

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

弛豫理论对离子交换毛细管电色谱中峰压缩现象的研究

张维冰^{1,2}, 郑政峰², 张玉奎¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023;

2. 国立中兴大学化学系, 台湾 台中 402)

摘要 :在毛细管电色谱中,由于溶质在运输过程中所具有的电性质,常会产生一些特殊的现象。这些现象,如离子交换毛细管电色谱中产生超高柱效峰的现象,已经不能用一般的色谱理论加以解释。基于弛豫理论所建立的基本模型,在考虑溶质在两相中皆有可能发生正、反向迁移的情况下,得到了流出曲线一阶原点矩和二阶中心矩的理论表达式,并通过对溶质在两相中电扩散速率与电泳速率、电渗流速率关系的分析结果证实:溶质在固定相表面的电扩散行为可以使其保留变弱,出峰加快;而这种电扩散导致的超常柱效峰的出现具有不稳定性,只有在多方面因素综合影响匹配的情况下才可能出现。

关键词 :离子交换毛细管电色谱;峰压缩;弛豫理论

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0437-04

A Study on Peak Compression Effect in Ion-Exchange Capillary Electrochromatography with Relaxation Theory

ZHANG Weibing^{1,2}, JEN Jen-Fon², ZHANG Yukui¹

(1. National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese

Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Department of Chemistry,

National Chung-Hsing University, Taichung 402, China)

Abstract : Due to the electric characteristics of the solute transport in capillary electrochromatography (CEC), some special phenomena might occur. An example is the peak compression effect in ion-exchange capillary electrochromatography, which cannot be explained with common chromatography theory. According to the basic model of relaxation theory, it is considered that there are "co-" and "counter-" solute flows in mobile phase and in stationary phase, the expressions of the first moment and the second center moment of profile, and column efficiency are derived by the method of Laplace transform. The relations of electrophoresis velocity, electroosmosis velocity and electric dispersion velocity are also investigated with these expressions. The results show that this new model offers a better explanation for peak compression effect on the migration behaviour of charged solute in CEC. The retention time will be shorter by peak compression effect, which is similar to a solvent gradients process. The peak compression effect is not steady, and doesn't appear until the conditions are fitted in some special situation.

Key words : ion-exchange capillary electrochromatography; peak compression; relaxation theory

毛细管电色谱为高效液相色谱和毛细管电泳相结合的分离技术,综合了高效液相色谱的高选择性和毛细管电泳的高分离效能^[1-3]。毛细管电色谱中采用电渗流驱动代替高效液相色谱中的压力驱动,流动相在柱内的运输流型为楔形,有利于得到更高的柱效。但由于毛细管电色谱中溶质在运输过程中

具有的电性质,一些在液相色谱中可以忽略或不可能出现的运输特征却对电色谱分离有着重要影响。

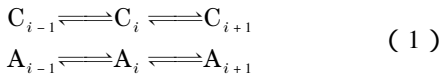
Evans等^[4]在采用离子交换毛细管电色谱进行几种药物的分离研究中出现了柱效奇高的反常现象,后来 Lobert等^[5]也报道了一种药物在裸胶上得到超高柱效,与电色谱中的局部堆积现象^[6]不同,

其流出峰远离电渗流标记物。在以强阴离子交换树脂 SAX 为固定相的毛细管电色谱过程中,也有人观察到类似的现象^[7],这一现象已经不能用一般的色谱理论或电色谱理论加以解释。

Stahlberg 等^[8]和 Horvath 等^[9]为了揭示这种现象的本质,分别建立了相应的理论模型。Stahlberg 等认为:非同一的电场强度及非线性吸附等温线的色谱与电泳输运机制的结合,对区带在色谱柱内的输运可能起到一定的稳定作用,使其分布不随迁移过程而变化是产生这种特殊峰压缩现象的原因;Horvath 等则认为:毛细管电色谱系统中形成的“内部梯度”导致谱带压缩效应的发生,而“内部梯度”是溶质的电泳迁移与其在固定相表面电扩散结合的结果。这些理论可以部分地说明这些特殊的实验现象,但 Lobert 等^[5]认为他们并没有很好地揭示这一现象的本质。本文基于弛豫理论^[10-12]的基本原理,引入逆向流的概念,并结合 Horvath 等^[9]对固定相表面溶质输运特征的描述,从理论上探讨毛细管电色谱中采用离子交换固定相时,流出曲线的统计特征及不同因素对其影响的规律。

1 溶质在固定相表面迁移的弛豫理论基本模型

根据弛豫理论的基本假设,溶质在电色谱柱内的输运过程以跃迁的形式完成,每一步的跃迁长度相当于塔板高度。Horváth 等^[9,13]认为,离子交换固定相表面的特殊带电性质,可能导致固定相表面吸附状态的溶质沿着一定的方向迁移。如果不考虑溶质在两相间传质速率的有限性,可以建立溶质在固定相表面迁移的弛豫理论基本模型:



其中 i 表示距离柱进样端第 i 个跃迁长度; C 和 A 分别代表溶质在流动相和固定相中的形态, C 序列对应于溶质在流动相中的输运过程, A 序列对应于溶质在固定相表面的输运流。

若定义 u_{c+} 和 u_{c-} 分别为流动相中溶质的正向迁移速率和逆向迁移速率, u_{a+} 和 u_{a-} 分别为固定相中溶质的正向迁移速率和逆向迁移速率, κ_c 和 κ_a 分别为溶质在流动相间和固定相间进行质量传递的速率常数,则基于式(1)也可以建立相应的动力学质量平衡方程组:

$$\begin{aligned} \frac{dC_i}{dt} &= u_{c+} \cdot C_{i-1} + u_{c-} \cdot C_{i+1} - \\ &(u_{c+} + u_{c-})C_i + \kappa_a A_i - \kappa_c C_i \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_i}{dt} &= u_{a+} \cdot A_{i-1} + u_{a-} \cdot A_{i+1} - \\ &(u_{a+} + u_{a-})A_i + \kappa_c C_i - \kappa_a A_i \end{aligned} \quad (3)$$

引入初始条件

$$C_0(t=0) = C(0) \quad C_{i>0} = 0 \quad (4)$$

其中 C_i 和 A_i 分别为溶质在第 i 区段上流动相和固定相中的浓度。

结合式(2)与式(3),令 $R_i = A_i + C_i$,即在第 i 区段上单位体积的溶质总量,则在柱内的第 i 区段上溶质输运总的的质量平衡方程可表示为:

$$\frac{dR_i}{dt} = u_{R+} R_{i-1} + u_{R-} R_{i+1} - (u_{R+} + u_{R-}) R_i \quad (5)$$

其中
$$u_{R+} = \frac{u_{c+} + k' u_{a+}}{1 + k'} \quad (6)$$

$$u_{R-} = \frac{u_{c-} + k' u_{a-}}{1 + k'} \quad (7)$$

其中 $k' = \kappa_c / \kappa_a$ 。

式(5)表示的过程相当于一个毛细管区带电泳过程,其中正向迁移速率与逆向迁移速率分别由式(6)和式(7)表示。结合式(4),对应的 Laplace 变换解的形式为:

$$\begin{aligned} \bar{C}_m &= C(0) \cdot \\ &\left(\frac{2u_{R+} +}{(u_{R+} + u_{R-} + s) + \sqrt{(u_{R+} + u_{R-} + s)^2 - 4u_{R+}u_{R-}}} \right)^m \end{aligned} \quad (8)$$

其中 m 为溶质在柱内总的跃迁次数, s 为 Laplace 变换参量。

再根据流出曲线 Laplace 变换解与其统计矩之间的关系^[14],进一步可以得到流出曲线一阶原点矩 γ_1 和二阶中心矩 μ_2 的表达式:

$$\gamma_1 = \frac{m}{u_{R+} - u_{R-}} \quad (9)$$

$$\mu_2 = \frac{m}{(u_{R+} - u_{R-})^2} + \frac{2mu_{R-}}{(u_{R+} - u_{R-})^3} \quad (10)$$

式(10)中第一项表示速度流对谱带展宽的作用,第二项中包括了分子扩散和电扩散的作用。根据式(9)和式(10)可以进一步对流出曲线的特征及其影响规律加以研究。

2 结果与讨论

2.1 表面电扩散对保留时间的影响

带电溶质在流动相中的迁移与一般反相电色谱中的情况相同,溶质的正向和逆向迁移速率可分别表示为:

$$u_{c+} = u_0 + u_D \quad (11)$$

$$u_{c-} = u_D \quad (12)$$

其中 μ_0 和 u_D 分别为溶质在流动相中的迁移速度和广义扩散速率。广义扩散速率可简化为由分子扩散速率 u_d 和电扩散速率 u_{ed} 两部分组成, 因此,

$$u_{c-} = u_d + u_{ed} \quad (13)$$

其中 μ_{ed} 是由于本底电解质中的同离子迁移速率 u_{bep} 与荷电溶质的迁移速率 u_{cep} 存在差别所致。当这种差别存在时, 一种离子相对于另一种离子的运动将产生类似于层流的现象。注意到唯象处理的特征 μ_{ed} 可近似表示为两种同离子层流的速率差:

$$u_{ed} = u_{bep} - u_{cep} \quad (14)$$

将式(11)~式(14)结合, 则在流动相中的溶质满足:

$$u_{c-} = u_{bepc} - u_{epc} + u_d \quad (15)$$

$$u_{c+} = u_{bepc} + u_{eoc} + u_d \quad (16)$$

同理, 对于固定相表面形态的溶质可以得到:

$$u_{a-} = u_{bepa} - u_{epa} + u_d \quad (17)$$

$$u_{a+} = u_{bepa} + u_d \quad (18)$$

其中 μ_{ep} 和 u_{eo} 分别表示电泳淌度和电渗流淌度, 下标 a 和 c 分别表示溶质处于固定相和流动相中。这里没有考虑分子扩散在两相中的差别。

进一步将式(15)~式(18)带入式(9)中得到:

$$\gamma_1 = \frac{m(1+k')}{(u_{eoc} + u_{epc}) + k'u_{epa}} \quad (19)$$

γ_1 的物理意义为溶质的保留时间^[16]。

令 $k_e = u_{epc}/u_{eoc}$, $k_c = u_{epa}/u_{epc}$, 其中 k_e 为溶

$$\mu_2 = \frac{m[(u_{eoc} - u_{epc}) - k'u_{epa} + 2(1+k')u_d + 2(u_{bepc} + k'u_{bepa})]}{[(u_{eoc} + u_{epc}) + k'u_{epa}]^2} (1+k')^2 \quad (21)$$

$$N = \frac{m[(u_{eoc} + u_{epc}) + k'u_{epa}]}{(u_{eoc} - u_{epc}) - k'u_{epa} + 2(1+k')u_d + 2(u_{bepc} + k'u_{bepa})} \quad (22)$$

将式(22)进一步改写为:

$$N = \frac{2m(1+k_e)}{1-k_e - k_e k_c k' + 2k_{ud} + 2k_{ui}} - m \quad (23)$$

其中

$$k_{ui} = 2(u_{bepc} + k'u_{bepa})/u_{eoc}$$

$$k_{ud} = 2(1+k') \cdot u_d/u_{eoc}$$

由式(23)可知, 随着溶质在固定相表面迁移速度的加快 k_{ui} 增加, 柱效增高。特别地, 对于特定的溶质和分离系统, 如果有:

$$1 - k_e - k_e k_c k' + 2k_{ud} + 2k_{ui} \rightarrow 0 \quad (24)$$

再考虑扩散等影响, 将得到极高的柱效。此时, 对应的溶质迁移时间:

$$t_m = \frac{t_0(1+k')}{2(1+k_{ud} + k_{ui})} \quad (25)$$

式(25)实际上是一种非常极端的情况, 因此实验条件的微小改变可能使得测定的柱效有很大改变。事实上, 在 Lobert 等^[5]完成的实验中, 4 次进

质在流动相中的电泳淌度与电渗流淌度之比, 反映了带电溶质的电色谱行为与其在 HPLC 中迁移行为的差异 k_e 为溶质在固定相和流动相上的电泳淌度之比。如果不考虑溶质在固定相中的迁移, 式(19)可以还原为电色谱中带电溶质保留时间或保留因子的一般表达式。

由于在固定相表面没有电渗流存在, 式(19)可以改写成:

$$t_m = \frac{t_0(1+k')}{1+k_e + k_e k_c k'} \quad (20)$$

其中 t_m 表示溶质的迁移时间。

Horvath 等^[9]根据其建立的模型采用唯象的方法也得到了与式(20)类似形式的表达式。在式(20)中, 因 $k_e > 0$, 意味着带电溶质在固定相表面的电扩散作用可以导致其保留变弱。与一般液相色谱得到的谱图对比, 这种电扩散作用类似于在电色谱柱中产生一个沿柱轴向的“内部溶剂梯度”, 从而导致溶质的流出时间加快。Horvath 等^[9]也根据实验结果证实了这一结论。

2.2 表面电扩散对柱效的影响

与式(19)的推导同理, 将式(15)~式(18)带入式(10)中, 可得到流出曲线二阶中心矩的表达式(21); 又因为电色谱柱效 N 与流出曲线统计矩的关系为 $N = \gamma_1^2/\mu_2$ ^[14], 而 μ_2 的物理意义为流出曲线的方差^[14], 因此结合式(21)与式(19)可得到式(22)。

样的柱效从 250 000 变化到 1 500 000, 方法的稳定性较差。

在系统一定的情况下, 尽管 k_e 与溶质的性质有关, 但关系并不很大, 因此极高柱效峰可能出现在色谱图的任意位置, 这一结论与 Lobert 等^[5]得到的实验结果相同。

3 小结

尽管由于流型的影响, 电色谱具有较液相色谱更高的柱效, 但是离子交换毛细管电色谱中产生超高柱效峰的现象已经不能够采用一般的色谱理论加以解释, 其本质上与溶质在固定相表面的迁移行为有关。本文基于弛豫理论的基本模型, 在考虑溶质在两相中皆有可能发生正、逆向迁移的情况下, 得到了可以反映溶质在两相中的迁移特征影响的流出曲线一阶原点矩和二阶中心矩的理论表达式, 以及色

谱柱效的理论表达式。并通过对溶质在两相中电扩散速率与电泳淌度、电渗流淌度关系的分析证实,溶质在固定相表面的电扩散行为可以使其保留变弱,出峰时间加快。更重要的是从理论上证实了这种电扩散导致的超常柱效峰的出现具有不稳定性,超常柱效现象只有在多方面因素综合影响匹配的情况下才可能出现。因此这种现象在实验中应尽量避免,也很难以在普适的电色谱方法发展中得到真正的实际应用。

参考文献:

[1] Zou Hanfa , Liu Zhen , Ye Mingliang , Zhang Yukui. Capillary Electrochromatography and Its Applications. Beijing : Science Press (邹汉法,刘震,叶明亮,张玉奎. 毛细管电色谱及其应用. 北京:科学出版社),2001. 7
 [2] Tsuda T. Anal Chem ,1987 ,59(3):521
 [3] Ettre L S. Chromatographia ,2000 ,51(1/2):7
 [4] Smith N W , Evans M B. Chromatographia ,1995 ,41(3/4):

197
 [5] Steiner F , Lobert T. J Sep Sci ,2003 ,26(17):1 589
 [6] Enlund A M , Andersson M E , Hagman G. J Chromatogr A , 2002 , 979(1-2): 335
 [7] Enlund A M , Andersson M E , Hagman G. J Chromatogr A , 2004 , 1 044(1-2):153
 [8] Stahlberg J. Anal Chem ,1997 ,69 :3 812
 [9] Xiang R , Horvath C. Anal Chem ,2002 ,74(4):762
 [10] Zhang Weibing , Zhang Bo , Zhu Jun , Zhang Yukui. Acta Chimica Sinica (张维冰,张博,朱军,张玉奎. 化学学报),2001 ,59(2):257
 [11] Zhang Y , Zhu J , Zhang L , Zhang W. Anal Chem ,2000 ,72 (22):5 744
 [12] Zhang Weibing , Xu Guowang , Li Ruijiang , Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography (张维冰,许国旺,李瑞江,张玉奎. 色谱),1999 ,17(1):1
 [13] Svec F. J Sep Sci ,2004 ,27 :1 255
 [14] Lu Peizhang , Dai Chaozheng. Basic Theory of Chromatography. Beijing : Science Press (卢佩章,戴朝政. 色谱理论基础. 北京:科学出版社),1989. Appendix

2006 年《化学分析计量》杂志征订启事

全国各地邮局均可订阅 邮发代号 24-138

《化学分析计量》是中国兵器工业集团第五三研究所(国防科工委化学计量一级站)主办的全国性分析测试、化学计量专业技术刊物。主要报道分析测试、化学计量行业的技术、学术论文;标准物质的研制与应用;分析、计量仪器的研制、开发、检定、维修经验;相关专业的法规、政策、标准,管理经验,技术发展动态,综述和技术经济信息等。本刊特色为学术性和技术性相结合,报道及时,信息容量大,涵盖面广。主要栏目有分析测试、仪器设备、经验交流、标准物质、计量管理、不确定度、综述、讲座、市场动态、简讯、广告等。

《化学分析计量》已被美国《化学文摘》(CA)、《中国化学化工文摘》、《中国无机分析化学文摘》等众多期刊和数据库收录。本刊为中国石油和化工行业优秀期刊、中国兵器工业优秀期刊、山东省优秀期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。

《化学分析计量》为双月刊,大16开本,单月20日出版,2006年全年定价共48元。公开发行,国内邮局发行代号24-138,中国国际图书贸易总公司办理国外订阅,国外发行代号4794 BM,同时杂志社自办发行业务。本刊自创刊以来至2005年共计14卷47期的合订本光盘已公开发售,利用该合订本光盘,既可按作者、文题、关键词、年、期等分类查阅本刊已发表的所有科技文章和科技信息的全文,又可根据读者自定义的关键词进行全文检索,非常方便、实用。该合订本光盘优惠价150元。

欢迎广大读者到当地邮政局(所)办理订阅手续,漏订或订阅合订本光盘及过期刊物的读者可直接向杂志社订阅。

邮局汇款:

地 址 济南市 108 信箱杂志社
 邮 编 250031
 电 话 (0531)85878132 85878278
 传 真 (0531)85947355 85878224
 电子信箱 master@anameter.net

银行汇款:

户 名 中国兵器工业集团第五三研究所
 开户银行 济南市工商银行八一分理处
 帐 号 1602001209014424079
 网 址 www.anameter.net

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

多氯联苯的正辛醇-空气分配系数与气相色谱保留参数的关联

张 青, 赵洪霞, 陈吉平, 梁鑫淼

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要 通过对 19 种多氯联苯(PCBs)在 DB-1, DB-5 和 DB-1701 等 3 种色谱柱上的气相色谱(GC)保留参数 A, B 值与正辛醇-空气分配系数(K_{oa})的相关分析,发现 GC 保留参数 A, B 与 K_{oa} 存在明显的线性关系。采用了逐步回归的方法,建立了保留参数 A, B 与 K_{oa} 的二元回归方程,相关系数的平方达到了 0.99 以上,标准偏差小于 0.11。此外,根据实验测定的 153 个 PCBs 的 GC 保留参数以及定量构效关系(QSAR)研究中的 56 个预测值,对剩余 190 种 PCBs 的 K_{oa} 值进行了预测。

关键词:气相色谱保留参数;正辛醇-空气分配系数(K_{oa});多氯联苯

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)05-0441-04

Correlation Between Octanol-Air Partition Coefficients and Retention Parameters of Polychlorinated Biphenyls on Gas Chromatographic Columns

ZHANG Qing, ZHAO Hongxia, CHEN Jiping, LIANG Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: Octanol-air partition coefficient (K_{oa}) is a key descriptor for describing the partitioning of organic pollutants, especially persistent organic pollutants (POPs), between air and environmental organic phases. Thus it is necessary to determine or predict the K_{oa} values of these compounds. A novel method was introduced to describe the quantitative relationship between the octanol-air partition coefficients and gas chromatographic (GC) retention parameters A, B values of polychlorinated diphenyls (PCBs) which are typical persistent organic pollutants. By the correlation analysis between GC retention parameters A, B values of PCBs on DB-1, DB-5 and DB-1701 columns, and their octanol-air partition coefficients, a good linear relationship was found. The stepwise multiple linear regression was used to derive binary equations with the correlation coefficients greater than 0.99, and the standard deviations are less than 0.11. In addition, based on the 153 experimental A, B values and 56 predicted A, B values, the K_{oa} values of the remaining 190 PCBs were predicted.

Key words: gas chromatographic retention parameters; octanol-air partition coefficients (K_{oa}); polychlorinated biphenyls

有机污染物的正辛醇-空气分配系数(K_{oa})是研究疏水有机污染物在环境中迁移行为的一个重要的理化参数,它能很好地描述有机污染物在空气、土壤和植物叶片等介质中的迁移、分配能力,对于评价两极地区的大气污染及生物污染尤为重要。正辛醇-空气分配系数的定义为^[1]:

$$K_{oa} = C_o / C_a \quad (1)$$

式中 C_o, C_a 分别是溶质在正辛醇和空气相中的浓度。目前,基于正辛醇-空气分配系数已成功地建立

了很多持久性有机污染物在环境中迁移、转化的模型^[2-4]。然而溶质在正辛醇-空气中的分配系数的直接测定非常繁琐费时,且受诸多外在因素的影响,因此发展一些估算溶质在正辛醇-空气中的分配系数的方法非常有意义。目前已经形成了一些估算方法,如正辛醇-水分配系数(K_{ow})估算法^[5]、量子化学参数法^[6]、线性自由能法^[7]等,而采用气相色谱法预测 K_{ow} 的报道不多^[8]。本文以持久性有机污染物多氯联苯(PCBs)为例,介绍了一种气相色谱保

留指数法预测正辛醇-空气分配系数的方法, 研究结果表明这种方法具有良好的预测能力。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP5890 气相色谱仪, 包括电子捕获检测器 (ECD) 和分流/不分流进样系统; DL-800 色谱工作站; 美国 J&W Scientific 公司生产的 60 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm 的毛细管色谱柱 DB-1, DB-5 和 DB-1701 柱。

PCB 混合物标准溶液 (National Research Council of Canada), 分别含有以下 PCBs 组分: 一氯代 PCBs :1 和 3 (1 和 3 为 PCB 的编号, 该编号由 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) 命名, 下同); 二氯代 PCBs :4, 8, 10 和 15; 三氯代 PCBs :18, 19, 22, 28, 33 和 37; 四氯代 PCBs :44, 49, 52, 54, 70, 74, 77 和 81; 五氯代 PCBs :87, 95, 99, 101, 104, 105, 110, 114, 118, 119, 123 和 126; 六氯代 PCBs :128, 138, 149, 151, 153, 153, 155, 156, 157, 158, 167, 168 和 169; 七氯代 PCBs :170, 171, 177, 178, 180, 183, 187, 188, 189 和 191; 八氯代 PCBs :194, 199, 201, 202 和 205; 九氯代 PCBs :206 和 208; 十氯代 PCBs :209。Aroclor 1016, 1221, 1242, 1260 和 ClophenA50 (德国国家环境与健康研究中心, 生态化学研究所提供)。

1.2 实验方法

HP5890 气相色谱仪, 采用分流进样模式; 电子捕获检测器保持 300 °C; N₂ 为载气, 柱头压力为 0.172 MPa (25 psi), 在 DB-5, DB-1 和 DB-1701 色谱柱上, 分别测定 PCBs 在 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 和 250 °C 等 8 个恒温条件下的保留时间以获取保留参数。在不同恒温条件下的死时间由二氯甲烷测定。恒温条件下各 PCBs 组分在各色谱柱上的识别是通过与以下数据或谱图的比较完成的: Mullin 等^[9]在 SE-54 柱上获得的全部 209 种 PCBs 的相对保留值及谱图; Larsen 等^[10]用一系列 Aroclor 混合样 (Aroclor 1016, 1232, 1248 和 1262 等) 在 SIL-5, SIL-8 和 SIL-19 毛细管柱上获得的各 PCBs 组分的分离谱图; Frame^[11]发表的不同固定相上各 PCB 组分的相对保留数据及一系列 Aroclor 样品中的 PCB 组分的含量分布数据; 本文在各色谱柱上分别用 PCB 混合标准溶液予以确认。

2 结果与讨论

2.1 理论

根据式 (1) 可知 K_{oa} 是表征溶质在气-液两相中

分配能力的系数, 如果把正辛醇填充至气相色谱柱作固定相, 那么正辛醇-空气分配系数可以通过下式计算获得:

$$K_{oa} = k\beta \quad (2)$$

式中 k 为溶质的气相色谱保留因子, β 为相比。遗憾的是, 对于 PCBs 等有机污染物来讲, 其饱和蒸汽压比正辛醇要低很多, 因此通过气相色谱法直接测定 K_{oa} 是不可能的。但如人们所知, 不同选择性的色谱柱间保留指数可以准确地换算, 如式 (3) 所示:

$$I = AI' + BN + C \quad (3)$$

式中 I, I' 是溶质在两种不同固定相上的保留指数; N 是溶质的含碳数; A, B 和 C 是常数, A 反映了一种固定相相对于另一种固定相对同碳数异构体的分离能力大小, B 反映了一个甲基在两种固定相上贡献自由能的差别, C 反映了不同官能团化合物在两种固定相上相互作用的差别。对于 PCBs 而言, $N=0$, $C = c_1\alpha_A + c_2\mu^2 + c_3\chi_H + c_4$ 。因此式 (3) 可改为:

$$I = AI' + c_1\alpha_A + c_2\mu^2 + c_3\chi_H + c_4 \quad (4)$$

式 (4) 中 c_1, c_2, c_3 和 c_4 是常数; α_A 是极化率; μ 是偶极距; χ_H 是氢键能。根据式 (2) ~ (4), 可以推出 $\log K_{oa}$ 的准确估算式, 用式 (5) 表示:

$$\log K_{oa} = A \log k + c_1\alpha_A + c_2\mu^2 + c_3\chi_H + c_4 \quad (5)$$

尽管通过式 (5) 可以直接计算 PCBs 的 $\log K_{oa}$ 值, 但由于在式 (5) 中, 有关 PCBs 的这些分子间作用参数的缺少, 因此用式 (5) 直接计算 $\log K_{oa}$ 值也是困难的。而气相色谱的保留参数 A, B 值可以很好地表述这些分子间的作用参数, 因此 $\log K_{oa}$ 与气相色谱的保留参数 A, B 值可能会存在式 (6) 这样的线性关系。

$$\log K_{oa} = a_0 + a_1A_1 + b_1B_1 + a_2A_2 + b_2B_2 + a_3A_3 + b_3B_3 + \dots + a_nA_n + b_nB_n \quad (6)$$

其中 a_0 为常数项, a_1, a_2, \dots, a_n 和 b_1, b_2, \dots, b_n 为线性回归系数; A_n, B_n 为溶质组分 n 的保留参数。对于式 (6) 中的 A, B 值, 通过溶质在气相色谱中的保留时间可直接获得, 因此通过式 (6) 可以方便、准确地对溶质的 $\log K_{oa}$ 值进行估测。

2.2 色谱柱的表征

GC 色谱柱的选择及分子间相互作用是通过线性溶剂化关系表征来完成的。在色谱领域, 通过保留参数与溶质溶剂化参数的关联分析, 运用线性溶剂化自由能 (LSER) 对分配或吸附过程中的分子作用力进行表征, 是近年来广泛采用的方法。其理论基础是溶质在固定相上的保留决定于溶质分子与固定相间的各种作用力 (色散、静电、偶极/极化、氢键碱性和酸性等):

$$SP = SP_0 + l \log L^{16} + S\pi + a\alpha_H + b\beta_H + d\delta \quad (7)$$

式中 SP 是热力学参数,如平衡系数或色谱中的保留因子等; SP_0 是 SP 的常数; $\log L^{16}$ 为色散力作用和溶剂分子中形成空穴时的吸收能量效应; π 为诱导偶极及偶极作用大小的量度; α_H 、 β_H 分别表示化合物在溶质-溶剂相互作用中提供质子或接受质子的能力; δ 为 Hildebrand 溶解度参数; l 、 S 、 a 、 b 、 d 是溶剂化参数的系数,这些系数的大小和正负反映了影响保留的响应分子间作用力的强弱和方向。

Zhang 等^[8]根据式(7),以 13 种化合物作为探针化合物,对 4 种色谱柱(DB-5, DB-Dioxin, RTX-2330 和 007-FFAP)与化合物的作用力进行了表征。由于 DB-5 柱是分析 PCBs 组分最常用的色谱柱,因此我们以 DB-5 柱的表征结果($SP_0 = -2.911$, $l = 0.400$, $S = 0.416$, $a = 0.011$, $b = 0.058$, $d = 0$; $SD = 0.017$, $r = 1.000$, $n = 13$)为例进行说明。从表征结果可以看到 l 和 S 的值相当,表明在 DB-5 柱上色散力和诱导力的作用基本相同,因此可以采用极性弱于 DB-5 柱、色散力相对占优势的 DB-1 柱和极性强于 DB-5 柱、诱导力相对占主导的 DB-1701 柱与 DB-5 柱 3 种色谱柱的保留参数来估算 K_{oa} 值。

2.3 $\log K_{oa}$ 与保留参数 A 、 B 值的回归分析

19 种 PCBs 在 20 °C 时的 K_{oa} 值由 Harner 等^[12]用发生柱(generator column)测得,结果见表 1。

采用逐步回归的方法分别考察了 19 种 PCBs 在 20 °C 条件下的 K_{oa} 与 3 种色谱柱上的保留参数 A 、 B 值的相关性。在 6 个保留参数中, $\log K_{oa}$ 与 $B_{(DB-1701)}$ 的相关性最好,相关系数的平方为 0.987,标准偏差为 0.120 5 个对数单位。当增加 DB-1 柱的保留指数 A 值时, $\log K_{oa}$ 与 3 种色谱柱上的 A 、 B 值

表 1 Harner 等^[12]测定的 $\log K_{oa}$ 实验值

Table 1 $\log K_{oa}$ values measured by Harner *et al.*^[12]

PCB No.	$\log K_{oa}$	A	B
3	7.01	-4.82	3470
15	7.88	-5.06	3792
29	8.03	-4.77	3792
49	8.57	-4.96	3981
53	8.24	-5.26	3965
61	8.90	-2.89	3464
66	9.22	-3.82	3827
77	9.96	-3.14	3828
95	9.06	-4.30	3904
96	8.77	-4.60	3913
101	9.31	-3.82	3841
105	10.27	-5.68	4678
118	10.08	-5.92	4693
126	10.61	-5.98	4870
138	10.09	-5.57	4584
153	10.04	-6.02	4695
155	9.16	-2.21	3954
171	10.51	-5.71	4757
180	10.75	-4.70	4535

的相关性得到了最大的改善,相关系数的平方增加到 0.991,而其他参数的加入不能很好地改善其相关性。当在公式中加入第三个变量时,相关性的改善也不是很明显,相关系数提高得不是很大,此外还存在一定的共线性效应。因此基于 $\log K_{oa}$ 与保留参数 $B_{(DB-1701)}$ 和 $A_{(DB-1)}$ 值间的对应关系,建立了 20 °C 时预测 $\log K_{oa}$ 的模型:

$$\log K_{oa} = 2.189 \times 10^{-3} B_{(DB-1701)} + 0.83 A_{(DB-1)} + 3.557$$

$$N = 19, R^2 = 0.991, SD = 0.1021, F = 925.977$$

其中 R 表示相关系数, SD 表示标准偏差, F 表示统计方差检测值, N 表示样本数, $F_{0.05}$ 表示置信度为 0.05 时的统计方差临界值,为了进一步验证这种相关关系,我们还进行了统计方差检验,在置信度为 0.05 时,各线性模型的统计方差检测值 F 明显高于其对应的临界值($F_{0.05} = 3.52$),显著性很高,表明 GC 保留参数 A 、 B 值与 $\log K_{oa}$ 值的线性非常好。

表 2 列出了用上述模型估算的 19 种 PCBs 的 K_{oa} 值及相对误差值。同时,表 2 中也列出了 Chen 等^[13]用偏最小二乘法(PLS)建立的量子化学参数模型所预测的 K_{oa} 值和相对误差。从表 2 可以看出,Chen 等预测的最大相对误差为 3.4%,而本文用 GC 保留指数模型所预测的最大相对误差为 2.28%。从整体上看,本文的预测结果更接近于实验值。图 1 显示了 19 种 PCBs 的正辛醇-空气分配系数实验值和预测值的相关关系。

表 2 20 °C 下 19 种 PCBs 的实验测定值与预测值的比较

Table 2 Comparison of $\log K_{oa}$ values of 19 PCBs between experimental and predicted values by quantum chemistry and GC method at 20 °C

PCB No.	Exp. value	Predicted values	
		quantum chemistry ^[13] ($RE^*/\%$)	GC ($RE/\%$)
3	7.01	7.11(1.43)	7.03(0.31)
15	7.88	8.10(2.79)	7.83(0.59)
29	8.03	8.27(2.99)	7.85(2.28)
49	8.57	8.33(2.80)	8.55(0.23)
53	8.24	7.96(3.40)	8.38(1.68)
61	8.90	8.99(1.01)	8.94(0.46)
66	9.22	9.36(1.52)	9.13(0.94)
77	9.96	9.70(2.61)	9.93(0.31)
95	9.06	9.04(0.22)	9.15(1.00)
96	8.77	8.76(0.11)	8.75(0.27)
101	9.31	9.34(0.32)	9.37(0.59)
105	10.27	10.18(0.88)	10.08(1.90)
118	10.08	9.90(1.79)	9.96(1.15)
126	10.61	10.63(0.19)	10.54(0.67)
138	10.09	10.07(0.20)	10.23(1.39)
153	10.04	10.01(0.30)	10.10(0.61)
155	9.16	9.27(1.20)	9.26(1.11)
171	10.51	10.65(1.33)	10.50(0.05)
180	10.75	11.01(2.42)	10.74(0.07)

* RE : relative error.

根据实验测定的 153 种 PCBs 在 3 种色谱柱上的 A, B 值以及本文采用定量构效关系(QSAR)以 PCBs 的 19 种取代模式为描述符,153 种 PCBs 的保留参数 A, B 值为训练集和验证集建立的模型,对剩余的 56 种 PCBs 预测的 A, B 值(见文献[14]),用本文模型把全部剩余的 190 种 PCBs 在 20 °C 时的 K_{oa} 值进行了预测,结果见表 3。

表 3 剩余 190 种 PCBs 在 20 °C 时的 $\log K_{oa}$ 预测值

Table 3 The predicted $\log K_{oa}$ values at 20 °C of the remaining 190 PCBs

PCB No.	$\log K_{oa}$	PCB No.	$\log K_{oa}$	PCB No.	$\log K_{oa}$	PCB No.	$\log K_{oa}$
1	6.65	54	8.09	109	8.73	162	10.52
2	6.98	55	9.46	110	9.77	163	10.25
4	7.21	56	9.44	111	9.54	164	10.20
5	7.55	57	8.90	112	9.30	165	9.94
6	7.46	58	7.98	113	9.34	166	9.27
7	7.26	59	8.82	114	9.99	167	10.35
8	7.53	60	9.36	115	9.56	168	10.14
9	7.33	62	8.55	116	9.22	169	11.02
10	7.17	63	8.97	117	9.37	170	10.91
11	7.68	64	8.87	119	9.38	172	10.70
12	7.89	65	8.49	120	9.59	173	10.55
13	7.88	67	8.89	121	9.17	174	10.35
14	7.62	68	8.86	122	10.05	175	10.19
16	8.08	69	8.53	123	10.03	176	10.12
17	7.85	70	9.15	124	9.96	177	10.50
18	7.89	71	8.89	125	8.46	178	10.16
19	7.75	72	8.83	127	10.05	179	9.95
20	8.38	73	8.58	128	10.36	181	10.47
21	8.33	74	9.01	129	10.30	182	10.48
22	8.47	75	8.60	130	10.18	183	10.27
23	7.14	76	9.08	131	10.10	184	10.09
24	8.05	78	9.41	132	10.03	185	10.24
25	8.18	79	9.34	133	8.89	186	10.19
26	8.20	80	9.08	134	9.97	187	10.27
27	7.89	81	8.46	135	9.76	188	10.03
28	8.25	82	9.90	136	9.66	189	11.25
30	8.56	83	9.54	137	10.08	190	10.93
31	7.27	84	9.46	139	9.79	191	10.79
32	8.06	85	9.64	140	9.88	192	10.68
33	8.37	86	9.39	141	10.09	193	10.54
34	7.99	87	9.66	142	9.71	194	11.42
35	7.66	88	9.03	143	8.83	195	11.18
36	8.44	89	8.23	144	9.83	196	10.90
37	8.92	90	9.29	145	9.51	197	10.81
38	8.59	91	9.15	146	10.05	198	10.80
39	8.51	92	9.33	147	9.75	199	10.87
40	9.02	93	8.97	148	9.63	200	10.87
41	8.80	94	8.02	149	9.88	201	10.34
42	8.78	97	9.58	150	9.43	202	10.28
43	7.61	98	9.07	151	9.76	203	10.86
44	8.81	99	9.35	152	9.45	204	10.77
45	8.49	100	8.69	154	8.62	205	11.47
46	8.79	102	9.04	156	10.67	206	11.59
47	8.51	103	7.93	157	10.76	207	11.06
48	8.54	104	7.70	158	10.28	208	10.89
50	8.20	106	9.76	159	10.39	209	11.59
51	8.41	107	9.94	160	10.04		
52	8.61	108	9.79	161	10.00		

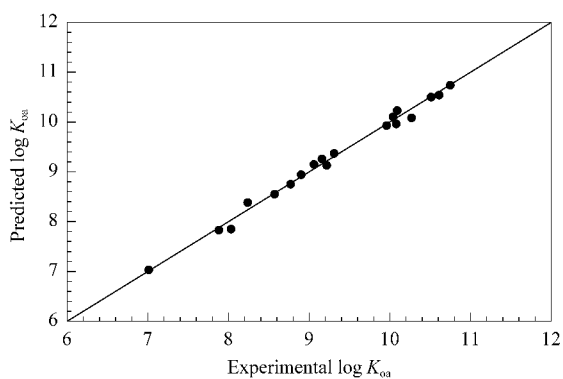


图 1 表 2 中 19 种 PCBs 的 $\log K_{oa}$ 的实验测定值与预测值的比较

Fig.1 Plot of experimental and predicted values of $\log K_{oa}$ of the 19 PCBs in Table 2

3 结论

通过以上研究表明,GC 保留指数 A, B 值和有机污染物的正辛醇-空气分配系数具有很好的相关性,采用逐步回归方法建立的二元线性模型对有机污染物的正辛醇-空气分配系数的预测结果接近于实验值。根据实验测定的 153 种 PCBs 在 3 种色谱柱上的 A, B 值和 QSAR 研究中对 56 种 PCBs 的 A, B 的预测值,对剩余的 190 种 PCBs 的 $\log K_{oa}$ 值进行了预测。和实验测定的发生柱法相比,用 GC 保留指数法对 PCBs 在正辛醇-空气中的分配系数进行预测不失为一种简便有效的方法。

参考文献:

- [1] Harner T, Mackay D. Environ Sci Technol, 1995, 29(6): 1599
- [2] Lee R G M, Jones K C. Environ Sci Technol, 1999, 33: 3596
- [3] Weiss P. Environ Sci Technol, 2000, 34: 1707
- [4] Won D Y, Corsi R L, Rynes M. Environ Sci Technol, 2000, 34: 4193
- [5] Li A, Andren A W. Environ Sci Technol, 1994, 28: 47
- [6] Wang Liansheng, Han Shuo. The Structure, Property and Activity of Molecules. Beijing: Chemical Industry Press (王连生, 韩朔. 分子结构、性质与活性. 北京: 化学工业出版社), 1997. 81
- [7] Chen J W, Harner T, Yang P, Quan X, Chen S, Schramm K W, Kettrup A. Chemosphere, 2003, 51: 577
- [8] Zhang X M, Schramm K W, Henkelmann B, Klimm C, Kaune A, Kettrup A, Lu P C. Anal Chem, 1999, 71: 3834
- [9] Mullin M D, Pochini C M, McCrindle S, Romkes M, Safe S H, Safe L M. Environ Sci Technol, 1984, 18: 468
- [10] Larsen B, Bowadt S, Tilio R. Int J Environ Anal Chem, 1992, 47: 47
- [11] Frame G M. Fresenius J Anal Chem, 1997, 357(6): 714
- [12] Harner T, Bidleman T F. J Chem Eng Data, 1996, 41: 895
- [13] Chen J W, Harner T, Schramm K W, Quan X, Xue X Y, Kettrup A. Computational Biology and Chemistry, 2003, 27: 405
- [14] Zhao H X, Zhang Q, Xue X Y, Liang X M, Kettrup A. Anal Bioanal Chem, accepted

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

多氯联苯分子结构参数与色谱焓、熵变化的定量关系

张 青¹, 戴朝政²

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023 ;
2. 中国科学院成都有机化学研究所, 四川 成都 610041)

摘要 :通过理论分析与研究,提出了描述多氯联苯(PCBs)氯原子数目与取代位置有关的分子拓扑指数——结构参数 J_G 以及描述多氯联苯分子中氯原子之间相邻关系的分子拓扑指数——邻接参数 L_j ,并推导出 PCBs 在色谱过程中的焓变(ΔH)、似溶解焓变($\Delta S'$)与结构参数 J_G 、邻接参数 L_j 的关系式。在 DB-1、DB-5、DB-1701 等 3 种固定相上测定了 140 余种 PCB 的 ΔH 、 $\Delta S'$ 数值,并运用所推导出的关系式对 ΔH 和 $\Delta S'$ 进行了预测,收到良好的效果, ΔH 和 $\Delta S'$ 的理论计算值与实验值的平均相对偏差分别为 0.56% ~ 0.97% 和 0.55% ~ 1.06%,接近实验数据本身的相对偏差。

关键词 :色谱热力学 ; 色谱理论 ; 分子拓扑学 ; 焓 ; 熵

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0445-04

Quantitative Relationship Between Molecular Structure of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Enthalpy Change (ΔH), Entropy Change ($\Delta S'$) in Chromatographic Process

ZHANG Qing¹, DAI Chaozheng²

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China ;
2. Chengdu Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract : The relationship between the rule of chromatographic retention value and molecular structure is an important part in the research of chromatographic thermodynamics. The topological index structural parameter J_G and the topological index adjoining parameter L_j are put forward. Parameter J_G describes the correlation of quantity and position of chlorine atoms in polychlorinated biphenyl (PCB) molecules. Parameter L_j describes the ortho-position correlation of chlorine atoms in PCB molecules. The relational expression between the PCB molecular structures and their enthalpy change (ΔH), entropy change ($\Delta S'$) in chromatographic process was discovered. The values of enthalpy change and entropy change for about 140 kinds of polychlorinated biphenyls in chromatographic process on three stationary phases, DB-1, DB-5 and DB-1701, were determined. In comparison with ΔH and $\Delta S'$ of the experimental data those calculated from the relational expression had the average relative deviations for ΔH and $\Delta S'$ are 0.56% - 0.97% and 0.55% - 1.06%, respectively.

Key words : chromatographic thermodynamics ; chromatographic theory ; molecular topology ; enthalpy ; entropy

色谱保留值规律与分子结构之间的关系是色谱过程热力学研究的重要内容。早在 1964 年,卢佩章^[1]就指出“研究物质在色谱柱上的保留值随分子结构变化的规律的本质科学问题是研究各种聚集态

的配分函数,特别是构型配分函数随分子结构变化的规律”。采用分子拓扑学的方法对溶质的气相色谱保留值与其分子结构参量相关联已经有诸多的研究方法^[2-6],这些方法不仅可以用于复杂样品体系

收稿日期 2005-05-16

作者简介:张青,男,博士,副研究员,从事复杂环境样品的分离与分析,Tel (0411)84379569,E-mail:zqzhang@dicp.ac.cn.

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(国家“973”项目)(No.2003CB150001),2005 年度大连理工大学-大连化学物理研究所合作科研探索基金项目。

中不同结构溶质的保留值预测,也可以了解溶质的分子结构信息及优化色谱分离条件。

在联苯分子中,两个苯环直接相连构成联苯,两苯环上的 π 电子形成一个 8 字形大 π 键,可使两苯环更趋于平面结构,然而由于 2,6 位氢原子的空间位阻作用,又使两苯环处于不同平面。因此,联苯可被认为是两苯环有夹角的准刚性分子。联苯分子中有 12 个碳原子和 10 个氢原子,当其中的氢原子被氯原子取代后生成多氯联苯(PCBs)。根据氯原子的个数和位置的不同,理论上—共有 209 种 PCBs 存在。具有不同结构的 PCBs 在气相色谱过程中的焓变(ΔH)与似溶解焓变($\Delta S'$)充分体现了分子结构对保留值的影响。

本文通过对 PCBs 的分子结构特征加以理论分析,提出了两个新的分子拓扑指数,建立了该分子拓扑指数与保留值之间的关系,并通过实验加以验证。

1 PCBs 分子构型与 ΔH 、 $\Delta S'$ 的关系

色谱依靠分子间作用能的差异实现组分间的彼此分离。根据色谱过程热力学有^[7]

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S'}{R} \quad (1)$$

其中, $-\Delta H = B_1\alpha_A + B_2\mu_A^2 + B_3 + B_4$ (B_1, B_2, B_3 和 B_4 分别是与分子极化率、偶极矩、氢键作用能贡献和排斥能贡献相关的系数)。

对于 PCBs 而言, $B_1\alpha_A \gg B_2\mu_A^2$; PCB 与固定相无氢键相互作用,故 $B_3 = 0$; 若忽略排斥能 B_4 的影响,则有:

$$-\Delta H \approx B_1\alpha_A \quad (2)$$

其中 $B_1 = N_{Cl} \cdot \frac{z}{r^6} \left(\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_{剂} I_A I_{剂}}{I_A + I_{剂}} + \mu_{剂}^2 \right)$ (3)

以摩尔折射率代替摩尔极化率,则有:

$$\alpha_A = \frac{3}{4\pi N_0} (50.463 + 4.816N_{Cl}) \quad (4)$$

其中 N_{Cl} 为 PCB 分子中氯原子的个数。

将式(3)、式(4)代入式(2)得:

$$-\Delta H = \frac{3}{4\pi} \cdot \frac{z}{r^6} \left(\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_{剂} I_A I_{剂}}{I_A + I_{剂}} + \mu_{剂}^2 \right) \cdot (50.463 + 4.816N_{Cl}) \quad (5)$$

因 $z, \alpha_{剂}, I_A, I_{剂}, \mu_{剂}$ 均为常数,因此,上式可写为:

$$-\Delta H = \frac{A}{r^6} (50.463 + 4.816N_{Cl}) \quad (6)$$

式(6)中 $A = \frac{3z}{4\pi} \left(\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_{剂} I_A I_{剂}}{I_A + I_{剂}} + \mu_{剂}^2 \right)$ 为常数。从式

(6)可见,决定多氯联苯的 $-\Delta H$ 的主要参数是氯原子个数 N_{Cl} 以及分子间距离 r 。当 PCB 分子上增加

一个取代氢原子的氯原子时, $-\Delta H$ 的变化率为:

$$\frac{\partial(-\Delta H)}{\partial N_{Cl}} = A \frac{4.816}{r^6} + \frac{\Delta H}{r^6} \cdot \frac{\partial(r^6)}{\partial N_{Cl}} \quad (7)$$

其中 $\frac{\partial(r^6)}{\partial N_{Cl}}$ 表示增加一个氯原子后组分分子与固定相有效距离 r 六次方的变化率。

以 $-\Delta H$ 为纵坐标, N_{Cl} 为横坐标,将各 PCBs 的数值点在坐标上,将 4-氯联苯与十氯联苯连一直线(见图 1),直线方程为:

$$-\Delta H = 44\,979 + 3\,432N_{Cl} \quad (8)$$

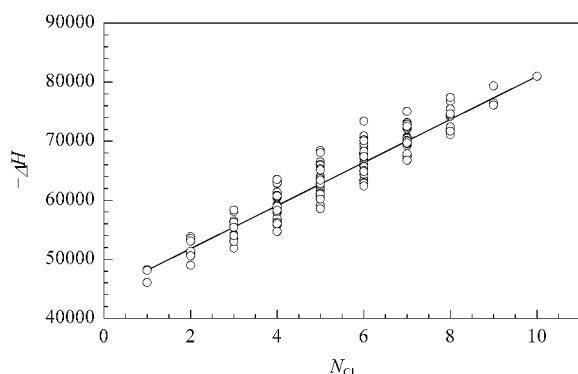


图 1 $-\Delta H$ 与 PCB 分子中氯原子个数 N_{Cl} 的关系

Fig.1 The relationship between the number of chlorine atoms (N_{Cl}) of PCBs and enthalpy change (ΔH)

Stationary phase: DB-1.

由图 1 可见,部分 PCB 的位置在线上方,部分 PCB 的位置在线下方。线上组分的取代位置分别为 4, 2, A', 2, 2', 4, 5', 2, 2', 3, 3', 6, 2, 2', 3, A', 5, 6; 2, 2', 3, 3', 5, 5', 6, 2, 2', 3, 3', 4, 5, 6, 6', 2, 2', 3, 3', 4, A', 5, 6, 6' 和 2, 2', 3, 3', 4, A', 5, 5', 6, 6'。

位于直线上的组分每增加一个氯原子所产生的 $\Delta(\Delta H)$ 增量相等,因此,据式(7)(8)可知线上各组分满足如下关系式:

$$\frac{r_{N_{Cl}+1}^6}{r_{N_{Cl}}^6} = 1 + \left(3\,432 + \frac{4.816A}{r_{N_{Cl}}^6} \right) / (-\Delta H) \quad (9)$$

$-\Delta H$ 值既与分子中的氯原子个数有关,也与氯原子的位置有关。一氯联苯中 2-位含氯原子者相对于线上组分的 $\Delta(\Delta H) > 2\,000$ J/mol; 二氯联苯中,凡 2-位和 6-位不含有氯原子者其 $\Delta(\Delta H) < -2\,100$ J/mol; 对于三氯联苯,凡 2-位和 6-位有两个以上氯原子者其 $\Delta(\Delta H) > 1\,170$ J/mol, 否则, $\Delta(\Delta H) < -170$ J/mol; 对于三氯联苯,如果 2-位和 6-位无氯原子者,其相应的 $\Delta(\Delta H) < -5\,000$ J/mol; 含有一个氯原子时,其相应的 $\Delta(\Delta H)$ 在 $-1\,912 \sim 3\,069$ J/mol 之间,含有二个氯原子时,其相应的 $\Delta(\Delta H)$ 在 $-1\,895 \sim 216$ J/mol 之间; 含有三个氯原子时,其相应的 $\Delta(\Delta H) > 1\,300$ J/mol。对

于含更多氯原子的多氯联苯也有类似的规律存在,即 2-位和 6-位氯原子数目多, $\Delta(\Delta H)$ 大;反之, $\Delta(\Delta H)$ 小。

从式(6)可见,氯原子数目 N_{Cl} 和分子间距离 r 是影响多氯联苯 $-\Delta H$ 的主要因素。氢原子电子结构为 $1s^1$,而氯原子外层电子结构为 $3s^23p^5$ 。氯原子的几何尺寸大于氢原子,C—Cl 键的极化率也大于 C—H 键的极化率。分子的摩尔极化率随 PCBs 分子中的氯原子数增加而增加,但分子间距离 r 也随之增加。由于氯原子大于氢原子,氯原子取代氢原子后会增加联苯环的局部厚度,从而使 r 改变。因此,PCB 的 $-\Delta H$ 的增量与氯原子个数不能成严格的比例关系。

氯原子对 r 的影响有两方面。在 3-、4-和 5-位上的氯原子位于联苯环的远端,它们的存在只能单纯地增加相连苯环的局部厚度而影响 r 值。位于 2-位和 6-位上的氯原子除有与 3-、4-和 5-位上的氯原子相同的作用外,由于氯原子相对于氢原子具有更大的空间位阻效应,使得二苯环的夹角增大,导致 r 值增大。对于同氯数 PCBs 2-位和 6-位上的氯原子越多, $-\Delta H$ 越小,正是体现了这种影响的存在。

然而, r^6 与氯原子个数的关系也不是简单的线性关系,相邻两个氯原子对 $-\Delta H$ 的影响不是单个氯原子影响的加和。

通过以上讨论可知: $-\Delta H$ 不仅与氯原子的个数和位置有关,还与氯原子之间的相邻关系有关。因此可以定义两个描述 PCBs 分子构型的参数:

1. 结构参数 J_G :此结构参数既与 PCBs 中氯原子个数有关,也与氯原子的位置有关。由于 3-、4-和 5-位氯原子对 PCBs 分子内部无空间位阻效应,它们对 $-\Delta H$ 的影响约为 2-位和 6-位上的氯原子的两倍,因此定义结构参数为

$$J_G = (2 - \beta\text{-位氯原子个数}) + 2 \times (3\text{-、4-和 5-位氯原子个数}) \quad (10)$$

2. 邻接参数 L_J :由于空间位阻效应,两个相邻氯原子对 r 的影响不及两个单独氯原子对 r 的影

响。因此定义邻接参数为

$$L_J = \text{相邻氯原子对的数目} \quad (11)$$

利用 J_G 和 L_J 两个分子参数可将 PCB 的 $-\Delta H$ 、 $\Delta S'$ 与构型联系起来,即 $-\Delta H$ 、 $\Delta S'$ 是 J_G 和 L_J 的函数

$$-\Delta H = f(J_G, L_J)$$

根据二元函数展开 Macjaurin 定理

$$f(x, y) = f(0, 0) + \left(x \frac{\partial}{\partial x} + y \frac{\partial}{\partial y}\right) f(0, 0) + \frac{1}{2} \left(x \frac{\partial}{\partial x} + y \frac{\partial}{\partial y}\right)^2 f(0, 0) + \Lambda$$

取其前几项有:

$$-\Delta H = f(0, 0) + J_G \frac{\partial f(0, 0)}{\partial J_G} +$$

$$L_J \frac{\partial f(0, 0)}{\partial L_J} + \frac{1}{2} J_G^2 \frac{\partial^2 f(0, 0)}{\partial^2 J_G} + R(J_G, L_J)$$

其中 $R(J_G, L_J)$ 为余误差函数。因为 $-\Delta H$ 随氯原子个数的增加而有上升趋势,可设

$$R(J_G, L_J) = d \sqrt{J_G}$$

最后得到:

$$-\Delta H = a + bJ_G + cJ_G^2 + d \sqrt{J_G} + eL_J \quad (12)$$

其中 $a = f(0, 0)$; $b = \frac{\partial f(0, 0)}{\partial J_G}$

对于 $\Delta S'$ 可得到相似的形式:

$$\Delta S' = a' + b'J_G + c'J_G^2 + d' \sqrt{J_G} + e'L_J \quad (13)$$

2 验证

在 DB-1、DB-5 和 DB-1701 等 3 种固定相上测定了 140 种 PCBs 的 ΔH 、 $\Delta S'$ 值^[8],并利用公式(12)和(13)计算出了 ΔH 、 $\Delta S'$ 的值,计算时采用的系数数值如表 1 所示。140 种 PCBs 在 3 种固定相上的计算值与实验值的平均相对偏差见表 1。

部分 PCBs 在 DB-1、DB-5 两种固定相上的 ΔH 、 $\Delta S'$ 实验值与计算值列于表 2 和表 3 中。对应的相对偏差较小,反映出所提出分子结构参数 J_G 和邻接参数 L_J 可以很好地描述 PCBs 的拓扑学性质。

表 1 在 3 种固定相上计算 PCBs 的 ΔH 、 $\Delta S'$ 值采用的系数数值及 ΔH 、 $\Delta S'$ 的平均相对偏差 (ARD)

Table 1 The values of parameters in Equation (12) and Equation (13) for PCBs on stationary phases DB-1, DB-5 and DB-1701 and average relative deviations of ΔH , $\Delta S'$ of 140 PCBs (ARD)

Parameters		DB-1		DB-5		DB-1701	
eq. (12)	eq. (13)	ΔH	$\Delta S'$	ΔH	$\Delta S'$	ΔH	$\Delta S'$
a	a'	-43112	-52.73	-49116	-64.02	-49115	-62.59
b	b'	-2538	-3.27	-3587	-5.35	-3718	-5.36
c	c'	44.0	0.056	72.5	0.107	95.5	0.134
d	d'	-724	0.942	2748	8.24	2286	6.97
e	e'	-509	-0.132	-574	-0.161	-840	-0.433
ARD/%		0.56	0.55	0.63	0.68	0.97	1.06

表 2 在 DB-1 固定相上 PCBs 的 ΔH 、 $\Delta S'$ 计算值与实验值的比较
Table 2 Comparison of the experimental and calculated ΔH , $\Delta S'$ of PCBs on stationary phase DB-1

PCB substitution	J_G	L_J	$\Delta H/(J/mol)$			$\Delta S'/(J/(mol \cdot K))$		
			experimental	calculated	deviation/%	experimental	calculated	deviation/%
2	1	0	-46380	-46331	-0.11	-55.12	-55.00	-0.22
4	2	0	-48410	-49036	1.29	-57.04	-57.72	1.18
2,3	3	1	-51614	-52094	0.93	-60.28	-60.54	0.43
2,3'	3	0	-51537	-51584	0.09	-60.54	-60.41	-0.22
2,5	3	0	-50941	-51584	1.26	-59.83	-60.41	0.97
2,3,5	5	1	-55842	-56830	1.77	-65.26	-65.72	0.70
2,4,4'	5	0	-56291	-56321	0.05	-65.34	-65.59	0.38
3,4,4',5	8	2	-63761	-63666	-0.15	-73.20	-72.94	-0.36
2,2',3,3',4,4',6,6'	12	4	-71527	-71778	0.35	-80.87	-81.23	0.44
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'	16	8	-79296	-79428	0.17	-87.98	-88.11	0.15

表 3 在 DB-5 固定相上 PCBs 的 ΔH 、 $\Delta S'$ 计算值与实验值的比较
Table 3 Comparison of the experimental and calculated ΔH , $\Delta S'$ of PCBs on stationary phase DB-5

PCB substitution	J_G	L_J	$\Delta H/(J/mol)$			$\Delta S'/(J/(mol \cdot K))$		
			experimental	calculated	deviation/%	experimental	calculated	deviation/%
2	1	0	-49663	-49881	0.44	-60.52	-61.02	0.83
4	2	0	-51491	-52112	1.21	-61.99	-62.63	1.03
2,3	3	1	-54736	-55037	0.55	-65.21	-64.99	-0.34
2,3'	3	0	-54433	-54463	0.06	-65.01	-64.83	-0.28
2,5	3	0	-53937	-54463	0.98	-64.59	-64.83	0.37
2,3,5	5	1	-58656	-59666	1.72	-69.55	-69.81	0.37
2,4,4'	5	0	-59229	-59092	-0.23	-69.77	-69.65	-0.17
3,4,4',5	8	2	-66547	-66547	0	-76.89	-76.96	0.09
2,2',3,3',4,4',6,6'	12	4	-74157	-74497	0.46	-84.38	-84.86	0.57
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'	16	8	-81109	-81552	0.55	-89.70	-90.48	0.87

3 结论

采用分子拓扑法预测色谱保留值一般不太容易得到精确结果^[9,10]。究其原因是分子本身有一定的柔性,而通常提出的分子拓扑指数定义不一定能很好地反映分子之间的作用能关系。联苯系准刚性分子,当氢原子被氯原子取代后生成 PCBs,分子的形状基本上无多大改变。采用本文定义的 PCB 分子拓扑指数 J_G 和 L_J 仅用 5 个参数。140 个 PCB 在 3 种固定相上的 ΔH 和 $\Delta S'$ 的理论计算值与实验值的平均相对偏差分别为 0.56% ~ 0.97% 和 0.55% ~ 1.06%,计算结果的相对偏差已经接近实验数据本身的相对偏差。本文所建立的方法有可能推广到其他类型准刚性分子的分子构型与色谱保留值规律研究中。

参考文献:

[1] Wang Zhiguo. Lu Peizhang Selections. Chengdu: Publication House of University of Electronic Science and Technol-

ogy (王治国. 卢佩章选集. 成都: 电子科技大学出版社), 1995. 221

[2] Randic M. J Am Chem Soc, 1975, 97(23): 6609
 [3] Doherty P J, Hoes R M, Robbat A Jr, White C M. Anal Chem, 1984, 56(14): 2697
 [4] Bahnick D A, Doucette W J. Chemosphere, 1988, 17(9): 1703
 [5] Sabljic A. Environ Sci Technol, 1987, 21(4): 358
 [6] Zhao Hongxia, Zhang Qing, Chen Jiping, Xue Xingya, Liang Xinmiao. Chemosphere, 2005, 59(10): 1421
 [7] Lu Peizhang, Dai Chaozheng. The Foundation of Chromatographic Theory. Beijing: Science Press (卢佩章, 戴朝政. 色谱理论基础. 北京: 科学出版社), 1989. 149
 [8] Zhang Qing. [PhD Thesis]. Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences (张青. [博士学位论文]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所), 2004. 33
 [9] Nie Changming, Dai Yimin, Wen Songnian, Li Zhonghai. Chinese Journal of Chromatography (聂长明, 戴益民, 文松年, 李忠海. 色谱), 2005, 23(1): 1
 [10] Xiang Zheng, Liang Yizeng, Hu Qiannan. Chinese Journal of Chromatography (向铮, 梁逸曾, 胡黔楠. 色谱), 2005, 23(2): 117

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞！

色谱专家系统的应用和发展

许国旺, 路 鑫, 孔宏伟, 石先哲, 赵欣捷, 田 晶, 卢 果

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023)

摘要 随着科学技术的发展, 色谱专家系统作为一种人工智能方法亦在不断发展, 并在实际工作中发挥着越来越重要的作用。该文综述了作者的研究小组在色谱专家系统研究方面的进展, 重点介绍从研究气相色谱专家系统开始, 到应用色谱专家系统的思想, 运用气相色谱、液相色谱和毛细管电泳新技术解决石化、环境、疾病诊断、基因分析和药物分析等领域实际问题的的工作。引用相关文献 64 篇。

关键词 :气相色谱 ; 色谱专家系统 ; 石化分析 ; 环境分析 ; 临床分析 ; 中药

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0449-07

Applications and Progresses of Expert System on Chromatography

XU Guowang, LU Xin, KONG Hongwei, SHI Xianzhe, ZHAO Xinjie, TIAN Jing, LU Guo

(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics,
The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : The expert system on chromatography has achieved great advancement in the past two decades, and is playing a more and more important role in solving analytical problems of complex samples. Research results of expert system on chromatography in authors' group are reviewed with 64 references. A brief introduction of the expert system on chromatography is presented. Applications of the expert system on chromatography are summarized in the fields of petrochemical online analysis, environmental air sample analysis, tumor diagnosis and traditional Chinese medicine analysis. The review followed the scientific foot steps in the authors' group, starting from the development of the expert system on gas chromatography, to the selection of multi-column systems in online industrial gas chromatographs in petrochemical plants, and to the employment of the new techniques in gas chromatography, liquid chromatography and capillary electrophoresis to solve the practical analytical problems in the nation's scientific and economic development.

Key words : gas chromatography ; expert system on chromatography ; petrochemical analysis ; environmental analysis ; clinical analysis ; traditional Chinese medicine

色谱法是目前使用得最广泛的分析方法之一, 随着现代色谱仪器的发展, 用色谱法分析一个样品所需的时间一般只需要几分钟或几十分钟。但对特定样品分析选用的色谱方法、色谱柱和最佳操作条件的确定以及最后所得谱图的定性、定量结果的获得, 仍然需要由高水平的色谱专家参与。所谓色谱专家系统是一个智能程序系统, 它拥有大量的色谱领域的专家级的专门知识及深厚的理论基础, 并且运用人工智能的理论和技巧, 根据一个或多个色谱专家做决定的过程, 解决色谱专家才能解决的色谱方法发展以及对色谱图的定性、定量问题^[1]。

色谱专家系统主要由以下几个部分组成:

(1) 知识库。它是色谱领域知识的存储器。知识库包括两类: 第一类是色谱领域的事实, 如保留指数、基团增量等; 第二类是产生式的知识, 如色谱专家系统的规则, 它是色谱领域中正确的实践和判断的知识, 很大一部分是凭经验得到的, 是专家经过多年工作而掌握的“善于猜想的艺术”。

(2) 推理机。它是用来控制、协调整个系统的一组程序, 它根据当前输入的数据(如待分离样品的物化性质等)利用知识库中的知识, 按一定的推理策略去解决当前的问题。

收稿日期 2005-06-27

作者简介: 许国旺, 男, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为高分辨分离分析, Tel (0411)84379530, E-mail xugw@dicp.ac.cn.

基金项目: 国家杰出青年基金(No. 20425516), 国家自然科学基金(No. 90209048)和中国科学院大连化学物理研究所知识创新工程基金(K2002A11)资助项目。

(3) 人机接口部分。

(4) 数据库。用于存储该领域内初始证据和推理过程中得到的各种中间信息,也就是存放用户回答的事实、文献已知的事实和由推理而获得的事实。

(5) 知识获取部分。知识获取部分也称学习功能,它为修改知识库中原有的知识和扩充知识提供手段。在专家系统的交互过程中,认为哪些知识不合理,甚至错了,或者需要加进新的知识,都要利用这部分。

20 世纪 80 年代中期,国际上多家科研机构开展了色谱专家系统的研究。其中较有影响的有 Varian 公司的 ECA(Expert Chromatography Assistance Team)^[21]和欧共体的 ESCA(Expert Sys-

tem in Industrial Chemical Analysis)^[3,4]。中国科学院大连化学物理研究所卢佩章院士的领导下,在 20 世纪 80 年代初就开展了色谱专家系统 ESC(Expert System for Chromatography) 的研究^[5-8]。ESC 有气相和液相两大部分(见图 1),包括色谱分离模式的推荐、柱系统和预处理方法的推荐、操作条件的最佳化和谱峰的定位与定量分析。

本文仅涉及作者所在的研究小组 20 年来在色谱专家系统研究方面的进展,重点介绍从研究气相色谱专家系统开始,到应用专家系统的思想,运用气相色谱、液相色谱和毛细管电泳技术解决石化、环境、疾病诊断、基因分析和药物分析等领域实际问题的研究结果。

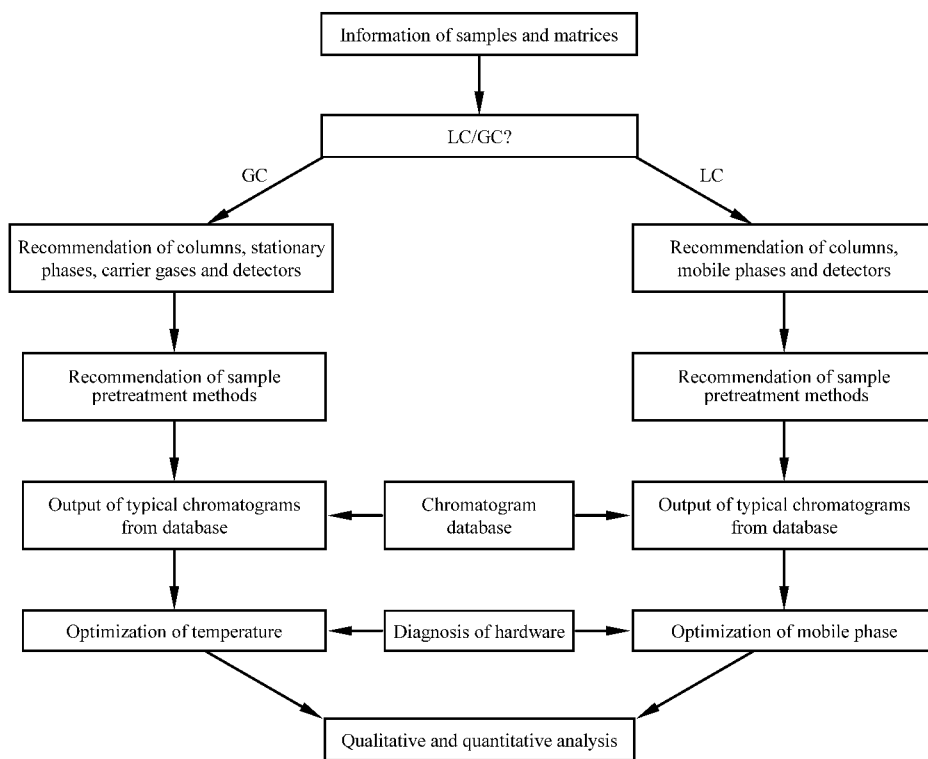


图 1 色谱专家系统的流程图

Fig.1 Flow sheet of expert system on chromatography

1 气相色谱专家系统的建立^[9-25]

在卢佩章院士的指导下,在深入研究色谱理论、归纳提高大量色谱实践的基础上,建立了气相色谱柱系统推荐的专家系统^[1],提出了用相应碳链长度(CCCL)来判断不同结构物质在不同色谱柱上流出顺序的方法^[19];并运用结构和保留关系从理论和实际上解决了“什么组分可从气相色谱柱中流出”和“什么样品可被气相色谱柱分开”的问题,并对不能直接用气相色谱分析的物质进行了系统的总结^[20,21]。同时,根据柱系统的比较要在各自最佳条件下进行的思想,以保留值方程为指导,通过研究溶

质-溶剂的相互作用,总结归纳了大量的数据,提出了对有机组分的同系物、结构异构体、立体异构体及无机气体和低碳烃采用气相色谱分析时的柱系统进行选择的 38 条规则^[11,14,17-19]。其中的不少规则是我们在国际上首次提出的,例如:分析非极性组分的同系物时选中等极性色谱柱或分析极性组分的同系物时选不拖尾的非极性色谱柱可在同样分辨率下取得更短的分析时间的规则等;指出了用“相似相溶原则”和只用“McReynolds 常数”来选择、评价固定相的不确定性和片面性。这些规则不但在科学上有所创新,而且为其更好地应用于实际奠定了基础。以上述色谱研究为基础,用 Scheme Lisp 语言和

Quick Basic 语言,采用产生式和以框架为主并适当运用过程式表示相结合的知识表达方式,第一次建立了气相色谱柱系统推荐的专家系统^[9,10,12,13,15,17,18]。它能对样品是否采用气相色谱这种分离模式进行判断,并对柱系统、衍生化方法等进行推荐和对推荐结果进行验证^[12-14]。

在上述基础上,我们进一步开发了气相色谱智能方法和软件^[22],在国际上首次提出:要实现方法的最佳化,首先必须确保柱系统最佳;同时在最佳化策略的设计上,注意借助于人工智能技术,每一策略可导出最佳的温度子策略,每一子策略又可针对一个最难分离物质对,而最难分离物质对则由色谱保留规律来确定^[23,24]。已开发的智能优化软件可对样品的可分离温度范围、升温方式及最少升温阶梯、交叉点及最高可分离温度等进行预测。在这些预测的基础上,可得到最佳的分离条件及模拟谱图。所有这些为发展全自动的人工智能优化迈出了关键的一步。在自行研制的全自动气相色谱仪上,在通用计算机的支持下,通过单纯型自动寻优,在色谱专家水平上建立了样品的最佳气相色谱分析方法^[25]。

气相色谱定性定量方面的工作我们在文献^[14]中有较好的总结,这里不再赘述。

2 色谱专家系统在石化样品分析中的应用

改革开放后,我国从国外引进了大量的先进设备和技术,但如何消化、吸收、不再依赖于进口是亟待解决的一个大问题。石化企业普遍采用在线气相色谱来控制生产过程,相关仪器及技术通常随装置配套引进。而在线色谱对固定相稳定性和选择性的要求非常苛刻;为了提高分析速度和获得好的分离,还需要用阀切换系统。如何针对分析目的选择合适的固定相,进而设计出符合实际需要的柱切换系统,是一个十分困难的任务。

例如,在石油化工生产中,低碳烃中 CO 和 CO₂ 的分析经常被人们所关注,它直接反映了烃被氧化的程度,无论为了提高反应产率、计算选择性,还是进行物料衡算,都必须准确计量 CO 和 CO₂。现在石化企业中广泛应用的检测低碳烃中痕量 CO 和 CO₂ 的分析系统为日本岛津公司的 GC-S161: 乙烯、丙烯中的微量 CO 和 CO₂ 分析系统。这是一个十分成熟的分析流程,采用的是 GC-14BPF 气相色谱仪配以氢火焰检测器(FID)。整套分析系统采用双流路流程,共用了 4 个阀、14 根色谱柱、2 个烃转化器和 2 个 FID。该流程十分复杂,不仅阻力很难匹配,而且 CO 和 CO₂ 在柱系统中的运动轨迹未知,调试非常困难。受企业的委托,我们对 C₁ ~ C₄ 烃

中痕量 CO 和 CO₂ 的分析流程进行了改造。将气相色谱专家系统的研究结果用于该项目,设计了单阀双柱流程^[26],使用常规的气相色谱仪,仅用了 1 个阀、2 根色谱柱、1 个烃转化器和 1 个 FID。所设计流程的 CO 和 CO₂ 的最小检测量为 0.05×10^{-6} (v/v) 左右。与进口的商业化流程相比,本流程简单,操作方便,现场运行情况良好。

甲苯歧化反应以甲苯和混合 C₆ 芳烃为原料,在分子筛催化下反应,得到含有苯、二甲苯的混合芳烃产物。产物中除裂解的低碳烃外,还有少量(3% 左右)的 C₁₀ 及 C₁₀ 以上的芳烃和多环芳烃。受上海石油化工研究院委托,我们对甲苯歧化在线分析系统进行了研制^[27]。首先,根据工艺要求推荐合适的柱系统,针对甲苯歧化反应产物的特点,研制了要与 C₆ ~ C₁₀ 芳烃在同一温度条件下分析、适合 C₁ ~ C₅ 非芳烃分离用的专用毛细管色谱柱。该柱可对反应产物中包括甲烷、乙烷、丙烷、异丁烷、正丁烷、异戊烷和正戊烷在内的全部 7 个非芳烃组分进行有效的分离,且最高使用温度达 280 °C,保证了该柱在所用分析条件下的长期稳定运行。其次,设计了双流路在线色谱分析流程,仅采用一台色谱仪即可对甲苯歧化反应的全部产物——C₁ ~ C₅ 非芳烃和 C₆ ~ C₁₀ 芳烃进行在线色谱分析,且两流路在所用的操作条件下可很好地匹配。同时,研制了在线数据处理系统,针对样品特点建立了智能峰匹配算法,避免了通常色谱工作站简单利用保留时间定性的弱点,可对运行过程中色谱保留时间的漂移作出智能修正,经长时间运行亦无须对保留时间进行校准,确保了反应产物中化合物定性定量的准确性。另外,根据催化反应样品的取样时间和所用装置及反应条件的不确定性,开发了时间表运行方式,可同时处理 1 ~ 6 套反应装置的在线分析数据。系统自动根据时间表设定的时间对指定反应装置的分析数据进行处理,并可对评价结果实时显示。现场应用显示,所研制的在线分析系统实现了甲苯歧化反应产物的实时自动在线采样,自动对甲苯歧化反应产物进行定性、定量分析,自动在线数据处理分析结果用于催化剂性能评价,并生成相应的评价报告。通过离线和在线数据对比,两种分析方法得到的数据具有可比性。稳定性考察表明,在线分析数据的重复性良好。

上述两个例子只是我们已完成的多个攻关项目的代表,我们将气相色谱专家系统的思想用于多个石化行业亟待解决的技术难题,如完成了大庆 30 万吨乙烯工程在线色谱柱国产化、大庆石化总厂塑料厂线性车间 1-丁烯装置技术革新、化工一厂 1,3-丁二烯装置技术革新、茂名石化和广州石化的技术改

造项目,及本所国家催化开放实验室催化反应产物在线监控色谱柱系统和色谱方法等^[28-30]。这些项目的完成在验证了气相色谱专家系统的实用性的同时,也为企业创造了良好的经济和社会效益。

3 色谱专家系统在环境样品分析中的应用

1990年,美国政府在“新空气清洁法修正案”中提出了189种优先控制的大气毒物,要求美国国家环保局(US EPA)在10至20年时间内研究建立这189种有毒物质的监测方法。为此,美国国家环保局与我们开展的国际合作研究。在魏复盛院士和张玉奎院士的领导下,在已有的智能色谱软件的基础上,我们发展了大气毒物气相色谱分析方法(合同号2D2398NFFX,1992),并用于固定排放源大气毒物的傅里叶变换红外光谱(FTIR)连续监测。在该项目完成过程中,色谱专家系统发挥了不可替代的作用。

以空气毒物的气相色谱分析为背景,应用色谱专家系统智能优化的原则和策略解决了分离问题。在US EPA所列的大气毒物表中,部分化合物已有气相色谱分析方法。这些方法针对不同的化合物,采用了很多不同的分析色谱柱和分离条件。实际上,完全可以建立一个通用的分析方法,减少方法间出现的矛盾,提高可靠性。

空气中的毒物种类多,在保留上有重叠,有交叉,也有本底干扰问题,一根色谱柱不能实现全部组分的分离。像这样典型的多交叉组分共存的情况,要避免每个交叉温度实现各个组分的最优分离,只凭经验和直观判断是不可能的。因此,寻找最佳的分离条件,必须采用智能优化方法^[22-24,31-34]。在这种情况下,有必要采用两根选择性有差异的非极性色谱柱和弱极性色谱柱来取得互补分离。基于统一方法双柱分离,并考虑到大气毒物多官能团易挥发且不含特殊异构体的特点,根据最佳双柱系统智能选择的基本原则,对最佳双柱进行了选择^[22,35]。通过实验和文献数据比较,确定了大气毒物分离的最佳柱系统为DB-1和DB-1301双柱。

关于最佳条件的选择,智能优化针对这种多交叉难分离样品实施了双柱优化策略。双柱上分离条件的优化,首先要确定互补分离组分,排除不能分离组分,对其余组分进行条件优化,采用重叠分离图确定每根色谱柱上组分的温度梯度,每阶温度值均由一对或几对难分离物质对所决定,考虑到前一段温度阶梯对后面分离的影响,根据智能优化软件提供的方法,还可以得到第二个重叠分离图,以修正以后的阶梯温度。用同样方法,可以逐一通过计算机仿

真和计算重叠分离图得到各阶梯准确的升温曲线。在分离过程中,为了避开交叉温度和组分发生重叠,以智能优化分离原则为基础,并根据组分间当前的速度差和分离趋势逐一判断调整,获得最佳分离条件^[22,31,35]。在此基础上,利用智能优化的原则和策略,针对70种有机毒物获得了双柱上的最佳分离条件,对包括在DB-1色谱柱上5对重叠组分和DB-1301柱上2对重叠组分在内的全部组分实现了双柱分离或互补分离^[36]。

大气毒物分析的智能优化是对色谱专家系统优化方法和理论的检验,它肯定了色谱专家系统优化理论的正确性,同时也证明了建立环境样品统一分析方法时,色谱专家系统优化理论发挥了重要的作用。在此基础上,我们进一步开展了气相色谱辅助FTIR分析方法用于烟道气排放有毒空气污染物监测的研究。在考察了FTIR吸收特征的基础上,首次提出了针对固定污染源毒物样品的气相色谱辅助FTIR对混合物光谱进行解释的方法^[37]。基于气相色谱保留指数和FTIR的二维信息,通过差减功能将多组分混合物的定性和定量交替完成。用气相色谱法检验该方法的精密度,相对误差小于8%。同时,我们还对US EPA列举的128种大气毒物中已有标准FTIR谱图的101种进行了研究,提出了差减谱位的推荐值,并建立了光谱差减量数据库,供大气毒物FTIR定量分析时使用。在此基础上,进一步研制了大气毒物FTIR自动差减定量软件^[38,39]。该软件可对数据库进行实时咨询,差减谱位的智能搜索和差减因子的自动计算,为最终实现固定污染源大气毒物的FTIR连续自动监测奠定了基础。

4 色谱专家系统在恶性肿瘤早期诊断研究中的应用

修饰核苷已被研究用作可能的肿瘤标记物,它是细胞增殖时的代谢产物,其含量随细胞增殖速度的加快而增高。恶性肿瘤是一类细胞无限制性恶性增生疾病,现已发现恶性肿瘤患者尿中核苷,特别是修饰核苷的含量提高。以修饰核苷作为生物标记物,辅以模式识别技术,有可能实现对恶性肿瘤的诊断^[36,40-42]。

尿中的化学成分复杂,而且核苷含量很低。为了准确获得体液中核苷的含量,我们建立了高效液相色谱测定尿中核苷的方法^[42]。反相液相色谱技术在分离和定量核苷组分方面,不仅具有较高的灵敏度,而且有广泛的适应性和选择性,可以同时检测大量的不同类别的核苷。根据色谱最佳柱系统理

论,通过考察缓冲溶液及流速、柱温度等方法进行优化,所建立的方法对尿中核苷实现了满意的分离。

由于各种条件的影响,不同样品中色谱峰的保留时间会有一些漂移,通过保留时间的校正才能使数据集匹配,进而进行定性、定量,也才能进行下一步的模式识别的分析。对色谱峰进行定性、定量是色谱专家系统研究的重点。在整个谱图范围内选择易于辨识的色谱峰作为峰位校正的参考峰,在两参考峰间计算保留因子,并将典型谱图的保留因子与样品谱图的保留因子进行比较,即可实现不同谱图间色谱峰的匹配^[43]。

模式识别是数据信息采掘技术的主要方法之一。为了辅助诊断恶性肿瘤,我们运用多元统计分析技术(如:因子分析^[44]或人工神经网络技术^[41]等),将正常人与已知恶性肿瘤患者进行分类,建立了“模式识别基图”。采用模式识别数据处理技术同时考虑癌症患者体液中多个修饰核苷类肿瘤标记物的浓度变化,据此来判断恶性肿瘤,可成功地将正常人及良性肿瘤患者与恶性肿瘤患者分类,达到诊断恶性肿瘤的目的。

现代肿瘤分子生物学研究表明,癌症是与遗传明确相关的“基因病”之一,其发生与多个基因变化相关。为此,建立了一套检测基因突变的毛细管电泳技术平台,包括单色荧光检测和双色荧光检测的单链构象多态性-毛细管电泳(SSCP-CE)技术^[45-48]、检测多个突变位点的 SNaPShot 技术(美国 ABI 公司开发的一种检测技术)^[49,50]、变性梯度毛细管电泳(CDCE)技术^[51]、基因片段序列的毛细管电泳测序技术^[52]。同时还建立了检测多个微卫星序列不稳定性的毛细管电泳技术和基因启动子甲基化的毛细管电泳技术。利用上述基因分析平台,筛查了散发性癌症和家族性癌症中抑癌基因 p53、错配修复基因 hMLH1、hMSH2 和癌基因 K-ras 的突变、hMLH1 基因启动子甲基化以及微卫星不稳定性情况。结果在 p53 基因的 exon7 和 exon8, hMLH1 基因的 exon8、exon12 和 exon16 以及 K-ras 基因的 exon1 上发现基因突变,其中 hMLH1 基因 T1775G 点突变在国际上未曾报道过,而且可能是我国胃癌家系突变热点。此外还发现散发性癌症中,造成错配修复基因 hMLH1 功能失活的主要原因是 hMLH1 启动子甲基化, hMLH1 基因突变只起次要作用;而且有错配修复基因 hMLH1 功能缺陷容易导致微卫星不稳定的发生^[53,54]。

另一方面,癌发生时基因的变化同时会引起许多代谢途径的改变。应用色谱专家系统和化学计量学方法对我国高发肿瘤家族中上述基因突变和核苷

代谢异常的关系进行了初步研究。从 114 例遗传性肿瘤家族亲属的样本中,检测出 20 例有基因突变,模式识别发现其中的 4 例存在核苷代谢异常,存在较大的肿瘤发病风险。将这 4 例进一步做临床检查,其中的 1 例被肿瘤医学证实确实患有癌症,表明基因和代谢相结合的研究对疾病的早期筛查非常有用。

5 色谱专家系统在药物分析方面的应用

中药是中华民族的瑰宝。我国有中药 12 807 种,挥发油类中药约占 20%,许多挥发油具有镇咳、抗菌、消毒、抗微生物等作用,某些挥发油如莪术、香叶天竺葵还具有一定的抗肿瘤作用。

无论是中药的药理研究还是质量控制,首先需要弄清其化学物质基础。气相色谱(GC)及气相色谱/质谱联用(GC/MS)是分析药用挥发油的主要手段。但由于中药挥发油组成复杂,且含量差异很大,使用常规的 GC 甚至 GC/MS,分辨率不足,导致峰重叠严重,指纹特征不明显;且由于检测灵敏度较低,低含量组分定性定量不准确,有时要做多次实验才能获得高含量和低含量组分的信息。全二维气相色谱(GC×GC)是 20 世纪 90 年代发展起来的高分辨、高灵敏度的多维色谱技术,与飞行时间质谱(TOFMS)联用非常适合中药这类复杂体系的分离分析^[55]。

我们在国际上率先将色谱专家系统的思想用于全二维气相色谱的方法学研究,在保留值的预测、柱温最佳化、柱系统推荐和二维数据处理等方面进行了深入的研究。首先,建立了依据等温实验数据预测全二维气相色谱二维保留值的方法。采用该方法仅通过 3 次等温实验即可精确预测二维保留值和峰宽。在此基础上,建立了通过预测难分离物质对在二维色谱的总分离效能指标实现全二维气相色谱柱温最佳化的方法^[56]。其次,基于正交分离对多维色谱的重要性,将因子分析法用于定量评价不同组成的样品在 GC×GC 中的正交分离程度,为柱系统的推荐提供了理论基础^[57]。建立了针对“海量”GC×GC/TOFMS 三维数据的自动“峰表”定性法。同时,对全二维气相色谱数据处理方法开展了多方面的研究,建立了全二维色谱数据的多种显示模式,如三维图形、等高线图、数据表格等多种方式;利用全二维谱图的数据特点,建立了用于解决全二维色谱数据基线漂移的方法,为准确的峰体积定量奠定了良好的基础;基于“漏水”算法,编制了全二维色谱工作站,它能较好地确定分离谱图的基平面,并正确地获取各峰的体积,进行全自动定量;建立了基于标

准偏差作为标准谱图对齐的方法,解决了柱流失的减扣和数据的批处理问题,极大地提高了数据处理的速度,为 GC × GC 的推广使用提供了良好的基础^[58]。

在上述研究基础上,开展了中药挥发油组分全分析和中药质量控制的 GC × GC 研究,提出了用于中药质量控制的 3 种方法^[59],如建立了广藿香挥发油组成研究的 GC × GC/TOFMS 方法,运用所建立的方法,鉴定出了广藿香挥发油中 394 个组分^[60],通过比较 GC 与 GC × GC、GC/MS 与 GC × GC/TOFMS,证明了 GC × GC/TOFMS 的高灵敏度、高峰容量、高分辨率等优点,表明了其在复杂体系的分离分析方面的优势。此外,用 GC × GC/TOFMS 方法研究了多种中药挥发油的化学组成^[60-63],鉴定出了莪术挥发油中的 249 种组分、连翘挥发油中的 220 种组分、姜黄和片姜黄挥发油的 216 种组分。采用反相高效液相色谱建立了参麦注射液的特征指纹图谱^[64],以 23 个特征指纹峰与内标(联苯)的峰面积比作为指标,结合主成分分析投影判别法比较了同一厂家不同批次产品和不同厂家同类产品的化学指纹差异。结果表明该法简便、可靠,专属性强,能满足参麦注射液的质量控制要求。

6 小结

色谱专家系统经过 20 年的研究得到了很大的发展。我们以气相色谱专家系统的研究开始,根据科学发展的需要,运用专家系统的思想,不断引进气相色谱、液相色谱和毛细管电泳色谱的先进技术,解决国民经济建设中的实际问题,并从最初的石化、环保延伸至与人民生活密切相关的健康、药物分析等领域。可以预测,随着科学技术的发展和各种新的分析问题的涌现,专家系统的思想也将被不断完善并将发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] Lu Peichang, Xu Guowang. Expert System on Gas Chromatography. Jinan: Shandong Sciences and Technology Press (卢佩章,许国旺. 气相色谱专家系统. 济南:山东科技出版社), 1994
- [2] Bach R. ACS Symposium Series 306. Washington, D. C: ACS, 1986. 278
- [3] Schoenmakers P J, Mulholland M. Chromatographia, 1988, 25(8): 737
- [4] Goulder D, Blaffert T, Blokland A, Buydens L, Chhabra A, Cleland A, Dunand N, Hindriks H, Kateman G, Leeuwen V H, et al. Chromatographia, 1988, 26: 237
- [5] Lu Peichang, Lu Xiaoming. Chinese Journal of Chromatography (卢佩章,卢小明. 色谱), 1984, 1(1): 58
- [6] Lu Peichang, Lu Xiaoming. Chinese Journal of Chromatography (卢佩章,卢小明. 色谱), 1984, 1(2): 102
- [7] Lin B, Chu X, Luo C, Li H, Lu P. Proceedings of Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis. Vol 2. Beijing: [s. n.]. 1985. 2 084
- [8] Lu P, Lin B, Chu X, Luo C, Lai G, Li H. J HRC & CC, 1986, 9(11): 702
- [9] Xu Guowang, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,卢佩章. 色谱), 1990, 8(5): 270
- [10] Xu Guowang, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,卢佩章. 色谱), 1990, 8(6): 345
- [11] Xu Guowang, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,卢佩章. 色谱), 1991, 9(4): 217
- [12] Xu Guowang, Zhang Xiangmin, Luo Chunrong, Yang Li, Zhang Yukui, Lu Peichang. Computers and Applied Chemistry (许国旺,张祥民,罗春荣,杨黎,张玉奎,卢佩章. 计算机与应用化学), 1995, 12(3): 174
- [13] Xu Guowang, Lu Peichang. In: Computer Chemistry Monograph, Series 2: Selected Papers of Computers and Applied Chemistry. Editorial Board of Computers and Applied Chemistry Laboratory of Computer Chemistry, Chinese Academy of Sciences, ed. Beijing: Science Press, 1991. 56
- [14] Xu Guowang, Yang Li, Liu Hui, Hong Qunfa, Yang Baiyu, Zhang Yukui (许国旺,杨黎,刘辉,洪群发,杨柏宇,张玉奎. 色谱), 1995, 13(5): 310
- [15] Xu Guowang, Li Haochun, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,李浩春,张玉奎,卢佩章. 色谱), 1992, 10(5): 257
- [16] Xu Guowang, Hao Wei, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,郝威,张玉奎,卢佩章. 色谱), 1992, 10(6): 315
- [17] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,张玉奎,卢佩章. 色谱), 1993, 11(2): 64
- [18] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺,张玉奎,卢佩章. 色谱), 1993, 11(3): 131
- [19] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (许国旺,张玉奎,卢佩章. 分析化学), 1993, 21(2): 143
- [20] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (许国旺,张玉奎,卢佩章. 分析化学), 1993, 21(3): 276
- [21] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Applied Chemistry (许国旺,张玉奎,卢佩章. 应用化学), 1993, 10(5): 66
- [22] Lu P C, Zhang X M, Yang L, Xu G W, Zhang Y K. Anal Sci, 1994, 10(2): 241
- [23] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Acta Chimica Sinica (许国旺,张玉奎,卢佩章. 化学学报), 1994, 52(9): 902
- [24] Xu Guowang, Zhang Yukui, Lu Peichang. Acta Chimica Sinica (许国旺,张玉奎,卢佩章. 化学学报), 1994, 52(9): 910
- [25] Ye Fen, Xu Guowang, Hong Qunfa, Dong Mingquan, Xu Fangbao, Zhang Yukui. Chinese Journal of Chromatography (叶芬,许国旺,洪群发,董明荃,徐方宝,张玉奎. 色谱), 1997, 15(5): 423
- [26] Ye Fen, Kong Hongwei, Lu Xin, Zhao Xinjie, Xu Guowang (叶芬,孔宏伟,路鑫,赵欣捷,许国旺). CN: ZL00110558.2, 2004
- [27] Ye Fen, Xu Guowang, Zhao Xinjie (叶芬,许国旺,赵欣

- 捷). CN:ZL01115824, 2004
- [28] Xu Guowang, Lu Xin, Wang Minyan, Ye Fen, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Chromatography (许国旺, 路鑫, 汪敏燕, 叶芬, 张玉奎, 卢佩章. 色谱), 1999, 17(2): 115
- [29] Cai Hua, Liu Lijiang, Yan Jian, Lu Xin, Ye Fen, Xu Guowang. Chinese Journal of Chromatography (蔡华, 刘漓江, 严建, 路鑫, 叶芬, 许国旺. 色谱), 2000, 18(2): 131
- [30] Lu Xin, Wu Hao, Xu Guowang, Guan Aimin, Zhao Xinjie, Song Yijing, Zhang Tongfeng, Liu Bin. Chinese Journal of Chromatography (路鑫, 吴浩, 许国旺, 管爱民, 赵欣捷, 宋怡静, 张桐凤, 刘斌. 色谱), 2001, 19(3): 196
- [31] Lu Peichang, Dai Chaozheng, Zhang Xiangmin. Theory Basis on Chromatography. Beijing: Science Press (卢佩章, 戴朝政, 张祥民. 色谱理论基础. 北京: 科学出版社), 1997. 2
- [32] Chen Jiao, Xu Guowang, Yang Li, Zhang Xiangmin, Zhou Shenfan, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (陈佼, 许国旺, 杨黎, 张祥民, 周申范, 张玉奎, 卢佩章. 分析化学), 1994, 22(10): 1029
- [33] Xu Guowang, Zhang Xiangmin, Yang Li, Zhang Yukui, Lu Peichang. Acta Chimica Sinica (许国旺, 张祥民, 杨黎, 张玉奎, 卢佩章. 化学学报), 1994, 52(9): 910
- [34] Yang Li, Xu Guowang, Luo Chunrong, Chen Jiao, Zhang Xiangmin, Zhou Shenfan, Zhang Yukui, Lu Peichang. Journal of Instrumental Analysis (杨黎, 许国旺, 罗春荣, 陈佼, 张祥民, 周申范, 张玉奎, 卢佩章. 分析测试学报), 1995, 14(5): 10
- [35] Zhang Xiangmin. [PhD Thesis]. Dalian: Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences (张祥民. [博士学位论文]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所), 1993
- [36] Xu G, Zhang Y. American Laboratory, 1998, 30(19): 4
- [37] Xu Guowang, Bi Weidong, Gan Jinping, Wang Naiyan, Zhang Yukui, Lu Peichang. Journal of Instrumental Analysis (许国旺, 毕卫东, 甘进平, 王乃岩, 张玉奎, 卢佩章. 分析测试学报), 1996, 15(1): 12
- [38] Wang Naiyan, Bi Weidong, Xu Guowang, Gan Jinping, Zhang Yukui, Lu Peichang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王乃岩, 毕卫东, 许国旺, 甘进平, 张玉奎, 卢佩章. 分析化学), 1995, 23(11): 1329
- [39] Zhang Yun, Xu Guowang, Hong Qunfa, Zhang Yukui, Dai Tianyou, Wei Fusheng. Chinese Journal of Analytical Chemistry (张云, 许国旺, 洪群发, 张玉奎, 戴天有, 魏复盛. 分析化学), 1999, 27(5): 616
- [40] Gehrke C W, Kuo K C, Waalkes T P, Borek E. Cancer Res, 1979, 39: 1150
- [41] Yang J, Xu G, Kong H, Zheng Y, Pang T, Yang Q. J Chromatogr B, 2002, 780: 27
- [42] Xu G, Di Stefano C, Liebich H M, Zhang Y, Lu P. J Chromatogr B, 1999, 732(2): 307
- [43] Yang J, Xu G, Zheng Y, Kong H, Pang T, Lv S, Yang Q. J Chromatogr B, 2004, 813: 59
- [44] Xu G, Schmid H R, Lu X, Liebich H M, Lu P. Biomed Chromatogr, 2000, 14(7): 459
- [45] Shi X, Xu G, Zhao C, Ma J, Zhang Y, Lü S, Yang Q. Electrophoresis, 2003, 24: 2316
- [46] Shi Xianzhe, Xu Guowang, Zhao Chunxia, Yang Qing. Chinese Journal of Analytical Science (石先哲, 许国旺, 赵春霞, 杨青. 分析科学学报), 2004, 20(4): 361
- [47] Shi Xianzhe, Li Jianhua, Zhao Chunxia, Lü Shen, Yang Qing, Xu Guowang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (石先哲, 李建华, 赵春霞, 吕申, 杨青, 许国旺. 分析化学), 2005, 33(2): 177
- [48] Zhao C, Xu G, Shi X, Ma J, Zhang Y, Lü S, Weng Q, Yang Q. Anal Sci, 2004, 20(6): 1001
- [49] Zhao C, Xu G, Shi X, Ma J, Zhang Y, Lü S, Yang Q. J Chromatogr B, 2003, 795(1): 55
- [50] Zhao Chunxia, Shi Xianzhe, Zhang Yan, Ma Jianmei, Mou Hongmei, Lü Shen, Xu Guowang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (赵春霞, 石先哲, 张岩, 马坚妹, 牟红梅, 吕申, 许国旺. 分析化学), 2003, 31(8): 906
- [51] Zhao C, Xu G, Shi X, Ma J, Lü S, Yang Q. Biomedical Chromatography, 2004, 18(8): 538
- [52] Zhao Chunxia, Xu Guowang, Shi Xianzhe, Ma Jianmei, Zhang Yan, Lü Shen, Yang Qing. Science in China (Series B) (赵春霞, 许国旺, 石先哲, 马坚妹, 张岩, 吕申, 杨青. 中国科学·B辑), 2003, 33(6): 496
- [53] Li Jianhua, Shi Xianzhe, Liu Min, Wang Yan, Yu Zhihong, Xu Guowang, Lü Shen. Chinese Journal of Cancer (李建华, 石先哲, 刘敏, 王彦, 于志红, 许国旺, 吕申. 癌症), 2005, 24(3): 273
- [54] Li Jianhua, Shi Xianzhe, Lü Shen, Liu Min, Wang Zhao-hui, Liu Lina, Jiang Jing, Xu Guowang. World Chin J Digestol (李建华, 石先哲, 吕申, 刘敏, 王朝晖, 刘丽娜, 姜静, 许国旺. 世界华人消化杂志), 2004, 12(8): 1774
- [55] Xu Guowang, Ye Fen, Kong Hongwei, Lu Xin, Zhao Xinjie. Chinese Journal of Chromatography (许国旺, 叶芬, 孔宏伟, 路鑫, 赵欣捷. 色谱), 2001, 19(2): 132
- [56] Lu X, Kong H, Li H, Ma C, Xu G. J Chromatogr A, 2005, 1086(1-2): 175
- [57] Lu Xin. [PhD Thesis]. Dalian: Dalian Institute of Chemical physics, The Chinese Academy of Sciences (路鑫. [博士学位论文]. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所), 2004
- [58] Kong Hongwei, Lu Xin, Ruan Chunhai, Yang Jun, Xiao Ke, Yang Qing, Xu Guowang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (孔宏伟, 路鑫, 阮春海, 杨军, 肖珂, 杨青, 许国旺. 分析化学), 2003, 31(4): 409
- [59] Ruan C, Xu G, Lu X, Hua R, Kong H, Xiao K, Yang Q. Chromatographia, 2003, 57: 265
- [60] Wu J, Lu X, Tang W, Kong H, Zhou S, Xu G. J Chromatogr A, 2004, 1034(1-2): 199
- [61] Wu Jianfang, Lu Xin, Tang Wanying, Kong Hongwei, Xu Guowang. Chinese Journal of Natural Medicines (武建芳, 路鑫, 唐婉莹, 孔宏伟, 许国旺. 中国天然药物), 2003, 1(3): 150
- [62] Wu Jianfang, Lu Xin, Tang Wanying, Kong Hongwei, Zhou Shenfan, Xu Guowang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (武建芳, 路鑫, 唐婉莹, 孔宏伟, 周申范, 许国旺. 分析化学), 2004, 32(5): 582
- [63] Wu Jianfang, Lu Xin, Tang Wanying, Lian Xiaohong, Kong Hongwei, Ruan Chunhai, Xu Guowang. Chemical Journal of Chinese Universities (武建芳, 路鑫, 唐婉莹, 廉晓红, 孔宏伟, 阮春海, 许国旺. 高等学校化学学报), 2004, 25(8): 1432
- [64] Shi Xianzhe, Yang Jun, Zhao Chunxia, Xiong Jianhui, Xu Guowang. Chinese Journal of Chromatography (石先哲, 杨军, 赵春霞, 熊建辉, 许国旺. 色谱), 2002, 20(4): 299

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞！

微流控芯片实验室

林炳承，秦建华

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要 :以作者所在课题组近年来的研究工作为基础,就芯片实验室平台建设及相应的以系统生物学为最终目标的功能化研究作一说明,对在分子和细胞层面,甚至是单分子、单细胞水平上实现以规模集成为特征的临床诊断和药物筛选的努力予以特别的关注。

关键词 :芯片实验室 ;系统生物学 ;功能化 ;临床诊断 ;药物筛选

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0456-08

Laboratory on a Microfluidic Chip

LIN Bingcheng, QIN Jianhua

(*Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China*)

Abstract : The recent achievements of microfluidic chip and its applications, based on the works mainly carried out in the authors' lab are reviewed. The chip fabrication capabilities have been extended into design and fabricate chips with higher degree of complexity in different materials, such as quartz, glass, polymethyl methacrylate (PMMA), and polydimethyl siloxane (PDMS). A set of methods for surface modification of micro-channels on such materials have been developed, which results in better reproducibility and higher efficiency in protein and peptide analysis. The use of novel materials for chip fabrication is also under investigation. A series of microfluidic workstations with integrated chip manipulation as well as laser induced fluorescence (LIF), ultraviolet (UV), electrochemical and chemiluminescence detection modules have been developed to attain the abilities of complex microfluidic control and data acquisition schemes. A single cell/single molecule imaging system was built up for dynamic analysis of molecular or cellular events too. Based on the work mentioned above, different functional units, such as membrane, monolithic, isotachopheresis (ITP) etc were set up and integrated. Glycoform separation of turkey ovalbumin in a lectin monolithic column and an electrophoresis channel was performed on an integrated microchip. And a novel technique has been developed that allows for the coupling of ITP and non-gel sieving electrophoresis for protein analysis in a single microchip and resulting in ~50 fold increase of the sensitivity in comparison with the use of gel electrophoresis only. A single molecule detection (SMD) based technique was developed for simultaneously measuring both bulk flow and near-wall flow velocity in the microchannels. And more recently, an SMD based technology was developed for observing molecular interactions at single molecule level. An ultra-rapid microchip electrophoresis method was established for simultaneous determination intracellular reactive oxygen species (ROS) and reduced glutathione (GSH) related to apoptosis and oxidative stress. In an effort to develop a novel microfluidic based drug screening platform, systematic studies on the interaction between granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and sulfated oligosaccharides were carried out at both molecular and cellular levels. Doxorubicin induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma (HepG₂) was studied using the integrated microfluidic device with concentration generator. In the application phase, severe acute respiratory syndrome (SARS) diagnosis based on reverse

收稿日期 2005-06-08

作者简介 :林炳承,男,博士,研究员, E-mail: bclin@dicp.ac.cn.

基金项目 :国家自然科学基金面上基金项目(No. 20275039),国家自然科学基金重点项目(No. 20035010),国家自然科学基金重大项目(No. 20299035)和大连化学物理研究所创新基金资助项目.

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and microfluidic chip electrophoresis (MCE) with 18 cases , methylation analysis of the P16 gene in 159 samples of patients and references for cancer diagnosis and polymorphism analysis of angiotenigen gene in 226 patients and references with essential hypertension are described. Forty-three up to date references are cited.

Key words : lab-on-a-chip ; systems biology ; integrated functionalities ; clinical diagnosis ; drug screening

微流控芯片实验室又称芯片实验室(lab-on-a-chip)或微流控芯片(microfluidic chip) ,指的是把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上 ,由微通道形成网络 ,以可控流体贯穿整个系统 ,用以取代常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术。微流控芯片实验室的基本特征和最大优势是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和大规模集成 ,高通量是大规模集成的一种形式。

微流控芯片实验室以微流控技术为基础 ,它有别于另一类以静态亲和杂交技术为核心的微孔板芯片 ,后者通常被国内的大众媒体称之为“ 生物芯片 ” ,以脱氧核糖核酸(DNA)芯片为典型代表 ,不在本文所讨论的范围之内。在一段时期的学术刊物中 ,微全分析系统(μ -TAS)往往和微流控芯片实验室混用。事实上 ,较之微全分析系统 ,微流控芯片实验室的外延更宽 ,内涵更为丰富。微流控芯片实验室的最早期形式是芯片毛细管电泳 ,芯片毛细管电泳至今仍是芯片实验室中分离部分的主体。

微流控芯片实验室是微纳米技术的重要组成部分 ,也是系统生物学研究的主要技术平台之一 ,有重大应用前景 ,尚未真正产业化。2004 年 9 月美国 Business 2.0 杂志的封面文章称 ,芯片实验室是“ 改变未来的七种技术 ”之一。芯片实验室所具有的多种单元技术灵活组合和大规模集成的特点 ,使之不仅能以极少量的样品获得极大的信息量 ,更有可能超越单一的分析功能 ,而以一个整体微型多元操作平台的姿态直面市场。

市场化对微流控芯片实验室的基本要求是它的功能化。功能化分通用型和专用型两类 ,按照目前的理解 ,一个功能化芯片实验室系统应包括芯片分析器、芯片及试剂盒等 3 个部分 ,试剂盒内包含有实现芯片功能化的方法和材料。

国内外已有很多研究小组在微流控芯片领域做了许多出色的工作^[1-5] ,但限于篇幅 ,又为避免挂一漏万 ,本文仅拟以作者所在课题组近年来的研究工作为基础 ,就芯片实验室平台建设及相应的以系统

生物学为最终目标的功能化研究作一说明 ,对在分子和细胞层面 ,甚至是单分子、单细胞水平上实现以不同操作单元规模集成为特征的临床诊断和药物筛选的努力予以特别的关注。

1 芯片分析仪

芯片分析仪主要由两部分组成 :一是动力源。广义的动力源包括电、磁、声、光、热 ,现阶段仍以电源为主。二是检测器。电源提供包括流体驱动在内的各种动力 ,检测器则用于捕捉微流控芯片产生的信号。检测器是微流控芯片实验室的重要组成部分 ,最常用的是激光诱导荧光检测器 ,此外还有紫外、电化学、质谱、化学发光检测器等。目前市场上还缺乏真正意义上的微流控芯片仪器 ,在中国市场上能见到的仅有的两种均采用激光诱导荧光检测 ,有很大的局限性。其中一种是加拿大 Albert 大学派生出的 Micralyne 公司生产的名为 Microfluidic Tool Kit 的仪器 ,其聚焦为手动式 ,操作不便 ,软件简单 ;另一种是 Agilent 公司的 Bioanalyzer 2100 ,其芯片、电极以至试剂盒均为固定模式 ,不能调节变更 ,不适用于通用型实验室。Agilent 公司的芯片高效液相色谱-质谱仪(HPLC-MS)尚未真正面世。作者所在课题组已设计研制了分别采用激光诱导荧光、紫外、电化学和化学发光等 4 类不同检测器的 7 台微流控芯片分析仪 ,其中一台装有 8 个电极和 2 个微泵的激光诱导荧光(473 nm)芯片分析仪(见图 1-a) ,可支撑多种功能的规模集成芯片实验室运行^[6] ;另一台配有电荷耦合器件(CCD)并以线性聚焦为特征的激光诱导荧光(473 nm)阵列芯片仪 ,则可支撑很高通量的芯片实验室运行^[7]。还有一台可扩展到 8 个电极并因此具有更普适功能的紫外微流控芯片仪(见图 1-b) ,由一体化的芯片平台、高压电源、紫外检测器和相应软件组成。该紫外检测器通用性很强 ,适用范围很宽 ,检测灵敏度较高 ,接近或超过常规毛细管电泳用紫外检测器的水平 ;采用石英芯片或聚二甲基硅氧烷(PDMS)-石英复合芯片 ,制作简便 ,并可重复使用^[8]。本课题组还按承担的奥林匹克项目的要求 ,研制了微型化便携式电

化学微流控芯片仪(见图 1-c),仪器结构紧凑,外观尺寸仅为 9.5 cm × 11 cm × 6.5 cm (W × L × H),重量轻,采用 USB 接口与上位机通讯,同时为电化

学检测系统供电;采用特殊设计的 PDMS 电化学检测芯片。仪器操作简单,成本低廉,携带方便,适合于实时检测或野外使用^[9]。



图 1 作者所在课题组研制的多功能微流控芯片分析仪(a)、紫外微流控芯片分析仪(b)和电化学微流控芯片分析仪(c)
 Fig.1 Multipurpose microfluidic chip analyzer (a), microfluidic chip analyzer with UV detector (b) and microfluidic chip analyzer with electrochemical detector (c) developed in the authors' lab

2 芯片及其表面改性

芯片本身有两个方面值得关注:一是尺寸;二是材料^[10]。作者所在的课题组已自行设计研制了 5 种不同材料、不同结构和不同集成度的微流控芯片,包括玻璃芯片^[11]、石英芯片及聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、PDMS 等塑料芯片(见图 2)^[12,13],并自

给有余;注塑型 PMMA 塑料芯片已有自制模具,具备规模生产的能力。本课题组还建立了一套水凝胶材料的加工方法,并采用该技术研制出以水凝胶材料为基础的一类新型微流控芯片。自制的玻璃芯片表面性质稳定,重复性较好,曾在同一块芯片上连续运行罗丹明样品 200 次,峰形基本保持对称,柱效无明显下降。



图 2 作者所在课题组研制的玻璃芯片(a)、PMMA 芯片(b)和 PDMS 芯片(c)
 Fig.2 Glass microfluidic chip (a), PMMA microfluidic chip (b) and PDMS microfluidic chip (c) developed in the authors' lab

我们建立了 PMMA 和 PDMS 微流控芯片管壁涂层修饰方法,使疏水的塑料芯片内表面高度亲水化,强烈抑制电渗流,并减少蛋白质等在塑料芯片内表面的吸附。对不同材料单元部件的表面修饰工作也已取得重要进展。在对 PDMS 芯片表面进行改性后 40 s 内成功地实现了碱性蛋白核糖核酸酶和溶解酵素的基线分离,最高柱效达 100 万/m 以上,重复 70 余次性能基本不变^[14]。在 PMMA 表面作静态修饰后,产生了一个均匀的涂层,连续运行肽样品 40 余次,柱效和分离度均无明显下降,现已成功

地用于蛋白质、核酸等芯片电泳的分离^[15]。

3 功能单元及其集成

前已提及,芯片实验室的基本特点是多种单元技术的灵活组合和规模集成。目前,芯片实验室制作的趋势是:被集成的单元部件和技术越来越多,规模也越来越大。其中涉及到和进样及样品处理有关的透析、膜、固相萃取,用于流体控制的微阀、微泵以及微混合器、微反应器、微分离器和微检测器等。这样一种微操作单元的规模集成能力是微流控芯片之

所以能成为系统生物学研究的主要技术平台之一的基本原因。按照现代生物学的观点,生物体是一个系统、一个网络,人们研究的不仅是其中某一个静态的“组学”,更重要的是要考虑系统中各个单元之间各种组成的动态的相互联系及相互作用,因此,不仅要测定关于生物体同一参数在不同时刻的变化,更要注意不同参数在同一时刻的数值。人类认识上的这么一种变化无疑为微流控芯片提供了一个极为广阔的舞台,尽管总体而言,它尚处于发展阶段的前期。

目前,膜、电泳、整体柱亲和色谱、聚合酶链反应(PCR)、酶反应、细胞培养、单细胞分析等单元操作及它们的初步集成已在本课题组自制的芯片上实现。我们建立了以原位聚合整体柱为载体,固定化凝集素为配体,集成有毛细管电泳和柱长仅为 500 μm 的凝集素亲和色谱功能的微流控芯片平台,成功地实现了糖蛋白中糖型的分析(见图 3)^[16]。整个过程所用时间仅为液相色谱的 3%,所用样品量仅为 3 μg ,体现了微流控集成芯片操作简单、分析过程短、样品消耗量少的优点。

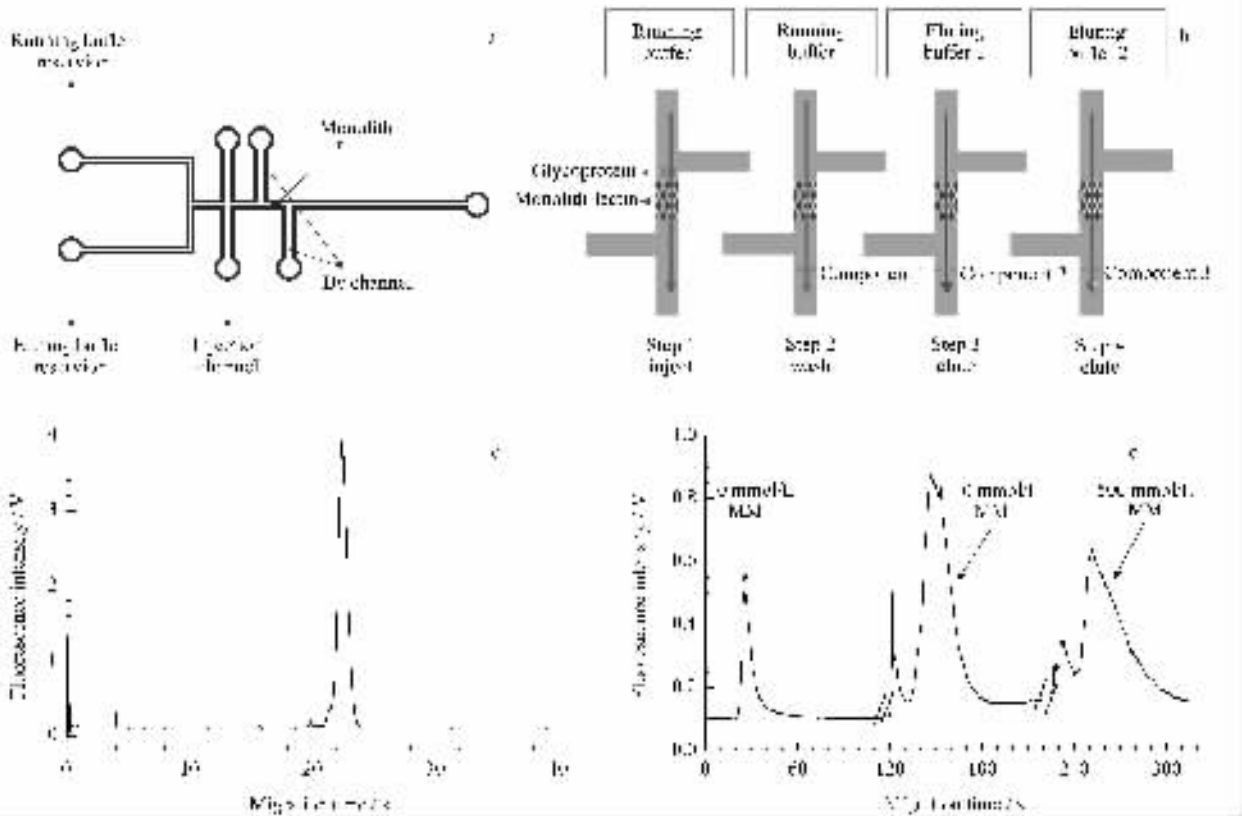


图 3 在微流控芯片平台上实现糖蛋白的糖型分析

Fig.3 Glyco-protein analysis with microfluidic system

a. Layout of the microfluidic chip. b. Operation sequence of *Pisum sativum* agglutinin-affinity microfluidic chip (PSA-AMC). The arrows indicate the movement of solutions. c. Electropherogram of chicken ovalbumin by chip-based capillary electrophoresis. d. Electropherogram of chicken ovalbumin by the PSA-AMC-based method. MM : methyl- α -D-mannopyranoside.

本课题组将等速电泳浓缩与无胶筛分电泳分离相结合,在一块多功能集成芯片上一步实现了蛋白质的浓缩和分离,灵敏度较十字进样分离的结果提高了约 50 倍^[17]。众所周知,等速电泳是在由前导电解质和尾随电解质所组成的非连续介质中进行电泳的分离技术,它可将分离后的组分压缩为一个很窄的区带,从而达到柱上浓缩的目的。我们将纳米孔径的微膜置于两层芯片之间,通过调节孔径大小截留不同大小的分子,已经用 0.01 μm 孔径的膜截留了急性早幼粒白血病细胞(NB4)悬浮液中的大分子,测到流出液中的小分子谷胱甘肽

(GSH)^[18]。在集成有 4 个平行通道的芯片上,一次同时成功地测定了 4 种不同的氨基酸、胰蛋白酶,实现了胰蛋白酶抑制剂与胰蛋白酶相互作用的并行研究,完成了手性拆分剂在 4 个通道上的同时筛选(见图 4)。

本课题组以两种来自不同物种的卵白蛋白(鸡卵白蛋白和火鸡卵白蛋白)为对象,进行了糖蛋白中的糖链结构和糖型分析,对两种糖蛋白中的糖链结构以及糖型进行了比较^[19]。与此同时,在芯片平台上建立了一种可同时测定细胞活性氧(ROS)和还原型谷胱甘肽的芯片电泳方法,并将其应用于

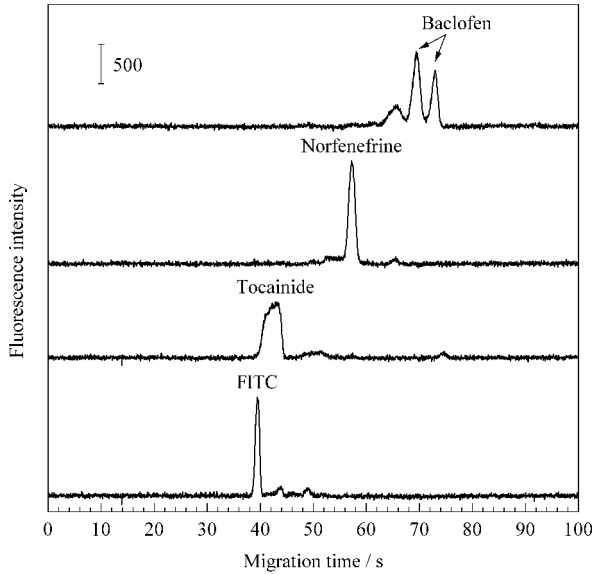


图 4 手性拆分剂在同一芯片 4 个通道上的同时筛选
Fig. 4 Electropherograms of chiral separations

Running buffer: 20 mmol/L phosphate containing 2 mmol/L γ -cyclodextrin, pH 9. 2.

As₂O₃ 诱导 NB₄ 细胞凋亡过程中氧化-还原状态的评价^[20, 21]和运动员体能训练的结果评价。已知活性氧和还原型谷胱甘肽是与细胞氧化应激和凋亡密切相关的两类重要信号物质。传统的检测 ROS 和 GSH 的方法所需样品量大,分析时间长,而且难以对两种物质同时测定。

4 疾病诊断和药物筛选

前已提及,市场化对微流控芯片的基本需求是它的功能化,现阶段功能化的两个重要出口是疾病诊断和药物筛选。我们研究了以基因多态性分析、外源性基因检测和基因表达为基础的基因诊断的可行性^[22, 23],并进行了临床样品严重急性呼吸系统综合征(SARS)病毒、细胞周期蛋白激酶抑制物基因(P16 基因)甲基化、高血压易感基因等的规模检测。利用逆转录多重 PCR 扩增 SARS 基因序列,在自制微流控芯片及相应的芯片分析器上实现了 PCR 反应和电泳检测。由芯片过程测定的 PCR 扩增产物长度和序列得到了测序结果的确认。测定了 18 例疑似 SARS 患者咽拭子样品,其中 17 例用二重逆转录(RT)-PCR 芯片电泳证实为阳性^[24]。采用微流控芯片技术与 PCR-限制性片段长度多态性方法相结合,对大连地区 123 例原发性高血压及 103 例正常人血管紧张素原(AGT)基因核心启动子区-6A/G 基因多态性进行分析,并对两组人群 AGT 基因的 3 种基因型(AA, AG, GG)及等位基因(A, G)频率分布进行了比较(见图 5)^[25]。同样在自行

研制的芯片和芯片分析仪上,配之以自行开发的专用试剂盒,对 93 例肿瘤病人和 66 例对照人群进行较大样本量 P16 基因的 DNA 甲基化检测,并与凝胶电泳和 Agilent 2100 芯片电泳仪的结果作双盲对照,在相当程度上证明了这一技术用于肿瘤早期诊断的可行性^[26]。

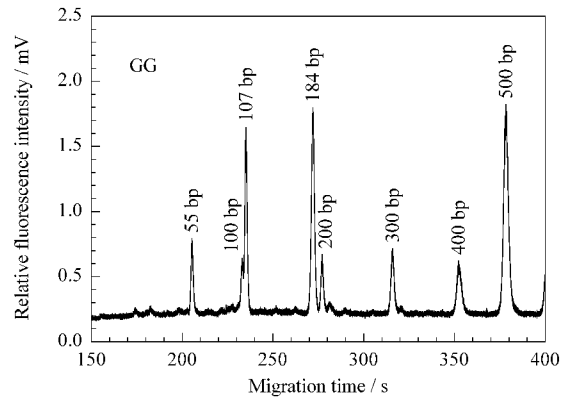
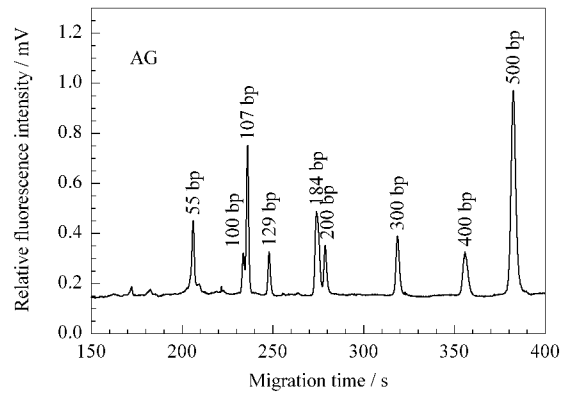
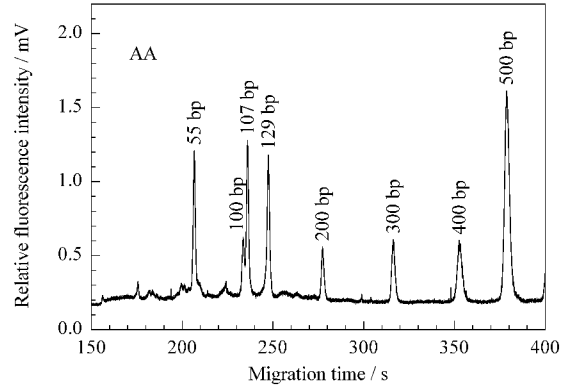


图 5 AGT 基因核心启动子区-6A/G 3 种基因型 (AA, AG 和 GG) 的芯片电泳图

Fig. 5 Microchip electropherograms of the genotypes (AA, AG and GG) of AGT gene at position -6

除此之外,还开展了人参微卫星位点短串联重复序列多态性分析及在此基础上的东方参和西洋参的鉴别^[27],临床疑诊感染性疾病样品中结核杆菌、丙型肝炎病毒及疑诊强直性脊椎炎样品中白细胞相关抗原 B27 基因等的相关检测,同时完成了细胞或组织核糖核酸(RNA)的完整性评价、不同组织岩藻

糖基转移酶基因表达研究等工作^[28-32]。

药物筛选是现阶段新药开发的主要途径。高通量药物筛选(HTS)是近 10 年发展起来的药物筛选研究方式的主流。HTS 的基础之一是分子水平和细胞水平的相互作用研究。相互作用研究和单核苷酸多态性及蛋白质组研究被称之为后基因组时代工作的三大组成部分。以毛细管电泳为基础的技术是近年来相互作用研究中用得较多的一种,芯片电泳平台也已日趋活跃。毛细管电泳以及芯片毛细管电泳因其样品及试剂消耗少、分析速度快、效率高、操作模式灵活多变、可在生理环境或近生理环境下运行、可给出相互作用常数等特点,已逐渐成为研究生物分子间相互作用的重要手段。以包括高通量在内的大规模集成为特点的芯片实验室已被看成是最有可能满足高通量筛选要求的新兴技术平台之一。

我们以毛细管电泳研究相互作用的积累为基础^[33],搭建了基于多通道芯片电泳的药物筛选技术平台,开展分子水平和细胞水平的药物筛选工作。完成了放线菌素与单、双链 DNA 结合常数和化学计量结合比的测定,并用质谱验证了它的结果^[34]。利用毛细管区带电泳(CZE)研究了粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和 15 种硫酸多糖的相互作用,计算了相互作用常数并发现 G-CSF 能和肝素、低分子量肝素、硫酸葡聚糖、卡拉胶等 10 种硫酸多糖结合,而且结合的强弱和糖的硫酸化程度、硫酸化位点、硫酸化类型,以及糖链的长度有关^[35,36]。用 10 种硫酸多糖和含有 G-CSF 受体的鼠骨髓细胞(NFC-60)作用,发现其中的 3 种具有抑制细胞生长并促进其分化的功能。在此基础上,用 Avidin-biotin 系统将肝素固定于芯片通道中的整体柱内,令异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 G-CSF 流经肝素柱,与固定化的肝素结合。除去非特异性结合的 G-CSF 后,用一定浓度的糖进行竞争亲和洗脱。根据 G-CSF 能否被洗脱及洗脱时间的长短来确定所用的糖与 G-CSF 能否作用及作用的强弱,再次实现了芯片平台上的相互作用研究。

这样一种已被证实的 G-CSF-肝素相互作用体系又被用来验证本实验室发展的一种通过单分子记数的手段定性测定分子相互作用的方法。我们发现,隐失场中在样品荧光团浓度一致的情况下,随着被检测分子分子质量的增大,检测到的分子个数减小。FITC 标记的不同长度的系列寡核苷酸分子的记数结果均符合这一规律(见图 6)。据此我们推断,发生相互作用而结合的分子复合体的单分子个数应该小于发生相互作用前的单分子个数。肝素与 G-CSF 相互作用体系验证了上述推断。这一发现

有可能提供一种全新的检测相互作用的方法^[37]。在此基础上,灵活地实现了宽场检测和隐失场检测的切换,并以纳米颗粒和多染料标记的 λ -DNA 分子为流体示踪剂监测了压力驱动下微通道中主流流速和近壁流速的差别^[38,39]。

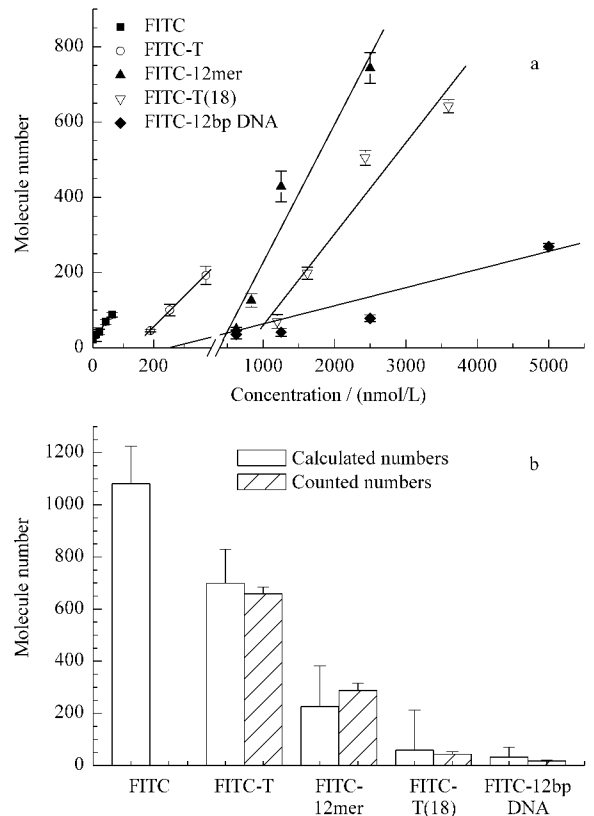


图 6 隐失场中分子个数的记数结果

Fig. 6 Molecule numbers in evanescent wave field

a. linear relationships between the numbers of molecules of oligonucleotides and different concentrations of each type of molecules; b. comparison of the experimental and calculated numbers of individual molecules of oligonucleotides at the same concentration (1 000 nmol/L).

本课题组还构建了一种集成化细胞水平的药物筛选微流控芯片(见图 7)。在已完成的浓度梯度阿霉素诱导肝癌细胞(HepG2)凋亡工作的基础上,增加细胞培养区平行的细胞池个数,使同一浓度药物对应多组不同细胞。这样一种以微流控芯片为基础的药物筛选平台,集细胞培养、浓度梯度加样、不同小分子-细胞相互作用等单元操作于一体,通过细胞毒性分析、细胞凋亡分析等筛选不同的先导化合物或抗凋亡药物^[40]。

目前,一种基于微流控芯片的 DNA 计算机研究工作在本课题组也已取得一定的进展^[41-43]。迄今为止报道的 DNA 计算机缺乏存储功能,难以将计算结果实时记录存储下来,成为影响该领域发展的瓶颈之一。我们提出了以微流控芯片为基础的 DNA 计算机的基本构想,将计算机的基本功能单元

如输入、输出、计算、控制单元,尤其是存储单元集成于微流控芯片上,解决了数学中的等腰三角形识别

问题,并尝试将微流控芯片 DNA 计算机用于疾病诊断和药物筛选。

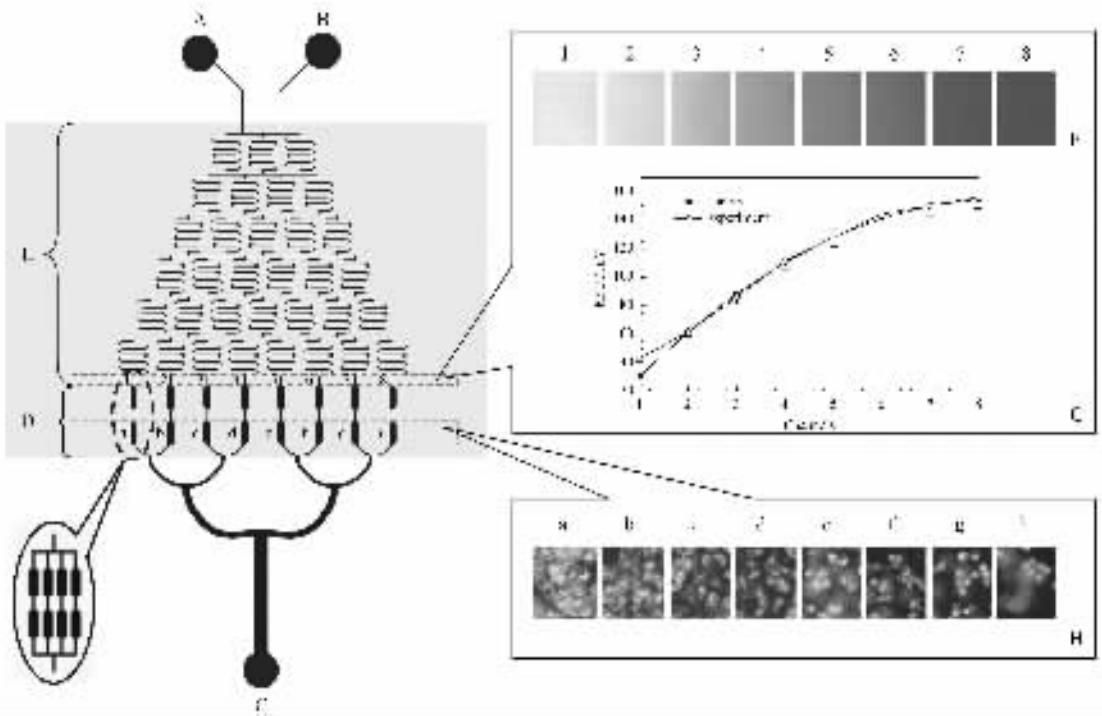


图 7 集成化细胞水平药物筛选微流控芯片

Fig. 7 Integrated microfluidic device for drug screening at cellular level

A : Inlet A (medium); B : Inlet B (medium + drug); C : Cell inlet ; D : Cell culture chamber ; E : Gradient generator ; F : The reagent gradient was visualized by injecting drug solution into inlet B and water into inlet A ; G : A comparison between theoretical estimates and experimentally obtained data ; H : The collapse of mitochondria membrane potential was found in apoptotic HepG2 cells by fluorescence microscope.

5 结语

微流控芯片是微纳米技术的重要组成部分,是一种正在蓬勃崛起的新的技术平台,其基本特征是多种单元操作在微小空间上的灵活组合和规模集成。微流控芯片研究已在非常广阔的领域取得了进展并显示了其在临床诊断、药物筛选等许多方面的应用潜力。研究人员应以更大的投入涉足于微流控芯片已提供但尚未被完全涉及的研究空间和应用领域,并加快这一技术平台的产业化进程。

致谢 参加此项工作的还有:戴忠鹏、时蔚、盖宏伟、王刚、毛秀丽、梁爱叶、刘大渔、姜雷、吴大朋、刘欣、刘晓君、罗勇、沈铮、龙志成、於林芬、黄淮青、钟润涛、马波、高雁、叶囡楠、解华、李博伟、李进、张宇、曾绍江、陆瑶、王琪、孙燕、周小棉、李大志、王辉、何新亚等,特此致谢!

参考文献:

[1] Vilckner T, Janasek D, Manz A. Anal Chem, 2004, 76(12): 3 373

[2] Minc N, Viovy J L. Comptes Rendus Physique, 2004, 5(5) :

565

[3] Chen H, Fang Q, Yin X F, Fang Z L. Lab on a Chip, 2005, 5(7): 719

[4] Dou Y H, Bao N, Xu J J, Meng F, Cheng H Y. Electrophoresis, 2004, 25(17): 3 024

[5] Qiu H B, Yin X B, Yan J L, Zhao X C, Yang X R, Wang E K. Electrophoresis, 2005, 26(3): 687

[6] Shen Zheng, Li Yihai, Lin Bingcheng. China Patent (沈 铮, 李义海, 林炳承. 中国专利): 200420031589. 3, 2004

[7] Long Zhicheng, Lin Bingcheng, Zhou Xiaomian, Li Yihai. China Patent (龙志成, 林炳承, 周小棉, 李义海. 中国专利): 200410020885. 8, 2004

[8] Lin Bingcheng, Wang Gang, Zhou Xiaomian, Ni Chunqi, Dai Zhongpeng. China Patent (林炳承, 王 刚, 周小棉, 倪春起, 戴忠鹏. 中国专利): 200520088915. 9, 2005

[9] Jiang L, Lu Y, Dai Z P, Xie M H, Lin B C. Lab on a Chip, 2005, 5(9): 930

[10] Lin Bingcheng. Journal of China Pharmaceutical University (林炳承. 中国药科大学学报), 2003, 34(1) : 1

[11] Wang Hui, Dai Zhongpeng, Wang Li, Bai Jiling, Lin Bingcheng. China Patent (王 辉, 戴忠鹏, 王 利, 白吉玲, 林炳承. 中国专利): 200310119466. 5, 2003

[12] Dai Zhongpeng, Luo Yong, Gai Hongwei, Lin Bingcheng. China Patent (戴忠鹏, 罗 勇, 盖宏伟, 林炳承. 中国专利): 2003111164. 5, 2003

[13] Huia Y N, Wang G, Lin B C, Chan W T. Lab on a Chip, in

- press
- [14] Wu D P , Luo Y , Zhou X M , Dai Z P , Lin B C. Electrophoresis , 2005 , 26(1) : 211
- [15] Wang Hui. [PhD Thesis]. Dalian : Institute of Chemical Physics , CAS(王 辉. [博士学位论文]. 大连 : 中国科学院大连化学物理研究所) , 2005. 3
- [16] Mao X L , Luo Y , Dai Z P , Wang K Y , Du Y G , Lin B C. Anal Chem , 2004 , 76(23) : 6 941
- [17] Huang H Q , Xu F , Dai Z P , Lin B C. Electrophoresis , 2005 , 26(11) : 2 254
- [18] Long Zhicheng , Lin Bingcheng. China Patent(龙志成 , 林炳承. 中国专利) : 200310119149. 3 , 2003
- [19] Mao X L , Wang K Y , Du Y G , Lin B C. Electrophoresis , 2003 , 24(18) : 3 273
- [20] Qin J H , Ye N N , Yu L F , Liu D Y , Fung Y S , Wang W , Ma X J , Lin B C. Electrophoresis , 2005 , 26(6) : 1 155
- [21] Qin J H , Ye N N , Liu X , Lin B C. Electrophoresis , in press
- [22] Qin J H , Fung Y S , Lin B C. Expert Review of Molecular Diagnostics , 2003 , 3(3) : 387
- [23] Wang H , Qin J H , Dai Z P , Wang L , Bai J L , Lin B C. J Sep Sci , 2003 , 26(9-10) : 869
- [24] Zhou X M , Liu D Y , Zhong R T , Dai Z P , Wu D P , Wang H , Du Y G , Xia Z N , Zhang L P , Mei X D , Lin B C. Electrophoresis , 2004 , 25(17) : 3 032
- [25] Qin J H , Liu Z Y , Wu D P , Zhu N , Zhou X M , Fung Y S , Lin B C. Electrophoresis , 2005 , 26(1) : 219
- [26] Zhou X M , Shao S J , Xu G D , Zhong R T , Liu D Y , Tang J W , Gao Y N , Cheng S J , Lin B C. J Chromatogr B , 2005 , 816(1/2) : 145
- [27] Qin J H , Leung F C , Fung Y S , Zhu D R , Lin B C. Anal Bio Chem , 2005 , 381(4) : 812
- [28] Zhou X M , Dai Z P , Liu X , Luo Y , Wang H , Lin B C. J Sep Sci , 2005 , 28(3) : 225
- [29] Liu D Y , Zhou X M , Zhong R T , Ye N N , Chang G H , Xiong W , Mei X D , Lin B C. Talanta , in press
- [30] Du M , Flanagan J H , Lin B C , Ma Y F. Electrophoresis , 2003 , 24(18) : 3 147
- [31] Qin J H , Fung Y S , Zhu D R , Lin B C. J Chromatogr A , 2004 , 1 027(1/2) : 223
- [32] Qin Jianhua. [PhD Thesis]. Dalian : Institute of Chemical Physics , CAS(秦建华. [博士学位论文]. 大连 : 中国科学院大连化学物理研究所) , 2005. 6
- [33] He X Y , Ding Y S , Li D Z , Lin B C. Electrophoresis , 2004 , 25(4/5) : 697
- [34] Zhou Xiaomian. [PhD Thesis]. Dalian : Institute of Chemical Physics , CAS(周小棉. [博士学位论文]. 大连 : 中国科学院大连化学物理研究所) , 2005. 3
- [35] Liang A Y , He X Y , Du Y G , Wang K Y , Fung Y S , Lin B C. Electrophoresis , 2004 , 25(6) : 870
- [36] Liang A Y , Chao Y P , Liu X J , Du Y G , Wang K Y , Qian S J , Lin B C. Electrophoresis , in press
- [37] Gai H W , Wang Q , Ma Y F , Lin B C. Angewandte Chemie International Edition , 2005 , 44(32) : 5 107
- [38] Gai H W , Li Y , Silber-Li Z , Ma Y F , Lin B C. Lab on a Chip , 2005 , 5(4) : 443
- [39] Gai H W , Yu L F , Dai Z P , Ma Y F , Lin B C. Electrophoresis , 2004 , 25(12) : 1 888
- [40] Lin B C. The 11th Asian Chemical Congress for the Quantum Leap of Asian Chemistry. Seoul , Korea : [s. n.] , 2005. 26
- [41] Lin Bingcheng , Li Bowei , Xie Hua , Ding Yongsheng , Huang Zhende. China Patent(林炳承 , 李博伟 , 解 华 , 丁永生 , 黄振德. 中国专利) : 200410100842. 0 , 2004
- [42] Lin Bingcheng , Xie Hua , Li Bowei , Huang Zhende , Ding Yongsheng. China Patent(林炳承 , 解 华 , 李博伟 , 黄振德 , 丁永生. 中国专利) : 200410082860. 0 , 2004
- [43] Lin Bingcheng , Li Bowei , Xie Hua , Ding Yongsheng , Huang Zhende. China Patent(林炳承 , 李博伟 , 解 华 , 丁永生 , 黄振德. 中国专利) : 200410082858. 3 , 2004

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

毛细管电色谱柱制备技术的进展

尤慧艳^{1,2}, 平贵臣², 张丽华², 张维冰², 张玉奎²

(1. 大连大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622 ;

2. 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023)

摘要 :介绍了毛细管电色谱开管柱、填充柱和整体柱的各种制备技术及其优势与不足,特别是对于近期发展的毛细管电色谱整体柱的制备方法及其应用进行了系统综述。引用文献 100 篇。

关键词 :毛细管电色谱 ;柱制备技术 ;进展

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0464-06

Advances in Packing Capillary Electrochromatographic Columns

YOU Huiyan^{1,2}, PING Guichen², ZHANG Lihua², ZHANG Weibing², ZHANG Yukui²

(1. *Environmental and Chemical Engineering Department, Dalian University, Dalian 116622, China;*

2. *National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China*)

Abstract : The columns in capillary electrochromatography can be classified into three classes : open tubular, packed and monolithic columns. The monolithic columns can be divided into three categories : organic polymer-based monolithic columns made from the polymerization of acrylamide, styrene, acrylate or methacrylate monomers, silica-based monolithic columns generally prepared by using sol-gel technology, and packed particulate-based monolithic columns. Monolithic columns are receiving quite remarkable attention and developing rapidly with a focus on monolithic stationary phases prepared from synthetic polymers. The preparation methods for various types of capillary electrochromatographic columns and their advantages and disadvantages are reviewed according to 100 research articles. In particular, recent advances in the preparation methods of monolithic columns and their applications are discussed in details.

Key words : capillary electrochromatography ; column preparation technology ; advances

毛细管电色谱(capillary electrochromatography, 简称 CEC)是在毛细管电泳(CE)技术不断发展和高效液相色谱(HPLC)理论日益完善的基础上发展起来的一种具有 CE 和 HPLC 双重分离性能的分 离分析方法^[1,2]。毛细管电色谱分离是在毛细管两端施加高电压,电渗流驱动流动相经过色谱分离柱,同时,带电溶质基于其质荷比在流动相中迁移,使中性和带电样品中的各组分根据其在色谱固定相和流动相间的吸附、分配平衡常数的差异及本身电泳淌度的差异得以分离。由于毛细管电色谱柱中可以填充各种小颗粒液相色谱固定相,因此毛细管电色谱不但具有毛细管电泳的高柱效,还具有高效液相色谱的高选择性;既可分离带电物质又可分离中

性物质,形成了自己独特的高效、微量、快捷的特点,开辟了高效微分离技术的新途径。近年来 CEC 一直是分析化学研究领域的热点课题,并已逐渐进入应用领域^[3-10]。

众所周知,色谱柱是色谱仪的心脏部件,是色谱分离理论与应用研究的重点。在毛细管电色谱的长足发展中,不可缺少的是毛细管电色谱柱制备技术的发展。一直以来,人们采用内径为 25 ~ 320 μm (常用的为 50 ~ 100 μm)的熔融石英毛细管为材料进行内部加工,制成 10 ~ 100 cm(常见的为 20 ~ 40 cm)有效长度的毛细管电色谱柱。根据加工方法的不同,毛细管电色谱柱被分为开管毛细管电色谱柱和填充毛细管电色谱柱。填充毛细管电色谱柱可进

收稿日期 2004-10-22

作者简介 :尤慧艳,女,博士,研究方向为毛细管电色谱, E-mail :dlyhy@dicp.ac.cn.

通讯联系人 :张玉奎,男,中国科学院院士,博士生导师, Tel/Fax (0411)84379560, E-mail :ykzhang@dicp.ac.cn.

基金项目 :国家重点基础研究发展规划项目(国家“ 973 ”研究项目 X 批准号 2001GB5102)、大连大学博士启动基金项目和科技发展基金项目。

一步分为颗粒填充毛细管电色谱柱和连续床层毛细管电色谱柱(也称毛细管电色谱整体柱)。整体柱又包括以聚合物整体柱、硅胶整体柱和以填充柱为基础的柱,它们是近年研究的重点。本文即对各类柱的制备方法、优缺点及其应用加以综述。

1 毛细管电色谱开管柱

毛细管电色谱开管柱主要通过涂布^[11-14]、键合^[15-20]和溶胶-凝胶^[21-23]等方法在柱内壁制备薄层固定相。它的制备关键是如何通过增大表面积来增大柱容量。开管柱的优点是制备过程简单、柱效高,但相对于填充柱,其相比低、柱容量小、检测灵敏度低。

1.1 涂布法

涂布法过程较简单。通常是将熔融硅胶毛细管在高温和氢气流条件下处理 2 h,然后通过静态方法使待涂溶液在毛细管内壁形成薄膜,最后将其固化。Pfeffer 等^[11]在 20 世纪 90 年代初即开展了这项工作;此后 Tan 等^[12]又通过在毛细管内壁键合线性聚合物,使硅羟基部分露出,增加了电渗流,因而扩大了应用范围。近年来有人在毛细管内壁涂布无机氧化物,如锆镁复合氧化物^[13]和氧化钛^[14]等,分离了碱性物^[13]、无机阴离子、中性化合物和肽^[14]。

1.2 键合法

键合法通常分为两类。一是先对易刻蚀的钠或硼玻璃柱内壁进行刻蚀,再键合上相应的固定相^[15-17]。二是先在内壁上键合一层多孔硅胶,即四乙氧基硅烷、乙醇、盐酸或氨水以一定比例混合,通过水解、缩聚反应,与毛细管内壁上的硅羟基相连,再在硅胶上引入其他官能团^[18-20]。键合法制柱可提高相比,但是制作步骤多,时间长。

1.3 溶胶-凝胶法

溶胶-凝胶法通过溶胶-凝胶技术在毛细管内壁形成一层含官能团的多孔硅玻璃膜,将固定相直接嵌入玻璃介质中。它的基本原理和制柱过程与键合法中的第二类相似,只是在制备多孔硅胶中先加入带有固定相基团的三乙氧基硅烷,使硅胶和固定相键合一步完成。该法既简化了制备过程又有效地提高了相比,故经常被采用。但由于必须加入带有固定相基团的三乙氧基硅烷,因而限制了固定相的选择。最近 Zeng 等^[23]用该法制备了大环多胺开管毛细管电色谱柱,并成功地分离了苯胺类化合物。

2 毛细管电色谱填充柱

毛细管电色谱填充柱即是将粒度为 1~5 μm (最常用的为 3 μm)的固体填充料填入石英毛细管

中。毛细管电色谱固定相有反相正构烷烃固定相(如 C_4 、 C_8 、 C_{12} 和 C_{18} 等)、两性固定相(如 CN、PH 等)、正相固定相(如 SI 等)、离子交换固定相(如 WAX、SCX、WCX 和 SAX 等)、手性固定相(如环糊精手性及生物手性等),这些固定相目前已经商品化。另外还有混合固定相^[24]、纤维素基质固定相^[25]等。由于有多种固定相可供选择,因而极大地增加了毛细管电色谱的分离选择性,拓宽了它的应用范围。但由于将固体颗粒封于毛细管内需要制备塞子,而塞子的制备很困难,重现性也难保证,同时塞子又被认为是导致柱内产生气泡的主要原因,因此使毛细管电色谱填充柱的使用受到了限制。

毛细管电色谱填充柱的制备方法主要有匀浆法^[26-27]、拉伸法^[28]和电动填充法^[29,30]。

2.1 匀浆法

匀浆法是目前常用的方法。用它制备色谱柱的过程是首先在毛细管的一端用硅胶颗粒烧结初始塞子。然后将填料与一定体积的有机溶剂混合成匀浆,在压力作用下将填料装入毛细管中。达到所需长度后,将有机溶剂换成水冲洗一段时间,直接烧结固定相制备末端塞子。接着将装好的毛细管柱倒接至泵上,重新烧结初始塞子以保证两个塞子尽量一致。高压冲出空管中多余的填料。该方法的优点是操作简单、设备要求低。但对于小颗粒填料或过长的色谱柱,由于其反压大,不易填充。

无论用哪一种方法制柱,均需要在柱末端(通常是在靠近第二个塞子的地方)开一个检测窗口。检测窗口的制备方法有一定的技术难度。一般可采用加热钳子、加热电阻丝或微火焰直接将毛细管外涂层烧掉;用十分锋利的刀片将毛细管外涂层刮掉;在毛细管上欲制窗口处滴 1 小滴浓硫酸,然后用环型电阻丝微热等方法。后一种方法可以克服前面方法的不足,值得提倡。

2.2 拉伸法

拉伸法是将硅胶先装入到大内径的毛细管中,再用玻璃拉伸仪于高温下将其拉至所需内径。该方法的优点是无塞子,免去了塞子的影响;但高温拉伸时均匀性难以控制,且会破坏填料的键合基团,需先填硅胶后衍生,所以应用较少。

2.3 电动填充法

电动填充法是在装填时用高压电源代替高压泵,在毛细管柱两端加高电压,利用固定相本身的电泳力来进行装填。在装填过程中,可以通过调节高压电电压的高低来控制装填速度。同时,为使匀浆罐中的匀浆均匀分散,不发生沉淀,匀浆罐要一直处于振荡状态(使匀浆罐与一振荡器相连)。装填至

所需长度后,关闭高压电,取下柱,其余步骤与匀浆法相同。该方法的优点是填充均匀,一次可填多根,并且由于没有反压,可以填充更长的色谱柱,因此既可以提高制柱效率,又可以保证柱的重复性。柱性能的研究结果已经充分证明了这一点^[30]。

You 等^[31-33]用此方法已填充了多种固定相毛细管电色谱柱,并对 C₁₈、CN、SI 等固定相的色谱柱进行了机理考察。

3 毛细管电色谱整体柱

毛细管电色谱整体柱(monolithic column),又称棒柱(rod)、连续床(continuous bed)、无塞柱(fritless column)。它是将单体、引发剂、致孔剂、交联剂、电渗流产生剂等的混合液(或悬浊液)灌入毛细管中,在一定温度条件下通过原位聚合形成一个棒状整体。具有制备方法简单,内部结构均匀,通透性、重现性好,柱效高,固定相表面易于改性,无需制备塞子和可进行快速分离等优点,近几年发展迅速。

毛细管电色谱整体柱主要有聚合物整体柱、二氧化硅整体柱和以填充柱为基础的整体柱。

3.1 聚合物整体柱

在制备聚合物整体柱时,通常先采用双官能团试剂——甲基丙烯酸-3-(三甲氧硅烷)丙酯对毛细管内壁进行处理,其甲氧基与毛细管内壁的硅羟基反应,双键留在外面,单体在柱内聚合时,双官能团试剂的双键同时也参与了聚合,从而间接地实现了整体固定相与毛细管管壁的键合。聚合时大多使用脂肪醇、环己醇、聚环氧乙烷作为致孔剂,引发剂则通常采用偶氮二异丁腈、过硫酸铵、过氧化甲酰。如所制备的整体柱在毛细管电色谱模式下使用,为使色谱柱在电场下产生稳定的电渗流,一般需在聚合物中引入 2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸(AMPS)、丙烯酸或乙烯磺酸等含有可解离基团的单体。

3.1.1 聚丙烯酰胺类整体柱

该类整体柱采用的功能单体有丙烯酰胺、*N*-异丙基丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、甲基丙烯酸丁酯、*N*-烯丙基二甲胺,交联剂则为二丙烯酰吡嗪、亚甲基二丙烯酰胺(BIS)^[34-41]。Fujimoto 等^[34]将丙烯酰胺、BIS、AMPS 在毛细管柱内聚合,在毛细管电色谱模式下,乙酰苯的柱效达 150 000 塔板/m;他认为该种整体柱的主要分离机理为筛分而非溶质与固定相之间的相互作用。之后,Fujimoto 等^[38]又采用疏水性较强的 *N*-异丙基丙烯酰胺替代丙烯酰胺,柱性能有所改善。聚合物凝胶作为固定相分离疏水化合物显现出一些反相色谱的性质,同最初的聚丙烯酰胺

凝胶相比,体积排阻不再是唯一的分离机理,溶质与整体固定相的疏水相互作用也有助于分离。

人们一直通过选择合适的单体、溶剂等使这类整体柱具有特殊的用途。Fréchet 等^[35]将二甲基亚砷和脂肪醇作为反应物的溶剂,采用 BIS、丙烯酰胺、丙烯酸丁酯在柱内制成疏水相互作用色谱柱,该柱可在 3 min 内分离 5 种蛋白质。Ueno 等^[40]将烯丙基氨基甲酰化的 β -环糊精(β -CD)与固定相键合制成手性固定相,在毛细管电色谱模式下分别拆分酸性和中性对映体。Hoegger 等^[41]用该类混合模式柱分析了氨基酸和多肽。

3.1.2 聚苯乙烯类整体柱

该类整体柱可供使用的单体种类较少,目前所使用的单体仅为苯乙烯、氯甲基苯乙烯、二乙烯基苯^[42-46]。采用氯甲基苯乙烯作为反应单体聚合后,氯甲基与十八烷基二甲基胺反应,进而实现在固定相中引入季胺基团,可在离子交换模式下使用。Horváth 等^[46]尝试在该类柱上分离多肽,其分离机理是基于电渗流、色谱保留、肽在电场中的迁移这三者的共同作用。Xiong 等^[47]以苯乙烯、二乙烯基苯、甲基丙烯酸为单体和交联剂,以甲苯为制孔剂一步合成制备了苯乙烯、二乙烯基苯整体柱。Jin 等^[48]在此基础上选用甲苯-异辛烷为制孔剂,发展了快速合成这类柱的新方法。

3.1.3 聚甲基丙烯酸酯类整体柱

该类柱可采用多种功能材料作单体以增加色谱固定相的选择性。常采用的功能单体有甲基丙烯酸酯、AMPS、甲基丙烯酸缩水甘油酯、*N*-烯丙基二甲胺,交联剂为乙叉二甲基丙烯酸酯^[49-55]。该类柱在 pH 2 至 12 范围内均具有良好的稳定性。

Peters 等^[49]将甲基丙烯酸丁酯作为功能单体聚合后,首次实现了在电渗流驱动体积排阻色谱模式下分离相对分子质量为 1 000 000 的聚苯乙烯。他还选择含有手性选择基的单体制备整体固定相,制成手性连续床,实现了在毛细管电色谱模式下拆分手性化合物^[50]。

将甲基丙烯酸缩水甘油酯作为功能单体聚合后,缩水甘油酯中的环氧基团与二乙胺反应生成 1-*N,N*-二乙胺基-2-羟基丙基官能团^[51-53,55],该固定相在离子交换色谱模式下可用于蛋白质和低聚核苷酸的分离。

最近,Fu 等^[56,57]制备了混合模式的整体柱及两性电荷型整体柱,成功地分离了碱性药物和苯胺类化合物。

3.1.4 分子印迹整体柱

分子印迹是合成对印迹分子具有预定分子识别

能力的聚合物的一种方法,近年来受到了越来越多的关注,其有望在外消旋体的拆分、基底选择性催化、人工抗体合成等方面获得应用。特别是1997年大孔印迹整体柱的出现^[58-60],使得该技术得以应用于毛细管电色谱。分子印迹整体柱的柱效一般不高,因而寻找新型交联剂,提高分子印迹聚合物孔径的均匀性,以获得较高的柱效将是其今后研究的主要方向。

3.2 硅胶整体柱

硅胶整体柱的制备方法通常采用溶胶-凝胶法。将四烷氧基硅烷、聚环氧乙烷及催化剂在柱内水解缩聚成凝胶,经干燥、老化,制成硅胶整体柱。其可直接作为固定相或再进行衍生化,Tanaka等^[61-65]在这方面做了大量的工作。该方法制成的色谱填料具有两种孔结构,分别为 μm 级的通孔(through-pore)和nm级的中孔(mesopore)。通孔的存在使得硅胶整体柱具有优异的渗透性。改变反应物组成的比例,可独立控制通孔和中孔的孔径。不同的反应条件可使硅胶整体柱分别具有颗粒聚集型结构^[61]和网络结构^[65]。由于硅胶为紫外透明体,因此该类柱可以直接采用柱内检测。有关硅胶类整体柱的制备国外已有综述文章^[66]发表。

最近硅胶类整体柱的制备又有新进展。Toyo 'oka等^[67-69]发展了温和反应条件下的溶胶-凝胶技术,制备了蛋白质包埋的硅胶整体柱。Dulay等^[70]在365 nm紫外线照射下,在毛细管中一步原位合成了多孔硅胶连续床。此柱表现出反相色谱的特性,可用于低相对分子质量中性化合物的分离分析。El Rassi等开展了大量的相关工作,制备了含有羟基和氟基等键合基团的硅胶整体柱,成功地分离了中性及带电化合物^[71]、核酸等天然极性成分^[72]以及蛋白质^[73]。

3.3 以填充柱为基础的整体柱

以填充柱为基础连续床层柱的制备方法一是先将固体填料填充到毛细管中,再将聚合反应物注入毛细管柱中,通过溶胶-凝胶技术^[74-78]、聚合^[79]或高温烧结^[80]形成连续床色谱柱;二是将固体填充料先与制备连续床的反应物混合均匀,形成悬浮液,装入毛细管中,再经热处理形成连续床^[81]。

Zare等^[74]和Ratnayake等^[77]在聚乙氧硅烷、乙醇、盐酸等反应物中加入5或3 μm 的ODS固定相,超声后ODS颗粒与反应物形成悬浮液,将悬浮液装入75 μm i. d.的毛细管中,热处理后形成整体连续床。存在于连续床中的ODS颗粒可减少床层因内部压力差异而引起的裂缝。使用3 μm ODS的柱效比使用5 μm ODS的柱效高。该类柱渗透性

好,但不易实现ODS颗粒在连续床内的均匀分布。

为了使整体固定相在较宽的pH范围内具有相对恒定的电渗流,Tang等^[78]在ODS/SCX混合填充柱中注入硅溶胶,经超临界CO₂干燥后形成整体柱。该柱在pH 2~9下电渗流均保持恒定。

Chirica等^[79]在ODS填充柱中注入单体及致孔剂混合物,单体聚合后形成连续整体,有机基底将填料颗粒固定,从而无需封口。因在反应单体中含有AMPS,故可通过调节AMPS的含量对电渗流进行精确的调控。

烧结法是将普通的硅胶柱进行热处理,使硅胶填料表面熔融,相互连结,进而形成连续床^[81]。Horváth等^[80]采用匀浆法制成6 μm ODS填充柱,经过一系列处理后分别在120 $^{\circ}\text{C}$ 和360 $^{\circ}\text{C}$ 下进行热处理,填料表面因熔融而相互连结在一起,然后键合C₁₈。与普通填充柱相比,该方法制成的整体柱的机械强度、稳定性都得到改善。分别在毛细管电色谱和微柱液相色谱模式下对柱效进行了考察,其柱效与普通填充柱的柱效接近。但该方法仍需繁琐的填料装填过程,并且高温烧结破坏了已键合的C₁₈固定相,需重新键合固定相,与溶胶-凝胶法相比,这种色谱柱制备相对复杂,因此报道不多。

毛细管电色谱整体柱也有其缺点。对于聚合物整体柱,其溶胀效应使固定相的稳定性和机械性能受到负面影响。此外,在制备聚合物整体固定相时,很难获得孔径分布非常均一的连续床,小孔的存在会影响柱效和色谱峰不对称度,因此小分子化合物很难得到较高的柱效。同传统的填料相比,聚合物的比表面积较小,从而导致其柱容量较低。

4 小结

毛细管电色谱柱的制备是近年来发展起来的新型技术,它对毛细管电色谱这一分离方法的发展具有举足轻重的作用。上述每种制备技术各有优势,目前正被逐渐完善并进入应用领域。毛细管电色谱开管柱在生物样品的分离^[16,17]、手性体的拆分^[82-83]等方面获得了应用。毛细管电色谱填充柱在环境样品如除草剂^[84]、农药^[85]、炸药^[86],生物样品如肽^[87]、核苷^[88]、糖^[89],食品^[90,91],特别是药物如酸性药品^[92-94]及碱性药品^[95,96]等的分离中发挥了巨大作用。毛细管电色谱整体柱在反相色谱^[37-39,42,49,50,62,65]、离子交换色谱^[36,43,51,53,57,97]、疏水作用色谱^[35,82]、亲和色谱^[98]、体积排阻色谱^[42,49]中获得了应用,且成功分离了肽^[41,44,51,54]、蛋白质^[35,36,44,57,82]、类固醇^[38]、芳烃^[37,62,65]、聚合物^[45,46,49]、低聚核苷酸^[45,53]、氨基酸^[41]等物质。由

于毛细管电色谱整体柱中孔结构可直接控制,因而在生物大分子的分离中具有一定的优势。近两年,国外已有关于毛细管电色谱整体柱的综述文章^[99,100]发表,对整体柱的发展与应用有较详细的介绍。随着柱制备技术的不断改进,毛细管电色谱法将会有更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Tsuda T. *Anal Chem*, 1987, 59(3):521
- [2] Ettre L S. *Chromatographia*, 2000, 51(1-2):7
- [3] Zou Hanfa, Liu Zhen, Ye Mingliang, Zhang Yukui. *Capillary Electrochromatography and Its Application*. Beijing: Science Press (邹汉法, 刘震, 叶明亮, 张玉奎. 毛细管电色谱及其应用. 北京: 科学出版社), 2001. 165
- [4] Krull I S, Stevenson R L, Mistry K, Swartz M E. *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography*. New York: HNB Publishing, 2000
- [5] Kang J, Wistuba D, Schurig V. *Electrophoresis*, 2002, 23(22-23):4005
- [6] Bedair M, El Rassi Z. *Electrophoresis*, 2004, 25(23-24):4110
- [7] Liu Z, Wu R A, Zou H F. *Electrophoresis*, 2002, 23(22-23):3954
- [8] Dermaux A, Sandra P. *Electrophoresis*, 1999, 20(15-16):3027
- [9] Dabek-Zlotorzynska E, Aranda-Rodriguez R, Keppel-Jones K. *Electrophoresis*, 2001, 22(19):4262
- [10] Colón L A, Burgos G, Maloney T D, Cintrón J M, Rodríguez R L. *Electrophoresis*, 2000, 21(18):3965
- [11] Pfeffer W D, Yeung E S. *Anal Chem*, 1990, 62(20):2178
- [12] Tan Z J, Remcho V T. *Anal Chem*, 1997, 69(4):581
- [13] Xie M J, Feng Y Q, Da S L, Meng D Y, Ren L W. *Anal Chim Acta*, 2001, 428(2):255
- [14] Fujimoto C. *Electrophoresis*, 2002, 23(17):2929
- [15] Pesek J J, Matyska M T. *J Chromatogr A*, 1996, 736:255
- [16] Huang X, Zhang J, Horvath C. *J Chromatogr A*, 1999, 858:91
- [17] Pesek J J, Matyska M T, Cho S J. *J Chromatogr A*, 1999, 845:237
- [18] Tock P P H, Boshoven C, Poppe H, Kraak J C, Unger K K. *J Chromatogr*, 1989, 477:95
- [19] Crego A L, Diez-Masa J C, Dabrio M V. *Anal Chem*, 1993, 65(11):1615
- [20] Crego A L, Dabrio M V, Diez-Masa J C. *J Chromatogr A*, 1994, 659:255
- [21] Ye Mingliang, Zou Hanfa, Liu Zhen, Ni Jianyi, Zhuang Qianyi, Zhang Yukui. *Chinese Journal of Chromatography* (叶明亮, 邹汉法, 刘震, 倪坚毅, 庄谦义, 张玉奎. 色谱), 1999, 17(2):142
- [22] Rodriguez S, Colo L A. *Anal Chim Acta*, 1999, 397(1-2):207
- [23] Wang Yuanchao, Zeng Zhaorui, Guan Na, Fu Enqin, Cheng Jieke. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (王园朝, 曾昭睿, 管娜, 傅恩琴, 程介克. 分析化学), 2002, 30(2):227
- [24] Zhang L H, Zhang Y K, Shi W, Zou H F. *J High Resol Chromatogr*, 1999, 22(12):666
- [25] Maruska A, Pyell U. *J Chromatogr A*, 1997, 782:167
- [26] Boughtflower R J, Underwood T, Paterson C J. *Chromatographia*, 1995, 40(5-6):329
- [27] Shi Wei, Zhang Lihua, Dong Lifu, Zou Hanfa, Zhang Yukui. *Chinese Journal of Chromatography* (施维, 张丽华, 董礼孚, 邹汉法, 张玉奎. 色谱), 1997, 15(3):201
- [28] Tsuda T, Tanaka I, Nakagawa G. *Anal Chem*, 1984, 56(8):1249
- [29] Yan C. *USP* 5453163, 1993
- [30] Li Zhixue, You Huiyan, Hu Sanhe, Wei Wei, Luo Guoan. *Chinese Journal of Chromatography* (李志学, 尤慧艳, 胡三河, 魏伟, 罗国安. 色谱), 1997, 15(1):67
- [31] You Huiyan, Zhang Weibing, Yan Chao, Zhang Yukui. *Chinese Journal of Chromatography* (尤慧艳, 张维冰, 阎超, 张玉奎. 色谱), 2002, 20(3):237
- [32] You Huiyan, Zhang Weibing, Zhang Yukui. *Chinese Journal of Chromatography* (尤慧艳, 张维冰, 张玉奎. 色谱), 2003, 21(2):102
- [33] You H Y, Zhang W B, Zhang Y K. *Chromatographia*, 2003, 58(5/6):317
- [34] Fujimoto C, Kino J, Sawada H. *J Chromatogr A*, 1995, 716:107
- [35] Xie S F, Svec F, Fréchet J M J. *J Chromatogr A*, 1997, 775:65
- [36] Hjertén S, Mohammad J, Nakazato K. *J Chromatogr A*, 1993, 646:121
- [37] Ericson C, Liao J L, Nakazato K, Hjertén S. *J Chromatogr A*, 1997, 767:33
- [38] Fujimoto C, Fujise Y, Matsuzawa E. *Anal Chem*, 1996, 68(17):2753
- [39] Liao J L, Chen N, Ericson C, Hjertén S. *Anal Chem*, 1996, 68(19):3468
- [40] Koide T, Ueno K. *J High Resol Chromatogr*, 2000, 23(1):59
- [41] Hoegger D, Freitag R. *J Chromatogr A*, 2003, 1004:195
- [42] Wang Q C, Svec F, Fréchet J M J. *Anal Chem*, 1993, 65(17):2243
- [43] Seubert A, Klingenberg A. *J Chromatogr A*, 1997, 782:149
- [44] Moore R E, Licklider L, Schumann D, Lee T D. *Anal Chem*, 1998, 70(23):4879
- [45] Petro M, Svec F, Gitsov I, Fréchet J M J. *Anal Chem*, 1996, 68(2):315
- [46] Gusev I, Huang X, Horváth C. *J Chromatogr A*, 1999, 855:273
- [47] Xiong B H, Zhang L H, Zhang Y K, Zou H F, Wang J D. *J High Resol Chromatogr*, 2000, 23(1):67
- [48] Jin W H, Fu H J, Huang X D, Xiao H, Zou H F. *Electrophoresis*, 2003, 24(18):3172
- [49] Peters E C, Petro M, Svec F, Fréchet J M J. *Anal Chem*, 1998, 70(11):2296
- [50] Peters E C, Lewandowski K, Petro M, Svec F, Fréchet J M J. *Anal Commun*, 1998, 35(3):83
- [51] Sykora D, Svec F, Fréchet J M J. *J Chromatogr A*, 1999, 852:297
- [52] Mihelic I, Koloini T, Podgornik A, Strancar A. *J High Resol Chromatogr*, 2000, 23(1):39
- [53] Podgornik A, Barut M, Jancar J, Strancar A. *J Chromatogr A*, 1999, 848:51
- [54] Yu C, Svec F, Fréchet J M J. *Electrophoresis*, 2000, 21(1):120
- [55] Svec F, Fréchet J M J. *J Chromatogr A*, 1995, 702:89

- [56] Fu H J , Xie C H , Xiao H , Dong J , Hu J W , Zou H F . J Chromatogr A , 2004 , 1 044 : 237
- [57] Fu H J , Xie C H , Dong J , Huang X D , Zou H F . Anal Chem , 2004 , 76(16) : 4 866
- [58] Schweitz L , Andersson L I , Nilsson S . Anal Chem , 1997 , 69(6) : 1179
- [59] Takeuchi T , Matsui J . J High Resol Chromatogr , 2000 , 23 (1) : 44
- [60] Schweitz L , Andersson L I , Nilsson S . J Chromatogr A , 1997 , 792 : 401
- [61] Tanaka N , Nogayama H , Kobayashi H , Ikgami T , Hosoya K . J High Resol Chromatogr , 2000 , 23(1) : 111
- [62] Minakuchi H , Nakanishi K , Soga N , Ishizuka N , Tanaka N . Anal Chem , 1996 , 68(19) : 3 498
- [63] Minakuchi H , Nakanishi K , Soga N , Ishizuka N , Tanaka N . J Chromatogr A , 1998 , 797 : 121
- [64] Minakuchi H , Ishizuka N , Nakanishi K , Soga N , Tanaka N . J Chromatogr A , 1998 , 828 : 83
- [65] Minakuchi H , Nakanishi K , Soga N , Ishizuka N , Tanaka N . J Chromatogr A , 1997 , 762 : 135
- [66] Allen D , El Rassi Z . Electrophoresis , 2003 , 24(22-23) : 3 962
- [67] Kato M , Sakai-Kato K , Toyo 'oka T , Dulay M T , Quirino J P , Bennett B D , Zare R N . J Chromatogr A , 2002 , 961 : 45
- [68] Kato M , Matsumoto N , Sakai-Kato K , Toyo 'oka T . J Pharmaceut Biomed Anal , 2003 , 30 : 1 845
- [69] Sakai-Kato K , Kato M , Nakakuki H , Toyo 'oka T . J Pharmaceut Biomed Anal , 2003 , 31 : 299
- [70] Dulay M T , Quirino J P , Bennett B D , Zare R N . Sep Sci , 2002 , 25(1-2) : 3
- [71] Allen D , El Rassi Z . Electrophoresis , 2003 , 24(3) : 408
- [72] Allen D , El Rassi Z . J Chromatogr A , 2004 , 1 029 : 239
- [73] Bedair M , El Rassi Z . J Chromatogr A , 2003 , 1 013 : 47
- [74] Dulay M T , Kulkarni R P , Zare R N . Anal Chem , 1998 , 70 (23) : 5 103
- [75] Chirica G , Remcho V T . Electrophoresis , 1999 , 20(1) : 50
- [76] Tang Q L , Xin B M , Lee M L . J Chromatogr A , 1999 , 837 : 35
- [77] Ratnayake C K , Oh C S , Henry M P . J High Resol Chromatogr , 2000 , 23(1) : 81
- [78] Tang Q L , Lee M L . J Chromatogr A , 2000 , 887 : 265
- [79] Chirica G S , Remcho R T . Anal Chem , 2000 , 72(15) : 3 605
- [80] Asiaie R , Huang X , Farnan D , Horváth C . J Chromatogr A , 1998 , 806 : 251
- [81] Cabrera K , Lubda D . J High Resol Chromatogr , 2000 , 23 (1) : 93
- [82] Hofstetter H , Hofstetter O , Schurig V . J Microcolumn Sep , 1998 , 10(3) : 287
- [83] Liu Z , Zou H F , Ye M L , Ni J Y , Zhang Y K . Electrophoresis , 1999 , 20(14) : 2 891
- [84] Lopez-Avila V , Benedicto J , Yan C . J Chromatogr Sci , 1999 , 37(5) : 165
- [85] Mayer M , Rapp E , Marck C , Bruin G J M . Electrophoresis , 1999 , 20(1) : 43
- [86] Bailey C G , Yan C . Anal Chem , 1998 , 70(15) : 3 275
- [87] Ye M L , Zou H F , Liu Z , Ni J Y . J Chromatogr A , 2000 , 869 : 385
- [88] Helboe T , Hansen S H . J Chromatogr A , 1999 , 836 : 315
- [89] Suzuki S , Yamamoto M , Kuwahara Y , Makiura K , Honda S . Electrophoresis , 1998 , 19(15) : 2 682
- [90] Sander L C , Pursch M , Marker B , Wise S A . Anal Chem , 1999 , 71(16) : 3 477
- [91] Dermaux A , Sandra P , Ferraz V . Electrophoresis , 1999 , 20(1) : 74
- [92] Euerby M R , Johnson C M , Bartle K D . LC-GC , 1998 , 15 : 387
- [93] Altria K D , Smith N W , Turnbull C H . J Chromatogr B , 1998 , 717 : 341
- [94] Robson M M , Gikalo M G , Myers P , Euerby M R , Bartle K D . J Microcolumn Sep , 1997 , 9(5) : 357
- [95] Gillott N C , Barrett D A , Shaw P N , Euerby M R , Johnson C M . Anal Commun , 1998 , 35(7) : 217
- [96] Wei W , Luo G A , Hua G Y , Yan C . J Chromatogr A , 1998 , 817 : 65
- [97] Bedair M , El Rassi Z . J Chromatogr A , 2003 , 1 013 : 35
- [98] Bedair M , El Rassi Z . J Chromatogr A , 2004 , 1 044 : 177
- [99] Legido-Quigley C , Marlin N D , Melin V , Manz A , Smith N W . Electrophoresis , 2003 , 24(6) : 917
- [100] Hilder E F , Svec F , Fréchet J M J . J Chromatogr A , 2004 , 1 044 : 3

书 讯

《毛细管电色谱及其在生命科学中的应用》

作者:罗国安 估价 50 元 出版单位:科学出版社 出版日期:2005 年 9 月

毛细管电色谱是近年发展起来的一种新型微分离分析技术,它整合了毛细管电泳与微径柱液相色谱的优点,通过在填充微细颗粒液相色谱填料的微径柱两端施加直流高压电场,达到其对痕量复杂生物及化学体系样品优越的分离能力。本书是作者及其研究生近年来从事毛细管电色谱领域研究工作的积累和总结,介绍了毛细管电色谱基本原理、分离机理和分离行为,加压毛细管电色谱仪的研制,以及一些应用实例。

本书可供大专院校化学、生物等专业的高年级学生及研究生和科研人员参考阅读。

购书者请与科学出版社联系,电话(010)64033515,联系人:黄海。

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

色谱指纹谱用于中药大黄抗肿瘤活性成分的筛选

孔 亮¹, 包永明², 于志远¹, 李 伟¹, 陈学国¹, 胡良海¹, 邹汉法¹

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要 :采用液相色谱-质谱联用方法分析了中药大黄经过 SD 大鼠肝匀浆体外代谢前后的指纹谱中色谱峰面积、保留值的差异。指出 5 种游离型蒽醌化合物在 SD 大鼠肝匀浆体外代谢体系中只有大黄酚发生代谢反应转化为芦荟大黄素。考察了体外代谢条件下,肝匀浆浓度与代谢时间对大黄酚转化及其代谢产物的影响。SD 大鼠体外抗肿瘤试验表明,大黄代谢物对于人宫颈癌(HeLa)细胞的抑制活性略高于其提取物。通过比较芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的活性,并结合大黄酚的体外代谢反应的考察,解释了大黄代谢物对肿瘤细胞活性的抑制率的提高是由大黄酚的代谢产物——芦荟大黄素浓度的增加引起的。

关键词 :高效液相色谱-质谱;大黄;色谱指纹谱;体外代谢;中药;SD 大鼠;肝匀浆

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0470-07

Screening of Antineoplastic Components in *Radix et Rhizoma Rhei* Using Chromatographic Fingerprints

KONG Liang¹, BAO Yongming², YU Zhiyuan¹, LI Wei¹, CHEN Xueguo¹,
HU Lianghai¹, ZOU Hanfa¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract : A new strategy for screening of antineoplastic components in the traditional Chinese medicine of *Radix et Rhizoma Rhei* has been developed using chromatographic fingerprints before and after metabolism by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. The metabolizing method was established based on the *in vitro* metabolism by Sprague-Dawley (SD) rat liver homogenate. By means of the metabolism methods *in vitro*, the antineoplastic activity of the extracts, metabolites and components of *Radix et Rhizoma Rhei* were determined by microculture tetrazolium (MTT) assays *in vitro*. It was observed that the inhibition rate of the crude extract for HeLa cell was increased from 26.7% to 36.2% after 60 min of metabolism. The changes of activities resulted from the changes of components' structures and the bioactive components were discovered simultaneously in view of metabolism by inhibiting rate assay for the components in *Radix et Rhizoma Rhei*. It is concluded that the antineoplastic activity of the crude extract from *Radix et Rhizoma Rhei* was increased after *in vitro* metabolism because the antineoplastic activity of aloe-emodin, the metabolite of chrysophanol, is higher than its parent compounds.

Key words : high performance liquid chromatography-mass spectrometry; *Radix et Rhizoma Rhei*; chromatographic fingerprints; metabolism *in vitro*; traditional Chinese medicine; SD rat; liver homogenate

大黄(*Radix et Rhizoma Rhei*)是我国传统中药之一,有 39 个品种和 2 个变种^[1],已在世界范围内得到广泛应用^[2-5]。通常,大黄是指蓼科植物掌叶 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tan-*

guticum Maxim. Ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale Baill* 的干燥根及根茎,其性寒味苦,归脾、胃、大肠、肝、心包经。临床功能主要是泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经^[6]。

收稿日期 2005-04-10

作者简介:孔 亮,男,副研究员。

通讯联系人:邹汉法,男,研究员,博士生导师,Tel (0411)84379610,E-mail zouhfa@mail.dlptt.ln.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 90209056)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KGCX2-SW-213)。

上世纪60年代,我国学者陈琼华等^[7]初步观察到了大黄中部分有效成分对某些肿瘤的抑制作用,从而引起世人对大黄的深入研究。大黄中的有效化学成分主要是蒽醌类化合物及其衍生物。目前已从大黄中分离出80余种化合物,分为:①蒽醌类化合物。包括游离型蒽醌如大黄酚(chrysophanol)、大黄素(emodin)等。结合型蒽醌类化合物主要有蒽甙,如大黄酚-1-葡萄糖甙(chrysophanol-1-*O*- β -D-glucopyranoside)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖甙(emodin-8-*O*- β -D-glucopyranoside)等;还有双蒽酮甙,如番泻甙(sennoside)A、B、C、D、E、F,是大黄泻下主要有效成分。②多糖类化合物。该类化合物有免疫调节的作用。③鞣质类化合物。主要有没食子酸(gallic acid)等,活性与蒽醌类化合物相反,具有止泻作用。其他还有挥发油、脂肪酸等^[1,8]。

到目前为止,关于大黄的药理活性研究报道较多^[6,9-11],但大多仍停留在动物试验阶段,缺乏分子水平的药理阐述,因而限制了大黄新药效的发现与利用^[12]。国内外在大黄代谢方面的研究报道较少。1986年,孙阳等^[13,14]研究了大黄素、大黄素甲醚和大黄酚在小鼠体内的代谢产物。欧宁等^[15]和蒋心惠等^[16]先后采用比色法和液相色谱法研究了大黄蒽醌类化合物在家兔体内的药代动力学。Liang等^[17]研究了大黄素在家兔体内的药代动力学。Mueller等^[18]以大鼠肝微粒体研究了大黄素与大黄酚的代谢物的基因毒性。Lee等^[19]研究了人体内来自大黄中大黄酸的药代动力学参数。

本文以Sprague-Dawley(SD)大鼠肝匀浆体外代谢方法为平台,以高效液相色谱-二极管阵列检测-质谱(HPLC-DAD-MS)为分析手段,结合抗肿瘤活性药理试验筛选了大黄中的活性成分。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

单味中药大黄购自大连药店;芦荟大黄素(aloe-emodin,纯度>99%)、大黄酚(chrysophanol,纯度>99%)、大黄素甲醚(phycion,纯度>99%)购自中国药品生物制品检定所;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)购自Sigma(St. Louis, USA);乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(分析纯,沈阳化学试剂五厂);其他试剂均为分析纯,纯水经Milli-Q水处理系统(Millipore, USA)纯化。

雄性SD大鼠((300±10)g)购自大连医科大学实验动物中心,实验前大鼠自由进水进食。

1.2 仪器设备

LCMS-2010型液相色谱-质谱联用仪由两台LC10Advp泵及一台SCL-10Avp控制器、SPD-M10Avp DAD、SIL-10Advp自动进样器、LCMS-2010A MS组成(Shimadzu, 日本);V-550紫外-可见分光光度计(Jasco, 日本);C₁₈色谱柱(200 mm × 4.0 mm i. d. 5 μm, 色谱填料均为Kromasil填料, 国家色谱研究分析中心, 中国);C₁₈固相萃取(SPE)柱(500 mg, 5 mL, 40 μm, 固定相为Zeochem, 国家色谱研究分析中心, 中国);DL型固相萃取器及萃取柱(国家色谱研究分析中心, 中国)。

1.3 单味中药样品的制备

准确称取20 g经粉碎(35目)的大黄粉末置于烧瓶内,加入100 mL 95%(体积分数)乙醇浸泡30 min,回流煮沸1 h后将提取液经微孔滤膜(0.45 μm)过滤,得到提取液。将提取液减压挥发除去溶剂,加入30 mL水经超声波振荡10 min后转入分液漏斗中,用30 mL乙醚萃取3次,合并乙醚萃取液,减压蒸馏除去溶剂得到大黄蒽醌类化合物粗提物,再加入50 mL乙醇溶解得到体外代谢指纹分析用样品溶液。

1.4 大鼠肝匀浆的制备

见文献[20]。

1.5 大黄样品在肝匀浆的温孵

体外代谢温孵时,先后准确移取1 mL肝匀浆、1 mL Krebs-Henseleit缓冲液^[21]、130 μL大黄样品溶液混合,使反应体积为2.13 mL。加入辅助因子NADPH,使之在反应体系中的浓度为1 mmol/L。混匀后,放入水浴摇床中于37℃下温孵。温孵60 min后,加入1.07 mL乙腈终止反应。

空白实验中,以1 mL Krebs-Henseleit缓冲液替代肝匀浆。

制备代谢物时,按比例放大肝匀浆代谢体系。

1.6 代谢后的大黄样品的制备

常温下,将上述温孵物以10 000 r/min的速率离心15 min后取上清液。得到各上清溶液后,加入纯水稀释10倍,再加入甲酸(体积分数为0.12%,下同此),最后转至已经活化的C₁₈ SPE柱中进行预处理。

SPE处理步骤:上样后先加入1 mL水淋洗,再加入1.2 mL乙腈淋洗,收集洗脱液。将洗脱液在35℃下减压蒸馏挥去溶剂,再加入1.5 mL乙醇溶解,得到分析样品溶液。

对照实验的样品预处理过程同上进行。

1.7 代谢前后大黄样品的分析条件

色谱指纹谱条件:流动相为乙腈-水(含0.12%

的甲酸)梯度洗脱,乙腈的体积分数在 60 min 内由 30%线性增加到 90%,流速 0.76 mL/min;二极管阵列检测器检测。

HPLC-MS 条件:电离方式为大气压化学电离 (APCI),APCI 温度 400 °C;曲型脱溶剂管 (CDL) 温度 250 °C(+)/200 °C(-);支架温度 200 °C; N_2 流量 2.5 L/min;APCI 电压 4.5 kV(+)/-4.0 kV(-);CDL 电压 -45 V(+)/45 V(-);Q-array 15 V(+)/-15 V(-);Q-array RF 150;检测电压 1.8 kV;扫描速度 1 000;扫描范围 m/z 50~400。

1.8 大黄素与大黄酸的制备

称取 150 g 大黄粉末置于烧瓶内,加入 750 mL 95% (体积分数,下同)乙醇,回流煮沸 1 h 后将提取液经微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤得到提取液。40 °C 下,减压蒸馏挥发除去溶剂,得到提取物。提取物中加入 200 mL 水,超声提取并移至分液漏斗中,用 100 mL 的乙醚萃取 3 次,合并乙醚溶液。然后参考文献 [22] 分离纯化大黄酸与大黄素。制备的大黄酸与大黄素用紫外光谱、质谱鉴定的结果与文献 [23] 报道的结果一致,经色谱峰面积归一化法测定其纯度均大于 97%,可作为对照品。

1.9 大黄乙醇提取物及其代谢物、大黄游离型蒽醌类化合物的抗肿瘤活性试验

按照“1.3”节方法制备大黄提取液后,移取 1 mL 至肝匀浆温孵体系中(肝匀浆与缓冲液加入量按比例放大)进行代谢反应,1 h 后加入乙腈终止反应(乙腈体积占溶液体积的 33%);以“1.6”节方法

处理代谢物,得到代谢后样品并减压蒸馏除去溶剂;精确称量获得的代谢提取物,将其配制成质量浓度为 0.25 g/L 的代谢后大黄样品的 95%乙醇溶液。

为了消除药物与肝匀浆间的相互作用影响,在制备对照样品时,首先将适量大黄乙醇提取液与肝匀浆混匀,然后立即加入乙腈终止反应,按照上述同样的预处理方法得到质量浓度为 0.25 g/L 对照样品的 95%乙醇溶液。其他蒽醌类化合物同上配制成对照样品的 95%乙醇溶液,其质量浓度分别为:芦荟大黄素 0.20 g/L,大黄酸 0.028 g/L,大黄素 0.22 g/L,大黄酚 0.10 g/L,大黄素甲醚 0.053 g/L。

抗肿瘤活性试验:以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 的密度接种人宫颈癌 (HeLa) 细胞于 96 孔板上。培养基中含有不同被测样品,对照组用等体积溶剂代替,每组设 4 个平行孔。细胞培养 48 h 后,每孔中加入 0.02 mL 四氮唑盐 (MTT 5 g/L),于 37 °C 条件下孵育 3~4 h,终止培养,小心吸弃上清液。每孔中再加入 0.1~0.2 mL 二甲基亚砜 (DMSO),振荡 10 min,使结晶物溶解。比色用酶联免疫检测仪在 570 nm 处测定其吸光度。

2 结果与讨论

2.1 大黄的体外代谢指纹谱分析

首先,通过大黄蒽醌类粗提物的体外代谢前后的指纹分析寻找大黄蒽醌类成分在代谢指纹谱中的主要变化。经过 SD 大鼠肝匀浆体外温孵后,大黄蒽醌类提取物代谢前后的色谱指纹谱见图 1。

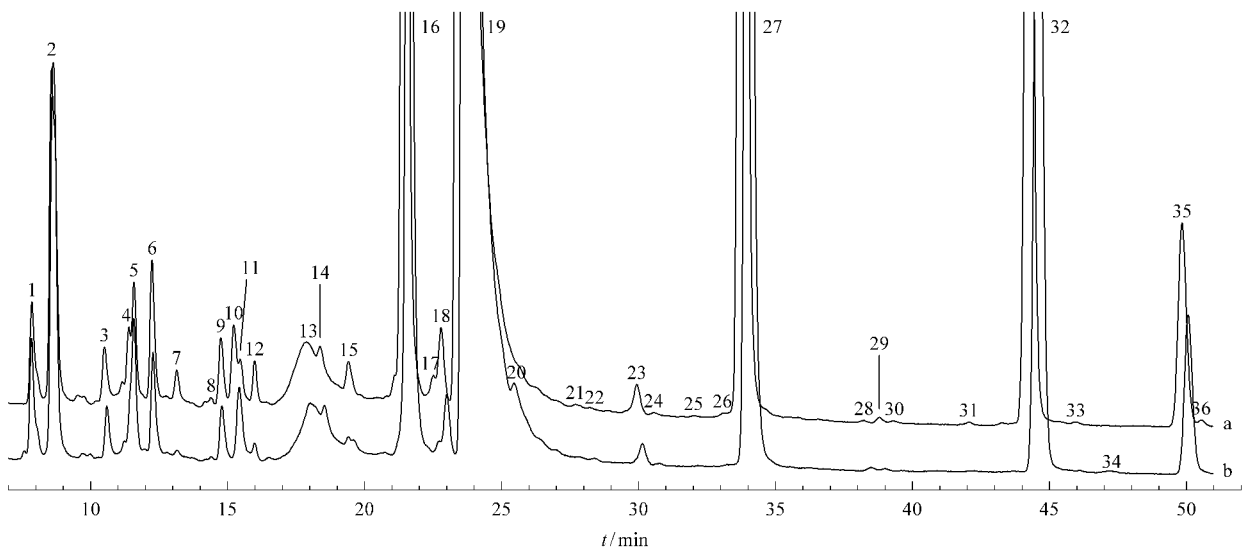


图 1 大黄提取物在体外代谢前 (a) 和代谢后 (b) 的色谱指纹图

Fig. 1 Chromatographic fingerprints for the crude extract of *Radix et Rhizoma Rhei* before (a) and after (b) metabolism

以蒽醌的特征紫外吸收波长 430 nm 为检测波长,大黄蒽醌粗提物在代谢之前的色谱指纹谱中可

以检测到 34 个指纹峰,同样色谱条件下可以在代谢之后的色谱指纹谱中检测到 28 个指纹峰。经谱图

比较可以看出,粗提物谱图中有 8 个指纹峰经代谢后消失,同时在代谢指纹谱中有 2 个新色谱指纹峰出现(见表 1)。为了量化代谢前后色谱指纹谱的变化,采用指纹图谱中描述差异程度的指纹峰总差异率^[24]来表征:

$$\text{指纹峰总差异率} = \frac{\sum(|A_i^b - A_i^a|/A_i^b)}{n} \quad (1)$$

其中 A_i^b 和 A_i^a 分别为代谢前和代谢后经归一化的第 i 个色谱指纹峰的峰面积; n 为色谱指纹峰的个数。

代谢前后色谱峰的重叠率^[21]按式(2)计算:

$$\text{重叠率} = \frac{\text{共有峰数} \times 2}{\text{代谢前峰数} + \text{代谢后峰数}} \times 100\% \quad (2)$$

以公式(1)计算代谢前后谱图指纹峰之间的总差异率为 0.569,而代谢指纹峰的重叠率为 82.0%,表明代谢前后谱图共有峰有很高的重叠性。尽管粗提物在代谢之后有 8 个指纹峰消失,但是由于所消失的色谱峰峰面积较小,对相对峰面积总差异率的贡献有限,因此代谢前后谱图之间的差异率不大。

表 1 大黄提取物经 SD 大鼠肝匀浆体外代谢前后的峰面积比较

Table 1 Comparison of peak areas in fingerprinting chromatograms for the crude extract of *Radix et Rhizoma Rhei* before and after metabolism

Peak No. in Fig. 1	t_R/min	Peak areas		Normalized peak areas		Variance ¹⁾
		before metabolism	after metabolism	before metabolism	after metabolism	
1	7.853	78462	95062	0.005110	0.007878	0.529432
2	8.570	335543	363799	0.021853	0.030150	0.368661
3	10.502	48333	40641	0.003148	0.003368	0.061459
4	11.393	44577	0	0.002903	0	1
5	11.578	89301	120364	0.005816	0.009975	0.701465
6	12.237	107728	78720	0.007016	0.006524	0.077558
7	13.138	34596	6479	0.002253	0.000537	0.763591
8	14.393	6341	2770	0.000413	0.00023	1
9	14.752	50519	42495	0.003290	0.003522	0.061856
10	15.224	65139	0	0.004242	0	1
11	15.458	34153	69110	0.002224	0.005727	1.554434
12	15.985	32661	12642	0.002127	0.001048	0.511383
13	17.883	192508	152715	0.012537	0.012656	0.001418
14	18.379	115556	93791	0.007526	0.007773	0.024593
15	19.414	53550	25732	0.003487	0.002133	0.393408
16	21.45	1843342	1440352	0.120050	0.119369	0.013618
17	22.508	29430	12741	0.001917	0.001056	0.453493
18	22.789	74834	58057	0.004874	0.004811	0.020649
19	23.453	7140492	6027980	0.465032	0.499568	0.065679
20	25.451	0	14560	0	0.001207	
21	27.714	3171	687	0.000207	0.000057	0.726509
22	28.407	885	1955	0.000058	0.000162	
23	29.932	31016	21021	0.002020	0.001742	0.144441
24	30.574	1750	1968	0.000114	0.000163	0.419612
25	31.970	1007	0	0.000066	0	1
26	33.067	3529	0	0.000230	0	1
27	33.783	3389175	2231312	0.220723	0.184920	0.168908
28	38.224	1767	3440	0.000115	0.000285	1.457562
29	38.797	5242	2080	0.000341	0.000172	0.499102
30	39.339	2310	0	0.000150	0	1
31	42.085	2325	0	0.000151	0	1
32	44.243	1276070	955701	0.083105	0.079204	0.044357
33	45.932	1895	0	0.000123	0	1
34	47.269	0	1585	0	0.000131	
35	49.835	250756	188633	0.016331	0.015633	0.050382
36	50.528	6885	0	0.000448	0.007878	1

1) Variance = $|A_i^b - A_i^a|/A_i^b$. A_i^b and A_i^a are normalized peak areas of peak i before and after metabolism respectively.

2.2 大黄中主要游离型蒽醌类成分的鉴定与其在 SD 大鼠肝匀浆中的变化

在图 1 的大黄提取物指纹谱中,通过与标准品

的色谱保留值、紫外光谱、质谱数据的对照,色谱峰 16,19,27,32,35 被依次鉴定为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。

以上述这 5 种单体化合物为原形成分进行肝匀浆体外代谢,其代谢反应前后的色谱图如图 2、图 3 所示。从图 2 中可以看到芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚与大鼠肝匀浆温孵后,均没有新的色谱峰出现,即在肝匀浆体系中没有发生生物转化。而大黄酚经体外代谢后,则产生了一个新的色谱峰

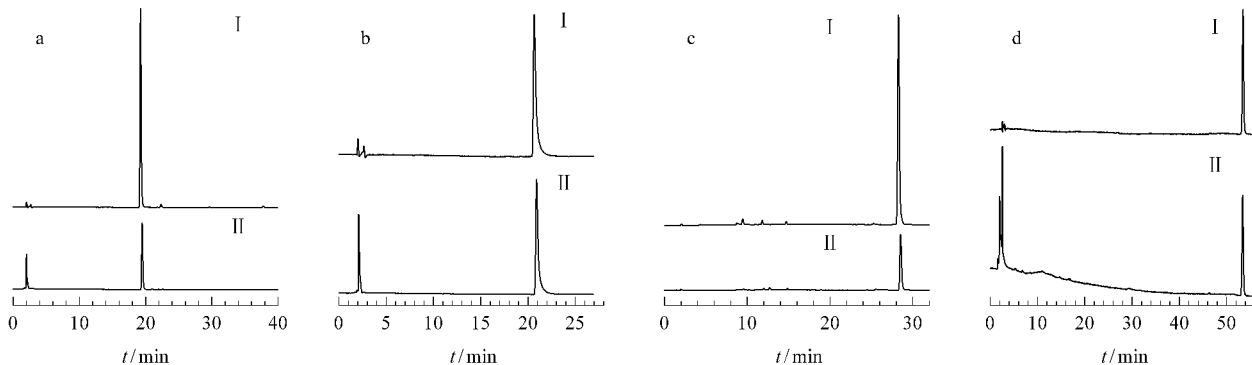


图 2 芦荟大黄素(a)、大黄酸(b)、大黄素(c)和大黄素甲醚(d)在肝匀浆体外代谢前后的色谱图

Fig.2 Chromatograms for aloemodin (a), rhein (b), emodin (c) and physcion (d) before and after liver metabolism I . before metabolism ; II . after metabolism.

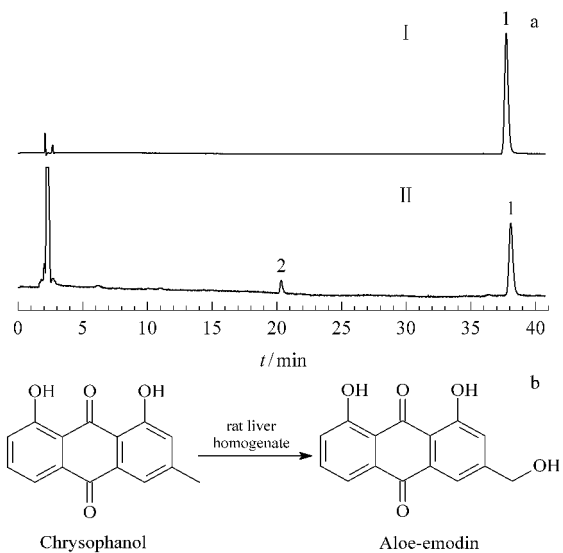


图 3 大黄酚在肝匀浆体外代谢前后的色谱图(a)与 大黄酚生成代谢产物的示意图(b)

Fig.3 Chromatograms of chrysophanol before and after metabolism (a) and proposed scheme (b) for the rat liver homogenate-dependent formation of metabolite of chrysophanol

I . before metabolism ; II . after metabolism. 1. chrysophanol ; 2. aloe-emodin.

2.3 大黄酚在 SD 大鼠肝匀浆中体外代谢特性的考察

由于大黄酚在体外肝匀浆中发生生物转化,生成代谢产物芦荟大黄素,因此有必要对其体外肝匀浆与药物的温孵时间及肝匀浆浓度对代谢原形化合物和代谢物的影响进行考察。大黄酚及其代谢产物芦荟大黄素在 0 ~ 120 min 温孵时间内的代谢变化

(见图 3-a),其保留值、紫外光谱及质谱数据与芦荟大黄素相符,表明在 SD 大鼠肝匀浆的代谢下大黄酚发生甲基羟化反应生成代谢产物芦荟大黄素,这与文献[18]中的报道是一致的。从图 2 中可以看出,大黄酸、大黄素、大黄素甲醚的相对峰面积也有变化,它们的变化与肝匀浆的相互作用有关。

趋势如图 4 所示。

由图 4 可看出,大黄酚随着代谢时间的延长其峰面积不断降低,在 90 min 左右时降低速度减缓而趋于平衡。芦荟大黄素随着代谢时间的延长其峰面积逐渐增加,在 60 min 时达到极值后开始缓慢降低,这可能是因为原形化合物的代谢反应趋于平衡时,代谢产物增长速度低于其与肝匀浆中物质相互作用的速度,因而造成游离的代谢物浓度降低。

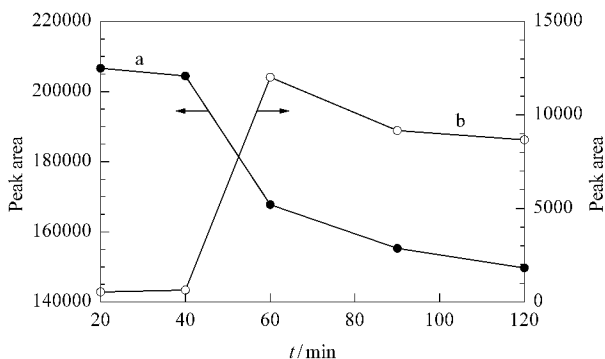


图 4 SD 大鼠肝匀浆温孵时间对大黄酚(a) 及其代谢物芦荟大黄素(b)的影响

Fig.4 Plots of peak area of chrysophanol (a) and its metabolite aloe-emodin (b) vs metabolizing time under continuous incubation of rat liver homogenate

为了验证上述解释,考察了芦荟大黄素与肝匀浆在 37 °C 条件下的吸附曲线。如图 5 所示,在 37 °C 下芦荟大黄素与肝匀浆温孵时发生显著的吸附现象,在 120 min 时,峰面积已经降低了 26.2%。因此图 4-b 中代谢产物在达到极值后的下降是因为芦荟大黄素与肝匀浆间的相互作用引起的,即肝匀浆吸

附代谢产物的速度高于代谢产物生成的速度,最终使游离状态的代谢产物浓度降低。

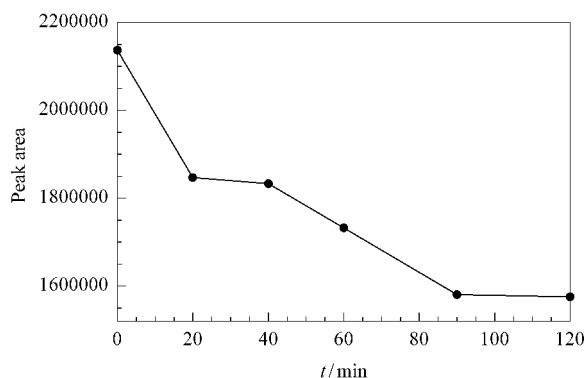


图 5 37 °C 下的 SD 大鼠肝匀浆对芦荟大黄素的吸附曲线
Fig.5 Plot of adsorption isotherm for aloemodin by rat liver homogenate at 37 °C

大黄酚经生物转化发生了典型的羟化代谢反应,可能是肝匀浆中的 P450 酶催化的结果,因此对肝匀浆的浓度对大黄酚与代谢产物的影响进行考察,代谢时间为 60 min,结果如图 6 所示。

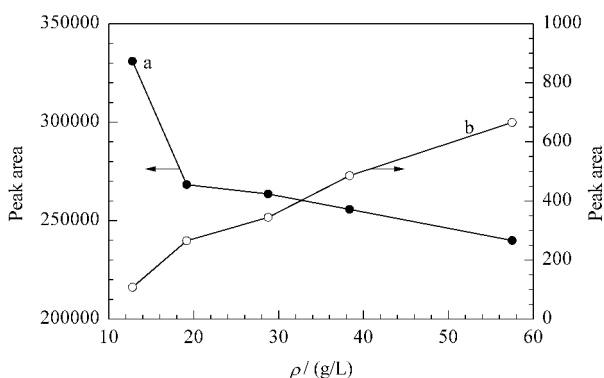


图 6 SD 大鼠肝匀浆浓度对大黄酚(a)及其代谢产物芦荟大黄素(b)的影响

Fig.6 Plots of peak areas of chrysophanol (a) and its metabolite aloemodin (b) vs the concentration of rat liver homogenate

从图 6 中可以看出,大黄酚的峰面积随着肝匀浆质量浓度的增高而减小,在 19 g/L 时,减小趋势变缓,其代谢产物芦荟大黄素的峰面积则随着肝匀浆质量浓度的增高而缓慢增加,在 50 g/L 时增加趋势减缓,而且在大黄酚的代谢物分离谱图中未见有其他新的代谢产物出现,说明肝匀浆质量浓度的提高没有引起大黄酚的体外代谢体系发生质的变化。同时,从图 6 中可以确定体外代谢肝匀浆的质量浓度以 20 ~ 50 g/L 为宜。

2.4 大黄蒽醌类提取物与其代谢物、大黄中主要的蒽醌类单体化合物的抗肿瘤细胞活性

体外细胞水平以及动物水平的药理学研究表明,大黄粗提物、大黄酸和大黄素对黑色素瘤、小鼠乳腺癌、腹水型艾式癌均有较强的抑制作用,芦荟大

黄素对小鼠 P388 白血病也有抑制作用。本节通过采用体外代谢的方法研究药物代谢是否对大黄粗提物的抗肿瘤活性造成影响,并筛选出其中影响粗提物活性的主要有效成分。

在 SD 大鼠肝匀浆体外代谢下,大黄蒽醌类粗提物对 HeLa 细胞活性的抑制率随代谢时间发生变化的变化曲线见图 7,可以看出在 60 min 代谢时间内抑制率由 26.7% 升至 36.2%,其中蒽醌类单体化合物对 HeLa 细胞活性的抑制率见表 2。由表 2 可以看出,同样条件下大黄酸的抑制率最高,为 46.2%;其次是大黄素甲醚和芦荟大黄素,分别为 18.1% 和 15.6%。在代谢过程中,抑制 HeLa 细胞活性较弱的大黄酚因代谢反应转化为活性较高的芦荟大黄素,在 120 min 的代谢时间内,芦荟大黄素与大黄酚的峰面积比由 59.1:40.9 升至 60.1:39.9,使芦荟大黄素在大黄粗提物中的含量提高,从而提高了对 HeLa 细胞活性的抑制率。同“2.3”节所述,大黄粗提物的抑制率在 60 min 后降低(见图 7)与芦荟大黄素被肝匀浆吸附有关。

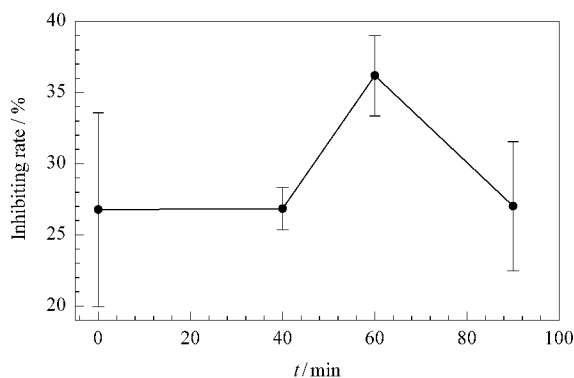


图 7 大黄蒽醌类粗提物对 HeLa 细胞活性的抑制率随代谢时间变化的曲线图(n=6)

Fig.7 Inhibition rate of the crude extract to HeLa cell vs metabolizing time under continuous incubation of rat liver homogenate (n=6)

表 2 大黄中蒽醌类化合物对 HeLa 细胞活性的抑制率(n=6)
Table 2 Inhibition rate of anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei to HeLa cell (n=6) %

Compound	Inhibiting rate	RSD
Aloe-emodin	15.6	3.49
Rhein	46.2	5.53
Emodin	12.0	11.38
Chrysophanol	6.5	11.28
Physcion	18.1	6.74

3 结论

以 SD 大鼠肝匀浆体外代谢方法为快速代谢平台,对单味中药大黄及其主要游离型蒽醌活性成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚进行体外代谢,采用色谱指纹谱分析手段对大黄蒽

醌粗提取物与体外代谢谱图之间的差异及相似性进行比较分析,以抗肿瘤体外试验测定大黄提取物及其代谢物、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的抗肿瘤细胞活性。将体外代谢方法应用于分析抗肿瘤活性在代谢前后的变化,并筛选出了其中的活性化合物,这将对中药的现代化生产具有重要意义。

参考文献:

[1] Xu Xiang , Li Baiping , Zhang Huifen. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine (徐 翔, 郦柏平, 张慧芬. 上海中医药杂志), 2003 , 37(4) : 56

[2] Tsai T H , Chen C F. Asia Pac J Pharmacol , 1992 , 7(1) : 53

[3] Liang J W , Hsiu S L , Huang H C , Lee-Chao P D. J Food Drug Anal , 1993 , 1 : 251

[4] Shangguan Jie. Journal of Chinese Clinical Medicine (上官杰. 中华临床医药), 2003 , 4(3) : 79

[5] Chang L C , Sheu H M , Huang Y S , Tsai T R , Kuo K W. Biochem Pharmacol , 1999 , 58(1) : 49

[6] Yin Jian , Guo Ligong. Modern Study of Traditional Chinese Medicine and Clinical Application. Part I. Beijing : Xue Yuan Press (阴 健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 (I). 北京 : 学苑出版社), 1993. 61

[7] Chen Qionghua , Zhao Yongquan , Li Diandong. Acta Pharmaceutica Sinica (陈琼华, 赵永荃, 李电东. 药学报), 1966 , 13(5) : 363

[8] Li Xiucan. Chinese Pharmaceutical Journal (李秀才. 中国药学报), 1998 , 33(10) : 581

[9] Chen Qionghua. Information on Metallurgical Medicine (陈琼华. 冶金医药情报), 1990 , 7(3) : 88

[10] Zhu Feng , Liu Xinguang , Liang Nianci. Chinese Journal of Cancer (朱 峰, 刘新光, 梁念慈. 癌症), 2003 , 22(4) : 358

[11] Wang H H , Chung J G , Ho C C , Wu L T , Chang S H. Planta Med , 1998 , 64(2) : 176

[12] Huang Zhaosheng , Wang Zongwei. Foreign Medical Sci-

ences : TCM Section (黄兆胜, 王宗伟. 国外医学·中医中药分册), 1997 , 19(5) : 9

[13] Sun Yang , Chen Qionghua. Acta Pharmaceutica Sinica (孙 阳, 陈琼华. 药学报), 1986 , 21(10) : 748

[14] Sun Yang , Chen Qionghua. Acta Biochimica et Biophysica Sinica (孙 阳, 陈琼华. 生物化学与生物物理学报), 1987 , 19(6) : 447

[15] Ou Ning , Gu Jinhua , Dong Qun. Chinese Traditional Patent Medicine (欧 宁, 顾进华, 董 群. 中成药), 1993 , 15(7) : 8

[16] Jiang Xinhui , Zhang Dan , Chen Shujie. Chinese Journal of Chromatography (蒋心惠, 张 丹, 陈淑杰. 色谱), 2003 , 21(3) : 251

[17] Liang J W , Hsiu S L , WU P P , Chao P D L. Planta Med , 1995 , 61(5) : 406

[18] Mueller S O , Stopper H , Dekant W. Drug Metab Dispos , 1998 , 26(6) : 540

[19] Raleigh S M , Wanogho E , Burke M D , Mckeown S R , Patterson L H. Int J Radiat Oncol Biol Phys , 1998 , 42(4) : 763

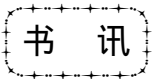
[20] Kong Liang. [PhD Thesis]. Dalian : Dalian Institute of Chemical Physics , The Chinese Academy of Sciences (孔 亮. [博士学位论文]. 大连 : 中国科学院大连化学物理研究所), 2005. 53

[21] Dogterom P. Drug Metab Dispos , 1993 , 21(4) : 699

[22] Shanghai Institute of Materia Medica , CAS. The Separation and Purification of Active Principles in Chinese Herbal Medicine. Shanghai : Shanghai Scientific & Technical Publishers (中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离. 上海 : 上海科学技术出版社), 1983. 329

[23] Hu Jun , Tu Pengfei , Guo Dean , Zheng Junhua. Northwest Pharmaceutical Journal (胡 军, 屠鹏飞, 果德安, 郑俊华. 西北药学杂志), 1997 , 12(4) : 153

[24] Hong Xiaokun , Wang Zhihua. The Digital Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine. Shanghai : Shanghai Scientific & Technical Publishers (洪筱坤, 王智华. 中药数字化色谱指纹谱. 上海 : 上海科学技术出版社), 2003. 66



《 计量置换理论及其应用 》

作者 : 耿信笃 定价 55 元 出版单位 : 科学出版社 出版日期 2004 年 9 月

本书系统地阐述了一种与组分在界面上迁移有关地全新理论——计量置换理论(SDT)及其在化学、化工、生物化学、分子生物学、基因工程、药学等正在发展的高新技术中的应用。全书共计 12 章,涉及 4 个方面的内容:从提出新概念到计量置换模型的建立,再到从理论上推导出液相色谱和物理化学中组分保留机理和吸附机理;SDT 中多种参数的理论推导及应用;在生物大分子中的应用包括蛋白质分子的构相变化,蛋白质折叠,生物大分子的分离与纯化;分离科学中长期存在的难题包括液-固界面热力学、收敛点的表征、RPLC 世界四大难题的解决。本书可供化学、化工、生命科学、药学领域的高年级本科生、研究生、教师及工程师参考。

购书者请与科学出版社联系,电话(010)64033515 联系人:黄海。

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞！

液质联用分析葛根提取物及中药片剂中异黄酮类化合物

田宏哲, 王 华, 关亚凤

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要 :采用反相 C_{18} 毛细管液相色谱柱,以乙腈(含 0.1% (体积分数,下同)三氟乙酸)和水(含 0.1% 三氟乙酸)为流动相梯度洗脱,在 26 min 内分离了葛根异黄酮提取物以及愈风宁心片中的主要成分。采用毛细管液相色谱/四极杆飞行时间串联质谱仪对葛根提取物以及片剂中的几种主要异黄酮类化合物做了结构分析,发现葛根素是主成分(提取物中其平均质量分数是 13.32%;片剂中每片含量 19.28 ~ 24.34 mg)。对微量未知化合物,用它们的离子谱图与已知化合物的谱图比较,推测其成分为 3'-甲氧基葛根素和 3'-甲氧基大豆苷。

关键词 :反相毛细管液相色谱;液相色谱-电喷雾离子质谱;葛根异黄酮;葛根素;中药

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0477-05

Separation and Identification of Isoflavonoids in *Pueraria lobata* Extracts and Its Preparations by Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry

TIAN Hongzhe, WANG Hua, GUAN Yafeng

(Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : Isoflavonoids in *Pueraria lobata* extract and its preparations were separated and identified by reversed-phase capillary liquid chromatography (RP-CapLC) coupled with photodiode array (PDA) detector and negative electrospray ionization quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. The separation was performed on a 150 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μ m C_{18} capillary column, using mobile phase of 0.1% aqueous trifluoroacetic acid solution and acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid under gradient elution. The product ion spectra of the deprotonated ions allowed for the identification of puerarin, daidzin and daidzein in the sample. Puerarin was found to be the most abundant component in the extract (about 13%, mass fraction) and its preparations (19.28 - 24.34 mg per tablet). The structures of trace amount of unknown isoflavonoids were deduced based on the spectra of known compounds. They were proposed to be 3'-methoxypuerarin and 3'-methoxydaidzin.

Key words : reversed-phase capillary liquid chromatography; liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; isoflavonoids of *pueraria lobata*; puerarin; traditional Chinese medicine

野葛(*Pueraria lobata* (willd.) Ohwi)为豆科(Leguminosae)葛属植物,是重要的药用植物之一^[1],其根为常用生药(其中黄酮类化合物的质量分数可达 10% ~ 14%),具有降低血管阻力,改善心、脑血液循环,减慢心率,降低心肌耗氧量等药理作用^[2,3],在肌体抗氧化、退热止汗、治呕吐、防治老年

痴呆症等方面也有治疗作用^[4,5]。葛根中主要异黄酮成分为葛根素(puerarin)、大豆苷(daidzin)、大豆苷元(daidzein)等,据报道这几类化合物都具有药理活性^[6,7]。

目前,对葛根异黄酮提取物的测定方法主要有高效液相色谱法、紫外分光光度法、薄层色谱法以及

收稿日期 2005-05-08

作者简介:田宏哲,女,博士研究生。

通讯联系人:关亚凤,男,研究员,博士生导师,Tel (0411)84379590, E-mail kfguan@mail.dlptt.ln.cn.

基金项目:国家自然科学基金仪器专项基金资助项目(批准号 20227501)、中国科学院大型科学仪器装备支持计划项目和大连化学物理研究所科学创新项目。

毛细管电泳-紫外、荧光或者电化学检测法等^[8-13]。但上述方法无法对提取物中的未知化合物进行定性。液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)已广泛应用于未知化合物的定性分析^[14],尤其近年来发展起来的生物质谱采用软电离和串联质谱技术,可得到很强的分子离子峰以及易于解析的分子碎片峰,从而可确定基团的连接位置,进一步推断化合物的结构。

本文以优化的乙腈-水(含0.1%(体积分数)三氟乙酸)流动相体系,用梯度洗脱模式分离了葛根提取物以及葛根制剂愈风宁心片中的主成分(葛根素、大豆苷、大豆苷元等);同时采用LC-MS-MS对提取物中的异黄酮类化合物进行定性。结果表明,该方法适用于上述活性成分的定性分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

毛细管液相色谱系统:Micro-Tech毛细管液相色谱仪,四元梯度泵,Linear 200 UV-VIS检测器,Chrom-Perfect色谱工作站(Micro-Tech Scientific Inc)。LC-MS联用系统:Waters毛细管液相色谱(CapLC)系统,包括自动进样器、三元高压微流量泵系统、二极管阵列检测器(PDA)、电喷雾-四极杆飞行时间串联质谱仪(ESI-Q-TOF)(Waters公司)和Masslynx质谱工作站。

试剂:乙腈,甲醇(色谱纯,Fluka公司),实验用水为娃哈哈纯净水。乙醇、三氟乙酸、醋酸铵均为分析纯。葛根素、大豆苷元购自中国药品生物制品检定所(含量 $\geq 98\%$)。

1.2 样品的配制

葛根提取物(总异黄酮含量(质量分数) $\geq 40\%$)由西安天诚医药生物工程公司提供。精确称取葛根提取物10 mg,置于10 mL容量瓶中,采用甲醇定容至刻度并摇匀。所有溶液用0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

葛根制剂愈风宁心片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂)供试品溶液的制备:取本品一片(0.28 g/片),除去糖衣,研碎,精密称取0.223 mg,放入5 mL带刻度离心管中,加入5 mL 30%(体积分数,下同)乙醇,超声处理30 min后,冷却,用30%乙醇补足减少的体积。摇匀后,静置1 h,然后离心(3 000 r/min)30 min,取上清液过滤,滤液作为供试品溶液,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3 分析条件

1.3.1 液相色谱条件

C_{18} 毛细管液相色谱柱(150 mm \times 0.32 mm i. d. 5 μm , Micro-Tech Scientific Inc)。流动相 A

为含0.1%(体积分数,下同)三氟乙酸的乙腈溶液,流动相 B 为含0.1%三氟乙酸的水溶液,梯度洗脱:0~30 min,流动相 A 的体积分数由5%到40%;在随后的5 min,流动相 A 的体积分数为95%。在下次分析前用体积分数为100%的流动相 B 平衡10 min,流速8.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。检测波长248 nm,柱温25 $^{\circ}\text{C}$,进样量320 nL。

1.3.2 液质联用分析条件

C_{18} 色谱柱(100 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μm , Waters),流动相 A 为10 mmol/L醋酸铵乙腈溶液,流动相 B 为10 mmol/L醋酸铵水溶液,梯度洗脱:0~30 min,流动相 A 的体积分数由5%到70%,流速4.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。PDA检测波长210~400 nm,柱温25 $^{\circ}\text{C}$,进样量200 nL。

质谱分别采用正、负离子检测模式:正离子模式下毛细管电压3 030 V,锥孔电压30 V。负离子模式下毛细管电压-2 250 V,锥孔电压35 V,扫描范围 m/z 200~800。干燥气为 N_2 ,流量450 L/h,脱溶剂气温度200 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度80 $^{\circ}\text{C}$ 。用氩气作碰撞气进行碰撞诱导裂解(CID),碰撞能量15~35 eV。

2 结果与讨论

2.1 微柱液相色谱分离

葛属植物成分复杂,其中主要活性成分为异黄酮类化合物。目前在葛属植物中已经发现了大约35种异黄酮类化合物^[15],而在葛根提取物中主要存在葛根素、大豆苷、大豆苷元和染料木苷等异黄酮。在甲醇-水体系下,葛根提取物中的主成分葛根素与其他成分难以完全分离^[16]。本文采用乙腈-水体系,分离了葛根提取物中的几种异黄酮(见图1)。葛根提取物中的主成分葛根素(平均质量分数为

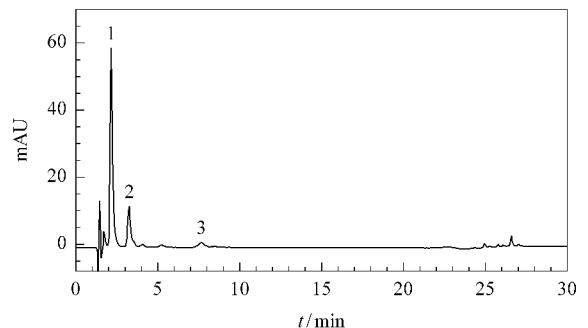


图1 葛根提取物的液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of *Pueraria lobata* extract
Column: ODS C_{18} (150 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μm). Mobile phase: A, acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid; B, 0.1% (v/v) aqueous trifluoroacetic acid solution; gradient: 0~30 min, 5% A \rightarrow 40% A. Flow rate: 8.0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Detection wavelength: 248 nm. Injection volume: 320 nL.
Peaks: 1. puerarin; 2. daidzin; 3. daidzein.

13.32%)的保留时间、峰高和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为1.18%、1.53%、3.18%($n=5$)。

2.2 葛根片剂的分析

采用上述优化条件,对愈风宁心片样品溶液进行测定,结果见图2。在葛根提取物样品中,葛根素的平均($n=5$)保留时间为2.14 min(见图1);而在片剂样品中,葛根素的平均($n=5$)保留时间为2.20 min(见图2)。片剂中葛根素(含量为19.28~24.34 mg/片)的保留时间、峰高和峰面积的RSD($n=5$)分别为1.26%、4.79%、7.17%,说明方法的重现性较好。因此采用该流动相组成和梯度洗脱方法,

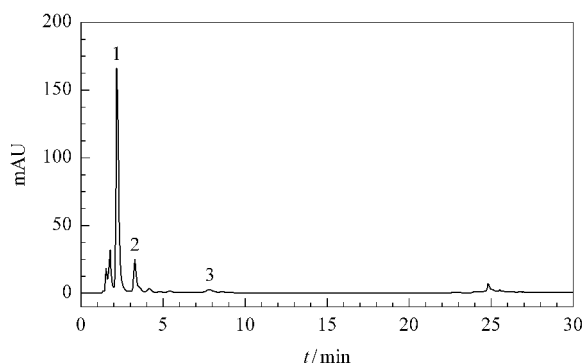


图2 愈风宁心片样品的液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of Yufeng Ningxin Tablet

For experimental conditions and peak identifications, see

Fig.1.

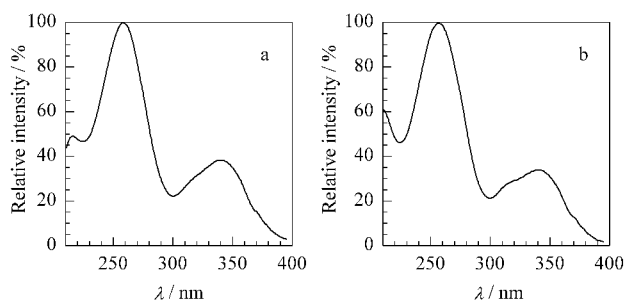


图4 图3中峰1(a)、峰2(b)、峰3(c)和峰4(d)的紫外光谱图

Fig.4 UV spectra of peaks 1(a), 2(b), 3(c), 4(d) in Fig.3

用葛根素和大豆苷元标样分别在正离子模式和负离子模式下直接进样,所得质谱图(未列出)表明,在正离子模式直接进样的情况下,由于加和离子的存在以及溶剂中杂质在该模式下易于离子化而形成干扰,谱图比较复杂,因此无法进行深入的解析。而在负离子模式下直接进样的谱图比较清晰,没有杂质峰干扰。因此,本文采用毛细管液相色谱与质谱联用,在负离子模式下进行分析,其总离子流图见图5。

从总离子流图中几个主要峰对应的质谱图(见图6)可以发现,图5中9.77 min流出峰的质谱特征峰的 m/z (见图6-c)与大豆苷元的质谱特征峰的 m/z 253($[M-H]^-$)相同,因此可以断定该峰为大

可以对中药提取物以及中药制剂中的葛根素进行定性分析。

2.3 葛根提取物的 LC-MS 分析

图3为采用二极管阵列检测器检测的葛根提取物的色谱图,图4为其中1,2,3,4号峰的紫外吸收光谱图。从图4中可看出,1,2,3,4号峰的紫外吸收光谱与异黄酮类化合物的紫外特征吸收峰相似。

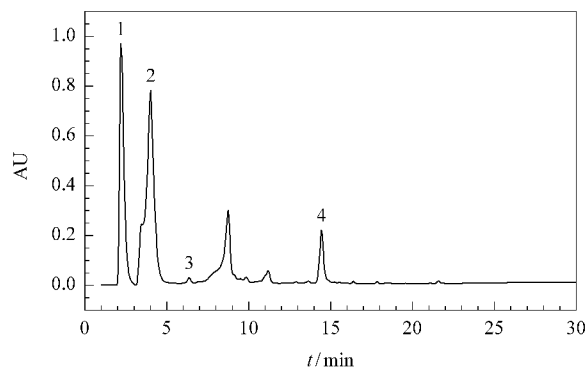


图3 葛根提取物的毛细管液相色谱图

Fig.3 PDA-CapLC chromatogram of *Pueraria lobate* extract

Column: Waters C_{18} (100 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μ m).

Mobile phase: A, acetonitrile containing 10 mmol/L NH_4Ac ; B, 10 mmol/L aqueous NH_4Ac solution; gradient: 0–30 min, 5% A \rightarrow 70% A. Flow rate: 4.0 μ L/min. Injection volume: 200 nL.

Peaks: 1. puerarin; 2. daidzin; 3. daidzein; 4. unknown.

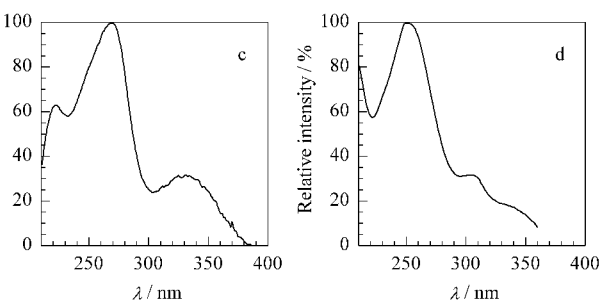


图4 图3中峰1(a)、峰2(b)、峰3(c)和峰4(d)的紫外光谱图

Fig.4 UV spectra of peaks 1(a), 2(b), 3(c), 4(d) in Fig.3

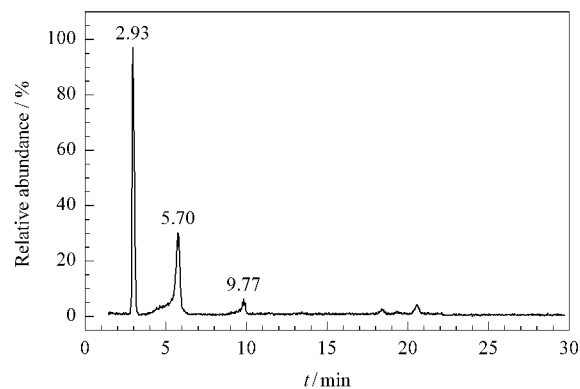


图5 葛根提取物的总离子流色谱图

Fig.5 LC-MS total ion current chromatogram of *Pueraria lobate* extract

豆昔元。图 5 中 5.70 min 流出峰的质谱特征峰(见图 6-b)的 m/z 值与葛根素和大豆昔的相同,但无法确定是这两种异构体中的哪一种化合物,因此采用 LC-MS/MS 对该峰进一步进行碎片分析,谱图见图 7。从文献 [14] 可知,葛根素在 8 位形成糖苷,属于碳苷类异黄酮;而大豆昔在 7 位形成单糖链苷,属于氧苷类异黄酮。氧苷类异黄酮的单糖链与异黄酮通过 C—O 键相连,其稳定性弱于通过 C—C 键相连的碳苷,因此在形成子离子时,主要失去了相对分

子质量(M_r)为 162 的碎片离子,形成糖昔配基——大豆昔元的脱质子峰,其 m/z 为 253。因此可以推断,图 5 中 5.70 min 流出峰为大豆昔。从图 6-a 可以看到,图 5 中 2.93 min 流出峰是多组分。我们分别以 m/z 415, 445, 546 为母离子进行 MS/MS 分析,结果见图 8, 9 和 10。从图 8 可以看出,在碰撞能量仅为 15 eV 时,该化合物即失去了 M_r 为 120 的碎片离子而形成 m/z 297 的子离子,因此可以推断其为碳苷类异黄酮——葛根素。

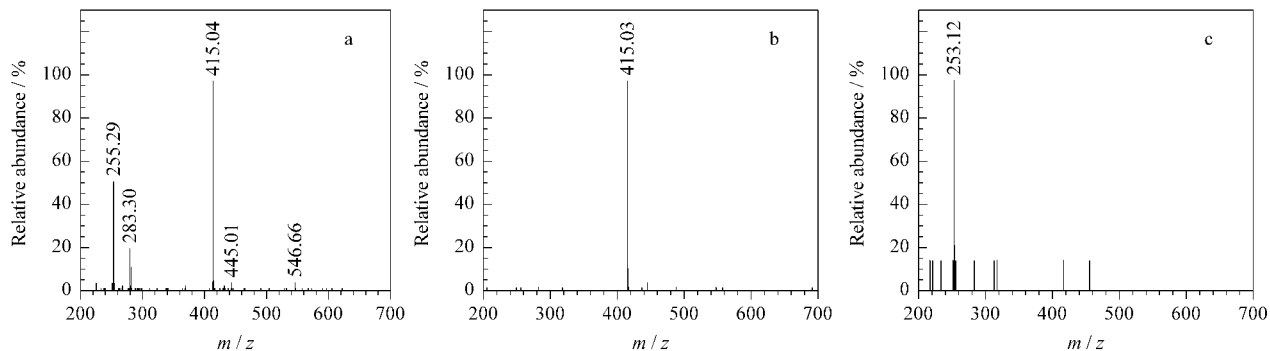


图 6 图 5 中主要峰所对应的质谱图

Fig. 6 MS spectra of the major peaks in Fig. 5

Retention times of peaks in Fig. 5 : a. 2.93 min ; b. 5.70 min ; c. 9.77 min.

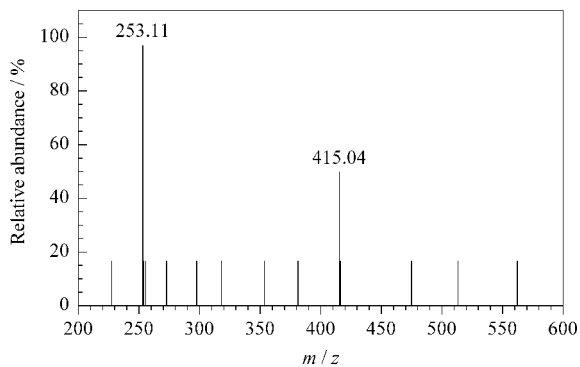


图 7 图 6-b 中质谱特征峰(m/z 为 415)的 LC-MS/MS 谱图

Fig. 7 Product ion spectrum of the ion at m/z 415 in Fig. 6-b

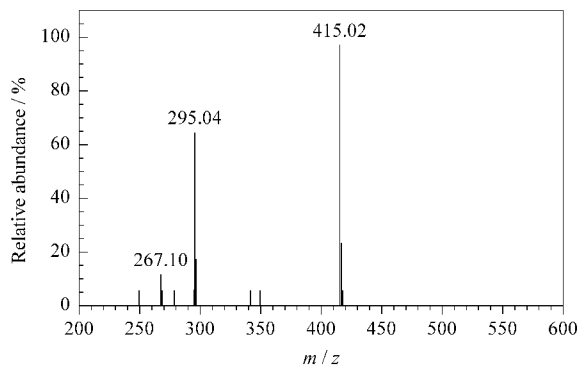


图 8 图 6-a 中以 m/z 415 为母离子的子离子谱图

Fig. 8 Product ion spectrum of the ion at m/z 415 in Fig. 6-a

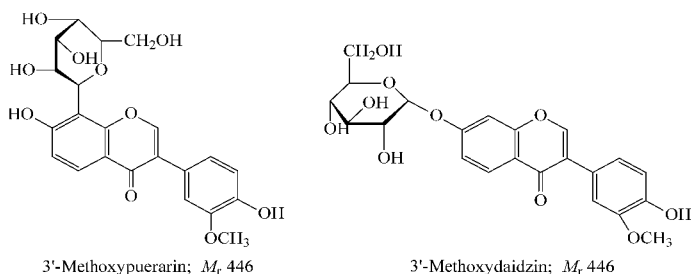
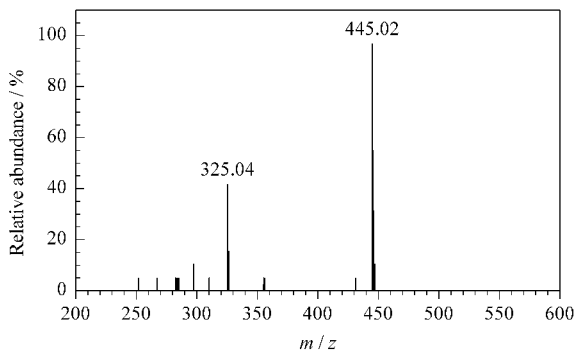


图 9 图 6-a 中以 m/z 445 为母离子的子离子谱图及据此推测的化合物结构

Fig. 9 Product ion spectrum of the ion at m/z 445 in Fig. 6-a and their proposed structures

从图9可以看到,母离子445失去一个 M_r 为120的碎片离子形成325.04的子离子峰,随后的碎裂片断既包含了氧苷也包含了碳苷的碎裂途径^[14],因此推断该化合物可能是3'-甲氧基葛根素和3'-甲氧基大豆苷的混合物。图10为图5中2.93 min流出的峰以 m/z 546为母离子进行分析得到的子离子谱图,该母离子的碎片峰没有给出太多的结构信息,虽然与7-木糖葛根素(见图11)的特征峰 m/z 547($[M-H]^-$)相似,但目前还无法确定该化合物结构。

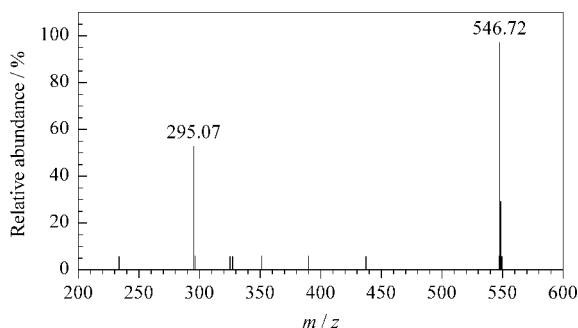


图10 图6-a中以 m/z 546为母离子的子离子谱图
Fig. 10 Product ion spectrum of the ion at m/z 546 in Fig. 6-a

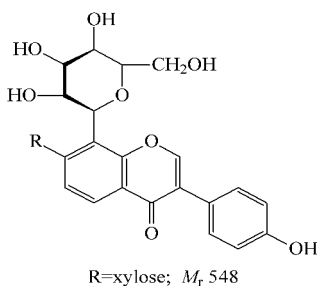


图11 7-木糖葛根素的结构
Fig. 11 Structure of 7-xylosepuerarin

2.4 愈风宁心片样品的LC-MS/MS分析

对该样品进行负离子模式的液质联用分析结果见图12。从其总离子流图中各峰所对应的质谱图

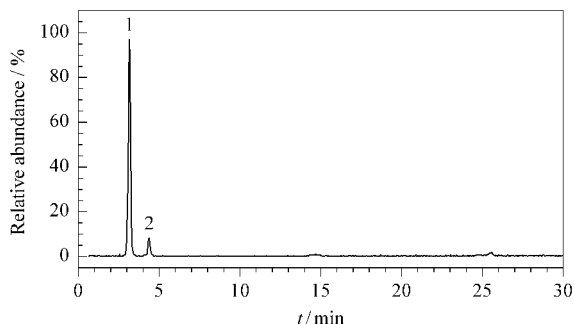


图12 愈风宁心片样品在负离子模式下的总离子流图
Fig. 12 LC-MS total ion current chromatogram of Yufeng Ningxin Tablet
Peaks: 1. puerarin; 2. daidzin.

(图略)可确定图12中3.15 min流出峰主要为葛根素,4.34 min流出峰为大豆苷。由于大豆苷元含量低,因此在联用分析中未被检测到,但在质谱直接进样分析中发现存在微量的大豆苷元以及 m/z 为445/546的化合物。对分子离子峰为 m/z 445的化合物进行串联质谱分析,与葛根提取物中 m/z 为445的化合物碎裂片断相同,可以确定为3'-甲氧基葛根素和3'-甲氧基大豆苷的混合物,而分子离子峰为 m/z 546的化合物目前还无法确定结构。

3 结语

本文以乙腈-水为流动相,在反相色谱中分离了葛根提取物以及中药片剂中的主要成分。采用液质联用方法对提取物及其片剂中的主成分进行了定性,并对其中两种微量成分的结构进行了推测。但另外一种微量成分目前还无法确认,对其结构需要进一步深入地研究。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press (中国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社), 2000. 273
- [2] Lai Yanglin, Tang Bing. China Journal of Chinese Materia Medica (赖洋林, 唐冰. 中国中药杂志), 1989, 14(5): 52
- [3] Luo Qizhi, Dai Kaijin, Ma Ande, Luo Jiabo. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (罗奇志, 戴开金, 马安德, 罗佳波. 药物分析杂志), 2004, 24(1): 11
- [4] Keung W M, Vallee B L. Phytochem, 1998, 47(4): 499
- [5] Song Hongjie, Zeng Ming, Hu Jinhong, Wang Daye, Zhang Hanming. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (宋洪杰, 曾明, 胡晋红, 王大业, 张汉明. 药物分析杂志), 2000, 20(4): 223
- [6] Rong H J, Stevens J F, Deizer M L, De Cooman L, De Keukeleire D. Planta Medica, 1998, 64(7): 620
- [7] Zhao Xiaoli, Cui Xiaobing, Di Liuqing. China Journal of Chinese Materia Medica (赵晓莉, 崔小兵, 狄留庆. 中国中药杂志), 2000, 25(7): 413
- [8] Chen G, Zhang J X, Ye J N. J Chromatogr A, 2001, 923: 255
- [9] Cao X L, Tian Y, Zhang T Y, Li X, Ito Y. J Chromatogr A, 1999, 855: 709
- [10] Chen G, Zhang J X, Ye J N. Analyst, 2000, 125: 815
- [11] Wang C C, Prasain J K, Barnes S. J Chromatogr B, 2002, 777: 3
- [12] Jiang R W, Lau K M, Lam H M, Yam W S, Leung L K, Choi K L, Waye M M Y, Mak T C W, Woo K S, Fung K P. J Ethnopharmacol, 2005, 96(1-2): 133
- [13] Benlhabib E, Baker J I, Keyler D E, Singh A K. Biomed Chromatogr, 2004, 18(6): 367
- [14] Prasain J K, Jones K, Kirk M, Wilson L, Smith-Johnson M, Weaver C, Barnes S. J Agric Food Chem, 2003, 51: 4213
- [15] Cao Zhongling, Li Jianbei, Zhang Dongming. Journal of Chinese Medicinal Materials (曹钟灵, 李建北, 张东明. 中药材), 2005, 28(1): 67
- [16] Li Meiqing, Sheng Xuan, Shao Xueguang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李梅青, 盛旋, 邵学广. 分析化学), 2003, 31(2): 178

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

应用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光散射检测器 联用技术同时测定清开灵注射液中的五类有效成分

严诗楷^{1,2}, 辛文峰^{1,3}, 罗国安¹, 王义明^{1,2}, 程翼宇²

(1. 清华大学化学系, 北京 100084; 2. 浙江大学药学院中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310027;
3. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要 :建立了复方清开灵注射液中 5 类主要有效成分的定量测定方法。应用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光散射检测器联用技术(HPLC-DAD-ELSD),根据各类成分紫外吸收光谱的差异,分别在 240, 254, 280 和 330 nm 波长下检测核糖苷、核苷(包括尿苷和腺苷)、黄芩苷和有机酸(包括绿原酸和咖啡酸)等 4 类成分,同时使用 ELSD 测定胆酸、熊去氧胆酸和猪去氧胆酸等 3 种甾体化合物,从而实现了清开灵注射液中的 5 类有效成分(共 9 个化合物)的同时分离和定量测定。用该法测定了 3 个不同厂家的 19 批清开灵注射液成品。该法快速、准确,操作相对简单,为中药复方复杂体系的多组分定量测定和质量控制提供了一种可靠、合理且简便、易行的方法模式。

关键词 :高效液相色谱法; 二极管阵列检测器; 蒸发光散射检测器; 有效成分; 清开灵注射液

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0482-05

Simultaneous Determination of Five Groups of Components in Qingkailing Injection by High Performance Liquid Chromatography with Photo Diode Array Detector and Evaporative Light Scattering Detector

YAN Shikai^{1,2}, XIN Wenfeng^{1,3}, LUO Guoan¹, WANG Yiming^{1,2}, CHENG Yiyu²

(1. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Department of Chinese Medicine Science & Engineering, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;
3. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract : A method was established for the simultaneous quantification of nine components of five different structural types in Qingkailing injection. High performance liquid chromatography coupled with a photo diode array detector and an evaporative light scattering detector (HPLC-DAD-ELSD) was employed in the determination. Four monitoring wavelengths of 240, 254, 280 and 330 nm were set to determine nucleosides (uridine and adenosine), iridoid glucoside (geniposide), flavone glycoside (baicalin) and organic acids (chlorogenic acid and caffeic acid) respectively, and a combined evaporative light scattering detector was used to detect three steroid compounds (cholic acid, ursodesoxycholic acid and hyodeoxycholic acid). The proposed method permitted the simultaneous separation and determination of five groups of compounds in Qingkailing injection, and acceptable validation results of the precision, repeatability, stability and accuracy tests were achieved. The method was applied to the analysis of 19 Qingkailing injection samples from three different plants, and the results indicated that the method could be used as a convenient and reliable method in the multi-component determination and quality control of traditional Chinese medicines.

Key words : high performance liquid chromatography; photo diode array detector; evaporative light scattering detector; active constituents; Qingkailing injection

收稿日期 2005-06-03

作者简介 :严诗楷,男,博士研究生,主要从事药物分析和中药质量控制的研究。

通讯联系人 :罗国安,男,教授,博士生导师, Tel (010) 62781688, E-mail luoga@mail. tsinghua. edu. cn.

基金项目 :国家重点基础研究发展规划项目(国家“973”研究项目)(No. G1999054404)及科技部重大专项基金(No. 2002BA906A29-3)资助项目。

清开灵注射液是由古方安宫牛黄丸经拆方改制而成,具有清热解毒、醒神开窍、镇静安神等作用,临床上广泛用于治疗呼吸道感染、急慢性肝炎、高烧、脑出血等症,是中医临床急症的必备药^[1]。清开灵注射液由板蓝根、栀子、金银花、黄芩苷、水牛角、珍珠母、牛胆酸、猪胆酸等8味药材或提取物配制而成^[2]。其中板蓝根性苦寒,具有清热解毒、凉血利咽的功效,腺苷和尿苷是其中的药效成分^[3];栀子性苦寒,具有清热泻火、利便止血的功效,其中的栀子苷被认为是复方中最重要的药效成分^[2];金银花性甘寒,抗菌解毒,绿原酸和咖啡酸是其重要指标性成分^[4];黄芩苷、牛胆酸和猪胆酸均以提取物入药(其中猪胆酸往往还混有少量熊去氧胆酸),化学成分和药效物质明确,可清热泻火,镇心开窍^[5];水牛角和珍珠母具有定惊、凉血的功能,水解后在复方中主要以氨基酸和结合钙的形式存在^[6]。可见,除了水牛角和珍珠母外,其他6味药材都有明确的指标性成分或有效成分可用于定量质量控制,因此,对上述9种成分进行定量,明确其含量范围,是控制复方制剂质量的关键步骤。上述成分根据化学结构可以分为5类,即腺苷、尿苷属于核苷类,绿原酸和咖啡酸属于有机酸类,栀子苷和黄芩苷分别是环烯醚萜苷和黄酮类成分,牛胆酸、猪胆酸和熊去氧胆酸属于甾体类。各成分的化学结构及其紫外特征吸收有较大的差异,使得它们很难在常规的色谱条件下同时得到分离和检测,因而往往需要在不同色谱条件和检测波长下逐一进行测定,特别是像胆酸类成分仅在紫外末端(192 nm附近)有微弱吸收,常规的紫外检测方法灵敏度低、准确度差^[7],需要另行使用蒸发光散射检测器(ELSD)等通用型检测器^[8-10],导致分析过程十分繁琐。近年来有文献报道使用多波长高效液相色谱法同时测定清开灵注射液中黄芩苷、绿原酸和栀子苷等3种药效成分^[11,12],但对于清开灵注射液这样的复杂体系,仅对这3种成分进行定量是不够的。本文根据各类成分不同的光谱特性,用高效液相色谱-二极管阵列检测器-蒸发光散射检测器联用技术(HPLC-DAD-ELSD),建立了同时定量测定清开灵注射液中5类共9种成分的方法,该方法克服了已有方法的不足,为中药复方复杂体系的多组分同时定量测定及其质量控制提供了一种简便、可靠、合理的新模式。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Dionex P580型高效液相色谱仪,配四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、二极管阵列检测器、All-

tech-2000型ELSD检测器;Milli-Q超纯水系统(Millipore公司,法国)。

对照品:栀子苷、黄芩苷、腺苷、尿苷、绿原酸、咖啡酸购于中国药品生物制品检定所,牛胆酸、猪去氧胆酸、熊去氧胆酸购于SIGMA公司。样品:19批清开灵注射液(记为样品1~19,其中1~10,11~15,16~19分别由A、B、C3家中药生产企业提供),胆酸类阴性样品按清开灵制备工艺自行配制(中间品由C厂提供)。试剂:甲醇(色谱纯,Fisher公司),乙腈(色谱纯,Merck公司),其余试剂为分析纯。

1.2 样品制备

对照品溶液:精密称取各对照品,用甲醇溶解,并定容于25 mL量瓶,得到混合对照品溶液,其中各对照品的质量浓度依次为尿苷0.07 g/L、腺苷0.08 g/L、绿原酸0.06 g/L、咖啡酸和栀子苷0.04 g/L、黄芩苷1 g/L、胆酸和猪去氧胆酸2 g/L。混合对照品溶液按不同比例稀释,得到一系列不同浓度水平的对照品溶液,用0.45 μm微孔滤膜过滤,密封后于低温下保存,备用。

样品溶液:精密吸取各清开灵注射液2 mL置于10 mL量瓶中,用超纯水稀释至刻度,用0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液即得。

1.3 实验条件

液相色谱条件:色谱柱为Phenomenex Luna RP C18柱(250 mm×4.6 mm i. d. 5 μm);保护柱为Alltech C18柱(7.5 mm×4.6 mm i. d. 5 μm);柱温35℃;流动相A液为含0.1%甲酸的水溶液,流动相B液为甲醇-乙腈(体积比为4:1);梯度洗脱程序为100% A $\xrightarrow{33 \text{ min}}$ 40% A $\xrightarrow{27 \text{ min}}$ 12% A;流动相流速为1.0 mL/min,进样量为20 μL。

二极管阵列检测器检测条件:200~590 nm全波长扫描,设定240,254,280和330 nm 4个检测波长。

ELSD检测器条件:漂移管温度110℃,载气(N₂)流速2.0 L/min,不分流模式。

上述条件下测定的清开灵样品色谱图如图1。图1中1~6号色谱峰的归属通过与相应对照品色谱峰的保留时间及其紫外光谱图的对照加以确认,7~9号色谱峰归属通过与对照品及阴性样品色谱图对照予以确认(图2为9种对照品的色谱图,图3为胆酸类成分阴性样品的HPLC-ELSD色谱图)。

2 结果与讨论

2.1 检测条件的优化

通过对清开灵样品的HPLC-DAD全波长扫描

分析,发现 5 类成分的紫外吸收波长有较大差异,其中尿苷和腺苷在 254 nm 附近有最大吸收,绿原酸和咖啡酸最大吸收波长为 330 nm,栀子苷和黄芩苷的最大吸收波长分别是 240 和 280 nm。如图 1、图 2 所示,尽管这 6 种成分在 254 nm 下都有一定的响应,但为了获取最佳定量结果,各成分宜在其最大吸收波长下分别测定。而 3 个胆酸类成分在 200 ~ 590 nm 内基本上没有紫外响应,宜使用其他如 ELSD 等通用检测器。因此,本文通过 DAD 和 ELSD 联用,实现了上述 5 类成分的同时检测。

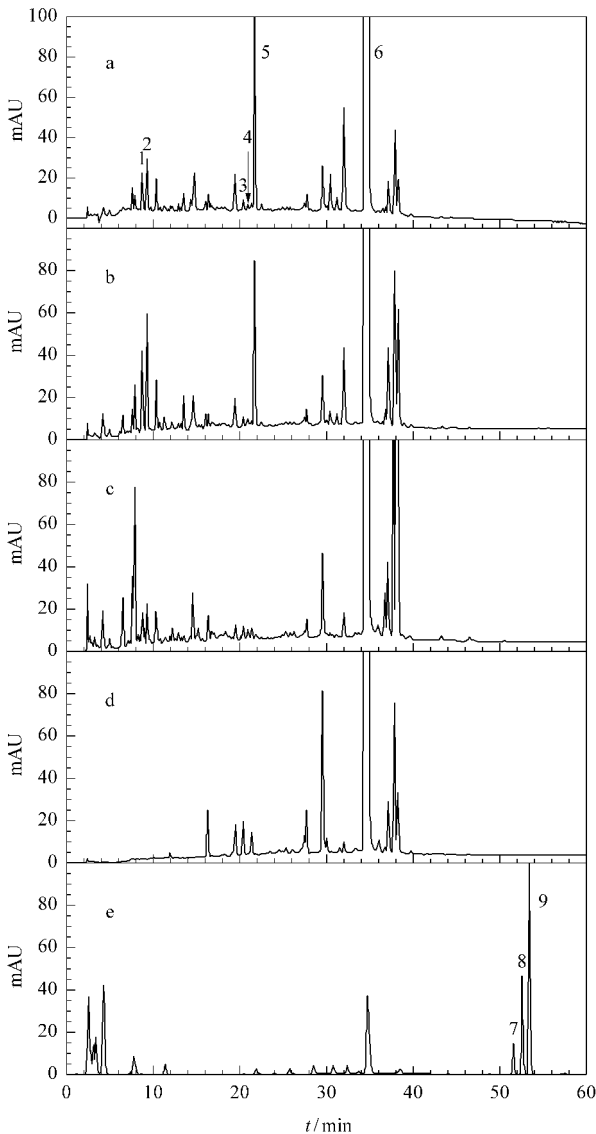


图 1 清开灵注射液的 HPLC-DAD-ELSD 色谱图
Fig.1 HPLC-DAD-ELSD chromatograms of Qingkailing injection

a. UV detection at 240 nm ; b. UV detection at 280 nm ; c. UV detection at 330 nm ; d. UV detection at 330 nm ; e. ELSD detection.

1. uridine (8.57 min) ; 2. adenosine (9.10 min) ; 3. chlorogenic acid (20.47 min) ; 4. caffeic acid (21.41 min) ; 5. geniposide (21.68 min) ; 6. baicalin (34.58 min) ; 7. ursodesoxycholic acid (51.97 min) ; 8. cholic acid (53.05 min) ; 9. hyodeoxycholic acid (54.12 min).

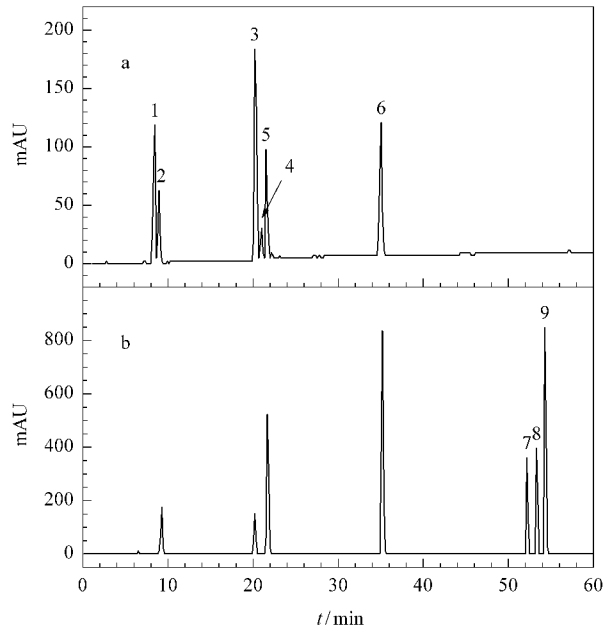


图 2 对照品的 HPLC-DAD-ELSD 色谱图
Fig.2 HPLC-DAD-ELSD chromatograms of the controls
a. UV detection at 240 nm ; b. ELSD detection.
The peak identifications are the same as in Fig.1.

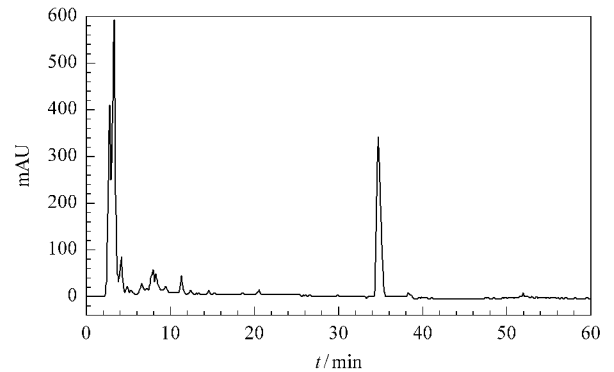


图 3 清开灵注射液胆酸类成分阴性样品的 HPLC-ELSD 谱图
Fig.3 HPLC-ELSD chromatogram of the sample without the steroid compounds

雾化气流速和漂移管温度是影响 ELSD 检测性能的两个最重要参数。本文比较了在不同流速 (0.8 , 1.0 , 1.5 , 2.0 , 2.5 L/min) 和不同温度 (90 , 100 , 110 , 115 , 120 °C) 条件下的信号响应,发现随着雾化气流速的增大以及漂移管温度的升高,噪声响应明显降低,但成分信号的响应强度同时降低。本文最后确定雾化气流速为 2.0 L/min,漂移管温度为 110 °C。在此条件下,检测器的信噪比较理想。这一结论与文献 [7] 报道的结果一致。

2.2 标准曲线的制作

在以上色谱条件下,分别测定 5 个浓度水平的对照品溶液,每个样品测定 3 次,以 3 次测定的平均峰面积对相应的浓度进行线性回归,得各组分的线性方程。图 1 中峰 1 ~ 6 的峰面积与浓度呈现良好

的线性关系 ($r^2 > 0.997$), 3 种胆酸类成分(峰 7 ~ 9)的 ELSD 谱峰面积值与其浓度取对数后呈线性关系 ($r^2 > 0.994$), 即 $\log A = b \log C + a$ (其中 A 为峰

面积值, C 为组分的浓度, a, b 为常数)。各标准曲线的回归方程、线性范围、相关系数及检出限 ($S/N > 5$) 结果见表 1。

表 1 各组分的标准曲线及其检出限

Table 1 Regression data and LOD for the compounds determined

No.	Compound	Detection wavelength/nm	Regression equation *	r^2	Linear range/(mg/L)	LOD/($\mu\text{g/L}$)
1	uridine	254	$A = 1820.9C + 3.1551$	0.9991	0.5 - 70	10
2	adenosine	254	$A = 324.41C + 1.0543$	0.9989	0.4 - 80	10
3	chlorogenic acid	330	$A = 518.2C - 0.1317$	0.9992	0.2 - 60	5
4	caffeic acid	330	$A = 1566.6C + 0.2331$	1.0000	0.1 - 40	5
5	geniposide	240	$A = 389.64C + 7.215$	0.9985	0.1 - 40	10
6	baicalin	280	$A = 522.11C - 95.003$	0.9976	0.2 - 1000	10
7	ursodesoxycholic acid	-	$\log A = 0.9641 \log C + 6.8665$	0.9991	0.5 - 150	40
8	cholic acid	-	$\log A = 0.8648 \log C + 5.7615$	0.9980	1.0 - 2000	50
9	hyodeoxycholic acid	-	$\log A = 0.8987 \log C + 5.7701$	0.9944	1.0 - 2000	50

* A : the peak area; C : the concentration of the compound, mg/L.

2.3 方法学考察

同一供试品连续进样 6 次, 测定 9 种成分的含量, 计算各组分含量的相对标准偏差 (RSD), 考察方法的精密度; 平行配制 5 份供试品进行测定, 计算各组分测定结果的 RSD, 考察方法的重复性; 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定, 计算各组分浓度的 RSD, 考察样品的稳定性; 准确

量取清开灵样品 20 mL, 定量加入对照品 (对照品 (按表 2 中的顺序号 1 ~ 9) 加入量分别为 0.1, 0.5, 0.2, 0.1, 1.0, 20.0, 1.0, 20.0, 20.0 mg) 后稀释于 100 mL 量瓶内, 平行测定 5 次, 计算各成分的加标回收率。方法学考察结果见表 2, 表明本方法精密度、重现性、回收率测定结果良好, 样品在 24 h 内稳定, 满足定量测定要求。

表 2 方法学考察结果

Table 2 Validation results of the proposed method

No.	Compound	RSDs			Accuracy ($n = 5$)	
		precision ($n = 6$)	repeatability ($n = 5$)	stability ($n = 6$)	recovery \pm SD	RSD
1	uridine	1.76	0.34	3.51	96.41 \pm 3.63	3.77
2	adenosine	4.48	1.15	3.01	98.02 \pm 3.83	3.91
3	chlorogenic acid	3.75	2.64	1.97	101.37 \pm 4.70	4.64
4	caffeic acid	1.40	2.42	3.33	98.54 \pm 4.48	4.55
5	geniposide	3.69	4.39	1.87	100.18 \pm 2.70	2.70
6	baicalin	2.16	2.98	1.43	100.58 \pm 4.88	4.85
7	ursodesoxycholic acid	3.24	3.03	2.79	98.81 \pm 3.10	3.14
8	cholic acid	3.35	4.68	3.48	99.78 \pm 2.66	2.67
9	hyodeoxycholic acid	4.92	2.05	2.55	98.81 \pm 3.79	3.84

2.4 样品分析

采用上述方法测定了来自 3 个不同厂家的 19 个清开灵注射液样品, 结果列于表 3。从表 3 发现: 不同厂家样品中各有效成分的含量存在较大的差别, 这主要是因为各厂家的工艺参数、原料来源和加工设备等在一定程度上各不相同, 导致了最终产品质量上的差异; 对于同一厂家不同批次的产品, 其测量结果也存在着一定的差别, 这主要跟该厂的工艺操作、药材来源和管理水平等因素有关。

根据各成分的定量测定结果, 分别计算了 3 个厂家各成分测定结果的 RSD。可以看出: 本文测定

的 9 种有效成分中, 黄芩苷、熊去氧胆酸、牛胆酸和猪去氧胆酸测定的 RSD 明显较低, 这是因为在清开灵注射液生产工艺中, 这 4 种成分都是通过直接加入高纯度的提取物 (纯度在 90% 以上) 实现的, 质量控制因而较容易进行; 而腺苷、尿苷、绿原酸、咖啡酸和栀子苷则通过药材提取得到, 其含量受药材来源及提取工艺等诸多因素的影响, 因此测定结果的 RSD 变化较大。

另外, 不难发现 A 厂产品 9 种成分的 RSD 都是 3 个厂家中最高的, 除了猪去氧胆酸外, 其他 8 种有效成分的 RSD 都高于 20%, 最高的竟达 95% 以上

(咖啡酸),说明 A 厂不同批次产品之间有效成分含量相差悬殊,因而无法保证该厂产品质量的稳定、可控。相比之下,B 厂和 C 厂产品的 RSD 明显较低,产品质量更加稳定。其中 B 厂产品中除了尿苷、腺

苷和绿原酸外,其他成分的 RSD 都小于 20%,而 C 厂产品各成分的 RSD 全部控制在 17% 以内,且除黄芩苷外,各 RSD 均为 3 个厂中最低,说明该厂的产品稳定均一,质量可控。

表 3 不同清开灵注射液的各成分定量分析结果

Table 3 Quantitative analysis results of various Qingkailing injections

Plant	Sample No.	Uridine/ μg	Adenosine/ μg	Chlorogenic acid / μg	Caffeic acid/ μg	Geniposide/ μg	Baicalin/ mg	Ursodesoxycholic acid/μg	Cholic acid/ mg	Hyodeoxycholic acid/mg
A	1	2.24	9.33	2.20	0.317	152	2.98	25.8	2.1	2.64
	2	1.67	4.20	1.56	0.421	145	3.02	26.5	2.5	2.6
	3	1.45	4.25	1.09	0.221	137	1.53	27.0	2.38	2.5
	4	0.898	3.47	0.993	0.116	141	1.47	28.1	2.27	2.62
	5	6.23	27.4	3.11	1.56	37.5	3.16	16.8	1.26	2.96
	6	7.70	36.9	4.58	2.49	51.0	3.09	16.1	1.2	3.22
	7	6.14	20.0	0.95	0.37	45.0	3.05	14.0	1.22	3.2
	8	4.99	16.7	2.97	1.78	47.2	3.14	14.3	1.23	3.15
	9	5.76	24.8	4.58	2.41	71.3	3.14	16.2	1.34	3.14
	10	5.62	18.1	1.08	0.33	45.4	3.18	16.6	1.37	3.12
	RSD/%	57.30	68.19	62.10	95.11	56.77	24.34	29.15	32.58	9.96
B	11	3.77	13.1	3.15	6.97	72.4	3.6	13.9	2.36	2.36
	12	4.85	28.6	2.92	8.24	83.3	3.85	15.5	1.97	2.59
	13	4.58	31.0	2.80	8.73	80.1	3.72	12.8	2.13	2.26
	14	3.72	25.6	2.73	8.81	70.1	3.75	14.0	2.18	2.28
	15	7.99	42.4	1.60	6.25	71.1	3.92	14.4	1.89	2.41
	RSD/%	35.18	37.46	22.84	14.58	7.85	3.27	6.89	8.75	5.55
C	16	9.82	69.1	5.93	3.78	94.1	4.61	22.8	1.89	2.31
	17	13	56.1	7.63	3.84	92.5	4.99	22.5	1.88	2.32
	18	15	45.2	7.33	4.98	87.5	4.71	20.1	1.96	2.22
	19	13.3	58.3	7.22	4.82	93.1	4.39	20.1	1.91	2.1
	RSD/%	16.91	17.14	10.70	14.54	3.20	5.32	6.91	1.86	4.56

3 结论

本文采用所建立的 HPLC-DAD-ELSD 方法,同时定量测定了清开灵注射液中 5 类不同结构的 9 种化合物。本方法简便易行,分析结果准确可靠,为中药复杂体系的多组分同时定量测定及其质量控制提供了一条新的思路。

参考文献:

[1] Jin Yulong, Zhao Zhixin. Acta Chinese Medicine and Pharmacology (金玉龙, 赵志新. 中医药学报), 1995, 10(4): 54

[2] Zheng Huzhan, Dong Zehong, She Jing. Modern Study and Application of Traditional Chinese Medicine. Vol 4. Beijing: Xue Yuan Press (郑虎占, 董泽宏, 余 靖. 中药现代研究与应用. 第 4 卷. 北京: 学苑出版社), 1998. 3 166

[3] Xiao Shanshan, Jin Yu, Sun Yuqing. Journal of Shenyang Pharmaceutical University (肖珊珊, 金 郁, 孙毓庆. 沈阳药科大学学报), 2003, 20(6): 455

[4] Ge Bing, Lu Xiangyang, Yi Ke, Tian Yun. Chinese Wild Plant Resources (葛 冰, 卢向阳, 易 克, 田 云. 中国野生植物资源), 2004, 23(5): 13

[5] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing:

Chemical Industry Press (中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社), 2000. 52, 260

[6] Xu Yan, Cheng Wei, Xu Yanhua, Cao Jin, Luo Guoan. Chinese Traditional Patent Medicine (徐 燕, 程 伟, 徐艳华, 曹 进, 罗国安. 中成药), 2003, 25(2): 106

[7] Cao Jin, Xu Yan, Zhang Yongzhi, Wang Yiming, Luo Guoan. Chinese Journal of Analytical Chemistry (曹 进, 徐 燕, 张永知, 王义明, 罗国安. 分析化学), 2004, 32: 469

[8] Chang Zengrong, Zhang Xiaoqian. Chinese Pharmaceutical Journal (常增荣, 张小茜. 中国药学杂志), 2003, 38: 155

[9] Ye Lei, Cao Jin, Xu Yan, Wang Yiming, Luo Guoan. Chinese Traditional Patent Medicine (叶 磊, 曹 进, 徐 燕, 王义明, 罗国安. 中成药), 2004, 26(9): 750

[10] Cao Jin, Xu Yan, Wang Yiming, Luo Guoan. Chinese Traditional Patent Medicine (曹 进, 徐 燕, 王义明, 罗国安. 中成药), 2003, 25(9): 705

[11] Cao Jin, Xu Yan, Wang Yiming, Luo Guoan. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (曹 进, 徐 燕, 王义明, 罗国安. 药物分析杂志), 2004, 24: 8

[12] Xu Yan, Cao Jin, Wang Yiming, Luo Guoan. Acta Pharm Sinica (徐 燕, 曹 进, 王义明, 罗国安. 药学学报), 2003, 38: 543

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

用 *N,N*-二甲基六烷基溴化铵涂层的毛细管对重组促红细胞生长素及其酶解产物进行毛细管电泳和毛细管电泳-电喷雾质谱分析

于 冰, 丛海林, 刘虎威, 李元宗, 刘 锋

(北京大学化学与分子工程学院 生物有机与分子工程教育部重点实验室, 北京 100871)

摘要 :采用毛细管电泳技术研究了重组促红细胞生长素(rhEPO)的分离问题。用 *N,N*-二甲基六烷基溴化铵(6- β -ionene)涂层的毛细管测定了 rhEPO 中唾液酸的微多相性,同时采用毛细管电泳-质谱(CE-MS)联用技术在 22 min 内鉴定了 rhEPO 20 段胰酶消化肽中的 11 段。该方法简单快捷,重现性好,可用于蛋白质一级结构的测定。

关键词 :毛细管电泳;毛细管电泳-质谱联用; *N,N*-二甲基六烷基溴化铵涂层;重组促红细胞生长素;酶解产物;微多相性;肽图

中图分类号 :O658

文献标识码 :A

文章编号 :1000-8713(2005)05-0487-05

Analysis of Recombinant Erythropoietin and Its Tryptic Digest by Capillary Electrophoresis and Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Using Capillary Coated with 6- β -Ionene

YU Bing, CONG Hailin, LIU Huwei, LI Yuanzong, LIU Feng

(The Key Lab of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract : The microheterogeneity of recombinant human erythropoietin (rhEPO) was analyzed by capillary electrophoresis (CE) using a capillary coated with 6- β -ionene. The applicability of a volatile electrolyte for fast analysis of tryptic fragments of rhEPO with online CE-electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) was investigated, resulting in a reproducible separation of eleven rhEPO tryptic fragments within 22 min under the following conditions: running buffer 300 mmol/L acetic acid-ammonium acetate (HAc-NH₄Ac), pH 4.80, separation voltage -15 kV and capillary temperature 25 °C. The proposed method is rapid and effective, and can be used for the structural analysis of related proteins.

Key words : capillary electrophoresis; capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-mass spectrometry; 6- β -ionene coating; recombinant human erythropoietin; tryptic digest; microheterogeneity; tryptic mapping

人促红细胞生长素(uEPO)是一种唾液酸化的糖蛋白,作为一种主要由人肾脏细胞分泌的荷尔蒙,对于调控红血球的形成和生长具有重要的作用^[1]。随着生物工程和基因技术的发展,已经实现了利用动物细胞(如仓鼠卵巢细胞)构筑基因重组生产线来制备重组促红细胞生长素(rhEPO)。由于基因重组和天然内源性的促红细胞生长素的生物学活性基本相同,而且理化性质也十分相近,因而被广泛用于治疗贫血等疾病^[2-4]。然而,一些运动员为了提

高自行车、长跑等耐力项目的比赛成绩,利用 rhEPO 的某些药用性能而将 rhEPO 作为兴奋剂使用^[5-7]。

医学和生物学方面的研究表明:促红细胞生长素(EPO)是高度糖基化的糖蛋白,唾液酸存在于糖链的末端, EPO 分子中糖基化程度,特别是唾液酸含量的多少对其体内生物学活性高低起决定性的作用^[8]。而其中糖基化链的含量、结构、尺寸、唾液酸化程度的差异使得 EPO 具有微多相性,这种微多相性的存在为 EPO 的分离和检测提供了重要依据^[9]。

收稿日期 2005-05-08

作者简介:于冰,女,博士研究生, Tel (010)62754976, E-mail yubing@pku.edu.cn.

通讯联系人:刘虎威,男,教授,博士生导师, Tel (010)62754976, Fax (010)62751708, E-mail hliu@pku.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金重点项目(No. 20335010).

随着仪器科学的发展,采用现代化的仪器分析手段分析 EPO 越来越受到生物医药界和兴奋剂检测界的关注^[10]。关于 rhEPO 的毛细管电泳分离检测,已有一些文献^[11-13]报道,其中采用未涂层毛细管大多需要较长的平衡时间^[14],并且因为 rhEPO 在毛细管壁的吸附问题而导致分辨率降低,结果的重现性差;而采用涂层毛细管,例如腐胺动态涂层柱,虽然可实现基线分离,但检测时间长,并且因为所用缓冲溶液体系中尿素含量过高而无法采用质谱联用技术^[15]。本文采用毛细管电泳法(CE),用自制的 *N,N*-二甲基六烷基溴化铵(6,6-ionene)涂层毛细管测定了影响 rhEPO 体内活性的唾液酸的微多相性,并且采用毛细管电泳-电喷雾质谱联用技术(CE-ESI-MS)分析了 rhEPO 的胰蛋白酶消解肽图。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

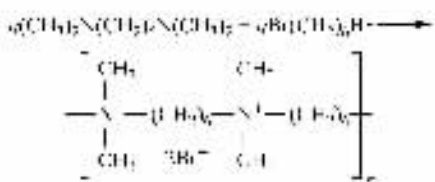
Agilent HP^{3D} CE, Agilent Trap-XCT 离子阱质谱仪,采用电喷雾离子源,配有 CE-ESI-MS 接口,以及相应的毛细管电泳-质谱工作站。

醋酸(HAc)、氨水、二甲基甲酰胺(DMF)、乙二醇和氢氧化钠(NaOH)均为分析纯,购于北京化学试剂厂;乙腈(MeCN)为色谱纯,购于 Fisher 公司;醋酸铵(NH₄AC, 99.995%)、1,6-二溴己烷(分析纯)和胰蛋白酶均购于 Aldrich 公司。四甲基己二胺为分析纯,购于 Acros 公司。实验室用水全部采用经 Aquapro 纯化系统(重庆艾科普仪器公司)重新纯化过的去离子水(电阻率大于 18 MΩ·cm)。rhEPO 购于宝依朴生化公司,质量浓度为 1.5 g/L,纯度大于 98.5%。未涂层的弹性石英毛细管由河北永年锐沓色谱器件公司提供。

1.2 聚阳离子 6,6-ionene 的合成

本实验所用毛细管涂层 6,6-ionene 是通过 DMF-H₂O 混合溶剂中四甲基己二胺和 1,6-二溴己烷的连续 Menshutkin 反应制备的^[16,17]。具体条件是:DMF-H₂O(体积比为 80:20)的混合溶剂中加入等物质的量的四甲基己二胺和 1,6-二溴己烷,浓度为 1.3 mol/L,于 50 °C 下反应 48 h,以丙酮为沉淀剂将聚合物沉淀出来。用丙酮洗 3 次,真空干燥,产率约 85%。

6,6-ionene 的聚合反应式为:



所合成的 6,6-ionene 的重均分子量(M_w)由凝胶渗透色谱(GPC, Waters 208)测定,结果约为 1.9×10^4 g/mol。

1.3 rhEPO 的胰酶消化

将 2 mg 胰蛋白酶溶于 50 mL 水中,然后移取 100 μL 注入 0.1 mL 质量浓度为 1.5 g/L 的 rhEPO 样品中,于 37 °C 条件下恒温消解 20 h 后,再注入 100 μL 上述胰蛋白酶溶液,恒温消解 4 h 后,取出置于 -70 °C 冰箱中 1 h,中止反应,然后于 4 °C 条件下冷藏备用。

1.4 毛细管电泳操作条件

实验前,将未涂层的毛细管(57 cm × 50 μm i. d.,有效长度 48.5 cm)先用 1 mol/L NaOH 冲洗 30 min 后,再用水冲洗 30 min,然后用涂层液和分离缓冲溶液先后冲洗各 45 min,压力进样(3.35 kPa, 5 s)。分离电压 -10 kV,毛细管柱温 25 °C。涂层液由质量浓度为 50 g/L 的 6,6-ionene 和体积分数为 2% 的乙二醇组成。分离缓冲溶液为 300 mmol/L HAc-NH₄AC, pH 为 4.80。紫外检测波长 214 nm。

1.5 毛细管电泳-质谱联用条件

毛细管尺寸为 79 cm × 50 μm i. d.,紫外检测窗口开在距离入口端 21.5 cm 处,压力进样(5 kPa, 10 s),分离电压 -15 kV,毛细管柱温 25 °C。质谱分析采用负离子模式检测,毛细管电压 4.5 kV,碎裂电压 -40 V,质谱扫描范围 m/z 300 ~ 2200。雾化气(N₂)压力 68.95 kPa,流量 4 L/min,温度 325 °C。鞘液为含 5 mmol/L NH₄AC 的乙腈-水(体积比为 1:1)溶液,流速 10 μL/min。

2 结果与讨论

2.1 毛细管电泳分析 rhEPO 样品

为了减少 rhEPO 样品在裸露的毛细管壁上的吸附,按“1.2”节所述合成 6,6-ionene 作为涂层。6,6-ionene 作为一种聚电解质,在主链上含有大量的铵正离子,因而可以稳定地吸附在带负电的毛细管内壁上,形成永久涂层。这种带有正电荷的涂层会使电渗流(EOF)的方向发生反转从而指向正极,因而毛细管入口端为负极,出口端为正极^[18-20]。由于在 pH 值为 4.80 时, rhEPO 的各糖化体均带负电,并且所带的负电荷数随唾液酸化程度的增加而增加,故可根据唾液酸含量的多少,通过电泳加以分离^[21-23]。如图 1 所示,根据糖蛋白中唾液酸的微多相性,利用 6,6-ionene 涂层毛细管在 15 min 之内分离出了 rhEPO 的 7 个峰,它们均在 EOF 标志峰(图 1 中较大的负峰)之前通过检测窗口。

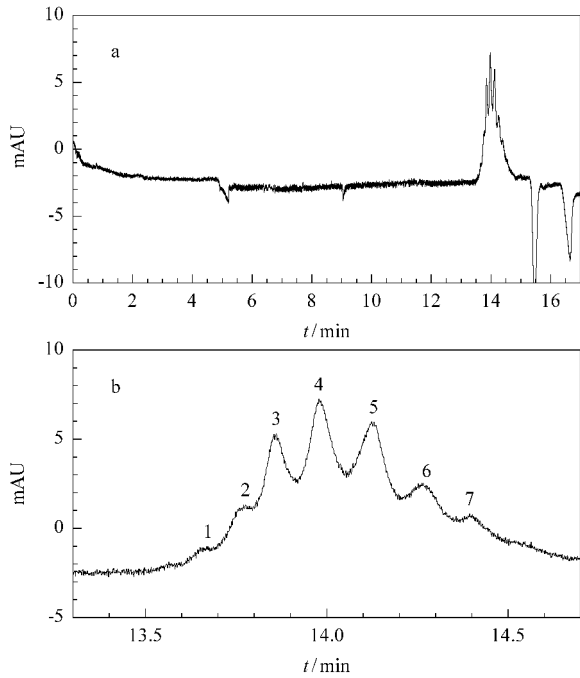


图 1 rhEPO 在 6 β -ionene 涂层的毛细管柱上的电泳分离图 (a) 及其局部放大图 (b)

Fig. 1 Capillary electropherogram of rhEPO glycoforms using a capillary permanently coated with 6 β -ionene (a) and its partial enlarged drawing (b)
UV detection wavelength : 214 nm.

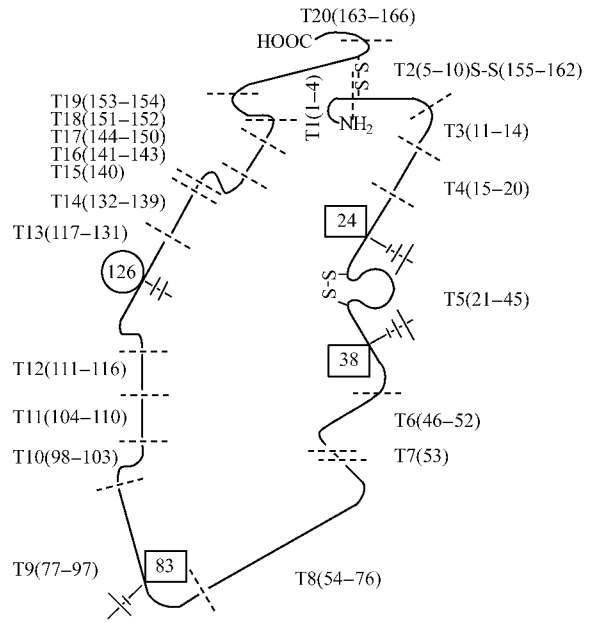


图 2 重组促红细胞生成素的预测结构
Fig. 2 Predicted structure of rhEPO

T1 - T20 are peptides generated by trypsin. The amino acid residue numbers are indicated in parentheses.

此外,利用同一根 6 β -ionene 涂层毛细管,连续 3 d 每天进样 6 次,测定 7 个峰的迁移时间的相对标准偏差(RSD)。结果日内 RSD 均小于 0. 2%, 日间 RSD 均小于 0. 5%, 说明该检测方法的重现性较好。与文献[11 ~ 15]方法相比,本文所采用的 6 β -ionene 涂层毛细管的方法,可以有效地减少 rhEPO 在毛细管壁上的吸附,因而具有检测时间短、重现性好的特点,并且因为使用了低盐含量的缓冲溶液,可以实现与质谱的联用。

2.2 rhEPO 的胰蛋白酶消解肽图分析

rhEPO 是由 166 个氨基酸残基组成的糖基化蛋白质,有两对由半胱 7-半胱 161 和半胱 29-半胱 33 组成的二硫键,糖基化位点为天胺 24、天胺 38、天胺 83 和丝 126^[24]。图 2 所示为 rhEPO 的预测结构。由于胰蛋白酶可特异性断裂精氨酸(R)和赖氨酸(K)所形成的肽键,故 rhEPO 经胰蛋白酶消化后的产物从理论上讲由 20 个肽段组成。其中 T5 ,T9 和 T13 是糖基化肽,T2 和 T5 肽段中包含二硫键。

图 3 是 rhEPO 的胰蛋白酶消解产物的 CE-ESI-MS 图谱。从质谱的总离子流图(TIC)上检测到了从 a 至 h 共 8 个产物峰(见图 3 上图),它们分别对应于电泳紫外检测器检测到的 a 至 h 峰(见图 3 下图)。因为电泳紫外检测窗口在距离毛细管入口端 21. 5 cm 处,有效分离距离较短,致使 a ,b 和 g ,h 峰

未能在 UV 检测窗口处分开,但在质谱检测窗口处(79 cm)可以实现较好的分离检测效果。

图 3 中 a ~ h 各电泳峰所对应的质谱图分别如图 4-a ~ h 所示,表 1 为 rhEPO 胰蛋白酶消解肽段的理论相对分子质量(M_r)与图 4 对应的各峰的质荷比(m/z)的汇总数据。结合表 1 可看出,图 4-a 和 b 确证了糖肽 T13 的微多相性及在肽图中的位置;根据文献[24]报道,T13 主要含有(NeuAc)₂ · Hex · HexNAc 和 NeuAc · Hex · HexNAc 两种糖基,其 M_r 分别为 2 412 和 2 121,我们分别在图 3 流出峰 a 和 b 的质谱图(即图 4-a 和 b)中检测到了其双电荷分子离子峰 1 205. 1 和 1 059. 5。依此类推,图 4-c 和 d 确证了 T2 ,T3 ,T4 和 T14 肽段在肽图中的位置,它们对应于图 3 中的流出峰 c 和 d。图 4-e 确证了 T11 和 T17 肽段在肽图中的位置,它们对应于图 3 中的流出峰 e。图 4-f 确证了 T10 和 T12 肽段在肽图中的位置,它们对应于图 3 中的流出峰 f。图 4-g 和 h 分别确证了 T16 和 T1 肽段在肽图中的位置,它们分别对应于图 3 中的流出峰 g 和 h。

由于 T5 和 T9 糖肽的糖基部分结构复杂、形式多,并且 T5 中含有两个糖基化位点,故其 CE 流出峰和质谱图难以解析。在 CE-MS 联用技术中,由于样品的进样量很小(纳升级),加之 MS 的检测灵敏度有限,所以未检测到 T6 和 T20 肽段。T7 ,T8 ,T15 ,T18 和 T19 肽段则是因其 M_r 超出了质谱扫描范围(m/z 300 ~ 2 200),因而也未能检测到。除上述肽段外,其余肽段均用该方法得到了确证。

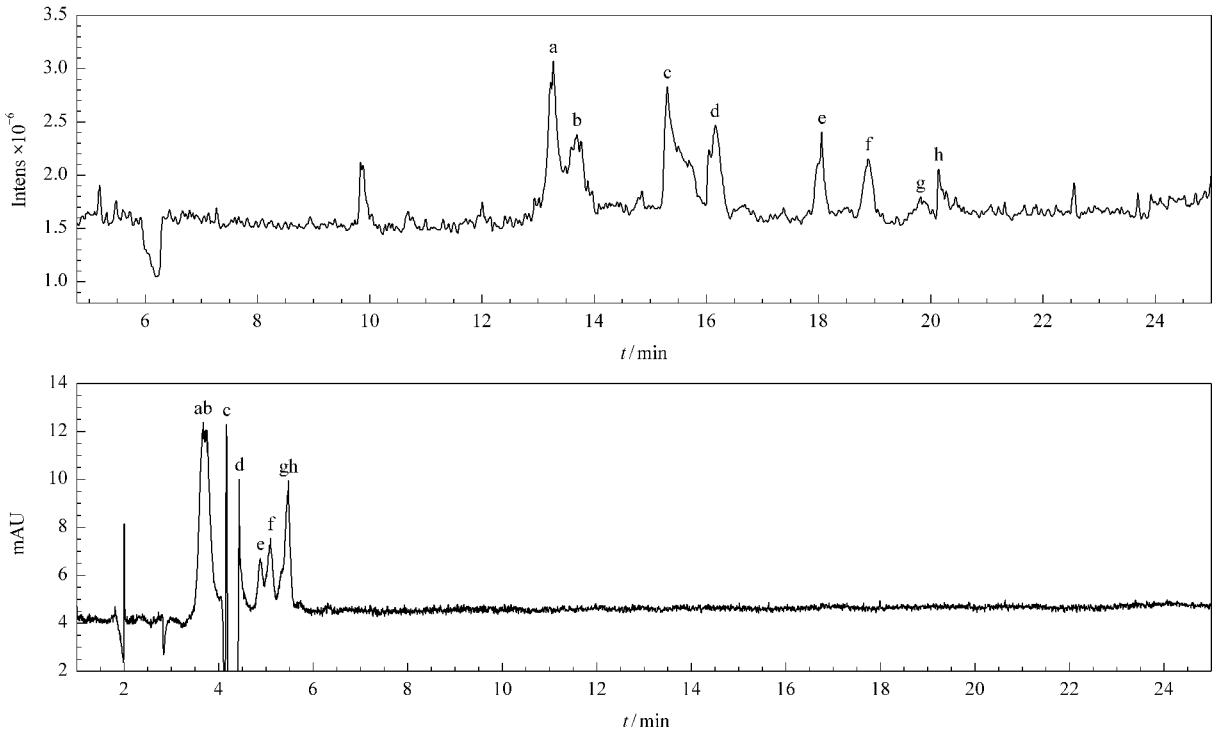


图 3 重组促红细胞生成素的胰蛋白酶消解产物的总离子流电泳图(上图)和紫外检测电泳图(下图)

Fig.3 Total ion current electropherogram (top) and UV electropherogram (bottom) of rhEPO tryptic digests

Migration times of the peaks in TIC : a. 13.1 – 13.3 min ; b. 13.6 – 13.8 min ; c. 15.2 – 15.9 min ; d. 15.9 – 16.4 min ; e. 17.8 – 18.1 min ; f. 18.7 – 19.0 min ; g. 19.6 – 20.0 min ; h. 20.0 – 20.3 min.

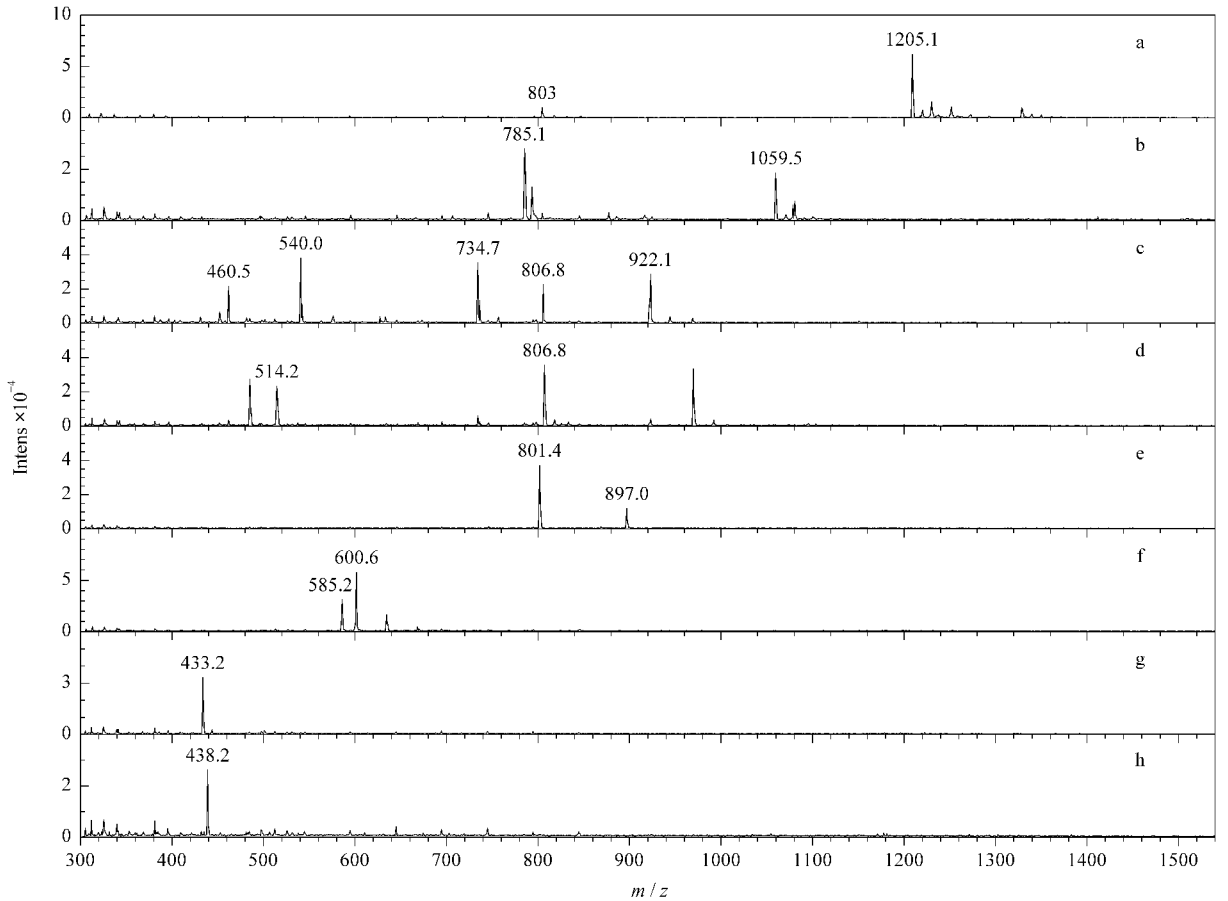


图 4 图 3 的总离子流电泳图中峰 a ~ h 的质谱图

Fig.4 Mass spectra of the peaks a ~ h in TIC of Fig.3

表 1 CE-ESI-MS 分析 rhEPO 胰蛋白酶消解产物的结果
Table 1 CE-ESI-MS analysis of the rhEPO tryptic digests

Peptide No. in Fig. 2	Sequence	Molecular mass (M_r)	Observed (m/z)		Peak No. in Fig. 3
			[$M - H$] ⁻	[$M - 2H$] ²⁻	
T1	APPR	439.5	438.2		h
T2	LICDSRLYTGEACR	1615.8		806.8	c, d
T3	VLER	515.6	514.2		d
T4	YLLEAK	735.9	734.7		c
T5	EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK				-
T6	VNFYAWK	927.1			-
T7	R	174.2			-
T8	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2525.3			-
T9	GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK				-
T10	AVSGLR	601.7	600.6		f
T11	SLTTLLR	802.5	801.4		e
T12	ALGAQK	586.3	585.2		f
T13	EAISPPDAASAAPLR				
	NeuAc · Hex · HexNAc	2121		1059.5	b
	(NeuAc) ₂ · Hex · HexNAc	2412		1205.1	a
T14	TITADTFR	923.0	922.1	460.5	c
T15	K	146.2			-
T16	LFR	434.5	433.2		g
T17	YSNFLR	898.0	897.0		e
T18	GK	203.2			-
T19	LK	259.3			-
T20	TGDR	447.4			-

- : uncharacterized. T5, T9 and T13 are glycopeptides.

3 结论

综上所述,本文利用 6,6-ionene 涂层毛细管,采用 CE 法在 15 min 之内测定了 rhEPO 中唾液酸的微多相性,按 rhEPO 唾液酸含量的多少,将其分离成 7 个峰,具有检测时间短,重现性好,分辨率高,能实现质谱联用的特点。并利用该涂层毛细管,采用 CE-ESI-MS 法在 22 min 之内鉴定了 rhEPO 20 段胰酶消化肽中的 11 段,表明该法是快速而又有效的蛋白质一级结构测定方法。

致谢 感谢安捷伦科技有限公司为本研究工作提供 CE-ESI-MS 仪器。

参考文献:

- [1] Kranz S. *Blood*, 1991, 77 : 419
- [2] Crommelin D J A, Sindelar R D. *Pharmaceutical Biotechnology: an Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997. 25
- [3] Markham A, Bryson H M. *Drugs*, 1995, 49(2) : 232
- [4] Fisher J W. *Exp Biol Med*, 2003, 228(1) : 1
- [5] Rivier L, Saugy M. *J Toxicol-Toxin Rev*, 1999, 18(2) : 145
- [6] Parisotto R, Wu M T, Ashenden M J, Emslie K R, Gore C J, Howe C, Kazlauskas R, Sharpe K, Trout G J, Xie M H, Hahn A G. *Haematologica*, 2001, 86(2) : 128
- [7] Lasne F, de Ceaurriz J. *Nature*, 2000, 405(6 787) : 635
- [8] Higuchi M, Oh-eda M, Kuboniwa H, Tomonoh K, Shimomaka Y, Ochi N. *J Biol Chem*, 1992, 267(11) : 7 703
- [9] Rush R S, Derby P L, Smith D M, Merry C, Rogers G, Rohde M F, Katta V. *Anal Chem*, 1995, 67(8) : 1 442
- [10] Yu B, Cong H L, Liu H W, Li Y Z, Liu F. *TrAC*, 2005, 24(4) : 350
- [11] Watson E, Yao F. *Anal Biochem*, 1993, 210(2) : 389
- [12] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*. 4th ed. Strasbourg: EDQM of the Council of Europe, 2002. 1 123, 1 316
- [13] Boss H J, Watson D B, Rush R S. *Electrophoresis*, 1998, 19(15) : 2 654
- [14] Tran A D, Park S G, Lisi P J, Huynh O T, Ryall R R, Lane P A. *J Chromatogr A*, 1991, 542(2) : 459
- [15] Choi D, Kim M, Park J. *J Chromatogr B*, 1996, 687(1) : 189
- [16] Zheng X L, Cao W X. *European Polymer Journal*, 2001, 37(11) : 2 259
- [17] Rambaum A, Noguchi H. *Macromolecules*, 1972, 5 : 261
- [18] Wiktorowicz J E, Colburn J C. *Electrophoresis*, 1990, 11(9) : 769
- [19] Cordova E, Gao J M, Whitesides G M. *Anal Chem*, 1997, 69(7) : 1 370
- [20] Tran A, Barker H, Levi V, Kunitani M. *Anal Chem*, 1998, 70(18) : 3 809
- [21] Sanz-Nebot V, Benavente F, Vallverdu A, Guzman N A, Barbosa J. *Anal Chem*, 2003, 75(19) : 5 220
- [22] Cifuentes A, Moreno-Arribas M V, de Frutos M, Diez-Masa J C. *J Chromatogr A*, 1999, 830(2) : 453
- [23] Zhou Guohua, Luo Guoan, Zhou Yong, Zhou Keyu, Song Qinxin. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (周国华, 罗国安, 周 勇, 周克瑜, 宋沁馨. 分析化学), 1998, 26(3) : 249
- [24] Zhou G H, Lou G A, Zhou Y, Zhou K Y, Zhang X D, Huang L Q. *Electrophoresis*, 1998, 19(13) : 2 348

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

高分辨气相色谱-高分辨质谱测定活性污泥中的多溴联苯醚

王亚伟, 张庆华, 刘汉霞, 江桂斌

(中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要 :建立了利用高分辨气相色谱-高分辨质谱定量测定多溴联苯醚(PBDEs)的方法,参与了测定 PBDEs 的国际比对实验,实验结果表明该法是可行的。对不同地区(北京、山东临沂、上海)的 3 个污水处理厂的活性污泥进行了索氏提取、多层复合硅胶柱分离,然后用所建立的方法测定了 19 种多溴联苯醚单体的含量。结果表明,北京某污水处理厂的活性污泥中 PBDEs 的总量高于其他两者。

关键词 :高分辨气相色谱-高分辨质谱;多溴联苯醚;污泥

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)05-0492-04

Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers in Sewage Sludge by High Resolution Gas Chromatography Coupled with High Resolution Mass Spectrometry

WANG Yawei, ZHANG Qinghua, LIU Hanxia, JIANG Guibin

(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract : Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a group of brominated flame retardants, which are manufactured in large quantities and widely used in a variety of consumer goods. Recently they spread ubiquitously as environmental contaminants. In order to investigate the pollution level of PBDEs in different environmental samples, a method has been established by using high resolution gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HRGC-HRMS). The method was used to analyze biosamples obtained from the international inter-calibration. The results were satisfactory by analyzing *z*-score figures. Then, PBDE contents in three samples of sewage sludge were investigated by the method after Soxhlet extraction and multi-layer silica gel chromatographic separation. The number of PBDEs determined was 19. From the results, we can see that the contamination level of PBDEs in the sample from Beijing was higher than those from two other areas. The method was validated and applied for the analysis of environmental samples.

Key words : high resolution gas chromatography-high resolution mass spectrometry; polybrominated diphenyl ethers; sewage sludge

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, 简称 PBDEs)属于溴代阻燃剂(brominated flame retardants, BFRs)类化合物。由于其优异的阻燃性能,被广泛应用于油漆、纺织品、电路板,特别是电器(如电视、电脑等)中的塑料高聚物中^[1]。

类似于多氯联苯(PCBs),PBDEs 共有 209 个单体,按照 IUPAC 编号系统编号^[2]。PBDEs 作为阻燃剂主要有以下 3 种混合商品^[3,4]:(1)Deca-

BDEs,包括 98%(质量分数,下同)十溴代 BDE 和 2% 九溴代 BDEs;(2)Octa-BDEs,包括 10% 六溴代 BDEs、40% 7-BDEs、30% 8-BDEs 和 20% 4,9-BDEs;(3)Penta-BDEs,包括 40% 4-BDEs、50% 5-BDEs、6% 6-BDEs 和 4% 其他单体。

目前测定 PBDEs 的前处理方法是建立在测定 PCBs 的基础之上的。由于环境样品中含有大量的干扰物质,所以需要样品进行纯化才能进行测定。

收稿日期 2005-07-17

作者简介:王亚伟,男,博士研究生,E-mail:wangyw_123@126.com.

通讯联系人:江桂斌,男,研究员,博士生导师,Tel (010)62849334,E-mail:gbjiang@mail.reeces.ac.cn.

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(国家“973”项目)(No. 2003CB415001).

目前常用的纯化柱有凝胶渗透色谱柱(GPC)^[5]、硅胶柱^[6]、氧化铝柱和弗罗里硅土柱^[5]。常用于检测PBDEs的仪器一般为气相色谱-低分辨质谱(GC-LRMS)^[7]和高分辨色谱-高分辨质谱(HRGC-HRMS)^[8]。而电子捕获检测器(ECD)由于对有机氯化物的响应远高于有机溴化合物,对低浓度溴化物有掩盖,所以只能测定浓度比较高的PBDEs的样品。

1979年,首先在美国的土壤样品和淤泥样品中检测到了BDE-209^[9]。两年后,在瑞典西部Visken河的梭子鱼中发现了PBDEs^[10]。自此不断有在空气、水、底泥甚至人体中检出PBDEs的报道。有关PBDEs在环境介质、生物体及人体组织的含量分布以及在生物链中的迁移富集等已成为过去两年国际环境权威刊物Environmental Science & Technology的报道热点。

我国有关环境中持久性有机污染物(POPs)的研究工作大部分集中于POPs公约中的化合物,而对于目前国际上研究较多的PBDEs的研究工作刚刚起步。据报道,欧盟为了控制PBDEs污染的进一步加剧,已经停止了五溴和八溴联苯醚阻燃剂的生产,美国五大湖公司也表示将于2005年年底停止生产上述两种阻燃剂。同时,欧盟已经发布《报废电子电气设备指令》,明确指出:自2006年7月1日起,进入欧盟市场的8类电气设备不得含有包括PBDEs在内的6种有害物质。这将对我国的电子电气设备出口造成极大的冲击。因此,迫切需要建立测定样品中的PBDEs的方法。本工作在实验室已有的基础上,结合美国环境保护局(EPA)1614草稿规定的方法建立了HRGC-HRMS测定PBDEs的方法,并用于污水处理厂中活性污泥中PBDEs的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪(Wilmington, USA)连接 AutoSpec Ultima 高分辨质谱(Waters Micromass, UK)。

所有试剂(正己烷、二氯甲烷、丙酮、壬烷)均为农残级,购自 Fisher 公司。硅胶(0.063 ~ 0.100 mm)购自 Merck 公司。¹³C 标记添加内标(BDE-LCS),¹³C 标记 PBDE 回收率内标(68A-IS,¹³C PCB52,¹³C PCB138),购自 Wellington 公司。

硅胶的活化:将硅胶盛于蒸发皿中,在马弗炉中于 550 °C 烘烤至少 12 h,然后降温到 180 °C 保持至少 1 h,取出转至烧瓶中加塞密闭,保存于干燥器

中,待用。

酸性硅胶的制备:称取 100 g 活化硅胶置于烧瓶中,逐滴滴入浓硫酸 40 g,置于摇床上振荡,直至硅胶没有结块。

碱性硅胶的制备:于 100 g 活化硅胶中加入 30 g 1 mol/L NaOH,方法同酸性硅胶的制备。

硝酸银硅胶的制备:将 5.6 g AgNO₃ 溶于 21 mL 超纯水中,然后加入 100 g 活化硅胶中,方法同上。然后用铝箔纸将烧瓶包裹,烧瓶口用铝箔疏松盖住,置于干燥烘箱中,于 30 °C 停留至少 5 h,升温至 60 °C 停留 3 h,最后升温至 180 °C 停留至少 12 h,于干燥器中降温加塞密闭,避光保存。

复合硅胶柱的制备:采用干样法自行装填,从下到上依次为 1 g 活化硅胶、4 g 碱性硅胶、1 g 活化硅胶、8 g 酸性硅胶、1 g 活化硅胶、2 g AgNO₃ 硅胶和 4 g 无水硫酸钠。

1.2 活性污泥样品的预处理

3 个活性污泥样品分别采自北京、山东临沂和上海 3 个污水处理厂的终端传送带,用铝箔密封以避光,然后置于冰箱中冷冻。使用前将冷冻的污泥样品放入 Christ Alpha 1-2 型冷冻干燥机中冷冻干燥(一般为 40 h),然后移入研钵中研碎,称取约 5 g 样品,用微量注射器移入 100 μg/L ¹³C 标记添加内标 10 μL,再加入 25 g 无水硫酸钠混匀,用 150 mL 正己烷-二氯甲烷混合液(体积比为 1:1)索氏提取 24 h。

将提取液转入洁净的烧瓶中,加入一定量的酸性硅胶,磁力搅拌约 0.5 h,以去除脂肪等大分子杂质;再将提取液过无水硫酸钠小柱,之后用盐酸处理过的铜粉进行处理以去除提取液中的硫;再将提取液过无水硫酸钠小柱;最后采用旋转蒸发法将提取液浓缩至 2 ~ 3 mL 以便做进一步的处理。

将浓缩好的提取液用复合硅胶柱进行纯化,先用约 70 mL 正己烷洗涤复合硅胶柱,然后上样,用 70 mL 正己烷预淋洗,然后用 70 mL 二氯甲烷-正己烷(体积比为 1:1)混合液洗脱并接取。

将接取的洗脱液旋转蒸发至 1 ~ 2 mL,然后转入 K-D 管中,用高纯氮气吹至 200 μL,转入样品管中吹至 10 μL,再加入 ¹³C 标记 PBDE 回收率内标,准备进样。

1.3 色谱和质谱条件

色谱条件 色谱柱 HP-5(30 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm);柱温程序升温:初始温度 90 °C,保持 2 min,以 25 °C/min 的速度升至 210 °C,保持 1 min,然后以 10 °C/min 的速度升至 275 °C,保持 10 min,再以 25 °C/min 升至 330 °C 并保持 10 min;

载气(氦气)流速为 1.2 mL/min ;无分流进样 ,进样量为 1 μL。

质谱条件 电离方式为电子轰击(EI⁺) ,电子能量为 38 eV ;分辨率10 000 ;源温度 280 ℃ ;采集方式为电压选择离子检测模式(VSIR)。

2 结果与讨论

2.1 国际比对实验

按照 EPA1614 草稿所规定的方法(相对响应因子法(RRF))建立了 5 点定量标准曲线 ,所用标准溶液的质量浓度为 1.0 5.0 50 500 2 500 μg/L。

为了检验该实验方法所得结果的可靠性 ,本实验室参加了 Norwegian Institute of Public Health 组织的测定 PBDEs 的国际比对实验。在此次国际

比对实验中 ,我们共测定了 3 个样品(即由组织者提供的鳕鱼肝脏的油、鲱鱼肉和驯鹿肉)中 PBDEs 的含量。此次国际比对实验的结果草稿已经在网页上公布(参见 <http://www.fhi.no/artikler/?id=53454>) ,正式文稿将在 2005 年多伦多 Dioxin 大会上公布。图 1 为国际比对实验中鳕鱼肝脏的油、鲱鱼肉和驯鹿肉的 z-score 图(本实验室编号为 71)。其中每个实验室的 z-score 是由以下公式计算得到的 $z = (x - X) / \sigma$ 。其中 x 是实验室测定的值 , X 是统一值 , σ 是相对于目标值 20% 的标准偏差。也就是说如果 z-scores 在 +1 和 -1 之间 ,表明该实验室的标准偏差在 ±20% 左右。通过图 1 可以看到 ,本文所建立方法测定结果的标准偏差在 20% 左右 ,说明该法可行。

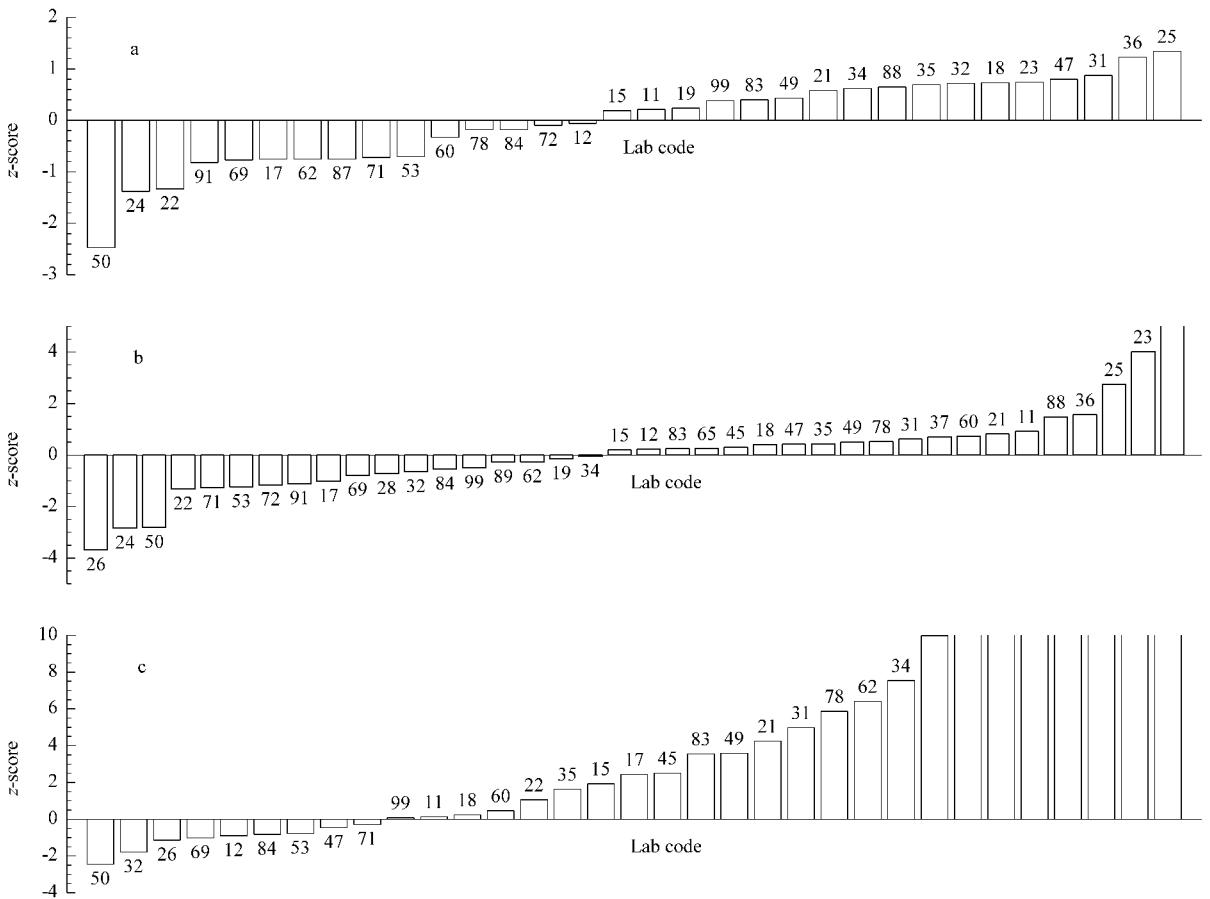


图 1 鳕鱼肝脏的油(a)、鲱鱼肉(b)和驯鹿肉(c)中 PBDEs 测定的国际比对实验结果
Fig.1 The interlaboratory comparison results of determination of PBDEs in cod liver oil (a) , herring meat (b) and reindeer meat (c)

The code of our laboratory is 71. " z = 1 " represents a deviation of 20% from the consensus value. BDE-209 was not determined.

2.2 添加回收率实验

PBDE 分析的预处理复杂 ,步骤繁多 ,获得足够的回收率是准确定性定量的前提。EPA1614 规定 ¹³C BDE-47 ,99 和 153 的回收率必须在 25% 与 150% 之间。表 1 是 3 个国际比对样品所得到的回收率的结果 ,除了驯鹿肉的 ¹³C BDE-99 外 ,其他回

收率结果都符合标准。

表 1 样品的加标回收率

Table 1 Recoveries of ¹³ C-BDE standards in samples %			
Sample	¹³ C BDE-47	¹³ C BDE-99	¹³ C BDE-153
Cod liver oil	83.4	64.4	100.2
Herring meat	77.0	39.6	87.2
Reindeer meat	26.5	23.3	25.7

2.3 实际样品的测定

用所建立的方法测定了 3 个污水处理厂的活性污泥中 19 种 PBDEs 的含量,其结果列于表 2。

表 2 活性污泥中 PBDEs 单体的含量
Table 2 The contents of PBDEs
in dry sewage sludge

PBDE	Sample origin		
	Beijing	Shandong Linyi	Shanghai
BDE-3	16.7	6.8	ND
BDE-7	28.9	23.7	17.9
BDE-15	334.8	487.7	110.6
BDE-17	1135	359.6	200
BDE-28	2015.2	1189.5	257.3
BDE-49	1557.9	611.2	466.3
BDE-71	93	26	19.8
BDE-47	8192.2	2650	1023
BDE-66	1448.3	492.1	222.9
BDE-77	158.1	77.6	76.6
BDE-100	1085.4	ND	157.4
BDE-119	ND	ND	ND
BDE-99	7366.3	177.0	1056.7
BDE-85	9.3	2.5	27
BDE-126	834	26.8	126.8
BDE-154	ND	ND	ND
BDE-153	1696.8	562.7	450.0
BDE-138	ND	ND	ND
BDE-183	1266.2	1304.1	1025.9
Total	27238.1	7997.3	5238.2

从表 2 可以看出,北京某污水处理厂的活性污泥的 PBDEs 含量明显高于其他两个地区。这可能是由于此污水处理厂的污水主要来源(90%以上)是居民生活污水,服务的居民人口远高于其他两个地区的居民人口。上海某污水处理厂的生活污水占总来水量的 65%,而临沂的生活污水占来水总量的 55%。并且在北京此污水处理厂附近有一个自发形成的废旧电器的拆卸以及交易市场。这可能是该地区活性污泥中 PBDEs 含量高于其他两个地区的主要原因。

从表 2 还可以看出,这 3 个地区的污泥样品中含量较高的单体为 BDE-28, 47, 49, 66, 99, 153, 183。

麦碧娴等^[11]曾测定了珠江三角洲地区河流底泥中 PBDEs 的含量,大部分样品的 PBDEs 总量(不包括 BDE-209)大于 50 ng/g(干重)。本实验结果表明这 3 个地区的活性污泥的 PBDE 的含量低于珠江三角洲的底泥的含量。

Öberg 等^[12]测定了瑞典的 22 个污水处理厂的 116 个活性污泥样品中的 PBDEs 含量,发现 PBDEs 的含量在未检出与 450 ng/g(湿重)之间。但大部

分样品的 PBDEs 含量明显高于本文的样品。

North^[13]对加利福尼亚的一个污水处理厂的活性污泥样品中的 PBDEs 含量进行了跟踪调查,发现总的 PBDEs 含量在 61 到 1 440 ng/g(干重)之间,远高于本文样品的测定结果,且其中的主要单体为 BDE-47, 99 和 209。

通过以上比较,我们可以发现此 3 个地区的 PBDEs 污染低于文献[11]所报道的珠江三角洲的污染,也低于文献[12, 13]所报道的欧美国家的污染水平。为了能够确切地比较我国总体 PBDEs 的污染程度,还需要有更多数据的支持。此工作正在本实验室进行。

3 结论

建立了利用同位素标记/高分辨气相色谱-高分辨质谱法测定环境样品中 PBDEs 的方法。国际对比实验表明该法是可行的。利用所建立的方法,对我国 3 个城市的 3 个污水处理厂的活性污泥中的 PBDEs 含量进行了测定,结果表明这 3 个地区的污泥样品中含量较高的单体为 BDE-28, 47, 49, 66, 99, 153, 183。本文所建立的方法可以满足不同领域测定的需求。

参考文献:

- [1] Renner R. Environ Sci Technol, 2000, 34: 223
- [2] Ballschmiter K, Mennel A, Buyten J. Fresenius' J Anal Chem, 1993, 346(4): 396
- [3] Darnerud P O, Eriksen G S, Johannesson T, Larsen P B, Viluksela M. Environ Health Perspect, 2001, 109(Suppl 1): 49
- [4] Hardy M L. Chemosphere, 2002, 46(5): 757
- [5] Haglund P S, Zook D R, Buser H R, Hu J W. Environ Sci Technol, 1997, 31(11): 3 281
- [6] Hale R C, La Guardia M J, Harvey E P, Mainor M T, Duff W H, Gaylor M O. Environ Sci Technol, 2001, 35(23): 4 585
- [7] Ackerman L K, Wilson G R, Simonich S L. Anal Chem, 2005, 77(7): 1 979
- [8] North K D. Environ Sci Technol, 2004, 38: 4 484
- [9] Alaee M, Wenning R J. Chemosphere, 2002, 46(5): 579
- [10] Anderson O, Blomkvist G. Chemosphere, 1981, 10(9): 1 051
- [11] Mai B X, Chen S J, Luo X J, Chen L G, Yang Q S, Sheng G Y, Peng P G, Fu J M, Zeng E Y. Environ Sci Technol, 2005, 39(10): 3 521
- [12] Öberg K, Warman K, Öberg T. Chemosphere, 2002, 48(8): 805
- [13] North K D. Environ Sci Technol, 2004, 38(17): 4 484

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

高效液相色谱法测定山楂中的苦杏仁甙

吕伟峰, 丁明玉

(清华大学化学系 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要 :建立了从山楂中提取苦杏仁甙的方法,样品先用石油醚脱脂,然后用甲醇进行索氏提取。用高效液相色谱法定量测定了山楂中的苦杏仁甙,色谱条件如下:反相 C_{18} 柱,流动相为 15% 的甲醇水溶液,检测波长为 215 nm。测定了含不同比例山楂籽的山楂样品,结果表明含山楂籽比例高的山楂样品中苦杏仁甙的含量高,且山楂粗粒样品中苦杏仁甙的提取量比粉末样品的提取量高。

关键词 :高效液相色谱法;索氏提取;超声提取;苦杏仁甙;山楂

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)05-0496-03

Determination of Amygdalin in Hawthorn by High Performance Liquid Chromatography

LÜ Weifeng, DING Mingyu

(Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology of Ministry of Education, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract : A suitable method for extraction of amygdalin from hawthorn has been established. At first, the lipophilic components were removed with petroleum ether by ultrasonic extraction. The amygdalin was then extracted by methanol in a Soxhlet's apparatus. For quantitation, a high performance liquid chromatographic method was developed by using a reversed-phase C_{18} column, mobile phase of methanol-water (15:85, v/v) and a detection wavelength of 215 nm. It can be concluded that the content of amygdalin is higher in the seeds than that in the hawthorn powder without the seeds and the yield of amygdalin is higher in the hawthorn pieces than that in the hawthorn powder.

Key words : high performance liquid chromatography; Soxhlet extraction; ultrasonic extraction; amygdalin; hawthorn

苦杏仁甙(amygdalin, 化学名为苯羟基乙氰- β -D-葡萄糖-6- β -D-葡萄糖甙, 结构式见图 1)属于芳香族甙,是维生素 B_{17} 的主要成分,它广泛存在于蔷薇科植物的种子中。在苦杏仁甙酶的作用下苦杏仁甙将分解产生氢氰酸,对呼吸中枢产生一定的抑制作用,起到镇咳平喘的功效^[1]。尽管少量的氢氰酸能止咳,但在人体内积累到一定量后氢氰酸会和细胞线粒体中的氧化酶反应而抑制酶的活性,进而抑制组织细胞的呼吸作用而致人死亡^[2]。因此必须限定苦杏仁甙在食物、药物中的含量。

检测苦杏仁甙的方法主要是高效液相色谱法(HPLC)^[3],其他的检测方法虽然也有报道,如气相色谱法^[4]、毛细管电泳法^[5]等等,但 HPLC 以其分离效率高、分析速度快而成为最通用的方法。HPLC

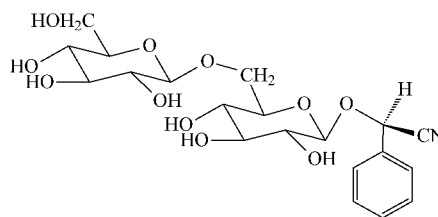


图 1 苦杏仁甙的化学结构

Fig.1 Chemical structure of amygdalin

方法常选用反相 C_{18} 柱作为分离柱,不同浓度的甲醇(或乙腈)水溶液作为流动相,采用紫外检测。

山楂为蔷薇科植物山楂红(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.)或野山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)的干燥成熟果实,其主要

成分包括有机酸和黄酮类化合物等,对这些成分的研究已有不少报道^[6,7]。日本等国家已经开始对从中国进口的山楂提出测定苦杏仁甙含量的要求,但是现在并未发现关于山楂中苦杏仁甙检测方法的报道。本文的研究目的就是优化山楂中苦杏仁甙的提取方法,建立山楂中苦杏仁甙的 HPLC 定量分析方法。本文用石油醚对山楂进行脱脂后用甲醇提取苦杏仁甙,并用 HPLC 对山楂中的苦杏仁甙含量进行检测。

1 实验部分

1.1 仪器及色谱条件

美国惠普公司 HP 1100 系列高效液相色谱仪,由四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)、HP 化学工作站和在线脱气装置组成。色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm)。流动相为 15% (体积分数)的甲醇水溶液,流速为 0.8 mL/min,紫外检测波长为 215 nm,柱温为 30 °C,进样量为 20 μL。所有样品均经 0.45 μm 滤膜过滤后进样。

1.2 样品与试剂

山楂样品由天津双勋堂药业公司提供,苦杏仁甙标准品购自北京化学试剂公司。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 样品处理

实验中所用山楂样品共 5 种:山楂粉、含 7% (质量分数,下同)山楂籽的山楂粉(在山楂粉中添加 7% 山楂籽粉末,下同)、含 20% 山楂籽的山楂粉、山楂粗粒(粉碎时过筛出来的粗颗粒)和含 24% 粗粒的山楂粉(在山楂粉中添加 24% 过筛出来的粗颗粒)。取 5 种山楂样品各 1 g,浸泡在 10 mL 石油醚中,超声提取 15 min。过滤后将残渣用 100 mL 甲醇在 70 °C 水浴条件下索氏提取 5 h。提取液用甲醇定容至 100 mL。

2 结果与讨论

2.1 苦杏仁甙的 HPLC 分析方法的建立

利用 C₁₈ 作固定相,不同体积比的甲醇和水作流动相。当甲醇和水的体积比为 15:85 时,苦杏仁甙和其他成分基本可以达到基线分离(见图 2)。苦杏仁甙在 215 nm 波长下有最大紫外吸收,故紫外检测波长选用 215 nm。

标准曲线:将苦杏仁甙标准品溶于甲醇中,并稀释成系列浓度的标准溶液。以峰面积对相应的苦杏仁甙浓度做标准曲线,得标准曲线的线性回归方程为 $A = 1.2391C + 1.7729$, $r^2 = 0.9986$,其中 A 为

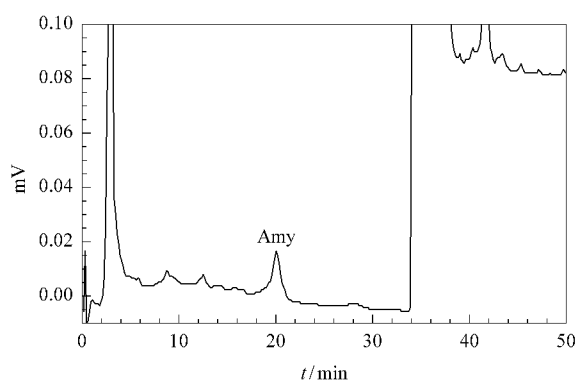


图 2 山楂粉的甲醇提取物的色谱图

Fig.2 Chromatograms of methanol extract of hawthorn powders

Column: C₁₈ (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm). Mobile phase: methanol-water (15:85, v/v). Flow rate: 0.8 mL/min. UV detection: 215 nm.

Amy: amygdalin.

峰面积, C 为质量浓度(mg/L)。结果表明,苦杏仁甙质量浓度在 1~20 mg/L 时,其质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。将最低浓度的标准溶液逐级稀释进样,当信噪比(S/N)为 3 时的浓度即为检出限。测得苦杏仁甙的检出限为 0.2 mg/L。

精密度实验:取质量浓度分别为 5, 10, 15 mg/L 的苦杏仁甙标准液,分别重复进样 5 次,测得峰面积,计算其峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.71%, 0.49% 和 0.88%,说明色谱分析方法具有良好的精密度。

稳定性实验:取同一份样品溶液,于室温下放置,分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 取样,在相同色谱条件下测定峰面积。苦杏仁甙的峰面积基本保持不变,相对标准偏差为 0.40%。说明被测组分在本实验条件下稳定。

加样回收率:取已知含量的纯山楂粉末样品 5 份,分别加入 0.1000 mg 的苦杏仁甙标准品,按样品测定方法处理和测定。计算加样回收率,结果见表 1。由表 1 数据计算得苦杏仁甙的平均回收率为 103.4%, RSD 为 1.05%。说明本方法可靠。

表 1 苦杏仁甙的加样回收率
Table 1 Recovery of amygdalin

No.	Added/mg	Found/mg	Recovery/%
1	0.1000	0.1029	102.9
2	0.1000	0.1041	104.1
3	0.1000	0.1042	104.2
4	0.1000	0.1011	101.1
5	0.1000	0.1045	104.5

2.2 山楂中苦杏仁甙提取方法的优化

苦杏仁甙易溶于甲醇,所以选用甲醇作为提取剂。甄攀等^[8]用甲醇从郁李中提取苦杏仁甙并测

定了含量,马辰等^[9]也用甲醇从苦杏仁中提取苦杏仁甙并进行了含量测定。但甲醇能将一些色素和酯类大分子同时提取出来,在分析过程中污染色谱柱,从而降低柱效,使苦杏仁甙难以和其他物质分离。石油醚是一种非极性溶剂,包括色素和酯类在内的亲脂性物质易溶于其中,而苦杏仁甙难溶于石油醚。所以首先用石油醚除去这些干扰成分。实验表明在石油醚相中检测不到苦杏仁甙,说明苦杏仁甙几乎未被石油醚萃取出来。

索氏提取是中药有效成分提取的最常用方法,由于它的溶剂是循环使用的,所以可以更有效地提取中药的有效成分。选择 70 ℃ 的水浴条件是因为温度太低会使溶剂的循环减慢,而温度太高则导致苦杏仁甙的分解。图 3 是不同提取时间(2, 3, 4, 5, 6 和 7 h)和对应的苦杏仁甙提取量(提取的苦杏仁甙质量与原药材粉末质量之比,下文的“苦杏仁甙的含量”也用此表示)的曲线,从图 3 可以看出 5 h 可以达到提取平衡。

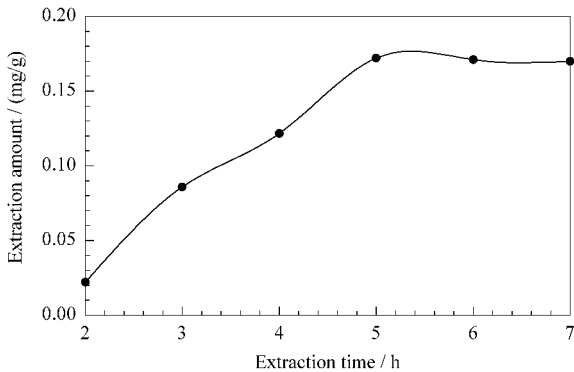


图 3 提取时间对苦杏仁甙提取量的影响
Fig.3 Effect of extraction time on extraction amount of amygdalin

2.3 不同样品形态的山楂中苦杏仁甙的含量

表 2 列出了含不同量山楂籽的山楂粉末和不同形态的山楂中苦杏仁甙的含量。可以看出,随着山楂籽含量的增加苦杏仁甙的含量也在增加。由此可以推断出苦杏仁甙在山楂籽中的含量较高。车凤斌^[10]也曾报道过苦杏仁甙广泛存在于杏、桃、李子、苹果、山楂等多种蔷薇科植物籽和苦扁桃种子中,而且随着粗粒含量的增加测得的苦杏仁甙的含量也在增加。由此可以推断出用山楂粗粒提取苦杏仁甙比用山楂粉提取的量要大。Hwang 等^[11]曾比较了不同形态杏仁中提取出的苦杏仁甙的量,也发现了用粗粒提取时苦杏仁甙的量比用粉末提取的量要高,

原因是苦杏仁甙在与之共存的苦杏仁甙酶(emulsin)的作用下水解,山楂粉末的比表面积大,与苦杏仁甙酶接触充分,促进了苦杏仁甙的水解,造成测得的苦杏仁甙的含量比粗粒山楂低。

表 2 含不同量山楂籽和粗粒的山楂样品中苦杏仁甙的含量
Table 2 The content of amygdalin in hawthorn powder samples with different ratios of seeds and pieces

Hawthorn sample	Content/(mg/g)
Powder only	0.17
Powder containing 7% seeds	1.03
Powder containing 20% seeds	1.32
Powder containing 24% pieces	0.70
Hawthorn fruit pieces	0.83

3 结论

本文建立了一种简便可行的从山楂中提取并定量测定苦杏仁甙的方法:先用石油醚超声提取 15 min,然后采用索氏提取法用甲醇提取残渣 5 h,提取液用 HPLC 方法(C₁₈柱,15%的甲醇水溶液为流动相)检测苦杏仁甙含量。本方法可以用作检测山楂中苦杏仁甙的质量控制方法。从不同样品的分析结果可以得出结论,含山楂籽量大的山楂样品中苦杏仁甙的含量高,而山楂粗粒中苦杏仁甙的提取量比粉末样品的提取量高。

参考文献:

[1] Isozaki T, Matano Y, Yamamoto K, Kosaka N, Tani T. J Chromatogr A, 2001, 923 : 249
 [2] Mu Jing. Information of Chinese Medicine (穆 静. 中医药信息), 2002, 19(3) : 19
 [3] Wasserkrug K, Rassi Z E. J Liq Chromatogr Relat Technol, 1997, 20(3) : 335
 [4] Cairns T, Froberg J E, Gonzales S, Langham W S, Stamp J J, Howie J K, Sawyer D T. Anal Chem, 1978, 50 : 317
 [5] Lim C K. Trends Anal Chem, 1988, 7 : 340
 [6] Svedstrom U, Vuorela H, Kostiaainen R, Huovinen K, Laakso I, Hiltunen R. J Chromatogr A, 2002, 968 : 53
 [7] Chang Q, Zhu M, Zuo Z, Chow M, How K K. J Chromatogr B, 2001, 760 : 227
 [8] Zhen Pan, Wang Debao, Jia Tianjun, Bai Xuemei. Journal of Zhangjiakou Medical College (甄 攀, 王德宝, 贾天军, 白雪梅. 张家口医学院学报), 2002, 19(5) : 13
 [9] Ma Chen, Li Chunhua. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (马 辰, 李春花. 中国实验方剂学杂志), 2000, 6(2) : 16
 [10] Che Fengbin. Science and Technology of Food Industry (车凤斌. 食品工业科技), 1997, 3 : 11
 [11] Hwang E Y, Lee S S, Lee J H, Hong S P. Arch Pharm Res, 2002, 25(4) : 453

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

有机-无机杂化硅胶基质整体柱的制备及其电色谱性能

严丽娟^{1,2}, 张庆合^{1,3}, 李彤^{1,3}, 张维冰³, 冯钰琦², 张丽华³, 张玉奎³

(1. 大连依利特分析仪器有限公司, 辽宁 大连 116011; 2. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072; 3. 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: 采用溶胶-凝胶法, 以四乙氧基硅烷和苯基三乙氧基硅烷作为反应单体, 通过酸碱两步催化在毛细管中进行原位缩聚反应, 制备了新型有机-无机杂化硅胶基质毛细管整体柱, 制备过程简单。整体柱基质中均匀分布的苯基基团可直接用于反相毛细管电色谱的分离, 因而不需要对基质再进行衍生化。优化了整体柱的制备条件, 采用扫描电镜和压汞法对整体柱的微观结构和孔径分布进行了表征。分别考察了溶胶-凝胶初始反应液中水的用量对柱床结构的影响和两种单体的对比对材料孔径分布的影响。研究了稠环芳烃类化合物在整体柱上的保留行为, 用所制备的整体柱分离了 7 种苯酚类化合物, 平均柱效达 100 000 塔板/m。

关键词: 整体柱; 毛细管电色谱; 溶胶-凝胶法; 有机-无机杂化材料

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)05-0499-05

Preparation and Evaluation of Organic-Inorganic Hybrid Silica-Based Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography

YAN Lijuan^{1,2}, ZHANG Qinghe^{1,3}, LI Tong^{1,3}, ZHANG Weibing³,
FENG Yuqi², ZHANG Lihua³, ZHANG Yukui³

(1. Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd., Dalian 116011, China; 2. College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 3. National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: A new type of organic-inorganic hybrid porous silica-based monolithic columns was developed for reversed-phase capillary electrochromatography (RP-CEC). The monolithic columns were prepared from *in situ* co-condensation of tetraethoxysilane (TEOS) and phenyltriethoxysilane (PTES) precursors via a two-step catalytic sol-gel procedure in the capillary to create phenyl groups distributed throughout the silica matrix for chromatographic interaction. The functionalized monolithic stationary phase was created without additional surface derivatization. The reaction conditions for the preparation of the monolithic columns were optimized. The structure and pore size distribution of the monolithic columns were characterized by scanning electron microscopy and mercury porosimetry, respectively. The effect of water concentration on the column structure was studied, and the influence of the ratio of two precursors on the pore size distribution was also investigated. The retention behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons on the monolithic column is discussed. Seven phenols were also separated with an average efficiency over 100 000 plates/m.

Key words: monolithic columns; capillary electrochromatography; sol-gel; organic-inorganic hybrid materials

通过原位聚合的方法在色谱柱中形成连续、多孔的整体固定相床层是近年发展起来的一种新型色谱分离介质^[1]。毛细管整体柱克服了开管柱相比不足的缺陷, 同时也避免了颗粒填充柱需要烧结塞

子的麻烦, 具有制备简单、渗透性好、传质速率高等优点^[2], 在反相色谱^[3]、正相色谱^[4]、离子交换色谱^[5]、亲和色谱^[6]、体积排阻色谱^[7]和手性色谱^[8]等中应用取得了很好的效果。根据材料的种类, 整

收稿日期: 2005-07-20

作者简介: 严丽娟, 女, 博士研究生, E-mail: lj_yan@hotmail.com.

通讯联系人: 张庆合, 男, 博士, 副教授, Tel: (0411) 83641666, E-mail: zhangqinghe@mail.china.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 20105006).

体柱可分为有机聚合物整体柱^[9,10]和硅胶基质整体柱^[11,12]两种类型。聚合物整体柱的优点是制备方法简单、耐酸碱性好,可通过改变致孔剂、单体和交联剂的比例方便地调节固定相的结构和孔径分布,在分离生物大分子方面具有一定的优势,然而其溶胀效应会影响固定相的稳定性和机械性能。硅胶基质整体柱的制备通常采用溶胶-凝胶法,方法为四甲氧基硅烷和聚环氧乙烷于毛细管中在酸催化条件下发生水解和缩聚反应,然后经过老化和干燥处理,形成具有微米级通孔和纳米级中孔的双孔结构整体柱,再在柱上进行衍生化反应以键合上不同的官能团。硅胶基质整体柱具有机械强度高,可单独调控硅胶骨架和通孔大小的特点,但是硅胶骨架在干燥过程中极易收缩和断裂,且通过改性在表面引入功能团的过程比较复杂,重复性也不太理想。因此,发展新型毛细管电色谱整体柱是目前电色谱研究领域非常重要的课题之一。

采用溶胶-凝胶法可以在温和条件下制备有机-无机杂化材料。这种材料中同时存在有机和无机组分,无机部分可提供机械强度稳定的聚合骨架,而结合于无机相上且均匀分布的有机基团可以改善材料的性能^[13]。通过在反应物中加入具有色谱保留基团的功能化单体,制备出杂化基质的色谱固定相,避免了传统硅胶基质整体柱所需的化学改性步骤,从而提高了制备的重现性。我们曾采用溶胶-凝胶法,以四乙氧基硅烷和 3-氨基三乙氧基硅烷作为反应单体,结合超分子模板技术制备了含有氨基基团的杂化基质毛细管整体柱,并在弱阴离子交换模式下分离了酸性样品^[14]。通过改变反应液中功能化单体的种类,可以制备出含有不同功能基团的杂化材料,以满足不同的分离需要。

本文采用两步催化的溶胶-凝胶法制备了有机-无机杂化硅胶基质整体柱。实验中通过加入盐酸和十二胺两种催化剂来调节反应过程的 pH 值,从而控制单体水解和缩聚反应速率;通过改变反应物配比来控制柱床的孔结构。以苯基三乙氧基硅烷 (PTES) 作为功能化单体,整体柱中均匀分布的苯基基团为色谱分离提供了反相色谱保留作用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE System 5010 毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司)。熔融石英毛细管(75 μm i. d. \times 375 μm o. d., 河北永年光导纤维厂)。P200 II 型液相色谱泵(大连依利特分析仪器有限公司)用于冲洗毛细管柱。JSM-6360LV 型扫描电子显微

镜(日本 JEOL 公司)用于表征整体柱的微观结构。Pore Sizer 9310 型压汞孔径测试仪(美国 Micromeritics 公司)用于表征整体材料的孔径分布。

四乙氧基硅烷(TEOS)、苯基三乙氧基硅烷和十二胺购自美国 Acros 公司;甲醇和乙腈为色谱纯;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、无水乙醇、硫脲、稠环芳烃类(PAHs)和苯酚类化合物购自上海化学试剂公司,均为分析纯。实验用水由德国 SG 公司的 CLEAR 超纯水设备制得。样品先用乙腈溶解,混合后再用流动相稀释至质量浓度为 0.01 ~ 0.05 g/L。流动相的 pH 值在加入有机改性剂之前测定,流动相在使用前超声脱气 15 min。

1.2 整体柱的制备

1.2.1 毛细管的预处理

对毛细管管壁进行预处理,以增大管壁上硅羟基的密度,达到固定柱床的目的。将毛细管柱依次用 0.2 mol/L 盐酸、水、1.0 mol/L 氢氧化钠、水分别冲洗 30 min,于 160 $^{\circ}\text{C}$ 下通氮气吹干。

1.2.2 整体柱的制备

将 200 μL 甲醇、10 μL 0.5 mol/L 盐酸和一定体积的水混合均匀,然后加入一定体积的 TEOS 和 PTES,涡流搅拌 3 min 后,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中水解 4 h。冷却至室温后,加入 15 mg 十二胺并混合均匀,充入预处理过的毛细管中,两端封口,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 h。然后用无水乙醇冲洗毛细管柱以除去表面活性剂十二胺,最后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥 48 h。以不同配比的反应液(见表 1)制备了 3 根整体柱。

表 1 以不同配比的反应液制备整体柱
Table 1 Compositions of original sol solutions for preparation of monolithic columns

Column	$V(\text{TEOS})/\mu\text{L}$	$V(\text{PTES})/\mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O})/\mu\text{L}$
A	90	70	20
B	90	70	30
C	92	68	20

TEOS: tetraethoxysilane; PTES: phenyltriethoxysilane.

1.3 整体柱的表征

截取 5 mm 长的毛细管整体柱,在其横截面处镀金,用扫描电镜对整体柱的微观结构进行表征。取 10 倍份的反应液,将其混合均匀后注入 100 mm \times 2.0 mm i. d. 不锈钢液相色谱柱管中,在上述相同条件下进行反应,用压汞仪测定制得的固定相的孔径分布。

1.4 电色谱实验条件

利用整体柱 A 对整体柱的电色谱性能进行评价。毛细管柱总长为 27 cm,有效长度为 20 cm,采用电动方式进样(3 kV 3 s),分离温度为 20 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为 214 nm,以硫脲作为电渗流标记物,数据

采集频率为 16 Hz。流动相采用不同体积比的乙腈与 5 mmol/L Tris-HCl 的缓冲溶液。

2 结果与讨论

2.1 制备条件的优化

实验研究了两种单体的配比、水的用量和溶液 pH 值等实验条件对制备整体柱的影响。

改变单体的配比可控制反应体系的相分离和溶胶-凝胶过程,从而改变固定相的骨架结构。当其他条件不变时,随着反应液中 PTES 比例的增大,得到的硅胶骨架和通孔孔径都增大,通透性变好。

水是水解反应中必要的反应物,同时又是缩聚反应的产物,在溶胶-凝胶过程中是必不可少的。然而过量的水一方面催化水解反应,另一方面又抑制缩聚反应。实验发现,其他条件不变时,水的用量增加,聚合速度减慢,形成的凝胶的机械强度增强,但柱床的通透性变差。

溶胶-凝胶过程中的水解和缩聚反应与体系的

pH 值有紧密联系。酸性条件下,水解速率大于缩聚速率,而在碱性条件下,缩聚速率大于水解速率^[15]。本实验采用反应过程中改变溶液 pH 的两步催化的溶胶-凝胶法,首先在酸催化条件下发生水解反应,以产生足够的硅羟基,然后加入碱性催化剂以加快缩聚反应的进行,这样可以有效控制水解和缩聚反应速率,单体的水解和缩聚反应都能够进行完全。

2.2 整体材料的表征

2.2.1 微观结构

图 1 是在两种不同条件下制备的整体柱横截面扫描电镜图。制备整体柱的初始反应液中水的添加量分别是 20 μL 和 30 μL , TEOS 与 PTES 的体积比均为 90/70,其他制备条件相同。从图 1 中可以看出,整体柱 A 与 B 的微观结构有很大的差异。反应液中水量较多的体系(柱 B),生成的骨架颗粒较小,聚集更致密。柱 A 结构均匀且连续,呈较规则的球形硅胶聚集结构,与柱 B 相比,骨架和通透孔较大,大的通孔提供了较好的通透性。

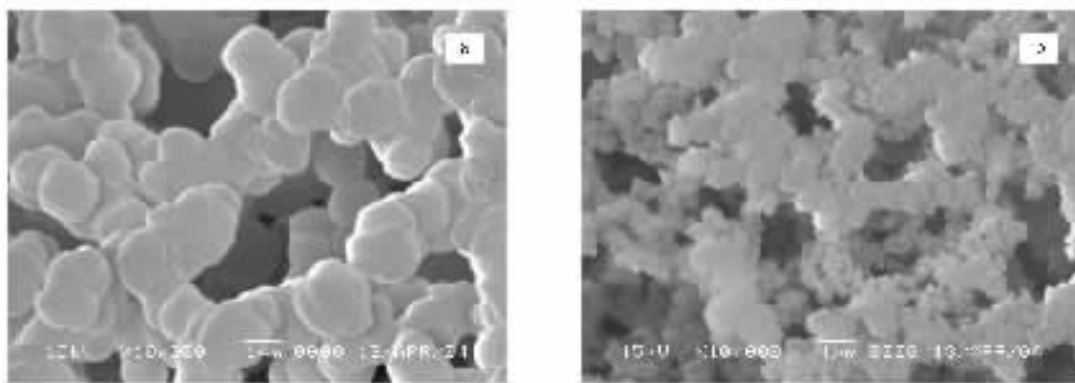


图 1 整体柱 A (a) 和 B (b) 的横截面扫描电镜图

Fig.1 Scanning electron microscope images of the cross-sectional view of monolithic columns A (a) and B (b)

Preparation conditions : 20 μL and 30 μL of water in original sol solutions for columns A and B, respectively ; and the volume ratio of 90:70 of TEOS and PTES in original sol solutions for both columns A and B.

2.2.2 孔径分布

图 2 是不同单体配比条件下制备的整体柱的孔径分布图。柱 A ($V(\text{TEOS})/V(\text{PTES}) = 90/70$) 的大孔主要分布在 5 μm 左右,孔容为 2.91 cm^3/g ,而柱 C ($V(\text{TEOS})/V(\text{PTES}) = 92/68$) 的大孔主要分布在 0.8 μm 左右,孔容为 2.20 cm^3/g 。产生这种差别的原因可能是由于随着 TEOS 与 PTES 比例的增大,相分离过程滞后,导致大孔的孔径减小。

2.3 整体柱性能的评价

2.3.1 电压对流速的影响

实验研究了电渗流与电压的关系,结果如图 3 所示,可以看出电压从 4 kV 增大至 27 kV 时,电渗流的线速度随着分离电压的增高而线性增大,表明在实验操作电压范围内,内径 75 μm 的毛细管整体

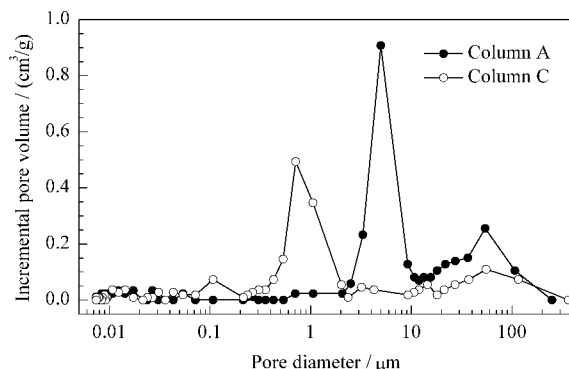


图 2 压汞法测定整体柱的孔径分布图

Fig.2 Incremental pore size distribution profile measured by mercury porosimetry

Column A : $V(\text{TEOS})/V(\text{PTES}) = 90/70$; Column C : $V(\text{TEOS})/V(\text{PTES}) = 92/68$.

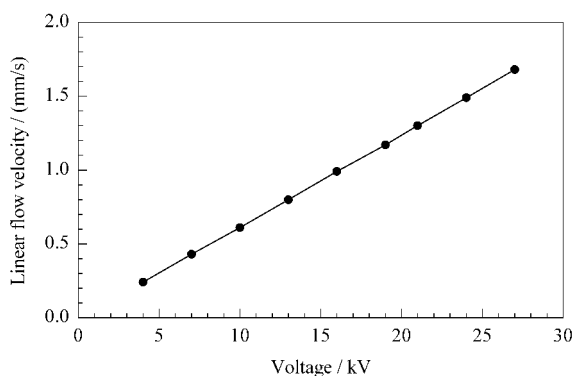


图 3 分离电压对电渗流流速的影响

Fig.3 Effect of applied voltage on linear velocity of electroosmotic flow through the monolithic column

Mobile phase : 5 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 70% acetonitrile.

柱系统中产生的焦耳热效应不明显,因此可以忽略由于焦耳热效应可能产生的温度梯度引起的流速梯度。

2.3.2 稠环芳烃类化合物在整体柱上的保留行为

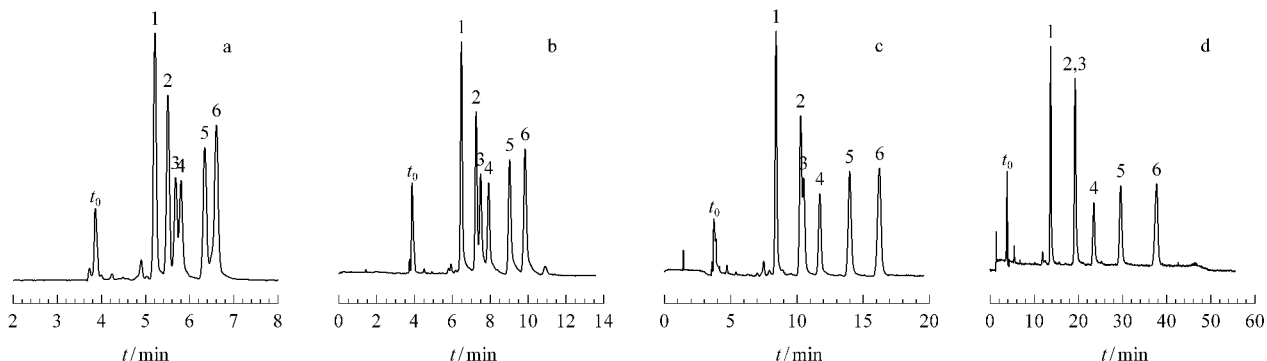


图 4 稠环芳烃类样品在整体柱 A 上的分离谱图

Fig.4 Electrochromatograms of PAHs on column A

Experimental conditions : mobile phase , 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) containing various proportions of acetonitrile , a. 80% ; b. 70% ; c. 60% ; d. 50% . Applied voltage : 13 kV.

1. naphthalene ; 2. acenaphthene ; 3. fluorene ; 4. anthracene ; 5. pyrene ; 6. triphenylene.

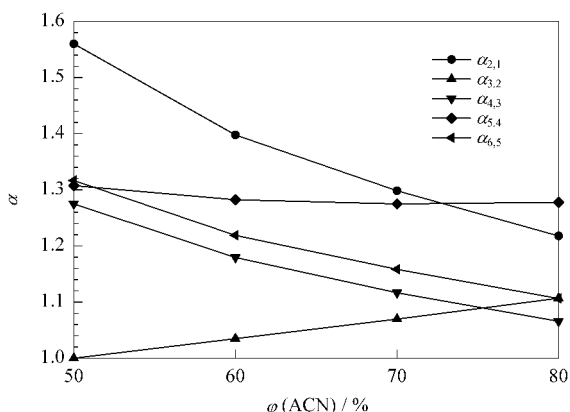


图 5 流动相中乙腈的含量对 PAHs 分离因子 alpha 的影响

Fig.5 Effect of acetonitrile content in mobile phase on separation factor alpha of PAHs

Suffixes of alpha , 1 , 2 , ... , 6 , are the peak No. in Fig. 4.

图 4 是在流动相中乙腈含量不同的条件下,6 种 PAHs 在整体柱 A 上的分离谱图。各化合物的保留随着乙腈含量的增大而减小,并按照其疏水性大小顺序流出。图 5 比较了各相邻稠环芳烃化合物的分离因子随流动相中乙腈含量变化的规律,可以看出随着流动相中乙腈含量的增加,芴和萘的分离因子 alpha_{3,2} 增大,蒽和葱的分离因子 alpha_{5,4} 基本恒定,而其他相邻溶质的分离因子都减小。为了从理论上解释该现象,用式(1)~式(3)对实验数据进行了分析评价,结果如表 2 所示。

$$\lg k = a + bC_B \quad (1)$$

其中系数 b 表示在固定相表面上一个溶质分子可以顶替溶剂分子的个数,与溶质和流动相组分分子结构有关,也与固定相的表面形态及性质有关。

$$\alpha_{2,1} = k_2/k_1 \quad (2)$$

由式(1)和式(2)可以得到:

$$\lg \alpha_{2,1} = (a_2 - a_1) + (b_2 - b_1)C_B = \Delta a + \Delta bC_B \quad (3)$$

从表 2 中还可以看出,芴和萘的 Delta b 值大于零,说明其分离因子 alpha_{3,2} 随着流动相中乙腈含量的增加而增大,蒽和葱的 b 值大小接近,其分离因子 alpha_{5,4} 几乎不随流动相中乙腈含量的变化而变化;而其他相邻洗脱化合物的 Delta b 值均小于零,因此它们的分离因子都随流动相中乙腈含量的提高而减小。

2.3.3 苯酚类样品的分离

酚类化合物是一类重要的环境污染物,因此本文利用整体柱 A 对 7 种苯酚类化合物进行了分离。在流动相中乙腈含量为 50% 的条件下,7 种化合物实现了基线分离(见图 6),且峰形对称,平均柱效达 100 000 塔板/m。相同条件下连续进样 7 次,死时间和样品保留因子的相对标准偏差分别小于 0.82% 和 1.45%,说明整体柱具有较好的分离重现性。

表2 溶质的保留因子 k 与流动相中乙腈含量 (C_B , 体积分数) 的线性关系Table 2 Linear relationships between acetonitrile content (C_B , %, v/v) in mobile phase and retention factor k for PAHs

Peak No. in Fig. 4	Compound	$\lg k = a + bC_B$	r	Δb
1	naphthalene	$\lg k = 1.84459 - 2.88297C_B$	0.9995	-0.35483
2	acenaphthene	$\lg k = 2.20958 - 3.23780C_B$	0.9991	0.14696
3	fluorene	$\lg k = 2.13611 - 3.09084C_B$	0.9990	-0.25715
4	anthracene	$\lg k = 2.36649 - 3.34799C_B$	0.9988	-0.03241
5	pyrene	$\lg k = 2.49663 - 3.38040C_B$	0.9985	-0.24939
6	triphenylene	$\lg k = 2.73702 - 3.62979C_B$	-0.9982	

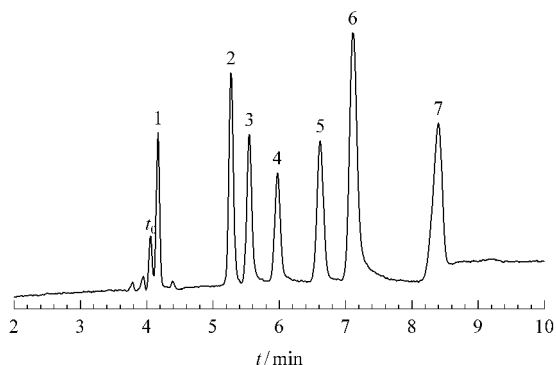


图6 苯酚类化合物在整体柱 A 上的分离谱图

Fig. 6 Electrochromatogram of phenols on column A

Experimental conditions: mobile phase, 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) containing 50% ACN; applied voltage: 10 kV.

Solutes: 1. hydroquinone; 2. phenol; 3. *m*-nitrophenol; 4. *p*-chlorophenol; 5. 2,3-dimethylphenol; 6. 2,4-dichlorophenol; 7. *o*-nitrophenol.

3 结论

采用四乙氧基硅烷和苯基三乙氧基硅烷作为反应单体,通过两步催化溶胶-凝胶过程制备了有机-无机杂化硅胶基质整体柱,优化了制备条件,制得的整体柱具有孔结构均匀、通透性好、分离效率高和重现性好等优点。以所制得的整体柱在反相电色谱模

式下分离了稠环芳烃类和苯酚类样品,取得了较好的分离效果,表明这种新型毛细管整体柱在电色谱研究中具有较好的发展前景。

参考文献:

- [1] Zou H, Huang X, Ye M, Luo Q. J Chromatogr A, 2002, 954:5
- [2] Svec F. J Sep Sci, 2005, 28:729
- [3] Okanda F M, El Rassi Z. Electrophoresis, 2005, 26:1988
- [4] Allen D, El Rassi Z. J Chromatogr A, 2004, 1029:239
- [5] Xie C, Hu J, Xiao H, Su X, Dong J, Tian R, He Z, Zou H. J Sep Sci, 2005, 28:751
- [6] Bedair M, El Rassi Z. J Chromatogr A, 2005, 1079:236
- [7] Peters E C, Petro M, Svec F, Fréchet J M J. Anal Chem, 1998, 70:2296
- [8] Chen Z, Nishiyama T, Uchiyama K, Hobo T. Anal Chim Acta, 2004, 501:17
- [9] Bedair M, El Rassi Z. Electrophoresis, 2004, 25:4110
- [10] Hilder E F, Svec F, Fréchet J M J. Electrophoresis, 2002, 23:3934
- [11] Allen D, El Rassi Z. Electrophoresis, 2003, 24:3962
- [12] Siouffi A M. J Chromatogr A, 2003, 1000:801
- [13] Li W, Fries D P, Malik A. J Chromatogr A, 2004, 1044:23
- [14] Yan L, Zhang Q, Zhang J, Zhang L, Li T, Feng Y, Zhang L, Zhang W, Zhang Y. J Chromatogr A, 2004, 1046:255
- [15] Fidalgo A, Rosa M E, Ilharco L M. Chem Mater, 2003, 15:2186

书讯

《色谱原子光谱/质谱联用技术及形态分析》

作者:胡斌 江祖成 估价:40元 出版单位:科学出版社 出版日期:2005年8月

元素形态分析是21世纪分析化学中发展最快的研究领域之一,而各种色谱(包括电泳)与原子光谱/质谱联用技术则是元素形态分析最有效的手段。本书详细介绍了自20世纪90年代以来联用技术及元素形态分析的研究成果及发展趋势。内容包括元素形态分析中的试样前处理技术、非色谱原子光谱/质谱联用技术、色谱(包括气相色谱、液相色谱、毛细管电泳)、原子光谱/质谱联用技术以及环境和生物体系中元素形态分析等。

本书可供从事分析化学、环境化学、临床医学、药学、生物无机化学等领域的科研人员参考,也可作为高等院校相关专业的教师和研究生的教学参考书。

购书者请与科学出版社联系,电话(010)64033515,联系人:黄海。

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞!

酯型十八烷基键合硅胶整体柱的制备、表征及性能评价

王利娟¹, 杨更亮^{1,2}, 李 煦¹, 李晓瑜¹, 尹俊发²,
李志伟^{1,2}, 高文惠³, 杨 静⁴, 陈 义²

(1. 河北大学药学院, 河北 保定 071002; 2. 中国科学院化学研究所分子科学中心, 北京 100087;
3. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 4. 中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要 将硅烷偶联剂 γ -(2,3-环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷与十八酸反应,再键合到硅胶整体柱上,得到了酯型十八烷基键合固定相,并用红外光谱、元素分析对其进行了表征。在以甲醇-水为流动相的反相色谱条件下分离了苯、联苯和蒽的混合样品,评价了该整体柱的色谱性能,考察了该整体柱适用的 pH 范围,以及柱压降、柱效与流速的关系。结果表明,该硅胶整体柱键合效果良好,具有较好的反相色谱性能,且在 pH = 2 ~ 8 时稳定性好,柱压降、柱效受流速影响较小,可有效地用于化合物的快速分离分析。

关键词 硅烷偶联剂;酯型十八烷基键合硅胶整体柱;反相液相色谱

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)05-0504-04

Synthesis, Characterization and Evaluation of Octadecyl Ester-Bonded Monolithic Column

WANG Lijuan¹, YANG Gengliang^{1,2}, LI Xu¹, LI Xiaoyu¹, YIN Junfa²,
LI Zhiwei^{1,2}, GAO Wenhui³, YANG Jing⁴, CHEN Yi²

(1. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Molecular Science Center, Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100087, China; 3. College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 4. China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

Abstract: An ester-bonded monolithic silica column for reversed-phase high performance liquid chromatography was synthesized by reacting stearic acid with γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane and coupling the intermediate product onto monolithic silica column. Characterization of the prepared column was carried out with Fourier transformation infrared spectrometry and elemental analysis. The chromatographic properties of the packing were evaluated by using benzene, biphenyl, and anthracene as samples and methanol-water as binary mobile phase. The column back-pressure and separation effect were also evaluated for fast separation. The results show that the stationary phase has satisfactory chromatographic properties and resists hydrolysis between pH = 2 - 8, and it can be used for the fast-separation of solutes efficiently.

Key words: silane coupling agent; octadecyl ester-bonded monolithic silica column; reversed-phase liquid chromatography

硅胶整体柱是近几年才出现的新型色谱柱,它打破了传统液相色谱柱的概念,克服了传统液相色谱填充柱的诸多缺点^[1,2],因此引起了色谱界的关注。1996年 Minakuchi 等首先制备了连续的硅胶整体柱^[3],随后又推出了新柱型 ChromolithTM,并得到了应用^[4]。硅胶整体柱同时具有通孔(亦称大

孔)和中孔双孔结构,空隙率大于 80%,因此,具有阻力小、适于极性及流速梯度洗脱等优点,适用于高通量分析和快速分离分析。

硅胶整体柱可以在正相色谱模式下直接使用^[5]。除此之外,应用于液相色谱的硅胶整体柱均需进行改性或修饰,得到各种键合相整体柱以适应

收稿日期 2005-05-19

作者简介:王利娟,女,硕士研究生。

通讯联系人:杨更亮,男,教授,博士生导师,主要从事药物分析、色谱理论及技术研究,E-mail: ygl@mail.hbu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 20375010)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目、教育部优秀青年教师资助计划项目、中国科学院“百人计划”项目。

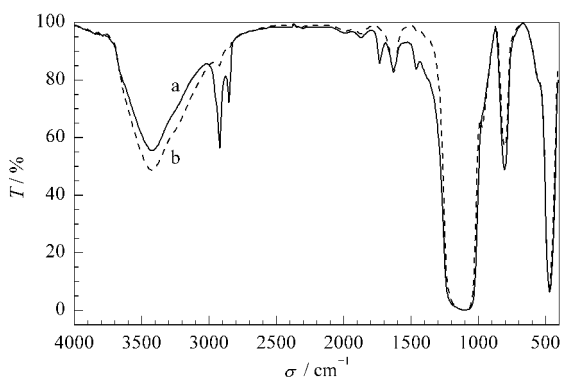


图 2 酯型十八烷基键合硅胶 (a) 和经酸处理硅胶 (b) 的红外光谱图

Fig. 2 IR spectra of octadecyl ester-bonded silica (a) and silica after acid treatment (b)

2.2 色谱性能测试及稳定性研究

以甲醇-水混合液作流动相,通过改变甲醇和水的比例,考察苯、联苯和蒽等多环芳烃在该键合十八烷基硅胶整体柱上的保留特性,结果见表 1。

表 1 流动相组成对溶质保留行为的影响

Table 1 Effect of the composition of mobile phases on retention times of solutes min

Solute	V(MeOH): V(H ₂ O)				
	75:25	60:40	55:45	50:50	45:55
Benzene	0.810	0.911	0.920	1.018	1.063
Biphenyl	0.969	1.593	1.695	2.803	3.627
Anthracene	1.183	2.573	3.401	5.817	8.294

Mobile phase : methanol-water ; flow rate : 1.0 mL/min ; detection wavelength : 254 nm ; temperature : 25 °C.

从表 1 可见,随着流动相中甲醇含量的降低,多环芳烃的保留时间逐渐增大,表明该键合硅胶整体柱对多环芳烃具有反相保留特性。图 3 给出了测试溶质在该柱上的色谱分离图,可以看出,测试溶质的流出顺序与传统反相柱一致,且可以达到较好的分离效果。但与商品化的硅胶整体柱相比,该柱柱效

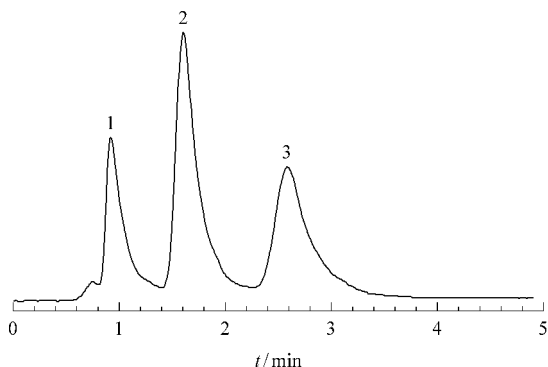


图 3 测试溶质的分离色谱图

Fig. 3 Chromatogram of test solutes

Conditions : mobile phase , 60% CH₃OH aqueous solution ; flow rate , 1.0 mL/min ; detection wavelength , 254 nm ; temperature , 25 °C.

1. benzene ; 2. biphenyl ; 3. anthracene.

偏低,峰容量较小,原因可能是(1)柱体包覆时,在柱体居中和柱端面处理上还不尽完善,这一问题有望通过改进包覆方法进行解决(2)键合工艺还有待于进一步改良,以提高键合率,这一部分工作正在进行之中。如果上述两个问题能够得到解决,该键合硅胶整体柱的色谱性能应该会有很大提高。

对该柱的稳定性进行了考察。该柱在经过 2 500 倍柱体积的甲醇-水(体积比为 60:40)溶液冲洗后,柱效基本无变化。同时还考察了该柱的 pH 稳定性,在分别经过 1 000 倍柱体积的 pH 2, 5 和 8 的甲醇-水(体积比为 60:40,以磷酸盐和柠檬酸调节酸度)溶液冲洗后,柱效基本无变化。由此可见,该键合硅胶整体柱具有良好的稳定性。

2.3 柱压降与流速的关系

考察了硅胶整体柱柱压降随流速的变化关系,并与填充 5 μm 硅胶填料的 50 mm × 4.6 mm i. d. 填充柱比较,结果见图 4。

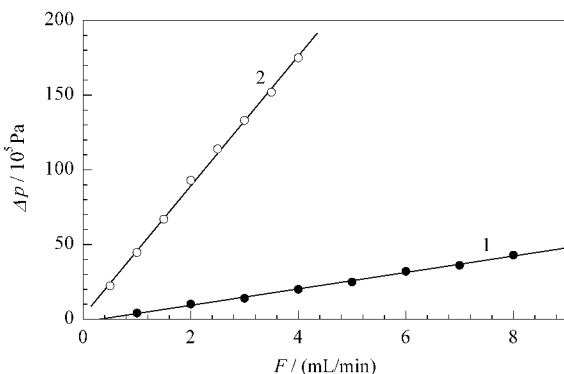


图 4 在硅胶整体柱(1)和微粒填充柱(2)上柱压降 Δp 与流速 F 之间的关系

Fig. 4 Column back pressure Δp vs flow rate F of mobile phase on a monolithic silica column (1) and a microparticulate column(2)

Other conditions as in Fig. 3.

从图 4 可以看出,柱压降随流速的变化呈线性关系,硅胶整体柱随流速增大柱压降的增幅明显小于微粒型填充柱,表明该柱空隙率高、渗透性强。因此,该整体柱不仅可用于极性梯度洗脱,而且十分适用于流速梯度洗脱,这对物质的快速分离极为有利。

2.4 柱效与流速的关系

高效快速分离是硅胶整体柱的突出优点。虽然目前本实验室所制备的十八烷基键合硅胶整体柱柱效偏低,但也已经充分体现这一优点。图 5 给出了不同流速下多环芳烃在十八烷基键合硅胶整体柱上的分离色谱图。由图 5 可以看出,随着流动相流速的增加,测试溶质的保留时间逐渐缩短,但分离效果并无明显改变。以蒽计算,流速由 1 mL/min 提高到 3 mL/min 时,分离速度提高了将近 3 倍,而柱

效下降并不明显。这充分体现出硅胶整体柱高效快速分离的优势。如果将这种色谱柱应用于实际分离分析工作,将会大大提高样品的分离分析通量和工作效率,这是颗粒型填充柱难以媲美的。

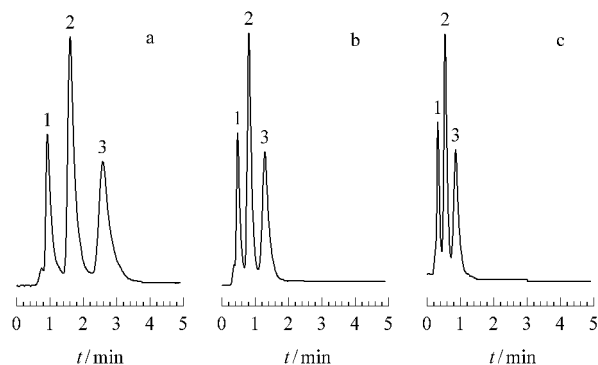


图5 测试溶质在不同流速下的分离色谱图

Fig.5 Chromatograms of test solutes on monolithic silica column at different flow rates

Flow rates : a. 1 mL/min ; b. 2 mL/min ; c. 3 mL/min.

Other conditions as in Fig. 3.

1. benzene ; 2. biphenyl ; 3. anthracene.

3 结论

本文制备了酯型十八烷基键合硅胶整体柱,评价了其色谱性能及稳定性,并考察了柱压降、分离效果与流速的关系。结果表明,该酯型十八烷基键合硅胶整体柱在反相色谱体系中对溶质具有保留特性,随着流动相流速的增大,分离效果无显著变化。与颗粒型填充柱相比,酯型十八烷基键合硅胶整体柱随流速增大柱压降增幅较小,表明该柱空隙率高、渗透性强。因此,该整体柱不仅可用于极性梯度洗

脱,而且十分适用于流速梯度洗脱,这对物质的快速分离极为有利。关于该键合硅胶整体柱批量制备的重复性考察正在进行之中,我们将另文报道。

参考文献:

- [1] Cabrera K, Lubda D, Sinz K, Schäfer C. Am Lab, 2001, 33(4): 40
- [2] Tanaka N, Kobayashi H, Nakanishi K, Minakuchi H, Ishizuka N. Anal Chem, 2001, 73(15): 420A
- [3] Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N. Anal Chem, 1996, 68(19): 3498
- [4] Rabel F, Cabrera K, Lubda D. Am Lab, 2000, 32(24): 20
- [5] Gao Wenhui, Yang Gengliang, Yang Jing, Liu Haiyan, Yin Junfa, Chen Yi. Chinese Journal of Analytical Chemistry (高文惠, 杨更亮, 杨静, 刘海燕, 尹俊发, 陈义. 分析化学), 2004, 32(3): 295
- [6] Tanaka N, Kinoshita H, Araki M, Tsuda T. J Chromatogr A, 1985, 332: 57
- [7] Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N. J Chromatogr A, 1997, 762: 135
- [8] Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N. J Chromatogr A, 1998, 797: 121
- [9] Chang S H, Gooding K M, Regnier F E. J Chromatogr, 1976, 120(2): 321
- [10] Long Yuande, Yang Xiaoye, Huang Tianbao. Chinese Journal of Chromatography (龙远德, 杨晓晔, 黄天宝. 色谱), 1999, 17(4): 339
- [11] Gao Wenhui, Yang Gengliang, Yang Jing, Liu Haiyan. Turkish Journal of Chemistry, 2004, 28(3): 379
- [12] Gao Wenhui, Yang Gengliang, Yang Jing, Liu Haiyan, Yin Junfa, Chen Yi. Chemical Journal of Chinese Universities (高文惠, 杨更亮, 杨静, 刘海燕, 尹俊发, 陈义. 高等学校化学学报), 2004, 25(12): 2250
- [13] Liu Guoquan, Yu Xin, Zhao Rui. Chinese Patent (刘国诠, 喻昕, 赵睿. 中国专利), 99111257. 1. 1999

书讯

《现代色谱法在药物分析中的应用》

作者: 孙毓庆 王延琮 估价: 70元 出版单位: 科学出版社 出版日期: 2005年9月

本书是现代色谱技术的专著。全书共10章,可分为4部分: 1. 绪论与样品预处理; 2. 色谱基础理论; 3. 色谱基本方法包含气相色谱法、高效液相色谱法及薄层色谱法; 4. 色谱新技术包含液相色谱溶剂优化导论、毛细管电泳法、微流控分析系统及色谱-光谱联用技术等。

本书理论与实践并重,基础理论与应用实例相配合,既有常用色谱方法,又囊括大多数的最新色谱技术。可作为色谱工作者的参考书及药学与化学专业研究生的教材。

购书者请与科学出版社联系,电话(010)64033515,联系人: 黄海。

Antibodies as Tailor-Made Chiral Selectors : an Interdisciplinary Approach to Enantiomer Separation and Detection

HOFSTETTER Heike , HOFSTETTER Oliver

(*Department of Chemistry and Biochemistry , Northern Illinois University , DeKalb , Illinois 60115 , USA*)

Abstract : It has long been known that the configurational isomers of biologically active compounds , e. g. , nutrients , pesticides , and drugs , may exhibit different activities in a chiral environment such as the human body. Although the majority of drugs presently in development are chiral , analytical and preparative methods for the quantitative determination and purification of stereoisomers still lag behind. One reason is that commonly used chiral selectors for the direct resolution of enantiomers are not tailor-made for a specific analyte. The identification of suitable selectors for a particular pair of enantiomers still requires considerable experimentation and is generally demanding with regard to material , time and labor. The rational design of chiral host molecules , therefore , represents a challenge in facilitating enantiomer analysis. In this article , we describe how a combination of techniques ranging from organic synthesis to molecular biology yields antibodies of predetermined specificity and stereoselectivity that can be used as tailor-made chiral selectors for the chromatographic separation of enantiomers and their sensitive detection in immunosensors.

Key words : chiral separation ; chromatography ; immunosensor ; stereoselective antibodies

CLC number : O658

Document code : A

Article IC : 1000-8713(2005)05-0508-12

Approximately two-thirds of all drugs presently in development and more than half of the 500 top-selling pharmaceuticals are chiral^[1,2], i. e. , they are optically active and can exist in nonsuperimposable stereoisomeric forms. Due to their distinct three-dimensional structure , however , such configurational isomers may differ in their interaction with , e. g. , receptors , enzymes , and transport proteins , and have different pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. Thus , one stereoisomer of a drug may exhibit a desired activity , while another may cause severe pharmacologic and toxicologic side effects , or act as an antagonist^[3]. Increasing understanding of the stereoselectivity of drug actions has caused regulatory agencies , such as the US Food and Drug Administration (FDA) , to establish guidelines for the development of stereoisomeric drugs and to demand that manufacturers specify their stereochemical purity^[4,5]. Especially the analysis of enantiomers , though , may represent a challenging task , as these mirror image isomers share most of their physical properties. Although a number of techniques have successfully been used to determine the enantiomeric composition of chiral compounds^[6-8] , direct separation and analysis utilizing chiral stationary phases (CSPs)

in high performance liquid chromatography (HPLC) represents the most popular approach. CSPs are produced by immobilizing a so-called chiral selector onto a chromatographic support , thus creating a solid phase that discriminates between the two mirror image forms of the analyte. Commonly used chiral selectors include oligo- and polysaccharides , macrocyclic antibiotics , synthetic polymers , π -donor/ π -acceptor systems , alkaloids , crown ethers , ligand exchange selectors , and various proteins^[9]. Despite their success , however , these selectors are generally not tailor-made for a specific separation problem , which can make the identification of a suitable CSP a time-consuming trial-and-error exercise^[10]. While the availability of ever-growing databases in combination with novel screening techniques promises to facilitate the search for an appropriate selector^[10-12] , the utilization of rationally designed host molecules of predetermined specificity represents an intriguing alternative strategy for enantiomer analysis.

We have recently demonstrated that suitably raised antibodies can be used as tailor-made chiral selectors for enantiomer separation in HPLC^[13,14] and for the ultra-sensitive detection of enantiomeric impurities in immunoassays^[15,16] and

sensors^[17-20]. In this article, we give an account of the interdisciplinary approach we are taking in our research to fully exploit the enormous potential of this class of proteins and to establish them as a new class of chiral host molecules for routine enantiomer analysis in chromatography and related techniques.

1 Antibody production : Nature's combinatorial synthesis of specific host molecules

Over the past few years, research at the interface of Chemistry and Biology has experienced a remarkable increase in popularity, which has led to the proclamation and recognition of "new" areas such as Chemical Biology and Bionanotechnology. The application of antibodies as chiral selectors provides a good example of how multidisciplinary research can combine seemingly diverse fields like synthetic Organic Chemistry, Immunology, Cell- and Molecular Biology, and Analytical Chemistry. Chemists, however, who want to make use of the astounding characteristics of antibodies in their research, need to have at least a basic understanding of the physicochemical properties of these biological macromolecules and how they can be raised. This section is intended to briefly introduce the reader to the most important immunological aspects of antibody production. For additional information, cited references and more specialized immunological literature should be consulted.

Antibodies are glycosylated proteins (glycoproteins), which are produced by the immune system of vertebrates in response to invading pathogenic microorganisms and "non-self" biological material, called antigens^[21]. In the first phase of an immune response, membrane-bound antibodies on the cell-surface of B-lymphocytes, so-called immunoglobulins M (IgM), bind to the antigen; this binding triggers proliferation of these cells and their differentiation into plasma cells^[22]. These secrete soluble antibodies, which have the same overall specificity as the membrane-bound IgM and can bind to the invader, thus marking it for destruction by other components of the immune system such as phagocytes and the complement system. The most abundant soluble antibodies in blood are immunoglobulins of the IgG class,

which are composed of four polypeptide chains, namely two identical heavy chains and two identical light chains. IgGs have a molecular weight of approximately 150 000 and possess two binding sites at their amino-termini. According to the clonal selection theory, only those B-cells, whose membrane-bound IgM interact with the antigen (or a portion thereof) differentiate into plasma cells; other B-cells, which carry antibodies with different binding properties are not stimulated and, therefore, do not produce soluble antibody (Fig. 1).

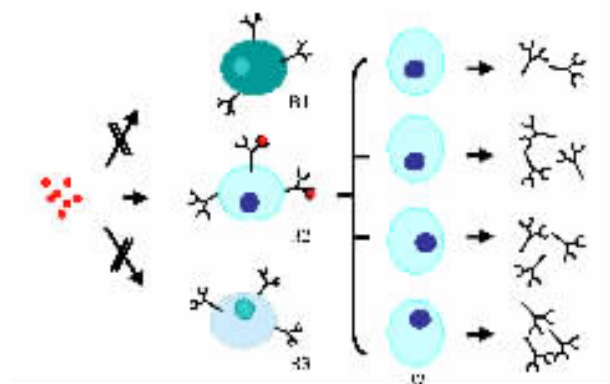


Fig.1 Clonal selection theory

Specific binding of antigen (red circles) to membrane-bound antibodies on the surface of a B-cell (B2) triggers its proliferation and differentiation to daughter cells that secrete soluble antibodies.

Since there are millions of different B-cells, each carrying only one type of antibody with a distinct specificity, the immune system can be seen as a natural library from which only appropriate binders/host-molecules are selected and amplified. The vast number of antibodies that can be produced by the immune system is the result of somatic recombination of a limited number of gene loci and the random combination of heavy and light chains^[23]. In addition, antibody diversity is further increased by the introduction of somatic mutations into the antibody-encoding genes during affinity maturation, which leads to a fine-tuning of the antibody's specificity and an increase in its affinity towards the antigen. As is the case for other types of protein-ligand interactions, such as enzyme-substrate, receptor-hormone, or lectin-sugar systems, the binding forces between an antibody and an antigen are of purely non-covalent nature and involve electrostatic interactions, electron acceptor-electron donor forces (hydrogen bonds), and non-polar interactions

(Lifshitz-van der Waals forces)^[24]. Formation of attractive interactions is generally facilitated by a certain shape complementarity between the antibody's binding site (paratope) and a corresponding target region on the antigen (epitope).

As early as in 1917 Karl Landsteiner and colleagues impressively demonstrated that highly specific antibodies can readily be raised in animals against virtually any molecule, including low-molecular weight compounds^[25]. Landsteiner also demonstrated that such antibodies may be stereoselective and distinguish between the enantiomers of chiral molecules^[25, 26]. Surprisingly, since then the stereoselectivity of antibodies has largely been ignored by chemists and has only rarely been used for the separation and detection of chiral compounds, notably in radioimmunoassays for the determination of drugs and drug metabolites^[27].

1.1 Production of stereoselective antibodies by classical immunological techniques

The general principles for the production of antibodies against small molecules, haptens, have not significantly changed since they were first described almost a century ago. Since compounds with a molecular weight under 5 000 generally do not elicit an immune response, it is necessary to couple them to carriers that are recognized by the immune system as being non-self. Most widely used for this purpose are proteins such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA), thyroglobulin, and ovalbumin. A wide variety of established coupling reactions can be utilized to synthesize hapten-carrier conjugates^[28, 29]; depending on the presence of suitable functional groups on the hapten, a procedure is preferred that maximizes presentation of the target structure on the surface of the conjugate. In the production of stereoselective antibodies, care should be taken that the coupling reaction does not involve the stereogenic center and that, ideally, the conjugation is carried out via a group that is located on the opposite side of the hapten. If this is not possible with the original hapten, the synthesis of appropriate analogs should be considered. The careful design and synthesis of suitable immunogens is probably the most important step in the production of antibodies of high specificity and stereoselectivity. However, following these general rules and stand-

ard immunization protocols^[30], it is possible to obtain antibodies, whose stereoselectivity is unrivalled. For example, we raised stereoselective anti-amino acid antibodies that enable the detection of trace amounts of enantiomeric impurities in samples having an enantiomer excess (ee) of 99.998%^[15, 19]. The antibodies were produced by linking the protein carrier KLH to an enantiomerically pure amino acid hapten distal to the α -amino acid function, the carboxylate/primary amino/hydrogen triad, so as to expose this functional grouping for maximal antibody binding^[31]. Thus, *p*-amino-D- or -L-phenylalanine was coupled to the protein via the *p*-amino group by diazotization, and the resulting conjugates, *p*-azo-D-phenylalanine-KLH and *p*-azo-L-phenylalanine-KLH, respectively, were separately used to immunize rabbits. Diazotization was especially suited for our purpose, since it allowed the synthesis of protein-conjugates exposing the hapten's stereogenic center without protection or deprotection of its functional groups. Conjugates of the pure enantiomers of *p*-aminophenylalanine and BSA, also prepared by diazotization, were used as solid phase coatings in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^[32] to follow the immune response. It was found that both types of antibody only bind to the "correct" BSA-conjugates; that is, the anti-D-amino acid antibody only binds to the BSA-conjugated D-enantiomer, while the anti-L-amino acid antibody only binds to the conjugated L-enantiomer. No significant binding to the opposite enantiomer was observed (Fig. 2).

The specificity and relative affinity of the antibodies for the enantiomers of free, that is, underivatized amino acids was determined in competitive ELISAs. So far, stereoselective binding of the anti-amino acid antibodies to more than 30 α -amino acids has been demonstrated. The affinities are highest for structures that resemble the hapten, i. e., bear aromatic side chains; however, amino acids with different side chains, including aliphatic, charged and non-charged residues, are also stereoselectively recognized by the respective antibodies. Thus, the antibodies can be considered to be "class-specific".

The class-specificity of the anti-amino acid antibodies was recently further investigated by testing their ability to bind to structurally related

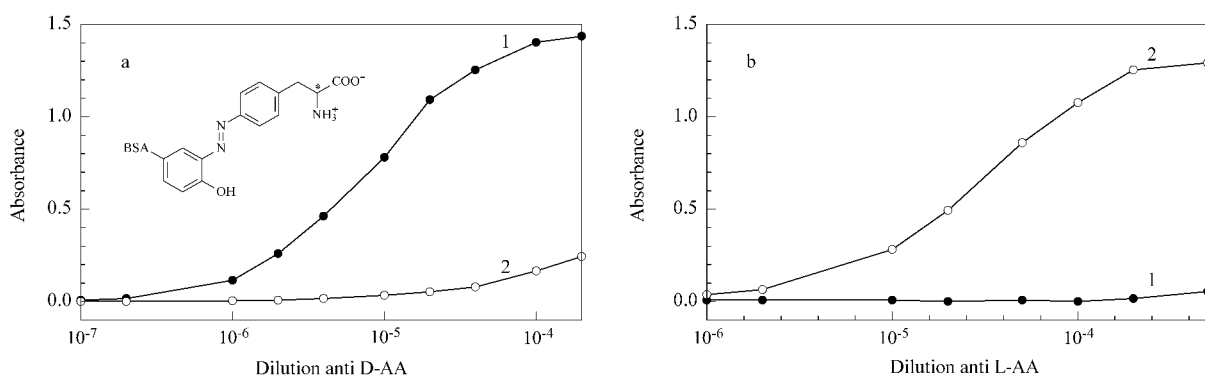


Fig. 2 Stereoselectivity of (a) anti-D- and (b) anti-L-amino acid antibodies as determined by non-competitive ELISA

Serial dilutions of antibody-containing rabbit serum were added to the BSA-conjugates of *p*-amino-D-phenylalanine (1) and *p*-amino-L-phenylalanine (2), immobilized onto a microtiter plate. Bound antibody was detected using a secondary peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibody and the substrate *o*-phenylenediamine. Absorbance was measured at 490 nm ; values obtained on non-derivatized BSA were subtracted.

compounds , and by comparing them to antibodies that have been raised against such molecules. For that purpose , we produced stereoselective antibodies to α -hydroxy acids , in which a hydroxyl group is substituted for the amino group of α -amino acids^[33]. Both antibodies recognizing either D-hydroxy acids or L-hydroxy acids were produced using *p*-azo-D- and -L-phenyllactic acid-KLH conjugates , respectively , as immunogens. A direct comparison of the anti-amino acid antibodies and anti-hydroxy acid antibodies revealed that both types of antibodies are not only highly stereoselective , but , in addition , show perfect class-specificity for the group of compounds they were raised against. Thus , anti-hydroxy acid antibodies only bind to the corresponding “ correct ” enantiomer of α -hydroxy acids , but not to the opposite enantiomer of this class of compounds or to either enantiomer of α -amino acids. An analogous combination of stereoselectivity and class-specificity was also observed with the anti-amino acid antibodies. While the enormous degree of stereoselectivity displayed by these antibodies clearly exceeds what is generally observed with other chiral selectors , also their class-specificity is by no means ordinary. It should be noted that many biological macromolecules have been found to be surprisingly indiscriminate with regard to their interaction with amino- or hydroxyl groups^[33]. In addition , most other selectors used for enantiomer analysis of amino acids can also be applied to hydroxy acids.

The serum of immunized animals contains a heterogeneous population of antibodies that may

differ with regard to specificity and affinity. Since they are produced by different plasma cells , they are referred to as polyclonal antibodies. In order to obtain antibodies with homogenous binding properties , monoclonal antibodies can be produced^[34, 35]. This involves the immunization of mice or rats and the fusion of antibody-producing lymphocytes with myeloma cells. The resulting hybridoma cells combine the properties of antibody production and immortality and can readily be cultivated. Individual clones producing an antibody with desired characteristics can be identified utilizing a suitable screening procedure , be isolated and expanded. Although , in principle , a wide variety of techniques can be applied in the screening process , it is important to choose a method that can be used to conveniently test a large number of samples for distinct binding properties. In the production of monoclonal anti-amino acid antibodies^[36] and anti-hydroxy acid antibodies^[33] , for example , a high degree of stereoselectivity of hybridoma-secreted immunoglobulins was ensured by screening the culture supernatants in ELISA on three different coatings , namely the BSA-conjugates of both the D- and L-enantiomers of the haptens , and underivatized BSA. Several clones producing stereoselective antibodies against the corresponding amino or hydroxy acid enantiomers were successfully subcloned and expanded. In general , the produced monoclonal antibodies did not deviate significantly from the respective polyclonal antibodies with regard to affinity and stereoselectivity , as determined by ELISA. Moreover , the monoclonal antibodies were also class-specific

and can therefore be used as chiral selectors for enantiomer discrimination of a large variety of analytes.

A major advantage of the hybridoma technology is that, once monoclonal antibody-secreting cells have been established, virtually unlimited amounts of a particular antibody can be produced. Small to medium quantities can be obtained from ascites fluid in mice^[37] or by cultivating hybridomas in small bioreactors^[38, 39]. Production of large quantities of antibodies for a variety of "achiral" applications in industrial-size fermenters is already common practice and could easily be adopted for antibody-based chiral selectors.

1.2 Biotechnological production of stereoselective antibodies

The last two decades have seen a remarkable development in antibody engineering techniques^[40, 41]. The application of such molecular biological methods for the production of stereoselective antibodies is particularly attractive since they offer the possibility for facilitated large-scale production in, e. g., bacterial cell cultures, and the manipulation of binding characteristics. In addition, biotechnology promises to significantly reduce or even bypass the use of animals. While, in principle, the whole repertoire of recombinant antibody technology can be applied to the design and construction of stereoselective antibodies, we will focus here on just two strategies: one that utilizes the genetic information of a particular monoclonal antibody, and another that enables the production of stereoselective antibodies from a complex library.

If monoclonal antibody-producing hybridomas are available, their mRNA can be isolated and used to amplify the genetic information that encodes the heavy and light chain variable (V) regions of an antibody's binding site. After combination with a so-called "linker", these sequences are cloned into a plasmid for transfection into suitable prokaryotic or eukaryotic host cells. The host's protein synthesis machinery is then exploited to produce a monovalent antibody fragment, whose heavy and light chain are covalently linked, and which, therefore, is called a single-chain variable fragment (scFv). Following this approach, we have recently used the genetic information of an anti-amino acid antibody to pro-

duce a scFv that retains the stereoselectivity of the original antibody and preferentially binds to L-amino acids^[42]. The scFv can now be produced in *E. coli* and be harvested from culture medium. Thus, in theory, there is no upper limit to the amounts of antibody that can be obtained this way. Once a reliable expression system has been established, the antibody can be manipulated using genetic engineering techniques to, e. g., vary its affinity towards a specific target molecule, increase its stability, or to completely alter its specificity. The potential value of genetic engineering techniques for the rational manipulation of the binding properties of stereoselective antibodies was recently demonstrated by Nevanen *et al.*, who used site-directed mutagenesis to lower the affinity of enantioselective antibody-fragments for their targets^[43].

An additional potential advantage of antibody-fragments is their reduced size compared to a whole antibody. With a molecular weight of approximately 30 000, scFvs, for example, are about five times smaller than IgGs. Consequently, a higher density of binding sites can be realized, for example, upon immobilization of scFvs on a surface; this should be especially beneficial in applications such as chromatography that call for high binding capacities.

While the biotechnological production of antibody fragments from monoclonals still requires immunization of animals, another technique, phage display^[44, 45] provides the potential to bypass immunization and to produce complex antibody libraries, from which antibodies with desired binding properties can be isolated within a relatively short time. This is achieved by fusing the antibody V regions to the amino-terminus of the coat protein pIII of filamentous bacteriophages. Upon infection of bacteria, the fusion product is incorporated into the phage coat, and the antibody is presented on the phage surface. The genetic material, however, which also contains the sequence of the fusion protein, resides within the mature phage particle. In order to produce a complex library of antibody-presenting phages, the genetic information of *all* antibody heavy and light chains of a donor, for example a mouse, is randomly combined to scFv sequences and cloned into plasmids. Such a library, which can com-

prise billions of different antibodies, can then be screened for phages having desired specificities using immobilized antigens in an appropriate affinity technique such as ELISA. Those phages displaying antibody directed against the chosen antigen will be bound on the antigen-coated surface, while non-binding phages can be removed in a washing step. The bound phages can then be eluted from the surface by washing with a solvent that disrupts the antibody-antigen interaction, and be used to re-infect bacteria.

Cultivation of the bacteria yields the desired antibody in large amounts. While, in principle, antibodies to any chosen antigen are accessible from universal, antigen-unbiased libraries that have been produced from non-immunized individuals, it is more common to use the genetic material of immunized donors. Using the latter approach, we demonstrated in a proof-of-concept experiment that stereoselective scFv can be obtained from an antibody-presenting phage display library. Phages displaying antibody directed against L-amino acids were isolated in a plastic vessel coated with *p*-azo-L-phenylalanine-BSA and used to re-infect *E. coli*. Soluble antibody was purified from the bacterial cell culture and tested for stereoselectivity in an ELISA. The expressed protein exhibited stereoselective binding to L-amino acids, but did not interact with the D-enantiomer^[42].

2 Applications of stereoselective antibodies in analytical techniques

To be attractive for widespread use in enantiomer separation and detection, a potential chiral selector should possess a number of desired qualities. In addition to showing a high degree of stereoselectivity, it should be reasonably stable, be obtainable in large quantities at low cost, and be widely applicable not only with regard to the possible number of target analytes but also to the type of methodologies this selector could be combined with. Considering this, it may not immediately be obvious, why antibodies should be suitable for routine enantiomer analysis in, e. g., an industrial environment. The reason for that is that all proteins supposedly share the following inherent disadvantages: first of all, proteins, such as enzymes, receptors and antibodies, typically bind

only to their natural ligands or structurally related compounds; this greatly limits the potential number of binding partners and, from an analytical chemist's point of view, the number of analytes. Proteins are also prone to denaturation and microbial degradation, which can reduce their half-lives significantly. It is furthermore widely assumed that, since proteins have to be isolated from biological sources and are not accessible by chemical synthesis, they are difficult to obtain, expensive, and available only in small quantities.

As described above, antibodies can be raised against virtually any molecule of interest, even classes of compounds, and can be obtained rather inexpensively in almost unlimited quantities by, e. g., biotechnological production. The following examples from our research are intended to demonstrate that antibodies are furthermore surprisingly stable, and can be conveniently used in an enormous variety of analytical techniques for enantiomer separation and detection ranging from liquid chromatography to high-throughput sensors.

2.1 Chiral immunoaffinity chromatography

Solid phase-immobilized antibodies have successfully been used for the chromatographic purification of high- and low-molecular weight antigens for almost four decades. The technique is known as immunoaffinity chromatography^[46-47] and is based on the principle that from a crude mixture only a suitable binding partner will be retained on a column, from which it can be eluted in pure form (Fig. 3).

While the binding step is carried out in a buffer that favors the association of antibody and antigen, elution usually requires harsh conditions, which may involve a drastic change in pH, or the addition of organic solvents or chaotropic salts. The elution step usually causes protein denaturation, which significantly shortens column lifetime. Although such a classical approach has occasionally been used for antibody-based separation of stereoisomers^[48-51] limited column reusability generally restricts it to special applications and makes it impractical for routine enantiomer separation.

In order to be able to compete with other commonly used CSPs, a chromatographic system should permit thousands of separations under experimental conditions that pose no inconvenience

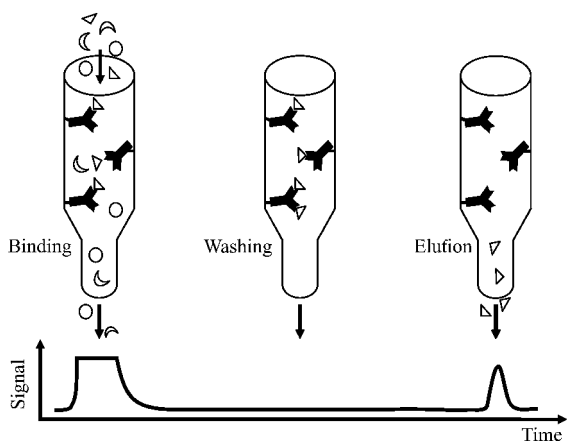


Fig.3 General principle of immunoaffinity chromatography

From a mixture of compounds (represented by circular , sickle-shaped , and triangular symbols) that are applied to a column containing solid-phase immobilized antibody (Y-shaped symbols) , only appropriate binding partners will be retained in the binding step , which is performed in a neutral buffer. After washing the column with the same or another buffer that is favorable for the interaction between antibody and analyte , a solvent is applied that disrupts this interaction. Eluted material can be detected by , e. g. , measuring UV-absorbance or another physical property.

to the scientist. We have recently demonstrated that antibody-based CSPs can meet these requirements if they are operated under mild isocratic conditions that do not compromise the protein's structural integrity^[13]. Monoclonal antibodies directed against either D- or L-amino acids were immobilized on agarose^[36], synthetic polymers^[13,14] or silica^[42] and used for enantiomer separation in analytical size, microbore, and capillary columns. Recently, we also used anti-hydroxy acid antibodies for enantiomer separation in microbore columns^[33]. Using a synthetic high flow-through support material, POROS^[52,53], which allows the use of flow rates up to 30 mL/min, it was found that enantiomer separation is purely based on specific, stereoselective interaction of the immobilized antibody with the analyte having the "correct" configuration, while the opposite enantiomer is not retained and elutes with the void volume^[13,14]. This is in contrast to most other CSPs, including other protein chiral stationary phases, where typically considerable retention of the first-eluting enantiomer, caused by non-specific or non-stereoselective interactions, is observed. We found that the high flow-through material is particularly valuable for separation of analytes that show a relatively high affinity towards

the immobilized antibody. In such cases, rapid elution of the retained enantiomer can still be achieved under mild isocratic buffer conditions by simply increasing the flow rate. Fig. 4, for example, shows the separation of the enantiomers of phenylalanine at room temperature in less than two minutes using an analytical size stainless steel column (2.3 mm × 200 mm); the CSP had been produced by derivatizing POROS with a monoclonal anti-D-amino acid antibody. By applying a relatively high flow rate of 6 mL/min, the whole chromatographic process can be carried out in phosphate buffered saline (PBS) at a neutral pH of 7.4. For comparison, the application of a flow rate of 1 mL/min, which is common for typical HPLC applications, would result in an extremely broadened second peak, making UV-detection of the retained enantiomer virtually impossible.

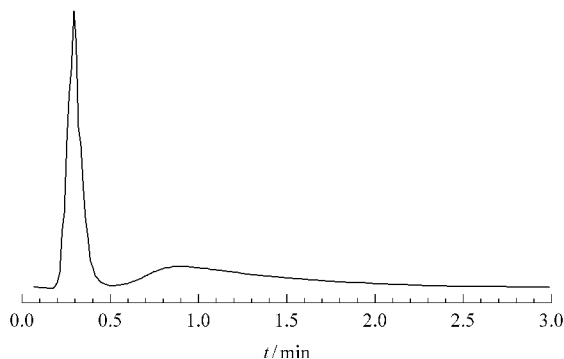


Fig.4 Enantiomer separation of D,L-phenylalanine (non-racemic mixture) on a POROS-immobilized monoclonal anti-D-amino acid antibody at 6 mL/min using phosphate buffered saline as sole mobile phase

The first peak corresponds to the L-enantiomer, the second to the D-enantiomer. Elution was monitored utilizing UV-absorbance at 240 nm. Separation was obtained at room temperature.

Interestingly, plots of the retention factor k as a function of the flow rate showed that, for the immunoaffinity-based enantiomer separations investigated, k is not independent of the flow rate as would be expected according to chromatographic theory for isocratic separations.

The decrease in k with increasing flow rates appears to be more prominent for analytes that have a relatively higher affinity towards the immobilized antibody than for those that are more weakly bound. This disparity may be explained with differences in the dissociation rate constants. It can be assumed that the association rate constants of such antibody-hapten interactions are

similarly high, whereas the affinity of the interaction is primarily determined by the dissociation rate constant. Thus, a more strongly bound analyte dissociates slower from the CSP, which results in an overall higher affinity towards the immobilized antibody. As a consequence, the local concentration ratio of free versus bound analyte decreases at high flow rates due to dilution effects, thus reducing the amount of dissociating analyte that is rebound. If both the association and dissociation kinetics are fast enough, as is the case for more weakly bound analytes, such a dilution effect will not be discernible. However, if the dissociation step is slow and the flow rate high enough, such an effect would result in a relatively lower retention at higher flow rates, which would manifest itself in a decrease in k . The k_1 values for the first eluting enantiomer, on the other hand, were close to zero and independent of the flow rate, which indicates that no noticeable specific or non-specific interactions between the CSP and this enantiomer occur; this, in turn, implies that the retention of the second eluting enantiomer is solely based on specific interactions with the CSP.

As with other protein CSPs^[54-56] optimization of chiral separations can also be achieved by varying other chromatographic parameters such as temperature, ionic strength, or pH of the mobile phase (Fig. 5).

The susceptibility of the antibody-antigen interaction towards changes in the environment (here the mobile phase), provides a convenient

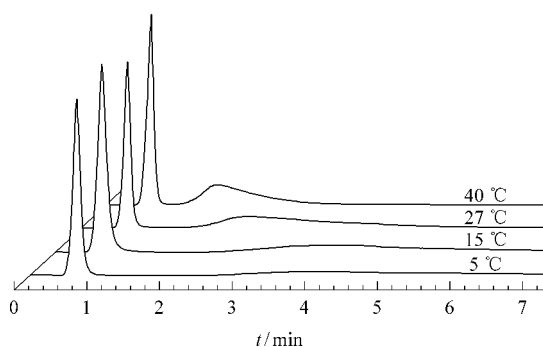


Fig. 5 Influence of the temperature on the enantiomer separation of D,L-phenylalanine (non-racemic mixture) on a POROS-immobilized monoclonal anti-D-amino acid antibody

The first peak corresponds to the L-enantiomer, the second to the D-enantiomer. Separations were performed at 2 mL/min in PBS.

tool to, e. g., increase the separation factor α of a particular separation, or to reduce separation time. Since we routinely operate our antibody columns under mild buffer conditions (such as PBS) that do not cause protein denaturation, they are very stable and, so far, have been reused for thousands of separations over a period of more than four years. This is even more remarkable as the chromatographic system is routinely operated at room temperature, and columns are stored under an azide-containing buffer at 4 °C only if not used for extended periods of time. Thus, the antibody phases combine the advantages of tailor-made chiral selectors with the convenience of other commonly used CSPs. An advantage of chiral immunoaffinity chromatography, however, is that the stereoselectivity as well as separation conditions are predictable: antibodies will preferentially bind to the enantiomer they were raised against, and binding will occur under physiological buffer conditions.

The predictability of antibody-based CSPs is exemplified in Fig. 6, which shows the inversion in elution order of the enantiomer separation of phosphotyrosine on two antibody columns with opposing stereoselectivity.

This example proves that the observed separations are undoubtedly the result of highly specific interactions between the antibodies' binding sites and their corresponding binding partners. The belief that protein-based chiral separations are based on a protein's "inherent chirality" (since they are made from chiral building blocks,

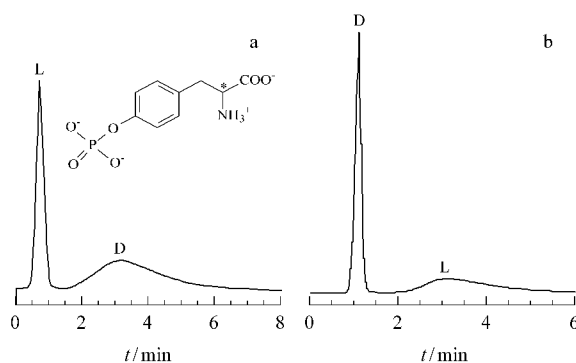


Fig. 6 Inversion of the elution order of the enantiomer separation of D,L-phosphotyrosine (non-racemic mixtures) on (a) an anti-D-amino acid antibody column at 4 mL/min and (b) an anti-L-amino acid antibody column at 1 mL/min

namely L-amino acids)^[55], however, is unsubstantial. It can be assumed that, at least in most cases, a particular three-dimensional arrangement of amino acid residues in a protein's binding site is responsible for chiral discrimination.

Although the POROS material offers a high degree of experimental flexibility, it has a lower capacity than, for example, silica. This may limit its utility for the separation of analytes that have a relatively low affinity towards the immobilized antibodies. In the case of anti-amino acid antibody CSPs, for example, we were not able to use POROS as support for the separation of aliphatic amino acids. However, such amino acids can be separated on phases that have been prepared by immobilizing stereoselective antibodies onto silica, which has a much higher capacity^[42].

We are currently investigating antibodies in a variety of different experimental setups and conditions to make full use of their extraordinary stereoselectivity. The development of miniaturized systems, for example, is especially attractive since they require only small amounts of analyte and chiral selector. Microbore and capillary systems can furthermore be interfaced with mass spectrometry (MS) instruments for the sensitive detection of analytes that, e. g., lack a chromophore. Since many buffers that are favorable for the antibody-antigen interaction (such as phosphate buffers) are incompatible with MS detection, the identification of a suitable mobile phase can be a challenging task. However, we found that our antibody-CSPs are stable in a low-ionic strength ammonium bicarbonate buffer, which allows interfacing of miniaturized columns with an MS detector and separation of a number of amino acid enantiomers^[42]. There appears to be no limit to the use of stereoselective antibodies for enantiomer separation, as long as the operating conditions do not cause protein denaturation.

2.2 Chiral immunosensors

As discussed above, in immunoaffinity chromatography the specific interaction between an analyte and an antibody results in a certain degree of retention, with the extent of retention reflecting the strength of interaction between the binding partners. If this method is to be used for analytical purposes, e. g., quantification, the antibody-antigen bond has to be disrupted in order to

elute the analyte and determine its concentration and amount, respectively, with the help of a suitable detection system. Thus, analyte binding and detection usually are consecutive events. However, a number of detection systems allow direct, that is, real-time monitoring of antibody-antigen or other receptor-ligand interactions. The combination of antibodies with such "transducers" results in the creation of immunosensors, which may be employed for the qualitative or quantitative detection of target molecules.

We have used a number of different physical transduction systems to design chiral immunosensors that allow enantiomer analysis in an automated or even high-throughput format. The first such sensor^[17] was based on surface plasmon resonance (SPR), an optical phenomenon that allows detection of mass-changes on the surface of a gold-coated prism^[57]. We utilized a commercially available instrument (BIAcore) to design an SPR-based chiral immunosensor that enabled quantification of amino acid enantiomers up to an ee of 99.9%. Enantiomeric impurities contained in non-racemic samples were detected by their ability to inhibit binding of stereoselective antibody to a hapten-analogue immobilized on the sensor surface (Fig. 7).

Despite the fact that the BIAcore instrument is amenable to automation, it does not allow simultaneous analysis of multiple samples. However, we have recently used other transduction elements that enable sensitive detection of enantiomeric impurities in a high-throughput format — a particularly challenging aim in enantiomer analysis.

Stereoselective anti-D- or anti-L-amino acid antibodies were covalently immobilized on the gold surface of nanostructured silicon microcantilevers to use analyte-induced nanomechanical surface stress for label-free detection^[18]. When such surfaces were subjected to samples containing an appropriate binding partner, i. e., corresponding amino acid enantiomers, the antibody-analyte interaction caused nanoscale bending of the microcantilevers, which could be detected with the help of a laser and a position-sensitive detector (Fig. 8).

The temporary response of cantilever bending upon injection of analyte was found to be linearly proportional to the analyte concentration, which allowed quantitative determination of enantiomer-

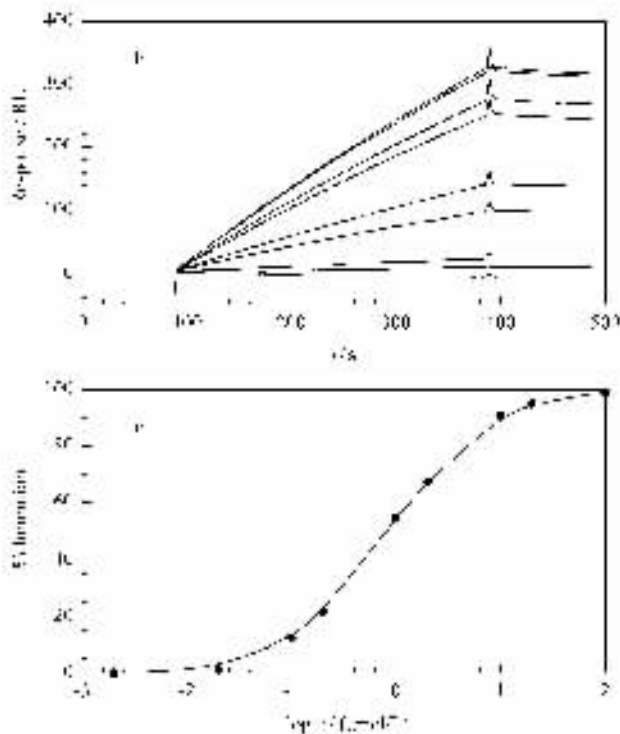
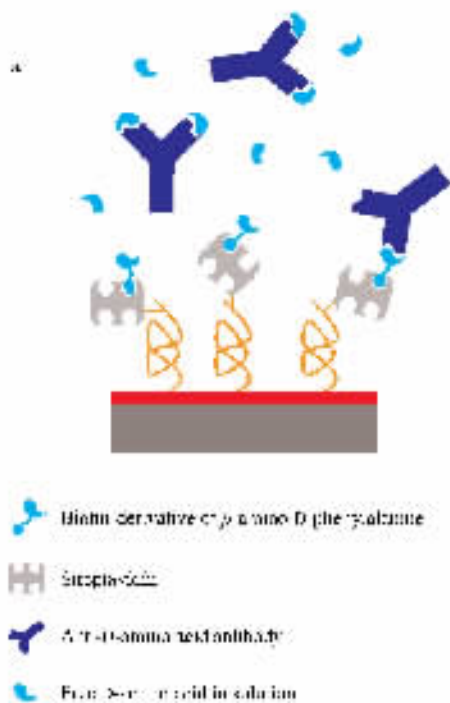


Fig.7 Chiral immunosensor based on SPR as transduction element

a. Schematic depiction of the sensor setup. The sensor chip comprises a dextran-modified gold film (brown layer) on top of a glass prism (grey box). A biotin-derivative of *p*-amino-D-phenylalanine was immobilized via its interaction with streptavidin covalently linked to the dextran (spiral). Anti-D-amino acid antibody was pre-incubated with varying concentrations of free D-amino acids in solution. b. Antibody binding to free amino acids results in a concentration-dependent decrease of the SPR response, as exemplified here in the overlay plots for D-phenylalanine in concentrations of 0.02 – 100 $\mu\text{mol/L}$. The maximum signal intensities can be converted to % inhibition values. c. A semi-logarithmic plot of % inhibition versus the logarithm of the inhibitor concentration gives a sigmoidal inhibition curve.

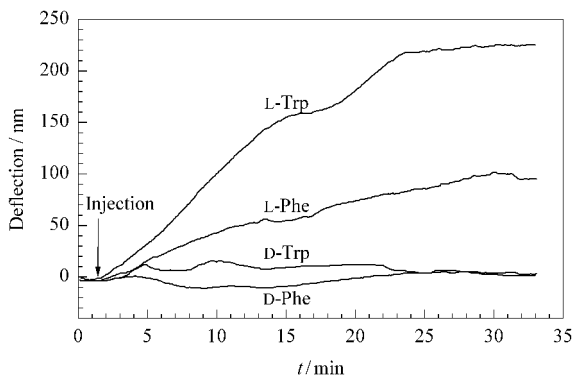


Fig.8 Chiral immunosensor based on nanomechanical surface stress

Amino acid enantiomers were injected over the surface of microcantilevers derivatized with anti-L-amino acid antibody. Stereoselective interaction with analytes having the " correct " configuration (here , L-Trp and L-Phe) caused nanoscale bending of the cantilever. The kinetics of the deflection could be used for quantification (not shown).

ic purities up to 99.8% ee. Although high-throughput analysis was not demonstrated , simultaneous analysis of multiple samples should be readily achievable by coupling cantilever arrays to flow-injection systems.

High-throughput analysis of enantiomers was

recently demonstrated by combining stereoselective anti-amino acid antibodies with magnetic relaxation switches (MRS)^[19]. MRS are dextran-coated superparamagnetic iron nanoparticles , whose aggregation alters the T2 relaxation time of adjacent water protons. Such particles can conveniently be derivatized with a ligand or receptor using standard immobilization strategies. Addition of a bi- or multivalent binding partner to MRS induces self-assembly of the particles , which can be monitored with a nuclear magnetic-resonance (NMR) instrument or magnetic resonance imaging^[58]. In order to employ MRS for antibody-based enantiomer analysis , a hapten-analogue was covalently linked to the dextran-surface of the particles. Since IgG possess two identical binding sites , addition of antibodies recognizing the immobilized ligand induced aggregation of the particles. The presence of free amino acid analytes having the correct configuration , however , resulted in dispersion of the clusters , which could be followed as an increase in the T2 relaxation time (Fig.9) .

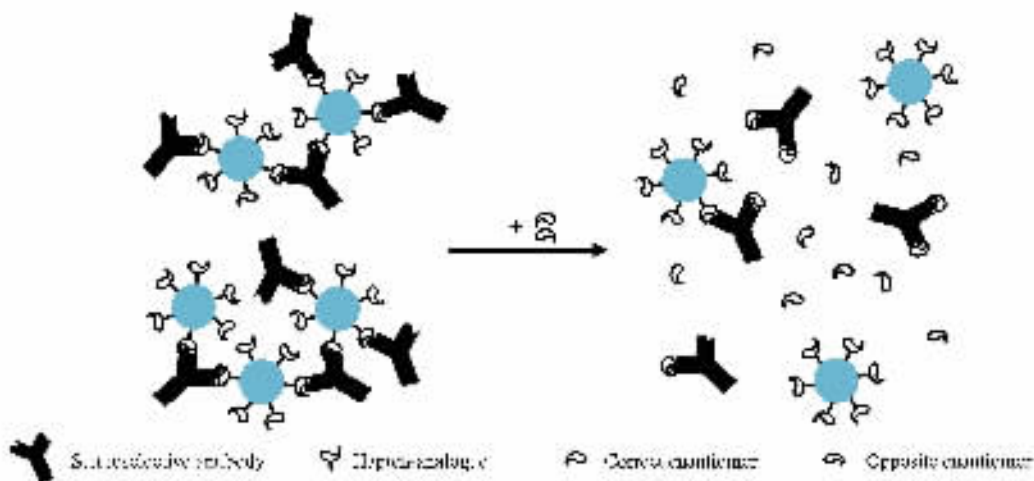


Fig.9 Schematic representation of a chiral MRS immunosensor

In the presence of stereoselective antibody, dextran-coated nanoparticles (grey spheres) that were derivatized with a hapten-analogue aggregate to form clusters. Addition of the correct enantiomer in the presence of the opposite enantiomer causes dispersion of the clusters, which can be followed by magnetic resonance.

Both the extent and rate of the measured signal were dependent on the concentration of the target enantiomer, which allowed sensitive analyte quantification. Since the presence of the opposite enantiomer did not cause a significant change in the signal, trace amounts of amino acid enantiomers contained in non-racemic mixtures could be determined up to an ee of 99.998%. Moreover, the ability to measure thousands of samples simultaneously in a magnetic resonance imager within as little as two minutes can be considered a significant achievement in the field of enantiomer analysis.

3 Conclusions

Although stereoselective antibodies were first described almost eighty years ago, their use as chiral selectors is still in its infancy. Recent work in this area, however, has clearly demonstrated that these biological macromolecules offer an enormous degree of flexibility with regard to their production, manipulation, and application in analytical techniques. It is up to us scientists to recognize this potential and to exploit it to address present or future separation or detection problems.

While antibodies possess a number of properties that should make them attractive for widespread use, three particular qualities (and their combination) appear to distinguish them most evidently from other commonly used chiral selectors. The ability to raise antibodies against virtually any target molecule using either classical im-

munological or molecular biological techniques has the potential to considerably ease the future search for suitable separation systems for chiral compounds. The unsurpassed stereoselectivity of antibodies enables the detection of enantiomeric impurities at levels not achievable with any other selectors. Stereoselective antibodies, furthermore, can be utilized in an amazing variety of techniques ranging from immunoassays to sensors and chromatography, and their combination with methods that have been established for "achiral" applications should be straightforward.

References :

- [1] Stinson S C. Chem Eng News, 1997, 75 : 38
- [2] Stinson S C. Chem Eng News, 2001, 79 : 79
- [3] Eichelbaum M, Gross A S. Adv Drug Res, 1996, 28 : 1
- [4] De Camp W H. Chirality, 1989, 1 : 2
- [5] FDA. Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs (5/1/1992). <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm> (post date 1/3/1996)
- [6] Schurig V, Lindner W, Uray G. In : Helmchen G, Hoffmann R W, Mulzer J, Schaumann E, eds. Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, Vol E21 a, Part A. 3. Stuttgart : Thieme, 1995. 147
- [7] Tsukamoto M, Kagan H B. Adv Synth Catal, 2002, 344 : 453
- [8] Finn M G. Chirality, 2002, 14 : 534
- [9] Chankvetadze B. Chiral Separation. Amsterdam : Elsevier, 2001
- [10] Maier N M, Franco P, Lindner W. J Chromatogr A, 2001, 906 : 3
- [11] Del Rio A, Piras P, Roussel C. Chirality, 2005, 17 : S74
- [12] <http://chirbase.u-3mrs.fr/>
- [13] Hofstetter O, Lindstrom H, Hofstetter H. Anal Chem, 2002, 74 : 2 119
- [14] Hofstetter O, Lindstrom H, Hofstetter H. J Chromatogr A, 2004, 1 049 : 85

- [15] Hofstetter O , Hofstetter H , Wilchek M , Schurig V , Green B S. *Chem Commun* ,2000 ,(17) : 1 581
- [16] Silvaeih H , Schmid M G , Hofstetter O , Schurig V , Gübitz G. *J Biochem Biophys Methods* ,2002 ,53 : 1
- [17] Hofstetter O , Hofstetter H , Wilchek M , Schurig V , Green B S. *Nat Biotechnol* ,1999 ,17 : 371
- [18] Dutta P , Tipple C A , Lavrik N V , Datskos P G , Hofstetter H , Hofstetter O , Sepaniak M J. *Anal Chem* ,2003 ,75 : 2 342
- [19] Tsourkas A , Hofstetter O , Hofstetter H , Weissleder R , Josephson L. *Angew Chem Int Ed Engl* ,2004 ,43 : 2 395
- [20] Hofstetter O , Hertweck J K , Hofstetter H. *J Biochem Biophys Methods* ,2005 ,63 : 91
- [21] Nezlin R. *The Immunoglobulins*. San Diego : Academic Press ,1998
- [22] Rajewsky K. *Nature* ,1996 ,381 : 751
- [23] Gellert M. *Annu Rev Biochem* ,2002 ,71 : 101
- [24] Van Oss C J. In : Van Oss C J , van Regenmortel M H V , eds. *Immunochemistry*. New York : Marcel Dekker ,1994. 581
- [25] Landsteiner K. *The Specificity of Serological Reactions*. New York : Dover Publications ,1962
- [26] Landsteiner K , van der Scheer J. *J Exp Med* ,1928 ,48 : 315
- [27] Cook C E. In : Wainer I W , ed. *Drug Stereochemistry : Analytical Methods and Pharmacology*. 2nd ed. New York : Marcel Dekker ,1993. 35
- [28] Erlanger B F. *Methods Enzymol* ,1980 ,70 : 85
- [29] Hermanson G T. In : *Bioconjugate Techniques*. San Diego : Academic Press ,1996. 419
- [30] Harlow E , Lane D. *Antibodies : a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1988
- [31] Hofstetter O , Hofstetter H , Wilchek M , Schurig V , Green B S. *J Am Chem Soc* ,1998 ,120 : 3 251
- [32] Catty D , Raykundalia C. In : Catty D , ed. *Antibodies : a Practical Approach* , Vol 2. Oxford : IRL Press ,1989. 97
- [33] Zeleke T K , Zeleke J M , Hofstetter H , Hofstetter O. *J Mol Recognit* ,2005 ,18 : 334
- [34] Köhler G , Milstein C. *Nature* ,1975 ,256 : 495
- [35] Goding J W. *Monoclonal Antibodies : Principles and Practice*. 3rd ed. San Diego : Academic Press ,1996
- [36] Hofstetter O , Hofstetter H , Wilchek M , Schurig V , Green B S. *Int J Bio-Chromatogr* ,2000 ,5 : 165
- [37] U.S. Department of Agriculture. *Alternatives to Ascites Production of Monoclonal Antibodies*. <http://www.nal.usda.gov/awic/newsletters/v8n3/8n3mcard.htm>
- [38] Falkenberg F W , Hengelage T , Krane M , Bartels I , Albrecht A , Holtmeier N , Wuthrich M. *J Immunol Methods* ,1993 ,165 : 193
- [39] Jackson L R , Trudel L J , Lipman N S. *Lab Animal* ,1999 ,28 : 38
- [40] Konterman R , Dübel S. *Antibody Engineering*. Berlin : Springer ,2001
- [41] Lo B K C. *Antibody Engineering , Methods and Protocols , Methods in Molecular Biology* , Vol 248. Totowa : Humana Press ,2004
- [42] Hofstetter H , Cary J R , Eleniste P P , Hertweck J K , Lindstrom H J , Smith G B , Ranieri D I , Undesser L P , Zeleke J M , Zeleke T K , Hofstetter O. *Chirality* ,2005 ,17 : 89
- [43] Nevanen T K , Hellman M-L , Munck N , Wohlfahrt G , Koivula A , Söderlund H. *Prot Eng* ,2003 ,16 : 1 089
- [44] Marks J D , Hoogenboom H R , Bonnett T P , McCafferty J , Griffiths A D , Winter G. *J Mol Biol* ,1991 ,222 : 581
- [45] Kay B K , Winter J , McCafferty J. *Phage Display of Peptides and Proteins*. San Diego : Academic Press ,1996
- [46] Phillips T M. *Adv Chromatogr* ,1989 ,29 : 133
- [47] Cutler P. *Immunoaffinity Chromatography*. In : *High Resolution Chromatography : a Practical Approach*. Millner P , ed. Oxford : Oxford University Press ,1999. 233
- [48] Mertens R , Stüning M , Weiler E W. *Naturwissenschaften* ,1982 ,69 : 595
- [49] Knox J P , Galfre G. *Anal Biochem* ,1986 ,115 : 92
- [50] Nevanen T K , Söderholm L , Kukkonen K , Suortti T , Teerinen T , Linder M , Söderlund H , Teeri T T. *J Chromatogr A* ,2001 ,925 : 89
- [51] Lua A C , Chou T-Y. *J Chromatogr A* ,2002 ,967 : 191
- [52] Afeyan N B , Gordon N F , Mazsaroff I , Varady L , Fulton S P , Yang Y B , Regnier F E. *J Chromatogr* ,1990 ,519 : 1
- [53] Regnier F E. *Nature* ,1991 ,350 : 634
- [54] Allenmark S G , Andersson S. *J Chromatogr A* ,1994 ,666 : 167
- [55] Haginaka J. *J Chromatogr A* ,2001 ,906 : 253
- [56] Aboul-Enein H Y , Ali I. In : *Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Techniques*. New York : Marcel Dekker ,2003. 209
- [57] Malmqvist M. *Nature* ,1993 ,361 : 186
- [58] Josephson L , Perez J M , Weissleder R. *Angew Chem Int Ed* ,2001 ,40 : 3 204

Biographic information

Heike and Oliver Hofstetter received their diplomas in Chemistry and Biochemistry , respectively ,from the Eberhard-Karls-University in Tübingen , Germany , before they joined Professor Volker Schurig 's group at the same institution as doctoral students. While Heike in her work focused on the use of peptides and proteins(such as serum albumin) as chiral selectors , Oliver already then started to investigate antibody stereoselectivity. This project was part of a collaboration with Professor Bernard Green from the Hebrew University , Jerusalem , and Professor Meir Wilchek at the Weizmann Institute of Science , Rehovot , Israel. After receiving their doctoral degrees , Heike and Oliver continued to work with Meir Wilchek as postdoctoral students at the Weizmann Institute , where they helped to develop a new protein labeling , purification , and detection system that is based on the interaction between 4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid(HABA) and avidin , and thus represents and extension of the avidin-biotin system. In August 2000 , Oliver accepted a position as Assistant Professor of Biological Chemistry in the Department of Chemistry and Biochemistry at Northern Illinois University , where Heike was appointed Adjunct Assistant Professor. Research in their group is multidisciplinary and ranges from immunogen synthesis and classical immunology to molecular and structural biology. A major focus of their work is the application of antibodies as chiral selectors in chromatography and immunosensors. Their research has been financially supported by various funding agencies including the German-Israeli Foundation , Boehringer Ingelheim Fonds , the Max-Planck-Society , Research Corporation , and the National Institutes of Health.

无胶筛分毛细管电泳法检测微量蛋白质骨桥蛋白

赵京山, 温进坤, 韩 梅

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 河北 石家庄 050017)

摘要 :采用非涂层毛细管,以 150 mmol/L 硼酸盐缓冲液为电泳缓冲液,30 g/L 聚乙二醇(PEG)20000 为筛分介质,经对分离条件进行优化,成功地建立了用无胶筛分毛细管电泳检测微量蛋白质的方法。用所建立的方法测定骨桥蛋白,其批内、批间迁移时间的相对标准偏差均小于 5%,回收率大于 95%,被检测样品中骨桥蛋白的含量与其峰面积呈良好的线性关系(相关系数为 0.996),最低检测限为 0.079 g/L。考察了无血清饥饿培养对血管平滑肌细胞分泌骨桥蛋白的影响,结果表明无血清饥饿培养 24 h 骨桥蛋白的合成与分泌达到高峰,此后随时间延长含量随之降低,此结果与采用 Western blot 方法检测的结果一致。该方法具有进样量小(nL 级)、检测速度快、可自动化等优点,是一种简便、快捷的检测微量蛋白质的好方法。

关键词 :毛细管电泳;聚乙二醇 20000;无胶筛分;骨桥蛋白;血管平滑肌细胞

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0520-04

Determination of Osteopontin at Trace Levels by Non-Gel Sieving Capillary Electrophoresis

ZHAO Jingshan, WEN Jinkun, HAN Mei

(Key Laboratory for Medical Biotechnology of Hebei Province, Institute of Basic Medicine Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract : A method of non-gel sieving capillary electrophoresis (NGSCE) was established to determine osteopontin at trace levels. The capillary used was uncoated fused silica with a size of 57 cm \times 75 μ m i. d. and an effective length of 50 cm. The electrode buffer was a 150 mmol/L boric acid-borate buffer containing 30 g/L polyethylene glycol 20000 (pH 10.0). Other conditions were as follows : separation voltage 23 kV ; detection wavelength 214 nm ; pressure of injecting sample 3.4 kPa (0.5 psi) \times 5 s ; and column temperature 25 $^{\circ}$ C. The NGSCE method had excellent linearity with correlation coefficient of 0.996, and reproducibility with the relative standard deviation of migration time of osteopontin less than 5%. The recovery was 95% and better, the sensitivity was 0.079 g/L. Osteopontin secreted by vascular smooth muscle cells was determined by the NGSCE method at different times after serum withdrawal, and the results were in agreement with those of Western blot method. The results indicate that NGSCE is a simple and rapid method of determining osteopontin at trace levels. This method only needs a micro-amount of sample and is easily automated.

Key words : capillary electrophoresis ; polyethylene glycol 20000 ; non-gel sieving ; osteopontin ; vascular smooth muscle cell

无胶筛分毛细管电泳(non-gel sieving capillary electrophoresis, NGSCE)是近年发展起来的一种检测微量蛋白质的新方法,与毛细管等电聚焦电泳和毛细管凝胶电泳相比,该法具有向毛细管内注入筛分介质方便、易于冲洗、毛细管可反复使用以及便于实现自动化等优点^[1,2]。该法一般以非交

联的高分子水溶性化合物作为筛分介质,常用的有水溶性纤维素衍生物、聚吡咯烷酮、线性聚丙烯酰胺等^[3,4]。本文采用非涂层毛细管,以大分子聚乙二醇 20000(PEG20000)为筛分介质,通过对缓冲体系、筛分介质浓度、上样量等分离条件进行优化,建立了采用无胶筛分毛细管电泳检测微量蛋白质骨桥

收稿日期 2004-09-20

作者简介 :赵京山,男,硕士研究生,E-mail zjs10@sina.com.cn.

通讯联系人 :温进坤,男,教授,博士生导师,主要研究方向为心血管分子生物学,Tel (0311)6265563,E-mail wjk@hebmu.edu.cn.

基金项目 :国家自然科学基金资助项目(No. 30270499)和河北省自然科学基金资助项目(No. 303454).

蛋白(osteopontin, OPN)的方法,并考察了无血清饥饿培养对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)分泌骨桥蛋白量的影响,取得了理想结果。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪、光电二极管阵列检测器及 MDQ 数据分析系统(美国 BECKMAN 公司)。硼酸、硼砂、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、HCl、NaOH 为国产分析纯,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、甘氨酸等试剂购自 Sigma 公司(分析纯),甲醇、PEG20000 为色谱纯试剂,OPN(2.5 g/L)为本室分离纯化所得,兔抗鼠 OPN 多克隆抗体为本室制备,羊抗兔二抗为华美公司产品。

1.2 毛细管电泳条件

非涂层毛细管总长度为 57 cm,有效长度为 50 cm,内径为 75 μm (河北锐沣色谱器件公司产品);电泳缓冲液为 pH 10.0 的 150 mmol/L 硼酸盐缓冲液(含有 30 g/L PEG20000);检测波长为 214 nm;分离电压为 23 kV;压力进样 3.4 kPa(0.5 psi) \times 5 s;检测温度为 25 $^\circ\text{C}$;第一次运行在 137 kPa(20 psi)压力下依次用 0.1 mol/L HCl 冲洗 5 min,三蒸水冲洗 2 min,0.1 mol/L NaOH 冲洗 5 min,三蒸水冲洗 2 min,最后用电泳缓冲液冲洗 5 min,平衡 30 min。每两次运行间用 0.1 mol/L NaOH 及电泳缓冲液各冲洗 2 min。

1.3 重复性实验

取 1.25 g/L 的 OPN 溶液 15 份,每 5 份为一批,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,每隔 3 d 测定一批,每批重复测定 3 次,每份重复测定 2 次,计算 OPN 迁移时间的平均值及批内、批间差异。

1.4 线性关系和最小检测限

取 2.5 g/L OPN 溶液经倍比稀释依次得到 1.25, 0.625, 0.313, 0.157 和 0.079 g/L 的溶液,依次经 NGSCE 方法检测,以确定峰面积和 OPN 浓度之间的关系。

1.5 回收率实验

取 1.25 g/L 的 OPN 溶液分为 6 份,每份 20 μL ,每 3 份为一组,在两组中分别加入 2 μL 和 4 μL 的 2.5 g/L OPN,混合后进行检测,计算回收率。

1.6 大鼠 VSMC 培养基的收集

用无血清饥饿培养法诱导传代培养的去分化型 VSMC 再分化^[5],分别于饥饿培养 0, 12, 24, 48, 72 h 后收集培养基,经 0.25 μm 滤膜过滤后备用。

1.7 Western blot 法检测 OPN

取饥饿培养不同时间后的 VSMC 培养液 8 μL ,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,通过电转移将蛋白印迹至聚乙烯二氟(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,用 5% (质量分数)脱脂奶粉封闭膜上的非特异性结合位点,依次与兔抗鼠 OPN 多抗(1:8,每份抗体用 8 倍体积的缓冲液稀释)和辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000,每份抗体用 1 000 倍体积的缓冲液稀释)进行反应,用 4-氯-1-萘酚/ H_2O_2 溶液进行显色。

1.8 统计方法

利用 P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪自带的 MDQ 分析软件分析电泳图谱;利用凝胶成像系统分析 Western blot 法的实验结果;其他数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 NGSCE 条件的优化

采用 50 mmol/L 硼砂、50 mmol/L 硼酸、50 mmol/L Na_2HPO_4 、50 mmol/L NaH_2PO_4 溶液及任意两者混合作电泳缓冲液时 OPN 的分离效果均不理想,选用 150 mmol/L 硼酸用 NaOH 调 pH 值的缓冲液作电泳缓冲液时,分离度虽有所改善,但仍因电流较大,分离度不够理想。在该电泳缓冲液中加入改性剂 PEG20000 时,可显著改善分离度。当 PEG20000 的质量浓度为 20 g/L 时不能分离出 OPN 峰,其质量浓度为 30 g/L 时分离效果较好,进一步增加 PEG20000 的质量浓度,迁移时间延长,峰形不变。以上实验结果说明,低浓度的 PEG20000 无筛分效应;当 PEG20000 的质量浓度达到 30 g/L 时,因其形成一定大小的筛孔而产生筛分效应^[6];此后随浓度升高,筛孔缩小,位阻效应增强,OPN 的迁移时间延长。本实验选用 30 g/L 的 PEG20000 作为筛分介质。

利用未涂层毛细管分离蛋白质时 pH 值的选择是一重要因素^[7]。分别配制 pH 值为 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的 150 mmol/L 硼酸盐缓冲液(含 30 g/L PEG20000)作电泳缓冲液进行实验,发现 pH 值为 7.0 和 8.0 时管壁吸附现象严重,毛细管易堵塞,且易出现断流现象,随着 pH 值的增加,该现象明显减弱,OPN 的迁移时间缩短,pH 值为 10.0 时无吸附现象发生,迁移时间最短;说明提高电泳缓冲液的 pH 值可使多数蛋白质分子带上负电荷,因其与管壁所带电荷相同,相互排斥,有利于减少蛋白的管壁吸附。本实验选用 pH 10.0 的缓冲液为电泳缓冲液。

以 pH 10.0 的 150 mmol/L 硼酸盐缓冲液(含 30 g/L PEG20000)作电泳缓冲液,考察分离电压为

18 20 23 25 27 kV 时对 OPN 分离的影响。结果表明,随电压的升高,OPN 的迁移时间缩短,分离度增加;但当电压大于 25 kV 时,分离度减小,基线上移,噪声增大;电压为 23 kV 时分离度较好,迁移时间适中。本实验选用 23 kV 作为分离电压。

以 pH 10.0 的 150 mmol/L 硼酸盐缓冲液(含 30 g/L PEG20000)作电泳缓冲液,考察上样量、压力进样和电动进样对 OPN 分离度的影响。结果发现,压力进样优于电动进样。实验选用的进样压力为 3.4 kPa (0.5 psi),当上样时间为 1 s 时几乎检测不到 OPN;上样时间为 10 s 时峰形展宽,分离度下降;上样时间为 5 s 时峰形较好,分离度较高。本实验选用 3.4 kPa (0.5 psi) × 5 s 的进样条件。

降低样品的离子强度,使样品溶液的离子强度低于电泳缓冲液的离子强度时,可产生在线浓缩效应,有利于提高分离度。因此,实验过程中需采用三蒸水稀释样品,以降低样品溶液的离子强度,产生浓缩效应。

本实验通过对缓冲体系、筛分介质、pH、上样量进行优化建立了理想的电泳条件(见“1.2”节)。图 1 为该条件下的电泳图谱。

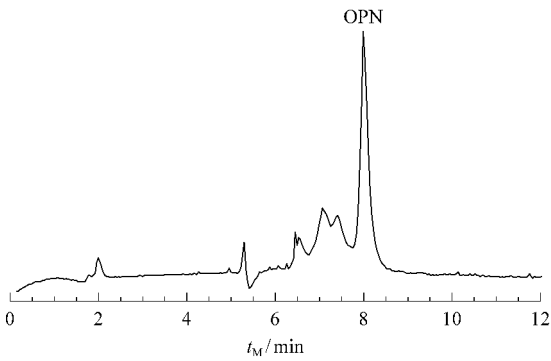


图 1 OPN 标准品的毛细管电泳图

Fig.1 Capillary electropherogram of OPN

Conditions: uncoated fused silica capillary (65 cm × 75 μm i. d.); voltage, 23 kV; temperature, 25 °C; pressure injection, 3.4 kPa (0.5 psi) × 5 s; run buffer, 150 mmol/L boric acid-borate buffer (pH 10.0) with 30 g/L PEG20000; detection wavelength, 214 nm.

2.2 方法评价

“1.3”节的实验结果见表 1。“1.4”节的实验结果表明 OPN 的质量浓度 x 在 0.079 ~ 2.5 g/L 时与峰面积 y 的线性关系良好,其直线方程为 $y = 39\ 019x + 1\ 193.8$,相关系数为 0.996,最小检测限为 0.079 g/L。“1.5”节实验结果见表 2。以上实验结果表明所建立方法的重复性、线性相关性、最小检测限和回收率均能满足微量蛋白质检测的需要。

2.3 应用

以本文所建立的方法检测无血清饥饿培养诱导

体外培养的去分化型 VSMC 再分化过程中 OPN 合成与分泌的变化,并同时采用内标和外标两种方法确定 OPN 峰。

表 1 重复性实验结果

Table 1 Reproducibility of OPN

Batch	Migration time/ min (n = 10)	RSDs/%		
		intra-group	intra-batch	inter-batch
1	7.87 ± 0.176	2.22		
	7.91 ± 0.102	1.29	2.21	
	7.92 ± 0.235	2.97		
2	7.90 ± 0.129	1.63		
	7.83 ± 0.133	1.71	2.02	2.16
	8.04 ± 0.129	1.61		
3	7.85 ± 0.150	1.91		
	7.90 ± 0.161	2.04	2.30	
	7.92 ± 0.235	2.97		

表 2 回收率实验结果(n = 3)

Table 2 Recovery of OPN (n = 3)

Added/ μg	Expected concentration/ (g/L)	Observed concentration/ (g/L)	Recovery/ %
5	1.364	1.314	96.31
10	1.458	1.379	94.58

图 2 为无血清培养不同时间后培养基中的 OPN 的相对含量。图 3 为无血清培养 24 h 后培养基的电泳图谱,图 4 为外标法确定 OPN 峰的电泳图谱,图 5 为内标法确定 OPN 峰的电泳图谱。图 2 结果显示,无血清培养 24 h OPN 的合成与分泌达到高峰,此后随无血清培养时间的延长,OPN 的合成与分泌逐渐下降,72 h 后恢复至对照水平。由图 3 可知,NGSCE 法还可检出 VSMC 分泌的其他蛋白质,如能用这些蛋白质的纯品对其进行标定,则能反映出这些蛋白成分的相对变化。可见,NGSCE 法是一种能同时检测多种蛋白质的高效方法。

为进一步确定 NGSCE 法检测 OPN 的可靠性,我们还对上述样品采用 Western blot 法进行了检

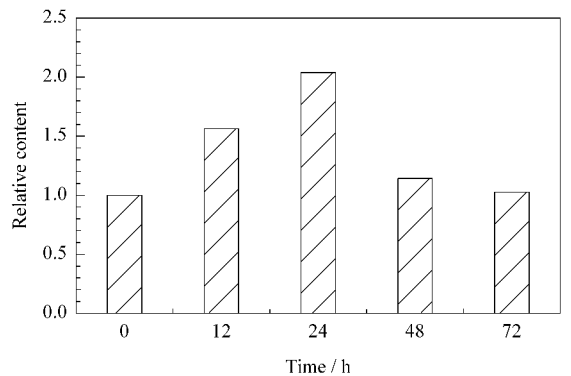


图 2 无血清培养不同时间后培养基中 OPN 的相对含量
Fig.2 Relative contents of OPN from capillary electropherograms at different times after serum withdrawal

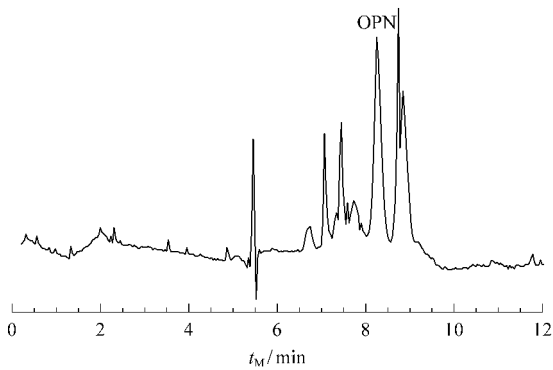


图 3 无血清培养 24 h VSMC 培养基的 CE 图谱
Fig.3 Capillary electropherogram of VSMC culture medium at 24 h after serum withdrawal

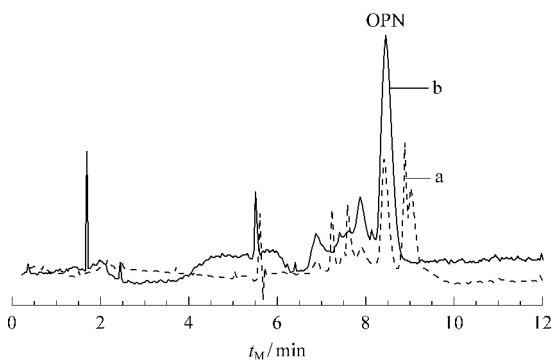


图 4 外标法确定 OPN 峰的拟合 CE 图谱
Fig.4 OPN peak identification in electropherograms by standard analysis

a. the culture medium sample at 24 h after serum withdrawal ; b. purified OPN.

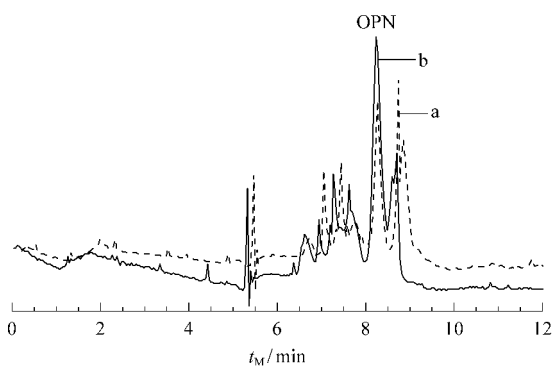


图 5 内标法确定 OPN 峰的拟合分析 CE 图谱
Fig.5 OPN peak identification in capillary electropherograms by standard-addition analysis

a. the culture medium sample at 24 h after serum withdrawal ; b. the culture medium sample at 24 h after serum withdrawal spiked with OPN standard.

测结果(见图 6)显示,两种方法所测得的 OPN 的变化趋势相同。这与文献[8]所述无血清饥饿培养可通过抑制 OPN 的合成与分泌,使去分化型 VSMC 再分化的结论相一致。

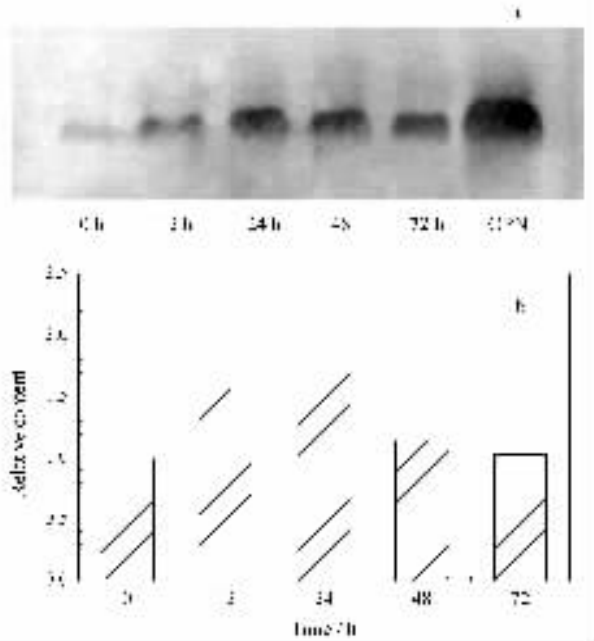


图 6 无血清培养不同时间后培养基中 OPN 的 Western blot 图(a)及其 OPN 含量(b)
Fig.6 Western blot picture (a) and relative content (b) of OPN at different times after serum withdrawal

3 结论

通过对实验条件进行优化,成功地建立了一种检测微量蛋白质的毛细管无胶筛分电泳方法。该方法具有检测速度快、进样量小(nL 级)、自动化程度高、可直接定量等特点。实验发现 PEG20000 是一种优良的筛分介质,适当提高缓冲液的 pH 值和离子强度,能解决未涂层管 NGSCE 模式分离蛋白质的吸附问题。该方法在微量蛋白质分子的检测方面具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] Guttman A. J Chromatogr Sci ,2003 ,41(9) :449
 [2] Wang Yuanchao , Xiong Yin , Zeng Zhaorui , Cheng Jieke , Shen Ping. Chinese Journal of Chromatography (王园朝,熊音,曾昭睿,程介克,沈萍.色谱),2001,19(5) :439
 [3] Larsen L A , Christiansen M , Vuust J , Andersen P S. Comb Chem High Throughput Screening ,2000 ,3(5) :393
 [4] Liu B F , Xie Q G , Lu Y T. Anal Sci ,2001 ,17(11) :1253
 [5] Liu Zhimin , Han Mei , Wen Jinkun. Chinese Journal of Pathophysiology (刘智敏,韩梅,温进坤.中国病理生理杂志),2003,19(2) :163
 [6] Heller C. J Chromatogr A ,1995 ,698 :19
 [7] Zhu M D , Rodriguez R , Hansen D , Wehr T. J Chromatogr ,1990 ,516(1) :123
 [8] Han Mei , Wen Jinkun , Zheng Bin. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology (韩梅,温进坤,郑斌.中国生物化学与分子生物学报),2003,19(2) :250

中药菟丝子中生物活性成分的毛细管电泳-电化学检测

傅 亮, 楚清脆, 管月清, 叶建农

(华东师范大学化学系, 上海 200062)

摘要 :采用毛细管电泳-电化学检测法(CE-ECD)同时测定了菟丝子中芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素等5种主要生物活性成分的含量,考察了运行缓冲液酸度和浓度、分离电压、氧化电位和进样时间等实验参数对分离检测的影响。在最佳实验条件下,以直径300 μm 的碳圆盘电极为工作电极,检测电位为+950 mV(vs. 参比电极),以50 mmol/L的硼砂缓冲溶液(pH 9.0)为运行缓冲液,上述各组分在19 min内能完全分离。芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素在两个数量级的范围内呈良好线性关系,检测下限(按 $S/N=3$ 计)分别为 1.93×10^{-5} 、 3.55×10^{-4} 、 3.65×10^{-5} 、 1.73×10^{-5} 和 1.46×10^{-4} g/L。该法已成功地应用于菟丝子中活性成分的分离检测,结果令人满意。

关键词 :毛细管电泳;电化学检测;芦丁;金丝桃甙;山柰酚;对香豆酸;槲皮素;菟丝子;中药

中图分类号 :O658 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-8713(2005)05-0524-04

Determination of Bioactive Components in *Semencustae* by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection

FU Liang, CHU Qingcui, GUAN Yueqing, YE Jiannong

(Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract : A method of high performance capillary electrophoresis with electrochemical detection (CE-ECD) has been developed for the determination of five bioactive components in *Semencustae*, namely rutin, hyperoside, kaempferol, *p*-coumaric acid and quercetin. The effects of several factors such as the acidity and concentration of the running buffer, the separation voltage, the applied potential and the injection time on CE-ECD were investigated. Under the optimized conditions, these five components can be separated in a 50.0 mmol/L borax running buffer (pH 9.0) within 19 minutes. A 300 μm diameter carbon disk electrode was used as the working electrode positioned carefully opposite to the outlet of the capillary in a wall-jet configuration at potential of +950 mV (vs. saturated calomel electrode as reference electrode, SCE). Good linear relationships were established between the peak current and concentration of analytes over two orders of magnitude. The detection limits ($S/N=3$) were 1.93×10^{-5} , 3.55×10^{-4} , 3.65×10^{-5} , 1.73×10^{-5} and 1.46×10^{-4} g/L for rutin, hyperoside, kaempferol, *p*-coumaric acid and quercetin, respectively. The method has been successfully applied to the determination of these analytes in *Semencustae* samples after a relatively simple extraction procedure, and the assay results were satisfactory.

Key words : capillary electrophoresis; electrochemical detection; rutin; hyperoside; kaempferol; *p*-coumaric acid; quercetin; *Semencustae*; traditional Chinese medicine

菟丝子(*Semencustae*)为旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)的干燥成熟种子,具有滋补肝肾、固精缩尿、安胎明目等功效。临床应用十分广泛,主治因肝肾不足引起的阳痿、早泄、遗精、腰膝冷痛、白浊及目暗不明等,亦可用于因脾肾不足引

起的大便溏泄,妇科用于治疗流产、月经不调、更年期综合征^[1]等。现代药理研究表明:菟丝子的浸提物具有壮阳、调节内分泌、抗衰老等活性,其主要生物活性成分为黄酮类化合物^[2]。

目前,高效液相色谱法(HPLC)^[3]已用于菟丝

子中黄酮类成分的含量测定。但是 HPLC 用于传统中药分析仍存在一些不足,例如分析时间长,分离度低,因多种相互干扰的化合物共存致使色谱柱使用寿命缩短,其中一些物质还可能被吸附在管壁上,导致色谱柱的快速老化,甚至造成不可逆的损坏。毛细管电泳(CE)具有分离效率高、分析速度快、重现性好、样品和试剂用量少等优点,是一种高效的分离分析技术。与电化学检测方法(ECD)联用,CE-ECD 对电活性物质具有很高的检测灵敏度和选择性^[4]。本实验成功地建立了一种采用毛细管电泳-电化学检测法同时测定菟丝子中芦丁、金丝桃甙、山柰酚、槲皮素和对香豆酸等 5 种活性成分(结构见图 1)的简便、可靠、灵敏的分析方法。

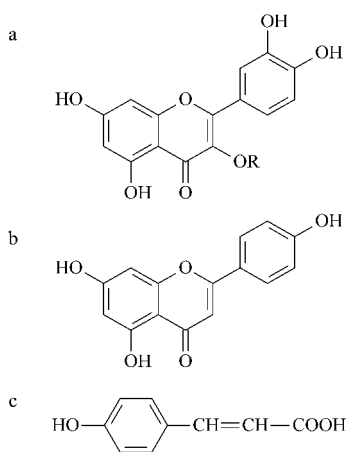


图 1 5 种组分的分子结构式

Fig.1 The molecular structures of five components

a. hyperoside (R = galactoside); quercetin (R = H); rutin (R = rutinoside); b. kaempferol; c. p-coumaric acid.

1 实验部分

1.1 仪器

毛细管电泳-电化学检测系统(CE-ECD)为自组装^[5],包括 ± 30 kV 高压电源(中国科学院上海应用物理研究所),BAS LC-4C 安培检测器(美国生物分析系统公司),EB100 型台式单笔记录仪(上海大华仪表厂),Model 14901 三维微定位器(斯特拉特福,康涅狄格州,美国),75 cm 长熔融石英毛细管(内径 25 μm ,外径 360 μm ,河北永年锐沓色谱器件有限公司);毛细管、检测池和三电极体系均组装在一个带有微动开关的树脂玻璃框架中,以保证仪器和操作人员的安全,当框架打开时,微动开关会自动切断电源^[6,7]。

工作电极为 300 μm 的碳圆盘电极^[8],使用前先用金相砂纸抛光,并置于二次蒸馏水中超声清洗 5 min,然后借助三维微定位器,使工作电极与毛细管出口在一条直线上,并尽可能靠近毛细管的末端。三电极体系包括碳圆盘工作电极、铂丝辅助电极和

饱和甘汞电极(SCE,参比电极)。用 BAS LC-4C 安培检测器检测氧化电流,电泳图谱由 EB100 型单笔记录仪记录。采用电迁移进样,采用 16 kV 电压从毛细管阳极端进样 6 s,检测池为阴极电泳池。

1.2 试剂

标准品芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸购自 Sigma 公司,槲皮素购自上海试剂二厂。各样品均按产品说明使用。

用无水乙醇(分析纯)配制 5 种标准储备液,使其质量浓度均为 1.00 g/L,避光于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。其他不同浓度的工作液,用 50.0 mmol/L 的硼砂溶液(pH 8.70 ~ 9.48)运行缓冲液稀释得到。所有分析样品经 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后进样。菟丝子购自上海市药店。

1.3 试液的配制

将菟丝子磨成粉状,准确称取 2.000 g,用 10 mL 80% 的乙醇溶液(无水乙醇-去离子水(体积比 4:1))超声萃取 1 h 后,先用滤纸过滤,再用 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤,将得到的滤液放于阴暗处保存。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的选择

2.1.1 工作电极电位的影响

由于 5 种组分均带有酚羟基,容易在碳电极上被氧化,因此本实验采用电化学检测。在安培检测中,工作电极的电位直接影响实验的灵敏度、检测限和稳定性,因而为了选择最佳工作电位,对 5 种组分的流体伏安曲线进行了测定。如图 2 所示,当电极电位超过 +400 mV(vs. SCE)时,5 种组分均产生

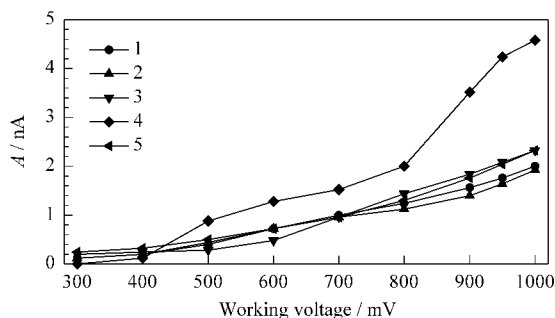


图 2 5 种组分的流体伏安图

Fig.2 Hydrodynamic voltammogram (HDV) of five analytes

Working conditions: fused-silica capillary, 25 μm i. d. \times 75 cm; working electrode: 300 μm diameter carbon disk electrode; running buffer, 50.0 mmol/L borate buffer (pH 9.0); separation voltage, 16 kV; injection, 16 kV \times 8 s; analyte concentration, 1.0×10^{-2} g/L each.

Analytes: 1. rutin; 2. hyperoside; 3. kaempferol; 4. p-coumaric acid; 5. quercetin.

氧化电流。随着电极电位的增大,对香豆酸的氧化电流增加迅速,而其他 4 种组分受氧化电位的影响较小。当电极电位大于 +950 mV(vs. SCE) 时,虽然对香豆酸的氧化电流仍稍有增加,但基线噪声和背景电流都急剧增大,导致基线不稳,对检测的灵敏度和稳定性不利。因此将工作电位选为 +950 mV(vs. SCE),此时的背景电流不太大且信噪比较高。

2.1.2 pH 值和缓冲溶液浓度的影响

运行缓冲溶液的酸度直接影响毛细管表面的 Zeta (ξ) 电势,从而影响电渗流(EOF)的方向和速率,同时溶液的酸度也决定样品中各组分分子的表观电荷数,从而影响组分的迁移时间和分离度,故对运行缓冲溶液的酸度进行优化是获得较好分离条件的关键。如图 3-a 所示,当 pH 为 8.4 时,山柰酚与对

香豆酸分不开,pH 为 8.7 时,金丝桃甙与山柰酚分不开。随着 pH 值的增大,各组分的分离度增加而迁移时间延长,pH 为 9.0 时,各组分可以达到基线分离,再增大 pH 值,分离度没有明显的改变而迁移时间延长。因此,选择运行缓冲液的 pH 为 9.0。

此外,缓冲溶液浓度是影响被测物迁移时间和分离度的另一个重要因素。这是因为缓冲液的浓度决定了溶液的粘度系数、溶质的扩散系数以及毛细管内壁的 ξ 电位。图 3-b 表明迁移时间和分离度随着缓冲溶液浓度的升高而增大。然而缓冲液浓度较高(>50 mmol/L)会增加它的导电性,从而产生较高的焦耳热,使组分峰变宽,导致峰电流降低及分离度和重现性变差。综合考虑上述各种因素,选择缓冲溶液的浓度为 50 mmol/L。

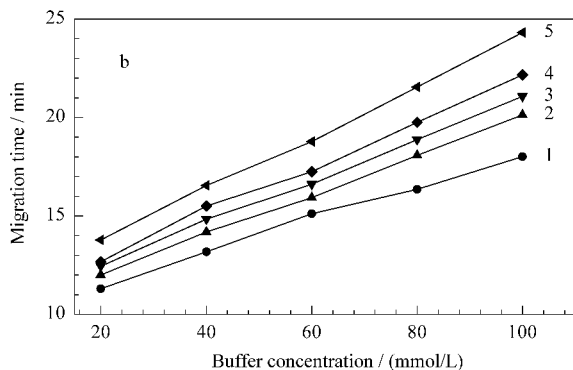
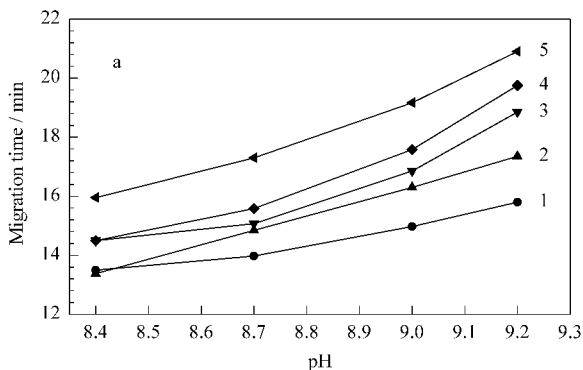


图 3 运行缓冲溶液 pH 值(a)和浓度(b)对分析物迁移时间的影响

Fig.3 The effects of the pH value (a) and concentration (b) of the running buffer on the migration time of the analytes Working electrode potential : +950 mV (vs. SCE). Analytes and other working conditions are the same as in Fig. 2.

2.1.3 分离电压和进样时间的选择

在毛细管长度一定的前提下,分离电压决定电场强度,而电场强度影响电渗流速度和带电物质的迁移率,继而决定了分析物的迁移时间。本实验在分离电压为 12 ~ 20 kV 的条件下,考察了分离电压对各分析物迁移时间的影响。实验结果表明:分离电压越高,组分的迁移时间越短,但当分离电压超过 18 kV 时,样品中待测物的峰与邻峰不能较好地分离,且基线噪声增大。故选择 16 kV 为分离电压。

进样时间决定了分析样品的进样量,而进样量的大小影响峰电流和峰形。本实验在 16 kV 下,研究了进样时间为 2 ~ 10 s 时对分离的影响。实验结果表明:峰电流随着进样时间的增加而增大;当进样时间大于 6 s 时,峰高趋于稳定,但峰扩展明显。故本实验选择在 16 kV 下进样 6 s 作为进样时间。

在上述优化条件下,芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素在 19 min 内即可达到基线或较好的分离,所得混合标准溶液的电泳图谱见图 4-a。

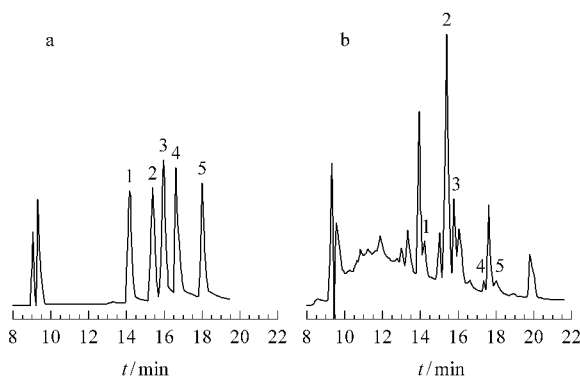


图 4 混合标准溶液(a)、菟丝子原草(b)的典型电泳图 Fig.4 Electropherograms of standard mixture solution (2.0×10^{-2} g/L of each analyte) (a) and sample solution of *Semencustae* (b)

Working electrode potential : +950 mV (vs. SCE). Analytes and other working conditions are the same as in Fig. 2.

2.2 重现性、线性范围及检测限

2.2.1 重现性

在上述优化条件下,将混合标准溶液(每种标准品的质量浓度均为 2.0×10^{-2} g/L)连续进样 7

次峰高的相对标准偏差(RSD)为 1.7%(芦丁)、3.6%(金丝桃甙)、1.6%(山柰酚)、1.0%(对香豆酸)和 2.7%(槲皮素),表明方法的重现性良好。

2.2.2 回归方程、线性范围及检测限

在最佳分离检测条件下,对一系列不同质量浓度($5.0 \times 10^{-4} \sim 0.2 \text{ g/L}$)的各组分的混合标准溶液分别进行测定,考察了各组分的线性范围,得出各组分的线性回归方程;以信噪比 $S/N = 3$ 对应浓度确定检测限。实验发现,芦丁、对香豆酸和槲皮素的质量浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 0.1 \text{ g/L}$ 时与电泳峰电流均呈现良好线性关系,金丝桃甙的质量浓度为 $2.5 \times 10^{-4} \sim 0.1 \text{ g/L}$ 时与电泳峰电流呈现良好的线性关系,山柰酚的质量浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-2} \text{ g/L}$ 时与电泳峰电流呈现良好的线性关系。以 y 表示峰电流(nA), x 表示样品质量浓度(g/L),5 种被测组分的线性回归方程分别为:芦丁, $y = 1.56 \times 10^2 x - 0.0003$ ($r = 0.9999$);金丝桃甙, $y = 2.71 \times 10^2 x + 0.0159$ ($r = 0.9998$);山柰酚, $y = 2.17 \times 10^2 x - 0.1212$ ($r = 0.9998$);对香豆酸, $y = 2.81 \times 10^2 x + 0.1165$ ($r = 0.9999$)和槲皮素, $y = 2.56 \times 10^2 x - 0.1238$ ($r = 0.9999$)。检测限分别为 $1.93 \times 10^{-5} \text{ g/L}$ (芦丁)、 $3.55 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ (金丝桃甙)、 $3.65 \times 10^{-5} \text{ g/L}$ (山柰酚)、 $1.73 \times 10^{-5} \text{ g/L}$ (对香豆酸)和 $1.46 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ (槲皮素)。

2.3 样品测定及回收率实验

在选定的测定条件下,对菟丝子原草中的 5 种组分进行了测定,典型电泳图谱见图 4-b。与标准品的电泳图相对照,菟丝子样品中含有芦丁、金丝桃甙、山柰酚、对香豆酸和槲皮素。测定结果见表 1。

为了评估本文方法的精密度和准确性,以菟丝子样品为基质进行了加标回收试验。采用标准加入

法测得的回收率为 91% ~ 105%,平均回收率和 RSD 分别为:芦丁 96.9%,0.9%;金丝桃甙 93.5%,0.69%;山柰酚 105%,5.70%;对香豆酸 91%,0.73%和槲皮素 92%,2.86%。

表 1 菟丝子样品中 5 种活性组分的测定结果($n = 3$)

Table 1 The assay results of a *Semencustae* sample ($n = 3$)

Component	Content/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
Rutin	422.0	1.1
Hyperoside	1486.0	0.8
Kaempferol	601.9	7.0
<i>p</i> -Coumaric acid	297.8	0.9
Quercetin	295.1	3.5

Working electrode potential: +950 mV (vs. SCE). Other working conditions are the same as in Fig. 2.

本实验成功地建立了菟丝子中 5 种生物活性成分的毛细管电泳-电化学检测方法。该法所用样品无需富集,过滤后可直接进样,方法简单可靠,可作为菟丝子中 5 种生物活性成分的快速测定方法。

参考文献:

- [1] Guo Hongzhu, Li Jiashi. Journal of Chinese Medicinal Materials (郭洪祝,李家实. 中药材), 1996, 19(4): 205
- [2] Jin Xiao, Li Jiashi, Yan Wenmei. China Journal of Chinese Materia Medica (金晓,李家实,阎文玫. 中国中药杂志), 1992, 17(5): 292
- [3] Zhu Lihua, Jiang Guoqiang, Yang Shuixin. Journal of Zhejiang College of TCM (朱丽华,蒋国强,杨水新. 浙江中医学院学报), 2001, 25(4): 65
- [4] Liu Jifeng, Yang Xiurong, Wang Erkang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (刘继锋,杨秀荣,汪尔康. 分析化学), 2002, 30(6): 748
- [5] Chu Q C, Qu W Q, Peng Y Y, Cao Q H, Ye J N. Chromatographia, 2003, 58(1/2): 67
- [6] Ye J N, Baldwin R P. Anal Chem, 1993, 65(23): 3525
- [7] Ye J N, Baldwin R P. Anal Chem, 1994, 66(17): 2669
- [8] Fang X M, Ye J N, Fang Y Z. Anal Chim Acta, 1996, 329(1-2): 49

反相高效液相色谱法测定血浆中的单硝酸异山梨酯

何 林, 余继英, 吴正中, 孙世明

(四川省人民医院临床药理研究室, 四川 成都 610072)

摘要:建立了反相高效液相色谱测定血浆中单硝酸异山梨酯浓度的方法。样品在碱性条件下经二氯甲烷提取后,用 C_{18} 柱进行分离,以 H_2O (用 0.03 mol/L 氨水调 pH 至 7.8)-乙腈(体积比为 80:20)为流动相,对乙酰氨基酚为内标,于 230 nm 处测定。结果表明,单硝酸异山梨酯的质量浓度为 20 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$ 时其峰面积与内标峰面积之比与单硝酸异山梨酯浓度有良好的线性关系。方法的最低检测质量浓度为 12 $\mu\text{g/L}$,平均回收率为 $(97.11 \pm 2.45)\%$ ~ $(104.34 \pm 2.17)\%$,日内测定的相对标准偏差(RSD) $\leq 2.52\%$,日间测定的 RSD $\leq 5.21\%$ 。

关键词:反相高效液相色谱法;单硝酸异山梨酯;血浆

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)05-0528-03

Determination of Isosorbide-5-Nitrate in Human Plasma by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

HE Lin, YU Jiying, WU Zhengzhong, SUN Shiming

(Laboratory of Clinical Pharmacology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

Abstract: The method was established to determine the level of isosorbide-5-nitrate in human plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The sample preparation was carried by alkalizing the plasma sample followed by extraction with dichloromethane. The HPLC analysis was performed under the conditions as follows: a mixture of an aqueous buffer (pH adjusted to 7.8 by 0.03 mol/L ammonia water) and acetonitrile (80:20, v/v) as mobile phase, paracetamol as the internal standard, and the detection at 230 nm. The linear range was 20 - 1 000 $\mu\text{g/L}$ using the ratio of peak areas; the detection limit was 12 $\mu\text{g/L}$; the average recovery was $(97.11 \pm 2.45)\%$ - $(104.34 \pm 2.17)\%$, the intra-day relative standard deviations (RSDs) were less than 2.52%, and inter-day RSDs were less than 5.21%.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography; isosorbide-5-nitrate; plasma

单硝酸异山梨酯是硝酸异山梨酯的主要代谢产物,是治疗心血管疾病的常用药物,由于其服用剂量较小,服用后血中浓度较低。对其血药浓度的测定大多采用气相色谱法^[1,2]或气相色谱-质谱法^[3],采用高效液相色谱法(HPLC)^[4]的较少。本文采用常见的反相高效液相色谱法,建立了血浆中单硝酸异山梨酯浓度的测定方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪,配有 996 二极管阵列检测器及 Millennium 数据处理系统;H-1 旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);80-2 离心机(上海手术器械厂)。色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm i. d. 5 μm),预柱为 C_{18} 柱(DIKMA)。

单硝酸异山梨酯、对乙酰氨基酚对照品由四川大学华西药学院临床药学教研室提供;氨水、二氯甲烷为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

1.2 色谱条件

流动相为 H_2O (用 0.03 mol/L 氨水调 pH 至 7.8)-乙腈(体积比为 80:20),流速 1.0 mL/min,检测波长 230 nm。

1.3 溶液配制

精密称取 10.01 mg 单硝酸异山梨酯对照品,用甲醇溶解并定容至 10 mL,得到 1 001 mg/L 单硝酸异山梨酯的储备液,并用甲醇稀释成不同浓度的系列溶液。

精密称取 10.04 mg 对乙酰氨基酚,用甲醇溶解并定容至 10 mL,得到 1 004 mg/L 对乙酰氨基酚的储备液。取 0.1 mL 储备液,用甲醇稀释至 10

mL,得到 10.04 mg/L 的内标工作液。

1.4 样品处理与测定

精密量取血浆样品 0.5 mL,加入内标 50 μ L、饱和碳酸钾 100 μ L、二氯甲烷 3 mL,旋涡振荡 2 min,于 4 000 r/min 条件下离心 5 min,取下层清液在 50 $^{\circ}$ C 氮气流下挥干,加入 200 μ L 流动相溶解,旋涡混合,于 4 000 r/min 条件下离心 2 min,取上层清液 50 μ L 进行 HPLC 分析,记录色谱图及内标与单硝酸异山梨酯的峰面积。

2 结果与讨论

2.1 保留时间的确定

图 1 为在选定的色谱条件下测得的空白血浆、内标及单硝酸异山梨酯标准溶液、空白血浆加内标及单硝酸异山梨酯标准溶液以及血浆样品的色谱图。由图 1 可见,血浆中的物质不影响单硝酸异山梨酯的分离测定,内标峰与样品峰分离良好,复方制

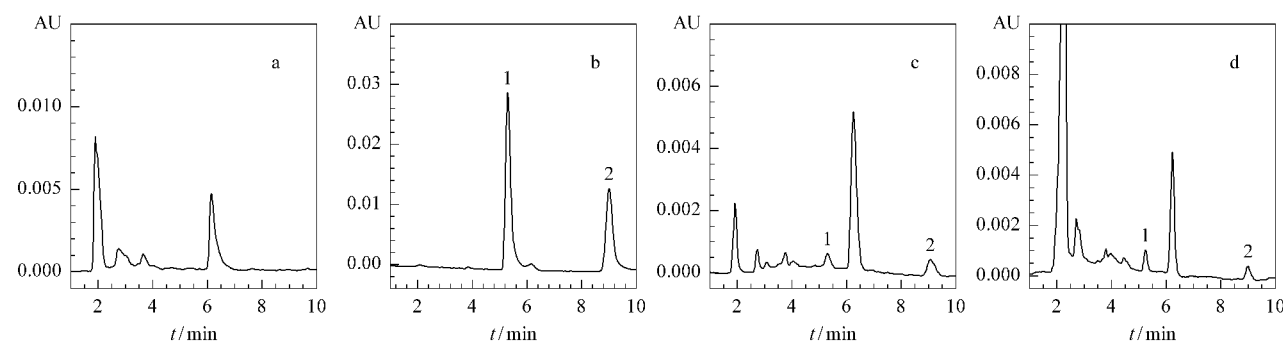


图 1 空白血浆(a)、内标及单硝酸异山梨酯标准溶液(b)、空白血浆加内标及单硝酸异山梨酯标准溶液(c)及血浆样品(d)的色谱图

Fig.1 Chromatograms of blank plasma (a), internal standard and isosorbide-5-nitrate (b), blank plasma spiked internal standard and isosorbide-5-nitrate (c) and a plasma sample (d)

1. paracetamol (internal standard); 2. isosorbide-5-nitrate.

2.3 回收率及精密度测定

分别于 0.5 mL 的空白血浆中加入 3 种不同浓度的单硝酸异山梨酯对照品溶液,混匀,得到 40, 200, 1 000 μ g/L 等 3 种不同单硝酸异山梨酯浓度的血浆样品,按选定的色谱条件进行测定,测得血浆中单硝酸异山梨酯的浓度,计算回收率及日内测定的相对标准偏差(RSD),连续测定 3 d,计算日间测定的 RSD,结果见表 1。

表 1 回收率及日内、日间测定的 RSD ($n=3$)

Table 1 Results of recovery, intra-day and inter-day RSDs ($n=3$)

Added/ (μ g/L)	Found \pm SD/ (μ g/L)	Recovery \pm SD/%	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%
40	41.73 \pm 0.87	104.34 \pm 2.17	2.08	4.64
200	196.56 \pm 0.95	98.29 \pm 0.48	0.49	1.18
1000	971.14 \pm 24.46	97.11 \pm 2.45	2.52	5.21

2.4 萃取回收率的测定

在 3 支试管中分别加入不同体积的单硝酸异山

梨酯标准溶液,使其中分别含有单硝酸异山梨酯 20, 100, 500 ng,挥干甲醇,加入 200 μ L 流动相溶解,取 50 μ L 在上述色谱条件下进样,分别记录峰面积 A_1 。另取 3 支试管,各加入空白血浆 0.5 mL,再分别加入不同体积的单硝酸异山梨酯标准溶液,也使其中分别含有单硝酸异山梨酯 20, 100, 500 ng,按血浆样品处理与测定方法进行操作,记录峰面积 A_2 ,以 A_2/A_1 之比计算萃取回收率,结果见表 2。

表 2 萃取回收率的测定结果($n=3$)

Table 2 The results of extracting recovery tests ($n=3$)

Added/ ng	Peak areas ¹⁾		Extraction rate ²⁾ /%	Average rate/%
	A_1	A_2		
20	733	607	82.8	
100	4832	3556	73.6	82.2
500	17139	15451	90.2	

1) A_1 : peak area of isosorbide-5-nitrate control; A_2 : peak area spiked the control in blank plasma.

2) Extraction rate = $A_2/A_1 \times 100\%$.

2.2 标准曲线的制作

在 6 支试管中分别加入不同体积的单硝酸异山梨酯系列标准溶液,用氮气吹干,每支试管中分别加入 0.5 mL 空白血浆,使其质量浓度分别为 20, 40, 100, 200, 400, 1 000 μ g/L,从“加入内标 50 μ L”起,按“1.4”节测定方法进行操作。以测得的单硝酸异山梨酯与对乙酰氨基酚的峰面积之比(R)为纵坐标,对应的单硝酸异山梨酯质量浓度(C , μ g/L)为横坐标,进行线性回归,得到回归方程 $R = -0.0022 + 0.0030C$, $r = 0.9999$ 。结果表明,血浆中单硝酸异山梨酯质量浓度为 20 ~ 1 000 μ g/L 时,其质量浓度与 R 有良好的线性关系。

方法的最低检测浓度(以 $S/N=3$ 计)为 12 μ g/L,定量限为 20 μ g/L。

2.5 方法应用

本文所建立的方法采用较为普及的反相高效液相色谱法,方法学实验证明能够满足药代动力学及生物利用度的要求,已用于含有单硝酸异山梨酯制剂的生物利用度测定,取得了较好的结果。图 2 为单剂量口服含 60 mg 单硝酸异山梨酯的某复方制剂及参比制剂后单硝酸异山梨酯的均值药-时曲线。

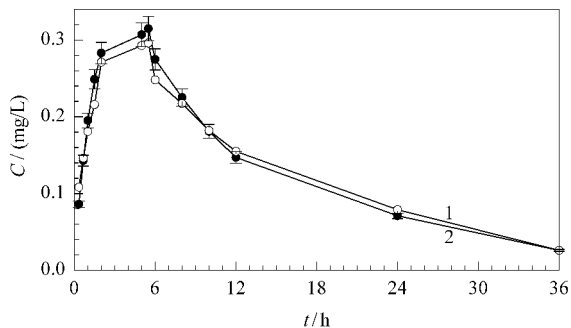


图 2 单剂量口服含 60 mg 单硝酸异山梨酯制剂后的均值药-时曲线

Fig.2 C-t curves of isosorbide-5-nitrate after single oral administration of preparations containing 60 mg isosorbide-5-nitrate

1. control preparation ; 2. isosorbide-5-nitrate compound preparation.

2.6 讨论

文献[4]曾采用高效液相色谱法测定血浆中单硝酸异山梨酯的浓度,但使用的是硅胶分析柱,且流

动相组成复杂。文献[5]采用了高效液相色谱-质谱法测定,但仪器昂贵。本文采用了常见的 C₁₈ 柱,流动相组成简单,使测定更方便。

本文考察了在不同的碱性条件下对单硝酸异山梨酯的提取效果,比较了 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液与饱和 K₂CO₃ 溶液的提取效果,综合萃取回收率与峰形,发现采用 K₂CO₃ 提取效果更佳,因而最终选择了在样品提取中加入 K₂CO₃ 溶液的条件。

参考文献:

[1] Huang Xiaofang, Zhu Yingzi, Cui Baodong, Liu Donglin, Yan Baoxia. Chinese Pharmaceutical Journal (黄小芳, 朱英姿, 崔宝东, 刘东麟, 严宝霞. 中国药学杂志), 1998, 33 (10): 608

[2] Yuan Jing, Ge Shengrong, Shi Anguo, Wang Pingquan. Chinese Journal of Hospital Pharmacy (袁 静, 戈升荣, 施安国, 王平全. 中国医院药学杂志), 2000, 20(8): 462

[3] Lauro-Marty C, Lartigue-Mattei C, Chabard J L, Beyssac E, Aiache J M, Madesclaire M. J Chromatogr B, 1995, 663 (11): 153

[4] Qin Yongping, Zou Yuangao, Liang Maozhi, Huang Ying, Yu Qin, Wang Jianxin. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (秦永平, 邹远高, 梁茂植, 黄 英, 余 勤, 王建新. 药物分析杂志), 2000, 20(3): 165

[5] Liu Lei, Li Kexin, Li Yang, Shi Aixin, He Guangwei, Sun Chunhua. Chinese Pharmaceutical Journal (刘 蕾, 李可欣, 李 扬, 史爱欣, 赫广威, 孙春华. 中国药学杂志), 2001, 36(6): 408

欢迎订阅《分析测试学报》

《分析测试学报》是由中国分析测试学会主办的全国性学术刊物。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面有很强实用性的实验技术。适合科研院所、大专院校、医学、卫生以及厂矿企业从事分析测试工作的人员和管理人员阅读。双月刊,国内外公开发行。国际标准刊号:ISSN 1004-4957,国内刊号:CN 44-1318/TH,国际刊名代码 CODEN: FCEXES,国内邮发代号:46-104,单价:8.00 元/册。

本刊继续入选为化学类核心期刊,并被选为我国论文和引文统计源。在我国 1 240 种主要科技期刊的 1997 年影响因子排序中名列第 9 位。每年被美国化学文摘千种表,美国科学引文索引(SCI)等多家检索数据库/文摘收录。

未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法:请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部(邮编:510070,电话:(020)87684776,E-mail:fxcsxb@China.com),写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期)。

反相高效液相色谱法同时测定川芎中的四种内酯类化合物

曹建敏^{1,4}, 王宗花¹, 丁明玉^{2,4}, 杨学东^{3,4}, 寇怀江⁴

(1. 青岛大学化工学院, 山东 青岛 266071; 2. 清华大学化学系, 北京 100084;
3. 天津大学药学院, 天津 300072; 4. 国家纳米技术产业化基地, 天津 300457)

摘要 :用反相高效液相色谱法同时测定了川芎中的4种主要内酯类成分(洋川芎内酯-H、洋川芎内酯-I、瑟丹酸内酯和蒿本内酯)。采用XDB-C₈柱,以甲醇-1%乙酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,甲醇-1%乙酸水溶液的体积比在15 min内从55:45线性变化至100:0,流速0.8 mL/min,紫外检测波长280 nm。4种内酯类化合物的检测限为0.011~0.027 μg,回收率为96%~108%。该方法操作简单,结果准确,重现性好,可用于川芎药材及饮片4种内酯类化合物的同时测定,具有很高的实用价值。

关键词 :反相高效液相色谱法;洋川芎内酯-H;洋川芎内酯-I;瑟丹酸内酯;蒿本内酯;川芎;中草药

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0531-03

Determination of Lactone Components in Chuanxiong by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

CAO Jianmin^{1,4}, WANG Zonghua¹, DING Mingyu^{2,4}, YANG Xuedong^{3,4}, KOU Huaijiang⁴

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3. College of Pharmaceuticals & Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

4. Nanotechnology Industrialization Base of China, Tianjin 300457, China)

Abstract : A reversed-phase high performance liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of four main lactone components including senkyunolide-H, senkyunolide-I, sedanenolide and Z-ligustilide in Chuanxiong, a Chinese herbal medicine. The samples were pretreated using ultrasonic extraction, and 80% ethanol was used as extractant in the experiment. The chromatographic analysis was carried out using an XDB-C₈ column and the mobile phase consisted of methanol-1% (volume fraction) acetic acid water (55:45→100:0, v/v, in 15 min). The flow rate was 0.8 mL/min. A diode array detector was used to detect the compositions and 280 nm was chosen as the detection wavelength. The whole process could be performed within 15 min. The operating curves were found to be linear over the ranges of 0.4 – 2.2 mg/L ($r=0.9992$), 0.4 – 2.2 mg/L ($r=0.9979$), 2.6 – 7.8 mg/L ($r=0.9992$) and 4.8 – 14.3 mg/L ($r=0.9998$) and the detection limits ($S/N=3$) were 0.024, 0.027, 0.018 and 0.011 μg for senkyunolide-H, senkyunolide-I, sedanenolide and Z-ligustilide, respectively. The recoveries of the four lactone components were found in the range of 96% – 108%. The rapid and accurate method has been successfully applied to the simultaneous determination of the four lactone components in Chuanxiong.

Key words : reversed-phase high performance liquid chromatography; senkyunolide-H; senkyunolide-I; sedanenolide; Z-ligustilide; Chuanxiong; Chinese herbal medicine

中药川芎是伞形科蒿本属植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)的干燥根茎,具有活血行气、祛风止痛之功效,是中医常用药物之一。研究表明,川芎的主要有效成分为挥发油、生物碱、酚性成分、

内酯类化合物及阿魏酸等^[1]。川芎内酯类成分是川芎中一类重要的化合物,属于苯醚衍生物,不少文献将其作为挥发油,采用气相色谱-质谱法对其进行研究^[2-5]。由于人们对川芎内酯的研究尚不够深入

和系统,尚无内酯化合物的对照品或标准品,所以到目前为止还没有关于川芎中川芎内酯的定量分析报道。本实验室自制了川芎中主要的 4 种内酯类化合物(洋川芎内酯-H、洋川芎内酯-I、瑟丹酸内酯和蒿本内酯)的单体,并测定了它们的纯度。本文以自制的 4 种化合物作对照品,采用反相高效液相色谱法同时测定了川芎中这 4 种内酯化合物的含量。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

HP1100 高效液相色谱仪,配有四元梯度泵、在线真空脱气机、柱温箱和二极阵列检测器(DAD)。Agilent 8453 紫外-可见分光光度计。

川芎内酯对照品:以市售的川芎挥发油(超临界流体萃取法制得)为原料,直接采用高压制备液相色谱分离纯化,所得内酯纯度为:洋川芎内酯-H, 98.1%;洋川芎内酯-I, 93.8%;瑟丹酸内酯, 97.0%;蒿本内酯, 86.8%。对照品相关资料详见文献[6]。

对照品溶液:精密称取洋川芎内酯-H、洋川芎内酯-I、瑟丹酸内酯和蒿本内酯对照品适量,分别用甲醇配成 1 g/L 左右的储备液。系列对照品溶液均为此储备液用甲醇稀释后得到。

川芎药材及饮片为市售品;甲醇为色谱纯;乙醇、乙酸乙酯等试剂均为分析纯,水为 Millipore 超纯水(18.2 MΩ·cm,总有机碳 3 mg/L)。

1.2 色谱条件

色谱柱:Eclipse XDB-C₈(150 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm);流动相为甲醇-1%(体积分数,下同)乙酸水溶液,其体积比在 15 min 内从 55:45 线性变为 100:0;流速 0.8 mL/min;检测波长 280 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

1.3 样品溶液的制备

称取同样条件下干燥的川芎药材及饮片粉末约 5 g,加入 50 mL 80%(体积分数,下同)乙醇,超声提取 0.5 h,过滤,残渣再用 40 mL 80%乙醇超声提取 0.5 h,过滤。合并滤液,用无水乙醇定容至 100 mL 备用。进样前用 0.45 μm 滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 样品提取方法的选择

溶剂提取是中药有效成分提取的首选方法,水和乙醇无毒性、成本低,是常用溶剂,因此本文优先予以考虑。另外,为了减少操作步骤及获得尽可能高的提取效率,实验中采用超声提取方式对样品进行提取。我们考察了水和不同浓度乙醇提取时得到的川芎内酯类产物的差异,结果表明,用水作溶剂

时,极性较强的洋川芎内酯-H 和洋川芎内酯-I 提取率较高,极性较弱的瑟丹酸内酯和蒿本内酯提取率较低;用 80%乙醇作溶剂时,4 种内酯均有较高的提取率,故最终选用 80%乙醇为溶剂进行超声提取。

2.2 色谱条件的选择

甲醇水溶液是反相分配色谱中最常用的流动相,在流动相中加入少量乙酸可控制流动相为弱酸性,从而改善色谱峰形,避免色谱峰的“拖尾”。本实验中所测 4 种内酯虽都属于苯酞类化合物,但极性差别很大。洋川芎内酯-H 和洋川芎内酯-I 的分子结构上带有两个羟基,具有较强的极性,在反相分配液相色谱中出峰较快,因此若采用等度洗脱,很难在合理的时间内同时分离上述 4 种内酯。当采用体积分数为 45% 的甲醇水溶液(含 1% 乙酸)等度洗脱时,洋川芎内酯-H 和洋川芎内酯-I 在 6 min 内出峰,且达到基线分离,但瑟丹酸内酯和蒿本内酯由于极性较弱,在色谱柱中的保留很强,不易洗脱出来;若将甲醇浓度提高到足以洗脱并分离瑟丹酸内酯和蒿本内酯的程度,则前两种内酯出峰太快而不能完全分离。因此本实验最终选择采用梯度洗脱。经过实验优化,得到如“1.2”节所述色谱条件,在此条件下 4 种内酯类化合物及共存杂质在 10 min 内达到了较好分离(见图 1)。

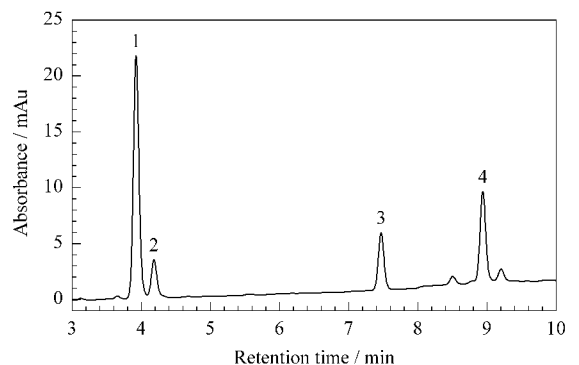


图 1 内酯标准品的高效液相色谱图

Fig. 1 Chromatogram of four lactone standards

1. senkyunolide-H; 2. senkyunolide-I; 3. sedanenolide; 4. Z-ligustilide.

用 Agilent 8453 紫外-可见分光光度计在 190 ~ 400 nm 范围内对各组分的标准溶液进行光谱扫描,结果发现 4 种内酯成分在 280 nm 处都有较大的吸收,故选 280 nm 作为检测波长。

2.3 工作曲线与检测限

取洋川芎内酯-H、洋川芎内酯-I、瑟丹酸内酯和蒿本内酯储备液用甲醇配成一系列不同质量浓度的内酯混合溶液,在“1.2”节所述色谱条件下,进样 10 μL,以各自的峰面积和质量浓度进行线性回归,得到的线性回归方程及相关参数如表 1 所示。

表 1 4 种内酯类化合物的线性回归方程、线性范围、相关系数和检测限 ($S/N=3$)
Table 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients and detection limits ($S/N=3$) of the four lactone standards

Component	Regression equation ¹⁾	r	Linear range/(mg/L)	Detection limit/ μg
Senkyunolide-H	$Y=57.878X-1.509$	0.9992	0.4-2.2	2.4×10^{-2}
Senkyunolide-I	$Y=6.782X+0.771$	0.9979	0.4-2.2	2.7×10^{-2}
Sedanenolide	$Y=12.619X-0.468$	0.9992	2.6-7.8	1.8×10^{-2}
Z-Ligustilide	$Y=21.8799X+1.997$	0.9998	4.8-14.3	1.1×10^{-2}

1) Y : peak area; X : mass concentration of lactone standard, mg/L.

2.4 精密度、重复性和回收率试验

取川芎内酯类化合物对照品,按“1.2”节色谱条件重复进样 6 次,测定色谱分析方法的精密度

(用相对标准偏差 RSD 表示),结果见表 2。从表 2 可看出,该方法的 RSD 为 0.85%~3.5%,说明 4 种内酯类化合物其色谱峰面积的重现性较好。

表 2 4 种内酯类化合物的精密度试验结果
Table 2 Precision of the HPLC method for the four lactones

Component	Peak areas						RSD/ %
	1	2	3	4	5	6	
Senkyunolide-H	73.7	73.0	74.9	73.8	74.2	74.0	0.85
Senkyunolide-I	12.5	11.9	12.7	12.7	12.8	12.9	2.9
Sedanenolide	17.5	18.0	19.0	18.9	19.1	18.5	3.5
Z-Ligustilide	29.2	30.5	30.6	29.9	30.3	30.8	1.9

取同一批川芎饮片 3 份,按“1.3”节所述方法制备样品溶液,重复进样 3 次,结果见表 3。

分别按“1.3”节所述制备样品液,测定其中 4 种内酯类化合物的含量,结果见表 5。

表 3 4 种内酯类化合物的重复性试验结果($n=3$)
Table 3 Repeatability of the four lactones ($n=3$)

Component	1	2	3	RSD/%
Senkyunolide-H	0.901	0.884	0.914	1.67
Senkyunolide-I	1.060	1.032	1.087	2.59
Sedanenolide	5.529	5.412	5.233	2.77
Z-Ligustilide	5.557	5.335	5.470	2.05

表 5 川芎药材及饮片中内酯类化合物的含量($n=3$)
Table 5 Contents of the four lactone components in Chuanxiong samples ($n=3$)

Component	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	mg/g
Senkyunolide-H	0.901	1.304	0.795	0.556	
Senkyunolide-I	1.060	2.083	1.185	0.714	
Sedanenolide	5.529	5.270	2.570	5.767	
Z-Ligustilide	5.557	7.486	4.105	8.427	

Sample A: Chuanxiong slices; sample B: Chuanxiong from Sichuan Guanxian; samples C, D: Chuanxiong from Sichuan Dujiangyan in 1999, 2004, respectively.

精密称取 3 份已知川芎内酯含量的川芎药材粉末,分别加入一定量(见表 4)的对照品,再按“1.3”节所述制备样品液,计算回收率,结果见表 4。

表 4 4 种内酯类化合物的回收率试验结果

Table 4 Recoveries of the four lactones

Component	Back-ground/ mg	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %	Average recovery/ %
Senkyunolide-H	0.454	0.201	0.631	88.060	96.05
	0.450	0.302	0.738	95.364	
	0.452	0.402	0.873	104.726	
Senkyunolide-I	0.519	0.244	0.781	107.377	108.68
	0.519	0.367	0.911	106.812	
	0.519	0.489	1.066	111.861	
Sedanenolide	2.736	0.550	3.331	108.182	104.55
	2.714	0.825	3.550	101.333	
	2.725	1.100	3.981	114.182	
Z-Ligustilide	2.801	0.490	3.340	110.000	108.12
	2.779	0.735	3.510	99.456	
	2.790	0.979	3.915	114.913	

2.5 样品的测定

称取市售饮片及产自四川灌县和四川都江堰(分别于 1999 年采收和 2004 年采收)的川芎药材,

3 结语

本文建立的分离和测定川芎中 4 种内酯类化合物的反相高效液相色谱方法简单、可靠,易于操作,重现性好,具有很高的实用价值。

参考文献:

- [1] New Medical College of Jiangsu. Great Dictionary of Chinese Medicine. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers (江苏新医学院. 中药大辞典. 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社),1988. 220
- [2] Choi H S, Kim M S L, Sawamura M. Flavour and Fragrance Journal, 2002, 17(1):49
- [3] Chen Peisheng, Cheng Xueren, Liu Fajin, Wu Huiqin. Journal of Instrumental Analysis(陈培胜,程学仁,刘法锦,吴惠勤. 分析测试学报),2001, 20(4):50
- [4] Shi Lifu, Deng Yanzhao, Wu Bosheng. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(石力夫,邓延昭,吴柏生. 药物分析杂志),1995, 15(3):26
- [5] Li Zhangwan, Zhang Qiang. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(李章万,张强. 药物分析杂志),1993, 13(3):187
- [6] Li H-X, Ding M-Y, Yu J-Y. J Chromatogr Sci, 2002, 40(3):156

杜仲中京尼平甙酸的硅胶柱色谱分离纯化及反相高效液相色谱/液相色谱-电喷雾质谱/核磁共振鉴定

曹 慧¹, 陈晓青¹, 肖建波¹, 唐兆麒¹, 欧阳冬生²

(1. 中南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410083; 2. 中南大学临床药理研究所, 湖南 长沙 410078)

摘要 :建立了杜仲中京尼平甙酸的硅胶柱色谱分离纯化及反相高效液相色谱/液相色谱-电喷雾质谱/核磁共振(RP-HPLC/LC-ESI-MS/NMR)鉴定方法。杜仲皮经粉碎后,用70%乙醇提取,提取液经减压蒸馏至干,再用甲醇溶解,然后吸附于硅胶上,并以不同体积比的氯仿-甲醇混合液按洗脱剂的极性由小到大进行洗脱,以RP-HPLC法检测洗脱液中物质的种类和含量。结果表明:洗脱剂为氯仿-甲醇(体积比为8:1)的洗脱液经分析为单一组分,其保留时间为5.142 min;以对照品京尼平甙酸添加法测定,其峰高增加;相关紫外光谱和红外光谱检测结果与京尼平甙酸对照品基本一致,结合LC-ESI-MS、¹H-NMR和¹³C-NMR等测定,确定该洗脱组分为京尼平甙酸。

关键词 :柱色谱法;反相高效液相色谱法;液相色谱-电喷雾质谱;核磁共振;京尼平甙酸;杜仲;中药

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0534-04

Isolation, Purification and Identification of Geniposidic Acid in *Eucommia ulmoides* Oliv. by Silica Column Chromatography, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance

CAO Hui¹, CHEN Xiaoqing¹, XIAO Jianbo¹, TANG Zhaoqi¹, OUYANG Dongsheng²

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract : The methods using silica column chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography, liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (RP-HPLC/LC-ESI-MS/NMR) for the isolation, purification and identification of geniposidic acid (GPA) in *Eucommia ulmoides* Oliv. were established. The crude extract of *E. ulmoides* was obtained after *E. ulmoides* was extracted with 70% ethanol and the extract was concentrated under reduced pressures. The obtained crude extract dissolved in methanol was injected to a silica gel column and eluted with chloroform-methanol. The eluted fractions were analyzed by RP-HPLC. The eluant from chloroform-methanol (8:1, v/v) was indicated to be a single component by HPLC with a retention time of 5.142 min. The HPLC analysis of the mixture of this fraction with a GPA standard resulted in a single peak. The ultraviolet and infrared spectra of the eluted solution were essentially the same to those of GPA. On the other hand, LC-ESI-MS, ¹H- and ¹³C-NMR experiments also indicated that the fraction was identical to GPA.

Key words : column chromatography; reversed-phase high performance liquid chromatography; liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; nuclear magnetic resonance; geniposidic acid; *Eucommia ulmoides* Oliv.; traditional Chinese medicine

杜仲是我国传统的名贵药材,《神农本草经》和《本草纲目》都记载杜仲具有增强人体内部机理、抗衰老等多种药理作用^[1]。现代研究表明,杜仲提取物还具有降血压、止痛、镇静及其他药理作用^[2,3]。日本学者最新实验研究发现,杜仲中京尼平甾酸(GPA)(结构见图1)在临床上降压作用十分明显,日本健康与卫生部已经把它作为一种有降压特殊用途的保健品添加剂^[4]。

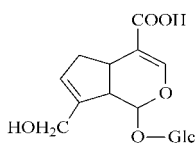


图1 京尼平甾酸的结构
Fig.1 Structure of geniposidic acid

虽然有利用大孔树脂吸附纯化杜仲中活性成分的研究报道^[5,6],但大孔树脂只能进行初步的分离纯化,不能得到高纯度的单体。到目前为止,关于高纯度的京尼平甾酸的制备鉴定的研究还未见报道。本文建立了杜仲中京尼平甾酸的硅胶柱色谱分离纯化及反相高效液相色谱/液相色谱-电喷雾质谱/核磁共振(RP-HPLC/LC-ESI-MS)鉴定方法,为杜仲的进一步开发利用提供了依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和材料

Shimadzu 2010A 高效液相色谱仪,SPD-M10AVP 检测器;LCQ 型电喷雾质谱(全扫描)(Finnigan 公司);Bruker DRX-500 型核磁共振仪;756MC 型 UV-VIS 扫描仪(上海分析仪器厂);Bruker Vector 22 型红外光谱(IR)仪。甲醇为色谱纯;高效液相色谱所用水为石英亚沸水;氯仿、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均为分析纯;GPA 标准品(纯度 $\geq 98\%$,日本和光纯药工业株式会社提供);柱色谱用硅胶(100~200目,青岛海洋化工厂)。杜仲原料购于湖南张家界。

1.2 硅胶的预处理

将500 g 硅胶装于玻璃柱中,用去离子水反复淋洗,直至用0.5 mol/L 硝酸银溶液检测不出 Cl^- ,用0.5 mol/L 氢氧化钡溶液检测不出 SO_4^{2-} ,取出并烘干,然后分别用分析纯的甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯各200 mL 淋洗,最后将溶剂挥发干净,在110 $^\circ\text{C}$ 下烘干5 h,置于干燥器中,待用。

1.3 杜仲中环烯醚萜类化合物的提取与分离

称取干燥杜仲皮粗粉10 g 置于提取器中,加入100 mL 70%(体积分数)的乙醇,在50 $^\circ\text{C}$ 下提取2

h,过滤。提取两次,合并滤液。滤液经减压蒸馏至约20 mL。用20 mL 正丁醇萃取浓缩液3次,合并萃取液,减压蒸馏并蒸发至近干。所得浸膏用40 mL 甲醇溶解后,转移至200 mL 烧杯中,加入40 g 处理后的硅胶,于30~40 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热,低温下蒸干甲醇,此时硅胶吸附了样品,将其烘干,备用。

将上述吸附了样品的硅胶用干法装于68 cm \times 25 mm i. d. 的开口玻璃柱(自制)中。配制不同体积比(20:1至1:1,每份配制50 mL)的氯仿-甲醇混合溶液作洗脱剂,按洗脱剂的极性由小到大顺序洗脱,每一配比的洗脱剂收集一个流分,同时进行高效液相色谱跟踪检测,检测洗脱液中的环烯醚萜类化合物的种类和含量。

1.4 供试品溶液的配制

将“1.3”节中洗脱剂为氯仿-甲醇(体积比为8:1)的洗脱液再上柱洗脱,洗脱液用70%的乙醇重结晶,将结晶溶于甲醇,作为LC-ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、UV 和 IR 的供试品溶液。

1.5 色谱和波谱条件

1.5.1 HPLC 分析

色谱柱为 C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm ,日本岛津);流动相为甲醇-水-醋酸(体积比为20:79.5:0.5),流速1.0 mL/min;检测波长237 nm;柱温25 $^\circ\text{C}$;进样量10.0 μL 。同时用光电二极管阵列检测器检测,波长扫描范围190~600 nm。外标法定量。

1.5.2 UV 光谱

将测试溶液置于石英比色皿中,用相应的溶剂作空白,在756MC 型 UV-VIS 扫描仪上扫描。如果样品浓度太高,则要用相应溶剂稀释。

1.5.3 IR 光谱

先压一空白的KBr片,用滴管将供试品溶液滴于KBr片上,置于红外灯下烘干。

1.5.4 LC-ESI-MS

LC 条件与“1.5.1”节相同。质量扫描范围 m/z 150~800,分辨率为13 000,锥体电压40 V,电离电压2.3 kV。

1.5.5 NMR

由于京尼平甾酸易溶于水,故采用 D_2O 作为试剂进行 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 分析。

1.5.6 产品中 GPA 含量测定

按“1.5.1”节方法进行测定。

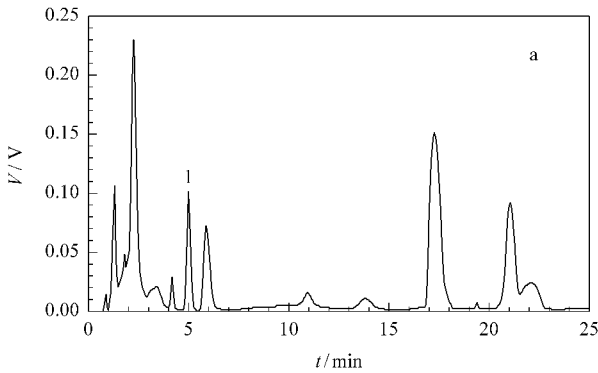
1.6 京尼平甾酸的鉴定

将供试品、对照品和两者混合液分别进行 RP-HPLC 分析,并进行 LC-ESI-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 、UV 和 IR 分析。

2 结果与讨论

2.1 杜仲粗提物及供试品溶液的 HPLC 分析

杜仲粗提物和供试品溶液的 HPLC 图谱见图 2。由图 2-b 可见供试品溶液的 HPLC 图谱只出现



一个色谱峰(保留时间(t_R)为 5.142 min),对应于杜仲粗提物的 HPLC 图谱中 t_R 为 5.108 min 的组分。与对照品京尼平甙酸混合进样分析,发现峰高增加。这表明该洗脱组分为京尼平甙酸,成分单一,可用硅胶柱色谱从杜仲粗提物中直接分离并纯化。

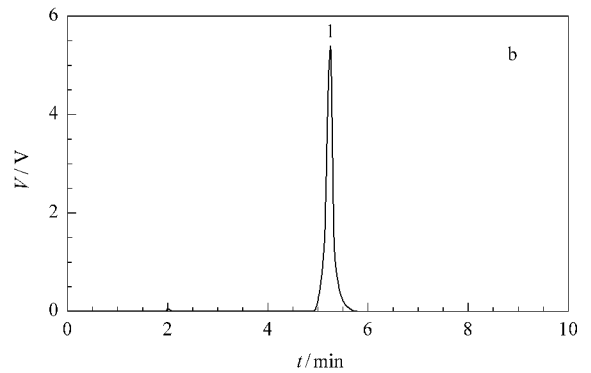


图 2 杜仲粗提物(a)和供试品溶液(b)的 HPLC 图谱

Fig.2 Chromatograms of a crude extract (a) and the fraction eluted with chloroform-methanol (8:1, v/v) (b)
1. GPA.

2.2 供试品溶液的紫外光谱

对供试品溶液进行紫外扫描,以甲醇为空白,扫描范围 190 ~ 400 nm,扫描速率 200 nm/min,吸光度范围 0 ~ 3.000。供试品溶液的最大吸收波长为 237 nm,与对照品溶液的紫外光谱图一致。

2.3 供试品溶液的红外光谱

红外光谱采用 KBr 压片,主要吸收峰出现的位置有 3388 cm^{-1} ,为一宽峰,表明有羟基存在; 2925 cm^{-1} ,为一尖峰(中等强度),表明有饱和 C—H 键存在; 1690.60 cm^{-1} ,为一强峰,是 $\alpha\beta$ -不饱和酯中羰基引起的伸缩振动,其波数比一般羰基的伸缩振动峰要高,从而佐证了取代羧基上的羰基的存在,说明供试品在 C_4 上有一 COOH; 1630.85 cm^{-1} ,为强峰,此峰系烯烃双键的伸缩振动引起的^[7]; 1161 和 1201 cm^{-1} ,为尖峰(中等强度),表明有醚键存在。

2.4 供试品溶液的 LC-ESI-MS 分析

对供试品溶液分别进行正离子化和负离子化方式的 LC-ESI-MS 分析,结果见图 3。

图 3-a 为供试品溶液的正离子 ESI-MS 图谱,在 m/z 375.3, 397.2 和 413.3 处有强的离子峰。由于以正离子源为离子化方式易形成 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 的离子峰,而此两者的相对分子质量数相差 16,根据一组相近的相对分子质量数相差 16 的离子峰可以推断出供试品中主要成分的相对分子质量。从图 3-a 可以看出,环烯醚萜类化合物在离子化的过程中产生了 $[M + Na]^+$ 和 $[M + K]^+$ 的离子峰,判断分子离子峰 $[M + H]^+$ 的 M_r 为 375.3,与京尼平甙酸 (M_r 为 374.3)一致。

以负离子源为离子化方式对环烯醚萜类化合物进行分析,一般只形成分子离子峰 $[M - H]^-$,而几乎无碎片离子峰,有利于相对分子质量的直接测定。因此负离子源离子化方式是正离子源离子化方式的

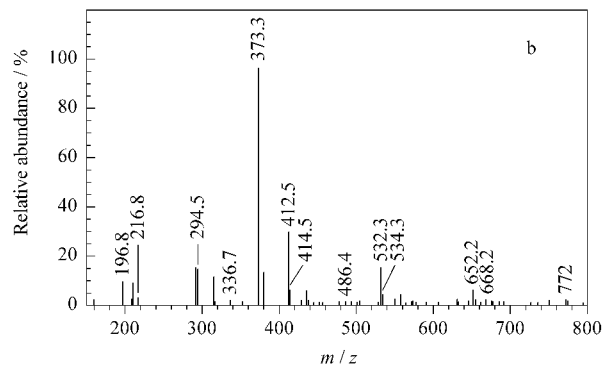
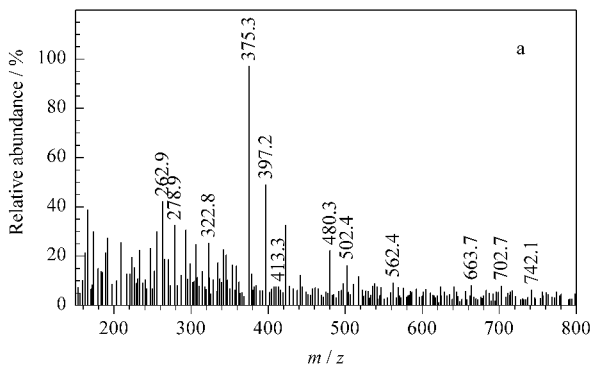


图 3 供试品溶液的 LC-ESI-MS 图谱

Fig.3 LC-ESI-MS spectra of the eluted solution

a. positive ionization mode ; b. negative ionization mode.

补充,根据相对分子质量数差值可以推断出环烯醚萜类化合物的相对分子质量。图 3-b 为供试品溶液的负离子 ESI-MS 图谱,在 m/z 373.3 处有分子离子峰 $[M-H]^-$,从而佐证了环烯醚萜类化合物的相对分子质量为 374.3 的结论。

2.5 供试品溶液的¹H-NMR 和¹³C-NMR 分析

供试品溶液去除溶剂后,分别进行¹H-NMR 和¹³C-NMR 分析。¹H-NMR(D_2O)的化学位移 δ 的检测结果:5.22(C_1-H),5.90(C_7-H),7.46(C_3-H);¹³C-NMR(D_2O)的化学位移 δ 检测结果:98.7($C-1$),152.8($C-3$),112.6($C-4$),5.4($C-5$),38.9($C-6$),126.6($C-7$),145.1($C-8$),46.8($C-9$),60.6($C-10$),168.4($C-11$),99.8($C-1'$),73.5($C-2'$),77.2($C-3'$),70.8($C-4'$),77.1($C-5'$),61.3($C-6'$)。这些结果与文献[8]报道的一致。

2.6 GPA 纯度的测定结果

按照上述方法制得京尼平甾酸晶体。称取适量晶体,用甲醇溶解并定容,按“1.5.6”节方法测得其纯度为 98.74%。按照上述方法加标进行 4 次平行制备,京尼平甾酸的平均回收率达 88.19%。

参考文献:

- [1] Zhao Juntai, Zhang Cheng. Journal of Practical Medical Techniques (赵军太,张 诚.实用医技杂志),2003,10(9):1025
- [2] Kwan C-Y, Chen C-X, Deyama T, Nishibe S. Vascular Pharmacology,2004,40:229
- [3] Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, Satoh S, Chiba A, Sekihashi K, Miura A, Yasugahira N, Sasaki Y F. Mutat Res,1997,388:7
- [4] Deyama T, Nishibe S, Nakazawa Y. Acta Pharmacologica Sinica,2001,22(12):1057
- [5] Peng Mijun, Zhong Shian, Zhou Chunshan, Dong Chaoqing, Lei Qifu. Ion Exchange and Adsorption (彭密军,钟世安,周春山,董朝清,雷启福.离子交换与吸附),2004,20(1):13
- [6] Chen Xiaoqing, Li Yuping, Peng Mijun, Wang Yulin, Deyama T. Journal of Central South University of Technology (陈晓青,李宇萍,彭密军,王玉林,出山武.中南工业大学学报),2003,34(3):262
- [7] Xiao Chonghou, Yang Songsong, Hong Xiaokun, Wan De-guang. Traditional Chinese Medicinal Chemistry. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers (肖崇厚,杨松松,洪筱坤,万德光.中药化学.上海:上海科学技术出版社),2002.444
- [8] Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S, Nishibe S. Chem Pharm Bull,1986,34(12):4933

关于首届中国中西部地区色谱学术交流会暨仪器展览会的征稿通知

(第一轮通知)

根据“中国中西南地区第三届色谱学术交流会暨仪器展览会”会议领导小组的建议,经甘青宁色谱协作中心讨论,决定由甘肃省化学会色谱专业委员会主办下一届色谱学术交流会。基于地域的扩大,主办单位与最早的发起单位、上一届的主办单位协商,将会议名称定为“首届中国中西部地区色谱学术交流会暨仪器展览会”。交流会拟于 2006 年 8 月份在丝绸之路重镇、万里长城起点——甘肃省嘉峪关市举行。现将征稿有关事项通知如下:

一、凡反映近年来色谱领域在基础研究新办法、新技术、分析应用、仪器及部件研制等方面有较高水平的论文均可应征。

二、应征的论文要求:

1. 内容简明扼要,能反映工作特点,按正式出版物要求编写,字数在 3000 字以内(含图表)。需纸样和电子文档,纸样采用 A4 纸打印,电子文档通过 E-mail 或软盘提交,文件采用 Word 格式。
2. 需附作者单位的推荐信,证明不涉及保密、未在全国学术会议上宣读或在公开刊物上发表。
3. 稿件需注明作者和单位(室、科、系)邮编、详细地址和联系电话,并附有 50 字以内的第一作者简介。
4. 征稿截止日期为 2006 年 5 月 31 日,逾期不再接受。
5. 应征稿件请寄:兰州市南昌路 341 号 401 室 董运宇 研究员 收 邮编:730000

Tel:(0931)8261026 Fax:(0931)8277088 E-mail:gshxh@lzb.ac.cn

甘肃省化学会
2005 年 8 月 13 日

高效液相色谱法同时测定扁桃仁中的 水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆

申烨华^{1,2}, 张 萍³, 孔祥虹⁴, 郭春会⁵, 王继武²

(1. 西北大学化学系, 陕西 西安 710069; 2. 延安大学化学系 化学工程陕西省重点实验室, 陕西 延安 716000;
3. 咸阳师范学院化学系, 陕西 咸阳 712000; 4. 陕西出入境检验检疫局, 陕西 西安 710068;
5. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 西安 710065)

摘要 建立了用高效液相色谱同时测定扁桃仁中4种水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆ 的方法。以酸水解法处理样品, 在 Inertsil ODS-3 柱 (25 cm × 4.6 mm i. d., 5.0 μm) 上, 以 0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.0)-甲醇 (体积比为 70:30) 为流动相进行等度洗脱, 检测波长 265 nm 条件下, 对陕西蒲城扁桃仁中的水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆ 的含量进行了同时测定。4种水溶性维生素在其质量浓度为 5.0 ~ 50 mg/L 时线性良好 ($r = 0.9990 \sim 0.9997$); 添加水平为 5.0 ~ 20.0 mg/kg 时, 平均回收率为 91.77% ~ 99.30%, 相对标准偏差 ($n = 3$) 为 0.31% ~ 1.98%。测得陕西蒲城产扁桃仁中维生素 B₂ 的含量为 4.27 ~ 4.53 mg/kg, 维生素 B₁ 的含量为 0.799 ~ 0.838 mg/kg, 未检出维生素 C 和维生素 B₆。该法简便、快速, 准确性和重现性均较好, 对果仁中水溶性维生素的测定具有一定的参考价值。

关键词 高效液相色谱; 水溶性维生素; 扁桃仁

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)05-0538-04

Simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins C, B₁, B₂ and B₆ in Almonds by High Performance Liquid Chromatography

SHEN Yehua^{1,2}, ZHANG Ping³, KONG Xianghong⁴, GUO Chunhui⁵, WANG Jiwu²

(1. Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Chemical Reaction Engineering Provincial Key Laboratory, Department of Chemistry, Yan'an University, Yan'an 716000, China;
3. Department of Chemistry, Xianyang Teachers College, Xianyang 712000, China; 4. Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China; 5. College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Xi'an 710065, China)

Abstract: A method has been developed for the simultaneous determination of four water-soluble vitamins C, B₁, B₂ and B₆ in almond by high performance liquid chromatography. The contents of vitamins C, B₁, B₂ and B₆ in almonds in Pucheng County, Shaanxi Province were determined under optimized conditions as follows. In the first step, the sample was prepared by acid hydrolysis. In the second step, the separation was performed on an Inertsil ODS-3 column (25 cm × 4.6 mm i. d., 5.0 μm) with a mobile phase of 0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.0)-methanol (70:30, v/v) and a detection wavelength at 265 nm. The linear ranges of four vitamins were within 5.0 – 50.0 mg/L ($r = 0.9990 \sim 0.9997$). At the spike level ranged between 5.0 – 20.0 mg/kg, the average recoveries of the four vitamins in the Pucheng almond ranged from 91.77% to 99.30% with relative standard deviations between 0.31% and 1.98%. For vitamins B₂ and B₁, the contents were found to be 4.27 – 4.53 mg/kg and 0.799 – 0.838 mg/kg, respectively, while vitamins C and B₆ were not discovered in Pucheng almonds. The method is simple, rapid, reproducible and accurate.

Key words: high performance liquid chromatography; water-soluble vitamin; almond

收稿日期 2004-09-14

作者简介: 申烨华, 女, 理学博士, 副教授, 主要从事植物有效成分的分析分离、天然植物产品开发和蛋白质分离纯化与复性研究,

Tel (029) 83040586, E-mail: yshen1220@163.com.

基金项目: 陕西省黄土高原水土保持世界银行贷款项目和陕西省自然科学基金项目(No. 2002B08).

扁桃(Prunes Amygdales Stokes),即巴旦杏,又称美国大杏仁,是世界著名干果之一。它除了富含人体所需的基本营养物质如氨基酸、脂肪酸、维生素、微量元素外,还富含其他活性成分如苦杏仁甙^[1,2]、消化酶、甾醇类^[3]、黄酮甙类^[4]、多酚类^[5]、神经鞘脂类^[3]、倍半萜烯内脂类^[6]等,有望被作为功能性食品。扁桃仁具有滋阴补肾、明目健脑、抗癌防癌、降血脂、抗氧化、增强免疫力等多种医疗功能^[2],也可用其直接制作高级食用保健油及高级化妆品^[2],因此市场开发前景极为广阔。

水溶性维生素是植物中一类重要的营养成分,常用的测定方法^[7]有:紫外分光光度法、荧光法和高效液相色谱法(HPLC)。HPLC法因处理样品简单、快速,且能同时测定几种维生素而被广泛应用于食品^[8]、药品^[9,10]中维生素的测定。但采用HPLC同时测定果仁中4种水溶性维生素C、B₁、B₂和B₆尚未见报道。本文用反相HPLC对陕西蒲城产扁桃仁中的4种水溶性维生素C、B₁、B₂和B₆进行同时测定,并对样品处理方法及流动相体系进行了优化,同时进行了方法学评价。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:Shimadzu 6A 高效液相色谱仪带紫外检测器(岛津公司);Mettler Toledo Delta 320pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)等。

试剂:V_C、V_{B₁}、V_{B₂}、V_{B₆}对照品(纯度≥99%,美国SPELCO公司);甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);磷酸二氢钾(分析纯,西安试剂厂)等。

扁桃仁样品 8[#]、11[#]和 13[#](陕西蒲城产,引种于美国加州,由西北农林科技大学园艺学院郭春会教授惠赠)。

1.2 标准储备液的制备

准确称取 V_C、V_{B₁}、V_{B₂}、V_{B₆}各 0.05 g 于 50 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至刻度,配成各种维生素质量浓度均为 1 g/L 的单标储备液。使用前,根据需要以 0.1 mol/L 盐酸稀释混合成指定质量浓度的混合标准工作液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱(25 cm × 4.6 mm i. d. 5.0 μm),流动相为 0.05 mol/L KH₂PO₄(pH 6.0)-甲醇(体积比为 70:30),流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,检测波长 265 nm,进样量 20 μL。用峰面积比较法计算出样品中各水溶性维生素的含量。

1.4 样品处理^[8]

取一定量干燥扁桃仁,粉碎,称取 5.0 g 扁桃仁

粉于 100 mL 锥形瓶中,加入 40 mL 0.1 mol/L 盐酸超声混匀后,于 100 kPa 高压下水解 30 min(120 °C),冷却后,再用 0.1 mol/L 盐酸定容至 50 mL,超声混匀,静置,取上清液离心,得 V_{B₁}、V_{B₂}和 V_{B₆}的提取液。另取扁桃仁粉 5.0 g 于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 8%(体积分数,下同)偏磷酸溶液超声提取 20 min,再用 2% 偏磷酸溶液定容至刻度,充分摇匀,静置,取上清液离心,得 V_C的提取液。取两种提取液各 1.0 mL 混合,过 0.3 μm 滤膜后测定。

2 结果与讨论

2.1 样品处理

天然食品中的维生素多以结合态形式存在于食品中,所以在分析测定之前,首先必须使其转变为游离态。参考文献[8],首先用 0.1 mol/L 盐酸于高压下水解样品,使结合态的 V_{B₁}、V_{B₂}和 V_{B₆}游离出来。然后对样品进行超声提取,并用 0.3 μm 滤膜过滤提取液以除去大量杂质的干扰。V_C通常采用草酸、醋酸、偏磷酸等溶液直接提取。由于偏磷酸对 V_C有很好的稳定性,且能沉淀蛋白质,澄清提取液,对含有大量蛋白的扁桃仁样品来说更为合适,故本文采用 8% 偏磷酸溶液提取 V_C。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 检测波长

测定 254 ~ 285 nm 之间各种维生素的响应值(见图 1)。实验结果表明,V_C、V_{B₁}和 V_{B₂}在 265 nm 处吸收最大。虽然 V_{B₆}在 255 nm 处吸收最大,但其在 265 nm 处的灵敏度也可满足要求,故选取 265 nm 为 4 种维生素的检测波长。

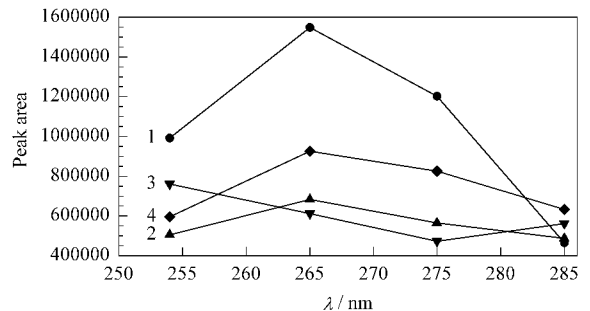


图 1 检测波长对 4 种维生素响应值的影响

Fig.1 Effect of wavelength on simultaneous detection of four water-soluble vitamins

1. V_C(100 mg/L); 2. V_{B₁}(100 mg/L); 3. V_{B₆}(200 mg/L); 4. V_{B₂}(100 mg/L).

2.2.2 流动相中缓冲液的种类

由于通常多用缓冲盐体系作为测定水溶性维生素的流动相,因此分别比较了 0.1 mol/L NH₄Ac-HAc 体系及 0.05 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄ 体系与甲

醇混合后对维生素分离情况的影响。实验结果表明,在 0.1 mol/L NH₄Ac-HAc (pH 4.5) 体系中 V_{B₂} 保留时间较长(25 min),且基线噪声大;而 0.05 mol/L KH₂PO₄-H₃PO₄(pH 4.5) 体系中,各种维生素保留时间适中,20 min 内均可出峰,且基线噪声小,所以最终选择 KH₂PO₄-H₃PO₄ 体系作为流动相缓冲溶液。

进一步的实验表明,当采用流动相体系为 0.05 mol/L KH₂PO₄(pH 6.0)-甲醇(体积比为 70:30) 时 4 种水溶性维生素的分离情况较好,在 15 min 之内出峰完全(见图 2-a)。

2.2.3 流动相中缓冲液的 pH 值

水溶性维生素在水中易产生电离,电离后的离子在反相柱中的保留时间较短,不利于分离。实验中通过调节流动相中 KH₂PO₄ 溶液的 pH 值来控制水溶性维生素的电离,从而提高 4 种维生素在色谱柱上的保留能力,达到有效分离。实验结果见图 2。

由图 2 可见,流动相中 KH₂PO₄ 溶液的 pH 值高低对 V_{B₂} 与其他 3 种维生素之间的分离影响不大,而对 V_C, V_{B₁} 和 V_{B₆} 之间的分离影响很大。pH 值小于 4.5 时, V_{B₆} 与 V_C 峰完全重叠, V_{B₁} 的保留时间小于 V_C 的保留时间。pH 4.5 时, V_{B₆} 与 V_C 峰部分重叠, 3 种维生素的保留时间顺序为 V_{B₁} < V_C < V_{B₆} (见图 2-c)。pH 5.5 时, V_C, V_{B₁} 和 V_{B₆} 基本分开,且保留时间顺序为 V_C < V_{B₁} < V_{B₆} (见图 2-b)。在 pH 6.0 时 4 种维生素达到基线分离,其保留时间顺序与 pH 5.5 时相同(见图 2-a)。故实验最终确定 KH₂PO₄ 溶液的 pH 值为 6.0。

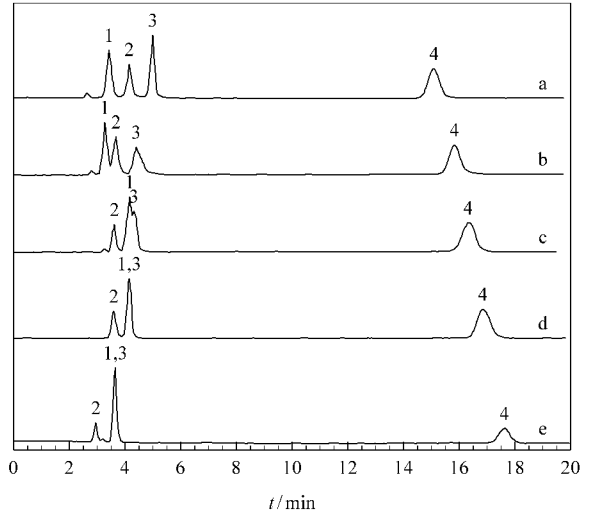


图 2 流动相中缓冲液 pH 值对 4 种水溶性维生素分离的影响

Fig. 2 Effect of the pH of the buffer in the mobile phase on separation of the four water-soluble vitamins

Mobile phase: 0.05 mol/L KH₂PO₄-methanol (70:30, v/v); pHs: a. 6.0, b. 5.5, c. 4.5, d. 3.5, e. 2.5. Detection wavelength: 265 nm.

Peaks: 1. V_C; 2. V_{B₁}; 3. V_{B₆}; 4. V_{B₂}.

2.3 方法学评价

2.3.1 线性关系与检出限

配制 2.0 ~ 50 mg/L 系列质量浓度的 4 种维生素混合标准溶液,在“1.3”节所述条件下进样测定,峰面积 A 与维生素质量浓度 C (mg/L) 的线性关系见表 1。以信噪比(S/N)为 3 计,测得各维生素的检出限也列于表 1。结果表明,各水溶性维生素在质量浓度为 5.0 ~ 50 mg/L 时线性关系良好。

表 1 4 种水溶性维生素的线性回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and detection limits of the four water-soluble vitamins

Analyte	Linear range/(mg/L)	Regression equation ¹⁾	r	Detection limit ²⁾ /(mg/L)
V _C	2.0 - 50	A = 25200C + 410.44	0.9991	0.65
V _{B₁}	5.0 - 50	A = 15581C + 74.739	0.9994	0.51
V _{B₆}	5.0 - 50	A = 14289C + 97.865	0.9997	0.42
V _{B₂}	2.0 - 50	A = 14821C + 205.25	0.9990	0.34

1) A: peak area; C: mass concentration, mg/L. 2) calculated as S/N=3.

2.3.2 回收率实验

在实际样品测定的基础上分别添加维生素 V_C,

V_{B₁}, V_{B₂}, V_{B₆} 对照品,每个添加水平平行测定 3 次,进行回收率和精密度实验,实验结果见表 2。

表 2 4 种水溶性维生素的回收率和精密度测定结果 (n=3)

Table 2 Recovery and precision of the four water-soluble vitamins (n=3)

Analyte	Added/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%	Analyte	Added/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Recovery/%	RSD/%
V _C	5.0	4.5	89.2	1.98	V _{B₆}	5.0	4.9	97.4	0.36
	10.0	9.3	92.6	2.68		10.0	9.6	95.5	0.83
	20.0	18.7	93.5	2.21		20.0	18.8	94.0	1.21
V _{B₁}	5.0	4.4	87.6	1.82	V _{B₂}	5.0	4.9	98.2	0.31
	10.0	9.1	91.2	0.76		10.0	10.3	103.2	0.54
	20.0	18.4	92.0	1.02		20.0	19.3	96.5	0.89

2.4 样品测定

按照上述条件测定陕西蒲城产 3 种扁桃仁中 4

种水溶性维生素的含量, 测定结果及与部分果仁的比较结果见表 3, 其中 13[#] 样品的色谱图见图 3。

表 3 扁桃仁与部分果仁中水溶性维生素含量的比较

Table 3 Comparisons of water-soluble vitamins between in almonds and some kernels

Analyte	Almonds (Shaanxi)			Almonds ^[11] (Xinjiang)	Pine nuts ^[12] (Beijing)	Apricot nuts ^[12] (Hebei)	Peanuts ^[12] (Shaanxi)
	8 [#]	11 [#]	13 [#]				
V _C	ND	ND	ND	-	-	-	-
V _{B₁}	0.812	0.838	0.799	3.50	1.9	0.5	5.4
V _{B₆}	ND	ND	ND	-	-	-	-
V _{B₂}	4.27	4.53	4.41	3.21	2.5	6.9	2.6

- : not determined ; ND : not detected.

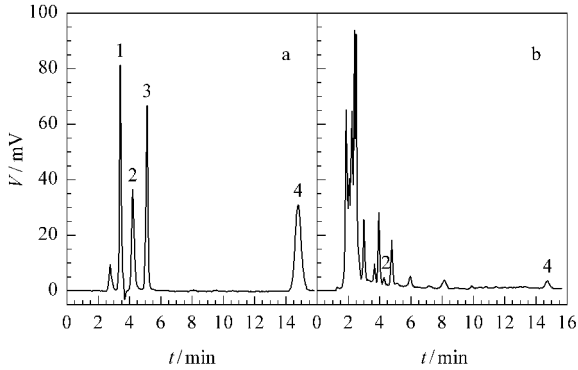


图 3 水溶性维生素混合标准液(a)及 13[#] 果仁样品(b) 的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the mixture of 4 vitamin standards (a) and an almond sample (b)

Peaks : 1. V_C ; 2. V_{B₁} ; 3. V_{B₆} ; 4. V_{B₂}.

由表 3 可见, 在陕西蒲城产扁桃仁中, V_{B₂} 含量为 4.27 ~ 4.53 mg/kg, 高于新疆产扁桃仁, 是松子仁的 1.71 ~ 1.81 倍, 花生仁的 1.64 ~ 1.74 倍, 但低于杏仁。而 V_{B₁} 的含量为 0.799 ~ 0.838 mg/kg, 低于新疆产扁桃仁, 也低于花生仁和松子仁, 但高于杏仁。用该法未检出 V_C 和 V_{B₆}, 说明扁桃仁中不含或含有极少量 V_C (低于 6.5 mg/kg) 和 V_{B₆} (低于 4.2 mg/kg)。

3 结语

采用酸水解法处理样品、流动相等度洗脱, 可简单、快速地测定扁桃仁中 4 种水溶性维生素 C、B₁、B₂ 和 B₆。方法准确、可靠, 重现性好, 对果仁中水溶性维生素的测定具有一定的参考价值。

参考文献 :

[1] Micklander E, Brimer B, Engelsens S B. Appl Spec, 2002, 56(9) : 1 139

[2] Guo Chunhui, Mei Lixin, Zhang Tan, Li Xin. Horticultures Technology of Almond. Beijing : Standards Press of China (郭春会, 梅立新, 张 檀, 李 鑫. 扁桃的园艺技术. 北京 : 中国标准出版社), 2001. 1

[3] Sang S M, Kikuzaki H, Lapsley K, Rosen R T, Nakatani N, Ho C-T. J Agric Food Chem, 2002, 50(16) : 4 709

[4] Frison-Norrie S, Sporns P. J Agric Food Chem, 2002, 50 (10) : 2 782

[5] Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nunez M J. Food Chem, 2004, 85(2) : 267

[6] Sang S H, Cheng X F, Fu H-Y, Shieh D-E, Bai N S, Lapsley K, Stark R E, Rosen R T, Ho C-T. Tetrahedron Lett, 2002, 43(14) : 2 547

[7] Maria Cortes S-M, Montana C-H, Carmen D-M, Maria Esperanza T-I. Eur Food Res Technol, 2000, 210 : 220

[8] Cheng Zhiqiang, Sun Chengjun, Li Yuanqian. Chinese Journal of Analytical Chemistry (成志强, 孙成均, 黎源倩. 分析化学), 2001, 29(9) : 1 068

[9] Li Ke, Wang Huajuan, Pan Chaohui, Yan Xiaoxing, Xia Peiyuan. Chinese Journal of Chromatography (李 克, 王华娟, 潘朝晖, 严晓星, 夏培元. 色谱), 2003, 21(1) : 66

[10] Moreno P, Salvado V. J Chromatogr A, 2000, 870(1 + 2) : 207

[11] Zhang Shuping, Zhou Dongxiang, Yan Bofen, Xia Zebing, Zhu Xinwu. Science and Technology of Food Industry (张淑平, 周冬香, 严伯奋, 夏泽冰, 朱信伍. 食品工业科技), 2000, 21(1) : 36

[12] Research Institute of Nutrient and Food Sanitation, Chinese Academy of Prevention Medical Sciences. Table of Food Components. Beijing : People 's Medical Publishing House (中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物成分表. 北京 : 人民卫生出版社), 1992. 36

凝胶柱净化-高效液相色谱检测食品中的苏丹红

谢维平, 黄盈煜, 傅晖蓉, 胡桂莲

(福建省泉州市卫生防疫站, 福建 泉州 362000)

摘要:建立了凝胶柱净化-高效液相色谱同时检测食品中苏丹红 I, II, III 和 IV 的方法。样品用乙醇提取, 提取液经 Bio-Beads SX3 凝胶柱(200 mm × 10 mm i. d.) 净化, 用环己烷-乙酸乙酯(体积比为 1:1) 洗脱。采用 Symmetry Shield RP18 柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) 分离, 以 100% 甲醇为流动相, 流速 1.5 mL/min; 用二极管阵列检测器检测, 检测波长 478 nm。上述 4 种苏丹红组分在其质量浓度为 0.1 ~ 10.0 mg/L 时有良好的线性关系($r > 0.999$), 方法的检测限为 7 ~ 14 μg/kg; 平均加标回收率为 80.7% ~ 96.3% (添加水平为 0.25, 2.5 mg/kg), 相对标准偏差为 2.4% ~ 5.9%。方法灵敏可靠, 能满足食品中苏丹红检测的需要。

关键词:凝胶柱; 高效液相色谱; 苏丹红; 食品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)05-0542-03

Simultaneous Determination of Sudan Red Dyes in Foods by High Performance Liquid Chromatography with a Clean-Up Procedure by Gel Column

XIE Weiping, HUANG Yingyu, FU Huirong, HU Guilian

(Quanzhou Sanitary and Anti-Epidemic Station, Quanzhou 362000, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of Sudan Red I, II, III and IV in foods by high performance liquid chromatography (HPLC) with a clean-up procedure by gel column. Sample was extracted from foods with ethanol. The extract was cleaned up with a Bio-Beads SX3 gel column (200 mm × 10 mm i. d.) and eluted with cyclohexane-ethyl acetate (1:1, v/v). The analysis was performed on a Symmetry Shield RP18 column (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) with 100% methanol as the mobile phase at a flow rate of 1.5 mL/min, detection at 478 nm and confirmation by diode-array spectra. All of the four compounds demonstrated good linear relationship ($r > 0.999$) in the range of 0.1 - 10.0 mg/L. The limits of detection (LOD) were from 7 to 14 μg/kg. The average recoveries for all four dyes (spiked at the levels of 0.25 and 2.5 mg/kg) in chili sauce and sausage ranged from 80.7% to 96.3%, and the relative standard deviations were from 2.4% to 5.9%. The method is sensitive, reliable and can be applied for the analysis of four Sudan Red dyes in foods.

Key words: gel column; high performance liquid chromatography; Sudan Red dyes; food

苏丹红的颜色鲜艳, 是一种合成的油溶性红色染料, 常用于汽油、墨水和塑料等的染色, 但不允许用作食品的添加剂。2005年2月, 英国食品标准署公布了500多种含有苏丹红 I 号的食物, 并宣布紧急召回。在英国发出食品警告之后, 我国也宣布在全国范围内紧急清查苏丹红 I 号。

对于苏丹红的检测, 目前主要采用液相色谱^[1-3]、液-质联用确认^[2]。由于食品中的基质复杂, 存在着大量的干扰物质(如辣椒酱中有天然色素、植物油的干扰), 而且这些干扰物的含量远超过目标分析物的含量, 若未经净化而直接测定, 不但会

污染色谱柱, 而且会给高效液相色谱(HPLC)测定带来困难, 因此本文建立了凝胶柱净化-高效液相色谱检测食品中苏丹红的方法, 取得了较好的结果。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Beckman 125 高效液相色谱仪带二极管阵列检测器(HPLC-DAD)(Beckman 公司, 美国)。甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司), 无水乙醇、乙酸乙酯、环己烷、无水硫酸钠(分析纯, 上海试剂厂), 苏丹红 I (97.52%)、苏丹红 II (90.0%)、苏丹红 III

(97.0%)、苏丹红IV(91.0%)标准品购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH(德国);Bio-Beads SX3 聚苯乙烯凝胶(200~300目,Bio-Rad公司)。

标准溶液 精密称取苏丹红I,II,III,IV标准品各10 mg(按其标称含量折算)。除苏丹红I用甲醇溶解外,其他3种苏丹红均用1 mL乙酸乙酯溶解,再用甲醇定容至10 mL,分别配成1.00 g/L的标准储备液。取储备液各2.50 mL于50 mL容量瓶中,用甲醇定容,该溶液即为4种苏丹红的质量浓度均为50 mg/L的混合标准储备液。再用甲醇配制0.10,0.50,1.0,5.0,10.0 mg/L的标准系列溶液。

辣酱和香肠样品均购自泉州市市场。

1.2 凝胶柱

称取10 g Bio-Beads SX3 聚苯乙烯凝胶浸泡在50 mL环己烷-乙酸乙酯(体积比为1:1,下同)溶液中10 h左右,吸涨后的凝胶仍保持在液面下。将吸涨后的凝胶转移到玻璃柱(300 mm×10 mm i. d.)内,用环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗剂,流速约0.8 mL/min,在重力作用下流经凝胶柱,填充高度为200 mm,稳定后待用。

1.3 样品的提取与净化

准确称取4 g均匀化后的样品,加入8 g无水硫酸钠,振荡,使样品成疏松状;再加入30 mL无水乙醇,于70℃水浴中加热10 min,取出再置于超声波清洗器超声10 min,静置10 min,上清液经无水硫酸钠滤入50 mL烧杯中,残渣再用30 mL无水乙醇重复提取一次,合并提取液。提取液于70℃水浴中用氮气吹干,用1 mL环己烷-乙酸乙酯溶液溶解。

将上述溶液用吸管转移到凝胶柱的上层,注意不要搅动柱床,待液面降至凝胶柱顶端后加入环己烷-乙酸乙酯溶液作为洗脱液,弃去前15 mL洗脱液,收集第15~21 mL的洗脱液。将洗脱液置于吹氮浓缩仪中于70℃水浴下吹干,残渣用1 mL甲醇溶解,经0.45 μm油性滤膜过滤后待测。

1.4 色谱条件

色谱柱:Waters公司Symmetry Shield RP18反相柱(250 mm×4.6 mm i. d. 5 μm);**流动相**:100%甲醇;流速:1.5 mL/min;进样量:100 μL;光谱采集范围210~600 nm;检测波长:478 nm。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

对于苏丹红I,II,III和IV的同时检测,文献[2]采用乙腈-酸性水溶液为流动相进行梯度洗脱。本文试验了98%(体积分数,下同)甲醇水溶液和100%甲醇两种流动相体系,发现在前一个体系中苏

丹红IV的保留时间过长;最后以100%甲醇作流动相,流速1.5 mL/min,4种苏丹红组分均峰形良好,其混合标准溶液(5.0 mg/L)的色谱图见图1。

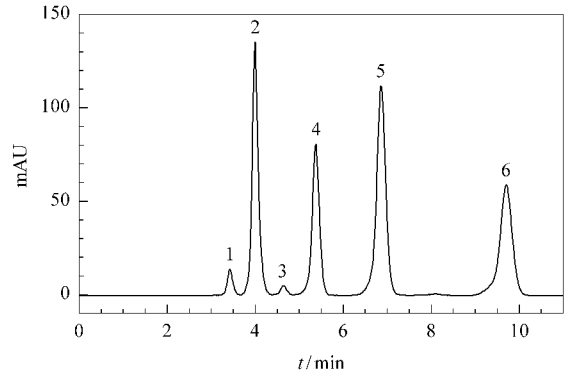


图1 苏丹红I,II,III,IV混合标准溶液(5.0 mg/L)的色谱图

Fig.1 Chromatogram of the standard solution of Sudan Red I, II, III and IV(5.0 mg/L)

1.3. impurity; 2. Sudan Red I; 4. Sudan Red II; 5. Sudan Red III; 6. Sudan Red IV.

用二极管阵列检测器采集210~600 nm的光谱图,发现苏丹红I,II,III和IV的最大吸收波长依次为478,498,510,518 nm。最终选定478 nm作为4种组分的检测波长。

2.2 提取溶剂的选择

苏丹红I,II,III和IV的极性较小,难溶于水而较易溶于有机溶剂,因此开始时选用乙酸乙酯作提取溶剂,但回收率只达到60%左右(辣酱加标2.5 mg/kg),其原因可能是乙酸乙酯难溶于水,在提取时较难渗入样品内部,从而影响了回收率。最终采用无水乙醇作提取溶剂,回收率上升到85%左右。

2.3 苏丹红在凝胶柱上的流出规律

Bio-Beads SX3 凝胶已成功地应用于动物食品中有机磷、有机氯、氨基甲酸酯农药检测中的净化^[4]。为了观察其对苏丹红的分离净化,在自填的凝胶柱上,采用文献[4]所用的流动相环己烷-乙酸乙酯(体积比为1:1)进行试验:配制苏丹红I,II,III,IV混合标准溶液(50 mg/L)过凝胶柱,用上述环己烷-乙酸乙酯溶液作淋洗液,弃去前10 mL洗脱液,从第11 mL开始将每1 mL洗脱液收集于单个试管中,吹干后分别用1 mL甲醇溶解,HPLC检测各段洗脱液中苏丹红的含量。结果表明,4种苏丹红组分均都在第15~21 mL洗脱液中流出,因此在净化操作时选择收集这一阶段流出液,其余部分弃去。

2.4 凝胶柱的净化效果

对于苏丹红的检测,国家标准^[3]采用氧化铝净化的方法,其原理是基于苏丹红的极性与天然色素、油脂的极性差异进行的。而本试验中采用凝胶柱净化是基于苏丹红与干扰物的相对分子质量的差异进

行的。苏丹红 I ,II ,III ,IV 的相对分子质量分别为 248 276 352 和 380 ,在凝胶色谱柱上可和色素、油脂等干扰物分离 ,从而达到较好的净化效果。

图 2-a 为一辣酱空白样品提取液经凝胶柱净化后的 HPLC 谱图 ,图 2-b 是样品加标(添加水平为

0.25 mg/kg)提取液经凝胶柱净化后的色谱图 ,而图 2-c 则是未经净化的加标样品色谱图。从图 2 中可以看出 ,即使目标组分仅有很低的浓度 ,经凝胶柱净化后仍能得到有较好信噪比的 HPLC 谱图 ,而未经净化的则难以从干扰峰中辨别出苏丹红。

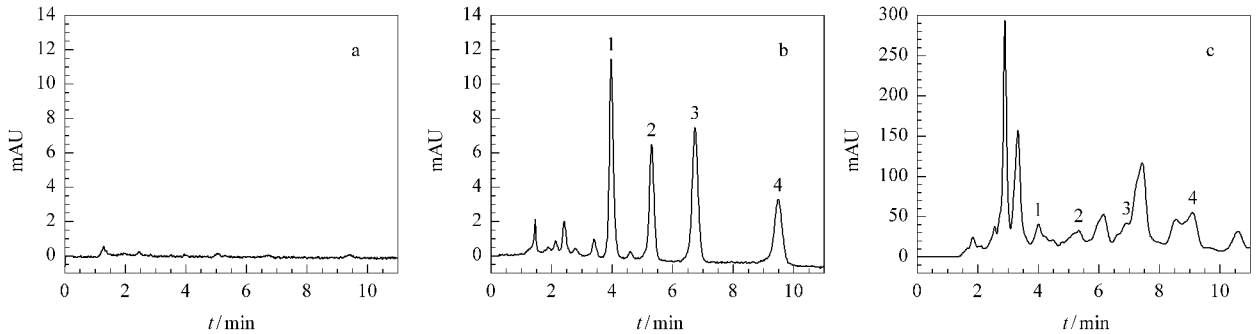


图 2 空白辣酱样品(a)和经凝胶柱净化的(b)及未经净化(c)的加标辣酱样品(添加水平为 0.25 mg/kg)的色谱图

Fig.2 Chromatograms of extract from blank sample of chili sauce (a) , extract from chili sauce spiked at 0.25 mg/kg with gel column clean-up (b) and extract from chili sauce spiked at 0.25 mg/kg without any clean-up (c)

1. Sudan Red I ;2. Sudan Red II ;3. Sudan Red III ;4. Sudan Red IV .

2.5 光谱定性

HPLC-DAD 可对目标组分的光谱信息进行即时采集 ,得到其完整的紫外光谱图 ,利用光谱图可对色谱峰进行有效的定性 ,但当待测物浓度较低 ,特别是在有其他天然色素、合成色素存在时 ,会给光谱定性带来困难^[5]。由于采用了凝胶柱净化技术 ,可得到较纯的目标组分提取物 ,使得光谱分析结果不易受其他杂质干扰 ,同时还加大了进样量 ,增加了检测的响应值及光谱定性的可靠性。图 3 为一辣酱样品添加 0.25 mg/kg 的苏丹红 I 标准品时所采集的样品光谱图与标准品光谱图 ,结果表明即使目标组分含量为 0.25 mg/kg 时 ,仍能采集到较好的光谱图 ,光谱匹配度为 0.963 0。

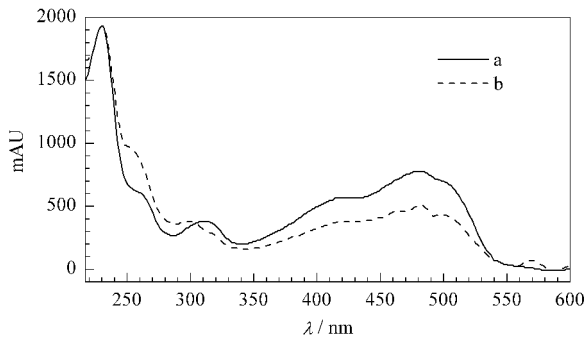


图 3 标准苏丹红 I (a)与加标(0.25 mg/kg)样品(b)的光谱图

Fig.3 Spectra of Sudan Red I standard (a) and chili sauce spiked at 0.25 mg/kg (b)

2.6 标准曲线与检测限

配制 0.1 ~ 10.0 mg/L 苏丹红 I ,II ,III ,IV 标准溶液 ,按选定的色谱条件测定 ,以峰面积 Y 对质

量浓度 X(mg/L)进行线性回归 ,其回归方程分别为 :苏丹红 I , $Y = 268\ 728X + 2\ 614$;苏丹红 II , $Y = 192\ 254 X - 223$;苏丹红 III , $Y = 338\ 161X - 16\ 570$;苏丹红 IV , $Y = 243\ 493X - 12\ 543$,相关系数为 0.999 3 ~ 0.999 9。以信噪比(S/N)为 3 计算 4 种苏丹红标准品的检测限(LOD)依次为 :0.007 ,0.012 ,0.009 ,0.014 mg/kg ;以 S/N 为 10 计算其定量限(LOQ)依次为 :0.02 ,0.04 ,0.03 ,0.05 mg/kg 。

2.7 方法的回收率与精密度

分别在辣酱、香肠样品中添加上述 4 种苏丹红标准品 0.25 和 2.5 mg/kg ,按本方法进行测定 ,每个浓度测定 3 次 ,计算其平均加标回收率为 80.7% ~ 96.3% ,相对标准偏差(RSD)为 2.4% ~ 5.9%。

2.8 样品中苏丹红的测定

用上述方法对市售辣酱和香肠样品中的苏丹红 I ~ IV 进行测定 ,结果未发现样品中含有目标组分。

参考文献 :

[1] Yu Linghan , Mou Dehai , Li Guangxian , Yan Shiping. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory (喻凌寒 , 牟德海 , 李光宪 , 阎世平. 光谱实验室) , 2004 , 21(6) : 1 131

[2] Veretout O , Demesse L , Szymanski L. Analysis and Dosage of the Colorants Sudan and Bixin in Chilli Powder and Pepper-Based Products. <http://www.aqsiq.gov.cn/cms/data/25/13951.doc> , 2005-02-24

[3] GB/T 19681-2005. <http://www.sac.gov.cn/news/general/4296.pdf> , 2005-03-29

[4] GB/T 5009.161-2003. Determination of Organophosphorus Pesticide Multiresidues in Animal Foods. Beijing : Standard Press of China (动物性食品中有机磷农药多组分残留量的测定. 北京 : 中国标准出版社) , 2003

[5] Tateo F , Bononi M. J Agric Food Chem , 2004 , 52(4) : 655

高效液相色谱法分析环境样品中的苯基砷化合物

李善茂, 李 伟, 岳丽君, 左伯莉

(防化指挥工程学院分析中心, 北京 102205)

摘要: 二苯氯砷和二苯氰砷是刺激性毒剂, 在环境中易于降解, 其产物苯砷酸、苯砷氧、二苯砷酸、氧联双二苯砷和三苯砷比较稳定, 对环境危害大。建立了同时测定这5种含砷产物的反相高效液相色谱方法, 选择了最佳色谱条件, 提供了各组分的紫外光谱图。5种化合物的线性范围分别为8~30, 5~40, 20~4 000, 120~8 000, 1~60 mg/L, 检测限分别为0.1, 0.1, 0.2, 10, 0.1 mg/L。对实际环境样品进行了分析, 结果较好。

关键词: 高效液相色谱法; 苯砷酸; 苯砷氧; 二苯砷酸; 氧联双二苯砷; 三苯砷; 苯基砷化合物

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)05-0545-03

Determination of Phenylarsonic Compounds in Environmental Samples by High Performance Liquid Chromatography

LI Shanmao, LI Wei, YUE Lijun, ZUO Boli

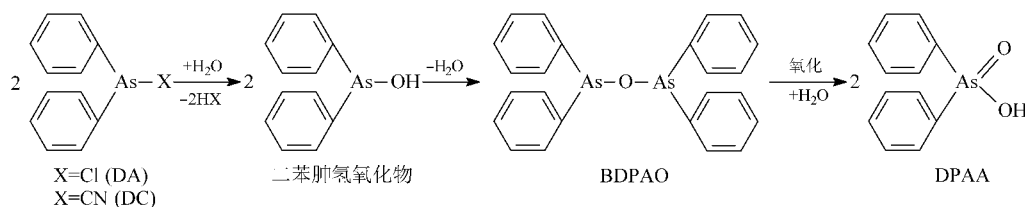
(Analytical Center, Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determination of phenylarsonic acid (PAA), phenylarsine oxide (PAO), diphenylarsinic acid (DPAA), bis(diphenylarsine) oxide (BDPAO) and triphenylarsine (TPA) in soil samples. The extraction solvent for soil samples was acetonitrile and ultrasound was used in the extraction. Good separation was achieved by using an Inertsil CN-3 column (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) with the following conditions: gradient program of mobile phase, a 10 min linear gradient from 100% A (a mixture of acetonitrile-2.5 g/L KH₂PO₄ (pH 2.0) buffer (5:95, v/v)) to 100% B (a mixture of acetonitrile-2.5 g/L KH₂PO₄ (pH 2.0) buffer (50:50, v/v)), and isocratic at 100% B from 10.01 min to 28 min; flow rate of 1.0 mL/min; time-programmed UV detection at 210 nm (0-10.5 min, 20-28 min) and 268 nm (10.5-20 min). The linear range of PAA, PAO, DPAA, BDPAO and TPA were 8-30, 5-40, 20-4 000, 120-8 000 and 1-60 mg/L, respectively. The detection limits at a signal-to-noise ratio of 3 were 0.1, 0.1, 0.2, 10, and 0.1 mg/L for PAA, PAO, DPAA, BDPAO and TPA, respectively.

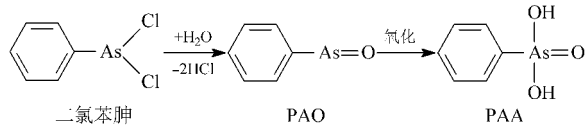
Key words: high performance liquid chromatography; phenylarsonic acid; phenylarsine oxide; diphenylarsinic acid; bis(diphenylarsine) oxide; triphenylarsine; phenylarsonic compounds

二苯氯砷(DA)和二苯氰砷(DC)是刺激性毒剂, DA中的砷-氯(As-Cl)键和DC中的砷-氰(As-CN)键都很活泼, 在质子性溶剂中容易发生取代反应, 在水中可快速水解, 生成氧联双二苯砷(BD-

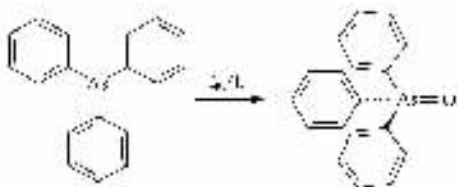
PAO), 甚至可与潮湿空气中的水作用。在酸性、碱性水中或加热条件下, 这种水解反应被加速。氧联双二苯砷在有氧条件下会进一步生成二苯砷酸(DPAA)^[1,2]:



在合成 DA 和 DC 时,由于工艺限制,往往同时产生二氯苯砷。二氯苯砷在水存在的条件下,可形成苯砷氧(PAO),并进而氧化成苯砷酸(PAA):



三苯砷(TPA)是合成 DA 和 DC 的原料,因此常与上述各化合物同时存在。TPA 在氧存在下可缓慢地氧化成三苯砷氧(TPAO):



通常这一过程过于缓慢,以至于 TPAO 的存在量很小,所以在研究过程中,未对此加以考虑,但本方法具有同时对 TPAO 进行定性和定量分析的能力。

由于以上反应过程的存在,所以环境样品中 DA、DC 长期存在的可能性很小,大量存在的是其水解或氧化产物。苯砷酸、苯砷氧、二苯砷酸、氧联双二苯砷和三苯砷这 5 种含砷化合物均比较稳定,能在常规条件下长期存在,可对环境造成严重的危害,因此准确地对这几种化合物进行定性和定量分析十分重要。Haas 等^[3-5]利用气相色谱和高效液相色谱分析了 PAO、PAA、TPA 等几种化合物,但未将 DPAA 和 BDPAO 考虑在内。另外还有采用其他方法^[6,7]分析 DC 及其相关化合物的报道。

本文采用高效液相色谱法同时对 PAA、PAO、DPAA、BDPAO 和 TPA 等组分进行定性和定量测定,避免了气相色谱法对同一个样品分别确定各成分含量的多次进样方法。该方法线性范围宽,检测限低,重现性好,可用于测定自然环境样品中苯砷酸、苯砷氧、二苯砷酸、氧联双二苯砷和三苯砷的含量,为环境样品中苯基砷化合物的检测提供了一种很好的手段。

1 实验部分

1.1 试剂

PAA、PAO、DPAA、BDPAO 和 TPA 均为本实验室合成(含量均大于 98%)。乙腈为 HPLC 级试剂(Fisher 公司),超纯水,磷酸(含量 85%,优级纯,北京市红星化工厂),磷酸二氢钾(KH₂PO₄,分析纯,北京市红星化工厂)。

1.2 仪器与色谱条件

HP1050 高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器和四元梯度泵。色谱柱:Inertsil CN-3 柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm)。流动相:A,乙腈-2.5 g/L KH₂PO₄ 缓冲液(以 85% H₃PO₄ 调至 pH 2.0) (体积比为 5:95);B,乙腈-2.5 g/L KH₂PO₄ 缓冲液(以 85% H₃PO₄ 调至 pH 2.0) (体积比为 50:50);梯度程序,在 10 min 内,流动相组成由 100% A 变为 100% B(线性梯度),然后保持 18 min;流速 1.0 mL/min。检测波长 0 ~ 10.5 min 210 nm;10.5 ~ 20 min 268 nm;20 min 后 210 nm。进样体积 10 μL。

1.3 标准溶液和样品的制备

1.3.1 标准溶液

以乙腈为溶剂配制标准溶液,其质量浓度范围为:苯砷酸 8 ~ 30 mg/L,二苯砷酸 20 ~ 4 000 mg/L,苯砷氧 5 ~ 40 mg/L,氧联双二苯砷 120 ~ 8 000 mg/L,三苯砷 1 ~ 60 mg/L。

1.3.2 样品处理

土壤等固体样品:以乙腈为溶剂,超声提取,定容至 50 mL 容量瓶中,经 0.45 μm 滤膜过滤后进样。水样:不需要提取,经 0.45 μm 滤膜过滤后可直接进样分析。

2 结果与讨论

2.1 标准样品的色谱图

PAA、PAO、DPAA、BDPAO 和 TPA 标样在“1.2”节色谱条件下的色谱图见图 1。可以看出,这 5 种化合物可以获得基线分离。对各个峰进行光谱纯度检测发现,它们对应的光谱纯度为 100%,说明各色谱峰中无杂质峰存在。

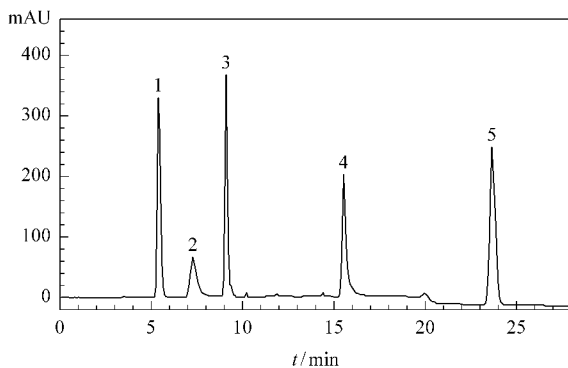


图 1 PAA、PAO、DPAA、BDPAO 和 TPA 标样的色谱图
Fig.1 Chromatogram of the standard mixture of PAA, PAO, DPAA, BDPAO and TPA
Peaks: 1. PAA; 2. PAO; 3. DPAA; 4. BDPAO; 5. TPA.

2.2 标准样品的紫外光谱图

图 2 是根据图 1 所示的液相色谱图,利用 HP1050 二极管阵列紫外检测器提供的全程扫描功

能得到的苯胂酸、苯胂氧、二苯胂酸、氧联双二苯胂和三苯胂标样的紫外光谱图。

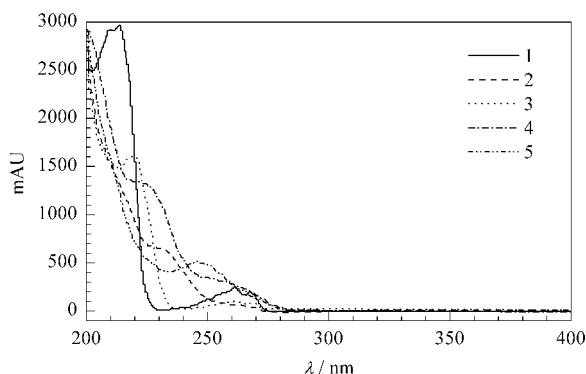


图 2 不同标样的紫外光谱图

Fig. 2 UV spectra of different standards

1. PAA; 2. PAO; 3. DPAA; 4. BDPAO; 5. TPA.

可以看出,这些化合物在 210 nm 处都有紫外吸收峰。但由于实际样品中氧联双二苯胂的量相对较大,如果仍使用 210 nm 作为其检测波长,将会造成该峰非常高,且峰形不好,因此需要降低氧联双二苯胂的检测灵敏度,将氧联双二苯胂的检测波长设置为 268 nm。

2.3 定量测定

2.3.1 线性范围和检测限

各化合物的线性范围、工作曲线、回归系数和最低检测限(以 3 倍信噪比计)如表 1 所示。

表 1 各化合物的工作曲线和最低检测限

Table 1 Linear equations and detection limits of compounds

Compound	Linear range/(mg/L)	Linear equation*	r	Detection limit/(mg/L)
PAA	8-30	$A = 33.738C$	0.999	0.1
PAO	5-40	$A = 24.215C$	0.999	0.1
DPAA	20-4000	$A = 87.479C$	0.999	0.2
BDPAO	120-8000	$A = 8.715C$	0.999	10
TPA	1-60	$A = 176.614C$	0.999	0.1

* A: peak area; C: mass concentration, mg/L.

2.3.2 精密度和回收率

在“1.2”节色谱条件下,对这 5 种化合物做平行实验,每个样品测定 5 次,结果见表 2。

表 2 定量分析的精密度($n = 5$)

Table 2 Repeatability of quantitative analysis ($n = 5$)

Compound	Average/(mg/L)	SD/(mg/L)	RSD/%
PAA	12.79	0.49	3.86
PAO	9.11	0.31	3.37
DPAA	115.91	1.97	1.70
BDPAO	1100.50	14.07	1.28
TPA	5.65	0.02	0.34

由表 2 可以看出,此种方法对这 5 种化合物测定的精密度均较好,除氧联双二苯胂外,其他几种化合物的标准偏差均小于 2 mg/L,而氧联双二苯胂的标准偏差主要是由于进样量大造成的,所以此种方法对这 5 种化合物的测定是可行的。

实验还对土壤样品进行了加标回收测定,回收率为 95%~98%。

2.4 样品测试

对实际土壤样品进行了分析,表 3 列出了部分样品的分析结果,样品 1 的色谱图见图 3。

表 3 实际样品的分析结果*

Table 3 Results of some representative samples* %

Sample	PAA	PAO	DPAA	BDPAO	TPA
1	0.00	-	0.14	24.74	0.05
2	0.00	-	0.14	25.84	0.04
3	0.09	-	12.13	7.44	0.00
4	0.10	-	12.87	6.41	0.00
5	0.04	-	0.72	34.66	0.09
6	0.02	-	0.46	40.89	0.11

* Calculated by peak areas.

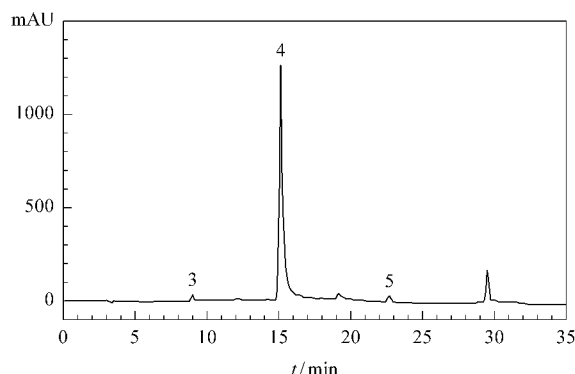


图 3 实际样品 1 的色谱图

Fig. 3 Representative chromatogram of sample 1

For peaks, see Fig. 1.

参考文献:

- [1] Jackson K E. Chem Rev, 1935, 17(2):251
- [2] Haas R. Umweltmed Forsch Prax, 1996, 1(4):183
- [3] Haas R, Schmidt T C, Steinbach K, von Löw E. Fresenius J Anal Chem, 1998, 361(3):313
- [4] Haas R. Determination of Chemical Warfare Agents in Soil and Materials. <http://r-haas.de/f8.html>, 2003-05
- [5] Haas R, Krippendorf A, Schmidt T C, Steinbach K, von Löw E. Umweltwiss Schadst Forsch, 1998, 10(5):289
- [6] Thurow K, Koch A, Stoll N, Haney C A. In: McGuire R R, Compton J C, eds. Environmental Aspects of Converting CW Facilities to Peaceful Purposes. Dordrecht: Kluwer, 2002
- [7] Smedts B R, Baeyens W, De Bisschop H C. Analytica Chimica Acta, 2003, 495:239

气相色谱-质谱法测定大蒜挥发油的组成

郭晓斐, 杜爱玲, 管从胜, 潘光民, 杜爱琴, 王威强

(山东大学化学与化工学院, 山东 济南 250061)

摘要 :采用改进的水蒸汽蒸馏法从山东金乡大蒜中提取挥发油。实验确定了气相色谱-质谱法分析大蒜油的条件,并对大蒜挥发油的化学成分进行了定性分析,共鉴定出20种物质。用峰面积归一化法对各物质的相对含量进行了测定,结果表明含硫化物约占挥发油总成分的95%以上,其中含量最高的是大蒜新素,约占挥发油总量的三分之一。对低温储藏半年的挥发油进行分析的结果表明样品在低温下可稳定存放。

关键词 :气相色谱-质谱法;水蒸汽提取;大蒜挥发油;大蒜新素

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0548-03

Analysis of Volatile Oil of Garlic by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

GUO Xiaofei, DU Ailing, GUAN Congsheng, PAN Guangmin, DU Aiqin, WANG Weiqiang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250061, China)

Abstract : The volatile oil of garlic was extracted by hydrodistillation method and gas chromatography-mass spectrometry was applied to analyse the compounds in the oil. The best extraction conditions for high-content, effective components were obtained through optimization. The capillary column was an HP-5MS column (25 mm × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm); oven temperature increased with a rate of 5 °C/min from 80 to 300 °C, and then maintained for 20 min; sample size of 1 μL; split ratio of 100:1; carrier gas of helium (1 mL/min). Mass spectra were obtained at 70 eV. The temperatures of injector base, ionization source were maintained at 270 °C, 230 °C respectively. Under these conditions, twenty compounds in the volatile oil of garlic were isolated and identified, and the content of each was determined. Sulfur-containing compounds were found to be the principal components, of which the major compound was diallyl trisulfide with the content of more than 30%, which is higher than the others in the literature. The experimental results also indicated that hydrodistillation method is an effective method for officinal component extraction. In addition, it was also demonstrated that the garlic volatile oil was stable when stored at 0 °C for 6 months.

Key words : gas chromatography-mass spectrometry; hydrodistillation; garlic volatile oil; diallyl trisulfide

大蒜(*Allium Sativum* L.)在我国作为药用植物已有悠久的历史。《本草纲目》中论述其有解散肿痛、消毒气、除风破冷、健脾等功效。大蒜中含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、无机盐和多种维生素。另外还有多种低聚肽类、胡萝卜素类、多种氨基酸等营养成分。其药用部位是鳞茎,主要成分是二烯丙基硫代亚磺酸酯,即大蒜新素。这种物质可以杀菌消炎、降低血脂和血压、预防冠心病和脑血栓、防治肠胃炎以及癌症,并能增强人体免疫力,减少感

冒和预防流行性传染病,有广谱抗菌作用^[1,2]。大蒜挥发油是以大蒜头为原料经一系列加工过程而得到的产品,被广泛用于医药、保健及食品工业领域。大蒜挥发油的成分因大蒜产地、制造工艺等不同而有较大的差异。目前国内外对其成分分析的方法主要有气相色谱法^[3,4]、高效液相色谱法^[5]、薄层色谱法^[6]等。本文以大蒜高产地区山东省金乡县生产的新鲜白皮大蒜为原料,通过改进的水蒸汽提取法获得了大蒜油提取的较优的工艺条件,使提取的挥发

收稿日期 2004-10-08

作者简介:郭晓斐,女,硕士研究生,E-mail:guoxiaofei@mail.sdu.edu.cn.

通讯联系人:杜爱玲,女,教授,主要从事生物资源的开发,Tel(0531)8395100,E-mail:duailing@sdu.edu.cn.

基金项目:山东省科技攻关项目.

油中有效成分大蒜新素的含量较多。以气相色谱-质谱法(GC-MS)定性定量分析了大蒜挥发油,同时对大蒜挥发油在低温状态下的稳定性进行了考察。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

美国 Agilent HP6890N-5972NMSD 气相色谱-质谱仪;二氯甲烷(分析纯)。实验样品为山东省金乡县生产的新鲜白皮蒜。

1.2 气相色谱-质谱条件

色谱条件:HP-5 石英毛细管柱(25 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm),程序升温:起始温度 80 °C,以 5 °C/min 速率升温至 300 °C,保持 20 min;汽化室温度 270 °C,氢火焰检测器温度 300 °C;进样量 1 μL,分流比 100:1;载气为氦气,流速 1 mL/min。

质谱条件:电离方式为电喷雾电离(EI),电子能量 70 eV,离子源温度 230 °C,接口温度 280 °C,质量扫描范围 m/z 29 ~ 500。色谱图中相应物质的质谱图采用 NIST98 谱图库进行检索。

1.3 大蒜挥发油的提取方法

取新鲜的金乡大蒜 150 g,用粉碎机粉碎至浆状,将蒜浆置于三口烧瓶中,按《中国药典》^[7]中挥发油的标准提取法进行提取,加入 300 mL 蒸馏水,用加热器加热,使被加热物质保持微沸状态 120

min(酶解过程),收集馏出物。加入少量二氯甲烷,充分振荡萃取,常温下静置分层,此时萃取液分为水、二氯甲烷萃取液两层,下层为大蒜挥发油的二氯甲烷萃取液,用分液漏斗分离出,备用。与一般的水蒸汽提取方法^[8,9]相比,本文在大蒜油提取过程中增加了酶解过程,该过程主要通过控制样品前处理条件来实现。

2 结果与讨论

2.1 大蒜挥发油的 GC-MS 定性分析结果

大蒜挥发油的 GC-MS 总离子流图见图 1。用毛细管气相色谱共分离检测出 20 种成分,利用 GC-MS 仪 NIST 谱图库自动检索被分析组分的质谱数据,并对检索结果进行人工核对,确定了各成分的物质名称,结果见表 1,其中含硫化合物为 19 种。这些物质的化学成分及其结构已经基本得到了鉴定。

2.2 大蒜挥发油主要成分的含量

采用峰面积归一化法得到了大蒜挥发油中各主要成分的含量(见表 1)。可以看出,在本研究所得到的大蒜挥发油中,含量最高的是二烯丙基三硫化物(包括异构体),为 32.207%,几乎占挥发油总量的三分之一;其次为二烯丙基二硫化物、甲基烯丙基三硫化物、二烯丙基四硫化物,含量依次为 26.414%,13.305%,5.781%。

表 1 金乡大蒜挥发油所含的化学成分分析结果

Table 1 Analysis results of chemical components in volatile oil of garlic from Jinxiang by GC-MS

Peak No. in Fig. 1	t_{R1} ¹⁾ /min	t_{R2} /min	Name of component	Formula	M_r	Content 1 ²⁾ /%	Content 2 ²⁾ /%
1	1.194	1.194	propene	C ₃ H ₆	42	2.725	2.819
2	1.335	1.279	methyl-thiirane	C ₃ H ₆ S	74	0.508	0.466
3	1.508	1.508	methyl allyl sulfide	C ₄ H ₈ S	88	0.232	1.787
4	1.659	1.659	dimethyl disulfide	C ₂ H ₆ S ₂	94	0.256	0.312
5	2.103	2.091	1,2-dithiacyclopentane	C ₃ H ₆ S ₂	106	0.933	0.797
6	2.173	2.177	diallyl sulfide	C ₆ H ₁₀ S	114	0.863	2.733
7	2.638	2.639	methyl allyl disulfide	C ₄ H ₈ S ₂	120	4.333	3.632
8	2.773	2.781	methyl allyl disulfide	C ₄ H ₈ S ₂	120	0.233	0.451
9	2.849	2.850	methyl allyl disulfide	C ₄ H ₈ S ₂	120	0.444	0.835
10	3.081	3.081	1,2-disulfide-3-cyclopentane	C ₃ H ₄ S ₂	104	5.417	3.173
11	3.222	3.221	dimethyl trisulfide	C ₂ H ₆ S ₃	126	1.363	1.181
12	4.746	4.748	diallyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	146	17.368	13.391
13	4.979	4.985	diallyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	146	3.017	3.961
14	5.087	5.108	diallyl disulfide	C ₆ H ₁₀ S ₂	146	6.029	5.807
15	5.844	5.866	methyl allyl trisulfide	C ₄ H ₈ S ₃	152	13.305	9.779
16	6.822	6.826	3-vinyl-1,2-dithiocyclohex-4-ene	C ₆ H ₈ S ₂	144	1.468	0.732
17	7.341	7.342	3-vinyl-1,2-dithiocyclohex-5-ene	C ₆ H ₈ S ₂	144	2.634	1.341
18	9.385	9.405	diallyl trisulfide	C ₆ H ₁₀ S ₃	178	32.207	23.174
19	11.174	11.176	5-allyl-1,2,3,4-tetrasulfide cycloheptane	C ₆ H ₁₀ S ₄	210	0.883	1.244
20	14.915	14.958	diallyl tetrasulfide	C ₆ H ₁₀ S ₄	210	5.781	7.185

1) M_r : retention time, t_{R1} for the fresh volatile oil and t_{R2} for the volatile oil saved for 6 months at 0 °C. 2) content: obtained by peak area normalization method, content 1 for the fresh volatile oil and content 2 for the volatile oil stored for 6 months at 0 °C.

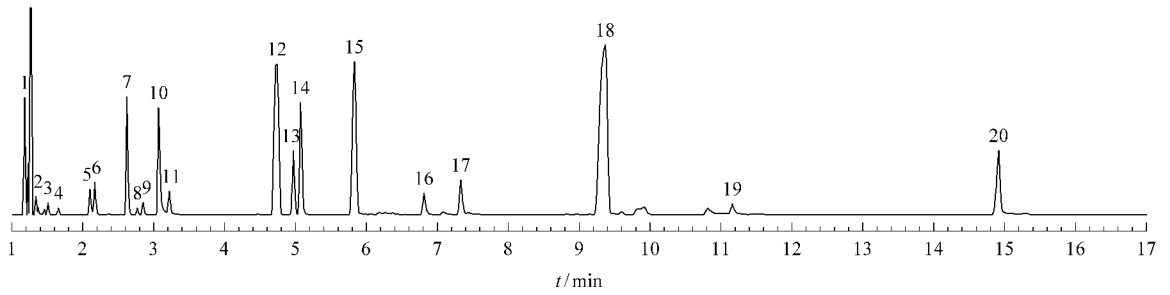


图 1 大蒜挥发油的气相色谱-质谱总离子流色谱图

Fig.1 Total ion current chromatogram of volatile oil of garlic by GC-MS

For peak identifications , see Table 1 .

特别需要指出的是 ,山东金乡大蒜挥发油中含量最多的物质为二烯丙基三硫化合物 ,俗称为大蒜新素 ,其含量高于其他同类文献报道的结果^[8,9]。此外 ,与文献[8,9]相比较 ,本实验所得的大蒜挥发油中几乎不含蒜氨酸、蒜糖醇等物质 ,这是因为蒜氨酸原以稳定无臭的形式存在于大蒜中 ,当大蒜受热或受到物理机械破碎后 ,大蒜中的蒜氨酸酶被激活 ,催化分解蒜氨酸为大蒜新素。

2.3 提取工艺对大蒜挥发油成分的影响

本实验提取的大蒜挥发油中大蒜新素的含量较其他同类文献报道要高。这主要与提取工艺的条件有关。在大量的探索实验中发现 ,挥发油中大蒜新素的含量主要与酶解时间、酶解温度、水蒸汽提取时间及提取温度有关。实验中酶解时间过短 ,挥发油中含较多的蒜氨酸及蒜氨酸醇 ,大蒜新素含量较少 ;时间过长 ,大蒜新素的含量降低 ,而其中二烯丙基二硫

化合物的含量升高。适宜的酶解温度可以使大蒜中的蒜氨酸在酶的催化下充分酶解。提取时水蒸汽加热时间为 120 min 左右 ,时间过短则不能进行充分的提取 ;时间过长 ,挥发油中大蒜新素的含量会降低。另外 ,提取温度过高会发生脱硫 ,导致大蒜新素的含量降低 ,二烯丙基二硫化合物的含量升高。因此在提取过程中要严格控制工艺条件。

2.4 大蒜挥发油在低温下的稳定性

图 2 为采用改进的水蒸汽蒸馏法提取得到的大蒜挥发油于 0 ℃ 下存贮半年后所做的气相色谱分析谱图 ,其实验操作条件与图 1 的相同。通过对存贮前后样品的定性分析 ,发现大蒜挥发油的主要成分保持不变 ;对其主要成分的定量分析结果表明 ,主要含硫成分含量的变化在行业允许范围之内 ,表明大蒜挥发油在低温状态下稳定性较好。

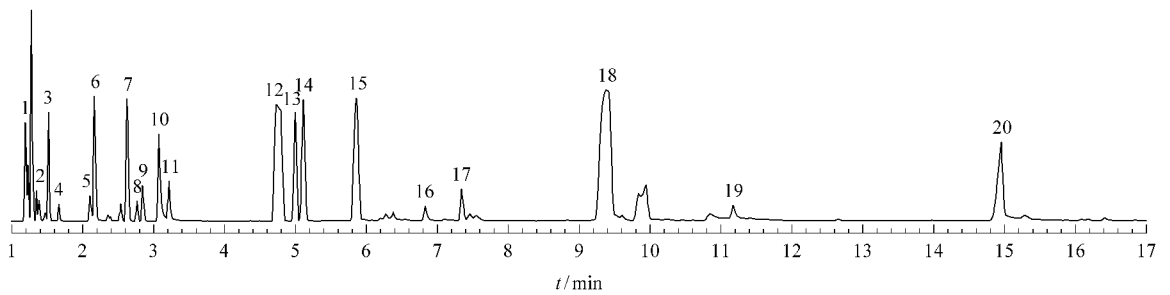


图 2 0 ℃ 下贮存 6 个月后的大蒜挥发油的气相色谱-质谱总离子流色谱图

Fig.2 Total ion current chromatogram of volatile oil of garlic saved for 6 months at 0 ℃

For peak identifications , see Table 1 .

参考文献 :

[1] Xiao Chonghou. Chinese Traditional Medicine Chemistry. Shanghai : Press of Science and Technology (肖崇厚. 中药化学. 上海 : 科学技术出版社), 1997. 556

[2] Thomson M , Ali M. Curr Cancer Drug Targets , 2003 , 3 (1) : 67

[3] Wei G S , Wang G H , Yang R P , Wu J L. Radiat Phys Chem , 1996 , 47 : 317

[4] Wang J H , Xu Q , Jiao K. J Chromatogr A , 1998 , 818 : 138

[5] Arnault I , Christides J P , Mandon N , Haffner T , Kahane R , Auger J. J Chromatogr A , 2003 , 991 : 69

[6] Lu Maosong , Min Jimei , Wang Kui. Chinese Traditional and Herbal Drugs (陆茂松 , 闵吉梅 , 王 夔. 中草药), 2001 , 32 (10) : 867

[7] Pharmacopoeia Commission of People 's Republic of China. Pharmacopoeia of People 's Republic of China. Beijing : Chemical Industry Press (中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京 : 化学工业出版社), 2000. Appendix : 64

[8] Chen Guangwei. Chinese Journal of Analytical Chemistry (陈光伟. 分析化学), 1997 , 25 (11) : 1327

[9] Abu-Lafi S , Dembicki J W , Goldshlag P , Hanus L O , Dembicki V M. J Food Compos Anal , 2004 , 17 (2) : 235

氧化锆固定相反相高效液相色谱法测定碱性化合物的离解常数

张庆合, 张维冰, 李彤, 张玉奎

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116023)

摘要 :研究了烷基键合氧化锆微球固定相(C_{12} -ZrO₂)的化学稳定性及其对碱性化合物的色谱保留特征,发现 C_{12} -ZrO₂在pH为2~12时稳定,碱性化合物在该固定相上为典型的反相色谱保留机理。基于对碱性化合物的保留因子与流动相pH关系的考察,建立了碱性化合物离解常数的测定方法。测定了13种典型芳香胺和吡啶衍生物的离解常数,与文献结果对比,其差值在-0.27~0.35 pH单位范围内,说明该方法能够用于碱性化合物离解常数的快速测定。

关键词 :高效液相色谱法;离解常数;碱性化合物;十二烷基键合氧化锆固定相

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0551-04

Determination of the Dissociation Constants of Basic Compounds by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography on C_{12} -Zirconia

ZHANG Qinghe, ZHANG Weibing, LI Tong, ZHANG Yukui

(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : The high performance liquid chromatographic (HPLC) behavior of aromatic amines and pyridine derivatives was studied on a new reversed-phase stationary phase, C_{12} -alkyl-modified zirconia. The effects of mobile phase variables such as methanol content and pH were investigated. The results showed that the stationary phase was stable in the mobile phase with a pH range of 2 - 12. It was found that on the new stationary phase the bases demonstrated the "traditional" behavior of retention due to their hydrophobicity. The retention factors of these basic compounds on the stationary phase increased rapidly with pH from pH 2 - 7, and then increased slowly until reaching a constant value. The dissociation constants (pK_a) of 13 basic compounds were determined based on the relationship between their retention factors and the pH of mobile phase. Compared with references, the errors of the pK_a values obtained by this HPLC method were within 0.35 pH units.

Key words : high performance liquid chromatography; dissociation constant; basic compounds; C_{12} -alkyl modified zirconia stationary phase

氧化锆基质高效液相色谱(HPLC)固定相结合了硅胶机械强度高和聚合物化学稳定性好的特点^[1],从1990年初至今,在正相、反相、离子交换及亲和色谱等领域均已表现出独特的优势,并得到了较快的发展。Unger等^[2]首次以十八烷基三甲氧基硅烷为原料制备了十八烷基键合ZrO₂微球色谱固定相,并用于稠环芳烃类化合物的分离,该填料在pH 12流动相条件下稳定。Yu和Ei Rassi^[3-5]制备了改性ZrO₂微球反相和离子交换色谱固定相,对固定相的化学稳定性、基本色谱性能和应用等进行了较为全面的研究。Wirth等^[6-8]制备了十八烷基、

碳水化合物和Cibacron Blue F3GA染料改性ZrO₂固定相,3种固定相稳定使用的最高pH分别为13, 12和10.5。我们也制备了十二烷基键合氧化锆固定相(C_{12} -ZrO₂),考察了中性、酸性和碱性化合物在其上的色谱保留行为,并与 C_{12} 烷基键合SiO₂固定相进行了比较,说明了新型固定相的特征^[9]。

本文在对 C_{12} -ZrO₂的化学稳定性、保留特征加以系统探讨的基础上,利用该固定相稳定使用pH范围宽、碱性化合物呈反相保留机理的特点,研究了芳香胺及吡啶衍生物的保留因子与流动相pH值之间的关系,建立了采用HPLC进行碱性化合物离解

常数测定的快捷方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统由 Shimadzu 10-AD 高压泵、Shimadzu SPD-10AV UV-VIS 检测器(岛津公司,日本)及 ZW 型色谱柱恒温箱、EC2000 色谱数据处理工作站(大连依利特分析仪器有限公司)、Rheodyne 7125 型高压进样阀组成。

甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司),Tris(北京百灵威化学技术有限公司)、醋酸钠、氯化钠及样品溶质均为分析纯试剂。实验用水为二次蒸馏水。 C_{12} -ZrO₂ 按文献[9]方法制备,采用匀浆法装入 100 mm × 4.6 mm i. d. 不锈钢柱管。

1.2 色谱分析条件

流动相为不同体积的甲醇与水或 5 mmol/L 缓冲溶液的混合溶液,pH 2.00 ~ 6.74 的缓冲溶液用醋酸和醋酸钠的混合溶液配制,pH 8.00 和 9.95 的缓冲溶液用 Tris 和 HCl、NaOH 溶液配制,pH 11.00 和 12.00 的缓冲溶液用 NaOH 溶液配制;各缓冲溶液中分别含有 50 mmol/L 的 NaCl 以控制离子强度。流动相流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,柱温控制在 25 °C。

2 结果与讨论

2.1 固定相的化学稳定性

在 1.0 mL/min 流速下,分别用体积比为 30:70 的甲醇与 pH 2.00,2.74,4.74,5.74,6.74,8.00,9.95,11.00 和 12.00 缓冲溶液作为流动相通过色谱柱 20 h,然后在甲醇/水(体积比为 30:70)流动相条件下测定 *N,N'*-二甲基苯胺和甲苯的保留值。用尿嘧啶测定死时间,并计算溶质的保留因子 *k*。用不同 pH 值的流动相冲洗色谱柱之后测定溶质的保留因子 *k*,其变化趋势如图 1 所示。从图 1 中可以看出,制备的 C_{12} -ZrO₂ 在流动相 pH 为 2 ~ 12 时具有很好的化学稳定性。该结果与文献[2,3,6]报道十八烷基键合氧化锆固定相在流动相 pH 为 12 时仍有很好的稳定性的结论一致。

2.2 碱性化合物在 C_{12} -ZrO₂ 上的保留特性

以碱性化合物芳香胺及吡啶衍生物为溶质,通过改变流动相中有机溶剂甲醇的含量,考察溶质的保留与流动相组成之间的关系。表 1 给出了 7 种苯胺衍生物和 4 种吡啶衍生物的 lg *k* 值与流动相中甲醇含量(20% ~ 80%,体积分数)关系的线性回归方程。结果表明,在试验的甲醇含量范围内,化合物的 lg *k* 与流动相中甲醇含量之间存在良好的线性关

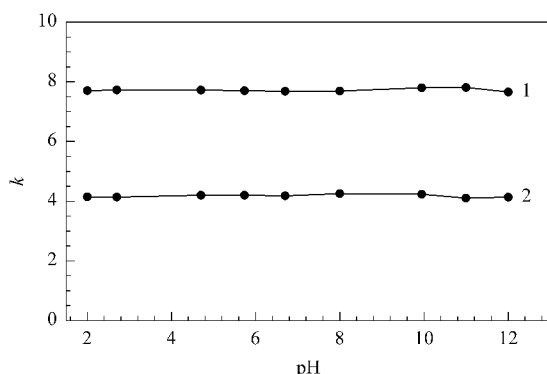


图 1 C_{12} -ZrO₂ 的化学稳定性

Fig.1 Stability of the C_{12} -zirconia stationary phase

Experimental conditions: column, C_{12} -ZrO₂, 100 mm × 4.6 mm i. d.; mobile phase, methanol-water (30:70, v/v); flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength, UV 254 nm.

Samples: 1. toluene; 2. *N,N'*-dimethylaniline.

系,线性相关系数 *r* 在 -0.983 7 到 -0.998 6 之间,表明碱性化合物在该固定相上为典型的反相色谱保留机理。与烷基键合硅胶固定相由于残留硅羟基的作用导致碱性化合物的色谱峰拖尾相比, C_{12} -ZrO₂ 在碱性化合物分离方面具有明显的优势。

表 1 溶质的保留因子 *k* 与流动相中甲醇含量的关系
Table 1 Relationship between retention factor *k* and the methanol content in mobile phase

Solute	Regression equation*	<i>r</i>
Aniline	lg <i>k</i> = 0.8212 - 0.0347 <i>C</i>	-0.9968
1-Amino-naphthylene	lg <i>k</i> = 1.7686 - 0.0366 <i>C</i>	-0.9884
3- <i>β</i> -Dimethylaniline	lg <i>k</i> = 2.2096 - 0.0371 <i>C</i>	-0.9845
<i>N,N'</i> -Dimethylaniline	lg <i>k</i> = 1.8675 - 0.0368 <i>C</i>	-0.9978
<i>N</i> -Ethyl- <i>p</i> -methylaniline	lg <i>k</i> = 1.6050 - 0.0355 <i>C</i>	-0.9981
<i>N,N'</i> -Diethylaniline	lg <i>k</i> = 2.9604 - 0.0513 <i>C</i>	-0.9934
Diphenylamine	lg <i>k</i> = 2.1746 - 0.0478 <i>C</i>	-0.9837
Pyridine	lg <i>k</i> = 0.6360 - 0.0334 <i>C</i>	-0.9981
4-Methyl-pyridine	lg <i>k</i> = 1.0900 - 0.0330 <i>C</i>	-0.9939
3,5-Dimethyl-pyridine	lg <i>k</i> = 1.3240 - 0.0322 <i>C</i>	-0.9986
2,4,6-Trimethyl-pyridine	lg <i>k</i> = 1.6360 - 0.1082 <i>C</i>	-0.9857

* *C*: volume fraction of methanol, %.

2.3 碱性化合物离解常数的测定

由于 C_{12} -ZrO₂ 在流动相 pH 为 2 ~ 12 时具有良好的化学稳定性,并且对碱性化合物表现出典型的反相色谱保留机理,因此有可能通过在较宽的范围内改变流动相 pH 值,进而改变碱性化合物在溶液中的存在形态,通过保留因子随流动相 pH 的变化曲线测定碱性化合物的离解常数 *K_a*。

固定流动相中甲醇的体积分数为 30%,考察 13 种芳香胺及吡啶衍生物的保留因子随 pH 的变化情况,结果见图 2。作为比较,也同时测定了几种硝基苯胺衍生物的保留因子随流动相 pH 的变化关系,结果见图 3。从图 2 可以看出,在酸性流动相条件

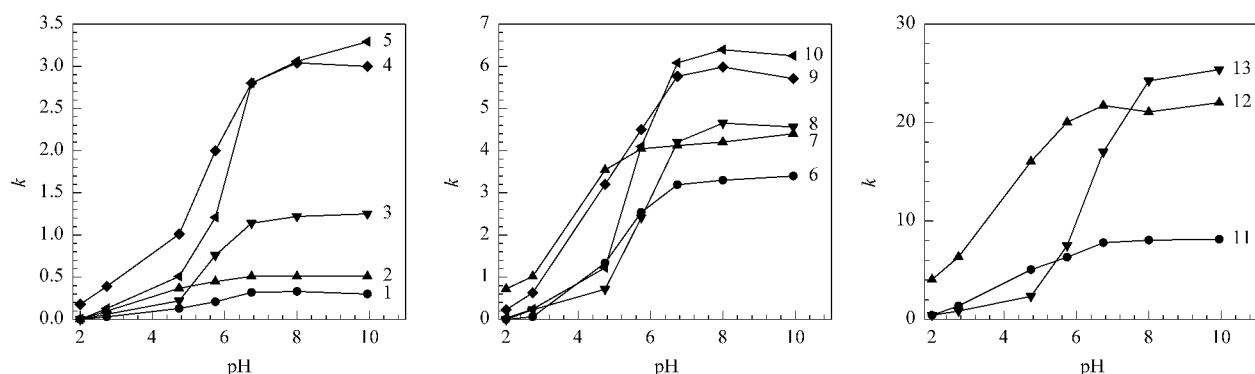


图 2 碱性化合物的保留因子与流动相 pH 值的关系

Fig. 2 Relationship between the retention factors of basic compounds versus pH value of mobile phase

Experimental conditions : column , C_{12} -ZrO₂ , 100 mm × 4.6 mm i. d. ; mobile phase , methanol-buffer (30 : 70 , v/v) , buffer pH , 2.00 , 2.74 , 4.74 , 5.74 , 6.74 , 8.00 , 9.95 ; flow rate , 1.0 mL/min ; detection wavelength , UV 254 nm.

Samples : 1. pyridine ; 2. aniline ; 3. 4-methylpyridine ; 4. 3,4-dimethylaniline ; 5. 3,5-dimethylpyridine ; 6. 4,4'-methylenedianiline ; 7. 1-amino-naphthalene ; 8. *N,N'*-dimethylaniline ; 9. 3,3'-methoxy-*p*-diamino-diphenyl ; 10. *N*-ethyl-*p*-methylaniline ; 11. 4,4'-ethylenedianiline ; 12. 4-amino-diphenyl ; 13. *N,N'*-diethylaniline.

下,碱性化合物的保留较弱,在 pH 2 时,大部分碱性化合物在固定相上几乎没有保留。随着流动相 pH 值的提高,溶质的保留逐渐增强,当 pH 值增大到一定范围时,化合物的保留趋于恒定。这是由于在酸性流动相条件下,碱性化合物会通过结合质子而带正电荷,但是随着流动相 pH 的增高,碱性化合物阳离子失去质子以电中性形态存在的比例逐渐增大,导致保留逐渐增强。pH 达到一定值后,溶质全部变为中性形态,其保留因子不再随 pH 发生变化。保留因子随 pH 值的变化过程呈现类似 S 形曲线,在该曲线的中点, pH 值等于该化合物(对碱性化合物 B 来说为其结合一个 H 离子后的形态,即 BH⁺)的 pK_a 值^[10]。硝基苯胺衍生物在所试验的 pH 范围内(见图 3),保留因子基本恒定,说明在考察的 pH 范围内这类溶质基本没有水解及离子化现象发生。

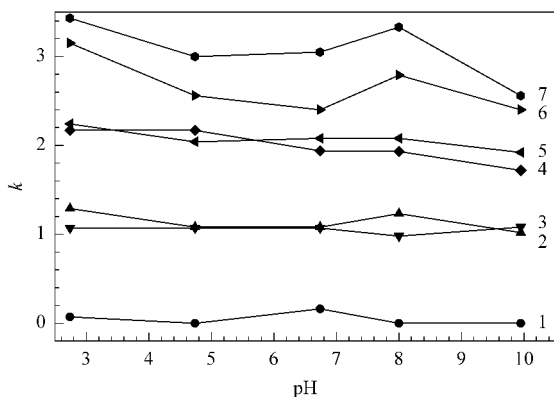


图 3 硝基苯胺衍生物的保留因子与流动相 pH 的关系

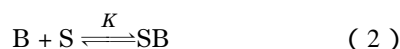
Fig. 3 Relationship between the retention factors of nitroanilines versus pH value of mobile phase

Experimental conditions are the same as in Fig. 2.

Samples : 1. 2,4-dinitrotoluene ; 2. *p*-nitroaniline ; 3. *m*-nitroaniline ; 4. *o*-nitroaniline ; 5. 2,6-dinitroaniline ; 6. 3,5-dinitroaniline ; 7. 2,4-dinitroaniline.

Lewis 等^[11]和 Schoenmakers 等^[12]分别对反相液相色谱中酸与碱的保留与流动相 pH 值的关系进行了详细的理论分析。当一种溶质的 pK_a = pH 时,其两种存在形态的浓度相等(即流动相中 B 与 BH⁺ 的浓度相等)。几乎所有与 pH 相关的保留值的变化大都出现在 pK_a ± 1.5 的 pH 值范围内,在这一范围之外一般可以认为化合物或者完全电离或者完全未电离,保留值随 pH 变化很小(即保留行为与其中性或完全离子化形态相似)。但是,对于 HPLC 体系,流动相中的有机调节剂将使得碱性溶质的离解曲线趋于平缓,并可能有小的位移。

反相 HPLC 中一元碱性化合物的离解及其与固定相的作用一般地可以表示为 :



其中 S 表示固定相, B 表示碱性化合物的中性形态, K 表示溶质的中性形态与固定相作用的平衡常数。

根据保留因子的定义,并结合式(1)和(2),可以得到保留因子 k 与流动相 pH 及溶质的离解常数 K_a 之间的关系 :

$$k = \frac{aK_a}{K_a + [H^+]} \quad (3)$$

其中 a 是与柱参数有关的常数。根据图 2,采用式(3)进行回归分析,求出部分碱性化合物的 pK_a 值列于表 2 中,表 2 中同时也给出了文献[13~21]的结果,对于没有发现文献数据的 3 种碱性化合物也分别给出了测定的离解常数。需注意的是文献中给出的 pK_a 值通常为在以水-缓冲溶液为流动相条件下测得的结果,而本试验的流动相中含有 30% 的甲醇有机溶剂调节剂,因此实测的 pK_a 值是该条件下

的数据。从表 2 可以看出,与文献的结果比较,测定值与文献值的差在 -0.27 与 0.35 pH 值单位内,表明 30% 甲醇对样品离解的影响不大。

表 2 本文方法测定的碱性化合物离解常数 pK_a 与文献数据^[13-21]的比较

Table 2 Comparison of pK_a values of basic compounds obtained by this method and references^[13-21]

Solute No. ¹⁾	$pK_{a(ref)}$	$pK_{a(det)}$	$pK_{a(det)} - pK_{a(ref)}$
1	5.17	5.14	-0.03
2	4.58	4.31	-0.27
3	6.02	5.75	-0.27
4	4.61 ²⁾	4.82	0.22
5	6.14	5.97	-0.17
6	-	4.91	-
7	3.92	3.61	-0.31
8	5.06	5.41	0.35
9	-	4.56	-
10	4.92 ³⁾	5.21	0.29
11	-	4.14	-
12	3.81	3.94	0.13
13	6.56	6.30	-0.26

1) 1. pyridine ; 2. aniline ; 3. 4-methyl-pyridine ; 4. 3,4-dimethylaniline ; 5. 3,5-dimethylpyridine ; 6. 4,4'-methylenedianiline ; 7. 1-amino-naphthalene ; 8. *N,N'*-dimethylaniline ; 9. 3,3'-methoxy-*p*-amino-diphenyl ; 10. *N*-ethyl-*p*-methylaniline ; 11. 4,4'-ethylenedianiline ; 12. 4-amino-diphenyl ; 13. *N,N'*-diethylaniline. 2) The pK_a value is for 2,4-dimethylaniline. 3) The pK_a value is for *N*-ethyl-2-methylaniline.

3 结语

制备的氧化锆基质十二烷基键合固定相在流动相 pH 为 2 ~ 12 时具有很好的稳定性,碱性化合物在该类固定相上的分离为反相色谱保留机理。利用氧化锆基质固定相的特点研究了碱性化合物的保留因子随流动相 pH 的变化规律,建立了测定碱性化合物离解常数的准确、快捷方法。测定结果与文献报道基本一致。

参考文献 :

[1] Nawrocki J , Rigney M , McCormick A , Carr P W . J Chromatogr A , 1993 , 657 : 229

[2] Trudinger U , Muller G , Unger K K . J Chromatogr A , 1990 , 535 : 111

[3] Yu J , Ei Rassi Z . J Liq Chromatogr , 1993 , 16 : 2 931

[4] Yu J , Ei Rassi Z . J High Resol Chromatogr , 1994 , 17 : 773

[5] Yu J , Ei Rassi Z . J High Resol Chromatogr , 1994 , 17 : 705

[6] Wirth H J , Eriksson K O , Holt P , Aguilar M , Hearn M T W . J Chromatogr A , 1993 , 646 : 129

[7] Wirth H J , Hearn M T W . J Chromatogr A , 1993 , 646 : 143

[8] Wirth H J , Hearn M T W . J Chromatogr A , 1995 , 711 : 223

[9] Zhang Qinghe , Zhang Yukui , Li Tong , Zhang Weibing , Feng Yuqi , Da Shilu . Chinese Journal of Analytical Chemistry (张庆合 , 张玉奎 , 李 彤 , 张维冰 , 冯钰琦 , 达世禄 . 分析化学) , 2002 , 30(2) : 134

[10] Snyder L R , Kirkland J J , Glajch J L . Practical HPLC Method Development . 2nd ed . Translated by Zhang Yukui , Wang Jie , Zhang Weibing . Beijing : Huawen Press (实用高效液相色谱法的建立 . 第 2 版 . 张玉奎 , 王 杰 , 张维冰 , 译 . 北京 : 华文出版社) , 2001 . 309

[11] Lewis J A , Lommen D C , Raddatz W D , Dolan J W , Snyder L R , Molnar L . J Chromatogr A , 1992 , 592 : 183

[12] Schenmakers P J , Tijssen R . J Chromatogr A , 1993 , 656 : 577

[13] Williams R . pK_a Data Compiled . http://research.chem.psu.edu/brpgrp/pKa_compilation.pdf . Sep 2004

[14] Perrin D D . Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution . London : Butterworths , 1965

[15] Perrin D D . Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution . Supplement . London : Butterworths , 1972

[16] Serjeant E P , Dempsey B . Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solution . Oxford : Pergamon Press , 1979

[17] Albert A . Ionization Constants of Heterocyclic Substances . In : Katritzky A R , ed . Physical Methods in Heterocyclic Chemistry . New York : Academic Press , 1963

[18] Sober H A , ed . CRC Handbook of Biochemistry . Boca Raton , FL : CRC Press , 1968

[19] Perrin D D , Dempsey B , Serjeant E P . pK_a Prediction for Organic Acids and Bases . London : Chapman and Hall , 1981

[20] Albert A , Serjeant E P . The Determination of Ionization Constants . Third ed . London : Chapman and Hall , 1984

[21] Budavari S . The Merck Index . Twelfth ed . Whitehouse Station , NJ : Merck & Co . , 1996

Thin Layer Chromatographic Study of Bauxite and Quantitative Estimation of Co-Existing Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+}

MOHAMED NAJAR P A , JEURKAR J U , RAMANA RAO K V

(*Jawaharlal Nehru Aluminium Research Development and Design Centre , Nagpur 440 023 , India*)

Abstract : Thin layer chromatography in combination with spectrophotometry and titrimetry has been used to evaluate chromatographic characteristics of bauxite constituents. The retention behaviors of four major constituents (Al^{3+} , Fe^{2+} , Ti^{4+} , Si^{4+}) in bauxite mineral have been examined on plain and modified layers of silica gel G , silica gel H and cellulose with mobile phases containing aqueous sodium chloride , formic acid and hydrochloric acid. Ternary separation of Al-Fe-Ti was achieved on chromatographic plates made of silica gel H. The pH effect and presence of impurity elements in samples , nature of stationary phases on the ternary separation and detection limits of bauxite constituents were studied. Silicon in bauxite was detected on cellulose plates. Quantitative determinations of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} on silica gel H impregnated with sodium formate layers were achieved by titrimetry and spectrophotometry.

Key words : thin layer chromatography ; silica ; aluminium ; iron ; titanium ; bauxite

CLC number : O658 **Document code** : A **Article IC** : 1000-8713(2005)05-0555-07

Chromatography is one of the modern analytical techniques used for achieving important separations of cationic and anionic species in a wide variety of natural and synthetic samples^[1-5]. Availability of wide range of modified layers of stationary phases with various mobile phase combinations and advances in modern instrumentation made thin layer chromatography (TLC) more simplified and versatile analytical technique for exploring better separations of inorganic ions present in a variety of natural and synthetic samples^[6,7].

The complexity in the chemical composition of bauxite is a major factor for deciding the efficiency and economic viability of alumina production by Bayer process. Though binary separation of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} in various samples by TLC is reported^[8-10] , it has been least utilized for studying chromatographic characteristics of bauxites of different geological origins. Mohammad and Hena^[11] recently reported the ternary separation of Al-Fe-Ti in water samples and bauxite ores on silica gel G layers by micellar mobile phases. However , this report has not highlighted the chromatographic behavior of all major constituents of bauxite including silica. TLC , being highly cost

effective and rapid , is ideal for routine analysis of bulk samples at mining sites where the composition of some typical constituents like Al_2O_3 and SiO_2 has to be recognized *in-situ* for continuous mining operations. Also , from the literature survey it has been realized that the chromatographic detection of silicon is difficult and no report is available on this context.

1 Experimental

1.1 Materials

1.1.1 Instrumentations

Systronics pH meter Model 335 was used for all pH measurements and photometric measurements were carried out by Shimadzu Model 1601 UV-Visible Spectrophotometer.

1.1.2 Test solutions

Standard aqueous solutions (1%) for reference were prepared in double distilled water from ammonium ferrous sulphate , potassium titanium oxalate and aluminium sulphate salts. Standard silicon solution (1 mg/mL) was used as received. One percent bauxite samples (Indian origin) were prepared by standard methods^[12,13]. Precipitated silica in the solution was separated by filtration through Whatman No. 40 ashless filter paper and

Received date : 2005-01-17

Corresponding author : MOHAMED NAJAR P A , Tel : +91-0712-220017/220465 , Fax : +91-7104-220942 , E-mail : najarp@hotmail.com.

Foundation item : the project of " Development of rapid analytical procedures for bauxite and semi-quantitative analysis of scrap aluminium " supported by Science & Technology Wing , Ministry of Mines , Government of India.

subjected for alkali fusion. Fused silica was redissolved in double distilled water containing dilute HCl (1 : 1 , v/v) and made up to the mark in polyethylene flask. The approximate chemical compositions of some representative bauxite samples used for this study are shown in Table 1.

Table 1 Approximate chemical compositions of some representative bauxite samples %

Sample	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	TiO ₂	CaO	LOI ¹⁾
Gujarat	57.17	2.80	2.99	2.48	2.03	32.24
Central India	57.08	5.04	1.11	4.98	Nil ²⁾	31.09
West Coast	57.03	5.56	1.80	5.12	Nil ²⁾	29.12
East Coast	44.30	26.70	1.90	2.70	Nil ²⁾	23.70

1) Loss on ignition ; 2) not present.

1.1.3 Detection reagents

Al³⁺ was detected by spraying TLC plates with 0.05% aqueous aluminon (tri-ammonium aurin tri-carboxylate , C₂₂H₂₃N₃O₉) , Fe²⁺ by 0.1% potassium ferrocyanide ([K₄Fe (CN)₆]) and Ti⁴⁺ by 0.50% tiron (Yoes reagent , C₆H₄Na₂O₈S₂) respectively. Si⁴⁺ was detected by spraying 1% ammonium molybdate [(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O] or sodium molybdate (Na₂MoO₄ · 2H₂O) followed by mild exposure to ammonia vapor.

1.1.4 Stationary phase

The stationary phases used for this study were microcrystalline cellulose (S₁) , silica gel G (S₂) , silica gel G impregnated with 1% sodium formate (S₃) , silica gel H (S₄) and silica gel H impregnated with 1% sodium formate (S₅).

1.1.5 Mobile phase

The solvent systems in Table 2 were found capable of resolving bauxite constituents.

1.2 Chromatography

1.2.1 Sample purification

One percent test solution of bauxite containing Al , Fe and Ti prepared by the standard method was evaporated on a hot plate. The dried sample was dissolved in double distilled water containing few drops of dilute HCl (1 : 1 , v/v) and made up to 100 mL in a standard flask for chromatographic study.

1.2.2 Preparation of TLC plates

TLC plates were prepared by mixing 1 : 3 (w/v) silica gel (G or H) or 1 : 4 (w/v) microcrystalline cellulose and double distilled water. The slurry obtained was shaken mechanically for 5 min after which it was spread as 0.25 mm layer

Table 2 Mobile phases and their compositions

Mobile phase	Composition (v/v)	Marking
Hydrochloric acid	1% , 3% , 5% , 7% , 9%	M ₁
Formic acid + 10% sodium chloride	1:9 , 9:1 , 1:1	M ₂
Formic acid + 1% sodium chloride	1:9 , 9:1 , 1:1	M ₃
0.1% Formic acid + saturated sodium chloride	1:9	M ₄
1% Formic acid + saturated sodium chloride	1:9	M ₅
10% Formic acid + saturated sodium chloride	1:9	M ₆
2.5% Formic acid + saturated sodium chloride	1:9	M ₇
5% Formic acid + saturated sodium chloride	1:9	M ₈
0.4% Formic acid + saturated sodium chloride	7:3	M ₉
0.4% Formic acid + 10% sodium hydroxide	1:9	M ₁₀
2.5% Formic acid + 10% sodium chloride	1:9	M ₁₁
10% Formic acid + 10% sodium chloride	3:7 , 1:3 , 2:8	M ₁₂

on to 20 cm × 3.5 cm polished glass plates. The plates were dried at room temperature and activated at (100 ± 5) °C for 1 h in an electric oven. The activated plates were stored in vacuum chamber until used.

Impregnated plates were prepared by mixing silica gel G or silica gel H with the impregnating reagents in place of double distilled water under the same experimental conditions for non-impregnated plates.

1.2.3 Procedure

Approximate 10 μL test solution was applied using a micropipette about 3.0 cm above the lower edge of TLC plates. The spots were dried at room temperature and the plates were developed in developing chambers containing mobile phase by ascending technique. The chambers were prepared in advance for pre-saturation with the mobile phase vapor. In all experimental runs the mobile phase ascend was fixed at 10 cm from the point of sample application. The developed plates were dried again and the sample constituents were visualized as coloured spots by spraying suitable detection reagents. The visualized spots were characterized on the basis of their respective R_F values , calculated from the equation R_F = (R_L + R_T) / 2 , where R_L is the R_F value of leading front and R_T is the R_F value of tailing front.

1.2.4 Separation of bauxite constituents

The ideal chromatographic system for selective separation of bauxite constituents was realized from the retention data (R_F) of the ions present in a 1% synthetic mixture prepared from their respective salt solutions. Chromatography was performed with various mobile phases comprising aqueous salt solutions, mineral and organic acids and their mixtures in various ratios. Separation possibilities of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} were observed on TLC plates coated with plain silica gel H (S_4) and 1% sodium formate impregnated silica gel H (S_5) with mobile phases $M_2 - M_{12}$. The combinations of mixtures of 10% formic acid and 10% sodium chloride (M_{12}) were found better for resolving Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} on S_4 and S_5 . The resolved spots were observed on the chromatographic plates after spraying the respective chromogenic reagents. The spots were characterized with distinct colours, *viz.*, pink for aluminium, blue for iron and yellow for titanium. Si^{4+} was found migrated from the point of sample application with respect to the pH of mobile phase M_1 used. The spot detection was achieved by spraying sodium molybdate followed by mild exposure to ammonia vapor. Silicon appeared as light yellow spot on cellulose layers with sodium molybdate and the colour turned to stable dull blue when exposure to ammonia vapor. The R_F values recorded for all the four ions in their mixture were similar to their individual R_F values under the same experimental conditions.

Chromatography was performed with TLC plates loaded with 10 μL solutions of bauxite samples under the same experimental conditions described for synthetic samples. Well resolved compact spots of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} were obtained on silica gel H plates. Si^{4+} was detected on cellulose plates developed with mobile phase M_1 (5%). The detection efficiency and separation possibilities of all the cations were confirmed with that present in bauxites of various geological origins.

1.2.5 Limit of detection

The detection limits of Al^{3+} , Fe^{2+} , Ti^{4+} and Si^{4+} were determined by spotting 10 μL of solutions on the TLC plates. The silica gel H plates were developed in M_{12} and cellulose plates in M_5

(5%). Spot detection was carried out by spraying appropriate visualization reagents as described earlier. The procedure was repeated with successive lowering of cationic concentration in the samples loaded (10 μL) on the TLC plates until no spot could be detected. The lowest detectable values of ions on TLC plates are reported as the detection limits of the ions studied.

1.3 Quantitative studies

1.3.1 Titrimetry analysis of aluminium

Determination of Al^{3+} by TLC in combination with titrimetric analysis^[14] was carried out by spotting standard bauxites samples (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL containing approximate 570, 1140, 1712, 2283, 2854 μg of Al_2O_3 respectively) on S_5 (0.3 mm thickness) in duplicate for each concentration and developed with M_{12} (2:8, v/v). The spots were detected on the developed TLC plates by spraying colouring reagents on one set of chromatographic plates and the area of adsorbent corresponds to the analyte spot on the second set of TLC plates were quantitatively collected in clean beakers. Al^{3+} was extracted with hot water containing a few drops of 1% hydrochloric acid. The adsorbent in the extracts were removed by filtration and the resultant solution was mixed with 10 mL 3 mol/L NaOH solution. The precipitate formed was separated by filtration through Whatman No. 1 filter paper. The contents in the beaker were mixed with 1–5 mL 1:1 H_2SO_4 followed by 10 mL 0.01 mol/L EDTA and the resultant solution was neutralized with 1:1 NH_4OH . 30 mL acetate buffer (pH 7.20) was added to the mixture and boiled for 3–5 min. The solution was cooled to room temperature and titrated by 0.01 mol/L zinc acetate. From the volume of titrant consumed and the amount of analyte loaded on the TLC plate, a recovery percentage in the range of 93%–95% was observed.

In order to improve the analytical utility of the method developed, different volumes (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL) of bauxite sample (Central India) containing known quantities of Al^{3+} (0.57, 1.14, 1.71, 2.28 and 2.85 mg) were loaded on TLC plates (S_5). The procedure was repeated under the same experimental conditions to get the recovery percentages. A calibration curve was constructed by plotting the quantity of Al^{3+} *vs.* the volume of the sample loaded on TLC

plates. From the slope obtained for the straight line graph the recovery percentages of Al^{3+} in unknown bauxite samples were calculated. A maximum recovery of 95.54% was noticed.

1.3.2 Spectrophotometric analysis of iron and titanium

TLC combined with spectrophotometry^[15,16] has been used for the quantitative determination of Fe^{2+} and Ti^{4+} in bauxite samples. For the determination of Fe^{2+} , standard bauxite solutions (East Coast) of 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 and 0.20 mL containing 74.68, 149.3, 224.0, 298.7, 373.4 μg of Fe^{2+} and for Ti^{4+} , 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 and 0.50 mL bauxite solutions (West Coast) containing 30.68, 61.37, 92.06, 122.7, 153.4 μg of Ti^{4+} were loaded on TLC plates made of S_5 . The plates were developed in M_{12} (2:8, v/v) and the corresponding areas of spots on the respective TLC plates were quantitatively collected in clean beakers as described above. Fe^{2+} was extracted with 10% acetic acid and filtered through Whatman No. 1 filter paper. The extract is then mixed with 1% hydroxyl ammonium chloride, 0.25% 1,10-phenanthroline and acetate buffer of pH 3.5 - 3.7 (1:1:3, v/v). The resultant solution was made up to 100 mL and allowed to stand for 15 min for complete colour development followed by spectrophotometric measurements at λ_{max} of 510 nm.

Similarly Ti^{4+} was extracted with dilute sulphuric acid (1:3, v/v) and the extract is mixed with 3 mL phosphoric acid (1:1, v/v) and 5 mL hydrogen peroxide (4.5%) and made up to 50 mL. The solution was left for complete colour development for 15 min. Photometric measurements were carried out at 410 nm (λ_{max}) by using 1 cm cells.

The absorbances obtained for Fe^{2+} and Ti^{4+} in standard bauxite sample were plotted against their concentrations to obtain the calibration curves for iron and titanium respectively. The Beer-Lambert law was satisfied for the range 50 to 350 μg for Fe^{2+} and 30 to 150 μg for Ti^{4+} . From the slope of calibration curves made the quantities of Fe^{2+} and Ti^{4+} present in bauxites of different origins (Central India, East Coast, and West Coast) were determined. The recovery percentages obtained for bauxites of various origins lay in the ranges of 92% to 94% for Fe^{2+} and 91% to

93% for Ti^{4+} .

2 Results and Discussion

The chromatographic behavior of major constituents in twenty five bauxite samples of various geological origins (India) was examined on selective chromatographic systems ($S_1 - S_5/M_1 - M_{12}$) comprising formic acid, sodium chloride, sodium formate, silica gels and cellulose. Considering the compositional complexity of bauxite, factors such as nature of chromatographic system, sample composition, sample medium and effects of organic and inorganic additives in the sample are discussed.

2.1 Sample composition and nature of chromatographic systems

To study the effect of sample composition on the mobility (R_F) of major constituents in bauxite chromatography was performed with S_4 and $M_2 - M_{12}$. The R_F values recorded for Al^{3+} , Fe^{2+} , Ti^{4+} in these systems revealed that the variation of chemical composition does not affect the mutual separation of Al-Fe-Ti. Reproducible R_F values as shown in Fig. 1 were obtained for the same sample with different chromatographic systems.

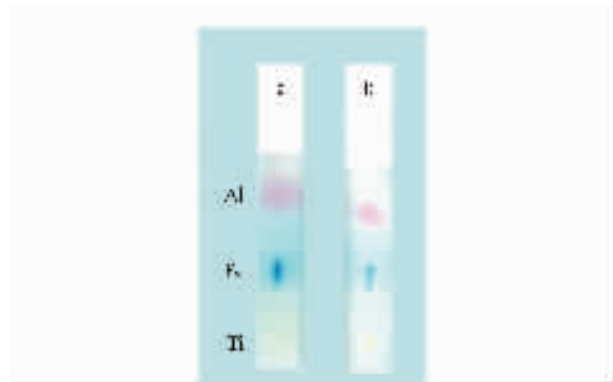


Fig.1 Separation of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} in bauxites on plain (a) and impregnated (b) silica gel H plates

Al^{3+} spot appeared slightly diffused on plain silica gel H and appeared more compact with slightly lower R_F values on silica gel H impregnated with 1% sodium formate plates. Ti^{4+} remained at the point of sample application showing little mobility on both plain and impregnated plates. Fe^{2+} spot appeared compact on plain and impregnated silica gel H (S_4 and S_5) plates and distinctly separated from Al^{3+} and Ti^{4+} . Fe^{2+} spot appeared diffused on silica gel G plates and some

parts of this diffused spot migrated along with that of aluminium resulting in poor or no separation.

The detection of silicon was achieved with sodium molybdate on microcrystalline cellulose plates developed with 5% hydrochloric acid. Si^{4+} appeared as bright yellow spot ($R_F = 0.97$) with molybdate solutions and turned to blue on exposure to ammonia vapor. The colour formed with molybdate and ammonia was stable (~ 3 h). Though Ti^{4+} was separated from Si^{4+} , practical detection was hampered due to the formation of a dark yellow complex of tiron and molybdate. Binary or ternary separation was not achieved on cellulose layers since Al^{2+} and Fe^{2+} traveled along with Si^{4+} .

Since the ternary separation of co-existing Al-Fe-Ti by TLC is rare, further studies were concentrated on the mutual separation of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} taking account of sample concentration, pH effect, nature of chromatographic system, temperature, humidity etc. The separation possibility decreases with the increase of sample acidity as well as the increase of acid concentration in mobile phase compositions (Fig. 2).

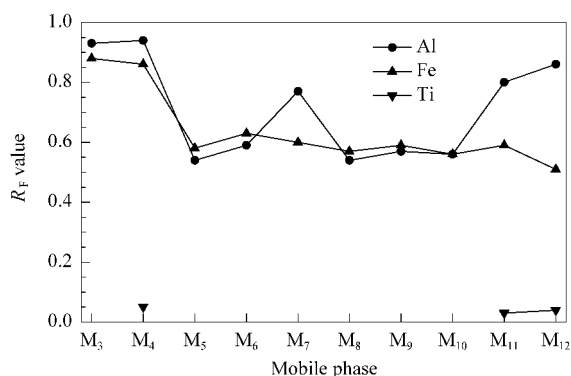


Fig. 2 Effect of formic acid concentration on R_F of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} in bauxite

High R_F value (R_F varies from 0.74 to 0.95) was observed for Al^{3+} and Fe^{2+} with pure formic acid systems and with $> 55\%$ formic acid in binary systems containing aqueous salt solutions. High concentrations of formic acid adversely affect the chance of Ti^{4+} detection. To achieve the effective ternary separations, the formic acid concentration must be kept below 50% in the binary mobile phase combinations comprising 10% formic acid and 10% aqueous salt solutions (M₁₂). A similar trend in the R_F values ($R_F \approx 0.85 -$

0.99) of Al^{3+} and Fe^{2+} were noticed with acidic samples (crude bauxite samples obtained after the removal of silica) on silica gel H and silica gel G plates. Ti^{4+} remained at the point of sample application. Further studies in these directions revealed that ternary separation is possible only if the sample pH is in the range 2.4 to 5.6. Beyond pH 5.6, detection possibilities of Al^{3+} and Ti^{4+} started to deteriorate. From these observations it is concluded that acidity of test sample along with nature of chromatographic system in general and mobile phase composition in particular play an important role in resulting the mutual separation of Al-Fe-Ti in bauxite samples.

2.2 Effect of impurities

In addition to the major constituents bauxite contains many other organic and inorganic impurities. Bauxites of some geological origins, especially from Gujarat (India), contain approximate 3% to 10% calcium. Silica in bauxites causes caustic losses and efficiency of Bayer plants. Though the organics concentration in Indian bauxites is very low, i.e. $< 0.10\%$, their periodic accumulation, especially that of humates and oxalates in sodium aluminate liquor, adversely affects the performance of Bayer plants. In view of these, the effect of organic impurities on chromatographic separation of Al-Fe-Ti in bauxite samples was studied. The separation possibilities were examined individually in the presence of added impurities *viz.* calcium, silicon, sodium and various organic compounds. The results of these studies are summarized in Fig. 3 and Fig. 4.

The samples were loaded on TLC plates made of silica gel H and chromatography was performed with M₁₂. From the R_F recorded it has been noticed that the presence of diethylamine adversely affects the separation possibilities by resulting in elongated spots for Al^{3+} and Fe^{2+} . The detection possibility was also poor for Al^{3+} and Ti^{4+} . The variations in R_F , spot size ($R_L - R_T$) and detection possibilities were further confirmed with the deliberate addition of various amines in bauxite samples. From this observation it has been concluded that the presence of some organic species in bauxite samples may affect the chromatographic detection of the major constituents.

The effect of some commonly occurring inor-

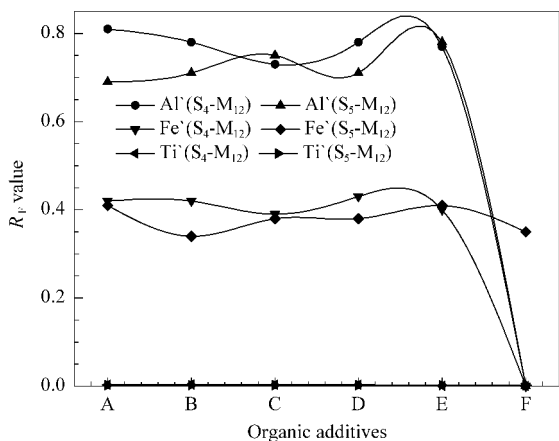


Fig. 3 Effect of organic additives on separation of Al, Fe and Ti in bauxite

Organic additives : A. acetic acid ; B. ethanol ; C. formaldehyde ; D. formamide ; E. sodium oxalate ; F. diethylamine.

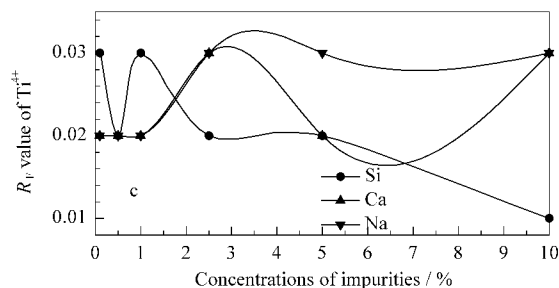
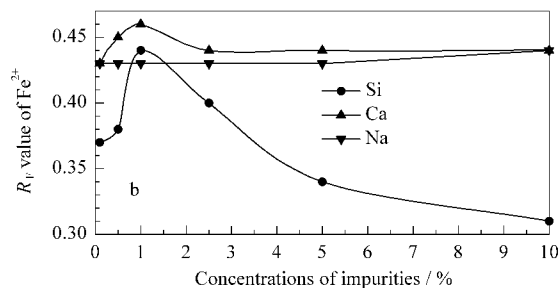
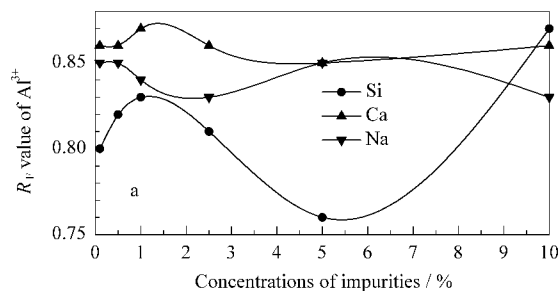


Fig. 5 Variation of R_F of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} with concentrations of impurities

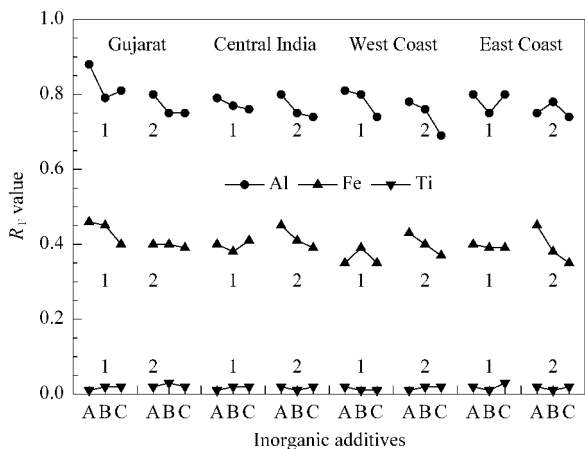


Fig. 4 Effect of inorganic additives on separation of Al, Fe and Ti in bauxites

Inorganic additives : A. 1% $CaCl_2$; B. 1% NaCl ; C. 1% Na_2SiO_3 . Chromatographic system : 1. S_4-M_{12} ; 2. S_5-M_{12} .

ganic impurities in bauxite on the chromatographic separation of Al-Fe-Ti was studied with bauxite sample solution mixing with 0.10% to 10% solutions of $CaCl_2$, NaCl or Na_2SiO_3 in 1 : 1, v/v. Chromatography was performed with S_5-M_{12} system. Interestingly no variation in spot size and detection efficiency was noticed and the resolution of Al-Fe-Ti remains intact. The study recorded negligible variations in R_F in presence of the impurity elements i.e. the changes were $R_F < 0.11$ for Al, $R_F < 0.14$ for Fe and $R_F < 0.02$ for Ti (Fig. 5).

The detection limits achieved for bauxite samples are in agreement with that of standard samples, the trace level detection of the cations in bauxite samples required dilution of detection reagents i.e. 0.01% aluminum, 0.10% potassium

ferrocyanide and 0.50% tiron. Sodium formate impregnated silica gel H plates were found more effective as of formate ion enhances detection of Ti in bauxite samples.

2.3 Effect of temperature and sorbent moisture

The effect of temperature on the separation of Al-Fe-Ti was studied by developing TLC plates (S_4/S_5-M_{12}) at different temperature conditions varying from 20 – 50 °C. No significant variation in R_F value was noticed except at 50 °C, where an overall increase in R_F (0.05) was noticed with Al^{3+} and Fe^{2+} . The increase in R_F of Ti^{4+} was due to the slight tailing of spot from the point of sample application. It is attributed that the slight increase in R_F was observed, probably due to the increased evaporation of mobile phase from the adsorbent layer and the increase of mobile phase flow.

The effect of adsorbent moisture on the separation was studied with non-activated (1), activated (2) and reactivated (3) (after sample load-

ing) TLC plates (S_4/S_5). The order of mobility (R_F) of Al^{3+} , Fe^{2+} and Ti^{4+} was (1) > (2) > (3), clearly indicating the role of humidity in the separation and the need of maintaining humidity level during experimental procedure for the realization of reproducible results.

2.4 Limit of detection

The detection limits of Al^{3+} , Fe^{2+} , Ti^{4+} and Si^{4+} were determined by spotting different volumes of bauxite solutions on TLC plates (S_4 , S_5 and S_1) followed by development of the plates with selected mobile phases M_{12} (2:8, v/v) and M_1 (5%). The results were listed in Table 3. The accuracy and reproducibility of detection limit were confirmed with different bauxite samples and their composite.

Table 3 Detection limits of cations in aqueous standards ppm

Standard samples	$\text{Al}^{1)}$	$\text{Fe}^{1)}$	$\text{Ti}^{1)}$	$\text{Si}^{2)}$
Aluminium sulphate	12.00			
Ferric chloride		2.40		
Potassium titanium oxalate			2.50	
Sodium silicate				6.20

1) All values are average of five consecutive trials in chromatographic systems S_4 - M_{12} & S_5 - M_{12} .

2) Average of five consecutive trials in S_1 - M_1 (5%).

The detection limits achieved for bauxite samples are in agreement with those of standard samples, the trace level detection of the cations in bauxite samples required dilution of detection reagents i. e. 0.01% aluminon, 0.10% potassium ferrocyanide and 0.50% tiron. Sodium formate impregnated silica gel H plates were found more effective as formate ion enhances detection of Ti in bauxite samples.

3 Conclusions

The present chromatographic studies on bauxite solutions revealed the possibility of an improved and rapid quantitative methodology for the analysis of major constituents in ore samples. The investigations also showed that TLC procedure can be successfully modified and coupled with suitable instrumentation methods for the qualita-

tive and quantitative determination of trace elements in ore samples.

Acknowledgement

The authors thank Dr. J. Mukhopadhyay, Director, JNARDDC for his constant encouragement, useful suggestions and permission for publishing the work. Science & Technology Wing, Ministry of Mines, GOI is acknowledged for financial support to the project on "Development of rapid analytical procedures for bauxite and semi-quantitative analysis of scrap aluminium".

References :

- [1] Netto J Z. *Eclat Quim*, 1991, 16 : 9
- [2] Mohammad A. *J Planar Chromatogr-Mod TLC*, 1995, 8(6) : 463
- [3] Mohammad A, Nasim K T, Ahmad J, Najar P A M. *Analisis*, 1995, 23(6) : 243
- [4] Mohammad A, Nasim K T, Najar P A M. *J Planar Chromatogr-Mod TLC*, 1997, 10(3) : 188
- [5] Mohammad A, Najar P A M, Iraqi E. *Indian J Chem Technol*, 1999, 6(1) : 38
- [6] Mohammad A, Najar P A M. *Acta Chromatogr*, 2001, 11 : 154
- [7] Mohammad A, Jabeen N. *Indian Journal of Chemical Technology*, 2003, 10(1) : 79
- [8] Varshney K G, Khan M A. In : *Inorganic Ion Exchanges in Chemical Analysis*. Qureshi M, Varshney K G, eds. BocaRaton : CRC Press, 1991. 177
- [9] Mohammad A, Ajmal M, Anwar S, Iraqi E. *J Planar Chromatogr Mod TLC*, 1996, 9(5) : 318
- [10] Ghoulipour V, Husain S W. *Analytical Sciences*, 2000, 16 (10) : 1079
- [11] Mohammad A, Hena S. *Separation Science and Technology*, 2004, 39(11) : 2731
- [12] *Laboratory Analyses and Instructions for Quality and Chemical Control*. Budapest, Hungary : Aluterv, 1970
- [13] *A Manual of Recommended Methods for Analysis of Ores and Minerals*. Geological Survey of India, 1993
- [14] Snell F D, Ettore L S. *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*. Vol 18. New York : John Wiley and Sons, 1973. 167
- [15] Mohammad A, Syed S, Sharma L M, Syed A A. *Acta Chromatogr*, 2001, 11 : 183
- [16] Snell F D, Ettore L S. *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*. Vol 14. New York : John Wiley and Sons, 1971. 24

十二烷基糖苷的反相高效液相色谱分析

陈敬德, 鲁波, 尹红

(浙江大学化学工程系, 浙江 杭州 310027)

关键词: 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography); 烷基多苷(alkyl polyglycosides); 聚合度(degree of polymerization)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2005)05-0562-01

烷基多苷(APG)是一类环保型非离子表面活性剂, 由脂肪醇与糖制备, 为单糖苷和多糖苷的混合物。受分离方法的限制, 难以得到其中各组分的纯品, 因此 APG 的组成测定一直未得到很好的解决。本文采用制备色谱对其进行分离, 经核磁共振氢谱($^1\text{H NMR}$)确定各组分结构, 用高效液相色谱(HPLC)分析测定了相对质量校正因子(f), 为完善 APG 的结构分析及质量控制奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与标样

SSI PC2000 型二元高效液相色谱仪, 配示差折光检测器; Avance DMX500 型核磁共振仪。正戊醇(分析纯); 十二烷基糖苷(自制); 十二烷基单糖苷和十二烷基二糖苷(由制备色谱分离十二烷基糖苷制得)。

准确称取正戊醇 100.0 mg, 加入流动相配成 100 mL 的内标溶液。准确称取样品 0.2 ~ 0.5 g, 加入标准溶液 1 mL, 再加入流动相配成 100 mL 的样品溶液。

1.2 分析条件

(1)制备色谱: Kromasil C_{18} 柱(250 mm \times 40 mm i. d., 20 μm), 柱温 35 $^\circ\text{C}$; 流动相为 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (体积比为 3:1), 流速 8 mL/min, 进样量 5 mL。

(2)分析色谱: Kromasil C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm), 柱温 35 $^\circ\text{C}$; 流动相为 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (体积比为 3:1), 流速 0.7 mL/min, 进样量 15 μL 。

(3) $^1\text{H NMR}$: 内标物为四甲基硅烷; 溶剂为氘代二甲亚砜。

2 结果与讨论

2.1 标样的制备及其聚合度的确定

将十二烷基糖苷的样品溶液进行 HPLC 分析(见图 1)。图 1 中峰 2 和 3 组分因量少而难分离, 故不予制备。对峰 4 ~ 9 组分进行分离制备, 通过 $^1\text{H NMR}$ 谱图数据计算出相应的聚合度。方法如下: 由 n (APG 中的糖单元数) 和 δ_1 (3.30 ~ 5.20, 糖单元氢的化学位移) 与 δ_2 (0.87 ~ 1.64, 烷基氢的化学位移) 内的积分面积计算出聚合度 DP_1 。理论上十二烷基糖苷 δ_1 范围内的氢个数与 δ_2 范围内的氢个数比应为 $(11n + 2) : 23$ 。

由峰 4 ~ 9 组分的 $^1\text{H NMR}$ 谱图数据计算可得 DP_1 , 分别为 2.02, 2.00, 2.03, 2.01, 1.01 和 1.02, 因此可认为峰 4 ~ 7 组分均为二糖苷, 组分 8 和 9 为单糖苷。由于在 APG 的合成过程中还有三糖苷、四糖苷、五糖苷生成, 因此据其极性大小不同和流出色谱柱的先后顺序不同, 判断峰 2 和 3 可能是三糖苷、四糖苷、五糖苷的混合物。

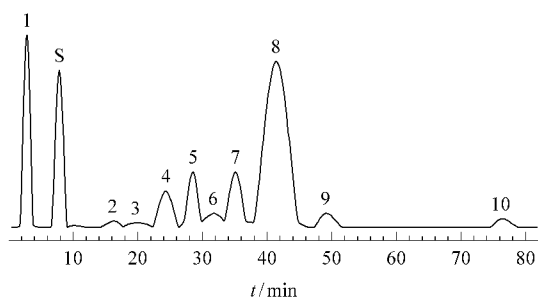


图 1 APG 的 HPLC 分析色谱图

1. 单糖和多糖; 2, 3. 三糖苷、四糖苷、五糖苷的混合物; 4 ~ 7. 二糖苷; 8, 9. 单糖苷; 10. 十二醇; S. 内标物正戊醇。

2.2 校正因子的测定

用单糖苷、二糖苷、十二醇、葡萄糖、麦芽糖作标样, 分别加入准确量的内标物, 经 HPLC 分析测得 f (结果略)。

2.3 HPLC 定量分析方法的准确度与精密度

为便于分析, 将图 1 中峰 2 和 3 的三糖苷、四糖苷、五糖苷的混合物均按四糖苷进行计算, 其 f 取单糖苷的 f 。峰 1 组分以葡萄糖进行计算。准确称取葡萄糖、十二醇、十二烷基单糖苷、十二烷基二糖苷模拟配样(样品中组分的质量分数分别为 0.98%, 2.38%, 57.34%, 21.09%); 通过 HPLC 测定, 测得上述样品中各组分的质量分数分别为 0.94%, 2.44%, 58.47%, 20.51%; 计算得到相对误差和标准偏差分别为 4.29%, 2.35%, 1.97%, 2.75% 和 0.048%, 0.064%, 1.281%, 0.657%。

2.4 聚合度的计算

通过 $^1\text{H NMR}$ 测得 $DP_1 = 1.61$ 。根据 HPLC 分析数据得到各组分的质量分数, 分别计算相应组分的物质的量: n_1 (葡萄糖), n_2 (三糖苷、四糖苷、五糖苷的混合物), n_3 (二糖苷), n_4 (单糖苷), n_5 (十二醇)。HPLC 分析聚合度 DP_2 按下式计算 $DP_2 = (n_1 + 4n_2 + 2n_3 + n_4) / (n_2 + n_3 + n_4 + n_5)$ 。得平均聚合度 = 1.58, 相对误差为 1.74%, 标准偏差为 0.036。

3 结论

(1)结合制备型 HPLC 分离获得了 APG 中的各组分, 并用 $^1\text{H NMR}$ 确定了其结构。(2)HPLC 分析测定得到了烷基单糖苷和二糖苷的校正因子, 以用于 APG 的 HPLC 分析。(3)本法操作简便、快捷、精密度高, 能很好地分析出 APG 的分布及组成, 从而对其合成工艺的跟踪分析有很大帮助。

非水反相高效液相色谱法测定阿立哌唑的含量

刘红菊, 蒋 晔, 郝晓花

(河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

关键词: 非水流动相(nonaqueous mobile phase); 反相高效液相色谱法(reversed-phase high performance liquid chromatography); 阿立哌唑(aripiprazole)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2005)05-0563-01

阿立哌唑(aripiprazole, 7-[4-(2,3-二氯苯基)-1-哌嗪基]-丁氧基]-3,4-二氢喹啉酮)是日本 Otsuka 公司于 1988 年开发的第二代非典型性抗精神病药,于 2002 年由美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市,商品名为 Abilify,用于精神分裂症的治疗^[1]。阿立哌唑的含量测定方法尚未见报道。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:P99 II 二元梯度泵,UV99 紫外检测器(北京温分分析仪器技术开发公司);N2010 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。阿立哌唑片(批号:20030701,20030702,20030703);阿立哌唑对照品(含量为 99.57%)。甲醇为色谱纯,三乙胺为分析纯。

1.2 对照溶液的配制

准确称取阿立哌唑对照品约 10 mg 置于 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。从中准确吸取 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液(质量浓度为 40 mg/L)。

1.3 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm);流动相为甲醇-三乙胺(体积比为 99.9:0.1);流速 1.0 mL/min,检测波长 257 nm,柱温为室温,进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

阿立哌唑结构中含有叔胺基团,呈弱碱性,以甲醇-磷酸二氢钠缓冲溶液体系作为流动相进行分离时,色谱峰拖尾,柱效低,加入 1.2% 的三乙胺后拖尾现象改善,但理论塔板数只有 2000 左右。考虑到阿立哌唑极性小,且在有机溶剂中介电常数小,电离弱,因此采用非水流动相进行分离。以纯甲醇为流动相时,阿立哌唑色谱峰有轻微的拖尾现象,加入 0.1% 的三乙胺可改善峰形,提高柱效,理论塔板数在 5000 以上。因此选择甲醇-三乙胺(体积比为 99.9:0.1)体系作为流动相。

2.2 线性关系及检测限

准确称取阿立哌唑对照品适量,用流动相溶解、稀释,配制成质量浓度为 1.5 ~ 400 mg/L 的系列标准溶液。分别准确吸取 20 μL 进样,以峰面积 A 对质量浓度 C(mg/L)作线性回归,在 1.5 ~ 400 mg/L 时 A 与 C 呈良好的线性关系,回归方程为 $A = 1.6 \times 10^4 C - 1.3 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。以信噪比为 3 计,测得阿立哌唑的最小检测量为 1 ng。

2.3 稳定性试验

取对照溶液于室温下放置,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 后测

定其峰面积,计算相对标准偏差(RSD)为 0.6%,说明阿立哌唑溶液在室温下 12 h 内稳定。

2.4 回收率及精密度试验

准确称取阿立哌唑标准品约 8, 10, 12 mg, 分别加入到 25 mL 量瓶中,按处方分别加入空白辅料适量,加流动相适量,超声 5 min,用流动相稀释到刻度,摇匀。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,准确吸取续滤液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释到刻度,摇匀。分别取上述溶液及对照溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。按外标法以峰面积计算含量,每个样品溶液平行测定 5 次,得到方法的回收率为 99.8% ~ 100.1%,RSD 为 0.3% ~ 0.5%。

2.5 样品测定

取阿立哌唑片 10 片,准确称定,研成粉末,准确称取适量(约相当于阿立哌唑 10 mg),置于 25 mL 量瓶中,按“2.4”节“加流动相适量……摇匀”操作,进行色谱分析。3 批样品的含量测定结果(相对于标示量(%), $n = 3$)依次为 99.2%, 98.7% 和 99.3%,其 RSD 分别为 0.6%, 0.9% 和 0.7%。空白辅料及样品的色谱图见图 1。

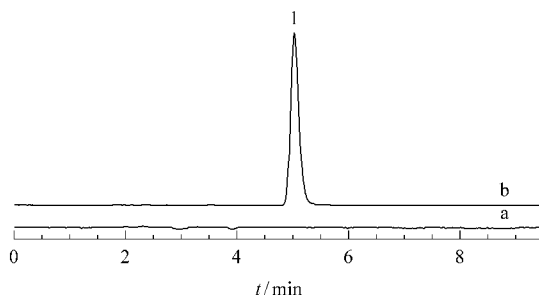


图 1 空白样品(a)和样品(b)的色谱图
1. 阿立哌唑。

3 结论

非水反相高效液相色谱法适用于非极性和弱极性物质的分离^[2,3],非水流动相与含水流动相相比具有载样量高、分离速度快、柱效高等优点。将非水反相高效液相色谱法用于阿立哌唑的含量测定,阿立哌唑保留时间短;由于多数片剂辅料在纯甲醇中不溶解,辅料对被测成分没有干扰,精密度高,结果准确。

参考文献:

- [1] 罗荣. 现代诊断与治疗, 2003, 14(6): 372
- [2] 张翠丽, 王珍, 李东光, 邹汉法, 洪名放, 张玉奎. 色谱, 1995, 13(6): 458
- [3] 姜少灏, 蒋晔, 郝晓花. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 437

高效液相色谱法测定酶转化液中胞苷三磷酸及其相关物质

肖明芳, 何明芳, 吕浩, 应汉杰

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

关键词: 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography); 胞苷三磷酸(cytidine triphosphate); 胞苷二磷酸(cytidine diphosphate); 胞苷一磷酸(cytidine monophosphate); 酶转化液(liquid of enzymatical reaction)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2005)05-0564-01

微生物多酶系统转化法^[1]是在胞苷三磷酸(CTP)的制备方法中比较有产业化前景的技术, 即由胞嘧啶核苷酸(即胞苷一磷酸, CMP)经微生物(如啤酒酵母)转化而得到 CTP, 但在其产物中可能还存在中间产物胞苷二磷酸(CDP)。有关核苷酸物质的高效液相色谱检测方法国外已有报道^[2,3], 我们在此基础上简化了色谱条件, 开发出一套适用于对酶转化液中 CMP, CDP 和 CTP 精确测定的方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

125/166/845 高效液相色谱仪及色谱工作站(Beckman 公司)。CMP, CDP, CTP 标准品购自 Sigma 公司(纯度大于 98%); 甲醇为国产色谱纯, 磷酸和三乙胺为国产分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: 汉邦 Lichrospher C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm i. d. 5 μm); 流动相: 甲醇-6%(体积分数)磷酸水溶液(用三乙胺调节 pH 值至 6.6)(体积比为 11: 89); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 271 nm; 柱温为室温; 进样体积 20 μL。

1.3 样品的处理

经过 10 h 的酵母酶系催化反应后, 取酵母转化液, 用盐酸调节其 pH 值至 2.0, 离心(15 °C, 4 000 r/min, 10 min)后取上清液, 用 Millipore Labscale TFF System 超滤器(超滤膜的截留相对分子质量为 5 000)超滤除去大分子物质, 得透明澄清浅黄色液体。再用流动相稀释定容, 过膜后待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的确立

3 种物质在 207 和 271 nm 处各有一个吸收峰, 由于流动相在 205 nm 处有吸收, 因此确定 271 nm 为检测波长。

在偏酸性的磷酸水溶液中, 核苷酸以负离子形式存在。加入适量三乙胺, 质子化的胺离子与核苷酸负离子结合形成离子对的复合物, 它容易被反相色谱柱的非极性表面所吸附。考察了流动相 pH 值及离子对试剂浓度变化对 CMP, CDP 和 CTP 色谱分离的影响。结果表明, 降低 pH 值、减小离子对试剂浓度都会使三者的保留时间明显减小, 而且 CMP 和 CDP 不能完全分离, CTP 的峰响应值也会减小。经过试验, 最终确立了“1.2”节中的色谱条件, 色谱图见图 1。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系试验 CMP, CDP, CTP 的标准品经流动相稀释定容, 配制 6 个水平的混合标准品溶液, 按选定的色谱条件进行分析, 以色谱峰面积 Y 对标准品质量浓度 X (mg/L) 进行线性回归。CMP 在 9.42 ~ 94.16 mg/L 内的回

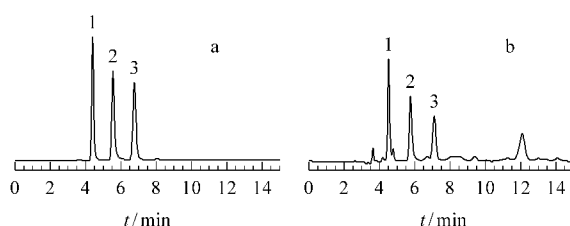


图 1 标准品混合物(a)和样品(b)的色谱图
1. CMP; 2. CDP; 3. CTP.

归方程为 $Y = 23\ 108X + 37\ 808$ ($r = 0.999\ 9$); CDP 在 11.20 ~ 112.00 mg/L 内的回归方程为 $Y = 17\ 668X + 33\ 267$ ($r = 0.999\ 9$); CTP 在 10.33 ~ 103.30 mg/L 内的回归方程为 $Y = 13\ 267X + 13\ 177$ ($r = 0.999\ 4$)。其检出限($S/N = 3$)依次为 35.3, 292.0, 350.4 μg/L。

2.2.2 精密度试验 取混合标准品溶液(CMP, CDP, CTP 的质量浓度分别为 94.16, 112.00, 103.30 mg/L), 连续进样 5 次, CMP, CDP, CTP 峰面积的相对标准偏差(RSD)依次为 0.60%, 0.74%, 0.75%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.3 重现性试验 精密吸取 1 mL 处理后的转化液 6 份, 分别用流动相稀释定容到 50 mL, 过膜进样, 按外标法以峰面积计算含量, CMP, CDP, CTP 含量的 RSD 依次为 0.98%, 0.83%, 1.64%, 表明该法重现性可以满足 CMP, CDP 和 CTP 定量分析的要求。

2.2.4 回收率试验 取处理后的转化液 9 份, 分别加入适量混合标准品溶液, 考察 3 个水平的回收率, 结果 CMP, CDP, CTP 的回收率分别为 99.1% ~ 102.2%, 98.8% ~ 102.2%, 99.2% ~ 102.2%; RSD 分别为 1.09%, 1.32%, 1.07%。

2.2.5 稳定性试验 取样品溶液于室温下放置, 在 6 h 内每隔 1 h 进样测定 1 次。结果表明, 样品溶液至少在 6 h 内稳定, CMP, CDP 和 CTP 峰面积的 RSD 分别为 0.97%, 1.28% 和 0.85%。将混合标准品溶液(浓度同“2.2.2”节) 每日进样 1 次, 连续测定 5 d, 3 d 之后 CTP 就发生了明显降解。因此, 标准品和样品溶液不能放置太久。

参考文献:

- [1] Kitajima N, Watanabe S, Takeda I. Hakkō Kogaku Zasshi, 1970, 48(12): 753
- [2] Daxecker H, Raab M, Cichna M, Markl P, Müller M M. Clin Chim Acta, 2001, 310(1): 81
- [3] Tomiya N, Ailor E, Lawrence S M, Betenbaugh M J, Lee Y C. Anal Biochem, 2001, 293(1): 129

收稿日期 2004-08-03

作者简介: 肖明芳, 女, 硕士研究生, E-mail: mingfang1981@sina.com.

通讯联系人: 应汉杰, 男, 教授, Tel (025) 83587329, E-mail: yinghanjie@njut.edu.cn.

基金项目: 教育部跨世纪优秀人才培养基金和江苏省新世纪学科带头人培养基金资助项目.

固相微萃取-气相色谱法测定醒脑静注射剂中的麝香酮

魏宁漪, 马长华, 段天璇

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

关键词: 固相微萃取(solid phase microextraction); 气相色谱法(gas chromatography); 麝香酮(muscone); 中药制剂(Chinese herba preparation)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2005)05-0565-01

中药制剂醒脑静注射剂中的麝香酮含量较低, 采用水蒸气蒸馏法需要长时间的提取富集才能进行含量测定。本文采用固相微萃取-气相色谱法(SPME-GC)对醒脑静注射剂中的麝香酮含量进行测定, 集样品采集、萃取、浓缩、进样和分析于一体, 完成测定的整个过程仅需十几分钟, 操作简单, 测定结果准确可靠。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

岛津 15A 气相色谱仪, SUPELCO 固相微萃取针, Finnigan 20 mL 顶空取样瓶。醒脑静注射剂样品(注射剂批号: 020322 020502 020503 020504; 大输液批号: 031201, 031203)由无锡山禾药业生产。

1.2 固相微萃取条件

将不加盐的样品液(1.0 mL)密封加热至 80 °C, 预平衡 10 min, 加热萃取 30 min, 使用聚二甲基硅氧烷(PDMS)100 μm 萃取头顶空萃取, 解吸附温度 250 °C, 解吸附时间 0.1 min。

1.3 气相色谱分析条件

色谱条件: 岛津 OV-17 填充柱(3 m × 0.4 cm i. d. 粒度 60 ~ 80 目, 涂布浓度 3%), 载气为氮气, 流速 50 mL/min; 柱温 170 °C, 进样口温度 210 °C, 火焰离子化检测器(FID)温度 210 °C。

1.4 用于进行比较的水蒸气蒸馏法的实验条件

取样品溶液 20 mL, 加入 1 mL 正己烷和 200 mL 蒸馏水, 置于挥发油提取器中提取 10 h, 收集正己烷溶液并定容至 2.0 mL, 加无水硫酸钠脱水, 取正己烷溶液 1 μL 进样。

2 结果与讨论

2.1 线性关系

取适量麝香酮标准品用正己烷溶液配制成 2.048 ~ 204.8 mg/L 系列质量浓度的标准溶液, 取上述溶液各 1 mL, 按照“ 1.2 ”与“ 1.3 ”节所述条件操作。以麝香酮的质量浓度(mg/L)为横坐标 X , 样品峰面积为纵坐标 Y , 得线性回归方程: $Y = 3239.034X - 5159.034$, $r = 0.9995$ 。结果表明, 在麝香酮的质量浓度为 2.048 ~ 204.8 mg/L (即麝香酮含量为 2.048 ~ 204.8 μg)时线性关系良好。

2.2 精密度试验

取某批号醒脑静注射剂 1 mL, 按“ 1.2 ”和“ 1.3 ”节所述条件测定 5 次, 麝香酮的质量浓度为: 40.12, 38.24, 39.50,

38.58, 38.46 mg/L, 平均值为 38.98 mg/L, 相对标准偏差(RSD)为 2.0%。实验结果表明, 本方法的精密度良好。

2.3 回收率试验

精密量取注射液 0.80, 0.60, 0.50, 0.40, 0.20 mL, 分别对应加入质量浓度为 53.42 mg/L 的麝香酮标准溶液 0.20, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80 mL, 密封于顶空瓶中, 按“ 1.2 ”与“ 1.3 ”节所述条件进行加标回收试验。回收率为 95.2% ~ 103.0%, RSD 为 3.0%。

2.4 水蒸气蒸馏法的工作曲线

取适量麝香酮对照品用正己烷溶液配制成 0.6848 g/L 的标准溶液, 分别进样 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μL, 按“ 1.4 ”节所述条件进样测定。以麝香酮质量浓度(g/L)为横坐标 X , 峰面积为纵坐标 Y , 得线性回归方程: $Y = 123604X - 5597.4$, $r = 0.9997$, 线性范围为 0.1370 ~ 0.6848 μg。

2.5 样品的测定

分别用 SPME 法和水蒸气蒸馏法对 5 个批次的醒脑静注射剂分别处理后再进行麝香酮含量的测定, 结果见表 1。

表 1 两种方法测定多批次样品中的麝香酮($n = 2$) mg/L

样品批号	SPME	水蒸气蒸馏法
020502	37.74	37.42
020503	36.81	36.27
020504	41.10	40.76
031201	2.88	2.74
031203	6.00	5.86

取 020322 批次注射剂样品分别采用固相微萃取法和水蒸气蒸馏法处理后各测定 5 次, 计算其中麝香酮的含量及相对标准偏差, 结果见表 2。

表 2 两种方法测定同批次样品中的麝香酮 mg/L

No.	SPME	水蒸气蒸馏法
1	37.51	37.59
2	37.96	37.24
3	38.77	39.57
4	38.92	39.83
5	39.40	35.81
平均	38.52	38.01
RSD/%	2.0	4.4

由表 1、2 可看出, SPME 法的测定值较高且 RSD 值较小, 经 s 检验与 t 检验证明两种方法无显著性差异, 但 SPME 方法操作简捷, 准确度高, 因此可应用于天然产物的测定。

气相色谱-质谱法同时测定氧化型染发剂中的多种染料中间体

朱 英, 杨艳伟, 李 静

(中国疾病预防控制中心 环境与健康相关产品安全所, 北京 100021)

关键词: 气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry); 染料中间体(dye intermediate); 氧化型染发剂(oxidation hair dyes); 化妆品(cosmetics)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2005)05-0566-01

氧化型染发剂是广泛使用的永久性染发剂。因其多具致敏性或致癌性, 因此我国《化妆品卫生规范》对其作了限量使用规定, 并采用高效液相色谱法(HPLC)测定其中 8 种染料中间体^[1], 但在实际应用中由于样品基体复杂, 导致分离效果不理想、定性困难等问题。《欧盟化妆品规程》采用的薄层色谱法能很好地分离和鉴别各种染料组分, 但对其进行精确定量存在一定困难^[2]。我国行业标准推荐的气相色谱法只能测定其中对苯二胺一种组分^[3], 故使用价值不高。本文采用气相色谱-质谱法(GC/MS)同时测定染发剂中的(1)邻苯二胺、(2)对苯二胺、(3)对氨基酚、(4)间氨基酚、(5)对苯二酚、(6)间苯二酚、(7) 2, 5-二氨基甲苯硫酸盐及(8) 4-甲胺苯酚硫酸盐等 8 种氧化型染料中间体, 可满足化妆品监督管理的需求。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与分析条件

岛津 QP5050 气相色谱-质谱联用仪, 配 NIST 谱库。上述 8 种氧化型染料中间体标准品为 Sigma 产品。乙醇(纯度 95%)为分析纯; 水为重蒸水。染发剂样品由生产厂家提供。

色谱条件: DB-225 气相色谱柱(30 m × 0.25 mm i. d. × 0.25 μm); 柱温为程序升温: 140 °C(2 min) $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 230 °C(3 min); 接口温度和进样口温度 230 °C; 载气为高纯氮气, 流速 0.8 mL/min, 进样量 1 μL; 分流比 10:1。

质谱条件: 电离方式为电子轰击(EI); 电子能量 70 eV; 扫描范围 40 ~ 350 u。

1.2 标准溶液的配制及样品的前处理

准确称取上述 8 种染料中间体标准品各约 0.1 g, 除 7[#]和 8[#]染料中间体用重蒸水稀释外, 其余 6 种用乙醇溶液稀释, 均稀释到 100 mL, 作为标准储备液。

取上述标准储备液各 5 mL, 制成含 8 种组分各约 500 mg/L 的混合标准液。用乙醇-水(体积比为 1:1, 下同)溶液将混合标准液逐级稀释为 250, 100, 50 和 25 mg/L 系列质量浓度。此标准系列现用现配。

准确称取染发剂样品约 0.2 g, 用乙醇-水溶液定容至 10 mL, 混匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 备用。

2 结果与讨论

2.1 线性范围及检出限

按选定分析条件进行测定, 染发剂标准溶液的总离子流色谱图见图 1。以标准系列质量浓度 C (mg/L) 为纵坐标、峰面积 A 为横坐标绘制标准曲线, 8 种染料中间体在 25 ~

500 mg/L 范围内均有良好的线性关系。1[#] ~ 8[#]染料中间体的线性方程、相关系数 r 和检出限(以 3 倍信噪比计算) 依次为 $C = 1.17 \times 10^{-5} A - 3.99$, 0.998 9, 4 mg/L; $C = 1.12 \times 10^{-5} A - 5.58$, 0.999 4, 4 mg/L; $C = 9.82 \times 10^{-6} A + 2.41$, 0.999 3, 5 mg/L; $C = 6.35 \times 10^{-6} A - 1.39$, 0.999 1, 3 mg/L; $C = 6.90 \times 10^{-6} A - 1.03$, 0.999 4, 4 mg/L; $C = 7.78 \times 10^{-6} A + 1.48$, 0.998 2, 5 mg/L; $C = 1.80 \times 10^{-5} A - 0.26$, 0.999 4, 4 mg/L; $C = 7.08 \times 10^{-6} A + 3.54$, 0.999 6, 4 mg/L。

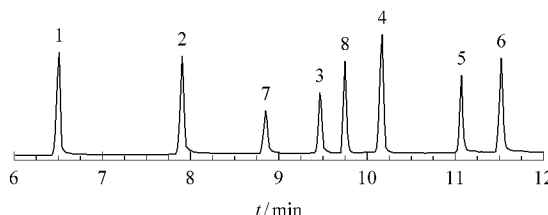


图 1 8 种氧化型染料中间体混合标准溶液(250 mg/L) 的总离子流色谱图

峰序号对应染料中间体序号(见本文第一段所述)。

2.2 精密度和回收率

对某企业提供的染发剂样品连续测定 6 次, 考察方法的精密度。结果表明, 该样品含 2[#], 3[#], 4[#], 6[#] 和 7[#] 中间体, 其含量测定的相对标准偏差(RSD) 依次为 3.26%, 2.60%, 5.90%, 4.75% 和 1.03%, 基本能满足分析要求。

准确称取 3 份上述样品各约 0.2 g, 分别加标为 0, 0.1, 2.0 mg, 重复测定 6 次, 结果表明, 8 种染料中间体的回收率为 83.3% ~ 109.9%。

2.3 样品测定

本实验测定了 6 种染发剂样品, 同时考虑到配方的真实性而用 HPLC 进行核实。结果表明, 其中 3 种样品的测定结果与配方及 HPLC 的结果基本吻合, 误差小于 15%; 另 3 种样品中部分物质与配方不符, 但与 HPLC 结果吻合, 误差小于 8%。经 t 检验, 在 95% 的置信区间内, GC/MS 和 HPLC 之间不存在显著性差异, 说明样品配方存在谎报的可能性。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范. 北京: [出版者不详], 2002. 211
- [2] European Commission. The Rules Governing Cosmetic Products in the European Union. Vol 2. Methods of Analysis. [s. l.]: [s. n.], 1999. 35
- [3] QB/T 1863-93