



固相萃取 串联 并联应用
二维 辅助泵应用



DGLC-AC

双三元液相色谱应用文集

前言

高效液相色谱仪自 20 世纪 60 年代研发生产以来，现已逐步应用于药物分析、食品检测、环境监测、生命科学以及石油化工分析等领域，能初步定性与准确定量分析化学合成物质和天然产物。在近代液相色谱仪发展过程中，逐步研发出很多新型液相色谱相关技术，如亚 2 微米细粒径色谱柱，耐压超过 1000Bar 的超高效液相色谱仪，新型的电雾式检测器等等。同时，在现代色谱分析过程中，对分析方法的检出限要求越来越低，分析的基质越来越复杂，分析通量的要求也越来越高。因此，需要硬件和软件功能更为强大，色谱柱填料更为多样，检测器类型更为广泛的液相色谱系统来满足分析的需求。

本文集综合了赛默飞自 20 世纪 70 年代以来生产的多种类型的色谱柱，各种不同检测原理的检测器，以及获得过匹兹堡金奖的 DGP 3600 双三元多功能液相色谱仪，得到不同领域的应用资料与分析方法并汇总成以下几个方面：1) 双三元固相萃取应用实例；2) 双三元串联应用实例；3) 双三元并联应用实例；4) 双三元二维应用实例；5) 双三元辅助泵应用（双三元柱后衍生、与 CAD 或 MS 联用等）等，期望对相关的科研工作者以及色谱分析工作者有一定的参考与借鉴意义。

赛默飞应用中心 / 市场部

2013 年 3 月 5 号

目 录

| | |
|--|-----|
| 第一章 高效液相色谱介绍..... | 4 |
| 第二章 双三元在线固相萃取应用..... | 7 |
| 第一节 双三元液相色谱在线样品处理应用指南..... | 7 |
| 第二节 双三元液相色谱 - 浓缩净化应用实例..... | 17 |
| DGLC-01 在线柱浓缩 - 超快速液相色谱法测定水体中痕量甲萘威和呋喃丹..... | 18 |
| DGLC-02 在线固相萃取技术 - 高效液相色谱同时分析饮用水中的 9 种有机物及农残..... | 23 |
| DGLC-03 在线固相萃取 - 高效液相色谱法快速测定柑桔原料及其成品中多菌灵的残留量..... | 27 |
| DGLC-04 采用 Online SPE 液质联用法分析水体中的丙烯酰胺..... | 31 |
| DGLC-05 在线固相萃取 - 高效液相色谱法测定食用油中多环芳烃..... | 33 |
| DGLC-06 采用 Online SPE 液质联用法分析原料糖浆中 2-氨基乙酰苯 (2-AP)..... | 38 |
| DGLC-07 在线固相萃取检测鸡肉中的五种磺胺类药物 (LC-UV)..... | 42 |
| DGLC-08 在线固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定六味地黄丸中马钱苷和丹皮酚的含量..... | 48 |
| DGLC-09 在线柱净化 - 高效液相色谱测定复方甘草片中吗啡含量..... | 52 |
| DGLC-10 在线固相净化方法结合电雾式检测器测定黄芪及复方中黄芪甲苷的含量..... | 56 |
| DGLC-11 在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 紫外检测法测定纺织品中直链烷基苯磺酸盐 (LAS)..... | 61 |
| DGLC-12 在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 紫外检测法测定聚合物中偶氮二异丁腈 (AIBN)..... | 65 |
| DGLC-13 采用在线 SPE 与离线 SPE- 液质联用法分析化妆品中的 41 种糖皮质激素比较..... | 69 |
| DGLC-14 在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 质谱 - 质谱检测法测定鼠血浆中杀鼠灵..... | 76 |
| DGLC-15 NanoLC 实现样品预富集分离的两种方式 - 常规双泵系统 (DP) 和单泵系统 (SP)..... | 79 |
| 第三节 双三元液相色谱脱盐脱糖应用实例..... | 83 |
| DGLC-16 采用二维柱切换液质联用法对流动相进行在线除盐分析阿莫西林中有关物质..... | 84 |
| DGLC-17 采用二维柱切换液质联用流动相在线除盐分析头孢地尼中有关物质..... | 94 |
| DGLC-18 阴离子交换色谱与 ESI-MS 联用的方法纯化鉴定经自动脱盐的磷酸二酯酶酶解产物中 RNA 连接异构体..... | 104 |
| DGLC-19 用于质谱分析的在线固相萃取除盐方法..... | 110 |
| 第三章 双三元串联应用..... | 115 |
| 第一节 双三元串联应用指南..... | 115 |
| 第二节 双三元液相串联应用实例..... | 123 |
| DGLC-20 双三元串联快速分析盐酸雷尼替丁注射液有关物质..... | 124 |
| DGLC-21 双三元串联快速分析去乙酰毛花苷注射液有关物质..... | 127 |
| 第四章 双三元并联应用..... | 131 |
| 第一节 双三元并联应用指南..... | 131 |
| 第二节 双三元并联应用实例..... | 140 |
| DGLC-22 并联色谱同时分析盐酸去氯羟嗪和格列吡嗪..... | 141 |

| | |
|---|------------|
| DGLC-23 并联液相色谱测定核苷酸、黄酮样品 | 146 |
| DGLC-24 并联液相色谱 - 紫外测定饮用水中的爆炸物 | 149 |
| DGLC-25 SEC/IEC 并联色谱分析牛血清白蛋白、卵清蛋白和细胞色素 C | 155 |
| 第五章 双三元二维应用..... | 161 |
| DGLC-26 在线二维柱切换 - 高效液相色谱法同时测定婴幼儿强化奶粉中维生素 A、D3、E 的含量 | 162 |
| DGLC-27 二维液相色谱分析肿瘤组织中 AICA riboside 和 AICA ribotide | 167 |
| DGLC-28 二维液相色谱纯化和分析单克隆抗体 | 172 |
| DGLC-29 全自动在线固相萃取 - 二维高效液相与质谱联用法测定辣椒油的苏丹红 | 177 |
| DGLC-30 全离线二维液相色谱与质谱检测技术联用在峰产率最大化方面的研究 | 182 |
| DGLC-31 在线全二维液相色谱串联质谱分析刺五加提取物成分 | 190 |
| 第六章 辅助泵应用（双三元柱后衍生、与 CAD 或 MS 联用等） | 197 |
| 第一节 双三元柱后梯度补偿指南与应用实例..... | 198 |
| DGLC-32 采用柱后补偿液相色谱与电雾式检测器分析茶氨酸 | 202 |
| 第二节 双三元辅助应用实例..... | 206 |
| DGLC-33 柱后碘衍生法测定芝麻中的黄曲霉毒素 | 207 |
| 附录..... | 210 |
| DGLC 应用文集附录..... | 210 |

第一章 高效液相色谱介绍

高效液相色谱简介

高效液相色谱法又叫做高压或高速液相色谱、高分离度液相色谱或近代柱色谱，以液体为流动相，采用高压输液系统，是色谱法的一个重要分支。它是用高压输液泵将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，经进样阀注入待测样品，由流动相带入柱内，在柱内各成分被分离后，依次进入检测器进行检测，从而实现对待测成分的分析。高效液相色谱系统的组成包括溶剂、泵、进样器、柱温箱、色谱柱和检测器等。如图 1 所示。

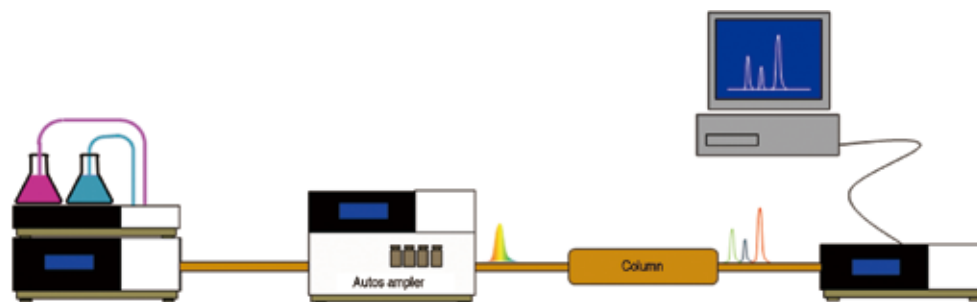


图 1 高效液相色谱系统

高效液相色谱法的来源与特点

高效液相色谱法 (HPLC) 是在 20 世纪 60 年代末，以经典液相色谱为基础，引入了气相色谱的理论，在技术上采用了高效固定相、高压输液系统和高灵敏度的在线检测器，从而发展起来的一种新型分离分析技术。随着科学和技术的不断改进与发展，目前已成为应用极为重要、广泛的分离分析手段。它摆脱了气相色谱的局限，几乎可以分析任何物质，具有分离效率高、分析速度快、应用范围广和操作自动化等特点。

液相色谱仪器

赛默飞 Ultimate 3000 系列高效液相色谱仪由泵、自动进样器、柱温箱和检测器四大部分组成，每一部件都有自己独特的特点。

泵

Ultimate 3000 系列有等度泵、二元梯度泵、四元梯度泵、双三元梯度泵和快速泵。

其中 Ultimate 3000 系列的双三元梯度泵是一种非常特殊的应用泵，其采用独特的双泵设计可以为许多应用提供有效地手段。双三元梯度泵的每个泵都可以是一个独立的系统，在变色龙软件的控制下分别可以同时控制三种不同的流动相进行复杂样品的分析，每个泵可以单独进行样品分析，也可以为一些特殊应用，如二维色谱和柱后衍生等同时在一个分析中使用。

Ultimate 3000 系列的快速泵是 Ultimate 3000 系列的泵的一个升级，对于前面介绍的二元梯度泵、四元梯度泵以及双三元梯度泵，Ultimate 3000 系列下都有相应的快速泵，可以将系统提升到快速液相水平。

自动进样器

Ultimate 3000 系列的自动进样器因为其创新、合理的设计，可以精确地为 nL 至 mL 级的样品进行进样。样品盘具有定时震动功能，可以保证长时间放置在样品盘里的样品溶液更加均匀。样品盘的 360 度转动功能可以有效地降低进样针的活动空间，使进样位置更加精确，独特的专利设计阀和温控系统，为客户进行大量样品测试和对温度变化敏感的特殊样品测试提供了有力的保障。

柱温箱

Ultimate 3000 系列的柱温箱不仅有常规温控系列，还有特殊的具有阀切换功能的温控系列，为 Ultimate 3000 系列的双三元液相色谱的一些特殊的应用提供了有力的支持，而且可以通过阀的不同配置，可以在不需要人为更换色谱柱的条件下实现不同色谱柱的样品分析。

检测器

液相色谱检测器可以分为通用型检测器和选择性检测器。通用型检测器是指可连续测量色谱柱流出物（包括流动相和样品组分）的全部特性变化；而选择性检测器是用以测量被分离样品组分某种特性的变化，这类检测器对样品中组分的某种物理或化学性质敏感，而这一性质是流动相所不具备的，或至少在操作条件下不显示。如紫外/可见光吸收检测器和荧光检测器等属于选择性检测器；示差折光检测器、电喷雾式检测器和蒸发光散射检测器等属于通用型检测器。

赛默飞独特的电喷雾式检测器是一种新型的，高灵敏度，重现性较好的检测器，它基于雾化检测器的原理，通过测定带电溶质的信号电流来得到目标物强度信息，不依赖于化合物的分子结构，具有更好的通用性，能检测大部分非挥发性和半挥发性的有机物。该电雾式检测器在 2004 年 10 月一经推出，就相继获得了仪器行业的最高荣誉，2005 年 PITTCON “撰稿人” 银奖和素有“发明领域的诺贝尔奖” 2005 年 R&D100 奖。

色谱柱

色谱柱是 HPLC 分离的核心，而对分离起决定作用的是色谱柱的填料颗粒和键合固定相。基于硅胶良好的物理性质，以硅胶为基质的填料是目前液相色谱柱中应用最广泛的。根据键合表面层的不同常用的有 C₁₈、C₈、NH₂ 和 CN 键合相色谱柱，也有一些针对某种特殊应用所开发的键合相填料，如 Acclaim surfactant 分析柱对表面活性剂有特殊的选择效应，Acclaim WAX、Acclaim WCX 及 Acclaim Trinity 等色谱柱同时具有反相 - 离子色谱功能对离子特性的化合物具有很好的选择性。但由于硅胶在高 PH 值条件下会溶解，一些聚合物填料的色谱柱成为硅胶基质填料的良好补充，大多数反相色谱用聚合物填料采用二乙烯苯交联聚苯乙烯制备，与离子交换树脂类似。赛默飞基于其在离子色谱领域多年的优势技术，具有很多聚合物填料的有特点的色谱柱，如用于核酸分析的 DNA PAC PA100。这类色谱柱一般可用于高 PH 值条件下，在钛系统液相上应用效果最佳。其他填料有石墨化碳、氧化铝和氧化锆等，如 Hypercarb 色谱柱，这类色谱柱基于其填料的性质对于目标化合物具有不同寻常的选择性。

分析工作者需要根据相应的目标化合物选择合适的色谱柱，当使用双三元液相时可以选择这些色谱柱较短规格的用作在线 SPE 色谱柱去除杂质保留目标物，与适合对目标物进行分析的色谱柱搭配使用。

流动相

目标物的保留行为是组分在流动相和固定相中不断相互作用的结果，在根据目标化合物选择合适的色谱柱之后，就要选择适合的流动相比例和组成。这里有广义上的反相流动相和正相流动相，反相流动相常用水、甲醇和乙腈；正相流动相常用正己烷、二氯甲烷和四氢呋喃等；两种流动相体系需要用异丙醇来过渡。目前反相流动相应用较多，尤其在使用 C₁₈ 色谱柱时。有时要根据化合物特性调整流动相的 PH 值改善峰形以及在流动相的水相体系里加入缓冲盐或离子对试剂，改变目标物的保留行为，从而达到分离测定的目的。

双三元液相色谱介绍

赛默飞双三元梯度系统作为 2006 年匹兹堡金奖产品，推出后受到国内外众多科研工作者的关注，并相继运用该仪器开发出了很多具有创新意义的方法，发表了很多有意义和影响力的文章。

双三元梯度泵采用独特的双泵设计，每一个泵都是一个单独的体系，都有各自独立的流动相比例阀和流动相进出系统，可以同时单独控制三种不同的流动相来进行复杂的样品分析。双三元梯度系统具有独特的阀切换系统，柱温箱部分放置的两个切换阀可以通过变色龙软件的控制相应的时间进行阀切换，从而实现流动相流路和色谱柱连接的不同组合切换。双三元液相色谱这种特殊的设计使其不仅可以实现常规应用，也可以完成一些特殊的功能，如：在线净化 SPE-LC 可用于全自动样品制备和分析；串联和并联使用，可获得工作效率的提高；2D-LC 可用于复杂样品的分离。还可以实现一些辅助的功能，如：柱后衍生应用、流动相梯度补偿等。

双三元液相具有常规液相、超高速液相系统 (RSLC) 和钛系统不同的色谱系统供客户选择，可以满足不同的分析需求。目前双三元液相已经在越来越多的领域得到广泛的应用，比如在食品领域三聚氰胺、多环芳烃和黄曲霉毒素的测定，药物领域复方中药和药物代谢研究，生物领域单克隆抗体的分析，化工领域一些复杂基质的样品的测定等，双三元液相均体现出了其独有的特点，提高了常规方法的灵敏度、稳定性和分析效率。

本文集试着选取了一些有代表性的应用，按照不同的功能特点展现给读者，尝试将双三元系统的技术特点、开发思路与实际应用结合起来与同行分享。

第二章 双三元在线固相萃取应用

第一节 双三元液相色谱在线样品处理应用指南

在色谱分析方法中，获得一致且准确的分析结果，样品前处理过程，如溶解，稀释，过滤等，是必不可少的。对于基质简单的样品（如合成化学品），则样品处理过程比较简单，操作方便，耗时短。但对于基质复杂的样品（如土壤、生物发酵液、天然产物），则前处理过程会很复杂（如粉碎、提取、富集、液液萃取等），操作繁琐，耗时长，存在安全隐患，因此不利于日常分析工作。对于复杂样品前处理，U3000 液相色谱可提供完美的整体解决方案。

当 U3000 液相色谱具有如下配置，则可以进行在线样品处理

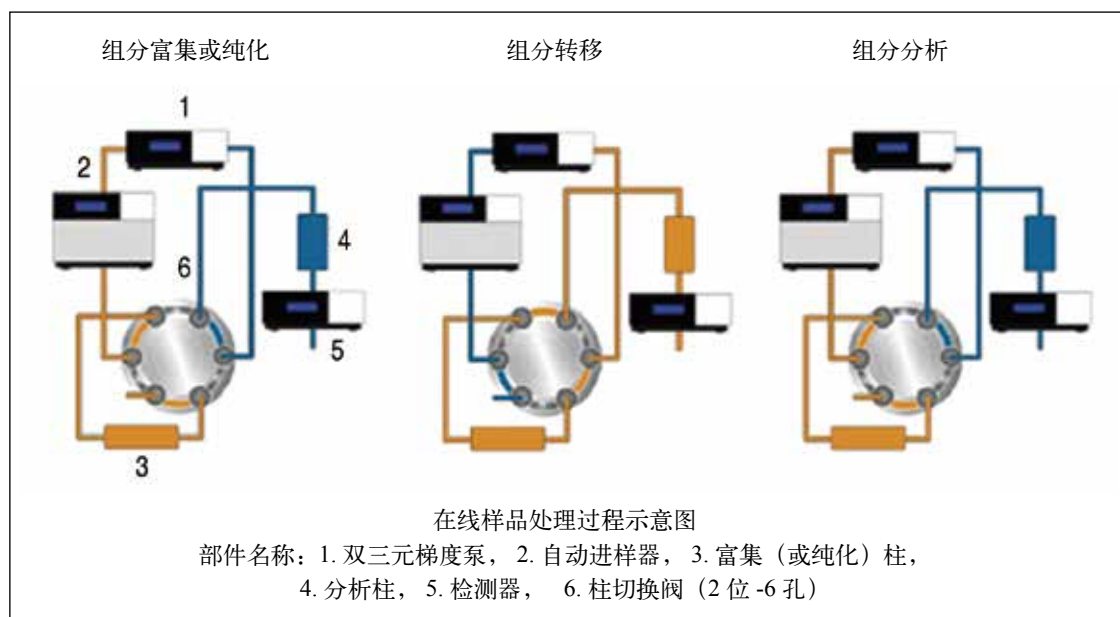
- 双三元梯度泵 (DGP-3600)
- 自动进样器 (WPS-3000 SL/TSL)
- 柱温箱 (TCC-3000)，配置有 2 位 -6 孔 (2-position-6-port) 或 2 位 -10 孔 (2-position-10-port) 柱切换阀
- 一根富集（或纯化）小柱和分析柱
- 一台检测器 (DAD, FLD, CAD, MSD)

同传统离线手工样品处理技术相比较，在线样品处理解决方案具有如下特点：

- 可以引入大体积的未经处理的样品溶液（如血浆，尿液，发酵液，环境水等）
- 自动对样品进行纯化或富集痕量组分，无需投入过多人力，可长时间自动运行（如过夜连续操作）
- 避免人工操作所带来的误差，方法重复性好，结果准确
- 耗时短，操作简便，成本低，工作效率高
- 最大程度降低人员操作所带来的危害和风险

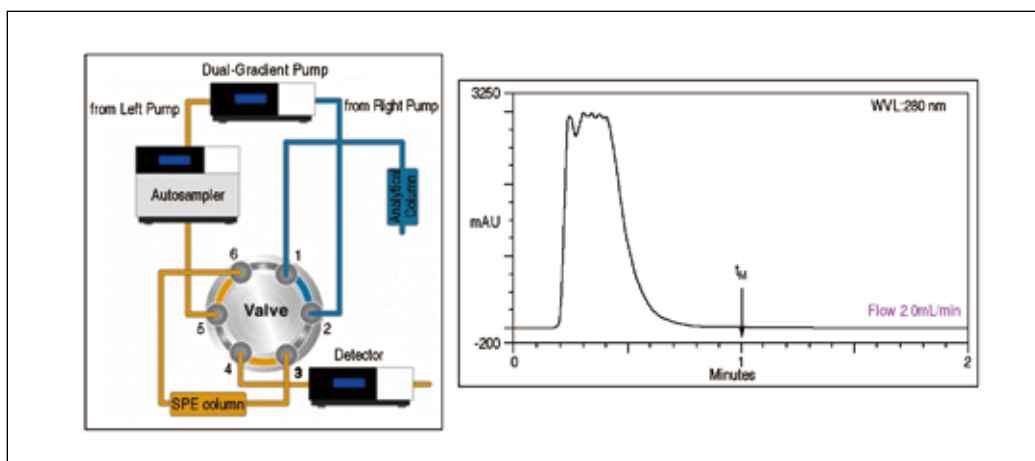
在线自动样品处理过程包括三个过程（如下图）：

- 1、样品组分由进样器与左泵流动相引入到富集（或纯化）上进行富集（或纯化），干扰物（或基质）则从柱上流出并排至废液收集器，分析柱处于清洗与平衡的过程。
- 2、目标组分由富集（或纯化）柱上转移至分析柱的过程。



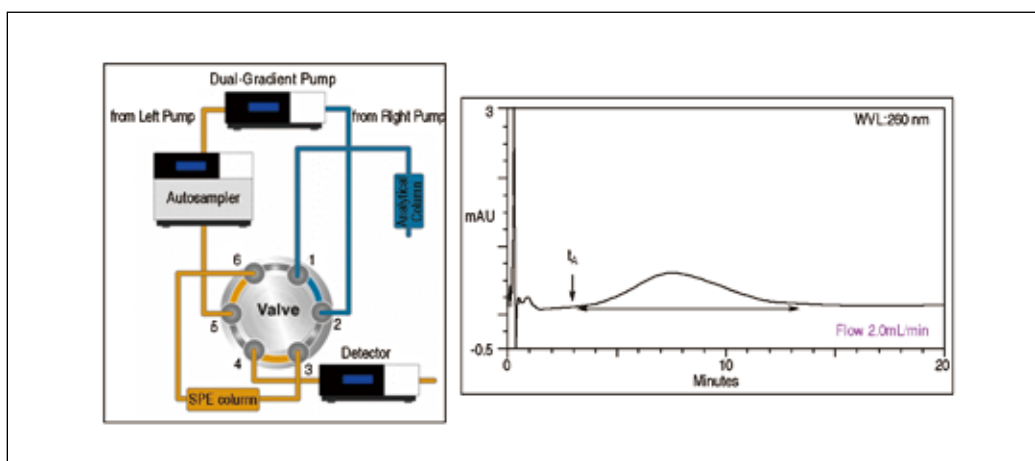
- 3、目标组分在分析柱上进行在线分离与定性（或定量）分析，富集（或纯化）柱则进行离线清洗和平衡的过程。
- 在线样品处理方法开发过程中，正确设置阀的切换时间对分析效果有着重要影响。通常要设置：1、基质流出时间 (t_M)，2、组分洗脱时间 (t_A)，3、组分转移时间 (t_T)

设置基质流出时间（如下图）：



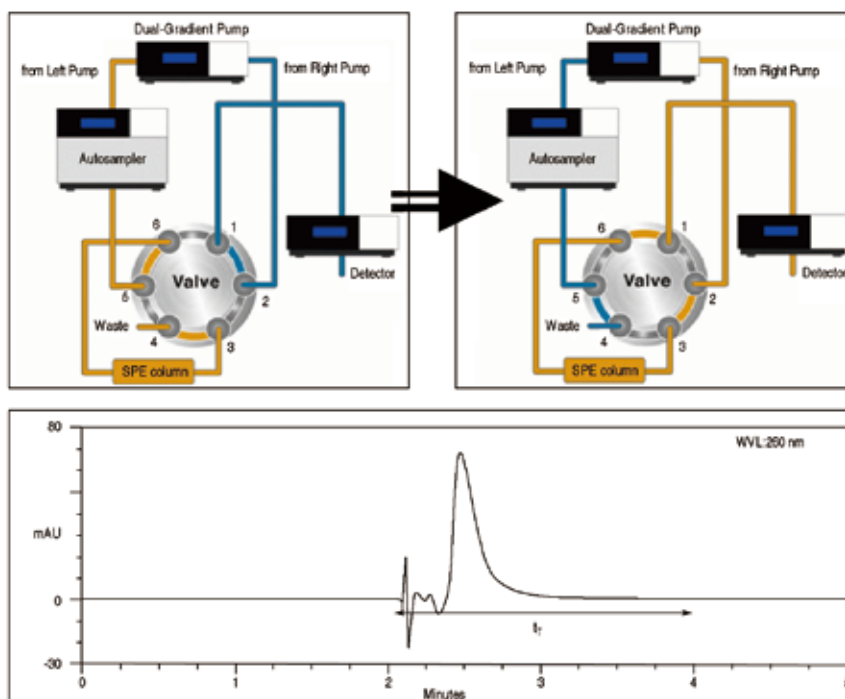
方法：将富集柱与检测器（如 UV）直接连接（切换阀位于 5-6 连接），设置左泵流动相条件，将样品由进样器引入至富集柱，由检测器上观测基线情况，如图所示，当基质流出后基线恢复到初始状态时（目标组分仍保留在富集柱上），该时间点则为基质流出时间。

设置组分洗脱时间（如下图）：



方法：将富集柱与检测器直接连接（切换阀位于 5-6 连接）。将组分标准品（浓度接近样品组分浓度）由进样器引入至富集柱，左泵流动相条件与设置基质流出时间方法中保持一致，观察组分流出并经过检测器所形成的信号响应，直至基线回复初始状态。在组分开始流出富集柱的时间点即为洗脱时间。可以看出，为保证结果准确，洗脱时间要长于基质流出时间。

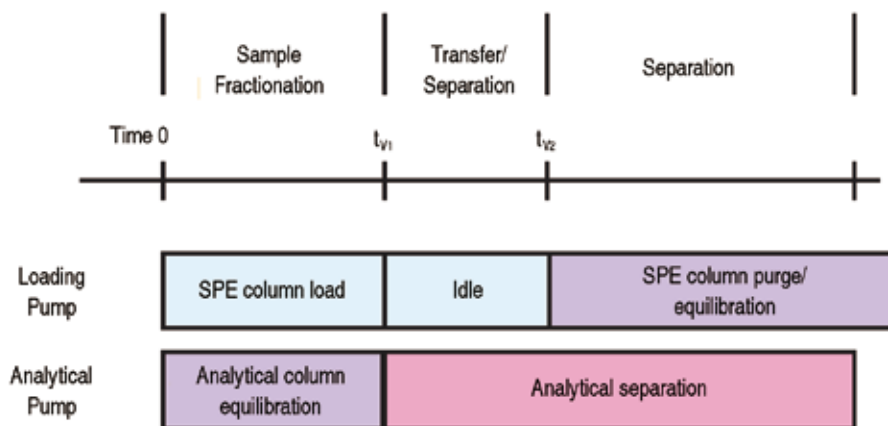
设置转移时间（如下图）：



方法：将分析柱与检测器直接连接（切换阀位于 5-6 连接）。将标准品溶液通过进样器引入至富集柱上，将柱切换阀由 5-6 连接转换为 1-6 连接（富集柱进行离线清洗和平衡），设置右泵流动相条件，观察标准品由富集柱转移至分析柱上并经检测器得到响应信号，直至标准品组分完全流出，检测器基线回复初始状态时，该时间点则为样品转移时间。

基于上述三个时间点的信息，运用变色龙 (Chromeleon®) 色谱管理软件中方法建立向导可以快捷准确地设置在线样品处理过程的阀的两次切换时间 (t_{v1} 和 t_{v2})，如下图所示

On-Line SPE-LC Column Switching Times

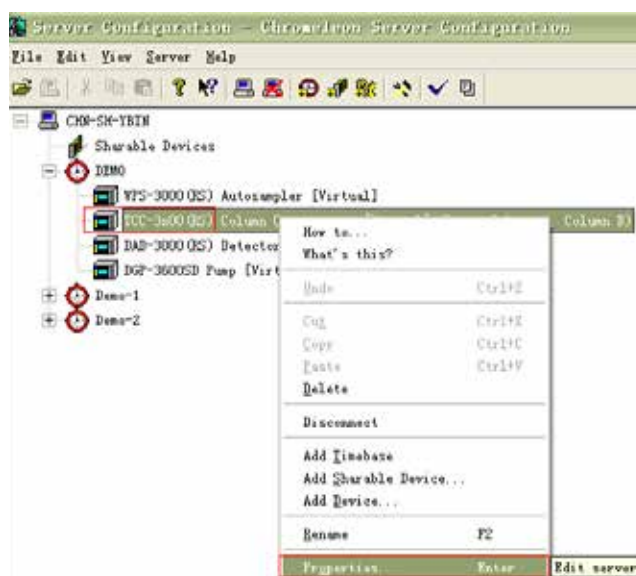


本例中将介绍在变色龙 (Chromeleon®, Ver.6.8, SR11) 色谱管理软件设置柱切换阀时间。

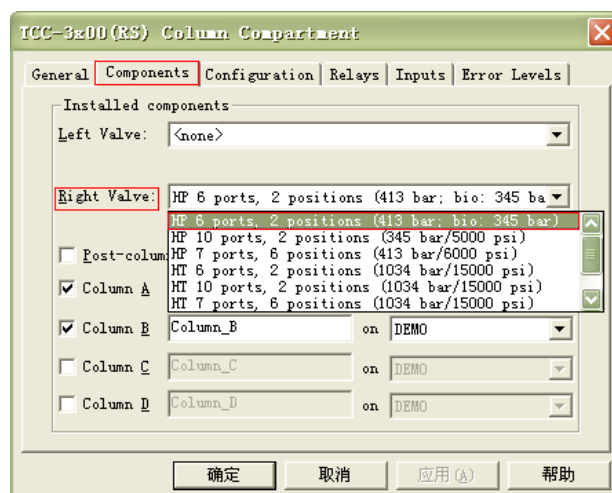
首先，在配置模块 (Server Configuration) 里确保柱温箱已配置有切换阀 (2 位 -6 孔或 2 位 -10 孔)，见下图



在打开配置模块后，选择相应的色谱系统 (Timebase) 中柱温箱部件，在工具栏上选择“编辑 (Edit)”下的“属性 (Properties)”选项 (或右键单击选择该选项)。本例中选择 Demo 系统并右键单击选择“属性”，如下图

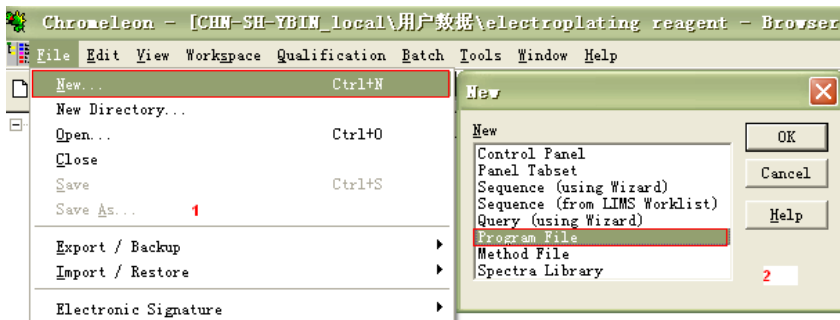


在柱温箱“属性”窗口中，选择“部件 (component)”栏，根据仪器实际配置 (左部或右部) 选择相应的柱切换阀和安装的两根色谱柱 (富集柱和分析柱)。本例中选择右部安装 2 位 -6 孔 (2-position-6-port valve) 和柱 A 和 B，如下图



上述设置完成后，保存设置并退出配置模块。

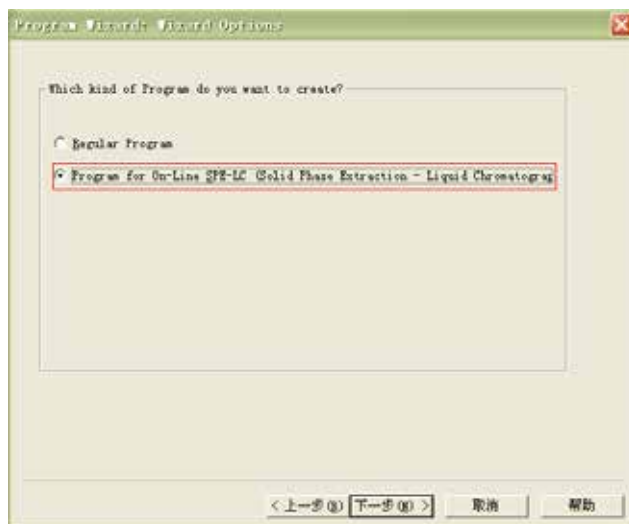
打开变色龙软件，在浏览器 (Browser) 窗口中，点击菜单栏中“文件 (File)”下“新建 (New)”工具，在出现的窗口中选择“新程序文件 (Program File)”，如下图所示



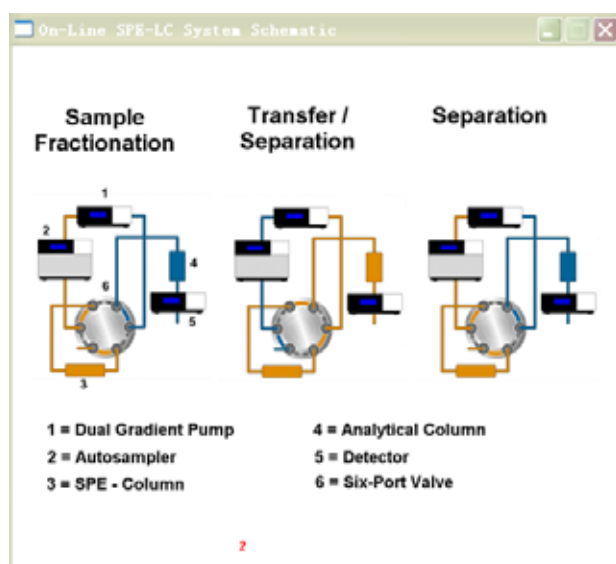
点击确认 (OK) 后，在出现的窗口中，选择相应的色谱系统。本例中选择 Demo 系统，如下图



点击“下一步 (next step)”，进行相应色谱配置。变色龙软件会基于仪器配置信息给出如下图中提示。本例中选择“在线样品处理 (Program for on-line SPE-LC)”选项



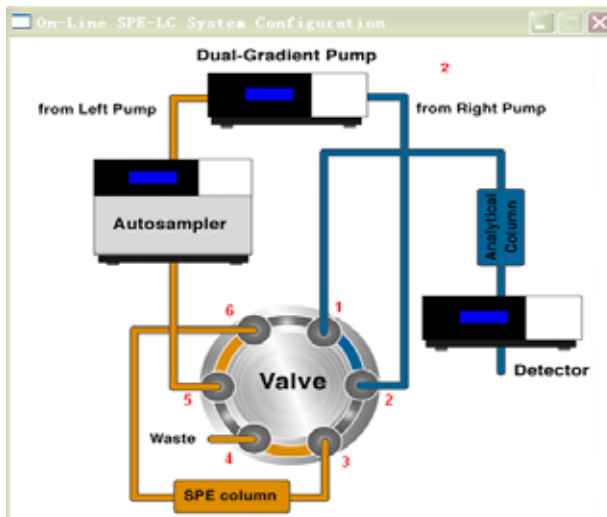
点击“下一步 (next step)”，出现如下对话框，其中图 1 为信息提示窗口，提示正确设置基质流出时间、切换时间和转移时间，图 2 为流程示意图，可以关闭该窗口而不会影响程序编辑



点击“下一步”，出现如下配置窗口和连接示意图（可关闭示意图而不影响程序编辑），继续对仪器进行配置



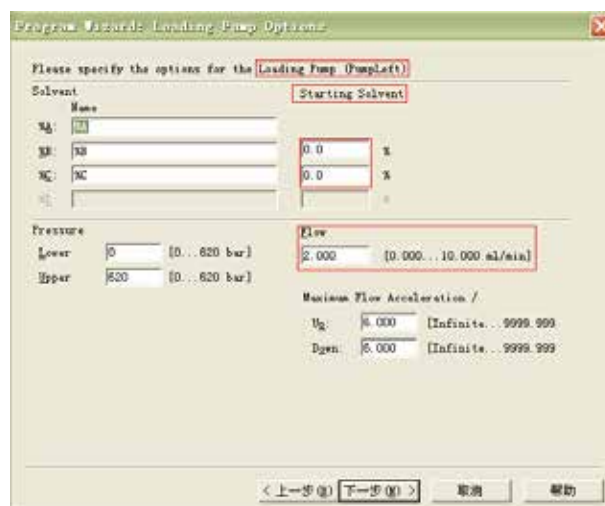
本例中将富集柱设为柱 A，分析柱设为柱 B，左泵用于样品富集（或纯化），右泵用于在线分析，切换阀位于柱温箱右侧，当柱切换阀处于 1-2 位相连时，样品由自动进样器引入至富集柱上进行富集，分析柱测处于清洗和平衡过程，如图 2 连接所示



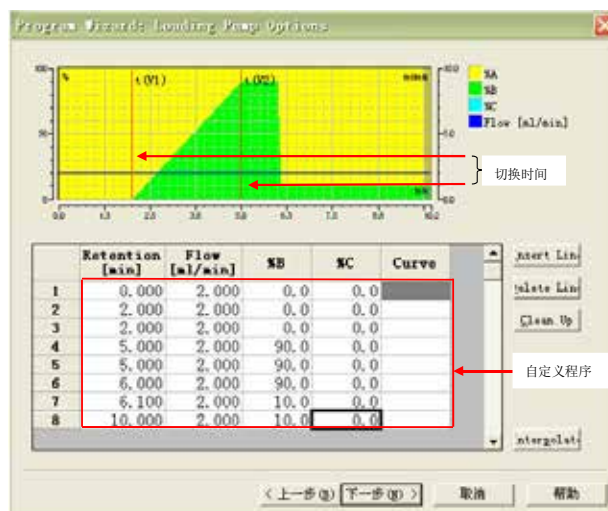
上述设置完成后，点击“下一步”，进行切换阀时间设置（跳过柱温和进样器温度设置），如下图

本例中设置基质流出时间为 1 分钟，组分流时间为 3 分钟，组分转移时间为 2 分钟，则软件自动计算两次切换时间，如图所示，第一次切换时间 (t_{V1}) 自 2 分钟开始组分由富集柱向分析柱转移，第二次切换时间 (t_{V2}) 为 5 分钟，此时组分完全转移至分析柱，切换阀又回复至最初上样状态，富集柱进行清洗和平衡以备下一次上样和富集。

点击“下一步”，进行上样泵（左泵）的设置，输入流动相的信息，如下图

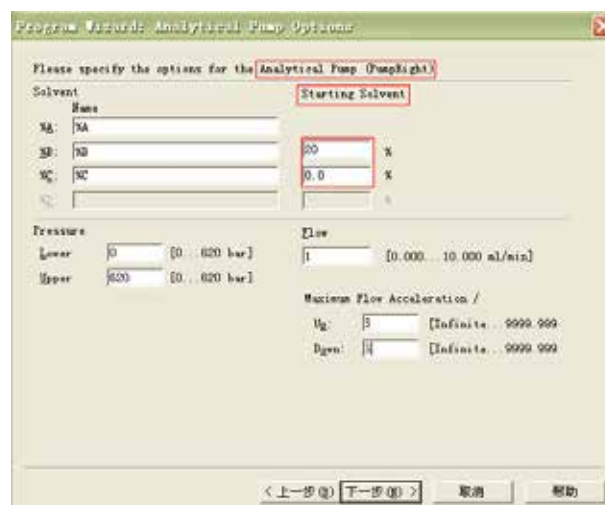


本例中设置左泵上样时流动相为100%A, 流速为2ml/min, 样品进入富集柱后在接下来的2分钟内进行富集(或纯化)。输入后, 继续点击“下一步”, 出现如下窗口

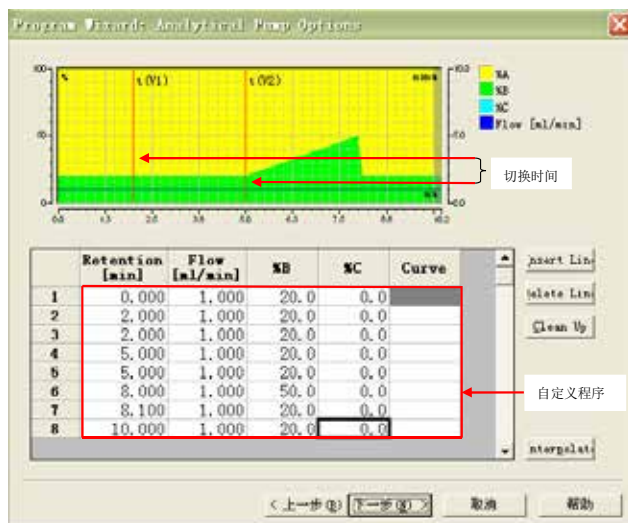


如图所示, 左泵上样、富集2分钟(t_{v1})后, 切换阀由5-6位连接转换至1-6位连接, 左泵流动相运行梯度将样品组分由富集柱转移至分析柱, 在5分钟(t_{v2})时切换阀回复至5-6位连接, 富集柱进行清洗和平衡。

继续点击“下一步”, 进行分析泵(右泵)设置, 如下图



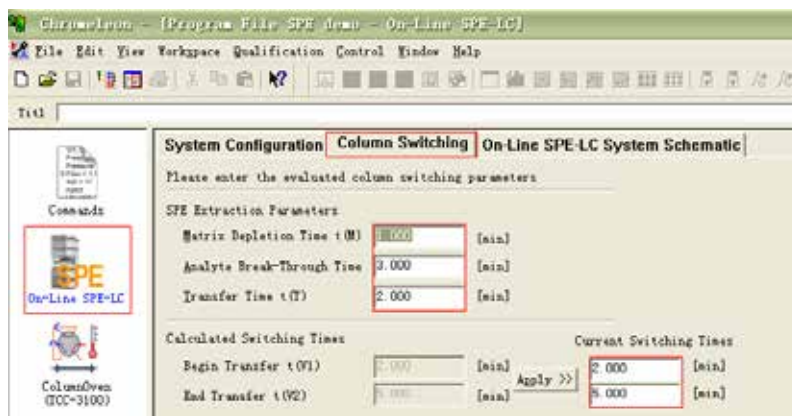
输入流动相信息，继续点击“下一步”，如下图



如图所示，在5分钟 (t_{V2}) 前，分析柱在右泵初始流动相条件下进行平衡，5分钟时，切换阀位于1-2位连接，右泵开始梯度进一步分离并对目标组分进行定性（或定量）分析，分析结束后进行清洗和平衡。

继续点击“下一步”，按照常规方法设置进样器和检测器等部件参数，直至完成编辑，保存方法至指定文件夹。在变色龙软件中打开所保存的仪器方法文件，可以查看各个模块的参数设置和修改相关设置，如下图

如查看本例所编辑方法文件中 SPE 模块的参数，只需点击左边向导栏的 SPE 模块。如需改动相关参数，则可以在图中可编辑区域进行修改。



第二节 双三元液相色谱 - 浓缩净化应用实例

DGLC-01 在线柱浓缩 - 超快速液相色谱法 测定水体中痕量甲萘威和呋喃丹

关键词：在线浓缩，甲萘威，呋喃丹，超高效液相色谱，双梯度

DGLC-01 Determination of trace carbaryl and carbofuran in water by online column enrichment-RSLC

Key words: Online enrichment, carbaryl, carbofuran, RSLC

引言

甲萘威和呋喃丹属于氨基甲酸酯类农药，是我国普遍使用的杀虫剂之一，主要应用于粮食、水果和蔬菜杀虫^[1]。相比于有机氯和有机磷农药，氨基甲酸酯类农药具有残效短、选择性强等特点，但是其进入人体后会抑制乙酰胆碱酯酶的活性，造成流泪、肌肉颤动、瞳孔缩小等急性中毒现象^[2]。由于农药的大量使用，除了农作物本身会有农药残留外，农作物附近的地表水也极易受到污染。为防止污染源影响人体健康，水体中农药残留的快速有效测定具有重要的意义。

氨基甲酸酯类农药因具有热不稳定性，其检测多以液相色谱为主^[3-9]，常用前处理方法有液液萃取，填充柱萃取和固相萃取技术，为了达到更好的净化效果也可将液液萃取与固相萃取方法组合起来进行样品处理。G. S. Nunes 等^[9]比较了上述 3 种前处理方法对蔬菜中 5 种氨基甲酸酯提取液的净化效果和回收率，3 种方法各有优点，但在旋转蒸发浓缩过程中甲萘威和呋喃丹极易发生降解，影响回收率。

水体中氨基甲酸酯类农药残留量较低，检测前均需要对水样进行大体积富集或采用高灵敏度检测器检测，如质谱检测器或荧光检测器。美国环保署方法 531.2^[3]采用大体积直接进样（进样量 1000 μ L）柱后衍生 - 荧光检测方法检测了 11 种氨基甲酸酯类农药，该方法虽无需样品前处理，但仪器操作较为繁琐。陈剑刚等^[4]利用质谱检测器检测水体中的 6 种氨基甲酸酯组分，但为了进一步增加灵敏度，将 500 mL 水样以固相萃取方式浓缩至 0.2 mL 后取 20 μ L 进样测定，前处理步骤较多且需接触环己烷、乙酸乙酯等有机试剂，《GB/T 5750.9-2006 生活饮用水检验方法 农药指标》^[5]中采用固相萃取 - 高效液相色谱 - 紫外检测方法测定了水样中的甲萘威，采用液液萃取 - 高效液相色谱 - 柱后衍生 - 荧光检测方法测定了水样中的呋喃丹。

本文选取甲萘威和呋喃丹两种氨基甲酸酯类农药为考察对象，采用在线固相萃取^[10-15]为样品前处理方法，样品经固相萃取柱浓缩后在线转移至分析柱进行分析。由于在线柱浓缩技术对样品量的无损耗性，样品中的待测组分全部转移至分析柱，采用紫外检测器即可达到《GB 5749-2006 生活饮用水卫生标准》^[6]中关于呋喃丹限值检测的要求。另外，样品无需前处理，过滤后即进样分析，5 分钟即可完成一次样品分析。

测试条件

在线 SPE 方法

仪器：Ultimate 3000；包括：带在线脱气单元的双三元梯度泵，自动进样器，带有一个六通阀的柱温箱，紫外检测器，系统连接参见图 1。

分析柱：Acclaim RSLC C₁₈，2.2 μ m 2.1 mm \times 100 mm

SPE 柱：SolEx RSLC HRP Cartridge，12~14 μ m 2.1 mm \times 20mm

柱温：40 $^{\circ}$ C

流动相和流速：见表 1

检测波长：280nm

进样量：2.5mL

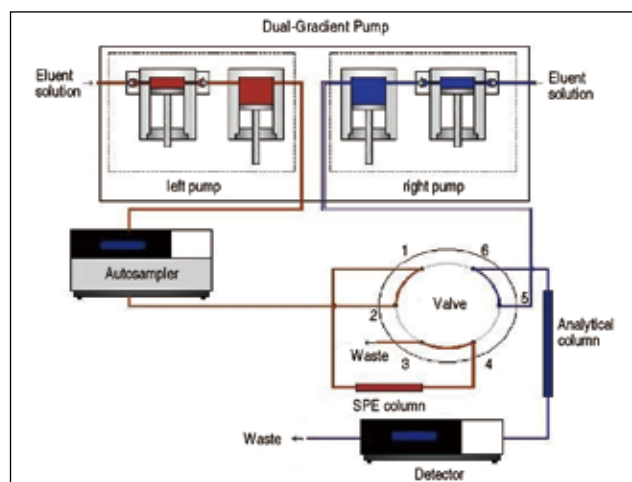


图 1 仪器连接图

上样泵流速为 2.0 mL/min，分析泵流速为 0.8 mL/min，上样泵流动相 A 为 H₂O，流动相 B 为甲醇，分析泵流动相 A 为 10 mmol/L NH₄OAc 缓冲溶液（pH 5.0，用醋酸调节），流动相 B 为乙腈。分析泵和上样泵梯度洗脱程序以及六通阀切换时间见 Table 1 所述。

表 1 梯度程序和阀切换时间

| Loading pump | | Analytical pump | | Valve | |
|--------------|-----|-----------------|-----|------------|----------|
| Time (min) | B%* | Time (min) | B%* | Time (min) | Position |
| 0 | 30 | 0 | 40 | 0 | 1-2 |
| 2.0 | 30 | 2.2 | 40 | 2.0 | 6-1 |
| 3.2 | 100 | 4.0 | 45 | 2.2 | 1-2 |
| 4.4 | 100 | 4.1 | 80 | | |
| 4.5 | 30 | 4.7 | 80 | | |
| 5.0 | 30 | 4.8 | 40 | | |
| | | 5.0 | 40 | | |

*: 流动相 A% = 100% - B%

*: Mobile phase A% = 100% - B%

样品前处理

标准品前处理

100 mg/L(μg/mL) 甲萘威和呋喃丹标准储备液的配制。分别准确称取 10.0 mg 甲萘威和呋喃丹于 100 mL 容量瓶中，甲醇溶解后，用甲醇定容，4 ℃ 保存待用。该溶液可放置 60 天。

1.0 mg/L(μg/mL) 甲萘威和呋喃丹混合标准溶液的配制。从 100 mg/L(μg/mL) 标准储备液中移取 1 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀，4 ℃ 保存待用。该溶液可放置 60 天。

不同浓度工作溶液的配制。从 1.0 mg/L(μg/mL) 混合标准溶液移取不同体积用去离子水配制成 100.0, 50.0, 10.0 μg/L 工作溶液，再从 100.0 μg/L 溶液中移取不同体积用去离子水配制成 5.0、1.0 和 0.5 μg/L 工作溶液待用，各浓度工作溶液均临用前新配。

待测样品前处理

样品溶液采集后，过 0.22 μm 滤膜后即可放入 10 mL 样品瓶中待测，未使用样品放入 -20 ℃ 冰箱保存。

结果和讨论

固相萃取柱的选择

在线固相萃取柱与离线固相萃取柱最大的区别在于在线固相萃取柱不是一次性消耗，可以反复利用。另外，由于在线固相萃取需要较大进样体积进行待测物的富集，要求固相萃取小柱能够兼容 100% 水相，同时可以耐受比较宽的 pH 范围。本实验选择 SolEx RSLC HRP (2.1 mm × 20mm, 12~14 μm) 为在线固相萃取小柱，该色谱柱填料为键合了亲水性膜的聚乙烯苯聚合物，可以经受 100% 水相冲洗，pH 范围为 0~14，最高柱压可达 80×10^6 Pa，适合超快速在线固相萃取。

方法线性范围、检出限、重现性和富集倍数

按上述色谱条件，本方法在 1.0 ~ 100 μg/L 范围内线性良好，甲萘威和呋喃丹的线性相关系数 $R^2 > 0.9999$ 。甲萘威线性回归方程为： $Y = 0.0562X - 0.0121$ ；呋喃丹线性回归方程为： $Y = 0.0231X + 0.0024$ ，其中，Y 为峰面积 (单位：mAU × min)，X 为浓度 (单位：μg/L)。S/N = 3，甲萘威和呋喃丹的检出限分别为 0.5、0.25 μg/L。以 5.0 μg/L 标准溶液考察方法重现性，连续 5 针进样，得出各组分峰面积 RSD < 2.5%，保留时间 RSD < 0.07%。

对于水样中痕量物质的检测，需要较高的富集倍数才能达到较低的检出限。文献 2 采用离线固相萃取方法富集水中的甲萘威，取 100 mL 水样经过清洗、洗脱、氮气吹干后，用 10 mL 流动相溶解残留物待测，此时有 10 倍富集倍数。然而进样时，只取 50 μL 测定，其甲萘威含量只相当于 0.5 mL 原始样品中的甲萘威含量。采用在线固相萃取方式，虽然进样量只有 2.5 mL，但是由于在线方式样品的无损耗性，2.5 mL 样品中的待测物是全部进入分析系统进行测定的。只需 2.5 mL 进样，被测物的灵敏度就与离线方法处理 500 mL 水样相当。相比繁琐的离线处理过程，在线固相萃取方式简单，方便。

样品测定

分别取实验室自来水、实验室附近池塘水和农田旁水渠水 100 mL，用 0.22 μm 滤膜过滤后按照 1.2 中色谱条件进行测定。每个样品均测定三次，结果所测样品均未检出甲萘威和呋喃丹。样品加标回收率如表 2 所示，样品加标 1.0 μg/L 时回收率在 76.0% ~ 120%，加标 5.0 μg/L 时回收率在 92.4% ~ 99.9%。样品加标 10.0 μg/L 时回收率在 87.5% ~ 99.7%。以加标 10.0 μg/L 时样品考察方法重现性，连续 5 针进样，得出各组分峰面积 RSD < 2.3%，保留时间 RSD < 0.09%。表明方法可准确用于实际水样中痕量甲萘威和呋喃丹的测定。自来水样品测定色谱图如图 2 所示。

表 2 样品在不同加标浓度时回收率测定结果 (数据均为三次测定平均值)

| 分析物 | 加标量 (μg/L) | 自来水 | 池塘水 | 农田旁水渠水 |
|-----|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Recovery(%) | Recovery(%) | Recovery(%) |
| 呋喃丹 | 1.0 | 82.0 | 120.0 | 76.0 |
| | 5.0 | 99.4 | 98.4 | 99.9 |
| | 10.0 | 96.1 | 99.7 | 93.2 |
| 甲萘威 | 1.0 | 100.3 | 99.4 | 105.0 |
| | 5.0 | 95.2 | 95.4 | 92.4 |
| | 10.0 | 98.1 | 92.6 | 87.5 |

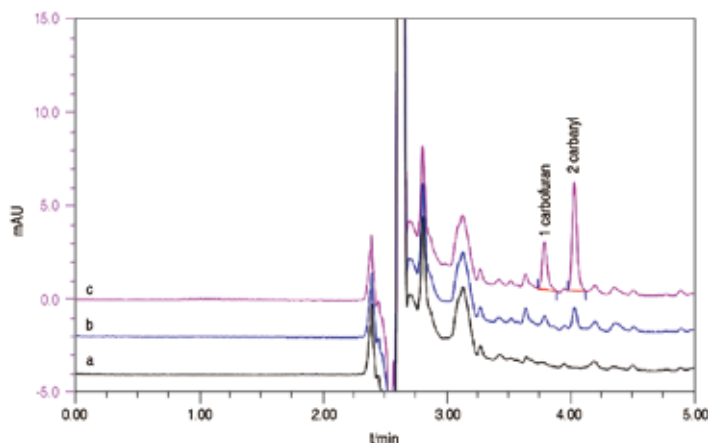


图2 自来水样品色谱图 (a- 自来水, b- 自来水加标 1 µg/L, c- 自来水加标 5 µg/L)
1. 呋喃丹 2. 甲萘威

结论

本文采用在线固相萃取-超快速液相色谱法准确地测定了水体中痕量甲萘威和呋喃丹, 5分钟即可完成一次实际样品测定。样品无须经过繁琐的前处理过程, 过滤后即可进样, 样品的萃取和浓缩完全由液相色谱系统自动完成。与传统的离线固相萃取相比, 在线固相萃取技术不仅具有样品需求量小, 试剂消耗量少, 还具有操作简单, 样品分析成本低廉, 回收率高等特点。在线固相萃取-超快速液相联用技术测定水样中痕量污染物将会有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Liu C W, Liu X W, Zhai G S, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘长武, 刘潇威, 翟广书, 等, 色谱), 2003, 21 (3): 255
- [2] Dai X L, Zhou Y. Environmental Monitoring in China (戴秀丽, 周怡, 中国环境监测), 2009, 25 (4): 32
- [3] EPA method 531.2, Measurement of n-Methylcarbamoyloxime and n-Methylcarbamates in Water by Direct Aqueous Injection HPLC with Postcolumn Derivatization, 2001
- [4] Chen J G, Zhao Q L, Lian Z Y, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (陈剑刚, 赵倩铃, 连宗衍, 等, 分析化学), 2005, 33 (8): 1167
- [5] GB/T 5750.9-2006, standard examination methods for drinking water-pesticides parameters (生活饮用水标准检验方法农药指标), 2006
- [6] GB 5749-2006, standards for drinking water quality (生活饮用水卫生标准), 2006
- [7] Yang R Z, Wang J H, Zhang R, et al. Chinese Journal of Chromatography (杨如箴, 王金花, 张蓉, 等, 色谱), 2010, 28 (8): 769
- [8] Liu C W, Liu X W, Zhai G S, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘长武, 刘潇威, 翟广书, 等, 色谱), 2003, 21 (3): 255
- [9] Nunes G S, Ribeiro M L, Polese L, et al. J. Chromatogr. A, 1998, 795 (1): 43
- [10] Dionex Corporation. Sensitive Determination of Microcystins in Drinking and Environmental Waters[EB/OL]. 2010. http://wwwsearch2.dionex.com/search?site=en-us&client=www_frontend&proxystylesheet=www_frontend&filter=0&output=xml_no_dtd&q=Sensitive+Determination+of+Microcystins
- [11] Dionex Corporation. Determination of Vitamin B12 in Beverages Using On-Line SPE Followed by HPLC with UV Detection. 2010. http://wwwsearch2.dionex.com/search?q=Determination+of+Vitamin+B12+in+Beverages+Using&btnG=Dionex+Search&client=www_frontend&proxystylesheet=www_frontend&output=xml_no_dtd&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&entqr=3&oe=UTF-8&ie=UTF-8&ud=1&site=en-us

- [12] Dionex Corporation. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Edible Oils by Donor-Acceptor Complex Chromatography (DACC)-HPLC with Fluorescence Detection. 2008. http://wwwsearch2.dionex.com/search?q=Determination+of+Polycyclic+Aromatic+Hydrocarbons+%28PAHs%29+in+Edible+Oils+by+Donor-Acceptor+Complex&btnG=Dionex+Search&client=www_frontend&proxystylesheet=www_frontend&output=xml_no_dtd&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&entq=3&oe=UTF-8&ie=UTF-8&ud=1&site=en-us
- [13] Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou E. J. Chromatogr. A, 2000, 904 (2) : 171
- [14] Akamine Y, Yasui-Furukori N, Kojima M, et al. J. Sep. Sci., 2010, 33 (21) : 3292
- [15] Xu L, Xia N. Chinese Journal of Instrumental Analysis (徐磊, 夏宁, 分析测试学报), 2011, 30 (5) : 558

DGLC-02 在线固相萃取技术 - 高效液相色谱同时分析 饮用水中的 9 种有机物及农残

关键词：在线固相萃取；农药残留；饮用水

DGLC-02 Determination of nine pesticide residues in drinking water by online SPE-high performance liquid chromatography

Key words: Online-SPE, pesticide residue, drinking water

引言

饮用水中有机物的分析非常具有挑战性。使用双三元（DGLC）的在线固相萃取技术和液相色谱法检测，使在实验室很容易实现饮用水标准检验方法的检出限要求，大大精简了 GB/T 5750 中规定的复杂的样品前处理流程，如水体的富集和净化，而且使用常规的紫外和荧光检测发即可获得极高的灵敏度，使得在饮用水水质控制方面更加简单易控。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；配有 2500 μL 半制备进样组件的自动进样器；带有一个六通阀的柱温箱，紫外检测器，荧光检测器。

分析柱：Acclaim PA II 120, 3 μm 3 \times 150 mm

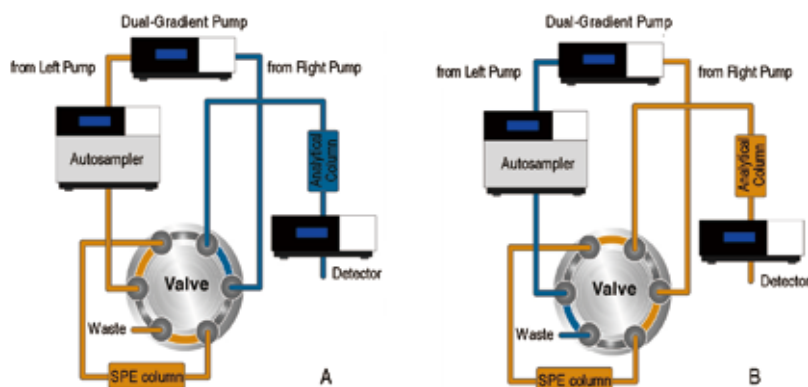


图 1 在线固相萃取 - 双梯度液相色谱分析原理图
(A: 上样, 清洗, 萃取; B: 洗脱, 分离, 分析)

富集柱：Acclaim PA II 120, 3 μm 3 \times 33 mm

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

紫外检测器：210nm, 220nm, 238nm, 280nm

荧光检测器：激发波长 290 nm，发射波长 410 nm

进样量：2.5 mL

流速：0.7 mL/min

流动相：A：0.05% 磷酸 B：水 C：乙腈

梯度洗脱条件：见表 1

表 1 流动相条件、阀位置及切换时间

| 时间 (min) | 富集泵 (B%) | 时间 (min) | 分析泵 (B%) | 分析泵 (C%) | 时间 (min) | 阀位置 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| 0 | 95 | 0 | 70 | 30 | 0 | 10-1 |
| 4 | 95 | 5 | 70 | 30 | 4 | 1-2 |
| 4.1 | 0 | 6 | 50 | 50 | 25 | 10-1 |
| 25 | 0 | 8 | 50 | 50 | | |
| 28 | 95 | 10 | 40 | 60 | | |
| 35 | 95 | 13 | 40 | 60 | | |
| | | 14 | 0 | 60 | | |
| | | 15 | 0 | 75 | | |
| | | 19.5 | 0 | 75 | | |
| | | 22.5 | 0 | 100 | | |
| | | 26 | 0 | 100 | | |
| | | 35 | 70 | 30 | | |

样品前处理方法

将采集的水样用 0.22 μm 滤膜过滤至 10mL 进样小瓶中直接进样。

方法特异性

在建立的色谱条件下分别注入液相色谱仪进行分析，结果表明各目标化合物的色谱峰之间能够很好地分离且相互之间无干扰，各个色谱峰的分度符合要求，色谱图见图 2（紫外谱图）和图 3（荧光谱图）。

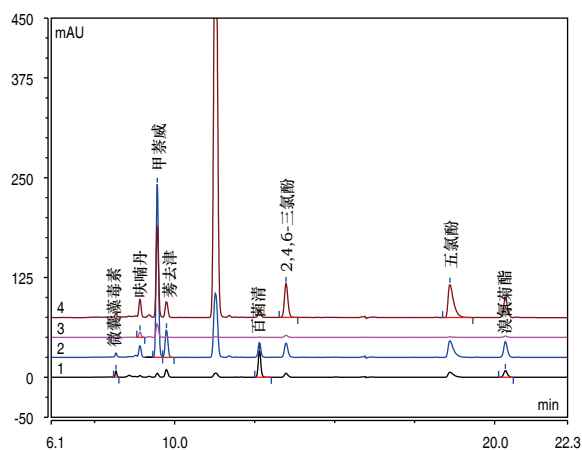


图 2 混合标准品的色谱图谱图 (UV)

1: 238nm; 2: 220nm; 3: 280nm; 4: 210nm

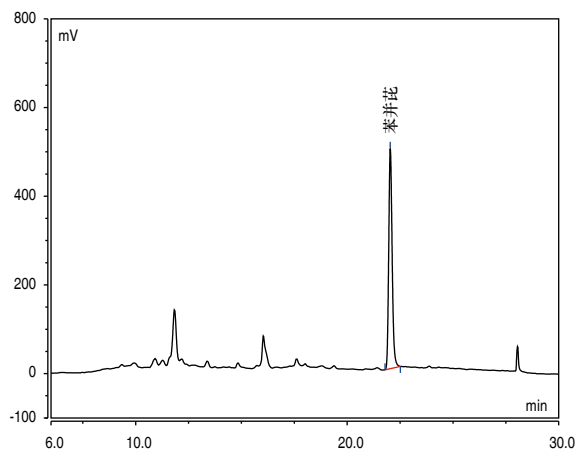


图 3 苯并(a)芘标准谱图 (FLD)

样品前处理方法的选择

对于微囊藻毒素-LR、甲萘威、莠去津、呋喃丹、百菌清、2,4,6-三氯酚的检测，水样直接过滤膜后进样检测即可。研究发现，由于苯并(a)芘、溴氰菊酯和五氯酚在水中的溶解度极低，当使用纯水稀释这三种标准品溶液时，目标化合物的回收以及重现性都比较差；当加入一定比例的乙腈后，可以显著提高改善回收率，灵敏度也随即明显提高。结合回收率等方法学指标的考察，最终选定 25% 乙腈 / 水溶液作为测定苯并(a)芘、溴氰菊酯和五氯酚时的溶剂。

结果与讨论

线性、检出限

以标样色谱峰面积对浓度做工作曲线, 具有良好线性, 线性相关系数 r 大于 0.999。以 3 倍信噪比计算检出限, 得到该方法最低检出限为 0.03-0.75 $\mu\text{g/L}$ (苯并(a)芘最低检出限为 0.3 ng/L)。以 10 倍信噪比计算定量限, 各化合物均满足国标检测要求。具体线性数据及检出限见表 2 和 3 所示。

表 2 微囊藻毒素-LR、甲萘威、莠去津、呋喃丹、百菌清、2,4,6-三氯酚线性数据

| 化合物 | 回归方程 | 相关系数 | 线性范围 ($\mu\text{g/L}$) | 检出限 ($\mu\text{g/L}$) | 定量限 ($\mu\text{g/L}$) |
|-----------|----------------------|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 微囊藻毒素-LR | $y = 0.083x - 0.007$ | 0.9990 | 0.18-9.00 | 0.05 | 0.18 |
| 2,4,6-三氯酚 | $y = 0.444x + 0.005$ | 0.9995 | 0.40-30.00 | 0.12 | 0.40 |
| 莠去津 | $y = 0.579x - 0.001$ | 1.000 | 0.10-15.00 | 0.03 | 0.10 |
| 甲萘威 | $y = 1.587x + 0.068$ | 1.000 | 0.20-30.00 | 0.06 | 0.20 |
| 呋喃丹 | $y = 0.045x - 0.002$ | 0.9995 | 0.40-30.00 | 0.12 | 0.40 |
| 百菌清 | $y = 0.053x - 0.002$ | 1.000 | 0.20-15.00 | 0.05 | 0.17 |

表 3 苯并(a)芘、溴氰菊酯和五氯酚线性数据

| 化合物 | 回归方程 | 相关系数 | 线性范围 ($\mu\text{g/L}$) | 检出限 ($\mu\text{g/L}$) | 定量限 ($\mu\text{g/L}$) |
|--------|----------------------|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 苯并(a)芘 | $y = 3.210x - 2.116$ | 0.9995 | 1.00-50.00 ng/L | 0.30 ng/L | 1.00 ng/L |
| 溴氰菊酯 | $y = 0.154x - 0.028$ | 0.9995 | 2.50-250.00 | 0.75 | 2.50 |
| 五氯酚 | $y = 0.465x - 0.070$ | 0.9995 | 0.5-12.00 | 0.15 | 0.50 |

实际样品的分析

将此方法应用于实际地表水、水源水样的检测, 样品中均为检测到各目标化合物。选取地表水为对象, 分别考察低、中、高三个浓度考察加标回收结果, 各化合物回收率均在 92.4-125% 之间, $\text{RSD} < 5\%$ 。具体结果见表 4 和表 5 所示。

表 4 微囊藻毒素-LR、甲萘威、莠去津、呋喃丹、百菌清、2,4,6-三氯酚加标回收结果

| 化合物 | 检出量 | 加入量 ($\mu\text{g/L}$) | 测得量 ($\mu\text{g/L}$) | 回收率 (%) | RSD(%) |
|-----------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------|--------|
| 微囊藻毒素-LR | - | 0.90 | 1.11 | 123.64 \pm 0.02 | 0.01 |
| | - | 5.40 | 4.97 | 92.12 \pm 0.01 | 0.01 |
| 2,4,6-三氯酚 | - | 2.00 | 1.99 | 99.23 \pm 0.16 | 0.16 |
| | - | 12.00 | 12.15 | 101.26 \pm 0.25 | 0.25 |
| 莠去津 | - | 1.00 | 1.03 | 102.99 \pm 0.60 | 0.58 |
| | - | 6.00 | 6.06 | 100.92 \pm 0.16 | 0.16 |
| 甲萘威 | - | 2.00 | 2.02 | 101.13 \pm 0.90 | 0.90 |
| | - | 12.00 | 11.21 | 93.42 \pm 2.44 | 2.60 |
| 呋喃丹 | - | 2.00 | 1.88 | 94.27 \pm 0.30 | 0.32 |
| | - | 12.00 | 11.41 | 95.12 \pm 0.53 | 0.56 |
| 百菌清 | - | 1.00 | 0.99 | 98.66 \pm 0.22 | 0.22 |
| | - | 6.00 | 6.03 | 100.54 \pm 0.14 | 0.14 |

表 5 苯并 (a) 芘、溴氰菊酯和五氯酚加标回收结果

| 化合物 | 检出量 | 加入量 (μg/L) | 测得量 (μg/L) | 回收率 (%) | RSD (%) |
|----------|-----|--------------|------------|-------------|---------|
| 苯并 (a) 芘 | - | 5.00 (ng/L) | 6.20 | 123.96±2.64 | 2.13 |
| | - | 30.00 (ng/L) | 32.98 | 109.94±2.91 | 2.65 |
| 溴氰菊酯 | - | 25.00 | 24.31 | 97.78±4.50 | 4.60 |
| | - | 150.00 | 142.81 | 95.21±4.75 | 4.99 |
| 五氯酚 | - | 2.00 | 1.85 | 92.73±4.67 | 5.00 |
| | - | 12.00 | 11.09 | 92.43±3.37 | 3.65 |

结论

采用一种新型双梯度液相色谱结合固相萃取建立了一种简便、快速、准确测定水中 9 种有机化合物的方法，本方法实现了样品在线富集及除杂，避免了繁琐的样品前处理过程，大大节约了样品量及时间，且重现性好，适用于水中微囊藻毒素-LR、甲萘威、莠去津、呋喃丹、百菌清、2,4,6-三氯酚、五氯酚、溴氰菊酯和苯并 (a) 芘等的测定。

DGLC-03 在线固相萃取 - 高效液相色谱法 快速测定柑桔原料及其成品中多菌灵的残留量

关键词：高效液相色谱，在线固相萃取，多菌灵，柑桔

DGLC-03 Determination of carbendazim residue in orange and its product by online SPE-HPLC method using DGLC

Key words: HPLC, online SPE, Carbendazim, Orange

引言

多菌灵是一种广泛用于保护蔬菜和水果的抗真菌剂，关于其残留量的测定方法较多，美国 FDA 采用液液萃取，液相色谱 UV 检测和 FLD 检测；近期的一些方法多采用离线 SPE 和 LC-MS 进行检测，其中 SN/T1753-2006 采用液相色谱进行分析，处理 10mL 样品，经过 MCX 净化，前处理过程繁琐。本实验拟利用 DGLC online-SPE 技术，建立快速测定橙汁中多菌灵残留量的测定方法。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

SPE 柱：Turboflow HTLC Cyclone-MCX-2, 1.0 × 50mm (P/N CH-953456)

二维分析柱：Acclaim Polar Advantage II C₁₈, 3μm 4.6 × 150mm (P/N 063191)

柱温：35℃

检测波长：280nm

进样量：2000μL

流动相组成：

上样净化泵：A, 甲醇；B, pH=10 氨水；C, 5% 醋酸

分析泵：A, 乙腈；B, 100mM 醋酸铵

梯度洗脱程序及流速：见表 1

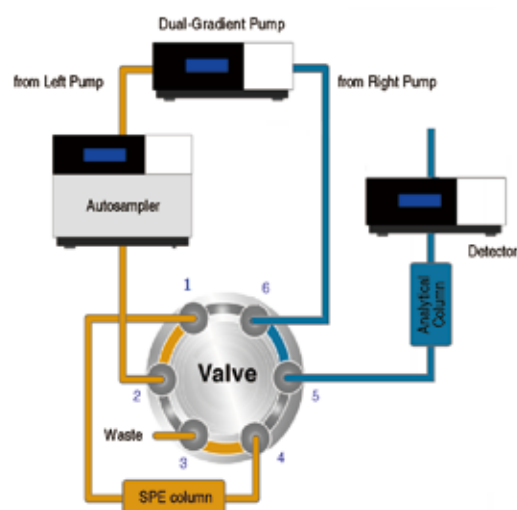


图 1 仪器连接图

表 1 一维分离和二维分离梯度程序

| 上样净化泵 Loading pump | | | | | 分析泵 Analytical pump | | | | |
|-----------------------|--------------|----|----|----|------------------------|--------------|----|----|----|
| 时间 (min) Time | 流速 mL/min | A% | B% | C% | 时间 (min) Time | 流速 mL/min | A% | B% | C% |
| 0 | 2.0 | 5 | 0 | 95 | 0 | 0.2 | 5 | 95 | 0 |
| 2.5 | 2.0 | 5 | 0 | 95 | 15.0 | 0.2 | 5 | 95 | 0 |
| 3.0 | 1.0 | 5 | | 95 | 15.1 | 0.8 | 5 | 95 | 0 |
| 7.0 | 1.0 | 20 | 0 | 80 | 18 | 0.8 | 5 | 95 | 0 |
| 10 | 1.0 | 20 | 0 | 80 | 18.1 | 0.8 | 25 | 75 | 0 |
| 10.1 | 1.0 | 5 | 95 | 0 | 28 | 0.8 | 25 | 75 | 0 |
| 12 | 1.0 | 5 | 95 | 0 | 30 | 0.8 | 85 | 15 | 0 |
| 12.1 | 1.0 | 95 | 5 | 0 | 30.2 | 1.0 | 85 | 15 | 0 |
| 15 | 1.0 | 95 | 5 | 0 | 35 | 1.0 | 85 | 15 | 0 |
| 15.1 | 1.0 | 10 | 0 | 90 | 35.2 | 0.8 | 5 | 95 | 0 |
| 18.0 | 1.0 | 10 | 0 | 90 | 40 | 0.8 | 5 | 95 | 0 |
| 25 | 1.0 | 95 | 0 | 5 | | | | | |
| 25.2 | 1.5 | 95 | 0 | 5 | | | | | |
| 32 | 1.5 | 95 | 0 | 5 | | | | | |
| 32.1 | 1.0 | 5 | 0 | 95 | | | | | |
| 39.5 | 1.0 | 5 | 0 | 95 | | | | | |
| 40.0 | 2.0 | 5 | 0 | 95 | | | | | |

样品前处理方法

标准品溶液制备：精密量取浓度为 100ppm 的多菌灵标准品溶液 1mL，至 100mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，制成浓度为 1ppm 的标准品储备溶液。再分别精密量取储备溶液适量，至 100mL 量瓶中，加水稀释并定容，制成浓度分别为 1、2、5、10 和 20 μ g/L 的系列标准品溶液。

样品溶液制备：取桔片或成品适量，榨汁机捣碎后，取 10g 样品，精密称定，至 100mL 量瓶中，以 pH=10 的氨水定容至刻度，摇匀后，过滤，取续滤液，0.45 μ m 水膜过滤，进样分析。

结果和讨论

标准品色谱图 (2ppb)

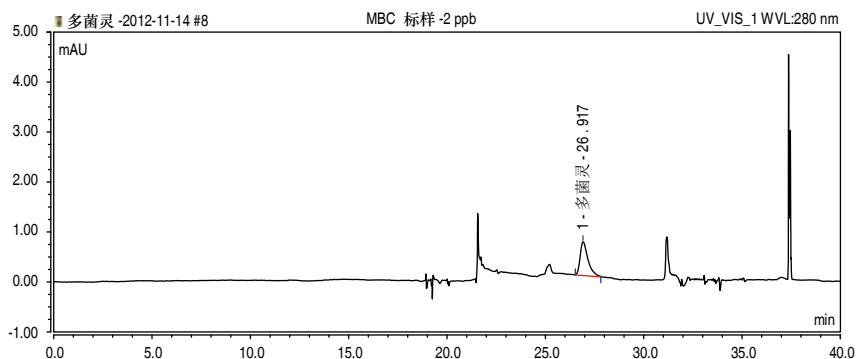


图 2 标准品测定谱图

样品及加标样品谱图 (加标量为 $2\mu\text{g}/\text{kg}$)

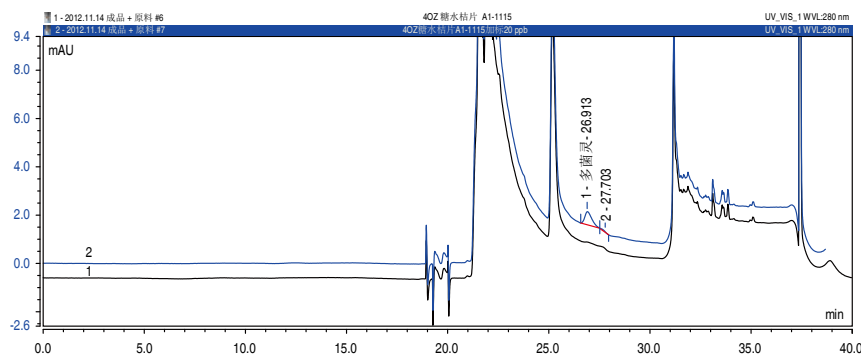


图3 样品及加标样品测定谱图

方法学考察

方法线性范围、检出限

取标准品系列溶液，进样 $2000\mu\text{L}$ ，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，考察线性。结果多菌灵在 $1\sim 20\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内相关系数 $r=0.9992$ ，线性相关关系较好。检出限按照信噪比 3:1 计算，为 $0.12\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

回收率实验

分别取桔片原料和成品 10g，精密称定，按照 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 分别加入多菌灵，按照样品溶液制备方法制备样品溶液，进样分析，计算回收率，结果原料的加标回收率为 86.6%，成品 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标回收率为 98%。

样品含量测定结果

取 5 个批次成品和原料，按照样品溶液制备方法 制备样品，进样分析，结果见图 4~5。

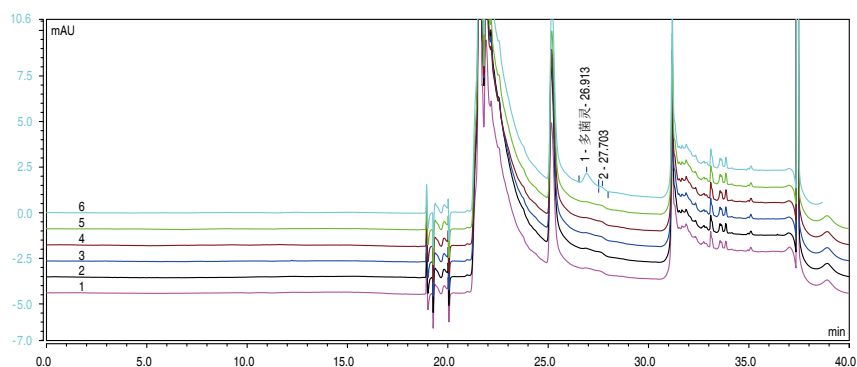


图4 成品 5 个批次和加标样品叠加谱图

(1 为 4OZ 糖水桔片 A1；2 为 4OZ 糖水桔片 A2；3 为 29OZ 糖水桔片 A1；4 为 29OZ 糖水桔片 A2；5 为 4OZ 糖水桔片 A1-1115；6 为 4OZ 糖水桔片 A1-1115 加标 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 的谱图)

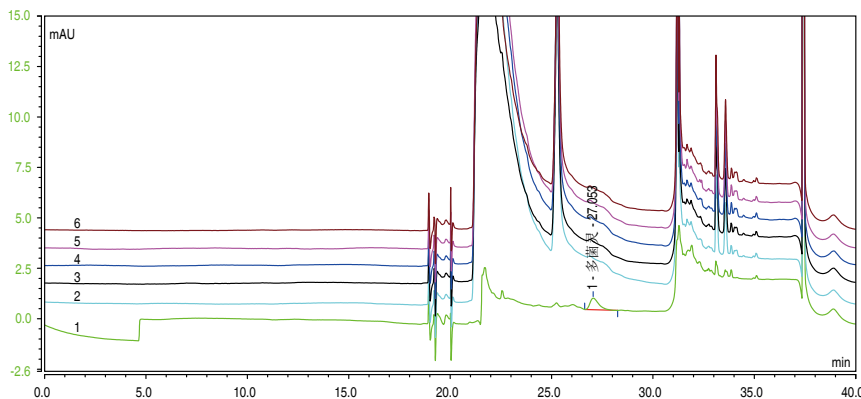


图 5 原料 5 个批次和 2ppb 标准品叠加谱图

(1 为 2ppb 标准品; 2 为桔子原料 -1115-1; 3 为桔子原料 -1115-2; 4 为桔子原料 -1115-3; 5 为桔子原料 -1115-4; 6 为桔子原料 -1115-5)

结论

方法的专属性:

本实验在 SPE 净化柱选择上尝试了 HRP 柱、PA II 柱, 其中 HRP 柱对目标物吸附富集效果较好, 因此针对此柱, 筛选了净化条件以及系统连接方式 (顺冲或反冲), 但基质干扰较大; PA II 50mm 柱净化、吸附效果较好, 但考虑到基质“较脏”, 小柱寿命很短。最后选定 Cyclone-MCX 柱, 优化了碱-甲醇除杂比例, 考虑到切换后一维流动相溶剂对二维色谱柱及色谱峰形的影响, 实验降低了一维氨水 pH 值至 10, 结果基质干扰显著减少, 从加标样品目标峰 UV 扫描图 (图 6) 及纯度检测结果可以看出, 基质干扰较少, 方法专属性较好。

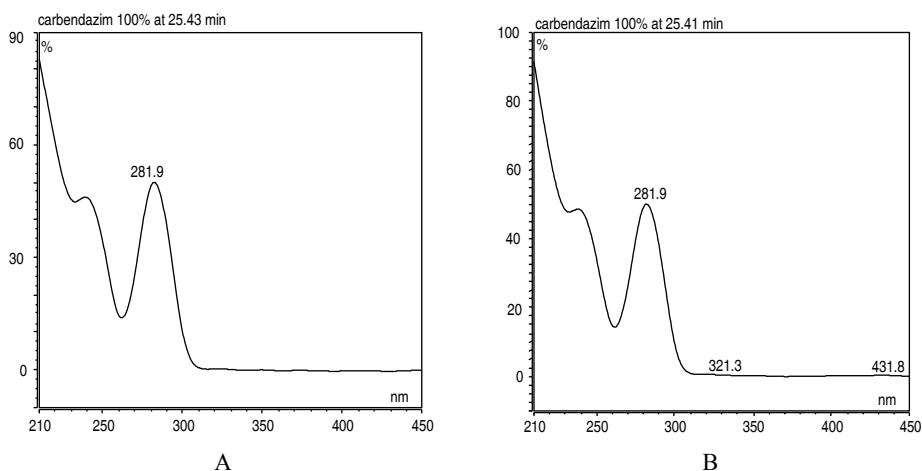


图 6 标准品 (A) 和加标样品 (B) UV 扫描图

分析柱选择: 实验分别采用 C_{18} 与 PA II C_{18} 作为分析柱, 从结果可以看出, PA II C_{18} 对目标物保留及分离效果较好, 同时此柱 pH 值耐受范围较宽 (2~10), 较适宜作为分析柱。

可行性分析: 本实验初步建立了 online-SPE-HPLC 方法快速测定多菌灵残留量的方法, 与标准方法比较, 提高了检出限和分析效率。方法对于桔片成品检测良好, 基质干扰少, 但对于桔片原料或未去皮的桔片原料依然在基质干扰, 或出现假阳性现象, 需要结合 LC-MS 方法做进一步验证。

参考文献

- [1] GB/T 18979-2003 《进出口浓缩果汁中噻菌灵、多菌灵农残检测方法 - 高效液相色谱法》
- [2] Mixed-Mode Solid-Phase Extraction and Cleanup Procedures for the Liquid Chromatographic Determination of Thiabendazole and Carbendazim in Fruit Juices, JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 84, NO. 2, 2001

DGLC-04 采用 Online SPE 液质联用法分析水体中的丙烯酰胺

关键词：在线固相净化；液质联用法；水体；丙烯酰胺

DGLC-04 Online-SPE determination of acrylamide in water by HPLC-MS

Key words: Online solid-phase purification, HPLC-MS, water, acrylamide

引言

丙烯酰胺是一种白色晶体化学物质，是生产聚丙烯酰胺的原料。聚丙烯酰胺主要用于水的净化处理、纸浆的加工及管道的内涂层等，也用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。淀粉类食品在高温（>120℃）烹调下容易产生丙烯酰胺。研究表明，人体可通过消化道、呼吸道、皮肤黏膜等多种途径接触丙烯酰胺，饮水是其中的一条重要接触途径。2002年4月瑞典国家食品管理局和斯德哥尔摩大学研究人员率先报道，在一些油炸和烧烤的淀粉类食品，如炸薯条、炸土豆片等中检出丙烯酰胺，含量超过饮水中允许最大限量的500多倍。之后挪威、英国、瑞士和美国等国家也相继报道了类似结果。我国也出台了相关标准，如GB5009.204，食品接触材料中的丙烯酰胺的测定，因此，对地表水中和饮用水中的丙烯酰胺进行监测是一项重要的任务。本实验采用双三元液相和质谱联用测定水体中的丙烯酰胺。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；TSQ Vantage 质谱仪。色谱质谱条件见表1。

表1 色谱质谱条件

| | |
|---------|--|
| 色谱柱类型 | 分析柱：Acclaim 120 C ₁₈ 3.0μm 3.0×150mm (P/N: 063691) 富集柱：Acclaim PA2 C ₁₈ , 4.3×10mm (P/N:063195) |
| MS 工作参数 | MS APCI 源 正离子模式, SRM 72-55 |
| 流动相组成 | APCI 源：A：水 B：乙腈 = 97：3，等度洗脱，流速：0.5ml/min |
| 阀切换时间 | 进样方式及体积 自动进样：100.0μL 0-0.2min, 阀位置 1-2, 富集柱上样，流动相：100% 纯水 0.2-1.0min, 阀位置 6-1, 富集柱洗脱，流动相：ACN：水 =3：97 1.0-5.0min, 阀位置 1-2, 富集柱平衡，流动相：100% 纯水 |

样品前处理方法

标准品前处理

CH₂CHCONH₂ (分析纯 ≥99.0%)，精密称取 0.1g，去离子水定容 1000ppm，分别稀释至 10ppm，再依次稀释分别配制得到标准工作溶液 0.01、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0ng/ml。

样品前处理

样品取自实验室自来水、Milipore 超纯水、某品牌矿泉水、某品牌纯净水和张江河流中的地表水，过滤后进样。

结果和讨论

标准曲线及谱图

标准曲线如图所示，以峰面积定量，回归方程为 $Y=6.3E5+1.21E7X$ ，相关系数 0.9992。

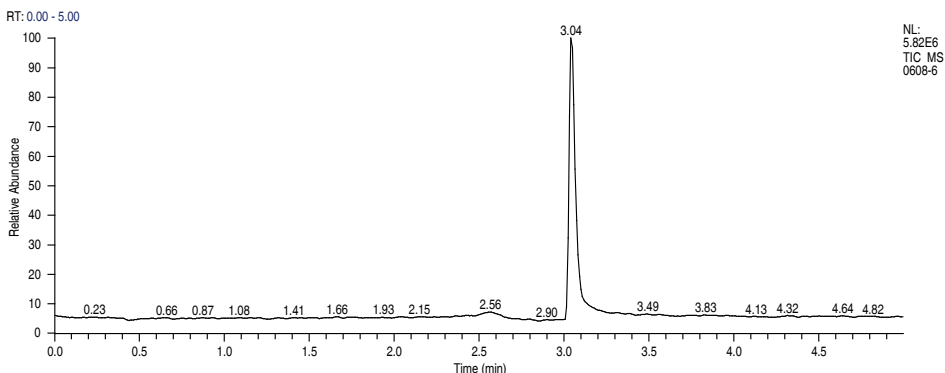


图 1 标准品谱图 (以 0.5ng/mL 为例)

样品谱图及分析结果

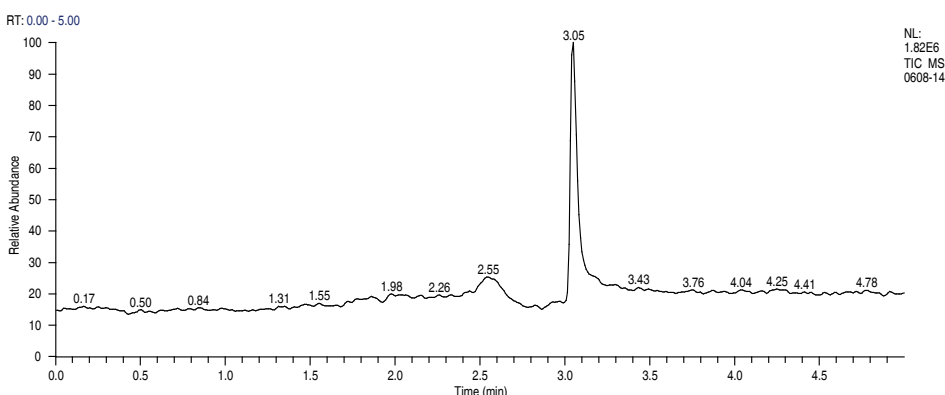


图 2 自来水分析谱图

分析结果表明，丙烯酰胺含量，Milipore 超纯水、某品牌矿泉水、某品牌纯净水均未达到检出限，自来水为 0.137ng/ml，张江某河流地表水为 0.317ng/ml。

加标回收率实验

表 2 加标回收率结果

| 样品基质 | 实际浓度 | 加入浓度 (ng/ml) | 测量值 (ng/ml) | 回收率 % |
|------|------|--------------|-------------|-------|
| 矿泉水 | 未检出 | 1 | 0.947 | 94.7 |
| 矿泉水 | 未检出 | 1 | 0.872 | 87.2 |
| 矿泉水 | 未检出 | 1 | 0.804 | 80.4 |
| 自来水 | 未检出 | 1 | 0.860 | 86.0 |
| 自来水 | 未检出 | 1 | 0.880 | 88.0 |
| 自来水 | 未检出 | 1 | 0.874 | 87.4 |

从以上数据可以看出，回收率在 80% 以上。

检出限

分析了最低浓度点 0.01ng/ml, 其信噪比达到 3 倍以上。因此，该方法的检出限 (LOD) 达到 0.01ng/ml。

结论

通过对 TSQ vantage 质谱参数的优化，同时采用 online SPE 在线富集浓缩的技术，一是可以去除干扰，二是可以降低检出限，最终达到 0.01ng/ml，满足标准检测的要求（定量至 0.03ng/ml），因此，该方法适用于对地表水及饮用水的分析。

DGLC-05 在线固相萃取 - 高效液相色谱法测定食用油中多环芳烃

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；荧光检测器；食用油；多环芳烃

DGLC-05 Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Edible Oils by HPLC with online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; Fluorescence detector; edible oil; PAHs

引言

多环芳烃类化合物 (PAHs) 是强烈的致癌物质，而食用油在其制造过程中会产生一定的多环芳烃类物质。因为苯并芘 (benzo[a]pyrene) 是多环芳烃中具有代表性的化合物，欧盟规定了食用油中的苯并芘含量不得高于 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。

多环芳烃类化合物的测定，通常使用高效液相色谱法 (HPLC) 分离，采用紫外检测器^[2]、荧光检测器^[3,4]、电化学检测器^[5]以及质谱^[6]测定，经氧化反应后，还可采用 LC-MS/MS^[7]进行检测，因常规方法中样品前处理采用离线固相萃取，手工操作繁琐，使其重现性受到影响。虽然已经有文献报道了在线固相萃取法分析多环芳烃类化合物，但装置极其复杂。本方法利用双三元液相系统，一套系统即可实现在线富集，大大加快了试验过程，操作简单，灵敏度高，试验成本低。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；荧光检测器；自动进样器。仪器连接图见图 1。

分析柱：2 根 SUPELCOSILTM LC-PAH, 5 μm 4.6 \times 250 mm

富集柱：ChromSpher Pi, 3.0 \times 80 mm

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

自动进样器温度：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：80 μL

流动相组成、流速及洗脱梯度条件：见表 1

检测波长：见表 2

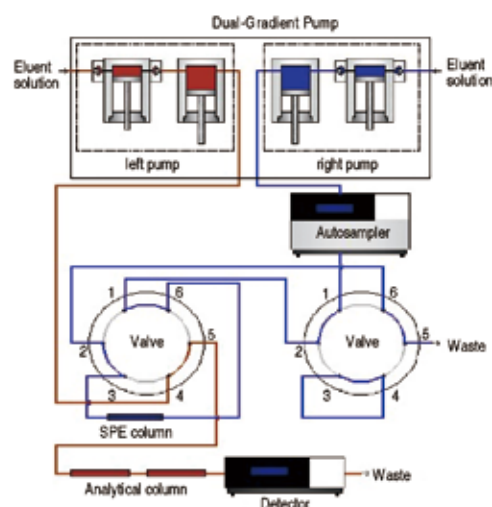


图 1-1 样品富集时连接图

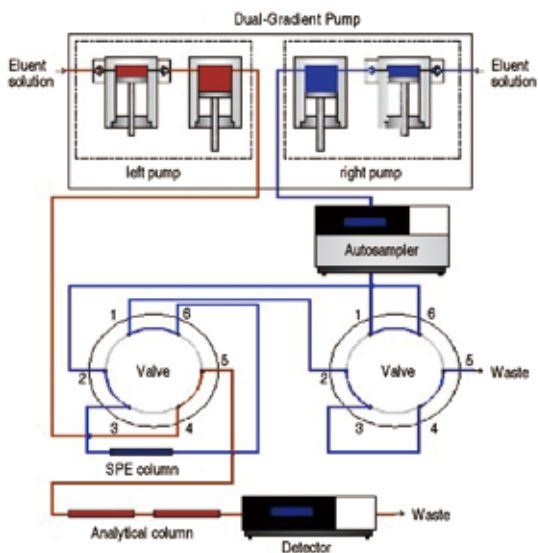


图 1-2 冲洗富集时连接图

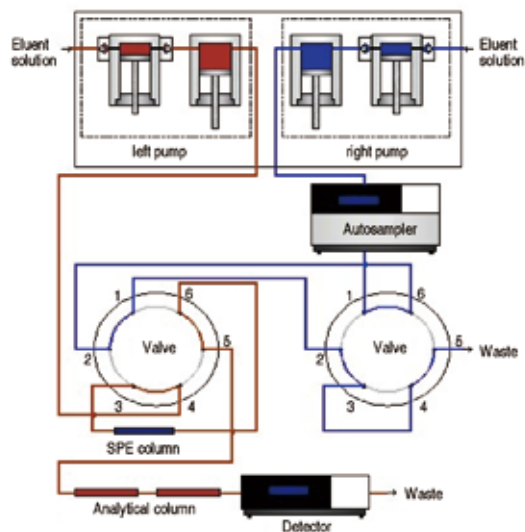


图 1-3 分析时连接图

图 1 仪器连接图

表 1 系统梯度洗脱条件

| 时间 (min) | 左泵 A——水; B——乙腈; C——异丙醇 | | | | left valve | 右泵 A——乙腈; B——异丙醇 | | | right valve |
|-------------|---------------------------|----|-----|-----|---------------|---------------------|----|-----|----------------|
| | 流速 (mL/min) | A% | B% | C% | | 流速 (mL/min) | A% | B% | |
| 0.00 | 0.35 | 0 | 0 | 100 | 6_1 | 0.4 | 20 | 80 | 1_2 |
| 12.00 | 0.35 | 0 | 0 | 100 | | | | | |
| 12.10 | 0.35 | 20 | 80 | 0 | | | | | 6_1 |
| 14.50 | | | | | 1_2 | | | | |
| 14.60 | | | | | | 0.4 | 20 | 80 | |
| 16.00 | | | | | | 1.0 | 20 | 80 | |
| 17.00 | | | | | 6_1 | | | | |
| 20.90 | 0.35 | 20 | 80 | 0 | | | | | |
| 20.91 | 0.35 | 0 | 100 | 0 | | | | | |
| 30.00 | | | | | | 1.0 | 0 | 100 | |
| 50.90 | 0.35 | 0 | 100 | 0 | | | | | |
| 51.50 | 0.35 | 0 | 0 | 100 | | | | | |
| 58.00 | | | | | | 1.0 | 0 | 100 | |
| 58.10 | | | | | | 1.0 | 20 | 80 | |
| 61.50 | | | | | | | | | 1_2 |
| 65.00 | | | | | | 1.0 | 20 | 80 | |
| 65.50 | | | | | | 0.4 | 20 | 80 | |
| 66.50 | 0.35 | 0 | 0 | 100 | | | | | |
| 70.00 | | | | | | 0.4 | 20 | 80 | |

表 2 检测波长

| 时间 (min) | 激发波长 (nm) | 发射波长 (nm) |
|----------|-----------|-----------|
| 0.00 | 256 | 370 |
| 27.05 | 256 | 390 |
| 29.50 | 240 | 420 |
| 33.50 | 270 | 385 |
| 37.50 | 290 | 430 |
| 51.50 | 305 | 480 |
| 53.50 | 290 | 430 |

样品前处理方法

将食用油试样过 0.45 μm 滤膜, 移取 40 μL 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 苯并 (b) 屈内标物至 10 g 食用油试样中, 混匀待测。

结果和讨论

方法的重现性

在橄榄油样品加入美国 EPA 610 方法所列出的 12 种多环芳烃类化合物标准对照品, 连续进样 7 次, 保留时间的 RSD 在 0.03%~0.08% 之间, 色谱峰面积的 RSD 在 4.1%~6.7% 之间。

线性、检出限

在上述色谱条件下进行试验, 各 PAHs 的线性、检出限数据见表 3。

表 3 PAHs 线性、检出限

| 析物 | 线性范围 ($\mu\text{g/kg}$) | 内标浓度 ($\mu\text{g/kg}$) | 线性系数 | 检出限 ^a ($\mu\text{g/L}$) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|--------|--------------------------------------|
| 菲 | 1~20 | 1 | 0.9952 | 0.42 |
| 蒽 | 1~20 | 1 | 0.9910 | 0.26 |
| 荧蒽 | 1~20 | 1 | 0.9808 | 1.19 |
| 芘 | 1~20 | 1 | 0.9905 | 0.69 |
| 苯并 (a) 蒽 | 1~20 | 1 | 0.9852 | 0.68 |
| 屈 | 1~20 | 1 | 0.9864 | 0.34 |
| 苯并 (b) 荧蒽 | 1~20 | 1 | 0.9907 | 0.21 |
| 苯并 (k) 荧蒽 | 1~20 | 1 | 0.9907 | 0.39 |
| 苯并 (a) 芘 | 1~20 | 1 | 0.9911 | 0.75 |
| 二苯并 (a, h) 蒽 | 1~20 | 1 | 0.9914 | 0.41 |
| 苯并 (g,h,i) 二萘嵌苯 | 1~20 | 1 | 0.9920 | 0.58 |
| 茚苯 (1,2,3-cd) 芘 | 1~20 | 1 | 0.9941 | 0.59 |

注:
a——t 检测估算 MDL, 置信度为 99% 时, MDL 等于一定浓度的标准溶液 (2 $\mu\text{g/kg}$) 重复测定 7 次的峰面积标准偏差 S 与对于的 t 值。

实际样品的分析

选取橄榄油、芝麻油进行试验, 并用橄榄油进行加标回收试验, 试验表明, 多环芳烃的加标回收率在 70%~131%。

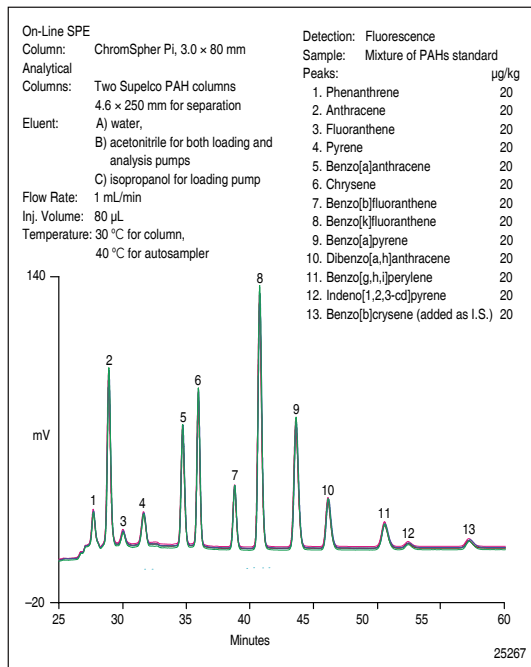


图 2 分析时连接图食用油基质标准溶液色谱图 (20µg/kg)

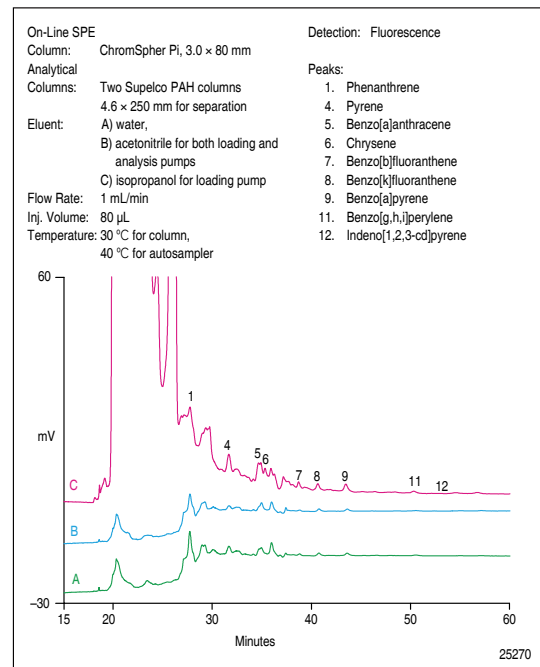


图 3 实际样品色谱图

表 4 食用油中多环芳烃含量的测定及加标回收试验

| PAH | 橄榄油 1# | | | 橄榄油 2# | 芝麻油 |
|---------------|----------------|------------------|------------|----------------|----------------|
| | 测得值 (µg/kg) | 标准加入值 (µg/kg) | 回收率 (%) | 测得值 (µg/kg) | 测得值 (µg/kg) |
| 菲 | 37 | 5 | 120 | 13.2 | 52 |
| 蒽 | 4.5 | 5 | 109 | 3.2 | 6.1 |
| 荧蒽 | 1.0 | 5 | 112 | 未检出 | 未检出 |
| 芘 | 2.2 | 5 | 131 | 1.3 | 未检出 |
| 苯并(a)蒽 | 2.8 | 5 | 108 | 2.1 | 18 |
| 屈 | 4.4 | 5 | 110 | 3.2 | 5.3 |
| 苯并(b)荧蒽 | 未检出 | 5 | 90 | 未检出 | 未检出 |
| 苯并(k)荧蒽 | 未检出 | 5 | 84 | 未检出 | 未检出 |
| 苯并(a)芘 | 2.7 | 5 | 106 | 2.5 | 3.9 |
| 二苯并(a,h)蒽 | 未检出 | 5 | 84 | 未检出 | 未检出 |
| 苯并(g,h,i)二萘嵌苯 | 未检出 | 5 | 70 | 未检出 | 1.2 |
| 茚并(1,2,3-cd)芘 | 未检出 | 5 | 82 | 未检出 | 未检出 |

结论

本方法使用在线固相萃取方法对食用油中多环芳烃的测定，操作简便，减少手动操作步骤，大大提高了方法的重现性。

参考文献

- [1] Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006, 49, L364, 5–24.
- [2] Saravanabhavan, G.; Helferty, A.; Hodson, P. V.; Brown, R. S. A Multi-Dimensional High Performance Liquid Chromatographic Method for Fingerprinting Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Alkyl-Homologs in

- the Heavy Gas Oil Fraction of Alaskan North Slope Crude. *J. Chromatogr., A* 2007, 1156, 124–133.
- [3] Zuin, V. G.; Montero, L.; Bauer, C.; Popp, P. Stir Bar Sorptive Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mate Teas. *J. Chromatogr., A* 2005, 1091, 2–10.
- [4] Pino, V.; Ayala, J. H.; Afonso, A.M.; González, V. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Following Micelle-Mediated Preconcentration. *J. Chromatogr., A* 2002, 949, 291–299
- [5] Bouvrette, P.; Hrapovic, S.; Male, K. B.; Luong, J. H. Analysis of the 16 Environmental Protection Agency Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by High Performance Liquid Chromatography-Oxidized Diamond Film Electrodes. *J. Chromatogr., A* 2006, 1103, 248–256.
- [6] Itoh, N.; Aoyagi, Y.; Yarita, T. Optimization of the Dopant for the Trace Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Liquid Chromatography/ Dopant-Assisted Atmospheric-Pressure Photoionization/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2006, 1131, 285–288.
- [7] Lintelmann, J.; Fischer, K.; Matuschek, G. Determination of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Particulate Matter Using High- Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2006, 1133, 241–247.

DGLC-06 采用 Online SPE 液质联用法分析原料糖浆中 2-氨基乙酰苯 (2-AP)

关键词：在线固相净化；2-氨基乙酰苯；糖浆；液质联用

DGLC-06 Online-SPE determination of 2-AP in syrup by HPLC-MS

Key words: online solid-phase purification, 2-AP, syrup, HPLC-MS

引言

2-氨基乙酰苯的英文名的缩写为 2-AP、2-AAP 或者 AAP，化学结构式如图 1 所示。2-氨基乙酰苯在国外已经被确认为在许多食品（葡萄酒、果葡糖浆）中经常出现的一种重要的、具有芳香活性的微量物质。最早描述在食品中出现 2AP 的一篇研究报道在 1967 年，由一个叫 Parks 的研究人员提出的，他发现了在奶类食品中存在着 1 种可以产生不良口味的微量成分，这就是后来被命名为 2-氨基乙酰苯的化学物质。从那时起，人们开始注意这种微量物质，研究也越来越深入。到了 1993 年，人们发现含有 2AP 的白葡萄酒中经常会出现 1 种类似于卫生球、地板漆、湿羊毛或者是杂醇酒精的口味，当酒中的 2-AP 浓度超过了某个感官阈值时，就会造成所谓“非典型老化 (untypical aging)”的不良风味，简称为“UTA”现象，这种 UTA 现象的存在会严重影响葡萄酒的口感和风味。后来也有文献记录 2-AP 有可能存在于果葡糖浆中，导致了果葡糖浆产生 UTA 现象，影响产品正常的风味和口感。许多研究表明，2AP 是造成 UTA 现象最重要的引发物质，对于广大的果葡糖浆生产企业，应该注意 2AP 等能影响糖浆风味的微量化学物质的产生、预防与检测，保证产品质量能够更好的满足市场需求。

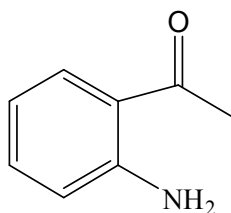


图 1 2-氨基乙酰苯

在果葡糖浆的生产过程中会有各种原因产生 2-AP 的微量物质，从而影响产品的风味口感。国外可口可乐公司已经对其有检测的要求。2-AP 是种不稳定的易挥发物质，在产品中的含量很低，目前主要采取色谱方法进行 2AP 检测。Ron 等从玉米粉、玉米粉圆饼、玉米面豆卷等食品中，分别用中性方法和碱性方法提取分离出 2-AP，用 GC-FID 法将进行定量检测。由于该方法，前处理提取步骤较繁琐，分析时间较长，检测限较高，不能进行准确定性，因此，较少使用。Fan 等采用了浸入式固相微萃取法 (DI-SPME) 快速检测 2AP 的方法，和 GC-MS 法联合进行使用，以乙酰苯-d8 作为内标物，将 SPME 的纤维制萃取头直接浸入到 30 度样品溶液中，并不停的搅拌，萃取 30 min，萃取完毕，将萃取头中的萃取液释放出进行 GC-MS 检测分析，这种方法既快又准确，整个过程只需 40 min，回收率可达 97%，灵敏性高，检测限较高为 0.5-1.0ug/L，但分析成本较高。而 HPLC 法，在淀粉制糖业应用较多，可以用于分析淀粉糖品的成分组成，也可进行 2AP 检测，样品用 2% 的磷酸溶液配制，进样体积 300 uL，以 0.1% 的磷酸溶液和 25% 的乙腈为流动相，流速 1.0mL/min，采用了 C₁₈ 柱和紫外检测器（检测波长 220nm）进行检测，柱温是 40℃，分离时间为 10 ~ 15 min，保留时间约 4.9 min。该法准确性、重现性和精密性等方面结果都较好，但该方法不能进行准确的定性。因此，本文采用了液质联用的方法，目前该类分析方法报道较少。同时，

考虑到样品前处理时，需要采用磷酸，而质谱不能进磷酸盐，因此，本方法采用了在线 SPE 技术，去除了磷酸的干扰，同时，采用了在线阀切换技术，避免了原料糖中大量糖类成分基质对质谱的影响，提高了质谱的稳定性和耐受性，同时通过在 SPE 柱上进行大体积进样，还可以进一步降低检出限。因此，该方法可以为原料糖中的 2-氨基乙酰苯的测定提供更为灵敏和准确定量定性的方法。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；MS TSQ Vantage。

富集柱：Acclaim PA C16, 5 μ m 4.3 \times 10mm (P/N: 020309)

分析柱：Acclaim 120 C₁₈, 3.0 μ m 2.1 \times 150mm (P/N: 063691)

柱温：35 $^{\circ}$ C

色谱质谱条件见表 1

表 1 色谱质谱条件

| MS 工作参数 | ESI 源 | 正离子模式, SRM | 136.0-91.1 CE 24V; S-lens:56.0 136.0-118.1 CE 14V; S-lens:56.0 136.0-65.1 CE 36V; S-lens:56.0 | |
|---------|---|------------|---|---------------------------|
| 流动相组成 | 分析柱 | | | |
| | 时间 | 流速 | CH ₃ CN | H ₂ O(0.1% FA) |
| | min | mL/min | % | % |
| | -2 | 0.3 | 30 | 70 |
| | 3 | 0.3 | 30 | 70 |
| | 10 | 0.3 | 70 | 30 |
| | 15 | 0.3 | 70 | 30 |
| | 15.1 | 0.3 | 30 | 70 |
| | 20 | 0.3 | 30 | 70 |
| | SPE 柱 | | | |
| | 时间 | 流速 | CH ₃ CN | H ₂ O(0.1% FA) |
| | min | mL/min | % | % |
| | -2 | 0.3 | 20 | 80 |
| | 5.0 | 0.3 | 20 | 80 |
| 5.1 | 0.3 | 80 | 20 | |
| 8 | 0.3 | 80 | 20 | |
| 8.1 | 0.3 | 20 | 80 | |
| 12 | 0.3 | 20 | 80 | |
| 12 | 0 | 20 | 80 | |
| 进样方式及体积 | 自动进样: 10.0 μ L | | | |
| 阀切换时间 | 0min, 阀位置 1-2, 富集柱上样, 流动相: ACN:0.1% FA = 20:80 2.2min, 阀位置 6-1, 富集柱洗脱, 流动相: ACN: 0.1% FA = 30: 70 3.5min, 阀位置 1-2, 富集柱平衡 / 再生, 流动相: ACN:0.1% FA = 80:20 | | | |

样品前处理

2-氨基乙酰苯 (2-AP) 标准溶液配制

于 100mL 容量瓶中精确称取 2-AP 标准物质的质量 0.300 g, 加入 25mL HPLC 级乙腈, 用超纯水定容至刻度, 摇匀后制成 0.300 g/L 的标准储备液。然后用超纯水逐级稀释分别得到 0.3ng/ml、3.0 ng/ml、15.0ng/ml、30.0ng/ml、150.0ng/ml 标准品, 分别经 0.45 μ m 的滤膜过滤后装瓶, 待测。

样品前处理

精确称取样品 3g，放入 10mL 进样瓶中，用含 2% H₃PO₄ 的超纯水定量到 9 g，摇匀后经 0.45μm 的滤膜过滤。在 100℃ 下加热 5 min 后，待冷却至室温，经 0.45μm 的滤膜过滤，装瓶并待测。

结果和讨论

标准曲线及谱图

标准曲线如图所示，以峰面积定量，回归方程为 $Y = -12123.6 + 33480.1X$ ，相关系数 0.9999。

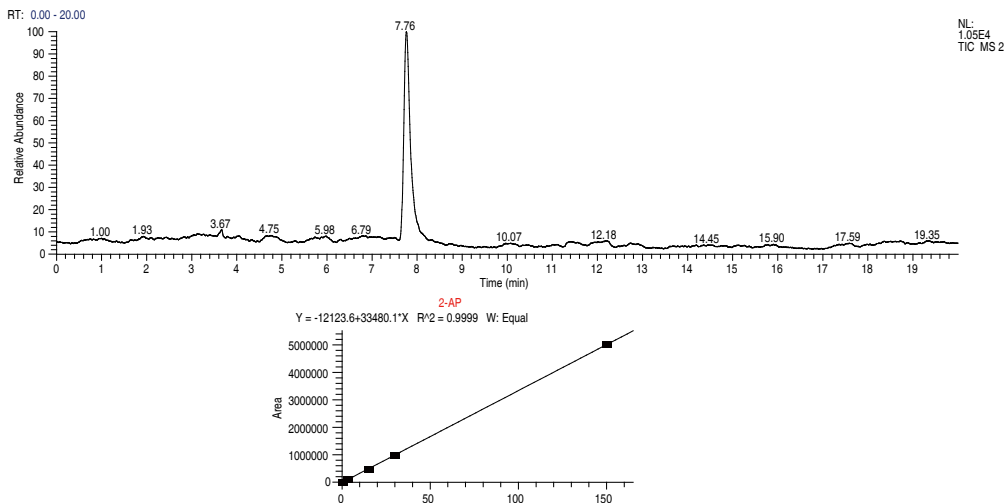


图 2 标准品谱图 (以 0.3 ng/ml 为例) 及标准曲线图

样品谱图及分析结果

样品分析

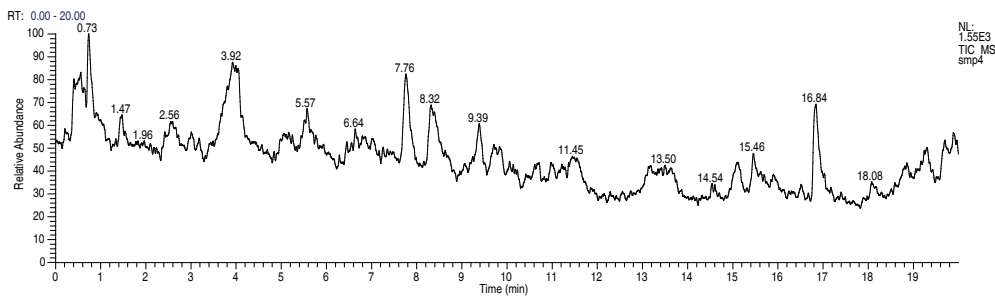


图 3 样品分析谱图

对某公司提供的两份糖浆样品进行了分析，结果表明，2-AP 均未检出。

样品加标回收率实验

表 2 样品加标回收率结果

| 样品基质 | 实际浓度 | 加入浓度 (ng/ml) | 测量值 (ng/ml) | 回收率 % |
|-------|------|-----------------|----------------|-------|
| 1 号样品 | 未检出 | 75.0 | 75.4 | 100.5 |
| 2 号样品 | 未检出 | 50.0 | 51.4 | 102.8 |

从以上数据可以看出，回收率很好。

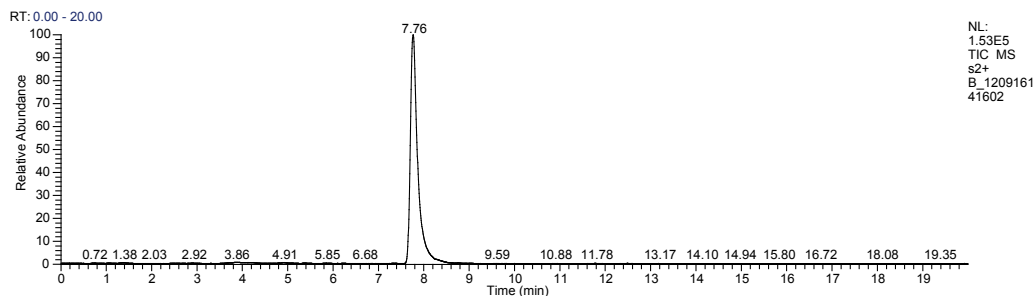


图 4 加标回收率谱图 (以 2 号样品, 加标 50 ng/ml 为例)

检出限

分析了最低浓度点 0.3ng/ml, 进样体积为 10uL, 其信噪比达到 6 倍以上。因此, 该方法的检出限 (LOD, 以 $S/N=3$ 计), 达到 0.15ng/ml。

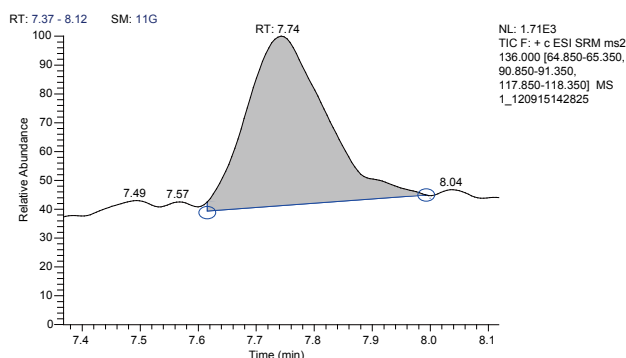


图 5 0.3ng/ml 标准溶液谱图

重现性分析

对 15.0 ng/ml 标准样品进行了分析, 连续进样了 3 针, 保留时间分别为 7.8、7.8、7.8min, 重现性较好; 峰面积分别为 542190、538625、499436, RSD 值为 4.5%, 重现性很好。

结论

通过对 TSQ vantage 质谱参数的优化, 同时采用 online SPE 在线富集浓缩的技术, 一是可以去除干扰, 如原料糖中的糖浆, 还有提取用的磷酸, 二是可以降低检出限, 最终达到 0.15ng/ml, 如果增加进样体积, 可以达到更低的检测限, 能满足企业检测的要求, 三是, 采用在线 SPE 技术比离线处理更快, 重现性更好。因此, 该方法适合用于糖浆或酿酒行业对 2-AP 的分析要求

DGLC-07 在线固相萃取检测鸡肉中的五种磺胺类药物 (LC-UV)

关键词：在线固相萃取；磺胺；鸡肉

DGLC-07 Determination of sulfanilamide in chicken by Online SPE-HPLC

Key words: Online-SPE, sulfanilamide, chicken

引言

磺胺类药物是以对氨基苯磺酰胺为基本化学结构的一类合成抗菌药物，它具有抗菌谱广、性质稳定、价格便宜、使用简便、生产是不耗用粮食等优点，即被广泛使用畜产品和水产品的饲料中，对畜禽疾病控制和治疗起到重要作用。但由于磺胺类药物存在严重副作用，人体食用磺胺类超标的食品后，药物进入人体产生富集，人体中长期存在磺胺类药物会导致许多细菌对磺胺类药物产生耐药性，会导致尿路障碍、肾脏功能损害，引起过敏反应，有皮疹，药热等，还可以造成对血液系统的伤害等诸多不良反应，因此磺胺类药物成为目前无公害畜产品和水产品药物残留的必检项目。所以建立有效快速的禽肉中磺胺类药物的检测方法具有现实意义。

对禽肉中磺胺类物质的检测，常规方法为先将禽肉经乙腈提取后使用正己烷去除部分杂质，再浓缩，然后还需要使用离线固相萃取柱进行主要的除杂和浓缩过程，之后再 HPLC 分离检测。离线固相萃取过程操作繁琐，耗时长，手动操作误差大。

本方法采用在线固相萃取—高效液相色谱法建立快速、灵敏的检测禽肉中磺胺类药物含量的测定方法，该方法经过反复实验，结果表明：磺胺分离效果好，检测时间短，重现性好，精密度高，试验所得回收率和相对标准偏差都比较理想，而且除了之前的提取和正己烷除杂步骤，整个过程自动化，操作简单。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

富集柱：ThermoFisher HyperSep Retain-CX, 20 × 3.0mm (PN: 60312-302)

分析柱：Acclaim 120 PAII, C₁₈, 5μm 4.6 × 250mm (PN: 063199)

柱温：40 °C

检测波长：270nm

流动相组成及阀切换时间，见表 1

表 1 流动相条件及阀切换时间

| | | | | | |
|---------------|-----------------------|--|------------------------|----------------------|-------------|
| SPE 柱流动相组成及流速 | 时间 (min) | H ₂ O(50mM KH ₂ PO ₄ , PH=5)(%) | CH ₃ CN (%) | H ₂ O (%) | 流速 (mL/min) |
| | 0 | 55 | 10 | 35 | 1 |
| | 11 | 55 | 10 | 35 | 1 |
| | 19 | 15 | 80 | 5 | 1 |
| | 29 | 15 | 80 | 5 | 1 |
| | 29.9 | 55 | 10 | 35 | 1 |
| | 40 | 55 | 10 | 35 | 1 |
| 分析柱流动相组成及流速 | 时间 (min) | H ₂ O(0.05% H ₃ PO ₄) (%) | CH ₃ CN (%) | H ₂ O (%) | 流速 (mL/min) |
| | 0 | 80 | 20 | 0 | 1 |
| | 7.8 | 80 | 20 | 0 | 1 |
| | 8 | 0 | 20 | 80 | 1 |
| | 11 | 0 | 20 | 80 | 1 |
| | 11.2 | 80 | 20 | 0 | 1 |
| | 19 | 72.1 | 27.9 | 0 | 1 |
| | 30 | 40 | 60 | 0 | 1 |
| | 30.5 | 5 | 95 | 0 | 1 |
| | 35 | 5 | 95 | 0 | 1 |
| | 35.5 | 80 | 20 | 0 | 1 |
| | 40 | 80 | 20 | 0 | 1 |
| 进样方式及进样体积 | 自动进样器 2000 μ L | | | | |
| 阀切换程序 | 时间 (min) | | 阀位置 | | |
| | 0 | | 1-2 | | |
| | 8 | | 1-6 | | |
| 11 | | 1-2 | | | |

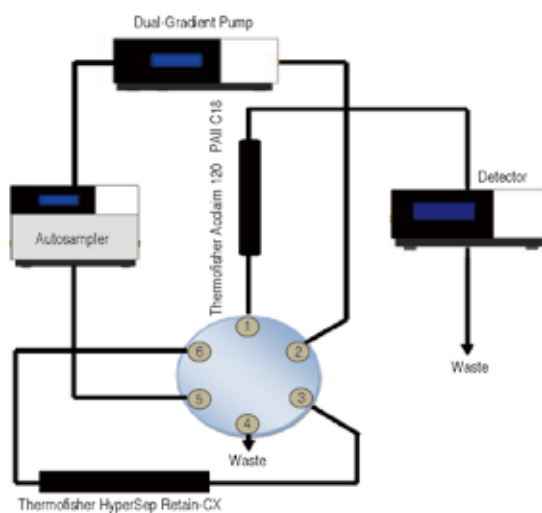


图 1 仪器连接图

样品前处理方法

标准品的配制

将客户带来的浓度都为 1mg/mL 的磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺二甲基嘧啶 (SM2)、磺胺甲恶唑 (SMZ)、磺胺二甲氧嘧啶 (SDM) 和磺胺喹恶啉 (SQ) 准品储备液分别去 100 μ L, 混匀制成分别含有浓度为 2000mg/L 的 SMM、SM2、SMZ、SDM 和 SQ 标准储备液, 然后使用流动相依次稀释成 15 μ g/L、25 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L 和 300 μ g/L 的标准品溶液, 分别经 0.45 μ m 的滤膜过滤后装棕色样品瓶内, 待测。

标准品前处理

称取鸡肉组织样品 15g, 绞肉机搅碎, 加入无水硫酸钠 3g, 加入乙腈 75mL, 于 25 $^{\circ}$ C 下超声 20min, 然后以 3000r/min 离心 5min, 取上清液。在残渣中加入乙腈 75mL, 于 25 $^{\circ}$ C 下超声 20min, 然后以 3000r/min 离心 5min, 合并上清液。于上清液中加入正己烷 60mL, 振荡 10min 后, 静置分层, 取下层乙腈层份。于乙腈流分中加入正丙醇 20mL, 50 $^{\circ}$ C 下氮吹干燥, 残留物用 95% 乙腈水溶液 6mL 溶解, 制成样品储备液 1, 加入 12mL 流动相稀释后, 5000r/min 离心 5min, 取非油层制成样品储备液 2, 装棕色样品瓶内, 待测。

加标样品的配制

精确量取 25 μ L 2000mg/L 的 SMM、SM2、SMZ、SDM 和 SQ 标准储备液于上述配置好的 1975 μ L 样品储备液 1 中, 摇匀, 加入 4mL 流动相稀释后, 5000r/min 离心 5min, 取非油层制成稀释 3 倍的加标 25 μ g/L 五种磺胺类化合物的样品加标储备液, 装棕色样品瓶内, 待测。

结果和讨论

标准曲线

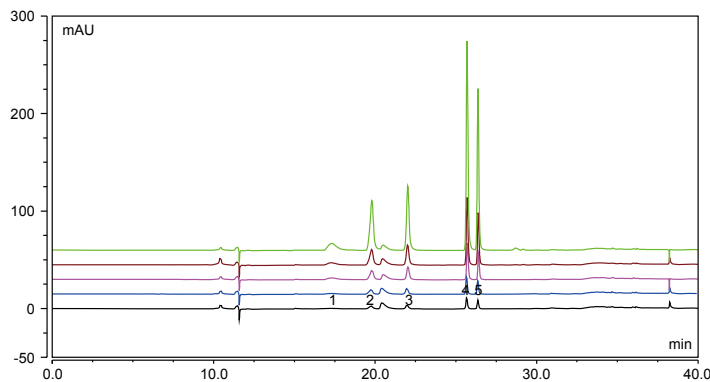


图 2 标准曲线各点 SM₂、SMM、SMZ、SDM 和 SQ 样品峰叠加谱图
(其中从下往上依次代表 15 μ g/L、25 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L、300 μ g/L 的五种磺胺混合物,
1、2、3、4、5 分别代表 SM₂、SMM、SMZ、SDM、SQ)

表 2 标准曲线方程数据

| | Ret.Time (min) | Peak Name | Cal.Type (C0) | Points (C1) | Offset (C2) | Slope % | Curve | Corr.Coeff. |
|---|-------------------|-----------------|------------------|----------------|----------------|------------|-------|-------------|
| 1 | 17.27 | SM ₂ | Lin | 5 | 0 | 0.0156 | 0 | 99.76 |
| 2 | 19.78 | SMM | Lin | 5 | 0 | 0.0434 | 0 | 99.80 |
| 3 | 22.01 | SMZ | Lin | 5 | 0 | 0.0431 | 0 | 99.77 |
| 4 | 25.70 | SDM | Lin | 5 | 0 | 0.0933 | 0 | 99.92 |
| 5 | 26.39 | SQ | Lin | 5 | 0 | 0.0669 | 0 | 99.91 |

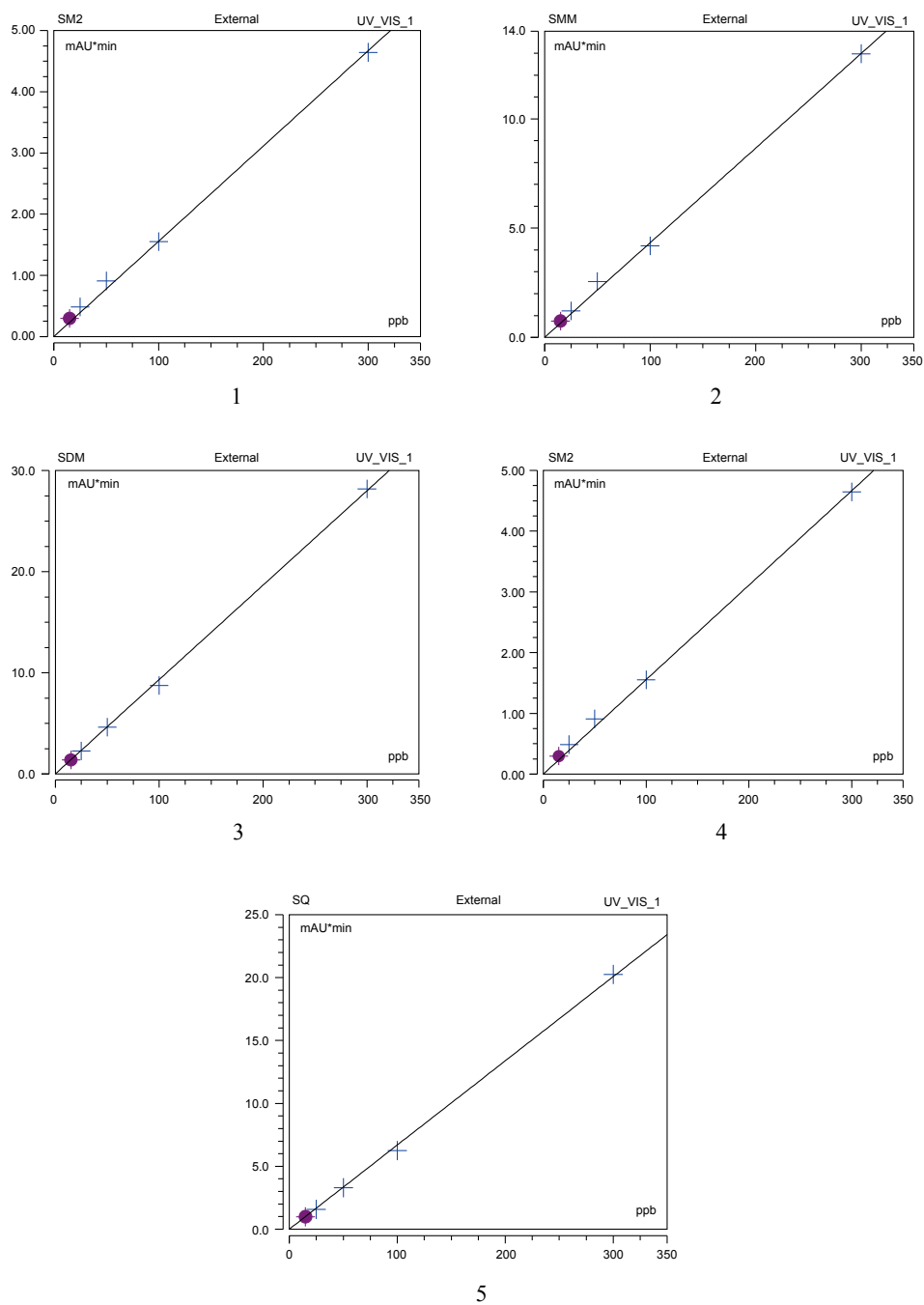


图3 五种磺胺类化合物的标准曲线
(其中1、2、3、4、5分别代表SM₂、SMM、SMZ、SDM、SQ)

15 $\mu\text{g/L}$ 的五种磺胺标准品混合物的精密度

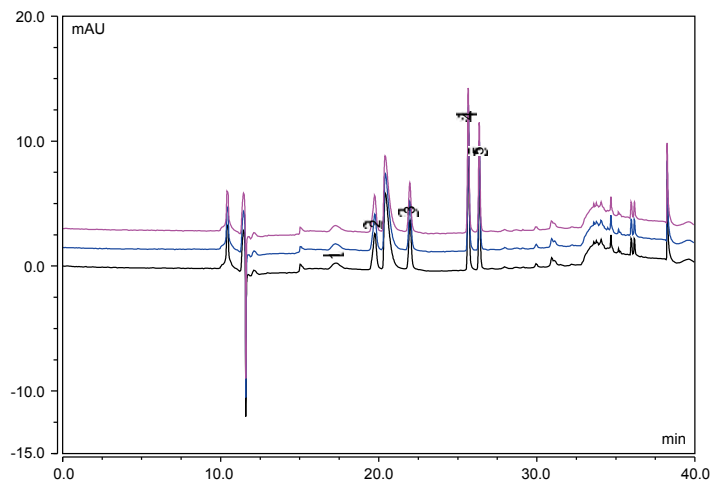


图 4 3 针 15 $\mu\text{g/L}$ 的五种磺胺标准品混合物的叠加谱图
(其中从下往上依次代表不同时间进样的 15 $\mu\text{g/L}$ 的五种磺胺混合物, 1、2、3、4、5 分别代表 SM₂、SMM、SMZ、SDM、SQ)

表 3 浓度为 15 $\mu\text{g/L}$ 的五种磺胺混合物连续进三次各磺胺的
峰面积及相对标准偏差数据

| No. | SM ₂ | SMM | SMZ | SDM | SQ |
|-----------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| 1 st | 0.2969 | 0.7491 | 0.7315 | 1.3899 | 0.9957 |
| 2 nd | 0.2898 | 0.7459 | 0.7423 | 1.4099 | 0.9934 |
| 3 rd | 0.2881 | 0.7292 | 0.7419 | 1.4012 | 0.9955 |
| Ave. | 0.2916 | 0.7414 | 0.7386 | 1.4003 | 0.9949 |
| RSD | 1.60% | 1.44% | 0.83% | 0.72% | 0.13% |

鸡肉样品储备液与加标 25 $\mu\text{g/L}$ 后的对比谱图

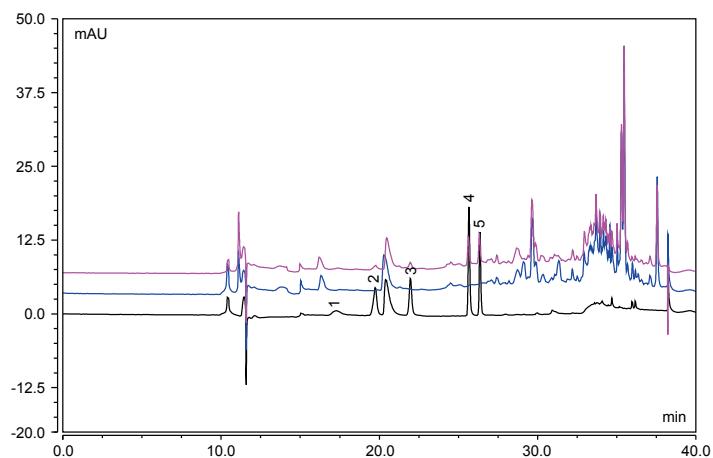


图 5 25 $\mu\text{g/L}$ 五种磺胺混合物标准品、鸡肉样品储备液 2 与稀释三倍的加标 25 $\mu\text{g/L}$ 的鸡肉样品储备液的叠加谱图 (其中从下往上依次代表 25 $\mu\text{g/L}$ 五种磺胺混合物标准品、鸡肉样品储备液与稀释三倍的加标 25 $\mu\text{g/L}$ 的鸡肉样品储备液, 1、2、3、4、5 分别代表 SM₂、SMM、SMZ、SDM、SQ)

表 4 鸡肉样品储备液 2 及稀释三倍的加标 25 $\mu\text{g/L}$ 的
鸡肉样品储备液中五种磺胺的加标结果数据

| | SM2 | SMM | SMZ | SDM | SQ |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 实际浓度 ($\mu\text{g/L}$) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 加标量 ($\mu\text{g/L}$) | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 稀释三倍后的加标后浓度 ($\mu\text{g/L}$) | 6.52 | 4.52 | 4.17 | 6.89 | 9.37 |
| 实际加标后浓度 ($\mu\text{g/L}$) | 19.56 | 13.56 | 12.51 | 20.67 | 28.11 |
| 回收率 (%) | 78.22 | 54.16 | 50.07 | 82.64 | 112.45 |

结论

在动物可食性组织中检测磺胺类化合物，由于干扰比较大且含量比较少，所以在提取之后往往需要进一步的离线固相萃取技术进行富集浓缩、除杂，但是整个过程比较繁琐、复杂，本方法采用在线固相萃取技术使用自动化过程代替实验人员的手工操作，既节省了时间，也减少了误差。五种磺胺类化合物的检测限分别为：LOD(SM2)=3.2 $\mu\text{g/L}$ 、LOD(SMM)=0.54 $\mu\text{g/L}$ 、LOD(SMZ)=0.4 $\mu\text{g/L}$ 、LOD(SDM)=0.14 $\mu\text{g/L}$ 、LOD(SQ)=0.18 $\mu\text{g/L}$ 。

本实验采用客户提供的方法对鸡肉中的磺胺类化合物进行提取，但是因为样品最后是溶解于 95% 乙腈中，导致大体积进样（2000 μL ）时，目标化合物直接从 SPE 柱上冲洗下来，所以对于实际样品及加标样品采取了加入两倍相同体积的流动相进行稀释来达到样品保留到 SPE 柱上的目的。

DGLC-08 在线固相萃取 - 高效液相色谱法 同时测定六味地黄丸中马钱苷和丹皮酚的含量

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；六味地黄丸；中药；马钱苷，丹皮酚

DGLC-08 Simultaneous determination of Loganin and Paeonol in Liu Wei Di Huang pill by HPLC with online solid-phase extraction

Key words: online-SPE, HPLC, LiuWeiDiHuangWan, TCM, Loganin, Paeonol

引言

六味地黄丸是常见 OTC 经典中药方剂，临床上有大蜜丸、水蜜丸、浓缩丸，胶囊等常见剂型。关于六味地黄丸药效的化学物质基础分析，文献报道较多，在 2010 版药典中，蜜丸和浓缩丸均有马钱苷的含量测定项，前处理过程为样品提取后，提取液经过氧化铝柱离线净化，再进样分析，采用四氢呋喃 - 甲醇 - 乙腈 - 0.05% 磷酸作为流动相系统，前处理方法和分析过程较繁琐；其中另外一个指标性成分丹皮酚采用甲醇 - 水作为流动相进行测定，本实验利用双三元液相色谱的 online-SPE 技术，快速并且同时测定两种成分，提供了在线净化和检测的解决方案。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

富集柱：Acclaim[®] PA II, 3 μm 4.6 × 50 mm

分析柱：Acclaim[®] C₁₈, 5 μm 4.6 × 150 mm

柱温：35 °C

检测波长：236 nm and 274nm

进样量：5 μL

流速：1.0ml/min

流动相组成及流速，见表 1

梯度洗脱程序，见表 2

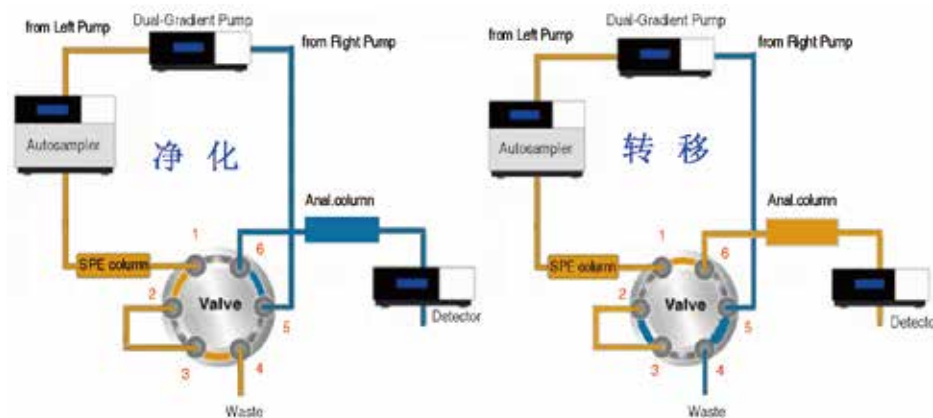


图 1-1 阀 1-2 位相通时连接图

图 1-2 阀 1-6 位相通时连接图

图 1 仪器连接图

表 1 流动相组成及流速

| | 富集泵 (left pump) | 分析泵 (right pump) |
|-------|--------------------|---------------------|
| 流动相 A | 0.1% H_3PO_4 | |
| 流动相 B | MeOH | ACN |

表 2 梯度洗脱条件

| 时间 (min) | 富集泵 (B%) | 分析泵 (B%) | 时间 (min) | 阀 |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| 0 | 5 | 13 | 0 | 1-2 |
| 15 | 50 | 13 | 7.7 | 1-6 |
| 20 | 95 | 65 | 8.2 | 1-2 |
| 25 | 95 | 65 | 14.2 | 1-6 |
| 25.1 | 5 | 13 | 14.8 | 1-2 |
| 30 | 5 | 13 | | |

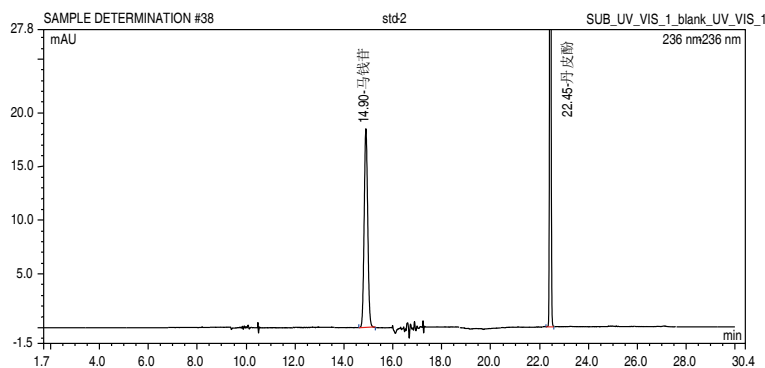
样品前处理方法

取本品水蜜丸 0.7g, 大蜜丸 1g, 浓缩丸 0.4g, 精密称定, 置 3 个具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25ml, 密塞, 称定重量, 超声处理 15 分钟使溶散, 加热回流 1h, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 滤过。取续滤液测定马钱苷和丹皮酚的含量。

取六味地黄胶囊 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50ml, 密塞, 称定重量, 超声处理 40 分钟, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 滤过。取续滤液测定马钱苷和丹皮酚的含量。

结果和讨论

混合标准品色谱图

图 2 标准溶液色谱图 (马钱苷浓度为 26.5 $\mu\text{g/mL}$, 丹皮酚浓度为 39 $\mu\text{g/mL}$)

实际样品分析

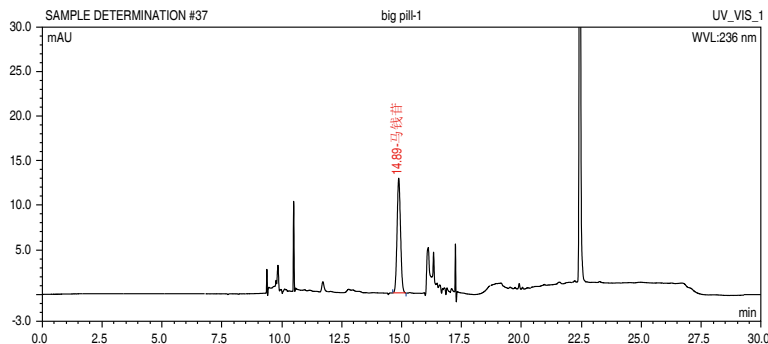


图3 六味地黄丸（大蜜丸）色谱图

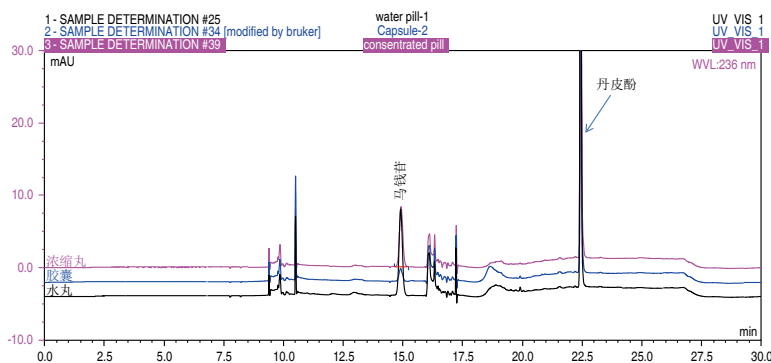


图4 六味地黄丸（水丸），胶囊和浓缩丸叠加色谱图

方法学考察

重复性实验

取大蜜丸样品溶液，在24小时内，间隔连续进样6次，每次进样5 μ L，马钱苷峰面积RSD为1.15%，含量的RSD为1.13%；丹皮酚峰面积的RSD为3.47%，含量的RSD为3.45%；表明方法重复性较好。

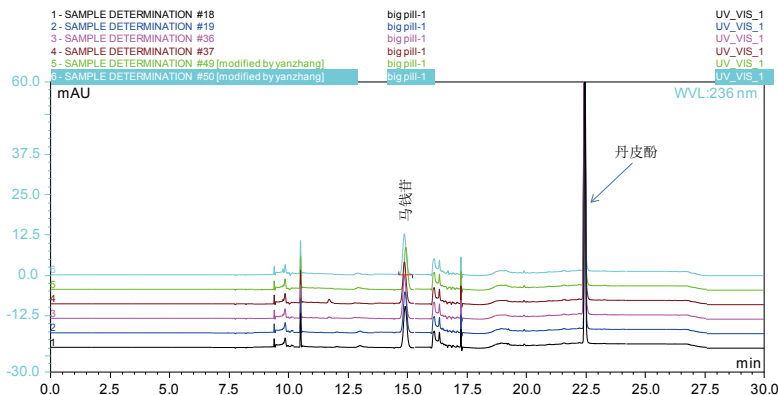


图5 大蜜丸测定马钱苷时连续进样6次叠加色谱图

线性关系考察

按上述色谱条件，马钱苷在2.6~53 μ g/mL、丹皮酚在3.9~78 μ g/mL范围内，相关系数r分别为0.9996和0.9998。

加样回收率实验

取已知含量的大蜜丸、水蜜丸和胶囊适量，分别加入与样品含量相当的对照品，按照样品前处理方法制备样品溶液，计算马钱苷和丹皮酚的回收率。结果表明回收率满足含量测定要求。

表 3 回收率测定结果

| 名称 | 待测成分 | 实际含量 μg | 添加量 μg | 测得量 μg | 回收率 % | 平均值 % |
|-----|------|--------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|
| 胶囊 | 马钱苷 | 115.2 | 106 | 222.4 | 101.1 | 100.1 |
| | | | | 220.3 | 99.2 | |
| | 丹皮酚 | 2222.4 | 1560 | 3757.4 | 98.4 | 97.7 |
| | | | | 3737.2 | 97.1 | |
| 水蜜丸 | 马钱苷 | 436.8 | 424 | 847.2 | 96.8 | 97.01 |
| | | | | 848.9 | 97.2 | |
| | 丹皮酚 | 889.2 | 780 | 1649.7 | 97.5 | 97.8 |
| | | | | 1654.4 | 98.1 | |
| 大蜜丸 | 马钱苷 | 505 | 424 | 907.8 | 95.0 | 95.1 |
| | | | | 908.7 | 95.2 | |
| | 丹皮酚 | 1343.3 | 780 | 2094.4 | 96.3 | 96.9 |
| | | | | 2104.6 | 97.6 | |

样品含量测定结果

按照前面确定样品前处理方法和分析方法测定六味地黄各个剂型中马钱苷和丹皮酚的含量。结果见表 4。

表 4 样品中马钱苷和丹皮酚含量测定结果 (n=2)

| 名称 | 待测物 | 含量 mg/g | 药典方法 ^[1] 测得含量 mg/g |
|-----|-----|---------|-------------------------------|
| 大蜜丸 | 马钱苷 | 0.50 | 0.52 |
| | 丹皮酚 | 1.33 | 1.37 |
| 水蜜丸 | 马钱苷 | 0.84 | 0.84 |
| | 丹皮酚 | 1.71 | 1.83 |
| 浓缩丸 | 马钱苷 | 1.58 | 1.72 |
| | 丹皮酚 | 1.85 | 1.96 |
| 胶囊 | 马钱苷 | 0.24 | 0.27 |
| | 丹皮酚 | 4.63 | 4.85 |

结论

专属性

本实验采用 PA II C₁₈ 小柱作为一维净化柱, 甲醇 -0.1% H₃PO₄ 水系统进行梯度洗脱, 二维分析采用 C₁₈ 色谱柱, 乙腈 -0.1% H₃PO₄ 水梯度分析。通过色谱柱和流动相系统差异, 增加了二维分离选择性, 从而确保目标成分色谱峰具有较好专属性。从目标色谱峰 UV 谱图的均匀性可以看出, 2 种目标成分测定方法的专属性较好。

可行性分析

该方法采用 online-SPE 即在线固相萃取方法同时测定六位地黄丸及其他制剂中马钱苷和丹皮酚的含量, 方法专属性好, 回收率高, 且整个分析过程简便、快速, 大大加快了样品分析的效率, 可满足现行药典对马钱苷和丹皮酚的测定要求。

参考文献

[1]ChP(中国药典). 2010.Vol I (一部): 597~598, 600~601.

DGLC-09 在线柱净化 - 高效液相色谱测定复方甘草片中吗啡含量

关键词：在线柱净化；复方甘草片；吗啡；高效液相色谱

DGLC-09 Determination of morphine in Fu Fang Gan Cao Pill by HPLC with online solid-phase extraction

Key words: Online-SPE, Fu Fang Gan Cao Pill, morphine, HPLC

引言

吗啡是一种强极性生物碱，在 C_{18} 色谱柱上保留很弱。2010 版《药典》测定复方甘草片中的吗啡含量采用离子对方法，但吗啡保留依旧很弱。样品测定时，由于吗啡极易受样品中其他组分干扰，所以测定前须对样品溶液进行净化。本实验将离线固相萃取柱净化过程用双三元液相系统来代替并实现在线化，从而提高了样品分析的速度、简化了繁琐的样品前处理过程。

测试条件

在线 SPE 方法

仪器：Ultimate 3000；包括：带在线脱气单元的双三元梯度泵，自动进样器，带有一个六通阀的柱温箱，CAD 检测器。连接图见图 1。

分析柱：Acclaim 120Å C8, 5 μ m 4.6 × 150 mm

SPE 柱：Acclaim PA2 Cartridge, 5 μ m 4.6 × 10 mm

柱温：30 °C

富集系流动相条件和流速：见表 1

分析泵流动相条件和流速：等度 A : B : C = 41.5 : 41.5 : 17

检测波长：220nm 进样量：10 μ L

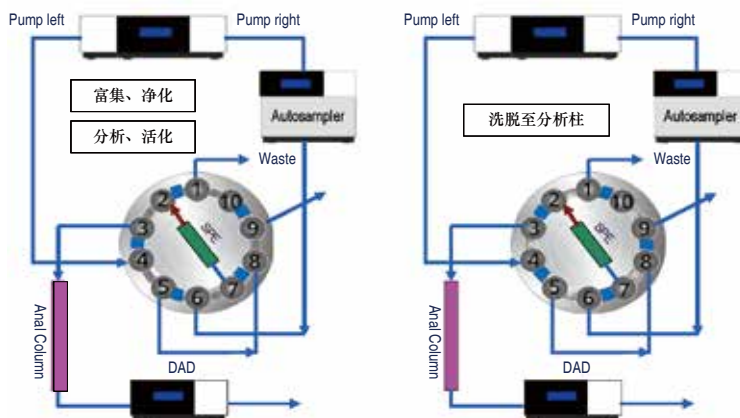


图 1 仪器连接图

表 1 梯度程序和阀切换时间

| 时间 (min) | 富集泵 (B%) | 富集泵 (C%) | 阀切换时间 (min) | 阀 |
|-------------|-------------|-------------|----------------|------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 1-2 |
| 3 | 0 | 0 | 4.05 | 10-1 |
| 3.1 | 7 | 93 | 4.25 | 1-2 |
| 6 | 7 | 93 | - | - |
| 6.1 | 70 | 0 | - | - |
| 10 | 70 | 0 | - | - |
| 10.1 | 0 | 0 | - | - |
| 15 | 0 | 0 | - | - |

*: 流动相 A% = 100% - B%

*: Mobile phase A% = 100% - B%

样品前处理

待测样品前处理

参照 2010 版《药典》中相关方法, 取复方甘草片 30 片, 精密称定, 研细, 精密称取约 10 片量, 至磨口锥形瓶中, 精密加水 90 mL, 超声提取 5 min, 精密加稀盐酸 (6 → 10) 5 mL, 超声提取 20 min, 取出, 放冷, 过 0.45 μ m 滤膜后, 待测。

结果和讨论

标样色谱图 (86 μ g/mL) :

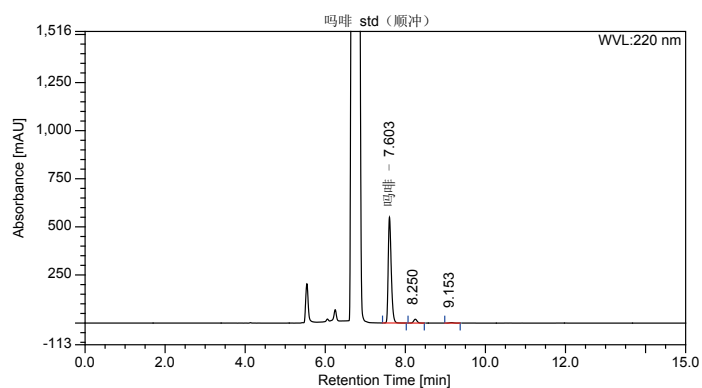


图 2 标样测定图谱

吗啡光谱图:

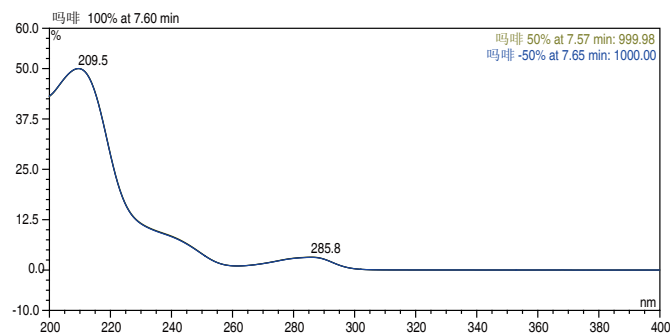


图 3 吗啡光谱图

方法精密度:

按上述色谱条件,以甘草样品溶液考察方法重现性,连续5针进样,得出吗啡峰面积 RSD < 0.1%,保留时间 RSD < 0.5%。

连续5针进样精密度:

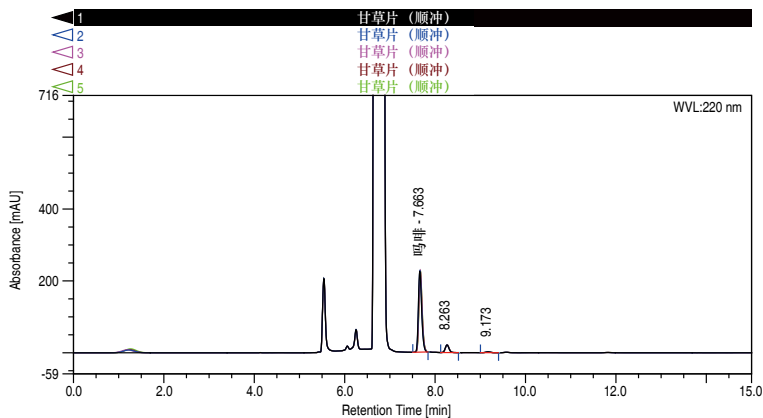


图4 精密度测定图谱

表2 精密度测定结果

| Sample No. | Sample Name (min) | Ret.Time (min) | Area (mAU*min) | Height (mAU) | Amount (ug/mL) | Plates (EP) |
|--------------|-------------------|----------------|----------------|--------------|----------------|-------------|
| 11 | 甘草片 (顺冲) | 7.663 | 19.2232 | 224.679 | 34.4413 | 53021 |
| 12 | 甘草片 (顺冲) | 7.663 | 19.3016 | 226.6663 | 34.5818 | 53476 |
| 13 | 甘草片 (顺冲) | 7.670 | 19.3970 | 227.3132 | 34.7528 | 53341 |
| 14 | 甘草片 (顺冲) | 7.673 | 19.2924 | 225.3804 | 34.5652 | 53160 |
| 15 | 甘草片 (顺冲) | 7.673 | 19.3029 | 226.1761 | 34.5840 | 53387 |
| Average: | | 7.669 | 19.3034 | 226.043 | 34.5850 | 53277 |
| Rel.Std.Dev: | | 0.07% | 0.32% | 0.46% | 0.32% | 0.35% |

注: RT: 保留时间, 单位为 min; Area: 峰面积, 单位为 mAU*min

样品测定

按样品前处理方法测定了某品牌复方甘草片,以单标法定量,该样品中吗啡含量为 0.35mg/片(该值略小于药典要求,因吗啡标准品较难买到,因此未配母液,标准校准溶液由直接称量 0.86mg 吗啡溶解于 10mL 5% 醋酸溶液所得),样品色谱图如下。

复方甘草片 (内嵌为吗啡峰光谱图):

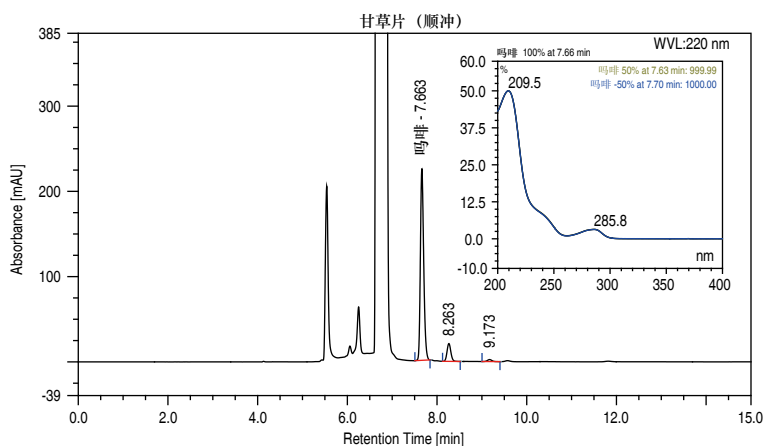


图5 复方甘草片测定图谱

注: 8.263min 处峰为流动相中引入杂质,并非样品中的组分,在做空白实验时亦有此峰。

结论

复方甘草片提取液在线净化效果

吗啡标准溶液直接进样色谱图及光谱图（分析方法参照 2010 版《药典》）：

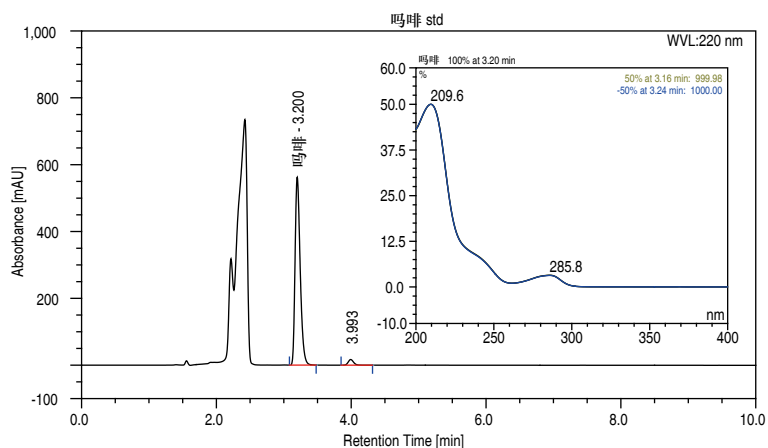


图 6 吗啡标准溶液直接进样色谱图及光谱图

复方甘草片样品提取液未净化直接进样色谱图及光谱图：

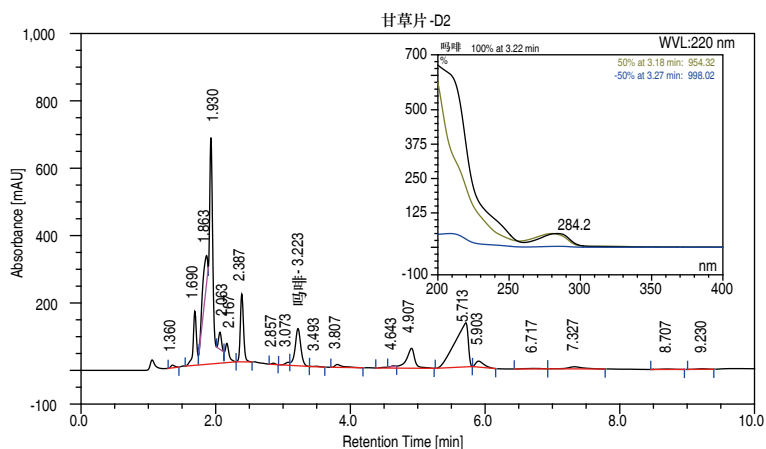


图 7 复方甘草片样品提取液未净化直接进样色谱图及光谱图

从上图可以发现，复方甘草片提取液若不进行净化，样品色谱图中杂峰很多且吗啡峰型不对称，光谱图纯度较差，说明吗啡出峰处存在共流出物。

DGLC-10 在线固相净化方法结合电雾式检测器测定黄芪 及复方中黄芪甲苷的含量

关键词：在线固相净化；高效液相色谱法；黄芪；中药；黄芪甲苷，电雾式检测器（CAD）

DGLC-10 Online-SPE determination of astragaloside IV in Radix Astragali and its preparations by HPLC-Charged aerosol detector

Key words: Online solid-phase purification, HPLC, Radix Astragali, astragaloside IV, CAD, TCM

引言

黄芪是常见的补益类中药，也是中药方剂配伍及其制剂中使用频率较高的中药。其中黄芪甲苷是主要活性成分，药品标准中常将其作为质量评价指标成分。但黄芪甲苷的测定有两个难点，一是黄芪甲苷是末端吸收的物质，采用 UV 末端波长或 ELSD 检测，灵敏度较差；二是黄芪甲苷在黄芪中含量较低，基质成分复杂。2010 版药典一部中，黄芪药材的前处理工艺采用正丁醇萃取，经过 D101 大孔吸附树脂离线纯化后，用 HPLC-ELSD 检测^[1, 2]，前处理步骤较多，黄芪甲苷回收率不高。电雾式检测器（CAD）是一种通用型检测器，具有宽的动态范围和低至 ng 级的检测灵敏度，它的检测不依赖于分析物光学性质，也不依赖于分析物在气相中离子化的能力，能够检测所有非挥发性的物质，同时适用于各种分离模式，如等度、梯度，HILIC，离子交换，SFC 和 SEC 等。

本文利用双三元高效液相系统 (Dual Gradient Liquid Chromatography, DGLC)，采用在线净化方法结合电雾式检测器检测，对样品进行净化后再自动切换到分析柱上进行分析，系统连接方式见图 1。这套系统还成功应用于归脾丸（浓缩丸），补肾固齿丸，益气养血口服液和颈复康颗粒等含黄芪的中药复方样品的分析，测定了其中黄芪甲苷的含量。该方法可实现样品自动化处理，回收率高，在线 SPE 柱可重复利用等优点。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

富集柱：Acclaim[®] PA II，3 μ m 4.6 × 50 mm

分析柱：Acclaim[®] C₁₈，5 μ m 4.6 × 150 mm

柱温：35 °C

CAD：雾化器温度：30°C；气体 (N₂) 压力：35.0psi；数据采集频率：5Hz

流速：1.0ml/min

流动相组成及流速见表 1，梯度程序见表 2

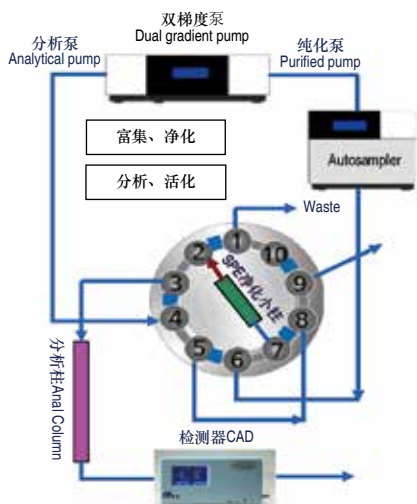


图 1-1 阀 1-2 位相通时连接图

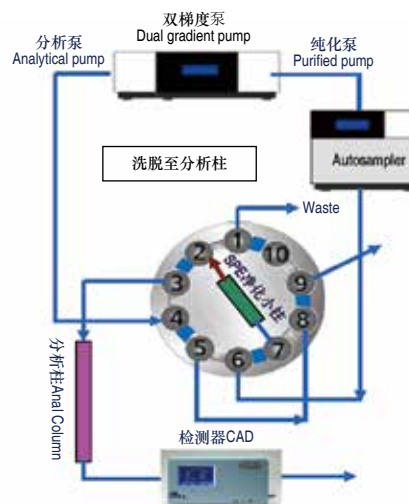


图 1-2 阀 1-10 位相通时连接图

图 1 仪器连接图

表 1 流动相组成

| | 富集泵 (right pump) | 分析泵 (left pump) |
|-------|---------------------|--------------------|
| 流动相 A | Water | |
| 流动相 B | MeOH | ACN |

表 2 富集泵梯度洗脱条件

| 时间 (min) | (A%) | (B%) | 时间 (min) | 阀 |
|-------------|------|------|-------------|------|
| 0 | 100 | 5 | 0 | 1-2 |
| 3 | 100 | 25 | 24 | 10-1 |
| 30 | 5 | 25 | 24.9 | 1-2 |
| 40 | 5 | 75 | | |
| 40.1 | 100 | 95 | | |
| 50 | 100 | 5 | | |

样品前处理方法

取黄芪饮片，粉碎成中粉约 4 g，精密称定，置 100mL 圆底烧瓶中，加 2%KOH/ 甲醇溶液 50mL，称定重量，冷浸过夜，加热回流 2 小时，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过。精密量取续滤液 5mL，以 50% 盐酸溶液调至中性，转移至 10mL 量瓶中，加水定容，即得。

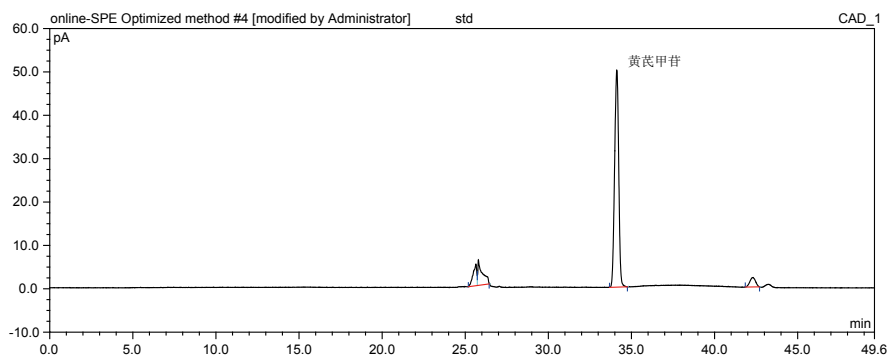


图 2 黄芪甲苷对照品色谱图

结果和讨论
实际样品分析

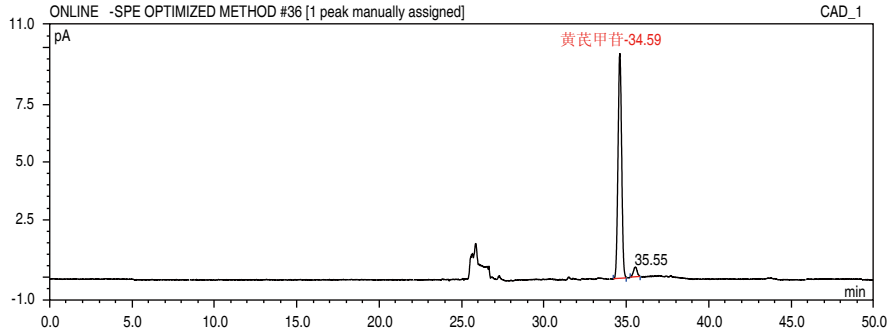


图3 黄芪饮片（蜜炙）色谱图

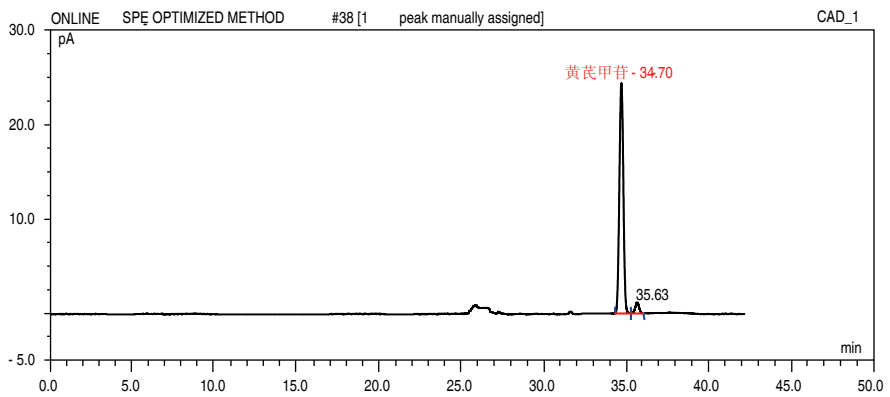


图4 黄芪饮片（生品）色谱图

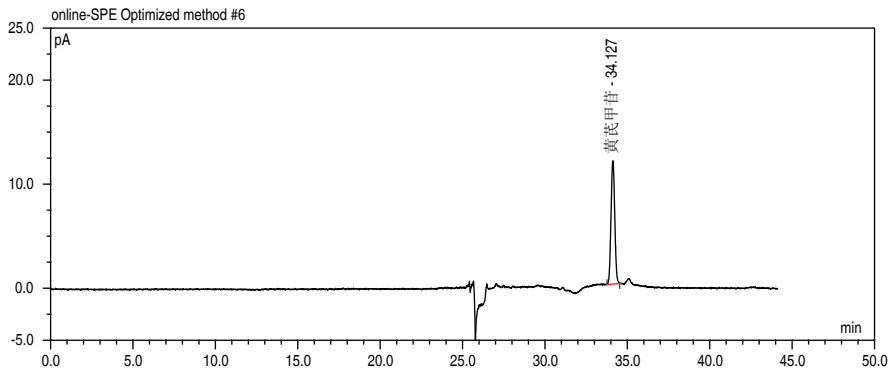


图5 归脾丸色谱图（进样体积 100 μ L）

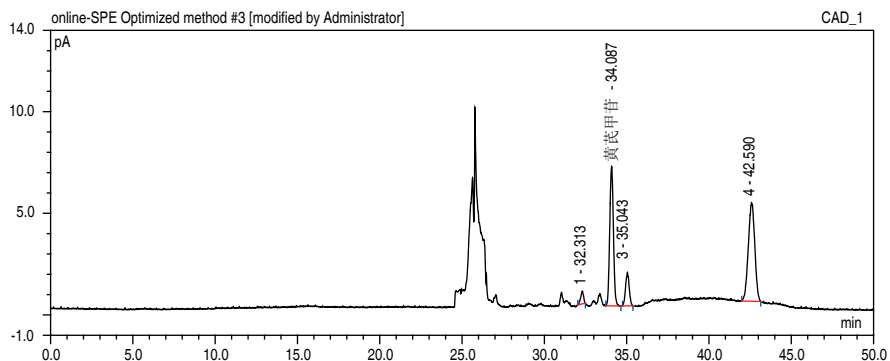
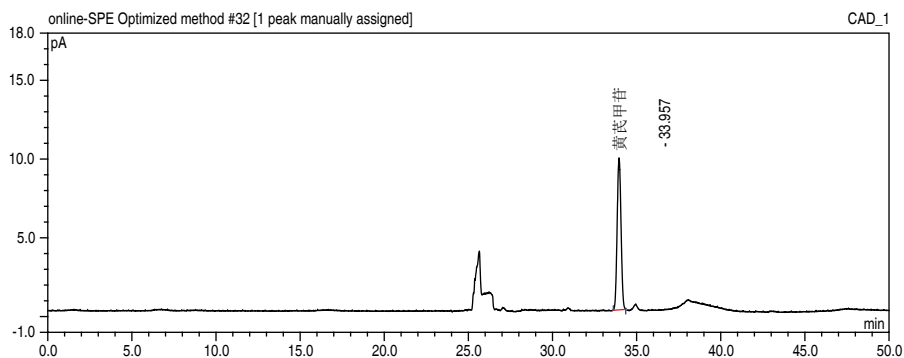
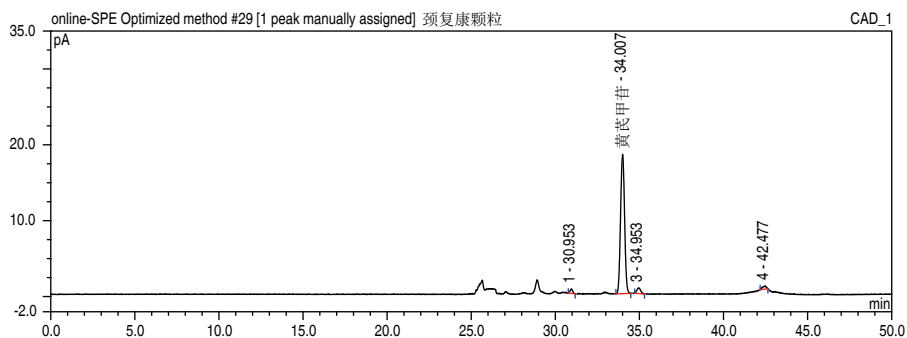


图6 益气养血口服液色谱图（进样体积 50 μ L）

图 7 补肾固齿丸色谱图 (进样体积 50 μ L)图 8 预复康颗粒色谱图 (进样体积 50 μ L)

黄芪药材测定结果

表 3 不同测定方法测得药材中黄芪甲苷的含量

| 方法名称 | 黄芪 (生品) 含量 % | 黄芪 (蜜炙) % |
|-------------------|--------------|-----------|
| Online-SPE | 0.166 | 0.063 |
| 常规方法 ¹ | 0.136 | — |

“1” 参考 2010 版药典一部 黄芪 项下 黄芪甲苷的含量测定方法。

表 4 黄芪 (蜜炙) 不同提取方法测得黄芪甲苷含量

| 方法名称 | 黄芪 (蜜炙) % |
|---------------------|-----------|
| 回流提取 | 0.063 |
| ASE 提取 ² | 0.069 |

“2” ASE 提取条件为:

溶剂: 甲醇; 萃取温度: 140 $^{\circ}$ C; 静态萃取时间 10 分钟, 循环 3 次;
吹扫体积: 60%, 吹扫时间: 90s

讨论

提取溶剂选择: 黄芪甲苷在药材中主要是以其结构中 C3 位木糖配基上不同位置羟基的乙酰化物的形式存在, 原化合物实际含量很低, 不经特殊处理, 甲醇提取后直接测定含量较低。目前是利用其乙酰化物在碱性溶剂中可还原为黄芪甲苷的特点, 在供试品处理过程中将部分乙酰化物转化为黄芪甲苷, 提高其含量, 以满足检测需要。这种方法多年来已广泛用于控制黄芪药材和制剂的质量。因此在药材的提取溶剂选择上, 本实验采用 2%KOH 甲醇溶液进行提取, 结果表明黄芪甲苷的提取率较高, 方法重现性较好。

提取方法: 本实验初步对比了 ASE 提取与回流提取方法, 结果表明在保证与回流提取法黄芪甲苷含量测定结果一致的前提下, ASE 提取方法可以显著减少药材的提取时间, 从而加快分析效率。

一维净化柱选择：为保持一维和二维的选择性的差异，本实验采用 PA II C₁₈ 柱，及甲醇 - 水梯度洗脱方式。在柱长选择上，对比了 50mm 与 10mm 两种规格的净化柱，10mm 小柱对于黄芪药材可以到达较好的净化效果，但对于基质较复杂的复方中药，50mm 小柱较好，综合考虑，确定了 50mm 的 PA II C₁₈ 作为一维的净化柱。

结论

与常规分析方法比较，在线前处理的方法具有以下几个优点：

1) 方法的专属性较好。通过一维和二维色谱柱选择性差异和洗脱溶剂上的差异，可以保证方法具有较好的分离干扰基质成分的效果。

2) 对分析柱有保护作用。中药尤其是复方中药的样品基质成分较复杂，对色谱柱污染较大，色谱柱的使用寿命会降低。采用在线纯化方法，通过阀切换，可以避免污染物进入分析柱，从而延长了分析柱的使用寿命。

3) 方法简便，快速。常规分析方法包括正丁醇萃取和大孔树脂的离线除杂处理过程，样品制备时间较长，且由于前处理步骤较多，最后的测定结果误差也较大。采用在线净化方法，样品提取后，直接进样分析，方法简便，且结果精密度、重现性较好。

参考文献

[1] ChP(中国药典). 2010.Vol I (一部): 283

[2] 陈海明. HPLC-ELSD 法测定黄芪及其复方制剂中黄芪甲苷的含量. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 426

DGLC-11 在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 紫外检测法测定纺织品中直链烷基苯磺酸盐 (LAS)

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；纺织品；直链烷基苯磺酸盐

DGLC-11 Determination of linear alkylbenzene sulphonate in textile using online solid-phase extraction followed by HPLC with UV detection

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV; textile; linear alkylbenzene sulphonate

引言

直链烷基苯磺酸盐 (LAS) 通常是指由直链烷基碳数从 10 到 13 的同系物 (homolog) 组成的混合物，结构式见图 1。

欧盟纺织品生态标准 Eco-Label 明确规定 LAS 为禁用和限制使用的部分纺织品化学品之一。国标 GB/T 23325-2009 检测 LAS 使用昂贵的 LC-MS/MS 连用方法，检出限仅为 2mg/kg^[1]。而本方法使用双三元高效液相系统 (DGLC-3600)，采用在线固相萃取 (On-line SPE) 技术对样品进行在线富集后再进行 HPLC 检测，进样 100 μ L 样品即可达到总含量 0.15 mg/kg 的检出限 (通过增大进样体积还可以进一步降低检出限)。该方法能够对含不同碳数的 LAS 进行基线分离，因而可使用紫外检测器进行直接检测，而无需使用质谱。该方法可实现样品的自动化前处理，灵敏度高，回收率好，在线 SPE 柱可重复使用，可大大节约测试成本。

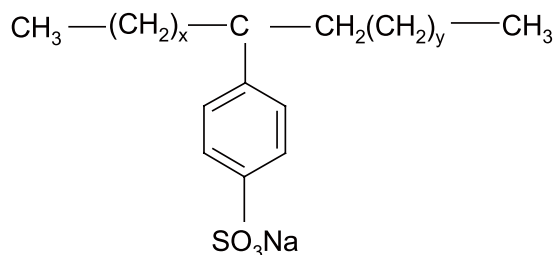


图 1 LAS 结构图

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系统，包括：带在线脱气单元的双三元梯度泵，自动进样器，带有一个六通阀的柱温箱，紫外检测器，系统连接参见图 2。

分析柱：Acclaim[®] surfactant, 5 μ m 250 \times 4.6 mm

保护柱：Acclaim Surfactant Guard, 4.3 \times 10 mm

富集柱：IonPac NG1, 5 μ m 4 \times 35mm

柱温：30 $^{\circ}$ C

检测波长：225 nm

进样量：100 μ L

流动相组成及流速见表 1

梯度洗脱条件见表 2

表 1 流动相组成及流速

| 富集泵 (Left pump) | | 分析泵 (Right pump) | |
|-----------------|------------------|---|------------|
| 流动相 A | ACN | ACN: 100 mmol/L NH ₄ OAC=7:3 (v/v) (pH=5, 以盐酸调节) | |
| 流动相 B | H ₂ O | | |
| 流速 | 1.0 mL/min | 流速 | 1.0 mL/min |

表 2 梯度洗脱条件

| 时间 (min) | 富集泵 (B%) | 阀位置 |
|----------|----------|-----|
| -5.0 | 100 | 1-2 |
| 0 | 100 | 6-1 |
| 5.2 | 100 | 1-2 |
| 6.0 | 0 | -- |
| 17.0 | 0 | -- |
| 18.0 | 100 | -- |
| 25.0 | 100 | -- |

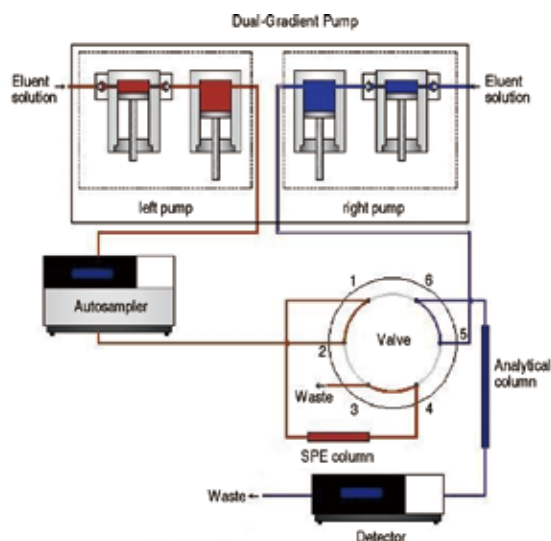


图 2-1 阀 1-2 位相通时连接图

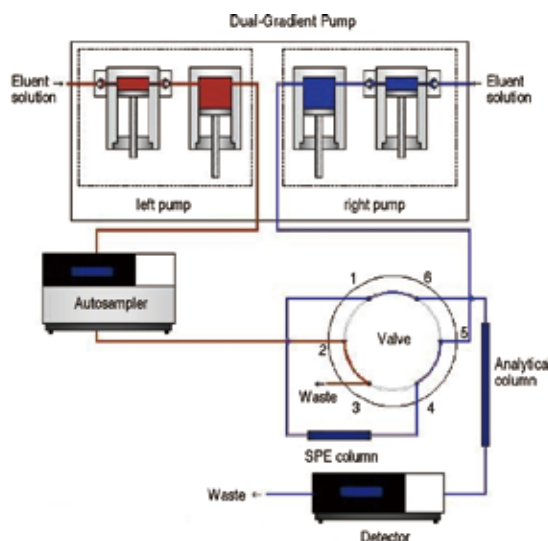


图 2-2 阀 1-6 位相通时连接图

图 2 仪器连接图

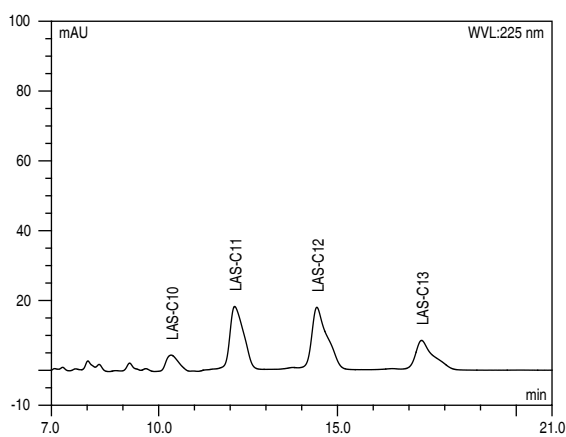
样品前处理

取代表性样品，剪成 5 mm × 5 mm 的碎片，混合，称取上述样品 0.25 g，准确加入甲醇 5 mL，加塞密闭，置于 75℃ 超声波水浴中提取 30min，冷却至室温。提取液用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后，根据需要用甲醇进一步稀释，待测。

结果和讨论

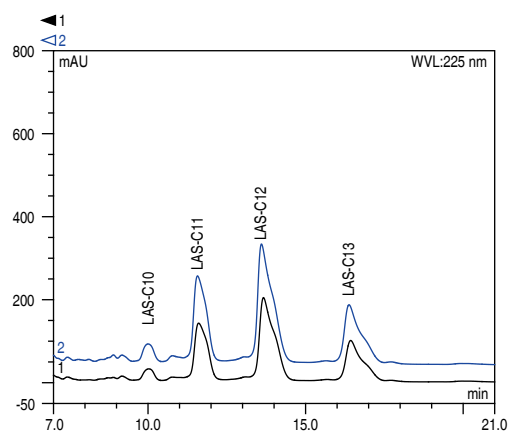
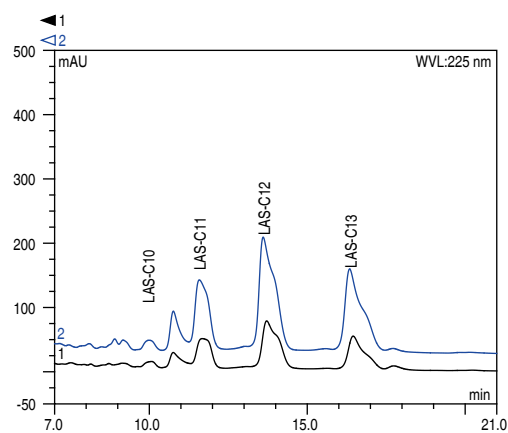
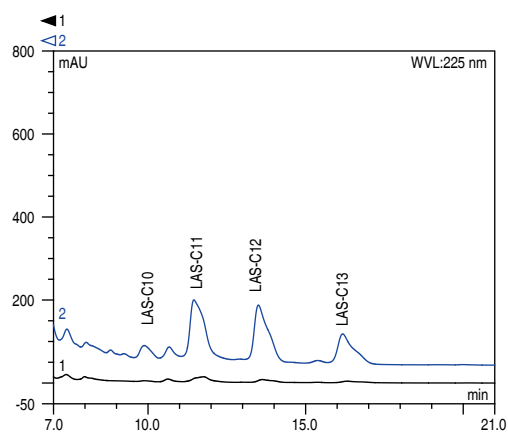
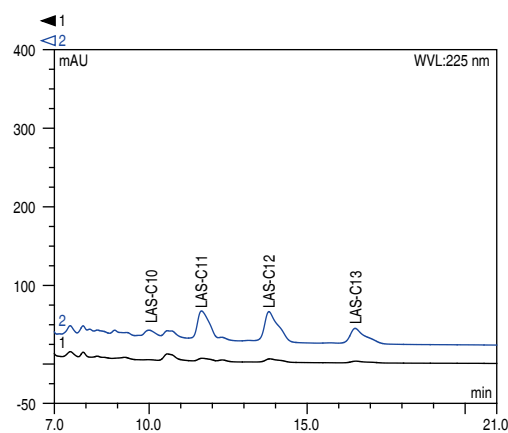
标准品色谱图

图 3 为 LAS 混合标准谱图。LAS 的线性烷基链一般在 C₁₀~C₁₃，平均碳链是 11.6。市售的 LAS 约含 20 多种化合物，包含有不同碳链的同系物及不同取代位置的异构体，也因而 C₁₀~C₁₃ 的色谱峰形并不规则。

图3 混合标准溶液色谱图 (LAS 总浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$)

线性、检出限

按上述色谱条件, 以 LAS 总峰面积进行评价, 本测定方法在 5 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 线性良好, 线性相关系数 $r > 0.9991$ 。以 3 倍噪音峰高为检出限, 该方法检出限为 0.15 mg/kg 。

(A) 棉布样品及棉样品加标 20 $\mu\text{g/g}$ (B) 牛仔布样品及牛仔样品加标 20 $\mu\text{g/g}$ (C) 无纺布样品及无纺布加标 20 $\mu\text{g/g}$ (D) 绸布样品及样品加标 20 $\mu\text{g/g}$ 图4 样品及加标样品谱图 (1- 样品; 2- 样品加标 20 $\mu\text{g/g}$)

实际样品的分析

棉布、牛仔布、无纺布、绸布样品及样品加标 20 $\mu\text{g/g}$ 谱图见图 4，加标回收率见表 3

表 3 样品中 LAS 的加标回收试验（按 LAS 总量计算）

| 样品名称 | 测得值 ($\mu\text{g/g}$) | 加标量 ($\mu\text{g/g}$) | 稀释倍数 | 加标测得值 ($\mu\text{g/g}$) | 回收率 (%) |
|------|----------------------------|----------------------------|------|------------------------------|------------|
| 棉布 | 95.05 | 20 | 2 | 105.18 | 101.3 |
| 牛仔布 | 52.3 | 20 | 2 | 63.23 | 109.3 |
| 无纺布 | 7.78 | 20 | 1 | 31.57 | 118.9 |
| 绸布 | 2.84 | 20 | 1 | 25.58 | 113.7 |

结论

本方法使用赛默飞双三元液相色谱系统 (Ultimate 3000 DGLC) 在线固相萃取技术 (online SPE)，实现样品在线富集及基体去除。Acclaim[®] surfactant 色谱柱可以实现对含不同碳数的 LAS 的基线分离，紫外检测器即可直接检测。以 IonPac NG1 柱做在线 SPE 柱，可以兼容 100% 水相，且可反复使用，节约成本。

本方法适于纺织品中十二烷基苯磺酸钠 (LAS) 的测定，样品干扰少，回收率高，检出限明显低于国标方法。根据测定需要，还可增大进样量以进一步降低检出限。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家标准，GB/T 23325-2009 《纺织品 表面活性剂的测定 线性烷基苯磺酸盐》

DGLC-12 在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 紫外检测法测定聚合物中偶氮二异丁腈 (AIBN)

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；聚合物；偶氮二异丁腈

DGLC-12 Determination of Azodiisobutyronitrile (AIBN) in polymer using online solid-phase extraction followed by HPLC-UV

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV detection; polymer; Azodiisobutyronitrile

引言

偶氮二异丁腈 (AIBN, 结构图见图 1) 常用作醋酸乙烯和丙烯酸酯等聚合或共聚合的引发剂, 其加入量直接影响聚合度。AIBN 易燃, 有毒, 遇热分解放出氮气和含 $-(\text{CH}_2)_2-\text{C}-\text{CN}$ 基团的有机氰化物, 对人体危害较大^[1]。

目前测定 AIBN 含量的方法有极谱法和分光光度法, 极谱法使用剧毒物质汞, 对人体危害极大。分光光度法测定聚合物中 AIBN 的含量方法简便, 但是样品基质干扰大。

AIBN 自身紫外吸收较弱, 分解温度为 64°C , 室温下缓慢分解, 100°C 急剧分解。一般在聚合物中含量较低, 采用 HPLC-UV 或者高灵敏度的质谱或者蒸发光散射检测器均无法达到要求。由于此聚合物样品中含有不易挥发的 DMSO, 常见的无需加热的浓缩方式 (如氮吹、冻干) 也受阻。本文利用双三元高效液相系统 (DGLC-3600), 采用在线固相萃取方式 (On-line SPE) 对样品进行在线富集后再进行 HPLC 检测, 实验证明此方法可行。

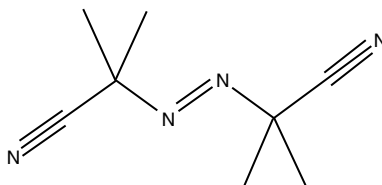


图 1 偶氮二异丁腈 (AIBN) 结构图

测试条件

仪器: Ultimate DGP 3600 系列, 包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵; 自动进样器 WPS 3000TSL(配 2.5mL 半制备进样组件); 带有一个六通阀的柱温箱; 紫外检测器。连接图见图 2。

分析柱: Acclaim® 120 C₁₈, 5μm 4.6 × 150 mm

富集柱: Acclaim® 120 C₁₈, 5μm 4.3 × 10 mm

柱温: 20 °C

自动进样器温度: 20 °C

检测波长: 346 nm

进样量: 2.5mL

流动相组成及流速: 见表 1

阀切换情况: 见表 2

表 1 流动相组成

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 富集泵 (left pump) | 分析泵 (right pump) |
| 10%MeAC+90%H ₂ O | 50%MeAC+50% H ₂ O |

表 2 阀切换情况

| 时间 (min) | 阀位置 | 备注 |
|----------|-----|------------------|
| 0 | 1-2 | 进样, 样品在 SPE 柱上富集 |
| 7 | 6-1 | 富集结束, 触发阀切换 |
| 13 | 1-2 | 等度洗脱 |

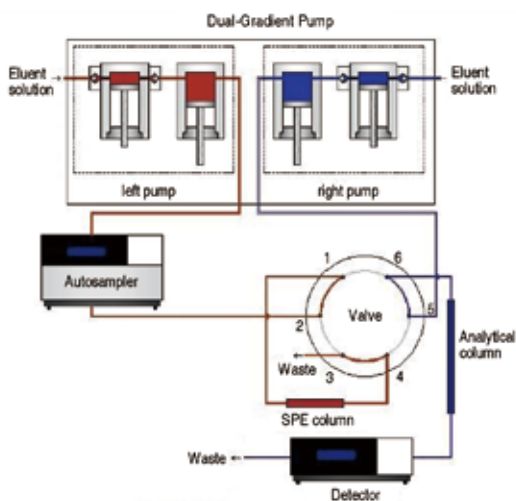


图 2-1 阀 1-2 位相通时连接图

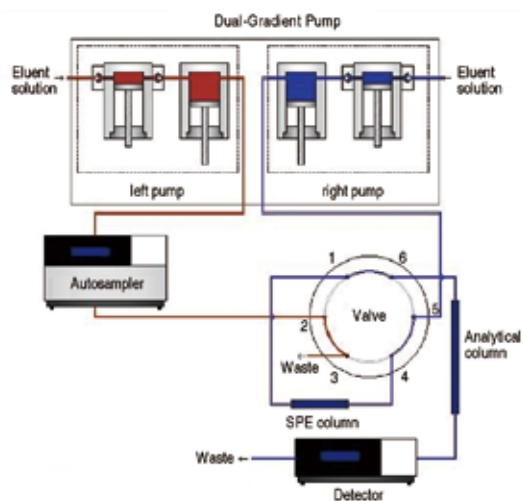


图 2-2 阀 1-6 位相通时连接图

2 仪器连接图

样品前处理

准确称取 1.0 g 聚合物溶液, 在约 10 倍体积的二氯甲烷中沉淀, 于 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10min。取上清液, 常温下氮吹除去二氯甲烷, 得到 AIBN 的二甲基亚砷溶液, 加入 1 mL 甲醇, 混合均匀, 用水稀释至 10mL, 于 4 °C 下 10 000 r/min 再次离心 10min, 过滤, 取上清液待测。

结果和讨论

标准品色谱图

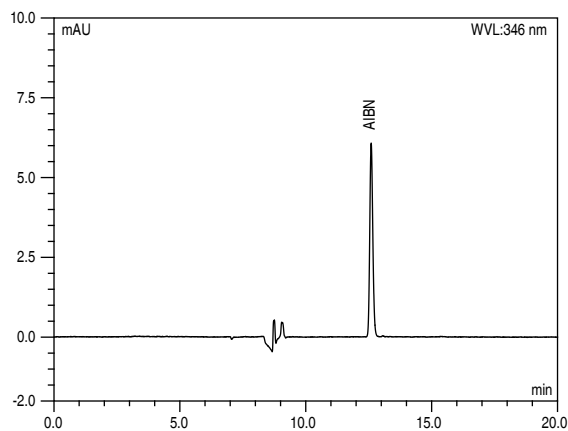


图 3 偶氮二异丁腈 (AIBN) 5 μg/mL

线性、检出限

按上述色谱条件，以峰面积进行评价，本测定方法在 $1.0\mu\text{g/mL} \sim 10\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，AIBN 线性良好，线性相关系数 $R > 0.9995$ ，检测限（按 $S/N = 3$ ）为 $0.1\mu\text{g/mL}$ 。

实际样品的分析

(1) 重结晶 AIBN 含量测试，用甲醇配成 10mg/mL 溶液后，用水稀释为 $10\mu\text{g/mL}$ 溶液，连续三次进样，谱图见图 4，重复性数据见表 3。

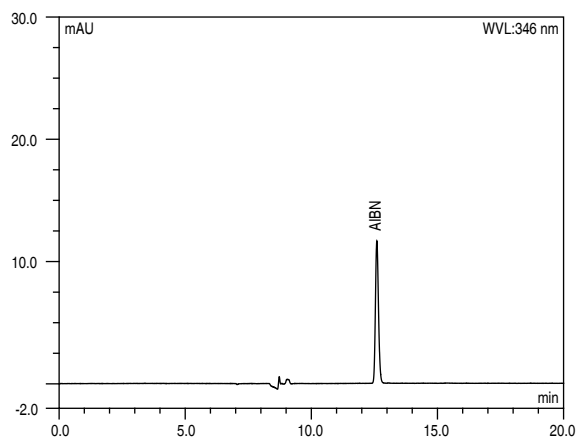


图 4 重结晶 AIBN 测试谱图

表 3 重结晶 AIBN 溶液 $10\mu\text{g/mL}$ 重复数据 ($n=3$)

| 样品 | 保留时间 min | 峰面积 mAU*min | 峰高 mAU | 含量 $\mu\text{g/mL}$ | 塔板数 (EP) |
|----------|-------------|----------------|-----------|------------------------|-------------|
| 10-un-1 | 12.597 | 1.6345 | 11.68 | 9.6722 | 52283 |
| 10-un-2 | 12.597 | 1.6321 | 11.63 | 9.6577 | 51883 |
| 10-un-3 | 12.597 | 1.6331 | 11.66 | 9.6640 | 52016 |
| Average: | 12.597 | 1.633 | 11.654 | 9.665 | 52061 |
| RSD | 0.000 % | 0.075 % | 0.204 % | 0.075 % | 0.391 % |

(2) 聚合物样品及加标样品谱图

按照样品前处理方法处理后进行 HPLC 测试，谱图如图 4，加标回收结果参见表 4。

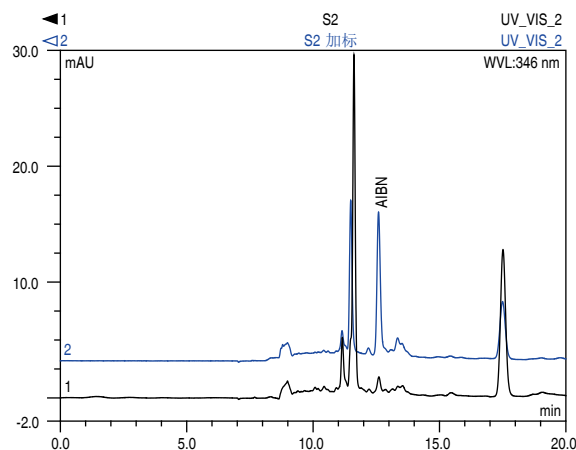


图 5 聚合物样品及样品加标谱图 (1- 聚合物; 2- 样品加标)

表 4 聚合物样品中 AIBN 的加标回收实验

| 样品测试液含量 ($\mu\text{g/mL}$) | 折合原样含量 ($\mu\text{g/g}$) | 加标量 ($\mu\text{g/g}$) | 测得加标样含量 ($\mu\text{g/g}$) | 加标回收率 (%) |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------|
| 1.080 | 10.80 | 95.20 | 79.66 | 75.2% |

结论

采用在线固相萃取技术，同时进行了基体去除和待测组分富集，可有效提高此类热不稳定且紫外响应较弱的化合物的检测灵敏度，本方法灵敏度高，方法重复性好。

注意事项

本实验难点在于前处理，样品中含有 DMSO，如果进样溶液中有 DMSO，势必仍会有一些聚合物溶解其中，所以要尽量除去 DMSO。DMSO 熔点较高，为 18.5°C ，所以采用 4°C 下离心以最大程度上除去 DMSO 和溶解在其中的聚合物。

本实验中过滤溶液所用滤膜为尼龙滤膜，DMSO 对尼龙有一定程度的溶解，为了保护色谱柱，应该用 DMSO 专用膜。

参考文献

[1] 在线化工词典，偶氮二异丁腈，<http://hellochem.com/xz/xz1/1493yyeee.htm>

DGLC-13 采用在线 SPE 与离线 SPE-液质联用法分析化妆品中的 41 种糖皮质激素比较

关键词：在线固相萃取；离线固相萃取；糖皮质激素；液质联用

DGLC-13 Comparison of On-Line SPE and off-line SPE for the determination of 41 glucocorticoid by LC-MS

Key words: On-line SPE; Off-line SPE; glucocorticoid; LC-MS

引言

糖皮质激素 (glucocorticoid, GCS) 是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素, 主要为皮质醇 (cortisol), 具有调节糖、脂肪、和蛋白质的生物合成和代谢的作用, 还具有抑制免疫应答、抗炎、抗毒、抗休克作用。化妆品中添加“糖皮质激素”, 可降低毛细血管的通透性、减少渗出和细胞浸润, 具有抗炎、抗过敏、免疫抑制、抗增生等作用。但含有此类激素成分的化妆品如果长期使用, 皮肤就会产生如同上瘾的症状, 只要停用, 过敏症状就会加重发作、反弹, 造成毛细血管扩张、萎缩, 皮肤变薄, 痤疮加重, 色素沉着, 甚至出现多毛、皮炎等症状。因此, “糖皮质激素”也被称作是“皮肤鸦片”, 在我国是严禁用在化妆品当中的。

我国分别出台了标准, 进出口化妆品中糖皮质激素类与孕激素类检测方法 (SN / T 2533-2010), 化妆品中 41 种糖皮质激素的测定液相色谱 / 串联质谱法和薄层层析法 (GB/T 24800.2-2009)。均采用液相色谱串联质谱法进行了分析, 前处理过程均采用乙腈提取, SPE 小柱净化, 上样分析。由于离线 SPE 前处理步骤较多, 过程较为繁琐, 分析时间较长, 重现性不好, 回收率不稳定, 因此, 本方法尝试采用在线 SPE 替代掉离线 SPE, 实现快速, 自动样品的前处理, 大大节省了前处理时间, 提高了分析速度, 节省了 SPE 前处理试剂。

测试条件

表 1 离线 SPE 色谱质谱条件

| | |
|---------|---|
| 色谱柱类型 | 分析柱: Acclaim 120 C ₁₈ , 3.0 μ m 2.1 \times 150mm (P/N: 059130, S/N:01160446) |
| 流动相组成 | A:0.1% 甲酸水, B:0.1% 甲酸乙腈 0.3 ml/min; 0-8min, B 保持 30%; 8-20min, B 从 30% 到 75%; 20min-25min, B 保持 75%, 25min-30min; B 返回 30%, 平衡色谱柱 |
| 进样方式及体积 | 自动进样: 20.0 μ L |

表 2 在线 SPE 色谱质谱条件

| | |
|---------|---|
| 色谱柱类型 | 分析柱: Acclaim 120 C ₁₈ , 3.0 μ m 2.1 \times 150mm (P/N: 059130, S/N:01160446) SPE 柱: IonPac NG1-10 μ m Guard Column, 4 \times 35 mm (P/N: 039567) |
| 流动相组成 | SPE 小柱: 水 B: 乙腈 = 90: 10, 等度洗脱, 流速: 0.3ml/min 分析柱: A:0.1% 甲酸水, B:0.1% 甲酸乙腈 0.3 ml/min; 0-8min, B 保持 30%; 8-20min, B 从 30% 到 75%; 20min-25min, B 保持 75%, 25min-30min; B 返回 30%, 平衡色谱柱 |
| 进样方式及体积 | 自动进样: 20.0 μ L |
| 阀切换时间 | 0-2min, 6-1, SPE 小柱上样; 2min-30min, 1-2, SPE 柱洗脱 |

表 3 化合物清单

| 编号 | 化合物名称 | 英文名称 | 离线保留 时间 | 在线保留 时间 | 母离子 (M+H) | S-Lens | 子离子 (M+H) | 碰撞 能量 |
|----|-----------|-------------------------|------------|------------|--------------|--------|----------------|----------|
| 1 | 曲安西龙 | triamcinolone | 1.92 | 6.18 | 395.2 | 110 | 225.1 357.1 | 14 8 |
| 2 | 泼尼松龙 | prednisolone | 4.52 | 9.57 | 361.1 | 100 | 146.9 343.1 | 20 6 |
| 3 | 泼尼松 | prednisone | 4.66 | 9.12 | 359.2 | 110 | 147 341.1 | 24 6 |
| 4 | 氢化考的松 | Hydrocortisone | 4.84 | 9.2 | 363.2 | 120 | 105.1 121 | 50 24 |
| 5 | 可的松 | cortisone | 5.08 | 9.58 | 361.2 | 90 | 121 163.1 | 30 20 |
| 6 | 甲基泼尼松龙 | methylprednisolone | 7.52 | 12.09 | 375.2 | 110 | 161.1 357.1 | 20 6 |
| 7 | 倍他米松 | betamethasone | 8.24 | 13.08 | 393.2 | 80 | 146.8 355 | 24 4 |
| 8 | 地塞米松 | dexamethasone | 8.64 | 13.01 | 393.25 | 120 | 146.8 355 | 24 4 |
| 9 | 氟米松 | flumethasone | 8.91 | 14.01 | 411.2 | 110 | 121.1 253 | 34 10 |
| 10 | 倍氯米松 | beclomethasone | 10.17 | 14.98 | 409.2 | 100 | 146.9 391.1 | 30 6 |
| 11 | 曲安奈德 | Triamcinolone acetonide | 11.18 | 15.48 | 435.1 | 100 | 338.9 396.9 | 10 10 |
| 12 | 氟氢缩松 | Fludroxycortide | 13.27 | 16.32 | 437.2 | 120 | 120.8 180.9 | 40 30 |
| 13 | 曲安西龙双醋酸酯 | Triamcinolone acetate | 13.3 | 16.49 | 479.1 | 120 | 321 440.9 | 10 4 |
| 14 | 泼尼松龙醋酸酯 | Prednisolone Acetate | 13.71 | 16.56 | 403.2 | 130 | 146.8 384.9 | 24 6 |
| 15 | 氢化可的松醋酸酯 | Hydrocortisone acetate | 14.48 | 16.9 | 405.2 | 130 | 120.8 309.1 | 34 12 |
| 16 | 氟米龙 | fluorometholone | 14.75 | 17 | 377.2 | 120 | 278.9 320.9 | 10 8 |
| 17 | 氟氢可的松醋酸酯 | Fludrocortisone acetate | 14.89 | 17.14 | 423.2 | 110 | 120.9 238.9 | 36 22 |
| 18 | 泼尼松醋酸酯 | PrednisoneAcetate | 15.43 | 17.45 | 401.2 | 100 | 146.8 295 | 24 8 |
| 19 | 地夫可特 | deflazacort | 15.56 | 17.24 | 442.2 | 90 | 123.9 141.9 | 50 36 |
| 20 | 可的松醋酸酯 | Cortisone acetate | 15.9 | 17.75 | 403.1 | 90 | 162.8 343.0 | 24 16 |
| 21 | 甲基泼尼松龙醋酸酯 | methylprednisolone | 16.83 | 18.29 | 417.2 | 120 | 253.2 399.2 | 18 6 |
| 22 | 倍他米松醋酸酯 | Betamethasone acetate | 16.97 | 18.43 | 435.2 | 110 | 309 337 | 8 8 |
| 23 | 布地奈德 | budesonide | 17.4 | 18.62 | 431.2 | 110 | 146.9 413.1 | 30 6 |

| | | | | | | | | |
|----|----------|---------------------------------|-------|-------|--------|-----|-------|----|
| 24 | 地塞米松醋酸酯 | Dexamethasone acetate | 17.54 | 18.87 | 435.25 | 120 | 309 | 8 |
| | | | | | | | 337 | 8 |
| 25 | 氢化可的松丁酸酯 | Hydrocortisone butyrate | 17.61 | 18.77 | 433.2 | 110 | 120.8 | 24 |
| | | | | | | | 345 | 8 |
| 26 | 氟米龙醋酸酯 | Fluorometholone acetate | 18.08 | 19.3 | 419.2 | 110 | 279 | 10 |
| | | | | | | | 321 | 8 |
| 27 | 曲安奈德醋酸酯 | Triamcinolone acetonide acetate | 18.90 | 20.18 | 477.2 | 120 | 338.9 | 10 |
| | | | | | | | 320.8 | 12 |
| 28 | 氢化可的松戊酸酯 | Hydrocortisone valerate | 19.19 | 20.12 | 447.3 | 120 | 120.8 | 30 |
| | | | | | | | 345.2 | 8 |
| 29 | 二氟拉松双醋酸酯 | Difluoro Larsson diacetate | 19.31 | 20.41 | 495.1 | 120 | 278.8 | 12 |
| | | | | | | | 316.8 | 12 |
| 30 | 氟轻松醋酸酯 | Fluocinolone acetate | 19.32 | 20.41 | 495.2 | 110 | 120.8 | 40 |
| | | | | | | | 337 | 12 |
| 31 | 倍他米松戊酸酯 | Betamethasone valerate | 20.12 | 21.03 | 477.3 | 100 | 278.8 | 14 |
| | | | | | | | 354.9 | 4 |
| 32 | 哈西奈德 | Halcinonide | 20.6 | 20.39 | 455.2 | 100 | 104.9 | 48 |
| | | | | | | | 121 | 40 |
| 33 | 泼尼卡酯 | Prednicarbate | 20.7 | 21.62 | 489.2 | 120 | 114.8 | 12 |
| | | | | | | | 380.9 | 6 |
| 34 | 安西奈德 | Amcinonide | 20.94 | 21.9 | 503.2 | 110 | 321 | 14 |
| | | | | | | | 338.9 | 10 |
| 35 | 阿氯米松双丙酸酯 | Alclometasone dipropionat | 21.07 | 21.87 | 521.25 | 100 | 279 | 10 |
| | | | | | | | 301 | 10 |
| 36 | 氯倍他索丙酸酯 | Clobetasol propionate | 21.21 | 22.01 | 467.2 | 100 | 354.9 | 8 |
| | | | | | | | 372.9 | 6 |
| 37 | 氟替卡松丙酸酯 | Fluticasone propionate | 21.32 | 22.17 | 501.2 | 120 | 292.9 | 10 |
| | | | | | | | 312.9 | 8 |
| 38 | 莫米他松糠酸酯 | Maumee him loose furoate | 21.55 | 22.24 | 521.1 | 120 | 263 | 24 |
| | | | | | | | 503 | 4 |
| 39 | 倍他米松双丙酸酯 | Betamethasone dipropionate | 22.14 | 22.45 | 505.2 | 120 | 278.9 | 12 |
| | | | | | | | 318.9 | 10 |
| 40 | 倍氯米松双丙酸酯 | Beclomethasone dipropionate | 22.13 | 23.06 | 521.2 | 120 | 319 | 10 |
| | | | | | | | 503 | 4 |
| 41 | 氯倍他松丁酸酯 | Clobetasone Butyrate | 22.53 | 23.47 | 479.2 | 110 | 278.9 | 14 |
| | | | | | | | 342.8 | 12 |

样品前处理

标准溶液的配置：分别称取 41 种糖皮质激素标准品，用甲醇配制成 1.0mg/mL 溶液，然后再配制成 200.0 μ g/L 混标溶液，然后用 40% 乙腈水溶液稀释成 1、5、10、20、30、50 μ g/L 的标准工作溶液。

离线 SPE 样品前处理：

1) 准确称取 0.2g 试样于 5ml 聚丙烯离心管中，加入 3ml 饱和氯化钠溶液，分散，再加 2ml 乙腈，混合振荡提取 2min，5000r/min 离心 2min，把上清液移入另一 50ml 离心管，再用 2ml 乙腈重复提取一次，合并上清液，加入 40ml 纯水，再加入 0.2mL 10% 的铁氰化钾和 0.2mL 20% 乙酸锌进行沉淀大分子，再 5000r/min 离心 2min，上清液过 SPE 小柱净化。

2) 净化：采用 Oasis HLB 固相萃取小柱，上面放置垫有滤纸的 20ml 漏斗，小柱预先用 5mL 甲醇，10mL 水进行活化。然后取上清提取液倒入漏斗，待样品流尽后，用 10% 乙腈水溶液 10mL 清洗小柱，待清洗液自然流尽后，

取下漏斗，用吸球吹出小柱中的残留液。然后用 4mL 甲醇淋洗小柱，待甲醇自然流尽后，用吸球吹出小柱中残留液。取下离心管，准确加入 4.0mL 高纯水，混合，经 0.2 μ m 样品滤器过滤后作为测定液。

在线 SPE 样品前处理：

1) 准确称取 0.2g 试样于 5ml 聚丙烯离心管中，加入 3ml 饱和氯化钠溶液，分散，再加 2ml 乙腈，混合振荡提取 2min，5000r/min 离心 2min，把上清液移入另一 50ml 离心管，再用 2ml 乙腈重复提取一次，合并上清液，加入 3.8ml 纯水，再加入 0.2mL10% 的铁氰化钾和 0.2mL20% 乙酸锌进行沉淀大分子，再 5000r/min 离心 2min，取上清液，直接上在线 SPE 液质联用分析。

结果与讨论

离线 SPE 分析标准品谱图及曲线如图所示（以峰面积外标法定量）

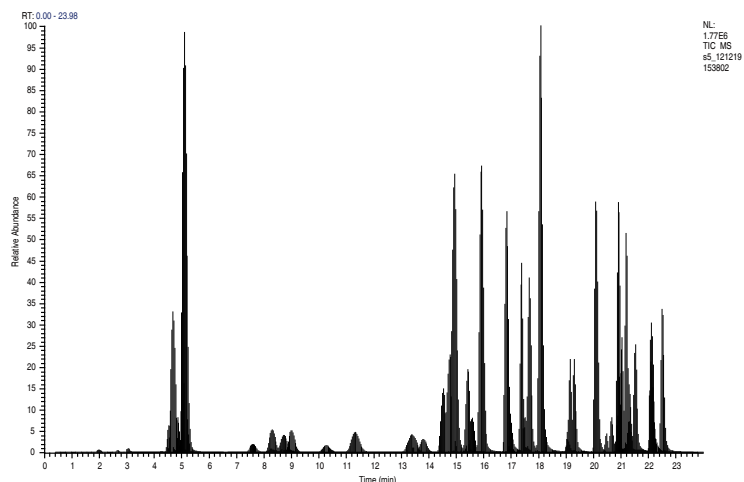


图 1 标准品 TIC 谱图（以 50 μ g/L 为例）

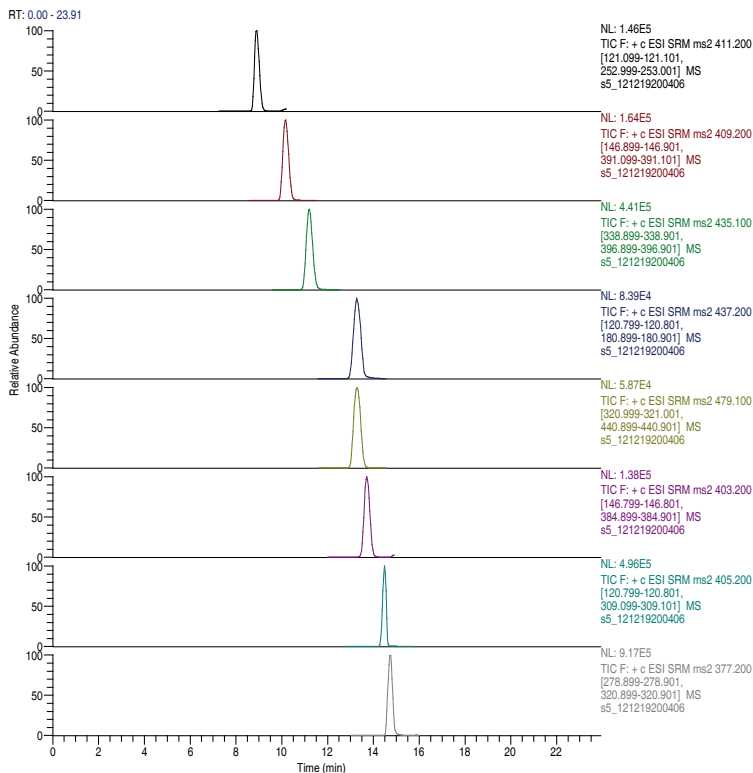


图 2 标准化合物特征离子图（从上至下，按时间排序）

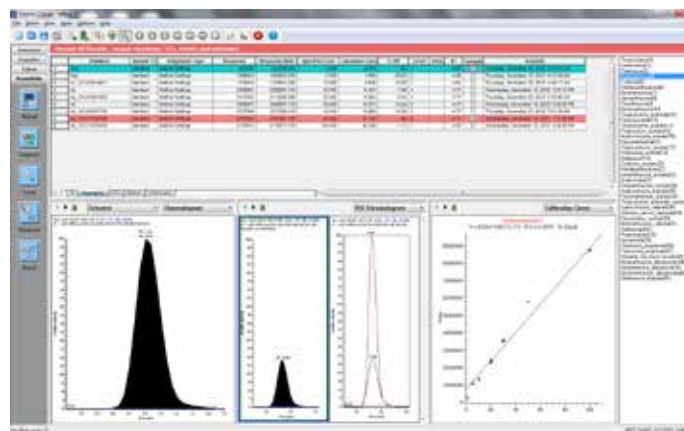
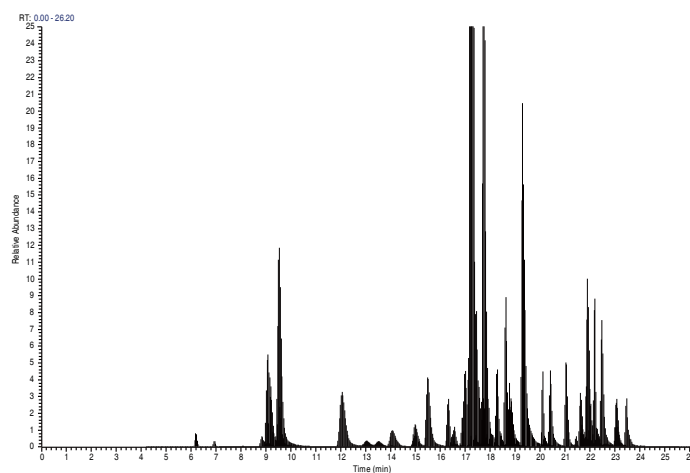


图 3 41 种激素分析结果图（从左至右，分别为 TIC，定量离子图，离子比率图，标准曲线图）

表 4 标准曲线分析结果

| 编号 | 化合物名称 | 英文名称 | 保留时间 | 线性方程 | 相关系数 | 定量离子 | 定性离子 | 离子比率 |
|-------|---------|-----------------------|-------|----------------------|-------|-----------------|-----------------|------|
| 1-7 | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| 8 | 地塞米松 | dexamethasone | 8.64 | $Y=8468.3+6258.8X$ | 0.990 | 393.2- 146.8 | 393.2- 355.1 | 55% |
| 24 | 地塞米松醋酸酯 | Dexamethasone acetate | 17.54 | $Y=46430.6+14207.1X$ | 0.991 | 435.2- 337.1 | 435.2- 309.1 | 76% |
| 25-41 | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |

在线 SPE 分析标准品谱图及曲线如图所示（以峰面积外标法定量）

图 4 标准品 TIC 谱图（以 50 μ g/L 为例）

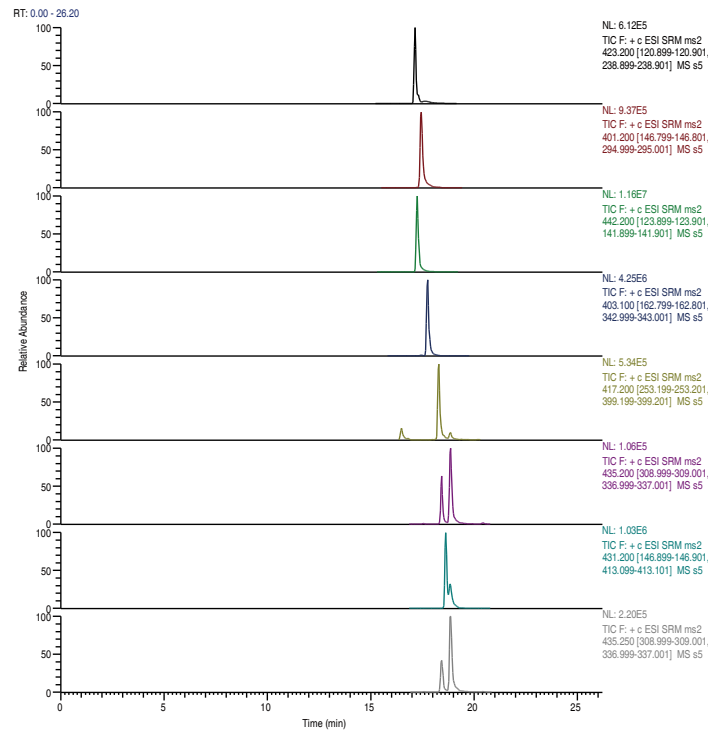


图 5 标准化合物特征离子图（从上至下，按时间排列）



图 6 41 种激素分析结果图（从左至右，分别为 TIC，定量离子图，离子比率图，标准曲线图）

表 5 标准曲线分析结果

| 编号 | 化合物名称 | 英文名称 | 保留时间 | 线性方程 | 相关系数 | 定量离子 | 定性离子 | 离子比率 |
|-------|---------|---------------|-------|-------------------------|-------|-----------------|-----------------|------|
| 1-7 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| 8 | 地塞米松 | dexamethasone | 13.54 | $Y = -2275.5 + 2662.6X$ | 0.991 | 393.2- 146.8 | 393.2- 355.1 | 55% |
| 24 | 地塞米松醋酸酯 | Dexamethasone | 17.54 | $Y = 45878.6 + 9491.1X$ | 0.993 | 435.2- 337.1 | 435.2- 309.1 | 80% |
| 25-41 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |

样品谱图及分析结果

样品分析结果

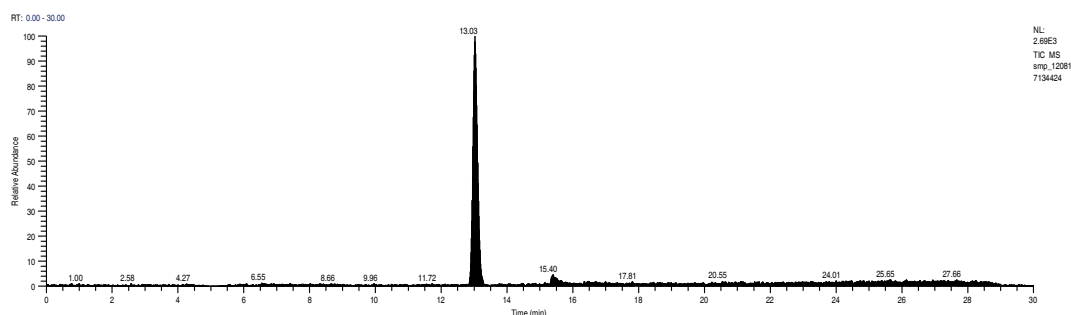


图 7 样品分析谱图 (以 HTY 样品为例)

表 6 在线 SPE 分析结果

| 编号 | 样品名称 | 取样量 /g | 地塞米松 | 地塞米松醋酸酯 |
|----|------|--------|-------|---------|
| | | | /μg/g | /μg/g |
| 1 | HTY | 0.2112 | 0.18 | 1.15 |
| 2 | XSB | 0.2011 | - | 0.18 |
| 3 | DQS | 0.2011 | - | 0.51 |
| 4 | WPD | 0.2014 | - | - |
| 5 | KLS | 0.2071 | - | - |
| 6 | RD | 0.2081 | - | - |
| 7 | MXLD | 0.2024 | - | - |
| 8 | MFB | 0.2015 | - | - |

表 7 离线 SPE 分析结果

| 编号 | 样品名称 | 取样量 /g | 地塞米松 | 地塞米松醋酸酯 |
|----|------|--------|-------|---------|
| | | | /μg/g | /μg/g |
| 1 | HTY | 0.2072 | 0.19 | 1.14 |
| 2 | XSB | 0.2021 | - | 0.30 |
| 3 | DQS | 0.2023 | - | 0.47 |
| 4 | WPD | 0.2024 | - | - |
| 5 | KLS | 0.2061 | - | - |
| 6 | RD | 0.2061 | - | - |
| 7 | MXLD | 0.2024 | - | - |
| 8 | MFB | 0.2015 | - | - |

从以上结果可以看出，离线结果与在线结果基本一致。

重现性实验

分别对标准品溶液 (30μg/L) 连续进样 3 次，保留时间和峰面积的 RSD 值分别少于 2.5% 和 20%。

加标回收率实验

分别对 HTY 和 MXLD 两份样品，各取两份，进行平行加标回收试验。结果显示：样品平行加标显示重现性较好，在线 SPE 与离线 SPE 的加标回收率均在 55-110% 之间，结果基本一致。

结论

通过对 TSQ vantage 质谱参数的优化，同时采用在线 SPE 在线富集浓缩的技术与离线 SPE 技术进行了比较，发现检测结果基本一致。但在线 SPE 能大大节省前处理分析时间，减少有机溶剂的使用，因此，该方法适合于对化妆品中激素类药物的分析。

DGLC-14 在线固相萃取 - 高效液相色谱 - 质谱 - 质谱检测法测定鼠血浆中杀鼠灵

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；质谱-质谱检测；鼠血浆；杀鼠灵

DGLC-14 Determination of Warfarin in rat plasma by HPLC-MS-MS detection with online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; MS-MS detection; rat plasma; warfarin

引言

杀鼠灵 (Warfarin), 又名华法令、华法灵、苊丙酮香豆素、酮苊香豆素, 为抗凝血型杀鼠剂, 在全世界广泛使用。

鼠血浆中杀鼠灵的常规分析方法是全血样品经乙酸乙酯提取后, 在 C_{18} 柱上以甲醇/0.1% 乙酸 (50+50, v/v) 为流动相进行分离, 紫外 308 nm 波长检测, 但灵敏度低, 方法回收率不高, 重现性较差。

本文详细介绍了在线固相萃取 (SPE) 方法结合 HPLC - MS/MS 液质联用方法测定鼠血浆中杀鼠灵的含量。血浆样品在 Bio Trap MS C_{18} (4.0 mm × 20 mm) 柱上富集, 之后在 Acclaim PA II 柱上进行分离。

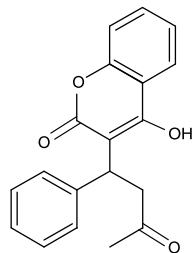


图 1 杀鼠灵结构式

测试条件

仪器型号: Ultimate DGP 3600 系统, 包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵; 自动进样器; 带有一个六通阀的柱温箱; API 2000 MS/MS。连接图见图 2。

分析柱: Acclaim Polar Advantage II, 5 μ m 4.6 × 150 mm

富集柱: Bio Trap MS C_{18} , 4.0 × 20 mm

柱温: 45 °C

自动进样器温度: 15 °C

进样量: 10 μ L

流动相组成及流速: 见表 1, 等度洗脱

通阀切换时间见表 2

质谱条件: 正离子模式, 分流比 90:10 (10% 进入 MS), 杀鼠灵离子对: 309.2/162.9

表 1 流动相组成及流速

| 分析泵 (左泵) | | 富集泵 (右泵) | |
|---|------------|---|------------|
| 0.1% (v/v) 甲酸溶液: ACN (35:65), 用氨水调节 pH 至 5.8 ± 0.05 | | 0.1% (v/v) 甲酸溶液 /4% 异丙醇溶液, 用甲酸调节 pH 至 2.5 | |
| 流速 | 1.0 mL/min | 流速 | 2.0 mL/min |

表 2 六通阀切换时间

| 时间 (min) | 阀位置 | 描述 |
|----------|-----|-------|
| 0-1.5 | 1-2 | 清洗及萃取 |
| 1.5-3.0 | 6-1 | 转载及分离 |
| 3.0-7.0 | 1-2 | 再平衡 |

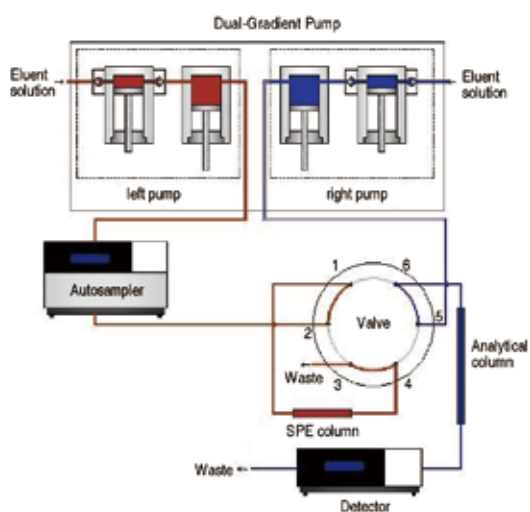


图 2-1 阀 1-2 位相通时连接图

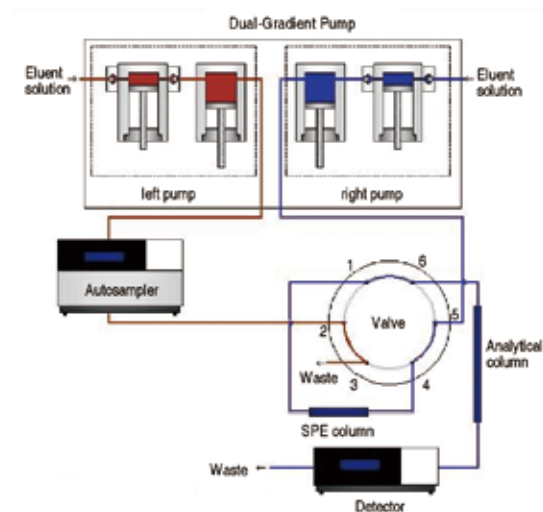


图 2-2 阀 1-6 位相通时连接图

图 2 仪器连接图

结果和讨论

标准品色谱图

总离子流图见图 3，100ppb 标准品图见图 4。

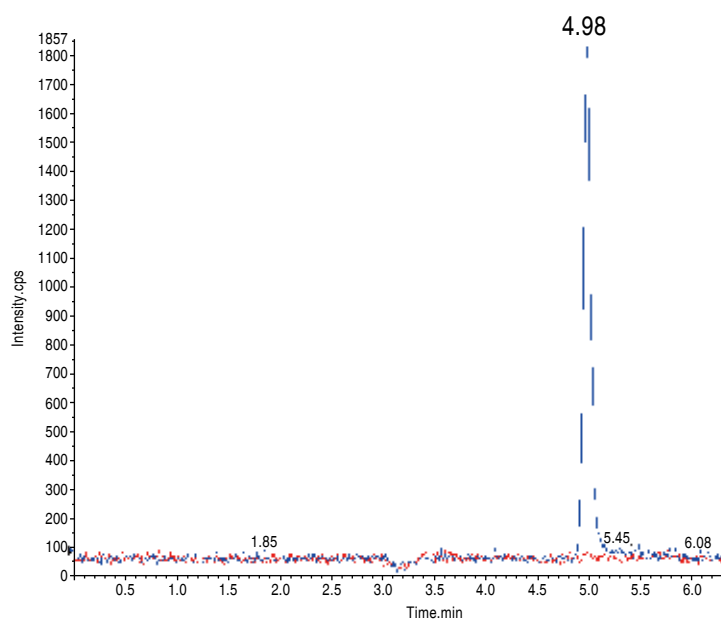


图 3 总离子流图

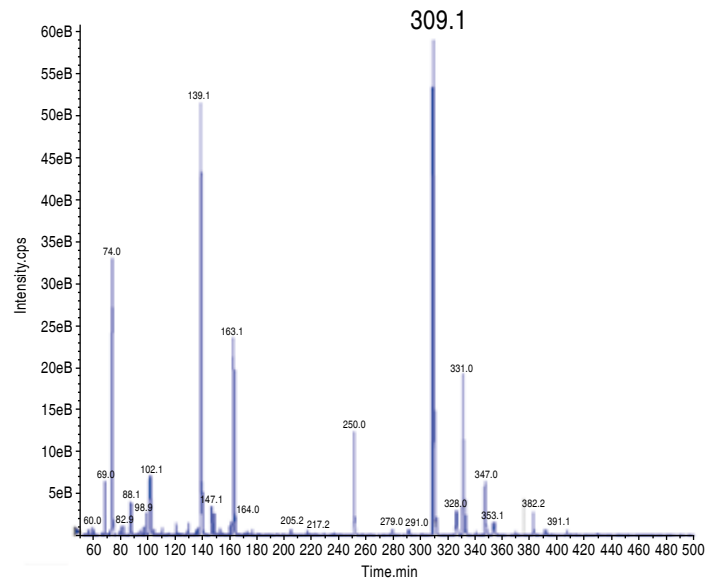


图 4 100ppb 标准溶液谱图

实际样品的分析

低浓度加标图见图 5。

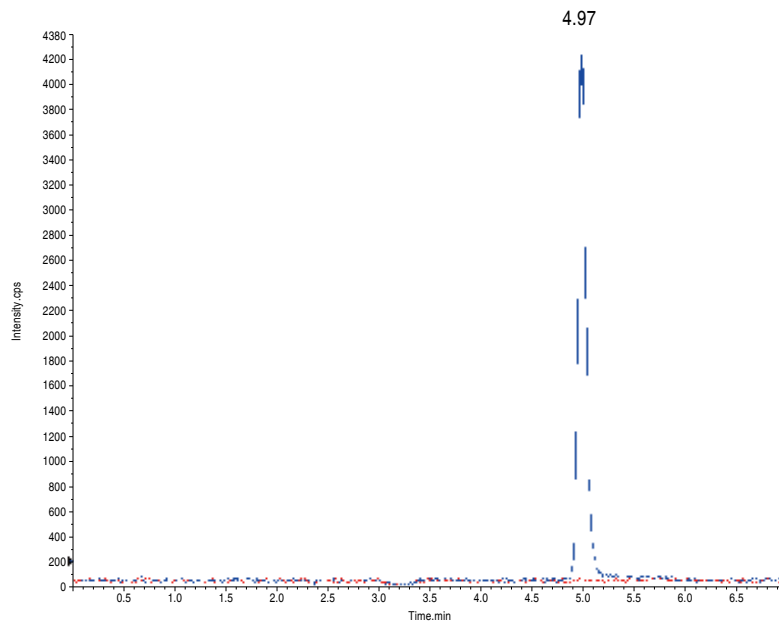


图 5 低浓度加标图

结论

本方法中每个 SPE 连续两天使用，共进样约 200 次，方法重现性好。本方法可成功用于检测鼠血浆中杀鼠灵，方法可靠稳定。

DGLC-15 NanoLC 实现样品预富集分离的两种方式 - 常规双泵系统 (DP) 和单泵系统 (SP)

关键词：在线富集；双泵系统；单泵系统；NanoLC

DGLC-15 Online column enrichment through Dual pumps (DP) and Single pump (SP) by NanoLC

Key words: Dual pumps (DP), Single pump (SP), NanoLC

引言

NanoLC 一般采用双泵系统（包括 Loading 泵和 Micro 泵），在此基础上能实现样品的预富集和复杂二维色谱分离的目的。但是有客户提出要求，希望只配置一个 Micro 泵就能实现样品的预富集分离，不需要进行二维色谱的分离，因此根据客户的要求，设计了单 Micro 泵的管路连接方式，同时分离了马心肌红蛋白的酶解片段，希望能够得到与常规的双泵系统相一致的分离结果。

测试条件

仪器条件见表 1、2

表 1 常规双泵系统 (DP) 分离条件

| | |
|------------------|--|
| Instrument Type | DGP3000,VWD3000,FLM3000,WPS3000 |
| Mobile phase A | 100%Water+0.05%TFA |
| Mobile phase B | 20/80Water/ACN+0.04%TFA |
| Loading solvent | 98/2Water/ACN+0.05%TFA |
| Column | 300 μ m I.D. \times 5 mm, packed with C ₁₈ PepMap, 5 μ m, 100 Å, S/N 160454 75 μ m I.D. \times 15 cm, packed with C ₁₈ PepMap, 3 μ m, 100 Å, S/N 160321 |
| UV Detection | 215nm |
| Loading Time | 3min |
| Gradient | 4% B in 0-3 min 4% to 55% B in 3-30 min 90% B in 30.5-38 min 4%B in 38-60 min |
| Valve Position | Initial 10-1, 3min 2-1,56min 10-1 (Fig1) |
| Oven Temperature | 25°C |
| WPS Temperature | 5°C (WPS-3000(B)T only) |
| Loading flow | 20 μ L/min |
| Flow rate | 300nL/min |

表 2 单泵系统 (SP) 分离条件

| | |
|------------------|---|
| Instrument Type | DGP3000,VWD3000,FLM3000.,WPS3000 |
| Mobile phase A | 100%Water+0.05%TFA |
| Mobile phase B | 20/80Water/ACN+0.04%TFA |
| Loading solvent | Same as Mobile phase A |
| Column | 300 μ m I.D. \times 5 mm, packed with C ₁₈ PepMap, 5 μ m, 100 Å, S/N 160454 75 μ m I.D. \times 15 cm, packed with C ₁₈ PepMap, 3 μ m, 100 Å, S/N 160321 |
| UV Detection | 215nm |
| Loading Time | 3min |
| Gradient | 3% B in 0-3 min, Flow: 20 μ L/min 3% B in 3.5 min, Flow: 20-0.3 μ L/min 3% to 55% B in 3.5-35min, Flow: 0.3 μ L/min 90% B in 30.5-40.5 min, Flow: 0.3 μ L/min 3%B in 41-60 min, Flow: 0.3 μ L/min 3%B in 60.5-65 min, Flow: 20 μ L/min |
| Valve Position | Initial 10-1, 3min 2-1,60.8min 10-1 (Fig2) |
| Oven Temperature | 25°C |
| WPS Temperature | 5°C (WPS-3000(B)T only) |

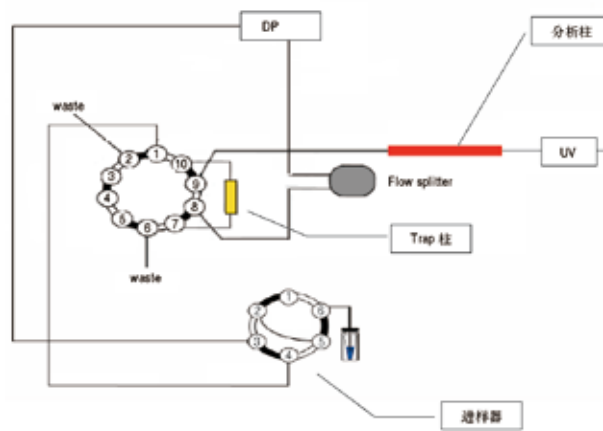


图 1 双泵连接流路

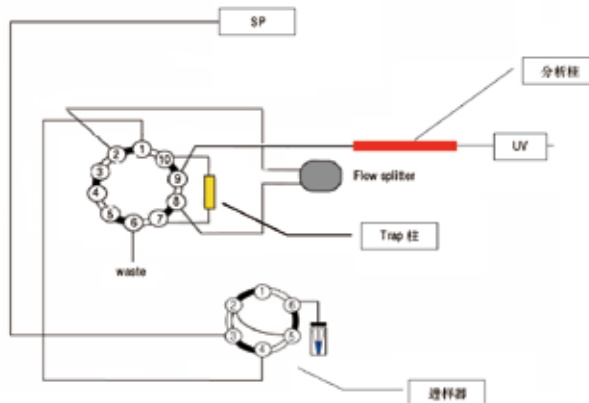
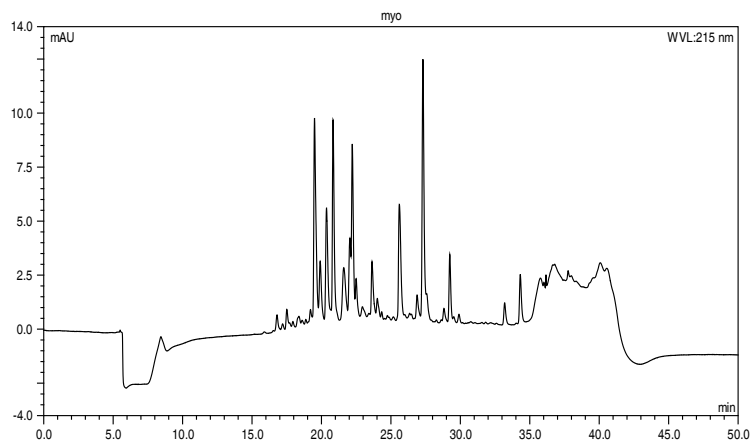


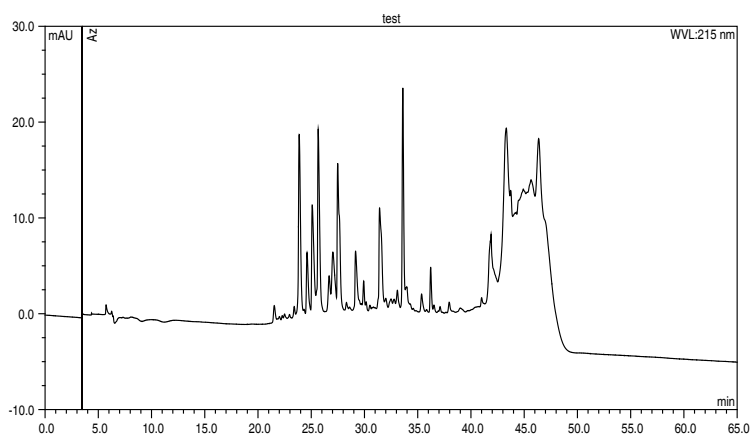
图 2 单泵连接流路

结果和讨论

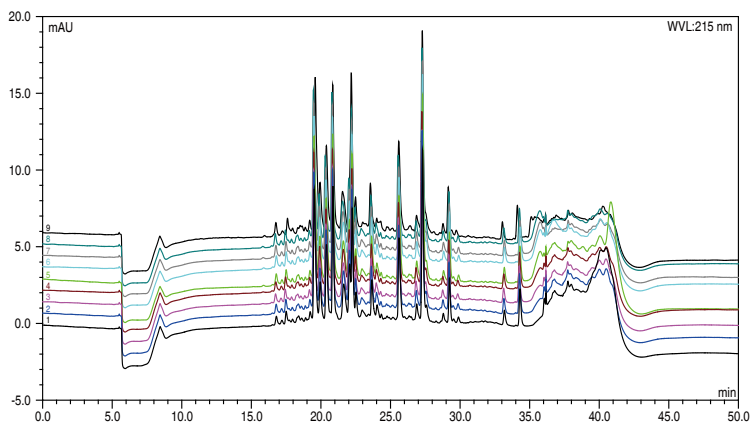
常规双泵预富集分析马心肌红蛋白酶解多肽片段



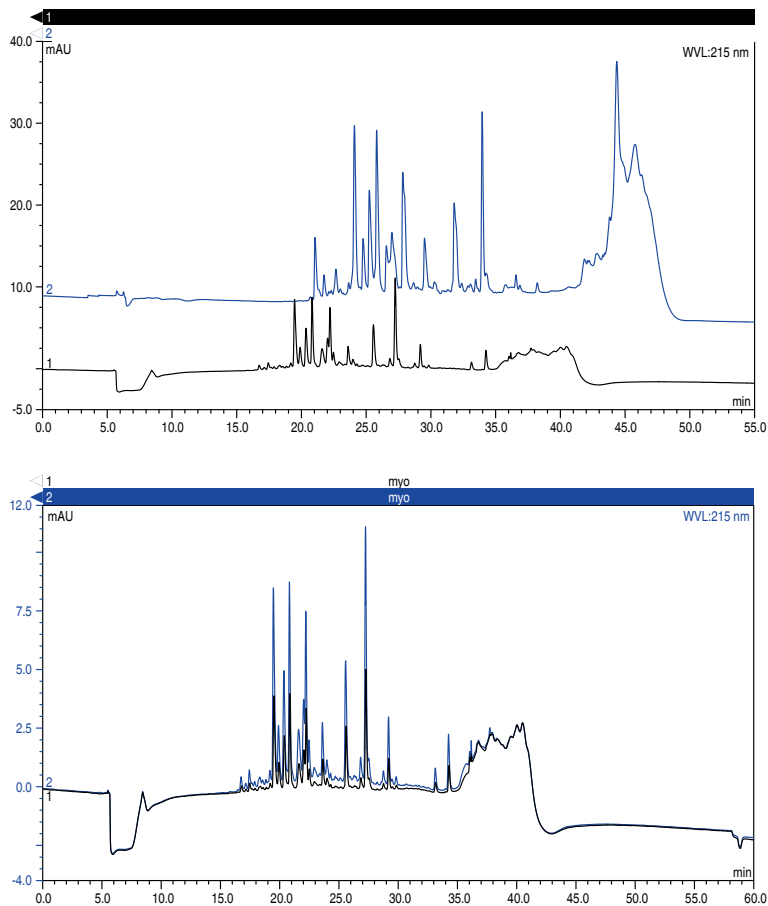
单泵预富集分析马心肌红蛋白酶解多肽片段



重复进样 9 针的色谱图



两种不同进样方式分离马心肌红蛋白酶解多肽片段色谱图比较 (blank-双泵, blue-单泵)



结论

NanoLC 双泵系统进行蛋白或者多肽样品的预富集分离是比较常见的方法，本实验采用 Nano 的流速分流器实现了对马心肌红蛋白酶解多肽片段的分离，分离结果和重复性都较好，是比较理想的质谱前端分离工具，如果能够在其后接上生物质谱，就能对一些非常复杂的生物蛋白样品进行很好的分析。

针对之前有客户只配置了单 Micro 泵，但是希望做一些预富集的样品分析，提出了单泵实现样品预富集的方法。通过设计管路连接，能够达到双泵系统相同的分离结果，只是在十通阀切换时系统有较大的压力波动，但是在分析过程中压力较稳定，对分离没有影响。比较了采用不同的管路连接分析相同样品，特征色谱峰能够一一对应，分离结果基本一致。

第三节 双三元液相色谱脱盐脱糖应用实例

双三元色谱可以应用于流动相在线脱盐，将方法中的离子对试剂轻松地除盐，这样该方法可以应用 CAD、ELSD 和质谱等检测器进行测定。

DGLC-16 采用二维柱切换液质联用法对流动相进行在线除盐分析 阿莫西林中有关物质

关键词：在线除盐；阿莫西林；有关物质；二维柱切换；液质联用

DGLC-16 Determination of amoxicillin and related substances by online-desalt of mobile phase with 2D column switch and LC-MS

Key words: Online-desalt, amoxicillin, related substances, 2D column switch, LC-MS

引言

阿莫西林 (Amoxicillin)，又名安莫西林或安默西林，学名：羟氨苄青霉素，英文名：AMOXICILLIN，CAS No. 26787-78-0，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，是目前应用较为广泛的口服青霉素之一，其制剂有胶囊、片剂、颗粒剂、分散片等等。

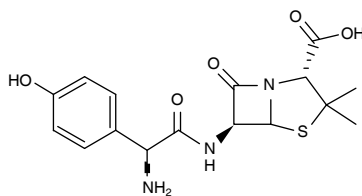


图 1 阿莫西林

在《药典》2010 版中，分析阿莫西林有关物质时，采用 HPLC 紫外检测器法，流动相为 0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液（用 2mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0）和乙腈，梯度分析。由于，该方法不能直接进行质谱分析，因此，本方法采用了二维色谱配置，在液相色谱紫外检测器分析完后，转入二维色谱柱，先进行在线脱盐，然后，采用对质谱兼容的流动相，进行定性分析，找到有关物质的结构信息，进行质量标准研究工作。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；DAD3000RS；MS TSQ Vantage。仪器连接图见图 2。

一维分析柱：Acclaim 120 C₁₈，5 μ m 4.6 \times 150mm (P/N: 059148)

二维色谱柱：Acclaim PA2，3 μ m 3.0 \times 50mm (P/N: 068973)

色谱质谱条件见表 1

表 1 色谱质谱条件

| | |
|---------|---|
| MS 工作参数 | 1) Full Scan, ESI 源, 正离子模式, M/Z:200-1200; 负离子模式: 80-500; Scan time 0.4S, FWHM 0.70 2) 子离子扫描 (母离子根据 (1) 扫描得到): 正负离子同时扫描, Full scan M/Z=100-400, Scan time 0.2s, FWHM 0.70, CE 10V, Energy Ramp: 3eV |
| 流动相组成 | 一维分析流动相 (右泵): A: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用 2mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.0), B: A 与乙腈 2: 8 混合。梯度洗脱。 |

| 时间 min | 流速 mL/min | A % | B % |
|-----------|--------------|--------|--------|
| 0 | 1.0 | 97 | 3 |
| 15 | 1.0 | 97 | 3 |
| 35 | 1.0 | 70 | 30 |
| 35.1 | 1.0 | 97 | 3 |
| 45 | 1.0 | 97 | 3 |

二维分析流动相 (左泵): A: 0.005mol/L 醋酸铵, pH 用乙酸调节至 5.0。B: 乙腈。

| 时间 min | 流速 mL/min | A % | B % |
|-----------|--------------|--------|--------|
| 0 | 0.3 | 100 | 0 |
| 10 | 0.3 | 100 | 0 |
| 20 | 0.3 | 97 | 3 |
| 30 | 0.3 | 80 | 20 |
| 35 | 0.3 | 60 | 40 |
| 40 | 0.3 | 60 | 40 |
| 40 | 0.3 | 100 | 0 |
| 45 | 0.3 | 100 | 0 |

* 根据每个化合物的保留时间与基质情况, 可以适当调整。

阀切换时间

注明: 每一个化合物的分析需单独进样一次。

| 化合物 编号 | 峰保留时间 /min | 六通阀切换 时间 /min | 质谱进样阀 切进质谱时间 /min | 可能的母 离子 M/Z | 子离子碎片 M/Z |
|-----------|---------------|------------------|----------------------|----------------|--|
| 1 | 3.1 | 3.0-3.2 | 6.2 | M-H 338.0 | |
| 2 | 4.1 | 4.0-4.2 | 7.2 | M-H 338.0 | 304.5、260.3、166.2 |
| 3 | 8.5 | 8.4-8.6 | 12.6 | M+H 366.3 | |
| 4 | 22.0 | 21.9-22.1 | 26.1 | M+H 340.2 | 323.2、228.6、188.8 |
| 5 | 24.1 | 24.0-24.2 | 28.2 | M+H 378.2 | 300.2、229.2 |
| 6 | 26.2 | 26.1-26.3 | 30.3 | M+H 778.7 | |
| 7 | 30.2 | 30.1-30.3 | 33.3 | M+H 295.2 | (负离子) 228.6、188.8 (正离子) 260.1、235、 1、179.9 |

柱温 35℃

六通阀 初始位置, 6-1, Loop 环体积, 200μL

进样方式及体积 自动进样: 10.0μL

UV 检测波长 230nm

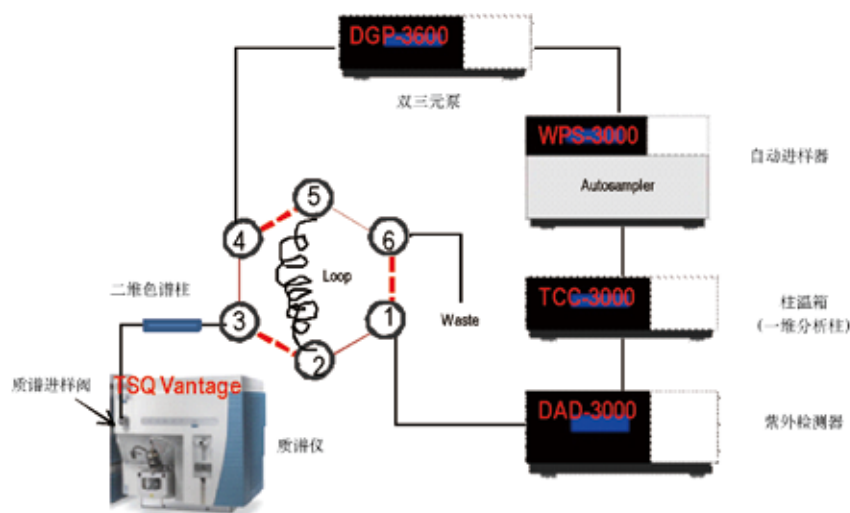


图 2 仪器连接图

样品前处理方法

分别对两份阿莫西林样品（编号分别为：403，519），进行了破坏性试样，分别取装量差异项下的内容物，混合均匀，精密称取适量，加流动相 A 溶解并稀释制成每 1 mL 中含阿莫西林 2 mg 的溶液，作为样品。

酸破坏试验：取样品 10 mL，加浓盐酸 1 滴，置沸水浴中加热破坏 5 min，过滤，待测。

碱破坏试验：取样品 10 mL，加氢氧化钠试液调节 pH 值至 10.0，置 80 °C 水浴中加热破坏 10 min，过滤待测。

结果和讨论

样品紫外谱图分析结果

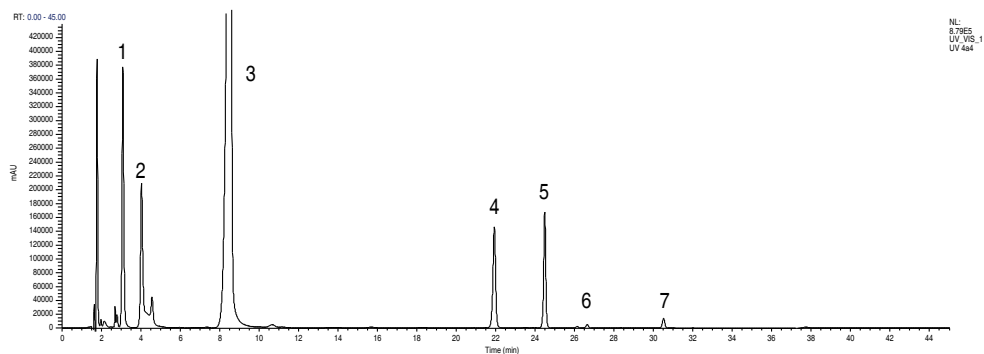


图 3 样品紫外谱图（碱破坏）

根据酸破坏和碱破坏紫外谱图，发现碱破坏杂质峰更多，因此，选用碱破坏样品进行杂质分析，从图 3 可以看出，1、2、4、5、6、7 号峰为杂质峰，3 号峰为阿莫西林。通过阀切换，把每个杂质峰先切到 Loop 环里，然后，再启动左泵洗脱除盐后，再进质谱分析。

质谱分析结果及谱图

质谱上进样阀不同切换时间对比

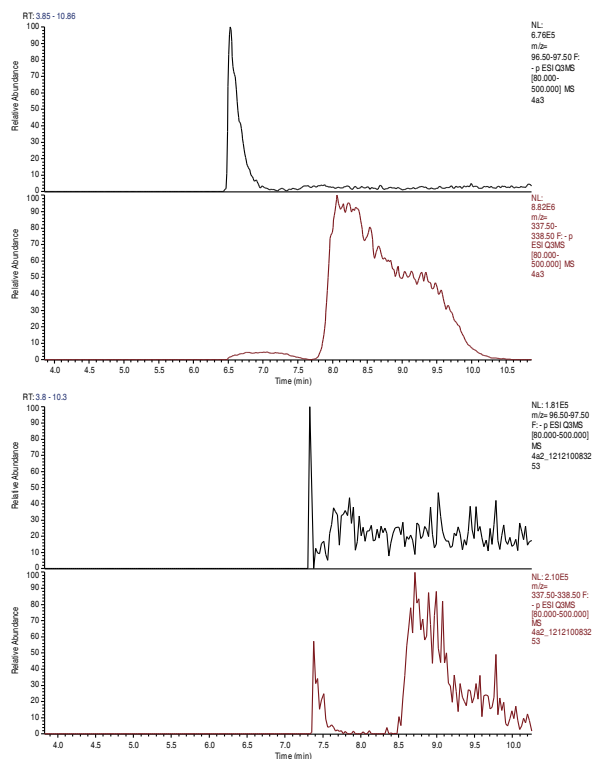


图4 质谱上进样阀时间对比 (TIC 图)

从以上图4上边的图可以看出,上面部分(黑色的)为负离子模式下,磷酸盐(M-H 97)的TIC图,下面部分(棕色)为化合物的特征离子图,显然,流动相中的盐没有去除干净。从下边的图可以看,流动相中的盐基本除净。因此,质谱上的进样阀的时间,需要准确控制,否则有可能造成,盐没有去除干净或者目标化合物随着盐份一起流失出去。因此,在质谱的进样阀切换时间,控制在3.5min左右,由于前面的化合物保留较弱,很容易在二维柱上洗脱下来,因此不宜过长,而对于后期保留较强的化合物,质谱进样阀的时间可以适当延后,以减少基质的干扰。

样品分析的 TIC 图及子离子扫描碎片图

1 号杂质

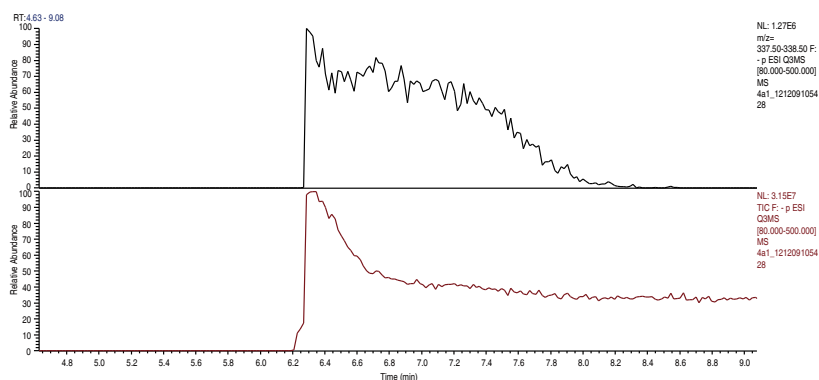


图5 TIC 谱图 (上图为负离子模式, 下图为正离子模式)

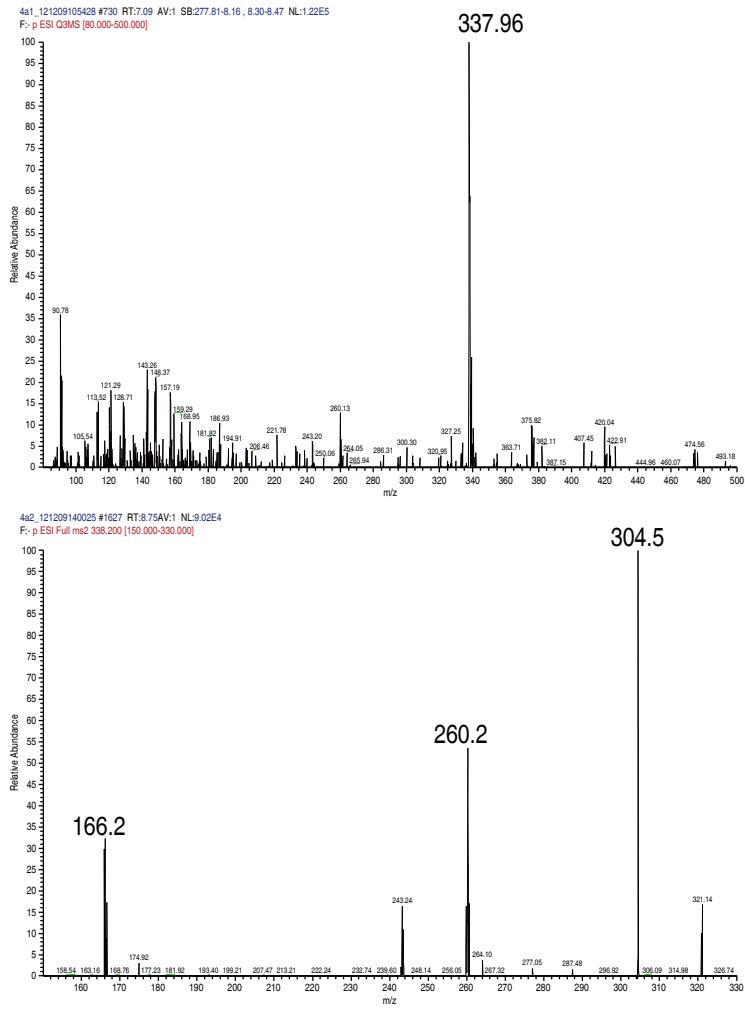


图6 特征离子谱图（上图为负离子模式，下图为正离子模式）

通过与文献报道，及阿莫西林碎裂规律，该杂质分子离子峰为 $M-H=338.0$ 。

2号杂质

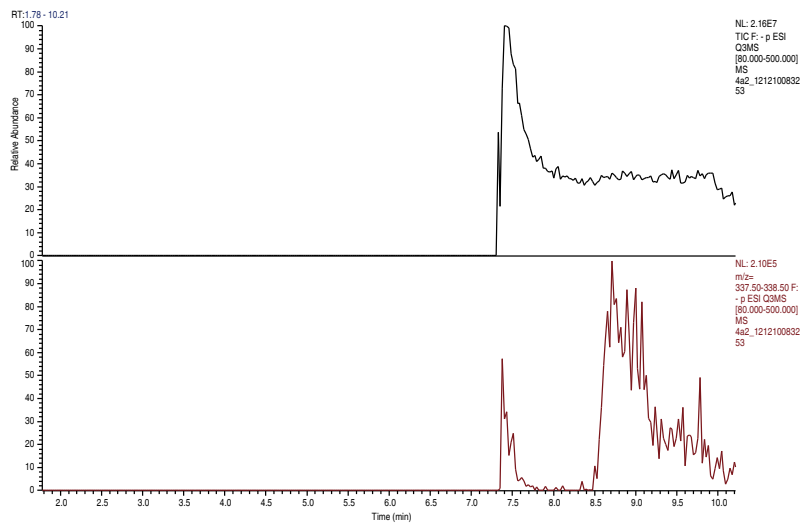


图7 TIC 谱图（上图为负离子模式，下图为负离子 SIM 模式（根据文献报道， $M-H=338.0$ ））

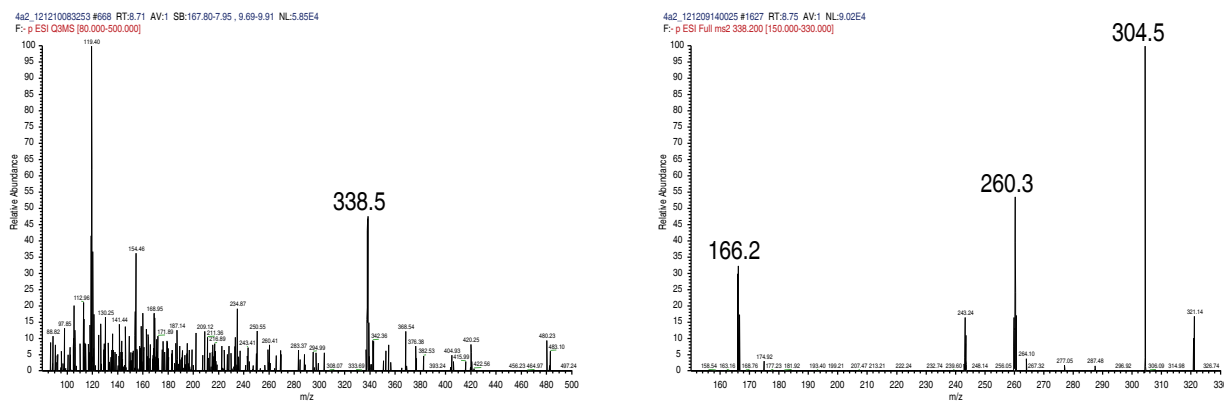


图 8 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为负离子模式下做子离子扫描)

经过负离子模式子离子扫描碎片, 为 304.5、260.3、166.2, 发现与文献报道基本一致, 基本可以确认为该杂质分子离子峰为 M-H=338.0。

3 号化合物 - 阿莫西林

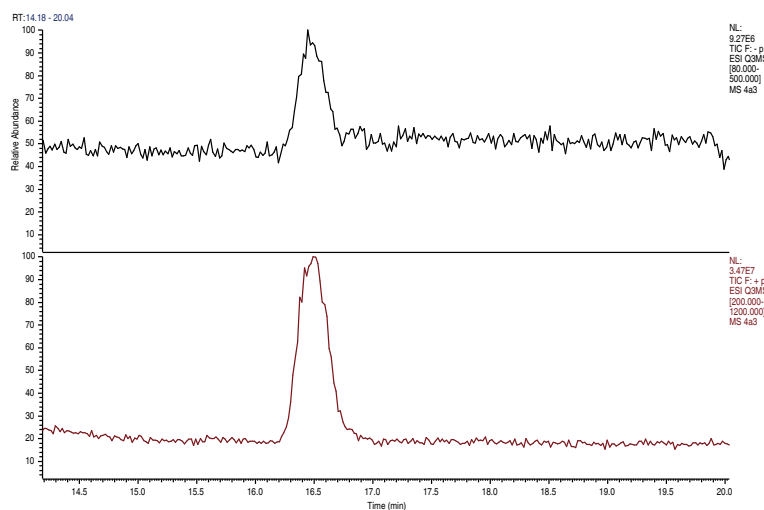


图 9 TIC 谱图 (上图为负离子模式, 下图为正离子模式)

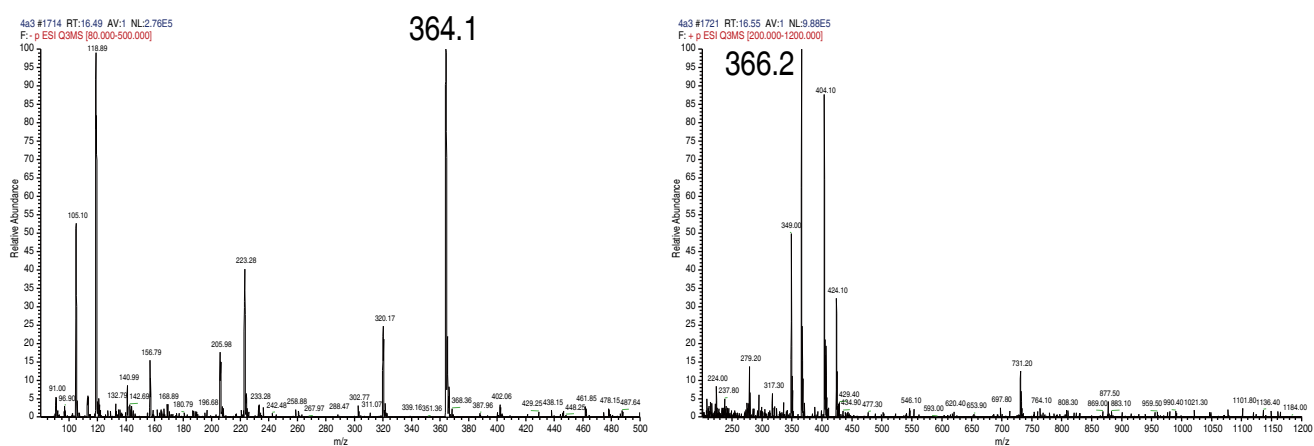


图 10 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为正离子模式)

通过，正负离子碎片比对，M-H 为 364.1，M+H 为 366.2，因此，该化合物为阿莫西林主成分。

4 号杂质化合物

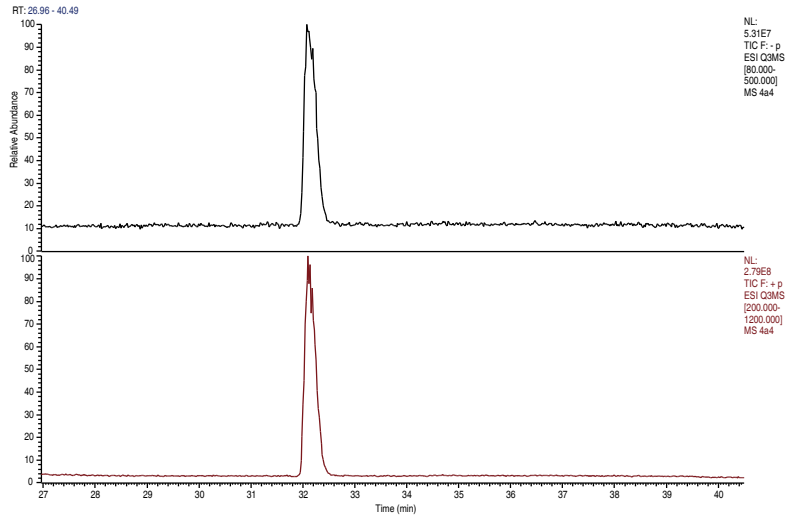


图 11 TIC 谱图（上图为负离子模式，下图为正离子模式）

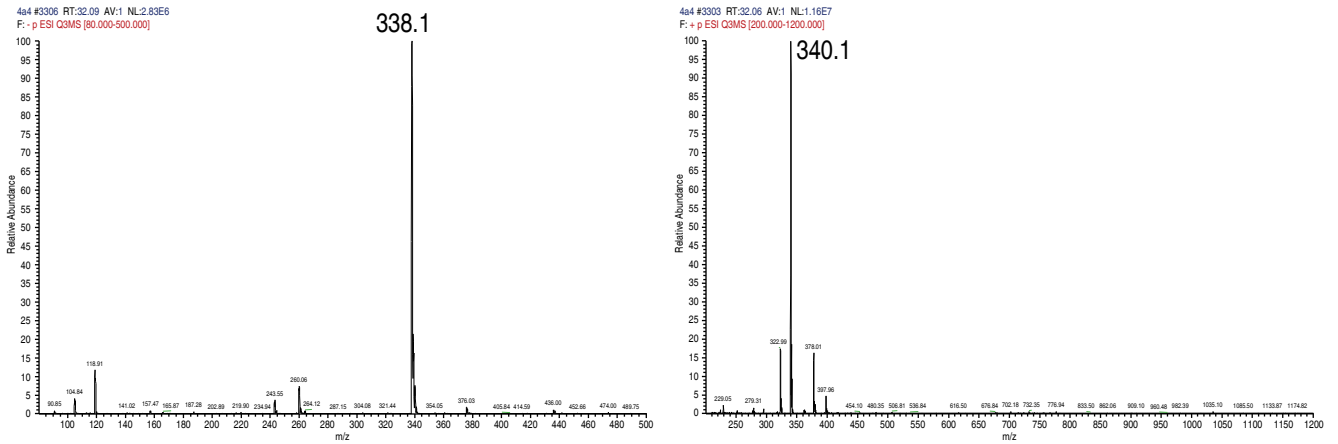


图 12 特征离子谱图（左图为负离子模式，右图为正离子模式）

通过，正负离子碎片比对，M-H 为 338.1，M+H 为 340.1，因此，初步确认该化合物为 M 为 339.1。对 M+H=340.1 进行了子离子扫描，谱图如下，与文献报道基本一致。

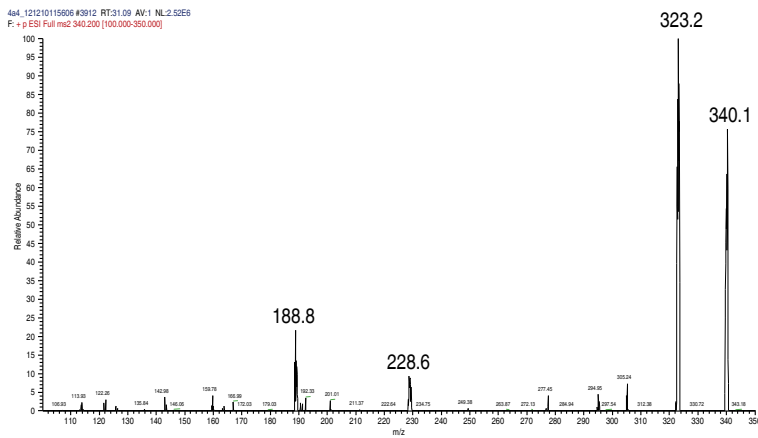


图 13 子离子碎片谱图 (M+H = 340.1)

通过对 $M+H=340.1$ 进行子离子扫描，碎片为 323.2、228.6、188.8。

5 号杂质化合物

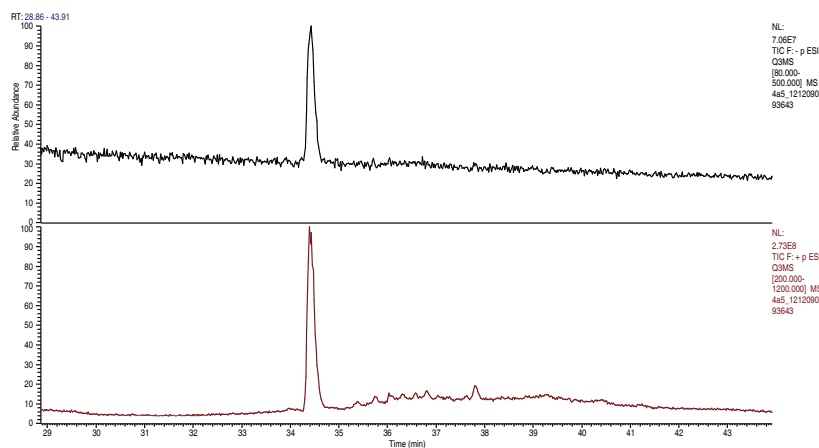


图 14 TIC 谱图（上图为负离子模式，下图为正离子模式）

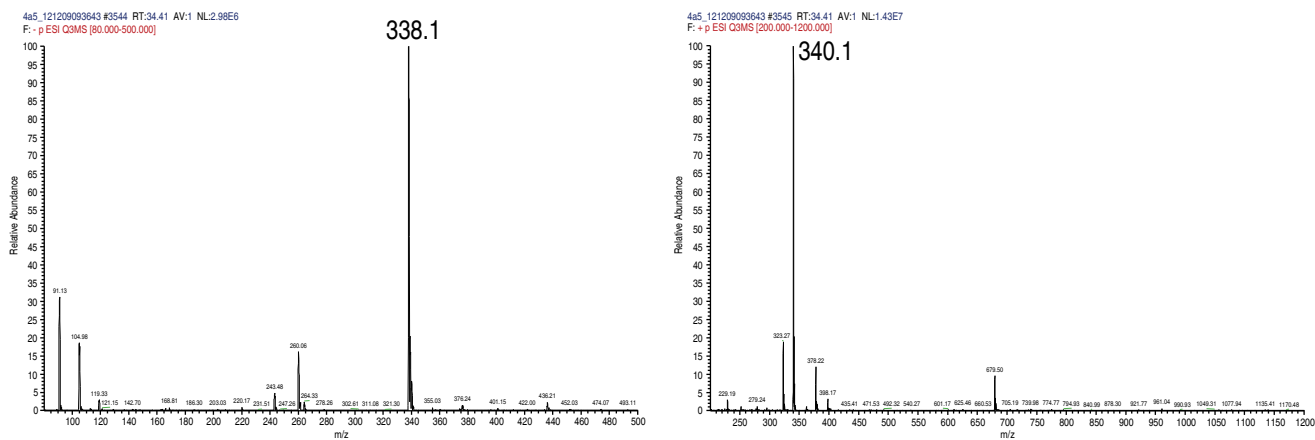


图 15 特征离子谱图（左图为负离子模式，右图为正离子模式）

通过，正负离子碎片比对， $M-H$ 为 338.1， $M+H$ 为 340.1，378.2，因此，根据文献报道，及保留时间对比，初步确认该化合物为 M 为 378.2。对 $M+H=378.2$ 进行了子离子扫描，谱图如下，与文献报道基本一致。

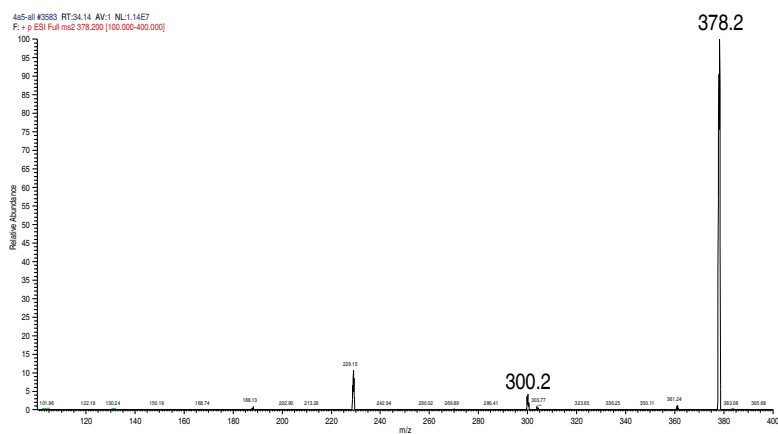


图 16 子离子碎片谱图 ($M+H=378.2$)

通过对 (M+H=378.2) 进行子离子扫描, 碎片为 300.2、229.2。

6 号杂质化合物

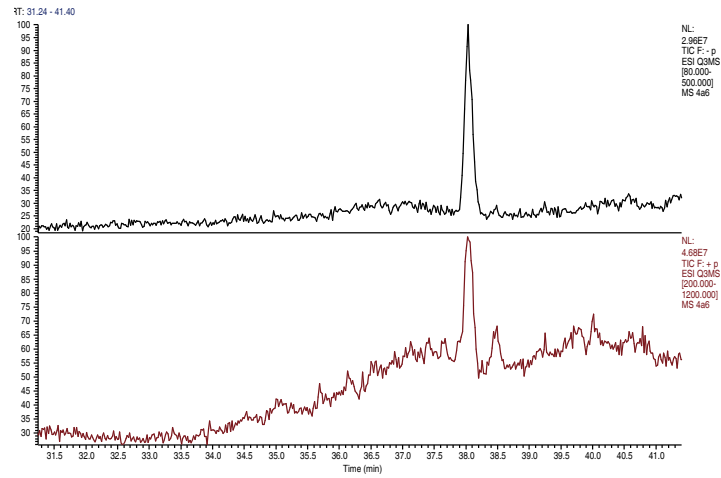


图 17 TIC 谱图 (上图为负离子模式, 下图为正离子模式)

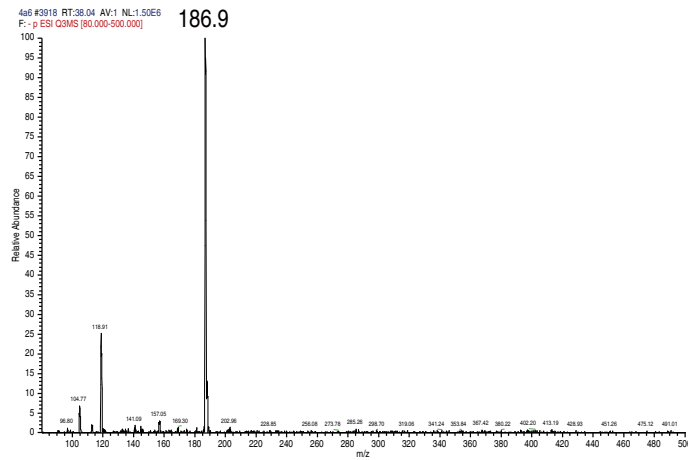


图 18 特征离子谱图 (负离子模式)

通过以上图可以看出, M-H 为 186.9, 未见文献报道。

7 号杂质化合物

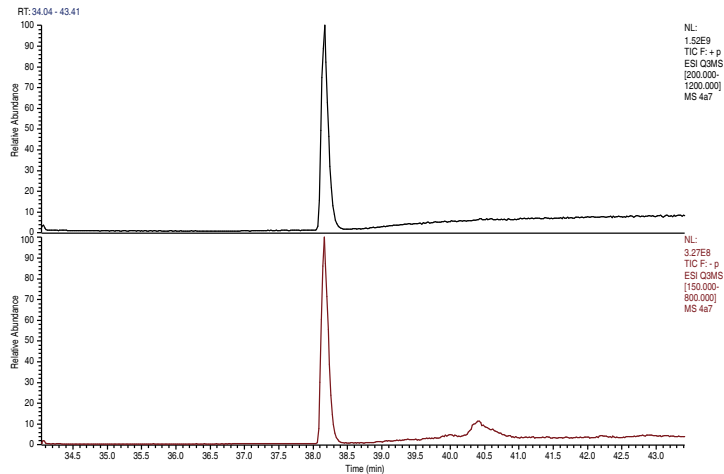


图 19 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

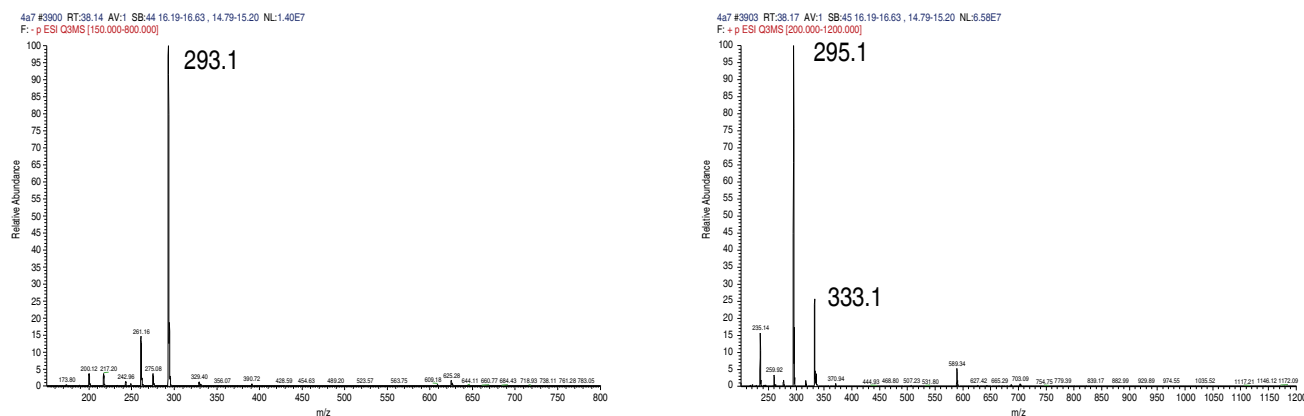


图 20 特征离子谱图（左图为负离子模式，右图为正离子模式）

通过以上图可以看出，M-H 为 293.1，M+H 为 295.1，未见文献报道该类杂质。但该化合物正离子模式中含有 M+H 333.1 碎片。在不确定的情况下，分别对 M-H=293.1 和 M+H=295.1 进行了子离子扫描，谱图如下，以方便进一步质谱碎裂解析工作。

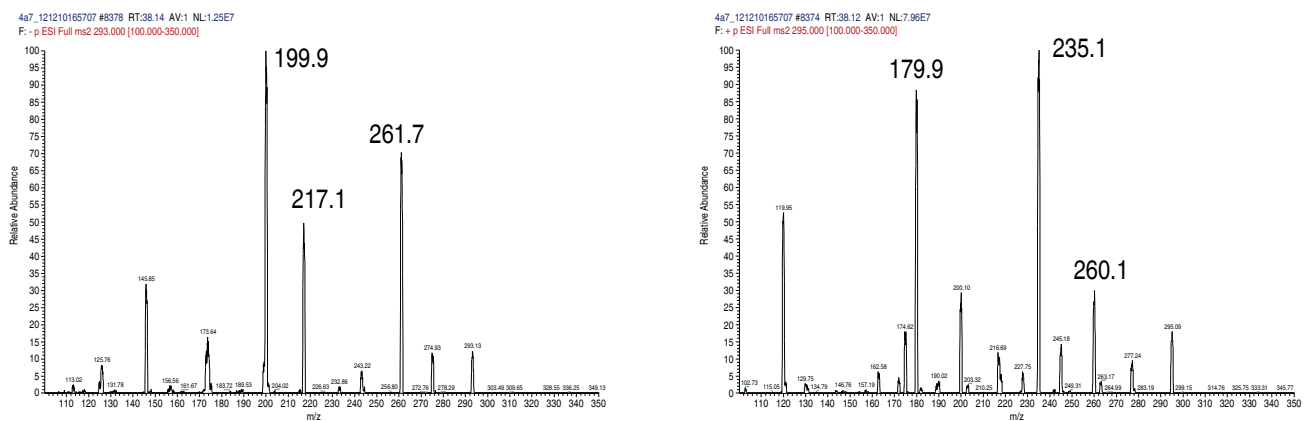


图 21 子离子碎片谱图（左图为 M-H=293.1，右图为 M+H=295.1）

通过文献比对，该化合物可能为 M+H=295.1，其负离子子离子碎片 228.6、188.8，正离子子离子碎片 260.1、235.1、179.9。

结论

通过该方法，对每一个杂质进行单独切换后，通过定量环转移至二维色谱柱上，再采用与质谱兼容的流动相，把二维色谱柱上保留的盐份通过 MS 上的切换阀去除掉，然后把目标化合物洗脱下来，进质谱分析，该方法取得了较好的结果。本方法同时对 519 号样品进行了类似分析，结果类似。因此，该二维在线去除流动相中的盐份的方法，可以参照用于该类型研究，解决相关难题。

DGLC-17 采用二维柱切换液质联用流动相在线除盐分析 头孢地尼中有关物质

关键词：在线除盐；头孢地尼；有关物质；二维柱切换；液质联用

DGLC-17 Determination of cefdinir and related substances by online-desalt of mobile phase with 2D column switch and LC-MS

Key words: Online-desalt, Cefdinir, related substances, 2D column switch, LC-MS

引言

药品杂质是反映药品质量的重要指标，药物的纯度，是指药物的纯净程度。药物的杂质检查是控制药物纯度的重要方面，也称为纯度检查。由于杂质不可能完全除尽，也没有必要除尽，所以在不影响疗效和不发生毒性的原则下，既保证药物质量，又便于制造、贮藏和制剂生产，对于药物中可能存在的杂质，允许有一定限量，这一允许量被称为杂质的限量。通常不要求测定其准确含量。《药典》中规定的杂质检查均为限量（或限度）检查（Limit test）。杂质限量：指药物中所含杂质的最大容许量。

表示方法：通常用百分之几或百万分之几（ppm）来表示。对危害人体健康、影响药物稳定性的杂质，必须严格控制其限量。检查时可用杂质的纯品或对照品在相同条件下来比较。人用药品注册技术要求国际协调会议（International Conference of Harmonization ICH）要求：表观含量 >0.1% 的杂质应进行定性分析。常规的杂质定性分析方法通常采用分离制备杂质纯品，再进行波谱学方法解析。

随着近年来，液质联用技术的发展已日臻成熟，现已广泛应用于现代药学研究的诸多领域，是一种有效的杂质定性手段。借助于质谱的定性能力，如多级扫描，子离子扫描等，以及质谱日渐提高的灵敏度与分辨率，越来越多的利用液质联用技术分析有关物质的含量及定性。但目前药典中很多的有关物质分析的方法，均采用非挥发性缓冲盐，甚至添加了离子对试剂作为流动相，因此不能直接进入质谱分析，给杂质定性带来了很大的挑战，导致应用出现局限性。本方法中，介绍了采用柱切换二维液相色谱分离-质谱定性的方法，来解决此类问题，对一维上洗脱下来的杂质等目标化合物经过阀切换至二维色谱柱，在二维色谱柱上进行除盐后，再进质谱进行定性分析，通过质谱裂解规律，寻找杂质可能产生的来源以及形成的机理，取得了较好的效果。

头孢地尼，CAS 号：91832-40-5，中文别名：(6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-氨基-4-噻唑基)-2-羟基亚胺基乙酰氨基]-8-氧代-3-乙烯基-5-硫杂-1-氮杂双环[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸；英文名称 Cefdinir，分子式 $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$ ，分子量 395.42。头孢地尼（cefdinir）属第 3 代头孢，胶囊剂：50mg/粒，100mg/粒，由日本藤泽药品工业公司原研，1991 年首次在日本上市，商品名 Cefzon，1997 年 12 月被美国上市，1999 年在韩国上市，2001 年国产头孢地尼获准在中国上市。该品用于对头孢地尼敏感的葡萄球菌属、链球菌属、肺炎球菌、消化链球菌、丙酸杆菌、淋病奈瑟氏菌、卡他莫拉菌、大肠埃希菌、克雷伯菌属、奇异变形杆菌、普鲁威登斯菌属、流感嗜血杆菌等菌株所引起的感染。

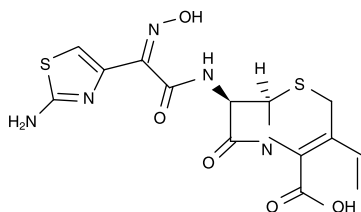


图 1 头孢地尼化学结构式

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；DAD3000RS；MS TSQ Vantage。仪器连接图见图 2。

一维分析柱：Acclaim 120 C₁₈, 5um 4.6 × 150mm (P/N: 059148)

二维色谱柱：Acclaim PA2, 3um 3.0 × 50mm (P/N: 068973)

色谱质谱条件见表 1

表 1 色谱质谱条件

| | |
|---------|--|
| MS 工作参数 | 1) Full Scan, ESI 源, 正离子模式, M/Z:100-600; 负离子模式: 100-600; Scan time 0.4S, FWHM 0.70。 2) 子离子扫描 (母离子根据 1) 扫描得到) : 正负离子同时扫描, Full scan M/Z=100-500, Scan time 0.2s, FWHM 0.70, CE 10V, Energy Ramp: 40eV 3) 调谐参数: 电压: 2200V; 雾化温度: 350C; 鞘气压力: 35psi; 辅助气压力: 10psi; 毛细管温度: 300C。 |
| 流动相组成 | 一维分析流动相 (右泵): 流动相 A: 0.25% 四甲基氢氧化铵溶液 (用磷酸调节 pH=5.5) 1000ml, 加入 0.1mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液 0.4ml; 流动相 B: 0.25% 四甲基氢氧化铵溶液 (用磷酸调节 pH=5.5)- 乙腈 - 甲醇 = 500-300-200, 加入 0.1mol/L 乙二胺四醋酸二钠溶液 0.4ml。 |

| 时间 min | 流速 mL/min | A % | B % |
|-----------|--------------|--------|--------|
| 0 | 1.0 | 95 | 5 |
| 2 | 1.0 | 95 | 5 |
| 22 | 1.0 | 75 | 25 |
| 32 | 1.0 | 50 | 50 |
| 37 | 1.0 | 50 | 50 |
| 38 | 1.0 | 95 | 5 |
| 48 | 1.0 | 95 | 5 |

二维分析流动相 (左泵): A: 0.005mol/L 醋酸铵, pH 用乙酸调节至 5.5。B: 乙腈。

| 时间 min | 流速 mL/min | A % | B % |
|-----------|--------------|--------|--------|
| 0 | 0.3 | 100 | 0 |
| 6 | 0.3 | 100 | 0 |
| 20 | 0.3 | 85 | 15 |
| 30 | 0.3 | 80 | 20 |
| 40 | 0.3 | 60 | 40 |
| 48 | 0.3 | 60 | 40 |

* 根据每个化合物的保留与基质情况, 可以对二维洗脱程序进行适当调整。

阀切换时间

| 化合物编号 | 峰保留时间 /min | 六通阀切换时间 /min | 质谱进样阀切进质谱时间 /min |
|-------|------------|--------------|------------------|
| 6 | 16.6 | 16.5-16.7 | 20.7 |
| 7 | 18.7 | 18.6-18.8 | 22.8 |
| 9 | 24.0 | 24.1-24.2 | 28.2 |
| 10 | 26.8 | 26.7-26.9 | 30.9 |
| 12 | 29.7 | 29.6-29.8 | 32.8 |
| 15 | 36.9 | 36.8-37.0 | 41.0 |

柱温 40℃
 六通阀 初始位置, 6-1, Loop 环体积: 200uL
 进样方式及体积 自动进样: 20.0μL
 UV 检测波长 254nm

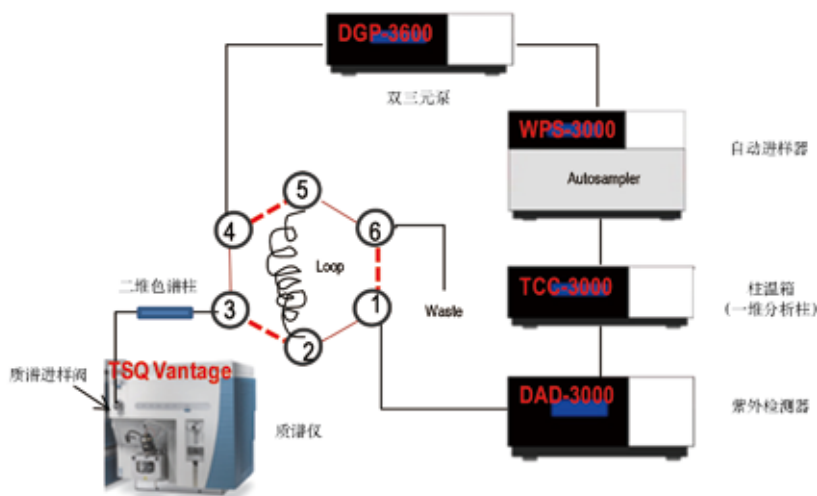


图2 仪器连接图

样品前处理方法

样品前处理: 对样品 (头孢地尼胶囊和分散片) 进行了破坏性试验, 以获得更多的杂质。

酸破坏试验: 取本品细粉适量 (约含头孢地尼 75mg), 用约 30ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液转移至 50ml 棕色量瓶中, 加 5ml 1mol/L 盐酸溶液超声 5 分钟, 取出放冷, 用 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH7.0, 加 0.1mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液 20 uL 注入色谱仪。

碱破坏试验: 取本品细粉适量 (约含头孢地尼 75mg), 用约 30ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液转移至 50ml 棕色量瓶中, 加 5ml 1mol/L 氢氧化钠溶液超声 5 分钟, 取出放冷, 用 1mol/L 盐酸溶液调节 pH7.0, 加 0.1mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液 20uL 注入色谱仪。

氧化破坏试验: 取本品细粉适量 (约含头孢地尼 75mg), 用约 30ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液转移至 50ml 棕色量瓶中, 加入 5ml 30% 过氧化氢溶液超声 5 分钟, 取出放冷后, 加 0.1mol/L 磷酸盐缓冲盐溶液至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液 20 uL 注入色谱仪。

热破坏试验: 取上述供试品溶液适量, 密封, 于水浴中加热不少于 30min, 取出放冷, 摇匀, 离心, 取上清液 20uL 注入色谱仪。

结果和讨论

样品紫外谱图分析结果

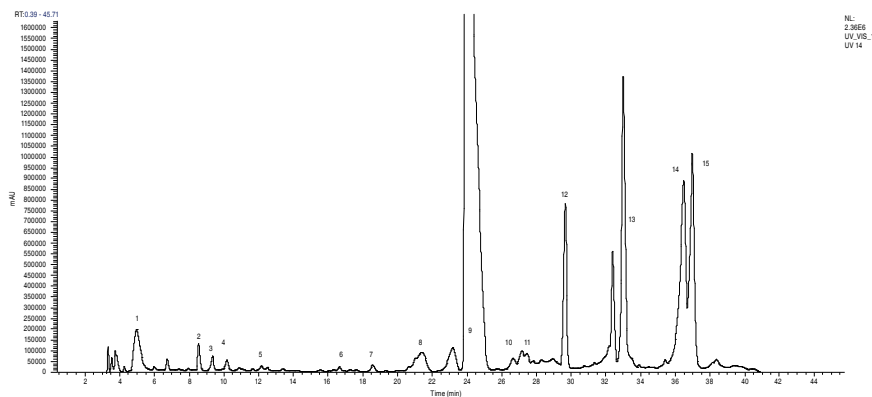


图3 样品紫外谱图（热破坏）

根据破坏紫外谱图，发现热破坏杂质峰更多，因此，选用热破坏样品进行杂质分析，从图可以看出，3号峰为主峰，头孢地尼，其他峰为杂质峰，分别对6、7、9、10、12、15号峰等进行了阀切换，把每个峰先切到 Loop 环里，然后，再启动左泵洗脱除盐后，再进质谱分析。

质谱分析结果及谱图

质谱上进样阀除盐切换时间试验

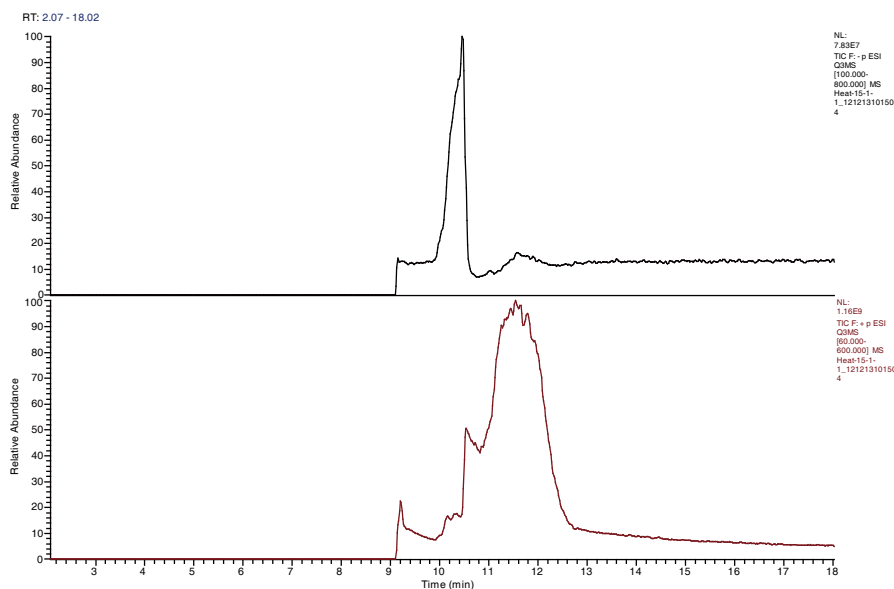


图4 质谱上流动相中的 TIC 图（上图为负离子模式，下图为正离子模式）

从以上图可以看出，上图为负离子模式，M-H 为 291.1，是 EDTA 盐；正离子模式下，M+H 74.1 为四丁基氢氧化铵盐，因此，要把流动相中的盐去除干净，需要找到合适的质谱上的进样阀的切换时间，把这两个峰进行切除，流入废液。在本试验中，质谱进样阀的切入时间约为 4.0min（以六通阀切换进样后开始计算）。

样品分析的 TIC 图及子离子扫描碎片图

6号杂质化合物

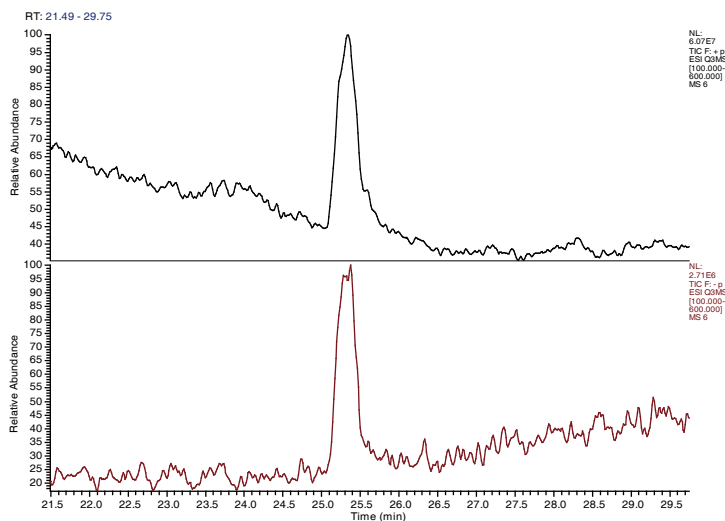


图 5 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

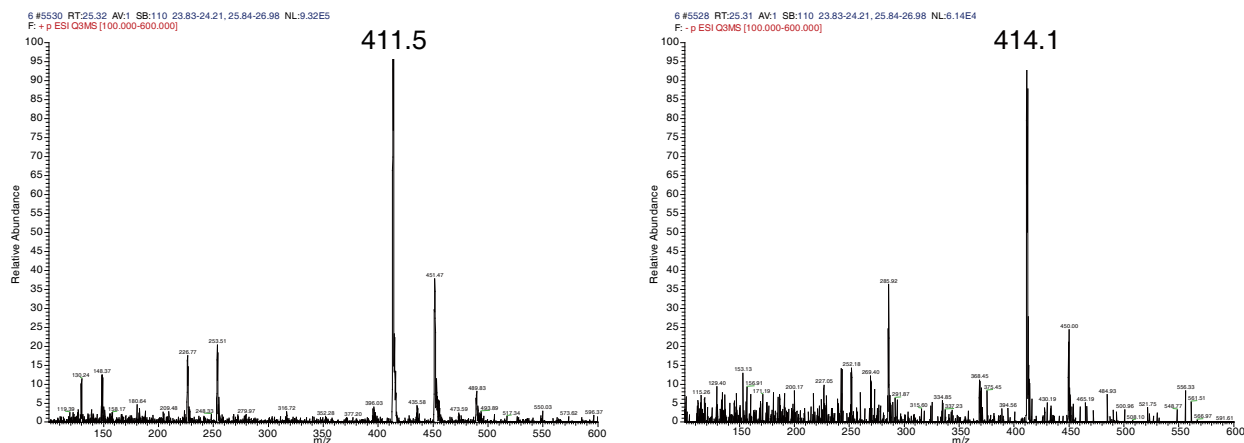


图 6 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为正离子模式)

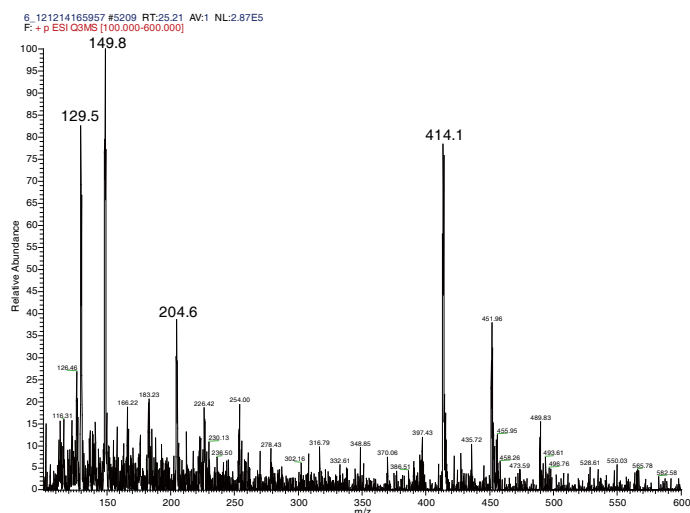


图 7 子离子扫描碎片谱图 ($M+H=414.1$)

通过以上图可以看出, $M-H$ 为 411.5, $M+H$ 为 414.1, 结合文献报道, 初步确认 $M+H$ 为 414.1, 对其再进行了子离子扫描, 主要碎片为 129.5、149.8、204.6。

7号杂质化合物

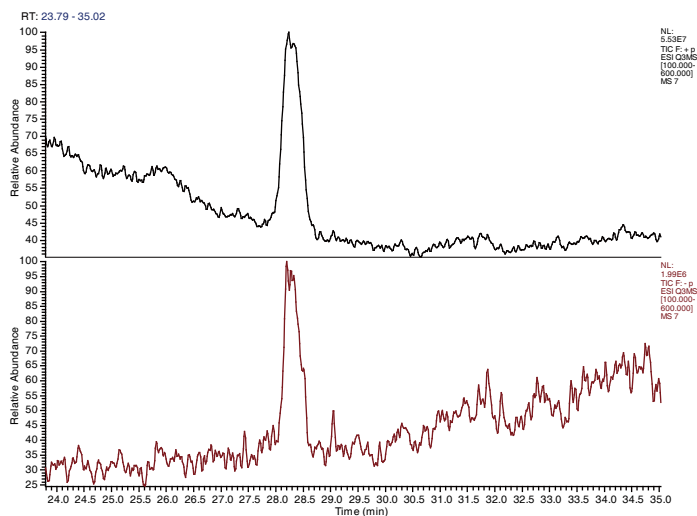


图 8 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

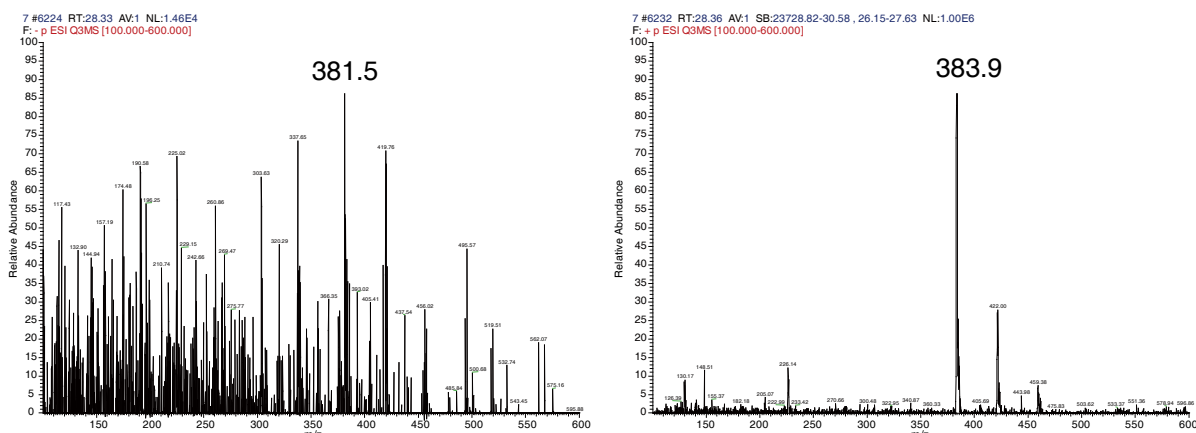


图 9 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为正离子模式)

通过以上图可以看出, $M-H$ 为 381.5, $M+H$ 为 383.9, 根据文献报道该杂质可能为 $M+H$ 为 383.9。

9号化合物 - 头孢地尼

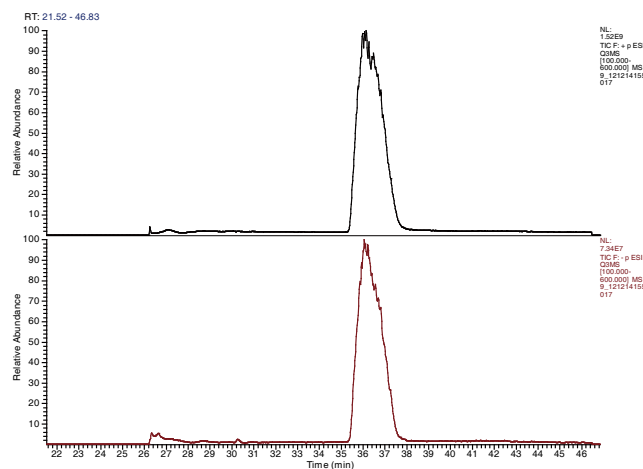


图 10 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

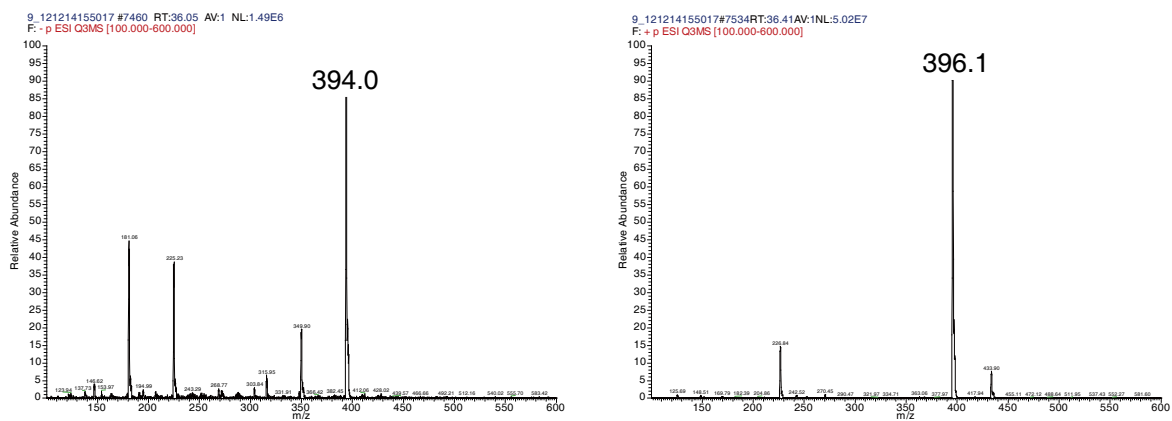


图 11 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为正离子模式)

通过以上图可以看出, $M-H$ 为 394.0, $M+H$ 为 396.1, 根据文献报道该杂质可能为 $M+H$ 为 396.1。

10 号杂质化合物

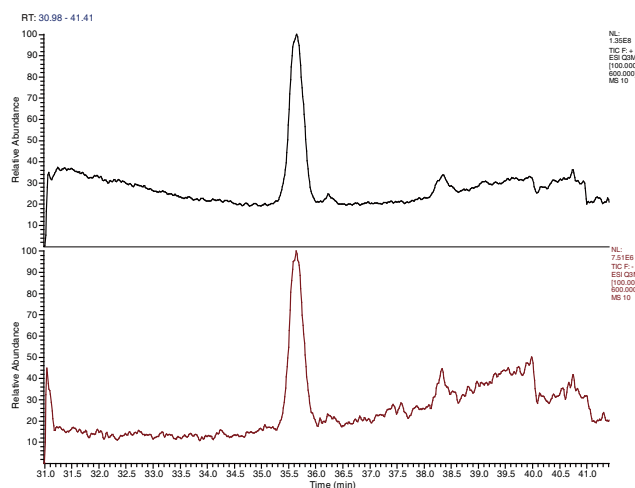


图 12 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

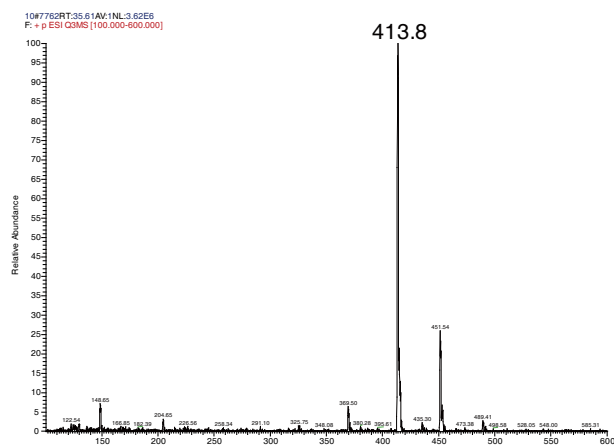


图 13 特征离子谱图 (正离子模式)

通过以上图可以看出, $M+H$ 为 413.8, 根据文献报道该杂质可能为 $M+H$ 为 413.8。

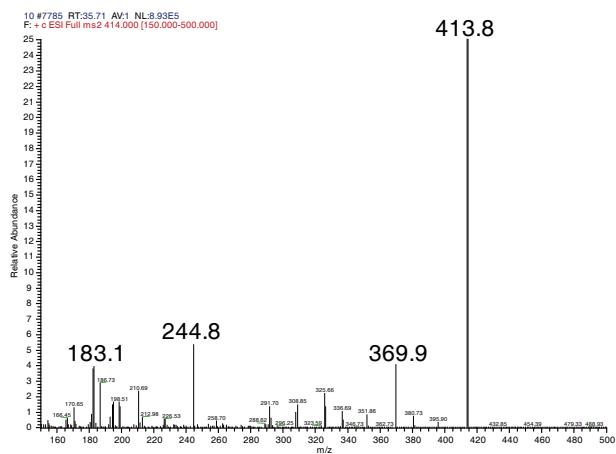


图 14 特征离子谱图 (M+H 为 413.8 子离子碎片图)

从上图可以看出, M+H 为 413.8 子离子碎片为 369.9、244.8、183.1 等。

12 号杂质化合物

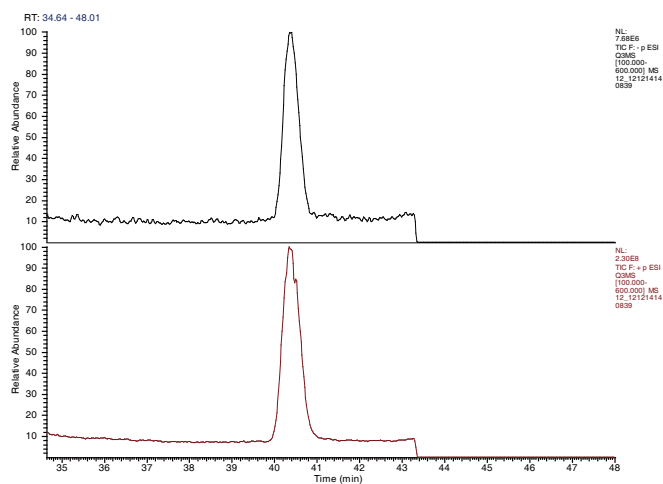


图 15 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

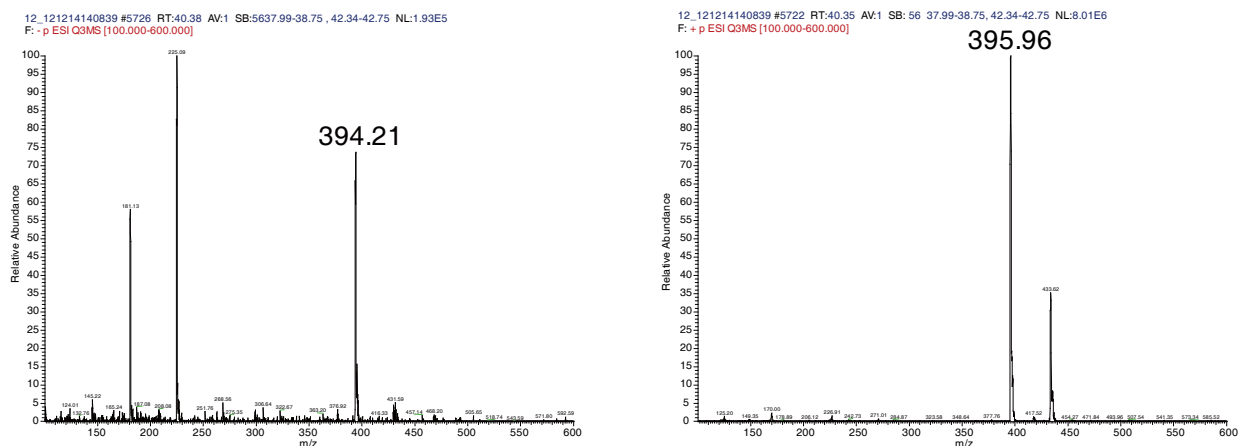


图 16 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为正离子模式)

通过以上图可以看出, M-H 为 394.1, M+H 为 395.9, 根据文献报道该杂质可能为 M+H 为 395.9。

15 号杂质化合物

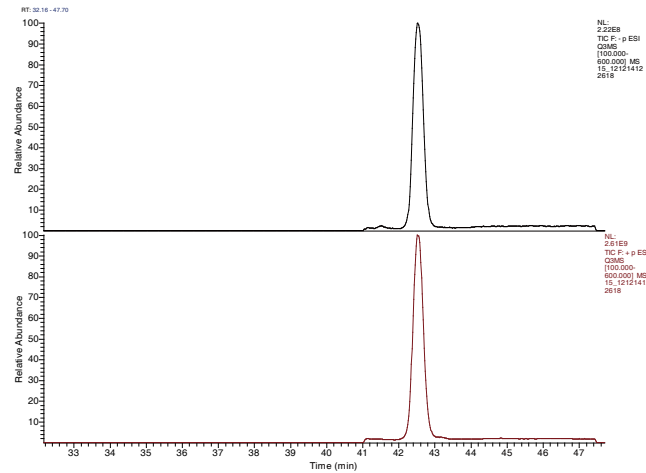


图 17 TIC 谱图 (上图为正离子模式, 下图为负离子模式)

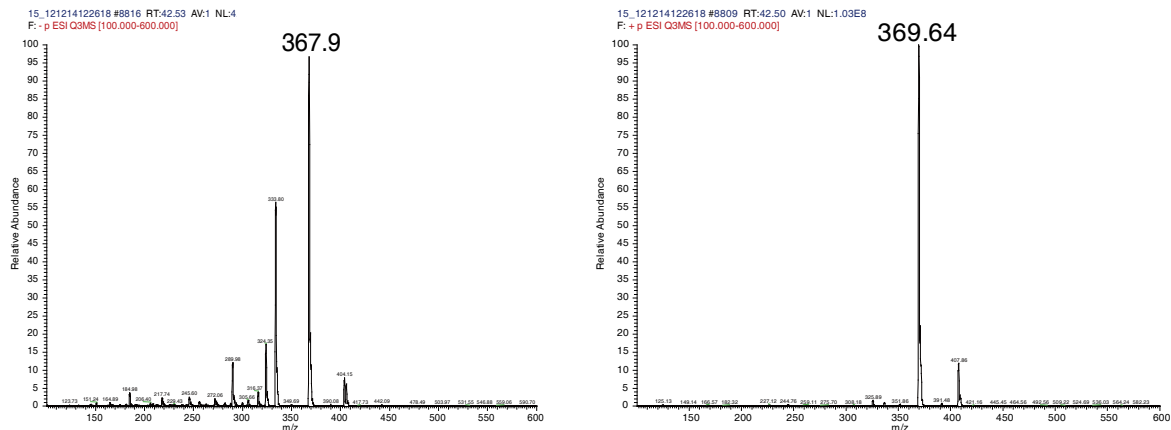


图 18 特征离子谱图 (左图为负离子模式, 右图为正离子模式)

通过以上图可以看出, $M-H$ 为 367.9, $M+H$ 为 369.7, 推测该杂质可能为 $M+H$ 为 369.7。

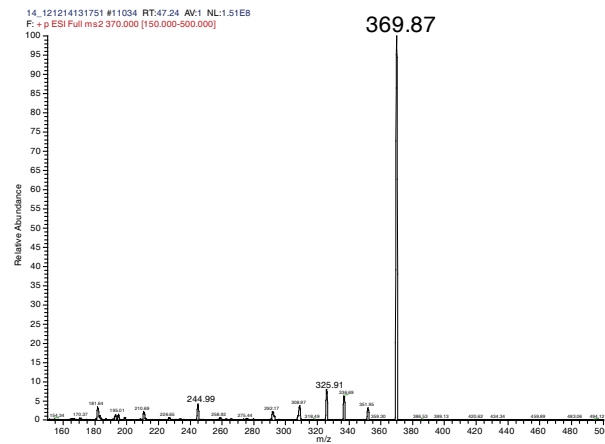


图 19 特征离子谱图 ($M+H$ 为 369.9 子离子碎片图)

对 $M+H$ 为 369.9 子离子进行扫描, 主要碎片为 325.9、244.9。

结论

通过该方法，对每一个杂质进行单独切换后，通过定量环转移至二维色谱柱上，再采用与质谱兼容的流动相，把二维色谱柱上保留的盐份去除掉，然后把目标化合物洗脱下来，进质谱分析，该方法取得了较好的结果，解决了相关难题，最终分析结果见下表。

表 2 最终分析结果

| 化合物编号 | 峰保留时间 /min | 六通阀切换时间 /min | 质谱进样阀切进质谱时间 /min | 可能的母离子 M/Z | 子离子扫描碎片 M/Z | 有无文献报道 |
|-------|------------|--------------|------------------|------------|-------------------|--------|
| 6 | 16.6 | 16.5-16.7 | 20.7 | M+H 414.1 | 129.5、149.8、204.6 | 有 |
| 7 | 18.7 | 18.6-18.8 | 22.8 | M+H 384.1 | | 有 |
| 9 | 24.0 | 24.1-24.2 | 28.2 | M+H 396.1 | | 有，主成分 |
| 10 | 26.8 | 26.7-26.9 | 30.9 | M+H 414.1 | 369.9、244.8、183.1 | 有 |
| 12 | 29.7 | 29.6-29.8 | 32.8 | M+H 396.0 | | 有 |
| 15 | 36.9 | 36.8-37.0 | 41.0 | M+H 369.7 | | 无 |

DGLC-18 阴离子交换色谱与 ESI-MS 联用的方法纯化鉴定经自动脱盐的磷酸二酯酶 II 酶解产物中 RNA 连接异构体

关键词：磷酸二酯酶 II 酶解产物；ESI-MS 联用；自动脱盐；RNA 连接异构体

DGLC-18 Identification of RNA Linkage Isomers by Anion-Exchange Purification with ESI-MS of Automatically-Desalted Phosphodiesterase-II Digests

Key words: Phosphodiesterase-II Digests, ESI-MS, Automatically-Desalted, RNA Linkage Isomers

引言

RNA 连接异构体是 RNA 众多特有杂质中的一种，目前采用 MS 和 LC-MS 方法很难将其鉴别。本文利用阴离子无孔聚合物整体色谱柱来纯化 RNA 粗品，从而证明 RNA 连接异构体的存在。同时利用核酸外切酶无法将 2'-5' 键断开的技术对分离的结果进行确认。提出一种新方法，该方法利用阴离子交换色谱与 ESI-MS 联用的纯化鉴定技术来确定酶解产物中不同连接位置的 RNA 异构体。由于典型的 IP-RPLC 脱盐法不能有效地将盐与少于 6 个碱基的寡核苷酸分开，因此本文采用直接反相色谱法对酶解产物进行自动脱盐，最后将脱盐后的样品用 ESI-MS 进行鉴定。

RNA 连接异构体：RNA 片段脱盐

在 2006 年的 TIDES (寡核苷酸和多肽技术国际会议) 上，报道了 DNAPac[®] PA200 色谱柱可以分离序列相同、而序列中特殊位置存在异常 2'-5' 连接 (见图 1,2) 的 RNA 寡核苷酸。用磷酸二酯酶 II 处理这些 RNA 寡核苷酸，而 5 核酸外切酶无法切断 2'-5' 键，所以会产生长度不定的片段。由 DNAPac[®] PA200 色谱柱分离结果表明，这些片段是可以被识别，因为每一个 RNA 连接异构体的酶解产物都会形成片段，而这些片段中 2'-5' 键在序列中的位置都是每一个片段所独有的 (见图 3,4)。这项研究随后就发表在：Thayer et. al, Anal. Biochem. 2007, 361, 132-139

2008 年在 TIDES 的寡核苷酸分析研讨会上，我们提出了一个简便、自动的方法将经过 DNAPac 柱分离后得到的核苷酸脱盐，随后进行 ESI-MS 序列分析 (见图 5-7)，但是发现为此开发的 IP-RPLC 方法在对链长小于 6 个碱基的寡核苷酸脱盐时，不能够将其与盐分离开。所以在此对那篇报告进行了更新 (见图 8-10)。本文采用了一种直接 RPLC 方法，在脱盐过程中，将短链或者长链的寡核苷酸与盐进行分离，使 ESI-MS 能够鉴别经磷酸二酯酶酶解产生的短链 RNA 片段 (见表 1)。在简单的梯度分离条件下，DNAPac PA200 柱能保留和分离一些长度和序列相同，但在不同序列的位置上含有异常 2'-5' 连接的 RNA 寡核苷酸。

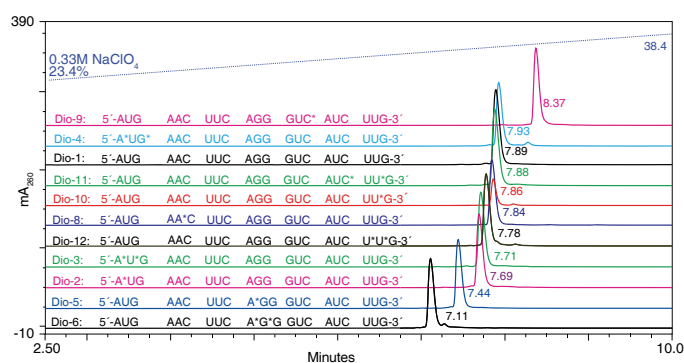


图 1 含 2'-5' 连接的序列相同的 21 个混合碱基聚体分离图谱。

色谱柱：DNAPac PA200，梯度：66–132 mM NaClO₄/10 min，1 mL/min，30 °C，pH 7。

新推出的 DNASwift™ SAX-1S 整体柱是专门用于核酸提纯的高容量色谱柱，能够提供与 DNAPac 柱对于这些同分异构体媲美的分辨率（见图 2）。

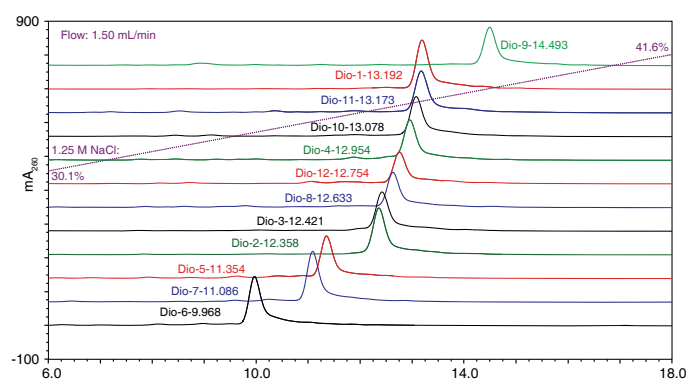


图 2 RNA 连接异构体在 DNASwift 柱上的预分离

10 倍柱体积 (CV) 中以 325-575mM NaCl 梯度变化，1.5 mL/min，pH 7，30 °C。图 3 和图 4 表明每一连接异常位点都会产生一组独特的磷酸二酯酶 II 酶解片段。

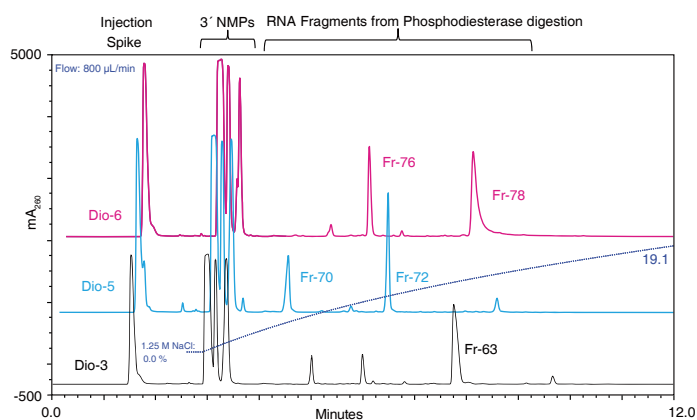


图 3 用 DNAPac PA200 柱分离 Dio-3, -5, 和 -6 的组分

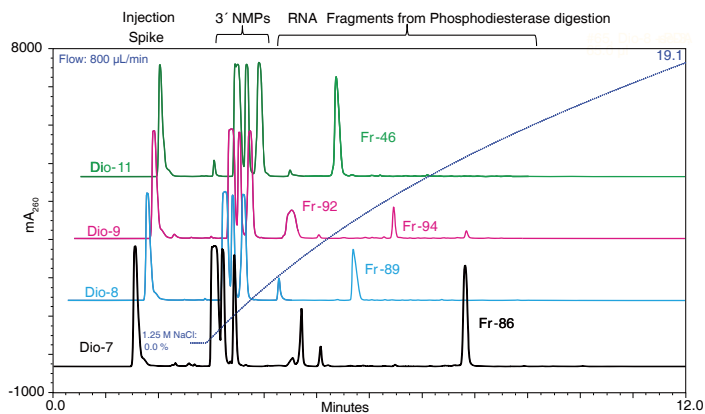


图 4 用 DNAPac PA200 柱分离 Dio-7, -8, 9 和 -11 的组分

配置了自动进样器 / 馏分收集装置的 UltiMate 3000 系统, 在程序文件的控制下, 可以配置成既能纯化寡核苷酸又能脱盐的体系。下面是装置的结构示意图。

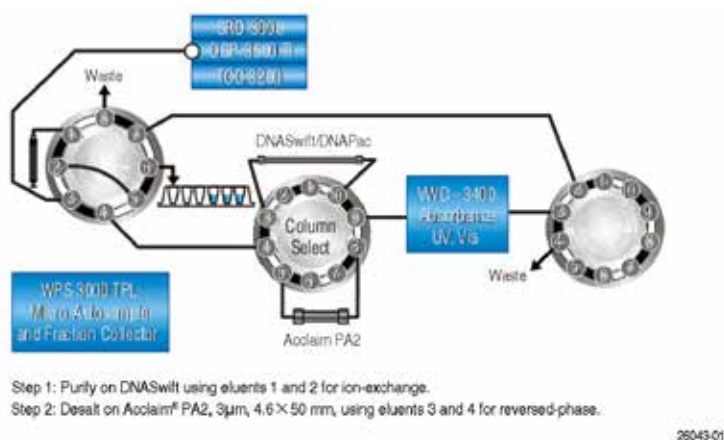


图 5 用 UltiMate[®]3000 钛系统进行便捷自动的纯化和脱盐过程

图 6 和图 7 所示为后续 ESI-MS 分析进行 RNA 纯化和脱盐的一个实例。图 6 所示为 125µg 某种含有 21 个碱基的 RNA 连接异构体在 DNASwift 整体柱上纯化结果。图中的插图表明经过纯化目标物 21 聚体 RNA 的纯度从 78% 提升到了 97%。

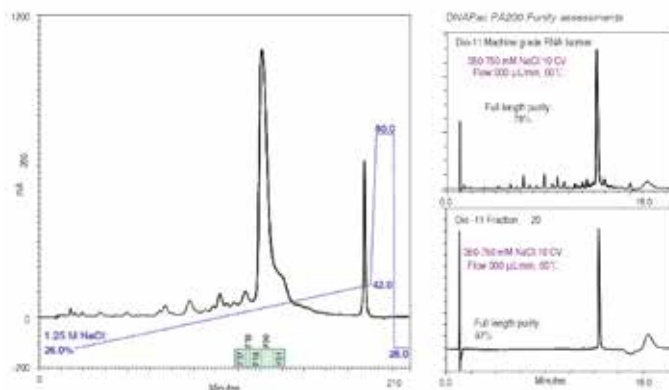


图 6 DNASwift 提纯 RNA 连接异构体 Dio-11。10 倍柱体积中以 325–525 mM NaCl 梯度变化, pH 7, 30 °C, 1.5 mL/min, 125 µg 样品。

图 7 含有 21 个碱基 RNA 连接异构体的自动脱盐示意图和脱盐后 RNA 的质谱图。表明符合寡核苷酸的分子量并含有少量钠加合物的存在。

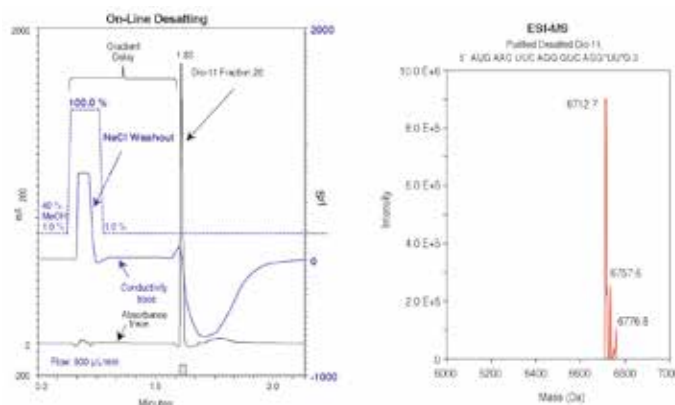


图 7 RNA 异构体采用 AcclaimPA2 柱自动脱盐：纯化组分 11 的离子对试剂脱盐及其 ESI-MS 质谱图

图 8 左侧的两张图显示了理想的离子对模式脱盐方法，该方法应用于序列相似含有 21 个碱基的 RNA 异构体的脱盐；另外还表明该方法对于经磷酸二酯酶 II 处理过的 RNA 所产生的短链 RNA 片段的脱盐是不适合的。右图表明利用直接反相色谱的方法（20 mM 甲酸铵，1-40% 的甲醇梯度）可以成功的对该短链片段脱盐。

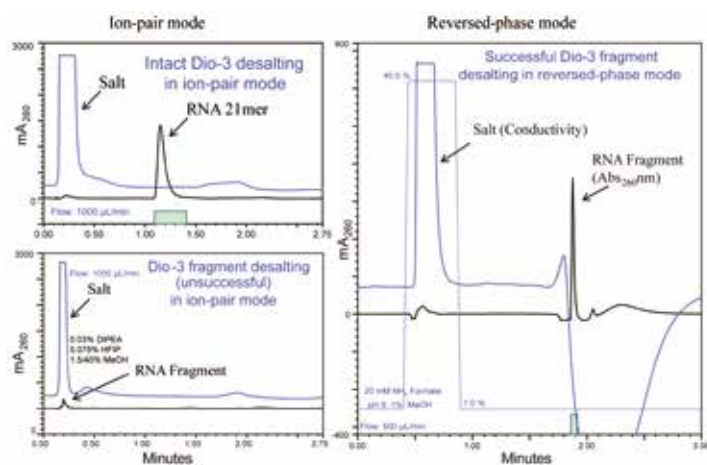


图 8 寡核苷酸片段脱盐：Acclaim PA2，离子对与反相模式比较

图 9 是去卷积前后的质谱图和在赛默飞 LTQ 质谱仪上校正的单一同位素质谱图实例。

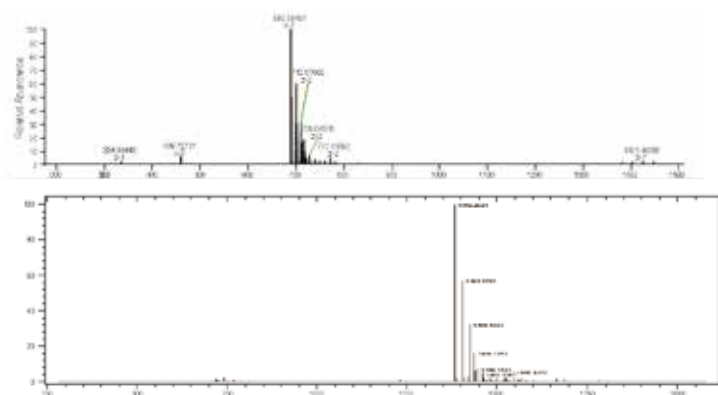


图 9 ESI-MS 鉴别来自 Dio-7 的片段 86. 此非同位素质谱图揭示了不带电荷的单一同位素质量。这个质量与 rArGrGrGp (即，一个末端磷酸) 是一致的。该物质的预期质量是 1382.2 (2ppm 误差)

图 10 是经磷酸二酯酶 II 酶解产生的另外两个 RNA 异构体片段 (Dio-3 和 Dio-5) 自动脱盐后的原始谱图。

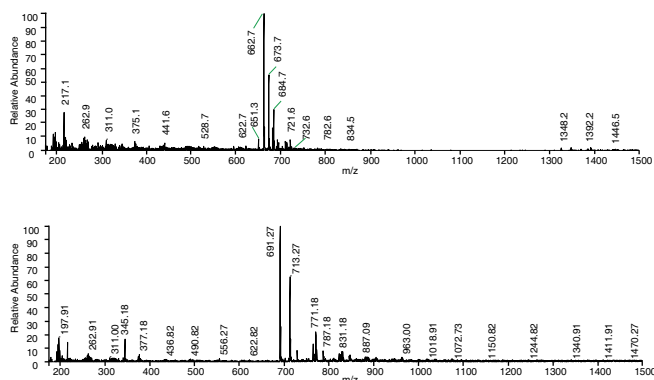


图 10 异常连接的 RNA 片段 ESI-MS 谱

上图: 组分 Dio-3, 片段 63 的负离子质谱图。m/z 662.7 的峰是一个双电荷峰, 与 rArUrGrA-p(MW=1327.2) 相一致; 下图: 组分 Dio-5, 片段 70 的负离子质谱图。m/z 691.2 的峰与 rArG-p (MW 692.1) 相一致。

表 1 RNA 异构体研究结果的总结
根据原始序列, 质谱结果和 DNAPac PA200 的洗脱

| 绿色荧光蛋白 | | | | |
|-------------------------------------|----|--------------------------------------|-------------|--------|
| 反义 5'-AUG AAC UUC AGG GUC AGC UUG-3 | | | | |
| 修饰: 所有下划线残基都为 2'-5' 键 | | | | |
| 名称 | 片段 | 酶解片段的序列和位置 | 片段 ID | 质量 |
| Dio-1 | 无 | 5' -AUG AAC UUC AGG GUC AGC UUG-3 | 无 (只有 NMPs) | — |
| Dio-3 | 63 | 5' -A*U*G AAC UUC AGG GUC AGC UUG-3 | rArUrGrA-p | 1327.2 |
| Dio-5 | 70 | 5' -AUG AAC UUC A*GG GUC AGC UUG-3 | rArG-p | 691.2 |
| Dio-5 | 72 | 5' -AUG AAC UUC A*GG GUC AGC UUG-3 | rArGrG-p | 1037.2 |
| Dio-6 | 76 | 5' -AUG AAC UUC A*G*G GUC AGC UUG-3 | rArGrG-p ? | 1037.2 |
| Dio-6 | 78 | 5' -AUG AAC UUC A*G*G GUC AGC UUG-3 | p-rArGrG ? | 1037.2 |
| Dio-7 | 86 | 5' -AUG AAC UUC A*GG* G UC AGC UUG-3 | rArGrGrG-p | 1382.2 |
| Dio-8 | 89 | 5' -AUG AA*C UUC AGG GUC AGC UUG-3 | rArCrU-p | 958.1 |
| Dio-9 | 92 | 5' -AUG AAC UUC AGG GUC* A GC UUG-3 | rCrA-p | 652.1 |
| Dio-9 | 94 | 5' -AUG AAC UUC AGG GUC* AGC UUG-3 | p-rArG | 692.1 |
| Dio-11 | 46 | 5' -AUG AAC UUC AGG GUC AGC* UU*G-3 | rCrUrUrG | 1200.2 |

数据结果表明:

1. 磷酸二酯酶 II 不能断开 2'-5' 连接的 RNA, 但会在 RNA 的内部, 异常链中 3'-5' 连接靠近 3' 的一个或两个碱基处断开序列。此酶发挥作用需要 5'-OH 同时产生 3'- (或者 2'-) 磷酸核苷酸, 除非最后一个碱基是 3' 末端就会产生 3'-OH (表 1, Dio-3,-5,-6,-7,-8,-11,-9[Fr 92]) 。

2. 鉴定了 DNAPac 色谱图 (图 3) 上出峰大约相差两分钟的来自 Dio-6 的两种产物, 发现它们具有相同的质量 (表 1)。认为是磷酸化 AGG-RNA 片段, 代表 3' 磷酸化形式、5' 磷酸化的 3'-OH 形式或者短的 (3-核苷酸) 四阶磷酸化方式 (表 1, Dio 6 [Fr 78])。

3. 组分 Dio-9 (磷酸化 AG) 的第二个产物表明 2'-5' 连接的断裂, 而不是相邻 (3'-5') 的断裂。

结论

-DNAPac PA200 柱

- 能够分析较多含有 21 个混合碱基的连接异构体 (图 1)

对于每一个混合碱基 2'-5' 连接异构体的磷酸二酯酶 II 不完全酶解产物, 在特定的位置上都会产生保留。(图 3-4)。

- 部分地分离了正常和异常连接异构体的完全降解产物 (3'NMPs) (图 3-4)。
- 在高浓度盐条件下能够获得高纯度的寡核苷酸和 RNA 片段组分。
- 专为柱容量达到 100 μg 左右的样品进行的高分辨率设计。

DNASwift SAX-1S 整体柱

- 分析 RNA 连接异构体 (图 2)

- 提供在高浓度盐条件下纯化寡核苷酸和 RNA 片段组分。

- 专为高容量、高产率的寡核苷酸提纯而设计 (柱容量可以达到 10mg)

Acclaim PA2 自动脱盐

- 在离子对模式中, 对 6 个碱基以上的寡核苷酸和 RNA 片段脱盐 (图 5-7)。

- 在 RP 反相模式 ($\text{NH}_4\text{HCO}_2\text{H}$) 中, 对 2 个碱基以上的寡核苷酸和 RNA 片段脱盐 (图 8)。

- 对 RNA 连接异构体的磷酸二酯酶 II 酶解产物, 可以直接进 ESI-MS 鉴别 (图 9-10, 表 1)。

DGLC-19 用于质谱分析的在线固相萃取除盐方法

关键词：在线固相萃取；在线除盐；双梯度高效液相色谱系统；阀切换

DGLC-19 On-Line High-Throughput Desalting to Prepare Samples for Mass Spectrometry

Key words: On-line SPE; On-line desalting; Dual gradient HPLC; Valve switching

引言

质谱 (MS) 和液相色谱 - 质谱联用 (LC-MS) 技术已经成为分析复杂生化样品的有效手段, 但生化样品如多肽和蛋白的制备过程中所大量使用的高浓度盐会干扰质谱分析的离子化过程, 从而导致峰强度降低和离子源污染, 致使检测无法进行。因此, 质谱检测前的样品除盐显得尤为重要。目前常用的方法是离线固相萃取 (off-line SPE), 但其步骤繁琐、耗时长差等缺陷影响分析效率^[1]。因此, 具有自动化程度高、节约时间和方法重现性好等优点的在线固相萃取 (on-line SPE) 除盐技术的开发和应用日益受到重视^[1-4]。

本文建立了一种简单、快速和有效的可用于质谱和液 - 质联用分析生化样品的在线固相萃取高通量除盐方法。方法分为单柱和双柱两种模式, 借助于包含双梯度泵、自动进样器和配有 2p-10p 切换阀 (即 2 位十通阀) 的柱温箱的高效液相色谱 (HPLC) 系统, 在色谱管理软件的控制下, 完成样品的在线除盐, 实现了样品除盐自动化, 大大提高了工作效率。

测试条件

仪器和试剂

赛默飞 UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 包括双三元梯度泵 (DGP-3600A) 配置六通道在线脱气机 (SRD-3600)、自动进样器 (WPS-3000TSL, 带大体积进样组件)、柱温箱 (TCC-3200RS, 带 2p-10p 切换阀, 即 2 位十通阀)、二极管阵列检测器 (DAD-3400RS); 变色龙色谱管理软件 Chromeleon[®] 6.8 SR9。

乙腈, 去离子水 (18.2 M Ω ·cm), 碳酸氢铵 (NH₄HCO₃)、甲酸 (HCOOH)、溴化钾 (KBr) 均为分析纯 (中国国药集团化学试剂有限公司)。

生化样品

含有高浓度磷酸缓冲盐的寡核苷酸样品由江苏某生化制品公司提供; 经过纯化和除盐的牛血清蛋白 (BSA) 标准品由上海阿敏生物技术有限公司提供。

在线固相萃取除盐单萃取柱模式的流程

以对含有 4 mg/mL KBr 的 BSA 标准品溶液进行除盐为例, 描述本研究中的在线串联固相萃取除盐单萃取柱模式的流程。流程装置如图 1 所示。十通阀 1-10 位通时, 上样泵 (Loading Pump) 以 0.1% HCOOH 溶液 (v/v) 为流动相, 1.5 mL/min 流速进样, 样品溶液中的 BSA 被保留在 SPE 柱 1 (Acclaim PA II Guard, 4.3 mm \times 10 mm, 5 μ m) 上, 而 KBr 不被保留, 被淋洗出 SPE 柱。在 SPE 柱上完成除盐后, 通过阀切换使 1-2 位通, 分析泵 (Analytical Pump) 以 0.1% HCOOH 溶液 - 乙腈 (6 : 4, v/v) 为流动相, 1 mL/min 流速淋洗 SPE 柱, 将富集的 BSA 洗脱, 通过流路与 MS 直接连接进行分析 (on-line SPE-MS), 或与紫外 (UV) 检测器连接直接进行分析 (on-line SPE-Flow Injection); 或通过流路经过色谱柱分离后进入 MS 进行分析 (on-line SPE-LC-MS), 或使用紫外检测器进行分析 (on-line SPE-HPLC)。

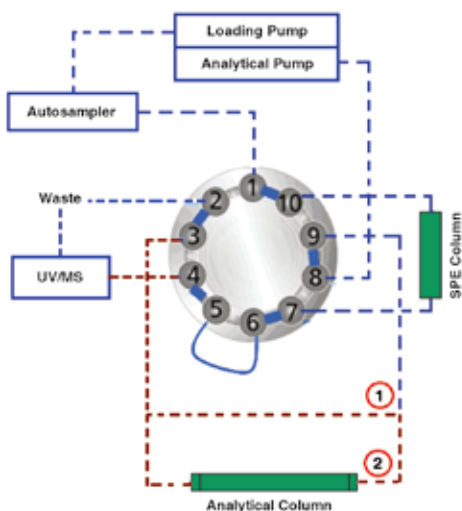


图 1 在线固相萃取除盐单萃取柱模式的流程图

在线固相萃取除盐双萃取柱模式的流程

同样以对含有 4 mg/mL KBr 的 BSA 标准品溶液进行除盐为例，描述本研究中的在线固相萃取除盐双萃取柱模式的流程。流程装置如图 2 所示，上样泵和分析泵所用的流动相、色谱柱以及萃取和淋洗条件均与单柱模式相同。十通阀 1-2 位通时，在 SPE 柱 1 上进样和除盐（周期 1）。上样泵进样后，样品溶液中的 BSA 被保留在 SPE 柱 1 上，而 KBr 不被保留，被淋洗出 SPE 柱。当周期 1 完成，将十通阀切换至 1-10 位通，周期 2（在 SPE 柱 2 上进样和除盐）开始，其使用的 SPE 柱和条件均与周期 1 相同。与此同时，分析泵将富集的 BSA 洗脱，通过流路与 MS 或与紫外检测器直接连接进行分析；或通过流路经过色谱柱分离后进入 MS 或紫外检测器进行分析。当周期 2 完成，将十通阀切换回至 1-2 位通，周期 1 又开始运转；同时，富集在 SPE 柱 2 上的 BSA 则被洗脱、检测或经过分离后检测。这样，SPE 柱 1 和 2 轮流工作，高效率地完成样品的在线除盐及检测。

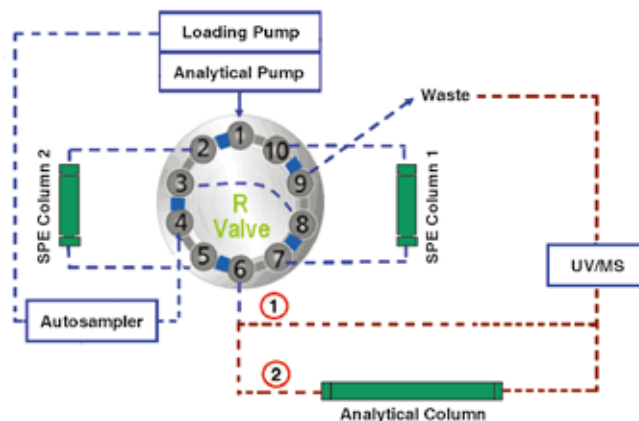


图 2 在线固相萃取除盐双萃取柱模式的流程图

结果和讨论

除盐效果的评价

提高在线固相萃取除盐效果的方法一般有两种，一是延长固相萃取除盐时间，也就是延长切阀时间；二是增大固相萃取除盐的流速。由于生化样品制备时所通常使用的缓冲盐如磷酸盐溶液没有紫外吸收，在方法开发时，可以通过向样品溶液中加入有紫外吸收的盐如 KBr 来判断除盐效果。

图 3 是单萃取柱模式下，不同浓度 KBr 溶液的在线固相萃取-流动注射 (on-line SPE-Flow injection) 色谱图。在 0.5 min 时，可以观察到 2.0 和 4.0 mg/mL 的 KBr 溶液尚有残余，但在 1.5 min 时，4.0 mg/mL 的 KBr 溶液也已经完全去除，表明通过延长固相萃取除盐时间，在线固相萃取除盐效果得到提高。

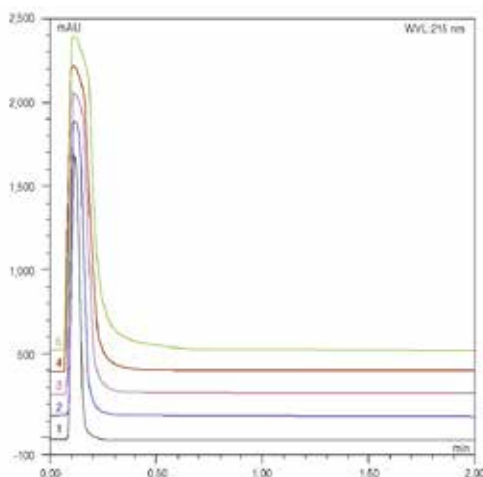


图 3 在线固相萃取除盐单萃取柱模式下的不同浓度 KBr 溶液的流动注射色谱图

SPE column: Acclaim PA II Guard (4.3 mm × 10 mm, 5 μ m); mobile phase: 5 mM NH₄HCO₃; temperature: 30 °C; flow rate: 1.0 mL/min for desalting; Injection volume: 5 μ L; detection: UV at 215 nm; samples: 1. 0.1 mg/mL; 2. 0.5 mg/mL; 3. 1.0 mg/mL; 4. 2.0 mg/mL; 5. 4.0 mg/mL

图 4 是单萃取柱模式下，不同固相萃取除盐流速时，含有 2.0 mg/mL KBr 的寡核苷酸样品的在线固相萃取 - 高效液相色谱 (on-line SPE-HPLC) 图。在除盐流速为 1.0 mL/min 时，如图 4 (a) 所示，在寡核苷酸色谱峰后有一个小色谱峰。经过紫外吸收光谱比对，可确认该峰是 KBr 的残留，说明流速为 1.0 mL/min 时样品中的盐没有完全去除；但当除盐流速增大至 2.0 mL/min 时，如图 4 (b) 所示，该色谱峰消失，表明样品中的盐已经去除。因此，通过增大固相萃取除盐的流速，可以提高在线固相萃取除盐效果。

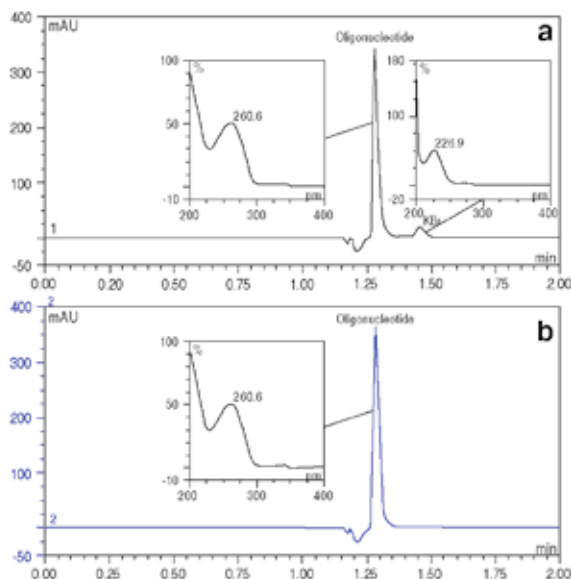


图 4 在线固相萃取除盐单萃取柱模式下的含有 2.0 mg/mL KBr 的寡核苷酸样品在除盐流速为 (a) 1.0 mL/min 和 (b) 2.0 mL/min 时的高效液相色谱图

Conditions for desalting: SPE column: Acclaim PA II Guard (4.3 mm × 10 mm, 5 μ m) ; mobile phase: 5 mM NH₄HCO₃; flow rate: 1.0 and 2.0 mL/min; injection volume: 5 μ L; temperature: 30 °C . Conditions for separation: analytical column: Acclaim PA II (3.0 mm × 33 mm, 3 μ m) ; mobile phase: 5 mM NH₄HCO₃ : CH₃CN, 8:2 (v/v) ; flow rate: 1.5 mL/min; detection: UV at 254 nm; temperature: 30 °C . Valve switching time: 1.0 min.

在线固相萃取除盐方法的重现性

本研究通过计算双萃取柱模式下，连续进样 10 次含有 4.0 mg/mL 的 BSA 溶液（每个萃取柱上各 5 次），所得到的 BSA 色谱峰（图 5）的保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD）来评估在线固相萃取除盐方法的重现性。BSA 保留时间的 RSD 为 0.1%，峰面积的 RSD 为 1.0%，说明该方法的重现性良好。

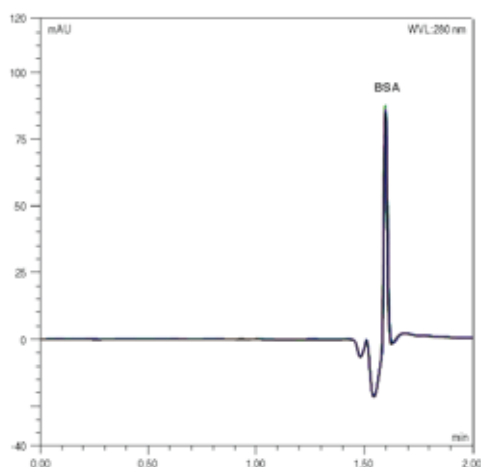


图 5 在线固相萃取除盐双萃取柱模式下的含有 4.0 mg/mL KBr 的 BSA 溶液连续进样 10 次（每个萃取柱上各 5 次）的叠加高效液相色谱图

Conditions for desalting: SPE columns: two Acclaim PA II Guard (4.3mm × 10mm, 5 μ m) ; mobile phase: 0.1% HCOOH (v/v) ; flow rate: 1.5 mL/min; injection volume: 5 μ L; temperature: 30 °C . Conditions for separation: analytical column: Acclaim 300 C₁₈ (4.6 mm × 50 mm, 3 μ m) ; mobile phase: 0.1% HCOOH : CH₃CN, 6:4 (v/v) ; flow rate: 1.0 mL/min; detection: UV at 280 nm; temperature: 30°C . Valve switching time: 1.0 min.

当样品溶液中的盐浓度不高时，采取双萃取柱模式，通过适当缩短阀切换时间可以大大提高在线固相萃取除盐的效率；但频繁的阀切换可能会导致方法重现性的降低。因此，机械性能良好的双梯度泵是实现这一目的的保证。图 6 是磷酸缓冲盐浓度低于 1.0 mg/mL 的寡核苷酸样品在的双萃取柱模式下，阀切换时间缩短至 0.4 min 时的连续进样 8 次的叠加液相色谱图（每个萃取柱上各 4 次）。除盐、洗脱和分离测定在 1.1 min 即可完成。寡核苷酸保留时间的 RSD 为 0.0%，峰面积的 RSD 为 1.5%。

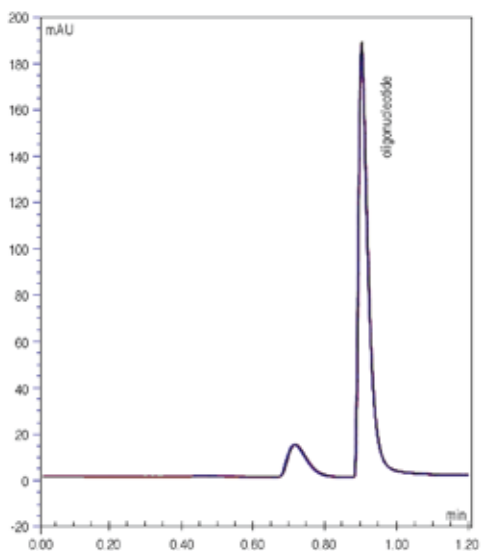


图 6 在线固相萃取除盐双萃取柱模式下的寡核苷酸样品连续进样 8 次（每个萃取柱上各 4 次）的叠加高效液相色谱图

Conditions for desalting: SPE columns: two Acclaim PA II Guard (4.3 mm × 10 mm, 5 μ m) ; mobile phase: 5 mM NH₄HCO₃; flow rate: 1.5 mL/min; injection volume: 2 μ L; temperature: 30 °C . Conditions for separation: analytical column: Acclaim PA II (3.0 mm × 33 mm, 3 μ m) ; mobile phase: 5 mM NH₄HCO₃ : CH₃CN, 8:2 (v/v) ; flow rate: 0.8 mL/min; detection: UV at 254 nm; temperature: 30 °C . Valve switching time: 0.4 min.

结论

本文建立了简单、快速和有效的可用于质谱和液 - 质联用分析生化样品的在线固相萃取高通量除盐方法。方法分为单柱和双柱两种模式，样品除盐过程完全由液相色谱系统自动完成，与传统除盐方法相比，该方法样品需求量小、试剂消耗量少、操作简单、分析成本低廉、除盐效率高等特点，大大提高了工作效率。因此，该技术在生化样品的分析中有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Opiteck G J, Lewis K C, Jorgenson J W, et al. Anal Chem, 1997, 69: 1518
- [2] Wei J, Sun J, Yu W, et al. J Proteome Res, 2005, 4: 801
- [3] Yoshida H, Mizukoshi T, Hirayama K, et al. J Chromatogr A, 2006, 1119: 315
- [4] Thayer J R, Puri N, Burnett C, et al. Anal Biochem, 2009, 399: 110

第三章 双三元串联应用

第一节 双三元串联应用指南

在梯度洗脱中，前一个样品分析结束后，再分析下一个样品前，色谱柱需要进行一个清洗和平衡过程，而在此过程中进样器，柱温箱和检测器则处于闲置状态。如图 1 所示

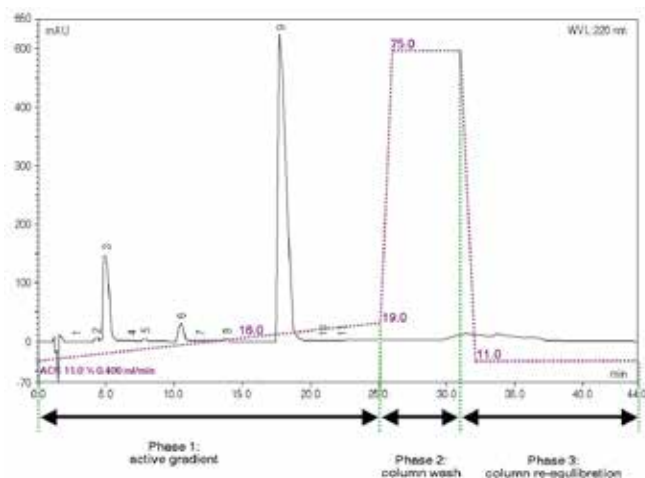


图 1 梯度方法运行示意图

若将此清洗和平衡阶段在离线状态进行，同时分析下一个样品则可提高分析工作效率。如图 2 所示。在 a) 示意图中，在前 25 分钟时间段里，运行梯度来分析样品，在随后的 25 分钟到 44 分钟这段时间里，色谱系统进行清洗和平衡过程，而样品中再无其他组分洗脱，因此这段时间对提高分析工作效率有着负面影响。为了提高分析工作效率，可采用 b) 图中的方案，在前 25 分钟梯度分析结束后，将已分析过样品的色谱柱（柱 1）切换至另外的清洗和平衡流路中，使其与进样器和检测器断开，即不再处于分析在线流路（离线），而将另外一根色谱柱（柱 2，其性质与前一根柱要尽量相同）接入在线分析流路，将流动相回到分析初始状态进行下一个样品分析程序。当其分析完样品后，再次被切换至离线清洗和平衡流路，而平衡后的柱 1 再接入分析流路进行样品分析。

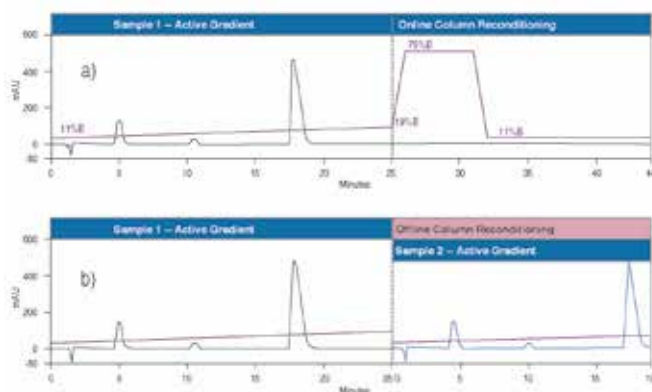


图 2 不同模式的分析、清洗和平衡过程：a). 在线过程，b). 离线过程

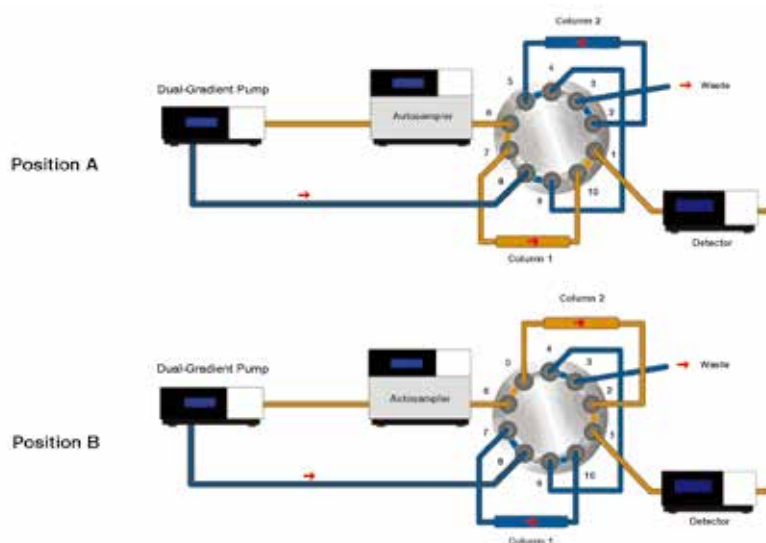


图3 串联分析示意图

在图3中,当切换阀处于1-10相连时,色谱柱1(黄色)处于在线分析流路中,进行样品分析,而柱2(蓝色)处于离线清洗和平衡流路中进行平衡以用于下次分析。两根色谱柱连续交替地进行在线分析与离线平衡,可节省20%-50%的时间。

U3000 智能液相色谱为此操作提供了完美的整体解决方案。当液相色谱具有如下配置,并配合软件辅助,色谱工作者则可无任何担忧而进行该操作,并得到满意的结果

- 双三元泵 (DGP-3600)
- 柱温箱 (TCC-3X00 SD/RS) 并配置有一个 2 位 10 通切换阀
- 自动进样器 (WPS-3000SL)
- 检测器 (DAD,FLD,CAD,MS 等)
- 两根性质相同的色谱柱 (填料类型、尺寸、规格、保留因子、理论塔板数)

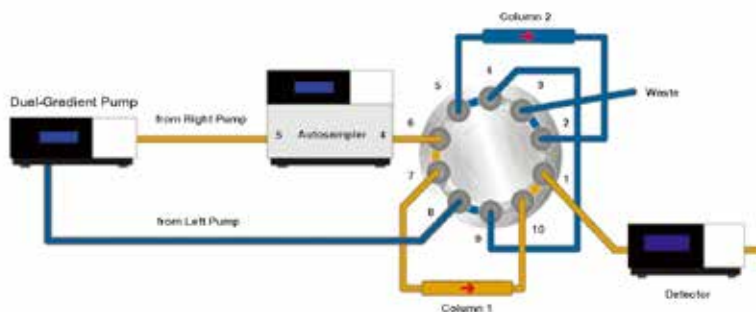


图4 色谱系统配置示意图

在按照上述示意图(图4)将各部件连接完成后,则可以利用变色龙(Chromeleon® Ver.6.8,英文版)软件向导(wizard)创建双三元串联应用程序(以分析中国药典2010版中去乙酰毛花苷注射液为例):

药典方法如下:

| | |
|-------|--|
| 色谱柱: | Acclaim 120Å C ₁₈ , 5μm 4.6×150mm, (PN:059148,SN:003534,003816) |
| 流动相: | A: 水, B: 甲醇-乙腈(14:22) |
| 检测波长: | 220nm |
| 柱温: | 30°C |
| 进样量: | 20μL |

| 梯度程序 | | |
|----------|-------------|----|
| 时间 (min) | 流速 (ml/min) | B% |
| 0 | 1.0 | 38 |
| 15 | 1.0 | 38 |
| 21 | 1.0 | 52 |
| 45 | 1.0 | 52 |
| 46 | 1.0 | 38 |
| 51 | 1.0 | 38 |

打开变色龙软件，在“浏览器 (Browser)”窗口点击“文件 - 创建新文档 - 新程序 (Program file)”，如图 5

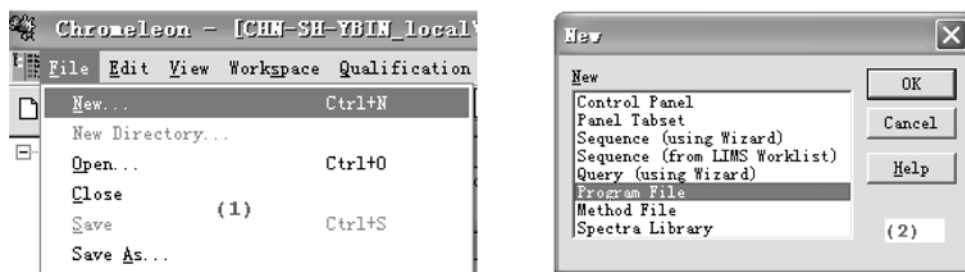


图 5 配置示意 -1

点击确认，出现如下窗口 (图 6)，选择要连接的仪器 (Timebase) 名称 (本例中选名为 DEMO 的双三元液相系统)。

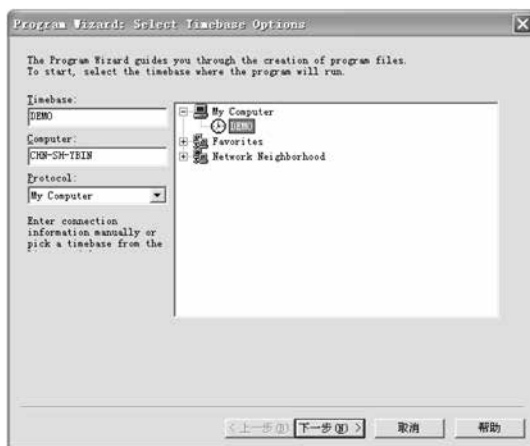


图 6 配置示意 -2

点击“下一步 (next)”，出现如下界面 (图 7)，选择“串联操作 (Program for x2 Tandem Operation)”



图 7 配置示意 -3

点击“下一步(next)”进行仪器控制方法建立（跳过柱温和进样器温度及检测器设置，同常规方法相同）。本例中主要介绍进行双三元泵和进样器设置，阀切换配置

提示：在方法创建过程中，会看到串联应用示意图（见图 8），可以关闭它而不会影响程序建立

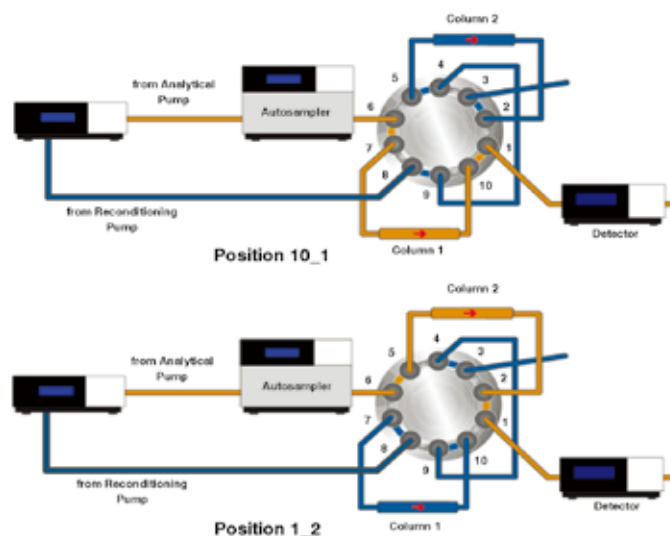


图 8 串联应用仪器连接示意图

双三元泵的设置

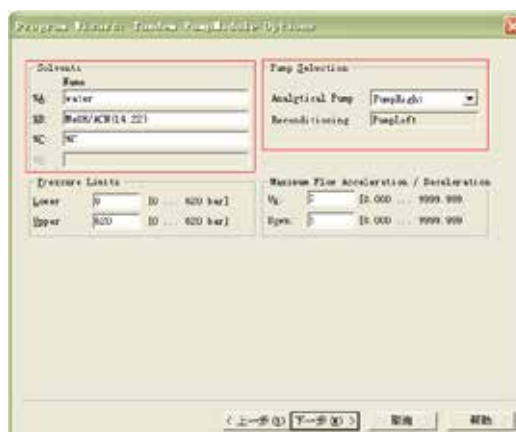


图 9 配置示意图 -4

在“溶剂 (Solvents)” 栏里输入溶剂名称（见图 9），“泵选择 (pump selection)” 栏里选择分析泵 (Analytical pump) 和平衡泵 (Reconditioning)，本例中因右泵与进样器连接，故右泵为分析泵，软件则自动将左泵设置为平衡泵。点击“下一步 (next)” 进行梯度设置

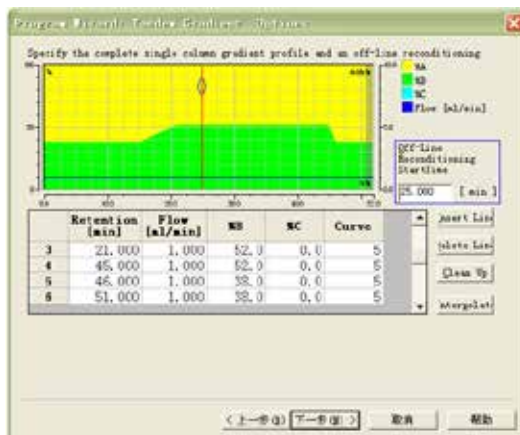


图 10 配置示意图 -5

在本例中标准方法总分析时间为 51 分钟，软件则自动将离线平衡条件设置为总分析时间的一半（25 分钟，红线所示），以使在线分析时间和离线平衡时间相等（见图 10），实际操作中应视分析情况确定切换时间以保证信息不会出现丢失（如所有样品出峰在 32 分钟，则该时间应更改（或拖拽红线）为 32 分钟，而后软件会自动调节离线清洗与平衡时间）。点击“下一步 (next)”，继续设置

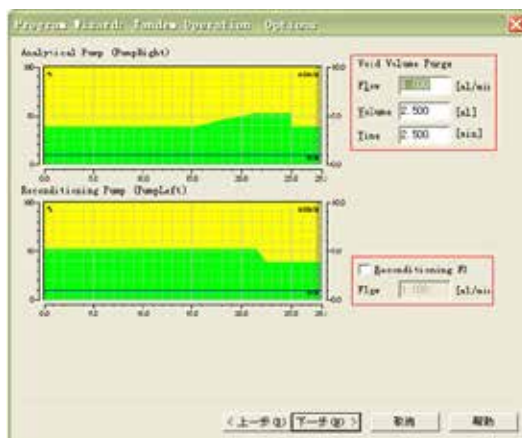


图 11 配置示意图 -6

此时软件已经自动将分析时间和离线平衡时间及梯度程序设置完整，如上图（图 11）左部。软件还自动根据仪器配置计算出进样器和柱切换阀之间的死体积 (void volume), 并根据前面设置中的流速 (flow) 计算出冲洗该段管路的时间 (time)，见图 11 红色区域, 在本例中根据仪器配置，软件自动计算出死体积为 2.5ml（不能更改）和冲洗所需时间为 2.5 分钟。可以修改冲洗进样器和主切换阀之间的连接管路 (void volume purge) 和柱平衡 (reconditioning) 的溶剂流速，以减少分析时间。继续点击“下一步 (next)” 进行设置（本例跳至进样器设置）



图 12 配置示意图 -7



图 13 配置示意图 -8

进样器旁路模式 (图 13, Bypass) 是为了使进样器进样后重新回到抽取 (Load) 样品位置, 与离线平衡色谱柱处在相同环境的冲洗流路中, 避免在下一次进样中因梯度延迟和管路清洗引起干扰。软件会自动利用流速 (flow), 样品环体积 (maximum injection volume) 和清洗系数 (Loop wash factor/Flush out factor, 见图 12) 计算所需冲洗时间而后执行旁路模式命令。需要注意, 该模式必须要在等度 (isocratic) 洗脱模式中才可以执行该命令。

继续点击“下一步 (next)”, 本例中跳至阀切换窗口, 如下图, 点击“打开阀切换设置面板 (open valve setting panel)”



图 14 配置示意图 -9

在串联应用中，仅有两根色谱柱连接在切换阀（2位10通）上，因此两根柱与切换阀的连接位置仅有1-10位和1-2位两种方式，则在如下图（图15）中，将A与B柱按照连接方式进行正确设置切换位置

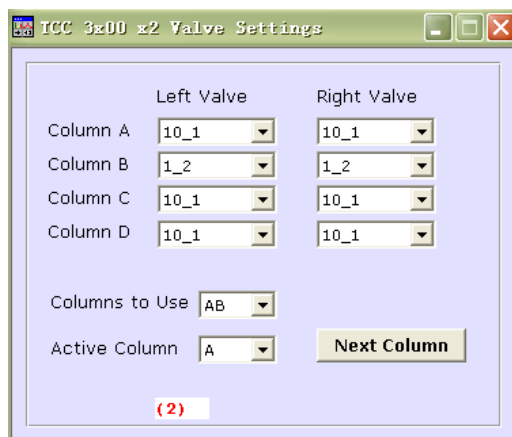


图 15 配置示意图 -10

在通过上面系列设置后，串联应用程序则设置完成并保存该程序文件。在具体分析时则可直接调用该程序文件。

在调用串联应用程序时，请先打开相应程序文件，检查串联程序设置是否有错误，如图16

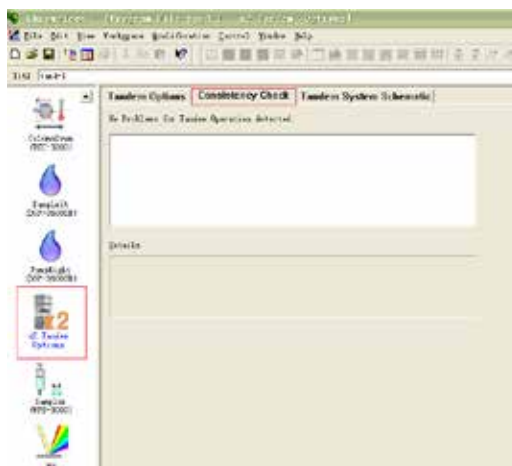


图 16 配置完整性检查

在左边导向栏里找到“串联选项 (tandem options)”并点击“完整性检查 (consistency check)”，如果程序文件有任何错误，则在该栏中会显示相关信息，并按照该信息进行修正程序。只有当程序设置正确提示无错误，该程序文件才能启动。

第二节

双三元液相串联应用实例

DGLC-20 双三元串联快速分析盐酸雷尼替丁注射液有关物质

关键词：盐酸雷尼替丁；串联；有关物质；双三元

DGLC-20 Rapid analysis of ranitidine hydrochloride injection and related substances by DGLC with tandem mode

Key words: ranitidine hydrochloride, tandem mode, related substance, DGLC

引言

在梯度分析方法中，色谱柱在梯度程序中分离样品后，还需要再经过冲洗与平衡阶段才能进行下一个样品分析。在这段时间里，进样器、柱温箱与检测器都处于闲置状态，若将该段时间用于下一个样品分析，则分析时间可节省 20% ~ 50%。运用双三元串联与柱切换技术，将右泵用于在线分析样品，左泵用于离线清洗与平衡，色谱系统共享进样器、柱温箱和检测器，两根色谱柱交替使用进行样品分析。

本文利用双三元液相串联技术快速分析盐酸雷尼替丁注射液中有关系物质，分析时间可缩短至 30% 左右。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个十通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

色谱柱：Acclaim 120Å C₁₈, 5μm 4.6 × 150mm, (PN:059148, SN:003618,003887)

柱温：35 °C

检测波长：230 nm

进样量：10μL

流动相：A：磷酸盐缓冲液（取磷酸 6.8ml 置 1900ml 水中，加 50% 氢氧化钠 8.6ml，加水至 2000ml，用磷酸或 50% 氢氧化钠调节 pH 值至 7.10 ± 0.05）- 乙腈（98:2）B：磷酸缓冲液 - 乙腈（78:22）

梯度程序：见表 1

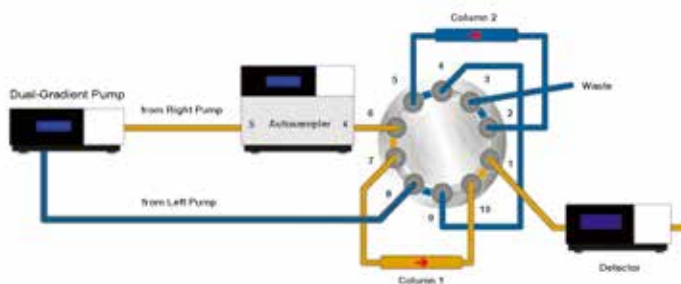


图 1 仪器连接图

表 1 梯度程序

| 左泵 (离线清洗与平衡) | | | 右泵 (分析) | | |
|--------------|-------------|-----|----------|-------------|-----|
| 时间 (min) | 流速 (ml/min) | B% | 时间 (min) | 流速 (ml/min) | B% |
| 0 | 1.0 | 100 | 0 | 1.5 | 0 |
| 8 | 1.0 | 100 | 10 | 1.5 | 100 |
| 9 | 1.5 | 0 | 12 | 1.5 | 100 |
| 13.0 | 1.5 | 0 | 13 | 1.5 | 0 |

样品前处理方法

取本品适量,用流动相 A 稀释成每 1ml 约含雷尼替丁 1mg 的溶液,做为供试品溶液。精密量取适量供试品溶液,用流动相 A 定量稀释制成每 1ml 约含雷尼替丁 10 μ g 的溶液,做为对照品溶液。

结果和讨论

对照品和样品色谱图

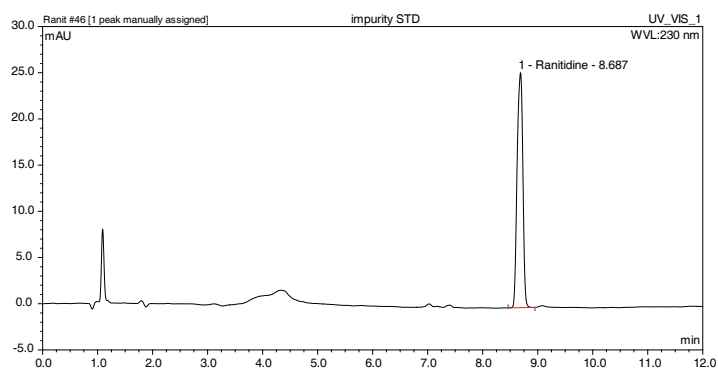


图 2 对照品溶液色谱图

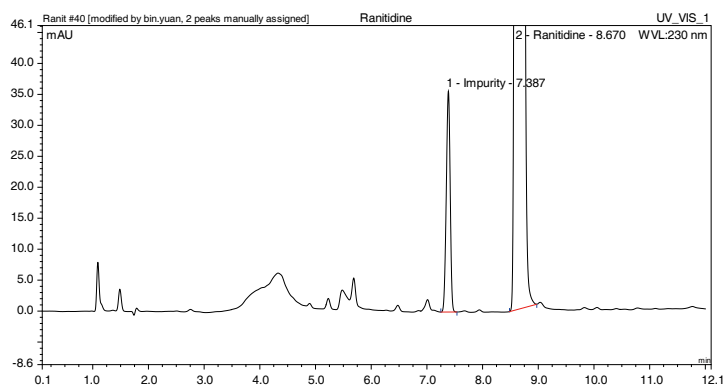


图 3 样品溶液色谱图

保留时间与峰面积重复性

表 2 杂质重复性测定结果

| Sample No | Sample Name | Ret.Time(min) | Area(mAU*min) |
|--------------|-------------|---------------|---------------|
| 40 | Ranitidine | 7.387 | 2.8966 |
| 41 | Ranitidine | 7.383 | 2.8756 |
| 42 | Ranitidine | 7.393 | 2.8732 |
| 43 | Ranitidine | 7.373 | 2.869 |
| 44 | Ranitidine | 7.39 | 2.8733 |
| 45 | Ranitidine | 7.373 | 2.8568 |
| Average: | | 7.383 | 2.8696 |
| Rel.Std.Dev: | | 0.13% | 0.26% |

表 3 雷尼替丁重复性测定结果

| Sample No | Sample Name | Ret.Time(min) | Area(mAU*min) |
|--------------|-------------|---------------|---------------|
| 40 | Ranitidine | 8.67 | 298.4788 |
| 41 | Ranitidine | 8.687 | 292.3304 |
| 42 | Ranitidine | 8.673 | 297.1056 |
| 43 | Ranitidine | 8.68 | 291.8824 |
| 44 | Ranitidine | 8.673 | 298.1597 |
| 45 | Ranitidine | 8.68 | 291.4154 |
| Average: | | 8.677 | 294.8954 |
| Rel.Std.Dev: | | 0.07% | 1.14% |

结论

本文运用双三元串联分析盐酸雷尼替丁注射液中有物质，通过柱切换技术达到高通量快速分析，在线样品分析时间为 13 分钟，较药典方法分析时间节省 35%。

在双三元串联应用中，应最大程度使待测成分在两根色谱柱上具有相同保留行为，同时应满足系统适应性要求，以利于定性和定量分析。

在有关物质分析应用中，应先按照药典方法进行方法确认（重现性），在此过程中可以筛选适合的色谱柱，同时能够确定样品中的杂质信息，有助于设置系统切换时间。由于软件自动设置切换时间时，可能会导致部分杂质信息丢失，因此应基于前述信息中通过修改软件设置改正系统切换时间以保证杂质信息的完整。

在系统切换之前，应保证进样器、柱切换阀和色谱柱之间的管路系统已清洗干净（可适当提高流速）且系统回复到分析流动相初始状态，以避免溶剂引起干扰。

DGLC-21 双三元串联快速分析去乙酰毛花苷注射液有关物质

关键词：串联；去乙酰毛花苷；有关物质；双三元

DGLC-21 Rapid analysis of related substances in Deslanoside injection by DGLC with tandem mode

Key words: tandem mode, Deslanoside injection, related substances, DGLC

引言

在梯度分析方法中，色谱柱在梯度程序中分离样品后，还需要再经过冲洗与平衡阶段才能进行下一个样品分析。在这段时间里，进样器、柱温箱与检测器都处于闲置状态，若将该段时间用于下一个样品分析，则分析时间可节省 20% ~ 50%。运用双三元串联与柱切换技术，将右泵用于在线分析样品，左泵用于离线清洗与平衡，色谱系统共享进样器、柱温箱和检测器，两根色谱柱交替使用进行样品分析。

本文利用双三元液相串联技术快速分析去乙酰毛花苷注射液中有有关物质，分析时间可节省约 50%。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个十通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

色谱柱：Acclaim 120Å C₁₈, 5μm 4.6 × 150mm (PN:059148, SN:003534,003816)

柱温：30 ℃

检测波长：220 nm

进样量：20μL

流动相：A：水，B：甲醇 - 乙腈（14:22）

梯度程序：见表 1

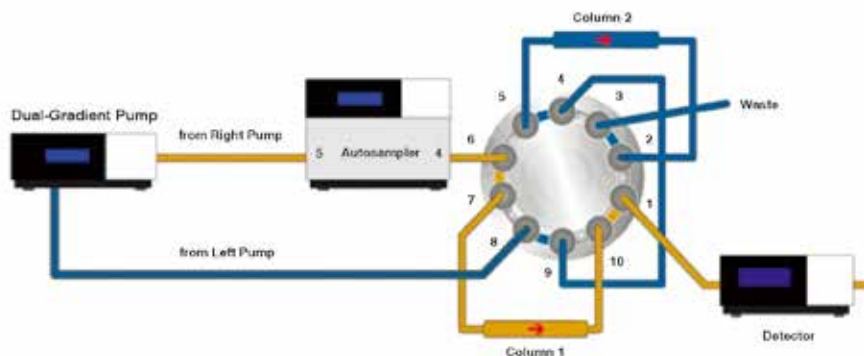


图 1 仪器连接图

表 1 梯度程序

| 左泵 (离线清洗与平衡) | | | 右泵 (分析) | | |
|--------------|-------------|----|----------|-------------|----|
| 时间 (min) | 流速 (ml/min) | B% | 时间 (min) | 流速 (ml/min) | B% |
| 0 | 1.0 | 52 | 0 | 1.0 | 38 |
| 18 | 1.0 | 52 | 15 | 1.0 | 38 |
| 19 | 1.0 | 38 | 21 | 1.0 | 52 |
| 25 | 1.0 | 38 | 25 | 1.0 | 52 |

样品前处理方法

取本品做为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1ml 置 100ml 量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 制成每 1ml 约含去乙酰毛花苷 2.0 μ g 的溶液, 做为对照品溶液。

结果和讨论

对照品和样品色谱图

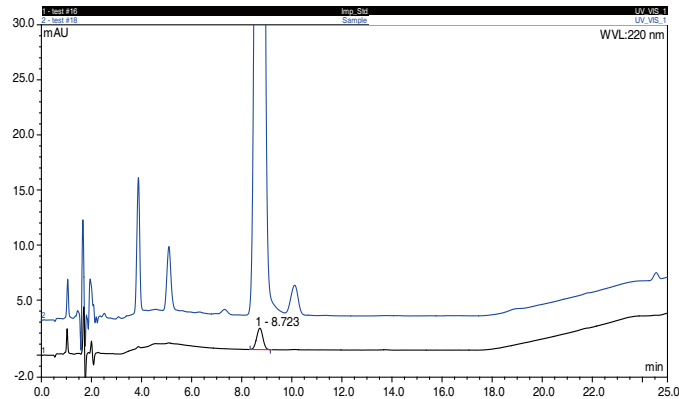


图 2 对照品与样品比较谱图

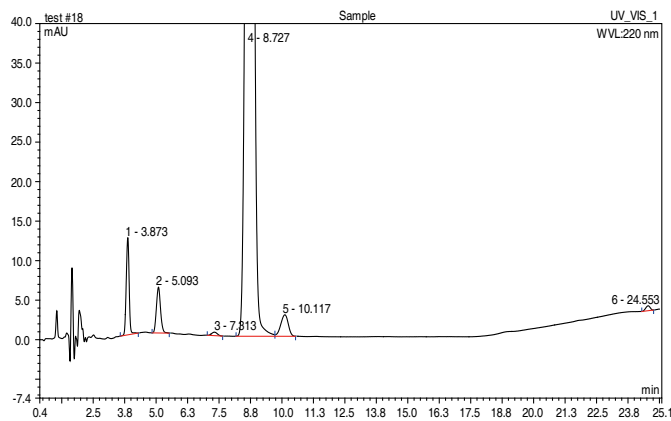


图 3 样品溶液色谱图

表 2 样品测定结果

| No. | Peak name | Ret.Time (min) | Area (mAU*min) | Height (mAU) | Rel.Area (%) | Resolution |
|--------|-----------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------|
| 1 | n.a. | 3.873 | 1.6466 | 12.297 | 2.81 | 4.79 |
| 2 | n.a. | 5.093 | 1.1044 | 5.796 | 1.89 | 6.16 |
| 3 | n.a. | 7.313 | 0.1130 | 0.440 | 0.19 | 3.04 |
| 4 | 去乙酰毛花苷 | 8.727 | 54.6012 | 171.834 | 93.28 | 2.62 |
| 5 | n.a. | 10.117 | 0.9429 | 2.720 | 1.61 | 32.10 |
| 6 | n.a. | 24.553 | 0.1292 | 0.625 | 0.22 | n.a. |
| Total: | | | 58.5373 | 193.713 | 100 | |

去乙酰毛花苷保留时间与峰面积重复性

表 3 去乙酰毛花苷保留时间与峰面积重复性

| Sample No. | Sample Name | Ret.Time(min) | Area(mAU*min) |
|--------------|-------------|---------------|---------------|
| 17 | Sample | 8.640 | 54.7141 |
| 18 | Sample | 8.727 | 54.6012 |
| 19 | Sample | 8.640 | 54.556 |
| 20 | Sample | 8.737 | 54.5700 |
| 21 | Sample | 8.637 | 54.4501 |
| 22 | Sample | 8.733 | 54.5637 |
| Average: | | 8.686 | 54.5758 |
| Rel.Std.Dev: | | 0.59% | 0.16% |

串联分析与药典方法比较

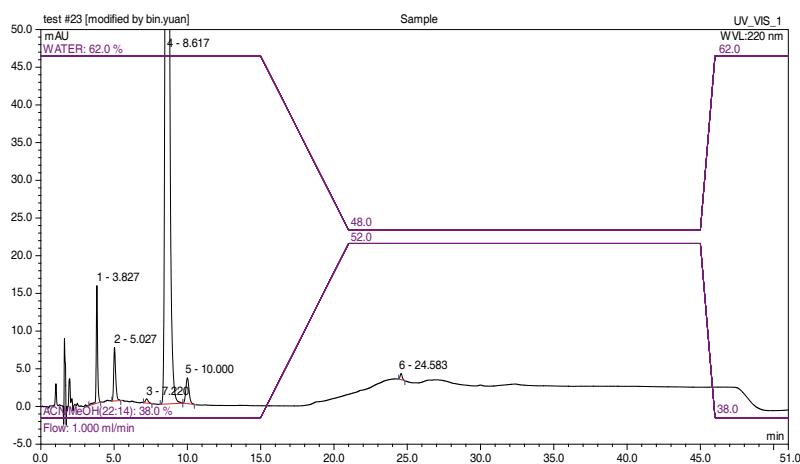


图 4 药典方法

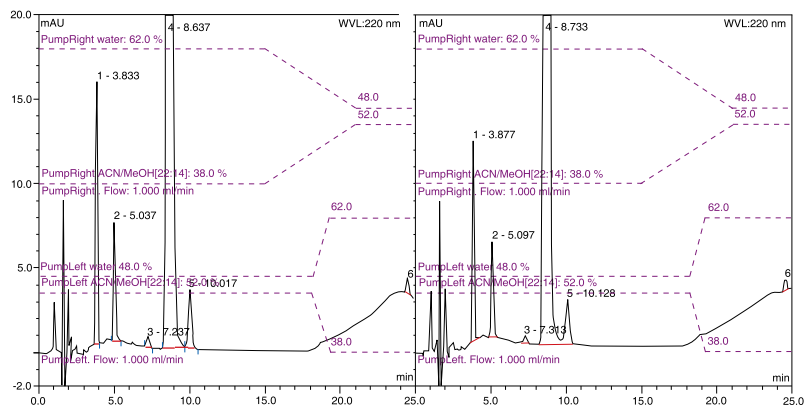


图 5 串联分析

结论

本文运用双三元串联分析去乙酰毛花苷注射液中有关物质，通过柱切换技术达到高通量快速分析，在线样品分析时间为 26 分钟，较药典方法分析时间节省约 49%。

在双三元串联应用中，应最大程度使待测成分在两根色谱柱上具有相同保留行为，同时应满足系统适应性要求，以利于定性和定量分析。

在有关物质分析应用中，应先按照药典方法进行方法确认（重现性），在此过程中可以筛选适合的色谱柱，同时能够确定样品中的杂质信息，有助于设置系统切换时间。由于软件自动设置切换时间时，可能会导致部分杂质信息丢失，因此应基于前述信息中通过修改软件设置改正系统切换时间以保证杂质信息的完整。

在系统切换之前，应保证进样器、柱切换阀和色谱柱之间的管路系统已清洗干净（可适当提高流速）且系统回复到分析流动相初始状态，以避免溶剂引起干扰。

在程序文件中设置进样器旁路（InjectValveToLoad）模式使进样器在进样完成后处于抽取样品状态，与离线平衡色谱柱处于相同流动相的环境中，从而避免在下次进样中因梯度变化造成干扰。

在程序文件中应始终保持命令（NextColumn）处于程序中的最后，即始终处于 End 的前一行，才能在下次进样时进行色谱柱切换。

第四章 双三元并联应用

第一节 双三元并联应用指南

在生物、医药、化工、食品、科研机构等行业的实验室，分析人员每天都会面临着纷繁复杂的测试工作。无论是快速的分析测试还是高通量样品筛选工作，U3000 智能液相色谱可以为分析人员提供完美的整体解决方案。

当 U3000 液相色谱具有如下配置：

- 双三元梯度泵 (DGP-3600 SD/RS)
- 自动进样器 (WPS-3000TSL)
- 柱温箱 (TCC-3X00) ，配置有 2 位 -6 通切换阀 (2 position-6 ports valve)
- 两个检测器 (DAD 和 FLD/RI/MS)

分析人员则可以利用并联应用方案来完成在同一台液相色谱上完成两个不同方法的分析测试任务，而不再需要两台独立的液相色谱来完成两倍量的样品分析工作，如下图

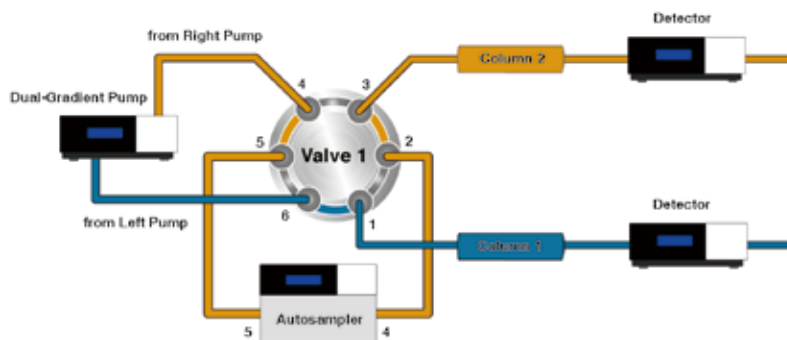


图 1 色谱系统连接示意图

其中色谱柱 1 所处的系统为系统 A, 色谱柱 2 所处的系统为系统 B, 两套系统独立分析各自的样品，从而提高工作效率并降低成本。

利用变色龙 (Chromeleon®) 色谱管理软件可以方便地将两个色谱图系统独立设置而互不影响。下面将介绍并联应用的设置过程 (Chromeleon Ver.6.8 SR11)

首先，打开变色龙软件中的服务器配置模块 (Server Configuration)，如图 2



图 2 配置步骤 -1

启动服务器配置模块后，出现如下 (图 3) 界面，点击 “编辑 (Edit)” 进行色谱系统配置。本例中将两套独立色谱系统命名为 Demo-1 和 Demo-2。在 “编辑” 栏中选择 “添加色谱系统 (Add Timebase)” ，

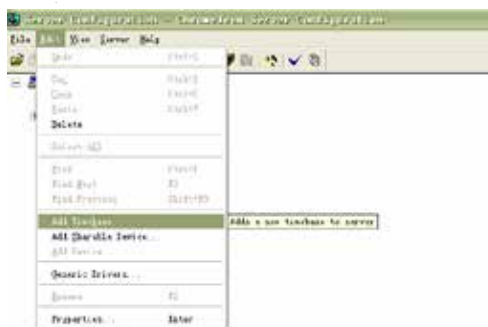


图 3 配置步骤 -2

在出现的对话框中，输入色谱系统名称（本例中分别为 Demo-1 和 Demo-2），如下图（图 4）



图 4 配置步骤 -3

可以看到两套独立的色谱系统已经建立完成。接下来在两套系统里分别添加相应的色谱模块（泵、进样器、柱温箱、检测器等）。在并联应用中，两套色谱系统共享同一个自动进样器和柱温箱，泵和检测器则各自分配给相应的系统，因此在配置过程中要注意各个模块的分配情况。如下图，先添加泵模块，本例中将双三元中的左泵配置给系统 1(Demo-1)，右泵配置给系统 2(Demo-2)



图 5 配置步骤 -4

选择 U3000 中的双三元泵（DGP-3600SD/RS/BM）模块，并点击“确认(OK)”

注意：在此配置过程中，仅能选择泵的类型（本例中的 DGP-3600 SD），而无法单独选择双三元中的左泵或右泵模块。

在配置窗口中，可以看到系统 1(Demo-1) 里有泵模块的标记，表示泵模块已经配置到指定的色谱系统中，如下图

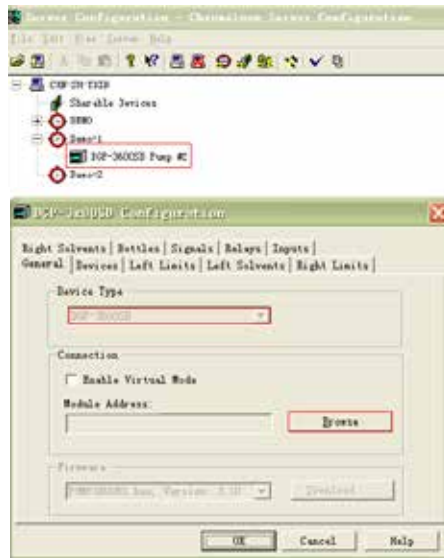


图 6 配置步骤 -5

在配置窗口里点击“浏览 (Browse)”，软件自动搜索泵的型号与序列号并分传输到模块地址栏 (Module Address) 中（本例中为虚拟模式 (virtual)）。此时，泵模块已成功添加至系统 1(Demo-1)。然后再点击配置窗口中的设备 (Devices) 选项，如下图

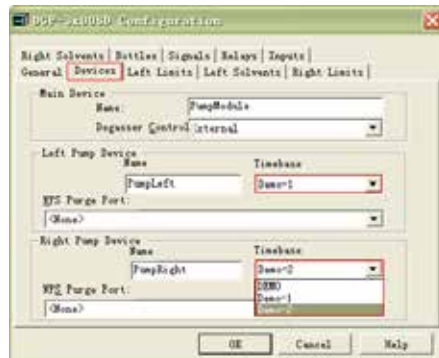


图 7 配置步骤 -6

在仪器系统 (Timebase) 下拉菜单中将左泵与右泵分别配置到不同系统（本例中将左泵配置到系统 1，右泵配置给系统 2），点击确认 (OK) 并关闭配置窗口，则软件自动将模块添加到相应系统中，如下图

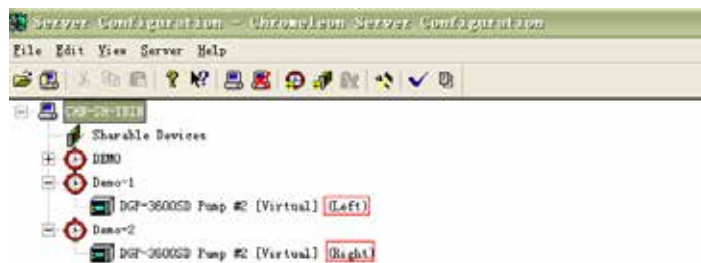


图 8 配置步骤 -7

至此，泵模块在两个系统中已成功设置。

接下来继续添加进样器模块。选择其中任意系统，点击“编辑(Edit)”工具栏（或右键单击指定色谱系统），在下拉菜单中选择“添加模块(Add Device)”，如下图所示（本例中选择系统1）

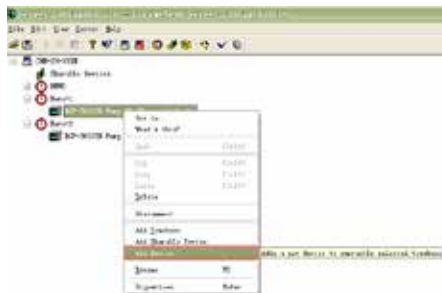


图 9 配置步骤 -8

在出现的窗口中选择“U3000”项下的“WPS-3000RS”并点击确认，如下图



图 10 配置步骤 -9

进样器模块就配置到该系统中，如下图

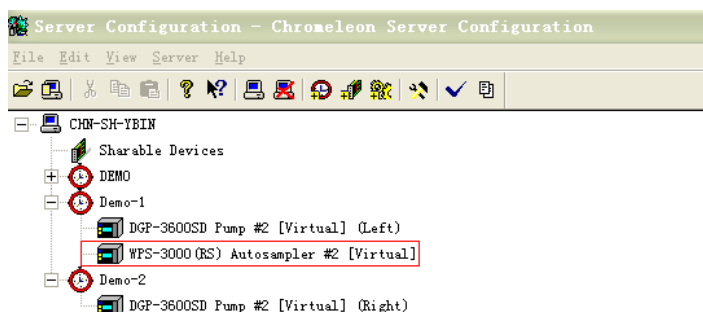


图 11 配置步骤 -10

可以看到系统 1(Demo-1) 中有进样器模块的相关信息。在出现的 General 窗口里，点击“浏览(Browse)”，让软件自动配置模块型号和序列号并传输至地址栏 (Module) 里（本例中选择虚拟模式，无序列号），如下图



图 12 配置步骤 -11

点击“下一步(next step)”，会出现如下窗口，提示根据仪器信息选择相应模块型号（本例中选择“WPS-3000TSL”，并点击确认（OK），如下图（图 13）

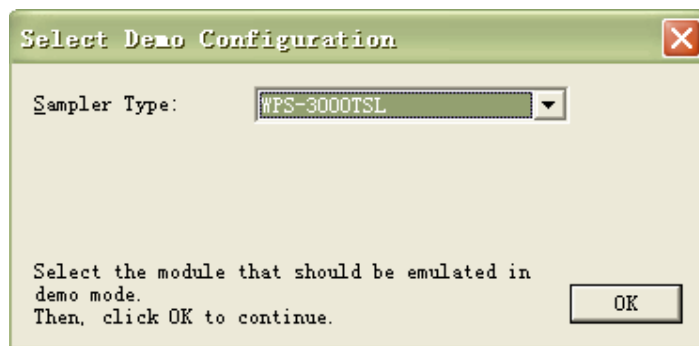


图 13 配置步骤 -12

在确认型号后，会出现如下对话框，



图 14 配置步骤 -13

该信息提示需要共用自动进样器的色谱系统（本例中为 Demo-1 和 Demo-2）。设置完成后，继续点击“下一步(next step)”设置其他参数，直至最后完成，出现如下窗口

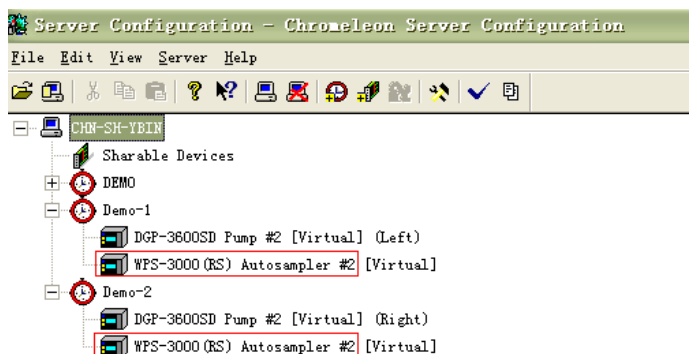


图 15 配置步骤 -14

可以看到进样器已设置为两套系统共享状态。

接下来，按照前述步骤继续添加柱温箱和检测器模块。

在并联应用中，两根色谱柱安装在同一个柱温箱中，通过同一个柱切换阀与相应的色谱系统相连接，因此在柱温箱配置过程中，应注意切换阀的类型和色谱柱所在的系统名称，如下图所示



图 16 配置步骤 -15

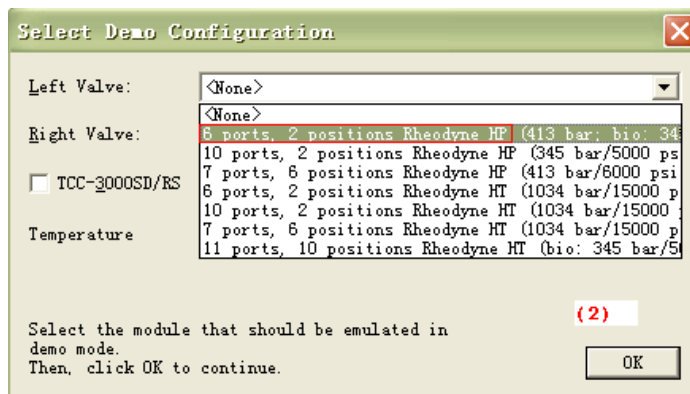


图 17 配置步骤 -16

在 (2) 中，按照实际仪器配置，将左（或右）切换阀配置成 2 位 -6 通切换阀。



图 18 配置步骤 -17

在(3)中, 将两根色谱柱分配给相应的仪器系统 (本例中将柱 A 配置给系统 1, 柱 B 配置给系统 2), 并点击“完成”, 结果如下图



图 19 配置步骤 -18

从图中可以看到柱温箱已经设置为两套系统共享, 且色谱柱已经分配给指定的色谱系统。

接下来, 仿照前述步骤为两套系统添加相应检测器。在并联应用中, 每个色谱系统与相应的检测器连接, 无法共享, 因此, 在配置过程中与常规配置相同。配置完成后, 结果如下图 (本例中系统 1 配置 DAD 检测器, 系统 2 配置 FLD 检测器)

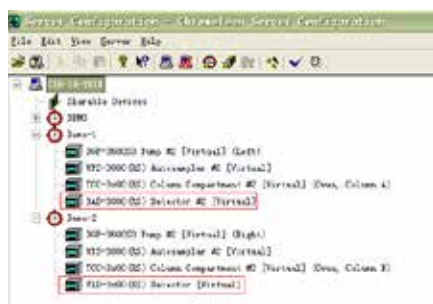


图 20 配置步骤 -19

从图中可以看出, 两套色谱系统已经配置好相应的检测器。

至此, 并联应用的仪器配置已经完成。点击菜单栏中“文件 (File)”项下“保存安装选项”, 将配置文件保存至变色龙软件中并推出服务器配置模块。如下图所示

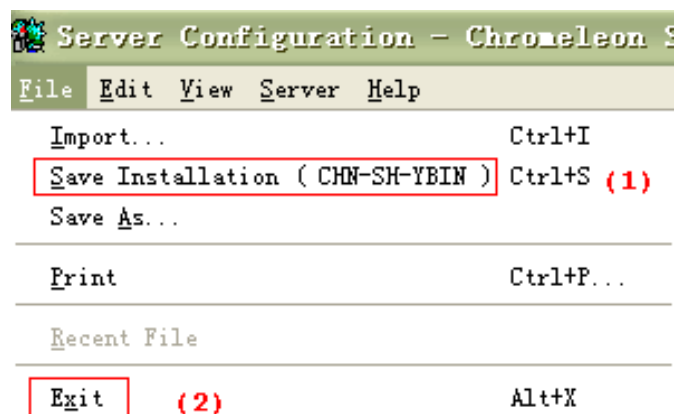


图 21 配置步骤 -20

打开变色龙色谱管理模块，在“浏览器 (Browser)”左边导引栏中可以看到两套色谱系统 (Demo-1 和 Demo-2) 已经添加至数据源 (Datasource) 里。此时分析人员可以利用该两套色谱运用并联分析不同样品。



图 22 配置步骤 -21

第二节 双三元并联应用实例

DGLC-22 并联色谱同时分析盐酸去氯羟嗪和格列吡嗪

关键词：盐酸去氯羟嗪；格列吡嗪；并联液相色谱

DGLC-22 Simultaneously determination of decloxyzine hydrochloride and glipizide using Parallel-HPLC

Key words: decloxyzine hydrochloride, glipizide, parallel-HPLC

引言

双三元液相具有两套独立的泵和流路，因此在应用两个检测器时可以作为两套系统来使用，这两套系统共用自动进样器和柱温箱，可以实现一套液相变成两套液相应用。

本文利用双三元液相并联技术同时分析盐酸去氯羟嗪和格列吡嗪，把 DGP3600 配置成两套并联系统，Timebase 1 为 BL1，使用 DGP 3600 右泵，色谱柱为 1 号柱，自动进样器设成共享，分析化合物为盐酸去氯羟嗪；Timebase 2 为 BL2，使用 DGP 3600 左泵，色谱柱为 2 号柱，自动进样器设成共享，分析化合物为格列吡嗪。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1，色谱条件见表 1、2。

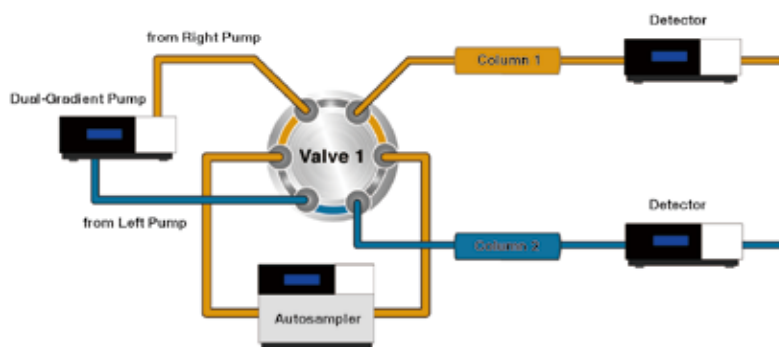


图 1 仪器连接图

表 1 盐酸去氯羟嗪测定条件

| 盐酸去氯羟嗪色谱条件 | |
|------------|--|
| 色谱柱: | Acclaim 120 C ₁₈ , 5μm 4.6×150 mm |
| 流动相: | 甲醇 - 水 - 三乙胺 (用磷酸调节 pH 至 3.0) =(42:58:0.5) |
| 流速: | 1.00 ml/min |
| 柱温: | 30 °C |
| 进样量: | 10 μL |
| 检测波长: | 225 nm |

表 2 格列吡嗪测定条件

| 格列吡嗪色谱条件 | |
|----------|---|
| 色谱柱: | Acclaim 120 C ₁₈ , 5μm 4.6×150 mm |
| 流动相: | 0.1mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用 2.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.00±0.05) - 甲醇 =(55:45) |
| 流速: | 1.5 ml/min |
| 柱温: | 30 °C |
| 进样量: | 20 μL |
| 检测波长: | 225 nm |

样品前处理方法

格列吡嗪: 取本品约 25 mg, 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇适量, 振荡使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇 20 ml, 用 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

盐酸去氯羟嗪: 取本品, 加流动相溶解并稀释制成每 1 ml 中含 0.8 mg 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取适量, 用流动相定量稀释成每 1 ml 中含 8 μg 的溶液, 作为对照溶液。

结果和讨论

参照向导建立程序文件及分析结果

盐酸去氯羟嗪程序文件及谱图

| | | |
|--------|---|----------------|
| | ValveRight = | 6_1 |
| 0.000 | Autozero | |
| | WashSampleLoop | Volume=300.000 |
| Wait | ColumnOven.Ready and Sampler.Ready and PumpRight.Ready and PumpModule.Ready | |
| | Inject | |
| | ColumnOven_Temp.AcqOn | |
| | PumpRight_Pressure.AcqOn | |
| | UV_VIS_1.AcqOn | |
| 1.209 | ValveRight = | 1_2 |
| | ReleaseExclusiveAccess | |
| 30.000 | ColumnOven_Temp.AcqOff | |
| | PumpRight_Pressure.AcqOff | |
| | UV_VIS_1.AcqOff | |
| | End | |

注: 1) Inject wash 设置为 both, 防止交叉污染。
2) 增加了 WashsampleLoop, 清洗了定量环。

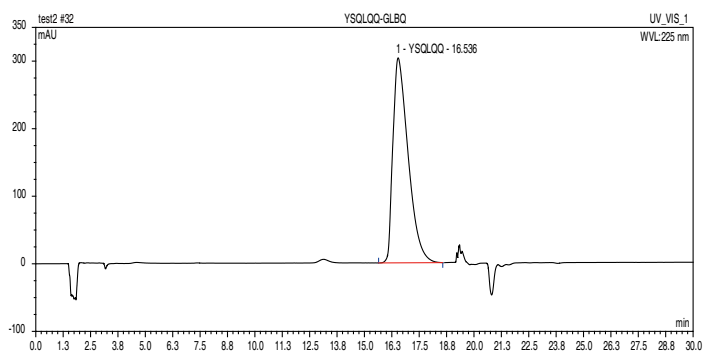


图2 盐酸去氯羟嗪分析谱图

格列吡嗪程序文件及谱图

```

ValveRight = 1_2
0.0 Autozero
WashSampleLoop Volume=300.000
Wait UV.Ready and
ColumnOven.Ready and Sampler.Ready and PumpLeft.Ready and
PumpModule.Ready
Inject
UV_VIS_1.AcqOn
3DFIELD.AcqOn
1.209 ValveRight = 6_1
ReleaseExclusiveAccess
30.000 UV_VIS_1.AcqOff
3DFIELD.AcqOff
End

```

注：1) Inject wash 设置为 both，防止交叉污染。

2) 增加了 WashsampleLoop, 清洗了定量环。

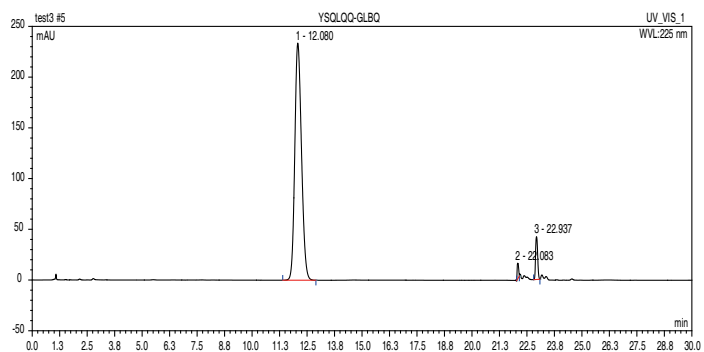


图3 格列吡嗪分析结果

结果分析：从图 2 和图 3 可以看出，谱图上均有杂峰出现，通过与普通液相色谱分析的谱图结果比较，确认除主成分峰外，其余峰均为并联系统分析时产生的系统峰。因此，决定对程序文件进行修改。

修改程序文件及谱图

盐酸去氯羟嗪程序文件修改后谱图

```

ValveRight = 6_1
-1.500 WashSampleLoop Volume=150.000
-1.0 InjectValveToInject
0.000 Autozero
Wait ColumnOven.Ready
and Sampler.Ready and PumpRight.Ready and PumpModule.Ready
Inject
ColumnOven_Temp.AcqOn
PumpRight_Pressure.AcqOn
UV_VIS_1.AcqOn
0.30 InjectValveToLoad
1.20 ValveRight = 1_2
ReleaseExclusiveAccess

30.000 ColumnOven_Temp.AcqOff
PumpRight_Pressure.AcqOff
UV_VIS_1.AcqOff
End

```

注：1) 在此前的基础上，增加了 InjectValveToInject 命令，置换 sampleloop 中的溶液。
2) 进完样后（0.3min 后），进样阀切回到 Load 状态。清洗 sampleloop。

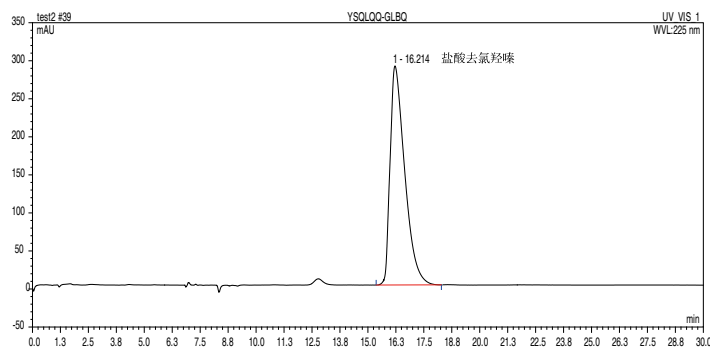


图 4 盐酸去氯羟嗪分析谱图

格列吡嗪程序文件修改及谱图

| | | |
|--------|--|------------------|
| | ValveRight = | 1_2 |
| -1.500 | WashSampleLoop | Volume=150.000 |
| -1.0 | InjectValveToInject | |
| 0.000 | Autozero | |
| | Wait | ColumnOven.Ready |
| | and Sampler.Ready and PumpRight.Ready and PumpModule.Ready | |
| | Inject | |
| | ColumnOven_Temp.AcqOn | |
| | PumpRight_Pressure.AcqOn | |
| | UV_VIS_1.AcqOn | |
| 0.30 | InjectValveToLoad | |
| 1.209 | ValveRight = | 6_1 |
| | ReleaseExclusiveAccess | |
| 30.000 | ColumnOven_Temp.AcqOff | |
| | PumpRight_Pressure.AcqOff | |
| | UV_VIS_1.AcqOff | |
| | End | |

注：1) 在此前的基础上，增加了 InjectValveToInject，命令，置换 sampleloop 中的溶液。

2) 进完样后（0.3min 后），进样阀切回到 Load 状态。清洗 sampleloop。

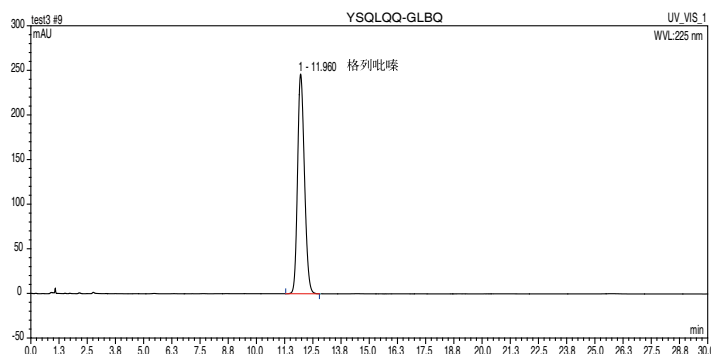


图 5 格列吡嗪分析谱图

结果分析：从图 4 和图 5 可以看出，基本消除了进样等带来系统峰问题。

结论

从以上两根不同的色谱柱分析谱图可以看出，并联色谱在使用同样或相近的色谱条件，如流动相均为反相，有机相比例相差较小，柱温相同，检测波长处于同一区域（如同属于末端吸收或均为紫外吸收区），获得了非常好的分析结果。

DGLC-23 并联液相色谱测定核苷酸、黄酮样品

关键词：核苷酸； 黄酮； 并联液相色谱

DGLC-23 Simultaneously determination of nucleotide and flavone using Parallel-HPLC

Key words: nucleotide, flavones, parallel HPLC

引言

双三元液相具有两套独立的泵和流路，因此在应用两个检测器时可以作为两套系统来使用，这两套系统共用自动进样器和柱温箱，可以实现一套液相变成两套液相应用。

本文利用双三元液相并联技术同时分析核苷酸和黄酮，把 DGP3600 配置成两套并联系统，Timebase 1 为 BL1，使用 DGP 3600 右泵，色谱柱为 1 号柱；Timebase 2 为 BL2，使用 DGP 3600 左泵，色谱柱为 2 号柱，自动进样器设成共享，从而实现同时对两类成分的同时分析。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；DAD 检测器。连接图见图 1，色谱条件见表 1。

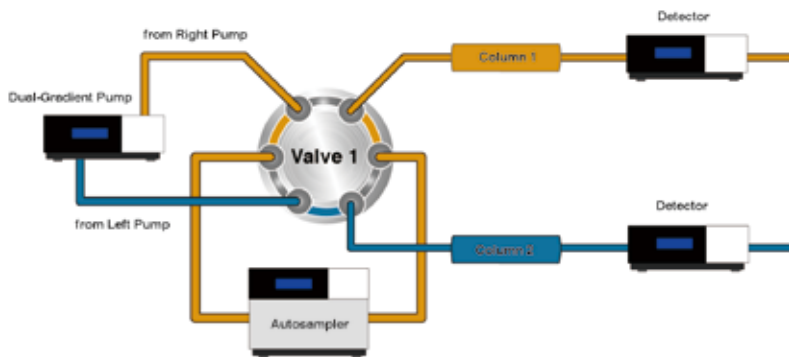


图 1 仪器连接图

表 1 色谱测定条件

| | | | |
|----------------|---|---------------------|------------------------------|
| 合成核苷酸样品 色谱柱 | XBridge OST C ₁₈ , 5 μ m 50 \times 4.6mm | | |
| 流动相 | 时间 (min) | 甲醇 (%) | 六氟异丙醇 (三乙胺) / 甲醇 =9:1 (%) |
| | 0 ~ 12 | 1 \rightarrow 2 | 99 \rightarrow 98 |
| 流速 | 0.4mL/min | | |
| 检测器条件 | 260nm | | |
| 进样量 | 1 μ L | | |
| 柱温 | 60 $^{\circ}$ C | | |
| 黄酮样品色谱柱 | Symmetry C ₁₈ , 3.5 μ m 150 \times 4.6mm | | |
| 流动相 | 时间 (min) | 乙腈 (%) | 水 (0.02% 三氟乙酸) (%) |
| | 0 ~ 15 | 20 \rightarrow 50 | 80 \rightarrow 50 |
| 流速 | 0.8mL/min | | |
| 检测器条件 | 338nm | | |
| 进样量 | 2 μ L | | |
| 柱温 | 室温 | | |

样品前处理方法

取客户已配制好的样品，直接注入液相色谱仪进行测定。

结果和讨论

黄酮测定谱图

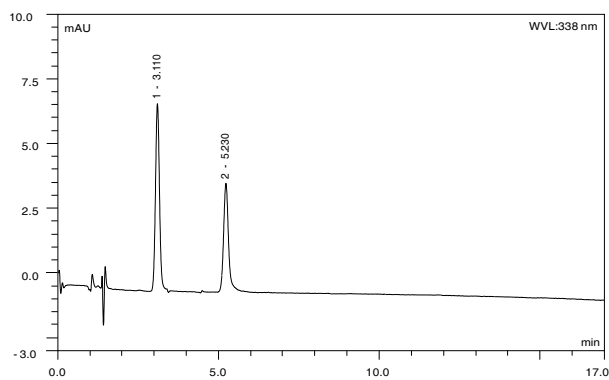


图 2 黄酮混合物测定谱图

合成核苷酸纯品和粗品对照图谱

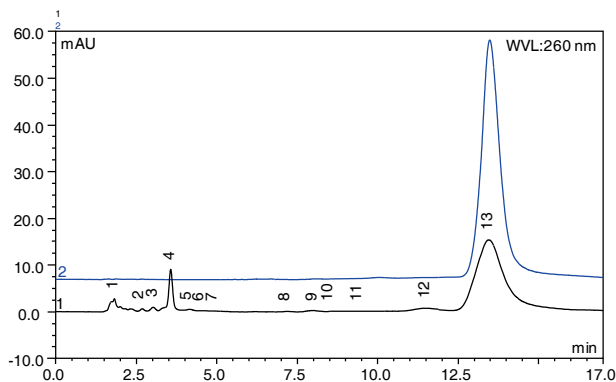


图 3 合成核苷酸纯品和粗品对照图谱
(1 为粗品, 2 为纯品)

测定结果

黄酮样品中两个主峰分离分析情况

表 2 黄酮样品中两个主峰信息

| Peak No. | Ret.Time min | Area mAU*min | Height mAU | Asym. EP | Resol. EP | Plates EP |
|----------|--------------|--------------|------------|----------|-----------|-----------|
| 1 | 3.110 | 1.0187 | 7.204 | 1.04 | 8.76 | 3114 |
| 2 | 5.230 | 0.7416 | 4.192 | 1.22 | n.a. | 6348 |

核苷酸样品主峰分离分析情况

表 3 核苷酸粗品的峰信息

| Peak No. | Ret.Time min | Area mAU*min | Height mAU |
|----------|--------------|--------------|------------|
| 1 | 1.814 | 0.9560 | 2.829 |
| 2 | 2.684 | 0.0790 | 0.558 |
| 3 | 3.027 | 0.1460 | 0.850 |
| 4 | 3.570 | 1.4092 | 8.886 |
| 5 | 4.164 | 0.0865 | 0.322 |
| 6 | 4.634 | 0.0049 | 0.035 |
| 7 | 4.884 | 0.0028 | 0.028 |
| 8 | 7.144 | 0.0247 | 0.072 |
| 9 | 7.990 | 0.0650 | 0.161 |
| 10 | 8.480 | 0.0012 | 0.019 |
| 11 | 9.380 | 0.0185 | 0.052 |
| 12 | 11.500 | 0.3541 | 0.462 |
| 13 目标核苷酸 | 13.450 | 15.4377 | 14.979 |

结论

本实验采用赛默飞 U3000 系列双三元液相色谱并联系统及 DAD 检测器对用户提供的黄酮样品和核苷酸样品进行测定, 黄酮样品各峰分离良好, 核苷酸样品主峰与其它杂峰分离良好, 达到用户对于分离度以及共享进样器同时进行两种不同实验的要求。

DGLC-24 并联液相色谱 - 紫外测定饮用水中的爆炸物

关键词：爆炸物；饮用水；并联色谱

DGLC-24 Determination of Explosive Compounds in Drinking Water using Parallel-HPLC with UV Detection

Key words: Explosive Compounds, Drinking Water, Parallel-HPLC

引言

环境中爆炸物材料和它们的降解产物的检测越来越得到人们的重视，因为它们自身存在的毒性、难以降解，而且爆炸物的存在涉及到国家安全。

传统上气相色谱用来对爆炸物进行检测和定量，然而一些爆炸物具有热不稳定性和不挥发性，用气相测定就可能不准确的结果。HPLC-UV 由于没有这些局限性，这时可以作为检测的理想选择。美国 EPA 规定了 14 种爆炸物及其相关物质的高效液相色谱 - 紫外检测方法（EPA Method 8330），要求使用紫外检测器来测定 14 种前体爆炸物及相关底物¹（图 1）。这个方法建议使用 1 根 C₁₈ 色谱柱来进行分离，第 2 根色谱柱来进行结果确认，程序较为繁琐。

Acclaim Explosives E1 和 E2 色谱柱用同样的色谱条件在更短的分析时间内可以实现 14 种化合物的基线分离（除了流动相组成不同）²，本文介绍了使用这两根色谱柱和 EPA 8330 方法测定爆炸物的结果。

本实验使用双三元并联模式，7 个其他化合物同时进行检测，其中 2 个用 EPA 8330 也可进行测定，并加入了 1,2-二硝基苯作为内标物。

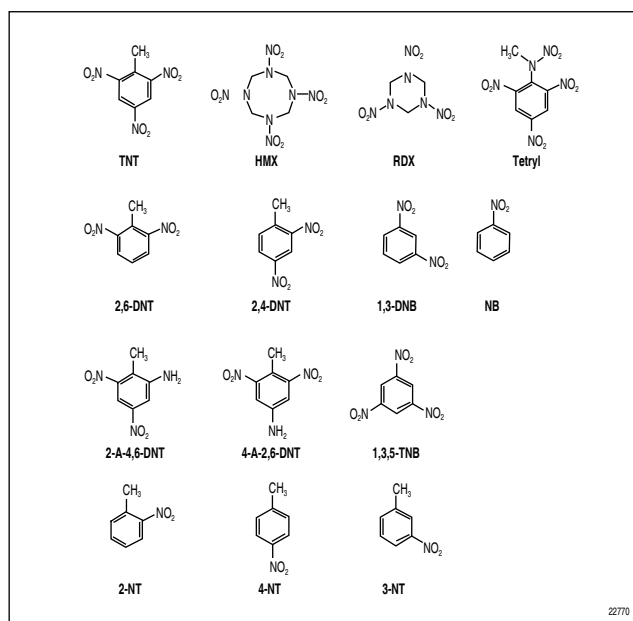


图 1 14 种前体爆炸物和相关底物

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。

Column: Acclaim Explosives E1, 5 μ 4.6 × 250 mm (primary column)

Acclaim Explosives E2, 5 μ 4.6 × 250 mm (secondary column)

Column Temp.: 30 °C

Mobile Phase: (E1 column) 57% water: 43% methanol

(E2 column) 52% water: 48% methanol

Flow Rate: 1.0 mL/min

Injection Volume: 80 μ L

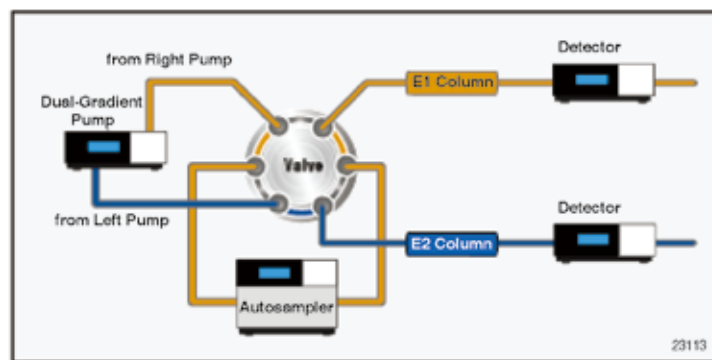


图 2 仪器连接图

样品前处理方法

基于 EPA 8330 方法制备

混合物 A：包含 2-氨基-4,6-二硝基甲苯、1,3-二硝基苯、2,4-二硝基甲苯、HMX、硝基苯、RDX、1,3,5-三硝基苯和 TNT，甲醇：乙腈（1:1）溶解，浓度 1mg/mL。AccuStandard (M-8330A-R-10X)

混合物 B：包含 4-氨基-2,6-二硝基甲苯、2,6-二硝基甲苯、2-硝基甲苯、3-硝基甲苯、4-硝基甲苯和三硝基苯甲硝胺，甲醇：乙腈（1:1）溶解，浓度 1mg/mL。AccuStandard (M-8330B-R-10X)

标准溶液 1：分别吸取 200 μ L 混合物 A 和混合物 B 到 1.8mL 的小瓶里，加入 400 μ L 甲醇，即得浓度为 250 μ g/mL 的储备液。

标准溶液 2：吸取 300 μ L 标准溶液 1 到 1.8mL 的小瓶里，加入 1200 μ L 甲醇，即得浓度为 50 μ g/mL 的标准溶液 2。

标准溶液 3：吸取 100 μ L 标准溶液 1 到 1.8mL 的小瓶里，加入 900 μ L 甲醇，即得浓度为 5 μ g/mL 的标准溶液 3。

中间标准溶液：分别吸取 200 μ L 和 300 μ L 标准溶液 3 到 2 个 25mL 量瓶里，甲醇定容至刻度，即得浓度为 40 μ g/mL 和 50 μ g/mL 的溶液。

分别吸取 100、160、200、250、400 μ L 和 500 μ L 标准溶液 5 到 5 个 25mL 量瓶里，甲醇定容至刻度，即得浓度为 200、320、500、800 μ g/mL 和 1000 μ g/mL 的溶液。

内标储备液：1,2-二硝基苯作为内标，称取 12.5mg 用 25mL 甲醇：乙腈（1:1）溶解，得浓度为 500 μ g/mL 的标准溶液。

中间内标溶液：吸取 500 μ L 内标储备液用 25mL 甲醇溶液稀释，得浓度为 10 μ g/mL 的标准溶液。

工作标准溶液：每个中间标准溶液分别吸取 800 μ L 到 6 个 1.8mL 的进样小瓶里，加入 760 μ L CaCl₂ (5 g/L) 溶液和 40 μ L 中间内标溶液，得到含 14 个爆炸物浓度为 20、40、100、160、250 和 400 μ g/L、内标物浓度标准溶液 250 μ g/L 的标准溶液。

样品和加标样品的制备：自来水和土壤取自赛默飞上海应用中心，按照 EPA8330 要求样品和加标样品使用前用 CaCl₂ (5 g/L) 溶液 1:1 稀释。

自来水样品制备：

按照 EPA8330 要求制备由低到高各浓度级别样品。

结果和讨论

用 E1 和 E2 色谱柱分析 14 种爆炸物

在 EPA8330 规定的方法中, 2,4-DNT 和 2,6-DNT 在 C₁₈ 色谱柱上的保留时间非常接近, 因此这 14 种爆炸物并不能一次完成分离 1, 需要将其分成两组, 两次进样后才能完成; 而在 E1 和 E2 柱上, 14 种爆炸物的分离能够分别进样一次就能完成 2。图 2 中为 14 种爆炸物和内标在 E1 和 E2 上的测定谱图, 从图中可以看出 E2 与 E1 选择性的不同点。

精密度、线性和检出限

取 250 μ g/L 的标准溶液连续进样 6 次测定精密度, 结果见表 1。

表 1 14 种爆炸物测定精密度结果

| Analyte | E1 Column | | E2 Column | |
|----------------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
| | RT RSD (%) | Peak Area RSD (%) | RT RSD (%) | Peak Area RSD (%) |
| HMX | 0.038 | 0.026 | 0.097 | 0.713 |
| RDX | 0.033 | 0.832 | 0.077 | 0.537 |
| 1,3,5-Trinitrobenzene | 0.023 | 0.472 | 0.051 | 0.660 |
| 1,3-Dinitrobenzene | 0.022 | 0.667 | 0.056 | 0.727 |
| Nitrobenzene | 0.021 | 0.472 | 0.063 | 0.213 |
| Tetryl | 0.038 | 1.136 | 0.090 | 0.801 |
| 2,4,6-Trinitrobenzene | 0.028 | 0.776 | 0.075 | 0.625 |
| 4-Amino-2,6-dinitrotoluene | 0.041 | 0.808 | 0.093 | 0.498 |
| 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | 0.041 | 0.595 | 0.081 | 0.985 |
| 2,6-Dinitrotoluene | 0.037 | 0.989 | 0.083 | 0.742 |
| 2,4-Dinitrotoluene | 0.034 | 0.836 | 0.100 | 0.835 |
| 2-Nitrotoluene | 0.047 | 0.621 | 0.101 | 0.922 |
| 4-Nitrotoluene | 0.035 | 0.989 | 0.089 | 0.587 |
| 3-Nitrotoluene | 0.038 | 1.026 | 0.082 | 0.406 |

Note: Six injections of the 250 μ g/L mixed standard were made on each column.

按照 EPA 8330 外标校正的方法, 取配置好的 6 个不同浓度的标准溶液制定校正曲线, 结果见表 2。内标校正的结果见表 3。其中 E1 柱测定结果中 HMX RSD 值偏高是由于购买的该标准品不纯, 杂质干扰所致。

表 2 方法线性与检出限测定结果

| Analyte | E1 Column | | | E2 Column | | |
|----------------------------|-----------|--------------|------------------|-----------|---------|------------------|
| | r | Area RSD (%) | MDL (μ g/L) | | RSD (%) | MDL (μ g/L) |
| HMX | 0.9981 | 3.45 | 4.5 | 0.9990 | 2.55 | 4.1 |
| RDX | 0.9996 | 1.56 | 0.6 | 0.9998 | 1.22 | 4.6 |
| 1,3,5-Trinitrobenzene | 0.9999 | 1.00 | 1.6 | 0.9999 | 0.88 | 2.4 |
| 1,3-Dinitrobenzene | 0.9999 | 0.83 | 2.5 | 0.9999 | 0.83 | 1.8 |
| Nitrobenzene | 0.9998 | 1.11 | 3.2 | 0.9999 | 1.13 | 3.3 |
| Tetryl | 0.9994 | 2.02 | 3.2 | 0.9998 | 0.76 | 3.4 |
| 2,4,6-Trinitrobenzene | 0.9999 | 0.96 | 2.3 | 0.9998 | 1.06 | 3.0 |
| 4-Amino-2,6-dinitrotoluene | 0.9998 | 1.29 | 2.7 | 0.9999 | 1.09 | 3.4 |
| 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | 0.9998 | 0.97 | 1.7 | 0.9997 | 0.88 | 2.4 |
| 2,6-Dinitrotoluene | 0.9998 | 1.11 | 3.3 | 0.9996 | 1.37 | 4.5 |
| 2,4-Dinitrotoluene | 0.9998 | 1.12 | 2.6 | 0.9997 | 1.64 | 2.7 |
| 2-Nitrotoluene | 0.9997 | 1.11 | 3.9 | 0.9998 | 1.37 | 4.8 |
| 4-Nitrotoluene | 0.9998 | 1.18 | 4.5 | 0.9998 | 1.35 | 4.3 |
| 3-Nitrotoluene | 0.9996 | 1.57 | 4.0 | 0.9999 | 1.22 | 4.6 |

¹A standard mix was prepared at the following concentrations: 20, 40, 100, 160, 250 and 400 μ g/L, and was used for calibration: each concentration was injected six times. Calculated values are those reported by Chromeleon. The internal standard was not used to obtain these calibration curves. ²MDL was calculated using S/N = 3, where S = signal, N = noise.

表 3 内标校正测定线性结果

| Analyte | E1 Column | | E2 Column | |
|----------------------------|-----------|---------|-----------|---------|
| | r | RSD (%) | r | RSD (%) |
| HMX | 0.9967 | 4.49 | 0.9979 | 3.60 |
| RDX | 0.9985 | 3.07 | 0.9994 | 2.01 |
| 1,3,5-Trinitrobenzene | 0.9993 | 2.25 | 0.9994 | 1.97 |
| 1,3-Dinitrobenzene | 0.9994 | 2.07 | 0.9996 | 1.64 |
| Nitrobenzene | 0.9995 | 1.86 | 0.9996 | 1.65 |
| Tetryl | 0.9984 | 3.38 | 0.9995 | 1.83 |
| 2,4,6-Trinitrobenzene | 0.9989 | 2.89 | 0.9994 | 2.06 |
| 4-Amino-2,6-dinitrotoluene | 0.9989 | 2.90 | 0.9991 | 2.50 |
| 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | 0.9990 | 2.63 | 0.9974 | 4.29 |
| 2,6-Dinitrotoluene | 0.9991 | 2.46 | 0.9996 | 1.62 |
| 2,4-Dinitrotoluene | 0.9992 | 2.40 | 0.9996 | 1.64 |
| 2-Nitrotoluene | 0.9993 | 2.23 | 0.9996 | 1.75 |
| 4-Nitrotoluene | 0.9992 | 2.35 | 0.9993 | 2.27 |
| 3-Nitrotoluene | 0.9993 | 2.28 | 0.9995 | 1.93 |

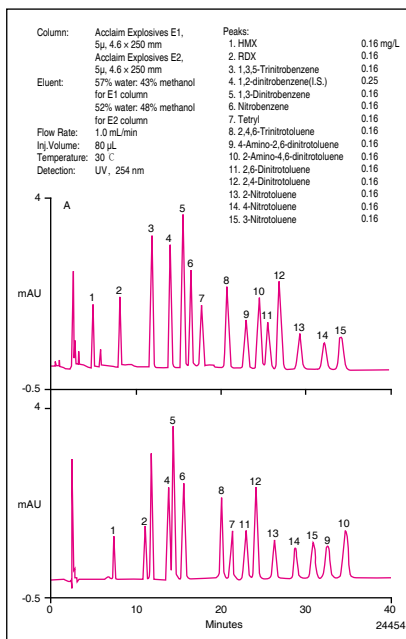


图 3 E1 和 E2 分析 14 种爆炸物 (160 µg/L) 和内标谱图

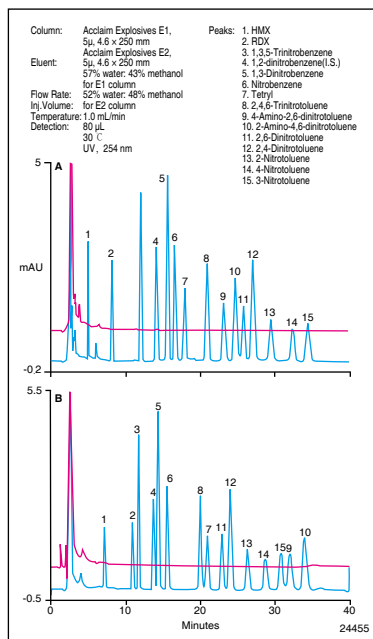


图 4 自来水和其高浓度加标样品测定谱图

表 4 自来水和其高浓度加标样品测定结果

| Analyte | E1 Column | | | | E2 Column | | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| | Detected (µg/L) | Added (µg/L) | Found ¹ (µg/L) | Recovery ² (%) | Detected (µg/L) | Added (µg/L) | Found ¹ (µg/L) | Recovery ² (%) |
| HMX | NA | 200 | 224 | 112 | NA | 200 | 199 | 100 |
| RDX | NA | 200 | 204 | 102 | NA | 200 | 208 | 104 |
| 1,3,5-Trinitrobenzene | NA | 200 | 206 | 103 | NA | 200 | 207 | 104 |
| 1,3-Dinitrobenzene | NA | 200 | 206 | 103 | NA | 200 | 205 | 103 |
| Nitrobenzene | NA | 200 | 203 | 102 | NA | 200 | 203 | 102 |
| Tetryl | NA | 200 | 200 | 100 | NA | 200 | 205 | 103 |
| 2,4,6-Trinitrobenzene | NA | 200 | 208 | 104 | NA | 200 | 208 | 104 |
| 4-Amino-2,6-dinitrotoluene | NA | 200 | 208 | 104 | NA | 200 | 204 | 102 |
| 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | NA | 200 | 208 | 104 | NA | 200 | 203 | 102 |
| 2,6-Dinitrotoluene | NA | 200 | 208 | 104 | NA | 200 | 206 | 103 |
| 2,4-Dinitrotoluene | NA | 200 | 204 | 102 | NA | 200 | 209 | 105 |
| 2-Nitrotoluene | NA | 200 | 204 | 102 | NA | 200 | 207 | 104 |
| 4-Nitrotoluene | NA | 200 | 204 | 102 | NA | 200 | 205 | 103 |
| 3-Nitrotoluene | NA | 200 | 202 | 102 | NA | 200 | 205 | 103 |

Note: 1. Two tap water sample were prepared, with two injections made for each preparation. 2. Four spiked samples were prepared, with five injections made for each preparation.

图 4 是自来水和其高浓度加标样品测定谱图，14 个化合物均有很高的加标回收率。结果见表 4。

图 5 是自来水和其低浓度加标样品测定谱图，其中硝基苯被检测到，其浓度接近校正曲线的最低浓度点，加标回收率在 E1 和 E2 柱上分别为 73% 和 67%。结果见表 5。

表 5 自来水和其低浓度加标样品测定结果

| Analyte | E1 Column | | | | E2 Column | | | |
|----------------------------|-----------------|--------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| | Detected (µg/L) | Added (µg/L) | Found ¹ (µg/L) | Recovery ² (%) | Detected (µg/L) | Added (µg/L) | Found ¹ (µg/L) | Recovery ² (%) |
| HMX | NA | 200 | 168 | 83 | NA | 200 | 210 | 105 |
| RDX | NA | 200 | 177 | 89 | NA | 200 | 153 | 77 |
| 1,3,5-Trinitrobenzene | NA | 200 | 214 | 107 | NA | 200 | 258 | 129 |
| 1,3-Dinitrobenzene | NA | 200 | 172 | 86 | NA | 200 | 230 | 115 |
| Nitrobenzene | NA | 200 | 159 | 73 | NA | 200 | 158 | 67 |
| Tetryl | NA | 200 | 178 | 89 | NA | 200 | 200 | 100 |
| 2,4,6-Trinitrobenzene | NA | 200 | 188 | 94 | NA | 200 | 190 | 95 |
| 4-Amino-2,6-dinitrotoluene | NA | 200 | 190 | 95 | NA | 200 | 191 | 96 |
| 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | NA | 200 | 181 | 91 | NA | 200 | 176 | 88 |
| 2,6-Dinitrotoluene | NA | 200 | 184 | 92 | NA | 200 | 205 | 102 |
| 2,4-Dinitrotoluene | NA | 200 | 183 | 92 | NA | 200 | 184 | 92 |
| 2-Nitrotoluene | NA | 200 | 196 | 98 | NA | 200 | 195 | 98 |
| 4-Nitrotoluene | NA | 200 | 193 | 97 | NA | 200 | 179 | 90 |
| 3-Nitrotoluene | NA | 200 | 169 | 85 | NA | 200 | 183 | 91 |

Note: 1. One tap water sample was prepared, with four injections made. 2. Two spiked samples were prepared, with eight injections made for each preparation. 3. The detected concentrations of nitrobenzene shown were calculated from the tap water prepared as low-level samples (concentrated). Results showed 14 µg/L, using the E1 column, and 26 µg/L using the E2 column.

相关化合物的分离

加入 7 个其他化合物的分析图谱见图 6，分析结果见表 6。其中只有四硝基戊四醇和 2,4,6-三硝基苯酚可以一同和 14 个化合物得到分离，在这个方法条件下二苯胺和六硝基二苯胺在柱子上被强烈地保留。

注意事项

溶剂、试剂和玻璃器皿很容易引入污染物，从而色谱图上出现未知的干扰峰，所有这些必须通过进空白样品来保证污染的不存在。三硝基苯甲硝胺在甲醇 / 水溶液中或加热时降解很快，所有含有三硝基苯甲硝胺的样品必须在过滤前先用乙腈溶解，而且不能置于高于室温的温度下。

表 6 EPA 8330 14 种爆炸物和 7 个相关化合物的测定保留时间结果

| | | Retention Time (min) | |
|--|------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| | | E1 Column | E2 Column |
| Added Compounds | 2,4,6-trinitrophenol | 2.22 | undetermined |
| | 2,4,6-diamino-4-nitrotoluene | 5.053 | 4.993 |
| | 2,4-diamino-6-nitrotoluene | 5.417 | 5.157 |
| | Nitroglycerin | 16.44 | 21.55 |
| | Nitropenta | 31.70 | 46.92 |
| | Diphenylamine | 99.51 | 67.04 |
| | Hexanitrodiphenylamine | No absorbance at 205,210, and 254 nm* | |
| Compounds Specified in EPA Method 8330 | HMX | 5.000 | 7.196 |
| | RDX | 8.200 | 10.95 |
| | 1,3,5-Trinitrobenzene | 12.05 | 11.78 |
| | 1,3-Dinitrobenzene | 15.71 | 14.38 |
| | Nitrobenzene | 16.68 | 15.57 |
| | Tetryl | 17.98 | 20.91 |
| | 2,4,6-Trinitrotoluene | 20.99 | 19.98 |
| | 4-Amino-2,6-dinitrotoluene | 23.24 | 31.85 |
| | 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | 24.81 | 33.88 |
| | 2,6-Dinitrobenzene | 25.84 | 22.89 |
| | 2,4-Dinitrobenzene | 27.17 | 23.98 |
| | 2-Nitrotoluene | 29.57 | 26.24 |
| | 4-Nitrotoluene | 32.51 | 28.66 |
| | 3-Nitrotoluene | 34.50 | 30.77 |

*Hexanitrodiphenylamine is not eluted with the standard conditions for the E1 and E2 columns.

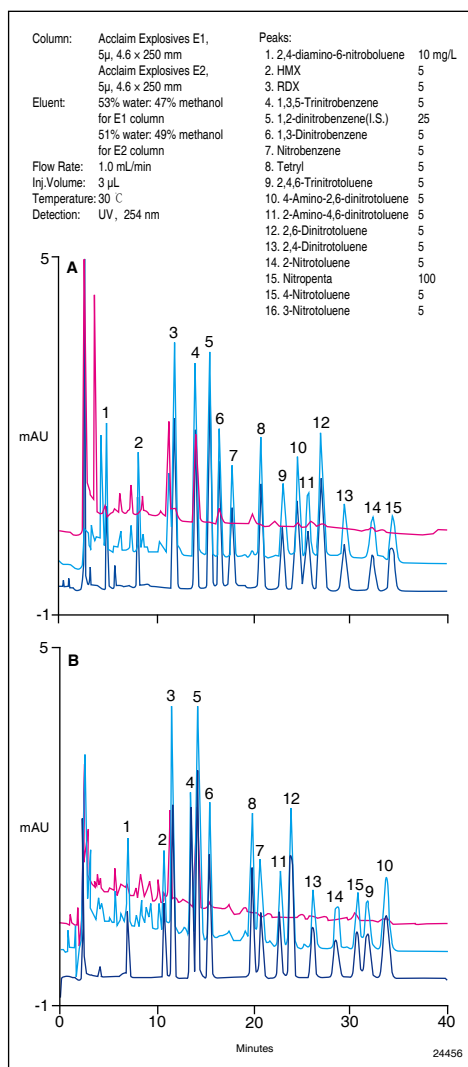


图 5 自来水和其低浓度加标样品测定谱图

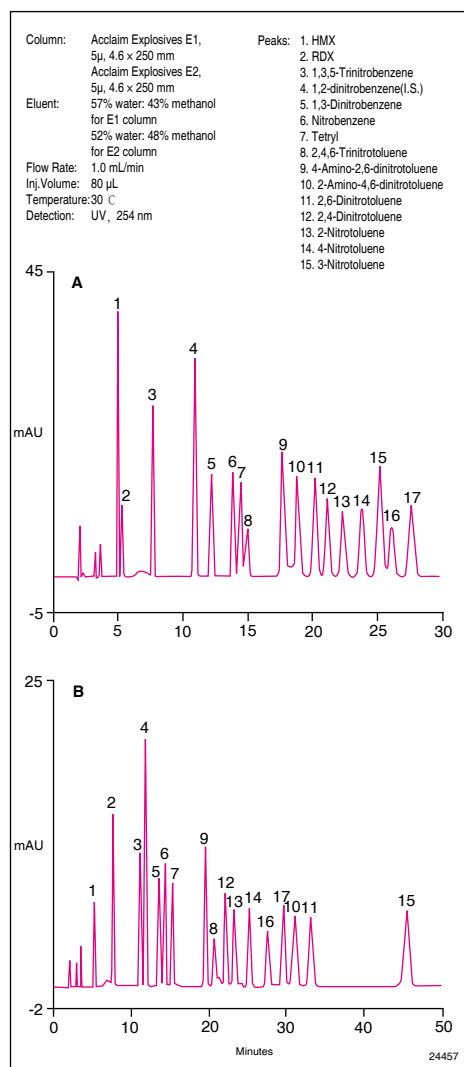


图 6 17 种爆炸物样品 (5mg/L) 测定谱图

结论

本实验采用赛默飞 U3000 系列双三元液相色谱并联系统，基于 EPA 8330 方法在 E1 和 E2 柱上，14 种爆炸物和其他相关化合物的分离能够分别进样一次就能完成，达到了原方法的检出限和测定要求，并且很大程度简化了原方法的操作步骤。

参考文献

- [1]. U.S. EPA Method 8330, "The Determination of Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)" United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH 45268
- [2]. X.Liu, Abordunov, M. Tracy, C. Pohl, New Columns for Baseline Separation of 14 Explosives-Related Compounds in EPA Method 8330, Dionex HPLC 2006 Presentation.
- [3]. G. Maio, F. Steiner, H. Franz, M. Tracy, X. Liu, F. Arnold, A Total Solution for Explosives Analysis by Reversed-Phase HPLC with a Parallel HPLC System, Dionex HPLC 2006 Presentation.

DGLC-25 SEC/IEC 并联色谱分析牛血清白蛋白、卵清蛋白和细胞色素 C

关键词：牛血清白蛋白；卵清蛋白；细胞色素 C；并联色谱

DGLC-25 SEC/IEC parallel LC Determination of BSA, ovalbumin, cytochrome C by SEC/IEC parallel LC

Key words: BSA, ovalbumin, cytochrome C, parallel LC

引言

双三元液相具有两套独立的泵和流路，因此在应用两个检测器时可以作为两套系统来使用，这两套系统共用自动进样器和柱温箱，可以实现一套液相变成两套液相应用。

本文把 DGP3600 配置成两套并联系统，Timebase 1 为 DEMO-1，使用 DGP 3600 左泵，色谱柱为 MabPac SEC-1 体积排阻色谱柱，自动进样器设成共享，通过体积排阻的方法分析混合溶液中的牛血清白蛋白、卵清蛋白和细胞色素 C；Timebase 2 为 DEMO-2，使用 DGP 3600 右泵，色谱柱为 ProPac WAX-10 离子交换色谱柱，自动进样器设成共享，分析化合物同 DEMO-1 系统；具体连接见下图 1。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵，带有一个六通阀的柱温箱，紫外检测器。连接图见图 1，色谱条件见表 1、2。

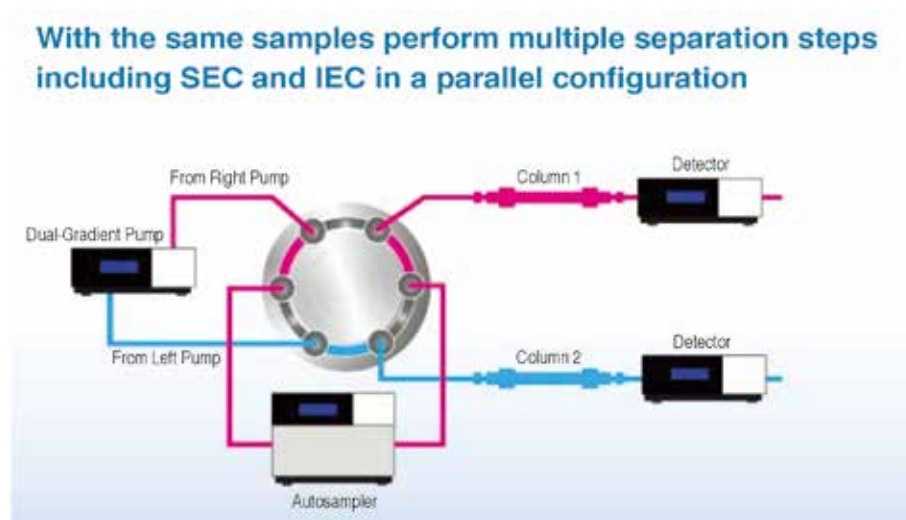


图 1 仪器连接图

表 1 体积排阻色谱条件

| | |
|-------|--|
| 色谱条件 | |
| 色谱柱: | Mab Pac SEC-1, 5 μm 4.0 \times 300 mm |
| 流动相: | 50mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH=6.8 和 0.3mol/L 的 NaCl 的混合溶液 |
| 流速: | 0.20 ml/min |
| 柱温: | 30 $^{\circ}\text{C}$ |
| 进样量: | 10 μL |
| 检测波长: | 280 nm |

表 2 离子交换色谱条件

| 色谱条件 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|--------|-----|-----|---|-----|---|----|----|----|----|---|-----|----|---|-----|----|-----|---|----|-----|---|
| 色谱柱: | ProPac WAX-10, 10 μm 4.0 \times 250 mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流动相: | MPA: Tris 缓冲液 PH=8.0, MPB: Tris 缓冲液 PH=8.0 加 0.5mol/L 的 NaCl, 梯度洗脱: <table border="1" data-bbox="703 689 1177 953" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>时间 min</th> <th>MPA</th> <th>MPB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> | 时间 min | MPA | MPB | 0 | 100 | 0 | 20 | 50 | 50 | 21 | 0 | 100 | 25 | 0 | 100 | 26 | 100 | 0 | 35 | 100 | 0 |
| 时间 min | MPA | MPB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 26 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速: | 1.0 ml/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 柱温: | 30 $^{\circ}\text{C}$ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 进样量: | 10 μL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 检测波长: | 254 nm/280nm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

样品前处理方法

牛血清白蛋白 (分子量 66KDa, 等电点 pI 为 4.7)、卵清蛋白 (分子量 44KDa, 等电点 pI 为 4.7) 和细胞色素 C (分子量 12KDa, 等电点 pI 为 10.7), 购于 Sigma 公司。

取牛血清白蛋白样品适量, 精密称定, 加超纯水溶解, 制成每 2mg/ml 的溶液。

取卵清蛋白样品适量, 精密称定, 加超纯水溶解, 制成每 2mg/ml 的溶液。

取细胞色素 C 样品适量, 精密称定, 加超纯水溶解, 制成每 0.25mg/ml 的溶液。

按照相同的方法配置三种蛋白的混合溶液。

结果和讨论

体积排阻色谱方法的部分程序

| | | |
|--------|--|----------------|
| -3.500 | WashSampleLoop | Volume=150.000 |
| -3.000 | InjectValveToInject | |
| | ValveRight = | 10_1 |
| 0.000 | Autozero | |
| | Wait | UV.Ready and |
| | ColumnOven.Ready and Sampler.Ready and PumpLeft.Ready and PumpModule.Ready | |
| | Inject | |
| | ColumnOven_Temp.AcqOn | |
| | PumpLeft_Pressure.AcqOn | |
| | UV_VIS_1.AcqOn | |
| 0.612 | ReleaseExclusiveAccess | |
| 30.000 | ColumnOven_Temp.AcqOff | |
| | PumpLeft_Pressure.AcqOff | |
| | UV_VIS_1.AcqOff | |
| | End | |

离子交换色谱方法的部分程序

| | | |
|--------|---|----------------|
| -3.500 | WashSampleLoop | Volume=150.000 |
| -3.000 | InjectValveToInject | |
| | ValveRight = | 1_2 |
| 0.000 | Autozero | |
| | Flow = | 1.000 [ml/min] |
| | %B = | 0.0 [%] |
| | %C = | 0.0 [%] |
| | Wait | UV.Ready and |
| | ColumnOven.Ready and Sampler.Ready and PumpRight.Ready and PumpModule.Ready | |
| | Inject | |
| | ColumnOven_Temp.AcqOn | |
| | PumpRight_Pressure.AcqOn | |
| | UV_VIS_1.AcqOn | |
| | UV_VIS_2.AcqOn | |
| | Temp_Lamphouse.AcqOn | |
| | 3DFIELD.AcqOn | |
| | Flow = | 1.000 [ml/min] |
| | %B = | 0.0 [%] |
| | %C = | 0.0 [%] |
| 0.300 | ReleaseExclusiveAccess | |
| 20.000 | Flow = | 1.000 [ml/min] |
| | %B = | 50.0 [%] |
| | %C = | 0.0 [%] |

其中 -3min 的阀切换比较重要，将公用流路中的另一个系统的流动相从色谱柱上冲走，避免其对样品分离的影响，同时在进样后使用 ReleaseExclusiveAccess 命令将自动进样器释放，以便另一个系统使用。

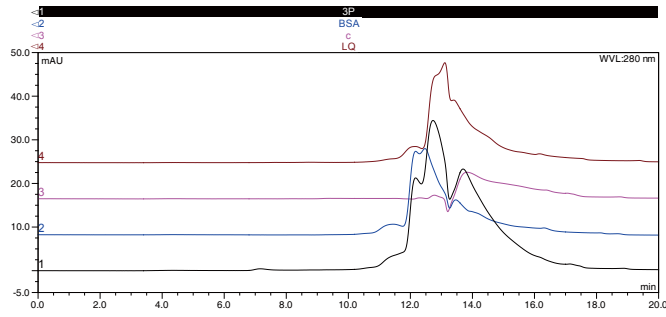


图 2 三种蛋白单独和混合分离图谱

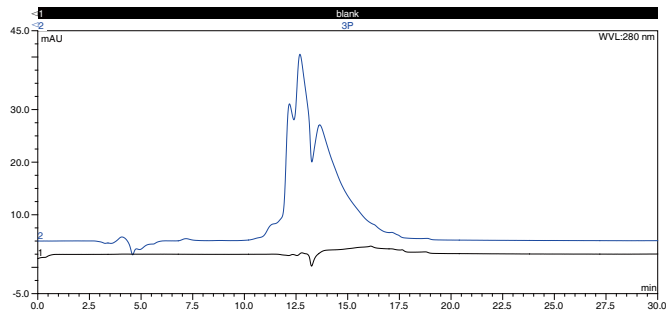


图 3 体积排阻色谱分离图谱空白和三种蛋白

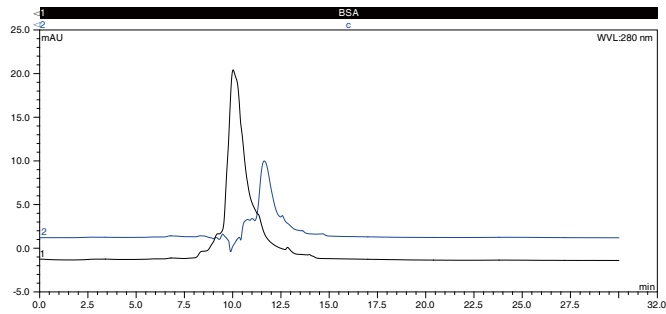


图 4 其中两种蛋白 (BSA 和细胞色素 C) 的单独进样图谱

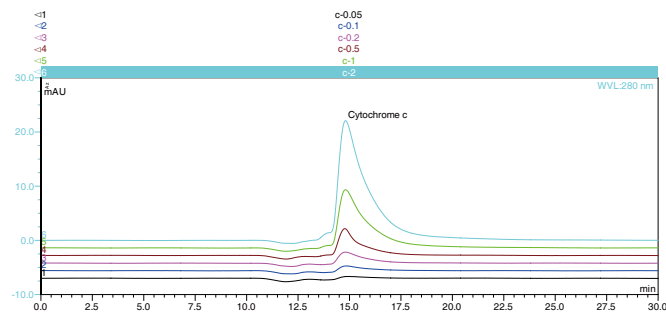


图 5 不同浓度细胞色素 C 的样品分离图谱

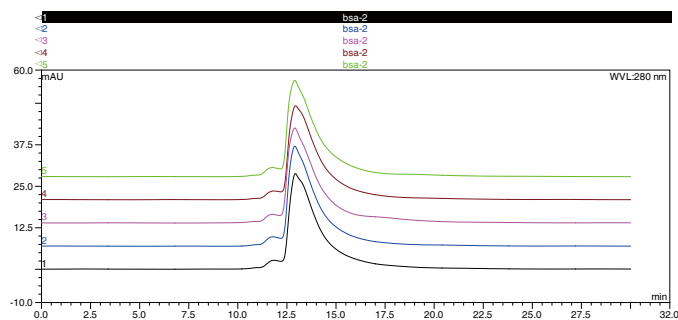


图 6 BSA 重复性实验

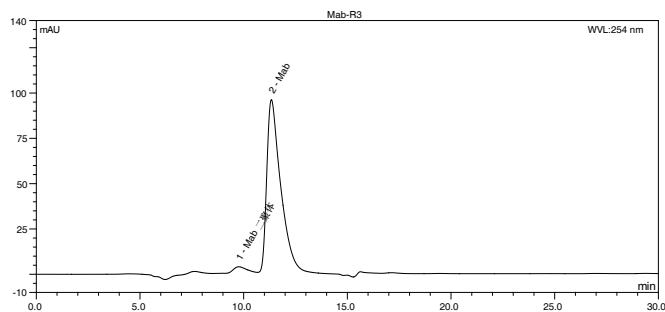


图 7 SEC-1 分离 Mab 及其二聚体的色谱图 (北京)

离子交换色谱图

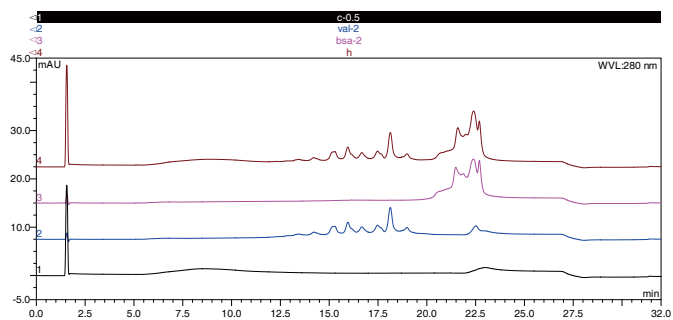


图 8 三种蛋白单独和混合分离图谱

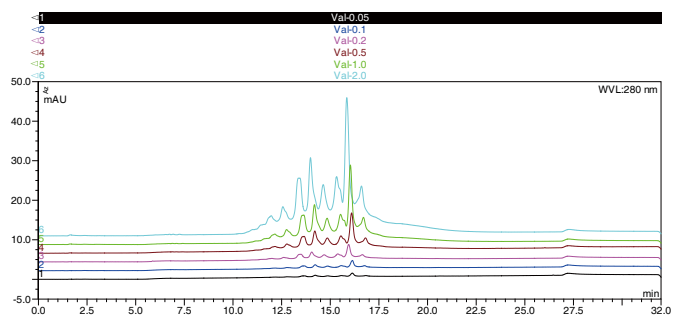


图 9 不同浓度卵清蛋白的色谱图

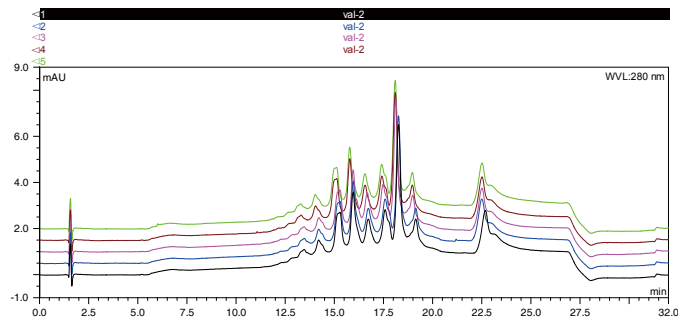


图 10 卵清蛋白的重复性图谱

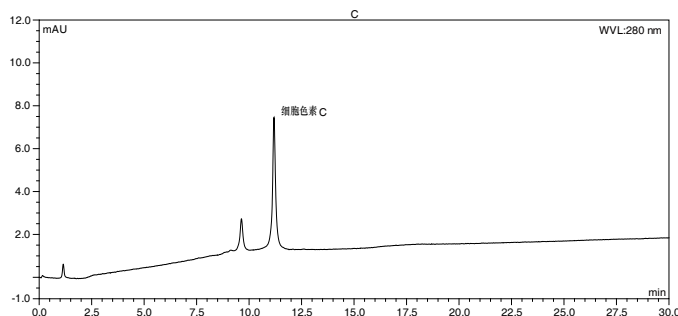


图 11 色谱柱 WCX-10 缓冲液 pH=5.5 条件下分离细胞色素 C 图谱

结论

并联液相是双三元液相系统的典型应用，本方法采用体积排阻色谱（SEC）和离子交换色谱（IEC）两套系统，对三种蛋白样品同时进行分离。通过优化阀切换的时间，使两个系统独立运行，不会产生相互之间的影响。

结果显示分子量相对较小的三种蛋白在 MabPac SEC-1 色谱柱（主要用于单克隆的分离）上的分离与色谱柱操作手册的结果基本相似，由于这三种蛋白的分子量偏小，均在 100kDa 以内，因此在 MabPac SEC-1 没有基线分离，结果供参考。同时在北京客户那里相同色谱柱上进行了 Mab 的分离，结果见体积排阻色谱第六张图，由图可知该色谱柱在分离单抗时分离结果较好，原因单抗的分子量一般在 150kDa，其二聚体可能为 300kDa、三聚体为 450kDa 等，分子量差异较大，更有利于体积排阻色谱的分离。

三种蛋白在离子交换色谱柱 ProPac WAX-10 上能够进行较好分离。蛋白质的离子交换色谱分离是基于蛋白质本身的等电点，一般当缓冲液的 pH 值与蛋白质的等电点相差越大，蛋白质表面暴露的带电基团越多，其在色谱柱上的保留越强，如离子交换色谱的第一张图所示，细胞色素 c 的 pI 为 10.7，而卵清蛋白和牛血清白蛋白的 pI 约为 4.7，因此在 WAX-10 色谱柱上、缓冲液 pH 为 8.0 条件下，细胞色素 c 的保留较弱，很快就出峰，而其余两种蛋白保留较强，在梯度的条件下才洗脱。当尝试采用 WCX-10 色谱柱，缓冲液 pH=5.5 条件下，细胞色素 C 有一定保留，结果见离子交换色谱第四张图。因此采用离子交换色谱对蛋白和多肽进行分离时，了解其等电点对色谱柱和流动相的选择至关重要。

由附录的结果可知，无论在体积排阻色谱还是离子交换色谱条件下，蛋白的紫外响应值与浓度呈一定的线性关系，由于蛋白样品出峰较复杂，因此未确定检出限，本方法的最低浓度细胞色素 C 为 0.2 μ g，卵清蛋白和 BSA 为 0.5 μ g。

第五章 双三元二维应用

二维液相色谱 (2D-LC) 是将分离机理不同而又相互独立的两支色谱柱串联起来构成的分离系统。样品经过第一维的色谱柱进入接口中, 通过浓缩、捕集或切割后被切换进入第二维色谱柱及检测器中。二维液相色谱通常采用两种不同的分离机理分析样品, 即利用样品的不同特性把复杂混合物(如肽)分成单一组分, 这些特性包括分子尺寸、等电点、亲水性、电荷、特殊分子间作用(亲和)等, 在一维分离系统中不能完全分离的组分可以在二维系统中得到更好的分离, 分离能力、分辨率得到极大的提高。

二维液相色谱大多通过柱结合技术实现样品的柱间切换。按切割组分是否直接进入二维中, 二维分离又可分为离线和在线两种方式。双三元液相基于其独特的设计原理, 通过阀切换功能轻松地实现了在线二维技术, 使这个较为复杂的技术应用起来不再困难。下面列举一些实例来让大家更好地理解该技术的操作。

DGLC-26 在线二维柱切换 - 高效液相色谱法同时测定婴幼儿强化奶粉中维生素 A、D₃、E 的含量

关键词：高效液相色谱；维生素 D；维生素 A；维生素 E；二维色谱；婴幼儿配方奶粉

DGLC-26 Simultaneous qualification of vitamins A, D3 and E in fortified Infant formulae by Liquid Chromatography Coupled with Fully Automated Online two-dimensional column switching method

Key words: Two-dimensional separation, vitamin D, vitamin A, vitamin E, high performance liquid chromatography, dual gradient system, Fortified Infant formulae

引言

婴幼儿配方奶粉又称为母乳化奶粉，是一种以牛乳（或其他动物乳）为主要原料，通过调整成分模拟母乳，可供婴幼儿生长和发育所需要的一种人工食品^[1]。根据国家标准中奶粉营养成分有关规定，维生素指标中必须强化的包括维生素 A、维生素 D 和维生素 E 及其他水溶性维生素等；其中维生素 D 在实际母乳中含量极低，约为 4–40 IU（国际单位）/L（0.1–1.0 μ g/L）^[2–4]，主要对应形式为维生素 D₃ 和 25-OH 维生素 D₃^[4–5]，因此通常将维生素 D₃ 制成水可分散性的微粒形式，添加到婴幼儿强化奶粉中^[5–6]。关于奶粉中维生素 A、D 和 E 的测定方法，文献报道较多，其中高效液相色谱法是常用的分析方法。由于样品基质复杂，三种维生素对温度、光照、氧气和极端的 pH 值较敏感，且多数经过包被后再添加到食品基质中^[7]，因此分析方法常包括皂化破壁、有机溶剂萃取，浓缩和净化等步骤^[8–9]，在现行标准分析方法中^[9]需采用正相制备色谱、反相分析色谱两套仪器，分别进行净化制备和分析，前处理过程极其繁琐，大大影响样品分析效率。

本文首次采用在线二维柱切换 - 高效液相色谱紫外检测法，样品经过皂化、萃取后，直接进样，同时完成维生素 A、D 和 E 的分析测定，提高了方法的准确性和样品分析效率。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 1。

一维分析柱：Acclaim 120 C₁₈，3 μ m 3.0 \times 150mm

二维分析柱：Acclaim 120 PA II C₁₈，3 μ m 4.6 \times 150mm

柱温：30 $^{\circ}$ C

检测波长：0~5min，325nm；5~12min，296nm；12~30min，263nm

进样量：50 μ L

流速：0.8 ml/min

流动相组成：

一维分析泵：A，乙腈；B，甲醇；C，为甲醇 - 四氢呋喃（80：20）

二维分析泵：A，乙腈；B，异丙醇

流速：0.8mL/min

梯度洗脱程序：见表 1

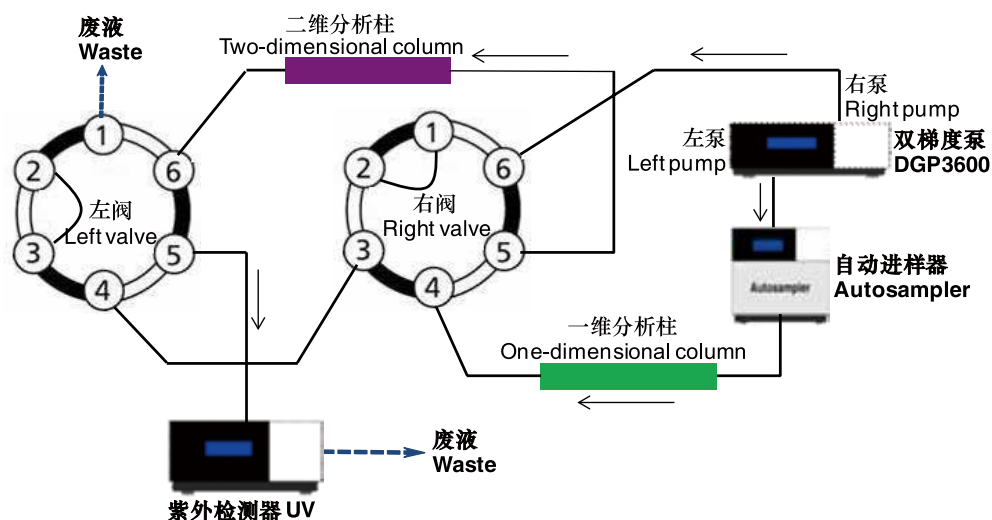


图1 仪器连接图

表1 一维分离和二维分离梯度程序

| 一维分析泵 | | | | 二维分析泵 | | |
|------------------------|----|----|-----|------------------------|-----|----|
| 时间 (min) Time (min) | A% | B% | C% | 时间 (min) Time (min) | A% | B% |
| 0 | 60 | 40 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 15 | 60 | 40 | 0 | 9 | 100 | 0 |
| 15.1 | 0 | 0 | 100 | 25 | 80 | 20 |
| 25 | 0 | 0 | 100 | 28 | 80 | 20 |
| 25.1 | 60 | 40 | 0 | 28.1 | 100 | 0 |
| 30 | 60 | 40 | 0 | 30 | 100 | 0 |

样品前处理方法

精密称取奶粉 10 g (液态奶 50mL)，于 250 mL 锥形瓶中，加入 30mL 热水使溶解 (液态奶不需加入)，再加入 15g/L 的维生素 C 乙醇溶液 100mL，再加入 55% 的氢氧化钾水溶液 25mL，磁力搅拌 45min，温度 53℃。将皂化液移至 500mL 分液漏斗中，以石油醚萃取 3 次，每次 100mL，合并萃取液，萃取液以水洗涤 3~5 次，至中性 (pH 试纸测试)，收集石油醚层，经过无水硫酸钠脱水。低温减压回收石油醚，至 1~2mL 时转移至 10mL 棕色瓶中，氮气吹干，再以 3~5mL 甲醇使溶解并转移至 10mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，待用。未用完溶液放入 4℃ 冰箱保存。

结果和讨论

标准品和样品色谱图

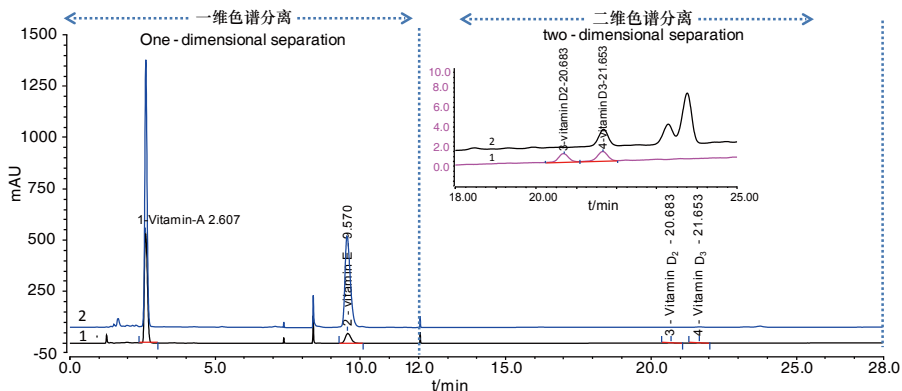


图2 采用二维柱切换法测定维生素A、D₂、D₃和E的分离谱图(1标准品, 2样品)

方法学考察

方法线性范围、定量限、精密度考察

分别精密量取维生素D₃、维生素A和E的标准工作溶液适量,至10mL棕色量瓶中,制成系列混合标准品溶液,再分别精密加入等量的浓度为10mg/L的维生素D₂的内标溶液0.5mL,甲醇稀释至刻度,进样50 μ L,以浓度为横坐标,维生素D₃/D₂峰面积比值为纵坐标,做线性回归,结果维生素D₃在20~2000 μ g/L的范围内,相关系数r为0.9995;维生素A在1.71~855mg/L的范围内,r为0.9979;维生素E在4.12~1030mg/L范围内,r为0.9998。其中维生素D₃最低定量限为20 μ g/kg,相当于800IU/kg。

取已知混合标准品溶液,连续进样6次,结果维生素D₂,维生素D₃的峰面积的RSD分别为1.94%和2.82%,维生素E峰面积的RSD为0.44%,维生素A峰面积的RSD为0.43%,表明方法的精密度较好。

回收率实验

分别取某品牌婴幼儿配方奶粉样品3份,每份10g,精密称定,分别精密加入浓度为10mg/L的维生素D₂的内标溶液0.5mL,再分别加入维生素A、D₃、E的标准品适量,按照2.4项下处理样品并测定维生素A、D₃、E的总量,计算回收率。结果维生素A、D₃、E的平均回收率分别为114%、100.68%和93.98%,其相应的RSD分别为0.16%,2.9%和0.58%。

样品含量测定结果

分别取各品牌婴幼儿和儿童配方奶粉10g,精密称定,按照2.4项下的样品溶液制备方法制备样品溶液,测定维生素A、D₃和E的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果

| 样品名称 | 维生素A(mg/kg) | | 维生素E(mg/kg) | | 维生素D ₃ (μ g/kg) | |
|------|-------------|-------|-------------|------|---------------------------------|------|
| | 标示量 | 测得量 | 标示量 | 测得量 | 标示量 | 测得量 |
| 奶粉-1 | 5.70 | 6.16 | 40 | 40.9 | 79 | 84 |
| 奶粉-2 | 5.91 | 6.49 | 87 | 83 | 84 | 76 |
| 奶粉-3 | 4.50 | 5.04 | 150 | 132 | 80 | 70 |
| AD钙奶 | 0.06 | 0.065 | — | — | 17 | 14.5 |

讨论

二维色谱流路构建和阀切换时间的确定

维生素A、E在配方奶粉中含量较高,样品经过皂化萃取后,可直接在一维色谱柱中实现分离。维生素D含量较低,且样品基质干扰较大,原标准方法需经过正相制备色谱的净化,再将含有维生素D的馏分蒸干定容后,再在反相色谱上进行分析。本文采用二维色谱分离的中心切割法,样品在一维色谱柱实现初步分离后,将含有维

生素 D 的馏分切割至二维色谱柱中进行分离。系统连接图见图 1。由于外界因素影响, 维生素 D 在一维色谱分离中的保留时间会有微小波动, 因此切割的时间窗太窄容易造成目标物的损失, 时间窗太宽, 会使切换到二维分离柱的溶剂体积过大, 对二维分离产生溶剂效应, 本实验通过连续进样, 考察了保留时间波动范围, 确定了最终的切换时间。在一维色谱分离中, 维生素 A、E 在 12min 内即可完成分离过程, 而在二维色谱分离中维生素 D 的保留时间约为 21~22min, 因此方法采用两位置六通阀实现了色谱柱后的紫外检测器共用。左侧阀的切换时间定在 12min, 在 12min 之前, 一维色谱柱与检测器连接; 在 12min 之后, 二维色谱柱与检测器连接, 从而实现维生素 A、D 和 E 的同时检测。

色谱分离条件选择

在色谱分离模式选择上, 文献中一般采用正相色谱或反相色谱法进行分析。反相色谱法的优势是可以将维生素 D₂、维生素 D₃ 以及维生素 D 前体和非活性的异构体分开, 因此可以选择维生素 D₂ 作为内标, 以补偿在前处理过程中维生素 D₃ 的损失, 提高测定结果的准确性和可靠性, 另外考虑到流动相的兼容性, 本实验在一维色谱和二维色谱分离中均采用反相色谱法。在色谱柱选择上, 二维分离选择性的变化能够改善样品的 2 个或更多色谱峰的分度, 能使色谱图中被大峰掩盖的小峰分离出来, 减少色谱峰重叠, 因此实验中采用 C₁₈ 作为一维分析柱, 采用 PA II C₁₈ (Embedded-polar-group C₁₈) 作为二维分析柱。在流动相选择上, 甲醇、乙腈、乙醇、异丙醇以及水是常用溶剂, 由于样品溶液中含有大量低极性的物质, 因此本实验采用了非水反相系统, 以增加低极性物质的溶剂度。在一维色谱分离中, 为减少强保留、低极性成分的干扰, 在维生素 A、E 分离结束后, 加入了四氢呋喃-甲醇的混合溶剂清洗色谱柱的过程。本实验对比了一维常规分离谱图 (见图 3) 和二维柱切换法的分离谱图 (图 2), 可以看出后者分离结果较好。

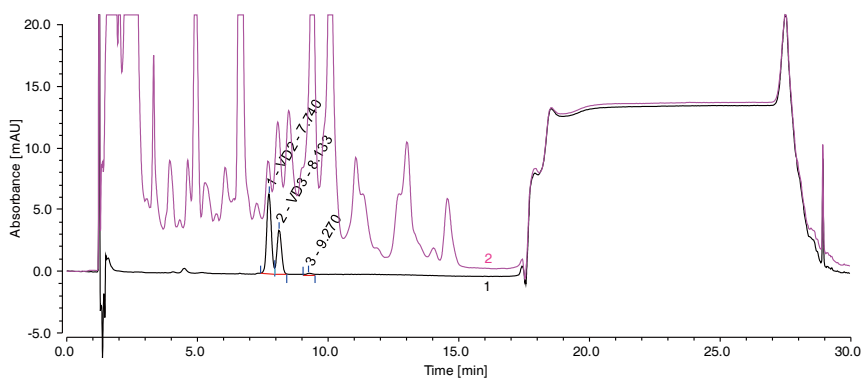


图 3 常规分离谱图 (1 维生素 D₂、D₃ 标准品溶液; 2 加 VD₂ 样品)

可行性分析

本文建立了在线二维柱切换-紫外检测法测定婴幼儿配方奶粉和乳品中维生素 A、D₃ 和 E 的含量测定方法, 本方法具有以下特点:

(1) 二维分离方法可以减少色谱峰重叠现象。在维生素 D₃ 测定中, 利用一维和二维色谱柱分离选择性差异, 可以更好的降低复杂基质成分对维生素 D₃ 测定的干扰。

(2) 与国标方法比较, 本方法可减少正相色谱的净化过程, 一次进样同时测定脂溶性维生素 A、E 和 D₃ 的含量, 大大提高了样品的分析效率。

(3) 在检测方法选择上, 紫外检测器和电化学检测器是应用较多的两种检测器。质谱检测器在复杂基质样品中对痕量组分的定性和定量上具有优势, 在婴幼儿奶粉检测中应用也越来越多。本文立足于方法的普适性, 选择紫外检测器, 利用其波长切换方式, 同时分析维生素 A、E 和 D₃, 通过一个六通切换阀, 实现检测器的共用, 所有过程在软件支持下, 可以实现全自动化控制。

作为二维分离方法, 相对于常规分析, 仍较复杂, 影响测定结果的因素较多。今后本实验将继续扩大样品分析范围, 考察方法耐用性, 并开展联合实验室的验证工作, 以完成对方法的综合评价。

参考文献

- [1]. ZHAO Rong, XUE Ying, WU Guo-Hua, ZHAO Hai-Yan, LUO Ren-Cai. Chinese J. Chromatogr., 2008, 26 (1): 113~115
赵榕, 薛颖, 吴国华, 赵海燕, 罗仁才. 色谱, 2008, 26(1): 113~115
- [2]. AOAC Official Method 995.05. Vitamin D in Infant Formulas and Enteral Products (Liquid Chromatographic Method). 1995
- [3]. GB 5413.9-2010, Determination of vitamins A, D, E in foods for infants and young children. National food safety standard.
GB 5413.9-2010, 婴幼儿食品和乳品中维生素 A、D、E 的测定, 食品安全国家标准
- [4]. Ball G.F.M. Determination of the fat-soluble vitamins in foods by high-performance liquid chromatography. In: Nollet M.L., Dekker M. (eds), Handbook of Food Analysis. New York: Leo Pub., 1996:601-647
- [5]. HUANG Fang, WU Hui-Qin, HANG Yi-Ping. PTCA (PART B: CHEM. ANAL. (理化检测 - 化学分册)). 2010, 47 (5): 577~582.
黄芳, 吴惠勤, 杭义萍. 理化检测 - 化学分册. 2010, 47(5): 577~582.
- [6]. Olivier Heudi, Marie-José Trisconi, Christopher-John Blake. Journal of Chromatography A, 2004, 1022 (1-2) : 115-123.

DGLC-27 二维液相色谱分析肿瘤组织中 AICA riboside 和 AICA ribotide

关键词：AICA riboside；AICA ribotide；肿瘤组织；二维液相

DGLC-27 Determination of AICA riboside and AICA ribotide in tumor by 2D-HPLC

Key words: AICA riboside, AICA ribotide, tumor, 2D-HPLC

引言

AICA riboside 和 AICA ribotide 在组织中含量较低，但这两个化合物较难离子化，不适合用 LC-MS 分析。用 C₁₈ 柱分析，由于这两个化合物的极性很强，保留较弱不能和生物样品中杂质分离。

本方法采用 online spe 和二维液相色谱相结合，采用了离子交换基质的色谱柱，对肿瘤组织中原形药物 AICA riboside 和代谢产物 AICA ribotide 这两个结构接近的化合物进行了分析，避开了基质的干扰，从而很好地阐释了该药物的代谢规律。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600RS 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个十通阀的柱温箱；DAD 检测器。仪器连接图见图 1。

色谱柱 Acclaim Mix-Mode WAX-1 Guard, 5 μ m 4.3 \times 10mm

IonPac CG16, 5 \times 50mm

Acclaim Mix-Mode WAX-1, 5 μ m 4.6 \times 150mm

Acclaim HILIC-10, 3 μ m 4.6 \times 150mm

柱温：40 $^{\circ}$ C

检测波长：270nm

色谱条件见表 1，阀切换时间见表 2

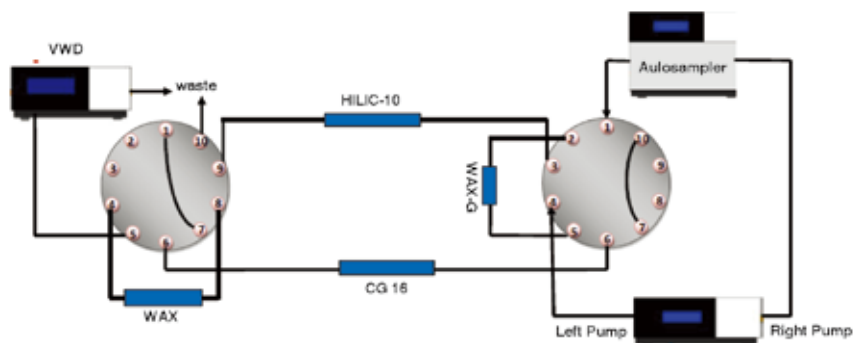


图 1 仪器连接图

表 1 色谱条件

| | H ₂ O(100mM KH ₂ PO ₄ , H ₃ PO ₄ 调 | | | | |
|----------------|---|---------------------------|-------------------|-------------------------|----------------|
| | 时间 (min) | CH ₃ CN (%) | PH 值为 2.5) (%) | H ₂ O (%) | 流速 (mL/min) |
| 左泵流动相组成 及流速 | 0 | 5 | 13 | 82 | 0.8 |
| | 13 | 5 | 13 | 82 | 0.8 |
| | 14 | 5 | 55 | 40 | 1.0 |
| | 30 | 5 | 55 | 40 | 1.0 |
| | 35 | 20 | 13 | 67 | 1.0 |
| | 38 | 5 | 13 | 82 | 1.0 |
| | 50 | 5 | 13 | 82 | 1.0 |
| 右泵流动相组成 及流速 | H ₂ O(100mM KH ₂ PO ₄ , H ₃ PO ₄ 调 | | | | |
| | 时间 (min) | CH ₃ CN (%) | PH 值为 2.5) (%) | H ₂ O (%) | 流速 (mL/min) |
| | 0 | 2 | 1 | 97 | 1.0 |
| | 50 | 2 | 1 | 97 | 1.0 |

表 2 阀切换时间

| 时间 (min) | 左阀 | 右阀 |
|-------------|------|------|
| 0 | 1-2 | 1-2 |
| 6 | 1-2 | 1-10 |
| 13 | 1-10 | 1-10 |
| 14.4 | 1-2 | 1-10 |
| 16 | 1-10 | 1-10 |
| 30.5 | 1-2 | 1-2 |

样品前处理方法

标准品前处理

精确称取 1mg 的 AICA riboside, 加入 25mL 的超纯水, 摇匀溶解后制成 40mg/mL 的储备液, 经 0.45 μ m 的滤膜过滤后装瓶, 再用超纯水逐级稀释得到 10 μ g/mL 的储备液 A, 经 0.45 μ m 的滤膜过滤后装瓶。

精确称取 1.5mg 的 AICA ribotide, 加入 25mL 的超纯水, 摇匀溶解后制成 50mg/mL 的储备液, 经 0.45 μ m 的滤膜过滤后装瓶, 再用超纯水逐级稀释得到 10 μ g/mL 的储备液 B, 经 0.45 μ m 的滤膜过滤后装瓶。

分别量取 1mL 储备液 A 和储备液 B, 混合均匀, 得到 5 μ g/mL 的 AICA riboside 和 AICA ribotide 的供试品溶液, 装瓶, 待测。

样品前处理

小鼠给药后分别在 5min、10min、15min、30min、1h、2h、3h 及 4h 时, 取肿瘤组织, 加入一倍体积的 PBS 匀浆, 匀浆液中加入一半体积的 10% TCA 沉淀蛋白, 高速离心, 用 4 倍体积的乙醚萃取两次, 取水相进行分析。

结果和讨论

方法开发前期工作

实验刚开始发现 AICA riboside 在 IonPac CG16 上保留很好, 并与基质达到基线分离, 而使用 Acclaim C₁₈ 柱子对 AICA ribotide 进行检测, AICA ribotide 没有保留, 之后也分别试过 Acclaim PA、Acclaim PA II 等柱子, AICA ribotide 都没有保留; 因为 AICA ribotide 是阴离子性质, 所以也分别在 NH₄OAc 及 KH₂PO₄ 等体系下适用过

Acclaim Mix-Mode WAX-1 及 IonPac AS11 柱子, AICA ribotide 能够保留很好, 但是与血浆和肿瘤里的基质分不开。之后也试过 Acclaim Mix-Mode HILIC-1 及 Acclaim HILIC-10 柱, 发现 AICA ribotide 在 Acclaim HILIC-10 上可以很好的保留, 但是仍然与血浆和肿瘤里的基质分不开。

尝试使用 on-line SPE 对样品进行分析, 经过不同 SPE 小柱的结果比较后, 选取 Acclaim Mix-Mode WAX-1 Guard 柱作为 SPE 小柱萃取血浆和肿瘤里的 AICA ribotide。通过对不同的分析柱的结果比较后发现, 没有柱子能够对 AICA ribotide 和其余组分达到基线分离, 但是从 Acclaim HILIC-10 柱对 SPE 小柱捕获的化合物组分分离结果 (如图 2 所示) 与 Acclaim Mix-Mode WAX-1 柱对 SPE 小柱捕获的化合物组分分离结果 (如图 3 所示) 可以看出, AICA ribotide 在两个柱子中出峰时间相似的化合物不是同一个化合物, 所以选择 Acclaim HILIC-10 柱作为一维柱, 而选择 Acclaim Mix-Mode WAX-1 柱作为二维柱。

整个实验的最终结果是 Acclaim Mix-Mode WAX-1 Guard 柱作为 SPE 小柱萃取血浆和肿瘤里的 AICA ribotide, 而 AICA riboside 与基质一起不被 Acclaim Mix-Mode WAX-1 Guard 柱保留而被冲洗到 CG16 里进行分析进入检测器, 当 AICA riboside 被检测器检测到之后, 通过阀切换将包括 AICA ribotide 在内的保留在 Acclaim Mix-Mode WAX-1 Guard 柱的样品反冲到第一维 Acclaim HILIC-10 柱上进行分析, 然后将 AICA ribotide 出峰时间的流份通过阀切换切到第二维 Acclaim Mix-Mode WAX-1 柱上进行分离, 达到 AICA ribotide 与基质的完全的基线分离, 如图 4、5 所示。

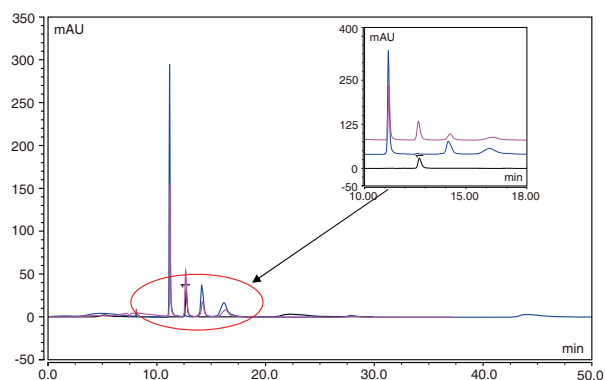


图 2 Acclaim HILIC-10 柱对 SPE 小柱捕获的化合物组分分离结果
(黑色为 AICA ribotide 标准品, 蓝色为肿瘤样品, 红色为肿瘤加标样品)

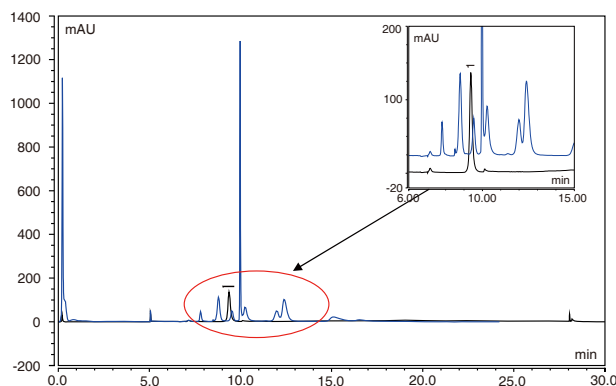


图 3 Acclaim Mix-Mode WAX-1 柱对 SPE 小柱捕获的化合物组分分离结果
(黑色为 AICA ribotide 标准品, 蓝色为肿瘤样品)

AICA riboside 和 AICA ribotide 的分离谱图

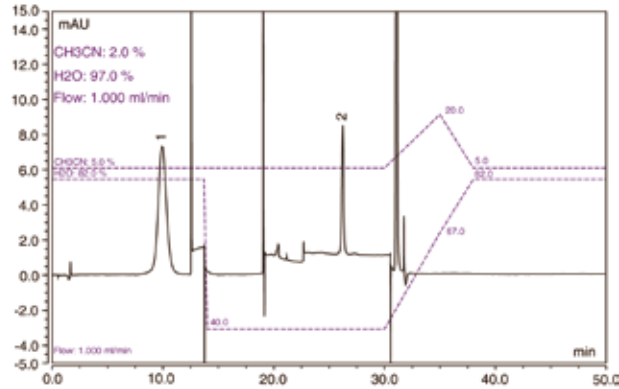


图 4 5 μ g/mL 的 AICA riboside 和 AICA ribotide 标准品
(1 为 AICA riboside, 2 为 AICA ribotide)

小鼠给药后血浆和肿瘤谱图

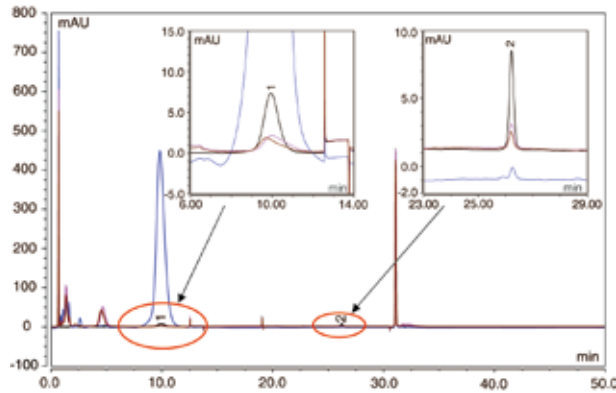


图 5 给药 0h, 1h 和 2h 后的小鼠血浆和标准品对比图谱
(1 为 AICA riboside, 2 为 AICA ribotide; 黑色为 5 μ g/mL 的 AICA riboside 和 AICA ribotide 标准品混合物, 蓝色为给药 0h 小鼠血浆样品, 红色为给药 1h 小鼠血浆样品, 棕色为给药 2h 小鼠血浆样品)

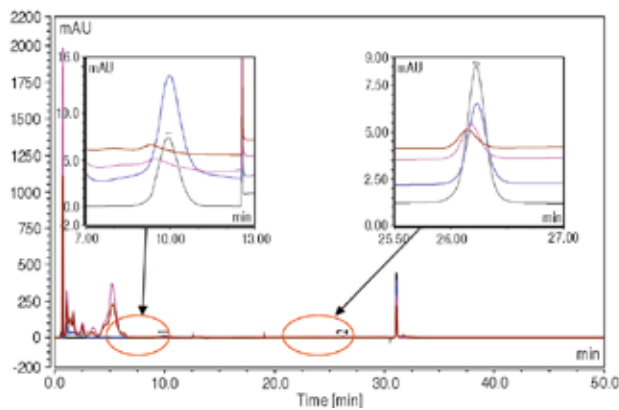


图 6 给药 0h, 1h 和 2h 后的小鼠肿瘤和标准品对比图谱
(1 为 AICA riboside, 2 为 AICA ribotide; 黑色为 5 μ g/mL 的 AICA riboside 和 AICA ribotide 标准品混合物, 蓝色为给药 0h 小鼠血浆样品, 红色为给药 1h 小鼠血浆样品, 棕色为给药 2h 小鼠血浆样品)

样品检测结果

表 3 给药 5min、10min、15min、30min、1h、2h、3h 及 4h 后的小鼠肿瘤中的 AICA riboside 和 AICA ribotide 峰面积结果

| | AICA riboside (mAU*min) | AICA ribotide (mAU*min) |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| 5min | 8.2594 | 7.5741 |
| 10min | 3.7185 | 8.4146 |
| 15min | 1.136 | 4.1822 |
| 30min | 1.0812 | 4.6812 |
| 1h | 0.5102 | 3.6921 |
| 2h | 0.159 | 2.3577 |
| 3h | 0.1907 | 3.7135 |
| 4h | 0.0685 | 0.0934 |

表 4 与甲氨喋呤同时给药 5min、10min、15min、30min、1h、2h、3h 及 4h 后的小鼠肿瘤中的 AICA riboside 和 AICA ribotide 峰面积结果

| | AICA riboside (mAU*min) | AICA ribotide (mAU*min) |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| 5min | 13.4058 | 18.569 |
| 10min | 7.0712 | 17.7688 |
| 15min | 4.968 | 18.1556 |
| 30min | 1.8691 | 7.4287 |
| 1h | 1.5929 | 8.0566 |
| 2h | 0.5819 | 7.39 |
| 3h | 0.7091 | 9.4042 |
| 4h | 0.3542 | 8.0372 |

结论

本实验将 on-line SPE 和二维分析结合到一起对肿瘤和血浆中的复杂成分进行分析, 很好的实现了原形药物 AICA riboside 和代谢产物 AICA ribotide 的分离, 也实现了两个目标化合物与肿瘤和血浆中的基质的基线分离。实验中分别对给药若干小时后的小鼠的血浆和肿瘤进行了分析, 得到了原形药物 AICA riboside 和代谢产物 AICA ribotide 的变化规律, 为之后的药代动力学的研究提供了基础。

DGLC-28 二维液相色谱纯化和分析单克隆抗体

关键词：单克隆抗体；纯化；分析；二维液相

DGLC-28 Development of an Automated Method for Monoclonal Antibody Purification and Analysis by 2D-HPLC

Key words: Monoclonal Antibody, Purification, Analysis, 2D-HPLC

引言

在生物制药的每个生产环节，产品的纯化和分析过程至关重要。早期抗体的质量控制过程中，需要测定样品的效价、聚集体和电荷亚型。单克隆药物（MAb）产品中两个主要的杂质是电荷亚型单抗和单抗聚集体，这些副产物会产生与主产品不同的药效，有时会引起严重的副作用，如抗药性抗体的形成。蛋白聚体是在生产过程、纯化或者运输过程中产生（如温度，pH 的影响）。

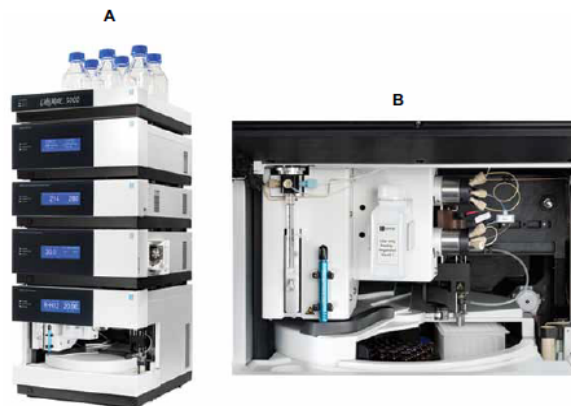


图 1 (A) UltiMate™ 3000 钛系统
(B) WPS-3000T(B)FC 生物兼容的自动进样器和收集模块。

在抗体的纯化过程中，第一步用蛋白亲和色谱进行分离。在 Protein A 或 G 色谱柱上进行亲和色谱一步分离后纯度能达到 95% 以上。为了确定纯化的效率、样品的纯度和抗体的质量，需要采用离子交换色谱（IEC）或者体积排阻色谱（SEC）进行测定。SEC 技术用来确定抗体的聚体和体积异构体。离子交换色谱的固定相能够对蛋白类生物药物的不同电荷亚型进行分离，通过优化色谱条件可以将这些具有细微变化的亚型分离开。

本文讨论了采用一套 HPLC 系统（如图 1A）实现单克隆抗体的自动纯化和分离（IEC 或 SEC）。二维液相色谱可实现复杂蛋白的全自动分析。HPLC 系统的自动进样器具有进样、收集样品和再进样的功能。整个过程可通过赛默飞变色龙软件实现全自动运行。

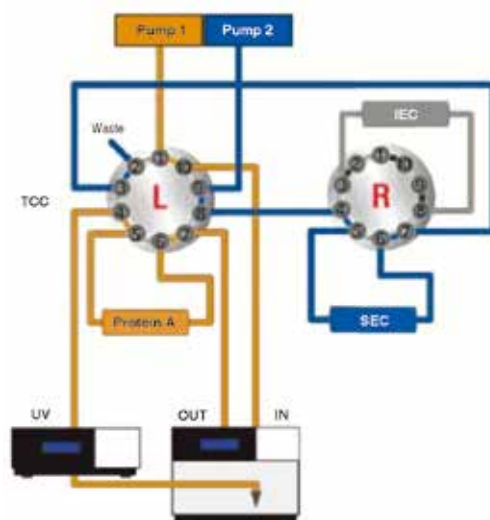


图 2 自动离线 2D 系统结构图（带收集功能的 WPS-3000T(B)FC 自动进样器）

测试条件

HPLC 实验配置 Dionex Ultimate 3000 钛系统：

SRD-3600 真空脱气机

DGP-3600BM × 2 双梯度泵系统

TCC-3000SD 柱温箱，带生物兼容的切换阀

WPS-3000T (B) FC 分析型，双阀自动进样器

VWD-3400RS 紫外检测器带 2.5μL 池子

带有样品收集控制功能的变色龙软件是用来设置 Dionex WPS-3000T (B) FC 自动进样器的一些高级功能。软件收集样品的扩展功能可以根据时间和峰的起始点进行收集。在样品富集的实验中进行连续或者部分收集。

自动离线 2D-LC 包括如下过程：

- 进样 50-250μL 的未纯化的单克隆抗体 / 多聚单克隆抗体
- 一维亲和色谱（1D）：在 2.0ml/min 条件下
 - 色谱柱清洗 / 平衡 0.75min
 - 样品洗脱 1min
 - 色谱峰检测后用自动进样器收集到样品盘中
 - Protein A 色谱柱再生后准备下次进样
 - 总的分析时间 3min
- 二维分析（2D）（下面二选一）：
 - 强阳离子交换色谱，NaCl 盐梯度洗脱（20mM MES 缓冲液，pH5.6）
 - SEC 分离（200mM 磷酸钠缓冲液，250mM NaCl，pH6.8）
 样品进入二维分离之前，在收集的样品中添加中性缓冲液（Tris，0.1M）来提高其 pH。由自动进样器准确控制加入的体积。

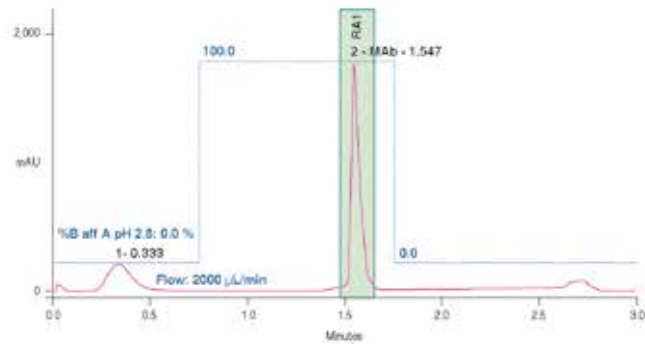


图 3 1D 亲和色谱分离 MAb 色谱图 (绿色标记峰收集的部分)

LC 条件

Protein A 亲和色谱

一维用 AB Poros Protein A 色谱柱 (20µm, 4.6mm i.d. × 50mm, 0.8mL), 紫外 214/280nm 检测波长。进样 50-250µL 之间, 使用大定量环进样, 并采用自定义进样模式。

亲和色谱条件:

流动相 A: 10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH7.0

流动相 B: 50mM 甘氨酸-HCl, 150mM NaCl, pH2.8

1D 维梯度: 100% 流动相 A 清洗和平衡 0.75min

流速: 2.0ml/min

温度: 25°C

离子交换色谱

Thermo Scientific MAbPac SCX -10 (4mm i.d. × 250mm) 色谱柱阳离子交换模式, MES 缓冲液 /NaCl 梯度分离, 214/280nm 紫外检测波长。

流动相 A: 20mM MES 缓冲盐, 60mM NaCl, pH5.6

流动相 B: 20mM MES 缓冲盐, 300mM NaCl, pH5.5

2D 维梯度: 30min 内 15-45%B; 6min 100%B 清洗; 10min 15%B 平衡

流速: 1.0ml/min

温度: 30°C

体积排阻色谱

Thermo Scientific MAbPac SEC -1 (4mm i.d. × 300mm) 色谱柱分离蛋白聚体

流动相: 200mM 磷酸钠缓冲盐, 250mM NaCl, pH6.8

结果和讨论

测定图谱与结果

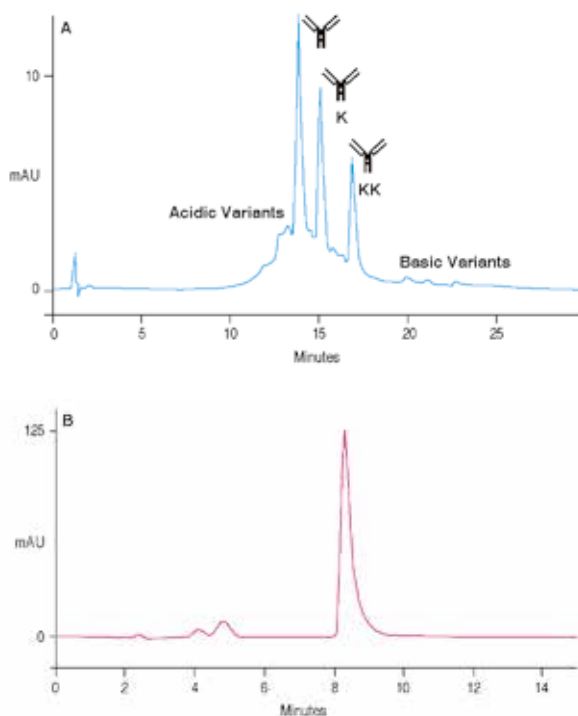


图 4 (A) 2D IEC 分离纯化后 MAb 色谱图 (MAbPacSCX-10, 250 × 4.6 mm i.d.) ; (B) 2D SEC 分离纯化后 MAb 色谱图

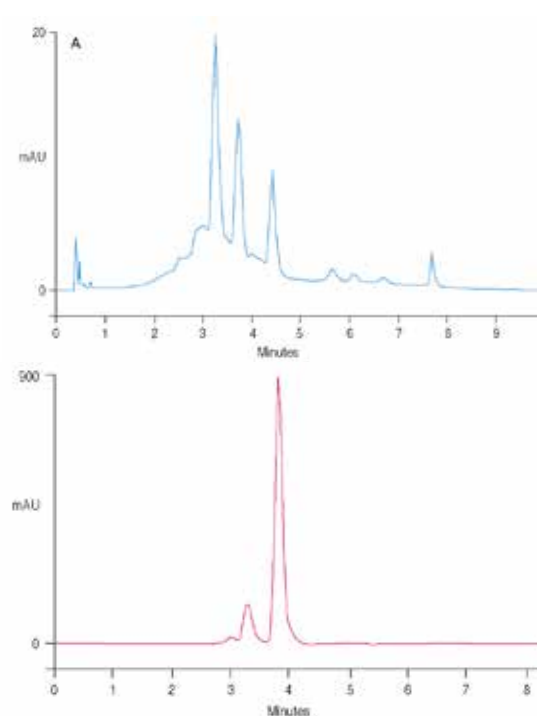


图 5 (A) 15min 分析时间, 2D IEC 分离纯化后 MAb 色谱图 (MAbPacSCX-10, 150 × 4.6 mm i.d.) ; (B) 2D SEC 分离纯化后 MAb 色谱图 (MAbPac SEC-10, 150 × 4 mm i.d.)

自动进样器将样品带入色谱柱, 在流动相 A 平衡一段时间后, 用流动相 B 将抗体粗品从 Protein A 色谱柱上洗脱下来, 同时紫外检测器监测色谱峰, 用自动进样器将样品收集在 96 孔板内 (图 3)。通过保留时间或者色谱峰的信号参数来收集需要的色谱峰, 在此过程中需要考虑大概 5S 的收集延迟时间。变色龙软件可以准确控制收集到样品的体积, 然后分别加入样品收集体积 15% 的中性缓冲盐来提高样品的 pH 值。

当自动进样器按照要求对样品进行收集后, 软件自动开始进行 2D 的分析。例如二维为强阳离子交换色谱 (样品所带电荷差异); 或者 SEC 根据抗体的尺寸或者聚体大小分离。离子交换色谱图显示重链 C 端赖氨酸不同亚型的三个较大的色谱峰, 同时可以清晰看到一系列碱性和酸性亚型的色谱峰。

由 1D 分离完成后, 软件自动生成 2D 的测定序列。通过提高流速可提高样品批处理效率, 大大缩短 SEC 和亲和色谱分离的时间, 同样也可以优化梯度时间来提高 IEC 的分离速度。

加速分析

根据分离的需要, 可以优化一些条件。在高通量分析时可考虑缩短色谱柱。或者 IEC 分离时采用 pH 梯度加快分离速度。IEC 和 SEC 快速分离的结果如图 5A 和 5B。

讨论

在离线二维分析过程中, 双阀 WPS-3000T (B) FC 自动进样器可在较快流速下进行样品收集和再进样, 这个过程可配置不同的分离模式 (亲和色谱后接 IEC 或 SEC; RP 和不同 pH 水平的 RP 分离; SPE 和 RPLC); 也可以 IEC 带馏分收集、浓缩或者作为 MS 前端的脱盐处理等。因此该模型可以作为生物医药和蛋白分析的一个多功能色谱分析技术平台。

同时, 变色龙软件可以满足所有的这些应用, 并能灵活方便的控制整个过程。包括样品的进样、衍生、纯化和 HPLC 分析。从而使仪器能够满足样品纯化、HPLC 标准分析和 QC 控制等多方面应用。

参考文献

- [1]. Dionex Corporation. Analysis of Monoclonal Antibody Heterogeneity by Cation-Exchange Chromatography: Separation of C-Terminal Lysine Variants. AN 127, LPN1047-01, 2009, Sunnyvale, CA.
- [2]. Dionex Corporation. Monitoring Monoclonal Antibody Stability by Cation-Exchange Chromatography. AN 128, LPN1052-01, 2007, Sunnyvale, CA.
- [3]. Dionex Corporation. The MAb Pac SCX-10 Column for Monoclonal Antibody Variant Analysis. Datasheet, LPN2567-03, 2007, Sunnyvale, CA.
- [4]. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* 2009, 81 (21), 8846–88575.
- [5]. Rea, J. C.; Moreno, T.; Lou, Y; Farnan, D. Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54 (2), 317-323.

DGLC-29 全自动在线固相萃取 - 二维高效液相与质谱联用法测定辣椒油的苏丹红

关键词: 苏丹红; 高效液相色谱; 二维液相色谱; 在线固相萃取; 辣椒油

DGLC-29 Two-Dimensional HPLC Combined with On-Line Solid- Phase- Extraction and Mass Spectrometry for Determination of Sudan Dyes in Chili Oil

Key words: Sudan dyes, High performance liquid chromatography, Two-dimensional liquid chromatography, On-line SPE; Chili oil

引言

苏丹红 (Sudan dyes) 是一种人工合成的偶氮类、油溶性的化工染料, 被广泛的用于溶剂、油、蜡和汽油的增色以及鞋、地板的增光。一旦被摄入人体, 极易溶解在肌体组织如脂肪中。由于不具水溶性, 因而不会在消化和循环过程中随尿液排出体外。如果长期较大剂量地摄入, 就会在体内累积而对肌体造成损伤或基因突变而致癌。被违禁用于食品着色的苏丹红染料通常有苏丹红 I、II、III、IV, 都有致癌毒性^[1]。

由于苏丹红属强脂溶性物质, 提取溶剂多为乙腈、乙醇、甲醇、正己烷、环己烷、石油醚等有机溶剂^[2]; 同时, 为了提高萃取效率, 在萃取过程中通常还需要辅以超声^[3]或微波^[4]提取。而提取液的净化则主要以固相萃取^[5], 凝胶渗透色谱^[6], 薄层色谱^[7]和分散固相萃取方法^[8]等技术。目前用于测定食品中苏丹红的方法有色谱、质谱、色-质联用、光谱、电化学、酶联免疫吸附、分子印迹等, 但最常用的仍是高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC), 并且中国^[5]和欧盟^[9]均颁布了 HPLC 测定食品中的苏丹红的标准方法。但使用 HPLC 方法测定复杂基质如辣椒油中的苏丹红时, 样品前处理要求较高。例如, 国标 GB/T19681 - 2005 使用正己烷萃取, 碱性氧化铝净化^[5], 致使有机溶剂消耗量大, 步骤十分繁琐, 而且由于氧化铝的活化程度直接影响净化效果, 而氧化铝的活化程度又难以准确控制, 造成方法重现性不能令人满意。

在本研究中, 利用双三元高效液相色谱系统, 采用二维色谱结合在线固相萃取技术 (on-line solid phase extraction, on-line SPE) 完成辣椒油样品中四种苏丹红的测定。完成萃取的样品首先在一维色谱柱上粗分, 通过阀的分段切换将被测组分在线依次引入到 SPE 柱上富集, 再通过阀切换将富集在 SPE 柱上的苏丹红转移到二维色谱流路上完成分析。当富集在 SPE 柱上的苏丹红被冲出富集柱后进入二维色谱流路后, 阀立即切换回初始状态。此时二维色谱柱上的分析过程继续进行, 而一维色谱柱则进行平衡, 等待下一次进样。相对于传统的离线固相萃取 (off-line SPE) 方法, 本方法实现了样品的自动化净化、富集和测定, 既节省了时间、又避免了试验人员大量接触有机溶剂, 大大提高了分析效率。

测试条件

仪器和试剂

赛默飞 UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 配置六通道在线脱气机 (SRD 3600 solvent rack with degasser)、双三元超快速梯度泵 (DGP-3600 RS pump)、可调速泵 (LPG-3400 pump)、自动进样器 (WPS-3000T RS autosampler)、带 2 个 2 位 -10 孔切换阀的柱温箱 (TCC-3000 thermostatted column compartment equipped with two 2p-10p valves)、二极管阵列检测器 (DAD-3000 RS UV-vis detector), MSQ Plus 单四极杆质谱检测器, 变色龙色谱管理软件 Chromeleon 6.8

SR11。IKA 旋涡振荡器 (德国 IKA 集团)

二次去离子水 (电阻率 ≥ 18.2 M Ω /cm), 乙腈、甲醇 (色谱级, Fisher 公司), 甲酸、四氢呋喃 (色谱级, 国药集团化学试剂有限公司), 二氯甲烷 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 苏丹红 I、II、III 和 IV 4 种标准物质均购自于 Sigma-Aldrich 公司。

全自动二维高效液相色谱结合在线固相萃取与质谱检测的流程及测定条件

全自动二维高效液相色谱结合在线固相萃取与质谱检测的流程如图 1 所示。其中, 左侧 (Valve L) 和右侧 (Valve R) 十通切换阀的切换时间如表 1 所示。

一维色谱用于粗分苏丹红 I~IV, 并随后通过阀切换使它们依次被富集在 SPE 柱上。其流路从双三元梯度泵 (DGP-3600 RS pump) 的左泵 (L) 开始, 此时左 (Valve L)、右 (Valve R) 切换阀均在 1-10 位。苏丹红 I~IV 的分离以水—乙腈—甲醇 / 四氢呋喃 (1:1, v/v) 为流动相, 在分析柱 1 (Analytical Column 1) Acclaim PAII (3 μ m, 3.0 \times 150 mm) 上进行。进样体积 20 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 0.6 mL/min, 梯度洗脱, 在波长 500 nm 处监测分离状况。梯度为: -3.5 ~ -0.5 min, 30% 水, 50% 乙腈, 20% 甲醇 / 四氢呋喃; 5.5 min, 50% 乙腈, 50% 甲醇 / 四氢呋喃; 11 ~ 14 min, 20% 乙腈, 80% 甲醇 / 四氢呋喃; 14.1 ~ 23 min, 30% 水, 50% 乙腈, 20% 甲醇 / 四氢呋喃。根据在二极管阵列紫外 - 可见检测器 (DAD UV-vis detector) 上监测到的 4 种苏丹红的出峰时间, 确定在右侧阀上 1-10 位与 1-2 位之间的数次适当切换, 将 4 种苏丹红依次引入到 SPE 柱 (Acclaim 120 C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 10 mm) 上, 完成在线净化和富集。与此同时, 右泵 (R) 用于二维色谱流路中分析柱 2 的平衡。另外, 如图 2 所示, 在左阀的 10 位与右阀的 1 位之间加了一个稀释泵 (dilution pump), 以 1.0 mL/min 流速连续注入浓度为 0.1% 的甲酸水溶液, 用以稀释来自于二维色谱中使用的高比例有机溶剂流动相, 以利于苏丹红 I~IV 在 SPE 柱上富集 (本研究中使用的是四元低压泵, 可采用普通可调速蠕动泵替代)。

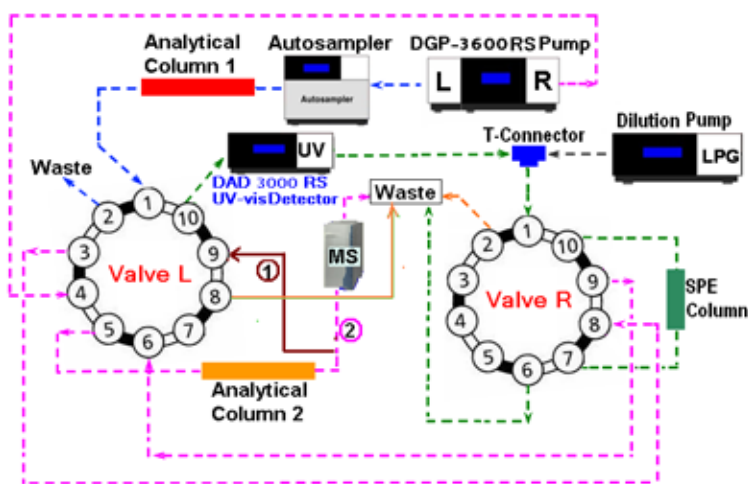


图 1. 全自动二维高效液相色谱结合在线固相萃取、紫外 - 可见和质谱检测的流程 (方法开发时通过流路 ①使用二极管阵列紫外 - 可见列检测器; 检测样品时通过流路②使用 MS 检测器)

表 1 阀切换时间表

| 切阀时间 | | -3.5 | -0.5 | 4.72 | 5.5 | 5.94 | 6.13 | 6.78 | 6.96 | 7.53 | 7.70 | 8.0 | 23 |
|----------------------------|-------------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|-----|----|
| Valve switching time (min) | | | | | | | | | | | | | |
| 左阀 | | | | | | | | | | | | | |
| 位置 | Valve left | 1-10 | 1-2 | | | | | | | | | | |
| 右阀 | | | | | | | | | | | | | |
| Position | Valve right | 1-10 | 1-2 | 1-10 | 1-2 | 1-10 | 1-2 | 1-10 | 1-2 | 1-10 | 1-2 | | |

在一维 (Acclaim 120 C₁₈, 5 μ m, Guard Cartridge, 4.6 \times 10 mm, use V-2 holder) 色谱柱上完成净化和富集后, 左、右阀均切换至 1-2 位。此时, SPE 柱被接入从右泵 (R) 开始的二维色谱流路, 而一维色谱流路则进行分析柱 1 的平衡。

二维色谱以水—乙腈—甲酸/乙腈 (0.1:100, v/v) 为流动相, 富集在 SPE 柱上的苏丹红 I~IV 被洗脱后在分析柱 2 (Analytical Column 2) Acclaim RSLC 120 C₁₈ (2.2 μm, 2.1 × 100 mm, 上) 进行分离。流速 0.3 mL/min, 梯度洗脱, 单四极杆质谱仪进行定性和定量。梯度: -3.5~7.0 min, 40% 水, 50% 乙腈, 10% 甲酸/乙腈; 16~22.4 min, 90% 乙腈, 10% 甲酸/乙腈; 12.5~23 min, 40% 水, 50% 乙腈, 10% 甲酸/乙腈。质谱条件: 采用 ESI+ 离子模式, 源温度 450℃, 电压 4000 V。苏丹红 I~IV 的 SIM 模式分别为 249, 277, 353 和 381 m/z。滞后时间 (Dwell Time) 为 0.2 秒, 锥空电压 (Cone Voltage) 分别为 35 V (苏丹红 I、II) 和 50 V (苏丹红 III、IV), 雾化气压力 5 bar。

样品前处理方法

对照品溶液制备

混合标准储备液 1 (100 mg/L): 将分别精密称取的 10 mg 苏丹红 I、II、III 和 IV 标准品置于同一只 100 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 摇匀至完全溶解。

混合标准储备液 2 (0.5 mg/L): 准确量取 0.5 mL 标准储备液置于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 摇匀。

混合标准工作溶液: 分别量取适量的混合标准储备液 2 置于容量瓶中, 用水稀释定容成浓度分别为 0.5、2.0、5.0、10、30 和 60 μg/L 的标准工作溶液用于绘制标准工作曲线。

供试品溶液制备

精密称取 1 g (精确至 0.1 mg) 辣椒油置于 100 mL 容量瓶中, 加入 20 mL 二氯甲烷溶剂, 旋涡振荡 5 min 后超声 30 min, 用乙腈定容至刻度, 再次超声 15 min 后, 移取 10 mL 混合液至离心管中, 以 10000 r/min 离心 10 min, 取上层乙腈过滤 0.45 μm 滤膜过滤, 待测。

结果和讨论

样品前处理方法探讨

样品前处理分为提取和净化两步。由于苏丹红具有高脂溶性, 传统提取方法多用非极性有机溶剂提取。在欧盟的官方方法 03/99 中^[9], 对于辣椒油样品中的苏丹红 I、II 用乙腈提取, 而苏丹红 III、IV 则采用二氯甲烷提取。在本研究中, 尝试了采用纯乙腈提取 4 种苏丹红, 结果显示, 苏丹红 I、II 回收率高, 而苏丹红 III、IV 的回收率偏低。因此, 提取溶剂仍采用乙腈和二氯甲烷分步提取, 同时采用旋涡振荡和超声方式改善回收率。

样品净化是针对油类等具有复杂基质的样品的前处理的关键。国标方法^[5]推荐使用活度四级的中性氧化铝作为吸附剂进行离线固相萃取。但由于中性氧化铝活度难以控制, 且目前没有已调整好活度的氧化铝商品供应, 从事相关检测的实验室都不得不自行进行氧化铝活化、脱活及活度测定, 不仅增加了实验人员的工作量, 而且无法严格控制中性氧化铝的活化过程, 造成检验结果重现性差。本方法采用在线二维色谱结合在线固相萃取净化技术, 首先样品在一维色谱上预分离, 通过分段切入技术, 依次将四种苏丹红保留到富集柱上, 而大部分的杂质则进入到废液, 保证了绝大部分干扰物质不会进入二维色谱。提高了净化效果的同时, 也实现了净化过程的完全自动化, 大大提升了方法的重现性。

实验配置的优化

图 1 显示了包括 2 个 10 通切换阀、2 根分析色谱柱、1 根 SPE 柱、2 台检测器 (DAD 二极管阵列紫外-可见和质谱检测器), 以及 2 台泵 (双三元超快速梯度泵和可调速泵) 的全自动二维高效液相色谱结合在线固相萃取与质谱检测的流程图。在实验方法开发时, 将二维色谱柱的出口连接到左阀的 9 号位上 (如图 1 中①所示), 此时 DAD 二极管阵列紫外-可见检测器通过阀切换可依次监测一维和二维色谱的分离情况。待方法完成后, 再将出口直接连接到质谱检测器上 (如图 1 中②所示), 利用其高选择性来提高方法的灵敏度, 对被测组分进行定性和定量; 而 DAD 二极管阵列紫外-可见检测器仍可用以监测被测组分在一维色谱流路的分离状况。

在该方法中, 样品净化作用多由一维色谱柱配合阀切换来完成, SPE 小柱的作用主要是富集。由于苏丹红的高脂溶性, 一维色谱流动相中有机溶剂比例较高时才能将苏丹红组分从一维色谱柱中顺利洗脱。但此时如果直接将 SPE 柱接入流路, 四种苏丹红均不能被保留。因此, 在左阀的 10 位与右阀的 1 位之间加了一个稀释泵, 以一定的流速连续注入与二维色谱流动相相匹配的、浓度为 0.1% 的甲酸水溶液, 对来自于一维色谱流路的流动相进行

稀释,使其能够保留在 SPE 柱上,从而完成富集。本研究还评估了稀释泵流速的变化对 SPE 小柱富集 4 种苏丹红效果的影响。试验结果表明,在流速不低于 1.0 mL/min 时,4 种苏丹红均可获得 100% 富集。因此,稀释泵上采用流速 1.0 mL/min。

色谱条件的优化

考察了采用不同的反相色谱柱对四种苏丹红的分离情况,发现 4 种苏丹红在 Acclaim PAII 和 120 C₁₈ 上均具有很好的分离效果。在一维色谱中,采用柱容量大一些的色谱柱 (Acclaim PAII, 3 μm, 3.0 × 150 mm) 来提高样品的上样量;而在二维色谱中,为了获得更好的色谱峰形和分离度,以及与质谱检测匹配,采用了粒径和尺寸更小的 UHPLC 色谱柱 (Acclaim 120 C₁₈, 2.2 μm, 2.1 × 100 mm)。另外,在流动相中加入四氢呋喃 (THF),以利于延长辣椒油样品中天然色素的保留时间,并使其呈现更窄的峰形,从而消除天然色素带来的干扰。

方法的重现性

取辣椒油样品,加入适量的苏丹红标准混合溶液,使之加入的苏丹红 I、II、III、IV 的浓度均为 1 mg/Kg,在所选定的实验配置和条件下,连续进样 7 次,考察方法的重现性,结果见表 2。被测组分的保留时间和峰面积的相对标准偏差均小于 2%,表明本方法具有很好的重现性。

表 2 方法重现性 (7 次重复测定)

| 苏丹红 | 相对标准偏差 | | 苏丹红 | 相对标准偏差 | |
|-----|--------|-------|-----|--------|-------|
| | 保留时间 | 峰面积 | | 保留时间 | 峰面积 |
| I | 0.090 | 1.211 | III | 0.052 | 1.350 |
| II | 0.060 | 0.871 | IV | 0.064 | 1.933 |

线性关系和方法检出限

取苏丹红 I、II、III、IV 混合标准工作溶液,按所选定的实验配置和条件进行分析。以峰面积对质量浓度 (μg/L) 进行线性回归。4 种苏丹红在 0.5 ~ 60 μg/L 的浓度范围内呈现良好的线性关系,线性相关系数 (r²) 均 ≥ 0.9958。苏丹红 I、II、III、IV 的检测限 (以信噪比 (S/N) 为 3 计),4 种苏丹红的检测限均 ≤ 0.20 μg/L,符合国标 (10 μg/L)^[5] 和欧盟官方 (13 μg/L)^[9] 液相色谱方法测定苏丹红的检出限要求。

样品测定及回收率

按样品制备方法和所选定的实验配置和条件,测定了某市售辣椒油样品。实验结果见表 3,显示在该样品中检测出了苏丹红 I、II 和 III。在同样辣椒油样品中加入适量苏丹红标准混合溶液,制备加标样品,并按所选定的实验配置和条件测定方法回收率,测定结果见表 3。4 种苏丹红回收率的范围在 67 ~ 97%,表明方法可用于实际辣椒油样品中 4 种苏丹红染料的测定。图 2 和 3 分别为辣椒油样品的紫外和质谱总离子流 (Total ionic current, TIC) 色谱图。

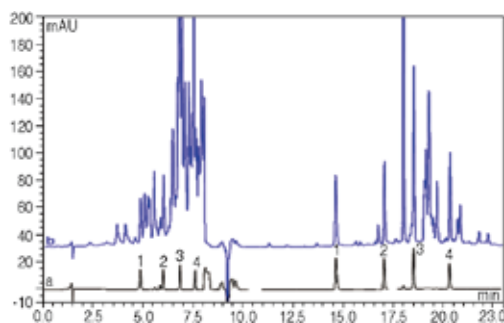


图 2 辣椒油样品的紫外色谱图

a) 混合标准溶液 (4 个组分均为 2 mg/mL), b) 加标辣椒油样品 (苏丹红组分均为 6 mg/mL), 二维色谱数据采集时间, 10 min, 色谱峰: 1- 苏丹红 I, 2- 苏丹红 II, 3- 苏丹红 III, 4- 苏丹红 IV

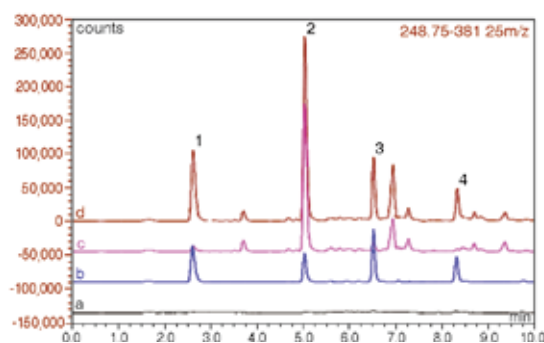


图3 辣椒油样品的质谱总离子流色谱图

a) 空白 (乙腈); b) 混合标准溶液 (苏丹红 II、III 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$, 苏丹红 I、IV 浓度为 15 $\mu\text{g/L}$); c) 辣椒油样品;
d) 加标辣椒油样品 (苏丹红 II、III 浓度为 10 $\mu\text{g/L}$, 苏丹红 I、IV 浓度为 30 $\mu\text{g/L}$);
色谱峰: 1- 苏丹红 I, 2- 苏丹红 II, 3- 苏丹红 III, 4- 苏丹红 IV

表3 辣椒油样品中苏丹红 I、II、III、IV 的测定结果

| 苏丹红 | 原样品中检测值 ($\mu\text{g/L}$) | 加标量 ($\mu\text{g/L}$) | 加标后测得量 ($\mu\text{g/L}$) | 回收率 (%) |
|-----|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|
| I | 2.0 | 30 | 31 | 97 |
| II | 29 | 10 | 37 | 80 |
| III | 0.6 | 10 | 7.3 | 67 |
| IV | Not detected | 30 | 24 | 80 |

结论

二维色谱应用多见于蛋白、多肽、指纹图谱等研究领域, 本研究中通过整合在线富集净化技术将其成功的应用到常规分析领域。充分利用二维色谱较强的分离能力, 实现了净化过程的完全自动化, 成功地完成了辣椒油中 4 种苏丹红的测定, 克服了标准方法使用特定活度氧化铝离线固相萃取方法存在的耗时、耗力及重现性差的问题。在为辣椒油中苏丹红的测定提供实用的技术手段的同时, 也为解决复杂基质中目标化合物的分析提供新的有效手段。

参考文献

- [1]. Assessment Report of the Risk of Sudan Dyes, Notice 5, 2005, Ministry of Health of the People's Republic of China, Beijing, China.
苏丹红危险性评估报告. 中华人民共和国卫生部公告 2005 年第 5 号, 北京.
- [2]. PANG, Yan-Ling. Food and Fermentation Industries (Chin.), 2008, 34 (3), 114 – 119.
庞艳玲, 食品与发酵工业, 2008, 34 (3), 114—119.
- [3]. Zacharis C K, Kika F S, Tzanavaras P D, Rigas P K, Efstratios R. Talanta, 2011, 84, 480 – 486.
- [4]. Ridgway K, Laljie Sam P D, Smith R M. J. Chromatogr. A, 2007, 1153, 36 – 53.
- [5]. GB/T19681 – 2005, The Method for the Determination of Sudan Dyes in Foods—High Performance Liquid Chromatography, National Standard of the People's Republic of China.
食品中苏丹红染料的检测方法高效液相色谱法. 中华人民共和国国家标准, GB/T19681 – 2005.
- [6]. Pardo O, Yusà V, León N, Pastor A. Talanta, 2009, 78, 178 – 186.
- [7]. Rebane R, Leito I, Yurchenko S, Herodes K. J. Chromatogr. A, 2010, 1217, 2747 – 2757.
- [8]. LIU Hong-Cheng, TANG Li-Bin, LI Qi-Wan, LIU Jian-Fu, ZOU Yan-Hong. Chinese J. Anal. Lab., 2007, 26 (6), 37 – 40.
刘宏程, 唐利斌, 黎其万, 刘家富, 邹艳虹. 分析实验室, 2007, 26 (6), 37 – 40.
- [9]. Véréttout O, Demesse L, Szymanski L. Analysis and Dosage of the Colorants Sudan and Bixin in Chili Powder and Pepper-Based Products, Health & Consumer Protection Directorate—General, European Commission, NEWS notification: 03/99. (<http://files.instrument.com.cn/FilesCenter/20071202/7864.pdf>)

DGLC-30 全离线二维液相色谱与质谱检测技术联用在峰产率最大化方面的研究

关键词：二维液相；液质联用；峰产率

DGLC-30 Maximizing the Peak Production Rate in Off-line Comprehensive Two-dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection

Key words: Two-dimensional Liquid Chromatography, LC-MS, Peak Production Rate

引言

本文研究了一种在全离线二维液相色谱中如何在最短的分析时间内使得“峰产率”达到最佳效果的优化方法。色谱柱参数（填料大小、色谱柱长）和液相色谱条件（包括采样时间、梯度时间和斜率以及色谱柱平衡时间）的影响在本文中做了重点阐述。通过对复杂多变的蛋白质组学样品的分析，串联质谱与全离线二维液相色谱联用的巨大潜力得以发挥，此外，我们还对一维液相色谱和离线二维液相色谱的结果进行了对比。

在过去十年中，高效液相色谱法（HPLC）以其出色的分辨能力^[1-3]，自动化的分析过程（具有操作方便和重现性好的优点）^[4]，以及与质谱（MS）的电喷雾（ES）技术良好的兼容性等特点，已逐渐发展成为分离复杂蛋白质组学样品的重要技术^[5-6]。

衡量多肽梯度分离效果好坏的标准之一为峰容量，峰容量即在设定的梯度程序时间内能从色谱柱中洗脱出来并且分离度可以达到1的最多色谱峰的个数^[7]。在一维液相色谱（1D）中，峰容量主要由色谱柱参数（色谱柱长度和填料颗粒大小）和梯度持续时间决定。而色谱柱的最大容许长度由色谱柱填料的渗透性和高效液相色谱仪器的最大耐压所决定^[8-9]。经典的快速分离常常是在小颗粒硅胶（<2μm）填料填充的短柱上实现的，但在长时间梯度程序下，使用较大填料粒径的长色谱柱一维液相色谱也具有很好的分离效果^[10-11]。

尽管一维液相色谱可以实现上百种组分的分离，但多维分离手段却可以实现上千种组分的分离^[12-13]。在所有的二维液相色谱技术中，2D-LC(or LC×LC)在分离模式选择和色谱条件优化等方面具有很大的灵活性。这是由于离线二维液相色谱对流动相的匹配性，流速以及转移体积等的要求比在线二维液相色谱低很多^[14]。而且，离线二维液相色谱在将第一维液相色谱柱分离后的馏分收集起来后可以对样品进行二次分析。由于多肽在第一维和第二维之间可以进行预浓缩和脱盐处理，所以第二维由进样量引起的外部峰展宽可以降到最小化^[15]。因此对于蛋白质组学分离，第一维常常使用较大内径的色谱柱（1mm），以提高样品容量；第二维常常使用较小内径的色谱柱（75μm），从而提高质量灵敏度，并能与质谱更好地匹配。

要充分利用全二维液相色谱高的峰容量，第一维的保留分离机理应不同于第二维的保留分离机理，即使由于采样过疏，被分离的组分也不应丢失（例如，传到第二维的组分数太少）。在这样的情况下，二维液相色谱的峰容量（^{2D}n_c）的最大值可以通过如下公式计算：

$${}^{2D}n_c = {}^1n_c \times {}^2n_c$$

* ¹n_c 为第一维的峰容量，²n_c 为第二维的峰容量

本文研究一种在全离线二维液相色谱中如何在最短的分析时间内使得“峰产率”达到最好效果的优化方法。

测试条件

实验试剂与材料

乙腈（ACN，HPLC 梯度级）、三氟乙酸（TFA，ULC-MS 级）均购自 BiosoLve（范肯斯沃德，荷兰）；二

水磷酸二氢钠、氯化钠（分析纯）均购自 Sigma-ALdrich（斯坦海姆，德国）；磷酸（85%）购自 BioLab（耶路撒冷，以色列）

用于测试色谱柱峰容量的样品：细胞色素 C 的酶解液，六种蛋白混合物的酶解液，包含转铁蛋白，牛血清白蛋白， β -半乳糖苷酶，乙醇脱氢酶，溶菌酶和细胞色素 c 六种蛋白的胰蛋白酶酶解肽段（Dionex）。用于二维液相色谱实验的样品：九种蛋白混合物的胰蛋白酶酶解液，包括上面提到的六种蛋白，还有 β -酪蛋白，肌红蛋白和单克隆抗体（MAb）；大肠杆菌（E.coLi）酶解液（BioRad，佩斯利，英国）。

色谱柱：用于多肽的反相液相色谱分离：Acclaim Pepmap nanoLC 色谱柱（ C_{18} ，100 Å，75 μ m \times 150/500mm，3 μ m，赛默飞）；用于第二维之前多肽的预浓缩和脱盐：Acclaim Pepmap 捕获柱（ C_{18} ，100 Å，300 μ m \times 5mm，5 μ m）；用于离子交换色谱实验：多肽键合的强阳离子交换硅胶柱（300 Å，1mm \times 150mm，3/5 μ m）。

仪器、配置和色谱条件

所有的 HPLC 实验均在 UltiMate 3000 蛋白组学多维色谱系统（Proteomics MDLC）（赛默飞）上进行，配置有脱气机、两个二元梯度泵、柱温箱、自动进样器和两台紫外检测器。配置电喷雾（ESI）离子源的离子阱质谱仪（HCTuLtra，Bruker 公司，德国不莱梅）可实现在线与液相色谱系统连接。质谱仪是在正离子（PI）模式下工作，扫描范围 $m/z=300-1600$ ，干燥气流 4L/min，雾化气压 138kpa，干燥温度 300 $^{\circ}$ C，目标化合物荷比 $m/z=800$ 。通过 MASCOT 软件（Matrix Science，伦敦，英国）搜索多肽片段，进行蛋白质的鉴别。

在一维液相色谱中，柱温箱内配置了 nano 液相色谱柱，进样器和紫外检测（包含一个 3nL 的 Z 型检测池）之间由 20 μ m 内径的管路连接。进样量：1 μ L；流速：300-1000nL/min；流动相 A：0.05% 三氟乙酸水溶液；流动相 B：乙腈；0.04% 三氟乙酸水溶液 =80:20；梯度程序：流动相 B=4-55%；紫外检测波长：214nm。

关键点

- 1、为防采样过疏，提高第一维液相色谱峰容量最简单的方法就是缩短采样时间。而改善梯度时间和斜率或者改善色谱柱参数的方法次之。
- 2、色谱柱平衡时间对第二维液相色谱梯度时间的优化影响很大。当增加色谱柱柱长时，平衡时间也随之增加，从而减少在二维液相色谱的峰产率。
- 3、当要求分离的峰容量在 400 个以上时，离线的强阳离子交换色谱 / 反相高效液相色谱 (SCX/RPLC) 就分析时间而言比一维液相色谱具有更大的优势。

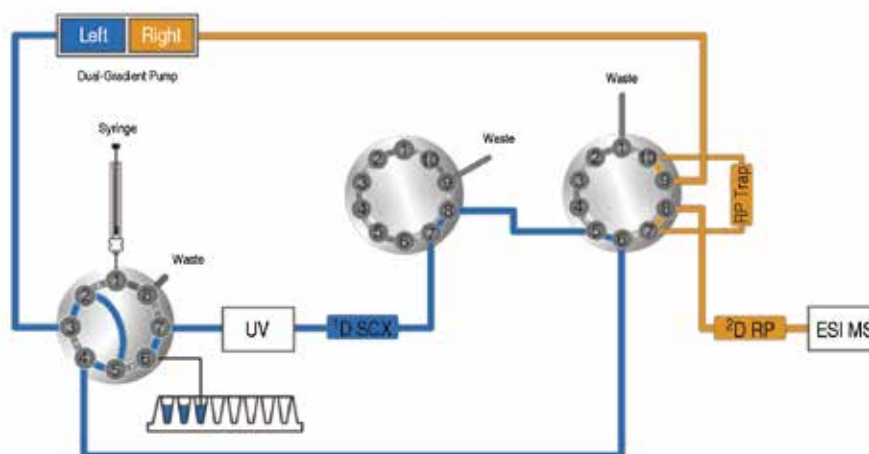


图 1 全自动离线二维液相色谱系统的色谱配置图

表 1 色谱柱参数、采样时间（每个峰切两次）、梯度时间以及第一维液相色谱收集到的组分数

| 色谱柱长 (mm) | 填料粒径 (μm) | 梯度时间 (min) | 峰宽 (s) | 采样时间 (s) | 采样量 (μL) | 收集到的组分数 |
|--------------|---------------------------|---------------|-----------|-------------|--------------------------|---------|
| 150 | 5 | 20 | 40 | 20 | 17 | 60 |
| 150 | 5 | 60 | 60 | 30 | 25 | 120 |
| 250 | 3 | 20 | 26 | 13 | 11 | 92 |
| 250 | 3 | 33 | 35 | 17.5 | 15 | 113 |
| 250 | 3 | 60 | 50 | 25 | 21 | 144 |

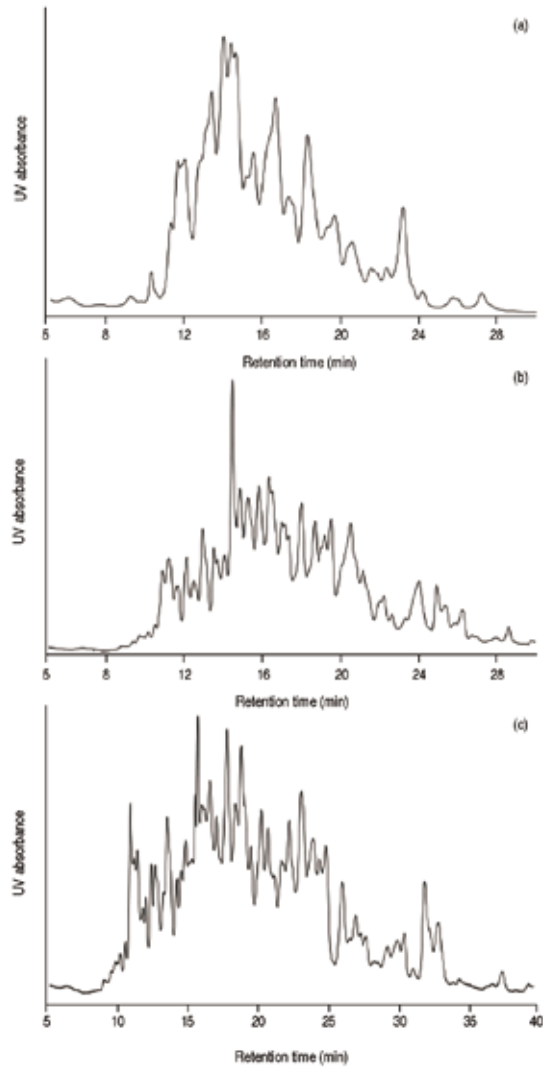


图 2 六种蛋白混合酶解液的强阳离子交换分离图
 (a: 色谱柱: 150mm, 5 μm , 梯度时间: 20min
 b: 色谱柱: 250mm, 3 μm , 梯度时间: 20min
 c: 色谱柱同 b, 梯度时间: 33min)

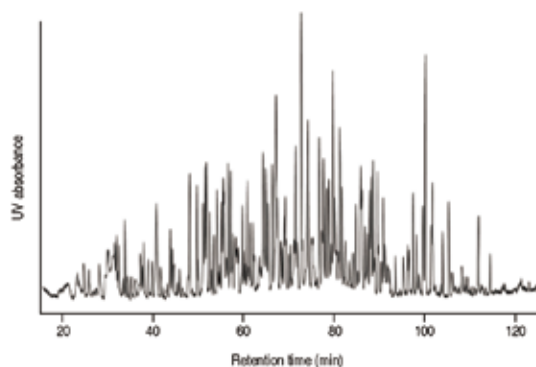


图3 六种蛋白混合酶解液的高分辨反相色谱分离图
(色谱柱: nano LC Acclaim Pepmap 柱 (C₁₈, 500mm, 3 μ m, 硅胶基质) 梯度时间: 120min)

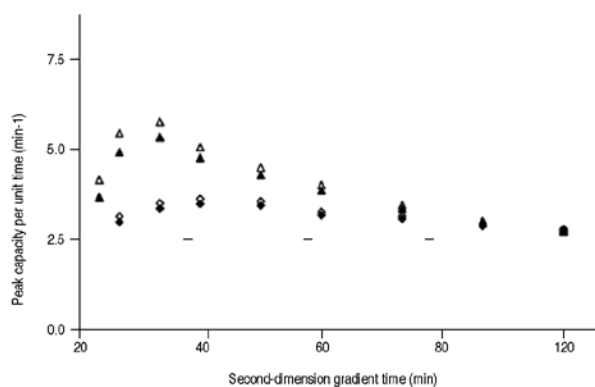


图4 第二维色谱中, 不同梯度时间和除盐时间下两种色谱柱对峰产率的影响图
(三角形图案代表 150mm nano RP 色谱柱, 方形图案代表 500mm nano RP 色谱柱,
空心图案代表除盐过程为 2min, 实心图案代表除盐过程为 5min)

图1为二维液相色谱系统的工作原理图。该自动化的离线二维液相的工作流程包括:

- 在第一维离子交换分离中, 采用孔板式自动进样器实现进样和分离组分的自动收集。
- 在捕获柱上实现多肽样品的重复进样、预富集以及脱盐步骤, 然后第二维中反相分离所有收集的组分。另外, 串联的质谱检测器用来鉴定各种肽段。

二维液相色谱的具体条件: 注入 2-10 μ L (10pmol) 的胰蛋白酶酶解的肽复杂混合物后, 走一个线性的盐梯度, 在 5mM 的磷酸缓冲液中, NaCl 线性梯度逐步从 0 上升到 600mM, 流速定为 50 μ L/min。流动相 A (水: 乙腈 =95:5, 5mM 的磷酸二氢钠缓冲液; pH=3); 流动相 B 为在流动相 A 中加入 1M 的 NaCl, 梯度从 0% 到 60% 的流动相 B。柱温定为 25 $^{\circ}$ C, UV 检测器流通池体积为 45nL, 检测波长定为 214nm。在三种不同系列的实验中, 每隔 1min, 2min, 5min 收集 50 μ L 的分离组分。

第二维分离中包括 5min 的在线样品预富集, 同时在流动相流速为 40 μ L/min 下在捕集柱上进行多肽脱盐过程。随后, 在长为 15cm 的 nano LC 液相色谱柱上进行各种肽段的反相分离。进样量为 20 μ L, 流速为 750nL/min, 流动相 A 为 0.05% 的三氟乙酸 (TFA) 水溶液, 流动相 B 为体积比为 80:20 的乙腈: 水 (0.04%TFA) 的混合溶液; 梯度定为从 2% 到 55% 的流动相 B, 梯度时间为 20min, 最后用 90% 的 B 流动相冲洗色谱柱 2.5min, 柱平衡时间为 12.5min, 柱温设定为 60 $^{\circ}$ C。

结果和讨论

第一维 SCX (强阳离子交换) 分离条件优化:

离子交换色谱 (IEX) 中的峰容量主要取决于离子交换色谱的色谱条件, 比如梯度斜率, 梯度时间, 以及所采用的色谱柱参数。六种蛋白混合酶解液的强阳离子交换色谱分离是在多肽涂渍 SCX 的 5 μ m 颗粒 150mm 色谱柱上进行, 梯度时间为 20min (图 2 (a))。

大多数由胰蛋白酶酶解产生的多肽片段都是带二价或者三价正电荷的色谱峰。图 2b 和图 2c 所示的是在柱填料颗粒粒径为 3 μm ，长度为 250mm 的色谱柱上，进行的 SCX 分离，梯度时间分别为 20min 和 33min。我们可以发现，当采取相同的梯度时间时，增加所用色谱柱的长度并减小色谱柱填充颗粒粒径时，峰容量会发生显著增大。另外，当在 t_0 和 33min 之间，进一步缩放梯度时间，峰容量会进一步的增大。

Tanaka 等人^[16]研究表明，第二维色谱分离的采样时间，应该调整为第一维色谱峰（例如：每个一维的峰切割 1-2 次）的标准偏差的 2 至 4 倍。这样，可以在第二维分离的可用时间上和第一维分离效果的保留上，实现最好的折中。表 1 向我们展示了色谱柱长度、柱填料颗粒尺寸、以及在最佳取样时间下的梯度时间，及对实验结果的影响。当采用柱长为 150mm，填料颗粒粒径为 5 μm 的色谱柱，且梯度时间定为 20min 时，已经可以得到非常多的分离组分数目（60 个），而这些分离组分也都需要在第二维色谱中进行分析。（在上述的第一维的条件下，）即使采用短的第二维梯度时间（10min），也会使得总的分析时间超过 10 个小时，而且这还没有考虑梯度洗脱的滞留体积，色谱柱平衡时间，脱盐时间等等对总的分析时间的影响。

如果第一维分离采样过疏，例如，若第一维分离由于受分离组分收集速率的影响而损失了一部分，那么第一维的峰容量（ 1n_c ）就不可能高于所接收分离组分的数量，第一维的峰容量可以定义如下^[17]：

$$^1n_c = \frac{^1t_G}{S_t} \quad [2]$$

式中 1t_G 为第一维的梯度时间； S_t 为采样时间。为了防止采样过疏，获取第一维更高的峰容量的最简单的方法就是缩短采样时间。增加梯度时间、斜率，或者改善色谱柱参数，效果都不如增加采样时间来的有效。

第二维反相分离的最优化：

第二维分离所用的反相色谱中的流动相，需要确保与电喷雾离子源（ESI）质谱检测器极好的兼容性。为了使两维间的正交最大化，我们在第一维强阳离子交换（SCX）分离所用的流动相中，加入 5% 的乙腈。这样，疏水作用便得到了抑制。

此处梯度洗脱中的（第二维的）峰容量（ 2n_c ）可以近似定义为^[17]：

$$^2n_c = \frac{^2t_G}{W} + I = \frac{^2t_G \sqrt{L}}{4t_R \sqrt{H}} + I \quad [3]$$

式中： 2t_G 为第二维反相色谱的梯度时间； W 是平均峰宽（近似等于标准偏差 δ 的四倍）； L 是色谱柱长度， t_R 是保留时间； H 是理论塔板高度。方程 3 说明：梯度洗脱色谱中的峰容量取决于色谱柱的参数（柱长、理论塔板高度 H ，后者主要反映了色谱柱填料颗粒的尺寸以及色谱柱的质量好坏）；液相色谱的条件，比如梯度时间，以及影响 H 的参数，如流速和柱温。

关于柱温、梯度时间以及流速对第二维色谱峰容量的影响，我们用了长度为 150mm 以及 500mm 的 nano 液相色谱 C_{18} 柱，做了系统的研究，且所用色谱柱的填料粒径均为 3 μm 的硅胶。我们发现，当提高柱温后，液固两相间的质量传递被加快了，因此得到了更窄的色谱峰，从而获得了更高的峰容量。我们在柱温为 80 $^{\circ}\text{C}$ 时，得到了最大的峰容量。同时，随着柱温度的升高，我们还观察到了保留值有所降低，而这一点的影 响，我们可以通过调整梯度洗脱中起始流动相的组成和最终流动相的组成，很容易地来加以抵消。然而，柱温升高还会导致捕集柱上脱盐过程捕集效率的降低。这一点可能会导致亲水性多肽的丢失。另外，在较高的柱温下，色谱柱（化学键合相以及硅胶颗粒）流失可能会加快。鉴于以上考虑，我们选择 60 $^{\circ}\text{C}$ 的柱温进行后续的实验。——参见图 3 所示为对六种蛋白质混合酶解液的典型分离。

一般来说，相同流速下较长的梯度时间峰容量更高。但是当我们在较高的流速下，采用相对较短的梯度时间，能显著提高峰容量。当流速接近范第姆特曲线所示的最佳流速时，峰容量比我们在上述条件下获得的更高，这可能是由于峰压缩效应的影响。在较长的梯度时间下，峰容量的增加率会变得平缓。当我们把梯度时间定为

120min, 流速定于范第姆特曲线所示的最佳流速的附近, 在长为 15cm 的色谱柱上, 我们获得了最大的峰容量为 390 个。另外, 在柱长为 50cm 的色谱柱上进行的实验, 在各种梯度时间的条件下, 所得到的峰产率都要明显地高于在 15cm 色谱柱上实验所得到的峰产率。然而, 我们也需要考虑到, 随着柱长的增加, 所需要的柱平衡时间也会随之增加。

图 4 显示了在 150mm 和 500mm 长的色谱柱上, 第二维梯度时间对二维液相色谱峰产率的影响。通过实验数据, 我们把其中至少 5 种肽的色谱峰宽度平均为 4δ , 再利用方程 3, 我们对峰容量进行了估算。另外, 我们还对总的分析时间进行了计算, 我们综合了第一维色谱 (离子交换色谱) 的梯度时间 (10min), 各种分离组分的收集时间, 加上第二维色谱的分析时间, 再考虑到不同的预富集以及脱盐过程所用的时间 (分别为 2min 和 5min), 还有用高含量乙腈清洗的梯度时间 (2.5min), 最后再加上柱长为 150mm 和 500mm 色谱柱的柱平衡时间 (分别为 12.5min 和 41.7min)。

对于长度为 150mm 的色谱柱, 在第二维梯度时间为 20min 时 (如图 4 所示), 我们获得了最高的峰产率。对于在更短的第二维梯度时间下所得到的峰产率, 主要取决于给分离得到的肽组分脱盐所需的时间。当第二维的梯度时间更长时, 峰容量增速会降低。峰容量之所以在这个范围内缓慢的增长, 是因为在更长的梯度时间内, 多肽组分色谱峰的平均峰宽会有所增加。在更长的梯度时间下, 500mm 柱上的最佳峰产率要明显地低于在 150mm 色谱柱上所得到的最佳峰产率。脱盐时间并不是非常重要的, 因为对于 500mm 的色谱柱而言, 梯度时间以及柱平衡时间, 都会更长。

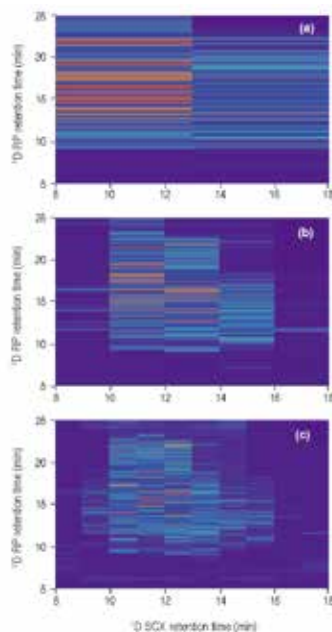


图 5 二维液相色谱分离九种蛋白质混合物的胰蛋白酶酶解液, 比较采样时间对分离的影响。采样时间分别为 5min (a), 2min (b) 和 1min (c)。

图 5 所示为在二维液相色谱 SCX/x/RP 模式下, 采样时间对包含约 1000 种多肽的九种蛋白混合物酶解液分离能力 (一种离线的方法) 的影响。第一维的梯度时间均为 10min, 分离组分的收集时间分别为 5min, 2min, 1min。分离组分会在捕集柱上进行预富集以及脱盐过程, 随后会在一根长为 150mm 的反相 nano 液相色谱柱上进行分析, 第二维梯度时间为 20min, 检测器采用紫外和质谱-质谱检测器。图 5 清楚地表明, 尽管分析时间缩短, 采样时间间隔的缩短, 但我们得到了更加出色的色谱分离结果 (柱容量分别在 400, 1000 和 2000 左右)。

虽然当把分离组分的采集时间从 5min 减至 1min 会发现在总离子数上会有 25% 的降低, 但是所有的蛋白质都可以以大于 29% 的序列覆盖率被成功地鉴定。这一点可以从质谱的快速循环周期来加以解释: 快速循环周期是用于分离母离子 (MS) 及其在碰撞产生裂解后鉴定碎片所需要的时间 (MS-MS)。当循环周期为 2s 时, 在 MS-MS 模式下分析两种母离子, 质谱可以鉴定同时洗脱下来的多肽, 从而提高了对蛋白质的鉴定能力。

一维和二维液相色谱的比较与权衡：

图 6 展示了一维液相色谱在柱长分别为 150mm 和 500mm，柱填料颗粒粒径均为 3 μ m 的色谱柱子上对蛋白质组的分离表现，以及离线二维液相色谱在“采样过疏”的条件下，采用最佳的第二维梯度对蛋白质组的分离表现，并对这两种分离表现进行了比较。我们可以很明显的发现，在一维液相色谱中，采用更长的色谱柱，会带来更高的峰容量。然后，在实际运用中，柱平衡时间也会随着柱长的增长而增加。在以上确定的条件下，当所需峰容量为 400 ($t_G=80\text{min}$) 或更少时，一维液相色谱要优于二维液相色谱。在一维液相色谱中，更高的峰容量可以通过增加梯度时间来获得。然而，一维液相色谱中，单位时间内的峰容量增长率要低于使用二维液相色谱所获的增长率。

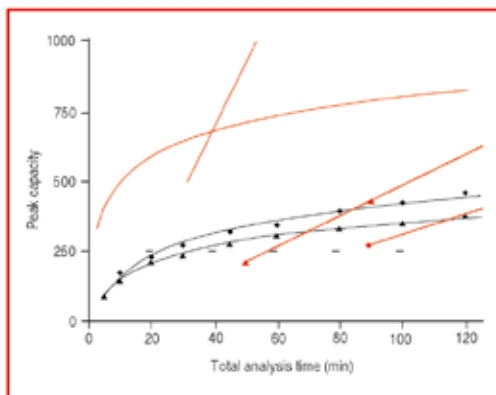


图 6：当采用柱填料颗粒粒径为 3 μ m，柱长分别为 15cm（图中用三角形标示）和 50cm（图中用菱形标示）的反相色谱柱（第二维）时，一维液相色谱（图中用黑色曲线标示）与二维液相色谱（图中用红色曲线标示）的比较；还对当使用填料颗粒粒径为 1 μ m，柱长为 15cm 的色谱柱时，一维液相法和二维液相法的分离表现进行了比较（图中用虚线标示）。

图 6 还表明了 UHPLC 柱技术（假设采用 150mm 长的色谱柱，填充粒径为 1 μ m 的填料颗粒）对一维液相色谱和二维液相色谱分离结果的影响。理论峰容量用 Neue 等人^[18]所描述的方法计算。我们还确定了在填料颗粒粒径为 3 μ m 的色谱柱上，溶剂组成对容量因子的影响，并用所得到的数据去计算填料颗粒粒径为 1 μ m 的色谱柱，在一维液相色谱上的分离表现。理论计算得到的一维液相的性能比当前得到的要提高 2-3 倍。另外，一维液相色谱与二维液相色谱表现相近的点，也移向至更短的分析时间处（40min），并且若第二维色谱柱使用更短的色谱柱时，这种效果会更明显。

结论

本文建立了一种 SCX/x/RP 两维分离的方法，实验中采用自动进样器的微馏分收集功能，这项功能可以在第一维多肽分离后自动收集样品，并且再次进样，还可以对分离组分进行预富集和脱盐处理，并将分离组分在第二维色谱中进行再次分离。实验中，我们优化了液相色谱的操作条件和色谱柱参数，从而使峰产率最大化。

当“采样过疏”时，改变第一维色谱柱的柱参数（填料颗粒直径或者柱长）或者液相色谱操作条件（梯度时间 / 斜率）都比不上增加采样时间带来的效果明显。

我们在以下条件得到了二维液相色谱模式下的最高峰产率：第二维反相分离的梯度时间为 20min；柱长为 150mm，填料颗粒直粒径为 3 μ m 的色谱柱。我们还发现第二维最佳的梯度时间极易受柱平衡时间的影响。当增加柱长时，柱平衡时间也相应地增长，进而降低了二维液相色谱中的峰产率。

若分离所需要的峰容量比 400 个要多时，离线的 SCX/x/RP 两维分离方法在分析时间上要优于一维液相色谱。但对于要求不是那么苛刻的样品，采用长柱的一维液相色谱会更加经济。

参考文献

- [1] Y. Shi et al., *J. Chromatogr. A*, 1053, 27–36 (2004).
- [2] H. Chen et al., *Anal. Chem.*, 77, 2323–2331 (2005).
- [3] H. Liu et al., *J. Chromatogr. A*, 1147, 30–36 (2007).
- [4] Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A*, 1067, 73–84 (2005).
- [5] M. Wilm, G. Neubauer and M. Mann, *Anal. Chem.*, 68, 527–533 (1996).
- [6] W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden and J. van der Greef, *J. Chromatogr.*, 554, 3–26 (1991).
- [7] J.W. Dolan et al., *J. Chromatogr. A*, 857, 1–20 (1999).
- [8] H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 778, 3–21 (1997).
- [9] G. Desmet, D. Clicq and P. Gzil, *Anal. Chem.*, 77, 4058–4070 (2005).
- [10] S. Eeltink et al., *J. Chromatogr. A*, 1104, 256–262 (2005).
- [11] G. Desmet and D. Cabooter, *LC•GC Europe*, 22(2), 70–77 (2009).
- [12] D.R. Stoll et al., *J. Chromatogr. A*, 1168, 3–43 (2007).
- [13] C. Delahunty and J.R. Yates III, *Methods*, 35, 248–255 (2005).
- [14] A.P. Kohne and T. Welsch, *J. Chromatogr. A*, 845, 463–469 (1999).
- [15] P.J. Schoenmakers, G. Vivo-Truyols and W.M.C. Decrop, *J. Chromatogr. A*, 1120, 282–290 (2006).
- [16] K. Horie et al., *Anal. Chem.* 79, 3764–3770 (2007).
- [17] X. Wang et al., *J. Chromatogr. A*, 1125, 177–181 (2006).
- [18] U.D. Neue, *J. Chromatogr. A*, 1184, 107–130 (2008).

DGLC-31 在线全二维液相色谱串联质谱分析刺五加提取物成分

关键词：提取物，刺五加，在线全二维，液质联用

DGLC-31 Determination of constituents in Radix Acanthopanax Semicosii extracts by online 2D-HPLC method using LC-MS

Key words: extracts, Radix Acanthopanax Semicosii, online 2D-HPLC, LC-MS

引言

高效液相色谱技术已成为中药复杂体系研究的强有力的分析技术支撑，在中药质量控制方面占据重要的地位。当前，随着新型色谱固定相和填料技术的不断发展，为中药各类成分的分析提供多种选择。然而很多中药复方中通常涵盖强极性、中等极性和弱极性等化学成分，这种性质决定了其很难用单一的分流模式进行分离，复杂性超出了单一色谱分离系统的分离能力。在这种情况下，结合多种分离方式的多维色谱分离模式，可以增加色谱系统的分离能力，扩大分离空间，增加色谱峰容量，减少色谱峰重叠。多维液相色谱分离技术已成为液相色谱发展的一个重要方向。

刺五加是五加科五加属的一种落叶灌木，主要的药用部分是它的根及根皮，药材名又称五加参，是中药五加皮的一种。我国民间很早就将其作为药材使用，以达到扶正固本，益智安神，补肾健脾的功效。其系统的化学研究已比较深入，主要含有甾体类、香豆素类、木质素类、酚类、糖类、三萜类及有机酸、微量元素等。本文拟采用全二维液相色谱分离技术结合质谱对刺五加水提取物进行系统的物质基础分析。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；柱温箱（配置一个六通阀和一个十通阀）；DAD 检测器。仪器条件及连接图见表 1，一维和二维分离梯度程序见图 1。

表 1 仪器条件及连接图

| | |
|-----------|--|
| 一维分析柱 | Hypersil GOLD PFP, 5 μ m 4.6 \times 150mm (P/N: 25405-154630) |
| 二维分析柱 | Acclaim Polar Advantage II C ₁₈ , 120° 3 μ m 4.6 \times 50mm (S/N 001160 P/N: 063189) |
| 柱温 | 40°C |
| 流动相 A | 一维分析泵：甲醇； 二维分析泵：乙腈 |
| 流动相 B | 0.1% 甲酸 |
| 流速 | 0.5mL/min for 一维分析泵；2.4 mL/min for 二维泵 |
| 检测 | UV@218, 230, 275nm |
| 进样量 | 5 μ L |
| LOOP 环体积 | 200 μ L |
| 一维色谱柱后分流比 | 1 : 4 |
| 采样频率 | 2.0 min |

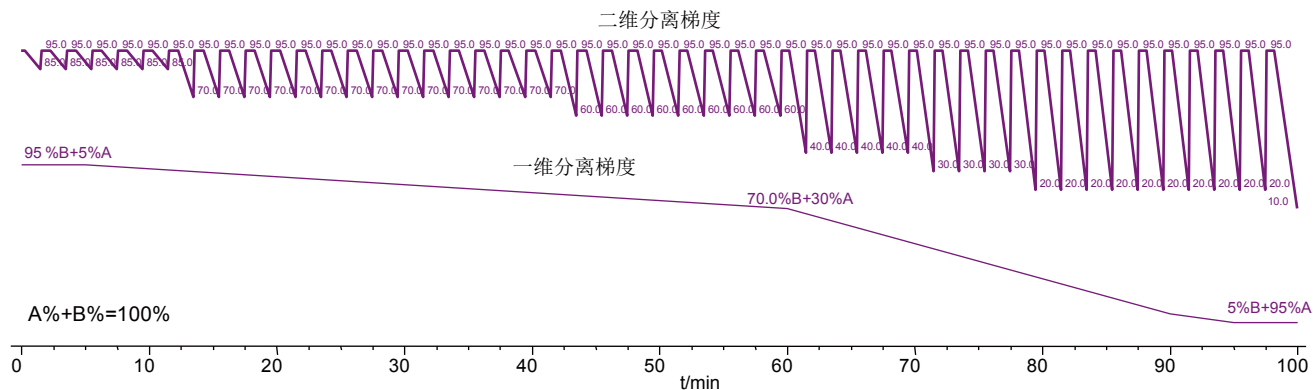
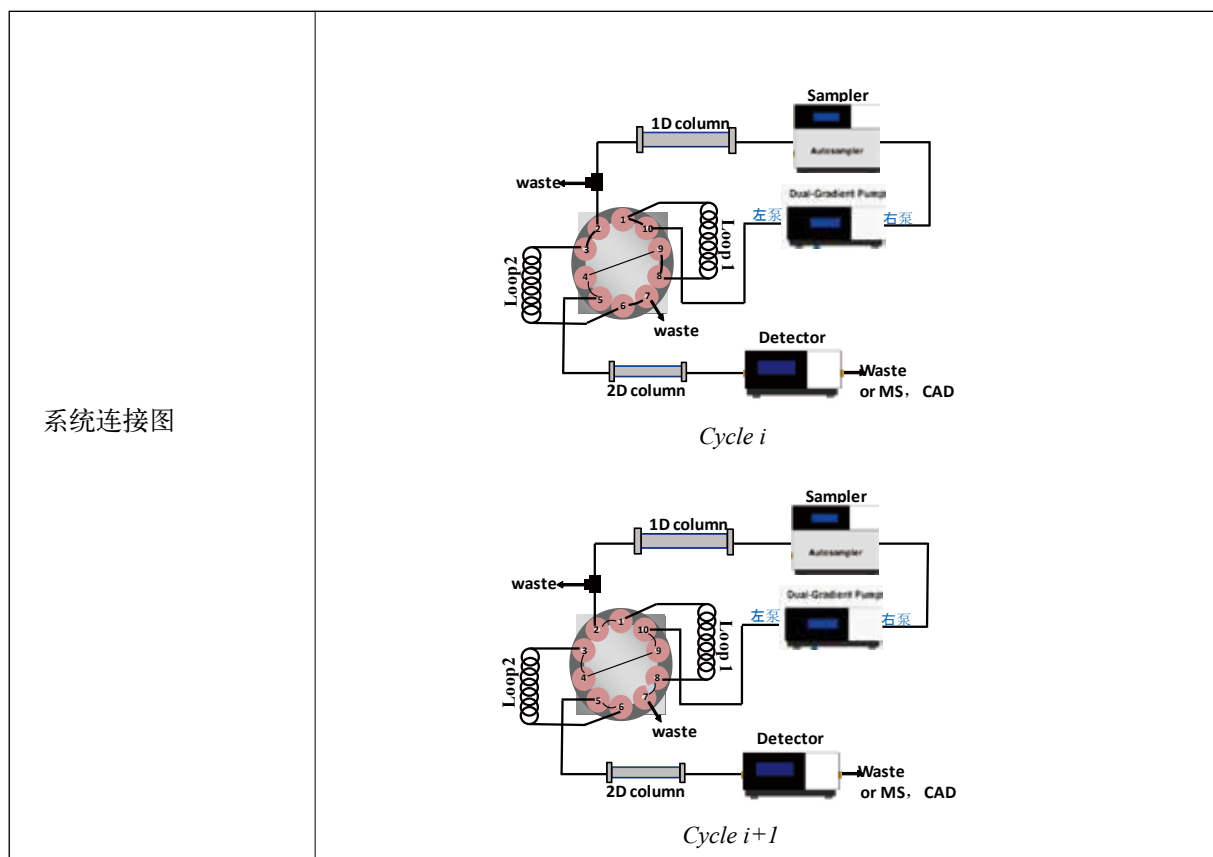


图1 一维和二维分离梯度程序

样品前处理方法

刺五加浸膏：取刺五加药材 100g，粉碎成粗粉，加水煎煮 2 两次，每次 3 小时，合并提取液，浓缩成浸膏即得。取浸膏适量，加 20% 甲醇 - 水溶解，滤过进样。

对照品溶液制备：取紫丁香苷、绿原酸、异嗪皮啶、刺五加苷 D 和 E 适量，加甲醇溶解，制成混合对照品溶液。

结果和讨论
标准品谱图

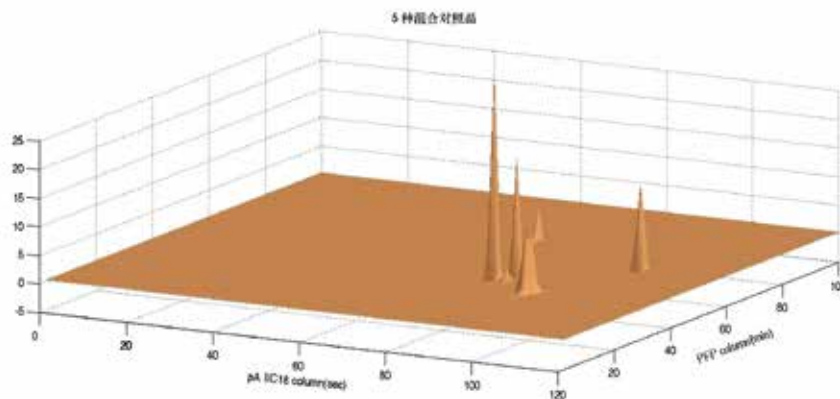


图2 刺五加药材中5种已知混合对照品3D谱图

样品分析谱图

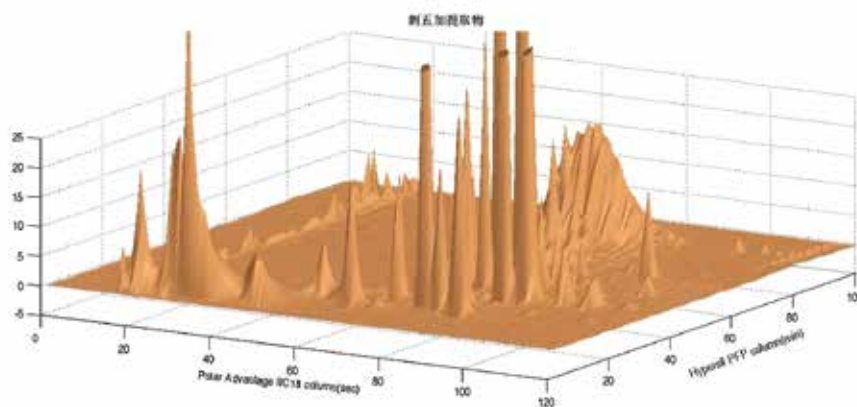


图3 刺五加提取物3D谱图

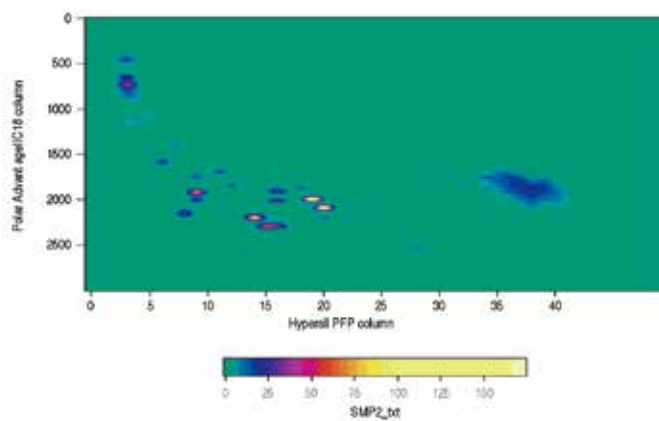
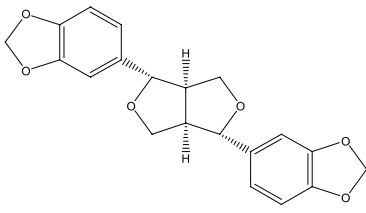
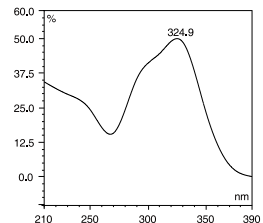
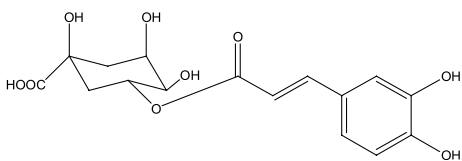
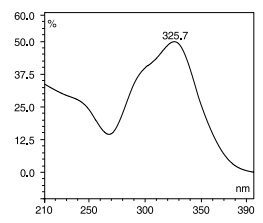
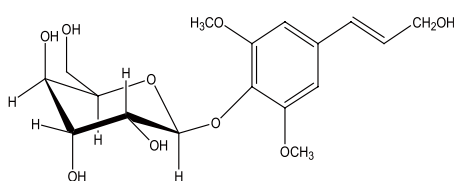
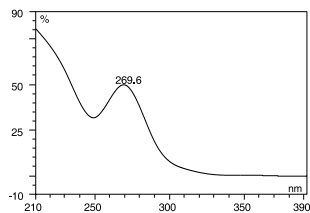
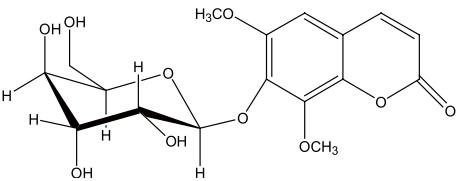
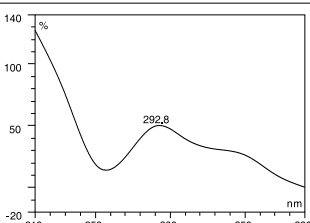
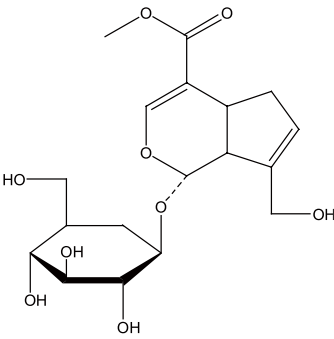
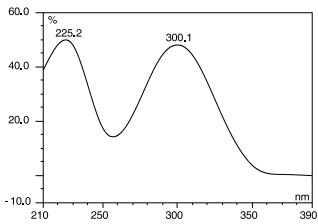
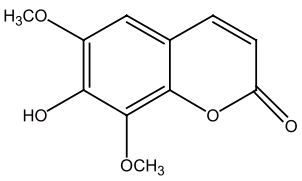
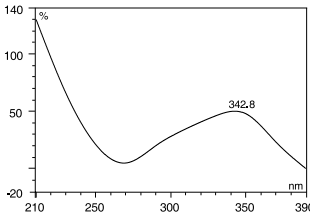


图4 刺五加提取物2D等高图

MS 结果

本实验在确立了色谱条件后，在二维色谱柱后采用柱后分离方式串联了 TSQ，对其中的主要成分进行结构确认工作，见表 2、3。

表 2 刺五加提取物中初步鉴别出的 7 个成分和分子量

| 序号 | Compound | Structure | Molecular weight | UV spectrum |
|----|---|---|------------------|---|
| 1 | L-sesmen (L-芝麻素) |  | 354 |  |
| 2 | chlorogenic acid 绿原酸 |  | 354 |  |
| 3 | Syringin 紫丁香苷 |  | 372 |  |
| 4 | Isofraxidin-7-O-β-Dglucoside 异嗪皮啶-7-O-葡萄糖苷 |  | 384 |  |
| 5 | Geniposide 京尼平苷 |  | 386 |  |
| 6 | Isofraxidin 异嗪皮啶 |  | 222 |  |

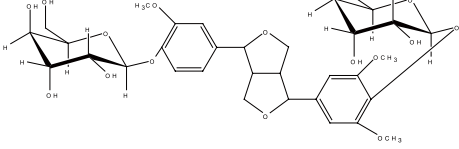
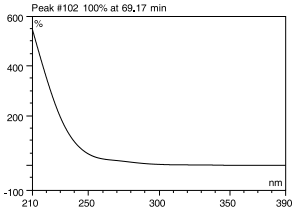
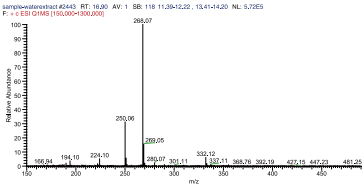
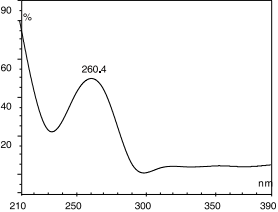
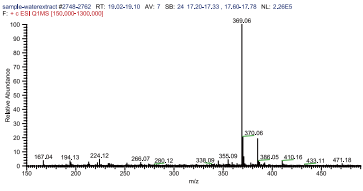
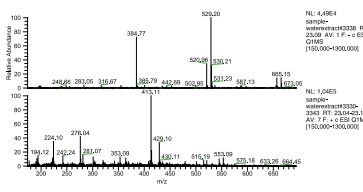
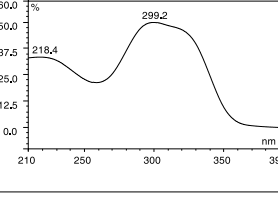
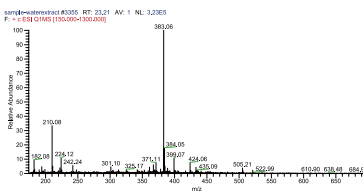
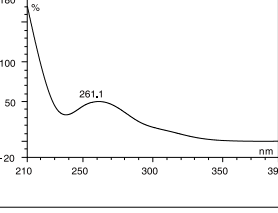
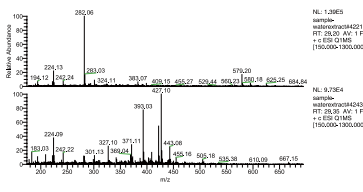
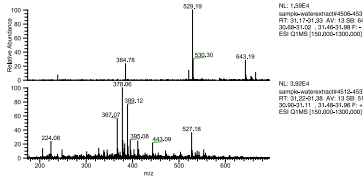
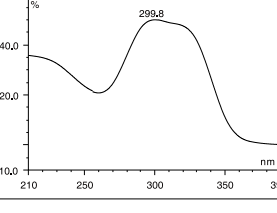
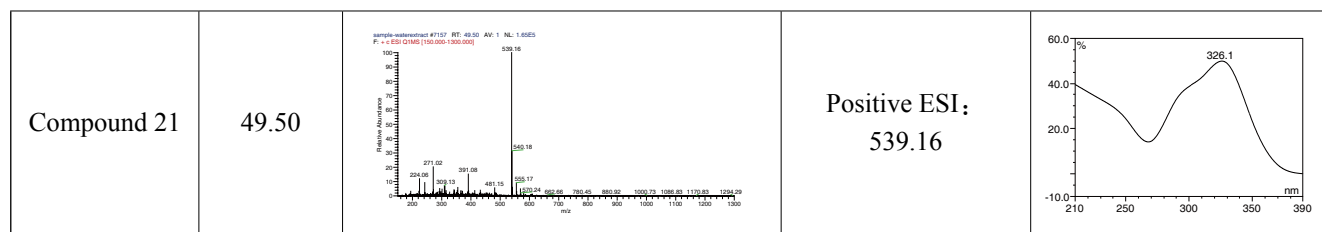
| | | | | |
|---|---------------------------|---|-----|---|
| 7 | ELEUTHEROSIDE E 刺五加苷 E |  | 742 |  |
|---|---------------------------|---|-----|---|

表 3 其他未知化合物

| Name | RT (min) | Ms spectrum | 主要离子峰 m/z | UV spectrum |
|-------------|----------|---|--|---|
| Compound 8 | 16.91 |  | 250 268 |  |
| Compound 9 | 19.06 |  | 369.06 330.06 | |
| Compound 10 | 23.09 |  | Negative ESI: 529.20 384.77 Positive ESI: 413.11 429.10 |  |
| Compound 11 | 23.21 |  | Positive ESI: 383.06 |  |
| Compound 12 | 29.35 |  | Negative ESI: 282.06 Positive ESI 不明显 | 无 UV 吸收 |
| Compound 13 | 31.25 |  | Negative ESI: 529.19 643.19 Positive ESI 峰较乱 |  |

| | | | | |
|-------------|-------|---|---|---------|
| Compound 14 | 33.21 | <p>sample: waterextract #4758-8056F T: 33.19-33.24 AV: 4 SB: 64 30-66-31.02, 31.49-31.08 NL: 9 30E4 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 557.17 442.18 | |
| Compound 15 | 33.26 | <p>NL: 6.15E4 sample: waterextract#4804 4875 RT: 32.25-33.28 AV: 5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000] NL: 6.49E4 sample: waterextract#4809 RT: 33.26 AV: 1 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Negative ESI: 529.20 384.83 643.20 (与化合物13类似) | |
| Compound 15 | 33.35 | <p>sample: waterextract #4821R T: 33.35 AV: 1N L: 7.49E5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 365.05 | |
| Compound 16 | 35.4 | <p>sample: waterextract #5120-5132R T: 35.42-35.49 AV: 6 SB: 33 34-96-35.15, 35.64-35.90N L: 1.19E5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 266.10 207.04 397.07 | 无紫外吸收 |
| Compound 17 | 37.24 | <p>sample: waterextract #5381R T: 37.22 AV: 1L L: 2.14E5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 557.17 573.14 | |
| Compound 18 | 37.26 | <p>sample: waterextract #5359-5402R T: 37.34-37.40 AV: 5 SB: 24 37-54-37.21, 37.66-37.70 NL: 1.12E5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 397.08 497.16 ? | |
| Compound 19 | 43.37 | <p>sample: waterextract #6295-6274R T: 43.30-43.30 AV: 7N L: 3.59E5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 407.05 223.01 | 无明显紫外吸收 |
| Compound 20 | 43.29 | <p>sample: waterextract #6281R T: 43.30 AV: 1 SB: 31 43-08-43.21, 43.37-43.65 NL: 1.50E5 F: + ESI Q1MS [150.000-1300.000]</p> | Positive ESI: 539.12 555.13 223.02 | 无明显紫外吸收 |



结论

二维色谱柱选择

本文根据刺五加药材中所含有化合物的种类和理化性质，筛选了部分分离机理差异较大的色谱柱，包括氟基柱、全氟苯基柱、极性嵌合 C₁₈ 柱和 C₁₈ 等，根据色谱柱的主要作用机制，基于雷达图的表达方式，对常用的几种色谱柱进行了筛选，从图 5 可以看出，二者分离机理差异较大，因此确定了全氟苯基柱 + 极性嵌合 C₁₈ 柱的组合。

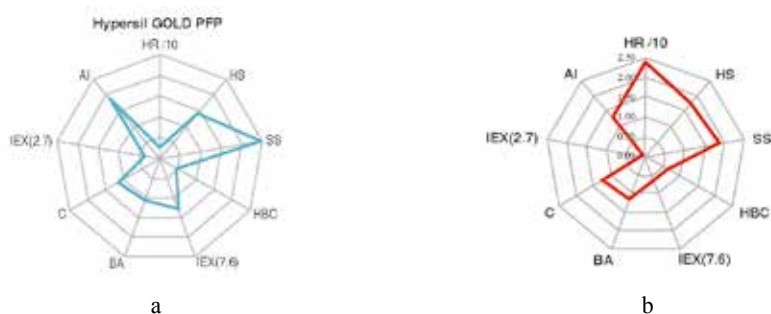


图 5 色谱柱的化学键合相性质 (a 为 PFP 柱; b 为 PA2 C₁₈ 柱)

全二维体系的分离能力分析

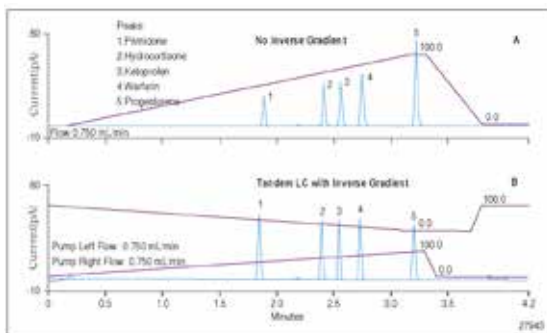
与传统一维分离比较，在 100min 内分离得到至少 60 个组分，结合 MS 数据和已知文献对 7 个成分进行定性结构鉴别，另外化合物 8~21 在 UV 或在 MS 中响应较高，需进一步采用二级质谱进行结构推断。实验结果初步显示出全二维液相色谱串联质谱分离分析体系的高峰容量、高灵敏度和自动化等特点，为中药复杂体系的分离分析提供了一种可靠的方法。

第六章 辅助泵应用（双三元柱后衍生、与 CAD 或 MS 联用等）

双三元由于具有两个独立的泵和流路，一个泵进行分析，另外一个泵可以完成一些辅助功能的应用，这些功能很多情况只需要一个简单的柱后三通或反应管的连接就可以实现。如柱后衍生，我们一般是用柱后衍生装置或需要另外一个独立泵来运行衍生试剂来实现衍生的目的，这些额外的装置有时由于与液相系统自身配套不完善从而无法理想的运行，达到我们想要的结果，而使用双三元液相来实现这样的目的就再简单不过了。还有在 HPLC 和 MS 连用时，有时为了增强质子化效率，需要另外的流路泵入甲酸或乙腈，这时用双三元液相就可以简单地实现这样的功能。另外还有在使用 CAD 或 ELSD 检测器进行梯度检测时，由于流动相始终在变化，流动相雾化程度在变化，影响待测物质响应的一致性，从而使测定结果不能反映待测物中成分的真实含量。下文详细讲解了双三元柱后梯度补偿功能，并对柱后衍生功能进行了举例。

第一节 双三元柱后梯度补偿指南与应用实例

在药物杂质和天然药物多组分分析中，大多数情况下无法获得对照品，因此无法进行定量分析。另外在用紫外进行分析化合物时，部分化合物没有紫外吸收或较弱的紫外吸收，给定量分析带来较大误差。电喷雾化学检测器（Charged Aerosol Detector, CAD）为质量型检测器，可用于分析无（或弱）紫外吸收的不（半）挥发成分，并且可在只获得一种对照品的情况下可以对其他组分进行半定量分析。基于检测雾化气溶胶分子数量信号的检测器（如 CAD, ELSD），流动相组分变化对待测物质的响应有着重大影响。在流动相组分不变的情况下，相同含量的组分具有相同的响应信号。但在梯度洗脱（反相液相）中，有机相浓度在水中的比例是由低到高进行变化，在整个分析过程中，柱后洗脱液则具有不同的雾化效率而出现不同的响应信号。利用双三元液相可对此缺陷进行加以补偿。在分析柱（右泵）后附加另一流路（左泵）的反梯度程序，使得进入 CAD 检测器的流动相组分比例保持恒定从而产生一致的响应信号，如图 1 所示



A. 未使用反梯度 B. 使用反梯度
图 1 反梯度的使用对响应信号的影响

只要配备了双三元梯度液相色谱，在梯度分析过程中分析人员就可以进行反梯度程序进行柱后梯度补偿，从而使得分析结果准确一致。

仪器配置：

- 双三元梯度泵（DGP-3600）；
- 自动进样器（WPS-3000）；
- 柱温箱（TCC-3000）；
- CAD 检测器；
- 两根同规格的色谱柱（优选相同供应商）；

仪器连接示意图（无需使用柱切换阀）：

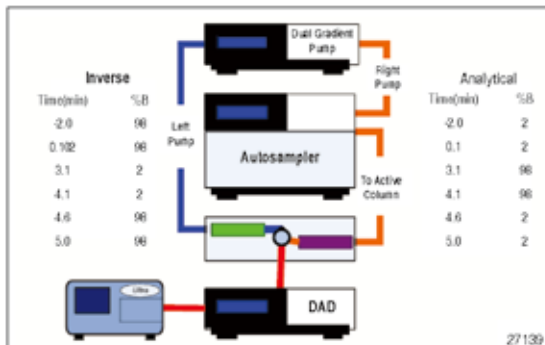


图 2 双三元柱后梯度补偿示意图

分析柱 (Active column, 红色) 按照常规使用与右泵、自动进样器和检测器连接 (本图中为 DAD 与 CAD 串联分析待测化合物), 并安装在柱温箱中。

体积补偿柱 (Delay column, 绿色) 安装在柱温箱中, 且规格尺寸尽量与分析柱一样 (如均为 Acclaim 120[®] C₁₈ 柱, 4.6 × 150mm, 5 μ m)。

利用三通连接管将分析柱和补偿柱连接在入口处一端, 检测器则连接在出口处一端。所有连接管线应耐压且具有良好密封性。

梯度程序请参考示意图中信息并结合实际应用进行设置。

附录

本部分介绍在变色龙 (Chromleon[®] V6.8 SR11) 中编辑柱后反梯度程序 (本示例中仅演示泵模块设置, 其他模块配置同常规程序)。

假设运用双三元液相进行柱后梯度补偿应用程序, 其左右泵的梯度程序见表 1

表 1 柱后梯度补偿梯度程序

| 时间 | 左泵 (辅助泵) | | 右泵 (分析泵) | |
|----|----------|------|----------|------|
| | A(%) | B(%) | A(%) | B(%) |
| 0 | 10 | 90 | 90 | 10 |
| 30 | 90 | 10 | 10 | 90 |
| 33 | 90 | 10 | 10 | 90 |
| 34 | 10 | 90 | 90 | 10 |
| 38 | 10 | 90 | 90 | 10 |

同常规程序, 在变色龙软件浏览器中“文件 (File)”栏中点击“新建程序 (New Program)”, 会出现如下对话框 (图 1), 选择相应的仪器系统 (本例中选择 DEMO 仪器)

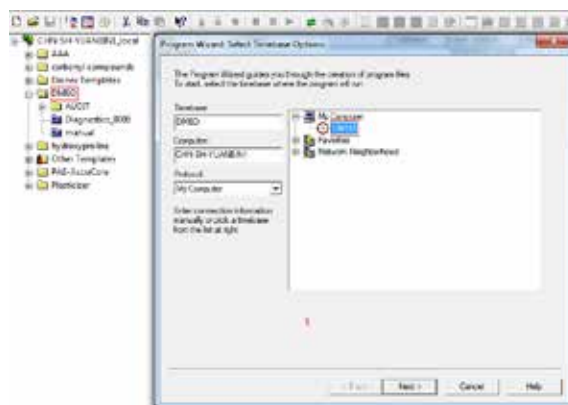


图 1 仪器配置示意图

点击“下一步 (Next)”, 出现对话框, 选择“常规程序 (Regular Program)”, 见图 2

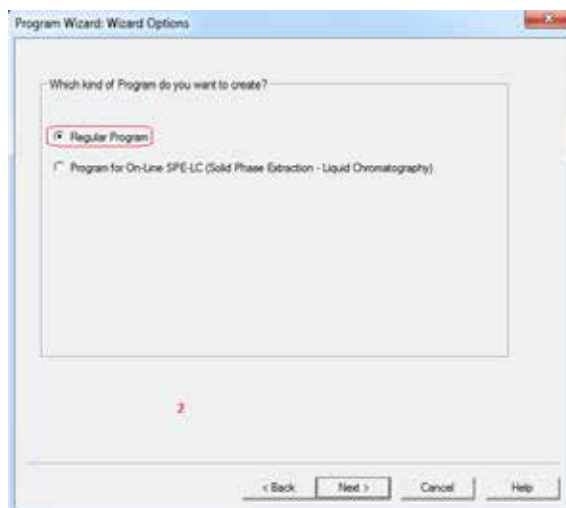


图 2 仪器配置示意图

点击“下一步 (Next)”至进入左泵模块设置 (省略其他模块配置)，见图 3，选择“多步梯度 (Multi-step gradient)”。可选择性地在溶剂栏中添加相应溶剂名称。

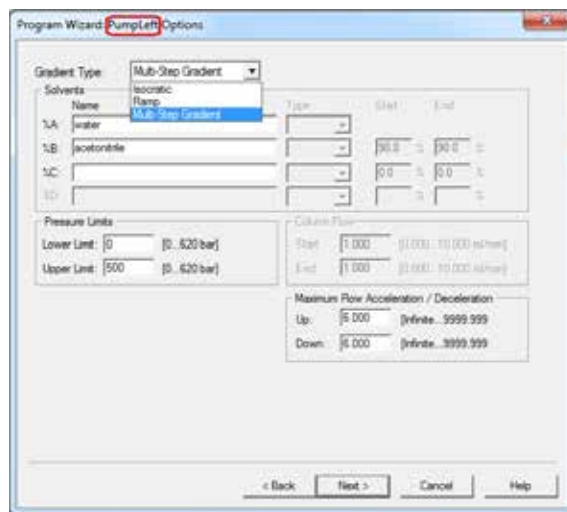


图 3 左泵设置示意图

点击“下一步 (Next)”进入左泵梯度程序设置，见图 4，按照表 1 进行梯度程序设置

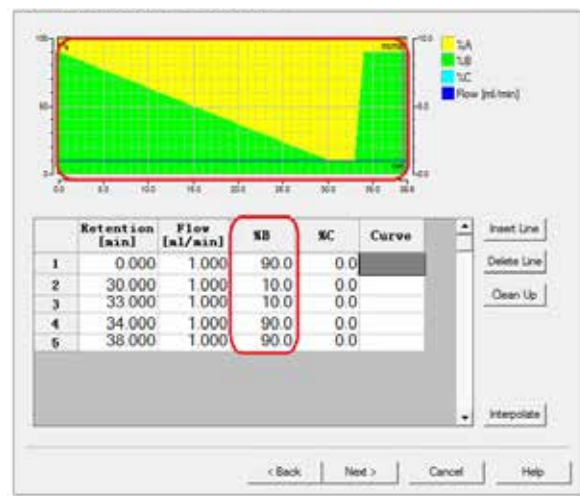


图 4 左泵梯度程序设置

完成后点击“下一步 (Next)”，进入右泵配置，方法同左泵设置，见图 5 和图 6

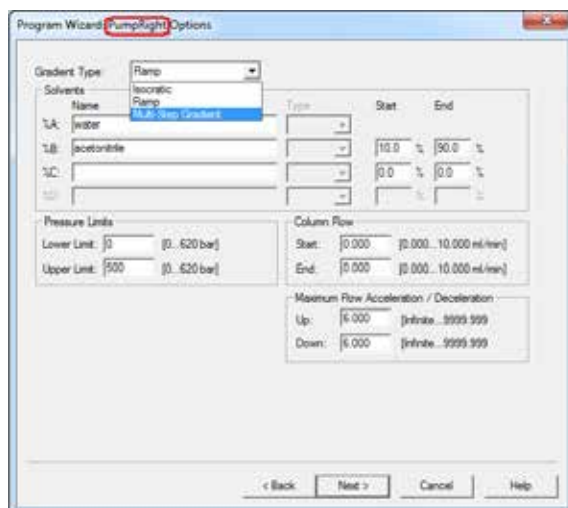


图 5 右泵设置示意图

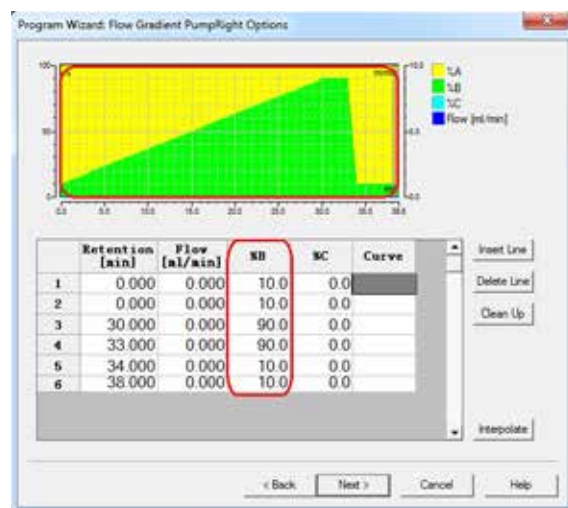


图 6 右泵梯度程序设置

通过上述步骤，可完成柱后梯度补偿程序设置。比较图 4 和图 6，可以观察到左泵与右泵的梯度变化曲线呈反向对称变化，两种梯度在柱后混合后则形成一条水平直线，可保证进入检测器（如 CAD,MS）里的有机相浓度始终保持一致，从而使得所有化合物响应值一致而达到保证方法有着良好的重现性和准确性。

DGLC-32 采用柱后补偿液相色谱与电雾式检测器分析茶氨酸

关键词：柱后补偿；液相色谱；电雾式检测器；茶氨酸

DGLC-32 Determination of Theanine in Tea-Extraction by HPLC with Compensation after Column and Charged Aerosol Detection

Key words: Compensation after column, HPLC, Charged aerosol detector, Theanine

引言

茶氨酸 (theanine, N-乙基- γ -L-谷氨酰胺) 是茶叶中特有的非蛋白氨基酸, 具有舒缓神经抗疲劳等作用, 常作为功能性成分添加到食品饮料中^[1]。自 1950 年日本学者酒户弥二郎首次从绿茶中分离茶氨酸以来, 对于茶氨酸的定性、定量方法, 已出现了碱式碳酸铜沉淀法、强酸性阳离子交换树脂法、薄层色谱法、气相色谱法和柱前衍生反相高效液相色谱法、直接进样蒸发光散射检测法、高效液相色谱质谱法等^[2-8]。茶氨酸属于紫外区末端吸收, 也无荧光发射特性, 采用低波长紫外检测时干扰较大, 因此, 为了提高分析检测的灵敏度和分离的选择性, 一般将茶氨酸进行衍生化, 朱松等^[2]采用 OPA 进行了柱前衍生后紫外检测器测定, 但通常这种方法对衍生试剂的要求高, 操作复杂, 分析成本也大大增加。为了减少繁琐的衍生操作, 李银花等^[9]报道了采用蒸发光散射检测器 (ELSD) 来直接分析茶氨酸, 但该方法通常灵敏度较低, 线性范围较窄, 重现性差。龚雨顺等^[9]采用离子对试剂色谱法分析需添加离子对试剂, 增加了分析成本, 同时离子对试剂造成本底背景值增加, 使得检出限较高。因此, 本文采用一种新型的通用型检测器 - 电雾式检测器, 对紫外末端吸收的化合物灵敏度相对较高, 进行直接进样分析, 无溶剂干扰, 以及消除了温度变化等引起的基线漂移, 重现性较好, 同时, 采用柱后补偿进行有机相补偿, 提高了雾化效率, 增加了响应性, 降低了检测限。总体而言, 该方法能准确进行定量分析且检出限较低, 同时使用简单、易操作等, 有一定的借鉴意义。

测试条件

仪器: Ultimate DGP 3600RS 系列, 包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵; 带有一个六通阀的柱温箱; 电雾式检测器 (型号 Corona Ultra)。

色谱柱: Acclaim 120

流动相 (左泵): A: 0.1% 三氟乙酸 (体积分数) 乙腈, B: 0.1% 三氟乙酸 (体积分数) 水, 洗脱梯度: 0-11min 内, A 为 100%, 11min-15min, A 由 100%-60%, 保持 5min, 然后 A 立即回到 100%, 流速为 0.5ml/min; 右泵, 为补偿流动相, 为 100% 乙腈, 流速为 0.5ml/min。进样体积: 20 μ L

柱温箱: 25 $^{\circ}$ C

电雾式检测器参数设置: 采集频率: 5Hz; 过滤模式: None; 雾化温度 35 $^{\circ}$ C; 载气压力 35.0psi; 氮气流速约 4L/min

样品前处理方法

标准溶液配制

称取茶氨酸适量, 用水超声溶解, 然后稀释配制成不同浓度的标准工作溶液, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。最终工作溶液浓度为 1.0、2.0、5.0、10、20、50 μ g/ml。

样品前处理

样品为茶叶粗提物，共三批，分别为绿茶、乌龙茶和红茶，由某生物公司提供，准确称取该样品 2.0g，用水稀释定容至 10ml，过 0.45 μ m 滤膜后，待进样分析。

结果和讨论

色谱条件选择

色谱柱与流动相的选择

由于茶氨酸为强极性化合物，在普通 C₁₈ 反相柱上的保留时间较弱，在死时间处出峰，且普通 C₁₈ 柱通常都不能兼容 100% 水相，容易出现疏水塌陷。因此，本文选用赛默飞 Acclaim PA2 C₁₈ 极性官能团改性柱，可以兼容 100% 水相，同时，耐受较低的 pH 值。在本方法中，参照文献^[4]中的方法，流动相中添加了 0.1% 三氟乙酸，增加了选择性，使得茶氨酸与其他化合物达到了基线分离。

采用柱后补偿分析

由于电雾式检测器同质谱仪等质量型检测器一样，也是基于雾化原理的检测器，其响应值依赖于洗脱液的雾化效率，通过增加有机相比例，可以提高雾化效率，从而增加响应值，降低检出限。因此，本方法中把 DGP3600 高效液相色谱仪左泵设置为分析泵，右泵设为补偿泵，左边的梯度洗脱程序为色谱分离条件，有机相从低到高；右泵为 100% 的乙腈，作为柱后补偿流动相。

电雾式检测器参数优化

由于电雾式检测器的原理及智能化设计，无需对多种参数进行优化，本实验仅对雾化温度和采集频率进行了优化。当雾化温度分别为 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C，目标化合物响应值略有增加，但基线噪音也随之增加（见表 1），最后为了使雾化温度与柱温接近及综合考虑，最后选择 30 $^{\circ}$ C 为雾化温度；采集频率分别使用 2Hz、5Hz、10Hz 进行试验，同紫外检测器一样，采集频率增加，基线噪音更明显，同时，数据量也大大增加，最后在考虑了满足峰形等要求下，选择 5Hz 作为检测器采集频率。

表 1 不同雾化温度对响应值影响

| 雾化温度 ($^{\circ}$ C) | 茶氨酸峰高 (pA) | 噪音值 (pA) |
|-------------------------|---------------|-------------|
| 25 | 7.903 | 0.211 |
| 30 | 8.808 | 0.232 |
| 35 | 8.946 | 0.287 |

标准曲线与检出限

取所配制的系列标准工作溶液，按“1.4”节色谱条件测定，标准品谱图（浓度为 10 μ g/ml）见图 1，茶氨酸保留时间为 8.247min。以茶氨酸峰面积 Y (pA*min) 与其对应的浓度 x (μ g/ml) 进行线性回归分析，结果表明：线性方程为 $Y=0.1412X-0.0614$ ，相关系数 $r=0.9998$ ，线性范围为 1.0 ~ 50 μ g/ml，方法最低检出限为 0.10 μ g/ml（以 S/N=3 计），定量限为 0.35 μ g/ml（以 S/N=10 计）。

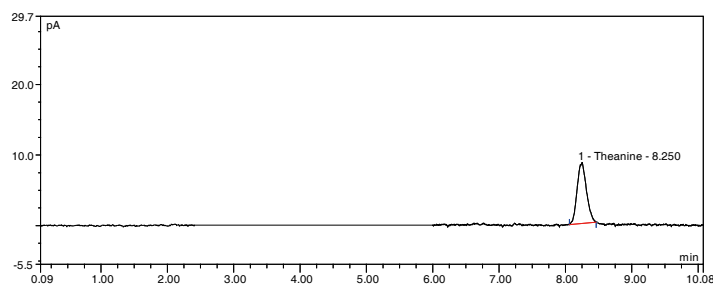


图 1 茶氨酸标准品 CAD 谱图

重现性与回收率实验

重现性试验,用同一标准品(10 μ g/ml)分别测定5次,计算得保留时间差小于0.2min,峰面积相对标准偏差(RSD值)为0.62%(n=5),重现性较好。取3份空白样品,分别添加5、10、15 μ g/ml标准工作溶液各1ml,按照分析测定条件,进行测定,结果见表1,计算得回收率为97.6%~112.1%,平均值为103.1%。

表 2 空白样品加标回收实验

| 项目 | 理论值 (μ g) | 实测值 (μ g) | 加标回收率 (%) |
|-----|-------------------|-------------------|--------------|
| 茶氨酸 | 5.0 | 4.88 | 97.6 |
| | 10.0 | 9.95 | 99.5 |
| | 15.0 | 16.81 | 112.1 |
| 平均值 | - | - | 103.1 |

注: - 为未计算

样品分析结果

按照分析测定条件,对三批样品分别进行了两次平行测定,计算得含量分别为绿茶25.2%、乌龙茶22.0%、红茶16.1%,平均含量为21.1%,各样品RSD值均小于2.5%。样品分析谱图见图2。

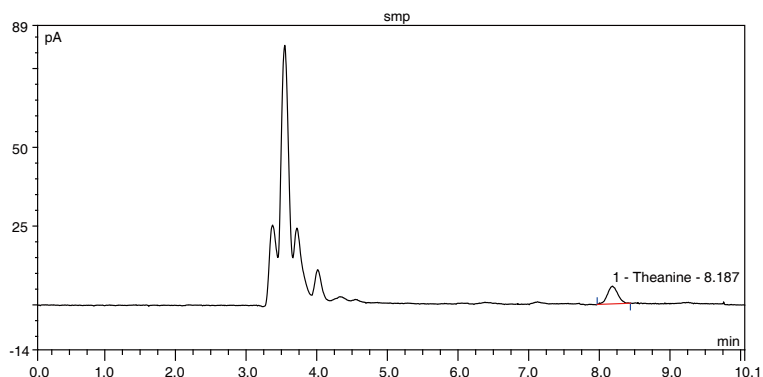


图 2 样品茶氨酸 CAD 谱图

结论

本文采用最新型通用型检测器 - 电雾式检测器 (CAD) 对茶叶粗提物中的茶氨酸进行了分析, 同时结合双三元液相色谱系统进行梯度洗脱与柱后补偿, 取得了较好的分析结果, 与蒸发光散射检测器相比, 大大降低了目标化合物的检出限, 取得了较好的重现性与回收率结果, 同时也避免了对茶氨酸进行衍生等复杂操作。

参考文献

- [1] 肖伟涛, 朱小兰, 陈波, 等. 制备高效液相色谱分离纯化茶氨酸对照品 [J]. 中草药, 2004, 35(2): 148 ~ 150.
- [2] 朱松, 王洪新. OPA 柱前衍生高效液相色谱法测定茶氨酸的研究 [J]. 分析检测, 2005, 26(2): 17 ~ 19.
- [3] 刘小力, 李想. 茶叶中茶氨酸的含量方法测定研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(14): 281 ~ 284.
- [4] 李银花, 刘仲华, 黄建安, 等. 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器测定茶叶中茶氨酸 [J]. 茶叶科学, 2005, 25(2): 225 ~ 228.
- [5] 郭升平. 高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸的研究 [J]. 色谱, 1996, 14(6): 463 ~ 465.
- [6] 朱小兰, 陈波, 罗旭彪等. 高效液相色谱法测定茶叶中的茶氨酸 [J]. 谱, 2003, 21(4): 400 ~ 402.
- [7] 朱曙东, 赵皓. 氨基酸的高效液相色谱分析 [J]. 色谱, 1994, 12(1): 20 ~ 23.
- [8] Unno T, Suzuki Y, Kaduka T, et al. Metabolism of Theanine, γ -Glutamylethylamide in Rats [J]. Journal of Agriculture and food chemistry, 1999, 47(4): 1593 ~ 1596.
- [9] 龚雨顺, 黄建安, 崔湘兴等. 离子对色谱法测定茶叶中的茶氨酸 [J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 89 ~ 92.
- [10] 周光明, 杨光明, 齐东梅, 等. 高效液相色谱. 钴离子催化化学发光抑制法测定茶叶中的茶氨酸 [J]. 色谱, 2002, 20(6): 550 ~ 553.
- [11] 张莉, 肖玉霞, 方洪钜, 等. 广东国宾茶中的氨基酸分析研究 [J]. 茶叶, 1995, 21(2): 20 ~ 21.
- [12] 高小红, 袁华, 喻综沅. 等. 茶氨酸的生理作用及合成 [J]. 化学与生物工程, 2004, 1: 7 ~ 9.

第二节 双三元辅助应用实例

DGLC-33 柱后碘衍生法测定芝麻中的黄曲霉毒素

关键词：柱后碘衍生法；芝麻；黄曲霉毒素

DGLC-33 Determination of aflatoxin in sesame with iodine derivation after column

Key words: iodine derivation after column, sesame, aflatoxin

引言

黄曲霉毒素 (AFT) 是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物，具有极强的毒性和致癌性，可引发动物的肝癌、肾癌、胃癌等，其中 B1 的毒性最强。我国规定在玉米、花生、花生油、坚果和干果等食品中的最高允许含量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。1995 年，世界卫生组织规定食品中黄曲霉毒素最高允许浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。免疫亲和柱是将特异性的黄曲霉毒素单克隆抗体与载体蛋白偶联并填柱而成，能特效性地、高选择性地吸附黄曲霉毒素，而让其它杂质通过柱子，使样品得以纯化，黄曲霉毒素吸附后可被极性有机溶剂洗脱。

本方法采用双三元液相色谱系统，使用 DGP 3600 右泵分析，使用 DGP 3600 左泵衍生，从而实现了黄曲霉毒素的柱后衍生测定。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600RS 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；带有一个六通阀的柱温箱；FLD-3400RS 检测器。

色谱柱：Thermo Synchronis C₁₈, 5 μm 4.6 \times 150 mm

衍生管：Reaction Coil 750 μL (PN: 42631) + Reaction Coil 375 μL (PN: 43700)

左泵（衍生泵）：0.05% 碘溶液

右泵（分析泵）：22% 乙腈 + 22% 甲醇 + 56% 水

左泵：0.2 ml/min；分析泵：0.8 ml/min

FLD 检测器条件：激发波长 365nm 发射波长 435nm

衍生化温度：70 $^{\circ}\text{C}$

进样量：100 μL

样品前处理方法

准确称取经过磨细的样品 10.0g，于 250mL 的具塞锥形瓶中，加入 2.0g 氯化钠及甲醇 / 水 (70/30) 至 50mL，震荡提取（约 5min），定量滤纸过滤。准确移取 10.0mL 滤液，加入 40mL 水稀释，用玻璃纤维滤纸过滤 2 次，保证滤液澄清。

准确移取 25mL 上述样品提取液上到免疫亲和柱（美国 VICAM）上，流速控制在 1 滴 /s。上样完成后，注入 20mL 水清洗，并将空气通过免疫亲和柱，去除水分。

取 4 mL 甲醇洗脱免疫亲和柱，流速为 1 滴 /s。收集全部洗脱液于刻度管中，氮气吹至 <0.5mL，用 50% 甲醇 / 水定容至 1mL，待测。

结果和讨论

黄曲霉毒素标准品测定谱图

各物质浓度：

黄曲霉毒素 M1：2.5ppb

黄曲霉毒素 G1、G2、B1、B2：0.75ppb

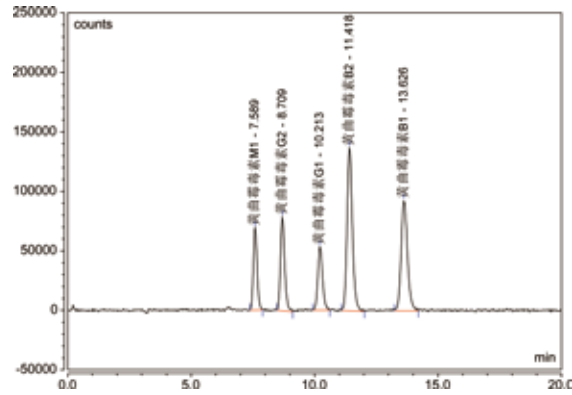


图 1 黄曲霉毒素标准品测定谱图

样品及加标谱图（黑色为加标谱图）

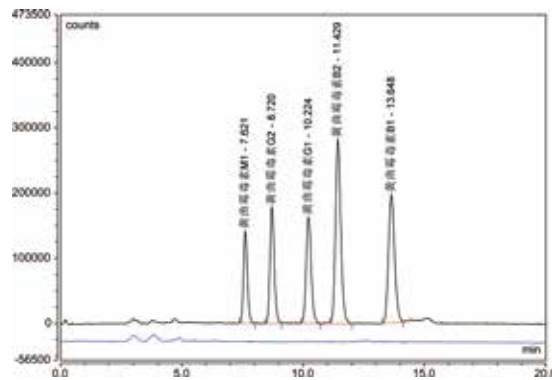


图 2 样品及其加标测定谱图

标准工作曲线

表 1 各标准品线性

| | 时间 min | Cal.Type | Points | 相关系数 | C0 (Offset) | C1 (Slope) | 线性范围 ($\mu\text{g/L}$) | LOD (S/N=3) ($\mu\text{g/kg}$) |
|----------|-----------|----------|--------|--------|----------------|---------------|-----------------------------|--|
| 黄曲霉毒素 M1 | 7.589 | LinOff | 5 | 0.9994 | 6.4397 | 5005.3058 | 0.5-15 | 0.1 |
| 黄曲霉毒素 G2 | 8.709 | LinOff | 5 | 0.9997 | 1345.6901 | 18171.8937 | 0.15-4.5 | 0.03 |
| 黄曲霉毒素 G1 | 10.213 | LinOff | 5 | 0.9997 | 1290.9989 | 13835.0040 | 0.15-4.5 | 0.04 |
| 黄曲霉毒素 B2 | 11.418 | LinOff | 5 | 0.9999 | 68.7725 | 46151.0730 | 0.15-4.5 | 0.018 |
| 黄曲霉毒素 B1 | 13.626 | LinOff | 5 | 0.9999 | 95.7629 | 36853.7696 | 0.15-4.5 | 0.03 |

样品检测及加标回收结果

表 2 样品含量及加标回收结果

| | 检测值 | 加标量 $\mu\text{g/L}$ | 加标后浓度 $\mu\text{g/L}$ | 加标回收 % |
|----------|-----|---------------------|-----------------------|--------|
| 黄曲霉毒素 M1 | NA | 5.0 | 4.56 | 91.2 |
| 黄曲霉毒素 G2 | NA | 1.5 | 1.25 | 83.0 |
| 黄曲霉毒素 G1 | NA | 1.5 | 1.47 | 98.0 |
| 黄曲霉毒素 B2 | NA | 1.5 | 1.45 | 96.4 |
| 黄曲霉毒素 B1 | NA | 1.5 | 1.46 | 97.4 |

结论

本方法采用 GB/T 18979-2003 规定的高效液相色谱 - 柱后碘衍生法对芝麻中的黄曲霉毒素 M1、G1、G2、B1 和 B2 进行了检测。由双三元液相色谱系统实现柱后衍生，即左泵为衍生泵，右泵为分析泵，柱温箱可提供高达 70℃ 的反应温度，该系统对 5 种黄曲霉毒素的检测灵敏度高，检出限分别为 M1 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 、G1 0.04 $\mu\text{g/kg}$ 、G2 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 、B1 0.03 $\mu\text{g/kg}$ 和 B2 0.018 $\mu\text{g/kg}$ ，完全满足国标检测要求（G1、G2、B1 和 B2 总检测限 1 $\mu\text{g/kg}$ ）。

DGLC 应用文集附录

一、双三元液相色谱在线固相萃取应用

1. 在线富集 -HPLC 测定环境水样中的 4 种痕量邻苯二甲酸酯 (APPSH-LC-091022)
2. 郭坚, 杨新磊, 叶明立. 全自动在线固相萃取 - 高效液相色谱法测定水体中痕量微囊藻毒素 [J]. 分析化学研究简报, 2011, 39 (8): 1256- 1260.
3. 陈艳, 罗继, 袁斌等. 在线柱浓缩 - 液相色谱法测定水体中痕量敌草快和百草枯 [J]. 环境化学, 2012, 31(5): 748- 751.
4. 王恩智, 杨新磊, 叶明立等. 在线柱浓缩 - 超高效液相色谱法测定水体中的痕量甲萘威和呋喃丹 [J]. 色谱, 2011, 29(11), 1141-1144.
5. 在线固相萃取 - 水中莠去津的测定 (APPBJ-LC-100220)
6. 在线固相萃取测定水体灭草松和 2,4-D (LC-AppGZ-110331)
7. 在线固相萃取测定水体中双酚 A (LC-AppGZ-110317)
8. 在线固相萃取 - 双梯度高效液相色谱测定饮用水及环境水体中痕量毒死蜱 (LC-AppGZ-110603)
9. 在线固相萃取 - 双梯度高效液相色谱测定饮用水中痕量甲萘威和百菌清 (LC-AppGZ-110630)
10. 在线样品除杂 + 固相萃取的方法分析水样中的敌草快和百草枯 (LC-AppSH-110111)
11. 饮用水和瓶装矿泉水中酚类的分析 (HPLC-UV) (AN191)
12. 地表水中微囊藻毒素 -LR、甲萘威、溴氰菊酯及苯并 (a) 芘同时测定 (HPLC-UV&FD) (APPBJ-FY11-030)
13. 焦炉飘尘咖啡因吸收液中苯并 [a] 芘的测定 (HPLC-FD) (AppBJ-FY11-031)
14. 刘磊, 温亚彬, 刘康宁等. 在线 SPE-HPLC 系统在补骨脂二氢黄酮甲醚药代动力学研究中的应用 [J]. 药物分析杂志 Chin J Pharm Anal 2012, 32(2): 206-209.
15. 在线净化 - 高效液相色谱快速测定维生素 AD 滴剂中的微量 VD3 (LC-AppSH-M27)
16. 中药六味地黄丸的 online-SPE 方法与常规方法对比实验 (2011-LC-AppSH-M13)
17. 中药及复方中盐酸小檗碱 online-SPE 方法开发 (LC-AppSH-110425)
18. 在线固相萃取 - 高效液相法测定大鼠血浆中盐酸莫西沙星 (AppBJ-FY11-069)
19. 人血浆中苯苄醇的分析 (HPLC-UV) (Dionex Report No. 11-2008-249)
20. 在线固相萃取测定饮料中痕量 VB12 (APPSH-LC-091113)
21. 在线固相萃取 - 高效液相色谱法荧光检测食用油中 15 种多环芳烃. (LC-AppBJ-100513)
22. 在线净化 - 高效液相色谱法快速检测婴儿奶粉中的微量 VD3 (2012-APP-RLC-001)
23. 白兰地酒中多环芳烃类化合物的分析 (HPLC-FLD) (Dionex Report No. 02-2009-277)
24. 牛奶中盘尼西林 G 的分析 (Dionex Report No. 04-2009-292)
25. 啤酒中异律草酮的分析 (Greg Malek July 21, 2011)
26. On-line SPE 测定纺织品中线性十二烷基苯磺酸盐 (LAS) (APPBJ-LC-100617)
27. 采用液质联用法分析化妆品中的醇胺类 (2012-APP-RLC-038)
28. 变压器油中 T501 测定比较 (2011-LC-AppSH-M28)
29. 采用 Online SPE 液质联用法分析化妆品中的四种糖皮质激素类药物 (2012-APP-RLC-024)
30. 在 LPG3400M 简单配置上实现肽段的预浓缩分析 (LC-AppSH-110124)
31. 双三元在线固相萃取分析水中的 Mc-LR、呋喃丹、甲萘威、莠去津、三氯酚和五氯酚 (DGLC-MSMS) (2012-APP-RLC-042)
32. 中药双黄连口服液及胶囊 online-SPE 方法开发 (2011-LC-AppSH-M18)
33. 在线柱切换 - 高效液相色谱快速测定婴儿奶粉中维生素 ADE 的含量 (2012-APP-RLC-020)

34. 山东潍坊瑞福油脂芝麻中黄曲霉毒素的测定 (2012-APP-LC-104)
35. 双三元测定牙膏中的三七皂苷类成分 (2012-APP-RLC-034)
36. 猪粪发酵液植物激素 (GA,6B,IAA,ABA) 的测定 (HPLC-UV) (BJ-FY10-139)
37. DGLC 和 CAD 检测器测定降解液中全氟丙酸~全氟辛酸的含量 (LC-SH-110708)
38. Sensitive Determination of Microcystins in Drinking and Environmental Waters (AN 261)
39. Automated Method Scouting to Speed Up the Development of Online SPE-LC-MS Analysis of Antibiotics (HPLC-MS) (Frank Steiner, Frank Arnold, et al. March 3, 2008)
40. Lei Liu, Kang-Ning Liu, Ya-Bin Wen, et al. Development of a fully automated on-line solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection method for the pharmacokinetic evaluation of bavachinin: A study on absolute bioavailability and dose proportionality [J]. J Chromatogr B, 2012, 893-894: 21- 28.
41. Dewei Shang, Xipei Wang, Xiutai Zhao, et al. Simultaneous determination of nitrendipine and hydrochlorothiazide in spontaneously hypertensive rat plasma using HPLC with on-line solid-phase extraction [J]. J Chromatogr B, 2011, 879: 3459-3464.
42. Direct Plasma Injection On-Line SPE-LC-MS/MS for the Quantitative Analysis of Drugs in Human Plasma Samples (HPLC-MS/MS) (<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/67575-LPN-2065-01-Direct-Plasma-note.pdf>)
43. Analysis of Antimycotic Drugs in Biofluids by On-Line SPE-LC (HPLC-UV) (http://www.dionex.com/en-us/webdocs/40381-LPN%201859-01_Antimycotic%20drugs.pdf)
44. Determination of Aniline and Nitroanilines in Environmental and Drinking Waters by On-Line SPE (AN292)
45. Fast and Effective Determination of Aflatoxins in Grains or Food Using Accelerated Solvent Extraction followed by HPLC (<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/67572-LPN-2069-01-Aflatoxins-note.pdf>)
46. Determination of Vitamin B12 in Beverages Using On-Line SPE Followed by HPLC with UV Detection (AN256)
47. Feng Guo, Qian Liu, Guang-bo Qu, et al. Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high- performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2013, 1281: 9-18.
48. Gaurava, Ashok Kumar Malika, P.K. Raib. Developments of a new SPME–HPLC–UV method for the analysis of nitro explosives on reverse phase amide column and application to analysis of aqueous samples [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172: 1652-1658.
49. Goran Mitulovic, Christoph Stingl, Ines Steinmacher, *et al.* Prevention of carryover effects of peptides and proteins in Nano LC-MS separations [J]. Anal. Chem. 2009, 81: 5955-5960.
50. XiaoNa Li, Ning Yu, JianMei Zhang, et al. Quantitative determination of cyclophosphamide in rat plasma by online SPE coupled with HPLC-DAD [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2012, 21: 156-161.
51. Anne-Marie Hesse, Paulo Marcelo, Jean Rossier, *et al.* Simple and universal tool to remove on-line impurities in mono- or two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry analysis [J]. J Chromatogr A, 2008, 1189: 175-182.

二、双三元液相色谱脱盐脱糖应用

52. Strategies for Coupling of Nonvolatile Salt-Based HPLC to MS Detection for the Separation and Characterization of Related Substances in Biopharmaceuticals. (67574-PO-LC-MS- Biopharmaceuticals-28Jun2011-LPN2858-01)

三、双三元液相色谱并联应用

53. 中药三七、肉苁蓉超快速并联分析 (2012-APP-LC-137)

54. 并联色谱同时分析盐酸去氯羟嗪和盐酸异丙嗪 (LC-AppSH-M10)
55. 并联色谱技术同时分析马钱苷、丹皮酚及青霉素、头孢菌素 C 杂质 (LC-AppSH-M26)
56. 并联色谱技术在罗红霉素和盐酸西替利嗪分析应用 (HPLC-UV) (GZ-FY11-13)
57. 卢燕, 许群, 陈静等. 高效液相色谱多阀多柱技术同时分析水溶性和脂溶性维生素 [J]. 环境化学, 2012, 31(9): 1442-1447.

四、双三元液相色谱二维应用

58. 二维检测东鹏特饮样品中肌醇 (2012-APP-LC-097)
59. 二维液相测定人参提取物中的 8 种人参皂苷 (2012-APP-LC-102)
60. 采用二维色谱质谱法分析双醋瑞因结果 (2012-APP-RLC-054)
61. 2D-UHPLC 分析苦荞麦中 12 个主要化学成分 (2012-APP-RLC-018)
62. On-line Characterization of Monoclonal Antibody Variants by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Operating in a Two-Dimensional Format. (On-Line-Characterization-of-MAb -Aug-11)
63. Optimization strategies for off-line two-dimensional liquid chromatography. (1-s2.0-S0 021967309001162-main [1])
64. DNASwift Monolith Column for DNA and RNA Oligonucleotide Purification. (73201-DS- DNASwift-29Jan2010-LPN2271-01)
65. Automated MAb Workflow: from Harvest Cell Culture to Intact Mass Analysis of Variants. (111618-PN-HPLC-MS-Automated-MAb-Workflow-25May2012-LPN3078-1)
66. Concanavalin A Column for Analysis of Glycoproteins and Their Tryptic Glycopeptides. (13707-AN1014-LC-ConA-Column-Glycoproteins-16Aug2012-AN70125_E)
67. Sebastiaan Eeltink, Sebastiaan Dolman, Frederik Detobel, *et al.* 1 mmID poly(styrene-co- divinylbenzene) monolithic columns for high-peak capacity one- and two-dimensional liquid chromatographic separations of intact proteins [J]. J. Sep. Sci. 2009, 32: 2504 –2509. LC GC Europe, 2005, 18(23): 345.
68. Xiaoliang Cheng, Liping Guo, Zaiquan Li, *et al.* A HPLC method for simultaneous determination of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and its active metabolite 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide in tumor-bearing nude mice plasma and its application to pharmacokinetics study [J]. J Chromatogr B, 2013, 915– 916: 64–70.

更安全

ThermoFisher
SCIENTIFIC

更清洁

更健康

赛默飞致力于帮助您使世界变得

关于赛默飞世尔科技

赛默飞世尔科技（纽约证交所代码：TMO）是科学服务领域的世界领导者。公司年销售额 170 亿美元，在 50 个国家拥有员工约 50,000 人。我们的使命是帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。我们的产品和服务帮助客户加速生命科学领域的研究、解决在分析领域所遇到的复杂问题与挑战，促进医疗诊断发展、提高实验室生产力。借助于 Thermo Scientific、Life Technologies、Fisher Scientific 和 Unity™ Lab Services 四个首要品牌，我们将创新技术、便捷采购方案和实验室运营管理的整体解决方案相结合，为客户、股东和员工创造价值。

欲了解更多信息，请浏览公司网站：www.thermofisher.com

赛默飞世尔科技中国

赛默飞世尔科技进入中国已超过 30 年，在中国的总部设于上海，并在北京、广州、香港、台湾、成都、沈阳、西安、南京、武汉等地设立了分公司，员工人数超过 3800 名。为了满足中国市场的需要，现有 8 家工厂分别在上海、北京和苏州运营。我们在全中国共设立了 7 个应用开发中心，将世界级的前沿技术和产品带给国内客户，并提供应用开发与培训等多项服务；位于上海的中国创新中心结合国内市场需求和国外先进技术，研发适合中国的技术和产品；我们拥有遍布全国的维修服务网点和特别成立的中国技术培训团队，在全国有超过 2000 名工程师提供售后服务。我们致力于帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。

欲了解更多信息，请登录 www.thermofisher.cn

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC