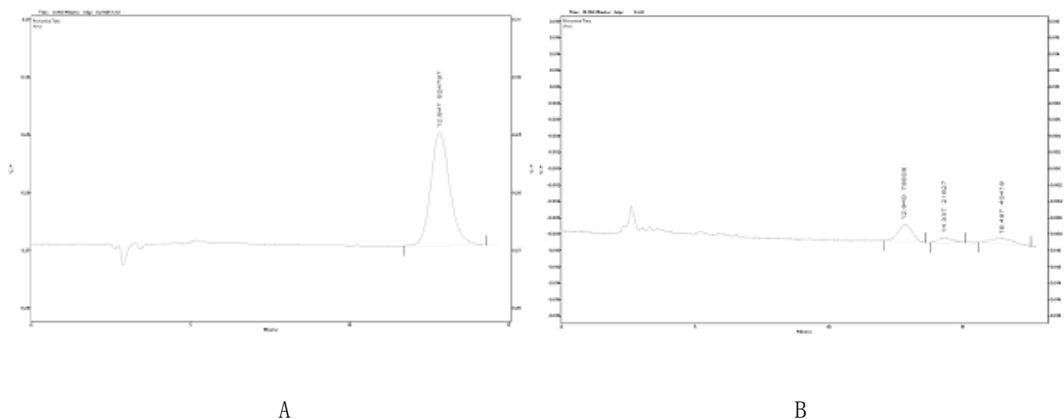


图1 高效液相色谱(HPLC)分析方法鉴定发酵液中所含紫杉醇。A. 紫杉醇标准品(出峰时间为12.847 min, B. 待测样品(出峰时间为12.840 min)图A和B中可以看出,二者的出峰时间在允许误差范围内可视为相同。

参考文献:

- [1] Wall ME, Wani MC, Taylor HL. Isolation and chemical characterization of antitumor agents from plants[J]. *Cancer Treat Rep.* 1976, 60: 1011-1014
- [2] Strobel GA, Stierle A, Stierle D, et al. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon*[J], 1993, 47: 71-78
- [3] Yuan, J.I., Bi, J. N., Yan, B. and Zhu, X.D. Taxol-producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol[J]. *Chin J Biotech.* 2006,22: 1-6.

The optimization of detecting Taxol from fermented liquor by HPLC

BI Jian-nan, NIU Xue-liang, HAO Xiao-ran, CHEN Huang, PAN Jiao, LV Xian-yu, ZHU XU-Dong

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 30071, China)

Abstract: Taxol is a kind of efficient anticancer drug. To meet the growing demands of this drug for the cancer patients, producing Taxol by fermentation has attracted more and more scientific attentions. In this paper, the chromatographic separation of taxol conditions were optimized.

Key words: Taxol; HPLC

蚕沙中 1-脱氧野尻霉素三种含量测定方法的比较

亓晖, 赵辉, 朱元元*

(南开大学药学院, 天津 300000)

蚕沙是一味传统的中药, 其味甘、辛, 性温, 无毒^[1]。主治肠鸣、热中、消渴、风痹、瘾疹等症。具有补肾生血、活血通络、清热祛风、利湿化浊、镇静安神等功效^[2]。近年有研究表明, 蚕沙提取物^[3]和蚕沙总生物碱^[4]具有抗糖尿病作用, 且HPLC分析表明其含1-脱氧野尻霉素^[5]。1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ), 化学名为(2R, 3R, 4R, 5S)-2-(羟甲基)-3, 4, 5-三羟基哌啶, 是一种天然糖的结构类似物, 该化合物及其衍生物具有竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 可用于治疗糖尿病、肥胖症、病毒感染等疾病^[6]。因此, 寻找一种简便, 准确的DNJ含量测定方法显的尤为重要。

Toshiyuki Kimura 等人^[7], 利用蒸发光检测法对桑叶中的 DNJ 进行含量测定, 检测限达 100ng, 使 DNJ 与其他成分得到很好的分离; Jin-won Kim 等人^[8]用 FOMC-Cl 对生物碱 DNJ 进行了结构衍生, 并用高效液相色谱荧光检测法对桑叶提取物中的 DNJ 进行了含量和稳定性测定, 取得了良好的效果。本文采用蒸发光、荧光和二极阵列三种检测器, 分别对测定蚕沙中 DNJ 的含量测定方法进行比较, 以确定一种效果更好的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 系列检测器; 色谱柱: Hypersil SCX 柱(250 mm×10.0 mm, 5 μ m); YMC-Pack ODS-A 色谱柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); YMC-Pack ODS-A 色谱柱(4.6mm×250mm, 5 μ m)

乙腈(色谱纯); 冰醋酸, 氨水均为分析纯; 娃哈哈纯净水。

1.2 色谱条件对比

蒸发光检测法	荧光检测法	二极管阵列检测法
色谱柱: Hypersil SCX 柱(250 mm×10.0 mm, 5 μ m); 流动相: 水-冰醋酸-氨水(1000: 0.25: 0.25; V/V/V); 流速: 1ml/min; 蒸发光检测器(漂移管 50℃, 自动增益, 气体压力: 25psi); 进样量 20 μ L。	色 谱 柱 : YMC-Pack ODS-A (4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%冰醋酸(40:60); 流速: 1.0ml/min; 荧光激发光波长为 254nm, 检测波长: 322nm; 进样量: 20 μ L。	色 谱 柱 : YMC-Pack ODS-A 色 谱 柱 (4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.1%冰醋酸(40:60); 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 265.4nm; 进样量: 20 μ L。

1.3 样品处理

取一定量样品, 加一定量 0.05MHC1, 加热回流提取, 即得供试品溶液, 根据不同的检测条件, 对供试品溶液进行一定处理, 即可进样。

蒸发光检测法	荧光检测法	二极管阵列检测法
供试品溶液过液相滤膜后直接进样	供试品溶液: 硼酸钾缓冲液: FMO-CI 衍生试剂: 甘氨酸试液(1:1:5:2.5)进行衍生后, 进样	供试品溶液: 硼酸钾缓冲液: FMO-CI 衍生试剂: 甘氨酸试液(1:1:2.5:1.25)进行衍生后, 进样

1.4 标准曲线及线性范围

蒸发光检测法	荧光检测法	二极管阵列检测法
以对照品进样量的 log 值为横坐标, 峰面积的 log 值为纵坐标, 作标准曲线, 得回归方程为 $Y=5.6556+0.9564X$ ($r=0.9995$), DNJ 对照品浓度在 5 μ g~50 μ g 范围内线性关系良好。	以对照品浓度的数值为横坐标, 峰面积的数值为纵坐标, 作标准曲线, 得回归方程为 $Y=-6786.95+41822922.26X$ ($r=0.9999$), DN 对照品浓度在 0.008mg/ml~0.08mg/ml 范围内线性关系良好。	以对照品浓度的数值为横坐标, 峰面积的数值为纵坐标, 作标准曲线, 得回归方程为 $Y=-7850.6+8E+06X$ ($r=0.9996$), DNJ 对照品浓度在 0.01mg/ml~0.10mg/ml 范围内线性关系良好。

1.5 稳定性, 重复性, 重现性, 加样回收率和同一批样品含量测定对比

	蒸发光检测法	荧光检测法	二极管阵列检测法
稳定性 (RSD)	2.01%	1.89%	1.90%
重复性 (RSD)	1.92%	1.66%	1.68%
重现性 (RSD)	1.81%	1.70%	1.65%
加样回收率 (RSD)	3.11%	2.94%	2.88%
样品含量测定	1.59%	1.65%	1.61%

2 结果与讨论

三种方法经过方法学考察, 结果表明荧光检测法和二极管阵列检测法稍好于蒸发光检测法, 但都能比较可靠地测定药材含量, 总体看来都可作为蚕沙药材的质量控制方法, 可根据自己的研究条件确定测定方法。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 1830—1831.
- [2] 刘朝胜, 陈云亮, 金进忠, 等. 治疗缺铁性贫血新药生血宁片. 中国新药杂志, 2001, 10(1): 61-62.
- [3] 谢明智, 申竹芳, 陈若芸, 等. 蚕沙提取方法、提取物及其用途. 中国专利: CN1277027.
- [4] 白钢, 杨文博, 耿鹏等. 一种蚕沙总生物碱及其制备方法, 中国专利: CN1557824A.
- [5] 陈智毅, 肖更生等. 蚕沙及蚕沙冲剂中1-脱氧野尻霉素的离子色谱法. 中国蚕业, 2003, 21(1): 30-31.
- [6] Yoshiaki A, Hivonu M. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1976, 50 (11): 571-572.
- [7] Toshiyuki Kimura, Kiyotaka Nakagawa, et al. BioFactors, 2004, 22: 341-345.
- [8] Jin-WonKim, Soo-UnKim, et al. J Chromatogr .A, 2003, 1002: 93-99.

Comparison of three determination methods of 1-deoxynojirincin in silkworm

Qi Hui , Zhao Hui , ZhuYuan-yuan*

(College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300000, China)

Abstract: AIM: To develop and compare three HPLC methods for determination of 1-deoxynojirincin in Silkworm. RESULTS: Three methods are of good reproducibility and sensitivity, and can be used for the quality control of DNJ in silkworm.

Key words: HPLC; 1-deoxynojirincin; methods.

分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定火腿肠制品中的四种苏丹红含量

乔晋东, 闫宏远, 王慧, 杨更亮*

(河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北大学药学院, 保定 071002)

苏丹红是非生物类合成色素, 主要分为苏丹红 I、II、III、IV 四种。由于其对人体的肝肾器官有明显的毒性作用且具有潜在的致癌性, 各国均严禁苏丹红作为食品添加剂加入到食品当中。目前苏丹红的检测方法以 HPLC^[1], HPLC-MS/MS^[2]和 GC-MS/MS^[3]为主。在实际样品分析过程中由于组分复杂且目标物含量低, 样品的前处理技术是整个分析过程的瓶颈, 影响整个过程的精确度和准确度。本文通过选择合适的苏丹红结构类似物作为虚拟模板, 以甲基丙烯酸(MAA)为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为分散剂, 采用悬浮聚合法制备具有较高选择性的分子印迹聚合物微球, 并以此作为固相萃取填料, 结合高效液相色谱法对不同品牌的火腿肠制品中四种苏丹红残留量进行检测。结果表明, 此法比国标有着更高的选择性。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司); 色谱柱: Optomapak-C₁₈ (4.6mm×150mm; C₁₈, 5μm); N2000 色谱工作站(浙大智达公司); MAA、EDMA、AIBN、AM(美国 ACROS 公司); 偶氮二异丁腈(AIBN, 上海天莲精细化工有限公司); 苏丹红 I, II, III, IV(天津福晨化学试剂厂); 流动相: 0.3%甲酸-甲醇溶液; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 475nm。

1.2 分子印迹聚合物的制备

准确称取适量苏丹红结构类似物和 MAA 溶于氯仿中, 充分混匀, 30min 后, 加入 EDMA 和 AIBN, 超声脱气 5min。将适量的 PVP 溶于超纯水中, 在 600 转/分钟的转速下将氯仿溶液逐滴加入溶有 PVP 的水中, 水浴温度控制在 60℃, 反应 24 小时。

1.3 分子印迹固相萃取

取 10 根自制层析柱管 1cm(内径)×6cm(高), 底部有砂芯隔板, 干法装入 500mg 的自制聚合物。轻敲实后加一砂芯隔板, 分别用 5mL 氯仿和 10mL 甲醇预淋洗。分别对上样液、淋洗液、洗脱液的种类及用量进行了优化。首先确定上样液为 2μg/mL 的苏丹红混标溶液 3mL, 分别考察了甲醇、50%甲醇水、20%甲醇水、乙腈、二氯甲烷、超纯水作为淋洗液的效果; 然后考察了 5%乙酸的甲醇, 二氯甲烷, 5%乙酸的二氯甲烷, 5%乙酸的乙腈, 5%丙酮的正己烷, 氯仿, 5%乙酸的氯仿, 乙酸乙酯作为洗脱液的效果和用量。

2 结果与讨论

2.1 聚合物的制备与表征

本文采用苯胺和萘酚为虚拟模板采用悬浮聚合法制备出粒径均一, 机械性能良好, 选择性高, 吸附性好的分子印迹聚合物微球。吸附性实验与 C₁₈ 进行了对比。如图 1 所示, 结果显示自制印迹材料比 C₁₈ 有更好的吸附性和选择性, 并且重现性良好。

基金项目: 国家自然科学基金(20905019)、河北省自然科学基金(B2010000209)、教育部留学回国基金、河北省留学人员科技活动择优资助项目、河北省高校百名优秀创新人才支持计划资助项目

作者简介: 杨更亮(1963-), 男, 河北人, 教授, Tel: 0312-5971107, E-mail: ygl@hbu.edu.cn

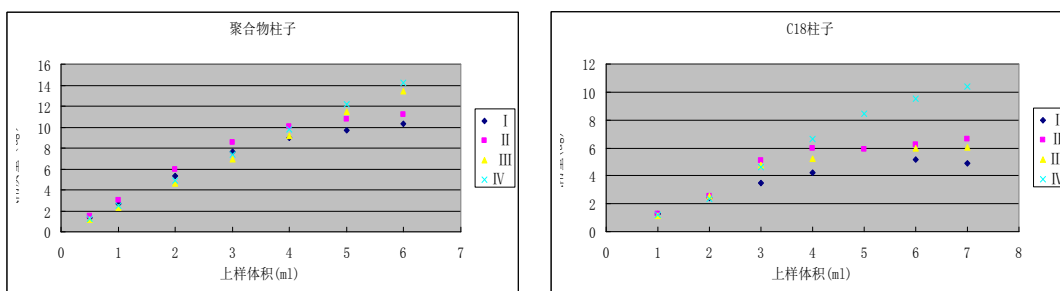


图1 材料吸附性和选择性对照表

2.2 分子印迹固相萃取条件的优化

实验结果表明, 采用 3.0mL 的 20% 甲醇水作淋洗液可以有效的除去样品中的大部分杂质, 用 5.0mL 的 5% 乙酸的氯仿作洗脱液的加标样品中无杂质影响, 能够较好的净化, 富集苏丹红 I-IV。一方面保证较高的回收率, 另一方面达到了去除杂质, 富集目标物的目的。不同品牌火腿肠样品经粉碎后用一定量的正己烷提取三次, 合并提取液后上自制印迹萃取柱在最优条件下进行固相萃取过程, 收集上样流出液、淋洗液、洗脱液挥干后用 0.5mL 流动相溶解, 进行 HPLC 分析。在三个不同的加标浓度 (0.03、0.50、2.00 $\mu\text{g/g}$) 下, 如图 2 示, 四种苏丹红的平均回收率在 90-100% 之间日内精密度均小于 1.7%, 日间精密度小于 4.0%。

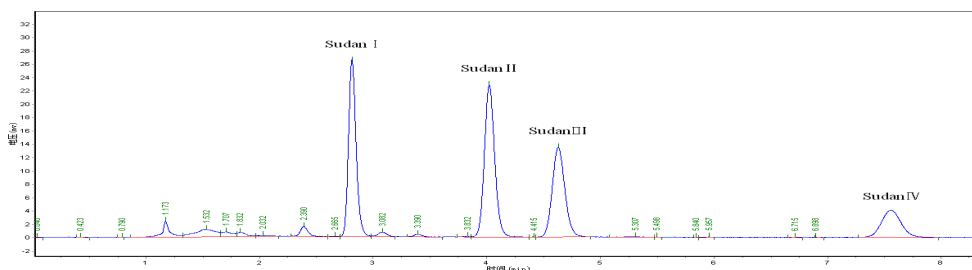


图2 火腿肠样品加标洗脱色谱图

参考文献:

- [1] Zhang Z, Zhang H, Hu Y, *et al.* [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 661: 173-180
- [2] Calbiani F, Careri M, Elviri L, *et al.* [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1042: 123-130
- [3] He L, Su Y, fang B, *et al.* [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 594: 139-146

Molecularly Imprinted Solid-phase Extraction for the Determination of Four Sudans in Sausage Products

QIAO Jin-dong, YAN Hong-yuan, WANG Hui, YANG Geng-liang*

(College of Pharmacy, Hebei University, Baoding, 071002, China)

Abstract: A simple molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography was developed for the simultaneous determination of four Sudans from sausage samples. The molecularly imprinted polymers were synthesized by suspension polymerization using aniline and naphthol as dummy template, which reveal high affinity to Sudans in aqueous solution. Comparing with alumina oxide and C₁₈, considerable differences in the interaction with Sudans were observed using MIPs as SPE sorbent.

Key words: Molecularly imprinted polymer; Solid-phase extraction; Sudans; Sausage products

原子转移自由基聚合(ATRP)法制备聚苯乙烯-二乙烯苯高分子包覆硅胶固定相

徐丹, 张海燕, 董襄朝

(南开大学化学学院, 天津 300071)

应用表面引发、活性自由基接枝聚合的方法可以在载体表面形成多层结构, 避免聚合溶液中产生非理想聚合物的问题, 同时, 交联聚合物包覆固定相具有较宽的pH使用范围, 因此, 活性自由基接枝聚合在多功能固定相的合成中具有很好的应用潜力。原子转移自由基聚合(ATRP)技术^[1,2]是活性自由基聚合发展史上最简便的一种合成技术, 具有巨大的潜在工业前景。ATRP集普通自由基聚合和活性可控聚合的优点于一体, 可以采用多种聚合方式, 在较温和的条件下经过较简单的合成路线合成指定分子结构、窄分子量分布的聚合物; 并且与其它活性可控聚合相比, ATRP能够较容易地合成星形、梳形以及超支化聚合物。

我们采用可控的 ATRP 在硅胶微球(孔径: 100Å, 粒径: 10 μm) 表面均匀包覆聚苯乙烯-二乙烯基苯, 得到表面修饰硅球。将修饰后的硅球装入不锈钢色谱柱(150 × 4.6 mm), 进行了苯类样品的色谱实验。从图 1 可以看出该填料对苯的同系物有较好的分离效果, 对苯的柱效达到 19000。图 2 为酚类样品的色谱图, 说明该填料对酚类化合物具有很好的色谱分离能力。

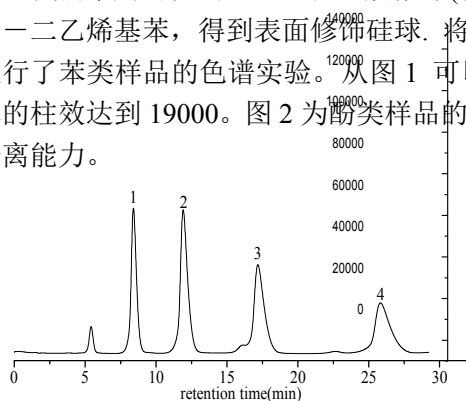


图 1. 烷基苯色谱分离图

色谱条件: 流动相: ACN/H₂O(55/45, v/v);

流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm。

化合物: 1. 苯, 2. 甲苯, 3. 乙苯, 4. 丙苯。

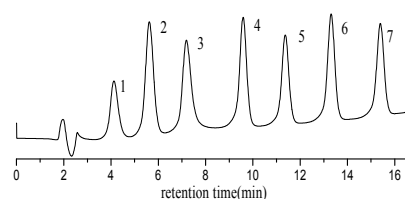


图 2. 酚类化合物色谱分离图

色谱条件: 流动相: ACN/H₂O (ACN: 0-25min, 25% -90%, v/v);

流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm。

化合物: 1. 对苯二酚, 2. 间苯二酚, 3. 邻苯二酚, 4. 苯酚,

5. 对羟基苯甲酸甲酯, 6. 对羟基苯甲酸乙酯, 7. 对羟基苯甲酸丙酯。

实验通过 ATRP 法, 成功的对二氧化硅微球表面进行化学修饰, 并将其应用于苯类化合物的分离分析, 从色谱结果可知该固定相柱效高, 对烷基苯及酚类化合物有较好选择性。我们将继续优化固定相的合成方法, 以便用于实际样品的分析。

参考文献:

[1] Wang J S, Matyjaszewski K. J. Am Chem Soc, 1995, 117: 5614-5615

[2] Kato M, Kamigaito M, Sawamoto M, et al. Macromolecules, 1995, 28: 1721-1723

毛细管电泳分离手性类氨基酸药物

李保会¹, 田宝娟²

(1.华北电力大学环境科学与工程学院, 河北保定; 2.保定学院理学院, 河北保定)

近年来毛细管电泳(CE)成功应用于药物的手性分离, 构筑手性环境使对映异构体间呈现物理特征的差异是分离手性药物的前提条件。目前手性环境的构筑呈现多样性的趋势, 比如手性衍生化试剂法、手性缓冲液添加剂法和手性固定相等。其中在缓冲液中添加手性拆分试剂是一种经济而又简单的方法。

β -环糊精(β -CD)是一类由7个葡萄糖分子通过糖苷键结合而成的环状中空筒型化合物, 其手性识别功能主要来自环内腔对芳烃或脂肪烃类侧链的包容作用, 以及环外壳上的羟基与药物对映体分子发生氢键作用。而 β -环糊精对形成包合物有最佳大小的内腔, 适用于大多数药物对映体的位阻和电子特征, 因此使用最为广泛。通过化学反应可以方便地引入不同的取代基而使其对不同的手性药物具有识别功能, 提高了 β -CD的手性识别能力。

高光学纯度的类氨基酸是合成某些医疗药物的前体, 分离类氨基酸具有重要的意义。本文以不同的 β -CD衍生物配合作为手性拆分试剂, 通过改变缓冲液中 β -CD衍生物种类、组合以及浓度分离了多种类氨基酸药物。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TH-2000 毛细管电泳系统(保定天惠分离科学研究所)。45 cm \times 75 μ m 石英熔硅毛细管(永年锐洋色谱器件有限公司)用于电泳分离。新毛细管首先用甲醇冲洗 30 min, 然后分别用 0.5 mol L⁻¹ HCl、高纯水、0.5 mol L⁻¹ NaOH、硼酸缓冲液分别冲洗 20、5、20 和 10 min。每天试验开始前用 0.5 mol L⁻¹ NaOH 和高纯水分别冲洗 20 min。每次进样之前, 毛细管分别用 0.5 mol L⁻¹ NaOH 和缓冲溶液冲洗 3 min。压力进样, 在 12 kPa 压力下进样 6 s。

1.2 试剂

所用试剂至少是分析纯。二次蒸馏水用于所有溶液配制。 β -CD 购自北京双旋微生物培养基试剂厂, 使用前经重结晶纯化; 甲基化 β -CD 和羟丙基 β -CD 购自百灵威; 羧甲基 β -CD 为实验室合成。用于手性分离的缓冲溶液由 15 mM NaH₂O₄(天津泰兴化工厂)添加一定量的 β -CD 配制, 并用 0.1~1 mol L⁻¹ NaOH(天津泰兴化工厂)调整其 pH 值, 最后用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤待用。

2 结果与讨论

2.1 不同拆分试剂的影响

以同系列的类氨基酸药物 3-(N-甲基)甲胺-对氟苯乙酰胺、3-(N-甲基)甲胺-对溴苯乙酰胺和 3-(N-甲基)甲胺-对甲氧基苯乙酰胺为分析对象, 实验了 β -CD、甲基化 β -CD、羟丙基 β -CD、羧甲基 β -CD 对三种手性药物的拆分效果。结果表明除却羟丙基 β -CD 外, 其它拆分试剂对三种手性药物没有任何分离效果。

2.2 分离效果的优化

以羟丙基 β -CD 为手性拆分试剂, 分别测试了 pH 值、羟丙基 β -CD 浓度、分离电压、有机添加剂等因素对分离效果的影响。实验得到的最优化条件为: 缓冲溶液 50 mmol L⁻¹ 羟

基金项目: 中央高校基金(No. 09QL53)

作者简介: 李保会, 男, 汉族, 1975 年生, 讲师。Email: bhlli@mail.nankai.edu.cn

丙基 β -CD + 10 mmol/L NaH₂O₄ (pH=7), 分离电压 18 kV。

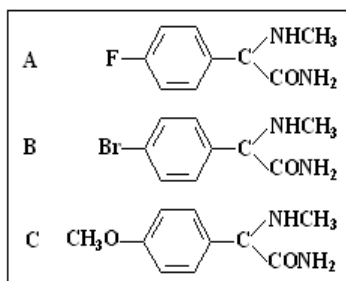


Fig. 1 The structure of several pseudo-amino acids.

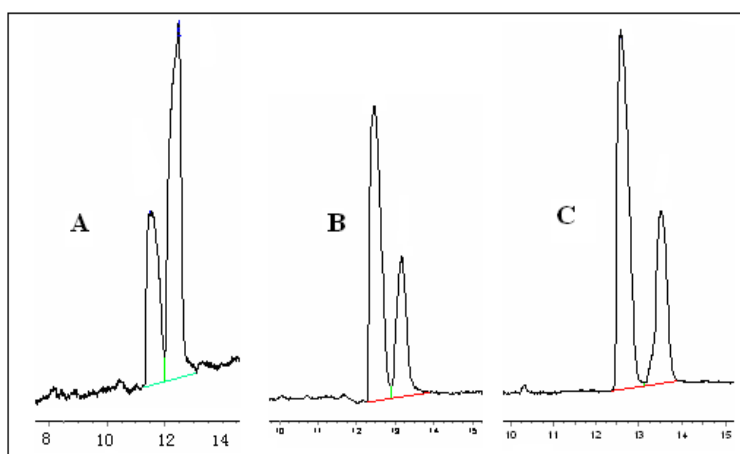


Fig. 2 Electropherogram of different pseudo-amino acids. A, 4-(N-methyl) methylamine -p- F phenylacetamide; B, 4-(N-methyl) methylamine -p- Br phenylacetamide; C, 4-(N-methyl) methylamine -p- methyl phenylacetamide.

参考文献

- [1] Kuwabe S. I., Torraca K. E., Buchwald S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12202-12206
- [2] Gubitz G., Schmid M. G. *Electrophoresis*, **2004**, *25*: 3981-3996
- [3] Natishan T. K. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2005**, *28*: 1115-1160

Chiral Separation of Pseudo- Amino Acid Enantiomers by Capillary

Electrophoresis with CD Derivations as Chiral Selector

LI Bao-hui¹, TIAN Bao-juan²

(1 School of Environmental Science & Engineering, North China Electric Power University, Hebei Province, 071003

2 Department of Chemistry, Baoding University, Hebei Province, 071003)

Abstract: A capillary electrophoresis (CE) method for the separation of pseudo- amino acid enantiomers was built. Several different dyclodextrin (CD) derivatives were tested for the chiral separation of three different pseudo- amino acids, and it was proved that hydroxypropyl β -CD showed better chiral selectivity for all three pseudo- amino acids than the neutral CDs. The baseline separation was obtained by CE in a 75- μ m i.d. \times 60 cm (effective length 45 cm) fused-silica capillary at 18 kV voltage, while 10 mM phosphate (pH=7.0) acted as running buffer and a 50mM hydroxypropyl- β -CD served as chiral selector. The detective wavelength was set at 254 nm.

Keywords: Capillary electrophoresis, chiral separation, enantiomers, pseudo- amino acids

大田软海绵酸的高效液相色谱

荧光检测方法

王丽, 王向红, 桑亚新, 周群标, 吉爽爽, 叶婧

(河北省农产品加工工程技术研究中心 河北农业大学食品科技学院, 保定 071001)

腹泻性贝类毒素(DSP)是一种肿瘤促进剂, 具有较强的致癌作用^[1], 大田软海绵酸是主要致病因子之一, 其毒素分子中没有生色集团, 但是在紫外区有吸收, 被贝类滤食后在其体内性质非常稳定, 一般的烹调加热不能使其破坏^[2]。常用的 OA 和 DTX-1 的检测方法为小白鼠生物学检测法, 该方法重现性差、灵敏度低而又易受脂肪酸等内源性化合物的干扰^[3]。随后, 酶联免疫(ELISA)学方法发展起来^[4-5], 但这种方法由于抗原抗体的交叉反应不能对混合毒素进行精确分析, 且易出现假阳性。目前最为常用的化学分析方法主要是高效液相色谱法, 荧光检测和质谱检测^[6-9]。由于 OA 和 DTX-1 的紫外吸收较弱, 必须经过荧光剂衍生处理之后方可检测, 常用的衍生试剂为 9-蒽醌(9-ADAM), 它具有高度的专一性和灵敏度, 但由于它价格昂贵且需在-80℃条件下保存从而使它的应用受到一定的限制^[10]。Jin 等^[10]用 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素作为衍生试剂, 可通过 OA 中的羧基和衍生剂的溴甲基的酯化反应生成荧光酯, 从而完成了对 OA 的分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

旋转蒸发器(上海绿叶); 电热恒温培养箱(泰斯特); 荧光分光光度计(Jasco); 高效液相色谱仪(日本岛津), 配备二元泵, 脱气装置, 自动进样器, 荧光检测器。

甲醇, 乙腈均为色谱纯(上海科密欧化学试剂有限公司); 正己烷、丙酮、氯仿(分析纯 上海科密欧化学试剂有限公司); 双蒸水由纯水系统制备; 大田软海绵酸(OA)(Zen-U Biotechnology, HPLC>95%); 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素(BrMmc)(百灵威科技有限公司); N,N-二异丙基乙胺(纯度 99%以上 百灵威科技有限公司)

2 试验方法

2.1 衍生条件

香豆素和 N,N-二异丙基乙胺在使用之前都需用干丙酮分别溶解至 0.1%和 0.3%。

2.2 激发波长和发射波长的测定

用荧光分光光度计分别对一定浓度的香豆素(BrMmc)和大田软海绵酸(OA)的衍生物进行全波长扫描, 根据所得的荧光吸收光谱, 分别记录其在最大特征吸收峰处的最大吸收波长, 从而确定荧光检测器的激发波长和发射波长。

2.3 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS-C₁₈ 色谱柱(E2017139, 250mm×4.6mm, 5μm); 柱温: 30℃; 流速: 1.2ml/min; 流动相: 乙腈/甲醇/水(58/4.5/37.5); 进样量: 10μl

2.4 标准曲线的制备

将标准品稀释为梯度浓度分别为 300、200、150、100、50、20、10ppb 的标准溶液。以 OA 衍生物标准品浓度(μg/L)为 x 轴, 以峰面积为 y 轴, 自动定量绘制标准曲线。

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项基金(NO.200805046)

作者简介: 王丽(1985—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail:wily851123@163.com

通讯作者: 王向红(1973—), 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品安全与检测方面的研究。

3 样品处理

3.1 方案一^[2]

3.1.1 提取

取适量样品用组织捣碎机捣碎混匀。取 2g 样品, 加入 10ml 甲醇/水(8:2)抽提, 用超声仪超声 30min 后, 以 3000rpm 离心 10min, 静置一段时间, 各取上层清液 1ml 至另一 50ml 的离心管。加入 5ml 正己烷脱脂提纯, 混合物在涡旋混匀器混匀 1min。待静置一段时间分层后, 弃上层正己烷。加入 5ml 水和 10ml 氯仿, 涡旋混匀器混匀 1min, 静置分层后, 将下层氯仿移至另一 50ml 离心管。水层用氯仿抽提两次之后合并氯仿层。用旋转蒸发器依次蒸发至干。用正己烷/丙酮(2:8)定容至 5ml。

3.1.2 过柱纯化

用 5ml 丙酮, 5ml 甲醇和 10ml 正己烷/丙酮(2:8)润洗硅胶柱, 取 1ml 定容后的样品加入柱子中, 用 1ml 正己烷/丙酮(2:8)和 10ml 甲醇/丙酮(3:97)先后进行淋洗。然后用 10ml 甲醇/丙酮(4:6)洗脱 DSP 毒素。

3.1.3 衍生

收集洗脱液, 蒸发至干, 加入 0.5ml 的甲醇丙酮(4:6), 过有机滤膜, 转移到棕色的小瓶中, 并用氮气吹干。然后在残留物中分别加入 50 μ l BrMmc(0.1%)和 50 μ l N,N-二异丙基乙胺(0.3%), 在 50 $^{\circ}$ C 下暗反应 2 小时。

3.2 方案二^[11]

3.2.1 提取

取 1.0g 贝样, 加入 2.0ml 丙酮匀浆, 以 3000rpm 离心 10min。待静置一段时间, 取上层清液 1.0ml, 并加入 25ml 水, 混合物在涡旋混匀器混匀 1min。待静置分层后, 将下层转移至另一离心管, 将上层再用 10ml 的二氯甲烷抽提两次, 之后合并二氯甲烷层。将所得溶液用旋转蒸发器蒸发至干。干燥后的提取液以少量二氯甲烷溶解定容至 5ml。

3.2.2 过柱纯化

填装两只串联的固相萃取柱, 上层柱为 2g 无水硫酸钠, 下层柱为 0.5g 二氧化硅。用 5ml 丙酮/甲醇(95:5)和 5ml 二氯甲烷先后润洗柱子。取 1ml 样品溶液上样, 用 10ml 二氯甲烷淋洗。然后去除硫酸钠柱, 依次以 5ml 二氯甲烷/丙酮(1:1)、5ml 丙酮、5ml 丙酮/甲醇(95:5)淋洗。最后用 10ml 丙酮/甲醇(75:25)洗脱毒素。

3.2.3 衍生

收集洗脱液, 转移到棕色的小瓶中, 并用氮气吹干。然后在残留物中分别加入 50 μ l BrMmc(0.1%)和 50 μ l N,N-二异丙基乙胺(0.3%), 在 50 $^{\circ}$ C 下暗反应 2 小时。

3.3 检测

在 DSP 的衍生反应完成后, 尽快用高效液相色谱仪荧光检测器分别进行分析检测。

4 加标回收实验及样品检测

取两份匀浆贝类样品, 其中一份加入 0.2ppm 的标准品溶液。分别按两种不同的方案处理加标和不加标贝类样品, 各重复三次, 根据测定的结果计算样品回收率。本实验选取海湾扇贝、虾夷扇贝、牡蛎、杂色蛤 4 种产于渤海地区的贝类进行样品测定, 并将海湾扇贝分为贝柱、裙边、卵黄、内脏四部分。选择较优方案进行样品检测, 比较不同贝类组织中腹泻性贝毒的含量。

5 结果与讨论

5.1 激发波长和发射波长的结果分析

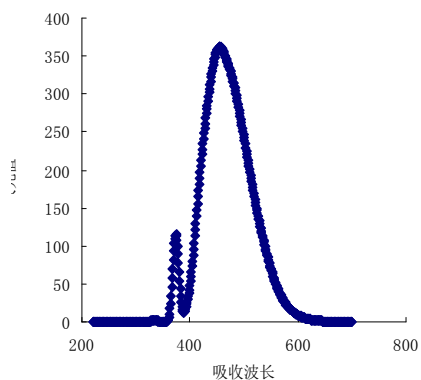


图1 香豆素激发光谱

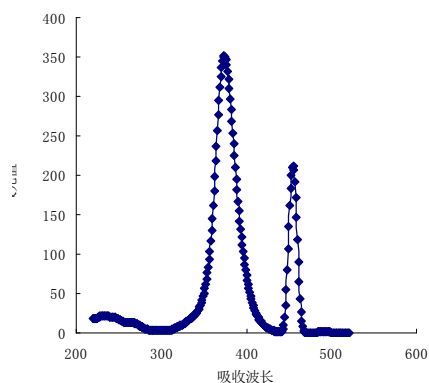


图2 香豆素发射光谱

根据图1和图2中最大吸收峰所对应的吸收波长可判定 BrMmc 的激发波长为 347nm, 发射波长为 445nm。

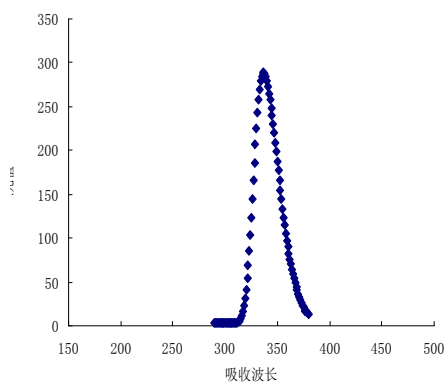


图3 OA 衍生物激发光谱

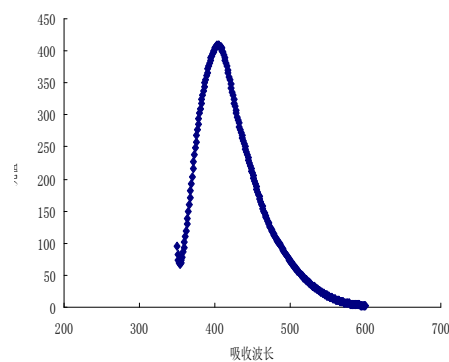


图4 OA 衍生物发射波长

根据图3和图4可知 OA 衍生物的激发波长为 337nm, 发射波长为 405nm。由先后测得的 BrMmc 和 OA 衍生物激发和发射波长的明显有所不同, 可以得知 OA 和香豆素的衍生反应已经完成, 因此荧光检测器设定的激发波长为 337nm, 发射波长为 405nm。

5.2 标准曲线结果分析

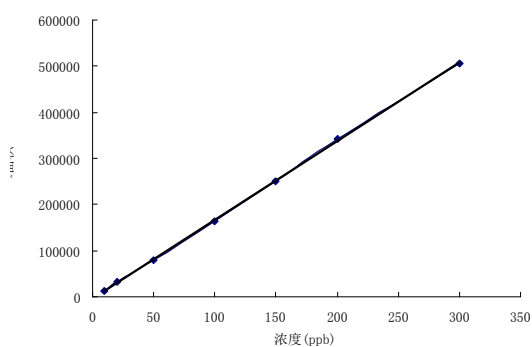


图5 不同浓度 OA 衍生物标准曲线

所得线性回归方程为 $y=1705.4x-4141.6$ ($R^2=0.9997$), 由此推断 OA 经衍生化反应后具有良好的线性关系。

5.3 色谱图结果分析

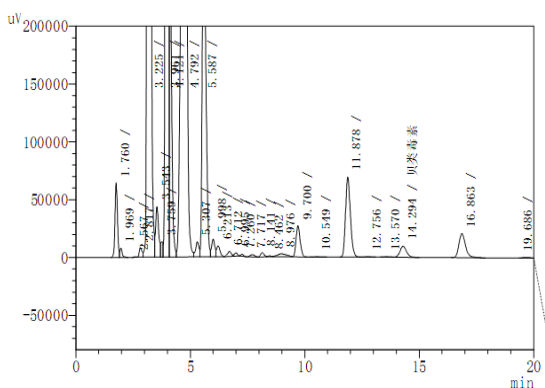


图6 OA 标准品衍生物色谱图

由标准样品色谱图可以看出 OA 保留时间为 14.294min, 避免了衍生剂的干扰。

5.4 加标回收实验结果分析

经两种实验结果表明, 方案一平均回收率为 56.25%, 前处理效果较差, 初步推断为正己烷脱脂造成标品损失, 而方案二的处理方法所得的平均回收率为 115%, 回收率高重现性好, 但两种前处理方法均操作步骤复杂繁琐, 需进一步考察研究, 使消除干扰物质的前提下, 简化处理步骤。通常接受的腹泻性贝类毒素的使用安全标准为 20 μ gOA 当量/100g 样重, 即 0.2ppm, 在所处理的 6 个样品中, 有 5 个检测到 OA 组分, 检出率约为 83%, 阳性样品为牡蛎、虾夷、杂色蛤、扇贝裙边、扇贝卵黄, 样品毒素含量大小为扇贝内脏>牡蛎>扇贝裙边>扇贝卵黄>杂色蛤>虾夷。

6 结果与讨论

大田软海绵酸经 BrMmc 衍生后, 经液相荧光检测具有良好的线性关系, 且衍生物激发和发射波长不同于衍生剂的激发和发射波长, 说明衍生反应生成新物质, 衍生条件满足反应的充分进行。经两种加标回收试验的比较, 探索较优前处理方法, 根据其性质选择提取剂和洗涤剂对样品的检测具有重大意义。我们发现渤海贝类受污染的程度较高。同时有关部门应定期检测, 及早防范, 尽量降低贝类毒素所带来的损害。

参考文献:

- [1] Yasumoto T., Murata M., Oshima M., Matsumoto G.L., "Seafood Toxins" American Chemical Society, 1984, 207-214.
- [2] 中国沿海贝类中的生物毒素研究[D]. 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2005.
- [3] Takagi, T., Hayashi, K., Itabashi, Y., Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 1984, 50, 1413-1418.
- [4] Shestowsky, S., Quilliam, M.A., Sikorska, H.M., Toxicon 1992, 30, 1441-1448.
- [5] Pamela, E., Núñez, Anne, C., International Journal of food Microbiology 1997, 36, 39-48.
- [6] Lawrence, J.F., Scott, P.M., Elsevier 1993, 273-309.
- [7] Kazuaki, A., Hiroshi, O., Yasumoto, T., J. Chromatogr. A 1996, 729, 381-386.
- [8] Kevin, J.J., Eoin, P.C., Marion, G., Sean, S.K., Rosa, D., Lucentini, L., Luigi, G., Toxicon, 1997, 6, 973-978.
- [9] Kevin, J.J., Alan, B.G., Yasumoto, T., J. Chromatogr. A 1999, 844, 53-65.
- [10] Jin, L.S., Christian, H., Bernd, L., Anal. Chem 1997, 357, 101-104.
- [11] 卢士英. 海产品中 大田软海绵酸快速检测方法研究[D]. 吉林大学, 2007.

The HPLC-fluorometric methods of the okadaic acid

Wang Li, Wang Xiang-hong, SANG Ya-xin, ZHOU Qun-biao, JI Shuang-shuang, YE Jing

(Engineering Research Center of agricultural products' processing in Hebei Province,

College of Food Science & Technical, Agricultural University of HeBei, Baoding 071001)

Abstract: The fluorescence derivation was reacted with BrMmc and Okadaic acid(OA), and preliminary exploration was made for the conditions of derivative reaction, excitation and emission wavelength of ester derivatives. The results show that the largest fluorescence absorption appeared on Ex=337nm, Em=405nm. After separated with C₁₈ column by HPLC, a good linear was obtained: Y=1705.4x-4141.6 (R²=0.9997). Two sample pretreatment methods were used in standard-addition experiment to prove the accuracy of the schemes.

Key words: Okadaic acid; HPLC; fluorometric derivation

对硫磷分子印迹聚合物固相萃取材料的合成及其应用

苏晓倩, 高瑞霞, 孙祥丽, 林冬, 陈朗星*

(南开大学化学学院, 天津 300071)

对硫磷 (Parathion) 是一种广谱性杀虫、杀螨剂, 对害虫具有强烈的触杀和胃毒作用, 为胆碱酯酶抑制剂。在密闭场所也有一定的熏蒸作用, 尤其在 30℃ 以上时, 熏蒸作用更加明显, 对硫磷的杀虫效果与气温有密切关系, 在 18℃ 以上时, 熏蒸作用更加明显。在 18℃ 以下效果较差。在 18℃ 以上杀虫效果随温度提高而增加, 但药效期相应缩短。对硫磷无内吸杀虫作用, 但有较强的渗透力, 施于植物叶表面的药液能渗透进入叶内, 杀死在叶背取食的蚜、叶蝉和螨。施于稻田水中的药剂, 能渗透进入叶鞘内或水稻心叶部位, 杀死已侵入叶鞘或心叶部位的螟虫一龄幼虫。在叶上的残效期一般为 4—5 天, 主要存在于大米, 鸡肉, 猪肉, 牛肉, 大蒜, 洋葱, 苹果等作物中。本文以对硫磷为模板, 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES), 苯基三甲氧基硅烷 (Phenyltrimethoxysilane, PTMOS) 为功能单体, 采用分子印迹溶胶-凝胶 (sol-gel) 方法, 以硅球 (45-75 μm) 为载体, 制备了可用作固相萃取材料的对硫磷分子印迹聚合物 (MIP) 和非印迹聚合物 (NIP), 并对该印迹聚合物的吸附特性进行了研究。如图 1 所示, 该印迹聚合物 1min 左右即可达到吸附平衡, 可达到快速分离的效果。

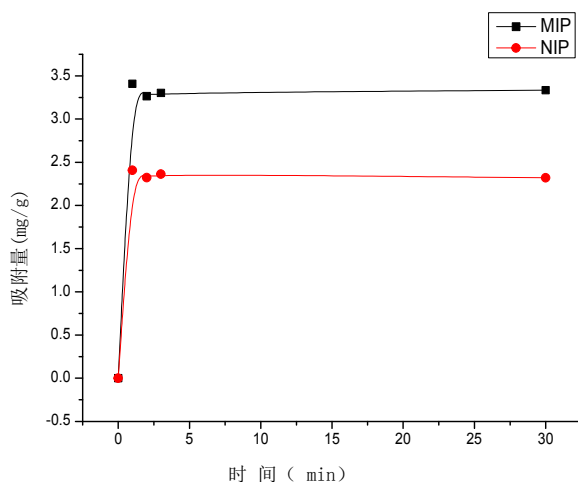


图 1 MIP, NIP 对 10mg/L 对硫磷溶液进行吸附

参考文献:

- [1] Sharon Marx, Amalya Zaltsman, Iva Turyan, Daniel Mandler, Anal. Chem. 2004, 76, 120-126
- [2] Xiaoman Jiang, Wei Tian, Chuande Zhao, Haixia Zhang*, Mancang Liu, Talanta 72(2007) 199-125
- [3] Raquel Gomes da Costa Silva, Fabio Augusto*, J. Chromatogr. A, 1114(2006)216-223

基金项目: 国家 863 计划: 有机磷、磺酰胺类农药高效分子印迹材料的制备技术及其检测应用 (批准号 2007AA10Z432)

HPLC 法在 PDS 靶标酶除草剂筛选中的应用

戎清清, 马荣, 朱晔荣*, 吕宪禹, 王勇

(南开大学 生命科学院, 天津 300071)

1 前言

八氢番茄红素脱氢酶(PDS)是类胡萝卜素生物合成途径中的关键酶。众所周知,类胡萝卜素是一种很重要的天然色素,对于保护植物叶绿体、防止光合系统的光灭活和光破坏发挥着重要的作用^[1],以八氢番茄红素脱氢酶为主要靶标设计的化合物,通过抑制类胡萝卜素的生物合成,从而阻碍植物光合作用的正常进行,可以有效发挥杀草的作用^[2]。由于该类除草剂同时破坏植物体内的叶绿素,因此它们兼具有漂白作用。同时由于PDS酶不存在于动物体内,故PDS靶标类除草剂对人与动物的毒性很低,因此,该类除草剂被认为是高效、低毒、环境友好型的除草剂,具有很好的应用前景。这也进一步促进了该类新型除草剂的研究与开发。加上组合化学的迅速发展,使得针对PDS靶标设计合成的化合物增加很快,因此该类的除草剂的筛选尤为重要。

2 PDS 靶标类除草剂的筛选方法

国内外对于PDS靶标类除草剂的筛选方法有多种,如常规的油菜平皿法^[3]、浮萍^[3]及藻类生测法^[4]、体外酶活检测法^[5-7]和同位素示踪法^[4,8-9]等。本实验室也在致力于筛选以八氢番茄红素脱氢酶为靶标的除草剂。我们主要是采用浮萍生测法^[3]和酶活抑制作用的研究。

如果对以上不同方法进行归类,可以分为生物活性测定和酶活抑制分析法。其中油菜平皿、浮萍和藻类生测法等都将待测化合物加入植物培养体系,通过检测其对植物生长的抑制作用或对叶绿素合成的影响来初步筛选出有效的化合物^[3,4]。而对于活体的同位素示踪和体外PDS酶活抑制作用分析都是检测待测化合物对八氢番茄红素代谢过程的影响,主要分析其对 δ -类胡萝卜素的合成是否有抑制作用,而且大多是采用HPLC方法检测 δ -类胡萝卜素含量的变化^[8,9]。

3 HPLC 法筛选 PDS 靶标酶的除草剂

高效液相色谱检测方法具有分辨率和灵敏度高,分析速度快,色谱柱可反复利用,流出组分易收集,重复性好,定量精度高,应用范围广等优点,适用于分析高沸点、大分子、强极性、热稳定性差的化合物。类胡萝卜素是高度不饱和化合物(多烯),含有一系列共轭双键和甲基支链,特定的化学结构使类胡萝卜素易溶于有机溶剂,且在可见或紫外光谱区域有强烈的吸收,适于高效液相色谱检测。

因此,近十年来,对于PDS靶标酶除草剂的筛选多采用HPLC方法。其中采用比较多的是体外分析不同化合物对PDS酶的抑制作用。主要是通过原核生物获得PDS酶和底物八氢番茄红素,即由含有pds基因的工程菌表达PDS酶,由含有合成八氢番茄红素基因的工程菌生产底物八氢番茄红素,分别提取底物和PDS酶后,在体外加入待测化合物进行酶化学反应,再通过HPLC方法,在425nm下检测产物 δ -类胡萝卜素的生成量来判断不同化合

*通讯作者: 南开大学生命科学院 300071

物对 PDS 酶活性的抑制作用^[8,9], 非常直观、简便, 而且较之于同位素示踪法^[8,9]更安全, 更稳定。

另外, 随着 HPLC 分析方法的不断优化, 采用该方法可以非常有效地筛选出有抑制作用的化合物, 因为在测定反应混合物时可以通过改变检测波长同时检测到产物和底物的变化, 能更客观真实地反应化合物的抑制作用, 并且是在短短 25min 之内就能测完一个样品^[10]。

4 结论与展望

近年来, 利用原核系统和体外 PDS 酶活反应, 并借助 HPLC 分析方法, 能够有效筛选 PDS 靶标酶的除草剂, 而且该方法特别适合于高通量的筛选 PDS 靶标酶的除草剂, 在该类除草剂的筛选中备青睐^[11]。此外, 随着 PDS 酶反应产物分离方法和 HPLC 检测方法的不断优化, 相信会探索出一种更加适合、高效、灵敏的检测和筛选除草剂的方法。

参考文献

- [1] Bramley P M. J Experimental Botany, 2002, 53: 2107.
- [2] Boger P, Sandmann G. Pestic. Outlook, 1998,9: 29.
- [3] Xu H, Zou X M, Zhu Y Q, et al. Synthesis and herbicidal activity of novel α,α,α -trifluoro-m-tolyl pyridazinone derivatives. Pest Manag Sci 2006.62:522-530.
- [4] Sandmann G, Ward C E, Lo W C. et al. Bleaching Herbicide Flurtamone Interferes with Phytoene Desaturase, Plant Physiol. 1990. 94: 476-478.
- [5] Linden H, Misawa N, Chamovitz D, et al. Functional complementation in Escherichia coli of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. Z Naturforsch 1991.46c:1045-1051.
- [6] Sandmann G, Schneider C, Boger P. A new non-radioactive assay of phytoene desaturase to evaluate bleaching herbicides. Z. Naturforsch. 1996. 51c: 534-538.
- [7] Hitoshi O, Isao Y, Kiyoshi Arai, et al. Mode of bleaching phytotoxicity of herbicidal diphenylpyrrolidinones. Pest Manag Sci, 2001, 57:33-40.
- [8] Sandmann G, In vitro assay system for phytoene desaturase inhibitors with isolated thylakoids, in Target Assays for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds, ed by BoEger P and Sandmann G, Lewis Publ, Boca Raton, FL, USA, (1993) pp 15-20.
- [9] Nancy J. Engelmann¹, Randy B. Rogers², Mary Ann Lila^{1,2}, and John W. Erdman Jr. Herbicide Treatments Alter Carotenoid Profiles for ¹⁴C Tracer Production from Tomato (*Solanum lycopersicum* cv. VFNT cherry) Cell Cultures. J Agric Food Chem. 2009, 57(11): 4614-4619.
- [10] Arno Schmidt and Gerhard Sandmann. In Vitro Characterization of Two Different *Phycomyces blakesleeana* Mutants with Impaired Phytoene Desaturation. Journal of Bacteriology, 1990, 172 (7): 4103-4105.
- [11] 赵显峰, 潘丽莉, 孟晶, 等. 高效液相色谱法测定蔬菜中类胡萝卜素组分. 卫生研究. 2008, 37(2) 228-230.

高效毛细管电泳法用于麻保沙星的测定

李志伟, 崔哲, 赵云超

(河北科技大学化学与制药工程学院, 河北石家庄 050018)

麻保沙星(marbofloxacin) (图 1)是一种动物专用的第三代氟喹诺酮类抗菌药。具有抗菌谱广, 抗菌活性强的特征, 生物利用度高,且毒性低, 较安全,被列为动物专用药^[1,2]。已有 HPLC^[3-4]法, LC-MS 法测定麻保沙星的报道。毛细管电泳是一种经济, 快速, 高效的分离分析方法, 论文建立了专属性强, 精确高效的毛细管电泳法测定麻保沙星原料药含量的方法, 为麻保沙星的质量监控提供参考。

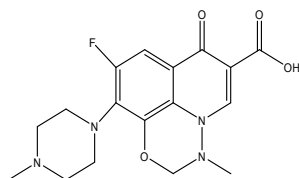


图1 麻保沙星的结构

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司), CL102 型紫外检测器, HW-2000 型色谱工作站, 石英毛细管(河北永年锐沣色谱器件公司)。

四硼酸钠, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 磷酸均为分析纯, 水为重蒸水, 所有样品及缓冲液均经 0.45 μ m 滤膜过滤。

麻保沙星样品(批号 20091002、20091005、20091008)为实验室自制, 麻保沙星对照品(Y0000819, ID0035Y7, 含量 100%)购自欧洲药典委员会。

毛细管柱为未涂层石英毛细管柱(75 μ m \times 70cm), 运行缓冲液为15mmol/L的硼砂缓冲盐(pH=9.2, 使用前先脱气); 采用高度差进样10s; 分离电压20kv; 检测波长295nm, 室温下操作。

1.2 线性范围

依次将配制好的一系列浓度的麻保沙星溶液 100 μ g/mL, 80 μ g/mL, 60 μ g/mL, 40 μ g/mL, 20 μ g/mL, 10 μ g/mL 进样, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得到的回归方程为 $Y=159.11+362.75X$, $r=0.9993(n=6)$, 标准曲线如图 2 所示。结果表明麻保沙星在此方法下在 10 μ g/mL~100 μ g/mL 范围内线性良好。

1.3 精密度, 稳定性和重复性试验

在上述实验条件下, 将 80 μ g/mL 的麻保沙星样品溶液重复进样 6 次, 考察此方法的精密度, $RSD\%=1.2\%$, 表明该方法精密度较高。

1.4 回收率试验

精密称取 0.64g, 0.8g, 0.92g 麻保沙星分别制成 64 μ g/mL, 80 μ g/mL, 92 μ g/mL 溶液, 测其峰面积, 再加入 80 μ g/mL 样品溶液 1mL, 测其峰面积, 结果平均回收率为 100.2%, $RSD\%$ 为 0.97%。

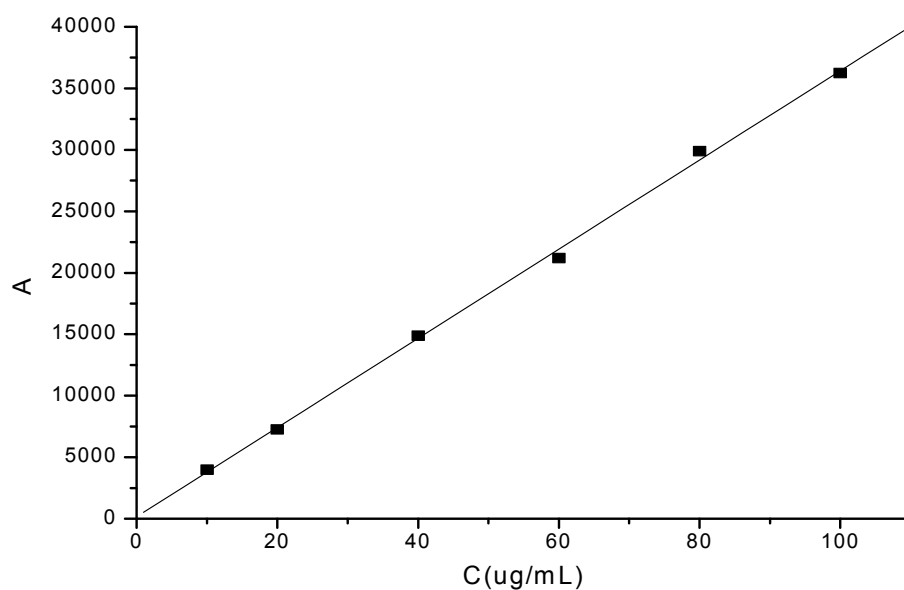


图2 标准曲线

2 结果与讨论

2.1 缓冲液 pH 值的选择

在相同浓度下比较了硼酸钠缓冲液, 磷酸盐缓冲液和硼砂-磷酸缓冲液三种缓冲盐体系, 实验发现硼酸钠缓冲液对麻保沙星的分析较为理想, 选择硼酸钠为毛细管电泳的缓冲液。

实验考察了在 15mol/L 硼酸钠溶液中加入磷酸调 pH 值为 8.0, 8.5, 9.2 和 0.1mol/L NaOH 调 pH10.0, 实验结果表明 pH 为 9.2 时峰型较好(见图 3)。

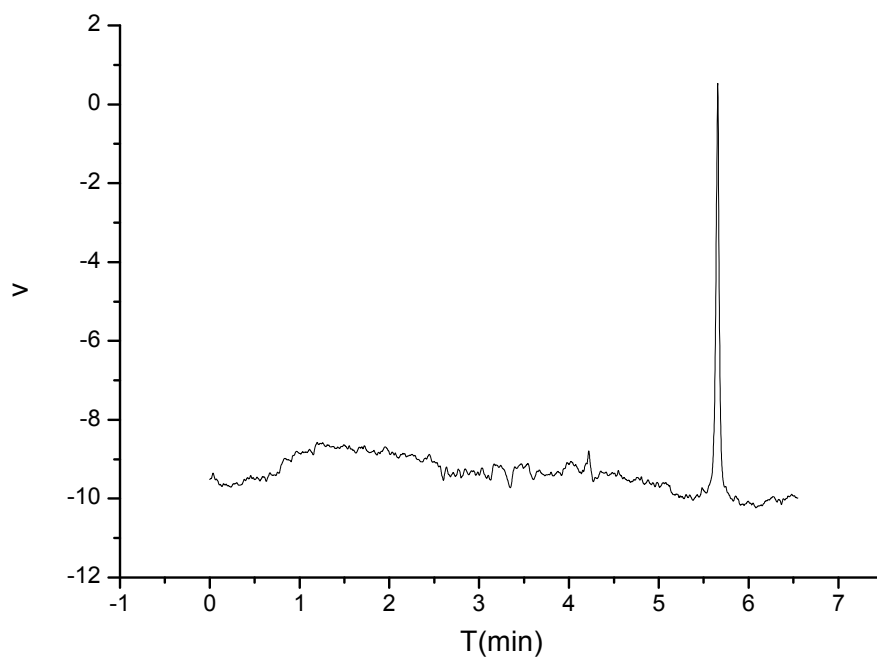


图3 麻保沙星样品在 pH=9.2 时高效毛细管电泳图谱

2.2 缓冲液离子浓度的选择

实验选择了 10mmol/L, 15mmol/L, 25mmol/L, 30mmol/L 的硼酸钠溶液作为缓冲液, 随着离子浓度的增大, 麻保沙星出峰时间延长, 而且浓度较大时电流过大, 焦耳热增大, 使峰型不稳, 所以选择 15mmol/L 的硼酸钠溶液作为缓冲液。

2.3 样品测定

取三批样品麻保沙星, 在选定的电泳条件下分别测定, 结果三批样品的含量均大于 99.0%。

3 结论

选用毛细管电泳法分析麻保沙星, 缓冲液为 15mmol/L 的硼砂溶液, pH 值 9.2, 进样时间 10s, 分离电压 20kV, 在此条件下麻保沙星迁移时间适中, 分离度较高, 峰型较好。精密度较高(RSD%=1.2%), 在 10 μ g/mL~100 μ g/mL 范围内线性良好($r=0.99927$), 检测限较灵敏(2.5 μ g/mL), 回收率较高(100.2%), 在此条件下测的麻保沙星的含量为 99.2%。该方法柱效较高, 分析时间较快, 使用样品、溶剂量较少, 为麻保沙星的分析测定提供了一种良好的分析方法。

参考文献

- [1] 邱银生, 吴佳. 动物专用氟喹诺酮类药物研究进展简介[J]. 中国兽药杂志, 1998, 32(3): 46~48
- [2] 王志强, 陈杖榴. 动物专用氟喹诺酮为抗菌新药—麻保沙星[J]. 中兽医医药杂, 2001, 22(4): 38~41
- [3] 冯利, 庞静秋. 高效液相色谱法在药物分析专业的应用[J]. 黑龙江医药. 2003, 16(1): 43~44
- [4] Ismail M, Kattan Y A. 2007. Coparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and Mannheimia haemolytica infected calves . Research in Veterinary Science 82, 398~404

Determination of Marbofloxacin by High Performance Capillary Zone

Electrophoresis

LI Zhi-wei, CUI Zhe, ZHAO Yun-chao

(College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

ABSTRACT: A high performance capillary Zone electrophoresis method was established for the determination of Marbofloxacin drug substance. An untreated fused-silica capillary was used with 15m mol/L sodium borate buffer (pH 9.2) as running buffer at the detection wavelength of 295 nm, separation voltage of 20 kV and the injection volume of sample for 10 s. The calibration curve for Marbofloxacin was linear in the concentration range of 10 μ g/mL~100 μ g/mL. The average recovery was 100.2% with *RSD* of 0.97%.

Key Words: Marbofloxacin; drug substance; high performance capillary electrophoresis; determination

毛细管区带电泳法拆分匹伐他汀钙对映体

杨更亮^{1,2}, 程晓昆^{1,2}, 王利娟^{1,2}

(1. 河北大学药学院, 保定 071002;

2. 河北省药物质量分析控制重点实验室, 保定 071002)

匹伐他汀钙 (pitavastatin, pitavastatin calcium, Livalo) 具有较强的 HMG-CoA 还原酶抑制作用、呈肝细胞选择性、药动学性质优异、安全性好, 被制药界誉为“超级他汀”^[1], 用于原发性高胆固醇血症和复合性血脂异常的基础治疗, 辅助膳食调整以降低总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 B 和甘油三酯的升高, 增加高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)^[2]。匹伐他汀钙在临床上使用的是它的右旋体: (+)-{双[(3R,5S,6E)-7-[2-环丙基-4-(4-氟代苯基)-3-噻琳基]-3,5-二羟基-6-庚烯酸]}单钙盐。化学结构式见图 1^[3]。在其合成过程中可能会有匹伐他汀钙的对映异构体作为杂质存在^[4], 为了使产品能够达到较好的疗效, 保障用药的安全性, 控制其对映异构体含量是一项非常必要的工作, 但是目前国内外对匹伐他汀异构体的检测方法并不多见。本文建立了毛细管区带电泳拆分匹伐他汀钙的方法。

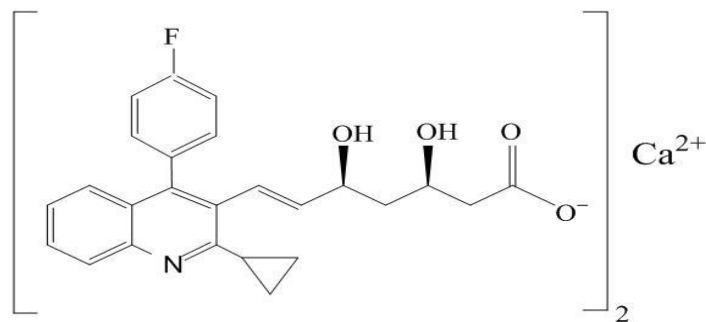


图 1 匹伐他汀钙结构式

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

高效毛细管电泳仪 (北京彩陆科学仪器有限公司, 中科院研究生院应用化学所), 内设可变波长的紫外检测器; HW-2000 色谱工作站 (南京千谱软件有限公司); 未涂层熔硅弹性石英毛细管柱 (内径 50 μ m, 柱长 52cm, 河北永年锐洋色谱器件有限公司); PHs-3C 型 pH 计 (上海精科仪器有限公司)。

匹伐他汀原料和匹伐他汀对映体均有兰州大学提供; 匹伐他汀钙片 (Kowa Company, Ltd. Nagoya Factory); Tris (北京双旋微生物培养基制品厂) (BR); 十二烷基磺酸钠 (天津市科密欧化学试剂有限公司) (AR); 羟丙基- β -环糊精 (山东新大精细化工有限公司) (AR); 实验用水均为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验样品制备

取一定量匹伐他汀钙、匹伐他汀钙对映体及匹伐他汀片分别加入三个试管中, 均用甲醇/水 (1:1) 溶解并超声。

1.3 实验条件

未涂层熔硅石英毛细管柱 (52cm \times 50 μ m); 运行缓冲溶液含 80mM Tris、盐酸、7.5g HP- β -CD、5mM SDS、5mM 尿素, pH=3.35; 检测波长 244nm; 分离温度 23 $^{\circ}$ C; 分离电压

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20375010, 20675084)

作者简介: 杨更亮 (1963), 男, 河北人, 教授, 博士生导师, Tel: 0312-5971108; email: ygl@hbu.edu.cn

18KV; 采用虹吸进样, 进样高度 17cm, 进样时间 2s; 每次进样前用 0.1mol/L NaOH 溶液冲洗毛细管柱 5min, 超纯水冲洗 10min, 缓冲溶液冲洗 5min, 每个样品重复进样三次。

2 结果

2.1 实验条件优化

实验研究了运行电压、背景电解质组成及浓度、环糊精种类及浓度、缓冲溶液 pH、添加剂等因素对拆分的影响。结果表明: 背景电解质组成、环糊精种类及缓冲溶液 pH 值对分离度结果影响较大; 添加剂种类和浓度对柱效和峰形影响较大。在优化的实验条件下, 匹伐他汀钙对映体达到了基线分离, 分离度可达 1.73。

2.2 拆分匹伐他汀钙混旋体色谱图

在 1.3 实验条件下, 拆分匹伐他汀混旋体标准样品拆分的色谱图如图 2 所示, 其中标准样品浓度为 0.5mg/ml。

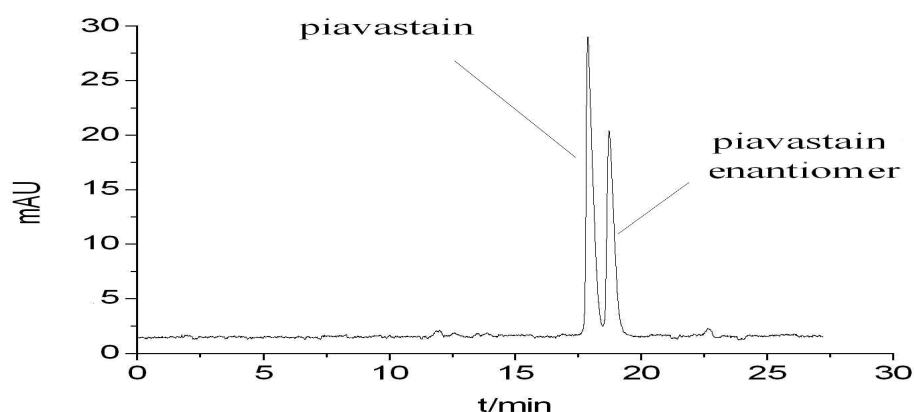


图 2 匹伐他汀钙电泳分离图

2.3 拆分匹伐他汀钙供试品色谱图

在 1.3 实验条件下, 匹伐他汀钙片分析如图 3 所示, 其中供试样品浓度为 5mg/ml。实验表明, 该厂家的匹伐他汀钙片不含其对映体杂质。

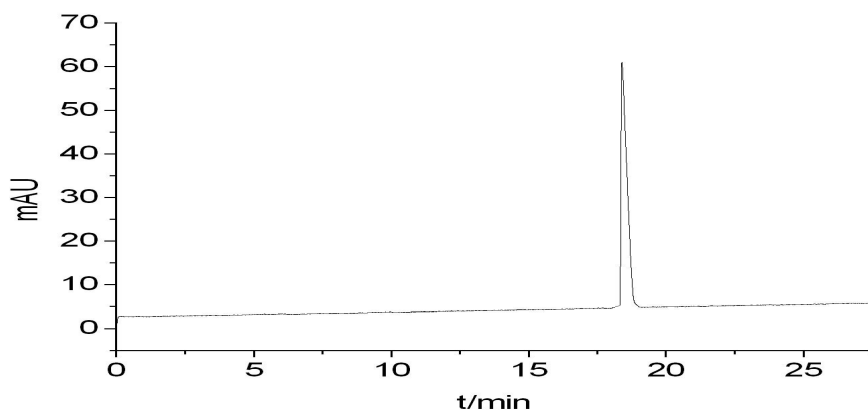


图 3 匹伐他汀钙片电泳图

2.3 方法的精密度

以 pitavastatin 为例, 其日间(n=6)和日内(n=6)测定的分离度的标准偏差(RSD)分别为 2.8%和 2.4%, 柱效的标准偏差(RSD)分别为 3.0%和 2.7%。结果表明, 该方法的精密度较高, 重现性较好。

(下转第 127 页)

基于原子转移自由基聚合和点击化学方法 制备手性色谱固定相

王怀松, 姜萍, 张敏, 董襄朝³⁴

(南开大学化学学院 天津, 300071)

原子转移自由基聚合 (atom-transfer radical polymerization, ATRP) 作为活性可控自由基聚合方法之一, 具有适用单体范围广, 可合成指定分子结构、窄分子量分布聚合物的优点。ATRP 以有机卤化物为引发剂、过渡金属配合物为卤原子载体, 通过氧化还原反应, 在自由基“活性种”和卤素原子封端的自由基“休眠种”之间建立可逆的动态平衡, 实现了对聚合反应的控制。

本实验采用“grafting from”的方法^[1], 以甲基丙烯酸甲酯丁醇酯 (2-methyl-3-butny-2-ol methacrylate, MBMA) 为单体, 采用 ATRP 方法, 在多孔硅胶表面制得聚 MBMA 链, 然后通过点击化学方法接枝上 β -环糊精 (β -CD)^[2] 作为 HPLC 手性固定相 (CD-click-sil, 结构见图 1)。

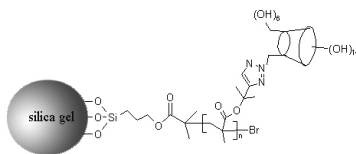


Fig. 1 the structure of CD-click-sil

以 CD-click-sil 为色谱固定相, 考察了其对手性化合物的分离能力。结果表明, 该固定相对一些手性异构体可以达到基线分离 (Fig. 2)。

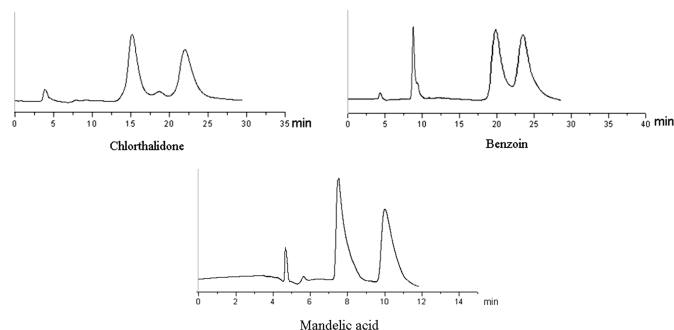


Fig. 2 Enantio-separation of chiral compounds on CD-click-sil stationary phase. HPLC column size was 150×4.6 mm. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. Mobile phase: MeOH/TEAA solution. Detection wavelength was 254 nm.

参考文献:

- [1] T. Wu, Y. Zhang, X. Wang, *Chem. Mater.*, 2008, 20, 101.
- [2] R. C. Petter, J. S. Salek, C. T. Sikorski and F. T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 3860.

基金项目: 国家自然科学基金 (No.20575030) 资助
作者简介: ³ 通讯联系人, Email: xcdong@nankai.edu.cn

Synthesis of Novel Chiral Stationary Phase based on Atom Transfer Radical Polymerization Method and Click Chemistry

WANG Huai-song, JIANG Ping, ZHANG Min, DONG Xiang-chao*

(College of Chemistry, Nankai University, Tianjin, 300071, P. R. China)

Abstract: A new chiral stationary phase was designed and synthesized via atom transfer radical polymerization (ATRP) and click chemistry. 2-Methyl-3-butny-2-ol methacrylate (MBMA) was polymerized and grafted on the silica surface by surface-initiated ATRP first. Then azide-modified β -CD was immobilized on the alkyne of pMBMA as chiral separation material (CD-click-sil). The chromatographic results demonstrate the chiral separation ability of CD-click-sil and illustrate the usefulness of click chemistry in the preparation of CD-click-sil.

Key words: atom transfer radical polymerization; β -cyclodextrin; chiral separation.

(上接第 125 页)

3 讨论

目前国内外尚无采用电泳模式对匹伐他汀钙拆分的报道,本实验考察了拆分匹伐他汀钙的区带电泳条件,通过优化实验条件,实现了基线分离。该方法分析速度快,结果较准确,试剂用量少,分析成本低,且不污染环境,为匹伐他汀钙的质量控制提供了良好的依据。

参考文献:

- [1] 何笑荣, 邹定, 姜文清, 马捷, 李金娥. [A]. 中国新药杂志. 2005, 14 (4): 483-487
- [2] 汤仲明. [A]. 国际药学研究杂志. 2010, 37 (1): 12
- [3] 许 筱, 申屠建中, 胡应江. [B]. 新药评述. 2009, 18 (5): 383-386
- [4] Suzuki M, Iwasaki H, Fujikawa Y, et al. Synthesis and biological evaluations of quinoline-based HMG-CoA reductase inhibitors. *Bioorg Med. Chem*, 2001, 9 (10): 2727

Chiral separation of pitavastatin by capillary zone electrophoresis

YANG Geng-liang^{1,2}, CHENG Xiao-kun^{1,2}, WANG Li-juan^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. Hebei Province Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control, Baoding 071002, China)

Abstract: The objective of this study was to establish a capillary zone electrophoresis method for the chiral separation of pitavastatin and its enantiomer. In this method, the bare fused-silica capillarie (52cm \times 50 μ m) was used and Tris-HCl buffer was employed. In order to optimize the method, more studies were performed with different parameters, i.e. composition of the running buffer, pH of the running buffer, concentration of Tris, additives and so on. Under the optimal separation conditions pitavastatin and its enantiomer were separated well. The result indicating that this method is suitable for the chiral separation of pitavastatin and its enantiomer, and is valuable for the limitation control of pitavastatin.

Key Words: Pitavastatin; enantiomer; Chiral separation; Capillary zone electrophoresis

利用UHPLC技术优化药典2010版甘草的含 量测定方法

肖尧

(安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100102)

本文采用了基于亚二微米填料技术(STM)的安捷伦1290 Infinity LC超高效液相色谱(UHPLC)系统对中国药典2010版中甘草含量测定的HPLC方法进行了优化和改进,使得分析速度提高了一倍多,并且更好的分离了杂质成分,提高了定量分析的准确性。

2010版中国药典一部中药部分收载2165个中药品种,新增1095种,修订634种,检测品种的增加修订,对分析方法的效率和数据结果的准确性提出了新的挑战,和如何快速准确的对药典种的各个项目进行检测,是提高药品质量的重要因素。传统的HPLC技术对中药及其制剂的分析通常需要较长的分析时间,对于有些成分复杂的样品,还存在分离效果不佳的问题,这些因素严重影响了中药分析速度和质量。

目前市场上热门的亚二微米填料(STM)技术和超高效液相色谱(UHPLC)技术为提高中药及制剂的整体分析效率提供了良好的解决方案,可以根据不同的应用需求,对HPLC方法进行分析速度,分离效果等方面的优化,使得色谱分析方法在更短的时间内获得更好的分离效果,从而提高中药分析的整体效率并降低检测的成本。

本文以2010版中国药典中甘草定量分析的HPLC方法为基础,将其转换为UHPLC方法并进行了优化,最终得到了快速准确的UHPLC分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

液相色谱仪: Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统

色谱柱: Agilent Zorbax Stable Bond C18 (2.1×100mm, 1.8μm) RHHHD 色谱柱

试剂: 实验所用的甲醇,乙腈,乙醇和磷酸均购买于迪马公司(色谱纯),超纯水为Milipore纯水机制。

对照品: 本实验室用的甘草苷、甘草酸照品及甘草对照药材均采购于中国生物制品及药品检定所

1.2 样品制备

对照品溶液的制备: 取甘草苷对照品、甘草酸对照品适量,精密称定,加70%乙醇制成每1ml各含0.02mg、0.2mg的溶液,即得。

样品制备: 取甘草对照药材粉末0.2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇100ml,密塞,称定重量,超声处理(功率250W,频率40kHz)30分钟,取出,放冷,再称定重量,用70%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.3 液相色谱条件

按照药典方法原始HPLC条件,使用安捷伦方法转换软件直接将药典规定的HPLC方法转换为UHPLC方法,按照色谱柱规格和流速变化相应调整了梯度时间和进样量,得到原始UHPLC条件,经过优化和改进后,调整了流动相比例和梯度时间,得到优化UHPLC条件,两个条件的具体参数见表1

表1 液相色谱条件

	原始 UHPLC 条件		优化 UHPLC 条件		药典 HPLC 方法	
色谱柱	Zorbax SB C18 (2.1×100mm, 1.8 μm)		Zorbax SB C18 (2.1×100mm, 1.8 μm)		C18	
流动相	A=0.05%磷酸水溶液 B=乙腈		A=0.05%磷酸水溶液 B=乙腈		A=0.05%磷酸水溶液 B=乙腈	
梯度时间表	Time	B%	Time	B%	Time	B%
	0	19	0	19	0	19
	1.6	19	1.6	19	8	19
	7	50	12	35	35	50
	7.2	100	14	40	36	100
	8	19	15	100	40	19
			16	19		
停止时间	10min		18min		-	
流速	0.4mL/min		0.4mL/min		-	
柱温	25℃		60℃		-	
进样量	0.8 μL		0.8 μL		10 μL	
检测波长	237nm		237nm		237nm	

2 结果

分别按不同色谱条件对标准品和甘草对照药材样品进行了分析, 所得结果见图 1、图 2, 两个方法得到的结果均能符合药典对于系统适应性的要求, 并且原始方法比要点原始的 HPLC 方法速度提高四倍多, 在优化方法中, 改变了色谱条件, 使得甘草酸中包含的一个杂质分离出来, 提高了定量准确性, 并且分析时间比药典 HPLC 方法缩短一倍多。

对样品中的甘草苷和甘草酸分别使用外标法进行定量计算, 使用原始 UHPLC 方法得到的结果为甘草苷含 1.8%、甘草酸含量 2.8%; 优化的 UHPLC 方法计算出甘草苷含量 1.8%、甘草酸含量 2.4%, 该甘草药材中甘草苷和甘草酸含量均符合药典规定, 但是两个分析方法计算出的甘草苷含量差异不大, 但是甘草酸含量差异较大, 原因是使用改进的方法分离出了更多的杂质, 使得定量分析的干扰更小, 准确性更高。

3 讨论

在方法优化的初始阶段, 分别选择了不同的固定相进行实验, 包括 Zorbax Stable Bond C18、Zorbax Eclipse Plus C18 和 Zorbax Extend C18 色谱柱, 发现使用 Zorbax Stable Bond C18 色谱柱得到的色谱峰具有较好的峰型, 拖尾因子小, 塔板数较高, 所以在以后的进一步优化中选用了 Zorbax Stable Bond C18 色谱柱作为固定相。

在直接转换得到的 UHPLC 方法中, 甘草酸峰附近有干扰物质的存在, 在调整了梯度条件后, 仍旧不能将甘草酸与其前后的干扰组分完全分离, 经过试验发现, 提高温度有助于这些峰的分离, 将温度升高至 60℃, 甘草酸可以与周围的杂质得到良好的分离, 分离度均达到 1.5 以上, 可以准确定量。这一色谱条件仍旧在色谱柱和仪器可正常工作的范围之内, 并且方法重现性良好。

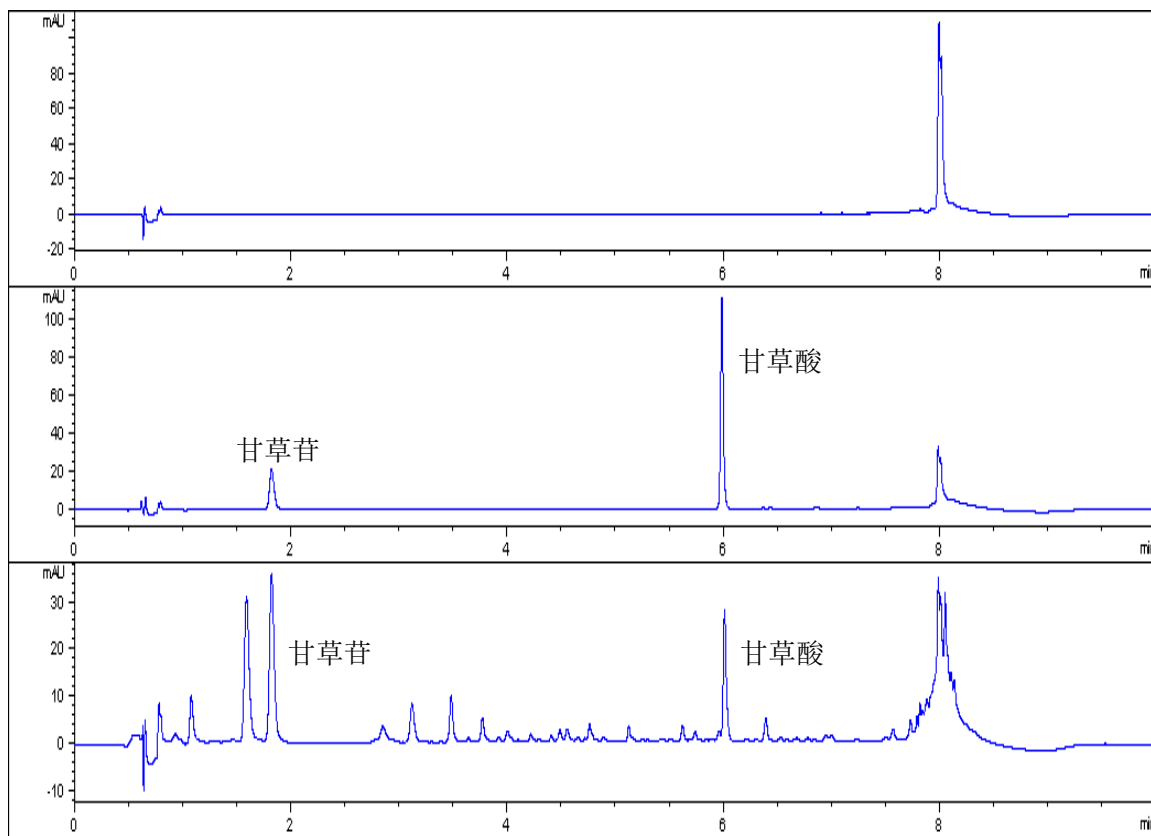


图1 原始 UHPLC 条件得到的色谱图：上：空白色谱图；中：对照品色谱图；下：甘草对照药材样品色图

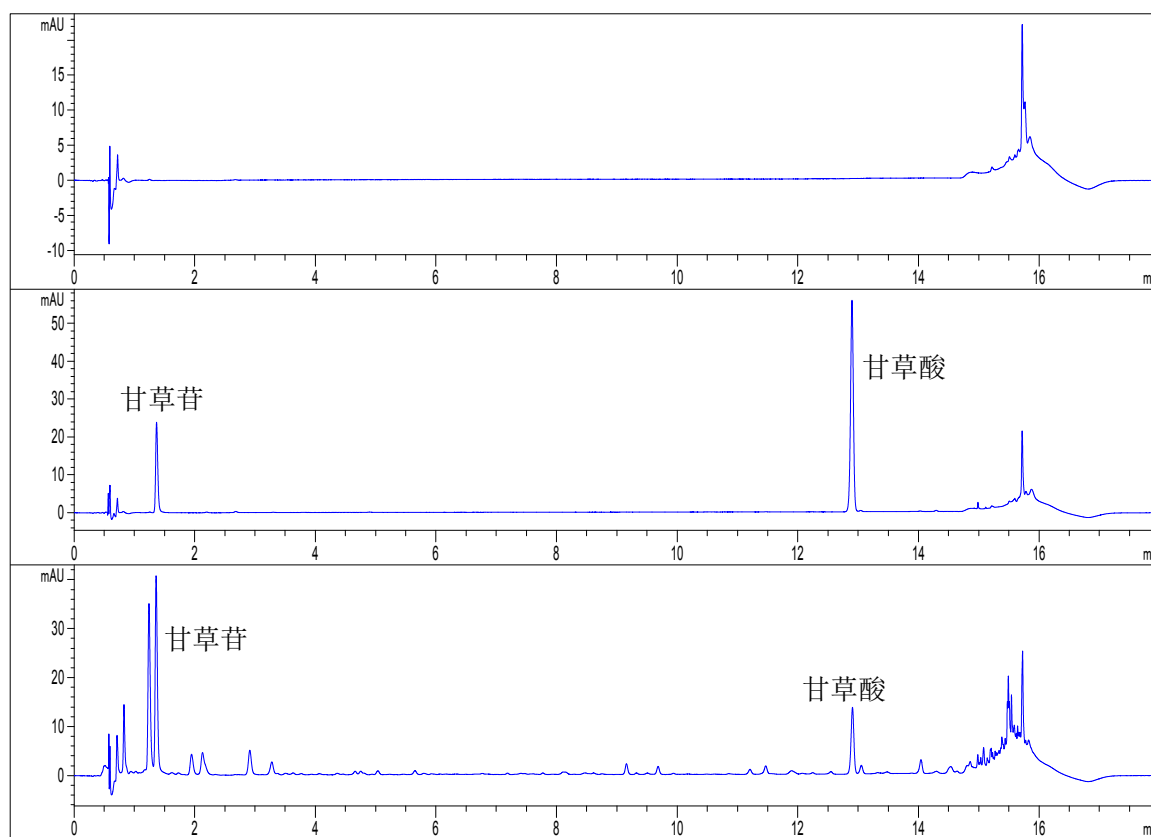


图2 优化 UHPLC 条件得到的色谱图：上：空白色谱图；中：对照品色谱图；下：甘草对照药材样品色图

由于分离了更多的杂质,使得方法的定量准确性提高,使用原始UHPLC方法与优化UHPLC方法计算得到的甘草酸含量结果相差10%以上,可见杂质的分离对定量结果有较大影响,提高分离效率和效果对于甘草定量分析的准确性和质量控制的可靠性有十分显著的影响。

相比较药典中收录的梯度方法,UHPLC方法节省了一半多分析时间,并且由于使用小内径色谱柱使得可以使用较低的流速进行分析,大大节省了时间和溶剂成本。

4 结论

本文通过对2010版中国药典甘草的含量测定液相方法的转换和优化,得到了一个能够准确快速对甘草中甘草苷和甘草酸进行定量的UHPLC分析方法,该方法准确、重现,是一个快速高效测定甘草含量的分析方法。达到了快速、高效和节省溶剂成本的目的。

参考文献

- [1] 中国药典2010版,2010,1:80-81

Optimization of Glycyrrhizae analysis method in Chinese pharmacopeia 2010 edition using UHPLC technology

XIAO Yao

(Agilent Technologies Co.,Ltd.(China),Beijing 100102,China)

Abstract: This article transferred a HPLC method in Chinese pharmacopeia 2010 edition to analysis Glycyrrhizae to a UHPLC method by the Agilent 1290 Infinity LC system which based on the sub-two micrometer(STM) and Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)technology, and optimized the UHPLC method, the result of optimized UHPLC were more accurate and effective than the original HPLC method.

Key words: Glycyrrhizae; UHPLC; Chinese Pharmacopeia; Traditional Chinese Medicine

液相色谱法同时测定3种B族维生素的研究

李建平, 党亚敏, 夏义平, 渠志华, 马永民

(天津市疾病预防控制中心 300011)

实验采用Waters600E - 2996高效液相色谱仪带PDA检测器, Hypersil 250 ×4.6 mm 5 μ m ODS柱,以甲醇+乙酸+己烷磺酸钠为流动相;流速1.0 ml/min;检测波长270 nm 作为实验条件,外标法定量;检测波长270 nm,流速: 1.0 ml/min。建立可同时测定保健食品中3种水溶性维生素的高效液相色谱法。实验结果表明各种维生素含量测定方法的线性关系良好, $r=0.9992\sim0.9998$,回收率98.1%~100.2%, $RSD=0.17\sim0.72$ 。用该法测定了市售保健食品中B族维生素的含量。本方法操作简便,分析速度快,灵敏度高,精密度好,结果准确可靠。

B族维生素是水溶性维生素中重要的一类,其中多种是酶的辅基和酶的组成部分。当人体内缺乏B族维生素时,便可导致多种疾病的产生,而人体自身又无法合成这些化合物,必须通过食物链或服用复合维生素制剂给予补充。随着人们对生活品质要求的提高,复合维生素制剂及高档营养品的出现,同时测定食物中或药物中B族维生素的含量引起人们的广泛关注。由于维生素的重要营养功能以及它们的相对不稳定性,定性和定量分析检测维生素具有一定难度。目前现有的分析B族维生素的检测方法包括滴定法^[1]、紫外分光光度法、荧光法^[2,3]、高效液相色谱法^[4-11]、微生物法^[12,13]。这些方法多数是针对某个单一维生素的测定,而且耗费时间较长。近年来国内外学者对多种B族维生素的同时测定进行了大量研究,出现了许多分析方法,其中以高效液相色谱法和高效毛细管电泳法^[14,15]为代表的色谱分析法较为突出。高效毛细管电泳法要求的仪器设备较高无法普及。液相色谱法由于水溶性维生素之间结构和化学性质相差很大,主要采用梯度洗脱的方式,分析时间比较长,结果的重现性比较差。本文采用高效液相色谱法以非梯度洗脱的方式完成了保健食品中3种B族维生素的同时测定,得到了满意的结果。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备

Waters600E - 2996高效液相色谱仪带紫外检测器(美国Waters公司);超纯水机(北京爱斯泰克科技开发有限公司);超声波清洗器(AS2050BT)(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

甲醇:色谱纯(天津康科德试剂有限公司);实验用水:超纯水;B1、B2、B6标准品(sigma公司);乙酸:分析纯(天津康科德试剂有限公司)己烷磺酸钠:

1.3 标准液的配置

准确称取B1、B2、B6标准品0.1000g,溶于0.01Mol/L盐酸,转移到100mL容量瓶,加0.01Mol/L盐酸定容至刻度。此溶液浓度为1.0mg/mL。将标准液用0.01mol/L盐酸稀释100倍后作为使用液。

1.4 高效液相色谱条件

色谱柱: Agilent Hypersil ODS 4.6 ×250mm (5 μ m);流动相: 10mL乙酸和1.0g己烷磺酸钠溶于700mL水中,与250mL甲醇混合,在用水定容至1000mL;流速: 1.0mL/min;检测波长: 270nm,柱温: 室温;进样量: 20 μ L。

1.5 样品前处理

取20粒以上片剂或胶囊试样研磨或混匀,根据试样B族维生素含量准确称取一定量的试样于100mL容量瓶中加入甲醇+水+磷酸=100+400+0.5混合溶液,混匀,再用甲醇+水+磷酸=100+400+0.5混合溶液定容至刻度。超声提取5min,以3000r/min离心5min,上清液经0.45

μm 滤膜过滤后待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的选择

流动相是HPLC方法中至关重要的组成部分,直接关系到目标化合物的有效分离和分析的灵敏度。目前很多研究者^[8-11]采用磷酸二氢盐+甲醇作为流动相来分析B族维生素,但是B族维生素在此流动相中很少保留,出峰在15min内,对于组分相对复杂的样品不能分离完全,影响准确定量。本文采用离子对试剂己烷磺酸钠和乙腈、乙酸作为流动相克服了上述缺点。标准和样品的色谱图见图1,图2。

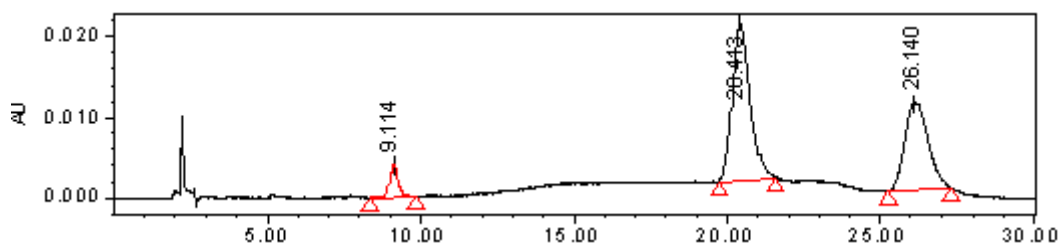


图1 VB1、VB2和VB6混合标准溶液色谱图

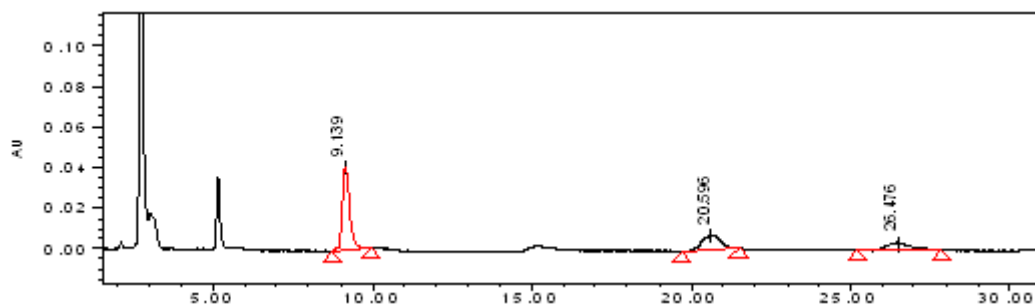


图2 保健品中VB1、VB2和VB6色谱图

2.1.2 检测波长的选择

从DAD 检测器提取的各成分紫外光谱图看出,VB1 在245.3nm 有最大吸收;VB2 在265.5nm处有最大吸收、VB6在290.5nm有最大吸收,为保证检测的灵敏度波长选择在270nm。VB1、VB2和VB6的光谱图见图3、图4、图5

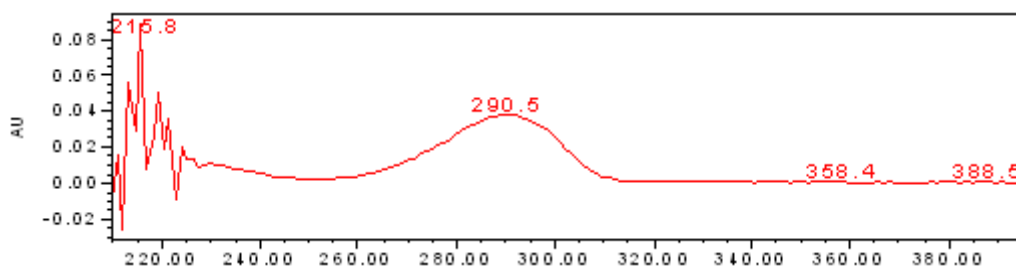


图3 VB6的光谱图

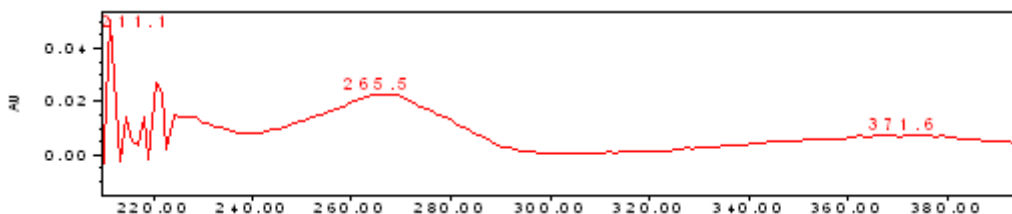


图4 VB2的光谱图

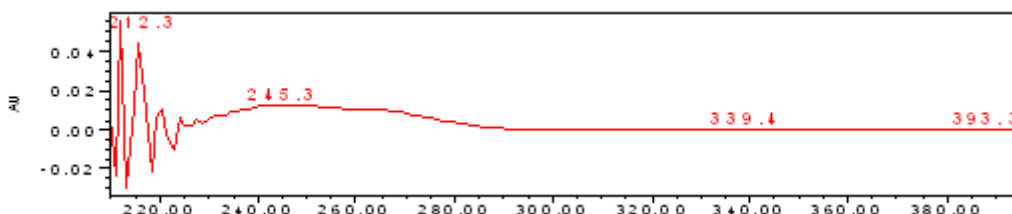


图5 VB1的光谱图

2.2 线性关系及检出限

将VB1、VB2、VB6的混合标准溶液采用逐级稀释法用0.01 mol/L HCl溶液配制成一系列不同浓度的混合标准溶液,摇匀,分别进样,以各自的峰面积(Y)对浓度(X, $\mu\text{g/ml}$)进行线性回归计算, 维生素B1、维生素B6、维生素B2回归方程为: $Y = 7855.5X + 79275$, $r = 0.9993$; $Y = 116827X + 103425$, $r = 0.9996$; $Y = 52336X + 545047$, $r = 0.9992$ 。以3倍信噪比计,方法的检出限分别为:维生素B1 2.51 ng、维生素B6 0.693 ng、和维生素B2 2.64 ng。

2.3 精密度和回收率实验

本法回收率实验选用不含有B族维生素的样品为基质,设定了3个添加浓度: 0.5、3.0、5.0mg/kg,制成食品样品。按本检验方法所确定的实验条件,对每个浓度样品进行6次实验,测得3种B族维生素回收率和室内精密度的相对标准偏差见表1。

表1 3中B族维生素回收率和精密度 (n=6)

出峰 次序	添加浓度0.5mg/kg		添加浓度3.0mg/kg		添加浓度5.0mg/kg	
	回收率 %	相对标准 偏差%	回收率 %	相对标准 偏差%	回收率 %	相对标准 偏差%
VB1	98.8	2.36	99.2	1.53	97.5	1.37
VB6	96.4	3.52	97.6	2.61	98.2	2.45
VB2	97.2	5.34	95.7	3.54	96.8	2.89

3 小结

本文建立的高效液相色谱法同时测定保健食品中3种水溶性维生素的方法简单,不需要梯度洗脱,快速,准确度高,解决了保健食品中基质复杂,基质干扰测定的问题。保健食品在添加B族维生素时往往还会根据需要量添加VC等水溶性维生素,因次VC的含量比B族维生素的含量高很多,导致色谱图中B族维生素的峰很小,故本实验未将VC的含量测定同时进行。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 1995
 [2] GB/T 5009184 - 20031食品中硫胺素(维生素B1)的测定[S].

(下转第137页)

按照美国药典对地塞米松磷酸钠注射液含量测定的方法学探讨

于润芳, 李瑾, 王虹

(天津金耀氨基酸有限公司)

在本实验中,主要为验证美国药典收载的地塞米松磷酸钠注射液的检验方法对地塞米松磷酸钠注射液的质量控制要求,故参照美国药典附录《药品质量标准分析方法验证指导原则》的要求,用HPLC法对地塞米松磷酸钠注射液含量测定项目进行了检验方法的方法学探讨。

1 仪器、试剂与仪器设备

1.1 试剂

注射用水(天津金耀氨基酸有限公司)

甲醇(色谱纯, TEDIA COMPANY, INC)

1.2 仪器设备

岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪、CLASS VP 工作站

METTLER AE240 电子天平;

2 地塞米松磷酸钠含量测定方法

2.1 色谱条件

色谱柱: 艾杰尔 C₁₈(4.6mm × 200mm, 5 μm)。流动相: 0.01mol/L 磷酸二氢钾与甲醇和水(1:1)溶液。流速: 1.6 ml·min⁻¹。柱温: 45℃。检测波长: 254nm。

在美国药典规定的条件下,地塞米松磷酸钠的保留时间约为 5min。

2.2 线性范围的考察

精密称取原料约 32mg, 置 50ml 量瓶中, 然后分别精密量取 2、3、4、5、6ml 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。即 40%、60%、80%、100%、120% 供试品溶液(见表 1)。按上述色谱条件, 分别吸取供试品溶液 10 μl 进样, 测定峰面积积分值

表 1 地塞米松磷酸钠线性范围考察

组号	浓度/(mg/ml)	峰面积
1	0.4	68893
2	0.6	102431
3	0.8	133961
4	1.0	171395
5	1.2	205492

(y)(见图 1), 结果见表 1。用峰面积积分值对浓度(x)进行回归, 得直线回归方程(见式(1))和标准曲线(见图 1))。

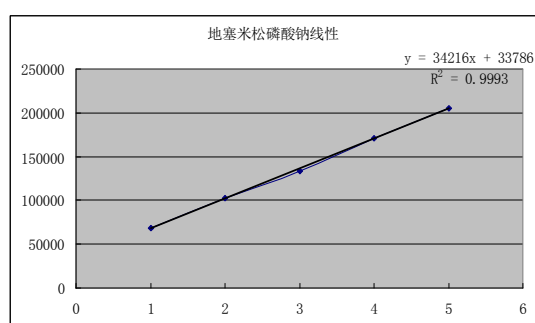


图 1 地塞米松磷酸钠标准曲线

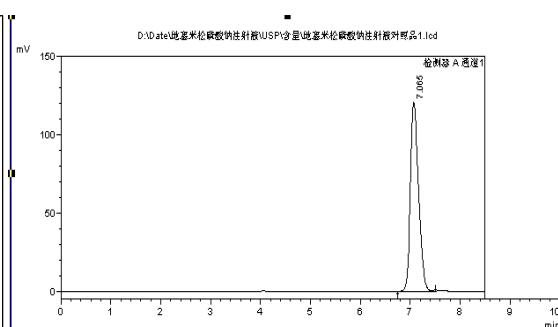


图 2 地塞米松磷酸钠对照品 HPLC 图谱

每次进样 10 μ l, 对峰面积 y 进行线性回归, 得回归方程:

$$y = 34216x + 33786 \quad (R = 0.9996) \quad \text{-----} \quad (1)$$

线性范围: 32~96 μ g/ml 范围内成良好的线性关系

2.3 重复性试验

精密量取地塞米松磷酸钠注射液 2ml, 置 50ml 量瓶中, 稀释至刻度混匀(浓度 80 μ g/ml) 10 μ l 进样, 重复 6 次, 记录所测定地塞米松磷酸钠的峰面积积分值, 计算地塞米松磷酸钠的 RSD 为 0.03%。结果见表 2。

表 2 重复性实验结果

次数	地塞米松磷酸钠峰面积	RSD/%
1	1399044	
2	1399336	
3	1398343	0.03
4	1399258	
5	1399088	
6	1399252	

表 3 稳定性试验结果

测定时间/h	地塞米松磷酸钠峰面积	RSD/%
0	1387302	
2	1388125	
4	1388167	
8	1387999	0.02
12	1387984	
24	1388042	

2.4 稳定性试验

精密量取地塞米松磷酸钠注射液 2ml, 置 50ml 量瓶中, 稀释至刻度混匀(浓度 80 μ g/ml), 按 0, 2, 4, 8, 12, 24h 不同时间间隔 10 μ l 进样, 测定地塞米松磷酸钠的峰面积积分值, 计算 RSD 为 0.02%, 结果表明样品测定液中地塞米松磷酸钠在 24h 内稳定。见表 3。

2.5 回收率试验

精密称取原料各 12.8mg、16mg、19.2mg 各三份, 分别置 200ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 进样 10 μ l, 测定峰面积积分值, 并计算回收率。结果见表 4。

2.6 样品含量测定

取 3 批地塞米松磷酸钠注射液样品, 每批进样 2 次, 按上述供试品溶液的制备方法制备供试液, 10 μ l 进样, 测定峰面积积分值, 计算地塞米松磷酸钠含量, 结果见表 5。

表 4 地塞米松磷酸钠的回收率

序号	实测峰面积	实测地米量/mg	加入地米量/mg	回收率%	平均回收率%	RSD%
1	1026518	12.48	12.58	99.20		
2	1028945	12.51	12.56	99.60		
3	1028770	12.51	12.59	99.33		
4	1264043	15.36	15.49	99.17		
5	1264614	15.37	15.5	99.15	99.47	0.30
6	1264351	15.34	15.47	99.33		
7	1486131	18.06	18.09	99.83		
8	1485973	18.06	18.07	99.94		
9	1485548	18.06	18.11	99.68		

表 5 样品测定结果。

批号	峰面积	含量
1	1399044	102.20%
	1399336	102.23%
2	1378265	100.69%
	1378323	100.69%
3	1394816	101.90%
	1394096	101.84%

表5 结果符合药典规定范围 90.0%~115.0%。

3 结论

在此色谱条件下,地塞米松磷酸钠的最小检测浓度为 0.2 μ g/ml。经验证,本产品各项指标均符合美国药典标准,故适用于美国药典检验。

参考文献:

- [1] USP32-NF27Page2092
- [2] 美国药典附录
- [3] 中国药典 2005 版

(上接第134页)

- [3] GB/T 5009185 - 20031食品中核黄素的测定[S].
- [4] Markopoulou CK, Kagkadis KA, Koundourellis JE. An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1,B6,B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal, 2002;30(4):1403—1410.
- [5] 吴芳,徐红艳.HPLC法测定复合维生素B片中四种成分的含量[J].中国医药导报,2007,4(31):95-96.
- [6] 刘晓琳,武谷,钟淮滨.HPLC法测定复合维生素B溶液中维生素B1、维生素B2、维生素B6和烟酰胺的含量[J].中国药事,2003,17(4):241-242.
- [7] 陈静君,刘敏,赖建民.高效液相色谱法测定六合维生素丸中3种B族维生素含量[J].南通大学学报(医学版),2006,26(4):255-256.
- [8] 崔蓉,李皎,王洪玮.水溶性维生素的高效液相色谱测定方法的研究.中国卫生检验杂志,2005,15(1):55-57.
- [9] 高旭,李淑娟,安娟等.高效液相色谱法同时测定食品中8种水溶性维生素.中国医药指南,2008,6(19):36-38.
- [10] 王艳,王坚民.高效液相色谱法同时测定元素多维片中5种水溶性维生素.中国卫生检验杂志,2010,20(3):510-511.
- [11] 王希希,胡燕,孙轶卓等.反相高效液相色谱法同时测定血清中5种水溶性维生素.四川大学学报(医学版),2010,41(1):158-161.
- [12] GB/T 50091154 - 20031食品中核维生素B6的测定[S].
- [13] GB/T 5009189 - 20031食品中烟酸的测定[S].
- [14] 严健,王小如,等.毛细管电泳法测定复合维生素B片含量.中国现代应用药学杂志,2002;19(4):326—327.
- [15] 邓光辉,李济权,马少妹.高效毛细管电泳电导法快速检测复方维生素片中的VB1、VB12、VB6和VC.分析实验室,2003;22(4):53—55.

高效液相色谱法对呋塞米注射液含量检测的方法学验证

于润芳, 唐洪

(天津金耀氨基酸有限公司)

参照中国药典 2010 版附录 XIXA《药品质量标准分析方法验证指导原则》的要求, 对呋塞米注射液含量测定项目进行方法学验证。

呋塞米注射液主要成分为呋塞米。其药理作用: 能增加水、钠、氯、钾、钙、镁、磷等的排泄, 可抑制前列腺素分解酶的活性, 使前列腺素 E2 含量升高, 从而具有扩张血管作用。扩张肾血管, 降低肾血管阻力, 在呋塞米的利尿作用中具有重要意义, 也是其用于预防急性肾功能衰竭的理论基础。其适应症为: 1. 水肿性疾病。 2. 高血压。 3. 预防急性肾功能衰竭。 4. 高钾血症及高钙血症。 5. 稀释性低钠血症。 6. 抗利尿激素分泌过多症 (SIADH)。 7. 急性药物毒物中毒等。

1 仪器与试药

1.1 仪器

名称	型号	编号	校准日期	有效日期
高效液相色谱仪	岛津 LC-2010A	C21244705659LP	2010. 1. 27	2011. 1. 28
电子天平	METTLER AE240	047102	2010. 1. 22	2011. 1. 27

1.2 试药

名称	规格	批号	生产厂家
乙腈	色谱纯试剂	001906	TEDIA COMPANY, INC.
冰醋酸	分析纯	2010401	天津市天新精细化工开发中心
四氢呋喃	色谱纯试剂	2010201	天津市光复精细化工研究所
试验用水	注射用水	同试验日期	天津金耀氨基酸有限公司

注: 试验用水均为天津金耀氨基酸有限公司每天生产的注射用水。

2 色谱条件及测定方法

2.1 色谱条件

色谱柱: 艾杰尔 C₁₈(4.6mm × 200mm, 5μm), 流动相: 水-四氢呋喃-冰醋酸(70:30:1), 流速: 1.2 ml·min, 柱温: 30℃, 检测波长: 272nm。

2.2 中国药典 2010 版收载的呋塞米注射液的检验方法:

有关物质 取本品 5ml, 用混合溶剂[取冰醋酸 22ml, 加乙腈-水 (1:1) 至 1000ml, 混匀]稀释制成每 1ml 中约含 1mg 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取适量, 用上述混合溶剂定量稀释制成每 1ml 中含 10 μg 的溶液, 作为对照溶液。照含量测定项下的色谱条件, 取对照溶液 20 μl 注入液相色谱仪, 再精密量取供试品溶液与对照溶液各 20 μl, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍, 供试品溶液的色谱图中如有杂质峰, 单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 1.5 倍 (1.5%), 各杂质峰面积的和不得大于对照

溶液主峰面积的3倍(3.0%)。

含量测定 照高效液相测定法(附录VD)测定。

色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以水-四氢呋喃-冰醋酸(70:30:1)为流动相;检测波长为272nm。理论板数按吠塞米峰计算不低于4000。

测定法 精密量取本品5ml,用混合溶剂[取冰醋酸22ml,加乙腈-水(1:1)至1000ml,混匀]定量稀释制成每1ml中约含吠塞米0.1mg的溶液,精密量取20 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图;另取吠塞米对照品0.00968g,同法测定。按外标法以峰面积计算,即得。

2.3 2010版中国药典标准

项目名称	考核方法	限度
专属性	酸破坏	单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的1.5倍(1.5%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的3倍(3.0%)。
	碱破坏	
	加热破坏	
	氧化破坏	
	光照破坏	
检测限(S/N)	测定吠塞米的含量(ng/ml)	样品能被检测出的最低量
精密 度	重复性	供试品溶液分别测定6次, RSD
	中间精密度	供试品溶液不同日不同人分别测定6次,与重复性试验的6次一起计算 RSD
线性范围	吠塞米相关系数 R	应 \geq 0.99
回收率	回收率	\geq 95.0%
	RSD	\leq 2.0%

3 吠塞米注射液的验证方法

3.1 吠塞米注射液的限度

指标名称	技术要求	方法依据
含量限度	90.0-110.0%	2010版中国药典
有关物质	单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的1.5倍(1.5%)	2010版中国药典
	各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的3倍(3.0%)。	2010版中国药典

3.2 测定结果计算公式:

3.2.1 含量测定

$$\text{标示量 \%} = \frac{A_x / A_R \times m_R}{m_x} \times 100 \%$$

式中: A_x ——供试品峰面积, A_R ——对照品峰面积, m_x ——供试品质量, m_R ——对照品质量(对照品称样量10.19mg, 10.40mg)。

3.2.2 有关物质计算

单个杂质: 单个杂质峰面积/对照溶液主峰面积 \times 0.015 \times 100%

总杂质峰: 各杂质峰面积的和/对照溶液主峰面积 \times 0.03 \times 100%

3.3 样品测定

有关物质测定结果(%):

批号	单一杂质			总杂质		
	1	2	平均	1	2	平均
0802271	0.46	0.36	0.40	1.29	1.00	1.1
0902051	0.45	0.35	0.40	1.26	0.97	1.1
1001081	0.34	0.35	0.30	0.82	0.84	0.8

含量测定结果 (%):

批号	1	2	3	4	5	6	平均	RSD
0802271	99.48	99.59	99.50	99.46	99.61	99.56	99.5	0.06
0902051	100.85	101.01	100.94	100.98	101.06	101.07	101.0	0.6
1001081	102.5	100.81	101.13	100.76	100.72	100.81	101.1	0.7

4 验证内容

4.1 专属性

①称取无水碳酸钠 0.4508 g 配成 10% 溶液, 备用。

②称取氯化钠 0.7515g, 转移至 100ml 量瓶中, 加入纯化水适量溶解; 再加入 10% 无水碳酸钠溶液, 用纯化水稀释至刻度, 摇匀, 作为空白辅料溶液。

4.1.1 酸破坏: 取本品 5ml 至 50ml 量瓶中, 加入 0.1mol/L 盐酸溶液 2ml, 摇匀, 置 80℃ 水浴 3h, 放冷, 用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至中性, 用稀释液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 取空白辅料溶液适量至 50ml 量瓶中, 同法操作, 按有关物质方法进行测定。

4.1.2 碱破坏: 取本品 5ml 至 50ml 量瓶中, 加入 1mol/L 氢氧化钠溶液 1ml, 摇匀, 置 60℃ 水浴 1h, 放冷, 用 1mol/L 盐酸溶液调 pH 至中性, 用稀释液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 取空白辅料溶液适量至 50ml 量瓶中, 同法操作, 按有关物质方法进行测定。

4.1.3 加热破坏: 取本品 (玻璃瓶) 置沸水中煮沸 2 小时后取出, 放冷, 取空白辅料溶液适量, 同法操作, 按有关物质方法进行测定。

4.1.4 氧化破坏: 取本品 5ml, 加 30% 过氧化氢溶液 1ml, 摇匀, 置 60℃ 水浴 2h 后, 加稀释液溶解并稀释至 50ml, 取空白辅料溶液 5ml 至 50ml 量瓶中, 同法操作, 按有关物质方法进行测定。

4.1.5 光照破坏: 取本品 (玻璃瓶) 10 支, 空白辅料溶液 20ml (置于玻璃瓶中), 在照度为 4000-5000LX 日光灯条件下放置 5 天, 10 天后, 按有关物质方法进行测定。

4.1.6 测定结果 (%):

项目	批号					
	0802271		0902051		1001081	
酸破坏	98.9		98.9		98.4	
碱破坏	98.4		98.7		98.9	
加热破坏	98.4		98.8		98.7	
氧化破坏	85.5		86.9		86.3	
光照破坏	光照 5 天	光照 10 天	光照 5 天	光照 10 天	光照 5 天	光照 10 天
	97.1	95.3	97.4	95.4	96.3	95.5

4.2 检测限

精密称取呋塞米 10mg, 加入 10ml 容量瓶中, 加入混合溶剂 [取冰醋酸 22ml, 加乙腈-水 (1:1) 至 1000ml, 混匀] 溶解并稀释至刻度, 精密量取 1ml 至 100ml、1ml 至 200ml 容量瓶中容量瓶中, 加入混合溶剂溶解并稀释至刻度, 按照有关物质方法进行测定

样品名称	样品在溶液的最低量 (ng/ml)	相对于样品的检测限 (ng/ml) (实测值/样品浓度)
呋塞米	5.2	0.05%

4.3 重复性

4.4 取供试品溶液分别测定6次含量,记录,计算RSD。

批号	1	2	3	4	5	6	平均	RSD
0802271	99.48	99.59	99.50	99.46	99.61	99.56	99.5	0.06
0902051	100.85	101.01	100.94	100.98	101.06	101.07	101.0	0.6
1001081	102.5	100.81	101.13	100.76	100.72	100.81	101.1	0.7

4.5 中间精密度

不同操作人员,不同时间对供试品溶液按含量方法进样测定。重复测定6次,共12次,计算RSD。

批号	1	2	3	4	5	6	平均	RSD
0802271	99.48	99.59	99.50	99.46	99.61	99.56	99.5	0.06
0902051	100.85	101.01	100.94	100.98	101.06	101.07	101.0	0.6
1001081	102.5	100.81	101.13	100.76	100.72	100.81	101.1	0.7

呋塞米注射液含量趋势图为①-③

批号	1	2	3	4	5	6	平均	RSD
0802271	100.09	100.03	100.09	100.08	100.07	100.09	100.1	0.02
0902051	99.48	99.51	99.52	99.52	99.50	99.51	99.5	0.02
1001081	101.0	101.04	101.07	101.08	101.09	101.1	101.1	0.04

塞米注射液含量趋势图为④-⑥

4.5 线性范围

按确认的各溶剂的验证范围,以标准溶液为100%浓度为基础,配制60%、80%、100%、120%、140%浓度系列,作为线性测定溶液。包括范围的最高点和最低点以及标准点,每个溶液进样2次20 μ l,记录色谱图。以峰面积对浓度二次回归,得到回归方程和相关系数。(标准溶液的配制要相对样品的浓度考虑)呋塞米线性结果:

X 浓度%	Y 峰面积	Y 平均值	r 相关系数(应 \geq 0.99)
0.014049	8577952	8576361	R=1
	8574769		
0.012042	7317115	7316257	
	7315398		
0.010035	6076047	6076677	
	6077306		
0.008028	4828456	4827470	
	4826484		
0.006021	3574298	3573855	
	3573411		

回归方程: $Y=0.6x+6E-172776$

以上结果表明:呋塞米注射液浓度和峰面积呈现良好的线性关系。

(呋塞米注射液线性试验趋势图附后。)

4.6 回收率:

标准溶液:线性项下80%,100%,120%浓度溶液作为标准溶液。

呋塞米的回收率:精密称取呋塞米约0.8 mg、1.0 mg、1.2 mg各三份,分别加入100ml容

量瓶中，加入纯化水稀释至刻度，照呋塞米含量测定项下方法测定，计算回收率，试验结果见表：

浓度	M 加入量 (mg)	M 测得的量 (mg)	回收率 (>95%)	平均回收率 (>95%)	RSD (%) ($\leq 2\%$)
80%	0.84702	0.84787	100.1	99.8	1.03
	0.85772	0.84914	99.0		
	0.86011	0.84893	98.7		
100%	1.08441	1.07790	99.4		
	1.07662	1.08200	100.5		
	1.09899	1.07920	98.2		
120%	1.27761	1.28272	100.4		
	1.27543	1.28691	100.9		
	1.27229	1.27356	101.1		

呋塞米的回收率均大于 95%，符合要求。

5. 变更和偏差调查

如验证过程中出现变更，则按公司相对应的 SOP 的名称进行。

如验证过程中出现偏差，则按公司相对应的 SOP 的名称进行。

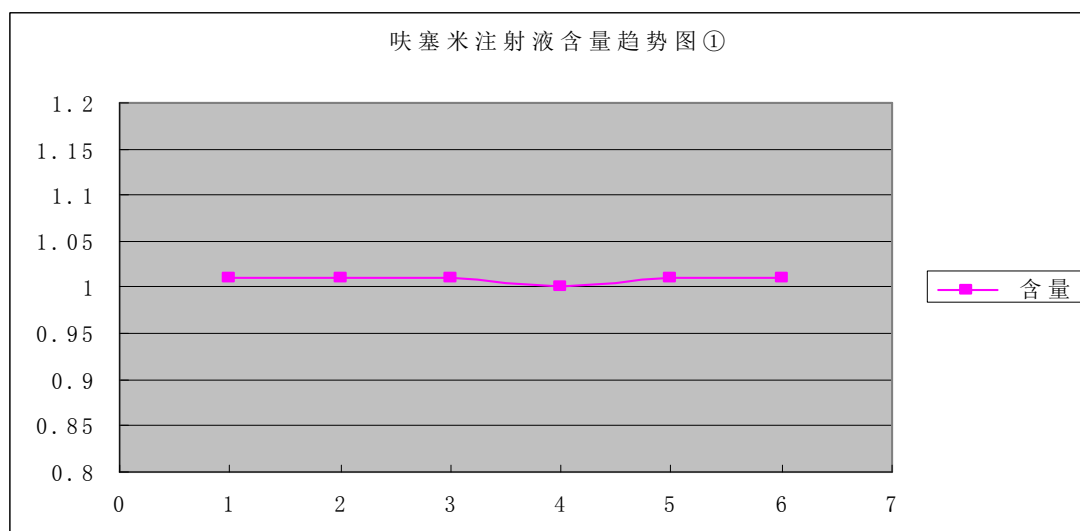
此次呋塞米注射液验证过程中没有出现偏差。

6 结论：

根据实验结果，与方案中的标准进行比较，均符合规定。此次呋塞米注射液按照中国药典 2010 年版分析方法验证成功，此方法可用于呋塞米注射液的检测，可以有效保证产品质量，为产品使用者提供安全保证。

7 趋势图

呋塞米注射液含量趋势图①



注：呋塞米注射液含量趋势图 2-6 略

(下转第 144 页)

反相高效液相色谱法分离九种精神类药物

程明, 王芳, 李广庆

(北京迪马科技有限公司, 北京 102200)

精神类药物是指一切作用于中枢神经系统并能影响人类认知、情感和行为等精神功能的药物, 临床常用的主要有: 抗精神病药、抗焦虑药、抗抑郁药和抗躁狂药。需要指出的是, 这种分类方式并不是绝对的, 各类别之间可能存在某种程度的重叠和交叉。该类药物都有一定程度的副作用, 长期服用还会造成药物依赖性和耐药性。

本文选取九种常用的三环类抗抑郁药和苯并二氮卓类抗焦虑药作为待测物, 采用反相高效液相色谱法, 在常规 C18 高效液相色谱柱 (Dikma Diamonsil 5 μm C18(2)) 上实现了等度基线分离。该测试方法具有操作简单、分析时间短、选择性和分离度好等优点。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Dikma Diamonsil 5 μm C18(2) 高效液相色谱柱 (北京迪马科技有限公司); 乙腈、三氟乙酸 (北京迪马科技有限公司); 蒸馏水 (屈臣氏)

1.2 色谱分析条件

色谱柱: Dikma Diamonsil 5 μm C18(2) 色谱柱。规格: 150 \times 4.6 mm。流动相: 乙腈+0.1% 三氟乙酸: 水+0.1% 三氟乙酸=40: 60。流速: 1.0 ml/min。温度: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。波长: 254 nm。

1.3 样品组成和配制

苯并二氮卓类抗焦虑药: 硝西洋、阿普唑仑、地西洋、奥沙西洋、三唑仑、氯硝西洋

三环类抗抑郁药: 去甲替林、去甲多虑平、曲米帕明

以上九种精神类药物用流动相作溶剂配成合适浓度, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2 结果与讨论

在该色谱分析条件下, 九种药物的分离结果如图 1 所示:

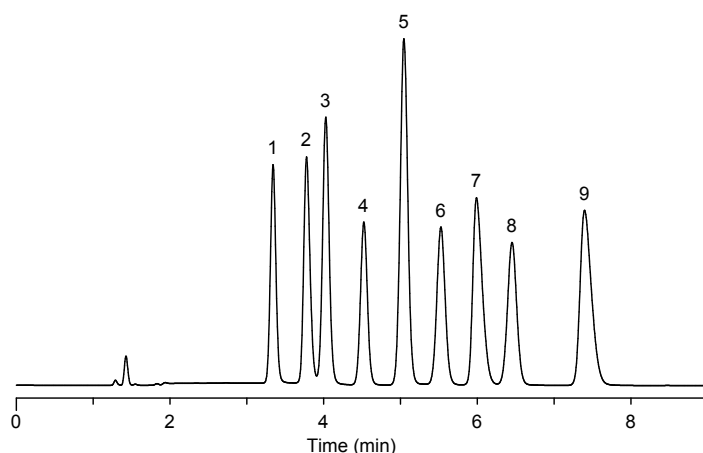


图 1 九种精神类药物检测色谱图 出峰顺序依次为: 1. 硝西洋 2. 去甲多虑平 3. 阿普唑仑 4. 地西洋 5. 奥沙西洋 6. 三唑仑 7. 去甲替林 8. 氯硝西洋 9. 曲米帕明

表 1 分离度测定结果

R (2,1)	R (3,2)	R (4,3)	R (5,4)	R (6,5)	R (7,6)	R (8,7)	R (9,8)
3.12	1.64	3.09	3.01	2.53	2.19	2.07	3.85

可以看出,在该色谱条件下,九种物质在不到8分钟的时间洗脱出来并达到基线分离,具有分析时间短、分离度高、选择性好的优点;同时由于该法采用等度洗脱,降低了仪器的配置要求,简化了操作,为建立快速、有效的精神类药物检测提供了一定的理论依据。

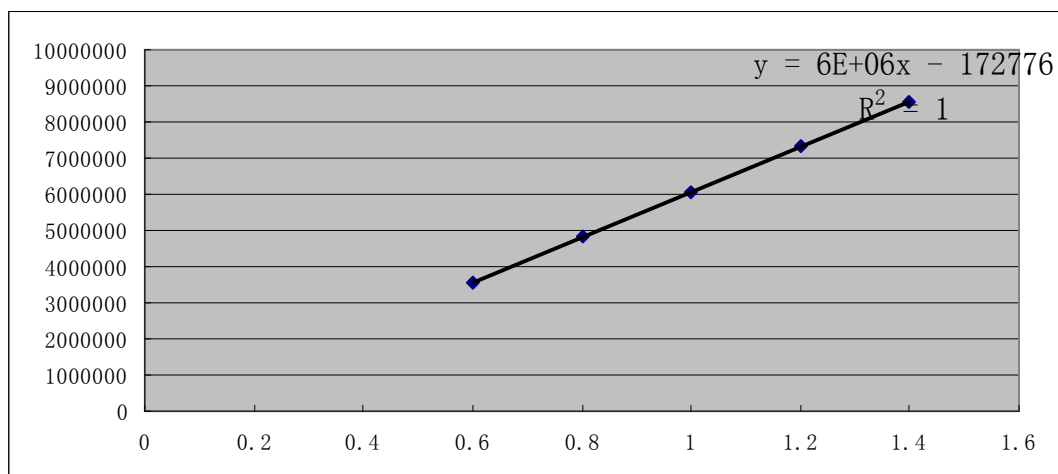
参考文献:

- [1] H. Y. Aboul-Enein *et al.*, *Anal. Profiles Drug Subs.* **9**, 487 (1980).
- [2] V. H. Sethy, *Arch. Pharmacol.* **301**, 157 (1978).
- [3] A. MacDonald *et al.*, *Anal. Profiles Drug Subs.* **1**, 79 (1972).
- [4] C. M. Shearer, C. R. Pilla, *Anal. Profiles Drug Subs.* **3**, 441 (1974).
- [5] K. K. Okawa, G. S. Allens, *J. Int. Med. Res.* **6**, 343 (1978).
- [6] W. C. Winslow, *Anal. Profiles Drug Subs.* **6**, 61 (1977).
- [7] J. L. Hale, *Anal. Profiles Drug Subs.* **1**, 233 (1972).
- [8] A. A. Al-Badr, *Anal. Profiles Drug Subs.* **12**, 683 (1983).

Abstract: Drugs acting on the central nervous system can affect cognition, emotion and other mental functions. The classes of clinically-used drugs include antipsychotics, anxiolytics, antidepressants and antimaniacs. However, the classifications are not absolute, as there exists a certain degree of overlap between the categories. These drugs often have side effects of varying degrees, and long-term use can result in addiction and resistance. This paper selects nine commonly used tricyclic antidepressants and benzodiazepine anxiolytics as analytes, using an HPLC method in the Dikma Diamonsil 5 μ m C18 (2) column to achieve a baseline separation under isocratic elution. This method is simple, fast and efficient with outstanding selectivity and resolution.

(上接第 142 页)

线性试验趋势图



参考文献

- 1.ChP (中国药典)。2010.Vol II (二部): 336

茶饮料中咖啡因检测存在问题的探讨和研究

张明月, 夏义平

(天津市疾病预防控制中心, 天津 300011)

咖啡因是从茶叶、咖啡果中提炼出来的一种生物碱,既可作为食品的组分,又可以作为药品的原料。咖啡因的含量是茶饮料和茶叶中重要的品质指标,。咖啡因的药理学效应主要是刺激中枢神经系统和心肌^[1]。低、中摄入咖啡因时能够振奋精神、提高注意力、增强自信心、提高工作效率、减少疲乏感^[2]、增强识别能力、提高瞬时口头记忆力。然而摄入高含量的咖啡因也有诸多的副作用,这些副作用包括影响妊娠、引起月经前期综合征,甚至还有引起不孕和促进癌症的发生^[1]。随着功能性茶饮料的日益流行,咖啡因的摄入量也是逐年上升,因此准确测定咖啡因的含量对于保证茶饮料的品质和维护人民健康显得十分重要。

我国食品添加剂使用卫生标准GB2760-2007规定^[3]在可乐型饮料中加入咖啡因限量为150 mg/kg;美国、加拿大、日本、阿根廷、菲律宾为200 mg/L 前南斯拉夫规定不得超过120mg/L^[4]。目前测定咖啡因的方法很多,如薄层色谱法、碘量法、高效液相色谱法、重量法、分子印迹毛细管整体柱液相色谱法和紫外分光光度法等^[5],其中最为普及和准确的为高效液相色谱法。相关的监管部门和科研人士^[6-8]进行了积极的研究与探索,制定了相关的国家标准和取得了一定的科研成果,但还是存在一些问题,本文经过试验对这些问题进行了分析与探讨。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备

Waters600E-2996高效液相色谱仪带紫外检测器(美国Waters公司);超纯水机(北京爱斯泰克科技开发有限公司);超声波清洗器(AS2050BT)(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

甲醇:色谱纯(天津康科德试剂有限公司);实验用水:超纯水;咖啡因标准品(sigma公司);乙酸钠:分析纯(天津康科德试剂有限公司)。

1.3 标准液的配置

咖啡因标准液A:准确称取咖啡因标准品0.1000g,溶于水,转移到100mL容量瓶,加水定容。此溶液浓度为1.0mg/mL。

咖啡因标准液B:准确称取咖啡因标准品0.1000g,溶于甲醇,转移到100mL容量瓶,加水定容。此溶液浓度为1.0mg/mL。分别将两种标准液用水和甲醇稀释10倍后作为使用液。

1.4 高效液相色谱条件

色谱柱:Agilent Hypersil ODS 4.6 ×250mm(5 μm);流动相:甲醇+乙酸铵(0.02mol/L)=15+85;流速:1.0mL/min;检测波长:272nm,柱温30℃;进样量:20 μL。

1.5 样品前处理

超声波脱气,经0.45 μm的微孔滤膜过滤,作为待测样品。

2 结果与讨论

2.1 咖啡因标准溶液

本实验考查了以水溶解的咖啡因标准液A与以甲醇溶解的咖啡因标准液B在相同的流动相中的峰面积。两种标准液分别进样六次,将浓度校正为0.100mg/mL后的峰面积进行单因

素方差分析。峰面积数据见表1。

表1 峰面积数据

进样次序	标准液A峰面积	标准液B峰面积
1	7620556	7025310
2	7708869	7040049
3	7677864	6989990
4	7625460	7025307
5	7630308	7011404
6	7681727	7005166

峰面积经SPSS11.5统计后，F值为1479.576、P值为0.000，P值小于0.05说明这两种标准液在同一浓度下经色谱分离后的峰面积具有统计学意义，即以水为溶剂的咖啡因与以甲醇为溶剂的咖啡因在相同浓度下的峰面积显著不同。国标GB/T5009.139-2003中，高效液相色谱法的咖啡因标准储备液和标准使用液均用甲醇配制。有机溶剂容易挥发，导致浓度不准确；茶饮料中咖啡因的存在形式是以水溶解因此以甲醇溶解的标准液峰面积为标准来计算茶饮料中的咖啡因浓度必然偏高。在出口饮料中维生素C和咖啡因检验方法SN/T0744-1999^[9]和SN/T1354-2004^[10]中也采用水作为咖啡因标准溶液的溶剂。1g 咖啡因能溶于50mL^[11]水完全能满足标准液的配置需要。实验表明，咖啡因水溶液的峰形也十分尖锐，未见拖尾等现象（见图1），故本实验支持用水作为咖啡因标准液的溶剂，而采用甲醇作为咖啡因标准的溶剂会导致测定结果偏高。咖啡因甲醇溶液标准色谱图见图2。

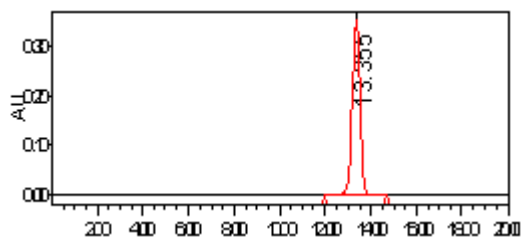


图1 咖啡因水溶液标准色谱图

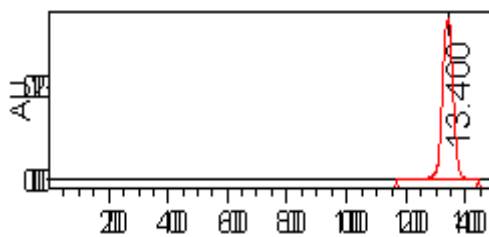


图2 咖啡因甲醇溶液标准色谱图

2.2 色谱条件

流动相是色谱分离中重要的一步，直接关系到分析的灵敏度和能否将样品中的组分有效洗脱分离。国标GB/T5009.139-2003中采用的流动相为甲醇+乙腈+水=57+29+14（每升流动相中加入0.8mol/L 乙酸液50mL），该法在实际操作中易造成峰形重叠，干扰检测结果^[12]。食品添加剂的常检项目一苯甲酸、山梨酸、糖精钠和合成着色剂，所用的流动相均是甲醇和乙酸铵，本文参考文献咖啡因的检测，也选择甲醇和0.02mol/L 乙酸铵溶液作为流动相，有促于咖啡因、苯甲酸、山梨酸的同时测定。

检测波长的选择 二极管阵列检测器在线扫描的结果表明样品和标准品中咖啡因峰的最大吸收均在272nm，并且紫外吸收光谱完全一致，因此测定波长定为272nm，咖啡因标准的光谱图见图3

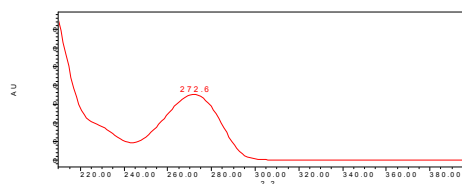


图3 咖啡因标准光谱图

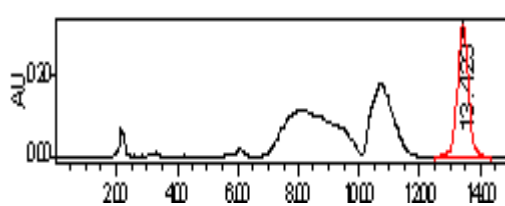


图4 茶饮料中咖啡因色谱图

2.3 线性关系

将配制好的一系列标准溶液A和B (0, 20, 50, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$) 分别按上述色谱条件进样20 μL , 以峰面积 (y) 对相应浓度 (c, $\mu\text{g/mL}$) 作回归分析, 得到回归方程。

咖啡因标准溶液A的回归方程为: $y=75713c+28295$, 相关系数 $r=0.9997$;

咖啡因标准溶液B的回归方程为: $y=69503c+28820$, 相关系数 $r=0.9998$ 。

从两条标准工作曲线上也能看出: 当样品的峰面积一定时, 以咖啡因标准溶液B的回归方程计算出的咖啡因结果偏高。本实验测定了市售茶饮料中的咖啡因含量, 其咖啡因峰面积为6839951。按咖啡因标准溶液A和咖啡因标准溶液B的回归方程计算出的咖啡因含量分别为90.0和98.0 $\mu\text{g/mL}$, 其绝对差值为算术平均值的8.51%。按照GB/T5009.139-2003的精密度要求: 对于饮料样品在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%。此次测定仅仅是因为标准液的溶剂不同导致了绝对差值为算术平均值的8.51%超出了GB/T5009.139-2003的精密度要求。产饮料中咖啡因色谱图见图4

2.4 精密度和回收率

准确吸取标准溶液20 μL (100 $\mu\text{g/mL}$), 重复进样6次, 分别测得咖啡因标准溶液A的RSD=0.481% (n=6) 咖啡因标准溶液B的RSD=0.252%。

取含咖啡因的样品, 在1.0mL样品中准确加入50 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡因标准A溶液0.5、1.0、1.5mL按照样品处理测定其回收率, 结果见表1; 在1.0mL样品中准确加入50 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡因标准B溶液0.5、1.0、1.5mL按照样品处理测定其回收率, 结果见表2。

表1 咖啡因的回收率 (以咖啡因标准溶液A计算)

本底值 ($\mu\text{g/mL}$)	加标量 (μg)	测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
90.0	50	92.7	98.1
90.0	50	92.5	97.5
90.0	100	95.1	100.2
90.0	100	94.8	99.6
90.0	150	95.6	99.3
90.0	150	95.7	99.5

表2 咖啡因的回收率 (以咖啡因标准溶液B计算)

本底值 ($\mu\text{g/mL}$)	加标量 (μg)	测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
98.0	50	98.3	98.9
98.0	50	98.1	98.3
98.0	100	99.6	101.2
98.0	100	99.5	101.0
98.0	150	100.2	101.7
98.0	150	100.5	102.2

本实验以两种不同溶剂溶解咖啡因标准进行加标回收实验, 实验结果表明回收率在97.5~102.2之间, 均在可接受范围内。以甲醇溶解的咖啡因标准作回收实验时可能因为加入的甲醇与水溶液互溶导致体积减小, 回收率偏高。

2.5 天然咖啡因与合成咖啡因的鉴别

食品添加剂使用卫生标准GB2760-2007中规定只能在可乐型碳酸饮料中添加咖啡因作为食品添加剂。茶饮料国家标准^[13] GB21733-2008和绿色食品 茶饮料国家标准

[14]NY/T1713-2009也对茶饮料中咖啡因作了明确的规定,不允许使用合成咖啡因调制饮料。GB2760-2007、GB21733-2008和NY/T1713-2009指定的检验方法同为GB/T5009.139-2003,但是GB/T5009.139-2003中检验方法能否鉴别天然与合成的咖啡因还值得商榷,因为根据QB 2079—1995^[15]中天然咖啡因和合成咖啡因在该方法中具有不同的色谱行为。本实验因未能购买到天然咖啡因的标准品,未能进行相关的鉴别试验。中华人民共和国行业标准QB 2079—1995采用HPLC对天然与合成的咖啡因进行了鉴别,建议国标GB/T5009.139-2003增加相关的咖啡因鉴别试验。

2.6 标准的匹配

GB2760-2007、GB21733-2008和NY/T1713-2009规定的咖啡因含量单位为 g/kg或者 mg/kg,其指定的检验方法均为GB/T5009.139-2003。但是GB/T5009.139-2003中检测饮料中的咖啡因含量的计量单位为mg/L,这样出现方法和标准使用的伎俩单位不统一,导致无法合理评价,建议统一计量单位以便合理准确评价,方便质量控制和市场监管。

参考文献:

- [1] Yuji YAMAUCHI, Akiko NAKAMURA, Iho KOHNO. Simple and Rapid UV Spectrophotometry of Caffeine in Tea Coupled with Sample re-treatment Using a Cartridge Column Filled with Polyvinylpyrrolidone (PVPP), *Chem. Pharm. Bull.* 56(2) 185—188 (2008)
- [2] Brice C, Smith A1The effects of caffeine on simulated driving, subjective alertness and sustained attention [J] *Hum Psycho2 pharmacol*, 2001, 16 (7) : 523 – 5311
- [3] GB2760-2007食品添加剂使用卫生标准。
- [4] GB/T5009.139-2003饮料中咖啡因的测定。
- [5] 徐学笛.高效液相色谱法测定咖啡因含量的研究与探讨, 科技成果纵横, 2008.2.60-61
- [6] 宁丽峰,王慧萍,何轩, 高效液相色谱法测定饮料中咖啡因的含量, 中国卫生检验杂志,2009,19,560-562
- [7] 崔海精, 郑彬, 宁琳琪, 高效液相色谱法测定饮料中的咖啡因, 中国热带医学,2009.10.2058-2059
- [8] 乐 健,洪战英, 高效液相色谱法测定绿茶和饮料中的咖啡因, 药物生物 技术,2003.10.174-176
- [9] SN/T0744-1999出口饮料中维生素C和咖啡因的检验方法。
- [10] SN/T 1354-2004进出口蜂蜜中咖啡因含量检验方法。
- [11] GB 14758—1993食品添加剂咖啡因。
- [12] 徐陆妹, 赵建. 高效液相色谱法测定饮料中咖啡因的方法改进 [J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12 (5): 608.
- [13] GB21733-2008茶饮料。
- [14] NY/T1713-2009绿色食品茶饮料。
- [15] QB 2079—1995食品添加剂天然咖啡因。

高效液相法测定比卡鲁胺含量

张莹, 张建柱, 李博, 周丽, 汪群杰

(天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津 300457)

采用高效液相色谱法测定比卡鲁胺含量。对方法的精密度、最低检出限度、重复性、稳定性进行了系统研究。本方法能够解决 R-比卡鲁胺与其异构体、杂质分离, 方法快速, 准确, 灵敏度高。

比卡鲁胺(bicalutamide)是一种新型非甾体抗雄激素药物^[1], 可阻断肾上腺产生的雄性激素作用, 抑制雄性激素在细胞核受体部位的结合或吸收, 导致前列腺肿瘤萎缩。临床可单独用于治疗晚期前列腺癌, 与黄体生成素释放激素(LHRH)类似物或外科睾丸切除术联合用于晚期前列腺癌的治疗^[2], 从而避免雄激素治疗引起的不良反应和睾丸切除术后病人的心理改变。

比卡鲁胺是消旋物, 其抗雄激素作用仅仅出现在(R)-结构对应体上。(S)-异构体相对(R)-异构体消除较为迅速, 所要在后续的检测中, 严格控制(S)-异构体的含量。现有比卡鲁胺的分析检测方法不能很好的将目标产物和杂质分开, 本文建立了比卡鲁胺的检测方法, 该方法能够将比卡鲁胺与异构体、杂质分开, 该方法快速, 准确, 灵敏度高。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪, 比卡鲁胺(进口), 乙腈(色谱纯, 美国 Honeywell 公司), 三氟乙酸(分析纯, 北京偶合科技有限公司), 水(屈臣氏)。

1.2 含量测定色谱条件

色谱柱: Venusil MP C18, 4.6×250mm, 5 μm, 100 Å(天津博纳艾杰尔科技有限公司);
流动相: A: 0.01%三氟乙酸水溶液, B: 0.01%三氟乙酸乙腈溶液,

时间/min	A%	B%
0	67	33
16.5	67	33
26.5	40	60
32.5	5	95
32.6	67	33
35.0	67	33

柱温: 30℃, 流速: 1.0mL/min, 检测波长: 276nm, 进样量: 20μL

1.3 样品的制备和测定

样品溶剂: 流动相A: 流动相B=1:2。样品溶液: 精密称取样品细粉1g, 置于100mL量瓶中, 加样品溶剂50mL溶解, 振摇10分钟, 加样品溶剂50mL稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 作为样品溶液。精密量取20 μL注入液相色谱仪, 记录色谱图。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

试验中考察过三氟乙酸对实验结果的影响, 采用流动相 A, B 不加三氟乙酸; 流动相 A 加三氟乙酸, 流动相 B 不加三氟乙酸; 流动相 A, B 都加三氟乙酸。

实验表明, 当流动相 A, B 都加三氟乙酸峰型最好, 说明流动相的 pH 值对分离有较好的改善。

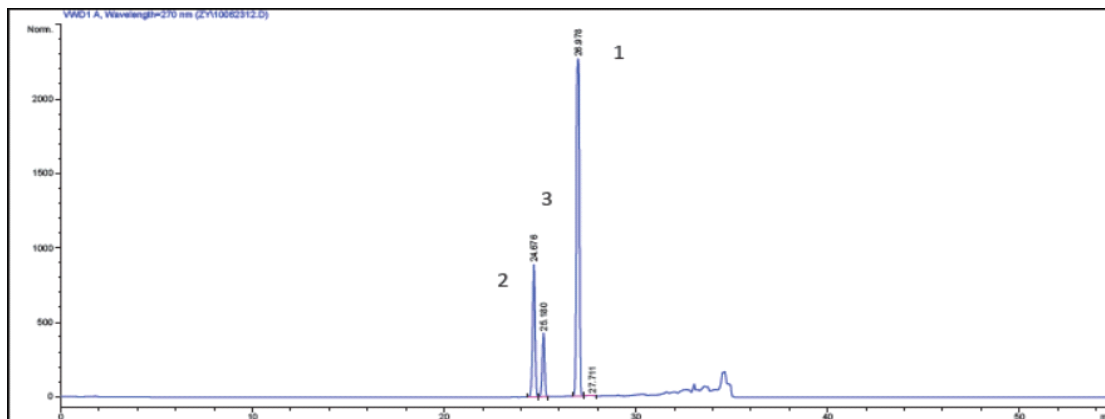


图1 比卡鲁胺液相色谱图

(1: 比卡鲁胺峰, 2: 异构体杂质 A, 3: 异构体杂质 B)

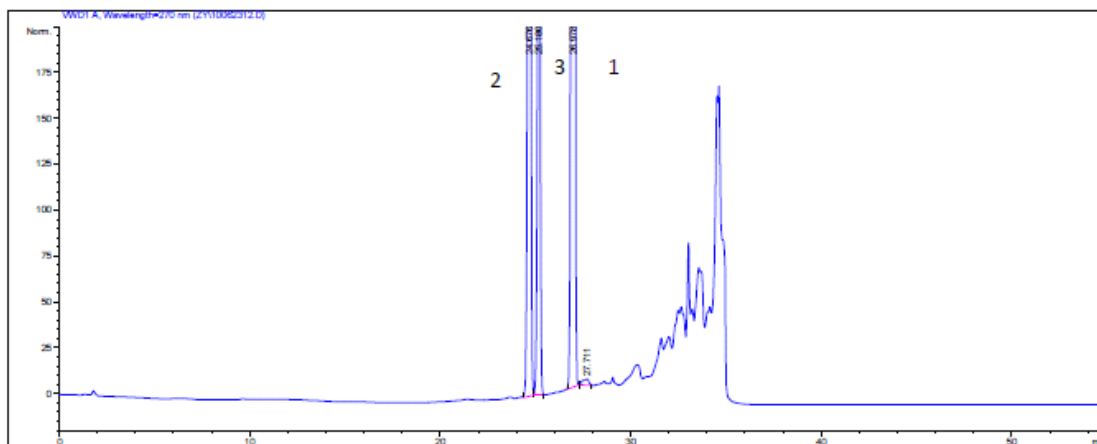


图2 比卡鲁胺液相色谱图放大图

(1: 比卡鲁胺峰, 2: 异构体杂质 A, 3: 异构体杂质 B)

2.2 最低检出限实验

比卡鲁胺 12.5 mg, 置 25mL 容量瓶中, 加流动相不断稀释进样, 记录峰面积, 使峰高大约为基线噪音的 3 倍, 记录色谱图。试验结果表明, 在上述色谱条件下比卡鲁胺检测限为 3ng。

2.3 精密度试验

分别取比卡鲁胺标准品 10mg, 20mg, 50mg, 精密称定, 置 50mL 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 定容。分别取此三种浓度的溶液各 10 μ L, 照上述色谱法各进样 6 份, 测得三种浓度主峰峰面积 RSD 分别为 (RSD 0.15%), (RSD, 0.14%), (RSD, 0.12%), 平均 RSD=0.13%。

2.4 重复性试验

取同一批比卡鲁胺样品 5 份, 各 20mg。精密称定, 置 50mL 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 定容。精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪, 分别测定比卡鲁胺的含量, 结果表明, 该方法的重复性较好。(见表 1)

2.5 稳定性试验

在不同时间段考察样品的稳定性, 室温放置考察日间差异, 过夜时密闭放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 考察日间差异。

取比卡鲁胺样品 20mg, 精密称定, 置 50mL 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 定容。精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪, 分别测定不同时间比卡鲁胺的含量。结果表明比卡鲁胺样品溶液稳定。

表1 卡比鲁胺样品含量

样品放置时间(h)	含量 (mg/ml)
1	0.970
24	0.969
48	0.967
72	0.967

表2 比卡鲁胺样品稳定性实验

样品	含量 (mg/ml)
样品 1	0.971
样品 2	0.975
样品 3	0.969
样品 4	0.970
样品 5	0.967

2.6 加标回收率

采用加标回收方法验证方法的准确性,准确称取 20mg 样品 3 份,分别配置为 1mg/mL 溶液进行加标回收试验,精密加入标准品适量,按照含量测定方法进样测定,并计算回收率。实验结果表明加标回收率良好,证明该方法测定比卡鲁胺的含量可行。(见表 3)

表3 比卡鲁胺加标回收率实验

样品含量 (mg/ml)	对照品加入量 (mg/ml)	测定值 (mg/ml)	回收率
1	0.1	1.23	102.5%
1	0.2	1.33	102.3%
1	0.3	1.37	97.8%
1	0.4	1.47	98%
1	0.5	1.62	101.2%

2.8 线性范围

精密称取比卡鲁胺标准品10mg, 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 精密称定,置50mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,定容。分别取此五种浓度的溶液按照含量测定方法各进样 10 μ L, 测定。以标准品浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归。回归方程为: $Y=532635X+1923$, $r=0.99998$ 。线性关系良好。

3 结论

针对比卡鲁胺与其异构体杂质能分离的情况质,建立了高效液相测定比卡鲁胺含量的 HPLC 方法。解决了比卡鲁胺消旋异构体杂质难以分开。该方法快速,准确,灵敏度高。可作为控制比卡鲁胺产品质量的方法。

参考文献

- [1] 孙忠全, 钱伟庆, 宋健达. 比卡鲁胺治疗雄激素非依赖性前列腺癌[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(2): 158-159.
- [2] SEPP—LORENZINO L, SLOVIN S. Prostate cancer: therapeutic patent review[J]. Exp Opin Ther Patents, 2000, 10(12): 1833-1842.

Determination of Bicalutamide with high performance liquid chromatography

ZHANG Ying, ZHANG Jian-zhu, Li Bo, ZHOU Li, WANG Qun-jie
Agela Technologies Inc, Tianjin 300457

Abstract: Determination of bicalutamide with high performance liquid chromatography. The paper studied the method in the precision, the detection limit, reproducibility, stability of the system. This method can separate R-bicalutamide, its isomer and impurity. The method is rapid, accurate and sensitive.

Keywords: Bicalutamide Isomer HPLC

紫杉醇真菌未知代谢产物的研究

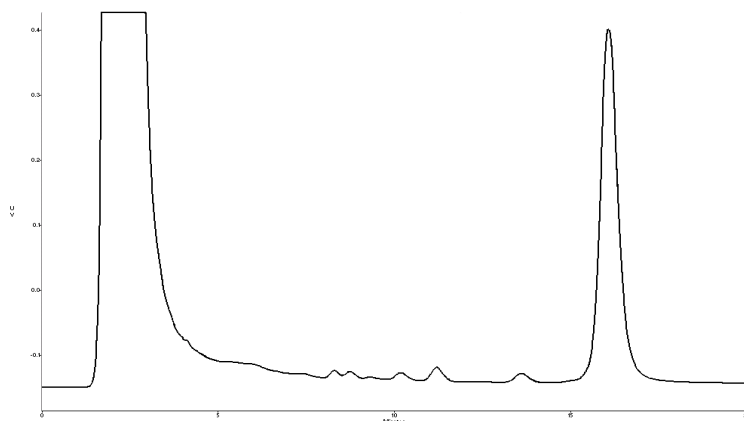
吴迪¹, 王伟¹, 曹淑珍², 吕宪禹¹

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津医科大学肿瘤医院, 天津 300402)

紫杉醇是从红豆杉属植物树皮中分离提取的一种次生代谢产物, 具有独特的抗癌作用, 紫杉醇是白色结晶粉末, 分子式为 $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 分子量为 853.92, 熔点为 213~216 °C, 难溶于水及许多药用溶媒, 易溶于氯仿、丙酮等有机溶剂

紫杉醇目前主要来源是从红豆杉树皮中提取, 这将破坏野生资源和生态环境, 而且天然红豆杉在世界范围内数量很少, 生长周期长, 从而对紫杉醇的进一步开发利用造成了很大的困难。微生物发酵法是生产紫杉醇的一种重要方法, 而研究紫杉醇真菌发酵产物中的其他组分也具有重要意义。

南开大学生命科学学院朱旭东分离到一株球毛壳真菌, 将其命名为 *NK-36b*; 朱旭东对 *NK-36b* 的发酵产物进行了薄层层析、高效液相色谱、质谱和酶联免疫吸附实验分析, 认为该菌株发酵产物中含有紫杉醇。



图一 *NK-36b* 发酵产物高效液相色谱图

我们针对 *NK-36b* 发酵产物中的未知高含量组分“化合物 X”进行研究。首先将化合物 X 自发酵产物中分离纯化出来, 之后针对化合物 X 纯品, 进行生物活性测试, 并确定了其分子结构。

1 仪器与样品

1.1 仪器

高效液相色谱系统包括: 高压恒流泵, 实验室自制; 手动进样器, 7725i; CO-IV 柱温箱, Scienhome 公司; Spectra 200 紫外吸收检测器, Spectra-Physics 公司; C18 色谱柱, 天津色谱科技有限公司。

1.2 样品

紫杉醇产生真菌 *NK-36b* 由朱旭东提供。

2 实验方法

2.1 化合物 X 分离纯化

将真菌发酵产物真空冷冻干燥后, 置于液氮中研磨成粉末。将真菌粉末分别按 0.1g/mL 的比例与乙酸乙酯混合。将真菌粉末浸出液进样到半制备型高效液相色谱中, 手工收集化合

物 X 处流出液。将色谱纯化收集液转移到圆底烧瓶中，室温下旋转蒸发浓缩。待获得较多沉淀后，将悬浊液离心弃上清取沉淀。

2.2 化合物 X 生物活性研究

将化合物 X 配置成不同浓度的溶液，饲喂果蝇和 A549 细胞，考察化合物 X 对它们的影响。

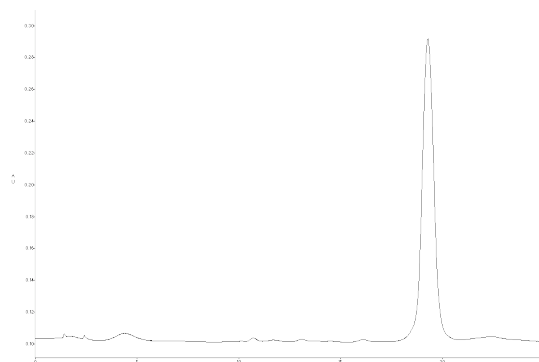
2.3 化合物 X 结构的解析

通过离子阱质谱、傅里叶变换质谱、元素分析、紫外光谱、红外光谱和核磁共振谱等仪器分析技术，综合化合物 X 的生物来源，综合分析确定化合物 X 分子结构。

3 结果

3.1 化合物 X 纯化效果

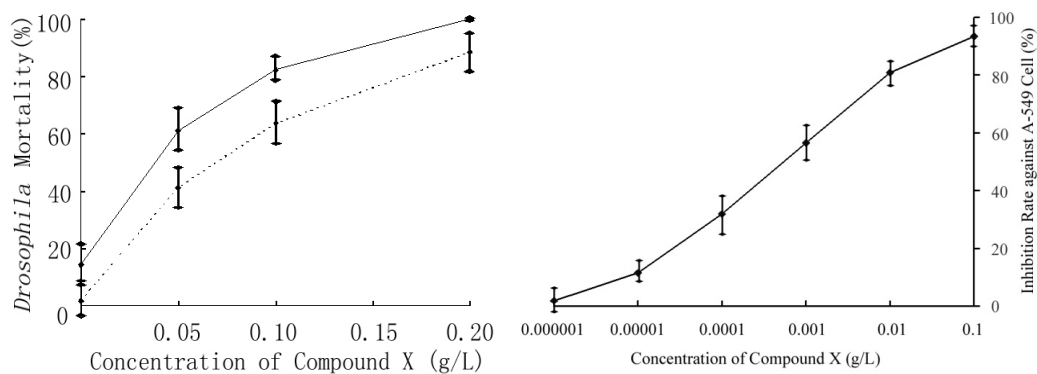
将纯化获得的化合物 X 溶解后进行高效液相色谱分析，结果如图所示。按照面积归一化法粗略估算，化合物 X 纯度在 95%以上；满足后续实验需求。



图二 化合物 X 高效液相色谱图

3.2 化合物 X 生物活性分析

实验发现化合物 X 对果蝇的成活和细胞生长都有抑制作用，是一种广谱生物毒性物质。

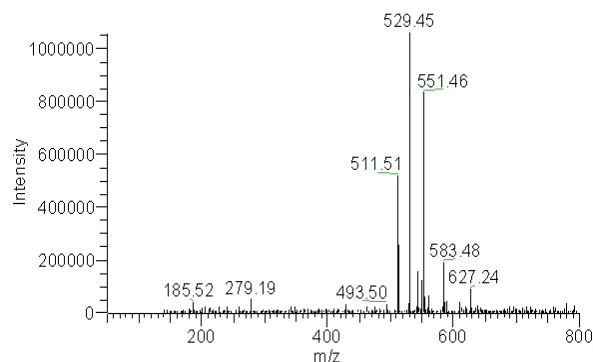


图三 化合物 X 对果蝇和 A549 细胞的毒性

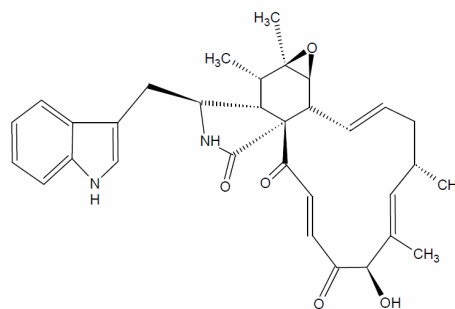
左：果蝇毒性实验； 右：MTT 实验

3.3 化合物 X 结构的解析

通过离子阱质谱测定化合物 X 相对分子质量为 528。进一步使用傅里叶变换质谱测定其精确分子质量并检索分子式，确定化合物 X 分子式为 $C_{32}H_{36}N_2O_5$ ，元素分析的结果支持这个结论。再综合化合物 X 的紫外光谱、红外光谱、核磁共振谱的结果，并考虑其生物来源，确定其为球毛壳甲素。



图四 化合物 X 的离子阱质谱图



图五 球毛壳甲素分子结构

4 讨论

实验表明 *NK-36b* 菌株能够同时产生紫杉醇和球毛壳甲素两种抗肿瘤药物, 有助于该菌株的深入开发利用; 同时, 基于球毛壳甲素的对 *NK-36b* 菌株的分子生物学改造也已经开始。

参考文献:

- [1] 元英进. 抗癌新药紫杉醇的药理与临床应用. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [2] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 1979, 277 (5698): 665~667
- [3] Hui Ming Ge, Wei Yun Zhang, Gang Ding, et al. Chaetoglobosins A and B, two unusual alkaloids from endophytic *Chaetomium globosum* culture. *Chem. Commun.*, 2008, 5978–5980
- [4] 倪志伟、李国红、赵沛基等. 云南美登木内生真菌 *Chaetomium globosum* Ly50 菌株的抗菌活性成分研究. *天然产物研究与开发*, 2008, 20: 33-36
- [5] Setsuko Sekita, Kunitoshi Yoshihira, Shinsaku Natori et al. Chaetoglobosins, Cytotoxic 10-(Indo-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetomium* spp. II Structures of Chaetoglobosins A, B and D. *Chem. Pharm. Bull.*, 1928, 30 (5): 1618 - 1628.

The Research about an Unidentified Metabolite from a Taxol-producing Strain

WU Di¹, WANG Wei¹, CAO Shu-zhen², LV Xian-yu¹

(1.College of Life Sciences, Nankai University,Tianjin 300071, China;

2.Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300420, China)

Abstract: Taxol is a secondary metabolite extracted from the bark of the Pacific yew tree and has unique anti-tumor effects. Microbial fermentation is an important method of yielding taxol, and study about the other components in the taxol-producing fungal fermentation products also has significant meanings. We focused on an unknown component "compound X" with high content in fermented products of Taxol-producing fungi *NK-36b*. First, the compound X was purified from the fermentation product, and then use the compound X purified for biological activity tests. Finally, Compound X was elucidated as Chaetoglobosin A.

Key words: Taxol; Chaetoglobosin A; Fermentation.

高效液相色谱-示差检测法分离蚕沙中的生物碱

亓晖, 张业云, 刘新来, 赵辉, 王鹏, 花同, 朱元元*

(南开大学药学院, 天津 300000)

蚕沙为蚕蛾科家蚕属昆虫家蚕幼虫的粪便, 具有较高营养成分, 药用价值很高。近年来研究发现, 蚕沙生物碱成分能抑制 α -糖苷酶活性, 改善糖尿病动物的糖、脂代谢异常, 有益于早期糖尿病及其慢性并发症的防治^[1-2]。对蚕沙中生物碱成分做 HPLC 分析, 实验数据显示, 至少含有八种化合物, 周元雄^[3]等人已分离鉴定出其中三种化合物, 而另外至少五种化合物还未见报道。因此, 有必要对蚕沙生物碱成分进行较深入的研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SHIMADZU 系列高效液相色谱仪; Hypersil SCX 色谱柱(250 mm×10.0 mm, 5 μ m); Varian-Mercury V×300 型高分辨核磁共振波谱仪; Thermofinnigan LCQ 质谱仪; 生药蚕沙由天津市中新药业提供; HPLC 用水均为娃哈哈纯净水; 其它试剂均为分析纯。

1.2 HPLC 法分离蚕沙中生物碱成分

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil SCX 柱(250 mm×10.0 mm, 5 μ m); 流动相: 水-冰醋酸-氨水 (1000:0.25:0.25; V/V/V); 流速: 3.0ml/min; 检测器: 示差检测器; 柱温: 室温。

1.2.2 供试品溶液的制备

2kg 蚕沙用离子水 6L, 调 pH3.0, 40~50 $^{\circ}$ C 保温 3 小时, 过滤; 滤渣同法再提取两次, 合并三次滤液, 减压浓缩至约 2.4L, 静置过夜, 10000rpm 离心 20min, 保留上清液。取上清液过 001×7 阳离子交换树脂柱, 以 50%乙醇和去离子水依次洗尽不吸附的杂质, 再采用 0.5mol/L 氨水溶液洗脱, 收集 α -糖苷酶抑制活性检测阳性部分, 减压蒸去氨水, 得到 9.7g 深棕色浸膏。取 9.3g 浸膏经 70g 硅胶吸附脱色, 无水乙醇洗脱, 减压蒸干后, 得蚕沙总生物碱提取物 3.2g (0.30%), 将其溶解, 做制备用。

1.2.3 蚕沙提取液中生物碱成分的 HPLC 法分离纯化

将上述供试品溶液以所选色谱条件进行分离, 谱图如图 1:



图 1 供试品溶液 HPLC 图谱

基金项目: 国家科技重大专项项目 (2009zx09103)

作者简介: 亓晖 (1985-), 女, 山东人, 硕士研究生, E-mail: qihui1985@126.com

通讯联系人: 朱元元, 女, 副教授, E-mail: zhuyy@nankai.edu.cn

分离得到干燥固体物质：化合物 A (119.5mg) 和化合物 B (20mg)

1.3 结构鉴定

对化合物 A 和 B 做 MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分析：

化合物 A：白色固体；ESI-MS m/z 118.0873[M+H]⁺；¹H-NMR(300MHz,D₂O) δ 3.236 (9H, s), 3.877 (2H, s)；¹³C-NMR(75MHz,D₂O)：δ 171.827(C=O), 68.907(CH₂), 55.077(CH₃×3)。碳谱及氢谱数据与文献报道的甜菜碱数据一致^[4]，故确定结构为 1-羧基-N,N,N-三甲基乙内酯，亦称甜菜碱，结构如图 2 所示。

化合物 B：白色晶体，mp 178℃；ESI-MS m/z ：164 [M+H]⁺；¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) δ：3.86-3.63 (3H, m, 2H-6; H-3), 3.52-3.36 (3H, m, H-2;H-4;H-1e), 3.09 (1H, dd, H-1a), 2.86 (1H, t, H-5)；¹³C-NMR (D₂O, 75MHz) δ：76.2 (C-3), 67.7 (C-4), 66.9 (C-2), 59.9 (C-6), 57.7 (C-5), 45.8 (C-1)。以上数据与 DNJ 标准品及其文献值相符^[5]，确认该化合物为 DNJ,结构如图 3 所示。

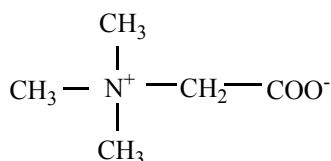


图 2

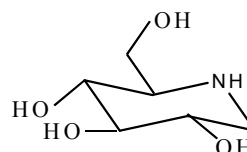


图 3

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 蚕沙生物碱成分分子极性较大，采用常规的反相 C18 色谱柱无法分析。为此选择了磺酸基柱，效果较好，且有合理的保留时间 (<15min)。

3.2 色谱条件的选择 实验探索得知当流动相为水-冰醋酸-三乙胺 (1000: 1: 1, V/V/V) 时，分离效果较好且峰形对称，但三乙胺的后处理困难，难以得到纯净化合物，因此改用有挥发性的氨水。对流动相 (水-冰醋酸-氨水) 配比进行考察，发现配比为水-冰醋酸-氨水 (1000: 0.25: 0.25) 时保留时间、分离效果、重复性均较理想。

3.3 检测器的选择 对蚕沙生物碱成分进行紫外扫描，发现紫外吸收很弱，同时考虑实验室条件，采用通用型检测器-示差折光检测器 (RID)，它是利用样品与流动相的折光率不同而检出信号，对没有紫外吸收的物质，如高分子化合物、糖类、脂肪烷烃等都能够检测。

参考文献：

- [1] Bollen M, Vandebreck A, Stalmans W, *etal.* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(5): 905-909
- [2] Arai M, Minatoguchi S, Takemure G, *etal.* [J]. *Circulation*, 1998, 97(13): 1290-1297.
- [3] 周光雄, 阮杰武, 黄关燕等. [J]. *中药材*. 2007, 30 (11): 1384-1385
- [4] 刘新亚, 马龙, 堵年生等. [J]. *西北药学杂志*. 2004, 19 (2): 63-64
- [5] Asano N, Tomioka E, Kizu H, *etal.* [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 253: 235-245

Alkaloid Constituents from Silkworm Dropping by HPLC-RID

Qi Hui, Zhang Yeyun, Liu Xinlai, Zhao Hui, Wang Peng, Hua Tong, Zhu Yuanyuan*

(College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300000, China)

Abstract: Objective: To extract and isolate chemical constituents from the total alkaloids of silkworm dropping (Can Sha). Methods: Chemical constituents were isolated by HPLC, ion-exchange resin. The structures of the isolated compounds were determined by spectral means. Results: Two compounds were isolated and identified as Betaine (A), Methyl nicotinate (B). Compound B is isolated and identified from Can Sha for the first time.

Key words: Silkworm dropping (Can Sha); Alkaloid; Betaine; Methyl nicotinate

紫云喷雾剂制备及其阿魏酸含量测定

李瑾

(天津金耀氨基酸有限公司)

1 引言

1.1 研究目的和意义

紫云喷雾剂处方源于部颁标准紫云膏。处方组成为紫草、地榆、当归、冰片。诸药合用，可活血祛瘀，抗菌消炎，使组织再生和伤口愈合及美白皮肤、去疤痕等，是一种理想的治疗各种外伤、感染及炎症方剂。

实验中，以紫草，当归，地榆，冰片为原料，通过提取分离等过程提取其中有效成分，制备紫云喷雾剂。

1.2 研究方法

1.2.1 提取工艺条件的筛选：用不同浓度的乙醇溶剂将药材先浸泡 60min，对紫草，当归，地榆，冰片按正交设计方案进行回流提取，以当归中的阿魏酸含量作为评价指标，用 HPLC 法测定其含量，优化最佳提取工艺。因素包括溶剂量、提取时间、提取次数等。

1.2.2 喷雾剂的制备：以原处方称取当归、地榆、紫草按试验安排加乙醇浸泡 60min，回流提取，回收乙醇，减压浓缩至约 200ml，过滤后置 250ml 容量瓶，精密称取冰片溶于 95% 的乙醇中与其混匀，定容。

2 工艺研究

2.1 工艺路线

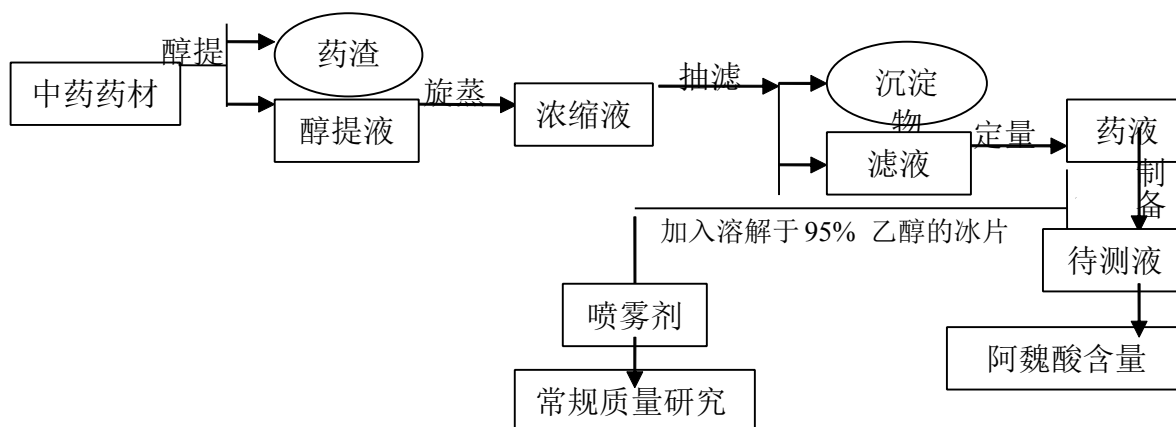


图1 工艺路线示意图

2.2 提取工艺条件的筛选

2.2.1 阿魏酸含量测定方法的确定：本试验选用阿魏酸作为定量指标，进行了方法学考察。

2.2.2 线性范围的考察：精密称取阿魏酸对照品 5mg，置 25ml 容量瓶中，用 65% 甲醇超声溶解，定容至刻度。精密吸取 0.5，1.0，1.5，2.0，2.5，

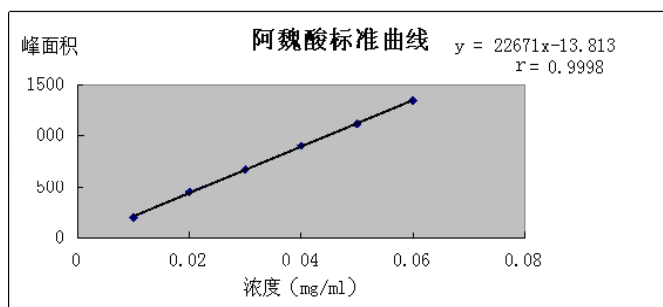


图2 阿魏酸标准曲线

3.0ml 对照品溶液, 分别吸取每组

对照品溶液 10 μ l 进样, 测定峰面积积分值 (y)。用峰面积积分值对浓度 (x) 进行回归, 得直线回归方程 (见式 (1) 和标准曲线 (见图 2))。每次进样 10 μ l, 对峰面积 y 进行线性回归, 得回归方程:

$$y=22671x-13.813 \quad (r=0.9998) \text{-----}(1)$$

线性范围: 0.01~0.06mg/ml 范围内成良好的线性关系。

2.2.2.3 精密度试验: 精密吸取对照品溶液 (阿魏酸浓度 0.06mg/ml) 10 μ l 进样, 重复 6 次, 记录所测定阿魏酸的峰面积积分值, 阿魏酸的 RSD 为 1.41%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.2.4 稳定性试验: 取某样品测定液, 按 0, 2, 4, 8, 24h 不同时间间隔进样, 测定阿魏酸的峰面积积分值, 计算 RSD 为 1.46%, 结果表明样品测定液中阿魏酸在 24h 内稳定。

2.2.2.5 阴性对照实验: 阴性提取液 (处方中缺当归药材), 按提取物测定液的制备方法制备供试液, 进样测定。结果其色谱在阿魏酸相应保留时间无峰, 说明处方中其他成分对测定结果无干扰。(见图 4)

2.2.2.6 当归药材试验: 精密称取当归粉末 0.25g (三批) 测得阿魏酸的峰面积积分值。计算得当归药材中阿魏酸的百分含量为 0.051%。(药典规定阿魏酸的含量总量不得低于 0.050%)。见表 1。

表 1 当归药材中阿魏酸的含量测定

批号	阿魏酸含量/ (mg/g)	阿魏酸含 量/%
1	0.508	0.051
2	0.512	0.051
3	0.497	0.050
平均	0.506	0.051

2.2.3 采用 $L_9(3^4)$ 表作正交试验

2.2.3.1 因素水平: 根据药材所含有效成分的化学性质, 选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排实验其水平因素表见表 2。

表 2 提取试验因素水平

水平	因素			
	溶剂用量/倍 A	乙醇浓度/% B	提取时间/min C	提取次数/次 D
1	10	30	60	1
2	12	50	120	2
3	14	70	180	2

2.2.3.2 试验方法及结果: 按 $L_9(3^4)$ 正交表方案安排试验。以原处方量比例 (0.4 倍量) 称取当归、地榆、紫草, 按试验安排加乙醇浸泡 60min, 回流提取, 回收乙醇, 减压浓缩至约 250ml, 用 15g 硅藻土加水进行抽滤, 制成滤饼。将药液倒在滤饼上进行抽滤, 倒入 250ml 容量瓶中定容。取滤液 8ml 至离心管中, 4000r/min 离心 20min, 得上清液。精密吸取 5ml 上清液置于 10ml 容量瓶中, 定容, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后取 10 μ l 进样, 记录所测定阿魏酸的峰面积积分值 (见图 11), 计算阿魏酸含量。结果见表 3。

表 3 提取工艺条件 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

实验号	因素				阿魏酸/ (μ g/ml)
	1A	2B	3C	4D	
1	1 (10 倍)	1 (30%)	1 (60min)	1 (1 次)	18.31
2	1	2 (50%)	2 (120 min)	2 (2 次)	18.84
3	1	3 (70%)	3 (180 min)	3 (2 次)	20.07
4	2 (12 倍)	1	2	3	18.84
5	2	2	3	1	19.17
6	2	3	1	2	20.52
7	3 (14 倍)	1	3	2	18.08
8	30	2	1	3	16.93
9	3	3	2	1	20.87
K_1	19.07	18.41	18.59	19.45	
K_2	19.51	18.31	19.52	19.15	
K_3	18.63	20.49	19.11	18.61	$A_2B_3C_2D_1$
R	0.88	2.18	0.93	0.84	

2.2.3.3 试验结果的统计分析: 极差分析: 由表 3 中的 R 值可知, 影响阿魏酸含量因素的大小顺序均为 $B>C>A>D$ 。乙醇浓度是重要影响因素, 提取时间、溶剂用量和提取次数次之。

方差分析: 采用国际通用 SAS 统计软件对正交试验结果进行方差分析, 结果见表 4。由方差

分析结果可知,因素B有显著性,即乙醇浓度对阿魏酸含量有影响,结合R值,取B₃;A、C、D均无显著性,水平可任取。按生产实际中降低消耗,提高效率的原则,确定较优的提取工艺条件为A₃B₃C₂D₁,即加入14倍量的70%乙醇,回流提取提取1次,时间为120min。

表4 方差分析分析结果

Source	SS	Df	MS	F	P
B	9.0453	2	4.5226	8.05	0.0396
C	1.3034	2	0.6517	1.16	0.4005
误差*	2.2469	4	0.5617	—	—
总	12.5956	8	—	—	—

注:*因素A、D的变异作为误差项

2.2.3.4 较优提取工艺的验证:按上述较优工艺条件进行试验验证(n=4),结果见表5。阿魏酸的平均含量为21.24 μg/ml,表明所确定的较优工艺合理可行。

表5 较优工提取工艺的验证结果

序号	阿魏酸含量/(μg/ml)
1	19.46
2	21.45
3	21.48
4	22.56
平均	21.24

2.3 喷雾剂的制备

3 质量研究

3.1 含量测定

3.1.1 加样回收率试验:精密吸取已知含量的同一批喷雾剂样品6份,每份5.00ml,分别各精密加入5.00ml阿魏酸对照品溶液(浓度:0.05mg/ml),混匀。按上述样喷雾剂样品测定液的制备方法制备测试液,进样10 μl,测定峰面积积分值,并以公式(2)计算回收率。结果见表6。

$$\text{阿魏酸回收率}(\%) = \frac{\text{阿魏酸测得量} - \text{样品中阿魏酸的量}}{\text{加入的阿魏酸对照品的量}} \times 100 \quad (2)$$

表6 阿魏酸的回收率

序号	实测峰面积	实测阿魏酸量/mg	样品中阿魏酸量/mg	加入阿魏酸量/mg	回收率%	平均回收率%	RSD%
1	764.60126	0.343	0.101	0.25	96.80	97.40	1.09
2	772.49890	0.347	0.101	0.25	98.40		
3	775.22034	0.348	0.101	0.25	98.80		
4	762.89105	0.343	0.101	0.25	96.80		
5	768.60785	0.345	0.101	0.25	97.60		
6	759.27814	0.341	0.101	0.25	96.00		

3.1.2 样品含量测定:取4批喷雾剂样品,每批取3份,按上述喷雾剂样品测定液的制备方法制备供试液,10 μl进样,测定峰面积积分值,计算阿魏酸含量,结果见表7。

表7 样品测定结果

批号	样品号	峰面积	*阿魏酸含量/(μg/ml)	批内RSD/%
1	1	432.83112	19.70	1.49
	2	442.10443	20.11	
	3	429.18518	19.54	
2	1	476.1886	21.61	0.87
	2	468.40375	21.27	
	3	475.11902	21.57	
3	1	476.92352	21.65	1.19
	2	486.08176	22.05	
	3	488.07275	22.14	
4	1	520.48944	23.57	1.22
	2	518.40002	23.48	
	3	530.79987	24.02	

注:*阿魏酸含量为喷雾剂样品被稀释一倍后的含量。

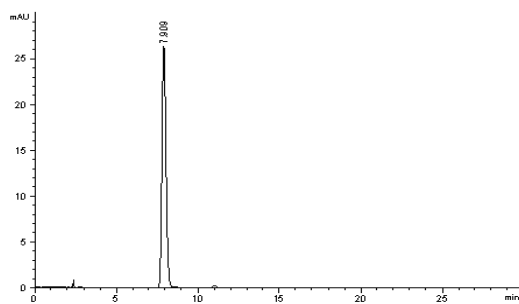


图3 阿魏酸对照品 HPLC 图谱

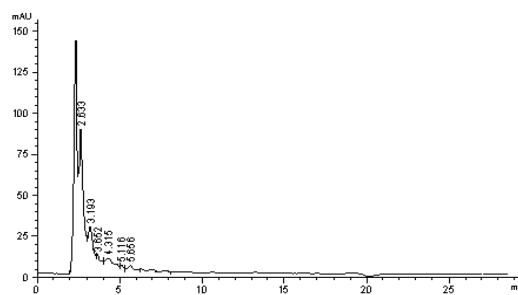


图4 阴性对照 HPLC 图谱

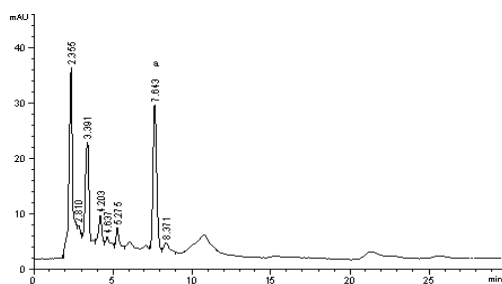


图5 当归药材 HPLC 图谱 (a. 阿魏酸)

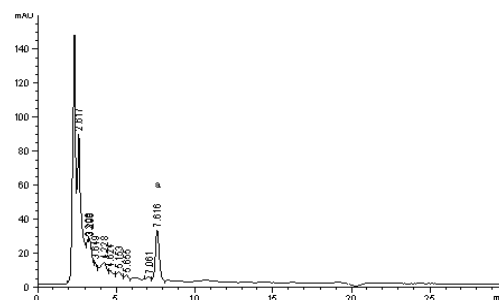


图6 紫云喷雾剂提取液 HPLC 图谱 (a. 阿魏酸)

4 讨论与结论

4.1 讨论

4.1.1 提取工艺方面：将醇提液回收乙醇浓缩后，需过滤，但浓缩液粘度较大，在过滤时很困难，速度很慢。为了解决这一问题，采用硅藻土作助滤剂，取得了较好的效果，过滤速度大大提高，节省了时间。

4.1.2 含量测定方面：进行阿魏酸含量测定时。参考有关文献，比较了不同流动相，如甲醇-水、甲醇-冰醋酸等溶剂系统，结果以甲醇：1%冰醋酸(32：68)条件下分离效果最好，杂质干扰较小，阿魏酸的保留时间约为10min。在测定提取液中阿魏酸含量时，采用了甲醇制备测试液。由于方法的实验步骤简单易行，而且节约能源。所以选用此方法作为提取液测定液的制备方法。

4.2 结论

本文根据处方的功能主治和处方中各中药成分的理化性质，结合处方中各中药的药理研究及临床用药要求，采用正交设计方法对紫云喷雾剂的提取工艺和制剂成型工艺进行了筛选。其最佳提取工艺为加入14倍量的70%的乙醇浸泡原料药60min，回流提取120min，提取次数为1次。同时，在提取工艺的研究中，建立了高效液相色谱法测定紫云喷雾剂中阿魏酸含量的方法，为确保研究数据的可靠性，本试验对其方法学进行了研究。其中阿魏酸在0.01~0.06mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系， $r=0.9998$ ，平均回收率=97.40%，RSD=1.09%。结果表明：该工艺简便、合理可行；所建立的定量检测方法能准确、快速地对紫云喷雾剂中阿魏酸的含量进行测定。

参考文献 (略)

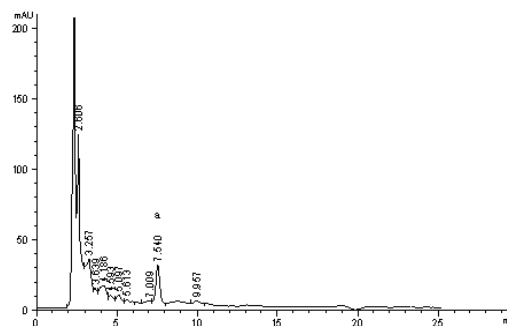


图7 紫云喷雾剂样品 HPLC 图谱 (a. 阿魏酸)

空气中异丁烷气体标准物质的研制

袁岭

(天津市化学试剂四厂, 天津 300381)

本文论述了用比较法对空气中异丁烷气体标准物质的制备, 并以气相色谱法对其均匀性和稳定性进行考察。证明达到国家二级气体标准物质要求, 研制方法可行, 量值准确可靠。

1 前言

空气中异丁烷气体标准物质广泛用于石油、化工、环境监测等领域, 更用于气体安全报警仪的校准和检测。

本文详细介绍了瓶装空气中异丁烷标准样品, 其组分含量为 $i\text{-C}_4\text{H}_{10}$ 0.1%—1.0% (mol/mol) 的标准气体的制备方法、定值方法及不确定度的合成方法。

2 标准气体的制备

2.1 气体的充填装置

配制气体中使用的装置是本单位自行设计制造的。该装置由真空泵、压差计、压力表、气路系统、气瓶连接部件组成。

气路系统由高压、中压和低压真空系统三部分组成。可使组分气体和稀释气体的充填彼此独立, 避免相互污染, 整个系统气密性良好。

2.2 气瓶的预处理

本实验采用国产4升钢瓶作包装容器, 配气之前气瓶经清洗、加热及抽真空处理, 检查钢瓶处于完好状态方可使用。

2.3 气体的制备

将预处理好的钢瓶接到配气系统中, 根据分压法配置空气中含有异丁烷气体, 其浓度分别为0.1%和1.0%各两瓶。配气用纯气的含量分别为 $i\text{-C}_4\text{H}_{10}$ (99.9%), N_2 (99.999%), O_2 (99.99%)。

3 标准气体的定值

本实验采用 SP-2100 气相色谱仪作高精度比较分析法, 该方法通过测量一级气体标准物的色谱峰面积和待测值气体标准物的色谱峰面积。

待测气体摩尔分数的相对标准偏差是由一级气体摩尔分数的相对标准偏差以及在色谱仪上一级气体的峰面积的测量相对标准偏差和待测气体峰面积测量相对标准偏差合成而得到的。将 S 乘以包含因子 ($K=2$, 相对置信概率 95%) 即可得到待测气体摩尔分数的不确定度。表中列出空气中异丁烷标准气体(瓶号为 00159 00108)以及待测气体(瓶号为 006157 005174) 的色谱分析数据, 样品定值数据见表 1

表1 样品定值数据表

样品编号	00159	006147	00108	005174	
色谱峰面积/mL	X1	2972891	2920622	324906	327016
	X2	2998141	2917809	325912	321393
	X3	2985828	2926236	327256	322790
	X4	2972837	2924269	326298	321592
	X5	2964533	2940541	327926	323861
	X6	2954658	2929674	326986	322967
面积平均值 \bar{X} /mL	2974814	2926525	326547	323269	
面积测定的标准偏差 S/mL	15394	8029	1072	2051	
面积测定的相对标准偏差 S/ \bar{X}	0.5%	0.3%	0.4%	0.6%	

根据测得色谱峰面积按下式定值：

$$C_2 = C_1 \frac{S_{\text{样}}}{S_{\text{标}}}$$

式中：C1----- 一级气体的摩尔分数；

S 标-----一级气体的色谱峰面积；

S 样-----待测气体的色谱峰面积；

C2-----待测气体的摩尔分数。

如果 S1、S2、S3、S4 分别表示 C1、C2、S 标、S 样的测量标准偏差，则有

$$\left(\frac{S_2}{C_2}\right)^2 = \left(\frac{S_1}{C_1}\right)^2 + \left(\frac{S_3}{S_{\text{标}}}\right)^2 + \left(\frac{S_4}{S_{\text{样}}}\right)^2$$

待测气体的摩尔分数及相对标准偏差见表 2。

表 2 待测气体的摩尔分数及相对标准偏差

钢瓶编号	C2	$\left(\frac{S_2}{C_2}\right)^2$	$\frac{S_2}{C_2}$	U
006157	0.994×10^{-2}	0.00006	0.0077	1.6%
005174	0.101×10^{-2}	0.00008	0.0088	1.8%

故待测气体 006157 的摩尔分数为 0.994×10^{-2} 其相对不确定度为 2%，
待测气体 005174 的摩尔分数为 0.101×10^{-2} 其相对不确定度为 2%。

4 标准气样均匀性和稳定性的考察

4.1 标准气样的均匀性考察

标准气体混合均匀的程度，直接影响标准样品组分含量的准确性。也是评价分压法配气准确性的依据之一。为此分别配制两组空气含异丁烷气体的样品。配制完毕后，立即进行均化处理半小时，并用色谱仪检测样品中异丁烷组分含量的变化情况，均匀性实验结果见表 3。

表 3 均匀性实验结果

钢瓶编号	00346	10152	05763	00357	00346	00412
组分	i-C4H10%	i-C4H10%	i-C4H10%	i-C4H10%	i-C4H10%	i-C4H10%
均化处理	1.01	0.97	1.02	0.12	0.13	0.09
考查时间	再静置两小时后	0.99	0.98	1.01	0.11	0.10
	再静置四小时后	0.99	0.98	1.00	0.11	0.09

实验结果表明样品气配制好后，经半小时均化处理已经混均。

4.2 标准气样的稳定性考察

稳定性是标准气体的一项十分重要的特性指标,本课题用GC法对两种含量的标准气体随时间和压力变化其量值的稳定性进行为期一年的考察,其结果见表4、表5。

表4 含异丁烷 1%标准气样稳定性的实验结果

瓶号编号	00346	10152	05763
08—2	1.00	0.98	1.01
08—3	0.99	0.99	1.00
08—4	0.99	0.98	1.00
08—6	0.99	0.97	0.99
考察时间及分析结果			
08—8	1.00	0.98	1.00
08—10	0.99	1.00	1.02
08—12	0.98	0.97	0.99
09—1	0.99	0.98	1.00
09—3	0.99	0.99	0.99
平均值 \bar{X}	0.99	0.98	1.00
标准偏差 S	5.3×10^{-3}	4.27×10^{-3}	1.1×10^{-4}
不确定度 $\Delta\%$	0.5	0.4	0.1

表5 含异丁烷 0.1%标准气样稳定性的实验结果

钢瓶编号	00357	00346	00412
08—2	0.111	0.137	0.099
08—4	0.110	0.135	0.098
08—6	0.109	0.136	0.099
考察时间及分析结果			
08—8	0.111	0.136	0.099
08—10	0.110	0.137	0.100
08—12	0.111	0.136	0.098
09—1	0.110	0.135	0.099
09—3	0.109	0.136	0.100
平均值 \bar{X}	0.110	0.136	0.099
标准偏差 S	0.08×10^{-2}	0.076×10^{-2}	0.076×10^{-2}
不确定度 $\Delta\%$	0.8	0.6	0.7

由结果表明,标准气体浓度值的变化在分析方法误差范围之内,考察期内组分的量值是稳定的。

4.3 标准气样组分随压力变化其稳定性考察

本实验对配制好的两组气样,用GC仪分别对i-C₄H₁₀组分进行测定,实验压力分别选定为8MPa,6MPa,4MPa,2MPa,和0.5MPa其结果见表6、表7:

表6 含量1%标准气样中含量随压力变化的考察结果

钢瓶编号	00346	10152	05763	
	压力 MPa	i-C4H10%	i-C4H10%	i-C4H10%
i-C4H10%分析值	8.0	0.992	0.982	1.00
	6.0	0.990	0.981	1.01
	4.0	0.992	0.982	1.00
	2.0	0.991	0.981	1.01
	0.5	0.991	0.980	1.01
平均值 \bar{X}	0.991	0.981	1.01	
标准偏差 S	0.087	0.087	0.7	
不确定度 $\Delta\%$	0.09	0.09	0.7	

表7 含量0.1%标准气样中含量随压力变化的考察结果

钢瓶编号	01983	972938	02835	
	压力 MPa	i-C4H10%	i-C4H10%	i-C4H10%
i-C4H10%分析值	8.0	0.109	0.110	0.102
	6.0	0.110	0.110	0.103
	4.0	0.109	0.109	0.103
	2.0	0.109	0.110	0.102
	0.5	0.109	0.110	0.103
平均值 \bar{X}	0.109	0.110	0.103	
标准偏差 S	0.05	0.05	0.07	
不确定度 $\Delta\%$	0.5	0.5	0.7	

由实验结果表明,空气中异丁烷标准气的含量值的变化在分析误差范围之内。

5 结论

本课题采用国产钢瓶贮装的组分含量为 i-C4H10% 0.1%—1.0% (mol/mol) 的空气中异丁烷标准气样品,经一年的考察实验表明组分含量稳定。

参考文献

- [1] GB/T1407—1993, 气体分析—校准用混合气的制备—压力法
- [2] 全浩 韩永志主编。标准物质及其应用技术。北京:中国标准出版社,2002
- [3] 金美兰 赵建南编著。标准气体及其应用。北京:化学工业出版社,2003
- [4] 韩永志,标准物质手册,1998年

The air in the standard gas isobutane of material

YUAN Ling

(Tianjin Forth Chemical Reagent Factory, Tianjin 300381)

Abstract: The paper discusses the method of using standard gas air isobutane material preparation, and by gas chromatography for its uniformity and stability. Prove to national standard material requirements, gas energy method is feasible and reliable.

Keywords: air, gas isobutane standard substance and developed

室内环境空气中 TVOC 测定注意要点

闫卿卿, 苏广志, 杨绍康

(天津市房屋质量安全鉴定检测中心, 天津 300060)

从 TVOC 定量重复性和 TVOC 分析的检测灵敏度两方面入手, 讨论了在 TVOC 分析测定过程中需要注意的问题。

TVOC (总挥发性有机物); 重复性; 灵敏度; 热解析

对于室内空气质量标准中主要的五项分析项目的检测, 应该说最难掌握和难以做得好的是室内空气中总挥发性有机物 (TVOC) 的热解析 / 毛细管气相色谱分析。尽管在《民用建筑工程室内环境污染控制规范》中和《GB/T 18883-2002 室内空气质量标准》中都介绍了 TVOC 分析的原理、方法。然而, 在实际操作应用中都不易做好, 存在不少具体问题。归纳起来, 主要存在二大类问题:

定量分析重复性做不好, 实质上也就反映了分析准确度差。

检测灵敏度低, 标准规定的最低检测限 $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 往往达不到。

我们做了大量试验研究, 总结出以下注意要点, 供提供开展室内空气中 TVOC 分析检测的工作者参考。

1 关于 TVOC 定量分析重复性问题

1.1 标样取样方法

由于空气中 TVOC 的定量方法是采用外标法, 需用液体标样或气体标样。气体标样国内还在有关单位攻关, 国内尚无商品供应, 自行配置 TVOC 气体标样较难, 不易配置准确。所以, 基本上是采用色谱纯物质精密天平称重法配制 TVOC 液体标样。

《标准》中只简单地写一句话: “采用液体外标法或气体外标法将其定量注入吸附管”。在实际操作中, 如何将标样百分之百地注入吸附管 (即标样取样方法) 是不可忽视的, 将直接影响 TVOC 定量分析的重复性。

1.2 正确选用毛细柱

众所周知, 采用小口径毛细柱就必须进行分流进样, 而对于复杂组份的毛细柱分流进样法就较难做好定量重复性。实践证明, 采用分离性能较好的大口径毛细柱, 不分流的直接进样法, 可获得很好的重复性。

1.3 仪器程序升温的重复性

由于 TVOC 分析必须采用柱箱程序升温来解决组份分离, 因此, 气相色谱仪器中柱箱程序升温的重复性及控温精度就十分重要, 将直接影响 TVOC 的定性定量重复性。

1.4 TVOC 吸附管热解析进样方法

热解析分析的原理是吸附管采样后, 将吸附管加热, 解析挥发性有机物, 将待测组份随载气进入毛细管气相色谱仪。然而, 在具体操作上, TVOC 吸附管热解析进样有二种方法: (1) 将吸附管置入加热炉并通载气, 由载气将 TVOC 组份解析到 100ml 的大针筒中 (即 TVOC 气样采集)。然后用小针筒 (1ml 注射器) 从大针筒中取样后注入气相色谱仪汽化室, 或用 10ml 注射器从大针筒中取样后再注入六通阀中定量管, 再用切换六通阀, 实现定体积气体进样。这种方法, 我们称谓“针筒取样进样法”; (2) 将 TVOC 吸附管置于 300°C 的加热炉中将 TVOC 组份热解析并连接六通阀直接注入气相色谱仪汽化室, 这种方法, 我们称谓“热解析直接进样法”。

显然, 从理论分析和实践证明“针筒取样进样法”是根本做不好重复性的, 只有“热解析直接进样法”可保证做好 TVOC 分析的重复性。

2 关于 TVOC 分析的检测灵敏度问题

2.1 热解析进样方法

从上所述,采用热解析后针筒取样进样法,方法本身就将 TVOC 样品经载气稀释了 100 倍,实质是减小了进样量。因此《标准》规定的最低检测限 $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 就往往难以达到。而采用热解析直接进样法,是将采集到吸附管中的 TVOC 组份,全部注入了色谱柱系统,只要仪器的敏感度达到 $Mt \leq 1 \times 10^{-11} \text{g/s}$ 的技术指标,实践证明完全可以达到《标准》规定的要求: $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 。

2.2 影响氢焰检测器 (FID) 检测灵敏度的因素

- (1) N_2/H_2 的流量比; (2) 空气的流量大小;
- (3) 咀的孔径大小; (4) 极化极与喷咀口的距离位置;
- (5) 放大器输入高阻大小; (6) 放大器的内衰减。

以上因素,有的是仪器的设计参数,有的是使用者操作参数,只要认识和熟悉其影响灵敏度的规律,正确选择这些参数,就可获得最佳检测灵敏度。

3 总结

室内空气中总挥发性有机物 (TVOC) 的热解析 / 毛细管气相色谱分析,要做好定量分析重复性,要达到《标准》规定的精密度、准确度和检测下限,就必须正确选用热解析直接进样装置,要采用正确的标样取样方法,要正确选用毛细柱,要正确选择气相色谱仪并将色谱分析条件调试到最佳灵敏度状态。

The Points to be Noted of the TVOC Analysis In Indoor Environment Air

YAN Qing-qing, SU Guang-zhi, YANG Shao-kang

(Tianjin Housing Center for Envaluation and Inspection of Quality & Safety Tianjin 300060)

Abstract: TVOC from the TVOC analysis of quantitative reproducibility and detection sensitivity of two-pronged approach, discussed in TVOC analysis of the Determination of issues that required attention.

Key Words: TVOC(total volatility organic compound); repeatability; sensibility; the analytic of theory of heat.

氮中甲烷、乙烷、丙烷和正丁烷 混合气体标准物质的研制

袁岭

(天津市化学试剂四厂, 天津 300381)

本文论述了氮中甲烷、乙烷、丙烷和正丁烷混合气体标准物质的制备方法, 均匀性、稳定性和压力递减后组分含量的变化情况, 定值结果及不确定度的估计。

1 前言

氮中甲烷、乙烷、丙烷和正丁烷混合气体标准物质 (以下简称为 $\text{CH}_4\text{-C}_2\text{H}_6\text{-C}_3\text{H}_8\text{-n-C}_4\text{H}_{10}/\text{N}_2$) 主要用于油田开采中录井仪的检测和钻井初期对采集样品中主要成分的含量分析。为了确保该气体标准物质的质量和技术水平, 对该标准物质研制显得十分重要。

本文研究了瓶装的甲烷、乙烷、丙烷和正丁烷混合气体标准物质, 其组分含量 CH_4 : 10%; C_2H_6 : 2.5%; C_3H_8 : 2.5%; $\text{n-C}_4\text{H}_{10}$: 2.5%。并对其稳定性、均匀性和压力递减后组分含量的变化进行了考察, 给出了总不确定度。

2 混合气体标准物质的制备

2.1 方法原理

$\text{CH}_4\text{-C}_2\text{H}_6\text{-C}_3\text{H}_8\text{-n-C}_4\text{H}_{10}/\text{N}_2$ 混合气体标准物质按照国家标准 GB5274—85《气体分析—校准用混合气体的制备—称重法》制备, 它是经典的称量法为基础, 以国际单位制“质量”为基准的绝对法, 是国际上公认的标准方法。

配制时用精密标准天平分别称量充入钢瓶中的组分气和稀释气的质量, 然后根据它们的质量确定其含量, 混合气体标准物质的组分含量定义为组分气的物质的量 (摩尔) 与混合气的总物质的量之比, 即:

$$X_i = \frac{n_i}{n}$$

式中 X_i 为组分 i 的物质的量分数; n_i 为组分 i 的物质的量; n 为混合气体总物质的量。

2.2 混合气体标准物质的制备

$\text{CH}_4\text{-C}_2\text{H}_6\text{-C}_3\text{H}_8\text{-n-C}_4\text{H}_{10}/\text{N}_2$ 混合气体标准物质是以甲烷 99.95%, 乙烷 99.9%, 丙烷 99.9%, 正丁烷 99.9%, 高纯氮 99.999% 为原料气, 采用称量法配制而成的。称量天平为上海第二天平仪器厂生产的 TG320 型精密标准机械天平, 最大称量 20kg, 最小分度值 10mg。配气称量时一律采用替代法, 它不仅可以消除天平的不等臂误差, 而且还可以减少浮力以及钢瓶吸附水对称量的影响。配气装置和气瓶预处理装置为我单位设计加工的, 配气装置设计合理, 气密性好, 能够满足配气要求, 气瓶经过多次抽真空、加热, 填充高纯气置换处理后方可使用。

3 混合气体标准物质性能检验

3.1 混合气体标准物质均匀性检验

$\text{CH}_4\text{-C}_2\text{H}_6\text{-C}_3\text{H}_8\text{-n-C}_4\text{H}_{10}/\text{N}_2$ 混合气体标准物质的均匀程度, 将直接影响标准气体组分含量的准确性, 为此将标准物质配制好后立即进行均化处理 1 小时后分析, 观察气体组成的变化情况, 结果列于表 1。

表1 CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂均匀性检验数据(单位: mol/mol)

瓶号	005033			
组分	CH ₄	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	n-C ₄ H ₁₀
均匀化处理后1小时	10.1%	2.57%	2.50%	2.56%
再静置1小时后	10.2%	2.55%	2.51%	2.55%
再静置2小时后	10.1%	2.56%	2.51%	2.55%

实验结果表明, CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂混合气配制完毕后, 通过均匀化处理1小时后即可处于均匀状态。

3.2 混合气体标准物质稳定性检验

稳定性是标准物质的一项十分重要的特性指标, 我们采用气相色谱法对 CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂ 标准物质稳定性进行了下列两种实验。

3.2.1 混合气体组分含量随时间变化的实验

在一年内分析了 CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂ 标准物质含量随时间变化的情况, 结果列于表2。

表2 稳定性检验数据 (单位: mol/mol)

瓶号	005056			
组分名称	CH ₄	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	n-C ₄ H ₁₀
2008-04	10.4%	2.53%	2.56%	2.55%
2008-05	10.4%	2.52%	2.54%	2.56%
2008-06	10.2%	2.51%	2.56%	2.56%
2008-07	10.1%	2.51%	2.55%	2.54%
2008-08	10.3%	2.53%	2.55%	2.55%
2008-09	10.2%	2.52%	2.57%	2.55%
2008-10	10.2%	2.52%	2.57%	2.56%
2008-11	10.3%	2.51%	2.56%	2.54%
2008-12	10.4%	2.53%	2.56%	2.56%
2009-01	10.4%	2.52%	2.55%	2.55%
2009-02	10.1%	2.52%	2.55%	2.55%
2009-03	10.2%	2.51%	2.57%	2.56%
平均值	10.3%	2.52%	2.56%	2.55%
标准偏差	0.012	0.006	0.010	0.008
$u_{\text{稳定性}}$	0.12%	0.24%	0.39%	0.31%

由表2的数据可知 CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂ 混合气体标准物质在一年内是稳定可靠的。

3.2.2 混合气体组分含量随压力变化的实验

为了检验组分含量随压力的变化情况, 并确定标准混合气的使用压力下限, 分析了 4.0~0.2Mpa CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂ 标准混合气组分含量的变化情况, 其结果列于表3。

4 总不确定度的分析及估算

4.1 原料纯度的不确定度

根据气相色谱法对原料气纯度分析, 乙烷、丙烷、正丁烷为 99.9%, 由杂质引入的标准不确定度应为 5.8×10^{-4} , 由甲烷杂质引入的标准不确定度应为 2.9×10^{-4} , 由高纯氮中杂质

引入的标准不确定度应为 1×10^{-6} ，因此可忽略不计。

表3 稳定性检验数据 (单位: mol/mol)

组分名称	005031			
	CH ₄	C ₂ H ₆	C ₃ H ₈	n-C ₄ H ₁₀
4.0MP a	10.0%	2.57%	2.51%	2.53%
3.0MP a	9.90%	2.56%	2.52%	2.54%
2.0MP a	10.0%	2.58%	2.51%	2.53%
1.0MP a	10.1%	2.57%	2.50%	2.52%
0.8MP a	10.0%	2.58%	2.51%	2.53%
0.6MP a	10.1%	2.57%	2.51%	2.53%
0.4MP a	10.0%	2.56%	2.50%	2.52%
0.2MP a	10.0%	2.57%	2.51%	2.53%
平均值	10.0%	2.57%	2.51%	2.53%
标准偏差	0.06	0.07	0.06	0.07

由表3的结果表明 CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂标准物质组分含量在 4.0~0.2MPa 较稳定。

4.2 均匀性引入的不确定度

从均匀性试验数据可以看出,标准气体在规定时间内加以滚动混合后,其组分完全均匀充分,由其引入的不确定度可忽略不计。

4.3 稳定性引入的不确定度

经一年的稳定性试验,研制的标准气体稳定性良好,对氮中甲烷、乙烷、丙烷和正丁烷混合标准气体最大重复性不超过 0.4%。

4.4 不确定度的合成

标准混合气组分含量不确定度来源于配制、称量过程的不确定度,原料气纯度分析的不确定度,稀释气中*i*组分含量及其测定的不确定度,气瓶处理引入的不确定度,气瓶和砝码浮力修正的不确定度,标准物质稳定性引起的不确定度。不确定度计算公式如下。

称量过程中相对不确定度为:

$$\frac{\Delta X_i}{X_i} \leq \frac{\Delta m_i}{m_i} \cdot (1 - X_i) + \sum \frac{\Delta m_j}{m_j} \cdot X_j$$

式中: m_i 为充入气瓶中*i*组分的质量 (g);

m_j 为充入气瓶中*j*组分的质量 (g);

Δm_i 为*i*组分质量称量的不确定度 (g);

Δm_j 为*j*组分质量称量的不确定度 (g);

标准气体定值的合成标准不确定度为:

$$u_c = \sqrt{u_{\text{称量}}^2 + u_{\text{原料气}}^2 + u_{\text{稀释气}}^2 + u_{\text{稳定性}}^2}$$

标准气体定值的扩展不确定度 (U) 由下式计算得出: $U = k \cdot u_c$ (k=2)

根据上述公式计算出混合气体标准物质的扩展不确定度如表4所示。

表4 CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂定值结果(单位: mol/mol)

序号	瓶号	组分名称	定值结果	总不确定度%
1	005008	CH ₄	10.2%	1.3
		C ₂ H ₆	2.58%	1.8
		C ₃ H ₈	2.52%	1.6
		n-C ₄ H ₁₀	2.56%	1.8
2	005025	CH ₄	10.3%	1.2
		C ₂ H ₆	2.62%	1.7
		C ₃ H ₈	2.59%	1.8
		n-C ₄ H ₁₀	2.57%	1.8
3	005016	CH ₄	10.5%	1.2
		C ₂ H ₆	2.49%	1.9
		C ₃ H ₈	2.50%	1.8
		n-C ₄ H ₁₀	2.54%	1.9

由表4可以看出该混合气体标准物质总不确定度小于2.0%。

5 结论

采用重量法配制的CH₄-C₂H₆-C₃H₈-n-C₄H₁₀/N₂混合气体标准物质,经过性能试验考察,组分含量稳定,混合气体标准物质总不确定度小于2.0%。标准气体使用压力下限为0.2MPa,有效使用期为12个月。

参考文献

- [1] GB5274-85, 气体分析-校准用混合气体的制备-称量法.
- [2] 李春瑛等. 标准气体研制过程中的不确定度估算及其表示方法. 低温与特气, 2000, 18(3):2.
- [3] 金美兰等. 标准气体及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [4] 全浩主编. 标准物质及其应用技术. 北京: 国家标准出版社, 2003

The development of the standard substance from the mixed gas of methane, ethane, propane and normal butane in nitrogen

YUAN Ling

(Tianjin Forth Chemical Reagent Factory, Tianjin 300381)

Abstract: The paper is demonstrated to show the preparation method, homogeneity and stability of the standard substance from the mixed gas of methane, ethane, propane and normal butane in nitrogen. Meanwhile, it also provides the analysis on the changes, valuing result and the indeterminacy estimation of the component concentration after the pressure depletion.

Key Words: methane, ethane, propane, normal butane, standard substance

高纯 CO₂ 中微量气体分析气相色谱仪的改装

张令甲¹, 吕宪禹², 张钰浩³

(1. 山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司, 山东 277500; 2. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071;

3. 华北电力大学 核科学与工程学院, 北京 102206)

1 前言

高纯 CO₂ 中微量 O₂、N₂、CO 及 CH₄ 不能直接用通用气相色谱仪分析, 因有两大致命弱点: 1. O₂、N₂ 要达到 R>1.5 的分离, 需使用分子筛色谱柱, 而分子筛色谱柱对二氧化碳有不可逆吸附, 二氧化碳将让分子筛色谱柱很快失效, 表现为 O₂、N₂ 无法分离; 2. 大量的 CO₂ 可使甲烷转化炉中的镍触媒中毒且 CO₂ 的峰很宽并有很大拖尾, 分析周期达 1 小时。此问题困扰着许多色谱分析工作者。通过对通用气相色谱仪的巧妙改装, 彻底去除了以上两大致命弱点, 且一次进样在 4 分钟内完成全分析。

2 实验

2.1 仪器和试剂

①SP-6890 气相色谱仪 TCD/FID (山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司); ②标气 (山东八三标气厂); ③镍触媒 (上海国药集团)

2.2 仪器改装

采用双阀三柱两检一转化模式 (见图 1)。

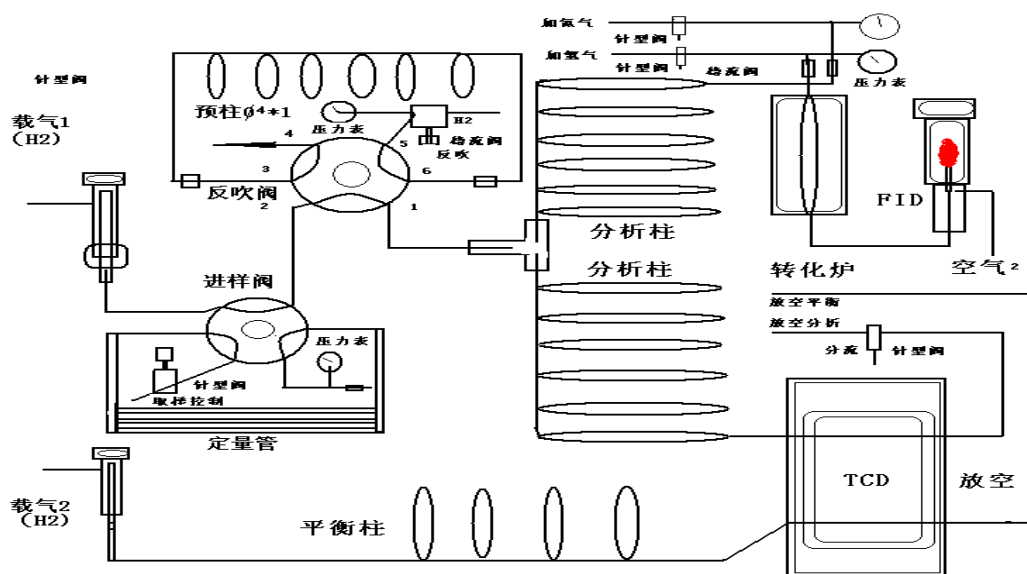


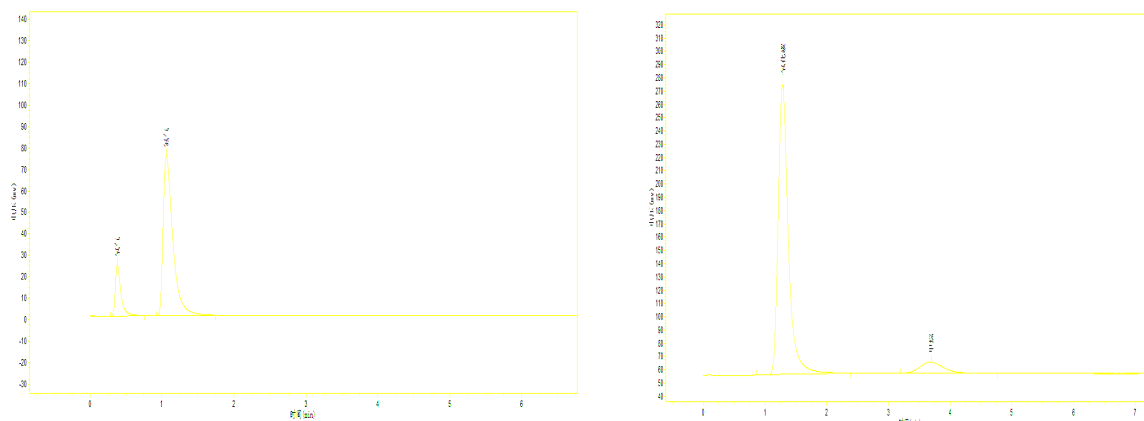
图 1. 高纯 CO₂ 中微量气体分析气相色谱仪改装气路流程图

工作过程: 被分析的混合气体, 通过进样六通阀, 被载气 1 带入预柱 (TDX-01), 等 O₂、N₂、CO 及 CH₄ 离开此柱, 二氧化碳还没有出来时, 切换反吹六通阀, 使预柱处于反吹状态, 将二氧化碳反吹放空; 由预柱出来的 O₂、N₂、CO 及 CH₄ 通过专用三通分流进入两根柱子, 一根是 5A 柱接 TCD 分析 O₂、N₂; 另一根是活性炭柱, 经转化炉接 FID, 分析 CO、CH₄。

3 实验与结果

开动仪器, 给适当色谱条件, 进标气 (CO₂ 作平衡气) 求校正因子; 进生产中的高纯 CO₂,

色谱图见图2。



峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量 Ppm
1	氧气	0.383	23886.838	130650.969	15.0000
2	氮气	1.063	74530.422	697476.188	47.0000
3	一氧化碳	1.298	216101.281	2495764.250	22.980000
4	甲烷	3.698	8256.489	217180.797	2.0000

图2. 高纯CO₂中微量气体分析色谱图

连续进6次的结果见表1。

表1. 进生产中的高纯CO₂, 连续进6次的结果

次数/结果	1	2	3	4	5	6	标准偏差
O ₂ (PPm)	15.00	14.78	15.02	15.24	15.00	14.96	0.15
N ₂ (PPm)	47.00	46.95	47.13	47.26	47.02	46.89	0.13
CO (PPm)	22.98	22.78	23.00	23.15	22.78	22.79	0.15
CH ₄ (PPm)	2.00	1.99	2.01	2.05	1.98	1.97	0.028

目前有12台改装仪器,在全国各地正常运转,第一台已连续正常运转22个月。

4. 讨论

由结果看,改装后的仪器:①效率高:能在4分钟内一次进样完成全分析;②灵敏度高:能检测到1PPm的微量组分;③稳定性高:标准偏差小于0.15;④可靠性好:能长期连续良好运行。

另外,改装后的仪器直接能做各种浓度O₂、N₂、CO、CO₂、CH₄及C₂/C₃烃类和H₂等分析。

参考文献:

- [1] 许国旺 等. 现代实用气相色谱法. 化学工业出版社 2004
- [2] 杨海鹰 等. 气相色谱在石油化工中的应用. 化学工业出版社 2005
- [3] 孙传经 等. 气相色谱分析原理与技术. 化学工业出版社 1985
- [4] 金美兰 赵建南. 标准气体及其应用. 化学工业出版社. 2003
- [5] 中国标准出版社. 仪器仪表常用标准汇编, 分析仪表卷. 2004

Prediction of retention times in multiple-ramp temperature programmed gas chromatography using non-linear plate theory

Huang-fu Xu-dan, Li Xiao-wei, Li Wen-chen

(The School of Material Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

Abstract: An approach based on non-linear plate theory was used to predict retention times of 10 compounds in ten different multiple-ramp temperature programs under constant flow with the non-polar HP-5 column. The non-linear plate theory was described that the distribution coefficient K was not linear partition isotherm. The function of capacity factor $\ln k'$ and temperature T appeared non-linear covering the wide temperature range 30°C to 250°C used in this study, so the equation of $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$ was adopted. The prediction accuracy had shown that the relative errors within $\pm 1\%$ accounted for 38.30%, the relative errors between $\pm 1\%$ - $\pm 2\%$ accounted for 34.04% and the relative errors between $\pm 2\%$ - $\pm 3\%$ accounted for 23.45%.

Key words: Prediction, non-linear plate theory, retention times, temperature programmed

1 Introduction

Chromatography is a robust, consistent technique for separating analytes in complex mixtures, but optimizing the separation of complex samples with a wide range of boiling points can be very time-consuming [1]. In order to circumvent labour intensive trial, the development of good calculation tools is therefore an important task. So the computer-assisted prediction has been addressed by many authors [2-4] and finite element methods by computer simulation for prediction of retention time also have attracted some authors [1, 5-6]. In the prediction of temperature programmed retention time, the notion of differential and integral was described by many authors. Snijders et al. [7] used this method and for most components a good agreement between experimental and predicted data was observed, but for certain components large differences were sometimes observed between experimental and predicted data. Although those methods may yield satisfactory results, some of those methods must rigorously figure out the position of each location to calculate the carrier gas velocity which may make the calculation complicated.

No reports have appeared to predict the multiple-ramp temperature programmed retention time based on non-linear plate theory under constant flow. In this paper, a non-linear plate theory model for the prediction of the retention time is presented.

2 Theory

Martin and Synge put forward the linear plate theory in the year of 1941. The plate theory assumed that [8]: Continuous or packed type of distillation column (in which equilibrium is not established at any point) could be divided up into a number of layers each of which was equivalent to one theoretical plate, and the height of such a layer was called the H.E.T.P. or 'height equivalent to one theoretical plate';

The calculation can be performed with that assumption. The mobile phase jumps between the plates. The whole chromatographic process can be expressed as follows: the solute is put in the zeroth-plate, then jumps into the first plate and achieves distribution balance according to the

distribution coefficient. Then the components go on jumping and re-distributing according to the distribution coefficient. For illustration purpose, we can assume that the capacity factor is $k=1$, the total number of plates is 5 and the total time for jumping is $\gamma=1.5$. One unit of solute $Q=1$ is initially present in the zeroth plate of the column. Table 1 showed this distribution.

Table 1 Distribution of the solute in a column (N=5). $\gamma=1.5$, $k'=1$. Jumping times $n=16$.

Jumping times	r=0	1	2	3	4	Column outlet
n=0	1	0	0	0	0	0
1	0.5	0.5	0	0	0	0
2	0.25	0.5	0.25	0	0	0
3	0.125	0.375	0.375	0.125	0	0
4	0.063	0.25	0.375	0.25	0.063	0
5	0.032	0.157	0.313	0.313	0.157	0.032
6	0.016	0.095	0.235	0.313	0.235	0.079
7	0.008	0.056	0.116	0.275	0.275	0.118
8	0.004	0.032	0.086	0.196	0.275	0.138
9	0.002	0.018	0.059	0.141	0.236	0.138
10	0.001	0.010	0.038	0.100	0.189	0.118
11	0	0.005	0.024	0.069	0.145	0.095
12	0	0.002	0.014	0.046	0.107	0.073
13	0	0.001	0.008	0.030	0.076	0.054
14	0	0	0.004	0.019	0.053	0.038
15	0	0	0.002	0.012	0.036	0.026
16	0	0	0.001	0.007	0.024	0.018

From the table1, we can get that after $n=4$, solute begins to appear at the column outlet and the maximum amount of solute is eluted at a value of n between 8 and 9.

In order to predict the retention time, we should relate the jumping times to the time γ . The retention time equals that the time from the component entering the column to when the elution curves have the maximum value. Although each jump is instantaneous, reaching the balance in the statistical significance will also take time which can be called $\Delta\gamma$ (time interval). This is the linear plate theory. However, temperature programmed retention time can not be predicted based on linear plate theory because the distribution coefficient is not a constant in the programmed temperature.

The non-linear plate theory is that If $\Delta\gamma$ is sufficiently small, the temperature of the whole column and the retention factor k' within each jump can be considered constant. The actual temperature T_i at each jump can be calculated from

$$T_i = T_0 + r \times n_i \times \Delta\gamma \quad (1)$$

Where T_0 is the initial absolute temperature, r is the applied temperature program.

According to the equation,

$$t_R = t_M(1+k') \quad (2)$$

k' can be calculated by the equation

$$k' = t_R / t_M - 1 \quad (3)$$

we fitted the curves $\ln k'$ versus temperature by

$$\ln k' = aT^2 + bT + cT + d^{[9]} \quad (4)$$

Then the the retention times can be predicted.

3 Experimental section

A 30m×0.32mm×0.25μm non-polar HP-5 column was used throughout the study. The temperature of detector and inlet were kept in 250°C and the mass flow was kept in 1ml/min. The constant flow model was used. Pure nitrogen was used as the carrier gas.

An Agilent 6890 gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector, a split injection adjusted to give a split ratio of approximately 50:1. The column oven was operated at two different temperature conditions, six isothermal and ten multiple-ramp temperature-programmed gradients;

Isothermal: 250°C, 200°C, 150°C, 100°C, 50°C, 30°C;

gradient 1, 30°C(held 2 min)+5°C/min to 70°C(held 1 min)+25°C/min to 250°C; gradient 2, 30°C(held 2 min)+10°C/min to 70°C(held 1 min)+25°C/min to 250°C; gradient 3, 30°C(held 2 min)+15°C/min to 70°C(held 1 min)+25°C/min to 250°C; gradient 4, 30°C(held 2 min)+ 25°C/min to 70°C(held 1 min)+10°C/min to 250°C; gradient 5, 30°C(held 2 min)+ 20°C/min to 70°C(held 1 min)+20°C/min to 250°C; gradient 6, 30°C(held 2 min)+20°C/min to 70°C(held 1 min)+25°C/min to 250°C; gradient 7, 30°C(held 2 min)+10°C/min to 70°C(held 1 min)+25°C/min to 250°C; gradient 8, 30°C(held 2 min)+15°C/min to 70°C(held 1 min)+ 5°C/min to 50°C; gradient 9, 30°C(held 2 min)+20°C/min to 70°C(held 1 min)+ 5°C/min to 50°C; gradient 10, 80°C+10°C/min to 50°C;

The process

- I Determination of the hold-up time: the hold-up time was directly measured under the six isothermal temperature conditions with methane
- II The retention times of compounds in the six isothermal temperature conditions were measured and then the retention factors in the six isothermal temperature conditions were calculated according the equation (3).
- III Fitting the curves $\ln k'$ versus temperature for compounds by equation (4)
- IV Calculate the retention times of compounds under the different temperature programmed gradients by computer program using the coefficient a, b, c and d of the fitted curves.
- VI Measure the retention times of compounds under the different multiple-ramp temperature programmed gradients.

4 Results and discussion

The fitting coefficient a, b, c, d and the correlation coefficient were given in the table 2

Table 2 The fitting coefficient a, b, c, d and the correlation coefficient of fitting curves for compounds

compounds	a	b	c	d	R^2
naphthalene	0.000000769386	-0.000944685753	0.358119621330	-40.692039443597	0.999964
o-dichlorobenzene	-0.000000149776	0.000299278166	-0.194828471589	39.434632444268	0.9999998
benzene methano	-0.000000213084	0.000393081951	-0.240295647434	46.624765244874	1.000000
butyric acid	-0.000000754875	0.001048120948	-0.483080116743	74.025377177982	0.999975
heptanoic acid	-0.000000283708	0.000439955830	-0.229232714418	37.672232136677	1.000000
butyl acetate	-0.000000277886	0.000457582513	-0.251725671013	43.839100492750	0.999998
amyl acetate	-0.000000271425	0.000457362052	-0.257202297219	45.936516021033	0.999991

Notably, It can be seen from the table 2, the correlation coefficients of all the compounds were greater than 0.9999. Then the retention times can be predicted by the fitting coefficient using the non-linear plate theory model. The measured, predicted retention times and the relative errors were shown in the tables 3 and 4. The $RE\%$ can be calculated by $RE\% = (t_p - t_R) / t_p \times 100$. t_p is the

measured values and t_R is the predicted values.

Table 3 The measured, calculated retention times and the relative errors RE%.

compounds	gradient 1			gradient 2			gradient 3		
	t_R	t_p	RE%	t_R	t_p	RE%	t_R	t_p	RE%
naphthalene	15.90	15.89	-0.06293	12.00	11.962	-0.31767	10.70	10.6745	-0.23889
anthraquinone	20.18	20.137	-0.21354	16.18	16.1375	-0.26336	14.84	14.804	-0.24318
o-dichlorobenzene	14.58	14.546	-0.23374	10.9	10.869	-0.28521	9.66	9.6345	-0.26467
benzene methano	14.65	14.6545	0.030707	10.93	10.9125	-0.16037	9.68	9.684	0.041305
butyric acid	12.54	12.562	0.175131	9.3	9.3545	0.582607	8.2	8.222	0.267575
heptanoic acid	15.50	15.719	1.393218	11.59	11.748	1.34491	10.25	10.432	1.744632
amyl acetate	11.99	11.893	-0.81561	8.88	9.0075	1.415487	8.05	8.011	-0.48683

Table 4 The measured, calculated retention times and the relative errors RE%.

Compound gradient	ethanol			1,4-dioxane			butyl acetate			iso-amyl acetate		
	t_R	t_p	RE%	t_R	t_p	RE%	t_R	t_p	RE%	t_R	t_p	RE%
gradient 4	3.43	3.339	-2.73	5.53	5.357	-3.23	6.97	6.831	-2.03	7.90	7.764	-1.75
gradient 5	3.46	3.367	-2.76	5.59	5.459	-2.40	6.96	6.825	-1.98	7.69	7.576	-1.50
gradient 6	3.46	3.370	-2.67	5.58	5.451	-2.37	6.87	6.742	-1.90	7.53	7.428	-1.37
gradient 7	3.51	3.445	-1.89	6.16	5.998	-2.70	8.16	7.793	-4.71	9.08	8.921	-1.78
gradient 8	3.48	3.421	-1.72	5.79	5.688	-1.79	8.28	8.125	-1.91	11.96	11.722	-2.03
gradient 9	3.46	3.388	-2.13	5.62	5.536	-1.52	8.20	7.980	-2.76	12.00	11.682	-2.72
gradient 10	2.88	2.884	0.14	3.96	3.894	-1.69						

From the table 3 and 4, it was observed that the relative errors within $\pm 1\%$ accounted for 38.30%, the relative errors between $\pm 1\%$ - $\pm 2\%$ accounted for 34.04% and the relative errors between $\pm 2\%$ - $\pm 3\%$ accounted for 23.45%. In a word, for most experiment a good agreement between experimental and predicted data was observed. In the gradient 8, after about 4.6min, the temperature-program began to cool, but ethanol was eluted out in the 3.48 min which meant that the latter cooling temperature program had no effect on the elute. As for ethanol, 1, 4-dioxane, butyl acetate and iso-amyl acetate were eluted out after 4.6min which meant that the latter cooling temperature program had great effect on the retention times. The effect of the latter cooling temperature program in the gradient 9 was similar to the gradient 8. Gradient 10 was cooling temperature program and the prediction accuracy was also high. Therefore, there was a lag phenomenon which made the predicted value smaller than the actual value.

So we can predict of retention times in temperature-programmed gas chromatography using non-linear plate theory.

References

- [1] Fredrik Aldaeus, Yasar Thewalim, Anders Colmsjo*. J. Chromatogr. A 2009, 1216, 134-139
- [2] E.Dose, J. Anal. Chem. 1987, 59, 2414-2419
- [3] T.I. Al-Bajjari, S. LeVent and D.R. Taylor, J. Chromatogr. A 1994, 683, 367-376
- [4] Vezzani, P. Moretti, M. Mazzi, G. Castello*, J. Chromatogr. A 2004, 1055, 151-158
- [5] K. Kaczmariski, J. Computers. Chem. Eng. 1996, 20, 49-64.
- [6] S.M. Ulmeanu, J. Josserand, H. Jensen, G. Bouchard, P.-A. Carrupt, H.H. Girault, J. Chromatogr. A 2005, 1063, 89-97.
- [7] Henri Snijders, Hans—Gerd Janssen, J. Chromatogr. A 1995, 718, 339-355.
- [8] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge. J. Biochem. 1941, 35, 1358-1368

The hold-up time has no effect on the prediction of retention times in temperature-programmed gas chromatography using plate theory

Huang-fu Xu-dan, Ao Min, Lan Che

(The School of Material Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

Abstract: The effect of hold-up time on the prediction of retention times in temperature programmed gas chromatography using plate theory has been studied in this paper. The result showed that γ (the total jumping time) can be assumed to be an arbitrary value which may be less than the minimum of real retention time. The prediction accuracy of retention times can not depend on the hold-up time.

Key words: Prediction, non-linear plate theory, retention times, the hold-up time

1 Introduction

In the prediction of temperature-programmed retention time, the notion of differential and integral was described by many authors. The column can be divided into a series of small segments according to the time intervals within which the time of mobile phase flowing through each segment is very short, so the separation at each segment can be considered isotherm and the carrier gas velocity and the retention factors are taken as constant. The total retention time under the temperature-programmed condition is equivalent to the sum of the individual time segments corresponding to a migration distance equal to the column length^[1]. Snijders et al.^[2] used this method and for most components a good agreement between experimental and predicted data was observed. However, the hold-up time in each segment must be known. That is to say, it would be necessary to know the pressure of column inlet and outlet and the viscosity of the carrier gas. That involved the complex calculation process which increased the use difficulty of this method. Although there were many methods to obtain the hold-up time^[3-4], the calculation process was very complex. In this paper, we proved and verified that γ (the total jumping time) can be assumed to be an arbitrary value which may be less than minimum of real retention time in this paper.

2 Theory

Martin and Synge put forward the plate theory in the year of 1941. The plate theory assumed that^[5]: Continuous or packed type of distillation column (in which equilibrium is not established at any point) could be divided up into a number of layers each of which was equivalent to one theoretical plate, and the height of such a layer was called the H.E.T.P. or 'height equivalent to one theoretical plate';

The calculation can be performed with that assumption. According to the plate theory, the column could be divided up into a number of layers each of which is equivalent to one theoretical plate. The mobile phase jumps between the plates. The whole chromatographic process can be expressed as follows: the solute is put in the zeroth-plate, then jumps into the first plate and achieves distribution balance according to the distribution coefficient. Then the components go on jumping and re-distributing according to the distribution coefficient.

3 Results and discussing

For illustration purpose, we can assume that the capacity factor is $k' = 1$, the total number of

plates is 5 and the total time for jumping is $\gamma_1=1.5$. One unit of solute $Q=1$ is initially present in the zeroth plate of the column. Table 1 showed this distribution.

Table 1 Distribution of the solute in a column ($N=5$). $\gamma_1=1.5$, $k_1'=1$. Jumping times $n=16$.

Jumping times	r=0	1	2	3	4	Column outlet
n=0	1	0	0	0	0	0
1	0.5	0.5	0	0	0	0
2	0.25	0.5	0.25	0	0	0
3	0.125	0.375	0.375	0.125	0	0
4	0.063	0.25	0.375	0.25	0.063	0
5	0.032	0.157	0.313	0.313	0.157	0.032
6	0.016	0.095	0.235	0.313	0.235	0.079
7	0.008	0.056	0.116	0.275	0.275	0.118
8	0.004	0.032	0.086	0.196	0.275	0.138
9	0.002	0.018	0.059	0.141	0.236	0.138
10	0.001	0.010	0.038	0.100	0.189	0.118
11	0	0.005	0.024	0.069	0.145	0.095
12	0	0.002	0.014	0.046	0.107	0.073
13	0	0.001	0.008	0.030	0.076	0.054
14	0	0	0.004	0.019	0.053	0.038
15	0	0	0.002	0.012	0.036	0.026
16	0	0	0.001	0.007	0.024	0.018

From the table 1, we can get that after $n=4$, solute begins to appear at the column outlet and the maximum amount of solute is eluted at a value of n between 8 and 9. A plot of mass of solute leaving the column vs n is shown in Figure 1.

The retention time equals that the time from the component entering the column to when the elution curves have the maximum value. Although each jump is instantaneous, reaching the balance in the statistical significance will also take time which can be called $\Delta\gamma$ (time interval). Assuming the total jumping times is n , then $\Delta\gamma=\gamma/n$. Where γ can be assumed to be an arbitrary value and the value of γ can not affect the prediction of retention time. This can be proved as following: according to the plate theory, we can get

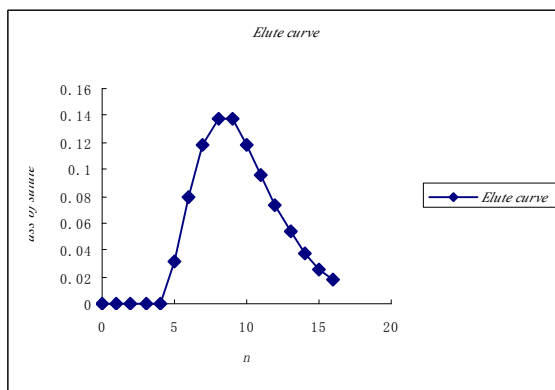


Figure 1 Elution curve for one unit of solute from five-plate column. $\gamma_1=1.5$, $k_1'=1$. Jumping times $n=16$.

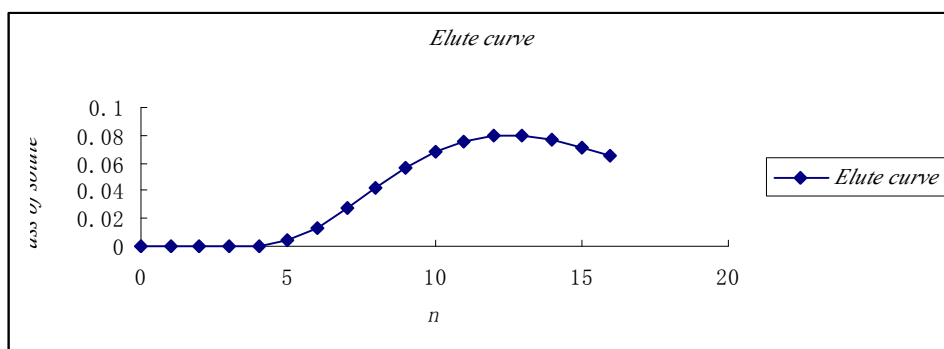
$$t_R=t_m(I+k') \tag{1}$$

If we make,
$$t_m(I+k')=\gamma(I+\delta) \text{ and } \delta=(t_R-\gamma)/\gamma \tag{2}$$

Compared (1) and (2), we can get $t_R=t_R$ when γ is an arbitrary value. This also can be proved by the figure 3 and 4. In order to compare figure1, we can assume that the capacity factor is $k_2=2$, the total number of plates is 5 and the total time for jumping is $\gamma_2=1$. One unit of solute $Q=1$ is initially present in the zeroth plate of the column. A plot of mass of solute leaving the column vs n is shown in Figure 2.

Table 2 Distribution of the solute in a column (N=5). $\gamma_2=1$, $k_2'=2$. Jumping times $n=16$.

Jumping times n	Column outlet
n=0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0.0041152
6	0.013717
7	0.027435
8	0.042676
9	0.056902
10	0.068282
11	0.075869
12	0.079482
13	0.079482
14	0.076538
15	0.071436
16	0.064942

Figure 2 Elution curve for one unit of solute from five-plate column. $\gamma_2=1$, $k_2'=2$. Jumping times $n=16$.

The jumping times corresponding to the peak of the elute curve is different in the figure 1 and 2, but we can respectively calculate the retention times. For $\gamma_1=1.5$, $\delta_1=1$, jumping times $n=16$ and the jumping times corresponding to the peak of the elute curve is $n=8$, so $t_{R1}=\delta \Delta \gamma_1=8 \cdot 1.5/16=0.75$. For $\gamma_2=1$, $\delta_2=2$, jumping times $n=16$ and the jumping times corresponding to the peak of the elute curve is $n=12$, so $t_{R2}=12 \Delta \gamma_2=12 \cdot 1/16=0.75$. From the above calculation, we can get that γ can not affect the prediction accuracy of retention times.

References

- [1] G. Castello*, P. Moretti, S. Vezzani, J.Chromatogr. A2009, 1216, 1607–1623
- [2] Henri Snijders, Hans—Gerd Janssen, J. Chromatogr. A 1995, 718, 339-355
- [3] Rosa Lebrón-Aguilar, Jesús Eduardo Quintanilla-López, José Antonio García-Domínguez, Hold-up time in gas chromatography I. New approach to its estimation, Journal of Chromatography A, 1997, 760(2): 219~226
- [4] Jesús Eduardo Quintanilla-López, Rosa Lebrón-Aguilar, José Antonio García-Domínguez, The hold-up time in gas chromatography II. Validation of the estimation based on the concept of zero carbon atoms alkane, Journal of Chromatography A, 1997, 767(1-2): 127~136
- [5] A.J.P.Martin,R.L.M.Synge.J.Biochem. 1941, 35,1358-1368

The effect of temperature on the entropy and enthalpy in the prediction of temperature programmed retention times

Huang-fu Xu-dan, Li Deng-ke

(The School of Material science and engineering, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

Abstract: Several equation of $\ln k'$ and T were studied in this paper. The equation of $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$ was best to show the effect of temperature on the entropy and enthalpy in the prediction of temperature- programmed retention times. The prediction can be performed covering the wide temperature range with that equation.

Key words: Fitting, Retention times, Temperature- programmed

1 Introduction

Chromatography is a robust, consistent technique for separating analytes in complex mixtures, but optimizing the separation of complex samples with a wide range of boiling points can be very time-consuming [1]. Grant and Hollis [2] suggested a method for the prediction of linear temperature programmed retention time on non-polar column. They made the assumption that temperature had no effect on the entropy and enthalpy. However this assumption can only come into existence in the relatively narrow temperature ranges. If there was a broad temperature range, the errors may become larger. The equation about relationship of retention factor and the temperature is well known, that is $\ln k' = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} - \ln \beta$. Considering the effect of temperature on the entropy

and enthalpy, a lot of mathematical models has been improved on this point such as $\ln k' = aT + b + c/T$ [3-4], $\ln k' = a/T^2 + b/T + c$ [5]. However, we found that if the curves of $\ln k'$ versus T were fitted by $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$, the correlation coefficient of fitting curves were very near 1.

2 Experimental section

A 30m×0.32mm×0.25μm non-polar HP-5 column was used throughout the study. Pure nitrogen was used as the carrier gas. An Agilent 6890 gas chromatograph, equipped with a flame ionization detector, a split injection adjusted to give a split ratio of approximately 50:1. Six isothermal condition: 250°C, 200°C, 150°C, 100°C, 50°C, 30°C, Two parallel trials were required for each test and the relative error of the values from the two parallel trials was less than 3%. Compounds: naphthalene, anthraquinone, o-dichlorobenzene, benzene methanol, butyric acid, heptanoic acid, butyl acetate, iso-amyl acetate, 1,4-dioxane, ethanol.

The process: I. Determination of the hold-up time: the hold-up time was directly measured under the six isothermal temperature conditions with methane.

II. The retention times of compounds in the six isothermal temperature conditions were measured and then the retention factors in the six isothermal temperature conditions were calculated according the equation

$$k' = t_R / t_M - 1 \quad (1)$$

III. Fitting the curves $\ln k'$ versus temperature for compounds by equation

$$\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d \quad (2)$$

3 Results and discussion

Table 1 showed the measured hold-up time under isothermal conditions.

Table1 The measured hold-up time under isothermal conditions

Temperature/K	523.15	473.15	423.15	373.15	323.15	303.15
Measured value/min	1.85185	2.00000	2.17391	2.38095	2.63158	2.77778

Then the retention time under the isothermal conditions can be measured. The retention factor under the six isothermal temperature conditions can be calculated according the equation (1) and the curves $\ln k' - T$ for compounds were fitted by equation (2). Figure 1 showed the fitting curves of compounds with different functional groups.

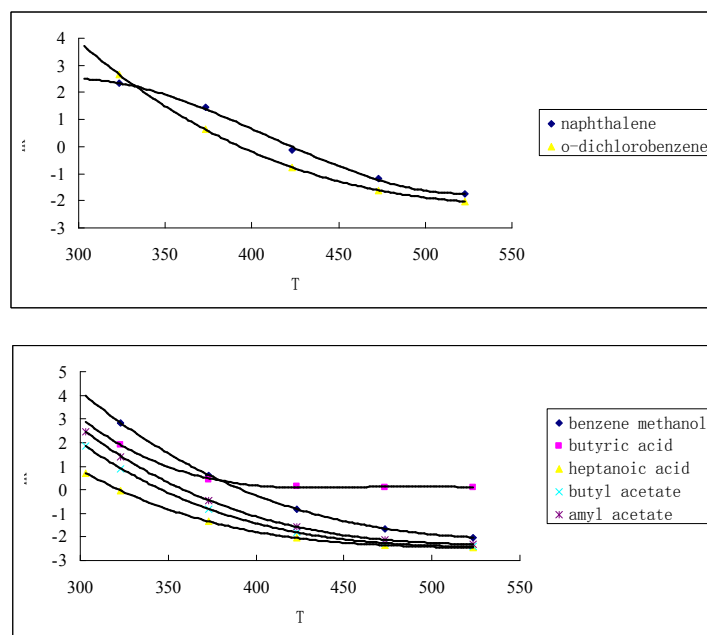


Fig.1. Fitting curves of $\ln k'$ versus temperature for the compounds with different functional groups.(A) is for aromatic compounds;(B) is for alcohol, acid and ester compounds.

Obviously, it can be seen from the figure 1, the data points were scattered in both sides of the curves. That implied the relationship of $\ln k'$ and T described by equation (2) was fairly accurate. The fitting coefficient a, b, c, d and the correlation coefficient were also given in the table 2.

Table 2 The fitting coefficient a, b, c, d and the correlation coefficient of fitting curves for compounds

compounds	a	b	c	d	R^2
naphthalene	0.000000769386	-0.000944685753	0.358119621330	-40.692039443597	0.999964
o-dichlorobenzene	-0.000000149776	0.000299278166	-0.194828471589	39.434632444268	0.999998
benzene methano	-0.000000213084	0.000393081951	-0.240295647434	46.624765244874	1.000000
butyric acid	-0.000000754875	0.001048120948	-0.483080116743	74.025377177982	0.999975
heptanoic acid	-0.000000283708	0.000439955830	-0.229232714418	37.672232136677	1.000000
butyl acetate	-0.000000277886	0.000457582513	-0.251725671013	43.839100492750	0.999998
amyl acetate	-0.000000271425	0.000457362052	-0.257202297219	45.936516021033	0.999991

Notably, it can be seen from the table 2, the correlation coefficients of all the compounds were greater than 0.9999. So the equation of $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$ is best to show the effect of temperature on the entropy and enthalpy in the prediction of temperature-programmed retention times. So the prediction can be performed covering the wide temperature range with the equation of $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$.

References (leaved out)

Using Plate Theory for the prediction of retention times in programmed temperature analyses

ZHANG Lan-lan, Li Deng-ke,

(The School of Material Science and Engineering of Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A novel approach is described to predict retention times of the compounds during the temperature programmed capillary gas chromatography with plate theory. In this study, the used model permits the prediction of the retention times of twenty different types of compounds analyzed with three different TP runs carried out on the HP-5 column. It is shown that the temperature programmed data can be successfully predicted using several preliminary runs carried out in six isothermal conditions 30, 50, 100, 150, 200, 250°C, the differences between the predicted and measured retention times were typically less than 1%.

Key words: retention time; plate theory; prediction

1 Introduction

To select the best analytical conditions for an efficient and rapid separation^[1], many works make use of the structural parameters of solutes to predict the relevant retention behaviors in temperature programmed gas chromatography currently^[2], although these procedures for the identification of a certain kind of chemical substances are useful, in practical it limits their use for complex samples or for samples with a wide range of boiling points. The finite element method has been used to predict the retention times of complex compounds during gas chromatography^[3]. But due to the requirement of relatively sophisticated and time-consuming mathematical analyses, the procedure is still of limited practical use, especially for routine analysis. Other prediction methods have been published^[4]. In all of them the carrier gas hold-up time t_M , is necessary in order to calculate the values of the retention time t_R , which is obtained through the direct measurement or the calculation of the average carrier gas velocity. When the overall programmed run includes tracts with different temperature gradient or an initial and final isothermal tract, they should accurately calculate the dead time to complete the calculation, however, the modified plate theory does not require the accurate determination of dead time, the detailed discussion will be mentioned in the another paper.

Compared with other theories and methods, the plate theory is visual image, In order to prove the correctness of our conclusions, this paper selected 20 different types of compounds analyzed with three kinds of non-linear models in isothermal conditions and three different TP runs carried out on the HP-5 column for the prediction of retention times.

2 Theory

The basic assumption of plate theory is thoroughly described in the literature [5]. Which can give the definite mathematical model and calculate the concentration of solute in each plate of the column at any time in temperature programmed conditions, shown in the table 1.

3 Experimental Section

3.1 Materials

The analyses were carried out on a capillary column: a non-polar HP-5 filled with Cross linked 5% PH ME Siloxane. The length of the column was 30m and the phase thickness 0.25 μ m, the nominal internal diameter of the column was 0.32 mm, which was obtained from Agilent Technologies. In both the calculated and empirical experiments the chromatograms obtained

Table 1. The specific distribution process of non-linear plate theory on HP-5 column in programmed temperature, initial temperature is 303.15K, samples used for the ethanol, assuming theoretical plate numbers are 5, and jump 5 times, the capacity factor of ethanol is 0.2974390 in 303.15K, the dead time in 303.15K is 2.778, so $\tau=0.5556$

Jump number \ theoretical plate		Assumed n=5 m=5				
		0	1	2	3	4
Jump number=0	solid	0	0	0	0	0
Total time=0	mobile	1	0	0	0	0
T=303.15K	solid	0.162481	0	0	0	0
k'=0.1940029	mobile	0.837519	0	0	0	0
Jump number=1	solid	0.162481	0	0	0	0
total time=0.3301	mobile	0	0.837519	0	0	0
T=304.8005K	solid	0.025634	0.132134	0	0	0
k'=0.1873211	mobile	0.136847	0.705385	0	0	0
Jump number=2	solid	0.025634	0.132134	0	0	0
total time=0.6604	mobile	0	0.136847	0.705385	0	0
T=306.452K	solid	0.003928	0.041213	0.108077	0	0
k'=0.1809405	mobile	0.021706	0.227768	0.597308	0	0
Jump number=3	solid	0.003928	0.041213	0.108077	0	0
total time=0.9909	mobile	0	0.021706	0.227768	0.597308	0
T=308.105K	solid	0.000585	0.009364	0.049981	0.088893	0
k'=0.1748437	mobile	0.003343	0.053555	0.285864	0.508415	0
Jump number=4	solid	0.000585	0.009364	0.049981	0.088893	0
total time=1.3217	mobile	0	0.003343	0.053555	0.285864	0.508415
T=309.759K	solid	0.0000846	0.001837	0.014969	0.054183	0.073507
k'=0.1690180	mobile	0.0005004	0.01087	0.088567	0.320574	0.434908

resulted from twenty kinds of different polar functional groups of solutes. Main categories are aldehydes, alcohols, and acids, including acetaldehyde, formaldehyde, ethanol, methanol, isoamyl alcohol, benzyl alcohol, dimethyl carbonate, ethyl acetate, isoamyl acetate, methyl benzoate, n-butyric acid, heptylic acid, n-heptane, dichloromethane, hexachloro-1,3-butadiene, mtbe, benzene, 1,4 dioxane, o-dichlorobenzene, naphthalene, anthraquinone.

3.2 Instrumentation

Gas chromatographic measurements were made with an Agilent Technologies HP 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), employing chemical station software (Rev. A.04.02) for data acquisition. Nitrogen was used as the carrier gas with a constant mass flow rate corresponding to a velocity of 1ml/min. Sample volumes of about 0.2 μ l were introduced by split injection (split ratio 1:50). The injection and detector temperature were 250°C. Retention times were measured in a linear temperature program starting at 30 °C and terminated at 250°C with different program rates as indicated in the text. The column temperature controlled by the gas chromatograph's software with an approximation of $\pm 1^\circ\text{C}$.

3.3 Calculations

3.3.1 establishing mathematical model

Fristly measured the retention times of twenty kinds of different polar functional groups of compounds in six different temperatures 30°C, 50°C, 100°C, 150°C, 200°C, 250°C respectively, according to the average linear velocity of carrier gas in above-mentioned temperature calculate

the corresponding hold up times t_M , and fitting the datas of void times with temperatures, then make use of the formula $t_R = t_M(1 + k')$, obtained the capacity factors in the above temperatures on non-polar HP-5 column, using natural logarithm of capacity factor plotted as a function of the temperature, comparing with diverse step linear fittings.

3.3.2 predict retention time

Many analyses were carried out at three temperature programmed at constant flow, and the specific conditions are described in table 2. The datas are shown in Table 3.

Table 2 Detailed programmed temperature

	ramp temp 1	ramp temp 2	ramp temp 3
initial temp, °C	30	30	30
initial time, min	0	0	0
rate, °C/min	5	15	25
final temp, °C	250	250	250

4 Results and Discussion

Table 3 The average experimental retention time, $t_{Rexp}(\text{min})$; obtained in three temperature programmed at constant flow(1ml/min) on HP-5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm layer thickness). The relative percent error between experimental and calculated retention time $E_N\% = 100 \times (t_{Rexp} - t_{Rcal}) / t_{Rcal}$ is also shown in the table 3.

Compound	5°C/min			15°C/min			25°C/min		
	t_{Rexp}	t_{Rcal}	$E_N(\%)$	t_{Rexp}	t_{Rcal}	$E_N(\%)$	t_{Rexp}	t_{Rcal}	$E_N(\%)$
hexachloro-1,3-butadiene	3.23	3.243	0.40	3.04	3.072	1.04	2.91	2.954	1.49
acetaldehyde	3.35	3.382	0.95	3.14	3.153	0.41	3.00	3.012	0.40
methyltertiarybutylether	4.00	3.985	-0.38	3.48	3.482	0.06	3.20	3.226	0.81
methanol	3.19	3.225	-1.09	3.00	3.049	1.61	2.87	3.937	2.28
formaldehyde	3.20	3.210	0.31	3.02	3.050	0.98	2.90	2.942	1.43
ethanol	3.40	3.416	0.47	3.12	3.172	1.64	2.97	3.022	1.72
benzene	5.17	5.147	-0.45	4.06	4.069	0.22	3.57	3.601	0.86
dimethyl carbonate	4.61	4.590	-0.44	3.79	3.789	-0.03	3.39	3.420	0.88
normal heptane	5.86	5.808	-0.90	4.37	4.356	-0.32	3.76	3.790	0.79
1,4 dioxane	6.02	5.982	-0.64	4.44	4.438	-0.05	3.80	3.833	0.86
butyl acetate	8.60	8.512	-1.03	5.41	5.400	-0.19	4.38	4.396	0.36
isoamyl alcohol	6.77	6.774	0.06	4.71	4.722	0.25	3.96	4.017	1.42
isoamyl acetate	10.33	10.284	-0.45	6.03	6.026	-0.07	4.76	4.770	0.21
butyrate	11.00	11.007	0.06	6.09	6.147	0.93	4.74	4.891	3.09
o-dichlorobenzene	15.2	15.153	-0.31	7.85	7.820	-0.38	5.88	5.871	-0.15
methyl benzoate	17.06	16.971	-0.52	8.43	8.415	-0.18	6.20	6.213	0.21
benzyl alcohol	15.42	15.383	-0.24	7.86	7.858	-0.03	5.87	5.887	0.29
naphthalene	19.35	19.272	-0.40	9.28	9.233	-0.51	6.74	6.712	-0.42
heptylic acid	18.41	18.476	0.36	8.68	8.817	1.55	6.30	6.375	1.18
anthraquinone	37.28	37.194	-0.23	15.44	15.391	-0.32	10.78	10.743	-0.34

(下转第 188 页)

塔板理论预测恒流模式下变化柱长毛细管 色谱程序升温保留时间

张兰兰¹, 敖敏¹, 张仲荣²

(1.天津大学材料科学与工程学院 300072; 2.中国汽车技术研究中心 300162)

塔板理论是色谱热力学理论的重要部分, 本文使用数学方法完成了塔板理论建模过程, 在此基础上运用计算机实现了对柱长发生变化的色谱柱在程序升温条件下进行保留时间的预测。

早期的保留时间预测^[1]的研究都是在同一操作条件下使用同样柱长的色谱柱, 通过恒温数据对程序升温保留时间进行预测(这里的同一操作条件是指温度、压力、流量以及色谱工作站中默认的其他参数条件)。随着色谱柱的使用致使柱机械损坏, 以及在实验操作中不同型号色谱柱间的更换不当导致的柱子折断, 柱长发生了明显的变化, 即使在同样的操作条件下色谱保留时间较早期的测定值也发生了很大的变化, 为了实现精确的分析, Nestor Etxebarria^[2-3]提出了保留时间锁定的方法, 这种方法在一定程度上缓解了分析工作者的困扰, 但是使色谱分析局限于少数公司的柱子的使用。本论文以塔板理论为基础提出了在恒流操作模式下利用折断前的数据在程序升温条件下预测现有柱长保留时间的新方法。

1 理论部分

1.1 理论

根据塔板理论, 气-液色谱过程可看成是组份在固定液里的溶解平衡, 即被分离的组份需在这两相间进行反复多次的分配, 并最终随流动相流出。而保留时间就基于这一相互作用(有机化合物与色谱柱固定相之间反复的相互作用)过程提出的。随着溶质在色谱柱内迁移, 各块塔板上的溶质在固定相的量和流动相的量也是随时变化的, 当组份最高浓度流出色谱柱时, 在色谱图上显示为色谱峰的最高值, 此时对应的时间即为此组份的保留时间, 由此可知保留时间是由色谱过程中的热力学因素所决定, 即在一定的色谱操作条件下, 保留时间由物质在色谱中的分配系数决定^[4-5]。

物质在色谱中的分配系数, 也叫平衡常数, 是指在一定温度、压力下, 气-液相间达到分配平衡时, 组份分配在气相中的平均浓度与其分配(溶解)在液相中的平均浓度之比值, 即 $K=C_L / C_M$ 。式中 C_L 为组份在固定液里的浓度, C_M 为组份在载气中的浓度。它是由组份及固定液热力学性质决定的, 只随柱温、柱压、固定相组成、流动相组成、待测组份性质变化, 与柱中气相、液相体积无关。但由于 K 为热力学平衡常数, 由热力学性质可知, 压力对 K 的影响很小, 可忽略不计。因此在相同程序温度下, 对于同一待测组份分别在柱长发生变化的同一根色谱柱中分配系数的关系: 柱长发生变化前后, 两柱中固定相组成、流动相组成、待测组份性质都可看作常数, 而在相同程序温度下的操作, 所以对于相同程序温度下, 色谱柱不同柱长的分配系数 K 是相同的。

因此, 从理论上讲色谱柱长短的变化, 色谱操作条件(如流速、柱压)的变化对热力学的影响是比较小的, 在许多情况下可以忽略它们的影响, 早期获得的恒温数据与变化了的色谱柱或操作条件下获得的恒温数据并不应该存在本质上的区别, 它们都只能是色谱与组分之间的热力学性质的反映。

由于色谱的分配系数 K 与容量因子 k 存在如下关系:

$$K = \beta \times k' \quad (1-1)$$

式中 β 为相比,是柱型及其结构的重要特征。对于同一根色谱柱,其柱型及其结构是定值,与柱子长短无关,因此相比 β 可以看作常数,这样由上式可知,分配系数 K 正比于容量因子 k' 。

又知色谱中容量因子与保留时间 t_R 的关系式:

$$k' = t_R / t_m - 1 \quad (1-2)$$

则:

$$K = \beta \times k' = \beta \times (t_R / t_m - 1) \quad (1-3)$$

由上述分析知,对于变化了的色谱柱在任意操作条件下的 K 是不变的,说明 K 与 t_m 存在一定的对应关系,此时的死时间 t_m 已不在是色谱意义上的死时间,它是保证在流量、流速、压力变时能找到与 K 对应的数学量 I ,即

$$K = \beta \times (t_R / I - 1) \quad (1-4)$$

如果能找到 K 与 I 的对应关系,不仅可以再次验证保留时间是色谱与组分之间的热力学性质的反映,而且能够为使用早期的恒温数据对现行的色谱保留时间进行预测提供理论依据。

1.2 数学模型的建立

由 K 与 I 的对应关系可知,能够使用早期的恒温数据对现在的色谱保留时间进行预测。首先需要确定容量因子与温度间的数学模型,根据早期分配系数 K ,能找到与之对应的数值 I ,由于同一根色谱柱其相比可视为常数,即能找到早期的容量因子与死时间的对应关系,则容量因子与温度间的数学模型可以沿用。即可选用恒流操作模式下王静^[3]选择的容量因子与温度间的数学模型 $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$ 及预测程序。

2 实验部分

2.1 实验样品

从芳香烃、卤代烃、烯烃、烷烃、醚、醛、酸、酮、酯和醇类具有不同官能团的有机化合物中分别选取苯,苯甲醇,邻二氯苯,1,3丁二烯,正庚烷,1,4二氧六环,乙醛,甲醛,乙醇,甲醇,正丁醇,正庚酸,乙酸异戊酯,异戊醇,萘,碳酸二甲酯,乙酸丁酯18种样品。(注:室温下,萘与蒽醌均为固体,将萘溶于无水乙醇中,蒽醌溶于二氯甲烷溶剂中配制成均匀溶液。)

2.2 实验仪器

HP6890 气相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)

进样器:分流进样方式,分流比1:50,温度250℃

检测器:FID检测器,温度250℃

色谱柱:HP-5 (Crosslinked 5%PH ME Siloxane,30m×0.32mm×0.25μm)

HP-5 (Crosslinked 5%PH ME Siloxane,22m×0.32mm×0.25μm)

恒流操作模式:载气在柱出口处,质量流量保持恒定,流量为1ml/min

2.3 不同柱长单阶程序升温条件下保留时间的预测

实验条件:在不同长度HP-5柱上,测定18种样品在单阶程序升温条件下的保留时间,温度条件设定如下:

初始温度为30℃,分别以5℃/min,15℃/min,25℃/min的升温速率升至250℃;

为保证所测定的保留时间的准确性,各样品在每一温度条件下进行两次平行实验,且两次平行实验的相对误差不超过1%。每次进样量均为0.2μl。

预测时间误差分析:18种样品在不同柱长的弱极性HP-5柱上,三种单阶程序升温条件下保留时间的计算值与实测值的比较如表2-1、表2-2所示。其中 t_R 为两次平行实验所测得的保留时间的平均值, t_p 为保留时间的预测值。RE%为预测值与实测值之间的相对误差,表征预

测的准确度为(2-1)式: $RE\% = \frac{t_P - t_R}{t_R} \times 100\%$ (2-1)

表 2-1 HP-5 色谱柱(30m)单阶程序升温保留时间预测值与实测值比较

样品	5°C/min			15°C/min			25°C/min		
	t _p	t _r	RE%	t _p	t _r	RE%	t _p	t _r	RE%
苯	5.17	5.147	0.45	3.04	3.072	-1.04	2.91	2.954	-1.49
苯甲醇	15.42	15.383	0.24	7.86	7.858	0.25	5.87	5.887	-0.28
蒎醌	37.28	37.194	0.23	15.44	0.32	15.44	10.78	10.743	0.34
邻二氯苯	15.2	15.153	0.31	7.85	7.820	-0.38	5.88	5.871	0.15
1, 3 丁二烯	3.23	3.243	0.40	3.04	3.072	1.04	2.91	2.954	-1.49
正庚烷	5.86	5.808	0.90	4.37	4.356	0.32	3.76	3.790	-0.78
1, 4 二氧六环	6.02	5.982	0.64	4.44	4.438	0.05	3.80	3.833	-0.86
乙醛	3.35	3.382	-0.95	3.14	3.153	-0.41	3.00	3.012	-0.40
甲醛	3.20	3.210	-0.31	3.02	3.050	-0.98	2.90	2.942	-1.43
无水乙醇	3.40	3.416	-0.47	3.12	3.172	-1.64	2.97	3.022	-1.72
甲醇	3.20	3.210	0.31	3.02	3.050	0.98	2.90	2.942	1.43
正丁酸	11.00	11.01	-0.06	6.09	6.147	-0.93	4.74	4.891	-3.09
正庚酸	18.41	18.48	-0.38	8.68	8.817	-1.56	6.30	6.375	-1.18
乙酸异戊酯	10.33	10.28	0.45	6.03	6.026	0.07	4.76	4.770	-0.21
异戊醇	6.77	6.774	-0.06	4.71	4.722	-0.25	3.96	4.017	-1.42
萘	18.41	18.48	-0.38	8.68	8.817	-1.55	6.30	6.375	-1.18
碳酸二甲酯	4.61	4.590	0.44	3.79	3.789	0.03	3.39	3.420	-0.09
乙酸丁酯	8.60	8.512	1.03	5.41	5.400	0.19	4.38	4.396	0.36

表 2-2 HP-5 色谱柱(22m)单阶程序升温保留时间预测值与实测值比较

样品	5°C/min			15°C/min			25°C/min		
	t _p	t _r	RE%	t _p	t _r	RE%	t _p	t _r	RE%
苯	3.46	3.533	-1.99	2.82	2.853	-1.08	2.50	2.521	-1.01
苯甲醇	12.86	13.169	-2.36	6.49	6.662	-2.51	4.77	4.909	-2.81
蒎醌	34.27	33.679	1.77	13.94	13.656	2.11	9.34	9.111	2.47
邻二氯苯	12.55	12.85	-2.32	6.46	6.545	-1.29	4.77	4.822	-1.10
1, 3 丁二烯	2.03	1.985	2.14	1.95	1.912	1.79	1.88	1.856	1.37
正庚烷	4.01	4.003	0.12	3.10	3.051	1.56	2.68	2.653	0.95
1, 4 二氧六环	4.15	4.214	-1.43	3.17	3.175	-0.27	2.72	2.728	-0.29
乙醛	2.11	2.086	1.16	2.02	1.991	1.25	1.94	1.917	1.41
甲醛	2.01	2.036	-1.41	1.93	1.958	-1.36	1.87	1.898	-1.45
无水乙醇	2.15	2.212	-2.88	2.03	2.068	-1.85	1.94	1.978	-1.86
甲醇	2.01	2.007	0.12	1.92	1.925	-0.09	1.86	1.861	-0.18
正丁酸	8.83	8.72	1.31	4.86	4.74	2.53	3.71	3.754	-1.24
正庚酸	16.01	16.662	-3.88	7.40	7.563	-2.12	5.26	5.417	-2.85
乙酸异戊酯	8.01	7.921	1.10	4.72	4.624	2.09	3.68	3.613	1.85
异戊醇	4.79	4.677	2.42	3.44	3.556	-3.36	2.88	2.981	-3.27
萘	16.61	16.385	1.37	7.87	7.751	1.58	5.63	5.534	1.68
碳酸二甲酯	3.03	3.060	-0.88	2.58	2.633	-1.99	2.33	2.378	-2.00
乙酸丁酯	6.40	6.366	0.57	4.11	4.049	1.42	3.30	3.255	1.43

3 结论

本文以塔板理论为基础,利用色谱保留值模型,对柱长改变的毛细管色谱柱气相色谱在程序升温操作条件下的保留时间进行了预测,实验说明在恒流操作模式下,完全可以用王静选择的数学模型 $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$ 。并且两表中实测数据比较,在保留时间减少近40%的情况下,用折断前的恒温数据对柱长改变了的弱极性 HP-5 柱上在单阶程序升温条件下对具有不同官能团的18种样品的保留时间的预测进行研究,由预测值与实测值的比较,误差 $\leq \pm 3\%$ 有 94.44%,误差大于 $\pm 3\%$ 的仅占 5.56%。以上的误差分析说明,在不同柱长同一单阶程序升温条件下,我们采用早期的恒温数据预测早期柱长以及柱长发生变化后的保留时间这一想法是可行的,而且这种方法在预测保留时间时具有相当高的精度。

除此之外此方法还解决了长期以来色谱柱在使用过程中不断折断,而造成的须舍弃以前的恒温数据重新测量新恒温数据进行程序升温保留时间预测的困扰,从而节省了大量的人力、物力和财力。

参考文献:

- [1] 王静,塔板理论对毛细管色谱程序升温保留时间预测的研究,硕士学位论文,天津大学,2003.
- [2] Leonid M.Blumberg; Matthew S.Klee. *J. Anal.Chem.* **1998**, *70*, 3828-3839.
- [3] NestorEtxebarria; OlatzZuloaga; MaitaneOlivares. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 1624-1629.
- [4] 孙传经,气相色谱分析原理与技术,北京:化学工业出版社,1979,2~14.
- [5] 洪厚胜,袁慕康,张庆文等,色谱保留值预测模型的研究进展,分析科学学报,2006,vol.22(No.6): 726~728.

(上接第184页)

The proposed method of retention time prediction in programmed temperature could be used as a new cheap, precise and time saving prediction method (as compared to the present methods). Presented results confirm the application of nonlinear plate theory as a basic chromatographic distribution theory to predict the retention time in programmed temperature. This method is characterized by high accuracy and wide temperature range of predictive ability, suitable for most organic compound types.

References

- [1] P. Moretti; S. Vezzani; E. Garrone; G. Castello. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1038*, 171-181.
- [2] H.W. Habgood; W.E. Harris. *J. Anal. Chem.* 1960, *32*, 450.
- [3] Fredrik Aldaeus; Yasar Thewalim; Anders Colmsjö. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 134-136.
- [4] W.E. Harris and H.W. Habgood, Programmed Temperature Gas Chromatography, Wiley, New York, 1966.
- [5] A. J. P. Matin; R.L.M. Synge. *J. Biochem.* 1941, *151*, 1359-1363.

塔板理论对毛细管色谱程序温度流量模式下保留时间预测的研究

张兰兰¹, 李笑玮¹, 颜昊¹, 孙志豪¹, 王伟²

(1.天津大学材料科学与工程学院 300072; 2.王朝葡萄酒酿造有限公司 300402)

塔板理论是色谱热力学理论的重要部分,本文使用数学方法完成了在程序温度流量模式下塔板理论的建模过程,在此基础上运用计算机实现了色谱柱在程序温度流量条件下进行保留时间的预测。

目前预测保留时间的研究主要集中在恒流与恒压模式下程序升温条件下的保留时间预测,为了实现精确的分析,人们也开发了在程序流量下保留时间的预测,但是由于其方法比较复杂不易在实际中应用,因此发展比较缓慢。本论文以塔板理论为基础提出了在程序温度流量操作模式下保留时间预测简单易行的新方法。

1 理论部分

1.1 理论

根据塔板理论,气-液色谱过程可看成是组份在固定液里的溶解平衡,即被分离的组份需在这两相间进行反复多次的分配,并最终随流动相流出。而保留时间就基于这一相互作用(有机化合物与色谱柱固定相之间反复的相互作用)过程提出的。随着溶质在色谱柱内迁移,各块塔板上的溶质在固定相的量和流动相的量也是随时变化的,当组份最高浓度流出色谱柱时,在色谱图上显示为色谱峰的最高值,此时对应的时间即为此组份的保留时间,由此可知保留时间是由色谱过程中的热力学因素所决定,即在一定的色谱操作条件下,保留时间由物质在色谱中的分配系数决定^[1-2]。

物质在色谱中的分配系数,也叫平衡常数,是指在一定温度、压力下,气-液相间达到分配平衡时,组份分配在气相中的平均浓度与其分配(溶解)在液相中的平均浓度之比值,即 $K=C_L/C_M$ 。式中 C_L 为组份在固定液里的浓度, C_M 为组份在载气中的浓度。它是由组份及固定液热力学性质决定的,只随柱温、柱压、固定相组成、流动相组成、待测组份性质变化,与柱中气相、液相体积无关。但由于 K 为热力学平衡常数,由热力学性质可知,压力对 K 的影响很小,可忽略不计。因此在相同程序温度流量下,对于同一待测组份分别在柱长发生变化的同一根色谱柱中,固定相组成、流动相组成、待测组份性质、温度都可看作常数,压力的变化可忽略,在此条件下分配系数 K 也是相同的,但是,由于柱长变短后对其死时间有很大影响,并且由于在程序温度流量下,流量、温度分别随着时间不断变化,因此影响此条件下物质保留时间的参数已不再是一个,而是一个多参数。需要建立新的数学模型进行程序温度流量下的保留时间的预测。

1.2 数学模型的建立

对于程序温度流量模式下,温度和流量都在随时变化,此时容量因子是温度、流量的函数,所以此条件下不能沿用王静^[3]选择的数学模型 $\ln k' = aT^3 + bT^2 + cT + d$, 而应该重新建立二元数学模型。根据保留时间 t_R 与容量因子 k' 的关系式: $t_R = t_m(k'+1)$, 计算 k' 的先决条件是要获知死时间 t_m 。所以容量因子与温度、流量的函数关系,就转化为死时间与温度、流量的函数关系,所以须找到死时间与温度、流量三者间的函数关系。

2 实验部分

2.1 实验样品

从芳香烃、卤代烃、烯烃、烷烃、醚、醛、酸、酮、酯和醇类具有不同官能团的有机化合物中分别选取苯, 苯甲醇, 邻二氯苯, 1, 3 丁二烯, 正庚烷, 1, 4 二氧六环, 乙醛, 甲醛, 乙醇, 甲醇, 正丁醇, 正庚酸, 乙酸异戊酯, 异戊醇, 萘, 碳酸二甲酯, 乙酸丁酯 18 种样品。(注: 室温下, 萘与蒽醌均为固体, 将萘溶于无水乙醇中, 蒽醌溶于二氯甲烷溶剂中配制成均匀溶液。)

2.2 实验仪器

HP6890 气相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司)

进样器: 分流进样方式, 分流比 1: 50, 温度 250℃

检测器: FID 检测器, 温度 250℃

色谱柱: HP-5 (Crosslinked 5%PH ME Siloxane, 30m×0.32mm×0.25μm)

HP-5 (Crosslinked 5%PH ME Siloxane, 22m×0.32mm×0.25μm)

2.3 不同温度流量程序条件下保留时间的预测

实验条件: 在 HP-5 柱上测定 18 种样品在程序温度流量条件下的保留时间, 温度条件设定如下: 初始温度为 30℃, 分别以 5℃/min, 15℃/min, 25℃/min 的升温速率升至 250℃;

与上面温度条件需同时设定的流量程序为: 流量程序: 初始流量为 0.5ml/min, 保持 2 分钟后, 以每分钟 0.2 ml/min 的流量速率升至 1.5 ml/min 后, 保持 1 分钟, 再以每分钟 0.5 ml/min 的流量速率升至 2ml/min。

为保证所测定的保留时间的准确性, 各样品在每一温度条件下进行两次平行实验, 且两次平行实验的相对误差不超过 1%。每次进样量均为 0.2μl。

预测时间误差分析: 18 种样品在不同柱长的弱极性 HP-5 柱上, 三种温度流量程序条件下保留时间的计算值与实测值的比较如表 2-1 所示。其中 t_R 为两次平行实验所测得的保留时间的平均值, t_p 为保留时间的预测值。RE% 为预测值与实测值之间的相对误差, 表征预测的准确度, 按式 (2-1) 计算。

$$RE\% = \frac{t_p - t_R}{t_R} \times 100\% \quad (2-1)$$

在流量程序及三种温度条件下, 18 种样品在弱极性 HP-5 柱上保留时间的计算值与实测值的比较如表 2-1 所示。

3 结论

对程序温度流量模式下具有不同官能团的 18 种样品在弱极性 HP-5 柱上保留时间的预测进行研究, 发现全部被测样品的预测值与实测值的相对误差均在 ±2.5% 以内, 以上的误差分析说明, 在同一操作条件下, 我们采用早期的恒温数据预测温度流量程序下的保留时间, 考虑的因素只是组份在每块塔板上的平衡分配, 并不会因为程序升温、流量过程变得复杂。我们只需要在原有计算程序的基础上加入控制流量变化的内容, 进一步验证了这种方法的可行性以及在预测保留时间方面具有很高的精度。由于对不同流量程序变化、温度程序变化操作条件下预测结果的研究表明, 运用塔板理论可以完成对不同柱长及任意操作模式下保留时间的预测这必将为塔板理论预测保留时间的实际应用奠定坚实的理论基础。

表 2-1 HP-5 色谱柱程序温度流量②保留时间预测值与实测值比较

样品	5°C/min			15°C/min			25°C/min		
	t _p	t _R	RE%	t _p	t _R	RE%	t _p	t _R	RE%
苯	5.10	5.147	-0.83	4.34	4.358	-0.34	3.96	4.008	-1.21
		5.145	-0.79		4.367	-0.55		4.012	-1.31
乙酸异戊酯	7.90	7.819	0.99	5.36	5.350	0.22	4.57	4.566	0.13
		7.791	1.35		5.349	0.24		4.562	0.22
葱醌	31.30	30.787	1.66	12.66	12.438	1.75	8.71	8.573	1.58
		30.781	1.68		12.430	1.82		8.573	1.58
正庚酸	14.05	14.021	0.21	7.08	7.078	0.00	5.45	5.480	-0.60
		13.904	1.06		7.105	-0.38		5.496	-0.89
1, 3 丁二烯	4.03	4.122	-2.20	3.79	3.875	-2.10	3.61	3.705	-2.44
		4.115	-2.03		3.873	-2.05		3.699	-2.29
正庚烷	5.44	5.422	0.38	4.50	4.480	0.46	4.06	4.072	-0.26
		5.405	0.69		4.489	0.26		4.059	0.06
1, 4 二氧六环	5.53	5.592	-1.15	4.53	4.546	-0.27	4.08	4.110	-0.68
		5.567	-0.71		4.538	-0.09		4.108	-0.63
乙醛	4.12	4.168	-1.20	3.86	3.885	-0.54	3.68	3.718	-1.09
		4.163	-1.08		3.890	-0.67		3.714	-0.98
甲醛	4.01	4.091	-1.88	3.79	3.868	-2.14	3.61	3.695	-2.30
		4.116	-2.48		3.860	-1.94		3.696	-2.33
无水乙醇	4.14	4.217	-1.79	3.85	3.911	-1.56	3.65	3.716	-1.86
		4.215	-1.75		3.907	-1.46		3.722	-2.02
苯甲醇	11.24	11.001	2.21	6.46	6.492	-0.54	5.19	5.219	-0.56
		10.974	2.46		6.483	-0.41		5.216	-0.50
正丁酸	8.40	8.201	2.45	5.37	5.367	-0.03	4.53	4.434	2.24
		8.372	0.35		5.387	-0.40		4.589	-1.21
邻二氯苯	11.03	10.725	2.87	6.46	6.442	0.32	5.21	5.163	0.87
		10.723	2.89		6.414	0.76		5.163	0.87
异戊醇	5.89	5.947	-0.94	4.66	4.694	-0.62	4.15	4.196	-0.99
		5.955	-1.07		4.682	-0.36		4.196	-0.99
萘	14.34	13.845	3.55	7.49	7.392	1.36	5.75	5.705	0.79
		13.844	3.56		7.377	1.56		5.716	0.59
碳酸二甲酯	4.82	4.843	-0.55	4.20	4.200	-0.06	3.87	3.904	-0.96
		4.843	-0.55		4.202	-0.11		3.907	-1.04
乙酸丁酯	6.85	6.845	0.03	5.02	4.996	0.52	4.37	4.362	0.20
		6.840	0.10		4.998	0.48		4.364	0.15

参考文献:

- [1] 孙传经, 气相色谱分析原理与技术, 北京: 化学工业出版社, 1979, 2~14.
- [2] 洪厚胜, 袁慕康, 张庆文等, 色谱保留值预测模型的研究进展, 分析科学学报, 2006, vol.22(No.6): 726~728.

气相色谱法测定涂料中挥发性卤代烃

张克贤

(天津现代职业技术学院, 天津 300222)

利用气相色谱法测定涂料中挥发性卤代烃, 采用电子捕获鉴定器 (ECD) 进行检测, 峰面积 (响应值) 与浓度进行线性回归, 得到线性回归方程, 进行外标法测定的方法。测定了三种涂料中的二氯甲烷和四氯化碳两种挥发性卤代烃。该方法简便、灵敏度高和重复性好。样品的加标回收率为 85.3%~95.6%, 标准曲线的相关系数为 0.9951 和 0.9998, 相对标准偏差为 5.96% 和 1.24%。

涂料中一般含有一定量溶剂, 随着人们环保意识的增强, 对涂料无毒无污染要求越来越高。目前市场上环保型涂料逐渐取代一般型涂料。挥发性卤代烃是一类对人, 对环境有害的溶剂。一般包括二氯甲烷、1, 1-二氯乙烷、1, 2-二氯乙烷、1, 1, 1-三氯乙烷、1, 1, 2-三氯乙烷、三氯甲烷和四氯化碳, 环保型涂料对其有限量要求。

目前标准中气相色谱法测定挥发性卤代烃, 有采用氢火焰离子鉴定器 (FID) 对其进行鉴定, 但其灵敏度不如电子捕获鉴定器 (ECD)。电子捕获鉴定器 (ECD) 对卤原子有较高灵敏度, 适合检测挥发性卤代烃。近期颁布的标准和报道采用电子捕获鉴定器 (ECD) 检测挥发性卤代烃^[1,2,3], 其定量方法为内标法。也有报道峰高 (响应值) 与浓度进行线性回归, 得到线性回归方程, 进行外标法测定的方法^[4]。本文介绍电子捕获鉴定器 (ECD) 检测挥发性卤代烃定量方法采用峰面积 (响应值) 与浓度进行线性回归, 得到线性回归方程, 进行外标法测定的方法。对样品涂料的二氯甲烷和四氯化碳两种挥发性卤代烃进行测定, 方法简便、灵敏度高和重复性好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

气相色谱仪 (上海天美仪器有限公司); 电子捕获鉴定器 (Ni⁶³ 源) (工作站: D-7900); 色谱柱: 甲基聚硅氧烷固定相 (30m×0.25mm×0.25μm); 微量注射器: 5 微升

1.1.2 试剂

二氯甲烷 (色谱纯), 1, 1-二氯乙烷 (色谱纯), 1, 2-二氯乙烷 (色谱纯), 1, 1, 1-三氯乙烷 (色谱纯), 1, 1, 2-三氯乙烷 (色谱纯), 三氯甲烷 (色谱纯), 四氯化碳 (色谱纯), 稀释剂: 甲醇 (色谱纯)。

1.2 色谱分析条件

进样方式: 分流进样; 载气流速 (N₂): 4mL/min; 柱温: 180℃; 进样口温度: 210℃; 检测器温度: 300℃; 尾吹: 30 mL/min; 进样量: 0.2μL。以保留时间 (min) 定性, 峰面积 (A, uV/s) 外标法定量。图 1 为卤代烃分离色谱图。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的制作和检出限

在开始对样品进行 GC-ECD 测定之前, 先测定标准工作液, 直到相应组分色谱响应值稳定后开始进标样, 制作标准曲线, 之后进行样品测定。以响应值峰面积 (A, uV/s) 与质量浓度 (X, mg/L) 进行线性回归, 得回归方程和相关系数。

作者简介: 张克贤 (1963-), 男, 天津市人, 天津现代职业技术学院工程师, 主要从事新技术开发和化验员职业技能培训。

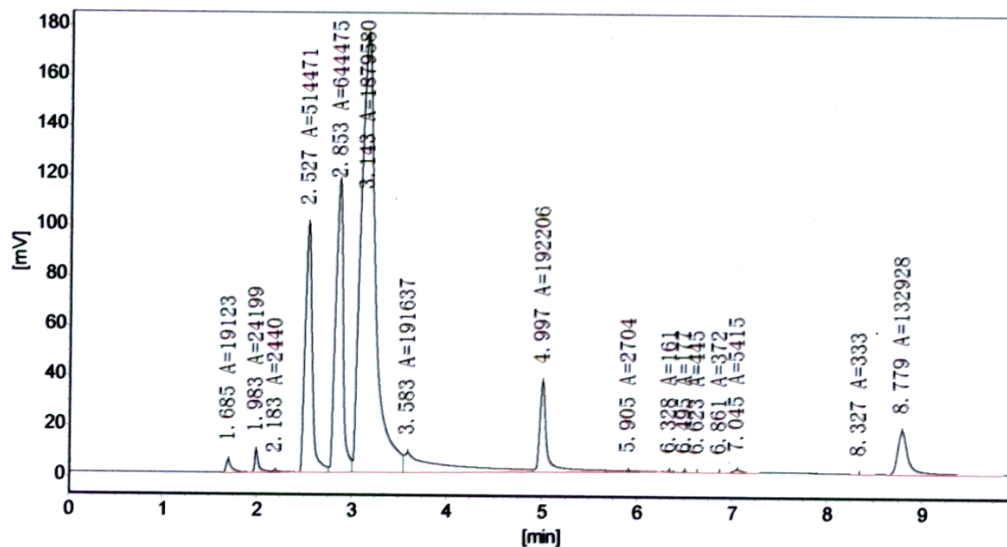


图1 卤代烃分离色谱图

保留时间：1.685min(CH₃OH)；1.983min(CH₂Cl₂)；2.183min(1,1-CHCl₂CH₃)；2.527min(CHCl₃)；2.853min(1,1,1-CCl₃CH₃)；3.143min(CCl₄)；4.997min(1,1,2-CHCl₂CH₂Cl)

取1.0000g二氯甲烷(色谱纯)或四氯化碳(色谱纯)置于1000mL容量瓶中,用甲醇(色谱纯)定容至刻度。(卤代烃含量1g/L)。取卤代烃含量(1g/L)1mL置于1000mL容量瓶中,用甲醇(色谱纯)定容至刻度(卤代烃含量1mg/L)。分别取二氯甲烷和四氯化碳(色谱纯,1mg/L)0.25、0.5、1.00和2.00于50mL容量瓶中,用甲醇(色谱纯)定容至刻度。该系列含卤代烃为0.005、0.010、0.020和0.040mg/L。依次取标准溶液0.2μL注入气相色谱仪,记下各次色谱峰面积(A,uV/s),以响应值峰面积(A,uV/s)与质量浓度(X,mg/L)进行线性回归,得回归方程和相关系数。

表1 标准系列的测试结果

浓度 (mg/L)	0.005	0.010	0.020	0.040
峰面积 (二氯甲烷)	13	27	58	105
峰面积 (四氯化碳)	730	1442	2918	5920

二氯甲烷标准溶液回归方程和相关系数: $A = 2680X$ $R^2 = 0.9951$

四氯化碳标准溶液回归方程和相关系数: $A = 147402X$ $R^2 = 0.9998$

通过下式计算涂料中组分含量 C(μg/kg)

$$C(\mu\text{g}/\text{kg}) = X \times V \times 1000/m$$

X-测试液中卤代烃的质量浓度, mg/L

V-样品定容体积, mL

m-样品取样量, g

样品配制称取1g(精确至0.0001)样品置于50mL容量瓶中用甲醇(色谱纯)定容至刻度。振荡混匀沉淀后取清液进行测定,进样量0.2μL。

通过测定空白液,由仪器噪声和标样峰面积计算方法的检出限二氯甲烷为3mg/L;四氯化碳为0.001mg/L

2.2 回收率实验

将三个不同样品分别做回收率实验(内墙涂料1#、内墙涂料2#和外墙涂料)。取同一样品

2份,分别加入不同量二氯甲烷标准,按本法重复测定6次,其结果见表二。另外再取同一样品2份,分别加入不同量四氯化碳标准溶液,按本法重复测定6次,其结果见表三。回收率在85.3%~95.6%。

表2 二氯甲烷准确度实验结果 (mg/kg)

样品名称	本底均值 (mg/kg)	CH ₂ Cl ₂ 标准加入量 (mg/kg)	测定均值 (mg/kg)	回收率 (%)
内墙涂料 1#	2.21	10.0	11.32	92.7
		5.0	6.61	91.7
内墙涂料 2#	3.44	10.0	12.55	93.4
		5.0	7.55	89.4
外墙涂料	7.34	10.0	16.97	95.6
		5.0	11.23	91.0

表3 四氯化碳准确度实验结果 (mg/kg)

样品名称	本底均值 (mg/kg)	CCl ₄ 标准加入量 (mg/kg)	测定均值 (mg/kg)	回收率 (%)
内墙涂料 1#	0.018	0.10	0.109	92.4
		0.05	0.058	85.3
内墙涂料 2#	0.039	0.10	0.125	89.9
		0.05	0.078	87.6
外墙涂料	0.068	0.10	0.155	92.3
		0.05	0.102	86.4

2.3 精密度实验

取两个不同样品,按本法重复测定6次,其结果见表四。

表4 精密度实验结果

样品名称	样品测定量						平均值	相对标准偏差%
	1	2	3	4	5	6		
内墙涂料 1# (CH ₂ Cl ₂)	2.15	2.13	2.16	2.18	2.11	2.12	2.14	1.24
外墙涂料 (CH ₂ Cl ₂)	7.22	7.13	7.19	7.20	7.16	7.15	7.18	4.82
内墙涂料 1# (CCl ₄)	0.016	0.014	0.015	0.017	0.015	0.015	0.015	5.96
外墙涂料 (CCl ₄)	0.066	0.063	0.065	0.062	0.064	0.065	0.064	2.31

3 结论

环保型涂料需要严格控制有害化学物质的添加量。挥发性卤代烃是严格禁止添加到涂料中。利用气相色谱法测定涂料中挥发性卤代烃,方法简便、灵敏度高和重复性好。方法的加标回收率为85.3%~95.6%;标准曲线的相关系数为0.9951和0.9998;相对标准偏差为5.96%和1.24%。适合标准检测和一般质量检测,

参考文献

- [1]HJ/T 220-2005 环境标志产品技术要求 胶黏剂
- [2]HJ/T 201-2005 环境标志产品技术要求 水性涂料
- [3]安琼,董元华,倪俊,等.[J]色谱,2002,20(2):167-171
- [4]张莘民,徐朝.[J]色谱,2000,18(3):274-276

气相色谱法测定烃中环丁砜的研究

徐忠贤

(中国石油化工股份有限公司天津分公司质量检验车间)

本文采用气相色谱法,用 Agilent 公司 $30\text{m}\times 0.32\text{mm}\times 0.5\ \mu\text{m}$ 毛细管柱,对烃中环丁砜进行了含量测定。方法简单,结果准确。

重整生成油中的芳香烃是利用环丁砜作溶剂抽提分离出来的,抽提过程完成后对溶剂环丁砜要进行回收利用,本文采用气相色谱法对烃中环丁砜含量进行了测定。结果满意,达到较好的精密度和准确度。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:安捷伦 7890 气相色谱仪, G4513A 十六位自动进样器, 355 SCD 检测器, 安捷伦化学工作站

试剂:环丁砜 ($\geq 99.5\%$), 纯苯 ($\geq 99.5\%$)

1.2 色谱条件

色谱柱:Agilent 公司 $30\text{m}\times 0.32\text{mm}\times 0.5\ \mu\text{m}$ 毛细管柱;柱温: $185\text{ }^\circ\text{C}$;检测器:355 SCD 硫检测器 $200\text{ }^\circ\text{C}$, 真空状态;355 SCD 燃烧器 $815\text{ }^\circ\text{C}$;汽化室温度: $250\text{ }^\circ\text{C}$

2 含量测定

2.1 标准溶液配制

采用母液稀释法配制 1ppm 环丁砜标样:用移液管准确移取 1ml 环丁砜至 100ml 容量瓶中,加入溶剂纯苯至刻度,此时溶液浓度为 10000ppm,作为母液;从母液中准确移取 1ml 至 100ml 容量瓶中,加入苯至刻度,此时溶液浓度为 100ppm,称为 1#溶液,再准确移取 1#溶液 1ml 至 100 ml 容量瓶中,用苯稀释至刻度,配制完成 1 ppm 环丁砜标准溶液,以上溶液配制过程中均要摇匀。标液谱图如图 1:

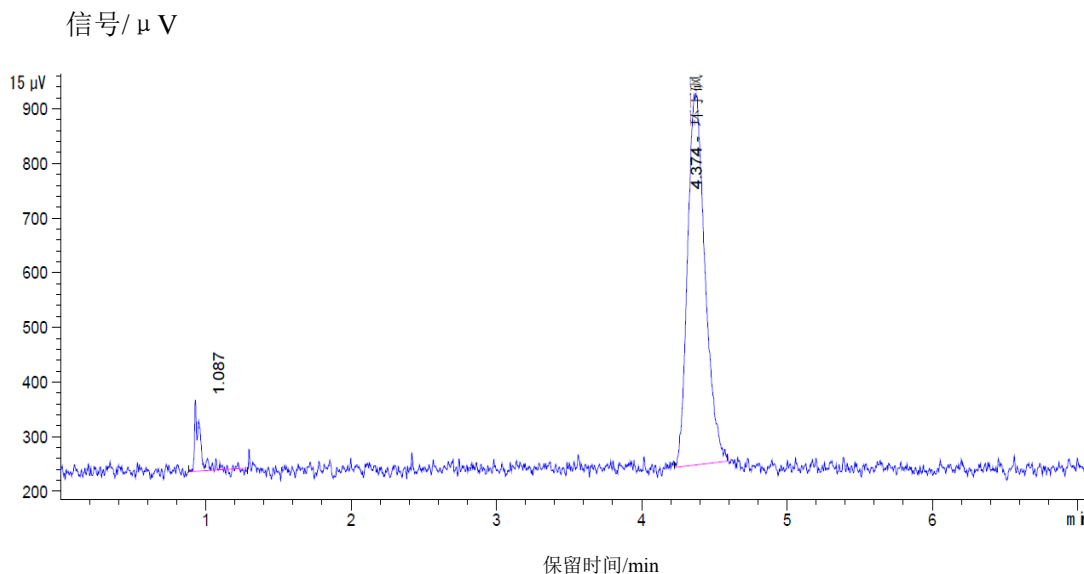


图 1 1ppm 标样色谱图

2.2 校正因子的计算

用上述色谱条件对标准溶液进行测定，进样量是 $1\mu\text{l}$ ，重复进样 4 次，记录峰面积，如果峰面积重复性差需重做上述工作，从而测定出环丁砜的校正因子。

$$f_s = W_s / A_s$$

f_s ——标准物质校正因子

W_s ——标准物质的含量

A_s ——标准物质的峰面积

2.3 精密度试验

针对同一样品 SN504，重复进样 5 次，外标校正获得样品中环丁砜含量，典型谱图如图 2，分析结果如表 1：

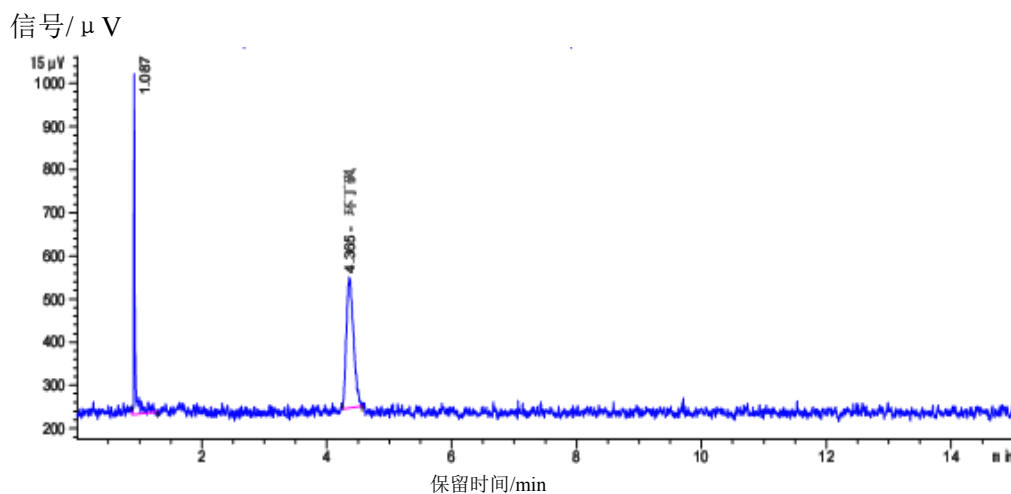


图 2 0.6ppm 标样色谱图

表 1 外标校正获得样品中环丁砜含量

进样次数	1	2	3	4	5	平均值
环丁砜含量 (ppm)	0.61	0.66	0.69	0.58	0.70	0.65

经过试验测得标准偏差 $SD=0.05$ ($n=5$) 符合方法 UOP660 重复性要求。

3 结果与讨论

原来用微填充毛细管柱和 FID 检测器测定环丁砜含量，本方法采用 $30\text{m} \times 0.32\text{mm} \times 0.5\mu\text{m}$ 毛细管柱和 SCD 检测器测定环丁砜含量，结果发现后者分析结果的重复性明显优于前者。本方法环丁砜标准溶液配制采用苯作溶剂好于方法 UOP660 中水作溶剂，同时操作简便易行。硫选择性检测器 SCD 灵敏度高，背景噪音相对也高，需要每天分析标样两次，两次分析峰面积的平均值。该方法操作简单，重复性好，能满足炼油厂重整装置样品烃中环丁砜的测定。

气相色谱法测定原油高温模拟蒸馏

徐忠贤

(中国石油化工股份有限公司天津分公司质量检验车间)

利用美国安捷伦公司 7890 气相色谱分析仪和荷兰 AC 公司分析软件进行原油高温模拟蒸馏测试, 分析的馏程范围为初馏点~750℃。采用 nC5~nC120 的正构烷烃混合物作为模拟蒸馏的沸点校正样, 外标参考油样品用于测定检测器的响应因子, 沸点范围是 366.0℃~544.5℃。该分析方法重复性好, 可指导原油的炼制, 优化重油的加工。

气相色谱进行原油高温模拟蒸馏测试的优点是分析速度快, 重复性好以及样品用量少。目前炼油厂原油品种多变, 而原油馏程的测定是评价原油质量的主要指标和确定原油加工方案的重要依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

安捷伦公司 7890 色谱仪, 带氢火焰离子化检测器 (FID), 7683B 八位自动进样器。天平: 感量为 0.0001g。

二硫化碳: 分析纯; 沸点校正样: nC5~nC28(19 个正构烷烃混合物)和 nC30~nC120 (38 个正构烷烃混合物); 外标样: 沸程为 366.0~544.5℃参考油。

nC5~nC120 沸点校正样配制: 在 nC30~nC120 沸点校正样试剂瓶中, 加入 10g 二硫化碳, 摇匀溶解。取该校正样 1.5mL 于 2 mL 取样瓶中, 再在该取样瓶中加入 4 μL nC5~nC28 沸点校正样, 摇匀。

1.2 色谱条件

色谱柱: AC 公司 HT750 5m×0.53mm×0.09 μm 毛细管柱; 柱温: 初始温度 40℃, 以 10℃/min 的速度升到 430℃, 保持 5min; 检测器温度: 430℃; 载气流速: 19.0 mL/min, 高纯氮; 燃气流速: 35 mL/min, 高纯氢; 助燃气流速: 350 mL/min, 净化压缩空气; 进样量: 1 μL。

1.3 分析方法的建立

1.3.1 保留时间对沸点的校正

按“1.2”色谱条件, 分析 nC5~nC120 沸点校正样, 典型的色谱图见图 1, 其沸点与保留时间的关系曲线见图 2。选择最佳的积分条件, 建立正构烷烃保留时间和沸点的校正表。

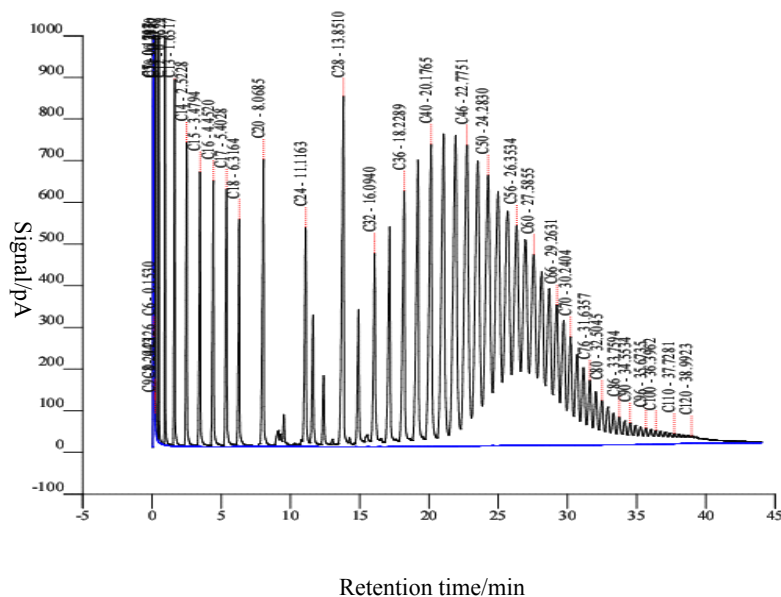


图 1 nC5~nC120 沸点校正样色谱图

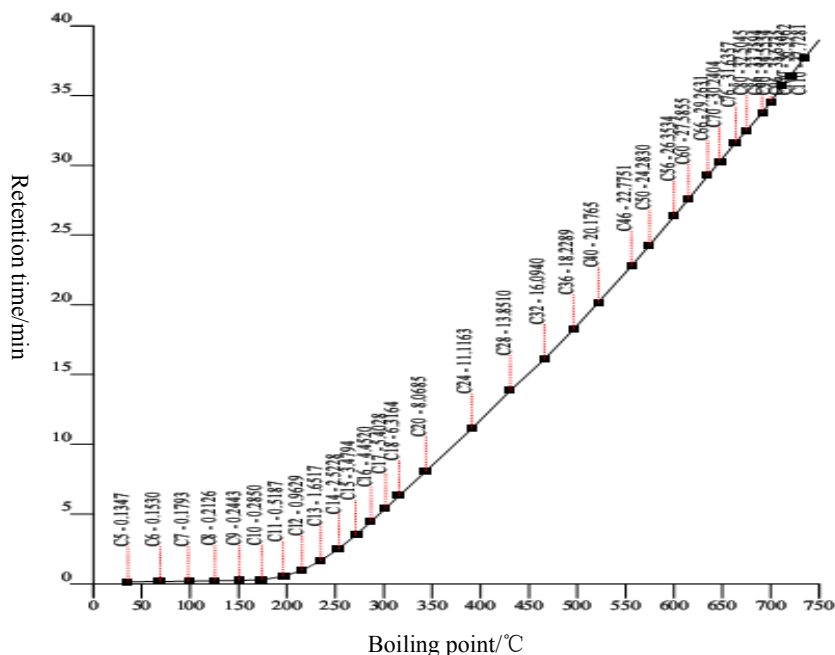


图2 沸点与保留时间的关系曲线

1.3.2 外标样的分析

在 2mL 取样瓶中, 准确称取一定量参考油 (约 0.015g), 加入约为参考油 100 倍的二硫化碳溶剂, 再准确称量, 混合均匀。按“1.2”色谱条件, 分析该外标样, 典型的色谱图见图 3。

对色谱信号采用切片积分来计算面积, 通过外标样的分析, 可计算出检测器的响应因子, 同时可以考察仪器状态, 若各点偏差在允许范围内, 见表 1, 表明仪器性能符合要求。

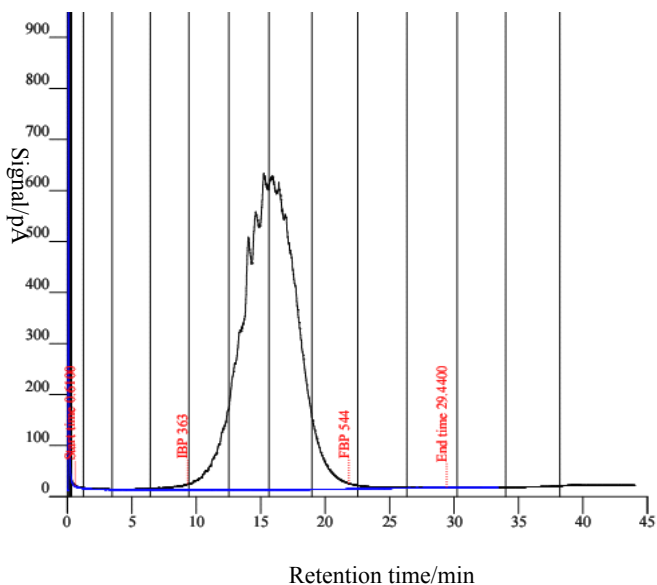


图3 外标样的色谱图

响应因子按 (1) 式计算:

$$R_f = \frac{W_r}{(W_r + W_{rs}) * A_r} \quad (1)$$

式中:

R_f : 响应因子; W_r : 参考油重量, g; W_{rs} : 外标样溶剂重量, g; A_r : 外标样从启动到洗脱结束点的总面积。

表1 参考油的偏差允许范围

回收率/m%	沸点/°C	沸点允许偏差/°C
IBP	366.0	6.0
10.0	421.5	3.0
20.0	436.0	3.0
30.0	445.5	3.0
40.0	454.0	3.0
50.0	462.0	4.0
60.0	469.5	4.0
70.0	477.5	4.0
80.0	486.0	4.0
90.0	498.0	4.0
FBP	544.5	8.5

1.3.3 原油样品分析

每次样品分析前均要进行基线补偿分析,按“1.2”色谱条件,分析二硫化碳溶剂。基线补偿分析要求反复进行,直到获得具有干净稳定高温平台的补偿基线。在进行沸点校正样、外标样和原油样分析时由所得信号扣除补偿基线信号。

在2mL取样瓶中,准确称取一定量原油(约0.015g),加入约为原油100倍的二硫化碳溶剂,再准确称量,混合均匀。按“1.2”色谱条件进行分析,运行高温模拟蒸馏软件,得到原油高温模拟蒸馏的分析结果报告。

原油样品分析的总收率按(2)式计算:

$$W\% = R_f * A_s * 100 * \frac{(W_s + W_{ss})}{W_s} \quad (2)$$

式中:W% : 原油样品总收率, %;
 R_f : 响应因子; A_s : 原油样品从启动到洗脱结束点的总面积; W_s : 原油样品重量, g; W_{ss} : 原油样品溶剂重量, g。

响应信号大小和保留时间分别对应于馏出百分率和沸点温度。从试验开始计算样品的收率,当收率为0.5%时,将该点温度定为样品的初馏点(IBP),当收率为99.5%,将该点温度定为样品的终馏点(FBP)。原油样品分析的色谱图见图4。

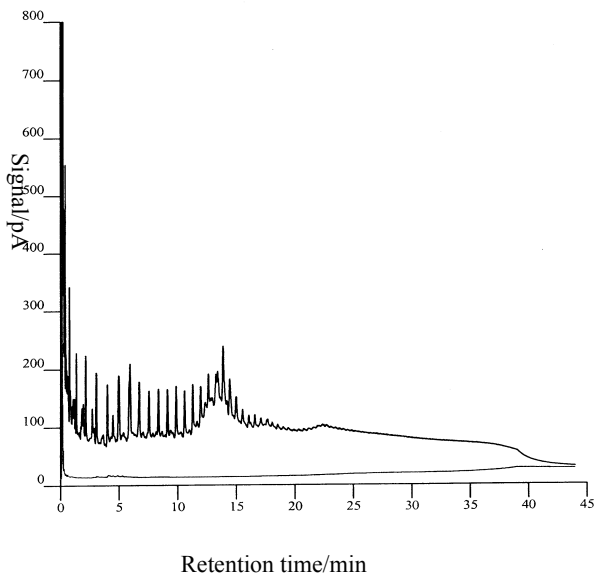


图4 原油的高温模拟蒸馏色谱图

2 结果与讨论

2.1 分析方法的精密度

对中转罐连续分析5次,进行重复性实验,分析结果见表2。从表2数据可见,高温模拟蒸馏时,仪器性能很稳定,分析重复性好。

表2 分析方法重复性考察实验

沸点 /°C	收率/m%					平均值/m%	标准偏差	相对标准偏
	Recovery/m%					Average	/m%	差/%
Boiling point/°C	1	2	3	4	5	/m%	SD	RSD
							/m%	/%
IBP	54.0°C	54.0°C	54.0°C	52.5°C	52.5°C	53.4°C	0.90°C	1.7
IBP~120	3.5	3.4	3.4	3.5	3.5	3.5	0.05	1.4
IBP~180	8.0	8.0	8.0	8.1	8.2	8.1	0.13	1.6
IBP~240	14.2	14.1	14.1	14.1	14.2	14.2	0.08	0.6
IBP~300	23.0	22.8	22.8	22.9	23.0	22.9	0.09	0.4
IBP~360	33.3	33.1	33.1	33.1	33.2	33.1	0.10	0.3
IBP~420	45.4	45.1	45.1	45.1	45.2	45.2	0.14	0.3
IBP~480	59.4	59.0	59.1	59.0	58.9	59.0	0.21	0.4
IBP~540	70.0	69.5	69.7	69.6	69.8	69.7	0.22	0.3
IBP~600	80.5	80.0	80.1	80.1	80.0	80.1	0.21	0.3
IBP~660	89.7	89.3	89.4	89.4	89.5	89.4	0.17	0.2
IBP~720	97.0	96.9	96.9	96.9	96.8	96.9	0.08	0.1
FBP	744.2	744.6	744.8	744.5	745.4	744.8	0.42	0.1

2.2 分析中应注意的问题

由于固定液的高温流失和重质馏分的影响,硅橡胶蒸气和重质馏分的燃烧会在离子头喷嘴周围形成晶状沉积物,从而影响FID响应特性。严重时堵塞喷嘴,点不着火,无响应信号,因此应定期清除沉积物。

由于样品的残存,会使模拟蒸馏分析数据不精确,因而原油分析前的基线补偿要反复进行,直到补偿基线干净且具有稳定的高温平台为止,同时要注意定期清洗进样衬管。

对耐高温密封隔片(进样器垫片)要注意它有一定的穿刺寿命,一般隔片只能有效穿刺60次左右,应按此数要求更换隔片,以保证整个气路不漏气。

3 结论

使用AC公司的高温模拟蒸馏软件,采用毛细管色谱柱进行分离,外标法定量来分析原油的馏程,测定的馏程范围可为IBP~750°C。实验结果表明,该分析方法重复性好,初馏点和终馏点的标准偏差<1°C,各馏分收率的标准偏差<0.3%;该分析方法精确度高,样品用量少,操作简便快速,发挥了积极有效的作用。

基质固相分散-气相色谱法测定水产品中痕量菊酯类药物含量

刘宝蜜, 闫宏远, 杜精精, 褚春霞, 杨更亮*

(1.河北省药物质量分析控制重点实验室; 2.河北大学药学院, 保定 071002)

菊酯类药物是一类广谱杀虫剂, 已用于粮食、蔬菜、水果等农作物的除虫并广泛应用于渔业生产中的清塘、毒杀杂鱼和有害生物等^[1]。这类药物若使用不当, 对鱼类和人类会造成较大危害。由于实际样品组分复杂且目标物含量低, 所以样品前处理方法在整个分析过程中显得尤为重要。传统的样品前处理过程操作复杂, 耗时, 样品易损失, 提取与净化效率低, 且需大量样品及有机溶剂, 易造成环境污染^[2]。而基质固相分散技术作为美国农业部最新农药残留检测样品前处理技术克服了上述缺点^[3], 本实验采用基质固相分散技术结合 GC-ECD 法分析水产品中痕量菊酯类药物残留, 方法简单、快速, 适用于水产品中菊酯类药物残留分析。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

GC-2014 气相色谱仪(ECD 检测器); N2000 色谱工作站; DB-5 色谱柱(30 m×0.53 mm×1.0 μm); 自制基质固相分散提取柱; 高效氯氰菊酯、氯菊酯标准品; 硅藻土、无水硫酸钠、正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷(分析纯, 保定华新试剂公司)。

1.2 色谱条件

进样口温度: 285℃; 检测器温度: 290℃; 分流进样, 分流比: 1:1; 载气: 高纯氮气(>99.999%); 柱流速: 7.45 mL/min; 进样量 1.0 μL。色谱柱升温程序: 250℃(4 min) $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ 285℃(10 min)。

1.3 样品处理

精密称取 0.25 g 样品和 0.75 g 活化后的中性氧化铝于玻璃研钵中充分研磨。MSPD 提取柱从下至上依次填入一层滤纸, 少许脱脂棉, 1 g 无水硫酸钠和硅藻土, 再加入上述研磨均匀的样品。用 6.0 mL 正己烷-二氯甲烷(1:1, v/v) 分两次洗涤研钵与研锤, 然后采用同一洗涤液淋洗层析柱, 控制流速大约 1.0 mL/min。收集洗脱液至 5.0 mL 容量瓶中, 定容后取 1.0 mL 挥干, 加 200 μL 正己烷充分溶解后进行色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 MSPD 条件的优化

在基质固相分散技术中, 分散剂种类、样品-填料比、洗脱液极性及其用量都会对测定结果产生影响。实验中对这四个影响因素进行了考察优化。通过方法优化, 最终结果如下: (1) 用中性氧化铝作吸附剂, 硅藻土作净化剂, 可除去很多极性杂质, 达到净化目的。(2) 正己烷为非极性溶剂, 与不同的极性溶剂混合可得到中等极性的混合溶剂。本实验用正己烷-二氯甲烷(1:1, v/v) 洗脱, 可以达到较满意的效果。(3) 中性氧化铝: 样品比例为 3:1, 用 6.0 mL 正己烷-二氯甲烷(1:1, v/v) 洗脱, 方法集提取净化于一体, 操作简单, 稳定可靠。

2.2 线性关系与检测限

基金项目: 国家自然科学基金(20905019)、河北省自然科学基金(B2010000209)、教育部留学回国基金、河北省留学人员科技活动择优资助项目、河北省高校百名优秀创新人才支持计划资助项目

作者简介: 杨更亮(1963-), 男, 河北人, 教授, Tel: 0312-5971107, E-mail: ygl@hbu.edu.cn

配制一系列不同浓度(0.0005-0.5 $\mu\text{g/mL}$)的混标工作溶液, 在最优色谱条件下进样分析, 以各组分的峰面积 y 对质量浓度 x 绘制标准曲线, 线性方程分别为 $y=3.19\times 10^6x-2.21\times 10^3$ ($r^2=0.9997$, 高效氯氰菊酯); $y=5.60\times 10^5x+1.31\times 10^4$ ($r^2=0.9995$, 氯菊酯)。

2.3 样品测定

从市场购买的水产品样品按 1.3 样品处理过程进行处理后采用 GC-ECD 进行分析, 均没有检测到两种菊酯药物残留。分别在样品中准确添加三种不同水平 (0.02、0.08、0.40 mg/kg) 的混合菊酯标准溶液, 放置数分钟后同样按“1.3”方法和优化的色谱条件进行处理和测定。每个样品均平行测定 3 次, 计算平均回收率和相对标准偏差, 两种药物残留的回收率在 72.5%~106.6%之间, 相对标准偏差在 1.1%~6.7%之间, 能满足药物残留分析要求。

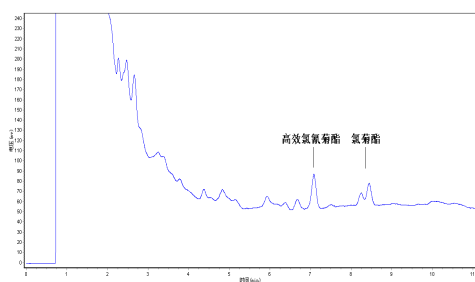


图 2-1 洗脱剂种类的比较

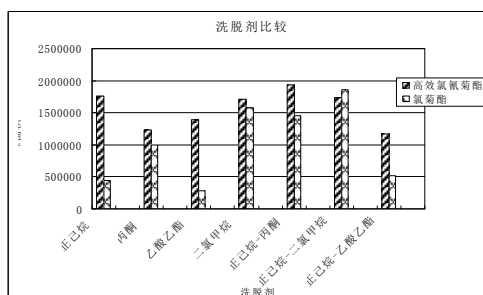


图 2-2 加标样品谱图

参考文献:

- [1] Esteve-Turrillas FA, Pastor A. [J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(3): 801-809
- [2] Chu XG, Hu XZ, Yao HY. [J]. J Chromatogr A, 2005, 1063(7): 201-210
- [3] 秦峰.[J].化学通报,2009,10(2): 130-132

Matrix Solid Phase Dispersion - Gas Chromatography for the

Determination of Trace Pyrethroids in aquatic Products

LIU Bao-mi, YAN Hong-yuan, DU Jingjing, CHU Chun-xia, YANG Geng-liang*

(College of Pharmacy, Hebei University, Baoding, 071002, China)

Abstract: A new analytical method based on matrix solid-phase dispersion coupled with GC-ECD was developed for the determination of permethrin and cypermethrin in aquatic products. Various parameters including types of sorbent and eluent, and proportion of sample to sorbent were investigated. The aquatic products were dispersed with neutral alumina adsorbent and eluted using n-hexane-dichloromethane (1:1, v/v). The average recoveries of the analytes in three spiked samples were in a range of 72.5%~106.6% with relative standard deviation less than 6.7%. This proposed method was simple, rapid, consumes less sample and organic solvents, and suitable for the detection of trace cypermethrin and pyrethroids in aquatic products.

Key words: Matrix solid phase dispersion; Gas chromatography; Aquatic products; Pyrethroids

硫化氢分析浅析

纪玉金，马秀英，唐太平

(渤海钻探井下技术服务分公司)

本文介绍了用气相色谱法测定天然气中的硫化氢含量的方法建立、重复性、准确度的测定，以及在分析过程中样品的处理，不同取样器具对分析结果的影响，形成完整的分析模式。

硫化氢是一种毒性很强的剧毒物，是易致人死亡的气体。因此在天然气勘探开发过程中对硫化氢测定、建立一种硫化氢准确的测定方法是非常重要的，因此，从2000年就开始建立和研究气相色谱法测定天然气中的硫化氢，通过十多年的研究、对比、应用，形成了取样、样品处理、分析、结果处理的完整体系，该方法分析过程简单、数据准确、分析范围宽、安全性强和适用范围广。

1 仪器分析方法的建立和应用

1.1 原理介绍

气相色谱分析天然气中的硫化氢含量：硫化氢在色谱柱中通过分离进入火焰光度检测器，由于硫化氢中硫在富氢火焰燃烧时发出394nm波长的特征光，这种特征光通过单色滤光片进入光电倍增管，光的信号就转变为电信号，这个信号再经过放大器放大后，由数据处理系统采集处理，最后得出分析谱图。

1.2 气相色谱仪介绍

Agilent 6890N 气相色谱仪：该仪器的气路系统采用了防硫材料制作，具有自动进样系统，仪器操作具有较好的稳定性。

火焰光度检测器：这是对硫能产生特征光谱的检测器，该检测器具有较高的灵敏度。

1.3 分析方法的建立

硫化氢色谱分析方法具有速度快、定量准确、精度高的特点，但是它的缺点是仪器结构复杂难掌握，样品量少，在日产几万立方米天然气井中分析结果重复性较差。

a.分析柱：磷酸三甲苯酯+6201担体，这种具有分离速度快、回收率高、容易定量等特点，但是它对天然气易中毒，我们对这个色谱柱进行了专项处理，对天然气中硫化氢分析取得了比较满意的效果。

b.标准气体：建立的分析方法是外标法，所选用的标准硫化氢气体是北京氩普北分气体有限公司生产的。

c.分析与计算

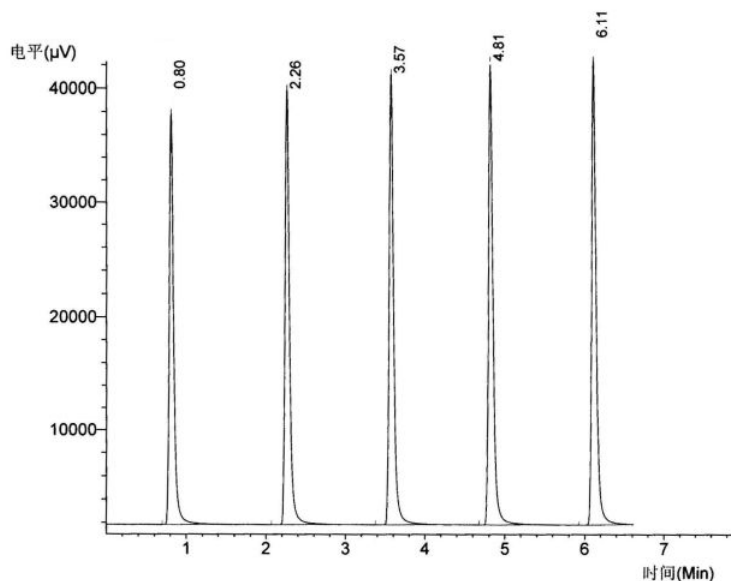
分析：将气相色谱仪三路气体比例调节好，检测器点火，待仪器稳定后，将标准气体进入仪器进行分析，因为硫化氢气体易吸附在钢瓶上，因此要放空数秒，连续进样数次，（见谱图1）取平行标准气两个，记录峰高 h_1 或峰面积 s_1 。把取样袋（钢瓶）与仪器进样口连接好，然后放空十多秒后将样品进入仪器进行分离，得到样品谱图（见谱图2）并记录峰高 h_2 或峰面积 s_2 。

计算：

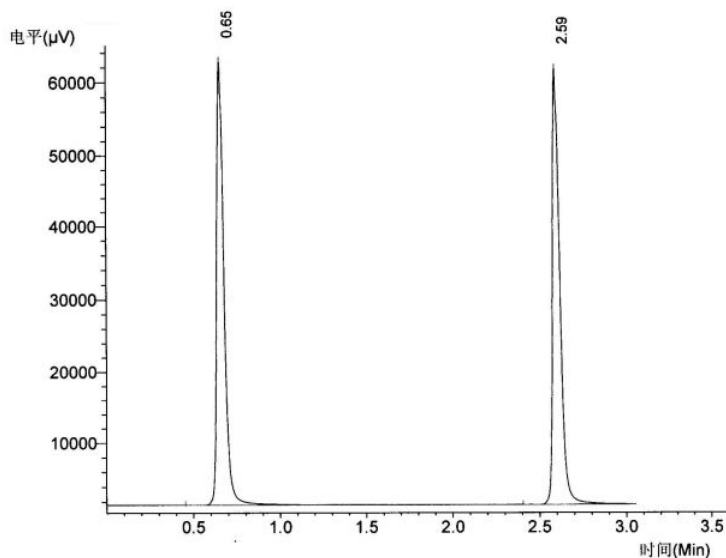
$$\sqrt{s_1} :_{30} = \sqrt{s_2} :x \quad \text{其中 } x \text{ 为样品中硫化氢含量}$$

1.4 应用

在分析方法建立后对油田气井中含硫化氢样品进行了分析，表1为近几年油气井天然气中的硫化氢含量



谱图 1: 标准气体谱图



谱图 2: 硫化氢气体谱图

2 硫化氢气体的特性及在取样、处理和分析上浅析

2.1 天然气中硫化氢含量的不均匀性

天然气中硫化氢含量是不均匀的,在同一层样品因取样时间不同,硫化氢含量也是不同的。

2.2 不同的取样器具硫化氢含量不同

从表 3 看出:不同的取样方法对结果有影响,排水取样影响最大,有部分硫化氢溶解在水中,造成结果偏低。钢瓶取样会有部分硫化氢分子吸附在钢瓶上,导致含量偏低,气袋取样在分析结果上从理论上讲应该较为准确。

2.3 样品稀释处理的误差分析

利用 Hamilton Microlab 500 型稀释仪对高含量硫化氢气体进行稀释(稀释剂为氮气)

从表 4 分析得出:样品稀释要以标准气体的含量为准,稀释倍数过大和过小都会产生误差,当稀释倍数过小时,含量超出线性范围直接影响了分析的准确性。

表1 油气井天然气中硫化氢含量统计表

样品	硫化氢含量(PPM)	取样时间
1	10	2006. 06
2	6	2004. 09
3	15	2003. 02
4	21	2009. 07
5	42	2003. 03
6	65	2002. 11
7	141	2000. 11
8	146	2000. 03
9	124	2003. 02
10	263	2002. 11
11	7881	2009. 07
12	160000	1999. 11
13	875	2000. 01
14	237	2009. 03
15	127000	2009. 11

表2 硫化氢含量不均匀性统计

	取样井段	取样时间	硫化氢含量(ppm)
第一层	5711.2-5734.5	1999.10.29	6859
	5711.2-5734.5	1999.10.29	7881
第三层	5460-5496	1999.12.17	619
	5460-5496	1999.12.17	522
第三层	5460-5496	2000.01.02	875
	5460-5496	2000.01.02	938

表3 取样器具对硫化氢含量影响统计

	样品	取样时间	硫化氢含量(ppm)
排水取气	同一样品	2009. 03. 11	198
	同一样品	2009. 03. 11	205
钢瓶取气	同一样品	2009. 03. 11	220
	同一样品	2009. 03. 11	224
气袋取气	同一样品	2009. 03. 11	235
	同一样品	2009. 03. 11	231

表4 同一样品稀释对硫化氢含量影响统计

稀释倍数	硫化氢含量(ppm)	标准气体含量(ppm)
20	4085	30
	4104	30
300	7665	30
	7684	30
500	7356	30
	7413	30

顶空气相色谱法测定 DT 中有机溶剂残留量

蔡振华, 李月鹏, 蒋庆峰

(天津药物研究院分析测试中心, 天津 300193)

DT 是一种 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素再摄取双重抑制剂, 通过抑制 5-HT 和去甲肾上腺素再摄取来提高这些神经递质的含量, 起到抗抑郁的作用。DT 对抑郁症的其他躯体症状如全身疼痛和胃肠紊乱有很好疗效, 因而比目前的抗抑郁药物更具有优势。由于其生产工艺中使用到了异丙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲苯和二甲亚砷等五种有机溶剂, 根据目前新药审批对有机溶剂残留量的要求, 必需对其残留量进行考察。因此, 按照《中国药典》2005 年版二部的要求和 ICH 中关于药品溶剂残留量的规定, 制定了用顶空气相色谱法测定 DT 中有机溶剂残留量的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890 气相色谱仪及 7694E 顶空进样器(美国安捷伦公司)。甲醇、异丙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲苯和二甲亚砷均为分析纯化学试剂。供试品 DT 由本院合成室提供(批号 01, 02, 03)。

1.2 色谱条件

色谱柱为 HP-624 毛细管柱(30.0m×0.53mm×3.00μm); 载气为氮气(99.999%); 载气流速为 3.0mL/min; 程序升温: 柱温初始为 40℃, 保持 4min, 然后以 20℃/min 的速率升温至 200℃, 保持 3min; 进样口设置温度为 250℃; 分流比为 10:1; 检测器为氢火焰离子化检测器(FID), 设置温度为 250℃。顶空进样条件设置: 顶空瓶加热温度 120℃; 进样环温度 130℃; 传送管温度 140℃; 平衡时间 20min; 进样时间为 1min; 进样环体积为 1mL。

1.3 溶液的配制

1.3.1 标准贮备液的配制

精密移取 400μL 异丙醇、320μL 乙酸甲酯、350μL 乙酸乙酯、65μL 甲苯和 285μL 二甲亚砷, 置于装有适量甲醇的 25mL 量瓶中, 用甲醇稀释到刻度, 混匀, 作为标准贮备液。

1.3.2 标准溶液的配制

精密量取贮备液 1mL 置 25mL 量瓶中, 用甲醇稀释到刻度, 摇匀, 作为标准溶液。

2 结果

2.1 方法专属性考察

取标准溶液按和空白溶液按上述色谱条件进行测定, 色谱分离图谱见图 1。空白溶剂峰不干扰残留溶剂的测定, 各残留溶剂的分离度均大于 1.5。

2.2 线性关系试验

精密移取贮备液 0.5、0.8、1.0、1.5、2.0mL 置 25mL 量瓶中, 用甲醇稀释到刻度, 混匀, 制成一系列浓度的对照品溶液。分别取 2mL 溶液加入到顶空瓶中,

密封,进样 1mL,记录色谱图,以峰面积为纵坐标(Y),对照品浓度为横坐标(X),进行线性回归。计算得回归方程:异丙醇在 0.2512~1.0048mg/mL 浓度范围内, $Y=13.81+766.67X$, $r=0.999$ 、乙酸甲酯在 0.2489~0.9956mg/mL 浓度范围内, $Y=11.21+888.30X$, $r=0.997$ 、乙酸乙酯在 0.2520~1.008 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, $Y=14.34+1058.76X$, $r=0.999$ 、甲苯在 0.04505~0.1802mg/mL 浓度范围内, $Y=8.68+2711.31X$, $r=0.997$ 、二甲亚砜在 0.2508~1.0032mg/mL 浓度范围内, $Y=2.12+129.35X$, $r=0.999$ 。结果表明:5种溶剂线性关系良好。

2.3 精密度试验

取标准溶液 2mL 置 10mL 顶空瓶中,密封,连续进样 5 次,计算异丙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲苯和二甲亚砜峰面积的 RSD 分别为 3.30%、2.66%、3.35%、3.60%、2.79% ($n=5$)。

2.4 最小检测限试验

用对照品溶液,采用逐步稀释法至信噪比约为 3 时,异丙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲苯和二甲亚砜的最小检测浓度分别为 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 回收率试验

取 DT 样品(01 批)约 200mg 共 6 份,精密称定,置 10mL 顶空瓶中,分别加入 2.0mL 标准溶液,密封进样。计算异丙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲苯和二甲亚砜平均回收率($n=5$)分别为 107.18%、103.55%、105.42%、101.37%、101.74%; RSD 分别为 2.32%、3.82%、1.93%、7.70%、7.30%。

2.6 供试品溶液的测定

取本品约 200mg,精密称定,置 10mL 顶空瓶中,加甲醇 2mL 溶解,加塞密封,进样,记录色谱图,按外标法计算供试品中异丙醇、乙酸甲酯、乙酸乙酯、甲苯和二甲亚砜的残留量。结果见表 1,样品色谱图谱见图 1。

表 1 三批样品溶剂残留量测定结果

批号	异丙醇检出量	乙酸甲酯检出量	乙酸乙酯检出量	甲苯检出量	二甲亚砜检出量
01	462 ppm	280 ppm	1112 ppm	未检出	560 ppm
02	458 ppm	373 ppm	719 ppm	未检出	569 ppm
03	434 ppm	372 ppm	655 ppm	未检出	430 ppm

3 讨论

药物中的残留溶剂是指在合成原料药或制剂生产的过程中使用或产生的挥发性有机化学物质,它们在实际的生产中未能被完全清除。近年来,药品中残存的有机溶剂的毒性和致癌作用日益引起重视。根据新药审批的要求,对合成中使用到的第一、二、三类溶剂均要进行测定。

顶空进样分析的优点是:①无非挥发性组分对进样口和色谱柱的污染;②增加了挥发性被分析物的灵敏度,可分析固体以及液体样品中的挥发性物质;③灵敏度高,能进行准确的定量分析。

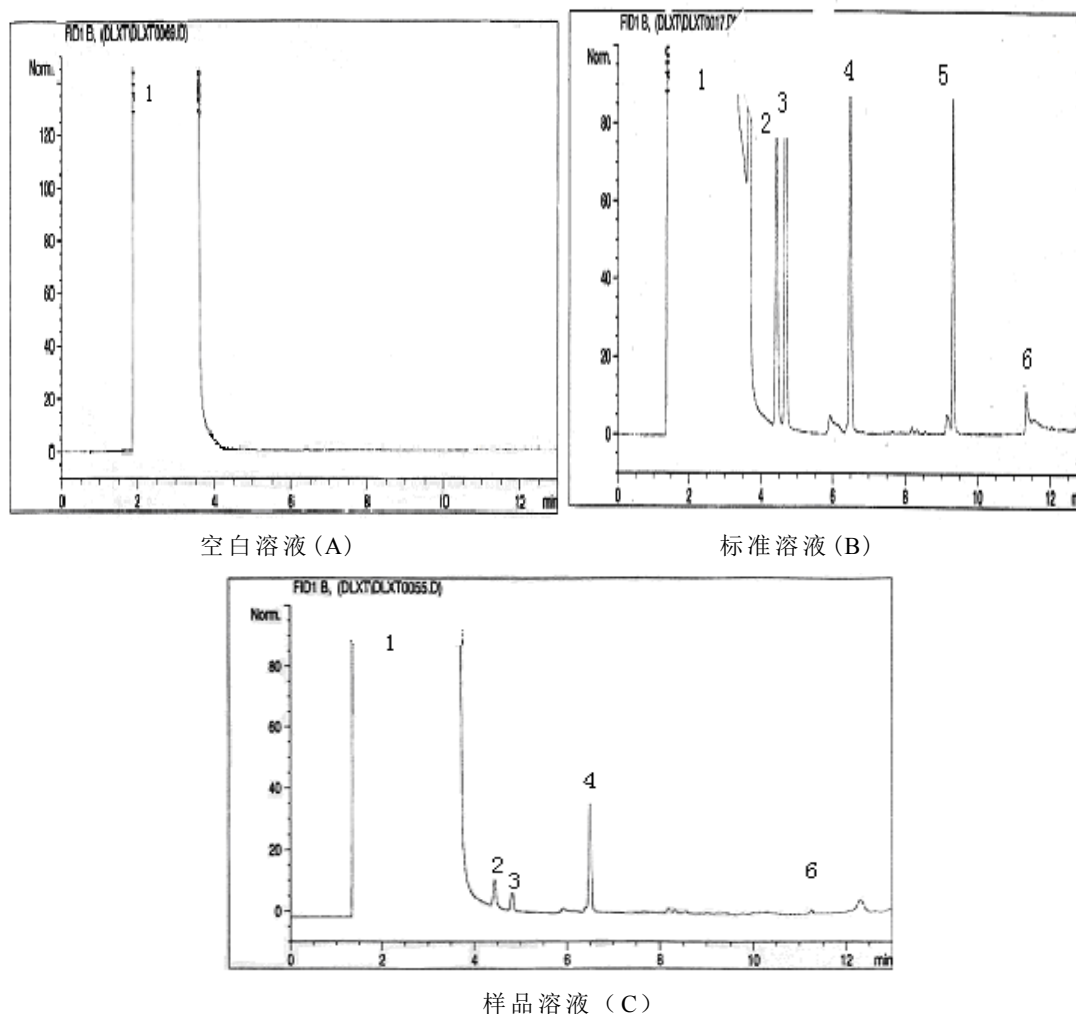


图1 空白溶液(A)、标准溶液(B)与样品溶液(C)的色谱图

1. 空白溶剂-甲醇 2. 异丙醇 3. 乙酸甲酯 4. 乙酸乙酯 5. 甲苯 6. 二甲亚砜

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M] 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 54。

Headspace GC Determination of Residual Organic Solvents in DT

CAI Zhen-hua LI Yue-peng JIANG Qing-feng

(Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193)

Abstract: Objective: To establish a method for determining the residual organic solvents in DT. Methods: The residual organic solvents were quantitatively determined by temperature programmed using headspace injector and a flame-ionization detector. The capillary column was HP-624. The initial column temperature was kept at 40°C for 4min, then raised to 200°C at the rate of 20°C/min. Results: There was a good liner in the experimental concentration. The average recoveries were 107.18%, 103.55%, 105.42%, 101.37%, 101.74%. Conclusion: The proposed method is easily operative and simple, accurate and rapid with good sensitivity.

Key Words: Headspace; GC; DT; residual organic solvents

顶空气相色谱法测定 HHL 中大孔树脂 有机溶剂残留量

金松子¹, 胡佰艳², 蔡振华¹ 蒋庆峰¹

(1. 天津药物研究院 分析测试中心 300193;

2. 河南大学药学院, 开封, 475001)

大孔吸附树脂(maeroporou resin)是20世纪60年代末发展起来的一类有机高聚物吸附剂, 具有多孔网状结构和较好的吸附性能^[1]。近年来, 大孔吸附树脂已广泛用于制剂和天然植物中活性成分(如皂苷、总黄酮、内酯、生物碱等大分子化合物)的提取分离与纯化, 但大孔树脂在制造过程中, 能带来少量的苯、二甲苯、苯乙烯等一些有机有害成分, 从而造成被提取、纯化出来的提取物中有有害物质残留的风险。因此, 建立大孔树脂有机溶剂的检测方法很有必要。

中药HHL是玄参科植物的干燥根茎, 具有清湿热、除骨蒸、消痞热等功效^[2]。在HHL提取物的制备工艺中使用了苯乙烯骨架型大孔吸附树脂。根据国家食品药品监督管理局的要求, 这种吸附树脂应检测的残留有机物主要有7种: 正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙基苯和二乙基苯, 同时在提取制备过程中使用到乙醇、乙酸乙酯和正十二烷也应检测。本文采用气相色谱法测定HHL中大孔树脂有机溶剂以及提取过程中使用到的有机溶剂残留物, 其线性、回收率较好, 灵敏度高。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP 6890N 气相色谱仪, Agilent 7694E 顶空进样器, 氢火焰离子化检测器(FID), 载气为氮气(99.999%), DM-624 毛细管柱(30.0m×0.53mm×3.00μm)(6%-氰丙基苯-94%-二甲基硅氧烷共聚物); 乙醇、乙酸乙酯、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙基苯、二乙基苯、正十二烷、N, N-二甲基甲酰胺(分析纯)、蒸馏水。样品共5批, 由天津药物研究院提供。

1.2 顶空条件

取2mL溶液于10mL顶空瓶中, 顶空平衡温度为80℃, 平衡时间50min, 轻微振荡, 进样体积1mL。

1.3 色谱条件

柱温采用程序升温: 以40℃维持5分钟, 以6℃/min的升温速率升温至190℃, 维持10分钟, 再以10℃/min的升温速率升温至200℃, 维持1分钟。气化室温度为250℃, 载气(氮气)流速为2.5mL/min, 分流比1:1, 氢火焰离子化检测器(FID), 检测器温度为250℃, 进样量为1mL。

1.4 溶液的配制

分别精密移取乙醇2.2ml、正己烷11μL、乙酸乙酯1.9mL、苯(1→10, 用二甲基甲酰胺稀释)8μL、甲苯8μL、二甲苯7μL、苯乙烯8μL、二乙基苯8μL、二乙基苯7.5μL、正十二烷9μL到装有适量二甲基甲酰胺的100mL量瓶中, 用二甲基甲酰胺稀释到刻度, 混匀, 即得标准贮备液; 精密量取此液5mL置装有适量50%二甲基甲酰胺水溶液的50mL量瓶中, 用50%二甲基甲酰胺水溶液稀释到刻度, 混匀, 即得标准溶液。

2 结果

2.1 标准曲线的绘制

取标准溶液 2mL 置 10mL 顶空瓶中，加盖密封。按上述色谱条件进行测定。各溶剂的残留限度及保留时间见下表 1。

表1 溶剂的残留限度及保留时间

溶剂	残留限度 (ppm)	保留时间 (min)
乙醇	5000	5.906
正己烷	20	9.209
乙酸乙酯	5000	10.852
苯	2	12.791
甲苯	20	17.099
二甲苯	20	20.305、20.555
苯乙烯	20	21.413
二乙基苯	20	25.682、25.871、26.132
二乙烯基苯	20	26.828、27.065、27.732、28.073
正十二烷	20	28.678

分别移取标准贮备液2.0、4.0、5.0、6.0、10mL置50mL量瓶中，用50%二甲基甲酰胺水溶液稀释到刻度，混匀。取01批样品700mg共5份，精密称定，分别依次加入上述标准溶液，密封后混匀，进行测定。分别取2mL溶液加入到顶空瓶中，密封，进样1mL。以各溶剂峰的峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归，结果见表2。

表2 线性范围与回归方程

溶剂	限度范围 (µg/ml)	回归方程	相关系数
乙醇	0.6943~3.4272	$Y=1406.450+1367.262X$	$r=0.998$
正己烷	0.0028~0.0148	$Y=17.876+35168.878X$	$r=0.999$
乙酸乙酯	0.6840~3.4200	$Y=1459.119+2983.788X$	$r=0.994$
苯	0.0002~0.0014	$Y=3.397+10922.872X$	$r=0.990$
甲苯	0.0028~0.0138	$Y=17.889+7036.450X$	$r=0.987$
二甲苯	0.0027~0.0136	$Y=8.538+3310.874X$	$r=0.989$
苯乙烯	0.0028~0.0138	$Y=9.195+3075.932X$	$r=0.983$
二乙基苯	0.0028~0.0138	$Y=4.458+1887.348X$	$r=0.991$
二乙烯基苯	0.0028~0.0138	$Y=8.121+994.505X$	$r=0.993$
正十二烷	0.0026~0.0134	$Y=14.208+1896.341X$	$r=0.994$

2.2 精密度的测定

取 01 批样品 700mg 共 6 份，精密称定，分别加入标准溶液 2mL 置 10mL 顶空瓶中，密封后混匀。连续进样 6 次。计算乙醇、正己烷、乙酸乙酯、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙基苯、二乙烯基苯、正十二烷的峰面积的 RSD 为 5.19%、10.27%、8.48%、8.70%、8.08%、6.84%、5.45%、6.36%、3.52%、13.92%。

2.3 样品中残留溶剂的回收率

分别取标准贮备液 4.0mL、5.0mL、6.0mL 置装有适量 50%二甲基甲酰胺水溶液的 50mL 量瓶中，用 50%二甲基甲酰胺水溶液稀释到刻度，摇匀，配成已知浓度的标准溶液。

取 01 批样品 700mg 共 9 份，精密称定，分别加入上述标准溶液，密封后混匀，进行测定。在此试验条件下，乙醇、正己烷、乙酸乙酯、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙基苯、

二乙烯基苯、正十二烷的回收率分别为 102.76%、101.66%、106.26%、104.83%、106.28%、101.41%、103.72%、103.79%、100.72%、108.30。RSD 分别为 4.41%、7.62%、6.05%、5.96%、6.91%、10.78%、4.74%、6.65%、5.16%、10.06%。

2.4 最小检测限试验

取标准溶液用溶剂逐步稀释，以信噪比 $S/N=3$ 计算检测限。在此试验条件下，乙醇、正己烷、乙酸乙酯、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙基苯、二乙烯基苯、正十二烷的最小检测浓度分别为 $1.74\mu\text{g/mL}$ 、 $0.07\mu\text{g/mL}$ 、 $0.34\mu\text{g/mL}$ 、 $0.07\mu\text{g/mL}$ 、 $0.07\mu\text{g/mL}$ 、 $0.68\mu\text{g/mL}$ 、 $0.14\mu\text{g/mL}$ 、 $0.69\mu\text{g/mL}$ 、 $1.38\mu\text{g/mL}$ 、 $0.67\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 样品测定

精密称取 01 批样品 700mg 置顶空瓶中，加 2mL 标准溶液，加盖密封，溶解混匀，即为加样标准溶液。取 01、02、03、04、05 五批样品，精密称取 700mg 到顶空瓶中，加 50% 二甲基甲酰胺水溶液 2mL 溶解混匀，加盖密封，按上述色谱条件以外标法进行测定。结果见表 3。

五批样品中正己烷、苯、二乙基苯、二乙烯基苯、正十二烷均未检出，而所检出的乙醇、乙酸乙酯、甲苯、二甲苯、苯乙烯含量均符合中国药典 2005 年版标准。样品色谱图见图 1。

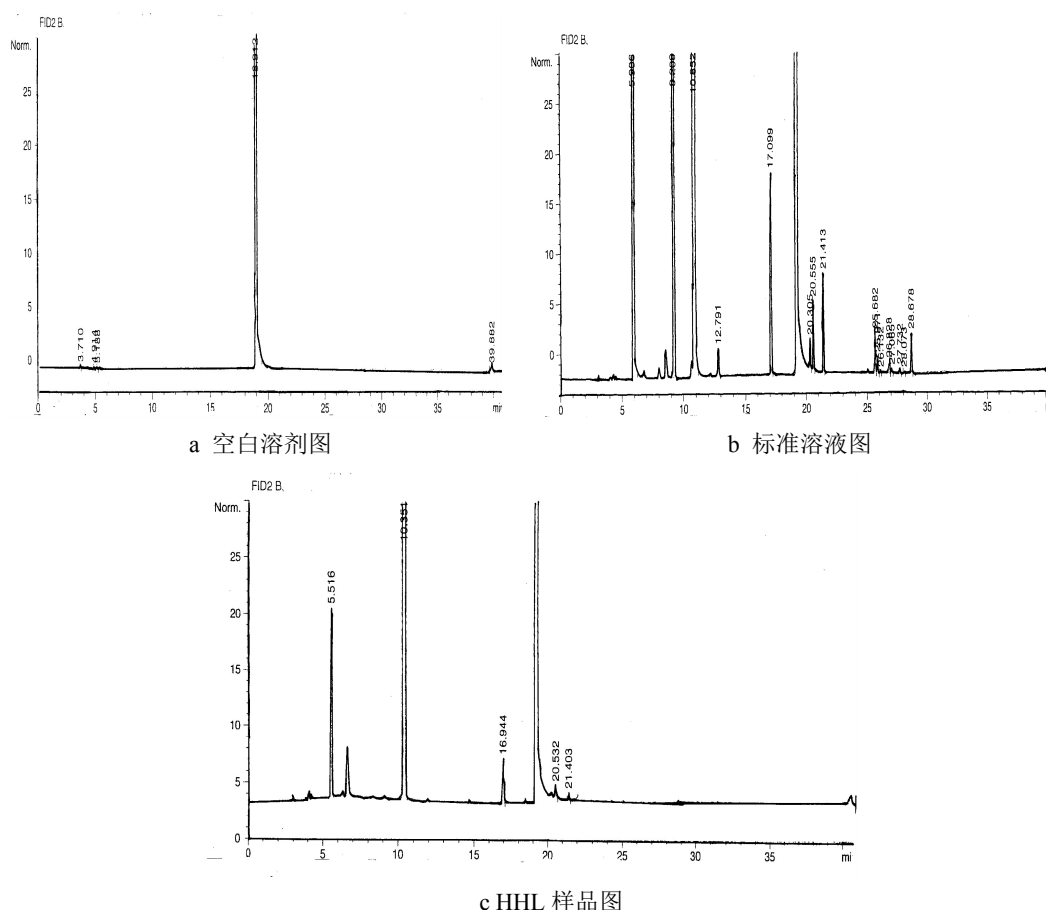


图 1 残留溶剂测定的气相色谱图

表3 三批样品溶剂残留量测定结果

批号	含量				
	乙醇	乙酸乙酯	甲苯	二甲苯	苯乙烯
01	200ppm	1700ppm	7.5ppm	4.3ppm	2.6ppm
02	260ppm	1600ppm	7.4ppm	4.2ppm	2.6ppm
03	240ppm	1600ppm	7.3ppm	4.4ppm	2.7ppm
04	330ppm	1600ppm	7.1ppm	4.0ppm	2.9ppm
05	250ppm	1500ppm	6.8ppm	3.9ppm	2.5ppm

3 讨论

大孔树脂残留物在有机溶剂(如DMF、DMSO)中的溶解性好,但采用纯有机溶剂会使这些残留物在液-气两相中的分配系数K增加,导致检测灵敏度下降。因此,采用DMF-水混合溶剂,既保证了待测残留物与样品都能溶解,又增大了残留物在顶空气体中的浓度,使分析灵敏度提高。

由于样品存在较严重的基质效应,因此,根据中国药典的相关要求,采用了标准溶液加入法以消除基质效应的影响。

参考文献

- [1] 马振山. 大孔吸附树脂在药学研究领域的应用[J]. 中成药, 1997, 19(12): 40.
 [2] 苗明三, 李振国. 现代实用中药质量控制技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 719.

Determination of macro-porous resin residua in HHL by Headspace Capillary Gas Chromatography

JIN Song-zi¹, HU Bai-yan², CAI Zhen-hua¹, JIANG Qing-feng¹

(1. Tianjin institute of Pharmaceutical Research, Tianjin, 300193, China;

2. Pharmacy college of Henan University, Kaifeng, 475001, China)

Abstract To establish a method for the detecting the residual organic solvents of macro-porous resin in HHL by headspace capillary gas chromatography. A DB-624 capillary column was used with nitrogen gas as carrier and FID as detector. Solvent media was DMF. The organic residuals including ethanol, n-hexane, acetidin, benzene, methyl-benzene, diethyl-benzene, evinyl-benzen, divinylbenzene and dodecane picrorrhiza were completely separated. There was a good linearity in the experimental concentration, The average recoveries of the 10 residua were in the range of 89.5%~110%, their RSDs were 3.54%~11.50%, and the detection limits of 0.07~1.74 μ g/ml.

Key words: HHL; Headspace GC; macro-porous resin residues

GC-MS 法评估陈皮原料品质

周德英¹, 刘志华²

(1. 天津中新药业隆顺榕制药厂, 天津 300457; 2. 河北工业大学化工学院, 天津 300130)

陈皮 (*Pericarpium citri reticulatae*) 为芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 药材分为“陈皮”和“广陈皮”。陈皮气香, 味辛、苦, 性温。具有理气健脾、燥湿化痰的功能^[1], 主要含挥发油、黄酮类、生物碱、肌醇等成分。挥发油中主要含柠檬烯 (Limonene), 黄酮类主要为橙皮苷 (Hesperidin)^[2]。陈皮挥发油对胃肠道有温和的刺激作用; 对呼吸道有刺激性被动祛痰的作用。其醇提物平喘效果较好^[3]。除配方使用外, 还是多种理气健脾和燥湿化痰类中成药的重要组成药味。近年来随着先进的仪器分析手段, 如气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 等引入中医药领域, 陈皮的化学成分进一步明确。

陈有根等通过气相色谱-质谱法研究了不同产地陈皮所含挥发油成分含量差异^[4]。易伦朝等用同样方法验证了“陈久者良”的说法^[5]。严寒静等对广陈皮挥发油成分分析, 也鉴定了茶枝柑中 20 种化学成分, 行柑中 11 种化学成分^[6]。宋辉和史东恒分别对陈皮的炮制和加工工艺进行了研究, 获得了最佳炮制工艺和根据临床需要进行陈皮炮制的改进方法, 有效提高了有效成分的提取率^{[7][8]}。目前还没有文献报导有关市售陈皮有效成分批间差异和根据该差异控制陈皮的内在品质和根据临床需要进行品质鉴定的方法。使用气相色谱-质谱联用的方法分析药用植物有效成分的指纹图谱法正在逐步成为目前控制药用植物材料及其制剂质量的重要手段。本文使用上述方法对三批市售陈皮的挥发油成分进行了初步分析, 这些结果对制定陈皮原料及以陈皮为原料的制品标准提供了重要线索, 尤其在药用植物有效成分的提取和质量控制上有着现实意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

菲尼根 TRACE-DSQ 型气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS), DB-5 弹性石英毛细管色谱柱。

1.2 材料

试验所用材料陈皮为市售样品, 根据不同采样点, 分别把样品编为三个批号, 它们分别是样品 061208、样品 070415 和样品 070324。本文所用试剂均为国产色谱纯。

2 实验方法及结果

2.1 挥发油的提取

按中国药典 (2005 年版) 附录 XD 挥发油测定法甲法提取挥发油^{[1]XD57}, 收集备用。从不同样品里提取的挥发油分别按照其原料批号命名为提取物 061208, 提取物 070415, 提取物 070324。出油率分别为 1.22%, 1.36%, 1.27%。

2.2 GC-MS 分析条件

色谱柱为 DB-5 弹性石英毛细管柱 (50m×0.25mm×0.25 μm), 初始温度 40℃, 停留 3.5 min; 程序升温 5℃至 240℃用时 14 min, 240℃保持 8 min; 气化室温度 250℃; 进样量 0.05 μl; 分流比 30:1; 载气为高纯氦气, 接口温度为 200℃。质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 200℃, 电子能量 70eV, 扫描质量范围 40~500u。标准图库 NIST, 16 万张。

作者简介: 周德英 (1974-), 女, 天津人, 高级工程师, Tel: 022-25291184, E-mail: zhoudeying7477@eyou.com

2.3 供试品液的制备

把上述三种挥发油提取物分别用无水硫酸钠干燥所得产品分别命名为供试品 061208, 供试品 070415 和供试品 070324。

2.4 重复性、稳定性和重现性试验

取供试品 061208 进行分析, 连续重复进样 5 次, 获得 10 个特征峰 (面积归一化浓度大于 0.5%) 且每个峰相对保留时间 RSD 均小于 0.5%, 相对含量 RSD 均小于 2%, 数据结果表明仪器及色谱条件精密度良好, 适合本样品的检测。

取供试品 061208 放置于室温, 分别于 1、2、4、8、24h 进样, 每次检测出现的 10 个特征峰相对保留时间 RSD 均小于 0.5%, 相对含量 RSD 均小于 2%, 这些数据结果表明样品在 24 小时内取供试品液 061208 成分无显著变化, 样品稳定性较好。

取样品 061208, 将其分为 5 份, 分别提取挥发油后, 得到五种供试品液, 分别命名为供试品 061208-1, 供试品 061208-2, 供试品 061208-3, 供试品 061208-4, 供试品 061208-5。把这五种供试品液分别按照 2.2 的条件上样分析, 每个供试品都出现 10 个特征峰。五种供试品的 10 个特征峰相对保留时间 RSD 均小于 0.5%, 相对含量 RSD 均小于 2%, 数据结果表明陈皮挥发油的提取方法和检测重现性良好, 建立的方法可以作为陈皮的指纹图谱质量标准。

3. 样品的检测

把从 2.3 得到的三种供试品液分别按上述方法分别进样分析, 每个供试品液的 10 个主要成分的 (面积归一化浓度 0.5% 以上) 相对含量见表 1, 供试品 061208 的挥发油 GC 指纹图谱见图 1。

表 1 不同批次陈皮样品挥发油主要成分相对含量 (%)

批号 峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
061208	2.62	0.64	1.48	1.65	9.90	73.45	1.94	2.16	2.31	1.49	97.64
070415	6.43	0.51	5.31	2.14	10.82	58.33	0.59	3.54	6.71	3.03	97.41
070324	4.72	1.47	0.67	1.02	4.36	78.53	3.85	0.56	2.81	0.75	98.74

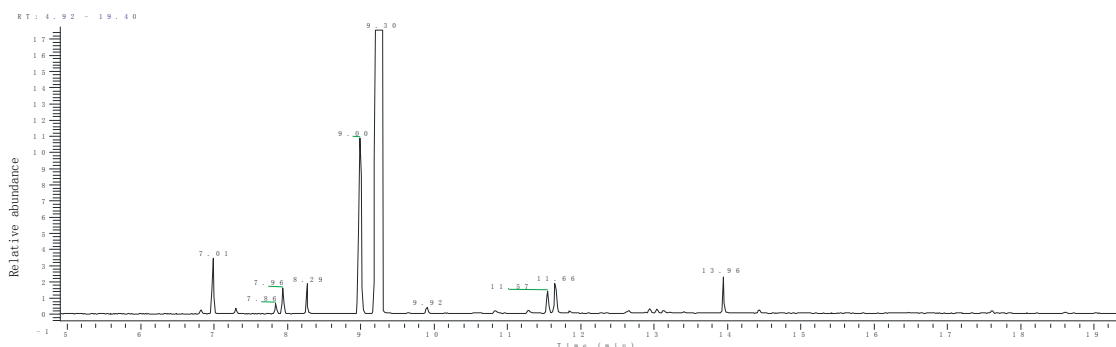


图 1 供试品 061208 挥发油气相色谱指纹图谱

4. 主要色谱峰分析

用菲尼根 TRACE-DSQ 型气相色谱-质谱联用仪检测并分析供试品 061208, 然后对检测到的 10 个特征色谱峰进行鉴别, 结果如表 2 所示。

5 结论与讨论

经实验研究建立的指纹图谱重复性良好, 稳定性和重现性能够满足实验要求, 通过对不同批次的陈皮挥发油气相色谱图进行分析, 发现有 10 个共有峰含量较高, 特征明显, 具有

代表性, 他们的峰位和大致的比例关系, 能够作为一个整体, 较清楚地显示出指纹图谱的特有属性, 适合作为评价指标峰进行品质的鉴定, 样品之间的差异未影响指纹图谱的整体特征。

使用气相色谱-质谱联用的方法分析药用植物有效成分的指纹图谱法正在逐步成为目前控制药用植物材料及其制剂质量的重要手段。通过对 10 个共有化学成分之间比例的测定确定了陈皮原料的品质鉴定方法, 建立了原料的质量标准。这些结果对制定陈皮原料及以陈皮为原料的制品标准提供了重要线索, 尤其在药用植物有效成分的提取和质量控制上有着现实意义。

表 2 陈皮(061208)挥发油 GC-MS 分析结果

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
保留时间	7.01	7.86	7.96	8.29	9.00	9.30	9.92	11.57	11.66	13.96
分子式	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₄	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₉ H ₁₁ NO ₂
分子量	136	136	136	136	134	136	136	154	154	151
化合物名称	α-蒎烯 2, 6, 6-三甲 基二环- (3, 1, 1)-2- 庚烯	β-蒎烯 6, 6-二 甲基-2- 亚甲基 降蒎烷	β-月桂 烯 7-甲 基 —3— 亚甲基 —1, 6—辛 二烯	萜品烯 1-甲基 -4-(1-甲 基乙 基)-1,3- 己二烯	对伞花 烯 1-甲基 -4-(1-甲 基乙基) 苯	柠檬烯 1-甲基 -1-(1- 甲基乙 烯基) 环己烯	异萜品 烯 1-甲基 -4-(1-甲 基亚乙 基)环己 烯	4-萜品醇 2-(4-甲基 -3-环己烯 基)-2-丙醇	α-松油醇 (S)-α,α-4- 三甲基-3- 环己烯-1- 甲醇	2-甲氨基- 苯甲酸甲 酯

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. [S]中华人民共和国药典 2005 版(一部).北京:化学工业出版社, 2005:30-31.
- [2] 欧立娟,刘启德. [J]陈皮药理作用研究进展.中国药房. 2006, 17(5):787-788.
- [3] 张志海,王彩云,杨天鸣等. [J]陈皮化学成分及药理作用研究进展.西北药学杂志,2005,20(1):47.
- [4] 陈有根,范崔生. [J]4 种陈皮药材挥发油成分的研究.江西中医学院学报,1998,10(2):79-80.
- [5] 易伦朝,谢培山,梁逸曾. [J]GC-MS 和 HPLC 对陈皮“陈久者良”的验证.中国药学杂志,2005,40(21):1610-1612.
- [6] 严寒静,房志坚,黄宁,等. [J]中药陈皮挥发油的成分分析.广东药学,2001,11(1):17-18
- [7] 宋辉,陈友国. [J]用正交试验探讨陈皮的炮制.中药材,1993,16(9):23-24.
- [8] 史东恒,张锡耀. [J]切制陈皮.中国中药杂志,1992,17(8):447-478.

Detection of Essential Oils from Pericarpium Citri Reticulatae by GC-MS

ZHOU De-ying¹, LIU Zhi-hua²

(1.Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Longshunrong Manufactory,Tianjin 300457,China;

2. School of Chemical Engineering, Hebei Industrial University, Tianjin 300130,China)

Abstract: [Objective]The main component of Pericarpium citri reticulatae is essential oils. It is necessary to establish the quantitative determination on Pericarpium citri reticulatae content. [Method]The essential oil was analyzed quantitatively and qualitatively on GC-MS instrument; For controlling the quality, GC fingerprint of essential oil from Pericarpium citri reticulatae was set up.[Results]Ten compounds including limonene were identified in three samples sold in the market. [Conclusion] The fingerprint and percentage of limonene can help distinguish the quality and assess the differences of Pericarpium citri reticulatae.

Key words: Pericarpium citri reticulatae;Essential oils;GC fingerprint

超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取陈皮挥发油的化学成分比较

周德英¹, 刘志华²

(1. 天津中新药业隆顺榕制药厂, 天津 300457; 2. 河北工业大学化工学院, 天津 300130)

陈皮 (*Pericarpium citri reticulatae*) 为芸香科植物橘 (*Citrus reticulata* Blanco) 及其栽培变种的干燥成熟果皮, 药材分为“陈皮”和“广陈皮”。具有理气健脾、燥湿化痰的功能^[1], 主要含挥发油、黄酮类、生物碱、肌醇等成分。挥发油中主要含柠檬烯 (Limonene), 黄酮类主要为橙皮苷 (Hesperidin)^[2]。陈皮挥发油对胃肠道有温和的刺激作用; 对呼吸道有刺激性被动祛痰的作用。陈皮煎剂对支气管有微弱的扩张作用, 其醇提物平喘效果较好^[3]; 对心脏有兴奋作用, 能增强心肌收缩力、扩张冠状动脉、升高血压提高机体应激能力; 陈皮提取液具有延缓衰老及提高生命活力的作用, 可能与抗氧化有关。近年来随着先进的化学分析仪器, 如气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 等引入中医药领域。

超临界萃取技术是一项集提取、分离、浓缩为一体的新技术。尤其 CO₂ 无色无毒, 廉价易得, 临界压力低, 并且临界温度也接近常温, 因此超临界 CO₂ 萃取技术在药用植物有效成分提取工艺改进中得到越来越广泛的应用^[4-6]。本实验分别采用了超临界 CO₂ 萃取 (SCDE) 法和水蒸气蒸馏 (SD) 法从陈皮中提取挥发油, 并用 GC-MS 法对两种不同提取方法获得的提取物进行化学成分定性和定量比较。

1 仪器与样品

1.1 仪器

HA121-50-01 型超临界萃取装置, 江苏南通华安超临界萃取有限公司生产; 多功能提取器, 衡阳市金山中药设备制造有限公司生产; 菲尼根 TRACE-DSQ 型气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS), 美国热电公司。

1.2 样品

陈皮为市售样品。处理方法为粉碎后过 1 号筛。

2 实验方法

2.1 超临界 CO₂ 萃取法 取 200g 样品装入萃取釜中。在萃取压力 15Mpa, 萃取温度为 40℃, CO₂ 流量为 18 L/h, 选用 90% 的乙醇为夹带剂的条件下萃取 2h, 收集陈皮挥发油。重复 3 次, 计算平均出油率。

2.2 水蒸气蒸馏法 取 200g 样品, 按中国药典 (2005 版) 附录挥发油测定法甲法提取挥发油^[2]。重复 3 次, 计算平均出油率。

2.3 GC-MS 分析条件 气相色谱: 色谱柱为 DB-5 弹性石英毛细管柱 (50m×0.25mm×0.25um), 初始温度 50℃, 停留 3 min; 程序升温 20℃/min 至 250℃, 保持 5 min; 气化室温度 260℃; 进样量 0.05 μl; 分流比 30:1; 载气为高纯氦气。质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 200℃, 电子能量 70eV, 扫描范围 30~500u。标准质谱图库 NIST(16 万张)。

3 结果

3.1 不同提取方法对陈皮油出油率的影响

作者简介: 周德英 (1974-), 女, 天津人, 高级工程师, Tel: 022-25291184, E-mail: zhoudeying7477@eyou.com

不同提取方法对陈皮挥发油出油率和性状的影响如表 1 所示。由表 1 可见，SCDE 法提取陈皮挥发油所需时间较短，SD 法所需时间较长；而前者出油率是后者的 1.30 倍，分别为 1.67% 和 1.28%；两种提取方法所得到的陈皮挥发油的性状也不同，使用前者提取得到的是浅黄色油状物，使用后者提取得到的是几乎无色油状物。

表 1 SCDE 法与 SD 法提取广藿香油对比

提取方法	提取时间/h	出油率%	性状
SCDE	2	1.67	浅黄色油状物
SD	8	1.28	几乎无色油状物

3.2 不同提取方法所得提取物中化学成分的定性和定量比较

按 2.3 所述 GC-MS 条件对两种提取方法所得产物进行分析，得总离子流图，如图 1 和图 2 所示。运用色谱数据处理系统，对陈皮挥发油各组分进行面积归一化可得各组分相对含量。

SCDE 法提取的陈皮挥发油中共分离出 11 种相对含量大于 0.5% 的化合物，该 11 种化合物峰面积之和占色谱出峰总面积的 99% 以上，且均可得到质谱鉴定。SD 法提取的陈皮挥发油中共分离出 10 种相对含量大于 0.5% 的化合物，该 10 种化合物峰面积之和占色谱出峰总面积的 97% 以上，也可得到质谱鉴定。

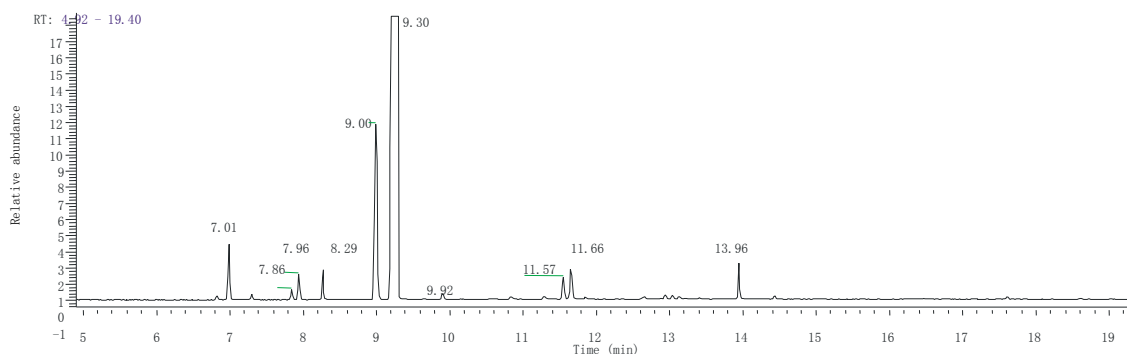
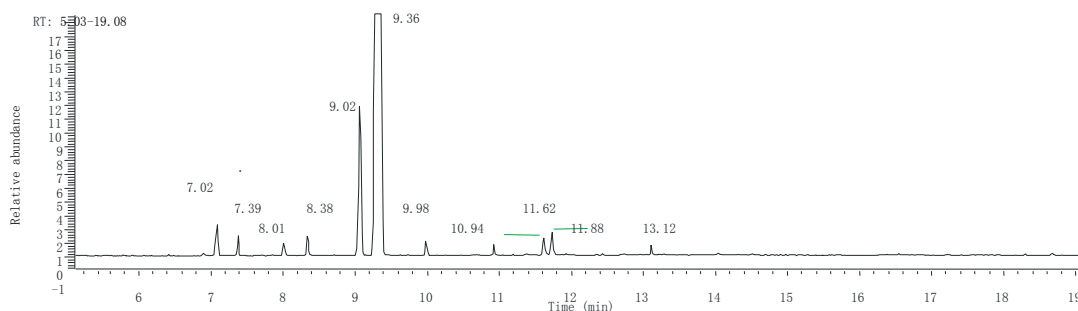


图 1 陈皮蒸馏产物的气相色谱-质谱总离子流图

图 2 陈皮超临界 CO₂ 萃取产物的气相色谱-质谱总离子流图

两种提取方法所得化合物成分定性及每种化合物相对含量对比如表 2 所示。4 讨论

两种提取方法得到的挥发油的组分及含量相差较大，面积百分含量大于 0.5% 的物质有十余种，并且各成分的含量也相差较大。运用 SCDE 法提取所能得到的 β -水芹烯，石竹烯虽含量较低，但 SD 法提取时均未检出（相对含量低于 0.5%）；运用 SD 法提取所能得到的 β -蒎烯，2-甲氨基-苯甲酸甲酯在 SCDE 法提取时也未检出。运用 SCDE 法所提取到的陈皮挥发油中沸点高，相对分子质量较大的成分比 SD 法多。SCDE 法提取过程在密闭系统中进行，且操作温度低，因此烯类成分不易损失，热不稳定成分及易氧化的组分也不会受到破坏，

出油率也高于 SD 法 1.30 倍。从出油率和成分定性定量结果上分析, SCDE 法提取过程优于 SD 法提取过程。

表 2 超临界 CO₂ 萃取法和水蒸气蒸馏法提取得到陈皮挥发油化学成分对比

序号	保留时间		化合物名称	分子式	分子量	百分含量%	
	SCDE	SD				SCDE	SD
1	7.02	7.01	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	2.23	2.92
2	7.39		β-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.89	未检出
3		7.86	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	未检出	0.64
4	8.01	7.96	β-月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.73	1.48
5	8.38	8.29	萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.46	1.65
6	9.02	9.00	对伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	135	10.25	9.90
7	9.36	9.30	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136	76.75	73.45
8	9.98	9.92	异萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.95	0.64
9	10.94		石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.58	未检出
10	11.66	11.57	4-萜品醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.74	2.66
11	11.88	11.66	α-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	2.15	2.81
12	13.12		γ-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.51	未检出
13		13.96	2-甲氨基-苯甲酸甲酯	C ₉ H ₁₁ O ₂	151	未检出	1.49
面积百分含量(合计)						99.27	97.64

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. [S]中华人民共和国药典 2005 版(一部).北京:化学工业出版社, 2005:30-31
- [2] 欧立娟,刘启德. [J]陈皮药理作用研究进展.中国药房, 2006, 17(5):787-788.
- [3] 张志海,王彩云,杨天鸣. [J]陈皮化学成分及药理作用研究进展.西北药学杂志,2005,20(1):47
- [4] 张杰. [J]浅谈超临界 CO₂ 萃取技术.黑龙江医药科学,2007,30(1):22-23
- [5] 王忠华,张钟宪. [J]超临界二氧化碳萃取技术.化学工程与装备,2007,20(1):57-59
- [6] 董新艳,张兴儒. [J]超临界萃取技术在中草药研究中的应用.青海大学学报(自然科学版),2005,23(3):15-18

Comparison of Essential Oils from Pericarpium Citri Reticulatae by

Supercritical CO₂ Extraction and Stream Distillation

ZHOU De-ying¹, LIU Zhi-hua²

(1.Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Longshunrong Manufactory,Tianjin 300457,China; 2. School of Chemical Engineering, Hebei Industrial University, Tianjin 300130,China)

Abstract: [Objective] To compare essential oil from Pericarpium citri reticulatae by different extract techniques. [Method] Essential oils were extracted by supercritical CO₂ extraction and stream distillation. The chemical components of essential oil were analyzed on GC-MS instrument. [Result] The extraction yield was 1.67% by SCDE and 1.28% by SD. The result of GC-MS analysis showed that 11 components of the essential oil by SCDE composed about 98% of the total, and 10 components by SD composed about 97% of the total. Relative content of main component limonene is 72.40% by SCDE and 80.75% by SD. [Conclusion] The extraction yield and the chemical components of the essential oils between two methods are different obviously.

Key words: Pericarpium citri reticulatae;Supercritical CO₂ extraction;Stream distillation;GC-MS

超临界 CO₂ 萃取法与蒸馏法提取 连翘挥发油的成分比较

周德英¹, 刘志华²

(1. 天津中新药业隆顺榕制药厂, 天津 300457; 2. 河北工业大学化工学院, 天津 300130)

连翘 (*Fructus forsythiae*) 为木樨科植物连翘 (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl) 的干燥果实, 味苦、性微寒, 归肺、心、小肠经。秋季果实初熟尚带绿色时采收除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”。连翘具有清热解毒, 消肿散结。用于痈疽, 瘰疬, 乳痈, 丹毒, 风热感冒, 温病初起, 温热入营, 高热烦渴, 神昏发斑, 热淋尿闭^[1], 主要含挥发油、黄酮类、木脂体类、三萜类等成分。连翘挥发油有抑制流感病毒的作用, 对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、白色念珠菌有明显抑制作用, 对结核杆菌也有抑制作用^{[3][4]}。孙国祥等人对连翘的 HPLC 指纹图谱进行了研究, ^[5]。近年来随着先进的挥发油提取方法和设备及化学分析仪器, 如气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 等引入中医药领域, 尤其是连翘挥发油的化学成分进一步明确, 对挥发油的提取工艺的改进有指导意义。

超临界萃取技术是一项集提取、分离、浓缩为一体的新技术。尤其 CO₂ 无色无毒, 廉价易得, 临界压力低, 并且临界温度也接近常温, 因此超临界 CO₂ 萃取技术在药用植物有效成分提取工艺改进中得到越来越广泛的应用^[6-10]。本实验分别采用了 (SCDE) 法和水蒸气蒸馏 (SD) 法从连翘中提取挥发油, 并用 GC-MS 法对两种不同提取方法获得的提取物进行化学成分定性和定量比较。

1 仪器与样品

1.1 仪器

HA121-50-01 型超临界萃取装置, 江苏南通华安超临界萃取有限公司生产; 多功能提取器, 衡阳市金山中药设备制造有限公司生产; 菲尼根 TRACE-DSQ 型气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS), 美国热电公司。

1.2 样品

连翘为市售样品。处理方法为粉碎后过 1 号筛。

2 实验方法

2.1 超临界 CO₂ 萃取法 取 200g 样品装入萃取釜中。参考王鹏^[11]等人超临界 CO₂ 萃取连翘挥发油的所述方法, 萃取压力 30Mpa, 萃取温度为 35℃, CO₂ 流量为 24 L/h, 萃取 3h, 收集连翘挥发油。重复 3 次, 计算平均出油率。

2.2 水蒸气蒸馏法 取 200g 样品, 按中国药典 (2005 版) 附录挥发油测定法甲法提取挥发油^[1]。重复 3 次, 计算平均出油率。

2.3 GC-MS 分析条件 气相色谱: 色谱柱为 DB-5 弹性石英毛细管柱 (50m×0.25mm×0.25um), 初始温度 55℃, 停留 4 min; 程序升温 20℃/min 至 280℃, 保持 5 min; 气化室温度 260℃; 进样量 0.05 μl; 分流比 30:1; 载气为高纯氦气。质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 200℃, 电子能量 70eV, 扫描范围 30~500u。标准质谱图库 NIST(16 万张)。

3 结果

3.1 不同提取方法对连翘油出油率的影响

不同提取方法对连翘挥发油出油率和性状的影响如表 1 所示。由表 1 可见, SCDE 法提取连翘挥发油所需时间较短, SD 法所需时间较长; 而前者出油率是后者的 1.12 倍, 分别为 3.89% 和 3.47%; 两种提取方法所得到的连翘挥发油的性状也不同, 使用前者提取得到的是淡黄色油状物, 微具松节油气味, 使用后者提取得到的是几乎无色油状物。

表 1 SCDE 法与 SD 法提取连翘挥发油对比

提取方法	提取时间/h	出油率%	性状
SCDE	2	3.89	淡黄色油状物
SD	8	3.47	几乎无色油状物

3.2 不同提取方法所得提取物中化学成分的定性和定量比较

按 2.3 所述 GC-MS 条件对两种提取方法所得产物进行分析, 得总离子流图, 如图 1 和图 2 所示。运用色谱数据处理系统, 对连翘挥发油各组分进行面积归一化可得各组分相对含量。

SCDE 法提取的连翘挥发油中共分离出 13 种相对含量大于 0.1% 的化合物, 该 13 种化合物峰面积之和占色谱出峰总面积的 99% 以上, 且均可得到质谱鉴定。SD 法提取的连翘挥发油中共分离出 15 种相对含量大于 0.1% 的化合物, 该 15 种化合物峰面积之和占色谱出峰总面积的 98% 以上, 也可得到质谱鉴定。

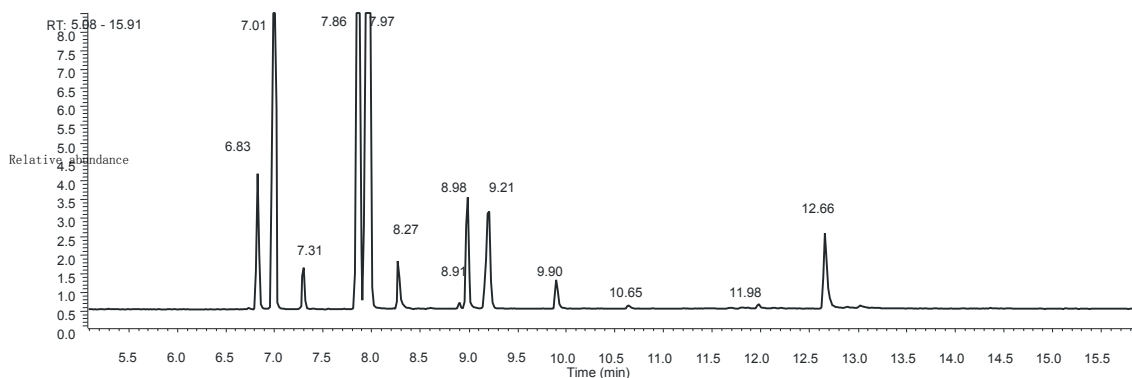


图 1 连翘超临界 CO₂ 萃取产物的气相色谱-质谱总离子流图

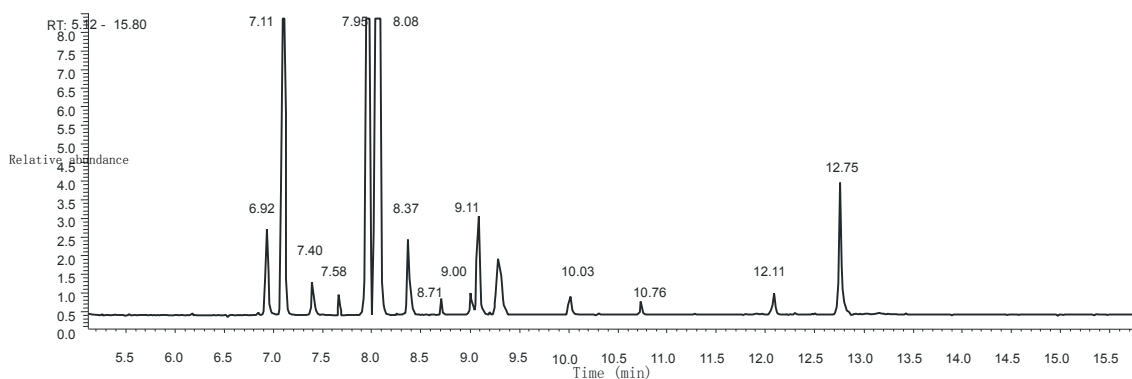


图 2 连翘蒸馏产物的气相色谱-质谱总离子流图

两种提取方法所得化合物成分定性及每种化合物相对含量对比如表 2 所示。

表2 超临界 CO₂ 萃取法和水蒸气蒸馏法提取得到连翘挥发油化学成分对比

	保留时间		化合物名称	分子式	相对分子量	百分含量%	
	SCDE	SD				SCDE	SD
1	6.83	6.92	烯烯	C ₁₀ H ₁₆	136	3.47	2.57
2	7.01	7.11	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	18.07	16.89
3	7.31	7.40	β-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.82	0.93
4		7.58	α-侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	136	<0.1%	0.51
5	7.86	7.95	β-月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136	10.05	9.35
6	7.97	8.08	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	59.12	54.30
7	8.27	8.37	对伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	134	0.81	1.26
8		8.71	苯甲醇	C ₇ H ₈ O	108	<0.1%	0.57
9	8.91	9.00	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.12	0.85
10	8.98	9.11	孟二烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.93	1.86
11	9.21	9.32	榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.91	1.65
12	9.90	10.03	α-松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.70	1.32
13	10.65	10.76	α-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.24	1.06
14	11.98	12.11	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	204	0.28	1.18
15	12.66	12.75	杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	151	2.31	3.95
面积百分含量(合计)						99.12	98.25

4 讨论

两种提取方法得到的挥发油的组分及含量相差不大,面积百分含量大于0.1%的物质分别有十余种,并且各成分的含量相差不大。运用SD法提取所能得到的α-侧柏烯,苯甲醇虽含量较低,但SCDE法提取时均未检出(相对含量低于0.1%);运用SD法提取所能得到的在SCDE法提取时均可检出。运用SCDE法所提取到的连翘挥发油中沸点低,相对分子质量较大的成分比例较SD法少。SCDE法提取过程在密闭系统中进行,且操作温度低,因此烯类成分不易损失,热不稳定成分及易氧化的组分也不会受到破坏,出油率也高于SD法1.12倍。从出油率和成分定性定量结果上分析,SCDE法提取连翘挥发油与SD法提取方法区别不大,也说明SCDE提取连翘挥发油为有效方法,只是目前还不能连续操作,如能改进SCDE提取中药挥发油为可连续操作将大大节省工作效率。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2005版(一部)[S].北京:化学工业出版社,2005,117-118.
- [2] 吴寿金,赵泰,秦永祺.现代中草药成分化学[M].中国医药科技出版社,2002,676-677.
- [3] 张海燕.连翘化学成分及药理活性的研究进展[J].中药材,2000,23(10):657.
- [4] 刘明.中药连翘药理作用的研究近况.现代医药卫生[J],2007,23(16):2438-2439.
- [5] 孙国祥,穆善学,侯志飞等.连翘的HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2007,29(2):161-163.
- [6] 张杰.浅谈超临界CO₂萃取技术[J].黑龙江医药科学,2007,30(1):22-23.
- [7] 王忠华,张钟宪.超临界二氧化碳萃取技术[J].化学工程与装备,2007,20(1):57-59.
- [8] 董新艳,张兴儒.[J]超临界萃取技术在中药研究中的应用.青海大学学报(自然科学版),2005,23(3):15-1.
- [9] 唐一梅,李仲瑾,张丽等.[J]超临界萃取技术在中药研究中的应用.西北药学杂志,2007,22(5):288-289.
- [10] 刘志华,周德英.超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法提取广藿香挥发油的化学成分比较[J].安徽农业科学,2009,37(19):8816-8817.

(下转第223页)

Nano-LC/MS/MS 鉴定组蛋白翻译后修饰

陈英, 张锴

南开大学化学学院, 天津 30071

组蛋白翻译后修饰包括---磷酸化、泛素化、乙酰化和甲基化, 这些修饰是表观遗传学的重要内容, 对染色体的结构和功能有重要的影响。目前通过特异性抗体或质谱技术等方法已经发现了组蛋白上有几十种不同的修饰。但是, 发生在组蛋白上的翻译后修饰数量预计远超过已鉴定出的量, 应该还有更多的修饰没有发现。大量的修饰具有潜在的功能响应^[1]。基于质谱技术的蛋白质组学方法是鉴定翻译后修饰位点的有力工具, 然而, 它的瓶颈在于很难从复杂样品中鉴定未知的修饰。本文, 我们以鉴定酵母中组蛋白上新的翻译后修饰为目标, 将组蛋白提纯技术、胶内酶解和 *shotgun* 技术相结合, 采用 PTMs 软件分析策略鉴定酵母组蛋白上新的翻译后修饰形式。

1 研究方法

我们以鉴定酵母菌中的组蛋白 H2B、H3 和 H4 上新的翻译后修饰形式为目标, 首先从酵母中提取出组蛋白。再采用凝胶蛋白电泳分离 (图 1), 进一步分离组蛋白混合物。通过胶内酶解技术, 将组蛋白酶解成多肽, 采用 Nano-LC/MS/MS 分析和蛋白信息化检索, 鉴定出酵母组蛋白上多种翻译后修饰。并且用质谱裂解碎片分析、免疫印记法、合成多肽的二级质谱碎片 (图 2) 比较和色谱保留分析等多种方法验证了这些修饰。

2 结果与讨论

我们鉴定出位于酵母组蛋白 H2B、H3 和 H4 多个赖氨酸位点上发生乙酰化和甲基化修饰, 同时我也发现了新的丙酰化和丁酰化修饰。通过免疫印记法、二级质谱解析和液相色谱保留分析, 验证了新发现的两种修饰形式。

联合生物信息学工具, 二级质谱的裂解碎片的信息分析, 以及色谱保留性质, 我们进一步发现了 14 个新的质量偏移, 也排除了基因突变和处理过成中化学反应的可能, 这预示着可能是一些新的修饰形式。这些修饰的化学性质还需进一步的鉴定。

3 小结

通过将 *shotgun* 策略和生物信息学相结合, 我们探索了鉴定组蛋白中新的翻译后修饰形式的方法, 并成功的在酵母组蛋白 H2B、H3 和 H4 上鉴定了未见报道的丙酰化和丁酰化修饰形式, 同时发现了一些潜在的蛋白修饰形式。

参考文献

[1] Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007, 128, (4), 693-705.

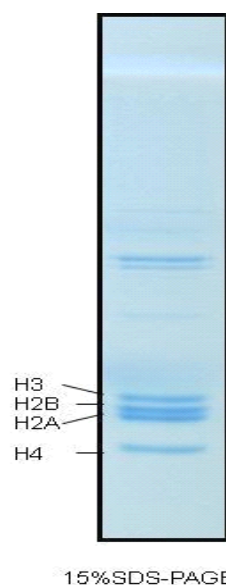


图 1 凝胶电泳分离组蛋白图

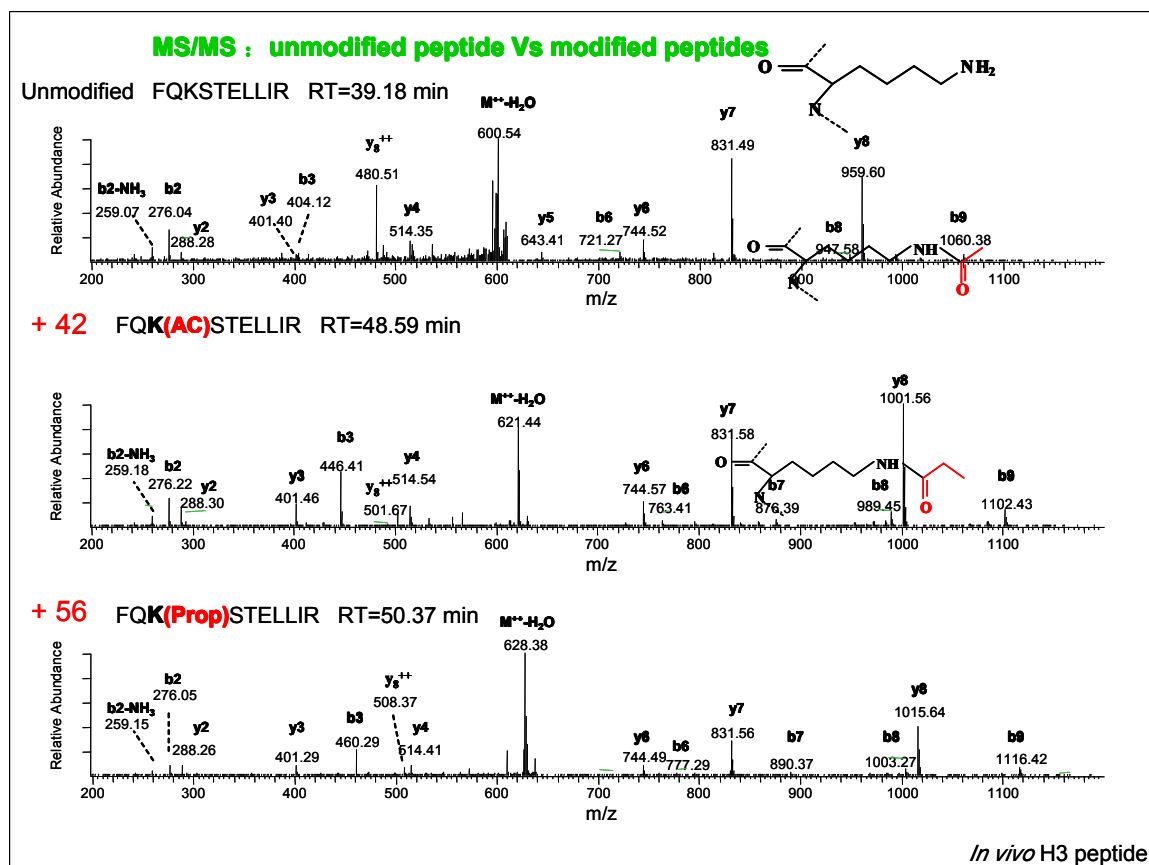


图2 乙酰化、丙酰化多肽及相应非修饰多肽二级质谱碎片

(上接第 221 页)

Comparison of Essential Oils from Fructus Forsythiae by Supercritical CO₂ Extraction and Stream Distillation

ZHOU De-ying¹, LIU Zhi-hua²

(1. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Longshunrong Manufactory, Tianjin 300457, China; 2. School of Chemical Engineering, Hebei Industrial University, Tianjin 300130, China)

Abstract: [Objective] To compare essential oil from Fructus forsythiae by different extract techniques. [Method] Essential oils were extracted by supercritical CO₂ extraction and stream distillation. The chemical components of essential oil were analyzed on GC-MS instrument. [Result] The extraction yield was 3.89% by SCDE and 3.47% by SD. The result of GC-MS analysis showed that 13 components of the essential oil by SCDE composed about 99% of the total, and 15 components by SD composed about 98% of the total. Relative content of main component β -pinene is 59.12% by SCDE and 54.30% by SD. [Conclusion] The extraction yield and the chemical components of the essential oils between two methods are not different obviously.

Key words: Fructus forsythiae; Supercritical CO₂ extraction; Stream distillation; GC-MS

青翘与老翘挥发油的化学成分比较

周德英¹, 刘志华²

(1. 天津中新药业隆顺榕制药厂, 天津 300457; 2. 河北工业大学化工学院, 天津 300130)

连翘 (*Fructus forsythiae*) 为木樨科植物连翘 (*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl) 的干燥果实, 味苦、性微寒, 归肺、心、小肠经。秋季果实初熟尚带绿色时采收除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”。连翘具有清热解毒, 消肿散结。用于痈疽, 瘰疬, 乳痈, 丹毒, 风热感冒, 温病初起, 温热入营, 高热烦渴, 神昏发斑, 热淋尿闭^[1], 主要含挥发油、黄酮类、木脂体类、三萜类等成分。连翘挥发油有抑制流感病毒的作用, 对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、白色念珠菌有明显抑制作用, 对结核杆菌也有抑制作用^[2-4]。近年来随着先进的挥发油提取方法和设备及化学分析仪器, 如气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 等引入中医药领域, 尤其是连翘挥发油的化学成分进一步明确, 对挥发油的提取工艺的改进有指导意义。

超临界萃取技术是一项集提取、分离、浓缩为一体的新技术。尤其 CO₂ 无色无毒, 廉价易得, 临界压力低, 并且临界温度也接近常温, 因此超临界 CO₂ 萃取技术在药用植物有效成分提取工艺改进中得到越来越广泛的应用^[5-9]。为进一步提高连翘的药材资源利用率, 本实验采用了 SCDE 法从青翘和老翘中提取挥发油, 并用 GC-MS 法对两种不同采摘时期的连翘挥发油进行化学成分定性和定量比较。

1 仪器与样品

1.1 仪器

HA121-50-01 型超临界萃取装置, 江苏南通华安超临界萃取有限公司生产; 菲尼根 TRACE-DSQ 型气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS), 美国热电公司。

1.2 样品

青翘和老翘均为市售样品, 购自安国药材市场。处理方法为粉碎后过 1 号筛。

2 实验方法

2.1 超临界 CO₂ 萃取法 取 200g 样品装入萃取釜中。萃取压力 30Mpa, 萃取温度为 35℃, CO₂ 流量为 24 L/h, 萃取 3h, 收集连翘挥发油。重复 3 次, 计算平均出油率。

2.2 GC-MS 分析条件 气相色谱: 色谱柱为 DB-5 弹性石英毛细管柱 (50m×0.25mm×0.25um), 初始温度 55℃, 停留 4 min; 程序升温 20℃/min 至 280℃, 保持 5 min; 气化室温度 260℃; 进样量 0.05 μl; 分流比 30:1; 载气为高纯氦气。质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 200℃, 电子能量 70eV, 扫描范围 30~400u。标准质谱图库 NIST(16 万张)。

3 结果

3.1 不同提取方法对连翘油出油率的影响

青翘与老翘挥发油对比如表 1 所示。

表 1 青翘与老翘挥发油对比

样品	提取时间/h	出油率%	性状
青翘	2	2.89	几乎无色油状物
老翘	2	3.97	淡黄色油状物

3.2 挥发油化学成分的定性和定量比较

按 2.2 所述 GC-MS 条件对青翘与老翘所得产物进行分析, 得总离子流图, 如图 1 和图 2 所示。运用色谱数据处理系统, 对挥发油各组分进行面积归一化可得各组分相对含量。

青翘挥发油中共分离出 100 种相对含量大于 0.2% 的化合物, 该 10 种化合物峰面积之和占色谱出峰总面积的 99% 以上, 且均可得到质谱鉴定。老翘发油中共分离出 15 种相对含量大于 0.2% 的化合物, 该 15 种化合物峰面积之和占色谱出峰总面积的 98% 以上, 也可得到质谱鉴定。

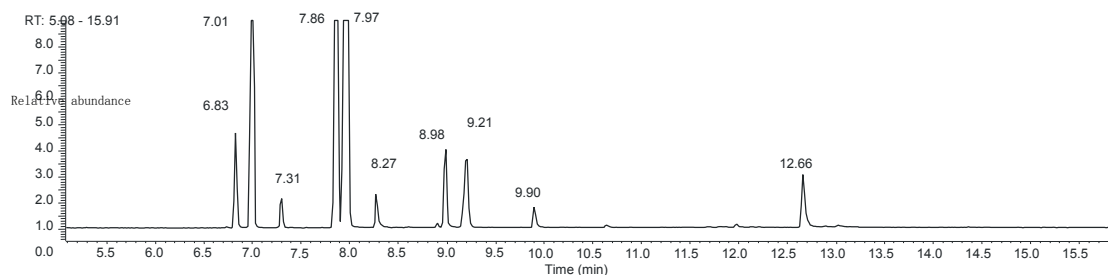


图 1 青翘挥发油的气相色谱-质谱总离子流图

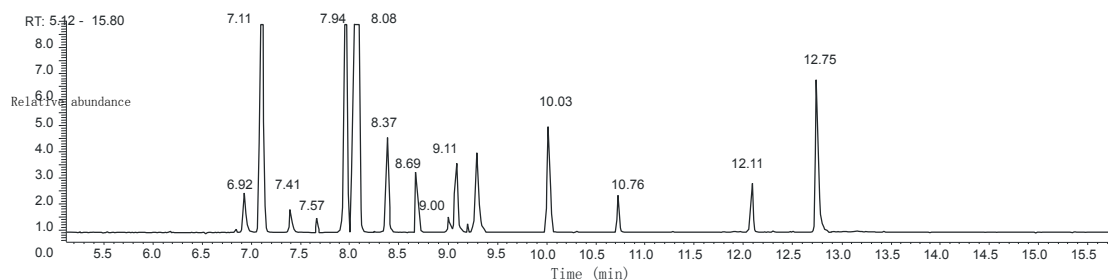


图 2 老翘挥发油的气相色谱-质谱总离子流图

青翘和老翘挥发油成分定性及每种化合物相对含量对比如表 2 所示。

表 2 青翘和老翘挥发油化学成分对比

序号	保留时间 (分)		化合物名称	分子式	相对分子量	百分含量 (%)	
	青翘	老翘				青翘	老翘
1	6.83	6.92	炭烯	C ₁₀ H ₁₆	136	3.47	2.57
2	7.01	7.11	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	18.07	9.89
3	7.31	7.41	β-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.82	0.93
4		7.57	α-侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	136	未检出	0.51
5	7.86	7.94	β-月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136	10.05	7.35
6	7.97	8.08	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	59.12	45.30
7	8.27	8.37	对伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	134	0.81	4.26
8		8.69	苯甲醇	C ₇ H ₈ O	108	未检出	2.87
9		9.00	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.12	0.75
10	8.98	9.11	孟二烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.93	3.86
11	9.21	9.32	榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.91	4.15
12	9.90	10.03	α-松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.70	4.52
13		10.76	α-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.24	1.96
14		12.11	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	204	未检出	3.28
15	12.66	12.75	杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	151	2.31	6.95
面积百分含量 (合计)						99.12	99.15

3.3 结论

老翘挥发油含量明显大于青翘,并且老翘所提取的挥发油中沸点高的化学成分所占比例也高于青翘。有文献报导青翘中连翘苷含量是老翘中连翘苷含量的两倍左右^[10],因此连翘中不同有效成分的含量与其果实的采摘时机也有关系。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.[S]中华人民共和国药典 2005 版(一部).北京:化学工业出版社,2005:117-118
- [2] 吴寿金,赵泰,秦永祺.[M]现代中草药成分化学.中国医药科技出版社,2002:676-677
- [3] 张海燕.[J]连翘化学成分及药理活性的研究进展.中药材,2000,23(10):657
- [4] 刘明.[J]中药连翘药理作用的研究近况.现代医药卫生,2007,23(16):2438-2439
- [5] 张杰.[J]浅谈超临界 CO₂ 萃取技术.黑龙江医药科学,2007,30(1):22-23
- [6] 王忠华,张钟宪.[J]超临界二氧化碳萃取技术.化学工程与装备,2007,20(1):57-59.
- [7] 董新艳,张兴儒.[J]超临界萃取技术在中草药研究中的应用.青海大学学报(自然科学版),2005,23(3):15-18
- [8] 唐一梅,李仲瑾,张丽等.[J]超临界萃取技术在中药研究中的应用.西北药学杂志,2007,22(5):288-289
- [9] 刘志华,周德英.[J]超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取广藿香挥发油的化学成分比较.安徽农业科学,2009,37(19):8816-8817.
- [10] 李书渊,施玉旋,罗婷.[J]青翘与青翘种子及老翘中连翘苷的含量测定.时珍国医国药,2006,17(9):1720

Comparison of Essential Oils from Fructus Forsythiae in green and grown

ZHOU De-ying¹, LIU Zhi-hua²

(1. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Longshunrong Manufactory, Tianjin 300457, China;

2. School of Chemical Engineering, Hebei Industrial University, Tianjin 300130, China)

Abstract: [Objective] To compare essential oil from Fructus forsythiae by different extract techniques. [Method] Essential oils were extracted by supercritical CO₂ extraction and stream distillation. The chemical components of essential oil were analyzed on GC-MS instrument. [Result] The extraction yield was 3.89% by SCDE and 3.47% by SD. The result of GC-MS analysis showed that 13 components of the essential oil by SCDE composed about 99% of the total, and 15 components by SD composed about 98% of the total. Relative content of main component β -pinene is 59.12% by SCDE and 54.30% by SD. [Conclusion] The extraction yield and the chemical components of the essential oils between two methods are not different obviously.

Key words: Fructus forsythiae; Supercritical CO₂ extraction; Stream distillation; GC-MS

TSQ Quantum 液相色谱-串联质谱法测定 十种全氟烷基化合物

刘飞, 王勇为, 刘婷

(赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部)

1 前言

全氟烷基化合物(Perfluorinated alkyl substances, PFAS)是一类普遍存在的环境污染物,自1951年由3M公司研制成功以来,已有50多年的生产和使用历史,以其良好的表面活性被广泛应用于纺织、造纸、包装、皮革、装潢、表面活性剂等多个领域。由于PFAS具有难降解性、生物蓄积性、沿食物链在生物体内富集以及潜在的生物毒性,如其中的全氟辛烷磺酸(PFOS)具有很强持久性,在任何水解、光解和生物降解环境条件下都不降解,并且会远距离迁移,这类化合物受到了越来越多的关注,并成为国际上环境科学和毒理学研究的热点。

已报道过的分析PFAS的方法可用单级四极杆液质、液质质(比如Q-TOF或三重四极杆)、气质联用GC/MS、液相色谱荧光检测等。我国也出台了PFOS的分析测试标准:GB/T 23243-2009《食品包装材料中全氟辛烷磺酰基化合物(PFOS)的测定 高效液相色谱-串联质谱法》,GB/T 24169-2009《氟化工产品 and 消费品种全氟辛烷磺酰基化合物(PFOS)的测定 高效液相色谱-串联质谱法》也已实施。本实验采用HPLC-ESI-MS/MS联用技术,建立了快速、准确、高灵敏度的同时测定十种PFAS的方法。十种全氟烷基化合物包括全氟己酸(perfluorohexanoate, PFHxA)、全氟辛酸(perfluorooctanoate, PFOA)、全氟壬酸(perfluorononanoate, PFNA)、全氟癸酸(perfluorodecanoate, PFDA)、全氟十一酸(perfluoroundecanoate, PFuDA)、全氟十二酸(perfluorododecanoate, PFDoA)、全氟丁烷磺酸(perfluorobutanesulfonate, PFBS)、全氟己烷磺酸(perfluorohexanesulfonate, PFHxS)、全氟辛烷磺酸(perfluorooctanesulfonate, PFOS)、全氟癸烷磺酸(perfluorodecanesulfonate, PFDS)。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

TSQ Quantum串联质谱仪(赛默飞世尔科技 Thermo Fisher Scientific公司),配置Surveyor液相色谱系统(Thermo Fisher Scientific公司)。Thermo Hypersil Gold C18柱(150×2.1mm, 5 μm)。

标准品: PFHxA, PFOA, PFNA, PFDA, PFuDA, PFDoA, PFBS, PFHxS, PFOS, PFDS购自加拿大Wellington Laboratories,纯度≥98%。准确称取适量以上标准品,用甲醇配制并稀释成浓度为10 μg/L的混合标准溶液。

甲醇, 乙酸铵(HPLC级, 美国Thermo Fisher公司), 水为二次蒸馏水。

2.2 色谱与质谱条件

色谱条件: Thermo Hypersil Gold C18柱(150×2.1mm, 5 μm), 柱温30 °C; 流动相A: 甲醇, 流动相B: 5 mM乙酸铵水溶液, 采用梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 0.25 mL/min; 进样体积: 10 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A 甲醇 (%)	B 5 mM乙酸铵水溶液 (%)
0	40	60
1	40	60
5	95	5
12	95	5
12.1	40	60
15	40	60

质谱条件：ESI负离子模式。喷雾电压：3.0 KV；鞘气：40 arb；辅助气：10 arb；毛细管温度：380 °C；碰撞气：氩气（1.5 mtorr）。采用选择反应监测（SRM）扫描模式，十种PFAS的SRM参数见表2。

表2 十种PFAS的SRM参数

化合物 (Comp.)	分子式 (Formula)	母离子 (parent ion)	子离子 (Product Ion)	碰撞能量 (Collision Energy, V)
全氟丁烷磺酸 (PFBS)	C4F9SO3NA	298.9	80.3*	33
			99.3	42
全氟癸酸 (PFDA)	C9F19COOH	513	269.1	16
			468.9*	14
全氟十二酸 (PFDoA)	C11F23COOH	612.9	269	25
			569.2*	15
全氟癸烷磺酸 (PFDS)	C10F21SO3NA	598.9	80.3	50
			99.1*	44
全氟己酸 (PFHxA)	C5F11COOH	312.9	119	18
			269*	11
全氟己烷磺酸 (PFHxS)	C6F13SO3NA	398.9	80.3*	40
			99.1	35
全氟壬酸 (PFNA)	C8F17COOH	462.9	218.9*	16
			326.7	15
全氟辛酸 (PFOA)	C7F15COOH	412.9	169	21
			369.1*	13
全氟辛烷磺酸 (PFOS)	C8F17SO3NA	498.9	80.2	55
			99.1*	36
全氟十一酸 (PFUdA)	C10F21COOH	562.9	269.1	21
			519.2*	13

注：* 代表定量离子

3 结果与讨论

3.1 LC-MS/MS方法优化及灵敏度考察

经优化流动相和质谱参数，采用ESI负离子模式检测，十种全氟烷基化合物均有很高的灵敏度。在该实验条件下所得LC/MS/MS色谱图见图1(0.1 ng/mL)。

3.2 方法的线性考察

将浓度为10 ng/mL的混合标准溶液逐级稀释成4.0, 2.0, 1.0, 0.25, 0.1 µg/L系列混合标准溶液，分别进样分析。以各分析物定量离子色谱峰面积对质量浓度作标准曲线，所得线性方程及线性系数见图2。

4 结论

本文建立的十种全氟烷基化合物的高效液相色谱—电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)检测方法，灵敏度高、实用性强，特异性好、分析速度快等特点，完全符合我国法规及欧盟等关于PFOA/PFOS的检测，可广泛用于纺织品等消费品及环境样品中全氟烷基化合物的检测。

D:\APPLICATIONS\...PFOAMix_100ppt2

PFOAMix_0.1ppb

RT: 4.00-9.50 SM: 5G

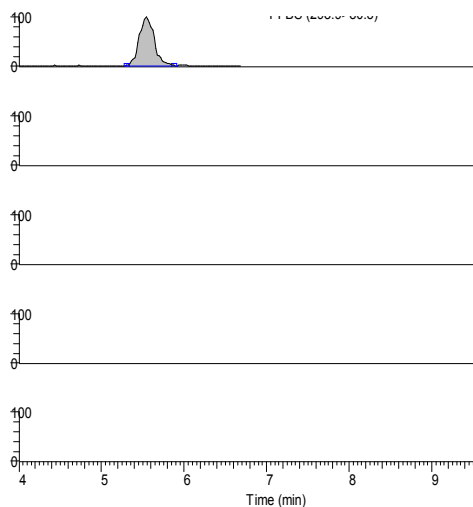


图1 十种全氟烷基化合物的LC/MS/MS色谱图 (0.1 ng/mL)

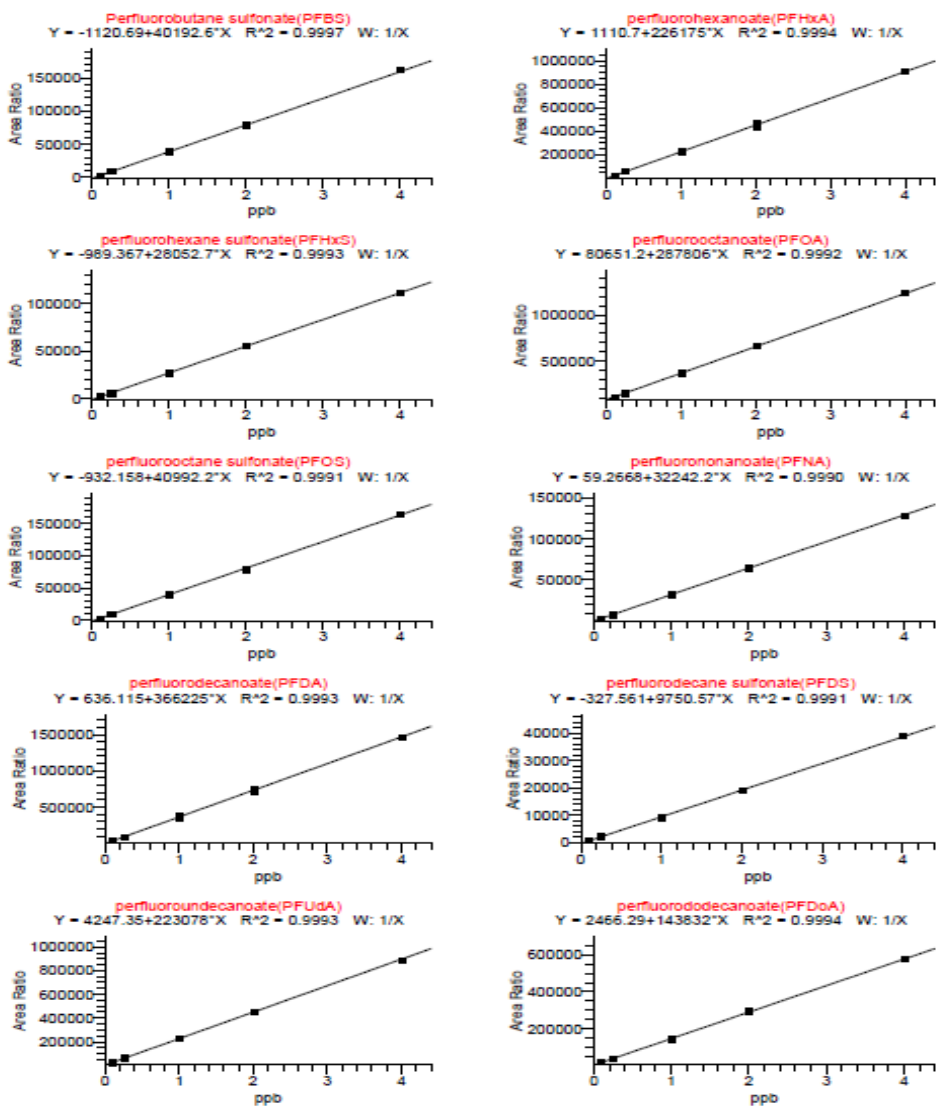


图2 十种全氟烷基化合物的标准曲线 (0.1-4 ng/mL)

高效液相色谱 - 串联质谱法测定 五种微囊藻毒素

刘飞, 王勇为

(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)

建立了高效液相色谱/串联质谱法(LC-MS/MS)同时定量检测微囊藻毒素(MC-RR, YR, LR, LW, LF)的方法。该法检出限(LOD)为0.2 µg/kg, 定量限(LOQ)为0.7 µg/kg, 标准曲线的线性相关系数均大于0.99, 回收率为85.3% - 101.3%, 该方法操作简便且灵敏度较高。

1 引言

近几十年由于水体富营养化程度的日益加剧, 涉及范围不断扩大, 包括水源水库水在内的淡水水体经常发生蓝藻水华。有害藻类水华的频繁发生已成为国内外普遍关注的环境问题。据2004年资料, 已从不同藻株中分离、鉴定了70多种微囊藻毒素^[1]。在已发现的蓝藻毒素中, 微囊藻毒(Microcystins, MCs)是一种在蓝藻水华污染中出现频率最高、造成危害最严重的藻毒素种类^[2]。

MCs的一般结构为环(D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬氨酸-L-Z-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸)。其中, Adda(3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯基-4, 6-二烯酸)是一种特殊的氨基酸^[3]。在已发现的MCs异构体中, MC-LR, RR, YR 毒性最强(L、R、Y分别代表亮氨酸、精氨酸、色氨酸)。MCs是一种水溶性肝毒素^[4-5], 它对动物和人类健康的潜在危害逐渐引起关注。

由于藻毒素可通过食物链累积, 供食用的水产品如鱼类、贝类等也可能携带藻毒素危害人类健康。为防止藻毒素对人类的进一步危害, 需进行更广泛而深入的研究。目前WHO仅规定了饮用水中微囊藻毒素可耐受量1.0 µg/L, 及暂定的微囊藻毒素临时可耐受的每日摄入量0.04 µg/(kg·d BW)^[6], 结合各国微囊藻毒素的安全限量标准, 微囊藻毒素每日安全摄入量在2.4 µg之内应是安全的。但鱼类等水产品中微囊藻毒素的限量还有待进一步的研究。鉴于微囊藻毒素对人体的危害, 应逐步建立和完善水产品中MCs含量的检测方法, 并制定食品中MCs的限量。

越来越多的分析技术用于MCs的检测当中, 水体中MCs中的检测方法已相对较完善^[7-8]。本文报道了同时对MC-RR, YR, LR, LW, LF进行定量分析的高效液相色谱/串联质谱(LC-MS/MS)分析方法, 这些毒素可产生典型的离子谱, 质谱仪对藻毒素有最佳分辨效果, LC-MS/MS方法由于其优良的选择性, 对样品的纯化步骤要求不高, 能够在混合物中同时实现多种藻类毒素的分离和鉴定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

液质联用仪由Surveyor液相色谱系统和Thermo Fisher TSQ Quantum三重四极杆串联质谱组成; 氮气吹干仪(美国Zymark公司); MilliQ去离子水发生器(美国Millipore公司); Sartorius冷冻离心机; WH-861漩涡混合器。

二次去离子水; 甲醇(色谱纯); Oasis HLB固相萃取柱(Waters公司, 60 mg, 3 mL); 标准品: 微囊藻毒素-LR(MC-RR), 微囊藻毒素-LF(MC-YR), 微囊藻毒素-YR(MC-LR), 微囊藻毒素-RR(MC-LW), 微囊藻毒素-LW(MC-LF), 纯度不低于95%; 鲫鱼样品来自市场, 冷冻保存于实验室。

分别准确称取标准品各10.00 mg, 至10 mL棕色容量瓶, 用甲醇定容, -20℃避光保存。再用甲醇稀释上述标准储备液, 配制成1.0 μg/mL的混合标准溶液, 于4℃避光保存1个月。

2.2 液相色谱和质谱条件

2.2.1 液相色谱条件

色谱柱: Polaris C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm×5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%(体积分数)甲酸水溶液; 流速: 0.25 ml/min; 梯度洗脱程序: 0.00min(20%甲醇, 80%甲酸水溶液), 4.00 min (95%甲醇, 5%甲酸水溶液), 8.00 min(95%甲醇, 5%甲酸水溶液), 8.10 min (20%甲醇, 80%甲酸水溶液), 10.00 min (20%甲醇, 80%甲酸水溶液); 柱温: 25℃; 进样量: 10 μL。

2.2.2 质谱条件

电离方式为电喷雾电离源(ESI+); 选择反应监测(SRM); 毛细管温度 300℃; 喷雾电压(spray voltage) 3.5 kV; 鞘气(N₂)流量: 6 L/min; 辅助气(N₂)流量: 2 L/min; 碰撞气(N₂)压力: 1.5 mTorr。

表 1 MCs 的母离子/子离子离子及碰撞能量

化合物 Compounds	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)
MC-RR	519.8[M+2H] ²⁺	135.0 *	30
		440.4	25
MC-YR	1045.6[M+H] ⁺	135.0 *	60
		375.0	45
MC-LR	995.6[M+H] ⁺	135.0 *	56
		553.0	45
MC-LW	1025.6[M+H] ⁺	375.0 *	30
		135.0	60
MC-LF	986.6[M+H] ⁺	375.0 *	43
		135.0	50
		375.0 *	22

* 定量离子 (quantitative ion)

3 结果与讨论

3.1 线性范围、定量限和检出限

将 MC- RR, YR, LR, LW, LF 逐级稀释配置成 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL 系列浓度的混合标样, 在 1.0~50.0 ng/mL 内线性良好, 当信噪比(S/N)为 3 时, 方法检出限分别为 0.2, 0.3, 0.3, 0.4, 0.4 μg/kg。以 3 倍信噪比、10 倍信噪比分别计算检出限和定量限, 结果见表 2, 相关系数均大于 0.99, 显示了良好的相关性。MC- RR, YR, LR, LW, LF 的检出限分别为 0.7, 1.0, 0.8, 1.2, 1.3。

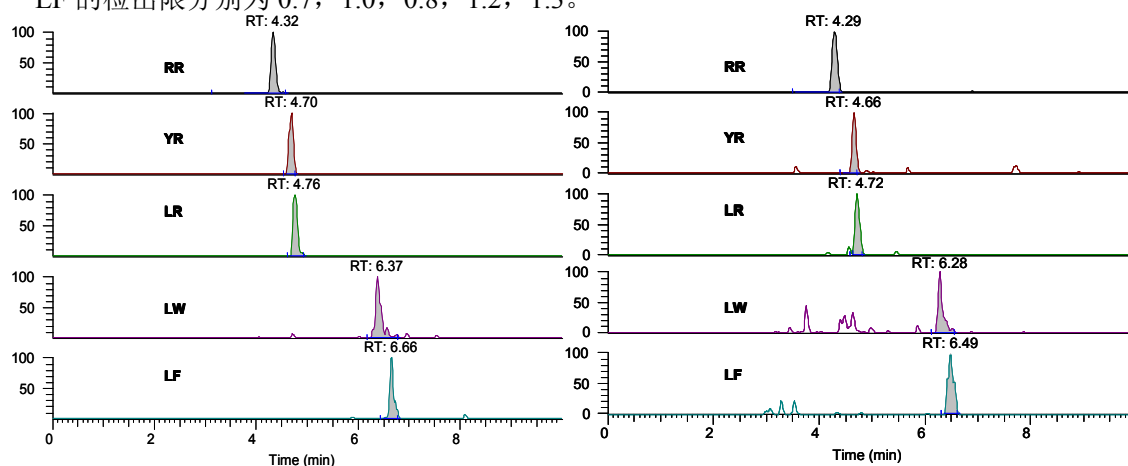


图 1 5 种 MCs 标准品及加标鱼样加标 5μg/kg 的 LC/MS/MS 谱图

(下转 234 页)

高效液相色谱串联质谱法筛选 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ产生菌

郝晓冉, 牛学良, 陈煌, 吕宪禹, 朱旭东

(南开大学生命科学院分子真菌学实验室, 天津, 300071)

癌症成为当今世界威胁人类健康的第一大杀手, 在众多抗癌药物中, 紫杉醇(Taxol)由于其可靠的疗效、独特的抗肿瘤作用机制^[1]、对多种癌症有广泛的抑制作用^[2]等使其成为过去数十年发现的最好的抗癌药物之一。目前生产紫杉醇的方法主要包括红豆杉树皮提取法及树枝提取-半合成法, 受原料和技术的限制, 短期内还无法实现大量生产紫杉醇, 以满足广大病患的需要。从环境中筛选紫杉醇或其前体产生菌是解决这一问题的捷径。10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ(10-Deacetylbaicatin III, 10-DAB)分子量是544.597, 溶于乙醇、二氯甲烷等, 是紫杉醇和生物半合成^[3]的前体, 如果可以大量生产10-DAB^[4], 将其用于生物半合成, 就能生产出大量紫杉醇, 造福于人类。本文利用高效液相色谱串联质谱法从环境中筛选出一株产10-DAB的真菌。

1 材料与方 法

1.1 仪器与材料

Spectra-physics 高效液相色谱仪; Beckman 质谱仪; 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ(Sigma 公司); 甲醇(色谱纯); 氯仿(色谱纯)。

1.2 标准溶液的配制

10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ储液的配制: 准确称取 10 mg 标准品于 1.5 ml Ep 管中, 用 1 ml 甲醇溶解, 混匀后置冰箱冷藏储存。

标准工作溶液的配制: 吸取储备液 100 μ l 于 1.5 ml Ep 管中, 加 900 μ l 甲醇稀释至 1 mg/ml。相同方法用甲醇稀释配成 0.1 mg/ml 工作浓度的标样。冰箱储存备用。

1.3 样品制备

待测菌株摇瓶培养 9 天, 布氏漏斗分离菌丝和发酵液。菌丝研磨后用 50 ml 甲醇浸泡过夜, 发酵液低压旋蒸浓缩, 浓缩液和菌丝浸泡液混合后过滤去除残余菌丝。混合液浓缩至一定体积后(5 ml)用氯仿: 甲醇(v/v, 10:1)萃取过夜。氯仿相在通风厨吹干, 样品用 1 ml 甲醇再次溶解, 离心去除杂质, 上清液用有机微孔滤膜过滤后进行 HPLC-MS 分析。

1.4 仪器分析条件

液相色谱条件: Kromasil C-18 5 μ m 250mm \times 4.6mm, 流动相: 甲醇: 水溶液=70:30; 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样量: 10 μ L, 流速为 1 mL/min。

质谱条件: 电离模式: ESI(+); 检测方式: 一针进样

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱法筛选出一株产 10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ真菌

采用 C-18 ODS 分析型色谱柱(4.6 \times 250 mm, Kromasil), 柱温调节为 30 $^{\circ}$ C, 流动相(甲醇:超纯水=7:3)流速为 1 ml/min, 检测波长 λ =227 nm, 进样量 20 μ l, 重复 3 次, 结果如图 1 图 2 所示。

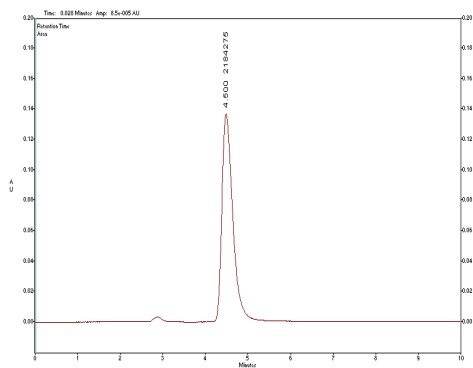


图 1. 10-DAB (0.1 mg/ml) 标准品色谱图

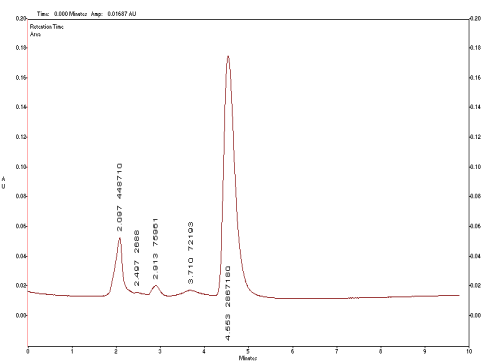


图 2. 发酵产物色谱图

10-DAB 标准品产生色谱峰的保留时间为 4.500min，而发酵产物经处理之后的出峰时间为 4.553 min，二者的出峰时间在允许误差范围内可视为相同，据此进一步证明样品中含有 10-DAB。

2.2 质谱进一步验证该菌株产 10-脱乙酰巴卡亭 III

发酵产物经甲醇浸提，旋蒸浓缩和 HPLC 纯化后，进行质谱检测（如图 3 图 4）。

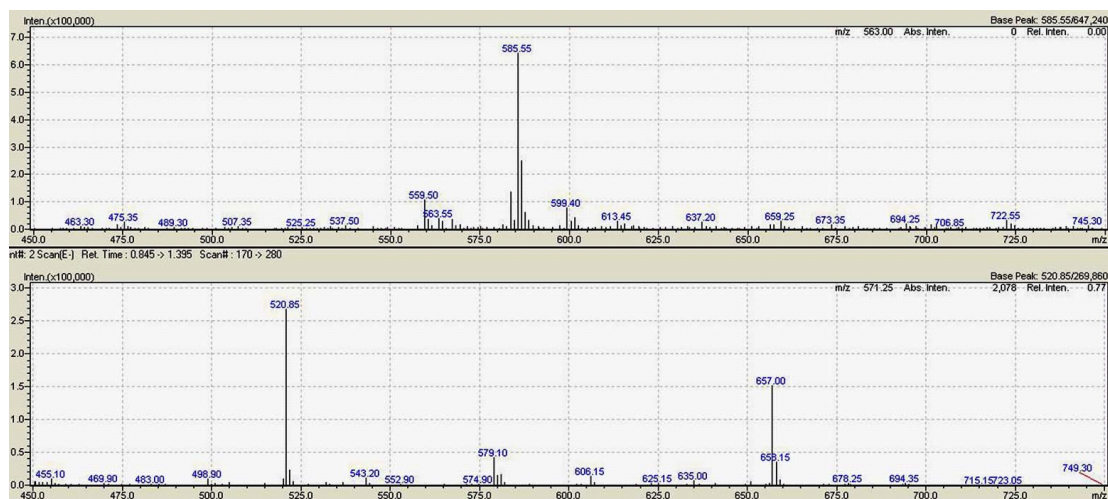


图 3. 10-DAB (0.1 mg/ml) 标准品质谱图

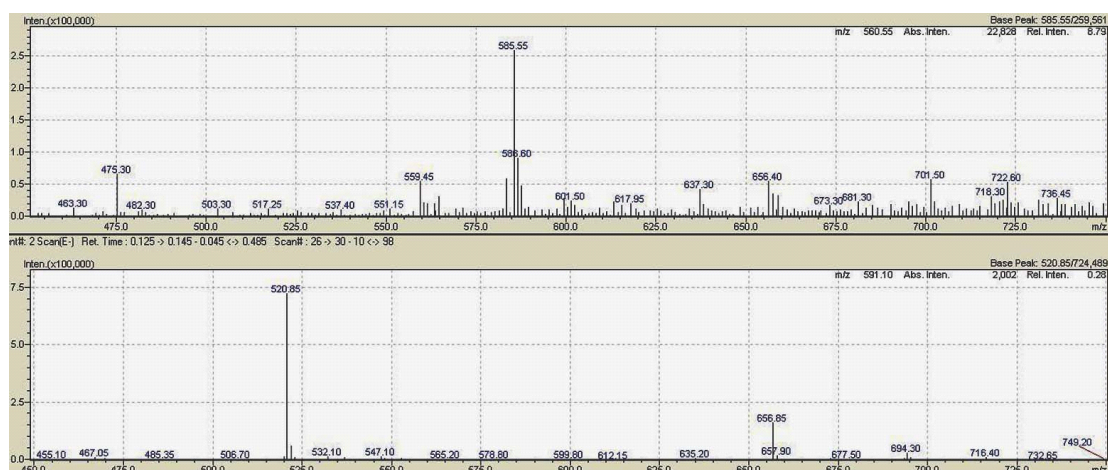


图 4. 样品质谱图

如图 3.图 4.所示，样品中的主要成分分子量 $[M+K+2H]^+=585.55$ ， $[M+CF_3COO]^-=657.00$ 由此可以得出 $[M]=544.55$ ，与 10-DAB 标准品的分子量相同，证明该菌发酵产物含有 10-DAB。通过高效液相色谱串联质谱方法可以快速准确的筛选 10-DAB 产生菌。

参考文献:

- [1] Downs Ls Jr, Judson PL, Argenta PA, *et al.* A phase I study of ifosfamide, paclitaxel, and carboplatin in advanced and recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2003, 95(2):347~351
- [2]. 李桂云,陈必良,马向东.紫杉醇对浆液性卵巢癌细胞HO-8910细胞凋亡的诱导作用.肿瘤研究与临床,2002,16(1):11~13
- [3]. Patel RN.Tour De Paclitaxel: biosynthesis for semisynthesis. *Annu. Rev.Microbiol*, 1998, 98:361~395
- [4] Arturo Battaglia, Andrea Guerrini, Eleonora Baldelli.*et al.* Synthesis of 7- and 10-spermine conjugates of paclitaxel and 10-deacetyl-paclitaxel as potential prodrugs. *Tetrahedron Letters* ,2006,47:2667~2670.

Screening Fungi Producing 10- Deacetylbaaccatin III

Using HPLC and MS Techniques

Hao Xiao-ran, Niu Xue-liang, Chen Huang, Lv Xian-yu, Zhu Xu-dong
(Nankai University, College of Life Science, Tianjin 300071, China)

Abstract: Establish a method screening for fungi producing 10- deacetylbaaccatin III using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectra(MS) techniques. The fungi were cultured for 9 days in liquid medium. Separated the fermented liquid and hyphae. Then the culture was concentrated, extracted by chloroform: methanol (v/v), dried, and dissolved in methanol. Tested sample was tested by Chromatography and mass spectrometry to determining whether strains produce 10- deacetylbaaccatin III.

Key words: High Performance Liquid Chromatography; Mass Spectra; 10-Deacetylbaaccatin III.

(上接 231 页)

参考文献

- [1] Ming Dai, Ping Xie, Gaodao Liang. Simultaneous determination of microcystin-LR and its glutathione conjugate in fish tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. *Journal of chromatography B*. 2008, 862: 43-50.
- [2] 聂晶晶, 李元, 李琴. 微囊藻毒素检测方法的研究进展 [J]. *中国环境检测*. 2007, 23(2): 43-48.
- [3] Humberto Vieira Frias, Maria Anita Mendes, Karina Helena Morais Cardozo. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 344: 741-746.
- [4] 郑明岚. 微囊藻毒素无害化处理的研究进展 [J]. *卫生研究*. 2007, 36(1):114-116.
- [5] 赵建伟, 黄廷林. 高效液相色谱法测定饮用水中的微囊藻毒素RR 和LR [J]. *中国环境检测*. 2006, 22(3):12-14.
- [6] WHO. Guidelines for drinking - water quality [M].3ed. Geneva :World Health Organization, 2004 :407 – 408.
- [7] Wei Xu, Qi Chen, Ting Zhang. Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples [J]. *analytica chimica acta*. 2008, 626: 28–36.
- [8] Jing Wang, Xiaolu Pang. An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China [J]. *Toxicon*. 2007, 49 :1120–1128.
- [9] Liming Cong, Baifen Huang, Qi Chen. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 569: 157-168.

熊果酸脂质体人体药代动力学研究

黄月珍¹, 阎昭², 董伟林³

(1.天津医科大学药学院 2010 届药学本科毕业生; 2.天津市肿瘤医院;

3.天津医科大学基础医学院 天津 300071)

熊果酸 (Ursolic acid, UA), 是一类存在于天然植物中五环三萜类化合物, 在自然界分布较广。目前, 熊果酸的防癌抗癌作用已引起广泛重视。熊果酸对肿瘤形成各阶段都有预防和抑制作用。它可以抑制各种肿瘤细胞的生长, 介导肿瘤细胞凋亡^[1-3]。熊果酸口服剂量下未发现毒副作用^[4]。而且熊果酸还具有增强机体免疫功能以及肝损伤保护作用。目前大多数抗肿瘤药物都具有不同程度的肝损伤作用; 肝癌的化疗尚缺少一种既抗肿瘤、又保护正常肝细胞的药物, 而熊果酸恰恰有望弥补这一缺陷^[1]。

1 实验部分

1.1 材料与方法

1.1.1 药品与试剂

试验用药物: 注射用熊果酸纳米脂质体, 临床研究批号: 090601 (仅供临床研究用药), 武汉利元亨药物技术有限公司。

试验用标准品: 熊果酸对照品, 含量 100%, 货号: 110742-200516, 中国药品生物制品检定所提供。

试验用标准品: 甘草次酸对照品, 含量 100%, 货号: 110723-200612, 中国药品生物制品检定所提供。

试剂: 乙腈 (色谱纯), 美国 Fisher 公司; 甲醇 (色谱纯), 美国 Fisher 公司; 甲酸铵 (分析纯), 上海润捷化学试剂有限公司。

1.1.2 试验仪器

液质联用系统: 美国 Waters 公司 UPLC-TQD 型超效液相色谱-质谱联用系统。

1.1.3 各种溶液的配制

称取熊果酸对照品 2.5mg, 用甲醇定容于 25mL 棕色容量瓶中, 即为 $100.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。用乙腈逐级稀释配制成系列溶液 (5000、4000、2000、500、100、20、 $10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。称取甘草次酸对照品 2.5mg, 用甲醇定容于 25mL 棕色容量瓶中, 即为 $100.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标储备液。精密吸取该储备液 10mL 置 100mL 棕色容量瓶中, 用乙腈稀释定容得到浓度为 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。以上配制的标准溶液均 4℃ 保存。

1.2 血药浓度分析

1.2.1 血浆样品处理方法

准确量取血浆 (空白、含药) $100\mu\text{L}$, 加入内标溶液 ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $100\mu\text{L}$, 混匀后加入 0.1% 盐酸水溶液 1mL, 混匀, 在 37℃ 水浴中放置 30 分钟后加入乙酸乙酯 1mL, 涡旋振荡 1min, 2000rpm 离心 10min, 取上清液, 常温下氮气吹干, 测定时残留物加 $200\mu\text{L}$ 流动相复溶, 进样 $5\mu\text{L}$ 。

1.2.2 液相色谱-质谱联用分析条件

色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH, C₈, 1.7 μm , (2.1×100)mm I.D.

作者简介: 黄月珍 (1987-), 女, 天津医科大学药学院, 2010 届本科毕业生。Tel:15522425061, E-mail: hyz121314@sina.com

阎昭 (1973-), 男, 天津医科大学肿瘤医院, 副主任药师, Tel:13512401435, E-mail: yanzhaotj@126.com

柱温：40℃

流动相：乙腈-10mmol·L⁻¹甲酸铵(含10%乙腈)(89:11)(v/v)

流速：0.2mL·min⁻¹

进样量：5μL

质谱条件：

电喷雾离子化源(ESI)，负离子检测。毛细管电压：3.8kV；锥孔电压：80V；源温度：110℃；雾化温度：350℃；雾化气(N₂)流速：600L·h⁻¹；锥孔气(N₂)：50L·h⁻¹。

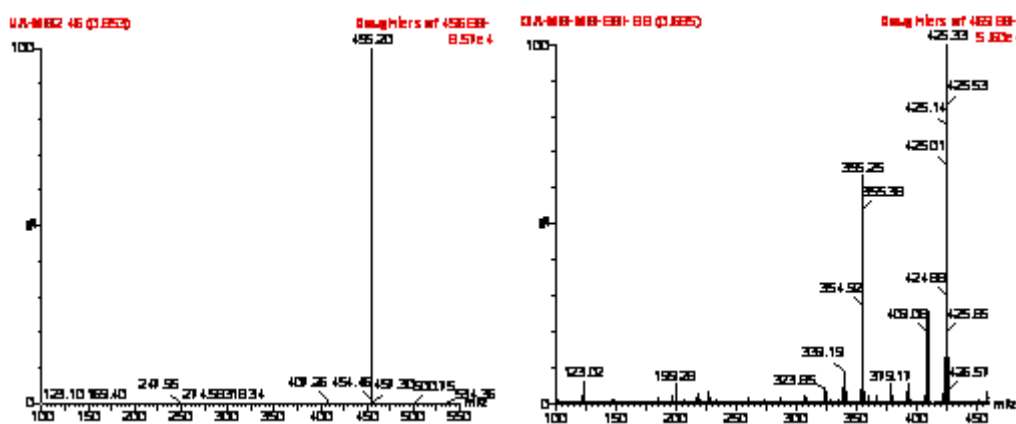
用于定量分析的离子反应分别为：熊果酸 m/z 455→455，甘草次酸 m/z 469→425。熊果酸及内标的二级全扫描质谱图见图 1-1。

2 结果

2.1 分析方法的确认

2.1.1 方法的特异性

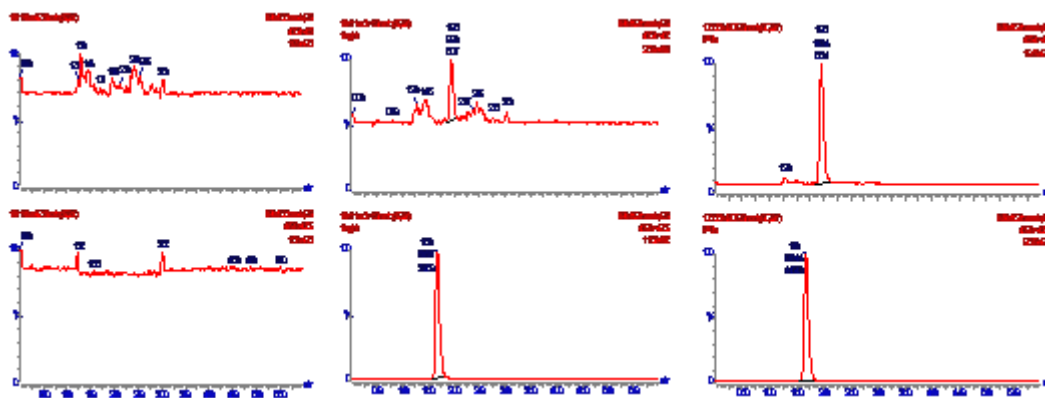
空白血浆、空白血浆加入 10ng·mL⁻¹ 熊果酸及人服药后血浆经提取后，进行 UPLC-MS-MS 分析，分别得色谱图 2-1-1、2-1-2、2-1-3。熊果酸及内标的保留时间分别为 1.96min 和 1.68min。从色谱图上可以看出，空白血浆中的内源性物质不干扰熊果酸及内标的测定。



(1) 熊果酸；

(2) 甘草次酸

图 1-1. 熊果酸及甘草次酸(内标)的 ESI 二级全扫描质谱图



1 空白人血浆

210ng·mL⁻¹的空白人血浆加熊

3 10ng·mL⁻¹的空白人血浆加熊果酸

图 2-1. 熊果酸血浆 MRM 色谱图

2.1.2 方法的线性

取人空白血浆 100 μ L, 再加入不同浓度的熊果酸标准液 100 μ L, 使成为含 10、20、100、500、2000、4000 和 5000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆, 经提取后, 进行 UPLC-MS-MS 分析。以测得的样品与内标峰面积比浓度用加权最小二乘法进行线性回归($1/X^2$), 得回归方程即为熊果酸的血浆标准曲线, 回归曲线见图 5-2。其典型曲线为: $Y=0.00107X+0.00096$ ($r=0.996$)。

2.1.3 方法的精密度与准确度

进行 20、500、4000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三种不同浓度样品的批内和批间精密度、准确度分析。批内分析每一浓度各做 6 个样品, 共做三批。三种浓度的批内、批间精密度均小于 10%, 偏差在(-2.0~2.0)%之间。

2.1.4 方法的稳定性考察

进行 20、500、4000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三种不同浓度血浆样品在室温放置 6h、经处理后进样器放置 24h、冻融循环 3 次、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 90 天的稳定性分析。每一浓度各做 6 份。测定的相对标准偏差均小于 10%, 偏差在(-5.63~6.50)% 之间, 表明在上述条件下, 熊果酸血浆样品均较稳定。

2.1.5 方法的灵敏度

进行 10 ng/mL 浓度血浆样品的测定, 共做 6 份。测定的相对标准偏差为 8.14%, 偏差在(-11.3~10.8)% 之间。熊果酸的最低检测浓度为 10 ng/mL 。

2.1.6 方法的回收率

用 20、500、4000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三种浓度进行血浆中药物浓度测定回收率试验, 每个浓度各做 6 份样品, 按“血浆样品处理方法”项操作, 以熊果酸从血浆中处理后测定值与相应浓度的标准品测定值相比, 计算其回收率。在 20~4000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内熊果酸的平均回收率在(72.2~75.1)%之间。内标的平均回收率为(64.2 \pm 2.20)%。

2.2 各剂量组血药浓度

24 位受试者以 37 mg/m^2 、74 mg/m^2 、98 mg/m^2 剂量静脉滴注给药, 在不同时间采集的血浆样品, 按“血浆样品处理方法”项下操作, 进行分析测定。

2.3 药代动力学参数

用 24 位受试者静脉推注给药 37、74 和 98 mg/m^2 三个剂量组的血药浓度-时间数据, 用中国药理学会数学药理专业委员会编制的 DAS2.0 程序估算主要药代动力学参数。用梯形法计算曲线下面积。受试者单次静脉滴注高、中、低三个剂量熊果酸脂质体的药代动力学参数比较见表 2-1。

表 2-1 受试者单次静脉滴注高、中、低三个剂量注射用熊果酸脂质体的药代动力学参数比较

药代参数	单位	低剂量 37 mg/m^2	中剂量 74 mg/m^2	高剂量 98 mg/m^2
AUC(0-t)	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	4222.2 \pm 602.3	7163.9 \pm 974.2	9644 \pm 1193.2
AUC(0- ∞)	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	4320.3 \pm 516.8	7422.3 \pm 1108.7	9918.4 \pm 1215.2
MRT(0-t)	h	3.732 \pm 0.349	3.913 \pm 0.381	3.845 \pm 0.34
MRT(0- ∞)	h	4.228 \pm 0.778	4.58 \pm 0.844	4.411 \pm 0.952
$t_{1/2}$	h	4.527 \pm 2.259	4.782 \pm 1.755	3.902 \pm 2.08
T_{max}	h	4.031 \pm 0.043	4.021 \pm 0.039	4 \pm 0
CL	$\text{L/h}\cdot\text{m}^2$	8.686 \pm 1.076	10.166 \pm 1.508	10.012 \pm 1.231
V_d	L/m^2	57.904 \pm 31.14	67.802 \pm 16.88	55.602 \pm 27.92
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1835.3 \pm 437.7	2864.8 \pm 867.9	3404.6 \pm 748.8

3 讨论

24名健康受试者分别单次静脉滴注熊果酸脂质体低、中、高三个剂量组（37 mg/m²/人、74 mg/m²/人、98 mg/m²/人）后，熊果酸脂质体 AUC_{0-16h} 与剂量呈正相关，相关系数为 0.998。其药代动力学参数呈现一级动力学特征。给药剂量与进入人体内的药量之间呈正相关。低、中、高三个剂量组熊果酸的 t_{1/2} 说明该药物属于快速处置类药物。在选择给药方案时，应该借鉴给药窗的大小来制定给药方案。

4 结论

24名健康受试者分别单次静脉滴注熊果酸脂质体低、中、高三个剂量组，结果表明药物 AUC_{0-16h} 与剂量呈正相关，相关系数为 0.998。其药代动力学参数呈现一级动力学特征。

参考文献:

- [1] 王春雷, 芦柏震, 侯桂兰. 熊果酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 安徽医药, 2005, 9 (10): 723-724.
- [2] 颜玲, 陈会敏. 熊果酸的免疫学活性[J]. 湖北民族学院学报, 2005, 22 (1): 51-53.
- [3] Chen guo-qing, Shen Yi, Duan Hong. Anti-tumor Effect and Its Mechanisms of Ursolic Acid on Human Esophageal Carcinoma Cell Eca-109 in Vivo[J]. Chin J Cancer Res, 2008, 20(3): 205-210.
- [4] 李开泉, 陈武, 熊筱娟等. 乌索酸的化学、药理及临床应用进展[J]. 中成药, 2002, 24 (9) :709-711.

Pharmacokinetics of Intravenous Liposome of Ursolic Acid in Human

Huang Yue-zhen¹, Yan Zhao², Dong Wei-lin³

(1.University gratuator in 2010, college of pharmacy, Tianjin Medical University;2Tianjin tumor hospital;
3.college of basic medicine, Tianjin Medical University)

Abstract Objective: To study phase I of clinical research to study the pharmacokinetics of liposome of ursolic acid and to supply guide for reasonable and safe medication in clinic.

Methods: Determined the concentration of UA in plasma by UPLC-MS-MS. Calculated the pharmacokinetic parameter and evaluate the pharmacokinetic test. **Results:** After 24 subjects were intravenously dripped on a single low, middle, high dose, the three maximum concentrations of UA are 1835.3±437.7μg L⁻¹, 2864.8±867.9μg L⁻¹, 3404.6±748.8μg L⁻¹, AUC_{0-t} 4222.2±602.3μg·h·L⁻¹, 7163.9±974.2μg·h·L⁻¹, 9644±1193.2μg·h·L⁻¹, and t_{1/2} 4.527±2.259h, 4.782±1.755h, 3.902±2.08h. **Conclusion:** AUC_{0-t} liposome of ursolic acid is positive correlation to the dose, and the correlation coefficient is 0.998. Its pharmacokinetic parameters present first-order kinetics characteristics.

Key words: Ursolic acid; UPLC-MS-MS; pharmacokinetics.

海洋生物体中的多环芳烃的检测方法探讨

降升平⁵

(天津科技大学现代分析技术研究中心, 天津 300457)

多环芳烃(PAHs)是指含有两个或两个以上苯环,以线状、角状或簇状排列的稠环型化合物,是世界公认的持久性难降解半挥发性有机化合物,有致癌、致畸、致突变等危害^[1]。这些污染物容易被水体中的悬浮颗粒物吸附,并且进入沉积物中,进而通过生物体的积累^[2],对近岸海域生态系统及人群造成极大危害。目前沉积物或土壤中多环芳烃的提取及检测方法主要有超声波-层析柱净化-气相色谱质谱法^[3]、索式提取-层析柱净化-高效液相色谱-荧光-紫外串联法^[4],而生物体中多环芳烃的检测报道较少。本实验样品前处理方法采用索式提取-硅胶氧化铝柱净化法,用气相色谱-选择离子质谱法(GC-MS-SIS)检测,结果显示质谱具有选择性,通过定性离子的扫描可以去除大量干扰信号,并且定性能力强,因此本文采用GC-MS-SIS法测定生物体中多环芳烃的含量,抗干扰能力强、定性定量结果可靠。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Varian 4000MS 型气相色谱-质谱联用仪,美国瓦里安公司;旋转蒸发仪,上海雅荣生化设备仪器有限公司;索氏提取器;具塞玻璃层析柱。

正己烷、丙酮、二氯甲烷,色谱纯;无水 Na₂SO₄,分析纯,400℃下烘干4h;中性氧化铝,层析纯,100~200目,400℃下烘干4h,加4%的水去活化;硅胶,层析纯,60~100目,140℃下烘干4h;高纯铜粉,99.8%。

多环芳烃标准物质:萘、菲、葱、荧葱、屈、苯并(a)芘,国家标准物质中心;芴、芘、苯并(a)葱、苯并(e)芘,美国 AccuStandard。

1.2 试样的制备、提取和净化

将海洋生物体样品用海水洗涤,除去杂物和壳,取其组织,匀浆处理,风干后收集备用。然后称取20g与20g无水Na₂SO₄混匀,用正己烷处理过的滤纸筒包好放入索氏提取器中加100mL正己烷-丙酮(体积比1:1)浸泡12h,在75~80℃水浴中回流提取16h,冷却至室温,用250mL质量分数2%的Na₂SO₄溶液洗涤,收集有机相到旋转蒸发器浓缩瓶中,浓缩至5mL,浓缩液通过活化的氧化铝/硅胶/无水硫酸钠(5g氧化铝、5g硅胶、1g无水硫酸钠)层析柱后,加入5mL正己烷淋洗,再加入80mL体积比1:4二氯甲烷-正己烷溶液,收集淋洗液,浓缩定容至1mL,加1g高纯铜粉,超声5min,做为样品净化液进行GC-MS分析。

1.3 色谱条件

VF-5ms 毛细管柱(30m×0.25mm×0.10μm);进样口温度290℃;初始柱温150℃,以4℃/min升到270℃,然后保持16min;分流比5:1;以高纯氦气为载气,流量1mL/min;进样量1μL;离子源为EI源,离子阱温度220℃,传输线温度280℃;溶剂延迟时间3min。

2 结果与讨论

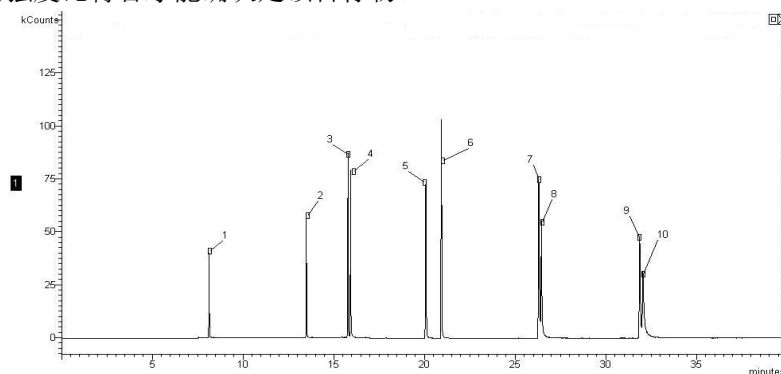
2.1 目标物的分离、定性离子的选择及质谱识别

将标样和样品都制备好后,分别用配有氢火焰检测器的气相色谱仪(GC-FID)和GC-MS分析,结果显示GC-FID法得到的样品色谱图背景值高,杂质对目标物的干扰严重,不能有效鉴别目标物并对其进行定量,而通过分析GC-MS-SIS法得到的样品总离子流图,峰型比较规整,背景值低,对目标物的干扰小,而且GC-MS-SIS法得到的标准品信噪比要比全扫

描方式下的信噪比高2~3倍。因此选择GC-MS-SIS法可以有效克服GC-FID法的缺点。

利用10种目标物的混合标准液进行GC-MS分析,得到总离子流图1,根据质谱图选出每种目标物中离子相对强度比值和特征离子的质荷比数值见表1。特征离子的选择原则是:在基质干扰较小的情况下首选基峰离子、强度较大的离子和分子离子峰;在考虑低质量区的情况下尽量选取质荷比较大的离子。从表1可以看出,多环芳烃的分子结构稳定。离子源发射的电子不易破坏其分子的骨架,只能使分子失去一个电子形成分子离子。所以该类化合物的基峰离子均为分子离子。

在定性离子数较少的情况下,被测物定性离子与该标准物定性离子间丰度比的匹配度显得尤其重要。表1中的离子强度比是和基峰离子做比得到的,基峰离子的强度为100%。在分析样品时,不仅要在标准物的保留时间出峰,而且质谱图中的每个定性离子之间的强度比也要与表中的强度比符合才能确认是该目标物。



1-萘; 2-芴; 3-菲; 4-蒽; 5-荧蒽; 6-芘; 7-屈; 8-苯并(a)蒽; 9-苯并(e)芘; 10-苯并(a)芘

图1 10多环芳烃组分的GC-MS总离子流图

表1 10种多环芳烃的保留时间、定性离子及相对强度比

PAHs	保留时间/min	定性离子	扫描时间段/min	强度比
萘	8.116	51、63、75、102、128*	7.5~9.0	2:7:6:13:100
芴	13.496	63、83、115、139、166*	9.0~14.2	4:6:5:7:100
菲	15.784	63、76、89、152、178*	14.2~17.0	4:9:6:17:100
蒽	15.932	63、76、89、152、178*	14.2~17.0	4:8:6:13:100
荧蒽	20.086	88、101、174、202*	17.0~22.0	5:9:2:100
芘	20.929	88、101、174、202*	17.0~22.0	4:10:2:100
屈	26.302	101、114、200、228*	22.0~28.0	5:8:2:100
苯并(a)蒽	26.447	101、114、200、228*	22.0~28.0	6:7:3:100
苯并(e)芘	31.858	113、126、226、252*	28.0~35.0	7:9:3:100
苯并(a)芘	32.045	113、126、226、252*	28.0~35.0	9:11:3:100:

注:带*号的离子是基峰离子;强度比是和基峰相比得到的,按质荷比大小顺序排列。

2.2 检出限、相关系数、回收率、精密度及样品分析

分别取1.00 μ L的0.01、0.02、0.05、0.08 μ g/mL的混合标准溶液进行GC-MS-SIS分析,得到线性方程、相关系数。0.01 μ g/mL的标样连续测定3次,进样量1 μ L,取其标准偏差 s ,仪器检出限为3sm/A^[5],m为每种PAHs实际进入仪器的质量,A为每种PAHs的平均峰面积。平行分析3个基质加标样品,即在样品前处理时不加生物体样品,在20g无水Na₂SO₄中混入1mL 0.05 μ g/mL的10种PAHs标样,得到回收率、相对标准偏差,方法检出限为3sc/A,c为已知加标浓度,A为每种PAHs的平均峰面积。结果见表2。从表中可以看出,基质加标回收率符合分析要求,样品分析结果可靠。

表2 方法的相关系数、检出限、回收率及精密度

目标物	仪器检出	方法检出限	相关系数	0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (n=3)		样品分析结果($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	限 DL	MDL		Recovery	RSD	生物样品 A	生物样品 B	生物样品 C
萘	8.3	0.6	0.9994	87.1	6.6	40.1	23.0	69.3
芴	7.7	0.5	0.9999	64.9	5.9	42.3	27.2	28.9
菲	5.9	0.4	0.9976	83.7	7.7	37.1	3.9	9.7
蒽	8.5	0.6	0.9982	74.5	11.9	-	-	-
荧蒽	2.7	0.2	0.9993	84.4	4.0	19.4	17.9	20.3
芘	2.5	0.2	0.9979	76.9	8.7	6.5	6.3	6.8
屈	1.6	0.1	0.9979	97.2	15.2	-	1.9	0.6
苯并(a)	3.1	0.2	0.9977	97.5	6.2	-	-	-
苯并(e)	2.9	0.2	0.9985	66.3	8.8	-	-	-
苯并(a)	6.5	0.5	0.9969	77.9	14.2	-	-	-

注: -代表未检出。

3 结论

本研究采用索式提取-硅胶氧化铝柱净化, GC-MS-SIS 检测的方法定量分析了生物体中 10 种 PAHs, 回收率在 64.9%~97.5% 之间, RSD 为 4.0%~15.2%, 方法检出限小于 $0.6 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 该方法适用于生物样品中 PAHs 的分析。

参考文献:

- [1] 陈皓, 刘颖, 刘海玲, 等. 超高效液相色谱法检测土壤中的多环芳烃[J]. 色谱, 2008, 26(6): 769 - 771.
- [2] 薛荔栋, 郎印海, 刘爱霞, 等. 黄海近岸日照段表层沉积物中多环芳烃的来源解析研究[J]. 海洋学报, 2008, 30(6): 164 - 170.
- [3] 黎晓霞, 蔡河山, 张珞平. 厦门西海域表层沉积物中多环芳烃含量分布及生态风险评价[J]. 热带海洋学报, 2008, 27(5): 43 - 46.
- [4] 饶竹, 李松, 何淼, 等. 高效液相色谱-荧光-紫外串联测定土壤中 16 种多环芳烃[J]. 分析化学, 2007, 35(7): 954 - 958.
- [5] 田强兵. 分析化学中检出限和测定下限的探讨[J]. 化学分析计量, 2007, 16(3): 72 - 73.

Discussion on Analysis Methods of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Organisms

JIANG Sheng-ping

(Research center for modern analysis techniques,

Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

Abstract : An analytical method for Polycyclic aromatic hydrocarbons in organism by chromatography-mass spectrometry was developed. The detection limits for the ten PAHs were $0.1 \sim 0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$, the linear relations was good, the most of recoveries for PAHs ranged between 64.9% ~ 97.5%, the relative standard deviations(RSDs) ranged from 4.0% ~ 15.2%. Finally, the developed analytical method has been successfully applied to the determination of PAHs in organism samples.

Keywords: organism; polycyclic aromatic hydrocarbons; GC-MS

用固相萃取和色谱联用技术分析柴油组成

袁维

（中石化股份有限公司天津分公司炼油部质检车间 300271）

本文介绍了利用固相萃取和色谱联用技术分析柴油组成的方法，首先利用固相萃取的方法将柴油分离成饱和烃和芳烃，分别加入等量内标物再分别取样进行气相色谱和质谱分析，通过芳烃和饱和烃的气相色谱图计算二者的含量，由质谱图得出芳烃和饱和烃的烃族组成，再根据饱和烃和芳烃的相对含量，由归一计算法得到柴油的烃族组成。

随着人们环境保护意识的逐渐加强以及对车用清洁燃料的要求不断提高，汽油和柴油的质量不断升级，2010年车用柴油全部达到国Ⅲ标准。车用柴油国Ⅲ标准中首次限制了多环芳烃的含量不大于，出口柴油对多环芳烃的含量要求更加苛刻，因此建立柴油烃族组成的分析方法，配合柴油质量全面升级意义尤为重要。准确测定芳烃和多环芳烃的含量是油品生产的迫切要求，但在油品的生产过程中，原料及工艺条件的变化与波动将直接影响油品的组成，尽快掌握油品组成的变化，及时调整操作条件才能生产出合格的产品。

首先利用固相萃取技术使饱和烃和芳烃分开，得到各自的分离样品，然后利用内标归一化定量方式在 GC-FID 上进行定量，得到样品的饱和烃和芳烃含量的族组成结果，在 GC-MS 上按 ASTM D2425 方法得到更详细的链烷、单、双和多环烷烃或芳烃的族组成信息。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP 7890GC/5973MS, 带 FID 检测器。

试剂：正己烷，正戊烷，二氯甲烷（均为分析纯），正构三十二烷（纯度大于 99.5%）。

1.2 实验条件

1.2.1 GC 工作条件

色谱柱	Agilent 19091s-433 毛细管柱 30m×0.25mm×0.25 μm		
进样量	1.0 μL		
分流比	30:1		
柱流量	2ml/min		
GC 进样口温度	300℃		
GC-MS 接口温度	280℃		
GC 柱箱温度	60℃	1 分钟	
	40℃/min	300℃	20 分钟
检测器温度	350℃		

1.2.2 MS 工作条件

EI	电离方式
EMV	941eV
GC-MS 接口温度	280℃
离子源温度	220℃

1.3 实验步骤

1.3.1 固相萃取分离柴油饱和烃和芳烃馏分

利用固相萃取柱（固定相为改性硅胶）上加入约 0.15ml 柴油，依次用正戊烷和二氯甲烷冲洗固相萃取柱，正戊烷萃取出柴油的饱和烃馏分，二氯甲烷萃取出芳烃馏分。溶剂用量为经典柱色谱的 1/70，样品处理时间 < 2min。

1.3.2 分别进样分析饱和烃和芳烃馏分

图1—芳烃分析色谱图

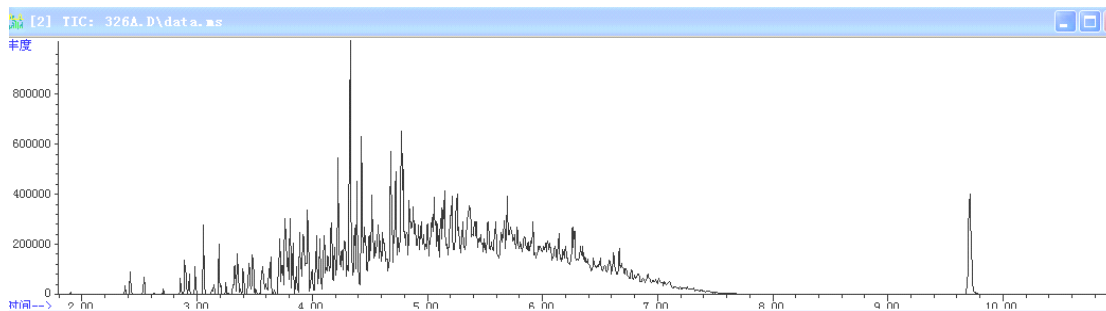


图2—芳烃分析质谱图

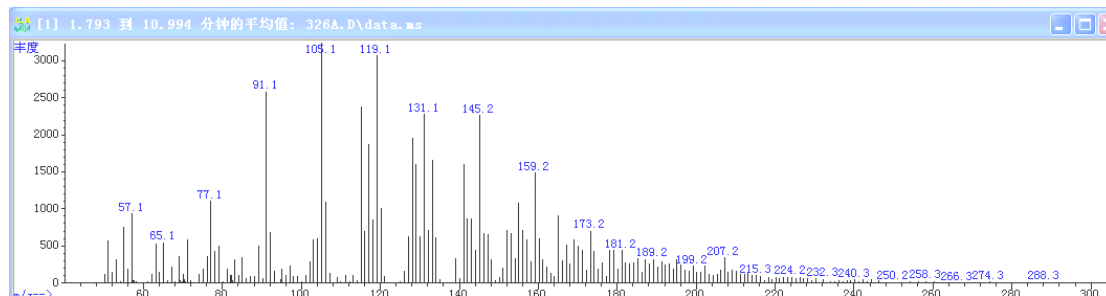


图3—饱和烃分析色谱图

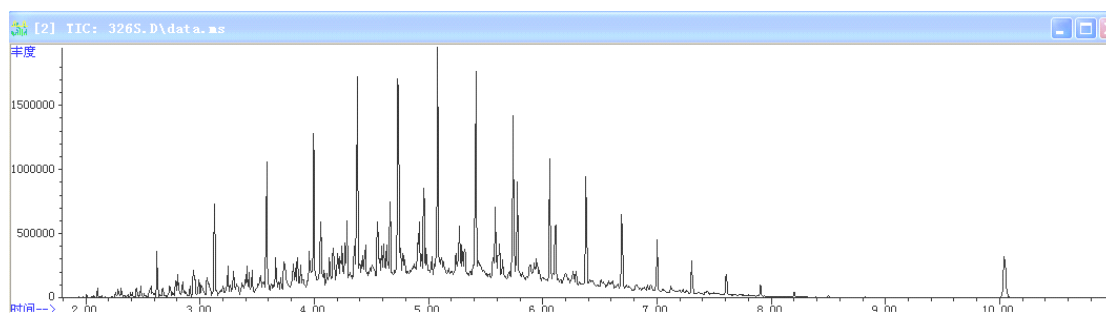
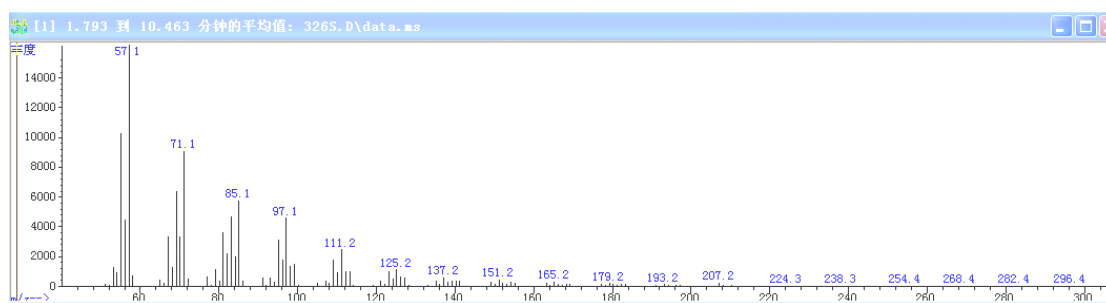


图4—饱和烃分析质谱图



2 定量计算

用内标法先求出饱和烃和芳烃相对于各自内标的含量,再将两者进行归一化处理得到最终的分析结果。所选内标为高碳数正构烷烃,如正构三十二烷,将其直接溶解在正戊烷或正己烷中即可得到相应的内标液。但内标法操作比较繁琐,需要准确确定样品中所加入的内标物含量,而本方法为了保证溶剂峰与样品峰能分开,选择了低沸点的烷烃做溶剂,所以更增加了内标浓度确定的困难。同时在放置过程中由于低沸点溶剂的挥发也会造成浓度的变化。

为此,本方法规定色谱测定时,在饱和烃和芳烃溶液中加入相同浓度和相同体积的内标液或相同质量的内标物,即令下式中的 mns 等于 mna ,从而使内标定量计算中的和可以互相约掉,在求相对含量时,内标量不参加计算。这样一来,内标液浓度及在放置过程中浓度变化对分析结果的影响就被最大限度地减少了。

饱和烃含量 = $(Asmns/Ans) / [(Asmns/Ans) + (Aamna/Ana)]$

芳烃含量 = $(Aamna/Ana) / [(Asmns/Ans) + (Aamna/Ana)]$

式中 As ——GC-FID 测量饱和烃的分析谱图上饱和烃的峰面积

Aa ——GC-FID 测量芳烃的分析谱图上芳烃的峰面积

Ans ——GC-FID 测量饱和烃的分析谱图上内标峰的峰面积

Ana ——GC-FID 测量芳烃的分析谱图上内标峰的峰面积

mns ——色谱分析用饱和烃馏分中加入的内标物质量

mna ——色谱分析用芳烃馏分中加入的内标物质量

当进行详细烃族组成分析时,只要将饱和烃或芳烃含量与按 ASTM D2425 方法得到的各馏分详细烃组成归一的结果相乘即可。

3 精密度

分析成品交库柴油结果见表 1,由表中数据可以看出总饱和烃、总单环芳烃和总芳烃的标准偏差均大于 1,是由于萃取操作不过关带来的影响,其他组分的标准偏差均小于 1。

表 1 柴油组成分析结果

馏分烃类组成	测定值			均值	标准偏差
链烷烃	45.6	46.7	45.6	46.3	0.62
一环烷烃	21.3	22.2	20.8	22.0	0.81
二环烷烃	8.7	8.9	8.9	9.0	0.20
三环烷烃	2.6	2.7	2.7	2.7	0
总环烷烃	32.6	33.8	32.4	33.7	0.98
总饱和烃	78.2	80.5	78.0	80.0	1.58
烷基苯	7.8	6.6	7.4	7.0	0.57
茚满或四氢萘	7.1	6.3	7.1	6.5	0.50
茚类	3.1	2.9	3.3	2.9	0.26
总单环芳烃	18.0	15.8	17.8	16.4	1.28
萘	0.7	0.6	0.7	0.6	0.10
萘类	1.1	1.1	1.2	1.1	0
茈类	0.8	0.8	0.9	0.8	0
茈烯类	1.0	1.0	1.1	1.0	0
总双环芳烃	3.6	3.5	3.9	3.5	0.24
三环芳烃	0.2	0.2	0.3	0.2	0
总芳烃	21.8	19.5	22.0	20.0	1.58
胶质	0	0	0	0	0
总重量	100.0	100	100	100	0

超声提取-GC/MS 测定贝类产品中的 多氯联苯

周群标, 王向红, 桑亚新, 王丽, 吉爽爽, 叶静

(河北农业大学食品科技学院, 保定 071000)

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一种典型的持久性有机污染物, 广泛存在于空气、水、土壤和食物中, 多氯联苯进入人体后, 有致毒致癌性, 能对人类健康危害极大^[1]。PCBs 是斯德哥尔摩公约中优先控制的 12 类持久性有机污染物之一。包括 209 种同系物异构体, 具有良好的阻燃性和稳定性, 被广泛应用于电力、液压油、阻燃剂等产品中, 由于其在自然环境中很难降解^[2]。因此, 在大气、水体、土壤、动物组织以及蛋类中也有多氯联苯检出。

水产品中多氯联苯的提取常用索氏提取法^[3], 但该方法所用时间较长, 不利于大批量样品的处理。由于技术条件、资金投入及其他一些客观因素的制约, 各实验室采用的方法存在一定的差距。超声波提取法被认为是分析固体基质较为简单的方法, 在油脂、蛋白、多糖和异黄酮等提取方面得到了广泛应用。多个研究表明, 超声波提取具有效率高、消耗能量少和不会对被提取的物质造成破坏等优点^[4]。本研究结合 GB/T 5009.190-2006《食品中指示性多氯联苯含量的测定》, 对秦皇岛水域不同贝类品种及不同组织中 7 种指示性 PCBs 单体进行了测定, 并对样品的前处理方法进行优化, 建立了采用超声提取, 硫酸和硅胶柱进行净化的方法, 简化前处理步骤, 以满足普通实验室对指示性多氯联苯的检测要求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

贝类样品采于秦皇岛沿岸养殖海域, 采集时间 2009.10.11, 活体采集, -20℃冷藏; 浓硫酸(分析纯); 正己烷(色谱纯), 无水 Na₂SO₄(分析纯), 天津科密欧公司; 层析硅胶(100目): 120℃过夜活化; PCBs 标准物质 10mg/l: PCB28、52、101、118、138、153 和 180 七种混合标准溶液: 德国 Dr 公司。

1.2 仪器及色谱条件

安捷伦气相-质谱联用仪(GC7890A/MS5975C)配有 Agilent NIST05.L 图谱库系统: 美国 Agilent 公司; TDL-5 型离心机: 上海飞鸽; S K-1 型涡旋混匀器: 麒麟医仪; RE52CS 真空旋转蒸发仪: 上海亚荣; JYL-A010 粉碎机: 山东九阳; S K 5200H 超声仪: 上海科导。

1.2.1 色谱条件

色谱柱: HP-5 石英毛细管柱(30 m×0.125 mm×0.125μm); 进样口温度 250℃; 升温条件: 100℃保持 2 min, 以 15℃/min 升至 180℃, 保持 0min, 3℃/min 升至 240℃, 保持 0min, 10℃/min 升至 270℃, 保持 2 min。载气(He)恒流: 1.0ml/min; 不分流进样; 进样量 1ul; 后运行: 280℃(2min)。

1.2.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源; 电子能量 70ev; 离子源温度: 250℃; 传输线温度: 280℃。

1.3 标准曲线的制作

将 10mg/l 的 PCBs 标准品用正己烷分别稀释成 300、200、100、50、25、10ng/ml 的标准溶液。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，自动定量绘制标准曲线。线性方程及相关系数见表 1。

表 1 7 种 PCBs 的标准曲线及其相关系数

名称	线性方程	相关系数 r	线性范围(ug/mg)
PCB28	$Y=3.778X-1.006$	0.9992	0.010-0.400
PCB52	$Y=2.598X-7.529$	0.9994	0.010-0.400
PCB101	$Y=2.614X-1.009$	0.9981	0.010-0.400
PCB118	$Y=2.336X-6.291$	0.9990	0.010-0.400
PCB130	$Y=2.112X-8.257$	0.9968	0.010-0.400
PCB153	$Y=3.084X-1.147$	0.9992	0.010-0.400
PCB180	$Y=1.729X-3.996$	0.9997	0.010-0.400

1.4 样品处理^[5-7]

贝类化冻，洗净泥沙，去除贝壳，粉碎机混匀贝肉。取样品 5g 置于具塞试管中，加入 3g 无水硫酸钠，加 20ml 正己烷，45℃ 超声 60min，3000 rpm 离心分离 5 min，取上清液于梨形瓶中，重复一次，合并上清液，旋转蒸发至干。5ml 正己烷分两次溶出，转入小试管中，取 2ml 浓硫酸加入，混匀，静置待溶液分层后，取上清过硅胶柱（2g 硅胶，上层覆盖 2g 无水硫酸钠），用 30ml 正己烷淋洗，收集并浓缩洗脱液，将洗脱液定容置 1ml，供 GC/MS 测定，外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 标准物及样品分析色谱图

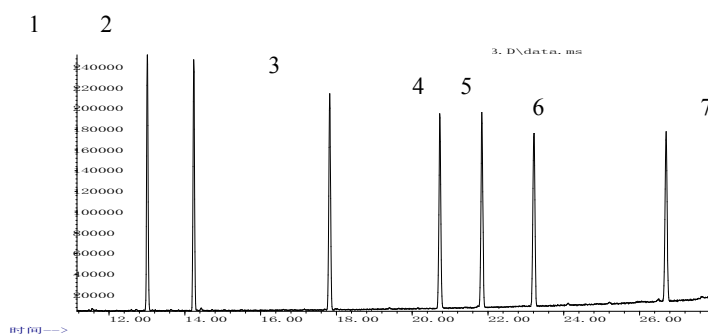


图 1 PCBs 标准样品 GC/MS 总离子流图

注：1 PCB28；2 PCB52；3 PCB101；4 PCB118；5 PCB130；6 PCB153；7 PCB180

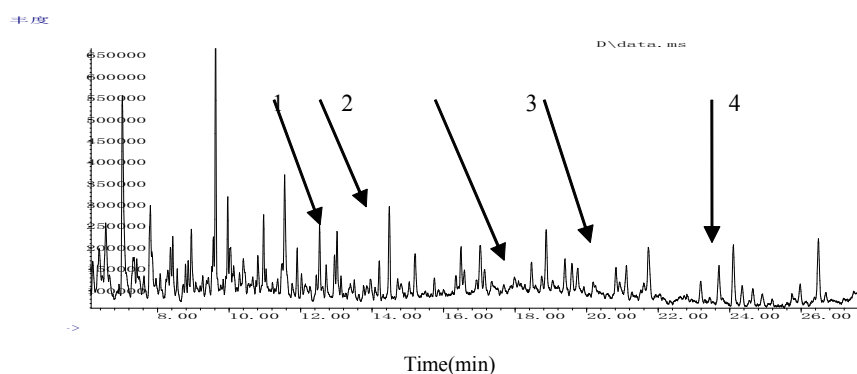


图2 海湾扇贝 GC/MS 总离子流图

注: 1 PCB28; 2 PCB52; 3 PCB101; 4 PCB118; 6 PCB153

2.2 样品精密度、回收率及检测线

配制 0.100ug/ml 混合标准溶液, 取 1ul 进样, 平行测定 6 次, 计算 RSD, 结果见表 2。

取混匀的贝肉样品 5g, 共 6 份, 分别加入 50ng 的混合标准溶液, 按照 1.4 样品处理方法进行处理。最低检测限以 3 倍信噪比计算, 结果见表 2。

表2 7种 PCBs 的回收率、检出限及精密度(n=6)

PCBs	回收率 (%)	RSD (%)	检出限 (ug/kg)
PCB28	83.42	5.52%	0.03
PCB52	80.92	5.12%	0.04
PCB101	81.31	4.89%	0.04
PCB118	81.67	3.70%	0.03
PCB138	94.37	4.24%	0.06
PCB153	96.89	4.67%	0.08
PCB180	93.89	4.13%	0.08

2.3 贝类样品的测定

2.3.1 不同品种贝类中 PCBs 的含量

表3 不同贝类品种中 7 种 PCBs 的含量 (ug/kg)

名称	海湾扇贝	花蛤	牡蛎	虾夷扇贝
PCB28	4.432	2.204	4.282	4.292
PCB52	10.446	8.836	10.948	5.606
PCB101	4.142	--	4.144	--
PCB118	4.332	4.256	4.226	4.226
PCB130	--	--	--	--
PCB153	7.260	2.632	--	--
PCB180	--	--	--	--
PCB 总量	30.612	17.928	23.600	14.124

注: "--"表示未检出。

由表 3 可知, 海洋贝类对有机氯具有较明显的富集作用; 渤海湾秦皇岛养殖海域采集的

不同贝类样品中 PCBs 的含量在 14.124-30.612ug/kg, 远低于 GB9674-88《海产食品中多氯联苯限量卫生标准》200ug/kg^[8]; 不同贝类对有机氯化化合物的累积程度有差异, 海湾扇贝和牡蛎中的含量较高, 而花蛤和虾夷扇贝较低, 这可能与贝类的养殖期和脂肪含量有关, 养殖期越长其体内富集的 PCBs 就越多。PCBs 的脂溶性较强, 故其在脂肪含量较多的牡蛎中富集也就较多^[9-10]。

2.3.2 不同贝类组织中 PCBs 的含量

表 4 海湾扇贝不同组织中 7 种 PCBs 的含量 (ug/kg)

名称	内脏	卵黄	裙边	贝柱
PCB28	10.990	5.433	2.023	5.300
PCB52	25.395	12.873	1.973	11.210
PCB101	10.410	5.183	2.009	2.593
PCB118	11.140	5.340	2.086	5.595
PCB138	10.075	2.665	3.780	--
PCB153	10.930	7.013	1.559	2.736
PCB180	11.445	5.623	2.036	5.805
PCB 总量	90.385	44.128	15.465	33.239

注: "--"表示未检出。

由表 4 可知, 在海湾扇贝的不同组织中均有检出 PCBs, 其中以内脏中的富集量为最多, 高达 90.385 ug/kg, 卵黄次之, 裙边和贝柱的含量最少。因内脏和卵黄中的脂肪和卵磷脂较多, 故其含量要远高于裙边和贝柱, 但上述结果与国标 GB9674-88 相比未有超出限量标准。

2.4 实验条件的选择和讨论

2.4.1 提取及净化方法的探讨

样品处理时充分捣碎有利于被测物质溶解和分散。在国标 GB/T5009.190-2006 中采用的是索氏提取, 该法方法繁杂、耗时, 且试剂挥发较多不利于人体健康。而超声提取贝类中的多氯联苯具有快速、高效、试剂消耗少等优点。贝类产品中含有大量的油脂和蛋白质等成分, 测定时应除去这些杂质, 以免影响测定结果。浓硫酸能够使蛋白质糖类成分变性碳化, 而 Na₂SO₄-硅胶柱有着较好的净化效果, 使用二者能够达到减少基质干扰的效果, 实验表明回收结果能达到 80%以上。

2.4.2 GC/MS 法测定条件的探讨

用标准溶液进行 GC/MS 测定, 确定 7 种多氯联苯单体的保留时间及碎片峰, 用各单体保留时间和 MS 特征子离子进行定性, 用所选定各单体定量离子进行定量。该法本底低, 各单体 PCBs 不易与干扰物发生干扰, 具有高的选择性, 可将 7 种 PCBs 单体进行准确的定性和定量分析, 适于普通实验室使用。

3 结论

通过超声优化建立了贝类海产品的前处理条件, 与国标相比降低了成本, 缩短了时间, 方法简便、快速、高效且稳定, 值得推广。该法除了适用于贝类海产中 PCBs 的分析, 也可满足对鱼、虾、蟹等其它水产可食部分中 PCBs 微量残留的分析测定。

采用 GC-MS 法定量测定了渤海湾秦皇岛海域不同贝类样品和不同组织中 PCBs 的含量, 结果表明牡蛎和海湾扇贝对 PCBs 的富集能力较强, 可作为沿海有机氯污染监测较理想的生

物指示种；海产贝柱中 PCBs 的含量远低于内脏，建议食用时弃去内脏。本研究表明渤海湾秦皇岛海域经济贝类已受到了 PCBs 的污染，虽然其含量均远低于食用卫生标准，但应引起有关部门的注意，及早防范，制定相应的管理措施，使 PCBs 的污染降到最低。

参考文献:

- [1] 联合国环境规划署. 环境署倡导消除持久性有机污染物多氯联苯 [R]. 日内瓦:联合国环境规划署, 2004.
- [2] 王玉飞, 陈晓红, 傅小红. 气相色谱-串联质谱法测定生物样品中的多氯联苯和滴滴涕 [J]. 色谱 2007, 25(1): 112-113
- [3] GB/T5009. 190-2006 食品中指示性多氯联苯含量的测定 [S].
- [4] 王大娟, 贾晓珊, 余光辉. 超声波提取植物性食品中六氯苯的研究. 食品科学, 2006, 27(12): 319-322
- [5] 张景明, 胡冠九, 多氯联苯的气相色谱/质谱/质谱法测定 [J]. 中国环境监测, 2003, 19(3): 5-8
- [6] 王玉飞, 金米聪, 陈晓红. 海产品中指示性多氯联苯单体的 GC/MS/MS 法快速定量测定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1511-1512
- [7] 王春玲, 张玉军, 刘建平, 等. 超声波对蜂胶中有效成分的提取率影响的研究. 郑州工程学院学报, 2003, 24(4): 28-33
- [8] GB/9674-88 海产食品中多氯联苯限量卫生标准 [S].
- [9] 陈伟琪, 张珞平, 王新红. 厦门岛东部和闽江口沿岸经济贝类中持久性有机氯农药和多氯联苯的残留水平 [J]. 台湾海峡, 2001, 20(3): 330-334
- [10] 刘仁沿, 吴世培, 王斌. 长江口以北沿海主要经济贝类中有机氯农药和多氯联苯的分布及评价 [J]. 海洋环境科学, 1996, 15(2): 29-35.

Determination of polychlorinated biphenyls by GC/MS with ultrasound-assisted extraction from shellfish

ZHOU Qun-biao, Wang Xiang-hong, SANG Ya-xin, Wang Li, JI Shuang-shuang, YE Jing
(College of Food Science & Technical, Agricultural University of HeBei, Baoding 071001)

Abstract: An efficient extraction method by ultrasound-assisted extraction (UAE) was developed for the extraction of polychlorinated biphenyls (PCB 28,52,101,118,130,153,180) from various shellfish. Analytes were determined by gas chromatography-mass spectrometry in selected ion monitoring (SIM) mode. All the samples were extracted by n-hexane and decontaminated by concentrated sulfuric acid. The resulting samples were determined by quantitative detection by comparison to external standards. The average recoveries of seven kinds of PCBs ranged from 80.92% to 93.89% and the lowest detectable limit was 0.08-0.03 ug/kg. The average concentrations of total PCBs were 14.12-30.61 ug/kg in the samples. This method was highly effective in reducing the cost and time for the pretreatment of samples. This method may be applied for the screening and monitoring of shellfish for organic pollutants in coastal waters.

Keywords: ultrasound-assisted extraction; GC/MS; shellfish; PCBs

药物中杂质鉴定新技术——MassWorks

顾鸣¹, 李卫建², 李宗华²

(1. Cerno Bioscience, 康州, CT06810, 美国;

2. 北京绿绵科技有限公司, 北京 100080, zonghua_li@lumtech.com.cn)

本文介绍一种用UPLC进行色谱分离, 单四极质谱检测, MassWorks数据处理, 鉴定药物中杂质组成的新技术。作为一项新技术, MassWorks实现了在低分辨率质谱上的精确质量数测定和分子式的准确识别。

药品中少量的杂质会大大降低药物的疗效或造成不良药物反应, 因此, 鉴定这些杂质的组成, 对于监管机构来说就是一项必不可少的工作。鉴定这些杂质, 首先需要测定这些它们的元素组成。过去, 我们只能借助高分辨率质谱(诸如qTOF、FT-ICR、或Orbitrap)测定精确质量数, 然后确定这些杂质的元素组成——分子式。现在, 我们借助MassWorks处理技术, 可以在低分辨率质谱上测定精确质量数, 然后结合MassWorks同位素峰形检索技术, 可以更加准确地测定目标物的分子式, 以准确鉴定药物中杂质的组成。

1 实验

辛伐他汀由土曲霉菌发酵生物合成, 是一种降血脂药物, 属于一类药品的“他汀”类, 用于控制高胆固醇血症, 并防止心血管疾病。将市场购买的辛伐他汀药物, 用超高压液相色谱(UPLC)(Waters, Milford, MA)分离, 单四极质谱仪(Waters Acquity SQD)检测。质谱采集方式: profile mode; 扫描速度: 1000 amu/s; 扫描范围: 380 to 520。用 MassWorks software (Cerno Bioscience, Danbury) 对 MassLynx 采集的质谱数据进行处理, 测定目标物的精确质量数, 并识别目标物的分子式。

2 结果与讨论

图1是样品的总离子流图, 由于采用了UPLC进行分离, 全部成分在9分钟之内全部出完, 4.4分钟的主峰即辛伐他汀, 其前后的小峰为杂质峰, 具体的保留时间见表1。

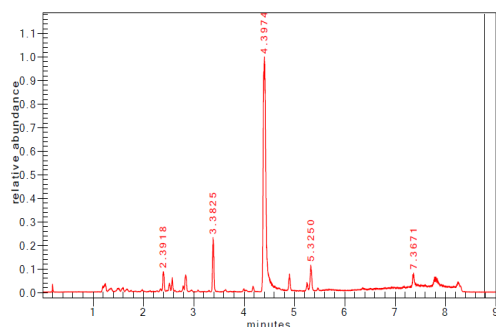


图1 辛伐他汀药物总离子流图

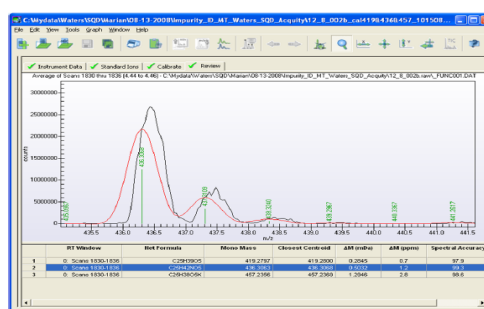


图2 辛伐他汀离子校正结果

辛伐他汀经ESI被离子化产生 $[M+H]^+$ 、 $[M+N_4H]^+$ 、 $[M+K]^+$ 三种离子, 其 m/z 分别为419、436和457。由于辛伐他汀的元素组成是已知的, 因此我们以它的离子作为MassWorks数据处理的内标, 建立校正函数, 对 m/z 和峰形进行校正。图2是MassWorks处理校正结果, 质量精度和谱图精度是衡量校正性能的重要指标, 3种离子的相对质量误差均小于5ppm, 谱图精度达到98%, 如此高的同位素峰形谱图精度, 为目标物的校正和同位素峰形检索元素组成的可靠性和准确性, 提供了保证。

将建立的校正函数应用到整个液相色谱/质谱数据, 以鉴定辛伐他汀杂质的元素组成。检索前, 设定目标物可能包含的元素为C、H、N、O、K、Cl和S, 原子数上限分别设定为30、200、10、10、1、5、5, 下限为0; 质量误差上限为10 mDa。尽管大部分杂质与主成份组成相似, 可能产生 $[M+H]^+$ 、 $[M+N_4H]^+$ 、 $[M+K]^+$ 3种离子, 但由于部分离子的丰度太低, 我们选择丰度相对较高的 $[M+H]^+$ 或 $[M+N_4H]^+$ 检索, 以识别杂质的分子式。

MassWorks 测定结果见表 1, 除保留时间为 4.0 分钟的杂质, 由于信噪比低导致谱图精度相对较差, 结果导致目标物的分子式位于待选分子式 (共 34 个) 的第 4 位外; 其余的杂质均位于各自待选分子式的前两位, 谱图精度均高于 97.2%, 质量误差小于 5.7mDa.

表 1 MassWorks 测定的杂质分子式结果

分子式	质量/Da	误差/mDa	相对误差/ppm	谱图精度	保留时间	排序	待选个数
C25H44N05	438.3219	4.4	10.1	98.4	4.88	1	34
C25H40N04	418.2957	5.7	13.7	99.1	5.33	1	28
C25H4106	437.2903	1.8	4.1	99.4	3.38	1	49
C24H40N05	422.2906	8.3	19.8	94.5	4.04	4	34
C24H40N05	422.2906	7.1	16.9	98.1	3.95	3	32
C26H44N05	450.3219	-0.4	-0.8	97.3	5.24	1	33
C25H40N05	434.2906	-1.4	-3.1	97.2	4.18	2	36

在用 MassWorks 处理液相色谱/质谱数据, 鉴定目标物分子式的时候, 我们可以看到, 同时利用质量精度和谱图精度进行检索, 其效果远高于仅用质量精度的结果。表 2 和表 3 列出了这两种方法对辛伐他汀酸测定的结果, 质量精度结合谱图精度进行检索时, 辛伐他汀酸由于其谱图精度为 99.4%, 远高于其它待选分子式, 位于第 1 位; 而当仅利用质量精度进行检索时, 辛伐他汀酸因其质量误差为 1.8mDa, 仅位于待选分子式的第 9 位。因此, 谱图精度是未知物分子式识别的重要手段。

表 2 MassWorks 以质量精度和谱图精度同时检索结果

排序	分子式	质量/Da	误差/mDa	相对误差/ppm	谱图精度	不饱和度
1	C25H4106	437.2903	1.8	4.1	99.4	5.5
2	C22H33N10	437.289	0.5	1.1	98.8	11.5
3	C21H37N6O4	437.2876	-0.9	-2.0	98	6.5
4	C26H37N4O2	437.2917	3.2	7.2	97.8	10.5
5	C27H37N2O3	437.2804	-8.1	-18.5	97.5	10.5
6	C23H41N4O2S	437.295	6.5	14.9	97.1	5.5
7	C24H41N2O3S	437.2838	-4.7	-10.8	96.9	5.5
8	C20H37N8O5	437.2811	-7.4	-16.9	96.7	6.5
9	C19H37N10S	437.2923	3.8	8.8	96.6	6.5
10	C20H41N2O8	437.2863	-2.2	-5.1	96.1	1.5

表 3 仅以质量精度为依据辛伐他汀酸检索结果

排序	分子式	质量/Da	误差/mDa	相对误差/ppm	谱图精度	不饱和度
1	C22H33N10	437.289	0.5	1.1	98.8	11.5
2	C29H410S	437.2878	-0.7	-1.6	95.7	9.5
3	C21H37N6O4	437.2876	-0.9	-2.0	98.2	6.5
4	C21H42N4O3K	437.2894	0.9	2.1	94	2.5
5	C20H42N4O4C1	437.2895	1.0	2.2	73	1.5
6	C21H45N2O3S2	437.2872	-1.3	-3.1	93	0.5
7	C16H38N10O2C1	437.2868	-1.7	-3.9	72.8	2.5
8	C17H38N10O2K	437.2867	-1.8	-4.1	93.1	3.5
9	C25H4106	437.2903	1.8	4.1	99.5	5.5
10	C20H41N2O8	437.2863	-2.2	-5.1	96.4	1.5

3 结论

UPLC串接单四级杆质谱采集数据后, 用Massworks对数据进行处理, 通过质量精度和光谱精度, 可以准确鉴定辛伐他汀药物中所有杂质的组成。

分子式精确的同位素分布中蕴藏的指纹信息, 是成功鉴定化合物分子式的重要依据。单四级杆的高动态范围, 有助于产生精确的同位素分布。UPLC在色谱上的高分离度, 可以补偿传统单四级杆质谱在质谱分离的低分辨。因此, 借助新的分子式识别技术——Massworks, 单四级杆质谱可以用来准确地识别药物中杂质的组成, 且单四级杆质谱使用方便, 价格便宜。

聚丙烯酸高级酯的裂解色谱质谱分析研究

张红玲¹, 范国樑¹, 徐海红², 贾子麒², 李春漫², 李国平²

(1. 天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072; 2. 中国石油管道科技研究中心, 河北 廊坊 065000)

石油管道运输是目前最经济的石油输送方式, 而降凝剂又是提高石油管道运输能力、降低输送能耗和成本的最有效的方法[1]。对于降凝剂产品的成分分析, 国内还没有统一的分析方法和评价标准, 国外也鲜见相关研究成果的报道。本文应用裂解气相色谱-质谱联机对聚丙烯酸高级酯原油降凝剂进行定性研究。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

丙烯酸十八酯（工业级, 天津天骄化工有限公司）; 聚丙烯酸十八酯自己合成制备。正庚烷（分析纯, 天津市河东区红岩试剂厂）

安捷伦 6890 气相色谱（美国安捷伦公司）; 5973 质谱检测器（美国安捷伦公司）; PYROJECTOR II 裂解器（澳大利亚 SGE 公司）; 固体进样器, 液体注射器（澳大利亚 SGE 公司）。

1.2 实验条件

热裂解器温度为 600℃ 对样品进行热裂解; 气相色谱进样口温度为 300℃; 毛细管色谱柱 HP-5MS, 柱长为 30m, 内径为 0.25mm, 固定相（聚硅氧烷含 5% 苯基）液膜厚度为 0.25 μm; 气相色谱程序升温条件为: 50℃ 恒温 5min, 15℃/min 的升温速率程序升温至 280℃, 保持 280℃ 恒温 10min, 氦气作载气, 载气模式恒流模式为 1mL/min 的, 分流比为 50:1, 质谱检测器离子源温度为 230℃; 质谱质量过滤器温度为 150℃; 质量扫描模式为 20amu 至 450amu。

2 结果

通过对裂解温度的研究确定裂解温度为 600℃ 时, 能够较好的反映聚丙烯酸高级酯的结构特征, 方便酯链长度的鉴别（图 1A）。从裂解产物的气相色谱-质谱联机分析结果来看, 聚丙烯酸酯的热裂解主要生成的是以直链的端位一烯、二烯和直链的正构饱和烃为主的裂解产物, 它同聚乙烯塑料的热裂解谱图有着许多的相似之处（见图 1B 和图 2D）。利用这种相似性成功地解决了聚丙烯酸高级酯的碳链长度的判断研究。一般聚丙烯酸酯的酯基碳链长度是从十几到二十几, 随着它们碳链的长短变化对降凝剂的性质产生很大的影响, 对它的确定十分重要。

正是由于聚丙烯酸高级酯同聚乙烯塑料都存在较长碳链的热裂解过程, 都会产生出相同的相差一个碳数的系列端位烯烃和直链饱和烃。而聚乙烯的这些特征峰更容易进行分子量的判断, 更容易确定它们的分子式。这就为我们提供了鉴别聚丙烯酸高级酯的酯基碳链长度的方法。聚丙烯酸高级酯的酯基碳链的热裂解虽然与聚乙烯相同, 但低碳数的少, 而高碳数的裂解产物在电子轰击的电离下很难存在分子离子峰, 这就为对它们直接使用它们的裂解产物进行酯基碳数识别造成了困难。同时聚丙烯酸酯很难获得纯品的标准样, 它们都是不同高级酯的共聚物, 所以采用标准样品的定性方法也不现实。

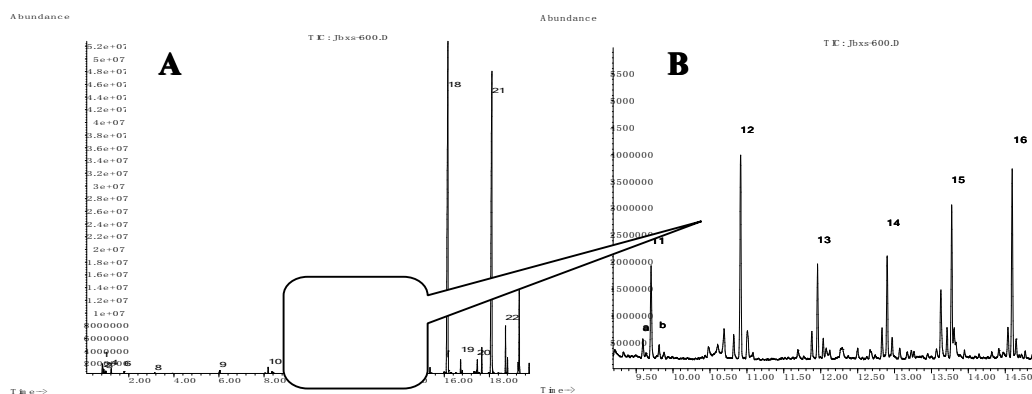


图1 600°C时聚丙烯酸十八酯的裂解总离子流图

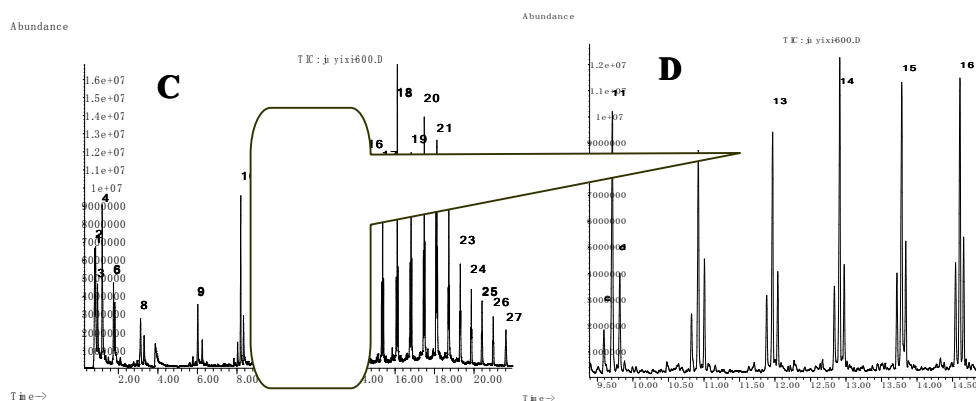


图2 600°C时聚乙烯（PE）的裂解总离子流图

图2 C是在与聚丙烯酸酯同样条件下的聚乙烯塑料的裂解色谱的总离子流图，它的裂解产物分子可以从几个碳到三十个碳，完全覆盖了聚丙烯酸酯的裂解产物的碳数，弥补了不能获得商业纯品聚丙烯酸酯的标准品的问题，解决了酯基碳链长度确定的困难。

3 讨论

应用裂解色谱—质谱联机操作，解决了对降凝剂聚丙烯酸酯的结构确认问题，重点的解决了在不能够获得不同碳数聚丙烯酸高级酯标准样品的情况下，同过对聚乙烯塑料的裂解谱图的对比，实现了对聚丙烯酸酯的碳数确定问题。

参考文献：

- [1] 付雪，李丹东，于海莲等，聚丙烯酸酯降凝剂的制备及应用，辽宁石油化工大学学报，2006，26(3).

The Analysis of poly (alkyl acrylate) by pyrolysis gas chromatography - mass spectrometry

ZHANG Hong-ling¹, FAN Guo-liang¹, XU Hai-hong², JIA Zi-qi², LI Chun-man², LI Guo-ping²

(1. School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. R&D Center of Petro China Pipeline Company, Petro China Company Limited, Langfang 065000, China)

Abstract: According to the pyrolyzed substances of polyethylene by pyrolysis gas chromatography - mass spectrometry succeed to resolve branched-chain carbon atoms number distribution of poly(alkyl acrylates).

Key words: PY / GC-MS; poly (alkyl acrylate)

聚丙烯酸十八酯的热裂解规律的研究

张红玲¹, 范国樑¹, 徐海红², 贾子麒², 李春漫², 李国平²

(1.天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072; 2.中国石油管道科技研究中心, 河北 廊坊 065000)

聚丙烯酸高级酯是石油管道输送中使用最多的降凝剂, 该降凝剂的酯基碳链的长短对降凝效果影响很大, 降凝剂中极性基团与长链烷基的含量达到最佳比例, 才能获得最佳的改性效果^[1-4]。因此为了对酯基碳链的长度给予正确的测定, 这就要求研究聚丙烯酸酯在不同温度下的热裂解产物的变化规律, 确定最佳的分析条件。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

丙烯酸十八酯（工业级，天津天骄化工有限公司）；聚丙烯酸十八酯自己合成制备。正庚烷（分析纯，天津市河东区红岩试剂厂）

安捷伦 6890 气相色谱（美国安捷伦公司）；5973 质谱检测器（美国安捷伦公司）；PYROJECTOR II 裂解器（澳大利亚 SGE 公司）；固体进样器，液体注射器（澳大利亚 SGE 公司）。

1.2 实验条件

热裂解装置温度设为 400-800℃，每隔 50℃ 对样品进行热裂解分析；气相色谱进样口温度为 300℃；使用的色谱柱长为 30m，内径为 0.25mm，固定相（聚硅氧烷类，含 5% 苯基）液膜厚度为 0.25 μm 的 HP-5MS 毛细管柱；气相色谱程序升温条件为：50℃ 恒温 5min，15℃/min 的升温速率程序升温至 280℃，保持 280℃ 恒温 10min，氦气作载气，载气模式恒流模式为 1mL/min 的，分流比为 50:1，质谱检测器离子源温度为 230℃；质谱质量过滤器温度为 150℃；质量扫描模式为 20amu 至 450amu。

2 结果

丙烯酸十八酯和十八醇是聚丙烯酸十八酯热裂解产生的最具特征的能够同大多数其它共聚物区分的特征裂解产物，它们对聚丙烯酸酯高聚物结构类型的鉴别具有十分重要的作用，原则上它们的峰值（丰度）越高鉴别的可靠性、灵敏度也就越高，从图 1、图 2 可以看出当裂解温度较低时高聚物的裂解产物以丙烯酸十八酯单体和十八醇为主，裂解产物简单易于识别，但存在的问题是此时裂解效率低，裂解不充分，对仪器的影响较大，同时也出现检测灵敏度偏低的问题。随着裂解温度的升高裂解效率增加，裂解产物也越来越复杂，虽然两

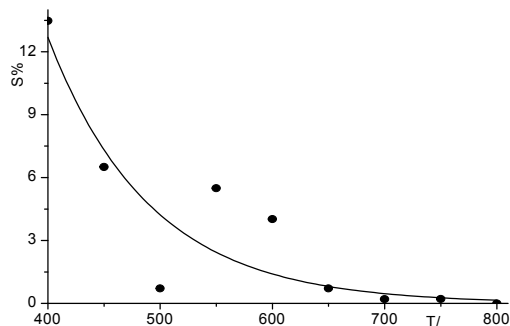


图 1 丙烯酸十八酯含量随温度的化曲线

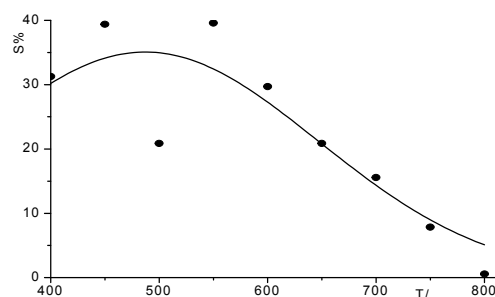


图 2 十八醇含量随温度的化曲线

个特征裂解产物的相对比例在整个裂解产物中有所下降，但绝对丰度值确变化不大。当裂解

温度超过 600℃ 以后，特征峰的丰度出现了明显下降的趋势，随着裂解温度继续增高不仅相对比例下降很大，而且绝对丰度值也出现了加速下降的过程。因此热裂解温度以不超过 600 度为好。由于聚丙烯酸酯的酯基碳链长度需要使用裂解产物端位烯烃进行判断，有必要进一步考察十八烯的裂解情况。图 3 显示 600 度时十八烯的相对比例基本不变，维持在较高的水平上，也符合分析检查的要求。图 4 是甲苯的变化情况，虽然聚丙烯酸酯中并不包含任何芳烃类化合物，热裂解产物中不应该出现芳香烃化合物，但实际中由于裂解温度的不断升高，裂解炉中的化学反应已经不再是简单的共聚物断裂过程，而是出现了十分复杂化学反应，芳烃类化合物由于其稳定的化学结构，就更容易出现。所以过高的裂解温度会给实验分析带来许多不必要的麻烦。

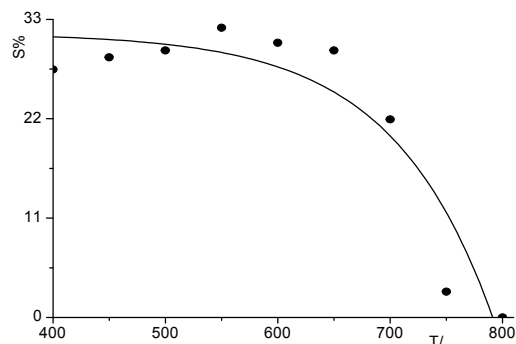


图 3 十八烯含量随温度的化曲线

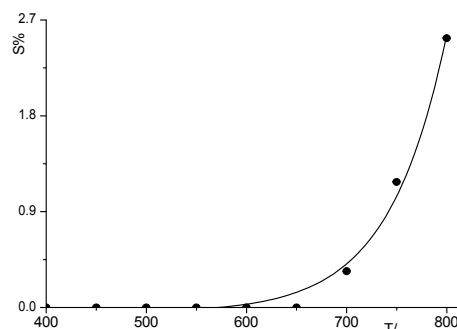


图 4 甲苯含量随温度的化曲线

3 讨论

以上面四种化合物为代表研究了聚丙烯酸酯在不同裂解温度中典型裂解产物的变化情况。它们呈现出完全不同的变化规律，但都在 600 度附近显现出明显的转变，说明该温度是比较重要的，尤其是芳香烃的出现说明当裂解温度超过 600 度以后大量的二次反应产物急剧增加对聚丙烯酸酯的结构鉴定产生不好的影响。

参考文献:

- [1] 邸进申, 张诚, 李英杰等, 原油流动改进剂的制备及应用, 石油炼制与化工, 1997, 28 (8): 43.
- [2] 杨嘉玲, 常景龙, 对新型降凝剂研究的评述[J], 油气储运, 1997, 16 (5): 5.
- [3] 王丽鹃, 田军, 聚合物型原油降凝剂的作用机理及应用, 精细石油化工, 1997, 5: 5.
- [4] 侯朝霞, 马敬环, 蒋薇, 高凝原油降凝剂的研制和应用, 吉林化工学院学报, 2000, 17 (1): 20.

The Low of poly (n-octadecane alkyl acrylate) by pyrolysis gas chromatography - mass spectrometry

ZHANG Hong-ling¹, FAN Guo-liang¹, XU Hai-hong², JIA Zi-qi², LI Chun-man², LI Guo-ping²

(1. School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. R&D Center of Petro China Pipeline Company, Petro China Company Limited, Langfang 065000, China)

Abstract: The study low of pyrolyzed substances of poly (n-octadecane alkyl acrylate) under the different temperature from 400 to 800 °C with the pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry.

Key words: PY / GC - MS; poly (alkyl acrylate)

GC-MS 法测定抑尘剂中的甲醛、乙醛含量

李静¹, 何秀坤¹, 那顺²

(1. 中国电子科技集团公司第46研究所, 300192; 2. 安捷伦有限公司, 北京办事处)

本文建立了抑尘剂中甲醛、乙醛含量的衍生气相色谱-质谱联用技术测量方法, 最低检出限甲醛小于15 $\mu\text{g/L}$, 乙醛小于50 $\mu\text{g/L}$, 回收率为85%~100%, 相对标准偏差小于5%。

1 前言

对于日常生活影响最大是空气污染, 在美国环境署发布的报告中指出: 空气污染92%为扬尘(尤其是PM_{2.5-10}的微粒), 其来源: 28%为裸露面, 23%来自建筑工地。由于抑尘剂使用方便效果良好, 喷洒一次就可以使自由落尘和道路遗留尘土大量减少。因此, 越来越受到了人们的重视。抑尘剂是一种人工合成的含水有机乳化液, 因而对其中所含的有害物质甲醛、乙醛就需要监控检测。本文利用甲醛、乙醛在酸性条件下与2, 4-二硝基苯肼衍生反应生成2, 4-二硝基苯腙, 经二氯甲烷萃取后, 用气相色谱-质谱联用技术定性和定量测量。该方法具有灵敏度高、准确、简便等特点。

2 实验部分

2.1 仪器与测试条件

PE公司的Clarus 600气相色谱-质谱联用仪; Elite-5MS色谱柱 30m \times 0.25mm \times 0.25 μm ; 可控温油浴装置和震荡装置。

色谱条件: 进样口250 $^{\circ}\text{C}$; 程序升温过程: 柱初温80 $^{\circ}\text{C}$ 保持2min, 以5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至150 $^{\circ}\text{C}$ 保持2min, 再以7 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至220 $^{\circ}\text{C}$ 保持3min; 载气为高纯氦气流速1.0mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 不分流方式进样, 进样量1 μL ^[1]。

质谱条件: GC-MS接口温度280 $^{\circ}\text{C}$, 离子源250 $^{\circ}\text{C}$, 电离方式EI, 电离能量70eV, 光电倍增管电压500V, 溶剂延迟8min, 扫描质量范围50—300m/z, 检测方式SIM, 甲醛选择离子63, 79, 210m/z; 乙醛选择离子163, 224 m/z。

2.2 试剂

甲醛标物浓度11.2mg/mL; 乙醛标物浓度1.0 mg/mL, 临用时配制成需要的浓度。

2, 4-二硝基苯肼溶液: 精确称取0.1000g 2,4-二硝基苯肼(分析纯), 溶解于24mL浓盐酸中, 加水定容至100mL。

二氯甲烷(色谱纯, 经质谱检测器检测无杂质后方可使用)

无水硫酸钠(分析纯): 经300 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧2小时, 冷却后贮存于干燥器中备用。

2.3 样品制备和测定

为避免抑尘剂中有机乳化液的干扰, 本实验选用蒸馏方法提取样品中的甲醛。根据样品的含量, 准确移取适量体积的样品, 加20%磷酸5mL, 用冰浴接受馏出液并准确定容, 然后用于衍生后GC-MS测定^[2]。

样品衍生过程, 移取样液10mL加入配制的2,4-二硝基苯肼溶液1.5mL, 在60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中衍生30min, 快速冷却后用5mL二氯甲烷分两次萃取, 用无水硫酸钠脱水, 用0.22 μm 滤膜过滤后, 再用GC-MS测量, 标样中的甲醛、乙醛衍生物选择离子流图如图1所示^[3]。

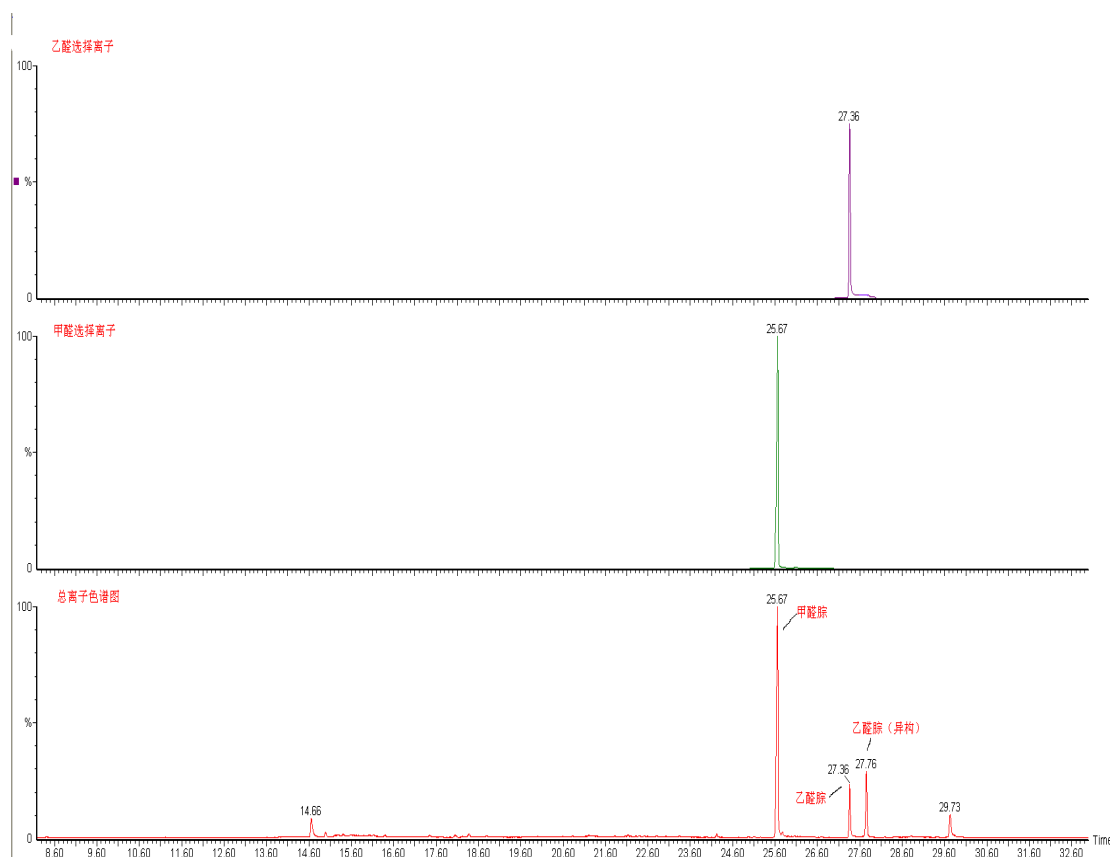
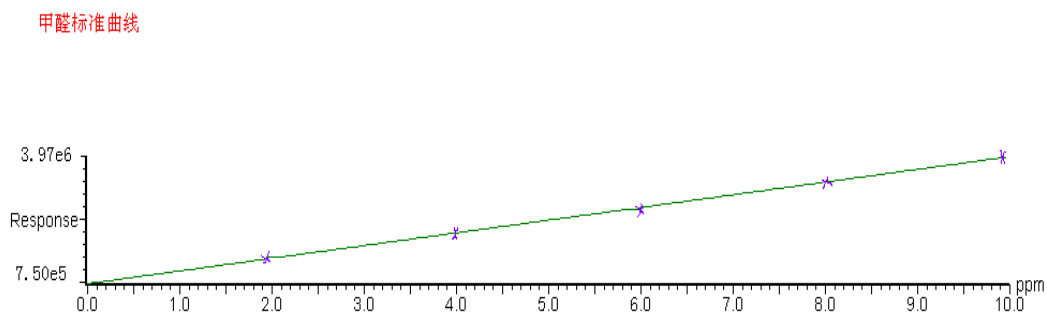


图1 标样中的甲醛、乙醛衍生物选择离子流图

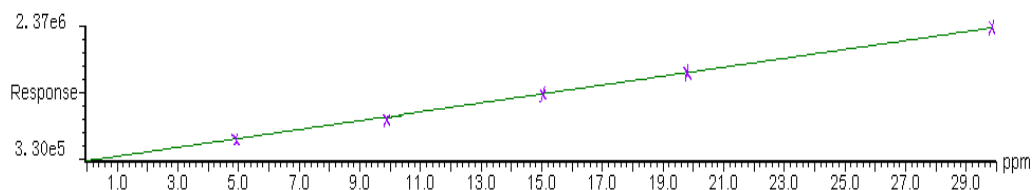
2.4 标准曲线绘制及标定

用水稀释甲醛、乙醛标样成 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,再分别配制甲醛系列 $2.0,4.0,6.0,8.0,10.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,乙醛系列标样 $5.0,10.0,15.0,20.0,30.0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后,按试样操作步骤进行测定,测定结果如图2所示,浓度与峰面积线性关系良好,甲醛相关系数分别为 $r=0.9990,r^2=0.9980$;乙醛相关系数分别为 $r=0.9987,r^2=0.9974$ 。



(a) 甲醛标准曲线

乙醛标准曲线



(b) 乙醛标准曲线

图2 甲醛、乙醛衍生物标准曲线

3 结果与讨论

3.1 衍生反应

醛类物质在酸性介质中能与2,4-二硝基苯肼发生反应生成相应的2,4-二硝基苯腙,反应式如下^[4]:

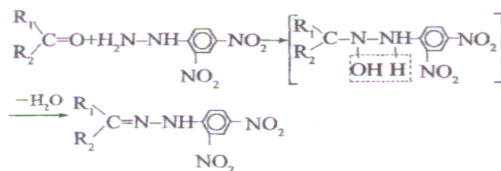
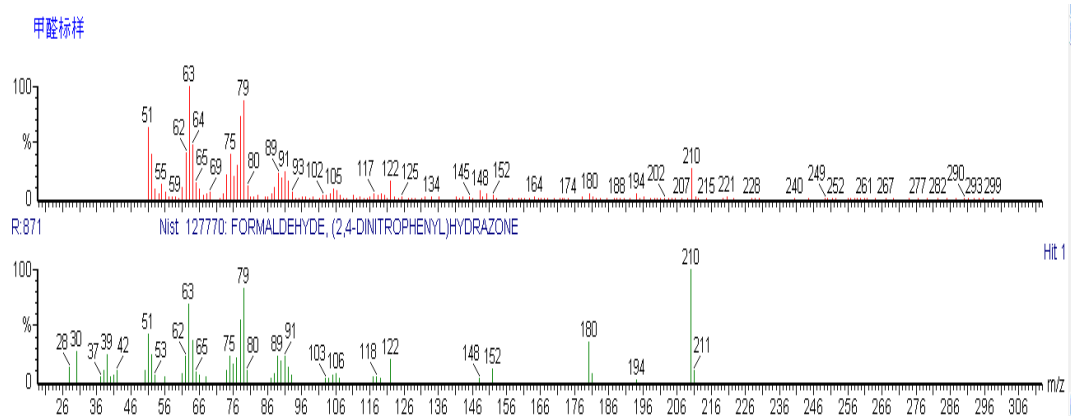
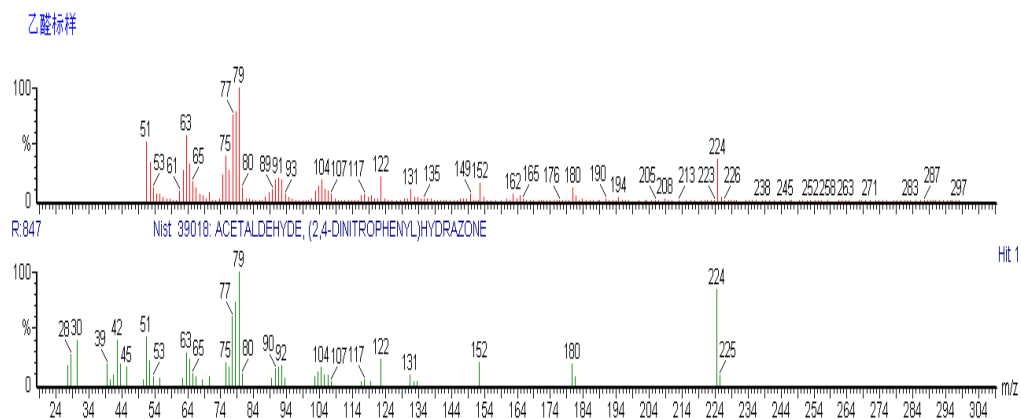


图3是甲醛、乙醛与2,4-二硝基苯肼生成衍生物2,4-二硝基苯腙的质谱图,与标准图谱的匹配度达到了95%,说明甲醛、乙醛与2,4-二硝基苯肼在此实验条件下能很好地衍生。



(a) 标样中的甲醛衍生物的质谱图



(b) 标样中的乙醛衍生物的质谱图

图3 标样中的甲醛、乙醛衍生物的质谱图

3.2 衍生温度的选择

取四支试管,各加入 $5\mu\text{g/mL}$ 甲醛、乙醛混标 10mL ,然后加入配制的2,4-二硝基苯肼溶液 1.5mL ,用振荡器混合 2min 后,分别在 40°C 、 50°C 、 60°C 、 70°C 水浴加热 30min ,然后冷却到室温后进样检测。观察生成的衍生物峰面积见表1,最终选择 60°C 水浴加热 30min ^[5]。

表1 峰面积随温度变化检测结果

衍生温度	甲醛衍生物的峰面积	乙醛衍生物的峰面积
40°C	1677507	49080
50°C	1882054	51208
60°C	1985026	53403
70°C	1950608	51270

3.3 干扰实验

对样品中可能存在的干扰物质进行了试验。实验结果表明,样品溶液中可能存在的能衍生的其它醛和酮,用选择离子测定也不会影响测定结果,因此本方法不受其它物质干扰。

3.4 精密度、回收率、检出限

在预先处理过不含醛、酮的蒸馏水中加入 $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甲醛、乙醛标准溶液,按与样品相同的处理方法蒸馏后,进行测定回收率为 $85\%\sim 100\%$ 。每个样品重复测定5次,相对标准偏差小于 5% 。最低检出限甲醛小于 $15\mu\text{g/L}$,乙醛小于 $50\mu\text{g/L}$ 。

4 结论

本文用蒸馏方法处理抑尘剂中甲醛、乙醛,以2,4-二硝基苯肼为衍生剂,在酸性介质中与甲醛、乙醛反应生成相应的2,4-二硝基苯腙,用气相色谱-质谱联用技术进行定性和定量测量。该方法具有线性范围宽,衍生物稳定,抗干扰性强,操作简便等优点,为抑尘剂中的甲醛、乙醛含量测定提供了技术保证。

参考文献

- [1] 杨柳,王建立等.GC-MS-SIM法测定水发食品中痕量甲醛,药物检测,2004,21(7):28
- [2] 徐天源,林太清等,水产及水发食品中甲醛的气相色谱法测定,中国卫生检验杂志,2005,15(1):64-71

(下转第262页)

利用 GC-MS 鉴别蜂胶提取物中化学成分

高振中, 降升平, 杨志岩

(天津科技大学分析中心, 天津 300457)

蜂胶(propolis)是蜜蜂从植物幼芽与树干上采集的树胶与其上颚腺分泌物和蜂蜡等混合加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物^[1]。蜂胶成分复杂, 已知成分包括多酚类(黄酮、酚酸及其酯类)、萜类、甾类、氨基酸及挥发性物质, 这些物质具有抗细菌、抗病毒、抗炎、抗癌、清除自由基等功效, 吴平谷用不同有机溶剂对蜂胶进行分离, 得到蜂胶的香气(挥发油)成分主要是醇、醛、酮及少量酚, 这些物质具有止咳、平喘、镇痛等效果^[2]。本文通过 GC-MS 方法对我国七个不同产地的蜂胶进行了挥发性成分初探, 为蜂胶真伪鉴别提供科学依据。中国幅员辽阔, 植被资源和气候条件差异很大, 从而影响不同产地蜂胶的化学成分差异显著^{[3][4][6]}。而蜂胶中的黄酮类化合物存在苯环、羰基等强紫外吸收的化学结构, 用高效液相色谱和紫外检测器可对蜂胶中的黄酮类化合物进行测定^[5]。而液质联用集分析鉴定于一体, HPLC对黄酮类化合物进行分离后, 质谱仪即对分离出的物质进行鉴定, 是一种高效的分离鉴定方法。但由于产地不同而造成的非挥发化学成分差异较大, 目前液质联用鉴定方法中还没有对不同产地蜂胶的化学成分建立可靠的标准谱库, 很难归纳出一个统一的标准。

本文借助 GC-MS 强大的谱库资源, 采用 GC-MS 技术对蜂胶中挥发性物质进行分离鉴定^[7], 为研究蜂胶组成提供了新的技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

气相色谱质谱连用仪 3800GC-4000MS (美国 Varian); 试剂: 乙醇(分析纯), 正己烷(色谱纯)。材料: 安徽、河南、江苏、山东、山西、四川、新疆七省区蜂胶。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

取粗蜂胶样品10g, 用 100 mL95%食用酒精浸泡24小时后过滤。再用旋转蒸发仪除去滤液中的酒精, 得到蜂胶粘稠液体。然后取此蜂胶0.1克, 加入10ml正己烷, 充分摇匀后进行 GC-MS 分析。

1.2.2 色谱质谱条件

色谱柱: VF-5ht毛细管柱, 30×0.25mm×0.10μm; 进样口温度: 300℃; 传输线温度: 280℃; 分流比: 1: 20; 载气: 氦气, 流速1mL/min; 进样量1μL;

柱温: 程序升温, 初始温度 60℃(保持2min), 以8℃/min升至 300℃(保持3min)。

离子源: EI源; 离子阱温度: 220℃; 扫描方式: 全扫描; 扫描质量范围 50-1000 amu;

检索谱库名称: NIST05。

2 结果与讨论

2.1 蜂胶的 GC-MS 总离子流图

不同省区蜂胶中挥发成分的 GC-MS 离子流图如图 1。从图 1 中可明显看出: 蜂胶中挥发性物质的组成基本相似。借助 GC-MS 强大的谱库, 识别出蜂胶中挥发性组分有黄酮、酚、

基金项目: 天津科技大学资助基金

作者简介: 高振中 (1956—) 男 (回), 讲师, 学士。现从事重金属离子检测工作。

醌、萜、甾类等 14 类 79 种物质。利用峰面积归一化法计算求得蜂胶中各化学成分的相对百分含量。

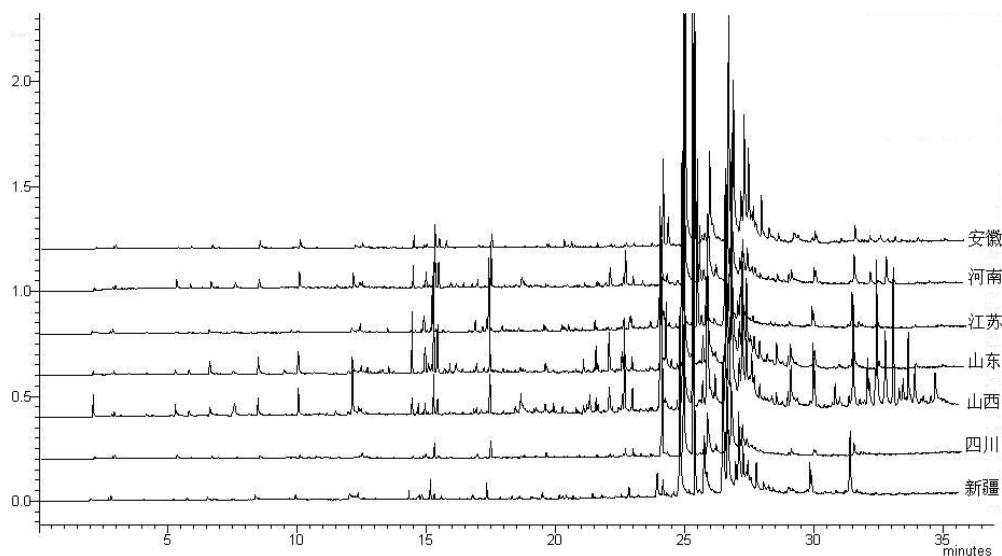


图 1 七省区蜂胶的 GC-MS 总离子流图

2.2 不同产地蜂胶中主要化合物相对含量的分析

产地为河南、山东、山西、四川、新疆的蜂胶中“松属素”含量最高分别是 26.29%、22.90%、21.69%、21.53%和 26.97%。

产地为安徽、江苏两省的蜂胶中“柯因”含量最高分别是，26.96%、26.34%；其次是松属素，分别为 21.04%和 21.12%。松属素和柯因同属于黄酮类化合物。

七省区蜂胶中挥发性化合物相对含量的异同点是：松属素、柯因、大黄酚的相对含量均处于前三位。但是三者的含量顺序有所不同。河南、四川、新疆的蜂胶相对含量排序完全相同，依次为松属素、柯因、大黄酚。这三种成分的含量均占总挥发物的 10%以上。

2.3 蜂胶中有效成分的化学分析：

七省区蜂胶中化学物类型共同点是：黄酮类物质是蜂胶的主要成分，占总挥发性物质的 42.27-55.59%，其次是醌类物质，占总挥发性物质的 19.78-30.26%。不同点是：除黄酮类、醌类以外其它类型的化合物的存在与产地有关，例如：河南、江苏、山西、新疆的其他成分以萜类为主，安徽、山东、四川的其他成分以酚类为主。

3 结论

利用 GC-MS 联用分析方法，借助于色谱的高分辨能力和质谱强大谱库的高识别能力，可鉴别出蜂胶中的大部分挥发性组分。本文利用 GC-MS 分析方法，从七省区蜂胶乙醇提取物中分离和鉴定出挥发性物质，黄酮、醌、酚、酯、萜、烯等 14 大类，共 79 种物质。七省区蜂胶成分相似度极高：以黄酮类的松属素或柯因的含量为最高，按化合物的类型来说，黄酮类最多，其次是醌类，另外还含有少量萜类和酚类，而这些萜类和酚类含量的变化是区别蜂胶产地的主要依据。该项研究的结果为鉴定蜂胶产地和有效成分的标准化提供了简便快捷准确的方法。

参考文献：

- [1] 符军放, 曹炜, 索志荣等. 高效液相色谱法识别蜂胶特征组分及定量对比[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2008, 36(4): 587-591.
- [2] 吴平谷, 叶立杨. 蜂胶有效成分的分离与鉴定[J]. 卫生研究, 2000, 29(2): 123-124.

- [3] Nicola Volpi, Gianluca Bergonzini Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42 (2006) 354-361.
- [4] Jinhui Zhou, Yi Li, Jing Zhao, etc. Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints Food Chemistry 108 (2008) 749-759.
- [5] 中国标准出版社. 蜂产品标准汇编[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [6] 赵淑云, 马海燕, 朱美玲等 不同产地蜂胶超临界CO₂ 萃取物8种黄酮比较研究 中国蜂业 2006年第57卷第11期8-10.
- [7] 盛文胜, 余兰平, 李树岚等 超临界 CO₂ 萃取蜂胶气相色谱/质谱法分析研究 中国蜂业 2006年第57卷第8期5-7.

Using in GC-MS distinction propolis extraction chemical composition

GAO Zhen-zhong, JIANG Sheng-ping, YANG Zhi-yan

(Tianjin Scientific and technical university Analysis center Tianjin 300457, China)

Abstract: In the propolis, besides flavonoids, there are terpene, steroid, alkene, etc. In this paper, GC-MS was used to identify the chemical constituents from the ethanol extracted propolis collected by local beekeepers of anhui, henan, jiangsu, shandong, shanxi, sichuan and xinjiang. 79 chemical constituents of 14 category including flavonoids, phenol, quinone, terpene, steroid, etc were identified. The quantity of flavonoids, phenol, quinone and terpene were abundant.

Keywords: Propolis; Flavonoids; Chemical constituents; GC-MS

(上接第 259 页)

- [3] 裘著革 张林等, 甲醛、乙醛、丙烯醛衍生物的特性研究, 上海环境科学, 1999, 18 (5): 236-238
- [4] 龚彩荣, 宋崇林等, 2, 4-二硝基苯肼衍生反应法测量醇类燃料发动机醛类排放物的研究, 燃料科学与技术, 2007, 13 (1): 15-19
- [5] 吕海涛, 邓锐等. 高效液相色谱法测定家用装饰材料中甲醛、乙醛的含量, 福建分析测试, 2009, 18 (4): 28-30

Determination of Formaldehyde and Acetaldehyde in Dust Suppressant by GC-MS

Li Jing¹, He Xiukun¹, Na Shun²

(1. (1 The 46th Research Institute, CETC, Tianjin 300192, China;

(2. 2 Instruments Beijing Representative Office)

Abstract: GC-MS with derivation was described for the determination of Formaldehyde and Acetaldehyde in Dust Suppressant. The detection limit was 5g/L and 50 g/L. The recoveries were 85%-100%. The relative standard deviations (RSDs) of contents of formaldehyde and Acetaldehyde was below 5%.

Key words: GC-MS ; Derivation; Dust Suppressant; Formaldehyde; Acetaldehyde

二维液相色谱质谱联用方法分析人血清中的磷脂类化合物

李珉, 聂洪港, 白玉, 刘虎威*

(北京分子科学国家实验室, 生物有机与分子工程教育部重点实验室,

北京大学化学与分子工程学院分析化学研究所, 北京, 100871)

磷脂是生物体内一类重要的物质, 他们是生物膜的主要组成部分, 参与脂类化合物的体内代谢过程和信号传导过程; 生物体内或细胞膜磷脂成分的改变与生物体的生理病理状态密切相关。因此, 准确分析生物体内磷脂成分能够为临床诊断与疾病监测提供依据。

磷脂类化合物主要由多元醇骨架、极性头部和疏水尾部三部分组成, 根据多元醇骨架的不同可以分为甘油磷脂和鞘磷脂两大类。甘油磷脂是以甘油作为磷脂骨架, 它的甘油骨架 C1 和 C2 位被脂肪酸酯化, 形成长链脂肪酸的疏水尾部。C3 位被磷酸酯化, 同时磷酸会进一步被另一极性醇酯化, 形成磷脂的极性头部。根据极性头部的不同甘油磷脂可以分为不同的类别, 如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸等等。鞘磷脂以鞘氨醇为骨架, 由鞘氨醇、脂肪酸和磷酸胆碱(少数是磷酸乙醇胺)组成^[1]。

在目前分离分析磷脂类化合物的方法中以液相色谱质谱联用技术的灵敏度最高, 抗干扰能力最好, 同时通过多级质谱技术能够对磷脂分子进行鉴定^[2]。而分离分析磷脂类化合物的两种液相色谱方法--正相液相色谱(NPLC)和反相液相色谱(RPLC)的单独使用都无法达到最佳的分离效果, NPLC 方法是针对极性头部不同分离磷脂的不同类别^[3], RPLC 方法是针对脂肪酸链的不同分离磷脂的不同分子种属^[4]。因此, 采用将 NPLC 和 RPLC 偶联的二维液相色谱方法, 是可以得到更好的分离效果, 更多的磷脂分子信息。

本文采用二维液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用(2-D HPLC-ESI-MS)的方法, 对人血清中的磷脂类化合物进行分离(如图 1), 并且对每个检出的磷脂组分进行了结构确认, 并对每一类磷脂成分在 ESI-MS 条件下的碎裂机制进行了讨论。

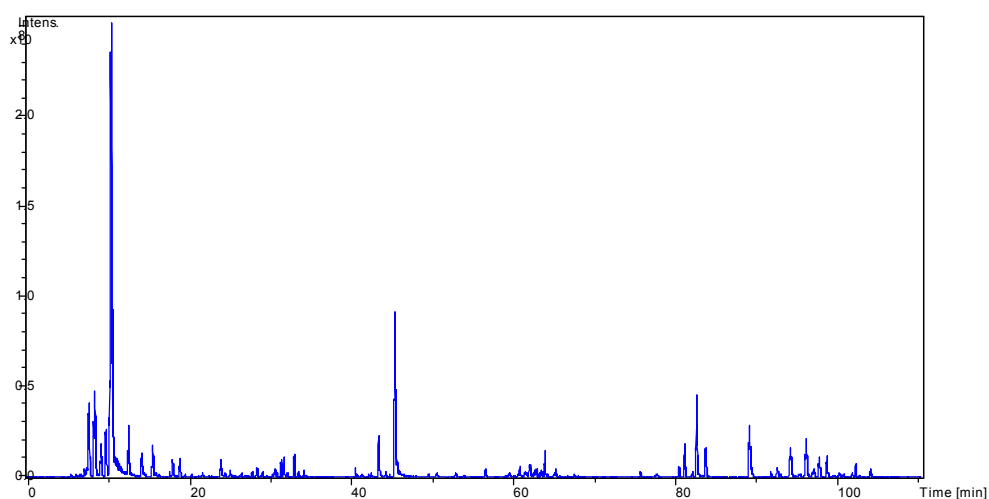


图 1 2D HPLC-ESI-MS 方法分析磷脂类化合物总离子流色谱图

参考文献(略)

国家自然科学基金(No. 90717002, No. 20775090, No. 20805001)资助项目

* 通讯联系人: Email: hwliu@pku.edu.cn

分子蒸馏提取紫苏油蒸出物的 GC-MS 分析

杨志岩, 降升平, 高振中

(天津科技大学分析中心, 天津 300457)

紫苏, 为唇形科一年生草本植物, 又名回回苏、红苏、红紫苏、赤苏、苏子等。具有特异的芳香, 我国栽培极广, 主要用于药用、油用、香料、食用等方面, 其叶、梗、果均可入药, 嫩叶可生食、作汤, 茎叶可淹渍。入药其性温, 味辛, 可解表散寒, 行气和胃, 用于风寒感冒、咳嗽呕恶、妊娠呕吐、鱼蟹中毒等症。现代药理研究表明: 紫苏还具有降血压、降血脂、抑制血小板凝集、抗血栓、抗衰老、减肥、抗过敏性炎症、增强学习记忆、预防癌变和抑制肿瘤细胞转移等功能。具有很高的研究及应用价值。本实验通过分子蒸馏分离紫苏油中的挥发物, 并通过 GC-MS 进行化学成分鉴别。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

分子蒸馏设备: 微量物质富集器(天津科技大学现代分析技术研究中心研发制造); 气相色谱-质谱联用仪: GC/MS-4000MS 型, 美国瓦里安技术有限公司; 粗紫苏油: 购于市场; 无水乙醇: 分析纯; 正己烷: 分析纯。

1.2 实验条件

1.2.1 紫苏油挥发物的分离提取条件

分子蒸馏仪器控制参数: 冷凝温度设置为 10-15℃; 一级温度 90℃, 绝对压力 30 kPa; 二级温度 100℃, 绝对压力 3Pa; 一级进料速度 10mL/min; 二级进料速度 5 mL/min。将 200ml 紫苏油样品放置在进样口处, 样品由蠕动泵带入各级分子蒸馏装置中, 分别收集蒸馏后的馏分。

1.2.2 紫苏油挥发物的化学成分分析条件

气相色谱条件: 色谱柱: VF-5ms(30 m×0.25 mm×0.25 mm); 样口温度: 280.0 ℃; 载气: 高纯氦; 柱流量: 1.0 mL/min; 分流比: 100:1; 进样量: 1 μL; 程序升温: 起始温度 60 ℃, 保持 2min, 以 7 ℃/min 升至 250 ℃, 然后以 10 ℃/min 升至 280℃, 保持 5min。

质谱条件: 电离方式: EI; 电子能量: 70 eV; 接口温度: 280 ℃; 离子源温度: 220 ℃; 溶剂延迟: 3 min; 扫描范围: 45~500 amu。

1.2.3 样品的配制:

分子蒸馏馏出样品用乙醇稀释 100 倍后, 取液体 1 μL 注入仪器进行分析。

2 实验结果

2.1 紫苏油挥发物的分离纯化

紫苏油中挥发性化学成分分离、富集的方法是: 将 200mL 紫苏油经二级分子蒸馏处理, 得到 0.2ml 馏分, 收率为 0.1%。

2.2 紫苏油的化学成分分析

将分子蒸馏后收集的馏分, 用无水乙醇稀释 100 倍, 进行 GC-MS 化学成分分析, 图-1 为总离子流。

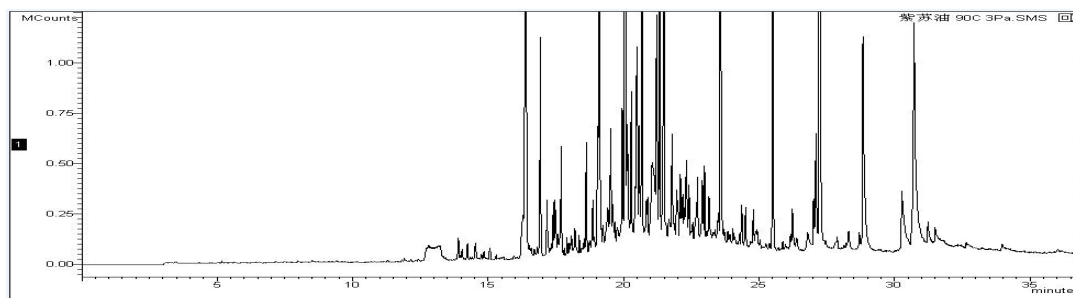


图-1 紫苏油蒸出物的总离子流色谱图

利用NIST05质谱库对各色谱峰进行检索,根据质谱数据、相对保留时间和有关参考文献,确认紫苏油中各化学成分。按照峰面积归一法进行定量分析,得出其中各化学成分的相对质量分数。在紫苏油分子蒸馏的馏分中共检出36种化合物,占总峰面积的99.997%,其主要成分是芳姜黄酮(35.55%),其次是(E,E)-3,7-二甲基-10-(1-甲基亚乙基)-3,7-环癸二烯-1-酮(10.070%)。

3 结果与讨论

本实验用分子蒸馏法分离、纯化紫苏油中挥发性成分,收率为0.1%。文献报道,紫苏的成熟果实,即紫苏子中所富含 α -亚麻酸等脂肪酸。实验表明,这些脂肪酸均以甘油酯的形式存在,不能通过分子蒸馏方法蒸出。分子蒸馏蒸出物,经GC-MS分离、鉴定出36种化合物。相对于总挥发而言,主要成分芳姜黄酮占35.55%,(E,E)-3,7-二甲基-10-(1-甲基亚乙基)-3,7-环癸二烯-1-酮占10.070%,A-姜黄烯占4.318%,亚麻酸乙酯占7.555%,姜黄新酮占7.988%等。天津科技大学现代分析技术研究中心研发制造的微量物质富集器,能够富集油脂中微量的有机挥发物。紫苏挥发油中化学成分的分析结果,为进一步开发紫苏挥发油在医疗、食品、环境等多方面的应用提供了新的信息,具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] 庄云, 马尧 紫苏子油提取方法比较研究 [J]安徽农业科学,Journal of Anhui Agri. Sci. 2008,36(33):14574,14586.
- [2] 李天祥,朱静,曾祥钦,王静康 分子蒸馏分离超临界CO₂萃取的米槁精油及其成分分析 [J]精细化工第24卷第10期 2007年10月.
- [3] 刘信平,张弛,余爱农,刘应焯,谭志伟,田大昕 紫苏挥发活性化学成分研究 [J]时珍国医国药 2008年第19卷第8期.

The molecular distillation extraction distills of perillartine oil by GC-MS analysis

YANG- Zhiyan, JIANG -Shengping, GAO- Zhenzhong

(Tianjin Scientific and technical university Analysis center Tianjin 300457, China)

Abstract: Object: to isolate and purify volatile oil from perillartine. Method: volatile oil of perillartine method was isolated and purified by molecular distillation, and the composition was analysed by GC-MS. Result: Volatile oil of perillartine was extracted under 3Pa、90 °C condition, and the composition was analysed as 36 compounds by GC-MS. Conclusion: Molecular distillation was capable of isolating and purifying volatile oil from perillartine., and GC-MS can analyze the composition very well.

key words: perillartine molecular distillation isolate and purificate GC-MS

应用 QTRAP™ 串联质谱仪分析和鉴定 中药有效成分

张克荣

(AB SCIEX 北京代表处, 北京 100027)

中草药成分分析是复杂和困难的一项工作, 本文利用QTRAP™质谱仪特有的扫描功能, 以肉苁蓉为例, 寻找出中药有效成分鉴定的最佳有效方案。

中草药成分分析是复杂和困难的一项工作, 其化学成分是中药发挥药效作用的物质基础, 是实现中药现代化的关键所在。搞清楚中药物质基础有利于揭示中药的作用机制、方剂的配伍规律, 对制订药材种植GAP标准及中药产品质量标准、优化制剂工艺、实现中药现代化和国际化具有重要意义。

QTRAP™质谱仪是新一代液质联用串联质谱技术, 其独特之处在于同时具备了完整的三重四极杆的质谱特点, 以及线性离子阱的功能, 在离子阱模式下, QTRAP™的MS/MS 谱的灵敏度比常规的三重四极杆型高出二个数量级以上, 同时还将两者的扫描功能巧妙的结合起来, 实现“串联四极杆-线性离子阱”的迅速切换。通过选择母离子扫描和中性丢失扫描等来发现中药有效成分组, 得到更丰富的MS/MS定性数据。因此, QTRAP™质谱仪兼有定性和定量分析的功能, 且具有很多特有的“杆-阱”的新型扫描方式, 使得QTRAP™串联质谱仪在中药成分鉴定分析、药物筛选以及代谢物定性及定量分析、蛋白定量和生物标志物验证等方面发挥巨大作用。

肉苁蓉(*Cistanche*) 是常用中药之一, 肉苁蓉中具有药效的主要化学成分为苯乙醇苷化合物, 本文应用QTRAP™质谱技术研究了肉苁蓉中苯乙醇苷类成分。

1. 试验部分

1.1 仪器和试剂

所用试剂均为色谱纯; 毛蕊花糖苷(Acteoside)和松果菊苷(Echinacoside)标准品, 以及肉苁蓉 70%乙醇提取物为中山大学提供。试验在 AB SCIEX 3200QTRAP™ LC-MS/MS 上完成, 液相为岛津公司 LC-20A, 色谱柱: Atlantis dC18 5 μ m 2.1*150mm。

2. QTRAP 试验方法

苯乙醇苷化合物结构由3部分组成, 即咖啡酸、苯乙醇苷元、糖。苯乙醇苷类化合物在负离子模式下, 具有一些独特的碎裂方式和碎片, 比如: m/z 461, m/z161特征碎片离子; 中性丢失糖 m/z 162。普通串联质谱难以从复杂中草药体系中发现这类结构化合物, 更难以获得它们的MS/MS图谱做结构鉴定。利用QTRAP独特扫描方式, 结合其结构特征, 我们采用母离子扫描(Prec)和中性丢失(NL)扫描筛查, 并实时切换到离子阱的二级扫描, 很好的发现和鉴定了苯乙醇苷类的化合物, 并比较了母离子扫描和中性丢失扫描的灵敏度。

2.1 Prec-EPI 方法(母离子扫描切换至增强子离子扫描)

通过母离子扫描 m/z 461, m/z 161, 如果发现特征的离子, 仪器自动切换到增强子离子扫描, 即线性离子阱的高灵敏度子离子扫描, 快速得到所有发现离子的高品质 MS/MS 质谱图, 进行结构鉴定。

2.2 NL-EPI (中性丢失扫描切换至增强子离子扫描)

通过中性丢失 NL 162 扫描, 如果发现特征性的离子, 仪器自动切换到增强子离子扫描, 快速得到高品质的 MS/MS 质谱图, 进行结构鉴定。

3 结果和讨论

3.1 结果

使用QTRAP特有的扫描技术, 根据特征性扫描方式Prec和NL去发现苯乙醇苷类化合物, 并实时获得它们的MS/MS质谱图, 结合具有相似结构的标准品毛蕊花糖苷(Acteoside)和松果菊苷(Echinacoside)的MS/MS质谱图, 进行结构比较和推演, 共鉴定出9种主要的苯乙醇苷类成分。

图1为具有代表性的苯乙醇苷类成分松果菊苷(Echinacoside)的结构及裂解特征。 m/z 161的碎片是 m/z 179 脱水得到, m/z 135.0为 m/z 153脱水所得, m/z 477.2、 m/z 461.2 分别为 m/z 623.3进一步丢失脱氧六碳糖基(146amu) 和一个咖啡酰基(162amu) 所得。所鉴定的各种成分的分子量及MS/MS碎片信息见表1。

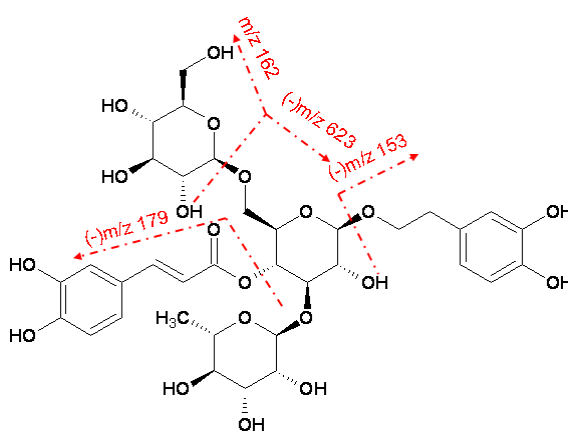


图1 松果菊苷(Echinacoside)结构及在负离子模式下裂解特征

表1 肉苁蓉提取物 QTRAP™ LC-MS/MS 分析结果

编号	RT(min)	m/z	MS/MS 主要的碎片离子	推测可能的化合物名称
1	6.34	461.2	135.0, 315.2	Decaffeoylacteoside
2	10.52	487.2	135.0, 161.0, 179.0	Cistanoside F
3	18.27	785.4	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.2, 477.2, 623.3	Echinacoside
4	21.65	623.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3	Acteoside
5	22.01	623.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3	Cisacteoside
6	23.01	623.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3	Isoacteoside
7	23.73	607.3	135.0, 161.0, 445.3	Kankanoside G
8	25.43	665.3	135.0, 161.0, 179.0, 315.1, 461.3, 623.3	2-acetylacteoside
9	29.64	591.3	135.0, 161.0	Osmanthuside

我们比较了 Prec-EPI 和 NL-EPI 的质量色谱图，发现前者的灵敏度明显高于后者，理论上讲中性丢失扫描应该发现 6 种成分，但实验结果只发现了两种含量较高的成分，我们推断可能是由于中性丢失糖分子的负离子扫描模式灵敏度较差所致。代表性图谱见图 2。

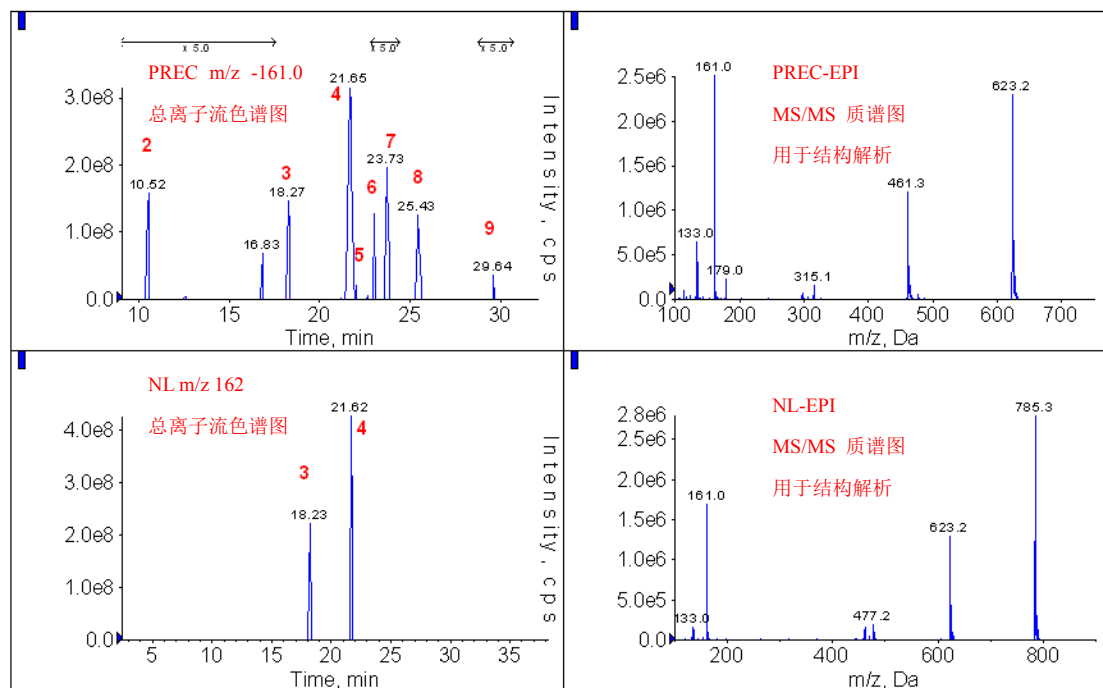


图 2 一次进行分析，所得的 PREC-EPI（左上），NL-EPI（左下）色谱图（通过 PREC，NL 扫描可以获得化合物分子量信息，EPI 扫描得到所测得的化合物的二级碎片，进行结构鉴定）

3.2 结论

如何从中草药复杂体系中快速发现和鉴定有效成分的结构，是极具挑战性的工作，QTRAP™型质谱仪独特的扫描模式—高的灵敏度和特异性Prec-EPI和NL-EPI，让“大海捞针”得以实现。本文采用QTRAP™质谱仪有效分析了肉苁蓉中的苯乙醇苷类化合物，在负离子模式下，根据一些特征的中性碎片（NL 162）的丢失和特征性的碎片，产生m/z 161，m/z461，可以快速鉴定出这些化合物，并根据所得的二级MS/MS质谱图推测出其分子结构。实验结果表明：QTRAP™质谱仪十分适合于中草药成分分析，其数据简单，灵敏度高，特异性强，节约时间。

质谱鉴定激酶中低丰度蛋白修饰的研究

朱金蕾 张锴

（南开大学化学学院，天津 300071）

蛋白激酶是一类十分重要的蛋白质翻译后修饰催化酶，介导着许多重要蛋白质的磷酸化修饰，在细胞信号级联放大转导、基因表达和酶活性调控等生物学过程中发挥功能。大量的研究证明，在肿瘤的发生发展中，蛋白激酶特别是酪氨酸蛋白激酶发挥着十分重要的作用，而成为许多抗肿瘤药物的靶点[1]。以往人们普遍认为，激酶参与肿瘤的发生发展仅与其异常蛋白质磷酸化修饰活性相关。然而最近的研究发现尽管肿瘤的发生与某些激酶的表达异常显著相关，但仅仅阻断某些激酶活性在大多数肿瘤患者身上并未导致明显的临床效果，暗示激酶这类生物大分子在肿瘤中可能还存在着其它的非磷酸化修饰以及功能表现形式。而这些翻译后修饰含量低、组成复杂、丰度差异大，其检测是生物分析技术面临的挑战。本文我们以激酶中多种低丰度修饰为目标，将蛋白标签融合技术与 Shotgun 技术相结合，探索系统研究激酶中各种翻译后修饰的新方法。

1. 研究方法

我们以酵母菌中的几种重要功能性激酶为先导目标模式，通过基因融合技术，将标签蛋白 DNA 分别嵌入目标激酶的 DNA 序列，并在酵母菌中过表达。然后，利用标签蛋白与固定相的特异性亲和作用，将细胞中的目标激酶富集、提纯。再采用凝胶蛋白电泳分离，进一步分离蛋白并确定激酶的表达质量。通过胶内酶解技术，将激酶酶解成多肽，采用 Nano-LC/MS/MS 分析和蛋白信息化检索，探索活体细胞中激酶的多种修饰形式，研究低丰度蛋白质修饰的鉴定方法。

2. 结果与讨论

利用标签蛋白融合以及亲和富集技术，我们能够快速、准确、有效的将激酶蛋白从细胞中提取，通过质谱的分析，可以确定提取的激酶保持了多种蛋白异构体形式，能够较完整的表征蛋白的特征和多肽序列的精细结构。

借助于蛋白质软件技术和质谱解析，该方法测定的蛋白的多肽序列覆盖率高，通过二级质谱解析和液相色谱保留时间的比较，我们在鉴定激酶中多种磷酸化位点的同时，在某些激酶位点上发现了乙酰化和甲基化修饰，这些修饰位点尚未见文献报道。

联合生物信息学工具，二级质谱的裂解碎片和一级质谱母峰的信息分析，以及色谱保留性质，我们进一步发现了几个氨基酸残基上的质量偏移，这些质量偏移与已知的修饰不同，也排除了基因突变和处理过程中化学反应的可能，这预示着可能是一些新的修饰形式。

3. 小结

通过联合标签蛋白融合技术和 Shotgun 策略，我们探索了快速鉴定激酶中多种低丰度蛋白修饰形式的方法，并成功的在激酶上鉴定了未见报道的甲基化和乙酰化修饰形式，同时发现了一些潜在的蛋白修饰形式。我们的研究的结果预示激酶这类重要的蛋白生物酶可能存在着更为复杂的修饰形势和生物功能。

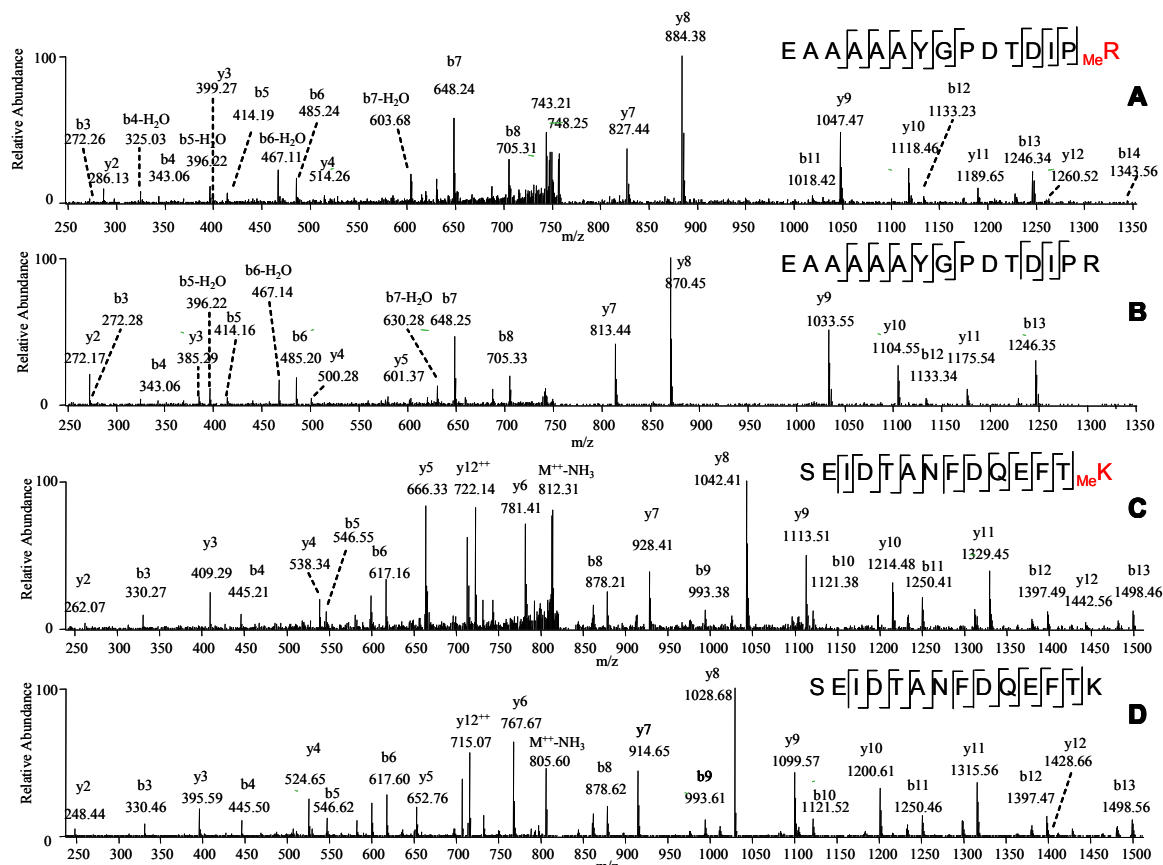


图1 甲基化多肽的二级质谱谱图

参考文献

- [1] J. Baselga, Targeting tyrosine kinases in cancer: The second wave. *Science*, 2006, **312**, 1175-1178.

Identification of non-phosphorylation post-translational modifications in yeast kinases by mass spectrometry

ZHU Jinlei, ZHANG Kai

Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, PR China

Abstract: A few protein post-translational modifications (PTMs), such as phosphorylation and ubiquitination, are known to be critical in regulation of protein kinase activities. However, the roles of other PTMs have not been extensively studied in kinases. Development of a comprehensive description of all types of PTMs and discovering novel *in vivo* PTMs in low abundance represent major analytical challenges. Toward this goal, we have developed a strategy for systematic and accurate identification of the full-spectrum of PTMs in yeast protein kinases. Our strategy involves isolation of GST-fused kinase proteins, mass spectrometry analysis, and unrestrictive PTM identification by PTMap algorithm. Among the purified yeast kinases, we identified some different types of PTMs, among which are some novel mass shifts that have not been previously reported, likely representing novel PTMs. These results represent a significant expansion of our current understanding of PTMs in kinases and suggest highly complex regulation of kinase function.

Keywords: protein post-translational modifications, PTMap, kinase, mass spectrometry

利用固相萃取和色谱联用技术 分析柴油组成

袁维

（中石化股份有限公司天津分公司炼油部质检车间，300271）

本文介绍了利用固相萃取和色谱联用技术分析柴油组成的方法，首先利用固相萃取的方法将柴油分离成饱和烃和芳烃，分别加入等量内标物再分别取样进行气相色谱和质谱分析，通过芳烃和饱和烃的气相色谱图计算二者的含量，由质谱图得出芳烃和饱和烃的烃族组成，再根据饱和烃和芳烃的相对含量，由归一计算法得到柴油的烃族组成。

1 前言

随着人们环境保护意识的逐渐加强以及对车用清洁燃料的要求不断提高，汽油和柴油的质量不断升级，2010年车用柴油全部达到国III标准。车用柴油国III标准中首次限制了多环芳烃的含量不大于，出口柴油对多环芳烃的含量要求更加苛刻，因此建立柴油烃族组成的分析方法，配合柴油质量全面升级意义尤为重要。

准确测定芳烃和多环芳烃的含量是油品生产的迫切要求，但在油品的生产过程中，原料及工艺条件的变化与波动将直接影响油品的组成，尽快掌握油品组成的变化，及时调整操作条件才能生产出合格的产品

2 方法原理

首先利用固相萃取技术使饱和烃和芳烃分开，得到各自的分离样品，然后利用内标归一化定量方式在GC-FID上进行定量，得到样品的饱和烃和芳烃含量的族组成结果，在GC-MS上按ASTM D2425方法得到更详细的链烷、单、双和多环烷烃或芳烃的族组成信息。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

HP 7890GC/5973MS,带FID检测器。

试剂：正己烷，正戊烷，二氯甲烷（均为分析纯），正构三十二烷（纯度大于99.5%）。

3.2 实验条件

3.2.1 GC工作条件

色谱柱	Agilent 19091s-433 毛细管柱 30m×0.25mm×0.25 μm		
进样量	1.0 μL		
分流比	30:1		
柱流量	2ml/min		
GC 进样口温度	300℃		
GC-MS 接口温度	280℃		
GC 柱箱温度	60℃	1 分钟	
	40℃/min	300℃	20 分钟
检测器温度	350℃		

3.2.2 MS工作条件

EI	电离方式
EMV	941eV
GC-MS 接口温度	280℃
离子源温度	220℃

3.3 实验步骤

3.3.1 固相萃取分离柴油饱和烃和芳烃馏分

利用固相萃取柱（固定相为改性硅胶）上加入约 0.15ml 柴油，依次用正戊烷和二氯甲烷冲洗固相萃取柱，正戊烷萃取出柴油的饱和烃馏分，二氯甲烷萃取出芳烃馏分。溶剂用量为经典柱色谱的 1/70，样品处理时间 < 2min。

3.3.2 分别进样分析饱和烃和芳烃馏分

图 1—芳烃分析色谱图

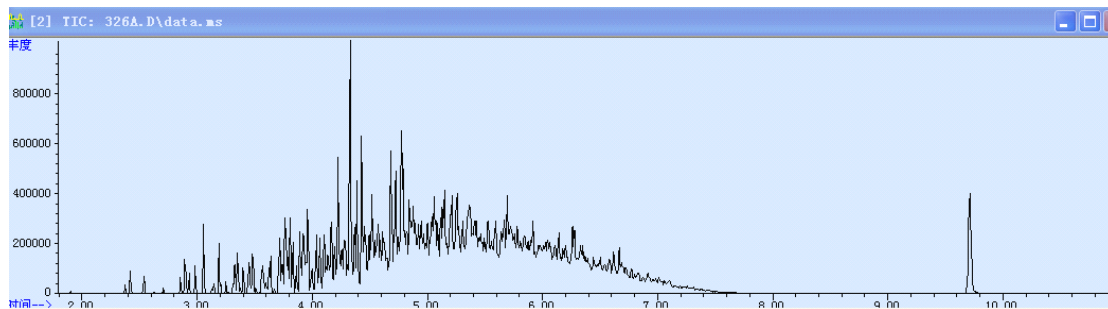


图 2—芳烃分析质谱图

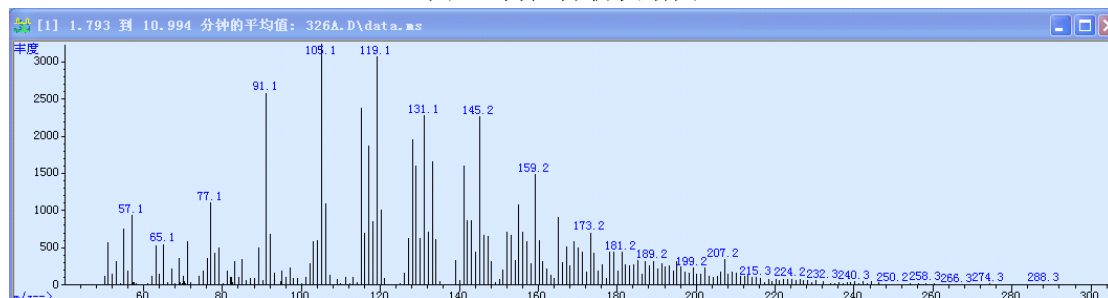


图 3—饱和烃分析色谱图

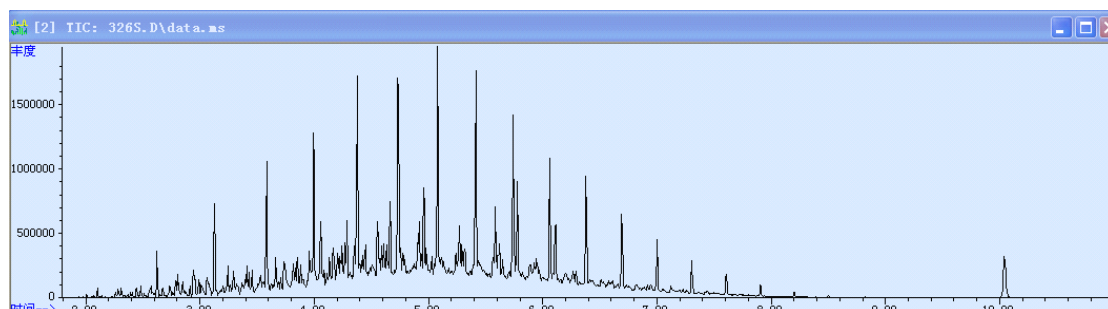
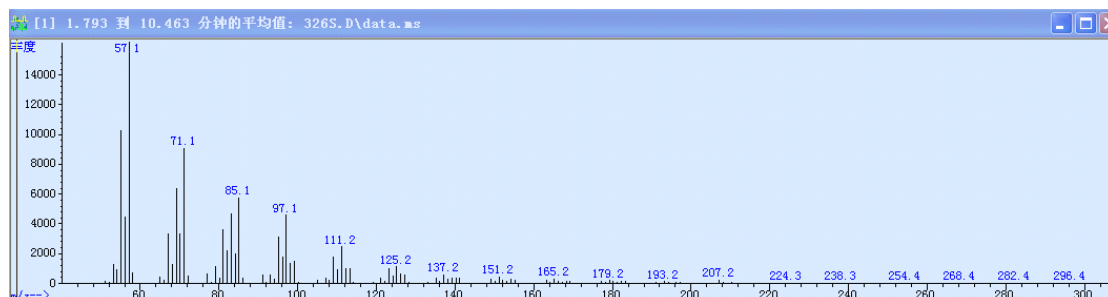


图 4—饱和烃分析质谱图



4 定量计算

采用内标与归一相结合的方式来计算饱和烃和芳烃的相对含量。用内标法先求出饱和烃和芳烃相对于各自内标的含量，再将两者进行归一化处理得到最终的分析结果。所选内标为高碳数正构烷烃，如正构三十二烷，将其直接溶解在正戊烷或正己烷中即可得到相应的内标液。但内标法操作比较繁琐，需要准确确定样品中所加入的内标物含量，而本方法为了保证溶剂峰与样品峰能分开，选择了低沸点的烷烃做溶剂，所以更增加了内标浓度确定的困难。同时在放置过程中由于低沸点溶剂的挥发也会造成浓度的变化。为此，本方法规定色谱测定时，在饱和烃和芳烃溶液中加入相同浓度和相同体积的内标液或相同质量的内标物，即令下式中的 mns 等于 mna ，从而使内标定量计算中的和可以互相约掉，在求相对含量时，内标量不参加计算。这样一来，内标液浓度及在放置过程中浓度变化对分析结果的影响就被最大限度地减少了。饱和烃含量 = $(Asmns/Ans) / [(Asmns/Ans) + (Aamna/Ana)]$

$$\text{芳烃含量} = (Aamna/Ana) / [(Asmns/Ans) + (Aamna/Ana)]$$

式中 As ——GC-FID 测量饱和烃的分析谱图上饱和烃的峰面积； Aa ——GC-FID 测量芳烃的分析谱图上芳烃的峰面积； Ans ——GC-FID 测量饱和烃的分析谱图上内标峰的峰面积； Ana ——GC-FID 测量芳烃的分析谱图上内标峰的峰面积； mns ——色谱分析用饱和烃馏分中加入的内标物质量； mna ——色谱分析用芳烃馏分中加入的内标物质量。

当进行详细烃族组成分析时，只要将饱和烃或芳烃含量与按 ASTM D2425 方法得到的各馏分详细烃组成归一的结果相乘即可。

5 精密度

分析成品交库柴油结果见表 1，由表中数据可以看出总饱和烃、总单环芳烃和总芳烃的标准偏差均大于 1，是由于萃取操作不过关带来的影响，其他组分的标准偏差均小于 1。

表 1—柴油组成分析结果

馏分烃类组成	测定值			均值	标准偏差
链烷烃	45.6	46.7	45.6	46.3	0.62
一环烷烃	21.3	22.2	20.8	22.0	0.81
二环烷烃	8.7	8.9	8.9	9.0	0.20
三环烷烃	2.6	2.7	2.7	2.7	0
总环烷烃	32.6	33.8	32.4	33.7	0.98
总饱和烃	78.2	80.5	78.0	80.0	1.58
烷基苯	7.8	6.6	7.4	7.0	0.57
茚满或四氢萘	7.1	6.3	7.1	6.5	0.50
茚类	3.1	2.9	3.3	2.9	0.26
总单环芳烃	18.0	15.8	17.8	16.4	1.28
萘	0.7	0.6	0.7	0.6	0.10
萘类	1.1	1.1	1.2	1.1	0
茈类	0.8	0.8	0.9	0.8	0
茈烯类	1.0	1.0	1.1	1.0	0
总双环芳烃	3.6	3.5	3.9	3.5	0.24
三环芳烃	0.2	0.2	0.3	0.2	0
总芳烃	21.8	19.5	22.0	20.0	1.58
胶质	0	0	0	0	0
总重量	100.0	100	100	100	0

离子液体辅助诺氟沙星分子印迹整体柱的制备及性能考察

孙祥丽¹, 刘焯², 何锡文¹, 陈朗星^{1*}, 张玉奎^{1,3}

(1.南开大学化学学院, 天津 300071; 2.天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心;

3.中科院大连化学物理研究所, 大连 116011)

喹诺酮类(quinolones, QNs)抗菌药是指人工合成的含有4-喹酮母核的一类广谱抗菌生物药. 根据喹诺酮类抗菌药药理机制, 该药物极易造成高浓度的组织材料残留. 如何从复杂样品中检测出喹诺酮残留已经成为食品安全检测工作中重要的研究课题, 其中样品的前处理是动物源性食品中抗生素残留检测中的关键步骤. 固相萃取(solid-phase extraction, SPE)是近年来迅速发展起来的专门用于样品纯化和浓缩的一项技术, 也是目前抗生素残留检测中样品前处理中的主流技术. 其中以分子印迹聚合物作为填料的分子印迹固相萃取技术(molecular imprinting solid-phase extraction, MISPE)以其高度的特异性、选择性和快速简洁的优势, 已成为当前国际上最先进最受关注的痕量样品富集和提取方法之一.

本文以诺氟沙星为模板, 甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 首次在离子液体中原位合成了诺氟沙星分子印迹整体柱, 过程如图1所示. 并以同样方法合成了非印迹整体柱, 并在普通致孔剂中制备了印迹整体柱作为比较. 如图2所示, 在相同条件下, 模板在印迹柱上的保留均强于非印迹柱, 同时离子液体中制备的印迹柱对模板有更好的保留.

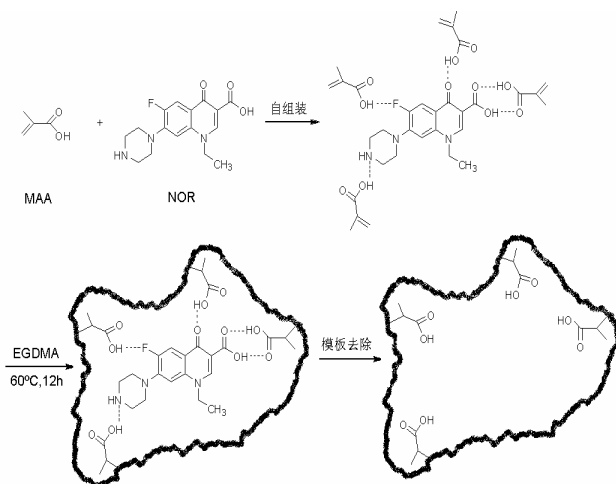


图 1

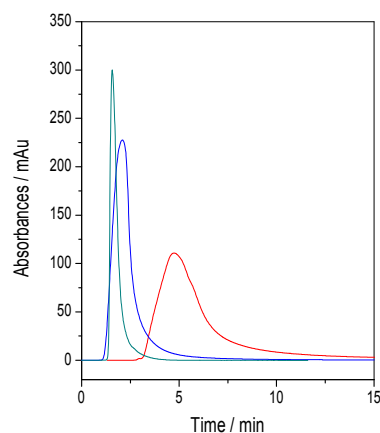


图 2

参考文献

- [1] Wulff, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1995, 34, 1812-1832.
- [2] Yan, H. Y., Qiao, F. X., Row, K. H., *Anal. Chem.* 2007, 79, 8242-8248.
- [3] Sun, X. L., He, X. W., Zhang, Y. K., Chen, L. X., *Talanta* 2009, 79, 926-934.

磺胺甲噁唑印迹纳米硅球的制备及其与传统分子印迹聚合物的比较

高瑞霞¹, 苏晓倩¹, 陈朗星¹, 何锡文¹, 张玉奎^{1,2}

(1. 南开大学化学学院, 300071, 天津; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 116023, 大连)

摘要: 本文以二氧化硅(SiO₂)纳米球为载体, 以磺胺甲噁唑(SMO)为模板分子, 乙腈为溶剂, 丙烯酰胺(AA)为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDGMA)为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 通过表面印迹技术制备了磺胺类药物的印迹聚合物和非印迹聚合物。同时, 通过传统分子印迹方法合成聚合物, 将两种聚合物加以比较。以纳米硅球为载体, 用表面印迹技术合成的聚合物相比较于用传统分子印迹方法合成的聚合物对模板分子有较快的结合速率、较大的吸附容量、较高的印迹因子和选择性因子, 如下图1所示。

关键词: 纳米硅球 分子印迹聚合物 吸附 磺胺类药物

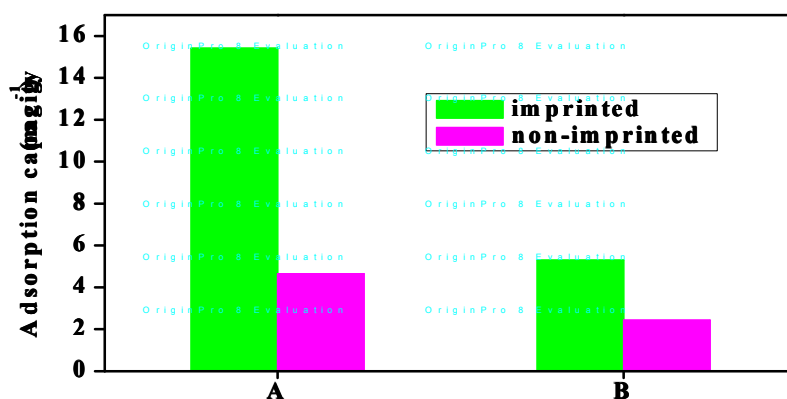


图1 印迹和非印迹聚合物的吸附容量。以纳米硅球为载体, 用表面印迹技术合成的聚合物(A), 用传统分子印迹的方法合成的聚合物(B)。

参考文献:

- [1] Huiqi Zhang, Lei Ye, J. Mol. Recognit, 2006, 19, 248-259
- [2] Jinxing He, Shuo Wang, Guozhen Fang, Huaping Zhu, J. Agric. Food Chem, 2008, 56, 2919-2925

基金项目: 组合分子印迹技术应用于农产品中禁用抗生素的分离和检测 (国家自然科学基金, No.20875050)

作者简介: 陈朗星 (1965-), 男, 教授, 研究方向: 分子印迹, Tel: 022-23505091, E-mail: lxchen@nankai.edu.cn.

氯霉素分子印迹整体柱的制备及其在色谱分离中的应用

林冬, 孙祥丽, 苏晓倩, 陈朗星

(南开大学化学学院, 天津, 300071)

氯霉素是一种广谱性抗生素, 广泛应用于畜牧业、水产业等, 但其对人体毒副作用极大, 可引发人体骨髓障碍性贫血, 是国家明令禁止使用的药品。因此, 为保证食品安全, 亟待寻求对氯霉素类抗生素的分离检测方法。然而, 抗生素类的残留浓度低, 且样品基体成分复杂, 样品前处理繁琐, 所以需寻求具有专一特异选择的前处理方法。分子印迹技术可很好地解决这类问题, 分子印迹聚合物具有三维立体空穴结构, 可以特异性地选择吸附所需分子, 在样品前处理过程中十分重要。本实验采用的是在整体柱中原位聚合聚合物。整体柱是近年来发展迅速的一种具有传质速率快、稳定性好、制备简单等多项优点的色谱固定相。本实验以热引发原位聚合法在不锈钢柱中合成了以甲基丙烯酰胺、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为基质的印迹聚合物整体柱。此过程中以绿色溶剂离子液体[BMIm]BF₄为致孔剂, 通过电镜表征可知, 制得了相比传统混合致孔剂更加均匀、饱满的聚合物。连接液相色谱仪检测, 模板分子与竞争物四环素基线分离良好, 分离度为2.103, 对模板的吸附量可达到7.91mg/g。

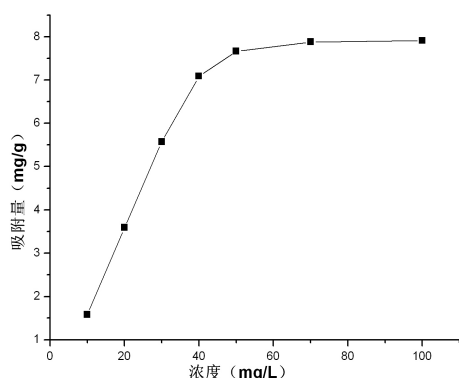


图1 印迹聚合物对氯霉素的等温吸附曲线

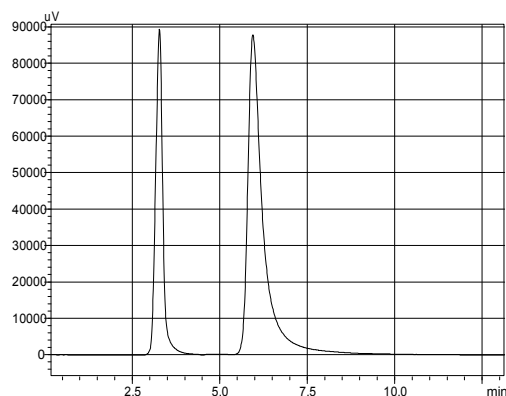


图2 模板分子氯霉素与竞争分子四环素在分子印迹整体柱上的分离色谱图

参考文献:

- [1] Georges Guiochon, Journal of Chromatography A, 1168 (2007) 101-168
- [2] 马娟娟, 王新龙, 许兴友, 功能高分子学报, 2005, 18 (1):144-148
- [3] Xiangli Sun, Xiwen He, Yukui Zhang, Langxing Chen, Talanta 79 (2009) 926-934

制备大孔硼酸亲和整体柱用于糖蛋白分离

杨帆¹, 何锡文¹, 张玉奎^{1, 2}, 陈朗星¹

(1. 南开大学化学学院, 天津 300071; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

作为蛋白质组学的一个重要分支,糖蛋白质组学已经成为目前蛋白质组学领域的一个研究热点。糖蛋白广泛存在于生物体内,与生物体的正常生理功能有着紧密联系。对于糖蛋白的研究具有十分重要的生物学意义和临床应用价值。糖蛋白组学研究的首要问题是对糖蛋白/糖肽的有效分离与富集。硼酸亲和色谱(boronate affinity chromatography, BAC),是一种有效的提纯糖蛋白的方法。硼酸基团在碱性条件下,与带有顺式二羟基(cis-diol)基团的物质共价结合,形成稳定的五或六元环酯结构;在酸性条件下则可逆的解离。利用这种可逆的性质,硼酸基团可以有效的对含有顺式二醇的物质,例如糖类, RNA, 核苷, 糖肽和糖蛋白进行分离和提纯。

整体柱,又称为整体固定相,是一种用有机或无机聚合方法在色谱柱中进行原位聚合的连续床固定相。这种色谱柱制备方法简单,易于改性,采用原位聚合方法制得,比常规填充柱具有更好的多孔性和渗透性,具有传质快、柱效高的优点。调节合适的比例可以制得含有介孔或大孔的整体柱,实现对生物大分子的高通量、高柱效的分离和分析,并且具有良好的稳定性。

本课题制备了一种新型的大孔硼酸亲和聚合物整体柱,用于对糖蛋白的选择性捕获和分离。制备简单,采用一步合成。研究中我们使用含有硼酸基团的3-丙烯酰胺基苯硼酸(AAPBA)作为功能单体,EDMA作为交联剂,在AIBN的引发下在不锈钢管柱中原位聚合制得大孔级硼酸亲和整体柱。实验中我们优化了整体柱的制备条件,并系统的对整体柱的形态,孔径分布进行了表征。制得的大孔硼酸亲和整体柱可以有效的捕获带有 cis-diol 基团的糖蛋白,实现对糖蛋白的有效、快速分离。

参考文献:

- [1] X.D. Geng, C.Z. Wang, *J. Chromatogr., B* **2007**, 849, 69-80.
- [2] Smith, N.W.; Jiang, Z.J. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1184, 416-440.
- [3] Svec, F.; Huber, C.G. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2100-2107.

苯硼酸修饰阳离子交换整体柱的制备及在蛋白质分离复性中的应用

孙祥丽¹, 林冬¹, 何锡文¹, 张玉奎^{1,2}, 陈朗星¹

(1.南开大学化学学院, 天津 300071; 2.中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

整体柱是近年来发展迅速的一种具有传质速率快、稳定性好、制备简单等多项优点的色谱固定相。离子交换色谱(ion exchange chromatography, IEC)是生物大分子色谱分离中很重要的一类方法, 比较常用的阳离子离子交换功能基有磺酸, 羧酸和磷酸基团。硼酸修饰的固定相一般应用于糖类化合物或糖蛋白的分离, 其离子交换性能还未有详细研究。本文首先以热引发原位聚合法合成了以甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为基质的整体骨架, 然后在其表面修饰间氨基苯硼酸(APBA)使基质表面带有负电荷从而制得阳离子交换整体柱。用该柱成功实现了对5种蛋白质的分离, 并以普通流动相和氧化还原流动相分别考察了脲变性、盐酸胍变性、SDS变性的RNase A在APBA柱上的重折叠行为, 酶活力测试显示本文采用的蛋白折叠液相色谱法是普通稀释法复性效率的4-8倍, 荧光光谱和圆二色光谱测定也证实了RNase A在APBA柱上的正确折叠。图1显示三种变性后的RNase A在以蛋白折叠液相色谱法(PFLC)复性时与活性RNase A的色谱对照图, 图2显示了三种变性RNase A及分别被PFLC法复性后的RNase A与活性RNase A的荧光光谱对照图。

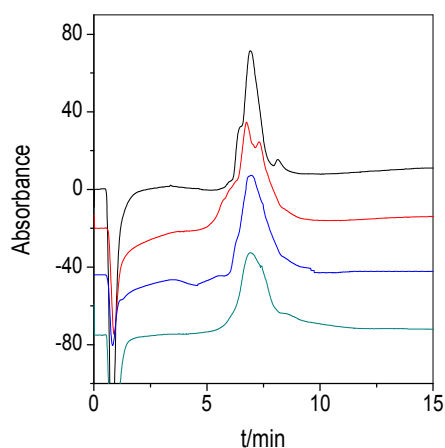


图1 活性及三种变性 RNase A 在 APBA 柱上色谱图

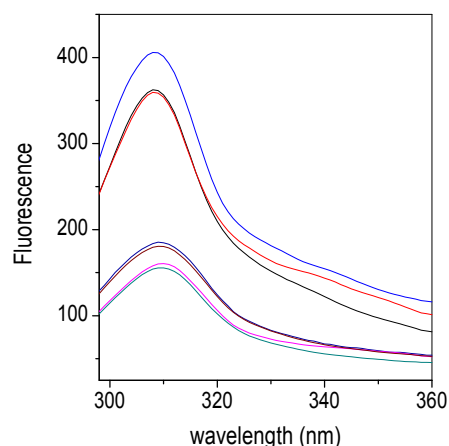


图2 活性、三种变性 RNase A 及分别被 PFLC 法复性后的 RNase A 的荧光光谱图

参考文献:

- [1] X.D. Geng, C.Z. Wang, *J. Chromatogr., B* **2007**, 849, 69-80.
- [2] Smith, N.W.; Jiang, Z.J. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1184, 416-440.
- [3] Svec, F.; Huber, C.G. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2100-2107.

点击化学修饰疏水有机聚合物整体柱的制备及其在蛋白质分离中的应用

孙祥丽¹, 林冬¹, 何锡文¹, 陈朗星¹, 张玉奎^{1, 2}

(1. 南开大学化学学院, 天津 300071; 2. 中科院大连化学物理研究所, 大连 116011)

摘要

色谱柱是整个色谱系统的核心,如何提高柱效是人们一直关心的问题。整体柱(monolithic column)是吸取了无孔填料和膜的快速分离能力及HPLC多孔填料的高容量,又没有增加柱阻力这几方面的优点而发展起来的一种新型高效液相色谱填料。与传统的填充柱相比,整体柱具有以下优点:(1) 整个床层高度均匀,分辨率高;(2) 可在高流速下操作;(3) 制备成本低;(4) 使用寿命长,稳定性好;(5) 简化了介质的衍生;(6) 分辨率、吸附容量、流速都可通过改变制备过程中单体溶液的组成来调节。点击化学(click chemistry)的概念最早是2001年诺贝尔化学奖获得者美国化学家 Sharpless提出的一种快速合成大量化合物的新方法,是继组合化学之后又一给传统有机合成化学带来重大革新的合成技术。

本文将整体柱与点击化学的优点有机结合,利用高选择性高效率的点击化学对整体柱进行表面修饰,从而得到疏水有机整体固定相。如图1所示,首先利用可click化的单体与交联剂聚合得到带有端基炔的整体骨架,然后利用一价铜催化的1,3-偶极环加成反应将叠氮化的两种烷烃长链修饰在该骨架表面。图2为修饰前后的整体柱对5种蛋白的分离性能比较,可以看出随着疏水性能的提高,固定相对5种蛋白的分离能力也随之增强。

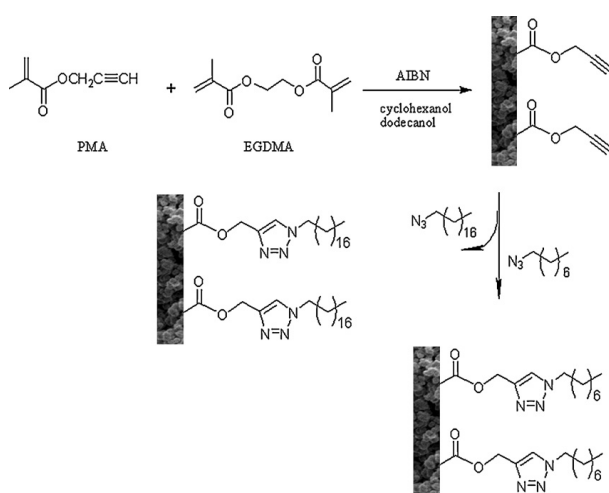


图1

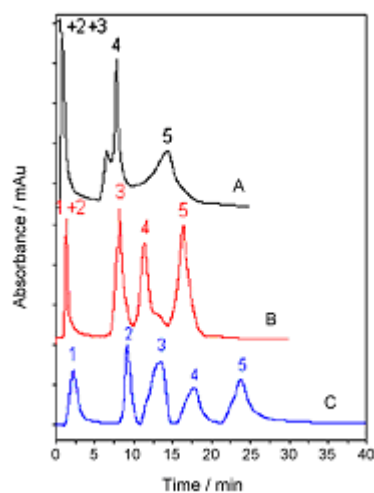


图2

参考文献

1. H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 2004–2021.
2. N.W. Smith, Z.J. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 416–440.
- 3 M.D. Slater, J.M.J. Fréchet, F. Svec, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 21–28.

转铁蛋白分子印迹颗粒的制备及应用

李沁然, 刘晋湘, 杨开广, 张丽华*, 梁振, 单亦初, 张玉奎

(中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连, 116023)

在自然界中, 生物体内的化学反应都可以看作是分子识别的过程。分子印迹就是仿生物体内“抗原-抗体”的理念, 在人工材料上制备特异识别位点的技术。与天然抗体相比, 分子印迹材料具有更高的环境耐受性、制备成本较低、可重复使用等优势。在蛋白质分子印迹的研究当中, 常使用在基质材料表面制备识别位点的方法, 即表面印迹方法。相对传统印迹方法, 该方法模板利用率高、位点易暴露、传质速度快, 故近年来得到较好的发展。

本研究采用纯硅胶颗粒为基质, 先将牛血清转铁蛋白 (apo-Transferrin) 吸附到硅球的微孔内; 然后将聚合溶液通入到硅球内, 封闭进行聚合反应; 聚合反应结束后, 用 NH_4HF_2 溶液刻蚀掉硅球, 形成分子印迹颗粒。实验结果表明, 使用制备得到的 MIP 印迹颗粒对四种标准蛋白的混合溶液进行处理后, 模板蛋白牛血清转铁蛋白几乎被全部吸附; 而其他非模板蛋白的非特异性吸附量很低。合成过程中不加模板蛋白的对照组材料 (NIP) 对于模板蛋白的吸附量也远低于 MIP 材料相应的吸附量, 如图 1 所示。对于模板蛋白, 其印迹因子 (MIP/NIP) 可以达到 1.6。以上结果说明, 印迹颗粒材料对模板分子具有较好的选择性识别能力, 可有望应用于蛋白质组学 HPLC-MS 分析中样品前处理环节对血浆样品高丰度蛋白血清转铁蛋白的选择性去除。

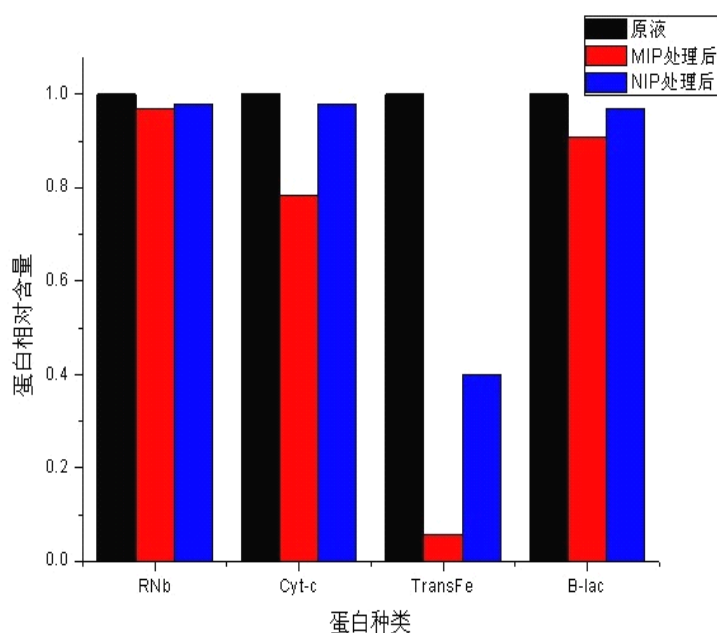


图 14 种标准蛋白混合溶液经印迹材料处理前后溶液中各种蛋白的相对含量

蛋白质印迹材料制备及其识别性能研究

邓启良^{1,2}, 刘晋湘², 梁振², 张丽华², 张玉奎²

(1.天津科技大学理学院, 天津 300222;

2.中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心, 大连 116023)

蛋白识别材料在分离科学、化学及生物传感器以及医药等领域都有重要应用价值。分子印迹是近年发展起来的人工合成分子识别材料技术。其分子识别性能是基于结合位点与模板分子在尺寸大小、形状和功能基团排列等方面的相互匹配。针对小分子合成的印迹材料已经广泛地应用于分离、催化和传感器等领域。但是,以蛋白质为模板分子制备分子识别材料仍然是一项艰巨的任务。本文以猪血清白蛋白为模板分子、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸为功能单体,哌嗪双丙烯酰胺为交联剂制备了印迹材料,所制备的材料用于蛋白混合液中模板蛋白的选择性识别。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

甲基丙烯酸,过硫酸铵和N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)购自Acros公司(Morris Plains, New Jersey)。甲基丙烯酰胺购自Fluka公司(Buchs Switzerland)。丙烯酰胺,哌嗪双丙烯酰胺,溶菌酶(lysozyme)与细胞色素C(cytochrome C)购自Sigma公司(St. Louis, MO)。高效液相色谱(HPLC)(岛津LC20AD,紫外/可见检测器SPD20A)。

1.2 PSA分子印迹聚合物及空白聚合物的制备

首先将哌嗪双丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸和猪血清白蛋白溶于磷酸缓冲溶液(10mM, pH6.5)中。然后依次加入过硫酸铵(10%, W/V)和TEMED,反应24h。再用10%SDS(W/V)+10%乙酸(V/V)溶液浸泡5h,冲洗掉蛋白质模板。最后,用水冲洗三次,去除SDS,聚合物晾干后备用。

空白聚合物的合成除不加模板分子外,其它条件与印迹聚合物的制备相同。

2 结果

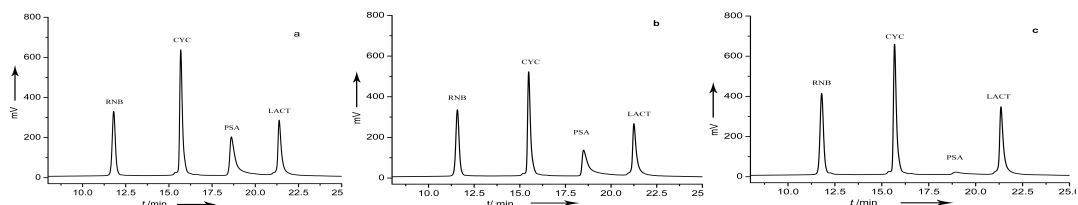


图1 聚合物对蛋白质的识别能力

a. 原始溶液; b.非印迹聚合物吸附后溶液; c. 印迹聚合物吸附后溶液

本研究中我们以细胞色素C,核糖核酸酶B, β -乳球蛋白为竞争蛋白与猪血清白蛋白一起

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20605024)

作者简介: 邓启良(1974-),男,山西人,副教授, E-mail:yhdql@tust.edu.cn

组成蛋白质混合液，以制备印迹聚合物模拟抗体用于选择性识别模板蛋白,由图 1 结果可以看出, 经过非印迹聚合物吸附后, 溶液中残留的四种蛋白质浓度与原始溶液相比, 并没有发生明显变化; 这说明非印迹聚合物对四种蛋白质的吸附量均很小。经过印迹聚合物吸附后的溶液中, 三种竞争蛋白质的浓度没有明显变化, 而猪血清白蛋白的浓度明显减小; 结果表明印迹聚合物对模板蛋白表现出高亲和性和特异性, 可以从蛋白混合物中识别出猪血清白蛋白; 而非印迹聚合物则不能从蛋白混合物中有效地识别猪血清白蛋白。由于蛋白的同源性, 该材料对人血清白蛋白也表现出较好的识别性能, 已初步应用于人血清中白蛋白的去处。

参考文献:

- [1] N. W. Turner, C. W. Jeans, K. R. Brain, C. J. Allender, V. Hlady, D. W. Britt, From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 1474-1489
- [2] A. Rachkov, N. Minoura, Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1544, 255~266.
- [3] M. Quaglia, K. Chenon, A. J. Hall, E. De Lorenzi, B. Sellergren, Target Analogue Imprinted Polymers with Affinity for Folic Acid and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 2146~2154.
- [4] P. Manesiotis, A. J. Hall, J. Courtois, K. Irgum, B. Sellergren, An Artificial Riboflavin Receptor Prepared by a Template Analogue Imprinting Strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44, 3902 - 3906.

Preparation of Protein Imprinted Materials and Its Recognition Properties

DENG Qi-liang^{1,2}, LIU Jin-xiang², LIANG, Zhen², ZHANG Li-hua², ZHANG Yu-kui²

(1. Department of Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300222;

2. National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics,
the Chinese Academic of Sciences, Dalian 116023.)

Abstract: In this work, an analogue protein of human serum albumin, porcine serum albumin, was chosen as the template to prepare imprinted material. The resulted material, in principle, could recognize human serum albumin due to the both proteins homologue. The selectivity and specificity to template was first investigated. The materials were evaluated as the stationary phase of SPE. The results indicated that the imprinted materials could recognize the template protein from a mixture of four proteins (porcine serum albumin; cytochrome C; ribonuclease B and β -lactoglobulin), which could not been accomplished by non-imprinted materials prepared in parallel. The recognition mechanism indicated that the formation of multiple hydrogen bonds and the template proteins - complementary shape of the imprinting cavities created during the imprinting process provided specific recognition toward the template protein.

Keywords: Molecularly Imprinted Polymers, Protein, Proteome

一种新的非平衡传质模型对柱内外 色谱峰形的描述

张兴华, 李笑玮, 孙志豪

(天津大学材料学院, 天津 300072)

本文提出了一种新的考虑了溶质在流动相和固定相两相之间存在传质阻力的非平衡塔板理论模型。该模型认为溶质在两相间的不平衡传质过程必须遵循 Fick 扩散定律, 即 $\Delta C = D_N * (C_{equ} - C_{cur})$, 传递的方向受浓度差值的正负符号决定。如果假定 D_N 对两相间的所有不同的浓度差值都是相同的数值 (0-1 之间), 且塔板高度不变 (记作 H_{non}), 这样确定的非平衡塔板模型称之为非平衡传质模型。本文借助于计算机程序用该理论作为指导模拟出的柱内外色谱峰形的变化。

1 前言

为了解释色谱分离过程, 马丁[1]等提出塔板理论, 假设色谱柱包含若干塔板, 且在每块塔板上溶质在两相之间可以实现完美平衡。在大多数学者看来这种假设的平衡是在等高的塔板上、瞬间完成的, 而在实际的色谱分离过程中由于流动相流动速度、分离组分的种类色谱柱品质等一系列因素的影响, 这种在等板高的柱长上完成平衡分配是不切实际的。许多学者一直在强调随着流动相线速度的增加溶质在两相间的传质越来越偏离理想平衡分配的情况, 塔板理论对流出曲线的峰形描述也越来越偏离实际情况, 所以要对塔板理论不平衡分配过程进行修正, 这种修正我们称之为非平衡塔板模型, 例如 Su-Cheng Pai[2]的包矩阵模型, 不幸的是该模型由于 K' 在基本假设上存在着错误, 它实际上并不是真正的非平衡塔板模型, 而只是一个改变了容量因子 K' 计算方法的经典塔板理论。

在理论研究中大多数学者认为非平衡塔板理论能更好地与实际色谱分离过程相符, 但是目前所提出的非平衡理论通常借助于偏微分计算, 这类非平衡理论尽管科学严谨但是失去了塔板理论简洁直观的优势, 本文正是从传质的角度提出了一个真正的非平衡塔板理论—非平衡传质模型, 该模型保留了塔板理论简洁直观的优势, 而重要的是不失计算的精确性。本文新提出的非平衡传质模型模拟出柱内外色谱峰形的变化, 并对得出的峰形对称性问题进一步讨论。

2 理论

根据 Adolf Fick 扩散第一定律:

$$J_A = -D_{AB}(d_{C_A} / d_z) \quad (1)$$

不论从形式还是理论上, 菲克定律与溶质在某一相间传质都极为相似, 这也奠定了本文基于菲克定律提出的新的非平衡塔板理论的坚实理论基础, 对于这一理论形态的结合至今还未曾见报道。

由于溶质在两相中分配时存在着传质阻力, 许多作者都将认为这一点不可忽略。文献中, 处理动力学传递过程中的浓度变化率大多数与 Georges Guiochona[3]一样, 即,

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{f,i}(q_i^* - q_i) \quad (2)$$

这里， $\frac{\partial q_i}{\partial t}$ 是浓度变化率， q_i^* 是平衡浓度， q_i 是实际浓度， $q_i^* - q_i$ 被认为是驱动力。

不难发现这种偏微分方法在动力学传递过程的处理与本文基于菲克定律得出的非平衡塔板理论浓度差作为传质动力的方法实质上是一致的，只是理论出发点不一样。

经计算得出，在塔板的某一相中，

$$m_{\text{non}} = D_N * (m_{\text{equ}} - m_{\text{cur}}) + m_{\text{cur}} \quad (3)$$

这里， m_{cur} 是传质前目前相中的溶质质量， m_{non} 是不平衡传质后相中溶质的质量， m_{equ} 为理论上平衡传质后相中溶质的质量。无论通过质量还是浓度变化传质的本质是一样的，本文通过质量变化模拟溶质的流动及峰形变化整个过程可以用下表来描述：

表 1 不平衡传质系数 $D_N=0.5$ 时非平衡传质模型模拟过程

		assumed $m=1, k=2, D_N=0.5$		
Plate number (n)		0	1	2
jump number=0	solid	0	0	0
	mobile	1	0	0
distribution	solid	0.3335(0.667)	0	0
	mobile	0.6665(0.333)	0	0
jump number=1	solid	0.3335	0	0
	mobile	0	0.6665	0
distribution	solid	0.2779(0.2223)	0.22215(0.4443)	0
	mobile	0.0556(0.1112)	0.44435(0.2222)	0
jump number=2	solid	0.2779	0.22215	0
	mobile	0	0.0556	0.44435
distribution	solid	0.2316(0.1853)	0.20366(0.18517)	0.148115(0.29623)
	mobile	0.0463(0.0926)	0.07409(0.09258)	0.296235(0.14812)

(jump number 栏是模拟每次流动相跳跃过程，数据是跳跃后相应塔板上两相的溶质质量，distribution 栏括号外的数据是当不平衡传质系数 $D_N=0.5$ 时，相应塔板上两相分配后的溶质质量，括号内的数据是理想分配完全平衡时相应塔板上两相的溶质质量)

3 非平衡传质模型对柱内外色谱峰形的描述

3.1 调整参数 D_N 值和 k' 值模拟出的柱内峰形变化

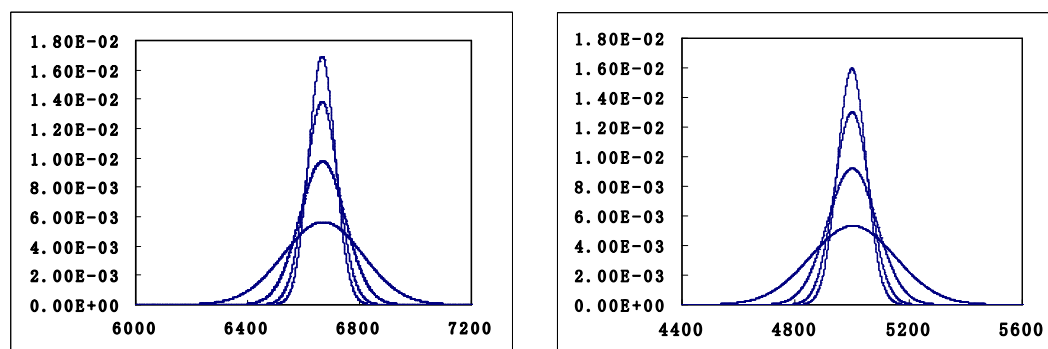
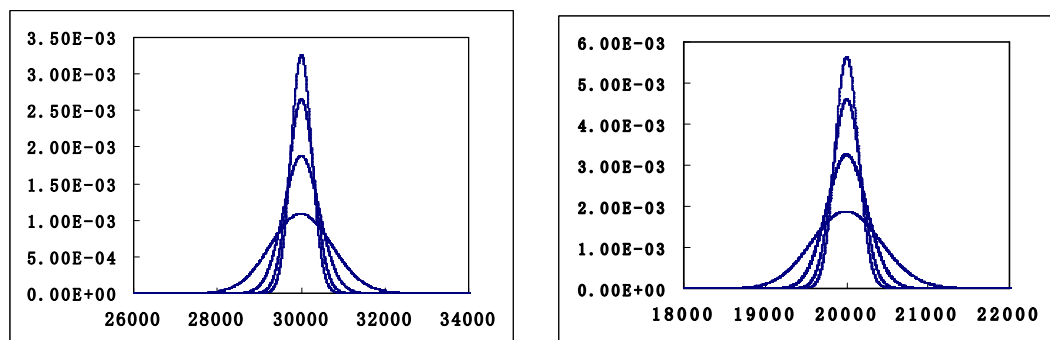


图 1 同一 k' 值不同 D_N 值的柱内色谱峰形曲线图 (假定塔板数为 10000 块，分别为 $k'=0.2, 1$ 时的柱内峰形曲线，在每张图中峰形曲线非平衡传质系数从下到上分别为 $D_N=0.2, 0.5, 0.8, 1$)

图2 同一 k' 值不同 D_N 值的柱外色谱峰形曲线图（注释同图1）

在图1和图2中，同一 k' 值下，峰位值不变，说明 D_N 不会影响溶质的保留本质。但是同时峰高变化比较明显，随着 D_N 值的减小，峰高值降低。这是因为 D_N 值越小，同一块塔板上溶质分配的越少，更倾向于保留在原相中不进行分配，从而会造成峰高值降低，同时分配的不完全使得谱带展宽。每张图中均有 $D_N=0.2$ 时峰高最小，展宽最严重，反映出色谱柱柱效下降，等同于色谱柱分离的理论塔板数下降。

3.2 峰形拖尾程度变化规律

这里采用面积法来讨论峰形不对称程度系数 c_{acy} (coefficient of asymmetry)，所谓不对称程度系数是峰顶点左侧区域的面积和右侧区域的面积之差与总峰面积的比值，即

$$c_{acy} = \frac{A_l - A_r}{A_l + A_r} \times 100\% \quad (4)$$

表2 非平衡传质模型对柱内峰形不对称程度系数值的计算

$c_{acy}(\%)$		$k'=0.25$	$k'=0.50$	$k'=1.00$	$k'=2.00$	$k'=4.00$
$n=5000$	$D_N=0.2$	2.54	1.20	0	-1.20	-2.54
	$D_N=0.5$	1.44	0.77	0	-0.77	-1.44
	$D_N=0.8$	0.94	0.46	0	-0.46	-0.94
	$D_N=1.0$	0.56	0.31	0	-0.31	-0.56
$n=10000$	$D_N=0.2$	1.83	0.91	0	-0.91	-1.83
	$D_N=0.5$	1.00	0.55	0	-0.55	-1.00
	$D_N=0.8$	0.63	0.46	0	-0.46	-0.63
	$D_N=1.0$	0.40	0.33	0	-0.33	-0.40

由表2可知，同一塔板数情况下，当 $k'=1$ 时，不论 D_N 如何取值 $c_{acy}=0$ ，柱内峰形永远为对称峰。同一 D_N 值时，当 $k'>1$ 时， $c_{acy}<0$ ，峰为拖尾峰，随着 k' 值的增大， c_{acy} 值逐渐降低，说明峰的拖尾程度增大；当 $k'<1$ 时， $c_{acy}>0$ ，峰为伸舌峰，随着 k' 值的减小， c_{acy} 值逐渐增加，说明峰的拖尾程度在增大，这一点与范国樑[4]等得出的结论一致。当 k' 取值相同时，随着 D_N 取值的减小， c_{acy} 的绝对值逐渐增大，表明峰的不对称程度在加大。这是因为随着 D_N 取值的减小溶质传质的不平衡性加剧，这必将造成峰形曲线最高点两侧浓度差值的“放大”，使得峰形的不对称程度加重。此外，同一塔板总数 n 的条件下，随着 D_N 的减小，使得柱效降低，造成峰的不对称程度加大。还应该注意到一点， $k_1=0.25$ 和 $k_2=4$ ， $k_1=0.5$ 和 $k_2=2$ 的 c_{acy} 分别互为相反数，则说明其中两峰形呈镜面对称关系，进一步用数据证明了 $k_1 \cdot k_2=1$ 时峰形关于横坐标 $x=n/2$ 的对称分布，这一点可以在数学上是可证明的。

表3 非平衡传质模型对柱外峰形不对称程度系数值的计算

$c_{acy}(\%)$		$k=0.25$	$k=0.50$	$k=1.00$	$k=2.00$	$k=4.00$
$n=5000$	$D_N=0.2$	-3.70	-2.88	-2.40	-2.03	-1.87
	$D_N=0.5$	-2.25	-1.69	-1.38	-1.12	-1.12
	$D_N=0.8$	-1.32	-1.03	-1.01	-0.87	-0.82
	$D_N=1.0$	-0.89	-0.87	-0.80	-0.77	-0.76
$n=10000$	$D_N=0.2$	-2.52	-2.19	-1.69	-1.49	-1.38
	$D_N=0.5$	-2.13	-1.27	-0.98	-0.79	-0.79
	$D_N=0.8$	-1.25	-0.84	-0.63	-0.62	-0.58
	$D_N=1.0$	-0.90	-0.61	-0.56	-0.54	-0.54

由表3可知,不论参数 k 和 D_N 如何取值均有 $c_{acy}<0$,说明流出曲线均为拖尾峰,当 D_N 值相同时,随着 k 值的增大, c_{acy} 值逐渐减小,可见峰的拖尾程度逐渐降低,这一点可以通过范国樑[4]等的柱出口效应给出很好的解释。此外, D_N 值对柱外峰形的影响与柱内相似。

4 结论

本文基于菲克定律提出了一种新的非平衡塔板理论—非平衡传质模型,借助于计算机程序能很好地模拟出柱内外色谱峰形的变化:柱内存在伸舌峰,对称峰和拖尾峰三种峰形;柱外的峰形均为拖尾峰。该模型保留了塔板理论简洁直观的优势,而重要的是不失计算的精确性,这一点无疑在某种程度上拓宽了塔板理论的使用范围,对以后非平衡模型的研究具有一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, Biochem. J. 35 (1941) 1358-1368.
- [2] Su-Cheng Pai. Journal of Chromatography A. J. 988 (2003) 233-260.
- [3] Georges Guiochon. Journal of Chromatography A. J. 965 (2002) 129-161.
- [4] 范国樑, 宋崇林, 周维义等. 分析化学研究简报. J. 29 (2001) 657-660.

A new non-equilibrium mass transfer model for describing of peak shapes both inside and outside chromatographic column

ZHANG Xing-hua LI Xiao-wei

(The School of Material Science and Engineer, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A new non-equilibrium plate model in which mass transfer resistance of the solute between the mobile phase and stationary phase is considered has been presented. This model is considered that the process of unbalanced mass transfer between two phases must follow Fick's diffusion law, viz. $\Delta C = D_N * (C_{equ} - C_{cur})$, in which the direction of mass transfer is accordance with positive/negative sign of the concentration difference. If D_N are the same values toward all the different concentration difference in two phases, and the plate height H_{non} is kept unchanged, such a non-equilibrium plate model is called non-equilibrium mass transfer model. In this paper, basing on this new theory, changes of peak shapes both inside and outside chromatographic column are simulated with the aid of computer programs.

Key words: Non-equilibrium plate theory; Fick's diffusion law; Non-equilibrium mass transfer model; Peak shapes

非平衡塔板理论和经典塔板理论在描述色谱峰形方面的定性比较

张兴华, 李登科, 王伟

(天津大学材料学院, 天津 300072)

本文重新认识了经典塔板理论并提出了一种新的非平衡塔板理论—非平衡传质模型,同时比较了非平衡传质模型和经典平衡塔板理论在描述柱内外色谱峰形方面的区别程度。通过峰形的不对称度,峰形重合度和峰形浓度分布比等计算结果表明,二者在描述色谱峰形上是没有差异的。

1 前言

塔板理论最早是由 Martin 等[1]提出,他们假设:色谱柱包含若干塔板,且在每块塔板上溶质在两相之间可以实现完美平衡。他们进一步指出这种完全平衡在色谱柱任何一点上都是无法建立的,但是却可以将色谱柱划分为这样的一系列的薄层,使每一薄层相当于一个理论塔板,这样每一薄层的高度就被称为一块理论塔板的等效高度(H.E.T.P.),而溶质通过这样的一块理论塔板时可以认为溶质是以平均浓度而完全实现了平衡。对于这一点却没有引起我们的足够重视,许多学者都认为在塔板理论中的塔板高度的划分带有任意性[2],其实质上并不是这样,更不是很多学者从塔板理论的假设中得出的板高必须是相等的结论,因为马丁说只是为了简化计算才作出等板高的假设,而在今天计算能力高度发达的今天我们没有必要这样简化,完全可以还原为非等板高。只要在一段色谱柱区域内溶质以平衡浓度达到平衡时,就可以看作为一块板高,这样可以把板高理解为达到统计意义上的平衡所需的色谱柱长度。

在相等板高的基础上,随着流动相流动速率的增大溶质在两相中的分配越来越偏离理想的平衡分配,这就促使许多学者一直在探寻着非平衡塔板模型,比如 Su-Cheng Pai[3]的包矩阵模型,遗憾的是他在基础假设上存在着错误,并没有达到非平衡塔板模型效果。本文立足于非平衡塔板理论的特点,根据菲克定律,提出了一种新的非平衡塔板理论,这里称之为非平衡传质模型。

本文在两个理论在描述色谱峰形方面比较了特定参数下的峰形不对称度,峰形重合度和峰形浓度分布比等计算结果,可见在描述色谱峰形方面二者是没有差异的。

2 两个理论在峰形描述上的定性比较

2.1 峰形不对称度的比较

由于模拟出柱内柱外曲线具有相似性,因此本文仅对柱外曲线加以说明(下同)。

由表 1, 2, 3 可知,当平衡塔板理论中的参数和非平衡传质模型的参数所得峰形曲线相似性极高,对于这一点我们可以定性看出只要两个参数满足一定关系式,必将可以把两个理论等同起来。

表1 两个理论模拟出的柱外流出曲线不对称度计算结果的对比(%)

塔板数	参数	$k' = 0.25$	$k' = 0.5$	$k' = 1$	$k' = 4$
$n=5000$	$M_E=2$	1.427	1.129	1.129	1.070
	$D_N=2/3$	1.426	1.228	1.129	1.078
	$M_E=4$	1.995	1.738	1.596	1.514
	$D_N=2/5$	1.999	1.736	1.596	1.548
$n=10000$	$M_E=2$	0.981	0.869	0.798	0.757
	$D_N=2/3$	0.979	0.860	0.798	0.762
	$M_E=4$	1.427	1.229	1.129	1.071
	$D_N=2/5$	1.426	1.231	1.129	1.065

<注> 不对称度计算式: $c_{acy} = \frac{A_l - A_r}{A_l + A_r} \times 100\%$, 即峰顶点左侧区域的面积和右侧区域的面积之差与总峰面积的比值。

2.2 峰形浓度分布比的比较

表2 两个理论模拟出的柱外流出曲线峰形浓度分布比计算结果的对比

塔板数	参数	$k' = 0.5$	$k' = 1$	$k' = 2$	$k' = 4$
$n=5000$	$M_E=2(i=600)$	0.7890	0.9557	0.9919	0.9987
	$D_N=2/3(i=600)$	0.7651	0.9557	0.9924	0.9988
	标准值($i=600$)	0.7898	0.9561	0.9919	0.9987
	$M_E=4(i=300)$	0.7883	0.9559	0.9918	0.9986
	$D_N=2/5(i=300)$	0.7578	0.9557	0.9925	0.9988
	标准值($i=300$)	0.7898	0.9961	0.9919	0.9987
$n=10000$	$M_E=2(i=600)$	0.7894	0.9560	0.9919	0.9987
	$D_N=2/3(i=600)$	0.7654	0.9558	0.9925	0.9988
	标准值($i=600$)	0.7898	0.9561	0.9919	0.9987
	$M_E=4(i=300)$	0.7891	0.9559	0.9919	0.9987
	$D_N=2/5(i=300)$	0.7585	0.9558	0.9925	0.9988
	标准值($i=300$)	0.7898	0.9961	0.9919	0.9987

<注> 计算标准值的公式: $\frac{T_{1'}}{T_1} \approx \frac{n^2 - \left(\frac{i}{k'}\right)^2}{n^2 - \left(\frac{i}{1+k'}\right)^2}$

2.3 峰形重合度的比较

表3 两个理论模拟出的柱外流出曲线重合度计算结果的对比（%）

塔板数	参数	$k' = 0.5$	$k' = 1$	$k' = 2$	$k' = 4$
$n=5000$	$N_E=2$	0.546	0.008	0.385	0.226
	$D_N=2/3$				
	$N_E=4$	0.483	0.022	0.340	0.431
	$D_N=2/5$				
$n=10000$	$N_E=2$	0.386	0.004	0.273	0.448
	$D_N=2/3$				
	$N_E=4$	0.341	0.005	0.241	0.396
	$D_N=2/5$				

<注> $\delta = \frac{A_1 \cup A_2 - A_1 \cap A_2}{A_1 \cup A_2}$ ，这里 A_1 、 A_2 分别是两个峰形的面积， $A_1 \cup A_2$ 和 $A_1 \cap A_2$ 分别是两个

峰面积的并集和交集。

3 结论

平衡塔板理论和非平衡塔板理论一直倍受色谱理论研究者的关注，本文对两种理论做了深层次地探索和研究。在对色谱的柱内外峰形描述的比较过程中（本文以柱外峰形为例）发现在某些参数下，所模拟出的峰形相似性极高，说明两个理论是没有差异的。但是，至于两个理论参数之间存在着什么样的定量的数学关系还仍然有待于探索。

参考文献

- [1] A.J.P. Martin, R.L.M. Syngé. *Biochem. J.* 35 (1941) 1358-1368.
- [2] Georges Guiochon. *Journal of Chromatography A.* J. 965 (2002) 129-161.
- [3] Su-Cheng Pai. *Journal of Chromatography A.* J. 988 (2003) 233-260.
- [4] 范国樑, 宋崇林, 周维义等. *分析化学研究简报.* J. 29 (2001) 657-660.

A comparison of between a new non-equilibrium plate theory and classical plate theory reconsidered in describing peaks shape

ZHANG Xing-hua LI Deng-ke

(The School of Material Science and Engineer, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: In this paper, classical plate theory is reconsidered and a new non-equilibrium plate model- non-equilibrium mass transfer model is presented, then difference of peak shapes that are respectively described by two theories is compared. Finally, it is conclude that, there is no difference between two theory in describing peak shapes by the calculation results of coefficient of asymmetry, concentration ratio of peak shape and contact ratio.

Key words: Classical plate theory; Non-equilibrium plate model; Non-equilibrium diffusion model; Peak shapes

非平衡塔板理论和经典塔板理论在描述色谱峰形方面的数学关系的定量研究

张兴华, 敖敏

(天津大学材料学院, 天津 300072)

本文对新的非平衡塔板理论(非平衡传质模型)和经典塔板理论在描述色谱峰形方面的数学关系作了定量研究, 最后得出结论: 如果非平衡扩散系数 D_N 同折合塔板系数 N_E 之间存在数学关系式: $N_E=2/D_N-1$ 时, 二者在描述色谱峰形上是没有差异的。

1 D_N 和 N_E 数学关系的推倒

在用新的非平衡塔板理论(非平衡传质模型)与经典塔板理论[1]在模拟峰形的过程中发现, 当两个理论参数 D_N 和 N_E 取为某组对应数值时, 所得到的峰形重合性极好。以此为原则, 在固定其中一个参数时不断调整另一个参数取值, 经过数次逼近, 使得两个峰形的重合性在感官程度上达到最大程度的重合, 此时记录下这组对应的参数取值。

表1 峰形重合时参数 D_N 和 N_E 的取值

$k'=1$	N_E	1	1.223	1.501	1.85	2.235	3	3.98	4.722	5.6	6.95
	D_N	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.35	0.3	0.25
$k'=5$	N_E	1	1.223	1.501	1.85	2.235	3	3.98	4.722	5.6	6.95
	D_N	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.35	0.3	0.25

表1列出了在取定 D_N 值不断调整 N_E 取值, 使得峰形达到最大程度重合时对应的参数取值, 可以看出 $k'=1$ 和 $k'=5$ 所得到的对应参数对不变, 可此可以证明 k' 对 D_N 和 N_E 之间的关系是没有影响的。此外, 此时对应的参数对是在在感官程度上达到峰形重合度最大的情况下得到, 所以与精确的 N_E 值对 D_N 值的参数对会存在着一定的误差。

图1为 N_E 值对 D_N 值的曲线作图, 可以得出随着 D_N 值的不断增大, N_E 值成下降的趋势。同时, 由 Van Deemter 方程[2]可知, 当分离达到最佳条件时, 传质达到平衡所需的板高最小, 此时分离的柱效最高, 而实际情况下, 这是不可能达到的, 板高的增大会造成柱效下降, 谱峰展宽。这时板高的增大过程正是本文中折合塔板数 N_E 取值增大的过程, 从峰的不对称性以及峰高下降等现象也证实了这个过程中柱效是在不断下降的。在用非平衡扩散模型模拟峰形变化时, 我们注意到随着参数 D_N 取值的减小, 溶质参与分配的质量减少, 也会使得峰形展宽以及峰的不对称性增强, 这也是一个柱效下降的过程。显然, 当 D_N 和 N_E 取值均为1的时候, 是完全等同的理想经典塔板理论。此时, 随着 D_N 的减小与 N_E 的增大对峰形趋势的影响是相同的, 都是引起峰高降低和不对称度加大, 同时是个柱效下降的过程。可见, 两个参数存在一种负相关的关系。

鉴于图1所反映的 N_E 值对 D_N 值的曲线趋势以及以上理论分析得出的参数对负相关关系, 对 N_E 与 D_N 的倒数作回归分析,

$$N_E = \frac{a}{D_N} - b$$

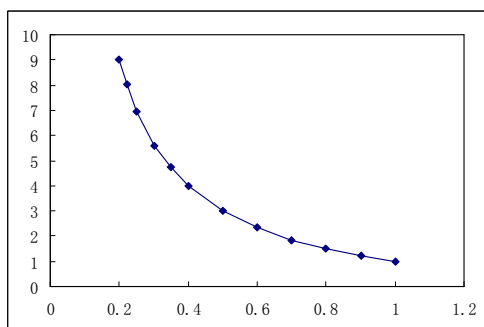


图1 N_E 关于 D_N 的回归分析

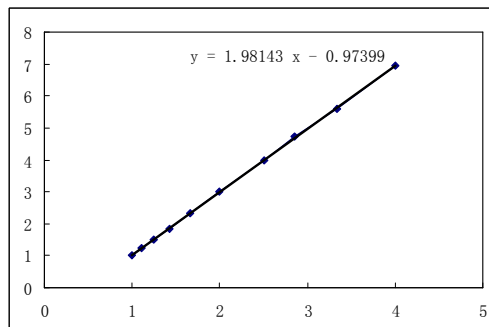


图2 N_E 关于 D_N 倒数的回归分析图

由图2得出 N_E 关于 D_N 倒数之间是一种线性关系，其中 $a=1.98143$ ， $b=0.97399$ ，即回归式为，

$$N_E = \frac{1.98143}{D_N} - 0.97399 \quad (1)$$

当随着参数对数不断增加时发现 a 的取值更接近于 2， b 的取值更接近于 1，因此上式简化式为，

$$N_E = \frac{2}{D_N} - 1 \quad (2)$$

2 简化式的证明

表2 回归式与简化式偏差百分数的比较

N_E	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.35	0.3	0.25	$\Sigma (E\%)$
D_N (对应值)	1	1.223	1.501	1.85	2.235	3	3.98	4.722	5.6	6.95	
D_N (回归式)	1.007	1.228	1.502	1.857	2.329	2.989	3.980	4.687	5.631	6.952	
D_N (简化式)	1	1.222	1.5	1.857	2.333	3	4	4.714	5.667	7	
回归式偏差 ($E\%$)	0.744	0.376	0.1120	0.358	-0.283	-0.371	-0.010	-0.736	0.550	0.025	5.38
简化式偏差 ($E\%$)	0	-0.064	-0.067	0.386	-0.071	0	0.503	-0.163	1.191	0.719	3.51

<注>回归式偏差 $E\%$ 为 D_N (回归式) 与 D_N (对应值) 的差值所占 D_N (对应值) 的百分数，回归式偏差同理。

由表2可知，简化式总的偏差 ($|E\%|$) 更小，即用简化式所求得的 D_N 值更接近于感官达到峰形重合度最大时对应的 D_N (对应值)，由此说明将回归式作以上简化是合理的。

3 用简化式得到的参数对的峰形重合度

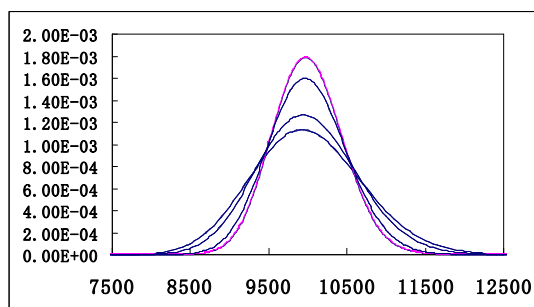


图3 用简化式得到的参数对模拟出的的柱外峰形重合程度

图3中的蓝色峰形曲线是用平衡塔板理论通过改变板高 N_E 变化模拟出的柱外峰形曲线,从上往下依次是 $N_E=20, 25, 40, 50$;红色峰形曲线是用非平衡传质模型通过改变不平衡传质系数 D_N 模拟出的柱外峰形曲线,从上到下依次是 $D_N=0.09524, 0.07692, 0.04878, 0.03922$,且以上所有峰形曲线均是在 $N=5000, k=1$ 时得到的。对以上四组图形计算曲线的重合度分别为($\times 10^{-5}$): 1.15, 1.25, 1.19, 1.12,可以看出即使在传质极端不平衡的条件下,只要满足简化式4-2对应的参数对所模拟出的峰形重合的精确性仍然极高,同时这也证明了式4-2的准确性,能通过简单的数学转换很好地把两个理论等效起来。

4 结论

本文对新的非平衡塔板理论(非平衡传质模型)和经典塔板理论在描述色谱峰形方面的定量数学关系作了研究,在对色谱的柱内外峰形描述的比较过程中(本文以柱外峰形为例)推导出当两个理论中的参数满足 $N_E=2/D_N-1$ 时,所模拟出的峰形重合度极高,说明此时两个理论是完全等效的。有了这个数学表达式,可以将两个理论作任意转换,这一点无疑是对马丁的塔板理论中关于传质平衡问题和板高高度问题一个很好的证明和补充。同时遵循这个转换的原则,在实际工作中完全可以用平衡的塔板理论代替非平衡塔板理论,这一点必将给研究工作带来极大的便利。

参考文献

- [1] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge. *Biochem. J.* 35 (1941) 1358-1368.
 [2] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem.Eng. Sci.* 5 (1956) 271-289.

A quantitative study of mathematic relationship between a new non-equilibrium plate theory and classical plate theory in describing chromatographic peak shapes

ZHANG Xing-hua AO Min

(The School of Material Science and Engineer, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: In this paper, the relationship between a new non-equilibrium plate model (non-equilibrium mass transfer model) and classical plate theory in describing chromatographic peak shapes is quantitatively studied. Finally, it is concluded that, if there is a mathematical relationship between non-equilibrium mass transfer coefficient D_N and the number of equivalent plate N_E : $N_E=2/D_N-1$, there is no difference between two theory in describing peak shapes.

Key words: Classical plate theory; Non-equilibrium plate model; Non-equilibrium mass transfer model; Peak shapes

在线速度改变的条件下塔板理论对柱内外色谱峰形的描述

张兴华

（天津大学材料学院，天津 300072）

本文通过速率理论在不同的线速度下确定了变化的板高，并把这样得到的板高用到经典塔板理论中，以此模拟出柱内外峰形变化。

1 前言

塔板理论最早是由 Martin 等[1]提出，他们假设：色谱柱包含若干塔板，且在每块塔板上溶质在两相之间可以实现完美平衡。他们进一步指出这种完全平衡在色谱柱任何一点上都是无法建立的，但是却可以将色谱柱划分为这样的一系列薄层，使每一薄层相当于一个理论塔板，这样每一薄层的高度就被称为一块理论塔板的等效高度（H.E.T.P.）。但是马丁只是这样定性地给出了理论塔板高度的定义，并没有指出实际的塔板高度是受哪些因素影响的。范蒂姆特[2]在速率理论中具体地指出了影响板高的一系列因素，这一点无疑是对塔板理论关于板高变化的一个很好的补充。

本文通过 Van Deemter 方程中线速度的变化得到变化的板高值，借助于电脑程序把得到的板高值“嫁接”到经典塔板理论上，以此来模拟柱内外色谱峰形的变化。

2 理论

由简化的 Van Deemter 方程[2]，

$$H(u) = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

这里的 u 为平均线速度 A, B, C 均为常数。Van Deemter 方程可知，当平均线速度改变时，必将引起板高的改变，且 u 取一定数值时存在一个最小的理想板高值。由塔板理论可知，板高的改变影响组分在塔板上的平衡分配，必将造成柱效的变化。本文对 Van Deemter 方程曲线的右半枝作了研究，线速度 u 的增加必将造成板高的增大，通过电脑程序改变线速度 u 的取值最终模拟出柱内外峰形变化。

3 线速度改变的塔板理论对柱内外色谱峰形的描述

3.1 不同参数 $H(u)$ 值和 k' 值模拟出的柱内外峰形变化

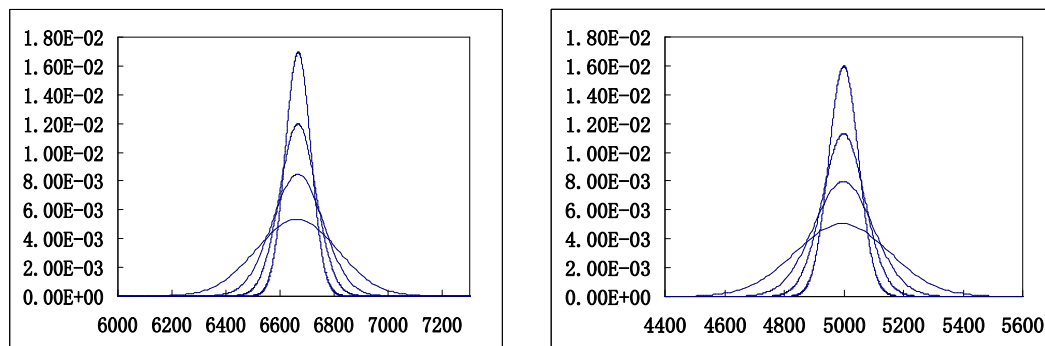
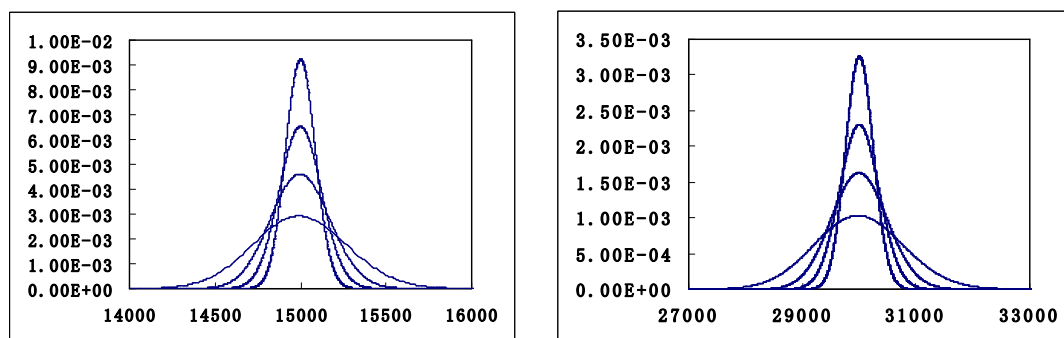


图1 同一 k' 值不同 $H(u)$ 值的柱内色谱峰形曲线图（假设总塔板数 n 为 10000，分别为 $k'=0.5, 1$ 时的柱内峰形曲线。在每张图中峰形曲线的折合塔板数从上到下分别为 $H(u)=1, 2, 4, 10$ ）

图2 同一 k' 值不同 $H(u)$ 值的柱外色谱峰形曲线图（注释同图1）

在图1和图2中，同一 k' 值下， $H(u)$ 的增大，所模拟出的峰形峰高变小，同时峰的展宽加大。此时，是由于线速的增大引起塔板高度的增大，使得组分在塔板上分配的的不平衡加剧，造成柱效的下降。

3.2 峰形拖尾程度变化规律

这里采用面积法来讨论峰形不对称程度系数 c_{acy} (coefficient of asymmetry)，所谓不对称程度系数是峰顶点左侧区域的面积和右侧区域的面积之差与总峰面积的比值，即

$$c_{acy} = \frac{A_l - A_r}{A_l + A_r} \times 100\% \quad (2)$$

由表1可知，首先，柱内存在着伸舌峰，对称峰和拖尾峰三种峰形，这一点与范国樑[3]等得出的结论一致。其次，同一塔板总数 n 的条件下，随着 $H(u)$ 的增大，造成峰的不对称程度加大，这一点是由于程序中给定的线速度 u 增大的引起的。还应该注意一点， $k'_1=0.25$ 和 $k'_2=4$ ， $k'_1=0.5$ 和 $k'_2=2$ 的 c_{acy} 分别互为相反数，则说明其中两峰形呈镜面对称关系，进一步用数据证明了 $k'_1 * k'_2 = 1$ 时峰形关于横坐标 $x=n/2$ 的对称分布，这一点可以在数学上是可证明的。

表1 平衡塔板理论对柱内峰形不对称程度系数值的计算

$c_{acy}(\%)$		$k'=0.25$	$k'=0.50$	$k'=1.00$	$k'=2.00$	$k'=4.00$
$n=5000$	$H(u)=1$	0.56	0.33	0	-0.31	-0.56
	$H(u)=2$	0.80	0.39	0	-0.39	-0.80
	$H(u)=4$	1.13	0.56	0	-0.56	-1.13
	$H(u)=10$	1.78	0.89	0	-0.89	-1.78
$n=10000$	$H(u)=1$	0.40	0.31	0	-0.33	-0.40
	$H(u)=2$	0.56	0.33	0	-0.31	-0.31
	$H(u)=4$	0.80	0.39	0	-0.39	-0.80
	$H(u)=10$	1.26	0.56	0	-0.56	-1.26

由表2可知，不论参数 k' 和 $H(u)$ 如何取值，均有 $c_{acy} < 0$ ，说明所得的峰形均为拖尾峰，当 $H(u)$ 值相同时，随着 k' 值的增大， c_{acy} 值逐渐减小，可见峰的拖尾程度逐渐降低，这一点可以通过范国樑[3]等的柱出口效应给出很好的解释。

表2 平衡塔板理论对柱外峰形不对称程度系数值的计算

$c_{acy}(\%)$		$k'=0.25$	$k'=0.50$	$k'=1.00$	$k'=2.00$	$k'=4.00$
$n=5000$	$H(u)=1$	-0.99	-0.87	-0.80	-0.77	-0.76
	$H(u)=2$	-1.46	-1.23	-1.13	-1.09	-1.07
	$H(u)=4$	-2.10	-1.74	-1.60	-1.57	-1.51
	$H(u)=10$	-3.19	-2.75	-2.53	-2.43	-2.40
$n=10000$	$H(u)=1$	-0.87	-0.61	-0.56	-0.54	-0.54
	$H(u)=2$	-0.99	-0.87	-0.80	-0.77	-0.76
	$H(u)=4$	-1.46	-1.23	-1.13	-1.09	-1.07
	$H(u)=10$	-2.26	-1.94	-1.78	-1.72	-1.69

4 结论

本文以速率理论为指导，通过改变平均线速度 u 值得到变化的板高值 $H(u)$ ，并在该板高前提下借助于电脑程序通过塔板理论模拟出柱内外色谱柱峰形变化，并对得到的峰形进行了对称性的讨论，得出结论：在柱内存在伸舌峰，对称峰和拖尾峰三种峰形；在柱外的色谱峰形都为拖尾峰。本文是对速率理论和塔板理论的有效结合，可以清晰地看出线速度是如何影响色谱峰形变化的。

参考文献

- [1] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358-1368.
- [2] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem.Eng. Sci.* 5 (1956) 271-289.
- [3] 范国樑, 宋崇林, 周维义等. *分析化学研究简报*. J. 29 (2001) 657—660.

Plate theory for describing of peak shapes both inside and outside chromatographic column in the condition of various line velocities

ZHANG Xing-hua

(The School of Material Science and Engineer, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The changed plate length is determined by the conditions of various line velocity which is determined by rate theory, and such plates are used in the classical plate theory for simulating peak shapes both inside and outside chromatographic column with the aid of computer programs.

Key words: Velocity theory, Plate theory, Plate length, Peak shapes

有机无机复合聚合物整体柱的制备及其在分离蛋白中的应用

杨更亮^{1,2}, 白立改^{1,2}

(1. 河北省药物质量研究与控制重点实验室, 河北 保定 071002; 2. 河北大学药学院, 河北 保定 071002)

近年来, 高效液相色谱方法 (HPLC) 在分离分析领域中扮演着越来越重要的角色。而其中, 色谱柱是整个色谱系统的核心, 聚合物整体柱的开发和应用弥补了传统的填充柱的诸多缺点。目前所报道的聚合物整体柱虽然对蛋白质也具有较好的分离能力, 但是聚合物的结构难以控制均匀, 且聚合完成后需要进行进一步的修饰, 步骤繁琐, 耗时耗力^[1,2]。本文给出了一种新型有机无机复合聚合物整体柱的制备方法, 该制备过程利用原子转移自由基聚合 (ATRP) 机理进行聚合, 可以通过改变单体、引发剂以及催化剂的比例来控制自由基的活性, 从而获得结构均匀的聚合物。实验表明聚合完成后无需再进行修饰即可对蛋白质进行快速分离分析。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

安捷伦 1100 系列高效液相色谱仪 (安捷伦公司, 美国); 乙烯基酯树脂由双酚 A 缩水甘油醚制备而得; 十二醇、亚硫酸氢钠、氯化亚铁、四氯化碳 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 所有试剂均为分析纯, 实验中所用水均为三次蒸馏水。

1.2 聚合物整体柱的制备

将乙烯基酯树脂、四氯化碳、十二醇、氯化亚铁、亚硫酸氢钠和水按一定比例加入试管中, 超声混匀, 倾倒入于不锈钢色谱柱管中, 于 70℃ 反应 24 小时, 反应完成后以甲醇在线冲洗 24 小时以除去致孔剂和其他未反应完全的可溶物即得到有机无机复合整体柱。

1.3 聚合物整体柱作为 HPLC 的固定相对人免疫球蛋白的分离

本实验对人血浆中的人免疫球蛋白进行了分离。自制整体柱: 50 × 4.6 mm i.d.; 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL/min。

1.3.1 流动相的选择

分别考察了缓冲盐的种类和浓度以及 pH 值对人免疫球蛋白 (IgG) 在该整体柱上的保留行为的影响。

1.3.2 人血浆中人免疫球蛋白的分离

以自制的有机无机复合整体柱 B (50 × 4.6 mm i.d.) 为固定相, 分别以水和磷酸氢二钠水溶液为流动相进行梯度洗脱, 对人血浆中的人免疫球蛋白进行分离, 并与本实验室之前制备的聚乙烯基酯树脂整体柱 A (50 × 4.6 mm i.d.) 对人血浆中的人免疫球蛋白的分离进行了对比。

2 结果

2.1 聚合物整体柱制备条件的优化

通过改变单体、引发剂、催化剂的比例, 制得一系列不同条件下的聚合物整体柱, 并分别利用傅里叶红外光谱和电子扫描电镜对上述聚合物进行了官能团的确定及聚合物形态结构的确定。红外吸收谱图结果表明: 改变单体、引发剂、催化剂的比例对聚合物的官能团基本无影响, 且 1510 cm⁻¹ 显示苯环的振动, 1725 cm⁻¹ 处是酯羰基的强吸收带, 2960 cm⁻¹ 处红

外吸收峰为聚合物中-CH₂-的 C-H 的伸缩振动。

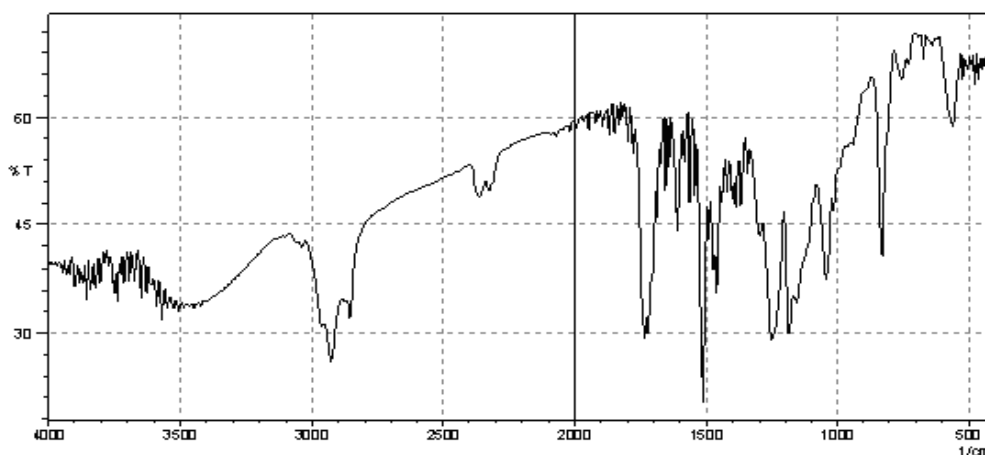


图1 聚合物整体柱的红外扫描图

而扫描电镜结果则表明：改变单体、引发剂、催化剂的比例对聚合物的形态结构则影响较大：可以由颗粒堆积致孔（e, g）甚至无孔（d）到基本具备骨架结构（f）的聚合物。其红外光谱图如图1所示，扫描电镜图如图2所示。

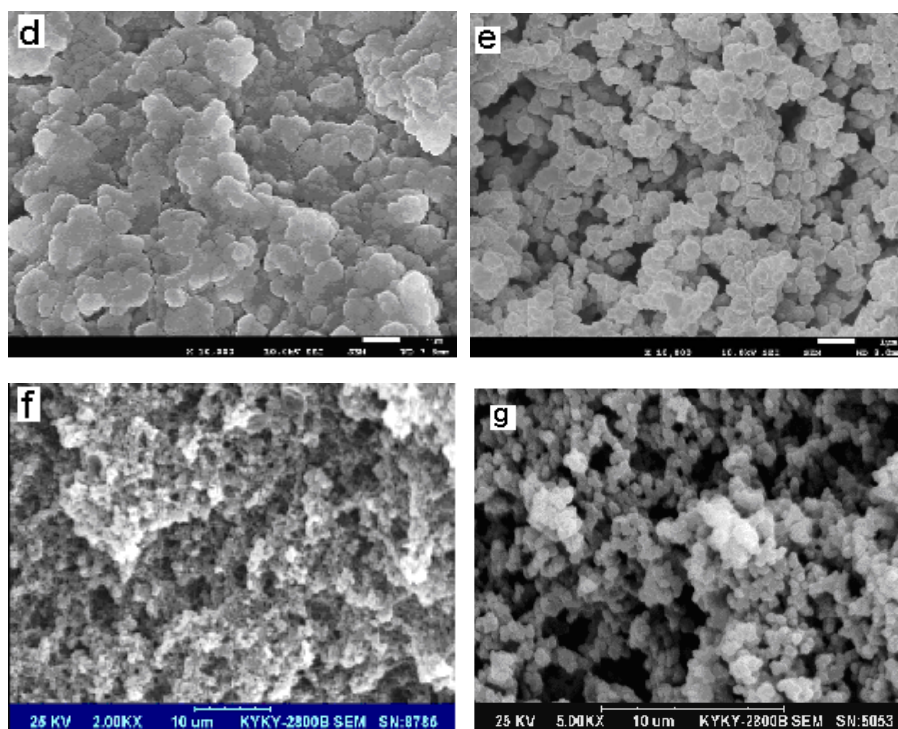


图2 聚合物整体柱的SEM结构表征图

2.2 有机-无机复合聚合物整体柱对人血浆中IgG的分离色谱图

人血浆中人免疫球蛋白的分离如图3所示。由图可知以自制的有机无机复合聚合整体柱无需进行化学修饰作为HPLC的固定相，即可以实现对人血浆中人免疫球蛋白的快速高效的分离。而以前报道的聚乙烯基酯树脂整体柱^[3, 4]不经化学修饰则对人血浆中的人免疫球

蛋白无分离能力。

3 讨论

该聚合物整体柱的制备利用了原子转移自由基聚合 (ATRP) 的原理, 并首次采用四氯化碳和亚硫酸氢钠为有机-无机联合引发剂引发聚合, 改善了传统的原位自由基聚合的链转移链终止所导致的分子量分布范围宽、聚合物不均匀等缺点, 改善

了聚合物整体柱的颗粒堆积致孔, 得到了具有较为均匀的骨架结构的有机无机复合

聚合物整体柱, 且无需再经过化学修饰即可对蛋白进行快速高效的分离分析。

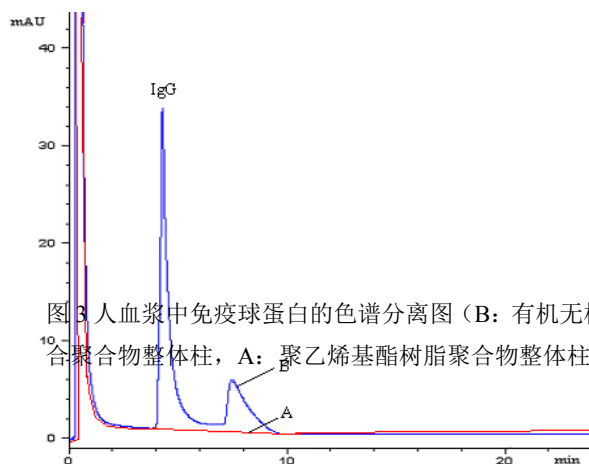


图3 人血浆中免疫球蛋白的色谱分离图(B: 有机无机复合聚合物整体柱, A: 聚乙烯酯树脂聚合物整体柱)

参考文献

- [1] F. Svec, E.C. Peters, D. Sykora, J.M.J. Frechet, *J. Chromatogr. A*, 2000, 3: 887.
- [2] L.T. Arenas, T. A. S. Aguirre, A. Langaro etc., *Polymer* 2003, 44: 5521.
- [3] L. G. Bai, H. Y. Liu, G. L. Yang etc., *Chinese journal of chemistry*, 2008, 26 (11): 2063-2066.
- [4] G. L. Yang, H. Y. Liu, L. G. Bai etc. *microporous and mesoporous materials*, 2008, 112: 351-356

Preparation of a Novel Hybrid Organic-Inorganic Monolith for the Separation of IgG from Human Plasma by HPLC

Geng-liang Yang^{1,2} Li-gai Bai^{1,2}

(1: Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province,

2: Pharmaceutical Sciences college of Hebei University, Baoding, Hebei, 071002, China)

Abstract: Recently, high performance liquid chromatography (HPLC) has played a very important role in the area of separation and analysis. Chromatographic column is the core of the system. The development and application of polymeric monolithic column offset the defects of traditional packed column. The disadvantage from the reported monolith previously is the pores which are created by accumulation of particles and the structure. Nevertheless, the previous monolith needs to be modified by chemical method when used as HPLC stationary phase to separate protein which is very cockamamie and time-consuming. A novel hybrid organic-inorganic monolith has been prepared by atom transfer radical polymerization (ATRP) in the current work. The optimization condition which was realized by changing the ratio of monomer, initiator and catalyst can lead a uniform skeleton structure. According to the result, the hybrid organic-inorganic monolith can be used as HPLC stationary phase without being modified to separate IgG from human plasma in a short time.

Key words: Organic-inorganic monolith; Vinyl ester resin; HPLC; IgG

ELSD 简介及在生物碱成分分析中的应用

赵辉¹, 亓晖², 朱元元³

(南开大学药学院, 天津 300000)

高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, 简称HPLC)已经在化学, 生化, 药物, 环保及工业分析中普遍使用, 所分析的样品范围也越来越广。高效液相色谱以其灵敏、快捷、操作方便, 适用范围广等优点, 已经广泛应用于中药的有效成分含量测定、组分分析、指纹图谱等方面。检测器是液相色谱仪的关键部件之一, 高效液相色谱检测器中除了最常用的紫外检测器之外, 还有荧光检测器, 示差折光检测器, 蒸发光散射检测器, 质谱检测器, 极谱检测器, 核磁共振检测器等, 本文主要介绍蒸发光检测器的应用。

1 蒸发光检测器(Evaporative Light Scattering Detect, ELSD)简介

1.1 ELSD的工作原理

在辅助气体作用下, 将流动相雾化, 形成的液雾(雾珠)通过加热而蒸发, 此时溶解在流动相中不易挥发的样品即形成颗粒物, 这些颗粒物由辅助气体推动进入光束通道, 造成光束散射。通过测定散射光的强度即可预测样品颗粒的数量, 从而测定样品浓度。

1.2 ELSD的基本结构:

依据ELSD的设计原理, ELSD的结构由三大部分组成: 即雾化雾珠处理, 蒸发和散射光检测。蒸发光散射检测器运行分为3个过程: 雾化过程, 即用惰性气体或纯净空气将色谱柱的流出物雾化; 蒸发过程, 即在加热的漂移管中将色谱柱流出物中的流动相挥发, 只剩下挥发性较小的被检物质的粒子; 检测过程, 即测定不挥发性粒子对光的散射, 记录其光散射信号^[1,2]。

1.3 ELSD的特点

1. 雾化气流的纯度和压力会影响检测器的信噪比。
2. 不能使用不易挥发的物质来调节流动相的pH值; 可以通过蒸发温度的调节来使比被测物质沸点低的组分蒸发; 在不能使被测物质蒸发的前提下, 温度越高, 流动相蒸发越完全, 色谱图基线越好、信噪比越高。
3. 检测光散射变化, 所有进入到散射池的物质都可被检测, 而且响应值只与物质的量(质量)有关。
4. 浓度跟峰面积不成线性, 分别取自然对数后成线性。

2 HPLC-ELSD在生物碱成分分析中的应用

中药的化学成分复杂, 有的中药成分不存在紫外吸收或仅在紫外末端有吸收。另外由于色谱分离的困难以及流动相带来的干扰, 使用传统的紫外检测器对其进行定性定量分析十分困难。ELSD在某种程度上弥补了这方面的不足, 被广泛的应用于皂苷类成分、糖类成分、内酯类成分、部分生物碱类成分以及其他一些成分的分析, 以及中药指纹图谱研究、药代动力学研究, 并且取得了满意的结果。本文就其在生物碱成分分析中的应用作简要陈述。

李松林^[3]等采用HPLC-ELSD法建立了伊犁贝母中西贝素和西贝素苷的检测法, 色谱条件: Kromasil C₁₈色谱柱(200mm x 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈: 水: 三乙胺(71: 29: 0.03, V/V/V), 流速1.0 mL/min; ELSD参数: 漂移管温度88 $^{\circ}$ C, 氮气流速2.38 L/min。

作者简介: 赵辉(1987-), 女, 山东人, 硕士研究生, E-mail: zhblbluesea@126.com

通讯联系人: 朱元元, 女, 副教授, E-mail: zhuyy@nankai.edu.cn

张盛等^[4]建立该法测定藜芦中的介藜芦碱和藜芦胺含量的方法, 并对4种藜芦属药材样品进行了测定, 色谱条件: Kromasil C₁₈柱(250mmx4.6mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈: 0.1% 三氟乙酸水溶液梯度洗脱; 流速0.8 mL/min, 柱温35 $^{\circ}$ C; ELSD参数: 漂移管温度98 $^{\circ}$ C, 载气流速2.2 L/min。

Song^[5]等人利用HPLC-ELSD方法,以乙腈(0.006%三乙胺):甲醇:水(66.5:3.5:30;V/V/V)为流动相在反相C₈柱上,实现了贝母类药材中6种异甾族生物碱的分离和测定,得到了良好的重现性和准确度。

我们利用ELSD,以色谱柱:Hypersil SCX柱(250 mm×10.0 mm, 5 μm);流动相:水-冰醋酸-氨水(1000:0.25:0.25; V/V/V);流速:3.0ml/min为条件,成功分离出蚕沙中的甜菜碱及DNJ等生物碱成分。

3 蒸发光检测器的缺点

ELSD用来测定那些不能用紫外检测器检测的组分,对紫外检测器是很重要的补充。但其在应用方面还存在一些问题,对关于影响ELSD检测各种参数的选择,以及流动相中修饰剂对物质响应值的改变等的问题还没有系统结论,另外其准确性与紫外检测器相比,其结果的准确度和重现性有待于进一步的提高,此外ELSD价格昂贵并且使用不便,需要配置高压氮气或空气,且实验中产生废气有害。这些缺点限制了ELSD更广泛的使用。

4 结论

HPLC-ELSD法虽有一些缺点,但不可否认它适合分析成分复杂的中药,其主要取决ELSD检测器的突出优势,即高效、灵敏,不受流动相系统温度变化的影响,基线稳定性好,有利于对成分复杂的中药检测,特别适用于无紫外吸收或紫外末端吸收的样品以及挥发性低于流动相的任何组分。因此,其对所有非挥发组分都可产生响应,应用范围十分广泛。随着ELSD检测技术和仪器本身的不断完善,相信会在中药成分分析中起到越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] A Stolyhwo, H Colin, G Guiochon. Use of Light Scattering as a Detector Principle in Liquid Chromatography[J]. J Chromatogr, 1983, 265 :1.
- [2] A Stolyhwo. Study of the Qualitative and Quantitative Properties of the Light Scattering Detector[J]. J Chromatogr, 1984, 288 :253.
- [3] 李松林, 李萍, 曾令杰. 伊犁贝母中西贝素和西贝素苷的高效液相色谱蒸发光散射检测法[J]. 药学报, 2001, 36(4):300-302.
- [4] 张盛, 周剑侠, 寿清耀等. 高效液相色谱. 蒸发光散射检测法测定藜芦中的介藜芦碱和藜芦胺[J]. 色谱, 2008, 26(1):56-59.
- [5] Song L L, Ge L, Shun W C, et al. Determination of the Isoterooidal Alkaloids in Bulbs of Fritillaria by High performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection[J]. J Chromatogr A, 2001, 909 :207.

The introduction of HPLC-ELSD and the application in alkaloids

Zhao Hui, Qi Hui, Zhu Yuanyuan*

(College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300000, China)

Abstract: This article describes the working principle, structure determination, and the advantages and disadvantages of HPLC-ELSD. HPLC-ELSD plays an important role in the analysis of alkaloids in traditional Chinese medicine and it is a very useful analytical method.

Keywords: HPLC-ELSD; analysis; alkaloids

离子液体在色谱领域的应用

张静¹, 寇登民²

(1. 天津北辰区产品质量技术监督检验所, 天津 300400 2; 2. 南开大学化学学院, 天津 300071)

1 引言

离子液体是指在室温及临近温度下完全由离子组成的有机液体物质, 是一类新型的软介质和功能材料^[1]。由于离子液体可以根据需要设计其阴阳离子的组成并改变其取代基, 进而改变其性能, 在一定程度上实现人为设计, 进而符合化学学科各个方向的研究需要, 在有机化学、催化化学、电化学、萃取分离等领域有了一定程度的应用^[2,3], 并且已经渗透到功能材料、能源环境和生命科学等学科。

离子液体一般是由特定的, 体积相对较大的有机阳离子和体积较小的无机阴离子构成, 大体可以分为 AlCl_3 型离子液体、非 AlCl_3 型离子液体和其它特殊类型的离子液体。最常见的阳离子有烷基铵盐、烷基磷酸盐、吡啶离子、咪唑离子等; 阴离子有卤素离子、含 F, P, S 的离子等。特殊功能化离子液体是针对某一性能或应用设计的具有特殊官能团或取代基的离子液体。离子液体的特点有: 蒸汽压低, 不易挥发; 液体状态温度范围广; 不可燃、稳定性好; 离子导电率高、电化学窗口宽; 对有机物、无机物都有良好的溶解性, 使许多化学反应得以在均相中完成, 且反应器体积大为减小; 密度大, 与许多溶剂不互溶。而且离子液体的可设计性使其成为特殊的“固体”液体。从理论上讲, 可以有超过万亿种高性能的离子液体, 这些特殊性质的存在使其在化学、材料学及生命科学中的应用成为可能。离子液体所具有的热稳定性、低挥发性等特点使其在分析化学中具有潜在的应用前景^[4,5]。

2 在色谱领域中的应用

离子液体是气相色谱的良好固定相, 是因为它具有高的粘度、高的热稳定性、几乎无蒸气压以及对色谱柱良好的润湿性。Armstrong 等^[6,7]最早将离子液体 1-丁基, 3-甲基咪唑氯化物 ($[\text{BMIM}]\text{Cl}$) 和 $[\text{BMIM}]\text{PF}_6$ 作为气相色谱固定相, 与角鲨烷等传统固定相进行了比较, 并测定了正烷烃、取代烷烃、芳香烃、醛、酮、酰胺、胺、酚、羧酸等物质的保留因子。结果表明, 离子液体作为固定相表现出双重性质。对于非极性物质如烃类, 保留因子小, 但选择性好, 离子液体的行为类似非极性固定相; 对于给出质子的物质如醇类, 保留时间长, 离子液体的行为类似极性固定相, 因此既可以分析正烷烃, 也可以分析醇类; 他们还以含有手性中心的离子液体作为固定相应用于亚砷、环氧化物等手性对映体的分离研究^[8]。但是离子液体阴离子部分的不同也会影响其作为固定相的选择性和增溶能力。

离子液体在液相色谱的应用中, 既可以作为流动相, 也可以作为流动相改性剂或者固定相。Zhang 等^[9]采用含离子液体 0.054%~0.869% (体积分数) 的水溶液作为流动相, 反相高效液相色谱法分离多巴胺、儿茶酚胺、肾上腺素、去甲基肾上腺素的混合物, 具有良好的对称峰形和线性范围。Kaliszan 等^[10]用二烷基咪唑型离^[11]将 1-烷基, 3-甲基咪唑基型离子液体用作流动相添加剂, 考察了具有不同烷基碳链的咪唑阳离子和不同种类阴离子的离子液体对核苷酸和生物碱分离的影响, 在不添加任何挥发性有机溶剂条件下, 仅用 mmol/L 级的离子液体水溶液即可对核苷酸、生物碱进行快速而高效的分离, 有效地改善了碱类化合物分离中常见的谱峰拖尾现象。

Berthod^[12]讨论了离子液体作为逆流色谱的固定相和流动相的应用前景, 将有机溶剂/离子液体/水的混合液体作为流动相可以有效降低流动相的粘度, 进而用于逆流色谱的检测。Qiu 等^[13]将 1,3-二烷基咪唑离子液体修饰硅胶作为固定相用于液体色谱柱, 对 I^- 、 Br^- 等无机阴离子和酸类有机阴离子、胺类、核苷酸类化合物可以进行有效的分离。Xiao 等^[14]将离子液体用作高效液相色谱流动相添加剂成功分离了联苯胺、苄胺、N-乙基苯胺等不同胺类物质, 并考察了离子液体的种类和性质对分离效果的影响。但是离子液体的黏度较大, 影响其作为流动相的效果, 离子液体对紫外光有一定的吸收, 进而限制了紫外光度检测器的使用。

3 在毛细管电泳中的应用

离子液体也可用于毛细管电泳(CE)。由于其导电率高,可作为流动相电解质添加剂用于无水溶液毛细管电泳的分离或毛细管电泳的背景电解质。Vaher等[15]将不同离子液体作为添加剂在非水毛细管电泳中分离路易氏酸和多酚类化合物,考察了离子液体的种类、浓度以及流动相甲醇和乙醇的不同比例对分离的影响,认为乙腈在离子液体阴离子与样品分子之间起到了复共轭作用而使样品得以分离。Qin等[16]将1,3-二烷基咪唑型离子液体涂覆在硅胶上做成毛细管电泳柱,在较宽的pH范围内考察了它对一系列阳离子如 K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ba^{2+} 的分离效果,并进一步应用于人尿样品中 NH_4^+ 和红酒中阳离子的检测,经离子液体涂覆的毛细管具有较好的稳定性,能连续使用80h以上。Yanes等[17]用CE考察了50~300 mmol/L咪唑类离子液体作为流动相,用于葡萄籽提取物中多酚类化合物的分离与检测。Jiang等[18]利用烷基咪唑型离子液体解决了蛋白质在毛细管壁的吸附,采用30~110 mmol/L [C2MIM]BF₄作为流动相,可以对多种碱性蛋白质的混合物进行分离与检测。Qin等[19]将离子液体修饰毛细管内壁用于DNA的分离,可以对分子量在72~1353 bp的11种DNA片段进行分离。Qi等[20]利用1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([BMIM]BF₄)与 β -环糊精的混合液作为毛细管电泳的流动相,用于中草药中蒽醌类物质的分离与分析。总之,将离子液体固定在毛细管表面可以有效地减少吸附量和电渗流,提高分离效率和重现性。

总之,离子液体在色谱领域中的应用,必将引起色谱领域的又一次新的飞跃。

参考文献

- [1] Li Ru Xiong(李汝雄). Green Solvent the Synthesis and Application of Ionic Liquid(绿色溶剂离子液体的合成与应用). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003: 20~21
- [2] Hiroyuki O. Electrochemical Aspects of Ionic Liquids, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2005
- [3] Wesserscheid P, Welton T. Ionic Liquids in Synthesis, Weinheim: Wiley VCH, 2002
- [4] Liu J F, Jonsson J A, Jiang G B. Trend Anal. Chem., 2005, 24(1): 20~27
- [5] Baker G A, Baker S N, Pandey S, Bright F V. Analyst, 2005, 130: 800~808
- [6] Armstrong D W, He L F, Liu Y S. Anal. Chem., 1999, 71: 3873~3876
- [7] Berthod A, He L F, Armstrong D W. Chromatographia, 2001, 53: 63~68
- [8] Ding J, Welton T, Armstrong D W. Anal. Chem., 2005, 77: 6453~6462
- [9] Zhang W Z, He L J, Liu X. Anal. Lett., 2003, 36: 827~838
- [10] Kalisz R, Marszall M P, Markuszewski M J, Baczek T, Pernak J. J. Chromatogr. A, 2004, 1030:263~271.
- [11] He L J, Zhang W Z, Zhao L, Liu X, Jiang S X. J. Chromatogr. A, 2003, 1007: 39~45
- [12] Berthod A, Carda Broch S. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2003, 26: 1493~1508
- [13] Qiu H D, Jiang S X, Liu X. J. Chromatogr. A, 2006, 1103: 267~270
- [14] Xiao X H, Zhao L, Liu X, Jiang S X. Anal. Chim. Acta, 2004, 519(2): 207~211
- [15] Vaher M, Koel M, Kaljurand M. Chromatographia, 2001, 53: 302~306
- [16] Qin W D, Wei H P, Li S F Y. J. Chromatogr. A, 2002, 979: 27~32
- [17] Yanes E G, Gratz S R, Baldwin M J, Robinson S E, Stalcup A M. Anal. Chem., 2001, 73: 3838~3844
- [18] Jiang T F, Gu Y L, Liang B, Li J B, Shi Y P, Ou Q Y. Anal. Chim. Acta, 2003, 479(2): 249~254
- [19] Qin W, Li S F Y. Analyst, 2003, 128: 37~41
- [20] Qi S D, Cui S Y, Chen X G, Hu Z D. J. Chromatogr. A, 2004, 1059: 191~198

色谱技术在阿莫西林中有关物质的

分析和鉴定中的应用

雷勇胜¹, 金松子¹, 姜喜成¹, 宋丽明¹, 王琳², 蒋庆峰¹

(1. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193; 2. 河南大学药学院, 开封 475001)

药物中杂质的分析非常重要,因其杂质会影响药物的质量,有时候甚至会引起副反应。特别是随着色谱技术的发展,使药物中杂质的分析更趋于完善。Nageswara Rao 等^[1]综述了近年来用 HPLC 法分析药物中杂质的研究进展。

阿莫西林 (Amoxicillin), 是一种最常用的青霉素类广谱 β -内酰胺类抗生素, 为一种白色粉末, 半衰期约为 61.3 分钟。在酸性条件下稳定, 胃肠道吸收率达 90%。阿莫西林杀菌作用强, 穿透细胞壁的能力也强, 是目前应用较为广泛的口服青霉素之一, 阿莫西林为青霉素类抗生素, 对肺炎链球菌、溶血性链球菌等链球菌属、不产青霉素酶葡萄球菌、粪肠球菌等需氧革兰阳性球菌、大肠埃希菌、奇异变形杆菌、沙门菌属、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌等需氧革兰阴性菌的不产 β -内酰胺酶菌株及幽门螺杆菌具有良好的抗菌活性。阿莫西林通过抑制细菌细胞壁合成而发挥杀菌作用, 可使细菌迅速成为球状体而溶解、破裂。其制剂有胶囊、片剂、颗粒剂、分散片等。

阿莫西林在高温、光照、酸、碱和氧化条件下, 降解情况如下: 在高温条件下, 随着时间增加, 样品外观逐渐变为淡黄色, 会发生明显的降解: 尤其因结晶水的失去, 阿莫西林分子之间因脱水而非常容易发生聚合; 在光照条件下, 随着时间的增加, 样品外观逐渐变为淡黄色, 杂质数量没有明显的增加; 在酸性条件下, 随着时间增加, 杂质数量有明显的增加, 一些杂质的含量也有明显的变化, 阿莫西林的含量从 98.6% 下降到 86.0%, 实验结果表明, 阿莫西林在酸性条件下不稳定, 会发生明显的降解: 主要降解杂质为 (5S,6R)、(5R,6R) 构型的青霉噻唑酸 (Penicilloic acids of amoxicillin)、脱羧青霉噻唑酸 (Penilloic acids of amoxicillin); 在碱性条件下, 随着时间增加, 杂质数量有明显的增加, 一些杂质的含量也有明显的变化, 碱性条件下也能促进阿莫西林的聚合。主要降解产物是: (5S,6R)、(5R,6R) 构型的青霉噻唑酸 (Penicilloic acids of amoxicillin), 阿莫西林的聚合物; 在氧化条件下, 也会发生明显的降解, 主要降解杂质是 (5R,6R) 构型的青霉噻唑酸 (图一为阿莫西林中的有关物质的化学结构), 临床上证实阿莫西林的聚合物会引起过敏反应。朱康琳等^[2]介绍了阿莫西林产品中的聚合物杂质: 阿莫西林的青霉噻唑酸、阿莫西林的脱羧青霉噻唑酸等及形成机理, 分析了影响阿莫西林聚合物形成的因素及主要致敏原, 为阿莫西林质量控制提供了依据。所以, 用色谱技术分析和鉴定阿莫西林中的相关物质是十分必要的。下面就简要介绍一下色谱技术在这方面的应用。

1 色谱技术在阿莫西林中相关物质的分析和鉴定中的应用

1.1 HPLC 法

李哲媛等^[3]采用 Ohpak SB-802.5HQ(聚合基柱)凝胶色谱柱, 以 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)为流动相, 外标法定量, 建立了在该系统下以分子量最大的杂质作为阿莫西林中的信号杂质进行质量控制; 李哲媛等^[4]还采用高效液相凝胶色谱系统对 21 批阿莫西林样品中高分子杂质进行测定; 晁阳等^[5]也采用凝胶色谱法测定阿莫西林中的高分子杂质(阿莫西林聚合物), 并对国内上市的两个厂家阿莫西林颗粒的高分子杂质进行了测定, 杂质含量均小

作者简介: 雷勇胜(1982-), 男, 山西人, 硕士, Tel: 022-23006881, E-mail: xiaolei_0520@126.com

于 0.1%。顾立素等^[6]采用反相色谱和 Superdex Petide 凝胶色谱分别测定阿莫西林颗粒和原料中的高分子杂质, 测定的 6 批阿莫西林颗粒中均无高聚物, 均为阿莫西林闭环二聚体和阿

莫西林噻唑酸。罗兴洪等^[7]采用高效液相色谱法测定了阿莫西林颗粒中的高分子杂质,色谱柱为 Sephadex G-10 凝胶柱;流动相 A 为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=7.0),流动相 B 为水;流速为 0.6~0.9 mL/min;检测波长为 254 nm。金少鸿等^[8,9]对阿莫西林聚合物进行了分离,并且用 HPLC 法测定了样品。Fong 等^[10]用 HPLC—三重梯度洗脱的方法研究了阿莫西林胶囊中的 amoxicilin penicilloic acids(PA)、*p*-hydroxyphenyl-glycine(*p*-HPG)、6-aminopenicillanic acid (6-APA)及未知结构的杂质。De Pourcq 等^[11]通过 HPLC 法定量研究阿莫西林及其分解产物,反相的 C₈ 可以分离 Amoxicillin、amoxicilloates、amoxicillin oligomers 和 amoxicillin piperazine-2,5-dione。实验结果表明,阿莫西林的三水合物中的主要杂质是 amoxicilloate,阿莫西林钠中的主要杂质是 piperazine-2,5-dione,二聚物、三聚物和四聚物比较少。Perez-Lozano 等^[12]按照《VICH 兽药靶动物安全性研究指导原则》用一种新的 HPLC-RP 的方法研究阿莫西林的降解产物及稳定性,证明该方法是可靠、快速的质量控制方法。

对于阿莫西林中高分子量杂质的分析和质量控制,一般采用 RPLC 和 HPLC—MS 的技术,但在没有对照品的情况下,这些方法使用起来并不方便。Cai 等^[13]用凝胶过滤层析色谱结合反相色谱分析了阿莫西林中高分子量的杂质。实验表明,相对于反相色谱法,凝胶过滤层析色谱是一种更加简单测定阿莫西林中聚合物的分析方法,在三种方法中,Superdex peptide 柱是一种不错的选择。此外,现在提倡低碳,凝胶是不使用任何有机溶剂的,有利于保护环境。有关阿莫西林分析中常用的 HPLC 系统见下表 1。

表 1 阿莫西林分析中常用的 HPLC 系统

方 法	色谱柱	检测波长 (nm)	柱温 (℃)	流速 (ml/min)	流动相
1	ODS	230	40	1.5	磷酸缓冲液(0.02mol/L, pH 为 5.0)-甲醇=93:7
2	ODS	230	室温	—	磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 为 4.5)-甲醇=95:5
3	C ₈	254	30	1.0	磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH 为 5.0)-甲醇=94:6
4	ODS	254	室温	1.5	1.25%醋酸液-甲醇=80:20
5*	ODS-PLRP-S	230	室温	1.5	磷酸缓冲液(0.05mol/L, pH 为 5.0)-乙腈=96:4

*注:方法 5 中的 PLRP-S 为聚苯乙烯-二乙烯苯柱

1.2 LC-MS 法

LC-MS 技术在快速结构鉴定方面有广泛的应用,该技术将液相色谱高效的在线分离能力与质谱高选择性、灵敏度的检测能力相结合,可以同时得到化合物的保留时间、在线紫外光谱、分子量及特征结构碎片等,该方法高效快速、灵敏度高,尤其适用于含量少、不易分离得到或在分离过程中容易丢失的组分。同样,在阿莫西林杂质的快速鉴定中也有很重要的作用。Valvo 等^[14]用 LC—UV 与 LC—MS 分析了阿莫西林中的杂质,通过质谱能够快速鉴定这些杂质的结构,表明这是快速鉴定杂质的方法,因为很难获得阿莫西林杂质的对照品,HPLC 的方法受到了限制。Valvo 等^[15]还用 LC-MS 鉴定了阿莫西林钠中的一个新的杂质,并推测了它的结构形成机理。牛长群等^[16]用 LC-MS 定性分析阿莫西林中的相关物质,通过解析相关物质的质谱,确定其结构,确定了 9 种阿莫西林的相关物质,并定量分析了实际样品中的相关物质。

1.3 其它色谱法

随着色谱技术的发展,其它色谱技术也应用于阿莫西林杂质的分析,这对 HPLC 法是一种有益的补充。胶束电动毛细管色谱法由将表面活性剂的胶束水溶液作为介质,用于毛细管电泳,这样的电泳分离技术称为 MEKC 或 MECC。由于引入了胶束相,它被视为“准固定相”(pseudo stationary phase)。这种技术以水作为流动相,分离机制中除电渗、电泳外还增加了胶束色谱分离机制,它即可以分离阴、阳离子,又可以进行中性分子的测定,并适于生物大分子的分析,大大拓宽了应用范围,增强了分离能力,缩短了分析时间,提高了重现性,

成为了高效毛细管电泳的一种。阳离子表面活性剂作为缓冲液添加剂，主要用于无机与有机阴离子的分离测定。非离子表面活性剂作为准固定相，可控制电渗流，手性表面活性剂的加入可用于对映异构体的分离。Li等^[17]用胶束电毛细管色谱法分析阿莫西林的杂质，通过对各种影响因素的研究，如 pH 值、缓冲液浓度、十二烷基硫酸钠和有机溶剂的浓度，这种方法可以完全分离阿莫西林及其杂质。

牛长群等^[18]用高效毛细管电泳分离阿莫西林聚合物，并测定了所收集的样品，试验表明：大部分样品以开环和闭环的二聚物为主，其它聚合物较少，本法与 HPLC 法相比，特点是：由于半峰宽与保留时间无关，采用相对含量的定量方法测定多个组分的含量，使结果更加准确，特别是含量较少，在 HPLC 中保留时间较长的组分，采用 HPCE 法有利于准确定量，更能真实反映产品质量。

Roets 等^[19]通过离子交换树脂 Amberlite XAD-2 分离阿莫西林的聚合物，通过氢谱和快原子轰击质谱确定其聚合物，分别是二聚物、三聚物、四聚物，此外，还有 piperazinedione。

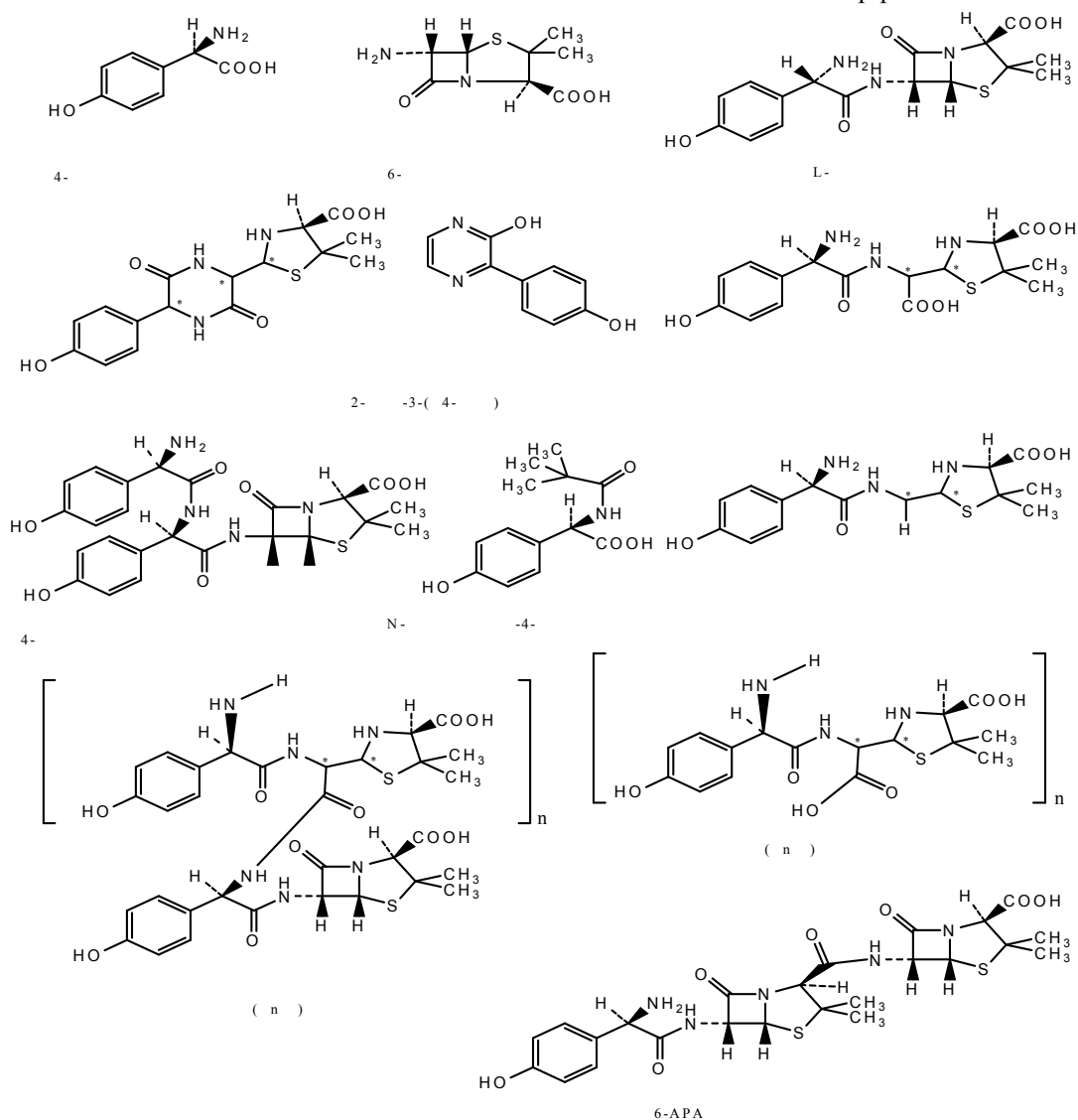


图1 阿莫西林中的化学结构

1.4 小结

近年来，色谱技术取得了较大进展，特别是一些联用技术的发展更是日新月异，极大地促进了药学的发展。随着色谱技术的发展，一定会有更丰富、更多样的色谱手段应用于这

方面,使药品阿莫西林的质量研究更加深入。

参考文献:

- [1] Nageswara Rao R, Nagaraju V. [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 33: 335-377
- [2] 朱康玲,康月菊,尹翠英,焦瑞恒. [J]. *石家庄职业技术学院学报*, 2006, 18(2): 9-10
- [3] 李哲媛,李玉凤,范兵,傅文,向金莲. [J]. *华西药学杂志*, 2005, 20(1): 52-54
- [4] 哲媛,李玉凤,范兵,向金莲. [J]. *中国现代应用药学*, 2006, 23(4): 326-327
- [5] 晁阳,余丽丽,章郑俊. [J]. *医药世界*, 2006, (11): 51-53
- [6] 顾立素,胡昌勤,周进东,罗兴洪,赵耀军. [J]. *药品评价*, 2005, 2(2): 119-121
- [7] 罗兴洪,周进东,赵耀军. [J]. *中国药业*, 2004, 13(5): 32-33
- [8] 金少鸿,经洁. [J]. *抗生素*, 1987, 12: 241-244
- [9] 金少鸿,经洁. [J]. *抗生素*, 1987, 12: 245-246
- [10] Fong Godwin W.K, Martin David T, Johnson Raymond N, Kho Boen T. [J]. *Journal of Chromatography A*, 1984, 298: 459-472
- [11] De Pourcq P, Hoebus J, Roets E, Hoogmartens J, Vanderhaeghe H. [J]. *Journal of Chromatography A*, 1985, 321: 441-449
- [12] Pérez-Lozano P, García-Montoya E, Orriols A, Miñarro M, Ticó J.R. [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 42: 192-199
- [13] Cai Shan-Ying, Hu Chang-Qin, Xu Ming-Zhe. [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 31: 589-596.
- [14] Valvo L, Ciranni E, Alimenti R, Alimonti S, Draisci R, Giannetti L, Lucentini L. [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 797: 311-316
- [15] Valvo L, Alimonti S, Alimenti R, De Sena C, Ciranni Signoretti, Draisci R, Giannetti L. [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 15: 487-493
- [16] 牛长群,祝仕清. [J]. *药学学报*, 1997, 32(3): 207-209
- [17] Li YM, Van Schepdael A, Zhu Y, Roets E, Hoogmartens J. [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 812: 227-236
- [18] 牛长群,祝仕清. [J]. *药学学报*, 2001, 36(10): 758-761
- [19] Roets E, De Pourcq P, Toppet S, Hoogmartens J, Vanderhaeghe H, Williams D.H. [J]. *Journal of Chromatography A*, 1984, 303: 117-129

Applications of chromatography technologies in analysis and identification to impurities of Amoxicillin

LEI Yong-sheng¹, JIN Song-zi¹, JIANG Xi-cheng¹, SONG Li-ming¹, WANG Lin², JIANG
Qing-feng¹

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Pharmacy school of Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: The applications of chromatography technologies in analysis and identification to impurities of Amoxicillin have been reviewed.

Keywords: Amoxicillin; impurities; chromatography; reviews

球型高分子共聚物 GDX 型气相色谱填料即 固定相的结构特征

张 策

（天津博瑞健合色谱技术有限公司，天津 300070）

使用填充柱作为气相色谱分离手段曾经开创了色谱分析的先例。经历了 50 余年的技术发展和进步，目前种类繁多的气相色谱填充柱及内装的色谱填料即固定相仍然在色谱分析领域发挥着巨大的作用。因其具有操作简便、快速、针对性强而又经济耐用等优点，尤其适合工矿企业中气体生产、气体监测过程的在线分析和科研、教学中非复杂组份的分离、分析。色谱仪的关键部位是色谱柱，而决定色谱柱性能的则是内装的色谱柱填料即色谱固定相。气相色谱固定相在种类、结构上的多样性，包括基质的不同，极性和所带功能基团的差别，孔径、比表面积等的差异等，决定了填充柱色谱分离范围的广泛性，如永久性气体的测定， $C_1 \sim C_5$ 脂肪烃及异构体、芳香烃、醇、醛、酮、酯等有机化合物的分析，这里暂不一一列举。气相色谱固定相在我国已有 40 年的生产历史，本文作者就几种典型的气相色谱固定相或称气相色谱柱填料的结构特征并结合生产过程中的要素工艺做下文简单的评述。

这里首先明确，GDX 型气相色谱固定相是由二乙烯基苯、苯乙烯通过三种聚合模式而组成的球型高分子共聚物，一些文献或信息中提出的“聚二乙烯苯”、“聚苯乙烯”等都是不全面的。GDX 型做为品种最多的有机基质固定相，可按其极性、比表面积的不同而选择使用，且不需任何前处理，直接装柱，耐酸碱。

1 非极性型的 GDX 固定相

这里指的 GDX-101、GDX-102、GDX-103、GDX-104、GDX-105、GDX-201、GDX-203 七个品种，其共同的特点是具有非极性表面，按孔径大小排列为 GDX-203 > GDX-103 > GDX-102 = GDX-201 > GDX-101 = GDX-104 > GDX-105。GDX-203 是所有 GDX 品种中孔径最大的，比表面达 $800\text{m}^2/\text{g}$ ，适合高沸点化合物如高碳烷烃等分析，虽然 GDX-104 与 GDX-101 具有相同的孔径和比表面积，但 GDX-104 的刚性要强于 GDX-101，这是由产品的合成工艺所决定的。前面提到的 GDX 型固定相是由三种模式聚合而成的共聚物，在 GDX-104 的聚合物中，聚苯乙烯占主要成份，而 GDX-101 则是聚二乙烯苯所占的比例要多，这一点在选择使用固定相时可作为参考。同样 GDX-102 与 GDX-201 也类似上述不同的聚合模式，GDX-201 的刚性要强一些，国外典型的非极性同类产品为 Porapak Q。

2 弱极性的 GDX-301 与 GDX-303 型气相色谱填料

GDX-301 的合成工艺中引入的极性基团为 $-Cl$ ，GDX-303 的极性基团为 $-COOH$ ，结构上的特点决定了它们都可用于极性化合物的分析，而 GDX-303 孔径较大，更适合含硫化物的分析。一般情况下，孔径越大，固定相小球的骨架越松弛，在装柱操作中应注意这一特点。

3 含有氮杂环的中等极性的 GDX-401、GDX-403 型气相色谱柱 填料

（下转第 309 页）

几类固相萃取柱使用的填料产品概述

张 策

（天津博瑞健合色谱技术有限公司，天津 300070）

作为样品前处理和条件实验等有效的实验器材，固相萃取柱（SPE 柱）已被广泛地使用。SPE 柱品牌纷杂，种类繁多，规格不一，尤其是一些无具体注释或描述不确定，甚至不确定标注的牌号，给众多使用者带来不便，甚至误导。规范的文字说明应包括：柱体的容积和填料的重量如 500mg / 6ml，填料的基质以及表面基团的种类如硅胶基质键合 C₁₈、聚苯乙烯基球表面磺酸基即表面磺化等，这样即使是不同的产品牌号，也可实现相互替代而方便使用者。固相萃取柱的柱体应高纯光洁，在使用有机溶剂时无溶出，筛片无杂质，筛孔孔径大小合适，孔分布均匀。本文重点讲述的是固相萃取柱使用的填料，通过描述一些填料的基质、结构、表面特征，使读者对不同牌号的 SPE 产品的性质、种类有一个初步的了解。

1 硅胶基质的 SPE 填料

所谓硅胶基质指的是具有一定孔径和比表面积硅胶颗粒，通过键合或其它化学或物理手段使硅胶表面改性，从而具有某种色谱性能。目前国内外使用最多的用来制造 SPE 填料的硅胶有 60 埃和 100 埃两种孔径规格，颗粒直径多为 40—60 μ，孔径为 60 埃的硅球是国外填料使用较多的基质，来源于大规模的工业生产线，生产的大量硅胶产品可用于日用化妆品工业，环境治理和家庭宠物饲养等多方面，因此货源充足，但键合改性后被键合在硅胶表面的基团数量（即键含量）相对较低，会影响填料的使用期，下面所述的硅胶基质 SPE 填料都以 100 埃孔径为例。

1.1 —C₁₈、—C₈、—C₄、—C₆H₅等非极性填料。

它们分别是在硅胶表面键合十八烷基、辛基、丁基、苯基的非极性 SPE 填料，残余的硅羟基可用小分子硅烷“封尾”处理，以称做“钝化”，即将硅胶表面的极性点降到最低，也有些此类填料不经封尾处理，目的是使填料略带一些极性，增加其亲水性，但使用寿命会降低。上述填料具有工艺成熟，质量稳定性高，应用范围广，经济耐用等优点，不足之处是耐碱性差，一般使用 PH 为 2~9。如无特殊说明，SPE 柱上的标识为—C₁₈、—C₈等，指的都是此类填料，包括国内品牌 YWG—C₁₈、YWG—C₈等，国外品牌 LRP—2、PrepODS 等。在此提示一点，“ODS”即十八烷基三氯硅烷的缩写字母，和“—C₁₈”有着相同的含意。填料产品的理化参数应包括颗粒度（粒径）、孔径、比表面积和键含量或键合率，键含量用碳含量表示，一般 C% = 18~20%，碳含量过高，会增加样品在固定相上的保留时间，过低会影响填料的分离效能或吸附性能。

1.2 —SiO₂、—NH₂、—CN、—(OH)₂等极性填料

—SiO₂即为硅胶表面只有硅羟基的极性填料(空白硅胶)，要求表面 Ca、Mg、Fe 等杂质尽可能小，因为硅胶表面的金属杂质会与某些微量样品产生螯合作用而形成不可逆的吸附。—NH₂为表面键合氨基，—CN 为表面键合氰基，而—(OH)₂为二醇基，也称为 Diol，其作用机理类似于空白硅胶填料，而极性吸附能力低于硅胶填料。硅胶基质的极性填料中，YWG—NH₂、YWG—SiO₂等均为国产填料，性能与国外的 PSA、PorasilA 等相当。用它们装填的 SPE 柱都应标出—NH₂、—CN 等极性基团的种类，同时标明或说明填料为硅胶基质。

2 硅胶基质的离子型填料

可分为强阳离子填料 SCX, 强阴离子填料 SAX, 弱阳离子填料—COOH, 弱阴离子填料—NH₂等。由于使用离子型 SPE 柱多在碱性条件下, 而硅胶的耐碱性能较差, 故离子型填料多由有机基质的基球合成而得。

3 有机基质的 SPE 填料

这里的“有机基质”指的是聚苯乙烯或聚二乙烯苯等有机聚合物微球, 耐酸碱是它的特点, 但很难达到硅胶那样的高纯度, 因为有机微球合成中的各种反应副产物及添加剂的除去是比较困难的工序, 在有机溶剂的存在下, 有机微球会有微量的杂质溶出, 影响实验的准确度。做为 SPE 填料, 按照引入官能团的工艺大体可分为三种。

1、无需引入官能团而直接使用的有机填料, 如大孔吸附树脂类, 只是微球的孔和非极性的表面在起作用, 此类填料牌号繁多, 使用者易被混淆, 无论是哪一国的产品都应标注非极性吸附树脂并注明孔径。2、有机基球合成中引入官能团的 SPE 填料, 如 HLB、国产的 GDX-403、GDX-502 等, 引入基团有氮杂球、氰基、羧基等。针对一些有复杂结构的较大分子样品, 此类样品效果独特。3、在有机基球上键合官能团的 SPE 填料, 如有机基质的强阳离子和强阴离子填料, 表面所键合的离子交换基团与前述硅胶基质的离子填料相同, 它们除具有离子交换性质外, 耐酸碱能力强。牌号为 PCX、MCX、PAX、MAX 等。

4 无机吸附剂型 SPE 填料

此类型包括氧化铝、硅胶、硅藻土、硅镁吸附剂（也称弗罗里硅土、Florasil）、活性炭、石墨化碳等, 填料要求纯度要高, 无水溶性或油溶性杂质。此类 SPE 柱填料组份简单, 无论是何种牌号都应简单明确标注。

结语: 固相萃取柱的应用基于液相色谱理论, SPE 填料也是液相色谱填料的一个使用范畴, 无论 SPE 柱的经营者还是使用者都应明确 SPE 柱属于液相色谱柱的一个分支, 所谓的“固相色谱”、“固相柱”的词语都是极其不专业的, 另外, 为加强自有产品的垄断性而有意忽略 SPE 柱的标识或不明确填料的结构, 这些做法也是不可取的。

（上接第 307 页）

合成工艺在主原料共聚过程中, 同时引入含有氮杂环的有机官能团, GDX-401 型官能团含量相对较少, 比表面积 280 m²/g, 而 GDX-403 型不但极性官能团聚合量多, 孔径也相对较大, 比表面积 370 m²/g, 这是两者的区别。这里想提一点, 在干态状态下, 它们极易产生静电团聚使装柱操作不便, 在抗静电剂如丙酮存在情况下, 可使团聚的填料分散开来。典型的分析实例可进行盐酸、有机胺等物质的分离测定。国外产品可与此对应的是 Porapak R、Porapak N、Chromosorb 102 等。

4 较强极性的 GDX-501、GDX-502 型气相色谱固定相

在生产合成中 GDX-501、GDX-502 都是引入了一CN 基团的较强极性的色谱填料, 且在 GDX 系列填料中使用广泛, 比较而言, GDX-501 的极性要强于 GDX-502, 较深的颜色和较强的静电作用也反映出它的强极性, 而 GDX-501 的孔径要小于 GDX-502。应用方面, 如 C₄ 烯烃异构体、CO、CO₂ 等分析测定, 国外同类型产品包括 Hayesep C、Chromosorb 104 等。

气相色谱固定相除 GDX 系列外, 还包括 TDX 系列即碳分子筛、多孔硅胶系列、活性炭、石墨化碳黑、5A 分子筛、13X 分子筛、白色担体、红色担体及其硅烷化产品等, 另文表述。

蜂胶活性成分及质量控制的研究

张明月

（天津市疾病预防控制中心，天津 300011）

蜂胶（propolis）是蜜蜂从植物芽孢或树干破皮伤处采集来的树脂（树胶），并混入蜜蜂上颚腺的分泌物，和蜂蜡、少量花粉等加工而成的一种具有芳香气味和黏性的胶状固体物质^[1]。主要活性成分有黄酮类化合物（槲皮素、芦丁、山奈黄素、白杨黄素、芹菜素、高良姜素、松属素等）、萜烯类、有机酸（阿魏酸、咖啡酸、苯甲酸等）、脂肪酸（10-羟基- α -癸烯酸等）、氨基酸、胰蛋白酶等活性酶类、维生素。蜂胶制品有两类，一类是以水为载体的，即所谓水溶性蜂胶；另一类是以酒精为载体的，即所谓醇溶或酒精溶的蜂胶。原胶（即从蜂箱中直接取出的蜂胶）中含有杂质而且重金属含量较高，不能直接食用，必须经过提纯、去杂、去除重金属如铅等之后才可用于加工生产各种蜂胶制品。蜂胶的活性成分因产地、气候、储存方式、提取工艺的不同而不同，从而使蜂胶质量和功效存在差异。蜂胶的质量控制贯穿于收购和加工的全过程，随着现代各种检测技术不断发展，特别是近年来色谱技术的日益发展、检测手段和能力的不断增强为蜂胶中有效成分的含量测定的研究提供良好的工作平台，采用先进的现代分析技术色谱、光谱、电泳技术以及联用技术，如气相色谱质谱联用、高效毛细管电泳质谱联用技术和高效液相色谱质谱联用技术，通过现代仪器分析方法，分析蜂胶中的有效成分和特有的芳香物质，科学建立起相应的质量技术评价平台和质量标准评价平台，最终推广行业应用，从而确保蜂胶质量稳定可控，使蜂胶这一宝贵的资源能更好造福于人类。对蜂胶活性成分及其质量控制的几个问题作以下综述：

1 蜂胶感官的判别

农业部颁发的标准《无公害食品-蜂胶》（NY5136-2002）^[1]中规定蜂胶为不透明团块或碎片，在35℃以上逐渐变软，有粘性和可塑性，有明显的芳香味，颜色由于树种或生产季节不同呈褐色、灰褐、暗绿、灰黑色等，有光泽，有明显的辛辣感。GB/T24283-2009《蜂胶》^[7]除了对蜂胶感官有上述描述外还对蜂胶的乙醇提取物的感官进行了规定。商业部颁发的《蜂胶 蜂蜡》（SB/T10096-92 SB/T10190-93）^[8]则根据感官性状对蜂胶进行了分级。

2 蜂胶黄酮类物质的含量

蜂胶产品中的蜂胶含量是有一定比例的，总黄酮含量是一个标志性成分指标，农业部颁发的标准《无公害食品-蜂胶》（NY5136-2002）规定总黄酮含量8%，GB/T24283-2009《蜂胶》中按照总黄酮含量和乙醇提取物含量的不同对蜂胶和蜂胶乙醇提取物分了二级。《无公害食品-蜂胶》（NY5136-2002）使用高效液相色谱法测定蜂胶中常见的高良姜素（galangin）、槲皮素（quercetin）、芦丁（rutin）、杨梅酮（myricetin）、茨菲醇（kaempferol）、芹菜素（apigenin）、松属素（pinocembrin）、柯因（chrysin）等8种黄酮含量，计算总和为总黄酮含量。该方法同国家质检总局国家蜂产品质量监督检验中心颁布的GB/T 19427-2003^[9]中的液相方法基本一致，GB/T19427-2003同时还制订了该8种黄酮的液相色谱-串联质谱检测法的测定方法。GB/T24283-2009《蜂胶》则以芦丁为对照，采用分光光度比色法测定总黄酮的含量，GB/T20574-2006^[10]亦是采用分光光度比色法测定蜂胶中总黄酮含量。

王小平等^[11]用高效液相色谱法建立蜂胶指纹图谱分析方法，用以鉴别蜂胶和树胶，采用蜂胶黄酮类物质中主要成分芦丁、槲皮素、白杨素、高良姜素作为观察指标，方法学考察中精密密度试验、重复性试验、稳定性试验色谱图的相似度均大于0.95，对蜂胶HPLC色谱图进行解析，确定有13个共有峰，构筑了蜂胶药材的HPLC色谱图的指纹特征，可作为蜂胶鉴别的

依据。朱恩圆等^[12]采用 RP-HPLC 梯度洗脱的方法对蜂胶总黄酮进行研究,对不同产地的蜂胶指纹图谱比较选出 10 个稳定的且具有代表的峰作为共有峰,建立了蜂胶的指纹图谱。沙娜等^[13]应用反相高效液相色谱法使蜂胶中各成分得到较好的分离,根据检测结果确定了 15 个共有指纹峰,并指认了其中的 14 个成分,建立蜂胶药材指纹图谱,对蜂胶进行质量控制。薛晓丽^[14]则通过使用高效液相色谱法和气-质联用分析仪将现代的超临界 CO₂ 流体提取工艺与传统的乙醇浸出提取工艺相比较,结果表明:两种方法都有利于蜂胶有效化学成分的提取,乙醇浸出提取工艺有利于提取蜂胶中黄酮类物质,超临界 CO₂ 流体提取工艺有利于蜂胶中化学成分的分析,应根据提取活性成分的主次及具体情况进行选择单体成分,进行指纹图谱研究,建立指纹图谱库。20 世纪 80 年代初发展的毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 依据样品中各组分之间的迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术,较 HPLC 测定,高效毛细管电泳法可以更好分离多种黄酮类化合物,并可以对糖类、有机酸进行同时测定^[15],与 HPLC 互补可以测定蜂胶中的芳香类化合物如酯类化合物、糖、糖醇类化合物、氨基酸、脂肪酸及黄酮类的含量。

3 蜂胶中的挥发性成分的研究

蜂胶中香气挥发性成分有萜烯类、醇、醛、酮、酯等类别,其挥发性成分是其一个重要的质量指标,具有指纹特征。传统的挥发性有机物富集方法为水蒸气蒸馏和同时蒸馏萃取,不能满足快速分析的要求。王小平等^[16]采用 GC-MS 法分别对不同产地蜂胶乙醚索氏提取法所得提取物的化学成分进行分析比较,发现蜂胶的产地、生态环境等条件与蜂胶挥发油种类及含量密切相关,可考虑通过选择蜂场附近的生态环境如主要树木种类等,改善蜂胶产品的质量。李雅萍等^[17]利用固相微萃取 (SPME) 对蜂胶挥发性成分进行提取,采用气相色谱-质谱联用技术对提取物进行定性定量研究,并与溶剂 (乙醇、乙酸乙酯) 提取法对蜂胶挥发性成分特别是萜烯类物质的提取效果进行了比较,建立了 SPME-GC/MS 联用技术分析蜂胶中香气挥发性成分方法,得到较理想的结果,利用 SPME-GC/MS 联用技术对不同产地采集期的蜂胶成分进行分析,提取有用的指纹信息,为进一步分析蜂胶某些成分的药用价值及蜂胶的开发利用及指纹图谱的建立提供依据。赵强等^[18]采用超临界 CO₂ 萃取和冷冻分离得到蜂胶挥发油,用化学发光法测定蜂胶挥发油对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除性能,并用质谱联用法分析其化学组成。实验结果表明,蜂胶挥发油能有效抑制羟自由基和超氧阴离子自由基诱导的化学发光,通过 GC-MS 分析,鉴定出 51 种化合物。

3.1 蜂胶中的蜂蜡

蜂蜡在蜂胶中占有约 30%-40%,农业部颁发的标准《无公害食品-蜂胶》(NY5136-2002) 中规定蜂蜡和 75%乙醇不溶物含量≤45%。该标准采用重量法测定 75%乙醇可溶物含量后采用减量法测定了蜂蜡和 75%乙醇不溶物含量。骆尚骅^[19]在《蜂胶质量控制的几个指标和检测办法》一文中采用索氏提取-重量法测定了蜡类含量。

3.2 蜂胶中酚酸类化合物的研究

有机酸成分也是蜂胶的活性成分,其含量的变化也会影响蜂胶质量,蜂胶中的有机酸,如苯甲酸、咖啡酸、阿魏酸、香草酸、肉桂酸、绿原酸等,具有强烈的抗病原微生物和保护动物肝脏的作用,与蜂胶中黄酮类物质起协同作用。索志荣^[20]采用高效液相色谱分析方法测定了蜂胶浸膏中咖啡酸、p-香豆酸、反式阿魏酸、肉桂酸、乔松素、白杨素和高良姜素 7 种多酚化合物的,并用该方法测定我国不同省份的 9 个蜂胶浸膏样品,为评价和控制蜂胶的质量提供科学依据。孟霞等^[21]建立了高效液相色谱同时测定蜂胶中的苯甲酸、咖啡酸、阿魏酸、香草酸、肉桂酸、绿原酸的方法,用于实际样品分析,结果满意,为测定蜂胶液中有机酸类物质提供了方法依据。国家质检总局颁布了《蜂胶中阿魏酸含量的测定方法 液相色谱-紫外检测法》GB/T 23196-2008^[22]。周立东等^[23]则采用采用弱碱溶解蜂胶再酸化萃取的方法纯化样

品,用返滴法测定,以水杨酸作为对照品检测样品中游离酸含量,结果测定了5个不同产地的蜂胶样品的游离酸含量,方法操作简单,有助于蜂胶质量的鉴别。李熠等^[24]采用超高效液相色谱法同时测定了蜂胶中方法,能够同时测定蜂胶中的阿魏酸、类黄酮、咖啡酸苯乙酯等12种活性成分,为建立蜂胶的指纹图谱和评价蜂胶质量提供了一种新的方法。贺嵘等^[25]则采用紫外分光光度仪、傅立叶变换红外光谱仪以及核磁共振谱仪等不同分析技术对贵州蜂胶中的有机酸成分进行了研究。HROBONOVA Katarina 等^[26]采用在线固相萃取-液相色谱法测定了蜂胶中芥草酸、奎尼酸、绿原酸、迷迭香酸、对羟基苯甲酸等有机酚酸类物质,只有对羟基苯甲酸没有检出。

4 氧化时间

国内外大量的科学研究证明,蜂胶对机体的诸多保健功效与其抗氧化活性有着密切的关系。因此,蜂胶的抗氧化活性特别受到研究者的关注和重视。农业部颁发的标准《无公害食品-蜂胶》(NY5136-2002)、商业部颁发的《蜂胶 蜂蜡》(SB/T10096-92 SB/T10190-93)以及国家质检总局颁布的《蜂胶》(GB/T24283-2009)均对氧化时间进行了规定,并提供了相应的检测方法。

5 其他方面

有资料表明还可以对蜂胶的灰分、酶活力、维生素、微量元素以及矿物质进行分析测定^[19,27-30],对于蜂胶浸提液,还应增加乙醇含量和比重^[31],从而对蜂胶质量的控制更加全面。在蜂胶质量评定中,不仅要对蜂胶的感官性状进行观察、对天然活性成分进行分析检测,还要把有毒物的残留如铅、砷、汞、镉等重金属污染和农药残留以及霉菌、致病菌等指标也应作为质量控制的重要指标。农业部颁发的标准《无公害食品-蜂胶》(NY5136-2002)对蜂胶中的微生物指标及检验方法、重金属指标及检验方法、农药残留指标及检验方法均进行了规范。国家质检总局颁发了GB/T23870-2009^[32],采用微波消解-石墨炉原子吸收分光光度法测定蜂胶中的铅。Fang Chen 等^[33]利用固相萃取法处理样品,电子捕获-气相色谱法测定了蜂胶中17种有机氯杀虫剂,定量限在2.6~38.1 μg/kg之间,平均回收率为62.6~109.6%,RSD%为0.8~9.4%,4,4'-DDE在很多种蜂胶中被检出。

6 结论

蜂胶作为一种独特而宝贵的纯天然保健食品资源和药源,成为近年来国内外蜂产品研究开发的一个热点。综合以上各项研究成果,利用先进的分析手段对蜂胶质量建立系统、全面、科学的质量评价,对规范蜂产品市场秩序,确保蜂胶质量稳定可控,使之更大程度的造福于人类。

参考文献:

- [1] NY5136-2002.《无公害食品-蜂胶》.中华人民共和国农业部.
- [2] 李彦杰,杨勇,阚健全.《蜂胶化学成分及其生物活性》.粮食与油脂.2003,12:43-45.
- [3] 徐响,张红城,董捷.《蜂胶功效成分研究进展》.食品工业科技.2008,9:286-288.
- [4] 何晓波,周俐斐,芦柏震.《蜂胶的药理活性》.中国药业.2006,15:27-28.
- [5] 宫继荣.《蜂胶在临床各科的应用》.中外健康文摘·医药学刊.2008,5:159.
- [6] 齐东梅.《蜂胶的药理作用和临床应用》.首都医药.2008,2:44-45.
- [7] GB/T24283-2009.《蜂胶》.中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.
- [8] SB/T10096-92 SB/T10190-93.《蜂胶 蜂蜡》.中华人民共和国国内贸易部.
- [9] GB/T19427-2003.《芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因、高良姜素含量的测定方

- 法 液相色谱-串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法》. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.
- [10] GB/T20574-2006.《蜂胶中总黄酮含量的测定方法 分光光度比色法》. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.
- [11] 王小平,林励,白吉庆.《HPLC 指纹图谱法鉴别蜂胶和树胶》.山西农业科学.2009,3:133-134,142.
- [12] 朱恩圆,窦玉玲,魏东芝等.《蜂胶 HPLC 指纹图谱及质量控制》.中国中药杂志.2005.30: 1423-1425.
- [13] 沙娜,黄慧莲,张金强等.《蜂胶的 HPLC 指纹图谱研究》.中国药科大学学报.2009, 40:144-146.
- [14] 薛晓丽.《蜂胶中天然有机化合物提取工艺比较及含量测定》.长春师范学院学报(自然科学版).2007, 26(6): 54-57.
- [15] 潘建国, 贺丽苹, 郑尧隆等.《蜂胶有效成分测定及质量控制的现代分析技术应用》.中国蜂业.2008, 59(3): 34-35.
- [16] 王小平,林励,潘建国等.《不同产地蜂胶挥发油成分的 GC-MS 比较分析》.药物分析杂志.2009.29(1): 86-90.
- [17] 李雅萍, 贺丽苹, 陈玉芬等.《SPME-GC/MS 联用技术分析蜂胶中挥发性成分的研究》.现代食品科技.2007, 97: 78-80.
- [18] 赵强,张彬,李岂凡等.《蜂胶挥发油抗氧化性能及其成分研究》.天然产物研究与开发. 2008, 20: 82-86.
- [19] 骆尚骅.《蜂胶质量控制的几个指标和检测方法》.中国养蜂.1999, 50: 35-36.
- [20] 索志荣, 曹炜, 秦海燕《蜂胶浸膏中 7 种多酚化合物的高效液相色谱法分析》.食品科学.2008, 29: 496-498.
- [21] 孟霞,彭敬东,刘绍璞.《高效液相色谱法测定蜂胶液中的 6 种有机酸》.西南大学学报(自然科学版). 2008, 3: 66-70.
- [22] GB/T 23196-2008.《蜂胶中阿魏酸含量的测定方法 液相色谱-紫外检测法》. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.
- [23] 周立东, 南焱, 孙兰等.《返滴定法测定蜂胶中游离酸含量》.中国养蜂.2005, 56(5): 10-11.
- [24] 李熠,赵静,薛晓锋等.《超高效液相色谱法同时测定蜂胶中的 12 种活性成分》.色谱.2007, 25(6): 857-860.
- [25] 贺峥嵘,潘卫东,卢玉振等.《贵州蜂胶中的有机酸成分研究》.中草药.2002, 33(5): 405-406.
- [26] HROBONOVA Katarina, LEHOTAY Jozef, CIZMARIK Jozef. Determination of Organic Acids in Propolis by HPLC Using Two Columns with an OnLine SPE System. Journal of liquid chromatography & related technologies.2009,32(14):125-135.
- [27] 章彬佳,胡福良,郑火青等.《蜂胶中酶活力的测定》.中国蜂业.2008, 59(6): 7-9.
- [28] 庞海岩, 刘晨, 朱茜等.《ICP-AES 测定蜂胶中 12 种元素》.广东微量元素科学.2002, 9(4): 44-46.
- [29] 张帆, 贺学锋, 汪学楷.《蜂胶中微量元素的测定——离子色谱法》.食品工业科技.2000, 21(3): 67-68.
- [30] Santana E.Q, Almeida A.A, Jabor A.P, et al. Determination of calcium and magnesium in hydroethanolic extracts of propolis by atomic absorption flame spectrophotometry. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences.2008,29(1):77-80.
- [31] 骆尚骅.《蜂胶质量控制的几个指标和检测方法(续)》.中国养蜂.1999, 50: 29-30.
- [32] GB/T23870-2009.《蜂胶中的铅的测定 微波消解-石墨炉原子吸收分光光度法》. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.
- [33] Fang Chen1, Lanzhen Chen1, Qiang Wang, et al. Determination of organochlorine pesticides in propolis by gas chromatography-electron capture detection using double column series solid-phase extraction. Analytical and Bioanalytical Chemistry.2009,393(3): 1073-1079.

植物激素茉莉酸的“短端进样”快速 CE 手性分离

韩晔华，白玉，刘虎威

（北京分子科学国家实验室，生物有机与分子工程教育部重点实验室，
北京大学化学与分子工程学院分析化学研究所，北京 100871）

植物激素是植物体内合成的一系列微量有机化合物，在极低的浓度下便可引发生理反应，从而调控植物从种子休眠、萌发、营养生长和分化到生殖、成熟和衰老的整个生命过程。茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 及其甲酯既是其中重要一类。茉莉酸是调节高等植物发育、应答外界刺激(尤其是创伤)、调节基因表达的一类内源信号分子。茉莉酸有两个手性中心，故有两对对映异构体。这些异构体在植物体内的分布和所起的生理活性各不相同，对其手性分离是进一步研究的必要前提。但目前尚未分离出四个手性异构体。因此本研究的目标是建立起简单快速的毛细管电泳分析方法以实现茉莉酸四个手性异构体的完全分离，为进一步揭示茉莉酸的生理调控作用和茉莉酸属植物间的比较性差异奠定基础。

毛细管电泳因其高效、快速及有多种手性添加剂可选择而在水性分离领域独具优势。我们从最常用的环糊精入手，根据空腔大小的匹配度和静电相互作用筛选出对茉莉酸有手性识别的添加剂。此外，我们对缓冲液种类、浓度、pH值，作为手性选择试剂的环糊精的种类、浓度，电泳分析电压、温度的都做了系统优化，最终实现了茉莉酸四个异构体的同时基线分离。

为了进一步发掘电泳方法快速高效的优点，我们在已有基础之上开发了毛细管短端进样的分析方法。即将样品从毛细管出口端用负压力引入，然后施加与常规电泳相反的电势，使得茉莉酸样品区带由出口端向检测窗口端迁移，这样，有效分离长度就由常规电泳的 40-50 cm 缩短至 8.5 cm，使分析时间大大缩短。经系统优化，茉莉酸的四个异构体在 2.8 min 内实现了基线分离，充分展现了该方法快速分析的优点。此外，该方法与部分填充技术相似，都是利用部分长度的分离区带对目标物进行分离，故为我们下一步利用部分填充技术将毛细管电泳与质谱联用实现高灵敏度检测奠定了基础。

参考文献（略）

免疫亲和色谱 LC-QTOF MS 联用分离分析 植物多肽系统素的研究

杜甫佑, 白玉, 刘虎威*

(北京分子科学国家实验室, 生物有机与分子工程教育部重点实验室,
北京大学化学与分子工程学院分析化学研究所, 北京, 100871)

植物多肽激素是一类非常重要的植物激素, 它在植物的生长发育、环境适应等方面具有重要的作用, 是一类防御信号分子。建立准确、快速分离分析植物体中痕量多肽激素的方法, 是研究植物激素分子作用机理的关键问题之一。

本文采用免疫亲和柱-LC-QTOF MS 联用分离分析植物体中的系统素多肽激素。首先采用免疫方法获得特异性的系统素多克隆抗体, 将该抗体与 CNBr-Sepharose 4B 凝胶耦合, 制备凝胶免疫亲和柱。研究了该免疫柱的洗脱条件、上样条件及柱容量。结果表明, 该免疫亲和柱在优化的条件下, 对番茄系统素的柱容量可达 1096 ng/mL, 可富集纯化番茄系统素、土豆系统素 I 和土豆系统素 II, 这三种系统素在该免疫柱上的回收率分别为 92.9%、56.7% 和 34.8%。另一方面, 对 LC-QTOF MS 的色谱和质谱条件进行了优化, 建立了系统素标准分析方法, 其线性范围为 5-200 ng/mL, 检出限低于 0.4 ng/mL。采用所建立的免疫亲和柱-LC-QTOF MS 联用对番茄叶和土豆叶进行了分析, 结果表明, 本研究所采用的番茄叶和土豆叶样品中的番茄系统素、土豆系统素 I 和土豆系统素 II 的含量分别约为 1.23、0.83 和 0.44 ng/mL。

参考文献 (略)

动物信息素的分离检测方法研究进展

翁瑞^{1, 2}, 张晓丽¹, 刘虎威²

(1. 山东大学化学与化工学院, 山东济南 250100; 2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

信息素是由生物的分泌腺分泌, 并排出到外环境中的化学物质, 这些化学物质会对其他生物(多为同种生物)的行为、生理活动等产生一定的影响。根据产生影响的不同, 信息素可以分为性信息素、聚集信息素等。根据化学结构中官能团的不同, 信息素可以分为羧酸、醇、酯、醛、酮、胺、杂环化合物等。

信息素广泛存在于动物的汗液、尿液和唾液中, 多为易挥发的有机化合物(VOCs)。这些易挥发的有机化合物则构成了动物的气味。信息素的分泌由动物的新陈代谢状态调节, 由于每个个体都处于不同的新陈代谢状态, 所以每个个体都有其独特的气味, 就像人的指纹。这些“指纹特征”反映了生物个体的非常重要的生物信息, 可广泛应用于害虫防治和疾病诊断等。

德国小蠊作为病原体的带菌者, 极易引起过敏性疾病。Nojima 将气相色谱(GC)与触角电位检测(EAD)联用, 检测其性信息素, 并化学合成了这一化合物。从行为测试和现场捕获实验的结果来看, 此合成的化合物具有非常好的活性。这提示我们可以将次人工合成的德国小蠊的性信息素应用于此害虫的监测和控制, 从而提供了一种非常好的防治德国小蠊的方法。疾病诊断方面, Berkel 等通过对人呼出气体中的 VOCs 的分析, 发现吸烟者和非吸烟者呼出的气体中, 2,5-二甲基己烷、十二烷、2,5-二甲基呋喃和 2-甲基呋喃四种化合物的含量有很大差异, 这可以作为区分吸烟者和非吸烟者的重要的生物信息。Buszewski 等对 20 名非吸烟者、4 名被动吸烟者和 14 名吸烟者呼出的气体进行气相色谱-质谱(GC-MS)分析, 发现吸烟者和被动吸烟者呼出的气体中含有较多的乙腈、呋喃、3-甲基呋喃、2,5-二甲基呋喃、2-丁酮、辛烷和癸烷等, 而非吸烟者呼出的气体中含有更多的饱和烃。Belda-Iniestaa 等和 Song 等对肺癌患者呼出气体中的 VOCs 进行了分析, 据此可对肺癌进行初步的预测。

为了对信息素的各个成分进行鉴定, 并进一步挖掘其“指纹特征”中蕴含的生物信息, 开发有效的分离检测方法是非常必要的。Zhang 综述了信息素的样本预处理方法、信息素成分的检测方法, 以及信息素中蕴含的生物信息的提炼方法, 并讨论了提炼生物信息的重要性及前景。本文综述了动物信息素的样本预处理方法和分离检测方法的研究进展, 并对这一方向未来的发展趋势进行了展望。

* 通讯联系人: Email: hwliu@pku.edu.cn

磁性分离在植物类转基因食品检测中的应用

王爱迪¹, 冉晓华¹, 万谦宏¹, 赵卫东², 陈磊¹

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072;

2. 天津出入境检验检疫局动植物和食品检测中心, 天津 300461)

自20世纪80年代迅速崛起的植物基因工程技术为抗虫害, 抗除草剂等育种技术开辟了新的途径, 同时转基因作物被大面积种植, 由其加工而成的转基因食品在世界范围内引起了人们的广泛关注。转基因食品对于人体和环境的安全性仍是公众争议的焦点, 各国都要求对转基因食品进行定性和定量的检测。基于基因组核酸模板的PCR检测, 是目前最常用的转基因食品检测方法。传统的核酸纯化方法以有机溶剂作为蛋白变性剂, 操作繁琐, 耗时耗力。生物磁分离技术由于具有快速、简便、绿色环保、对生物样品影响小、易于实现自动化等优点, 在核酸分离纯化等生物学领域日益体现出了重要的作用^[1-3]。

由于食品的成分复杂而粘稠, 从中提取基因组DNA所用的磁性微球需要具有更高的饱和磁化强度, 更好的单分散性和更低的剩磁。本研究报道了利用溶剂热法制备单分散性好, 磁响应性高的磁性微球, 通过表面修饰, 获得四氧化三铁/二氧化硅复合微球, 并将其作为吸附剂, 用于食品中基因组DNA的提取。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

JEOL透射电子显微镜, TDL-40B型低速台式大容量离心机, VS-15小型离心机, UV2450紫外分光光度计, DYCP-31C水平电泳槽, BioDoc-IT凝胶成像系统, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (天津市双船化学试剂厂), 乙二醇、三乙二醇、醋酸钠 (天津科威化学试剂公司), 十二烷基硫酸钠、聚乙二醇8000 (北京鼎国生物技术有限公司)、四乙氧基硅烷 (TEOS, 武大有机硅新材料有限公司), 蛋白酶K (德国merck公司), 盐酸胍 (天津市光复精细化工研究所)

1.2 磁性微球的制备及修饰

按照文献^[4]的溶剂热还原方法, 制备 Fe_3O_4 磁性微球, 饱和磁化强度(Ms)达到77.83 emu/g。按照Sol-gel方法, 在磁珠表面进行TEOS修饰, 得到以 Fe_3O_4 为核, 以 SiO_2 为壳的复合磁性微球。

1.3 DNA提取及检测

称取大豆粉, 豆奶粉, 豆腐, 土豆, 薯条各0.5g于离心管中, 加入预热的细胞裂解液5 mL (0.01mol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, 0.002mol/L 乙二胺四乙酸二钠, 2%十二烷基磺酸钠 (SDS), pH 8.0), 5 mol/L的盐酸胍溶液0.5mL, 10mg/mL的蛋白酶K溶液50 μL 。55 $^\circ\text{C}$ 温育30 min, 加入10 μL 13mg/mL的RNase, 反应5 min, 放入4 $^\circ\text{C}$ 冰箱30 min, 然后于4000 rpm离心10 min, 取上清于1.5mL离心管中, 12000rpm离心5 min得到样品液。取0.5 mL 10mg/mL的磁性微球悬液放于1.5mL的离心管中, 磁分离弃去清液, 加入吸附液 (PEG8000 20%, 2 mol/L NaCl) 1.0mL, 振荡混匀, 加入样品液0.5mL, 室温充分混匀10 min。磁场分离, 弃去清液。再加入吸附液1.0 mL, 同法处理一遍。70%乙醇洗涤磁珠两遍, 弃去洗涤液。室温下风干。加入TE (0.01 mol/L EDTA, 0.025mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 缓冲液0.5mL, 轻轻颠倒10min, 使磁珠充分分散均匀。磁分离, 清液即为DNA提取液, 备用。空白组操作时不加样品液, 其余操作均相同。

以空白组为对照, 用紫外分光光度计上测定在260 nm和280 nm的吸收值 A_{260} 和 A_{280} , 以

A_{260}/A_{280} 的值鉴定DNA的纯度。取10 μ LDNA提取液在1%琼脂糖凝胶上电泳检测，TAE为缓冲溶液，溴化乙锭染色，在凝胶成像仪上观察并拍照。

2 结果

2.1 磁性微球的表征

用JEOL透射电子显微镜对磁性 Fe_3O_4 颗粒的粒径和形貌进行分析，见图1。可以看出所制备的磁性微球单分散性良好，球形规整。

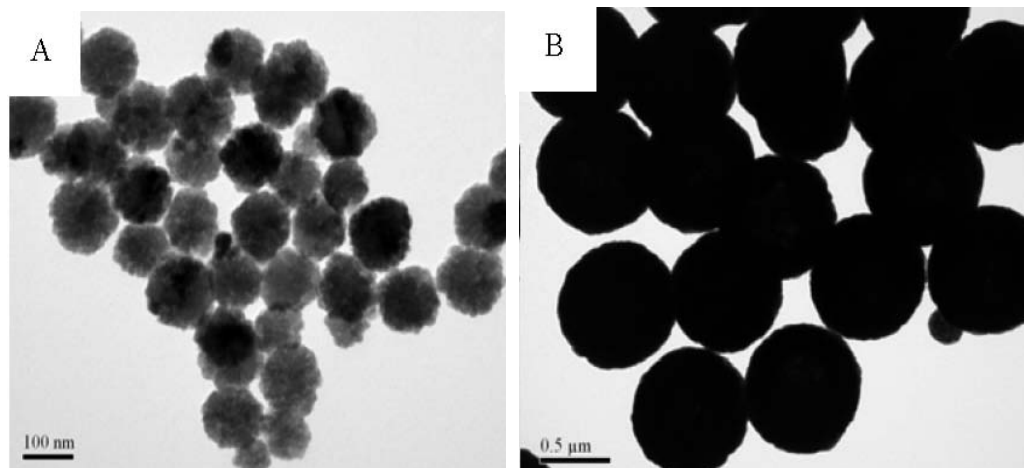


图 1 Fe_3O_4/SiO_2 磁性微球的透射电镜照片100 nm (A) 和 800 nm (B)

2.2 转基因作物及其制品DNA提取及其检测

由表 1 所示，提取的食品 DNA 的 A_{260}/A_{280} 均介于 1.6-1.9 之间，表明其纯度较高，其质量满足后续 PCR 的检测要求。同时由图 2 的电泳检测结果可知，食品的加工过程对其 DNA 片段的影响较大，从马铃薯鲜品以及豆粉中可以提取到基因组 DNA，其分子量大于 10kb，但薯片以及豆腐、豆奶粉等食材由于在加工过程中受到 pH、温度影响较大，只能提取到小片段 DNA。

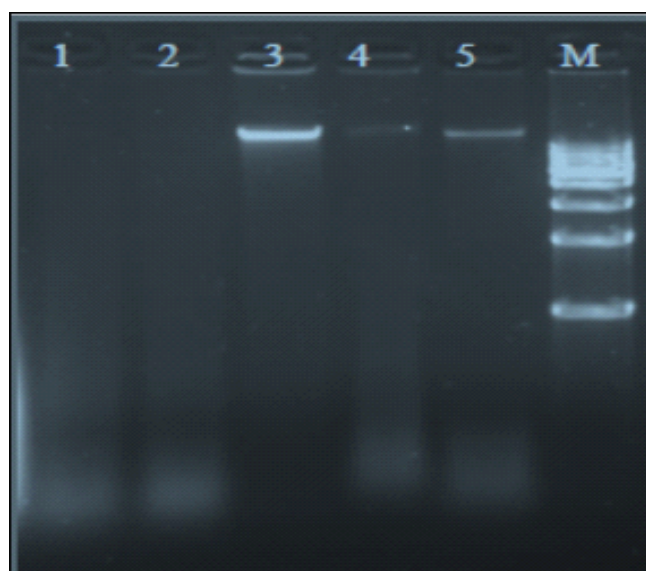


图2 DNA的1%琼脂糖凝胶电泳图 1. 豆腐；2. 豆奶粉；3. 大豆粉；4. 薯条；5. 马铃薯-M.1 kb DNA ladder

表1 DNA紫外检测结果

样品	豆腐	豆奶粉	大豆粉	薯条	土豆
A260	0.682	0.974	0.843	1.01	1.09
A280	0.365	0.592	0.472	0.586	0.642
A260/A280	1.87	1.64	1.85	1.72	1.70

3 讨论

综上所述，热溶剂还原法制备得到的磁性微球具有磁响应性高和粒径分布均一的特点，可以作为DNA的固相萃取剂。以磁性微球为吸附剂的生物磁分离技术方法简便，快速，适用于转基因作物以及深加工食品的核酸纯化以及后续生物鉴定，在转基因食品进出口检验和规范食品市场方面具有广阔的应用前景。

参考文献：

- [1] ZC Zhang, C Yuan, QH Wan. [J]. Analytical Chem, 2007, 35:31-36
- [2] Saiyed ZM, Ramchand CN, Telang SD. [J]. Phys: Condens Matter, 2008, 20:204153-204158
- [3] RB Shi, YC Wang, YL Hu, et al. [J]. J Chromatogr B, 2009, 1216: 6382-6386
- [4] SH Xuan, YJ Wang, JC Yu, et al. [J]. Chem Mater, 2009, 21:5079-5087

Detection of Genetically Modified Food Based on Magnetic Microspheres

WANG Ai-di¹, RAN Xiao-hua¹, WAN Qian-hong¹, ZHAO Wei-dong², CHEN Lei¹,

(1.College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072;

2. Animal & Plant & Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461)

Abstract: The genetically modified food (GMF) captivated widespread attention since 1980s. Since the safety of GMF remains the focus of public controversy, it is necessary to make the qualitative and quantitative detection. The most accepted analytical methods for GMF detection is based on DNA techniques, that is polymerase chain reaction (PCR). In comparison with traditional methods using liquid-liquid extraction, the solid-phase process developed in this work is characterized by simplify, expedite, and amenable to automation. Magnetite microspheres were synthesized using a hydrothermal method and follow up by a sol-gel process. The multiple beads were comprised of a magnetite core and silica shell with the saturation magnetization values up to 77.83 emu/g. They were used as solid-phase adsorbent for rapid extraction of genomic DNA from plant source food.

Keywords: Magnetic Microspheres; Hydrothermal Method; Genetically Modified Food; DNA Extraction

原子层沉积法制备键合相硅胶

肖得力, 万谦宏, 陈磊

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

硅胶基质分离载体具有机械强度高, 孔结构和表面积易于控制, 化学和热稳定, 表面具有足够的可反应硅羟基等优点, 成为各种分离载体的理想基质材料。硅胶表面修饰的方法主要有液相反应法、自组装法、超临界流体反应法和原子层沉积法。与其他方法相比, 原子层沉积法避免了价格昂贵且污染环境的有机溶剂或超临界流体等反应介质的使用, 同时具有反应耗时短, 易于扩大生产及有机功能基团键合量高等优势。为硅胶基质分离载体的生产开辟了一条节能降耗, 环境友好的绿色途径^[1-5]。

我们利用原子层沉积法制备了苯基键合硅胶和环氧丙基键合硅胶, 可以获得比传统液相法更高的键合量。在此基础上制备了表面为二醇基, 孔内为间氨基苯硼酸的新型限进介质固相萃取剂, 以儿茶酚胺类药物作为顺式二羟基化合物模型, 其在制备的新型限进性固相萃取剂上具有较高的回收率。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GSHA-1型高压反应釜(威海鑫泰化工设备厂), 5 μm球形硅胶(天津市倍思乐色谱技术开发中心), 苯基三甲氧基硅烷及γ-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷(武大有机硅新材料股份有限公司), Fe₃O₄-SiO₂复合磁性微球(天津市倍思乐色谱技术开发中心), 磺酸化聚合物微球(50 μm, 天津市倍思乐色谱技术开发中心)。

1.2 原子层沉积法制备键合硅胶

称取5.0 g经过酸化干燥处理过的球形硅胶放入坩埚中, 将其置于高压釜内, 加入3.0 mL γ-缩水甘油醚氧基丙基三甲氧基硅烷和1.0 mL三乙胺, 密封高压釜, 抽气至真空, 加热至120 °C反应4 h。待反应釜冷却至室温, 取出反应产物, 依次用甲苯, 甲醇, 甲醇-水(1:1, V/V)、甲醇和丙酮洗涤。60 °C真空干燥12 h, 即得环氧基键合硅胶。将硅烷试剂换成苯基三甲氧基硅烷即可得到苯基键合硅胶。

作为对照, 采用传统液相法制备键合相硅胶。

1.3 限进性硅胶材料的制备

称取1.0 g环氧丙基键合硅胶和1.0 g磺酸化聚合物球, 置于100 mL离心管中, 加入50 mL去离子水, 65 °C摇床反应48 h。反应结束后, 依次用水和甲醇洗涤, 挥干, 加入50 mL氯仿, 3500 rpm离心10 min, 倾去浮于氯仿上层的磺酸化聚合物微球。将下层环氧丙基键合硅胶置于三口瓶中, 加入pH 3.0的盐酸溶液50 mL, 90 °C反应2 h。反应结束后, 依次用水和甲醇洗涤。60 °C真空干燥12 h。得到孔内为环氧丙基, 孔外为二醇基的键合硅胶。加入0.4 g间氨基苯硼酸, 加去离子水约50 mL, 均匀分散, 用3 M NaOH溶液调pH到8.5, 超声溶解10 min后, 再用3 M NaOH溶液调pH到8.5。室温下轻柔摇晃24 h, 反应结束后依次用0.5 M NaCl溶液, 0.1 M NaHCO₃溶液, 0.1 mM HCl溶液及去离子水洗涤填料至中性, 抽滤, 60 °C真空干燥12 h, 得到孔内为间氨基苯硼酸, 孔外为二醇基的限进性键合硅胶。

作为对照, 制备孔内外均键合二醇基的硅胶和孔内外均键合间氨基苯硼酸的硅胶。

2 结果与讨论

2.1 苯基键合硅胶的性能表征

通过扫描电镜照片, 考察苯基键合硅胶微球的形貌和粒径分布。如图1所示, 填料粒径

在5 μm 左右，单分散性良好。

2.2 苯基键合硅胶填料色谱性能的比较

为了评价两种不同方法制备的苯基键合硅胶填料分离结构相似的芳香化合物的色谱性能，我们选取苯酚/对氯硝基苯/萘作为分子探针，在甲醇-水流动相条件下，比较三种物质的分离情况，对氯硝基苯和萘在液相法制备的苯基硅胶填料上两峰重叠，而在原子层沉积法制备的硅胶填料上分离度达到0.838。这是由于原子层沉积法制备的苯基键合硅胶的键合量更高，可达到 3.6 mmol/m^2 ，对模型化合物的保留能力更强。

2.3 儿茶酚胺类药物回收率的测定

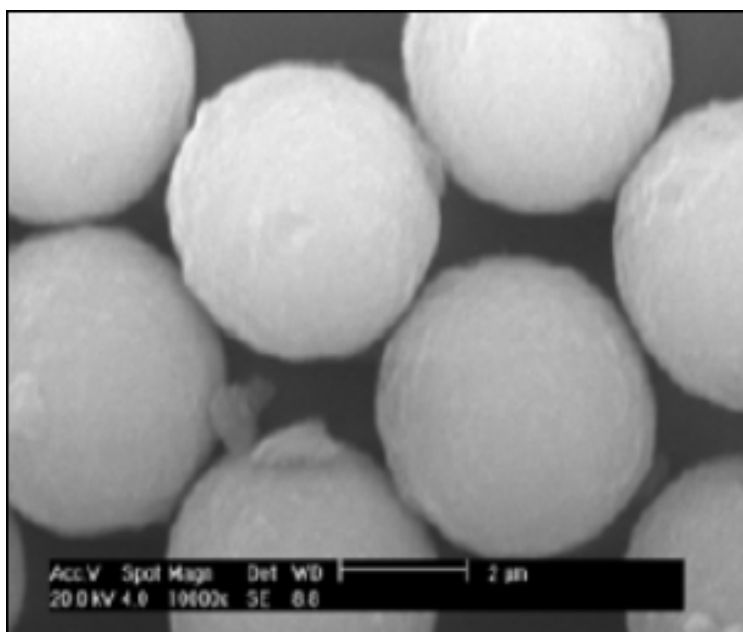


图1 苯基键合硅胶的扫描电镜图

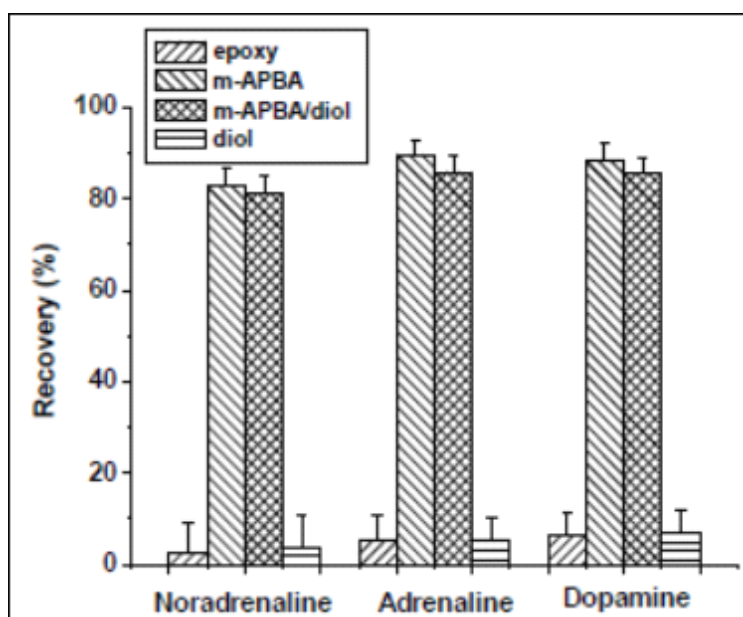


图2 去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺的回收率

选用去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺等三种儿茶酚胺类药物评价环氧基键合硅胶(A),

间氨基苯硼酸键合硅胶（B），间氨基苯硼酸/二醇基键合硅胶（C）和二醇基键合硅胶（D），结果如图2所示。四种填料对于三种儿茶酚胺类药物的回收率存在明显差异，B和C对三种儿茶酚胺类药物的回收率明显高于A和D。作为限进性材料C的吸附和回收性能比B稍差，这是因为限进介质固相萃取剂为了追求其限进性能，在孔外键合了二醇基，从而导致间氨基苯硼酸的键合量稍低。

3 结论

将原子层沉积法应用于键合相硅胶的制备可以获得比液相方法更高的键合量，并且在制备过程中避免了有机溶剂的使用，是一条节能降耗，环境友好的新型硅胶键合相制备的途径。利用原子层沉积法，制备了一种孔内键合间氨基苯硼酸，孔外键合二醇基的新型限进介质固相萃取剂，同时控制硅胶材料合适的孔径，使得蛋白质等生物大分子不能进入孔内，且由于材料表面亲水性的二醇基的存在，避免了生物大分子在其外表面不会发生不可逆的变性和吸附。可直接应用于从血清等体液中萃取和检测小分子化合物。

参考文献：

- [1] White LD, Tripp CP. [J]. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2000, 232(2): 400-407
- [2] Ek S, Iiskola EI, Niinistö L. [J]. *Langmuir*, 2003, 19(8): 3461-3471
- [3] Wikström, P, Mandenius, CF, Larsson, PO. [J]. *J. Chromatogr.*, 1988, 455: 105-117
- [4] Doppelt P, Stelzle M. [J]. *Microelectron. Eng.*, 1997, 33(1-4): 15-23
- [5] 郭志强, 陈磊, 万谦宏. [J]. *分析化学*, 2009, 37: 1572-1576

Atomic Layer Deposition for Preparation of Silica Bonded Phase

XIAO De-li, WAN Qian-hong, CHEN Lei*

(College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Silica-based separation carriers, with the advantages of high mechanical strength, controllable pore morphology and surface area, good chemical and thermal stability and abundant surface reactive groups, became ideal matrix of separation carriers. There are liquid phase reaction, self assembly, supercritical fluids and atomic layer deposition methods to produce bonding silica phase. Compared with other methods, atomic layer deposition is more predominant because of it avoiding the organic solvents and easy to carry out. Moreover, it is more convenient to get the production in short time with higher surface coverage of organic functional groups. Therefore, this method described here offers an economic and environmental benign approach for mass production of silica-based separation carriers. In this work, we first prepared phenyl and epoxy propyl bonded silica with atomic layer deposition method which obtained higher bonding amount than traditional liquid methods. On the basis of that we further prepared restricted access matrix sorbents with diol groups on the external surface and 3-aminophenylboronic acid group on the internal surface. The detection date indicated that the cis-dihydroxy compounds had high recovery on the novel restricted access matrix sorbents.

Key words: Atomic layer deposition; Silica bonded phase; Restricted access matrix sorbents

谈谈同一物质色谱分析方法的多样性

张令甲¹，朱瑞林¹，吕宪禹²

(1. 山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司，山东 277500； 2. 南开大学 生命科学学院，天津 300071)

1 前言

同一物质，所处介质不同、分析目的不同，所用色谱分析方法就大相径庭，难易程度也相差很大。这就是同一物质色谱分析方法的多样性。下面以酒精分析为例，说明一下。

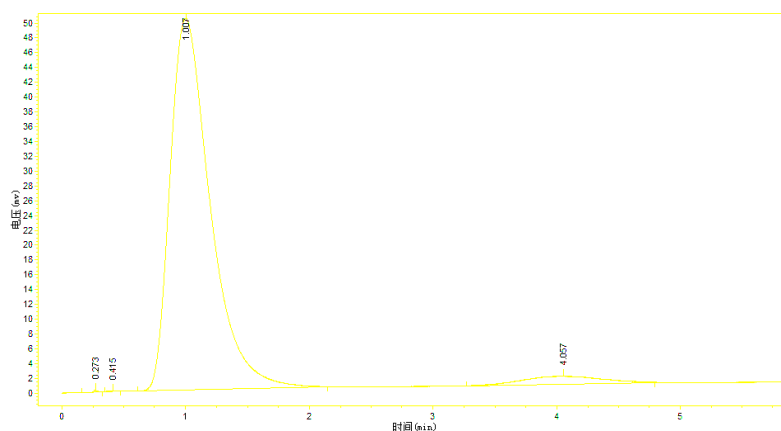
2 实验部分

2.1 食品级酒精的色谱分析

目的①：食品级

酒精的含量：用填充柱 TCD 面积归一法即可，比较简单，见色谱图(-)。目的

②：食品级酒精中的杂醇油分析：用 FID 毛细管程升面积外标法，要分析到 5PPm，有一定难度，见色谱图(-)。



色谱图(-)食品级

2.2 白酒的色谱分析：

目的①：常规分析：用填充柱 FID 面积内标法即可，比较简单，见色谱图(=)。目的②：白酒中醇酯、高级醇、酸的分析：用 60 米毛细管柱 FID 程升面积内标法分析，比较复杂，见色谱图(=)。

2.3 甲醇中的酒精含量分析：

目的①：甲醇中的酒精及水含量分析：填充柱 TCD 面积外标法，比较简单，见色谱图(=)。目的②：甲醇中的微量酒精分析：用 FID 毛细管校正面积归一法，要分析到 1PPm，有一定难度，见色谱图(=)。

2.4 血液中的酒精含量分析：

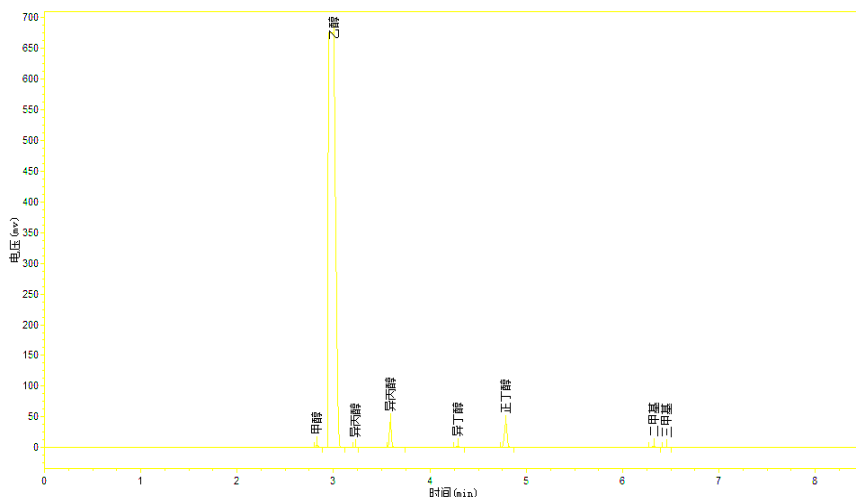
方法①：可用顶空填充柱 FID 面积外标法，见色谱图(=)。方法②：可用水溶高速离心填充柱 FID 面积内标法，见色谱图(=)。

2.5 药品中的酒精含量分析：

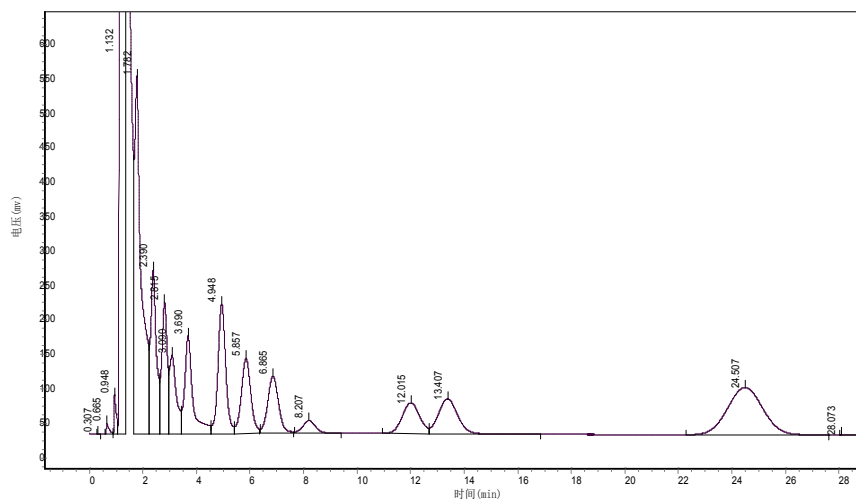
方法①：可用顶空填充柱 FID 面积外标法，见色谱图(=)。方法②：可用 FID 毛细管外标法，要分析到 10PPm，见色谱图(=)。

3 讨论

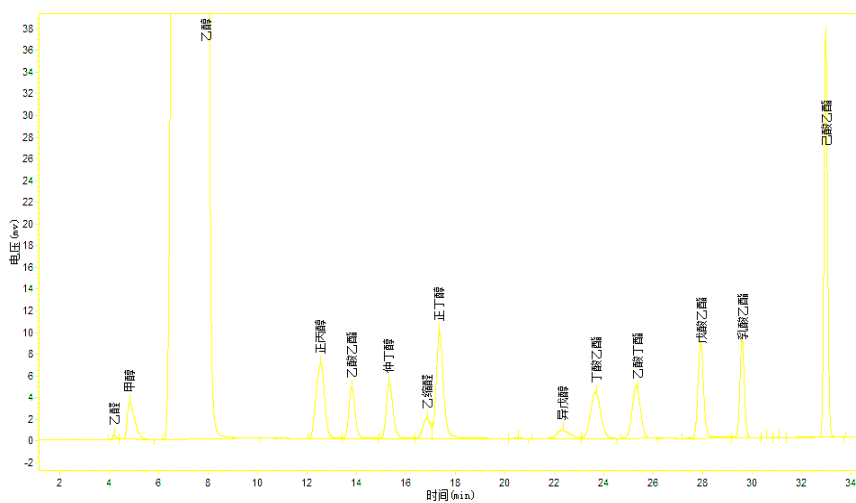
由此可见，同一物质色谱分析方法具有多样性和复杂性。除文中所述几种方法以外还有很多。色谱分析方法奥妙无穷……



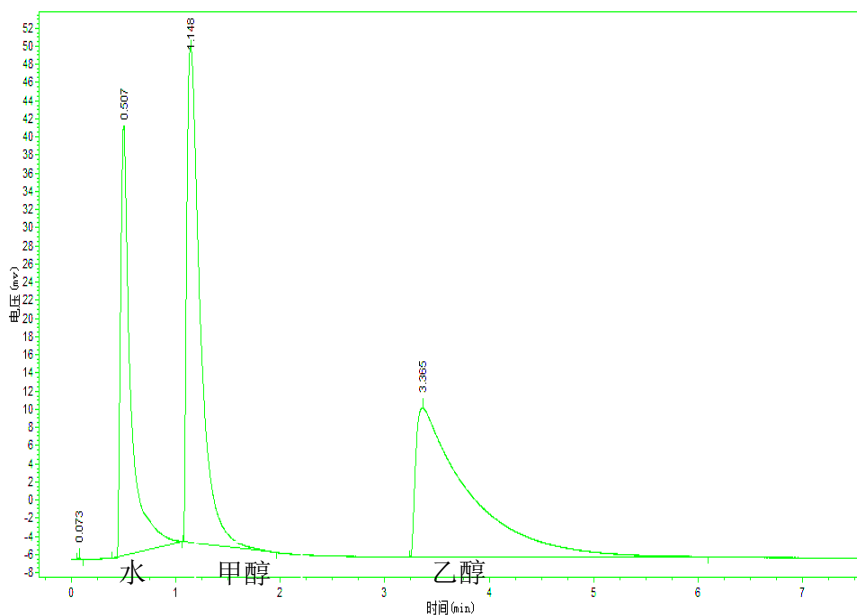
色谱图(二) 食品级酒精中的杂醇油分析



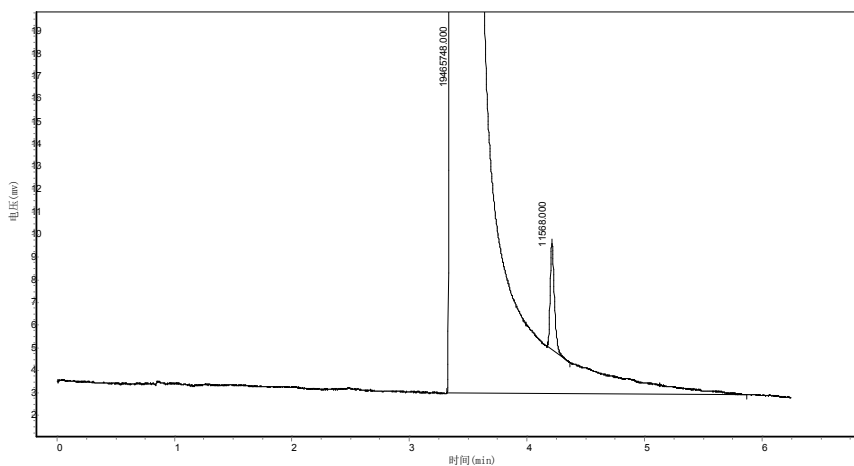
色谱图(三) 白酒的色谱常规分析



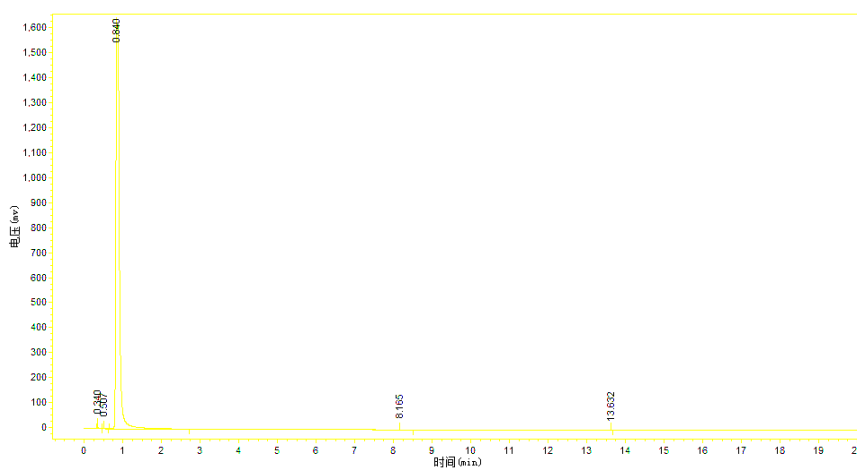
色谱图(四) 白酒中醇酯、高级醇、酸的分析



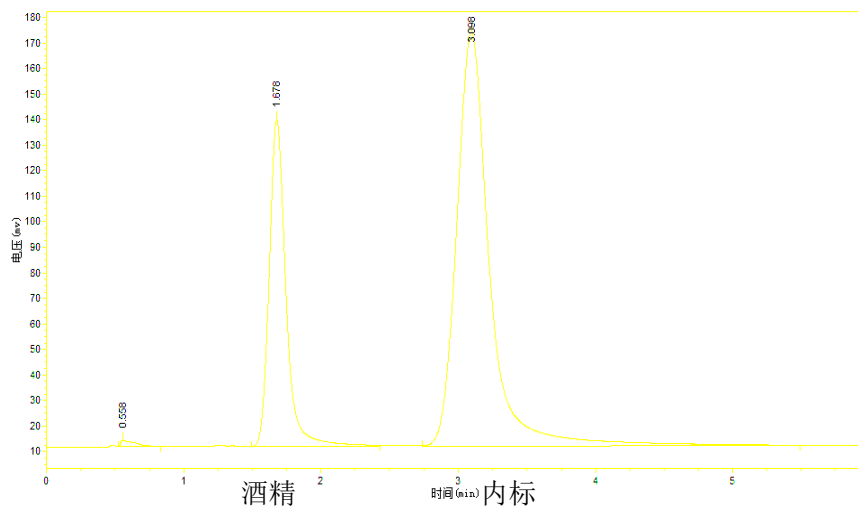
色谱图(E) 甲醇中的酒精及水含量分析



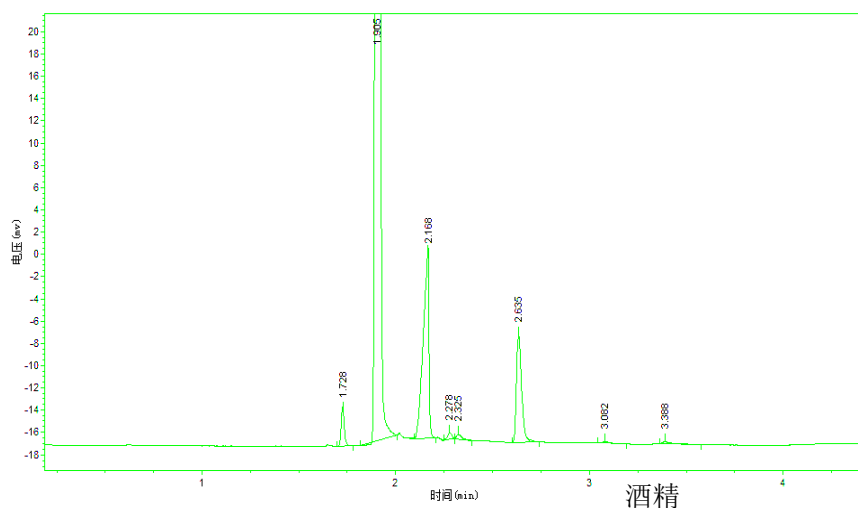
色谱图(F) 甲醇中的微量酒精分析



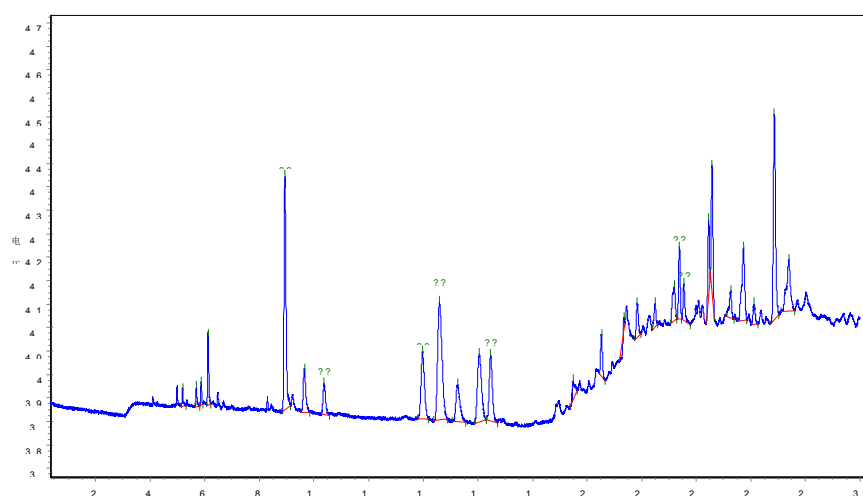
色谱图(G) 血液中的酒精含量分析—顶空法



色谱图(h)血液中的酒精含量分析—内标法



色谱图(i)药品中的酒精含量分析



色谱图(j)药品中的微量酒精含量分析

参考文献：(略)

TCF7L2、AKT2、FOXO1 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究

张捷，刘德敏

（天津医科大学代谢病医院，天津 300070）

本研究利用 DHPLC 技术对 TCF7L2、AKT2、FOXO1 三种基因不同位点与散发 T2DM 的相关性进行了初步探讨，DHPLC 技术是 SNP 研究中较客观的研究方法，在基因多态性研究中具有非常重要的应用价值。总之，本研究数据表明，TCF7L2 基因 rs12255372 位点，及 FOXO1 基因 rs2701891 位点与天津地区汉族人群 T2DM 的发生相关，且两基因间存在一定的协同作用，对此两种基因的检测为 T2DM 的预防及早期诊断提供了重要的依据。

The association study between polymorphisms on TCF7L2、AKT2、FOXO1 gene and Type 2 Diabetes

LIU De-min, ZHANG Jie

Metabolic Diseases Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective:** To detect the variant in transcription factor 7-Like 2(TCF7L2), protein kinase B(AKT2) and forkhead box transcription factor subgroup O1 (FOXO1) gene of the WNT signalling pathway, and to investigate the relationship between the different gene polymorphism and the type 2 diabetes mellitus(T2DM) in Tianjin Han populations. **Methods:** To select 352 T2DM patients and 176 case controls randomly, and extract the genome DNA, then use the denaturing high performance liquid chromatography to detect the PCR amplified fragment, and choose the different peaks for sequencing. Analysis the differences of different genotype frequency between the groups and use the Logistic regression to evaluate the risk factors of type 2 diabetes. **Results:** It's good representation of the population used the Hardy-Weinberg equilibrium testing ($P>0.05$). In the T2DM group and case control group, the C/T genotype frequency of rs11669332 in AKT2 gene are 7.67% and 3.41%, there is no different between the two groups. The G/T genotype frequency of rs12255372 in TCF7L2 gene are 18.5% and 2.8%, The C/C and C/T genotype frequency of rs2701891 in FOXO1 gene are 3.1%、1.1% and 21.3%、10.2%, respectively. There are significant differences ($P<0.01$). Significant differences of the TCF7L2 T+/ FOXO1T+、TCF7L2 G+/ FOXO1 C+ genotypes frequency exists in the conjoint analysis between the two groups After a standard calibration of α ($P<0.004$). The TCF7L2 T+/ FOXO1C+ genotype, glycosylated hemoglobin, urea nitrogen are the risk factors of type 2 diabetes, high density lipoprotein is a protective factor. **Conclusion:** This study indicates that G/T genotype in the TCF7L2 and the C/C, C/T genotype in the FOXO1 gene significantly contribute to type 2 diabetes susceptibility in Tianjin Han populations. There is a certain synergy between TCF7L2 and FOXO1, they are the risk factors of the type 2 diabetes.

Key words: Type 2 diabetes mellitus, gene polymorphism, Denaturing high performance liquid chromatography

新配方汽油分析仪 M3 的应用

袁维

（中石化股份有限公司天津分公司炼油部质检车间，300271）

摘要：介绍了由化学工作站控制的 AC Reformulyzer M3 新配方汽油分析仪。利用该仪器，根据样品性质和分析要求选择相应的分析模式，一次进样分析可以得到汽油组成、苯含量、含氧化合物、蒸汽压、辛烷值等结果。

关键词：新配方汽油分析仪 多维气相色谱 汽油 族组成

结论

多维气相色谱法测定汽油族组成，具有自动化程度高、人为误差小、分析准确度较高、测定重复性好、适用范围广、信息量大、定性定量可一次完成等特点，是汽油族组成分析较为理想的分析方法。

参考文献

- [1] 田亮. 石化技术与应用, 2000, 18 (2): 119-121
- [2] Reformulyzer M3分析使用手册, 荷兰AC公司。

含硫化合物类蔬菜中农药多残留快速 分析方法的研究

陈子雷

摘要: 农药残留问题是目前影响食品安全的重要问题,而蔬菜中农药残留问题又是重中之重,蔬菜中农药残留中毒事件已经是屡见不鲜。因此蔬菜中农药残留的检测技术研究也越来越受到重视。常见蔬菜的残留检测技术已经比较成熟,但是对于葱蒜等百合科蔬菜由于含有大量硫化物干扰,使用传统农药残留检测方法无法检测,因此有必要对葱蒜等蔬菜农药残留检测进行研究。

本研究报告针对葱蒜类蔬菜中含硫化合物严重干扰农药残留检测的问题,研究和建立了一种快速、高效、经济实用的葱蒜等含硫化合物类蔬菜中农药多残留检测一种方法。本研究根据百合科蔬菜中硫化物产生的特点,在提取前利用微波加热的方法,破坏蒜氨酸酶的活性,有效的避免了硫化物干扰物的产生,然后用乙腈做溶剂匀浆提取, SPE 净化, GC-MS 检测的方法。具体内容及研究情况如下:

1、研究了 L-半胱氨酸、铜离子、冷冻、水浴加热、微波加热等不同条件下对蒜氨酸酶活性的影响,选择了水浴加热、微波加热两种最佳的蒜氨酸酶灭活的处理条件。本研究表明,在样品未破损情况下, L-半胱氨酸、铜离子溶液浸泡的方法很难在短时间内使蒜氨酸酶完全失活;冷冻法虽然可以使蒜氨酸酶失活,但温度升高后蒜氨酸酶仍然具有活性;加热法(水浴加热和微波加热)则可有效的使蒜氨酸酶完全失去活性,可以有效的排除掉硫化物的干扰,满足实验的要求。

2、研究了 100 多种农药在水浴加热(80℃和沸水浴)以及微波加热条件下的稳定性,对两种加热方法进行了比较,选择出最佳的加热方法和加热条件。通过实验表明,两种水浴加热方法,在不同程度上造成了部分农药的损失。而微波加热实验表明,微波加热在一定程度上也可以使少部分农药损失,但控制好加热时间,农药的损失很少,不影响农药残留的定性定量,完全满足农药残留检测的要求。

3、对 100 多种农药残留的提取溶剂、提取方式、净化、浓缩等条件进行了讨论。对不同溶剂的提取效率进行了比较,选取了提取效率最好、易于操作的乙腈作为提取溶剂,用匀浆的方法进行提取;净化方式则采用 Florisil 柱,用正己烷+丙酮(9+1)作为淋洗剂进行净化;在浓缩过程中根据不同需要,结合旋转蒸发和氮吹法的不同特点,选择合适的浓缩方法。

4、对色谱条件进行了优化。确定了 100 多种农药 GC-MS 分析的色谱条件,将所检测农药依据其在色谱柱上不同保留时间进行了分组,确定了各组分选择离子,对定性、定量方法进行了确定。

5、对方法可靠性进行了确证。进行了 100 多种农药在不同样本中的回收率及重现性试验,回收率在 70%~110%之间,相对标准偏差(RSD)在 1.2~11.3%之间,最底检出浓度均小于 0.02mg/kg,满足我国规定的有关农药残留在蔬菜中的最低残留限量(MRL)标准。

农兽药残留检测中串联质谱方法优化策略

牛增元

（山东出入境检验检疫局技术中心）

摘要：本报告以食品农产品中敏感检测项目，如硝基呋喃代谢物、Bata-兴奋剂（瘦肉精）、氟苯尼考胺、三聚氰胺、涕灭威等农兽药残留为例，介绍在液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）检测方法建立中，色谱分离条件以及串联质谱条件的选择优化策略。主要内容有三个方面：

1 影响质谱定量的主要因素：①色谱峰采集点数 为更好的定量，色谱峰采集点数至少要采集 15-20 个点，如果采集的点数不够，得到的峰不完全，损失信息。②喷雾稳定性 喷雾稳定性会影响信号的强度。喷雾不好会影响峰形，且标准曲线不好，使精密度下降。③峰形 峰形不好，积分会有偏差，导致定量不准确。④色谱 色谱好可以带来更好的定量和校准曲线，同时色谱能将峰分离开，使 S/N 和 RSD 更好。⑤添加剂 质谱中使用的添加剂只能是挥发性溶剂，不挥发的缓冲溶液、酸和碱使灵敏度降低、出峰不稳定，影响定量。⑥内标 内标的使用可提高数据的重复性和精确度。内标物可选择稳定同位素。⑦质量分辨能力 高的质量分辨能力能把质量相近的化合物分开，提高质谱的定量能力。

2 色谱和质谱条件建立过程：根据化合物的性质（分子量、结构、极性）来确定仪器条件（离子源类型、正负离子话模式、裂解方式等），仪器确定好后，优化质谱条件和色谱条件，质谱条件主要是优化母离子、子离子和碰撞能量等参数，色谱条件主要优化色谱柱、流动相、梯度/等度，流速等条件。条件确定好后要对标准溶液及基质匹配标准溶液进行考察，考察项目包括重复性、重现性、各离子的信噪比、基质效应和线性范围等。

3 色谱质谱方法优化实例：通过姜中涕灭威残留测定、调味酱中硝基呋喃代谢产物残留测定和稻米中苯氧羧酸除草剂残留测定的例子介绍了定量离子和定性离子的选择。通过动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和特布他林残留量检测介绍了色谱质谱方法建立的过程，包括流动相的选择、在复杂基质中如何选择子离子、考虑到基质的抑制作用选择内标法定量等。

饮用水中痕量有机污染物色质联用 快速筛查技术研究

贾瑞宝, 赵清华, 孙韶华

(济南市供排水监测中心, 国家城市供水(排水)监测网济南监测站, 济南 250021)

摘要: 调研了固相萃取、固相微萃取、顶空进样、吹扫捕集、加速溶剂萃取、微波消解等样品预处理技术与气相色谱-质谱、液相色谱-质谱、液相色谱-等离子发射光谱-质谱等联用技术的最新进展, 分析了不同预处理方式及色质联用技术的组合模式及其在饮用水水质监测中的应用情况, 对国内外饮用水中痕量污染物色质联用快速筛查方法的技术优势、技术缺陷和成功案例进行了系统综述, 提出了色质联用筛查方法快速识别饮用水痕量有害污染物的技术定位、发展方向和应用前景。

关键词: 饮用水 重金属 有机污染物 色质联用 预处理 快速筛查

气质联用技术在非食品消费品 安全中的应用

高翠玲

（山东省产品质量检测研究院）

摘要： 各类消费品与人类生活密切相关，其质量安全直接影响人身健康。本文主要介绍了气-质联用技术在各类消费品的功效成分、杂质含量、违禁添加物和有毒有害物质的定性、定量分析方面的应用进展，以及如何利用气-质联用技术开展消费品中未知物剖析等质量安全风险监测；同时，介绍了各国对消费品的安全监管方向，以及气质联用技术的发展在未来的消费品的安全监管、风险评估和技术研究方面的应用。

食品中富马酸二甲酯的气相色谱测定

陈旭艳, 葛宝坤, 赵孔祥

(天津出入境检验检疫局, 天津 300456)

建立了简便、快速、可靠的食品中富马酸二甲酯(Dimethylfumarate, DMF)的气相色谱测定法, 样品经乙酸乙酯提取后直接进行气相色谱分析。该方法的最低检出限(LOD)为 1.5 mg/kg, 最低定量限(LOQ)为 5 mg/kg。奶制品(婴儿配方奶粉)、粮谷(白芸豆)、蔬菜(西红柿)中的平均添加回收率为 84.0 %~94.4 %, 变异系数为 1.3 %~4.6 %。

富马酸二甲酯(Dimethylfumarate, DMF)是美国上世纪 80 年代开发出来的一种低毒高效的新型防霉剂, 也叫反丁烯二酸二甲酯。它具有广谱高效的特性, 对 30 多种霉菌都有很好的抑制效果, 并且具有抗真菌能力, 而且其抗菌活性受 pH 影响小, 防腐防霉性能优于常用的苯甲酸、山梨酸、丙酸及双乙酸钠等, 曾被广泛应用于食品、饮料、饲料、中药材、化妆品、鱼、肉、蔬菜、水果等防霉、防腐、防虫、保鲜, 也常用于皮革、鞋类、纺织品等的生产、储存、运输中, 后经科学实验证明, 富马酸二甲酯易水解生成甲醇, 对人体的眼睛、皮肤等有刺激作用, 大量食用会引起咽痛、腹痛及呕吐等症状, 并对肝、肾有很大的毒副作用, 一项用皮革家具和纯富马酸二甲酯补片的人体临床研究(斑贴试验)显示, 在最严重的情况下到 1 mg/kg 即出现强烈反应。欧盟委员会于 2009 年 3 月 17 日通过《要求各成员国保证不将含有生物杀灭剂富马酸二甲酯(DMF)的产品投放市场或销售该产品的决议》(2009/251/EC), 要求自 2009 年 5 月 1 日起, 欧盟各成员国禁止将 DMF 含量超过 0.1ppm 的消费品投放或在市场上销售, 已投放市场或在市场上销售的含有 DMF 的产品应从市场上和消费者处回收。该决定的有效期截至 2010 年 3 月 17 日。

目前已发表的各种基质中富马酸二甲酯检测方法主要有气相色谱法(1-4,16)、气相色谱-质谱联用法(5-10,17)、液相色谱法(11-14)等。但上述方法多数比较复杂, 并且在研究中发现添加富马酸二甲酯的样品提取后不论采取旋转蒸发还是氮气吹干的方式浓缩都会导致回收率降低和变异系数增大。本文建立的方法采用少量的容积提取, 不经浓缩直接进行气相色谱分析, 使回收率有了很大的提高并且变异系数较小。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器: Agilent 7890A 气相色谱仪, 配有 FID 检测器和 7683B 自动进样器; HG-1803A 型高纯氢气发生气; KAG-1602 型空气泵; 超声波清洗器; 旋转蒸发器

试剂: 富马酸二甲酯(99%); 乙酸乙酯(分析纯)

1.2 标准溶液及标准使用液配制

准确称取富马酸二甲酯标准品 0.1000g, 乙酸乙酯溶解并定容至 100mL, 该标准溶液浓度为 1mg/mL, 梯度稀释配制成 4、10、20、40、100、200 μ g/mL 的标准工作液。

1.3 样品处理

取 5.0g 捣碎样品于 10mL 离心管中, 加入 5mL 乙酸乙酯, 加盖密封, 超声提取 10min, 5000r/min 离心 5min, 上清液过 0.22 μ m 滤膜待气相色谱检测。

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent 19091J-413HP-5(30m \times 320 μ m \times 0.25 μ m); 进样口温度: 200 $^{\circ}$ C; 检测器温度: 200 $^{\circ}$ C; 柱温: 40 $^{\circ}$ C 保持 1min, 以 5 $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 80 $^{\circ}$ C, 再以 10 $^{\circ}$ C/min 的速度升温至 160 $^{\circ}$ C; 气体流量: N₂, 30mL/min, H₂, 30mL/min, 空气, 400mL/min; 不分流进样; 进样量 1 μ L。

2 结果与讨论

2.1 方法的准确度

方法准确度用添加回收率衡量。5mg/kg、10 mg/kg、40 mg/kg 三个添加水平下富马酸二甲酯在粮谷（白芸豆）、奶制品（婴儿配方奶粉）、蔬菜（西红柿）中添加回收率见表1，在三种样本中平均添加回收率为84.0%–94.4%，相对标准偏差为1.3%–4.6%，色谱图见图1。

2.2 精密度、灵敏度和线性相关

由表1可以看出，试验样本在5–40mg/kg添加浓度内变异系数为1.3%–4.6%，最小检出量为1.5 ng，最低定量限为（LOQ）5 mg/kg。

表1 富马酸二甲酯在不同样本中的添加回收率（n=5）

样品	添加浓度, mg/kg	平均回收率, %	变异系数, %
粮谷（白芸豆）	5	86.7	4.6
	10	91.2	2.8
	40	90.4	2.2
奶制品（婴儿配方奶粉）	5	84.0	2.5
	10	93.3	2.7
	40	91.0	1.4
蔬菜（西红柿）	5	86.3	1.8
	10	94.0	1.3
	40	94.4	1.9

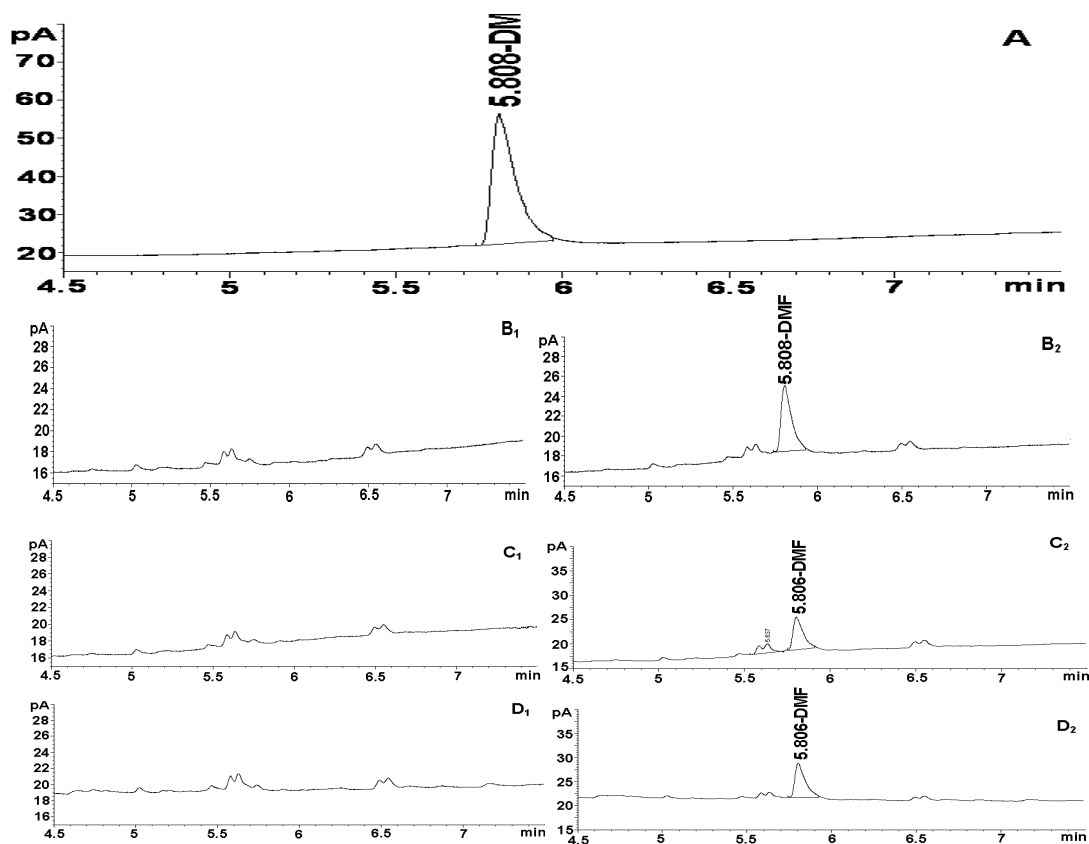


图1 标准品及添加样品色谱图

(A 标准品, B₁ 婴儿配方奶粉空白, B₂ 婴儿配方奶粉添加 5mg/kg, C₁ 白芸豆空白, C₂ 白芸豆添加 5mg/kg, D₁ 西红柿空白, D₂ 西红柿添加 5mg/kg)

梯度稀释配制的4、10、20、40、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液，按照上述色谱条件进样，以峰面积对标样浓度绘制标准曲线，标准曲线方程为 $y=4.47x-5.4731$ ， $r^2=0.9999$ 。

参考文献

- [1] 钱凯, 曹锡忠, 丁友超等. [J]印染, 2009, 14: 44-45
- [2] 金良正, 胡浩军. [J]中国卫生检验杂志, 2006, 16(10): 1209, 1214
- [3] 顾秀英, 鲍忠定, 许荣年等. [J] 食品科技, 2006, 9: 248, 268
- [4] 林海琳, 林海丹. [J]广东化工, 1999,2: 88,98
- [5] 马贺伟, 张丹云, 程飞, 黄新霞. [J]分析试验室, 2009, 28,(9): 62-65
- [6] 钱凯, 曹锡忠, 丁友超, 周静珠. [J]印染助剂, 2009, 26(9): 50-52
- [7] 林碧芬, 程群, 童玉贵等. [J]中国皮革, 2009, 38(5): 54-56
- [8] 阚周密, 林建阳, 王戏丹. [J]食品科学, 2007, 28(01): 247-249
- [9] 曹华娟, 冯家力, 潘振球等. [J]实用预防医学, 2005, 12(1): 173-174
- [10] 路铭, 欧子相. [J]广东卫生防疫 1997, 23(2): 19-21
- [11] 冯楠, 路勇, 吴颖等. [J]中国卫生检疫杂志, 2009, 19(8): 1801-1803
- [12] 刘义, 谭建兵, 王正虹等. [J]预防医学情报杂志, 2009, 25,(5): 466-468
- [13] 庞艳苹, 赵志磊, 吴广臣等. [J]食品工业科技, 2009, 30(06): 311,352
- [14] 何小青, 罗美中, 蓝勇波等. [J]光谱实验室, 2004, 21(4): 701-704
- [15] 韩惠雯, 黄菲菲, 赵嘉胤等. [J]上海农业学报, 2009, 25(3): 72-74
- [16] J. Pablo Lamas, Lucia Sanchez-Prado, Carmen Garcia-Jares, Maria Llompart. Journal of Chromatography, 2009, 1216: 5755-5758
- [17] J. Pablo Lamas, Lucia Sanchez-Prado, Jorge Regueiro, Maria Llompart, Carmen Garcia-Jares. Anal Bioanal Chem, 2009, 394: 2231-2239

Determination of dimethylfumarate in foods by gas chromatography

Chen xuyan, Ge baokun, Zhao kongxiang

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300456)

Abstract: An easy, rapid, reliable gas chromatography method was developed for the determination of dimethylfumarate in foods. The sample was extracted by ethyl acetate and analyzed by gas chromatography with FID. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the method was 1.5 mg/kg and 5 mg/kg. The average recoveries in dairy products (infant formula milk powder) grains (white kidney bean) and vegetables (tomato) ranged from 84.0 % to 94.4 % with a coefficient variation between 1.3 % and 4.6 %.

Key words: dimethylfumarate; gas chromatography; grains; vegetables; dairy products

废水及高纯三甲胺中痕量一、二甲胺的气相色谱分析

李洪宽

（山东省化工研究院，250014）

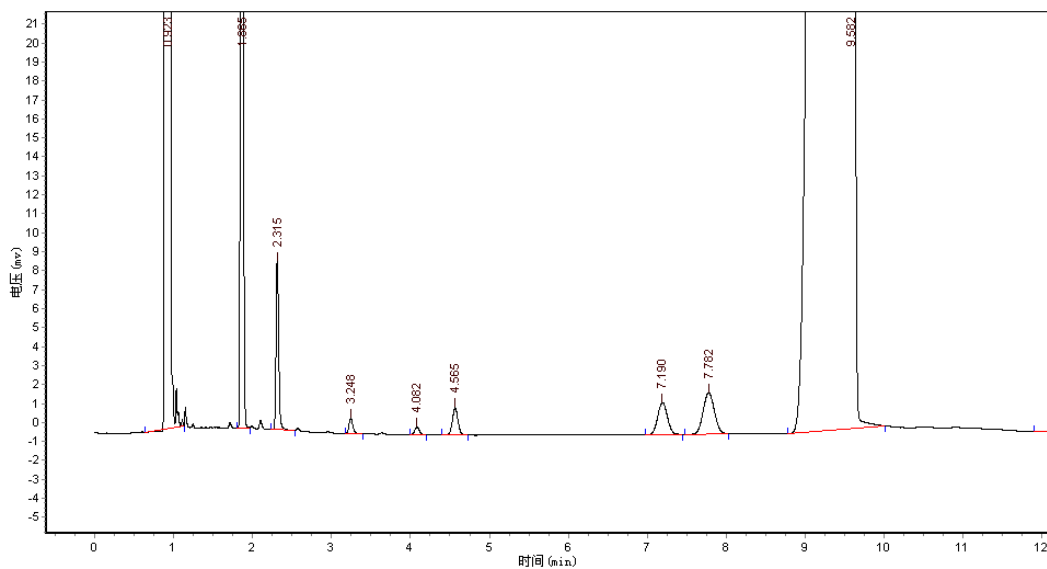
废水中痕量甲胺有用大口径毛细管柱和热离子化检测器（TID 或 NPD）分析的报道⁽¹⁾，空气中甲胺分析有国家标准⁽²⁾，由于甲胺极易溶于水，且三个异构体的浮点相近，直接进水样会影响 TID 的寿命，顶空进样灵敏度又低，氢火焰检测器（FID）是又灵敏又耐用的理想检测器。不论那种方法对甲胺三个异构体的分离都不理想，尤其检测作为氯化胆碱原料的高纯三甲胺中痕量一、二甲胺时，大峰三甲胺会掩盖一、二甲胺的峰，从而得不一、二甲胺的准确结果，况且杂质一、二甲胺反应生成的 N-（二）甲基乙醇胺有致癌毒性，在出口欧美的饲料添加剂氯化胆碱中严格控制甲基乙醇胺含量。工业甲胺水溶液分析的国标（GB9010-88）用四乙烯五胺涂在 407 有机载体上，此方法也不能很好地分离甲胺三个异构体，且四乙烯五胺耐温低（仅 100 度），也不能很好地分析高纯三甲胺。

本文采用固相萃取-柱上衍生化气相色谱法测定了废水中痕量一、二甲胺含量。用衍生化-萃取衍生产物气相色谱法测定了高纯三甲胺中一、二甲胺杂质含量。还测定了高纯二甲胺中一、三甲胺的杂质含量。

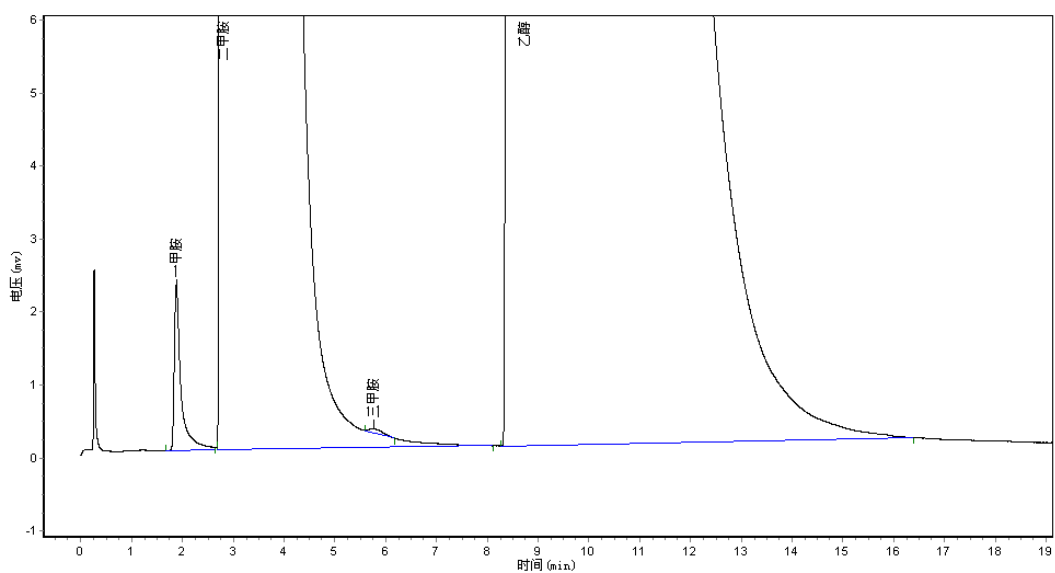
样品处理过程：取有机单体 10 克装入玻璃萃取柱中（两端塞上石英棉）从上端加入 2,4-二硝基氟苯/二氯甲烷，使溶剂挥发干净，取 1L 废水过萃取柱，再用 100ML 二氯甲烷洗脱萃取柱，蒸发溶剂并定容至 10ML，加三苯甲烷作内标，供气相色谱分析。

向 10ml 三甲胺样品中加 1ml 2,4-二硝基氟苯，加 10ml 二氯甲烷振荡，再加水 20ml 振荡，下层供气相色谱分析。

色谱条件：30M×0.32mm i.d.×df1.0um 内涂 28%二苯基甲基聚硅氧烷；汽化检测温度都是 260 度，柱温 200 度，FID 高阻 1G 欧，进样量 1ul。色谱图如下图：



工业高纯二甲胺是合成脂肪叔胺、DMF 等的重要原料，其杂质一、三甲胺含量很低，需准确测定，下图是高纯二甲胺产品的色谱图。



峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1	一甲胺	1.892	2252.682	21461.209	0.0900
2	二甲胺	2.825	143635.141	6587000.000	27.6322
3	三甲胺	5.758	53.023	987.500	0.0041
4	乙醇	8.745	150959.500	17228656.000	72.2736

参考文献（略）

化妆品中残留右美沙芬的 高效液相色谱检测方法

吴延晖, 许泓, 何佳, 肖亚兵, 张骏

(天津出入境检验检疫局, 天津市 300201)

样品经甲醇提取后, 采用高效液相色谱法检测化妆品中右美沙芬的残留量。色谱条件为采用 phenomenex C₈ luna 柱(5 μ m, 250 mm \times 4.60 mm) 色谱柱; 流动相 V(乙腈):V(3%醋酸溶液, 用三乙胺调节 pH=4.3) =34:66; 荧光检测器检测, 激发波长: 280 nm, 发射波长: 310nm。结果表明在此条件下, 右美沙芬在 0.025mg/L~20 mg/L 范围内与相应的峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9993$)。回收率为 96.16%~101.4%, $RSD\leq 3.73\%$ ($n=6$)。

右美沙芬(dextromethorphan, DM)具有非特异性内源性细胞保护功能, 可选择性保护线粒体和线粒体酶活性, 增加抗氧化作用, 减轻细胞损害, 减少氧自由基的产生^[1], 因此右美沙芬添加在化妆品中, 可以起到抵抗皮肤老化的作用。但是右美沙芬大剂量使用会对人体造成危害, 如脑损伤、心跳不规则、呼吸抑制等, 在欧盟于 2008 年开始执行新的化妆品卫生标准, 将右美沙芬列为禁用物质。右美沙芬的含量测定方法, 有高效液相色谱(HPLC)法、紫外分光光度(UV)法、非水滴定法等, 但国内外文献中未见有关化妆品中右美沙芬残留量的检测方法和质控标准的报道。由于有些方法所用试剂昂贵或需用内标, 操作烦琐。笔者采用 HPLC 法, 外标法定量。本方法简便, 适合于日常检验工作中应用。为化妆品的进出口安全提供了可靠的检测技术手段, 同时对提高化妆品产品质量, 保障人民身体健康具有非常重要的意义^[2]。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱系统(美国Waters公司), 配有 Waters515 HPLC 泵, Waters 717自动进样器, Waters 470荧光检测器; 超声波清洗仪, 上海医用仪器厂; R200D分析天平(德国Sartorius 公司, 1/100 000天平)。

氢溴酸右美沙芬标准品(Dr. Ehrenstorfer GmbH); 三乙胺(色谱纯, 天津市光复精细化工研究所); 乙腈(色谱纯, Fisher Chemicals); 甲醇(色谱纯, Merck 公司); 冰乙酸(色谱纯, 天津市化学试剂三厂)

1.2 色谱条件

色谱柱: phenomenex C₈ luna 柱(5 μ m, 250 mm \times 4.60 mm); 流动相: V(乙腈): V(3%醋酸溶液用三乙胺调节 pH=4.3) =34:66, 检测器: 荧光检测器, 激发波长: 280 nm, 发射波长: 310nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μ L。

1.3 标准溶液及供试品溶液的制备

精密称取一定量的右美沙芬标准品, 加甲醇溶解、定容配制浓度为1g/L的标准储备液。分别移取一定体积的上述标准储备液至10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配成一系列标准溶液。精确称取化妆品试样约1.000 g于具塞离心管中, 加甲醇定容至10 mL, 超声提取20 min, 离心分离, 取上清液以0.22 μ m滤膜过滤, 供HPLC检测用。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择^[3-8]

2.1.1 色谱柱的选择

通常使用的右美沙芬多为其氢溴酸盐，因而具有较强的极性，由于固定相表面的硅醇基对极性化合物（特别是碱性药物）的色谱行为有严重影响，其表现为色谱峰拖尾，保留时间过长。而C₈柱比C₁₈柱的碳覆盖量小，碳键短，疏水性弱于C₁₈柱，因此本实验采用疏水性较小的C₈柱代替C₁₈柱，即可得到对称的峰形。

2.1.2 流动相的选择

由于右美沙芬为弱碱性物质，使用离子对试剂能很好消除右美沙芬的拖尾，但这些方法所用流动相的费用较高，且分析完成后色谱柱需清洗较长时间。本实验中加入乙酸组成的流动相，可较好的分离碱性物质，本实验中以pH=4.3较为适宜。在流动相中加入扫尾剂三乙胺，可抑制或掩蔽固定相表面的游离硅醇基的活性，使氢溴酸右美沙芬峰形对称，消除了拖尾现象。右美沙芬的标准图谱见图1，色谱峰的保留时间为5.4min，与溶剂峰、空白基质峰分离较好。

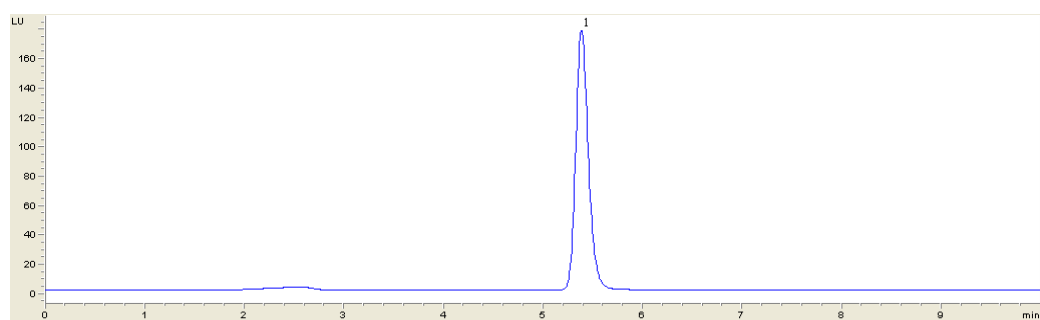


图1 右美沙芬标准溶液色谱图

2.1.3 检测器的选择及检测波长的确定

荧光检测器的灵敏度较高，特异性好，故选用荧光检测器。通过定性扫描，确定最佳荧光激发波长为：280 nm，最佳发射波长为：310 nm。

2.2 线性范围及定量检出限

准确吸取适量标准储备液至相应容量瓶中，加水稀释至刻度，配成0.025 mg/L、0.05mg/L、1.0mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L的溶液，用上述色谱条件进行分析，每份测定6次，取峰面积平均值，以质量浓度 ρ 和峰面积 A 进行线性回归，得线性方程： $A=143882\rho-13761$ ($r=0.9993$)。用该方法检测化妆品中右美沙芬，检出限为0.05mg/L ($S/N=3$)。空白样品添加0.5mg/kg的回收色谱图见图2。

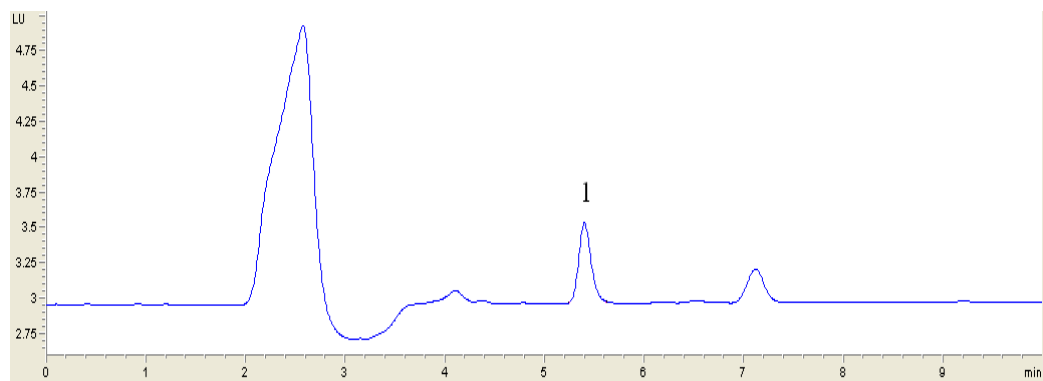


图2 空白样品+0.5mg/kg 标准品的回收色谱图

2.3 精密度及回收率

取10 mg/L标准样品重复测定6次以上, 检验方法的重现性, 所得结果平均值为9.91 mg/L, RSD =3.73%。精密量取右美沙芬浓度为5 μg/ mL 供试液2 mL, 定量精确加入10、2、1 μg/ mL高中低三种浓度的标准品, 使用与样品相同的方法制备和测定, 取5次平均值计算回收率分别为100.4%、101.4%、96.16%, 相对标准偏差分别为2.4%、1.3%、4.0%。测定结果表明, 该法具有良好的精密度、重现性和稳定性。

3 结论

本法前处理简便, 回收率高, 色谱峰重现性好, 分离速度快, 能较好地应用于化妆品的监督工作, 为化妆品评审检验和卫生监督提供有效的测试手段。

参考文献

- [1] 冯善武, 徐建国. [J]. 临床麻醉学杂志, 2006, 20 (5) : 399-401
- [2] 朱英, 赵月朝, 付斌. [J]中国预防医学杂志, 2006, 7 (5) : 493-495
- [3] 彭芳辰, 张相林, 刘晓. [J]中国药房, 2004, 15 (10) : 616-617
- [4] 姜自彬, 袁继民, 魏学彦[J]中国医院药学杂志, 2000, 20 (3) : 147-149
- [5] 郑琼. [J]上海医药, 2005, 24 (1) : 33-34
- [6] 倪燕君, 郝彩莲, 包占华. [J]中国医药工业杂志, 2004, 35 (5) : 296-297
- [7] 化妆品中曲酸的检测方法液相色谱法, SN/T 1499-2004
- [8] 蒙缔亚, 任立伟. [J]分析科学学报, 2001, 17 (5) : 231-233

Determination the Residue of Dextromethorphan in Cosmetics by HPLC

Wu Yanhui, Xu Hong, Xiao Yabing, He Jia, Zhang Jun

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of China Tianjin 300201)

Abstract: A HPLC method for the determination the residue of dextromethorphan in cosmetics was established. Samples of cosmetics were extracted using methanol as solvent under ultrasonic wave. The extract was analyzed on phenomenex C₈ luna column(5μm, 250 mm×4.60 mm)and mobile phase consisted of V (acetonitrile):V(3%acetic acid solution adjusted pH=4.3 by triethylamine)=34:66.The fluorescence detector measured with the excitation wavelength of 280nm and the emission wavelength of 310nm. Results showed that as the concentration of dextromethorphan is in the range of 0.025 mg/ L~20 mg/ L, the relationship between concentration and the corresponding peak area shows good linearity (r= 0.999 3) The recovery achieves 96.16%~101.4%.The RSD of the method is below 3.73%. (n=6) .

Key word: dextromethorphan ,cosmetics , HPLC method

光引发 Fe(III)-柠檬酸钠配合物对环境内分泌干扰物的降解及羟基自由基的测定

张长波⁶, 王蕾², 唐世荣¹, 宋宁宁¹, 王芳丽¹

(1. 农业部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190)

自然环境中, 在光照条件下, 铁-羧酸盐配合物在水中可以发生光化学反应。Zuo 和 Hoigné^[1]对铁-草酸盐体系作了大量研究, 并指出铁-草酸盐是大气水相中 H₂O₂ 的重要来源。在前面的工作中, 吴峰等用 Fe(III)/柠檬酸盐配合物降解染料, 得到了比较好的降解效果和脱色率^[2,3,4]。

本文首次系统的考察了各种影响因素, 如 pH 值、Fe(III)及柠檬酸盐的浓度配比等, 对 Fe(III)/柠檬酸盐光解生成羟基自由基的影响, 并首次用 Fe(III)/柠檬酸盐配合物降解环境内分泌干扰物, 及分析了其降解动力学。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

自转式光反应器; 250W 金属卤化物灯($\lambda \geq 313\text{nm}$); UV-1601紫外-可见分光光度计(日本岛津); pH-4 型酸度计; 高效液相色谱(日本岛津); N3000 色谱工作站(浙江大学)。

17 α -乙炔雌二醇(EE₂), 17- β 雌二醇(E₂), 双酚A(BPA), 壬基酚(NP), 雌酮(E₁), 己烯雌酚(DES)。以上药品由Sigma公司购买, 均为分析纯。

FeCl₃·6H₂O, 柠檬酸三钠, 苯, 苯酚, 乙腈等药品均为分析纯。实验用水为超纯水。

1.2 实验方法

配制含有一定浓度Fe(III)、柠檬酸钠和7mmol L⁻¹苯的水溶液, 用盐酸和氢氧化钠调节反应液的pH值, 分装入8只10mL比色管至刻度, 置于自转式光反应支架上, 用250W金属卤化物灯照射上述溶液(试管表面光强度为 1.2×10^5 勒克斯)。隔20min 取样, 用高效液相色谱测定反应液中苯酚的浓度。

色谱条件: Kromasil, KR100-5 C₁₈ 柱; 流动相为 40%乙腈; 流速为 0.8 mL min⁻¹; 紫外检测器波长 $\lambda = 270\text{nm}$; 进样体积 20 μL 。苯酚的保留时间为 4.2 min, 标准曲线方程为: $A = -4096.00014 + 1039.52427 C$ ($r = 0.99897$), A: 峰面积, C: 苯酚浓度($\mu\text{mol L}^{-1}$)。

选取上述产生羟基自由基最佳的实验条件, 研究其对环境内分泌干扰物的光降解。17 α -乙炔雌二醇, 17- β 雌二醇, 双酚 A、雌酮及己烯雌酚色谱测定条件: 280nm, 50%乙腈; 壬基酚: 280nm, 70%乙腈。

2 结果与讨论

2.1 铁(III)-柠檬酸盐配合物体系中·OH 的产生

在 pH=3.0, Fe(III)、柠檬酸盐及苯的浓度分别为 10.0、150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 和 7mmol L⁻¹ 时, 以及向体系中通入氮气在无氧条件下实验等不同条件下作对照实验。结果如图 1 所示, Fe(III)-柠檬酸盐配合物经过 160 min 光照, 可以产生 56.55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ·OH, 大约是只含 Fe(III)的体系产生·OH 浓度 20.64 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 3 倍。可见加入柠檬酸盐能够促进含 Fe(III)水溶液中·OH 的产生。暗反应或体系中无氧条件下均无·OH 产生。

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)资助项目(2010-ZCB-01)

作者简介: 张长波(1976-), 男, 山东人, 助理研究员, Tel: 022-23003713, E-mail: changbowhu@hotmail.com

图2是测定苯酚的高效液相色谱图,1号峰对应的物质是苯酚。可见,随着反应时间的延长,体系中产生的苯酚的量逐渐增加。用苯作捕获剂,与体系中生成的·OH反应生成苯酚。这种测定·OH的方法具有较好的选择性,因为苯自身光反应产生苯酚的转化率小于1%,以及苯酚由于直接光解或被H₂O₂、单线态氧分子及其它氧化剂氧化而消耗的速率相对于苯与·OH生成苯酚的速率很小^[5,6,7]。在实验中加入7mmolL⁻¹的苯,可以完全捕获光照产生的·OH,因此通过测定苯酚的浓度即得到·OH的浓度^[8,9]。在色谱图中,除了2号峰对应的强极性的低分子量的羧酸外,并无其它产物。

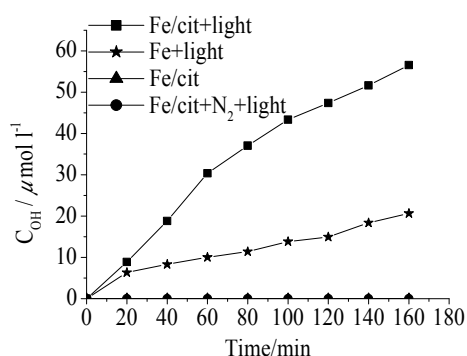


图1. 不同条件下Fe(III)-柠檬酸盐水溶液中的·OH产生

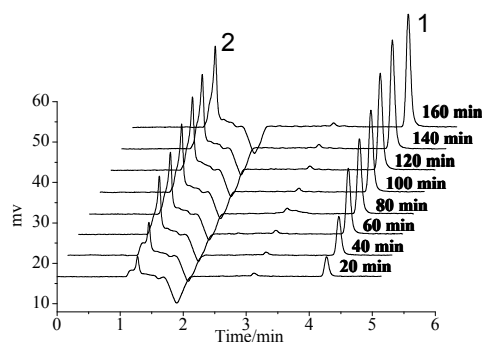


图2. 按照反应时间,苯酚测定的HPLC图

2.2 pH值的影响

在不同pH值条件下,Fe(III)-柠檬酸盐水溶液中的·OH产生量不同,在pH值3.0~7.0之间,pH=3.0时产生的·OH浓度最高为51.69 μmol L⁻¹(图3)。pH值的影响主要表现为:一是影响了体系中物质组分的形态分布,从图4可见,在pH值3.0~7.0之间,反应液中主要的组分为Fe(III)-Citrate配合物;二是影响体系中光反应过程,从而改变了体系中产生过氧化氢及·OH的浓度。通过对反应过程中溶液的pH值的测定,发现经过160 min的光照,体系的pH值并无太大变化,从初始3.24变化到3.12,说明体系中的主要组分仍然是Fe(III)-Citrate配合物。

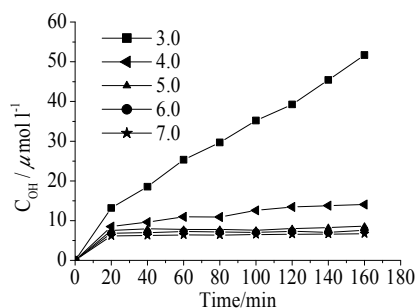
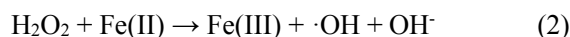
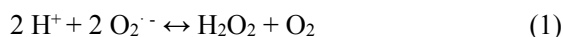


图3 溶液的pH值对·OH产生的影响

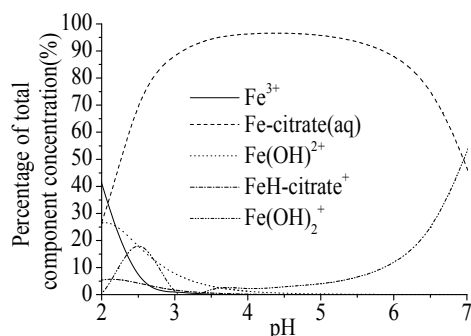
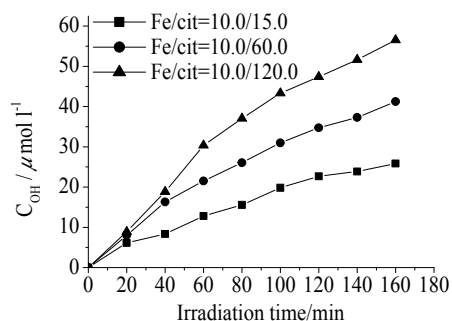
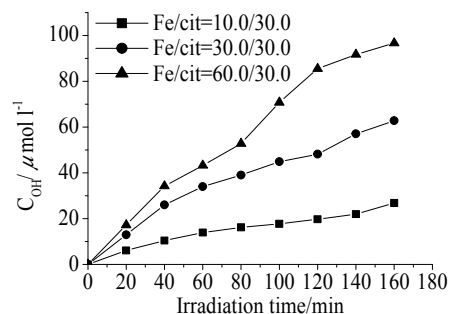


图4 pH对溶液中Fe(III)形态分布的影响

2.3 Fe(III)/柠檬酸盐配比的影响

在pH值一定的条件下,Fe(III)/柠檬酸盐的配比决定了反应液中配合物的形态分布。通过Visual MINTEQ计算,一般Fe(III)/柠檬酸盐配比<1时,Fe(III)-Citrate是主要的形态,当

Fe(III)/柠檬酸盐配比 > 1 时, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ 成为主要形态。图 5 和图 6 列出了不同配比下, 体系中 $\cdot\text{OH}$ 的产生量。结果表明, 在 Fe(III) 的浓度 $10.0 \sim 60.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, 及柠檬酸盐浓度在 $15.0 \sim 120.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的范围内, 单独增加 Fe(III) 或者柠檬酸盐浓度, $\cdot\text{OH}$ 的产生量均增加。平均速率常数如表 1 所示, 也是随着 Fe(III) 或者柠檬酸盐浓度的增加而增加。

图 5 柠檬酸盐浓度改变对 $\cdot\text{OH}$ 产生的影响图 6 Fe(III) 的浓度改变对 $\cdot\text{OH}$ 产生的影响表 1 铁 (III) / 柠檬酸盐配比对 $\cdot\text{OH}$ 产生速率的影响

Fe(III)/柠檬酸盐的配比($\mu\text{mol L}^{-1}/\mu\text{mol L}^{-1}$)	$\cdot\text{OH}$ 产生的平均速率($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$)
10.0/30.0	0.17
30.0/30.0	0.39
60.0/30.0	0.60
10.0/15.0	0.16
10.0/60.0	0.26
10.0/120.0	0.35

2.4 Fe(III)/柠檬酸盐配合物降解环境内分泌干扰物 (EEDs)

选取上述最佳实验条件, 即 Fe(III)/柠檬酸盐的配比为 $60.0/30.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pH 为 3.0。分别用于降解 17α -乙炔雌二醇(EE_2), $17\text{-}\beta$ 雌二醇(E_2), 双酚 A, 雌酮, 己烯雌酚及壬基酚几种典型的内分泌干扰物, 底物浓度均为 10.0mg/L 。实验结果如图 7 所示, 经过金属卤化物灯 160min 的照射, 发现几种底物都不同程度的发生了降解, 其中 DES 降解率最高为 57%, E_1 、 EE_2 及 E_2 的降解率约 46%, NP 和 BPA 降解率较低约 27%。环境内分泌干扰物光降解的动力学分析见表 2, 用一元线性回归方程对不同光照时间后内分泌干扰物残余浓度与初始浓度的比 (C/C_0), 与时间 T 的相关性分析表明, 一级回归方程的相关系数大于临界相关系数 ($-r_1 > r_c$), 因此内分泌干扰物的光降解反应符合一级反应动力学模式。

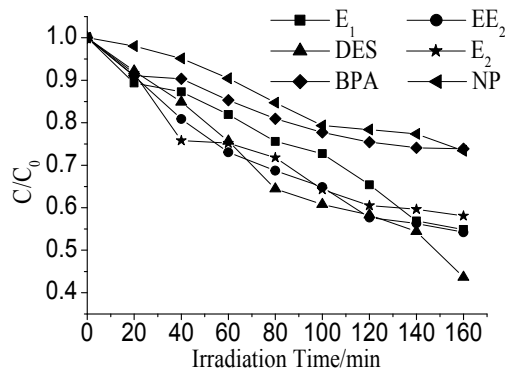


图 7 Fe(III)/柠檬酸盐配合物降解环境内分泌干扰物

表 2. 环境内分泌干扰物光降解的动力学分析 (n=9, r_c=0.8471, a=0.001)

环境内分泌干扰物	-t ₁	动力学方程	K(min ⁻¹)
E ₁	0.9888	LnC/C ₀ = 0.00395-0.00371T	0.00371
EE ₂	0.9877	LnC/C ₀ = -0.03959-0.0039T	0.0039
DES	0.9885	LnC/C ₀ = 0.00927-0.00489T	0.00489
E ₂	0.9669	LnC/C ₀ = -0.06032-0.00339T	0.00339
BPA	0.9735	LnC/C ₀ = -0.03688-0.0019T	0.0019
NP	0.9861	LnC/C ₀ = 0.01153-0.00206T	0.00206

3 结论

- (1) Fe(III)/柠檬酸盐配合物能够光解生成·OH, 且生成量与只含铁体系比有显著提高。
- (2) pH 值, Fe(III)和柠檬酸盐浓度都对体系中·OH 的生成有影响。pH 值为 3.0 时效果最好; 在本实验控制的浓度范围内, 即 Fe(III)的浓度 10.0~60.0 μmol L⁻¹, 柠檬酸盐浓度在 15.0~120.0 μmol L⁻¹ 的范围内, 单独增加 Fe(III)或者柠檬酸盐浓度, ·OH 的产生量均增加。
- (3) Fe(III)/柠檬酸盐配合物能够引发环境内分泌干扰物的降解, 其中 DES 降解率最高为 57%, E₁、EE₂ 及 E₂ 的降解率约 46%, NP 和 BPA 降解率较低约 27%, 光降解反应均符合一级反应动力学模式。

参考文献:

- [1] Zuo Y, Hoigné J. [J]. Atmos Environ, 1994, 38, 1231-1239
- [2] Wu F, Deng N, Zuo Y. [J]. Chem, 1999, 39, 2079-2085
- [3] 余金保, 王振华, 吴峰. [J]. 水处理技术, 2001, 27 (6): 332-334.
- [4] 罗凡、吴峰、邓南圣、肖玫. [J]. 环境科学与技术, 1998, 2: 4-7
- [5] Kochany J, Bolton JR. [J]. Environ Sci Technol, 1992, 26, 262-265
- [6] Faust BC, Zepp RG. [J]. Environ. Sci. Technol, 1993, 27, 2517-2522
- [7] Liu XL, Wu F, Deng NS. [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38, 296-299
- [8] Faust BC, Allen JM. [J]. Environ. Sci. Technol 1993, 27, 1221-1224
- [9] Joseph JM, Varghese R, Aravindakumar CT. [J]. J. Photochem. Photobiol. A: Chem 2001, 146, 67-73

Photodegradation of Environmental Endocrine Disruptors (EEDs) and Quantitation of Hydroxyl Radicals by Photolysis of Fe(III)-citrate Complexes in Aerobic Water

ZHANG Chang-bo¹, WANG Lei², TANG Shi-rong¹, SONG Ning-ning¹, WANG Fang-li¹

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, P. R. China;

2. National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, P. R. China)

Abstract: In the aqueous solution containing 60.0/30.0 μmol L⁻¹ Fe(III)/citrate and 7.0 mmol L⁻¹ benzene at pH 3.0, 96.66 μmol L⁻¹ ·OH was produced after irradiation by 250W metal halide light (λ ≥ 313 nm) for 160 minutes. The average generation rate was 0.6 μmol L⁻¹min⁻¹. Results showed that Fe(III)-Citrate complexes can degrade environmental endocrine disruptors (EEDs). The photodegradation efficiency of DES was 57%, E₁, EE₂ and E₂ were about 46%, NP and BPA were nearly 27%. The photodegradation of EEDs were all pseudo-first order reaction.

Keywords: Fe(III)-citrate complexes; Hydroxyl radicals; Photodegradation; Environmental endocrine disruptors (EEDs)

液相色谱-质谱/质谱法测定肉及肉制品中 2, 4-滴残留量

何佳, 许泓, 林安清, 张曼, 吴延晖, 张骏

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 天津 300458)

在酸性条件下, 以二氯甲烷提取肉组织中残留的2, 4-滴及其钠盐, 并转移至碱液中。用有机溶剂洗涤后在将其酸化, 2, 4-滴再用二氯甲烷提取。去除溶剂后用甲醇溶解定容, 供液相色谱-串联质谱测定。MS-MS采用电喷雾负离子化方式电离, 多离子反应监测方式检测。优化了MS-MS参数和液相色谱条件, 检测限可达0.005mg/kg, 回收率、精密度、线性均满足农药残留分析的规定。

2, 4-滴(2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid; 2, 4-D; CAS No. 94-75-7), 又名2, 4-二氯苯氧基乙酸, 因其用量少、成本低而一直是世界主要除草剂品种之一, 在30ppm以下低浓度时可作为植物生长调节剂。各个国家都对该药作了严格的使用规定, 国际农药残留量法典会议对2, 4-D提出的最大残留限量: 柑桔, 2mg/kg; 谷类, 0.2mg/kg; 小麦, 0.5mg/kg; 蛋、肉、乳与乳制品, 0.05mg/kg。CAC和日本肯定列表规定2, 4-D在各类商品中的最大残留限量(MRL)为0.01-5.0mg/kg。对于肉类, 各国MRL规定均在0.05~0.3mg/kg。

本研究以二氯甲烷提取组织中残留的2, 4-滴及其钠盐, 并转移至碱液中。用有机溶剂洗涤后在将其酸化, 2, 4-滴再用二氯甲烷提取。去除溶剂后用甲醇溶解定容, 供液相色谱-串联质谱测定, 电喷雾负离子化方式(ESI⁻)电离, 多反应监测(MRM)检测模式, 对被测样品进行定性、定量分析, 并且方法的准确度和灵敏度都满足残留测定的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HPLC-MS-MS联用仪: 1100-API 4000 (Agilent-AB公司, 美国)。氮吹仪: N-EVAPTM 112 (Organomation Associates公司, 美国)。实验室常规玻璃器具。

甲醇为色谱纯。二氯甲烷。乙醇。无水乙醚。硫酸-水(1+9)。氢氧化钠溶液(30 g/L)。氯化钠。饱和氯化钠溶液。水为超纯水。0.22 μ m针筒式微孔滤膜过滤器(有机相)。2, 4-D标准品溶于甲醇配成浓度为1mg/mL的储备液, 再稀释成适当浓度的标准品工作溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 提取和净化

称取混合均匀的试样10 g(精确到0.01g)于500 mL具塞锥形瓶中, 加15 mL无水乙醇、5 mL硫酸-水(1+9)、10 g氯化钠和100 mL二氯甲烷。加塞, 振荡提取30 min。通过快速滤纸过滤, 滤液收集于250 mL分液漏斗中, 用约50 mL二氯甲烷分三次洗涤锥形瓶及滤渣。合并洗液于分液漏斗中, 于上述分液漏斗中加25 mL氢氧化钠溶液和50 mL蒸馏水, 再加入10 mL饱和氯化钠溶液(此时水相pH应大于12, 否则应补加适量氢氧化钠溶液。对于极易乳化的样品可再补加约3g氯化钠), 振摇提取2 min。静置分层, 弃去二氯甲烷层。以25 mL二氯甲烷洗涤水层二次, 弃去二氯甲烷层。再以25 mL无水乙醚洗涤水层, 静置分层, 将下层水相转移至另一500 mL分液漏斗中, 弃去无水乙醚层。于上述水相中, 加入25 mL硫酸-水(1+9)进行酸化, 摇匀(水相pH应小于2, 否则应适量补加硫酸-水(1+9)), 然后分别用50 mL、25 mL、25 mL二氯甲烷提取水相。将二氯甲烷提取液收集于250 mL旋转蒸发瓶中。于50 $^{\circ}$ C水浴中蒸干。用2 mL流动相溶解, 经0.22 μ m微孔滤膜过滤后供液相色谱-串联质谱测定。

1.2.2 LC-MS/MS条件

HPLC 条件: 色谱柱为 Allure C18 柱, 100×2.1mm, 5 μ m; 流动相为甲醇-水 (40+60, V/V); 流速 0.2mL/min; 进样量 20 μ L。

MS-MS 条件: 电离方式 ESI-, 离子源温度 450 $^{\circ}$ C; 气帘气压力 30psi; 雾化气压力 12psi; 辅助气 1 压力 40psi; 辅助气 2 压力 15psi; 电喷雾电压-4500V; 入口电压-8V; 碰撞能量-16V; 碰撞室出口电压-10V。多反应监测方式 (MRM), 监测离子对 (m/z): 定性离子对 (218.6/160.9, 220.8/162.9), 定量离子对 (218.6/160.9)。

1. 2. 3 测定

根据上述条件, 以样品空白提取液稀释的标准溶液作定量曲线, 对被测样品进行测定。

2 结果

2. 1 线性

在优化的色谱质谱条件下, 对一系列不同浓度的标准溶液 (0.01 μ g/mL~1 μ g/mL) 进行色谱测定, 以标准溶液浓度为横坐标, 定量离子对的面积值为纵坐标绘制标准曲线, 线性方程为 $y=6.66\times 10^6X+5.48\times 10^4$, 相关系数为0.9997。

2. 2 检测限

2, 4-D的测定低限是根据添加法进行实测确定的, 为5 μ g/kg, 可满足各类进出口肉及肉制品残留限量检验的要求。以火腿罐头为例, 空白及添加检测低限的谱图见图1与图2。

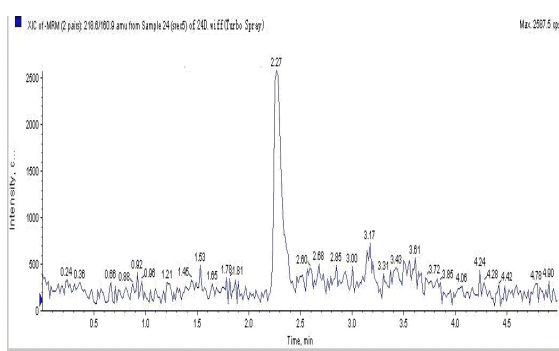
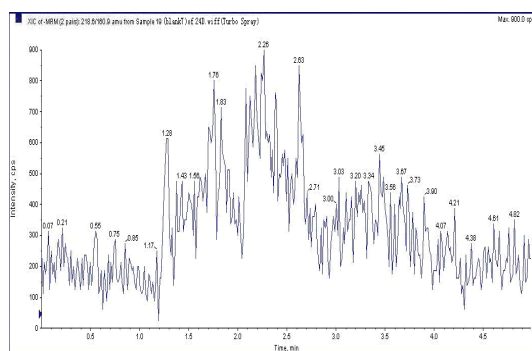


图1 空白火腿罐头样品的质量色谱图

图2 空白火腿罐头添加检测低限 2, 4-D的质量色谱图

2. 3 回收率与精密度

本方法采用标准加入法, 分别取空白的猪肉、鸡肉和猪肉罐头样品, 准确加入2, 4-D标准溶液, 分别制备添加浓度为5、10、50 μ g/kg的样品各10份, 对样品进行前处理, 并进行LC-MS/MS分析, 计算回收率和精密度, 结果得到所有农药的回收率均在60%~120%之间, 精密度也均小于15%, 回收率与精密度结果见表1。

表1 2,4-D的添加回收率和精密度

添加量 样品	5 μ g /kg		10 μ g /kg		50 μ g /kg	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
猪肉	90.75	11.86	94.39	5.81	90.16	5.40
鸡肉	84.05	12.15	99.34	2.45	99.13	4.75
火腿罐头	74.3	7.69	93.2	9.07	95.5	3.86

3 讨论

3. 1 前处理方法的选择及优化

前处理方法上, 参考美国《农药分析手册》(PAM)和进出口行业标准SN 0195-1993中的提取和净化方法, 把主要提取溶剂由三氯甲烷更换为二氯甲烷。两者的提取效率接近, 而二氯甲烷的毒性比三氯甲烷要低得多。

由于采用液质质方法检测,就省却了原方法的衍生化过程,改为溶解后直接进样,节省大量处理时间。

3.2 质谱条件的优化

因为2,4-D的准分子离子[M-1]-经二级碰撞后仅产生一个丰度较强的子离子(即Q3)(见图3),这就要求每个化合物分别选择两个母离子(即Q1),才能满足4个鉴别点的要求。由于2,4-D分子含有2个C1原子,利用C1同位素的丰度比,选择了[M+2-1]-作为另一个Q1,对Q1进行二级碰撞,找到其对应的Q3(图4)。

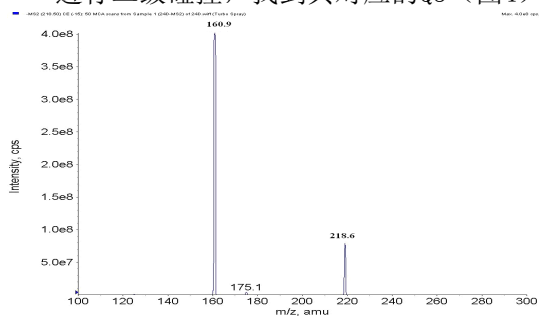


图2

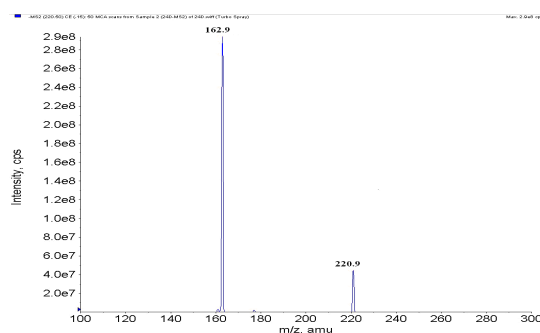


图3

3.3 结论

本研究建立的利用 HPLC-MS-MS, ESI 负离子化技术,以 MRM 方式检测肉及肉制品中 2,4-D 残留的方法,完全可以满足肉及肉制品中的残留限量要求,具有应用价值。

参考文献:

- [1] 古珑,许泓,林安清,唐丹舟. [J].现代仪器 2005,4(11): 52-55
- [2] V. Desauziers, C. Boucharat and P. Le Cloirec 2, Ion-exchange extraction of organic acids in water samples. Study of the influential factors and interactions [J], Analisis, 1998, Vol.26, 294-300
- [3] SN0195-93, 出口肉及肉制品中 2,4-滴残留量检验方法[S]
- [4] The European Commission. COMMISSION DECISION of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results [J]. Official Journal of the European Communities, 2002, L221:8-36

Determination of 2, 4-D residues in meat and meat products by

LC-MS/MS

HE Jia, XU Hong, LIN An-qing, ZHANG Man, WU Yan-hui, ZHANG Jun

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300458, China)

Abstract: The 2, 4-D residues and its Na salts are extracted from the tissue with dichloromethane under acidified condition, then transferred into alkaline solution. The alkaline solution is washed with organic solvents and acidified, 2, 4-D is then reextracted with dichloromethane. After the dichloromethane evaporated, the residues is resolved by methanol and determined by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The electrospray (ESI) negative mode detected by MRM is used for MS-MS. The optimization of analytical conditions of HPLC and analytical parameters of MS-MS are performed. The detection limit by this method is 0.005mg/kg. The linearity, recovery rate and precision meet the rules of the residue analysis of pesticides.

Key words: HPLC-MS-MS; Residue analysis; 2,4-D

DMI-GCMS 快速测定土壤中 16 种多环芳烃

孙碧霞¹, 郭德华², 丁卓平¹, 冀峰³, 董吉川², 姚劲挺^{3*}

(1.上海海洋大学, 上海 201306; 2.上海出入境检验检疫局, 上海 200135;

3.岛津国际贸易(上海)有限公司, 上海 200052)

本实验采用先进的OPTIC3多功能进样口DMI(复杂基质进样)功能结合气相色谱-质谱联用技术, 直接将土壤样品不经任何前处理直接进样分析其中的16种多环芳烃。结果表明, 土壤样品中16种多环芳烃的含量为0.08~5.10mg/kg。同时, 与微波萃取-SPE提取净化处理的土壤样品检测结果比较, 除芴、蒽和二苯并[a,h]蒽外, 其他PAHs的检出浓度在两种方法下较为接近。由此可见, DMI-GCMS可以作为土壤等样品中多环芳烃的有效筛查工具。

1 引言

多环芳烃(PAHs)是一类含有2个或2个以上苯环的芳香族化合物, 既可以来源于各种人为活动, 也可能由自然过程产生, 因此在大气、水体和土壤等各种环境介质中及生物体内广泛存在。自Blumer1961年首次报道土壤中普遍存在PAHs以来, 人们对各种土壤中的PAHs进行了较多研究; 特别是1979年美国环保署1979年将16种PAHs列为优控污染物。由于它们大都具有较强的毒性和潜在的致癌性, 可能会给人类及生态环境带来健康风险, 更是引起了广泛关注。多环芳烃是具有强烈的憎水性, 进入土壤后很难降解并积累起来。研究表明, 土壤作为一种重要的环境介质, 是PAHs重要的汇集源。

由于环境介质尤其是土壤的基体复杂, 所含干扰物质多, 常规分析方法难以获得令人满意的检测结果, 因此需采用适当的样品进行前处理技术以达到环境分析工作的要求, 同时也决定其前处理过程操作较为复杂。文献报道的前处理方法有液液萃取、索氏提取、超声提取法、固相萃取、固相微萃取、超临界流体萃取、微波辅助萃取、加速溶剂萃取等^[1]。以上提取方法都需要后续的净化步骤去除其中的干扰杂质, 耗时耗力。

ATAS/GL Sciences公司的OPTIC 3多功能进样口具有大体积进样、冷/热进样、热裂解及复杂基质进样(Difficult Matrix Introduction, DMI)等功能。其中, DMI功能设计的初衷是减少或者不需要样品前处理过程。

如图1所示, DMI功能的具体操作为: 称取一定量的标样或样品于DMI微量瓶中, 放入玻璃衬管, 特殊设计的进样口(Linex, 自动衬管更换装置)可以自动打开进样口头部并将装有样品的衬管放入进样口, 再自动关闭进样口, 之后进样口程序升温进行分析。可见, DMI进样分析所需样品量小, 且对样品不需要前处理或仅需简单处理即可。目前, 已有报道表明DMI被用来进行烟丝中尼古丁的快速分析、水果类婴儿食品的农残分析、头发中药物分析测定等^[2,3]。

US EPA 8275a方法采用热提取-气质联用(Thermal Extraction-GCMS)方法分析土壤、污泥和固体废物中的PAHs和PCBs等半挥发性物质^[4]。以此为依据, 本实验中采用OPTIC3多功能进样口, 直接将风干磨细的土壤样品不经任何前处理步骤以DMI方式进样, 再配合气相色谱-质谱联用仪对土壤中的PAHs测定进行了初步探讨。

*通讯作者: 姚劲挺, 男, 籍贯中国浙江, 岛津国际贸易(上海)有限公司, 液相高级应用工程师。E-mail: sshyjt@shimadzu.com.cn

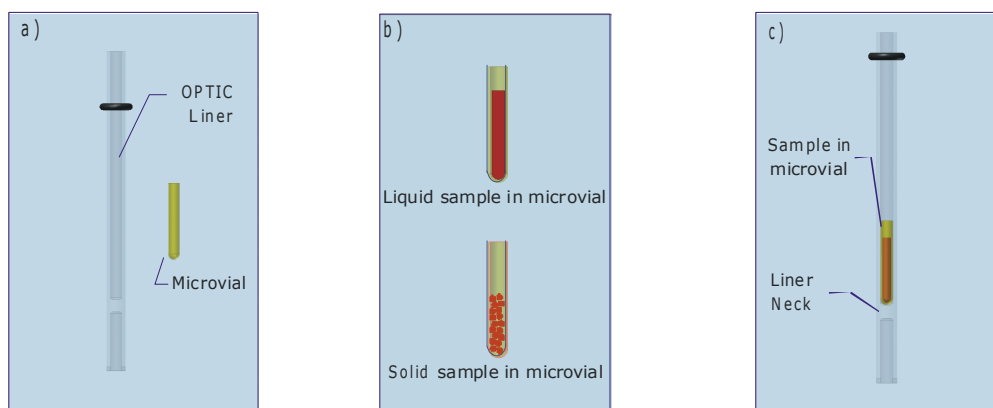


图1 DMI进样操作示意图

a) DMI衬管和微量瓶

b) 样品装填入微量瓶

c) 微量瓶放入衬管

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

仪器：Shimadzu GCMS-QP2010 Plus，OPTIC 3多功能进样口（GL Sciences）；Milestone Ethos1微波消解仪（Italy）；CNMBOND硅胶SPE小柱（500mg，3ml）。

16种PAHs标准品溶液：100mg/L，购自ACCuStandard公司（USA）

2.2 供试土壤

土壤为采自上海世博园区的表层土壤。样品在暗处风干后，磨碎过60目筛，于-18℃下保存备用。测定分析时直接称取约10mg（精确至0.0001g）样品至微量瓶中，将其放置入进样口衬管中即可开始分析。

标准土壤的制备：取上述磨细土壤置于350℃下烘烤2h后，取10mgDMI进样检测，无干扰物检出即为空白土壤。分别取PAHs标准溶液（100g/L）10、100、200μL准确加入1.0000g空白土壤中，加入0.05ml去离子水和适量丙酮使液面略微超过土壤，振荡30min使其混合均匀。等待丙酮挥干后，于50℃下烘干即为1、10、20mg/kg标准土壤。

2.3 分析条件

色谱柱：Rxi-5 MS 30m×0.25mm×0.25μm（Restek公司）

OPTIC 3进样口条件：初始50℃，以15℃/s升至320℃，并保持38min。

进样方式：不分流；进样时间：1.2min。

程序升温：50℃保持1.2min，以25℃/min至160℃，以5℃/min至300℃，保持5min。

质谱条件：离子源温度:200℃；接口温度：300℃；

SIM方式定量：定量离子见表1。

2.4 对比试验

为考察DMI-GCMS测定PAHs方法准确性，与采用常规检测方法测定结果进行了对比。常规检测方法参考EPA 3546和EPA 3530c对土壤样品进行微波萃取和SPE硅胶柱净化，GCMS检测（除进样方式外，其他分析条件同2.3）。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线

采用本实验条件，16种PAHs得到较好的分离效果，结果如图2所示。

16种PAHs分别1、10、20mg/kg标准土壤称取10mg以DMI方式装填入微量瓶中进样，得到各组分校准曲线。具体如表1所示。

对10mg/kg标准土壤以DMI方式重复进样3次，测得其中16种成分的面积RSD%见表1。

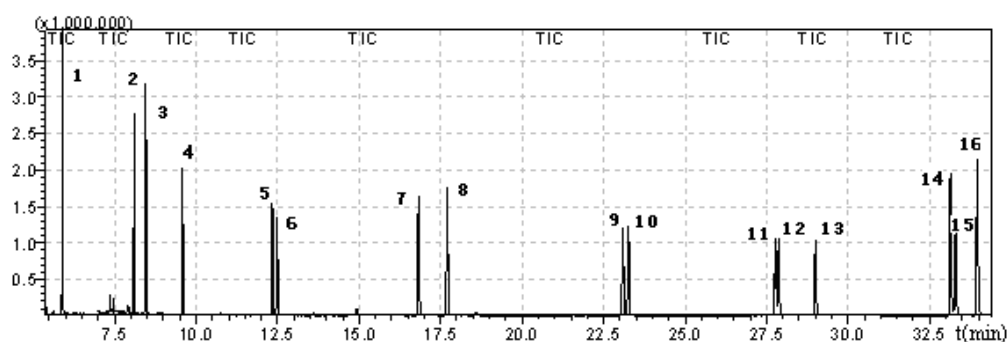


图2 SIM方式标品谱图

- 1、萘 2、芴烯 3、芴 4、芴 5、菲 6、蒽 7、荧蒽 8、芘 9、苯并[a]蒽 10、屈 11、苯并[b]荧蒽
12、苯并[k]荧蒽 13、苯并[a]芘 14、茚并[1,2,3-cd]芘 15、二苯并[a,h]蒽 16、苯并[g,h,i]北

表1 16种PAHs校准曲线相关系数和RSD%

化合物	保留时间(min)	目标离子	相关系数	RSD% (n=3)
萘	5.91	128	0.9964	20.7
芴烯	8.10	152	0.9993	4.57
芴	8.45	153	0.9869	16.5
芴	9.58	166	0.9981	24.4
菲	12.33	178	0.9983	8.88
蒽	12.48	178	0.9983	5.29
荧蒽	16.82	202	0.9983	5.08
芘	17.70	202	0.9993	6.98
苯并[a]蒽	23.08	228	0.9996	12.1
屈	23.26	228	0.9996	9.32
苯并[b]荧蒽	27.76	252	0.9995	15.2
苯并[k]荧蒽	27.86	252	0.9945	12.2
苯并[a]芘	29.00	252	0.9992	13.3
茚并[1,2,3-cd]芘	33.13	276	0.9992	7.61
二苯并[a,h]蒽	33.29	278	0.9992	1.81
苯并[g,h,i]北	33.95	276	0.9992	7.67

3.2 样品分析结果

土壤中分析结果表明, DMI-GCMS和微波萃取-SPE净化-GCMS两种样品处理方式对16种PAHs均有检出, 具体含量见表2。除芴、蒽和二苯并[a,h]蒽外, 其他组分的检出浓度在两种测定方法下较为接近。可见, DMI-GCMS可以用来对土壤中的多环芳烃类物质进行定性乃至定量检测。在快速筛查工作中, 由于不需要繁杂的样品前处理过程, 本方法具有较为广泛的应用前景。

表2 DMI和微波萃取两种方式下土壤中PAHs检测结果

化合物	DMI-GCMS (mg/kg)	微波萃取-SPE-GCMS (mg/kg)
萘	0.22	0.84
芴烯	0.08	0.17
芴	0.32	0.21
芴	1.91	0.22
菲	1.59	2.33
蒽	2.09	0.49
荧蒽	1.90	3.97
芘	2.23	4.16
苯并[a]蒽	2.84	2.53
屈	5.08	3.69
苯并[b]荧蒽	5.10	5.24
苯并[k]荧蒽	2.57	1.99
苯并[a]芘	3.93	3.17
茚并[1,2,3-cd]芘	3.19	2.87
二苯并[a,h]蒽	1.72	0.59
苯并[g,h,i]北	4.10	3.45

3.2 结论

采用OPTIC 3进样口DMI进样技术, 结合GCMS气质联用仪, 不需要对样品进行前处理即可进行初步的分析筛查, 大大缩短了样品分析时间和节省了样品前处理过程中的溶剂消耗。

参考文献

- [1] 何燕, 冯琳. 2007. 多环芳烃的样品前处理技术研究进展 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 24(03): 1-5.
- [2] Cajka T, Maštovská K, Lehota SJ, et al. 2005. Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues [J]. J. Sep. Sci. 28: 1048-1060.
- [3] Wainhaus SB, Dagan S, Miller ML, et al. 1998. Fast drug analysis in a single hair [J]. J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 9: 1311-1320.
- [4] US EPA, 1996. Semivolatile organic compounds (PAHs and PCBs) in soils/sludges and solid wastes using thermal extraction/GCMS (TE/GC/MS).

离子阱-飞行时间串联质谱快速筛查蔬菜中 189种农药残留

孙碧霞¹, 郭德华², 丁卓平¹, 冀峰³, 董吉川², 姚劲挺

(1. 上海海洋大学, 上海 201306; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135;

3. 岛津国际贸易(上海)有限公司, 上海 200052)

目前应用于蔬菜中多农药残留检测的方法是气质联用(GC-MS),但是随着农药种类增多、极性差异较大,很多农药不适合用气质联用的方法检测,需采用液质联用仪。液质联用主要采用三重四极质谱、四极杆串联飞行时间质谱等,而采用IT-TOF检测的方法至今没有报道。三重四极杆质谱仪方法局限于对已知目标成分的分析,需要有相应的标准品并建立多反应离子监测的分析方法,方法开发烦琐且耗时较长。其低分辨率和低质量数准确度的缺点导致复杂基质样品分析易产生干扰。四级杆飞行时间串级质谱具备高分辨率和高质量数准确度的特点,但是只能进行二级质谱分析,因此化合物分子式预测结果不确定性大,对复杂裂解规律的推导比较困难。此外,QQQ和Q-TOF对非目标化合物的检测和未知物的定性分析则不能完全胜任,无法对样品进行筛查检测。随着法规的日益严格,要求检测的食品污染物数量越来越多,传统方法已经无法满足这种高通量筛查的要求。对于突发事件等应急检测,在没有标准品和无法在短时间内优化方法的情况下,LCMS-IT-IOF具备高分辨率和高质量数准确度的特点以及多级质谱功能(最多可到十级),可为未知物分析提供有效的解决方案。

本文建立了一种以含1%乙酸的乙腈提取、Carbon GCB/PSA SPE柱净化、离子阱飞行时间串联质谱(LCMS-IT-TOF)测定蔬菜中189种农药的方法。IT-TOF高灵敏度、高分辨率、高质量数准确度、及可行的线性范围,在复杂基质多残留检测应用领域具有光明的前景。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 超快速液相色谱和离子阱飞行时间串联质谱(LCMS-IT-TOF)(日本Shimadzu公司);电子分析天平(精度为0.0001g,德国SartoriusME公司);均质器;固相萃取装置;氮气浓缩仪(美国Organom Associates公司);Mili-Q高纯水发生器(美国Milipore公司);Carbon GCB/PSA SPE柱(安谱公司),规格200/200mg或250/200mg,3mL。

1.1.2 试剂 189种农药标准品均购买于日本关东试剂公司;乙腈、甲醇(农残级);冰乙酸(分析纯);无水硫酸钠(分析纯),在650℃下灼烧4h、置于干燥器中备用;纯水,Mili-Q超纯水仪制备得到;乙酸铵(质谱级);所有试剂和样品都需过滤膜。

1.2 标准品配制和保存

标准储备溶液:分别准确取适量的各组农药标准品混合并用甲醇稀释使所有农药浓度10μg/mL,-18度下可保存6个月。

混合标准工作溶液:将农药标准储备溶液逐级稀释,配置成5、10、25、50、75、100、250μg/L的系列标准溶液。

1.3 仪器条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Shimadzu Shim-pack XR-ODS II(2.0mm I.D.×75mm L.,2.2μm);流动相:A相-含10mmol/L乙酸铵的水,B相-含10mmol/L乙酸铵的甲醇;流速:0.4mL/min;梯度洗脱程序:0→0.25min,15%B→40%B;0.25min→0.88min,40%B;0.88min→1.50min,40%B→50%B;1.50min→2.00min,50%B→55%B;2.00min→8.00min,

55% B→95% B; 8.00 min→10.00 min, 95% B; 10.10 min→12 min, 15% B; 柱温: 40 °C; 进样量: 2 μ L。

1.3.2 质谱条件 离子源: ESI, 正负离子同时采集; 采集范围: m/z 150-900, 加热模块温度: 200 °C; CDL 温度: 200 °C; 雾化气流速: 1.5 L/min; 干燥气体压力: 100.0 kPa; IT 真空度: $1.8e^{-002}$ Pa, TOF 真空度: $2.0e^{-004}$ Pa, 离子源电压: 正离子模式+4.5 kV, 负离子模式-3.5 kV; 检测器电压: 1.7 kV; 质量数校准方法: 自动调谐优化电压, 外标法校准质量数。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取 准确称取 10.0 克 (精确至 0.01 g) 样品置于 25 mL 具盖离心管中, 加入含 1%乙酸的乙腈 15 mL, 30000 r/min 均质 2 min, 40000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 残渣加入含 1%乙酸的乙腈 15 mL 洗涤两次, 合并入 25 mL 的离心管中, 加入 NaCl 3.5 g、磷酸氢钾缓冲溶液 (pH=7) 2 mL, 振荡 4 min, 40000 r/min 离心 8 min, 取上清液过适量的自制无水硫酸钠柱, 并用 250 mL 的梨形烧瓶收集, 于 40 °C 水浴中旋转蒸发浓缩至近干, 乙腈-甲苯 (3: 1) 溶解残渣, 定容 3 mL 待净化。

1.4.2 固相萃取复合柱净化 将 Carbon GCB/PSA SPE 柱先注入乙腈-甲苯 (3: 1) 混合溶液 10 mL 活化, 舍弃流出液, 上样, 乙腈-甲苯 (3: 1) 混合溶液 10 mL 洗脱, 氮吹至干, 用甲醇定容至 1 mL, 在混合器上混匀 1 min, 过膜待测。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂对回收率的影响

乙腈是多农药残留通用的提取液, 但考虑到 189 种农药中大部分农药偏酸性, 本文采用乙腈、1%甲酸乙腈、1%乙酸乙腈、2%乙酸乙腈四种提取液分别提取, 结果发现 1%乙酸乙腈提取最佳。

2.2 净化方式对回收率的影响

蔬菜中含有大量的色素等杂质, 为了除去杂质, 本实验采用 GPC、固相萃取小柱 Carbon GCB/PSA SPE 柱、Waters 的 QuEChERS 柱进行比较, 结果发现 GPC 萃取方法虽较省人力、重现性好, 但处理样品较耗时、且在颜色较深的样品中去色素效果不好, 如紫苏叶、菠菜、蒜等; Waters 的 QuEChERS 柱操作简便, 但去色素效果差、重现性不好; Carbon GCB/PSA SPE 小柱较 GPC 省时, 且可根据蔬菜色素含量灵活使用不同活性炭含量的小柱、重复性好, 因此采用 Carbon GCB/PSA SPE 小柱。

2.3 进样量、提取离子对离子强度的影响

Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 柱是超快速色谱柱, 进样量常用范围为 1~4 μ L, 本实验分别对 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L 进样量考察, 2 μ L 进样量的提取离子流图中发现大部分离子峰的信号明显比 1 μ L 进样量强, 考虑到高进样量可能会引起峰展宽, 最终采用了 2 μ L 的进样量。离子源是正负模式同时采集, 农药的极性各异, 采用的离子模式也需不同。大部分农药在 $[M+H]^+$ 模式下有强峰, 10 种农药需采用 $[M-H]^-$ 模式, 如: 溴苯腈、双氯氰菌胺、氟虫腈、碘苯腈、异菌脲代谢物、敌草胺、消草磺灵、敌稗、虫酰肼、特草定。另些农药在 $[M+H]^+$ 或 $[M-H]^-$ 模式下, 离子峰很小或甚至没有, 只在 $[M+NH_4]^+$ 或 $[M+Na]^+$ 模式下才有强峰。如: 农药得灭克、氟丙嘧草酯、醚菊酯、乙氧呋草黄为 $[M+NH_4]^+$ 模式, 苯酮唑、醚菌酯为 $[M+Na]^+$ 模式。

2.4 线性关系与检出限

在最佳液-质分析条件下, 配制 5、10、25、50、75、100、250 μ g/L 的系列混标进行测

定，以峰面积(y)对质量浓度(x)做标准曲线，重复5次取平均，保留时间和相关系数见表1。结果表明：农药在5~250 µg/L的线性范围内线性良好（除了特草定、双氯氰菌胺线性范围为10~250 µg/L），且相关系数均高于0.991，以3倍信噪比计算本实验各种农药的定出限(LOD)检测限，检出范围为0.02 µg/kg~17.12 µg/kg，除了氟乐灵、特草定、双氯氰菌胺3种农药外，其余186种农药残留检出限都小于5 µg/kg。

*表1: 189种农药的保留时间、定量离子、相关系数(γ)、检出限(LODs)、及西兰花基质加标两个水平的平均回收率和相对标准偏差(RSDs)

No	Pesticide	γ	LOD (µg/ Kg)	Spiked level is 5 µg/kg		Spiked level is 10 µg/kg		No	Pesticide	γ	LO (µg/ Kg)	Spiked level is 5 µg/kg		Spiked level is 10 µg/kg	
				Recovery/% (n=6)	RSD/% (n=6)	Recover y/% (n=6)	RSD /% (n=6)					Recove ry/% (n=6)	RSD /% (n=6)	Recover y/% (n=6)	RSD /% (n=6)
1	氧乐果	0.999	0.90	42.65	15.59	64.03	21.37	31	麦草氟甲酯	0.998	0.9	60.81	20.1	65.34	11.3
		5								4	3	7		8	
2	得灭克	0.992	0.44	54.93	24.00	68.50	9.43	32	腈菌唑	0.996	4.7	104.55	18.3	98.01	15.8
		1								7	5	4		5	
3	阔草清	0.997	0.21	35.42	17.46	45.52	13.44	33	三唑酮	0.992	0.5	77.39	21.9	85.89	10.9
		0								5	5	3		0	
4	噻虫嗪	0.996	0.28	28.73	9.10	62.75	20.65	34	苯酮唑	0.991	2.4	77.75	20.7	84.15	7.83
		3								9	5	0			
5	久效磷	0.998	1.55	62.16	15.97	73.36	14.84	35	苄草隆	0.996	0.4	65.75	19.5	71.90	8.84
		6								3	7	4			
6	甲磺隆	0.995	0.13	50.00	17.66	53.15	14.04	36	草氟醚	0.997	0.5	68.08	10.0	70.83	9.48
		3								9	1	7			
7	噻磺隆	0.994	0.52	55.03	16.98	63.41	19.99	37	Z-甲基毒虫畏	0.998	0.3	55.36	16.2	71.02	9.12
		6								9	5	4			
8	倍硫磷	0.999	1.81	66.43	22.33	82.94	11.29	38	枯草隆	0.993	0.3	67.80	18.4	71.43	7.71
		1								4	0	2			
9	吡虫啉	0.998	0.64	44.12	19.51	72.01	13.23	39	丙森辛	0.995	0.5	71.12	13.8	75.17	10.5
		6								1	1	6		7	
10	双氟磺草 胺	0.999	0.18	66.02	10.91	84.70	16.93	40	异恶唑磷氧化	0.993	0.9	54.63	10.0	60.95	8.65
		3								7	4	7			
11	绿磺隆	0.995	0.22	80.06	16.16	99.34	20.38	41	氟丙噻草酯	0.997	0.4	42.69	10.5	61.03	14.8
		5								0		3		3	
12	醚磺隆	0.998	0.10	65.76	9.55	122.00	19.83	42	噻菌胺	0.995	1.1	58.25	18.6	65.11	17.0
		6								5	8	8		5	
13	啶虫脒	0.991	3.54	75.06	18.16	94.28	18.03	43	扑草净	0.999	0.7	68.52	17.4	54.46	6.36
		2								3	7	2			
14	溴苯腈	0.998	1.78	40.90	18.86	38.90	18.64	44	E-啶斑肟	0.995	0.1	62.38	19.5	65.63	22.5
		9								6	7	0		4	
15	乐果	0.995	0.47	54.92	20.92	65.99	13.98	45	甲氧噻草胺	0.998	0.1	57.29	16.9	62.42	22.1
		7								8	3	8		3	

16	杀草敌	0.996 6	0.18	56.90	17.20	74.20	18.84	46	苯噻草胺	0.999 5	0.2	15.7	17.0	63.08	71.85	4
17	啶嘧磺隆	0.999 3	0.11	92.00	15.37	119.08	16.57	47	硅氟唑	0.999 7	1.9	18.3	13.5	49.00	64.03	9
18	醚苯磺隆	0.993 4	0.23	67.15	20.65	83.21	13.22	48	消草磺灵	0.999 1	1.4	18.8	12.3	98.36	95.74	5
19	氧化萎锈 灵	0.997 7	0.28	69.35	18.83	84.38	14.91	49	甲草胺	0.996 9	0.9	11.1	16.8	69.25	65.96	0
20	苯磺隆	0.993 2	0.06	69.59	21.00	103.07	17.59	50	敌草胺	0.999 1	0.1	17.5	19.2	62.77	66.41	0
21	噻虫啉	0.997 7	0.84	58.14	15.35	78.82	12.87	51	灭菌唑	0.998 3	1.3	10.7	14.3	64.56	58.15	7
22	磷甲磺隆	0.994 3	0.33	82.24	22.80	121.81	15.79	52	双氯氟菌胺	0.993 3	17.	15.1	17.2	104.27	86.29	2
23	速灭磷	0.997 6	3.86	72.32	12.40	88.17	7.90	53	灭克磷	0.997 3	0.3	16.3	11.8	70.53	69.30	9
24	甲磺胺磺 隆	0.997 7	0.02	58.16	15.35	98.60	16.58	54	氟环唑	0.998 8	0.1	20.1	6.51	62.14	75.13	2
25	三环唑	0.992 5	0.75	72.55	10.96	82.81	14.16	55	异丙甲草胺	0.996 3	0.6	20.4	22.1	64.91	63.39	6
26	磺苯腈	0.998 2	0.85	44.56	17.78	45.98	20.38	56	氰唑磷菌胺	0.997 3	0.1	11.8	18.7	66.09	63.90	8
27	三氟吡啶 隆	0.997 7	0.08	77.53	8.88	105.20	17.20	57	Z-啶虱脲	0.996 3	0.3	14.9	11.0	61.60	45.21	1
28	磺草唑胺	0.998 5	1.34	27.45	19.38	31.22	20.31	58	氟硅唑	0.993 3	0.4	14.3	10.3	67.25	46.67	8
29	恶霜灵	0.998 8	1.14	46.92	17.46	53.03	7.31	59	苯线磷	0.996 5	0.2	15.5	15.9	58.11	56.07	8
30	噻苯咪唑	0.996 1	0.17	59.55	21.76	63.04	12.98	60	乙啶酚磷酸酯	0.996 1	0.3	20.0	6.45	49.87	44.18	9

*由于论文篇幅限制本表只收录了全部 189 种的前 60 种农药，如果需要详细的数据信息可同岛津公司分析中心联系

2.5 回收率与精密度

在空白西兰花基质中添加 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 2 个水平的 189 种农药的混合标准溶液，每个水平重复 6 次，计算添加平均回收率和相对标准偏差。结果如表 1：平均回收率为 10.62%~129.88%、相对标准偏差为 5.75%~30.10%。在添加水平为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的基质中有 188 种农药的 RSD<25%，在添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的基质中 174 种农药 RSD<21%。有 Z-啶螨酯、E-啶螨酯、解毒啉等少量农药平均回收率比较低且相对标准偏差比较大，可能是 189 种农药各极性差异大、互相干扰造成。

2.6 在各类蔬菜样品中的应用

经过实际样品验证，此方法同样适用菠菜、紫苏叶、西兰花、葱等蔬菜的多种农药残留的筛查。对西兰花、菠菜、紫苏叶、葱等 20 多批蔬菜进行检测，分别检出葱中含有仲丁威 9.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，甲氧噻草胺 4.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，氯苯嘧啶醇 10.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，氟丙啶草酯 14.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；菠菜中含有吡虫啉 52.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，紫苏叶中还有噻虫啉 8.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，倍硫磷 9.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，环磺隆 37.86

μg/kg。采用国家标准方法确证，所筛查到的农药确实存在且含量基本相符。

3 结 论

本文建立了蔬菜中189种农药的快速筛查方法。方法的检测限为0.02 μg/kg~17.12 μg/kg, 平均回收率为10.62%~129.88%，相对标准偏差为5.75%~30.10%。该方法上机12 min完成检测，快速方便，满足食品安全检验检疫机构筛查蔬菜中多农药残留的要求。

参考文献：

- [1] 孙碧霞, 郭德华, 丁卓平, 冀峰, 董吉川, 姚劲挺, 离子阱-飞行时间串联质谱快速筛查蔬菜中189种农药残留[J].分析测试学报, 在投。
- [2] 姚劲挺, 冀峰, 郝红元等, 离子阱飞行时间串联质谱快速筛查农产品中农药残留[J]检验检疫学刊, 2009, 5(19): 12-17。