



戴安公司双三元液相应用文集 (DGLC-AC)

环境、食品饮料、工业产品及药物代谢



戴安中国有限公司

目 录

第一部分 双三元液相色谱-在线固相萃取在环境领域中的应用	2
DGLC-E-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外和荧光检测联用测定自来水中的多环芳烃	3
DGLC-E-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定饮用水和瓶装矿泉水中苯酚	8
DGLC-E-A03 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定水样中痕量微囊藻毒素	16
DGLC-E-A04 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定环境水样中四种痕量邻苯二甲酸酯	21
DGLC-E-A05 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定污水处理厂水样中直链烷基苯磺酸盐 (LAS)	26
DGLC-E-A06 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定污水处理厂水样中直链烷基苯磺酸盐 (LAS)	31
DGLC-E-A07 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定水样中痕量莠去津 (阿特拉津)	35
第二部分 双三元液相色谱-在线固相萃取在食品饮料中的应用	39
DGLC-F-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定食用油中多环芳烃	40
DGLC-F-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定饮料中维生素B12	45
DGLC-F-A03 加速溶剂萃取-在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法快速测定谷物或食品中的黄曲霉毒素 ...	49
DGLC-F-A04 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定白兰地中的多环芳烃	54
DGLC-F-A05 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定牛奶中青霉素G	59
第三部分 双三元液相色谱-在线固相萃取在工业产品中的应用	62
DGLC-I-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定纺织品中直链烷基苯磺酸盐(LAS)	63
DGLC-I-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定聚合物中偶氮二异丁腈(AIBN)	67
第四部分 双三元液相色谱-在线固相萃取在药物代谢中的应用	71
DGLC-M-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-质谱-质谱检测法测定鼠血浆中杀鼠灵	72
DGLC-M-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定人血浆中苯苄醇	75
DGLC-M-A03 在线固相萃取-高效液相色谱-质谱-质谱检测法测定人血浆中非索非那定	79
DGLC-M-A04 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定鼠血浆中氢氯噻嗪和尼群地平	85
DGLC-M-A05 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定血浆中的抗真菌药	91

第一部分

双三元液相色谱-在线固相萃取在环境领域的应用

DGLC-E-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外和荧光检测联用测定自来水中的多环芳烃

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测器；荧光检测器；自来水；多环芳烃

DGLC-E-A01 Hydrocarbons (PAHs) in tap water using online solid-phase extraction followed by HPLC with UV and fluorescence detections

Key words: Online solid-phase; HPLC; UV detector; fluorescence detector; tap water; PAHs

引言

多环芳烃类化合物 (PAHs) 是强烈的致癌物质, 因此它们在食品和环境中的存在受到关注。世界各国的法规都限制了饮用水, 食品添加剂, 化妆品, 工作场所, 以及工厂排出物中多环芳烃类化合物的含量。通常使用高效液相色谱法 (HPLC) 分离测定多环芳烃质类化合物, 但是 HPLC 所使用的直接注射样品的方法检出限太高, 不适用于检测实际样品中和限制标准相接近的低浓度 PAHs, 因此样品需要在检测前预浓缩。美国 EPA 描述用液-液萃取^[1], 液-固萃取(也称为固相萃取)^[2]作为样品预浓缩的方法, 但该方法费时, 费人工, 并且每个样品需用新的固相萃取柱也花费不少。相比之下, 在线固相萃取 (On-line SPE) 结合 HPLC 是一种简单, 快速, 精确的检测方法。

Dionex UltiMate® 3000 智能液相色谱系统的设计则为高级液相色谱分析提供了经济有效、精确的方法, 完成饮用水样品中美国 EPA 优先控制污染物名单所列出的 16 种多环芳烃类化合物在 EPA 550.1 方法所列检测限浓度下的在线固相萃取-HPLC 的分析^[3]。

测试条件

仪器: UltiMate 3000 HPLC 系统, 包括 DPG 3600A 泵 (带脱气机), TCC-3100 柱温箱 (带六通阀), WPS 3000TSL 自动进样器, VWD-3400RS 可变波长检测器, RF2000 荧光剂监测器, 使用变色龙软件控制仪器运行。

分析柱: SUPELCO SILTM LC-PAH (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm)

富集柱: Acclaim PA 2 (3 μm , 4.6 mm \times 50 mm)

柱温: 20 $^{\circ}\text{C}$

进样体积: 2.0 mL

淋洗液组成、流速及淋洗梯度条件: 见表 1。

检测波长: 紫外检测 254 nm, 荧光检测(多种激发和发射波长编程)见表 2。

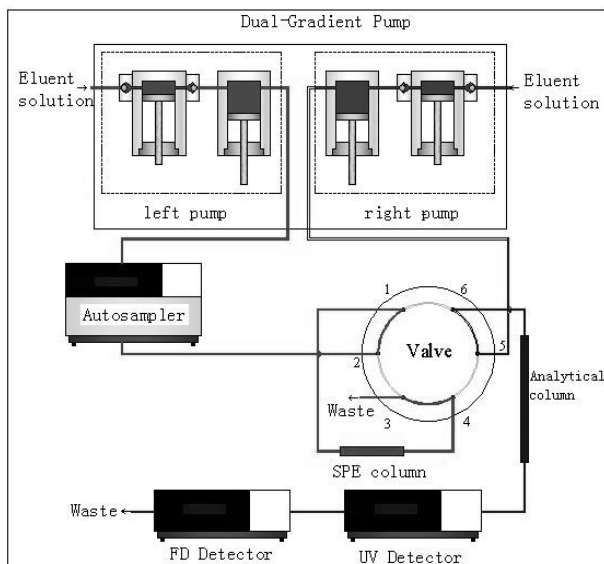


图 1-1 冲洗富集时连接图

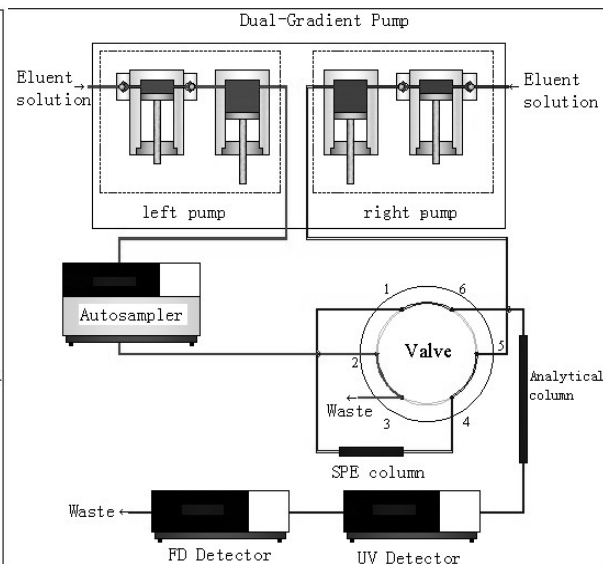


图 1-2 分析时连接图

图 1 仪器连接图

表 1 系统梯度淋洗条件

时间 (min)	左泵: A—水; B—乙腈。				右泵: A—水; B—乙腈。				valve
	流速 (mL/min)	A%	B%	curve	流速 (mL/min)	A%	B%	curve	
0.00	1.00	95	5	—	1.00	60	40	—	1_2
8.00	1.00	95	5	5	1.00	60	40	5	6_1
8.50	0.50	0	100	5	1.00	60	40	5	
10.00	0.50	0	100	5	1.00	60	40	5	
30.00	0.50	0	100	5	1.00	0	100	5	
54.00	0.50	0	100	5	1.00	0	100	5	1_2
54.50	1.00	95	5	5	1.00	60	40	5	
65.00	1.00	95	5	5	1.00	60	40	5	

表 2 荧光检测波长

时间 (min)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	增益
0.00	256	390	1
31.50	275	420	4
34.00	270	385	1
37.00	290	430	1
51.00	305	480	4
65.00	256	390	1

样品前处理

取试样 39.6 mL, 加入 400 μ L 标准储备液, 过 0.45 μ m 滤膜 (Millex[®]-HN), 待测。

结果和讨论

方法的重现性、线性和检出限

在上述色谱条件下进行试验，各PAHs的线性、检出限数据见表3，加标回收率在70%~131%。

表3 PAHs线性、检出限

分析物	线性范围 (µg/kg)	线性系数	检测方法	检出限 ^a (µg/L)
萘	1.00~25.00	0.9950	紫外检测法	1.17
芴烯	2.00~50.00	0.9994	紫外检测法	1.08
芴	1.00~25.00	0.9986	紫外检测法	0.84
芘	0.20~5.0	0.9994	紫外检测法	0.11
菲	0.10~2.50	0.9986	荧光检测法	0.15
蒽	0.10~2.50	0.9969	荧光检测法	0.08
荧蒽	0.20~5.00	0.9943	荧光检测法	0.09
芘	0.10~2.50	0.9945	荧光检测法	0.26
苯并(a)蒽	0.10~2.50	0.9843	荧光检测法	0.08
苯并菲	0.10~2.50	0.9952	荧光检测法	0.15
苯并(b)荧蒽	0.20~5.00	0.9964	荧光检测法	0.017
苯并(k)荧蒽	0.10~2.50	0.9991	荧光检测法	0.01
苯并(a)芘	0.10~2.50	0.9982	荧光检测法	0.022
二苯并(a, h)蒽	0.20~5.00	0.9984	荧光检测法	0.025
苯并(g,h,i)二萘嵌苯	0.20~5.00	0.9989	荧光检测法	0.070
茚并(1,2,3-cd)芘	0.10~2.50	0.9992	荧光检测法	0.059

实际样品分析

在自来水样品中加入美国 EPA 优先控制污染物名单所列出的 16 多环芳烃类化合物标准对照品，连续进样 8 次，保留时间的 RSD 在 0.03%~0.13%之间，色谱峰面积的 RSD 在 1.0%~10.8%之间。

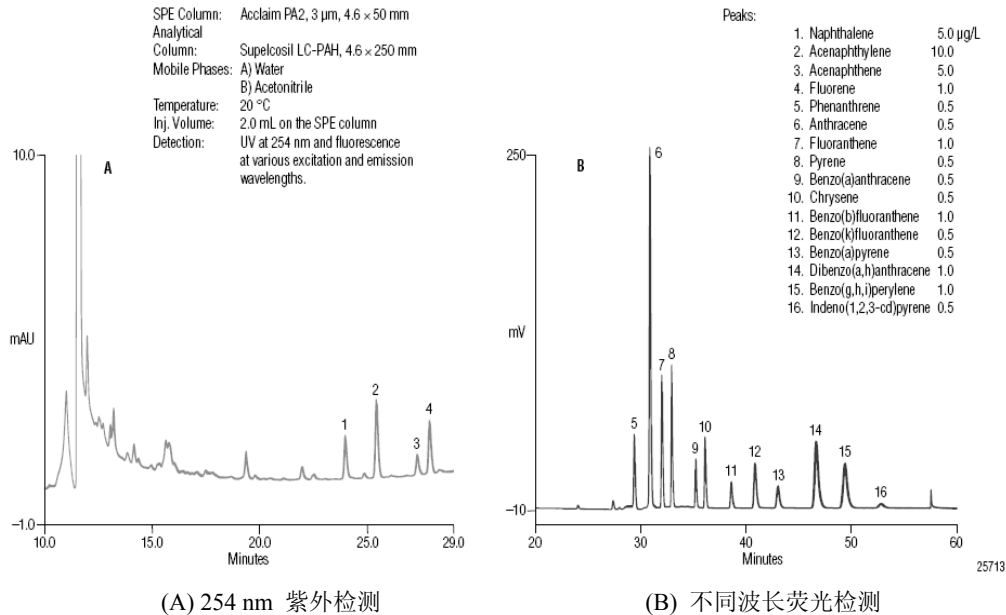


图 2. 加入多环芳烃标样的自来水的色谱图 (8 次连续进样的重叠图)

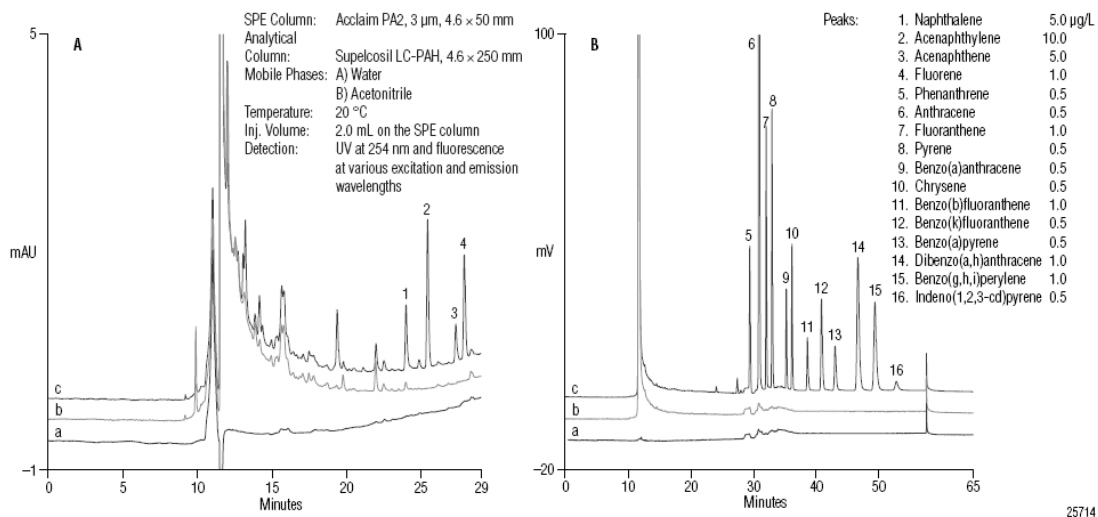


图 3. 样品色谱图

注意事项

方法的干扰来自溶剂、试剂中的杂质、玻璃器皿及其他的样品处理过程, 所以高灵敏度实验必须使用高纯试剂, 实验所需器皿必须仔细清洗干净。

在程序中应加入清洗 2.5 mL 样品环路, 以减少残留。具体程序如下:

20.000 WashSampleLoop Volumn=2500.000

22.000 Wash

25.000 InjectValveToInject

在分析大量样品的时候, 建议在进样器和转换阀之间加一个在线过滤器 (0.2 μ m), 以保护固相萃取柱和分析柱。

结论

- (1) 在线SPE (OnLine SPE) 方法对自来水中多环芳烃的测定可完全满足EPA方法550.1的要求。
- (2) 该方法简单可靠、重现性高而且线性好, 节省分析时间, 比离线固相萃取节省费用。
- (3) 戴安UltiMate 3000系列双梯度泵配合变色龙软件可以简单、方便地实现OnLine SPE的所有要求。

参考文献

- [1] Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection, Method 550, U.S. EPA.
- [2] Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection, Method 550.1, U.S. EPA.
- [3] Dionex Corporation. Determination of Phenols in Drinking and Bottled Mineral Waters Using Online Solid-Phase Extraction Followed by HPLC with UV Detection, Application Note 191, LPN 1949-02.Sunnyvale, CA, 2008.

DGLC-E-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法 测定饮用水和瓶装矿泉水中苯酚

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；紫外检测器；饮用水；瓶装矿泉水；苯酚

DGLC-E-A02 Determination of phenols in drinking and bottled mineral water by HPLC-UV detection with online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV detector; drinking; bottled mineral water; phenol

引言

苯酚类化合物是一种水体污染物，欧盟规定饮用水中每种苯酚类化合物的限量为 $0.5 \mu\text{g/L}^{[1]}$ ，日本厚生劳动省 (Ministry of Health, Labour and Welfare) 规定饮用水中苯酚类化合物的含量不得高于 $5 \mu\text{g/L}^{[2]}$ ，美国 EPA 规定五氯苯酚及优先污染物列表^[3]中的 11 种苯酚类化合物（11 种苯酚类化合物结构式见图 1）限量为 $1 \mu\text{g/L}^{[4]}$ ，采用 GC 法进行检测。常见的检测方法有 GC^[5,6]，GC-MS^[7-9]，因样品中一些物质对

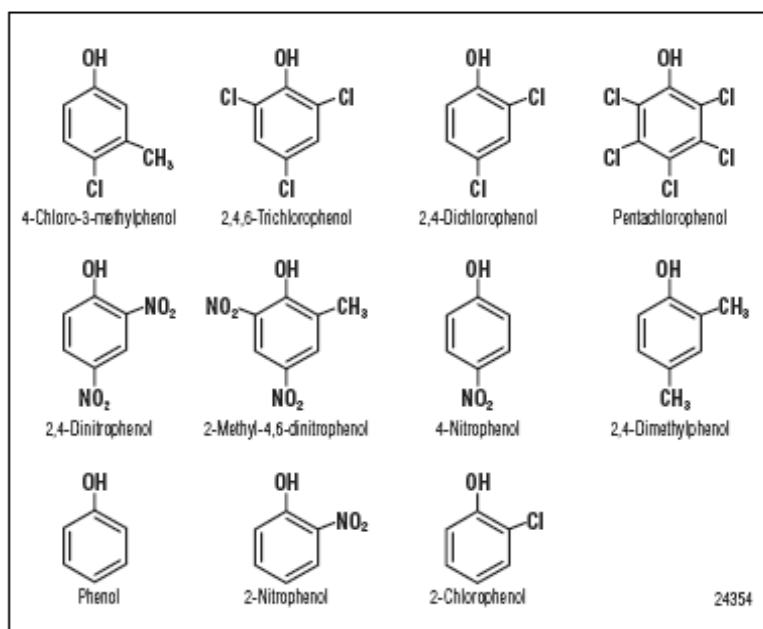


图 1 美国 EPA 公布的优先污染物列表中的 11 种苯酚类化合物结构图

气相色谱柱的损害较大，故液相的应用方法渐渐增多。

因饮用水中苯酚类化合物的含量很低，直接进样的液相色谱法无法满足要求，而传统的离线样品富集操作繁琐，本方法利用双三元液相系统，实现在线富集，大大加快了试验过程，操作简单，灵敏度高，试验成本低。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器；大体积进样器。连接图见图 2。

分析柱：Acclaim[®] PA ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$)；

富集柱: IonPac® NG1 Guard (5 μm, 4.0 mm×35 mm);
 柱温: 40 °C;
 检测波长: 280 nm;
 进样量: 10 mL;
 淋洗液组成、流速及淋洗梯度条件: 见表 1。

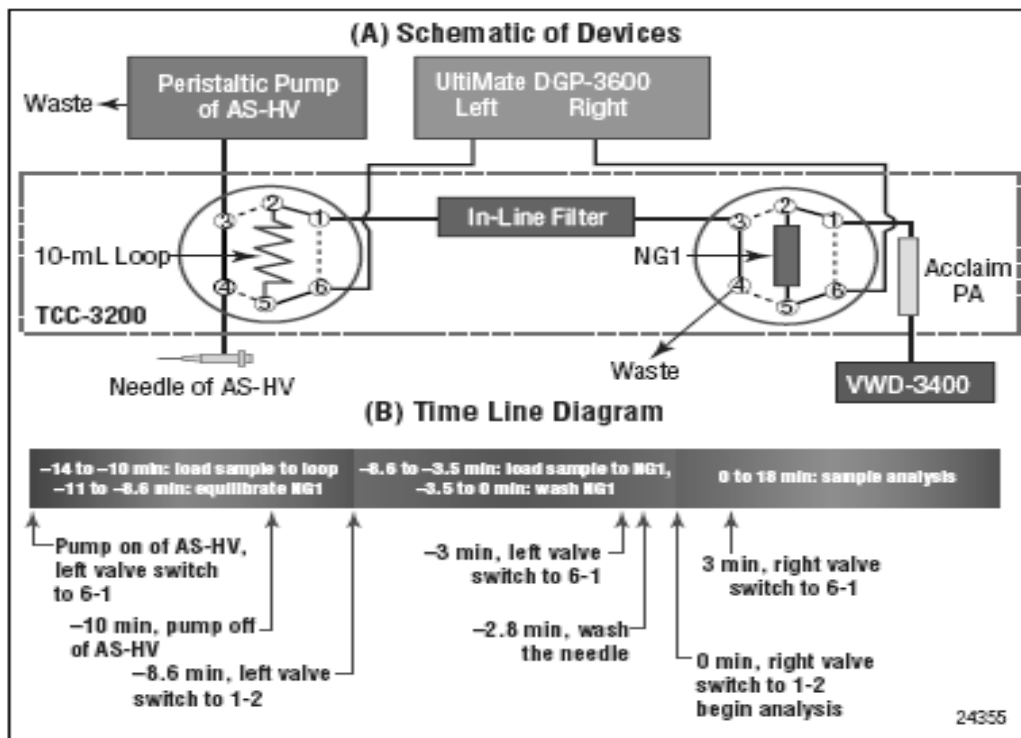


图2 仪器连接图

表 1 系统梯度淋洗条件

左泵程序: A=0.2 mmol/L MSA 溶液, B=ACN					右泵程序: A=25 mmol/L HAC 溶液/25 mmol/L NH ₄ Ac 溶液 (1.45:1; v/v), B=ACN			
时间(min)	流速 (mL/min)	A%	B%	备注	流速 (mL/min)	A%	B%	备注
-14.0	1.0	0	100	冲洗 SPE 柱	0.2	0	100	冲洗分析柱
-13.0					0.2	75	25	
-11.5	1.0	0	100					
-11.0	1.0	99	1	平衡 SPE 柱				
-8.6	2.0	99	1	载入样品				
-5.0					1.0	75	25	平衡分析柱
-3.5	2.0	99	1					
-3.0	1.0	85	15	冲洗 SPE 柱				
0.0					1.0	75	25	进样
0.2	0	0	0					
3.5	0.2	0	100					
17.5					1.0	30	70	
18.0					1.0	0	100	

样品前处理

将样品通过0.45 μm 滤膜过滤，取495 mL滤液，加入5 mL甲醇和56 μL MSA（最终试液中MSA的浓度约为2 mmol/L），待测。

结果和讨论

流动相种类及浓度对酚保留时间的影响

许多酸溶液^[10-12]可以作为流动相来分离酚类化合物；本试验对分析色谱条件中的 A 通道溶液进行了优化，分别将 A 通道溶液换成 0.1 mM 甲基磺酸溶液（图 3A）、0.1% 三氟乙酸溶液（图 3B）、0.1%乙酸溶液（图 3C）及 25 mM 乙酸-乙酸钠（1:1, v/v）缓冲液（图 3D），酚类分离情况见图 3。

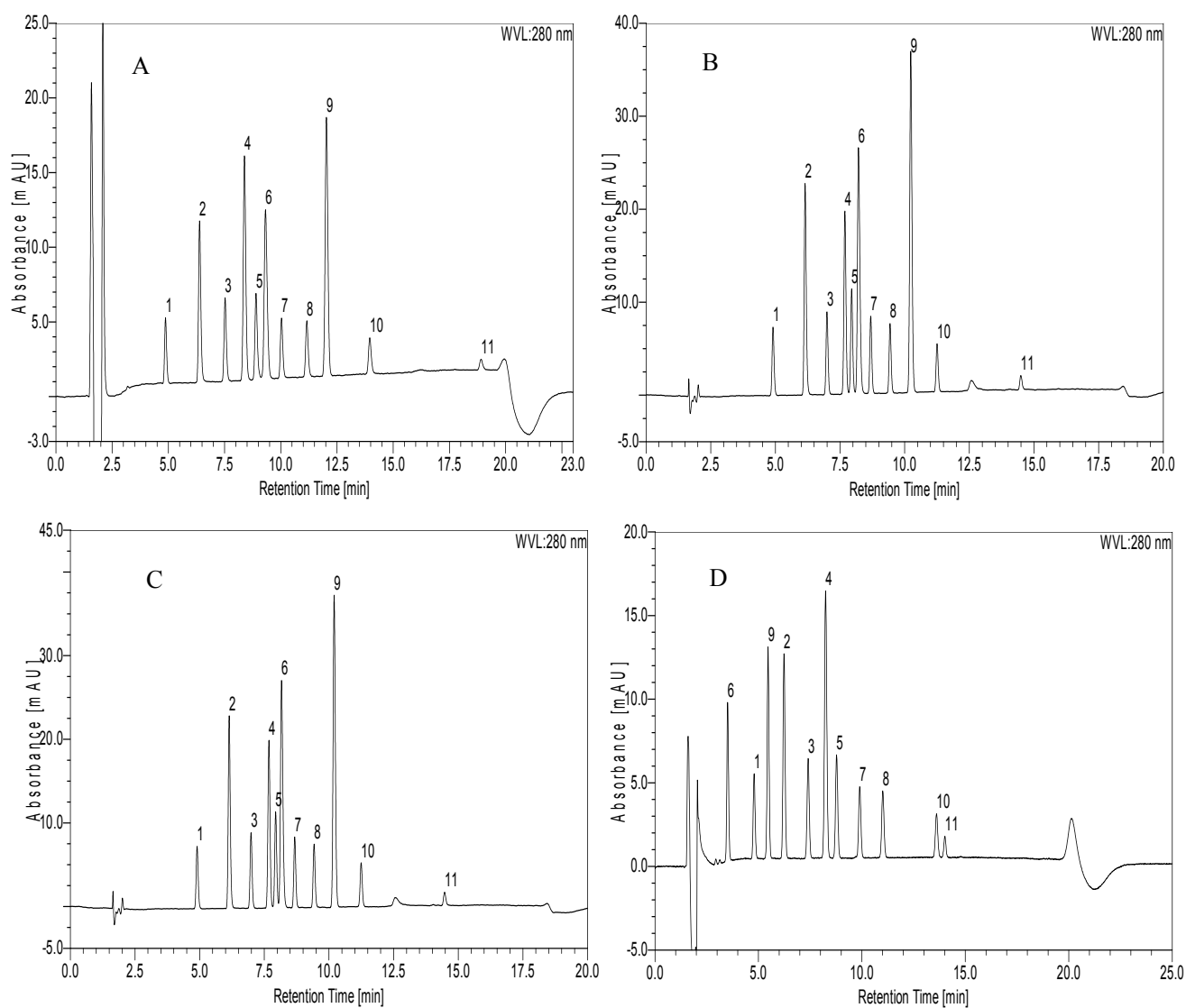


图 3 酚类化合物（浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ ）的色谱图

色谱峰：(1). Phenol; (2). 4-Nitrophenol; (3). 2-Chlorophenol; (4). 2-Nitrophenol; (5). 2,4-Dimethylphenol; (6). 2,4-Dinitrophenol; (7). 4-Chloro-3-methylphenol; (8). 2,4-Dichlorophenol; (9). 4,6-Dinitro-2-methylphenol; (10). 2,4,6-Trichlorophenol; (11). Pentachlorophenol。

试验表明, 甲基磺酸溶液、三氟乙酸溶液、乙酸溶液对酚类分离的选择性基本一样, 而乙酸-乙酸铵缓冲液则不同。我们研究了流动相中酸浓度变化对各种酚类保留值的影响。试验表明, 除了某些酚外, 大部分组分的保留时间随酸浓度的变化都不明显。当使用 MSA 溶液时, 浓度从 0.1 mmol/L 提高到 3 mmol/L 时, 2,4-dinitrophenol 的保留时间逐渐缩短, 其色谱峰的位置从 2,4-dimethylphenol 之后提前到 2-nitrophenol 之前。当使用 HAc 溶液时, 浓度从 0.03% 至 2.0%, 各个酚的保留时间移动倾向类似于 MSA 溶液。用 TFA 代替 HAc 结果一样。而当使用 25 mM 的 HAc-NH₄Ac 缓冲体系时, 不同的 pH 值 (酸碱比例不同) 使 2,4-dinitrophenol 及 4,6-dinitro-2-methylphenol 的保留时间变化远大于酸溶液。同时 2,4,6-trichlorophenol 及 pentachlorophenol 也有很大的变化。

流动相的选择

不管使用 HAc、MSA 还是 TFA 溶液, 美国 EPA 604 中所指定的所有 11 个酚都能被很好的分离, 酸的浓度更低时分离会更好。但由于酸的浓度很低时其溶液易受环境中二氧化碳的影响导致酸浓度变化, 而某些酚对酸的浓度变化又比较敏感; 从而进一步导致了方法的重现性变差。因此我们选用 HAc-NH₄Ac 缓冲盐体系作为流动相, 在浓度为 25 mM, 并且酸与碱体积之比为: 1.45 比 1 时, 有更好的分离度及方法重现性。

优化在线 SPE 方法

我们试验了不同浓度的酸 (HAc 或 MSA) 与不同浓度甲醇或乙腈混合, 作为 SPE 的洗脱溶液洗提杂质并保留、浓缩酚类, 试验表明, 使用酸/乙腈溶液时的效率更高, 所以我们使用 0.2 mmol/L MSA/乙腈为提脱液以降低背景。

线性、检出限

在上述色谱条件下, 按 EPA Method 604 中的线性浓度进行试验。线性、检出限数据见表 2。

表 2 11 中苯酚类化合物线性、检出限

序号	分析物	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	线性系数	检出限 ^a ($\mu\text{g/L}$)	EPA 604 检出限 ($\mu\text{g/L}$)	
					GC-FID	GC-ECD
1	2,4-二硝基苯酚	0.5~20	0.9998	0.46	13.0	0.63
2	苯酚	0.5~20	0.9984	0.87	0.14	2.2
3	4,6-二硝基-2-甲基苯酚	0.5~20	0.9998	0.40	16.0	未检出
4	4-硝基苯酚	0.5~20	0.9997	0.42	2.8	0.70
5	2-氯苯酚	0.5~20	0.9996	0.41	0.31	0.58
6	2-硝基苯酚	0.5~20	0.9992	0.41	0.45	0.77
7	2,4-二甲基苯酚	0.5~20	0.9999	0.30	0.32	0.68
8	4-氯-3-甲基苯酚	0.5~20	0.9998	0.31	0.36	1.8

9	2,4-二氯苯酚	0.5~20	0.9998	0.08	0.39	未检出
10	2,4,6-三氯苯酚	0.5~20	0.9999	0.20	0.64	0.58
11	五氯苯酚	0.5~20	0.9965	0.93	7.4	0.59

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

实际样品的分析

选取瓶装矿泉水、饮用蒸馏水和自来水进行加标回收试验，试验数据见表 3~6，色谱图见图 4~7。

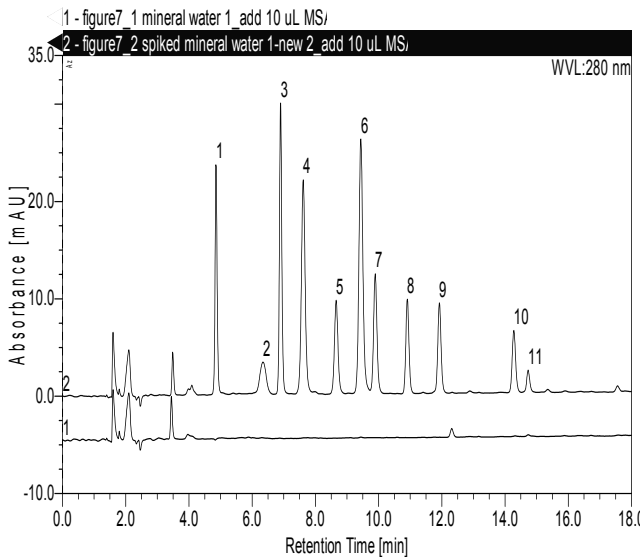


图 4 瓶装矿泉水 1#加标叠加图

(1, 瓶装矿泉水 1#; 2, 瓶装矿泉水 1#加标)

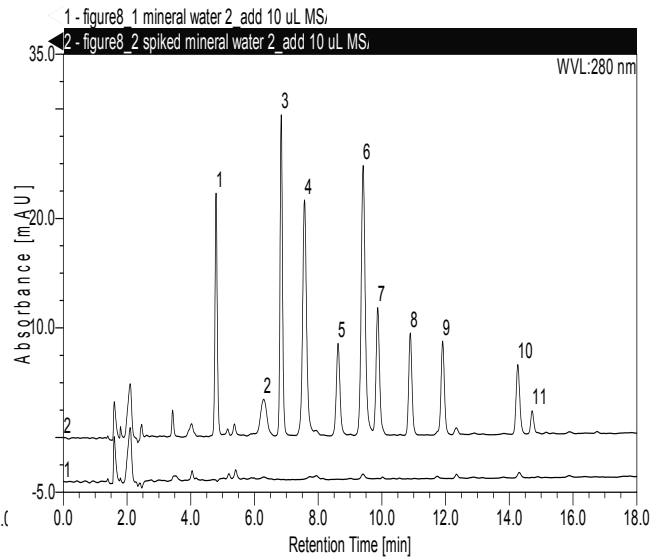


图 5 瓶装矿泉水 2#加标叠加图

(1, 瓶装矿泉水 2#; 2, 瓶装矿泉水 2#加标)

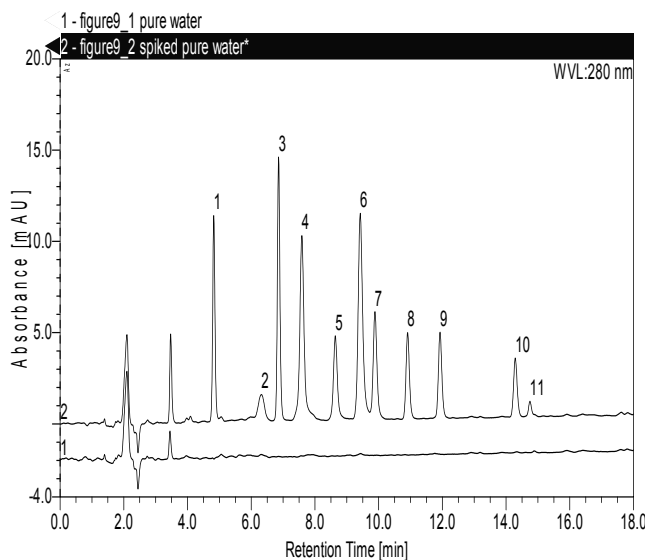


图 6 饮用蒸馏水样品加标叠加图

(1, 饮用蒸馏水样品; 2, 饮用蒸馏水样品加标)

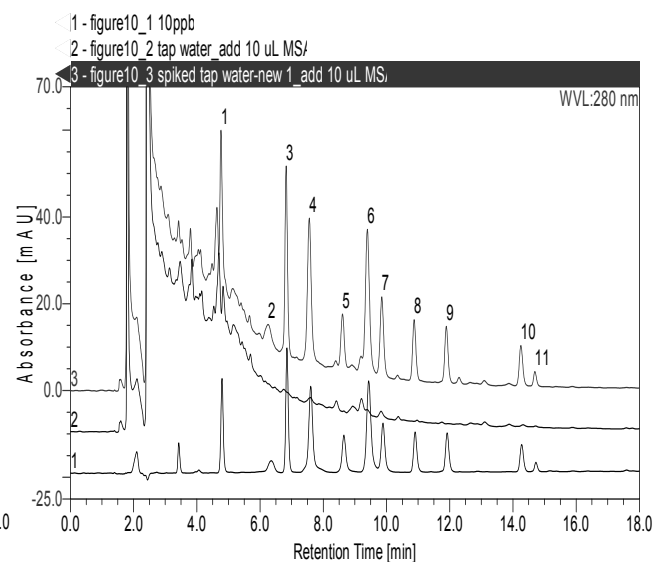


图 7 自来水加标叠加图

(1, 标准图谱; 2, 自来水样; 3, 自来水加标)

表 3. 瓶装矿泉水 1#加标回收试验

峰序号	化合物名称	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准加入值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
1	2,4-二硝基苯酚	未检出	10	9.44	94
2	苯酚	未检出	10	11.9	119
3	4,6-二硝基-2-甲基苯酚	未检出	10	9.56	95.6
4	4-硝基苯酚	未检出	10	10.2	102
5	2-氯苯酚	未检出	10	10.4	104
6	2-硝基苯酚	未检出	10	11.9	119
7	2,4-二甲基苯酚	未检出	10	10.5	105
8	4-氯-3-甲基苯酚	未检出	10	9.56	95.6
9	2,4-二氯苯酚	未检出	10	9.75	97.5
10	2,4,6-三氯苯酚	未检出	10	10.1	101
11	五氯苯酚	0.73	10	9.67	96.7

注：样品进样 2 次，取平均值；加标样品进样 4 次，取平均值。

表 4. 瓶装矿泉水 2#加标回收试验

峰序号	化合物名称	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准加入值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
1	2,4-二硝基苯酚	未检出	10	9.57	95.7
2	苯酚	0.37	10	10.0	100
3	4,6-二硝基-2-甲基苯酚	未检出	10	9.57	95.7
4	4-硝基苯酚	未检出	10	10.0	100
5	2-氯苯酚	未检出	10	9.02	90.2
6	2-硝基苯酚	未检出	10	10.9	109
7	2,4-二甲基苯酚	未检出	10	9.97	99.7
8	4-氯-3-甲基苯酚	未检出	10	9.40	94.0
9	2,4-二氯苯酚	未检出	10	9.05	90.5
10	2,4,6-三氯苯酚	0.75	10	9.55	95.5
11	五氯苯酚	未检出	10	9.60	96.0

注：样品进样 2 次，取平均值；加标样品进样 5 次，取平均值。

表 5. 饮用蒸馏水加标回收试验

峰序号	化合物名称	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准加入值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
1	2,4-二硝基苯酚	未检出	5	4.95	99.0
2	苯酚	未检出	5	4.84	96.8
3	4,6-二硝基-2-甲基苯酚	未检出	5	5.02	100
4	4-硝基苯酚	未检出	5	5.09	102
5	2-氯苯酚	未检出	5	5.22	104
6	2-硝基苯酚	未检出	5	5.30	106
7	2,4-二甲基苯酚	未检出	5	5.19	104

8	4-氯-3-甲基苯酚	未检出	5	5.07	101
9	2,4-二氯苯酚	未检出	5	4.98	99.6
10	2,4,6-三氯苯酚	未检出	5	5.20	104
11	五氯苯酚	未检出	5	4.99	99.8

注：样品进样5次，取平均值；加标样品进样4次，取平均值。

表 6. 自来水水加标回收试验

峰序号	化合物名称	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准加入值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
1	2,4-二硝基苯酚	2.11	15	10.4	70.0
2	苯酚	0.41	15	14.2	94.7
3	4,6-二硝基-2-甲基苯酚	未检出	15	15.1	101
4	4-硝基苯酚	0.80	15	15.2	101
5	2-氯苯酚	低于检出限	15	11.50	76.7
6	2-硝基苯酚	未检出	15	14.0	93.3
7	2,4-二甲基苯酚	1.63	15	15.0	100
8	4-氯-3-甲基苯酚	低于检出限	15	14.5	96.4
9	2,4-二氯苯酚	未检出	15	14.1	94.0
10	2,4,6-三氯苯酚	0.65	15	14.6	97.0
11	五氯苯酚	1.13	15	14.2	94.5

注：样自进样2次，取平均值；加标样品进样5次，取平均值。

使用双梯度泵的其中一个泵作为大体积进样器

如果所需分析的样品量不多，可以不使用自动进样器。而用双梯度泵中的一个泵代替 AS-HV。该泵的 A 及 B 可放置溶剂，而 C 可以放置样品。根据泵的流量及时间确定进样量。

注意事项

方法的干扰来自溶剂、试剂中的杂质、玻璃器皿及其他样品的处理过程，所以高灵敏度实验必须使用高纯试剂，实验所需器皿必须仔细清洗干净。

大体积进样时，样品的 pH 值需用 MSA 调整至 3.5 以下。

AS-HV 自动进样器的管路及定量环与高有机含量的溶剂不兼容，因此必须用不锈钢或 PEEK 材料对相应的部件或管路进行改造。

结论

- (1) 在线SPE (OnLine SPE) 方法对环境中酚的测定可完全满足EPA方法604的要求。
- (2) 该方法简单可靠、重现性高而且线性好，灵敏度达到GC的水平，而且适应性更好。
- (3) 戴安UltiMate 3000系列双梯度泵配合变色龙软件可以简单、方便地实现OnLine SPE的所有要求。

参考文献

- [1]. Drinking Water Directive 80/778/EEC, Commission of the European Communities, 1980.

- [2]. Ministry Ordinance No. 15, Ministry of Health and Welfare, Tokyo, Japan, 2000.
- [3]. U.S. Environmental Protection Agency. Current National Recommended Water Quality Criteria. <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/wqcriteria.html> (accessed Aug 23,2007)
- [4]. U.S.EPA Title 40, Chapter 1, Part 141, National Primary Drinking Water Regulation.
- [5]. Fiamegos, Y.C.; Nanos, C.G.; Pilidis, G.A.; Stalikas, C.D. Phase-Transfer Catalytic Determination of Phenols as Methylated Derivatives by Gas Chromatography with Flame Ionization and Mass- Selective Detection. *J. Chromatogr., A* 2003, 983, 215-223.
- [6]. U.S. Environmental Protection Agency. 40 CFR 136: Appendix A to Part 136, Methods for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater, Method 604—Phenols. Cincinnati, OH,1984
- [7]. Peng, X.; Wang, Z.; Yang, C.; Chen, F.; Mai, B.Simultaneous Determination of Endocrine-Disrupting Phenols and Steroid Estrogens in Sediment by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.,A* 2006, 1116, 51-56.
- [8]. Montero, L.; Conradi, S.; Weiss, H.; Popp, P.Determination of Phenols in Lake and Ground Water Samples by Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry.*J. Chromatogr., A* 2005, 1071, 163-169.
- [9]. Saraji, M.; Bakhshi, M. Determination of Phenols in Water Samples by Single-Drop Microextraction Followed by In-Syringe Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrometric Detection. *J.Chromatogr., A* 2005, 1098, 30-36.
- [10]. Application Update 119, Phenols, Dionex Corporation, 2000
- [11]. Acclaim Column Brochure, Dionex Corporation, p34, 2006
- [12]. D. Xuan, Y. Li, *China Public Health*, 18 (2002) 1102

DGLC-E-A03 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定水样中痕量微囊藻毒素

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；紫外检测器；水；微囊藻毒素

DGLC-E-A03 Determination of trace microcystins in water by HPLC-UV detection with online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV detector; water; microcystins

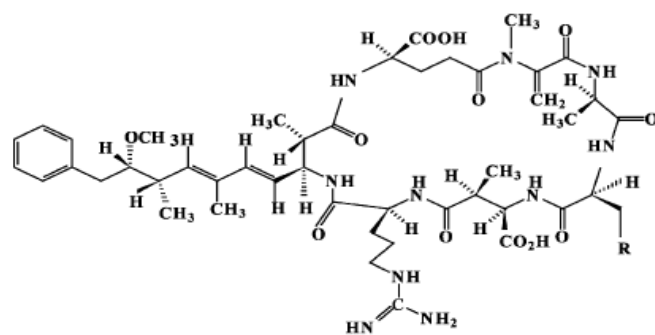
引言

微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 是水体中有害蓝藻水华释放出来的一类具有强致癌作用的肝毒素, 迄今已发现 60 多种异构体。已知存在的最普遍、含量相对较多、毒性较大的主要是 MC-LR, MC-RR, MC-YR 三种 (见图 1)。微囊藻毒素有很高的耐热性, 加热煮沸都不能将毒素破坏, 也不能将其去除。自来水处理工艺的混凝沉淀、过滤、加氯也不能将其去除。目前, 我国《生活饮用水卫生标准》(GB/T 5749-2006)^[1] 规定了饮用水中的 MC-LR 含量不得高于 1 μg/L。世界卫生组织(WHO)在其推荐的饮用水标准指导(第二版, 1998)^[2] 中增加了微囊藻毒素等指标, 要求 MC-LR 含量不得高于 1 μg/L。

国家标准 GB/T 20466-2006《水中微囊藻毒素的测定》^[3] 中的高效液相色谱法采用离线样品处理, 将过滤后的 1 L 水样通过固相萃取柱进行富集, 经洗脱、浓缩后测定, 检出限为 0.1 μg/L。该方法操作繁琐, 处理试样量大, 给实验带来不便。本方法利用双三元液相系统, 实现在线富集, 10 mL 进样量即可达到检出限 0.1 μg/L 的要求, 操作简单, 灵敏度高, 试验成本低。

测试条件

仪器: Ultimate DGP 3600系列, 包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵; 配有2500 μL



- | | |
|-------|---|
| MC-LR | R=CH(CH ₃) ₂ |
| MC-RR | R=CH ₂ CH ₂ NHC(NH ₂)NH |
| MC-YR | R=C ₆ H ₄ OH |

图 1 微囊藻毒素结构图

半制备进样组件的自动进样器；带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图2。

分析柱：Acclaim® PAII (3 μm, 4.6 mm×150 mm)

富集柱：Acclaim® PAII Guard Cartridge(5 μm, 4.3 mm×10 mm)

柱温：30 °C

检测波长：238 nm

进样量：10 mL

淋洗液组成及流速：见表 1

梯度淋洗：见表 2

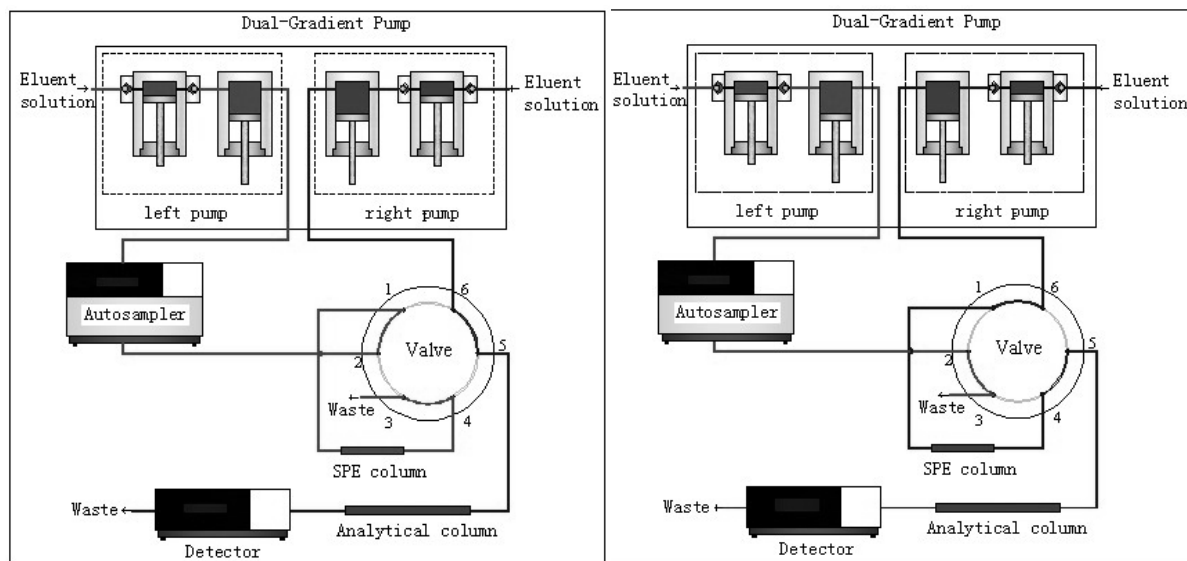


图2 仪器连接图

表 1 淋洗液组成及流速

	富集泵 (left pump)	分析泵(right pump)
流动相 A	20 mM KH ₂ PO ₄ 缓冲溶液 (用 50% H ₃ PO ₄ 调 pH 至 2.5)	
流动相 B	MeOH	ACN
流速	2.0 mL/min	1.0 mL/min

表 2 梯度淋洗条件

时间 (min)	富集泵 (B%)	时间 (min)	分析泵 (B%)	时间 (min)	阀
0	20	0	20	0	1-2
4	20	7	20	7	6-1
10	50	15	50	11	1-2
11	70	17	50	—	—
16	70	18	70	—	—

样品前处理方法

将样品通过0.45 μm滤膜过滤，置于10 mL样品瓶中，待测。

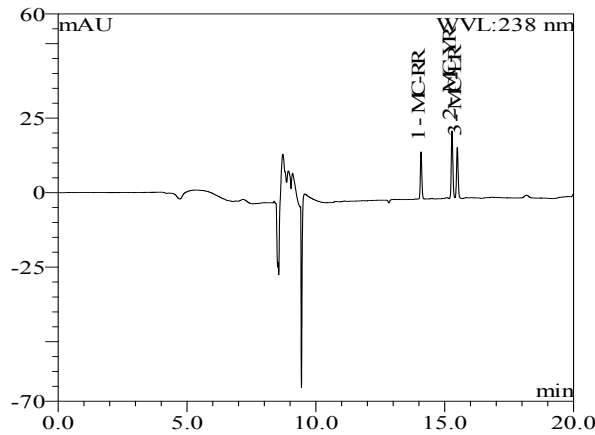


图3 标准溶液色谱图（各离子浓度均为 5 $\mu\text{g/L}$ ）

结果和讨论

用户自定义进样程序 (User Defined Program, UDP)

变色龙软件具有强大的用户自定义功能，其 UDP 进样功能可实现不同样品瓶内溶液混合、扩展进样体积等操作。本实验使用的进样组件为半制备进样组件，一次最大进样量可达 2.5 mL。但由于所测目标物在样品中含量极低，需更大体积进样量才能达到检测要求。通过 UDP 功能，可实现连续多次进样以达到大体积富集的效果。

上样流动相选择

试验对比了用纯水和 20 mM KH_2PO_4 (pH 2.5) 缓冲溶液作为富集泵的流动相 A 的区别。当用纯水时，按照上述色谱条件进行分析，发现自来水样品加标测定时，MC-YR 和 MC-LR 峰丢失，加标样品中只有 MC-RR 峰且回收率良好。原因可能是自来水样品中的组分干扰了富集柱对 MC-YR 和 MC-LR 的保留，通过更换不同填料富集柱，减少进样体积，增加进样时对富集柱的洗脱时间和洗脱强度均无改善。最终，将富集泵的流动相 A 更换为 20 mM KH_2PO_4 (pH 2.5) 缓冲溶液，解决了 MC-YR 和 MC-LR 峰丢失现象。

线性、检出限

按上述色谱条件，以峰面积进行评价，本测定方法在 0.5 $\mu\text{g/L}$ ~10 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，三种微囊藻毒素的线性相关系数 $R > 0.9996$ ，检出限 ($S/N = 3$) 为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

实际样品分析

选取自来水和湖水进行加标回收试验，扣除空白，收试验数据见表 3~5，色谱图见图 4~5。从试验数据可以看出，MC-RR 的加标回收率在 100%~112% 之间；MC-YR 的加标回收率在 100%~107% 之间；MC-LR 的加标回收率在 92%~102% 之间，方法准确性良好。

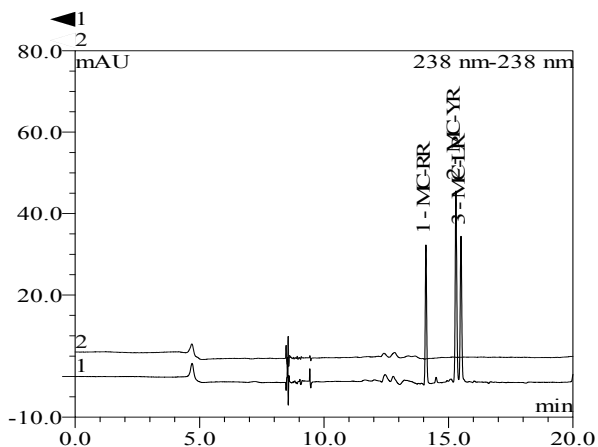


图4 自来水加标叠加图

(1, 自来水加标扣空白; 2, 自来水样)

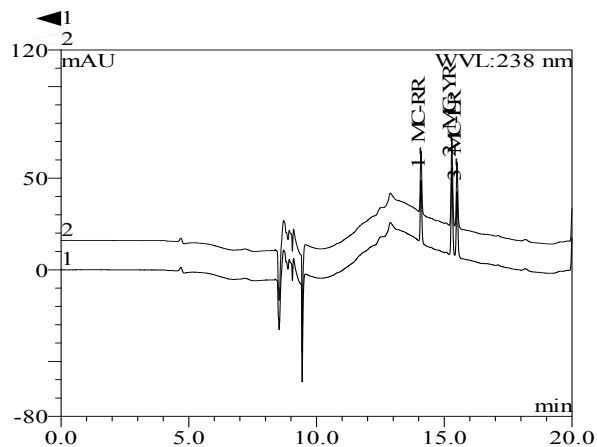


图5 湖水加标叠加图

(1, 湖水加标; 2, 湖水样)

表3 MC-RR 加标回收试验

样品名	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准添加值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 (%)
自来水	未检出	1	1.048	104.8
	未检出	10	10.36	103.6
湖水	未检出	1	1.116	111.6
	未检出	10	10.38	103.8

表4 MC-YR 加标回收试验

样品名	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准添加值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 (%)
自来水	未检出	1	1.061	106.1
	未检出	10	10.06	100.6
湖水	未检出	1	1.011	101.0
	未检出	10	10.21	102.1

表5 MC-LR 加标回收试验

样品名	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准添加值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 (%)
自来水	未检出	1	0.923	92.3
	未检出	10	10.04	100.4
湖水	未检出	1	0.973	97.3
	未检出	10	10.13	101.3

结论

该方法测定时间短，回收率高，样品前处理简单，所需样品量少，可满足现行相关法规对水体中3种常见痕量微囊藻毒素的同时检测。

参考文献

- [1]. 中华人民共和国国家标准，GB/T 5749-2006 《生活饮用水卫生标准》
- [2]. Guidelines for Drinking Water Quality , 2nd Ed
- [3]. 中华人民共和国国家标准，GB/T 20466-2006 《水中微囊藻毒素的测定》

DGLC-E-A04 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定环境水

样中四种痕量邻苯二甲酸酯

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；紫外检测器；水；痕量；邻苯二甲酸酯

DGLC-E-A04 Determination of four trace phthalate esters in environmental water by HPLC-UV detection with online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV detector; environmental water; trace; phthalate ester

引言

邻苯二甲酸酯是一种增塑剂，被广泛应用于化工、医药、食品等各个领域。塑料及其制品中的邻苯二甲酸酯在一定的环境下，迁移至与之接触的环境或食品中，最终通过呼吸道或食物链进入人体，造成内分泌紊乱。此外，男性睾丸癌和生殖器官发育不良也与这种化学物质有关。我国生活饮用水卫生标准 GB 5749-2006《生活饮用水卫生标准》^[1]中规定水质中 DEHP 的含量不得高于 8 μg/L。

目前对于邻苯二甲酸酯的测定有气相色谱-质谱联用法和液相色谱法，如 GB/T 22048-2008《玩具及儿童用品 聚氯乙烯塑料中邻苯二甲酸酯增塑剂的测定》^[2]、GB/T 21911-2008《食品中邻苯二甲酸酯的测定》^[3]和 HJ/T 72-2001《水质 邻苯二甲酸二甲(二丁、二辛)酯的测定 液相色谱法》^[4]，《水和废水监测分析方法(第四版)》^[5]中也分别介绍了液相色谱法和 GC-MS 法检测水体中邻苯二甲酸酯。食品及环境水样中的邻苯二甲酸酯的含量很少，传统的样品处理操作繁琐，有机溶剂消耗大，处理样品量大，给试验带来不便。本方法利用双三元液相系统，实现在线富集，各项指标符合国标要求，操作简单，灵敏度高，试验成本低。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；自动进样器；

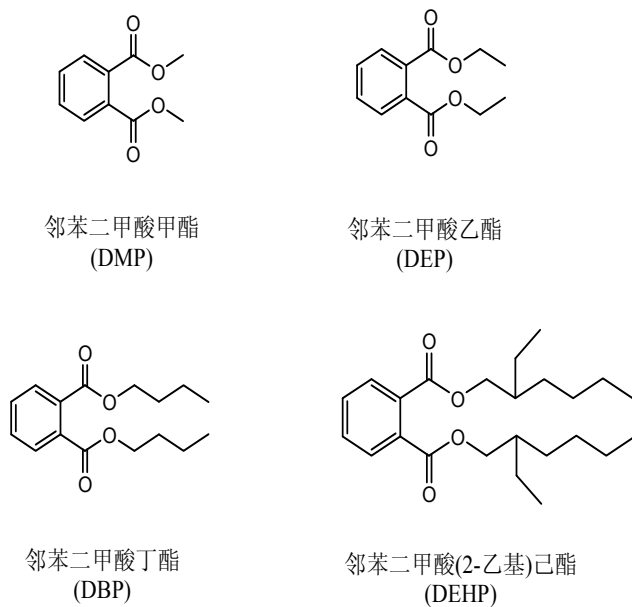


图1 四种邻苯二甲酸酯结构图

带有一个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图2。

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

富集柱：IonPac® NG1 Guard (10 μm, 4.0 mm×35 mm)

柱温：40 °C

检测波长：224 nm

进样量：15 mL

淋洗液组成及流速：见表 1

梯度淋洗：见表 2

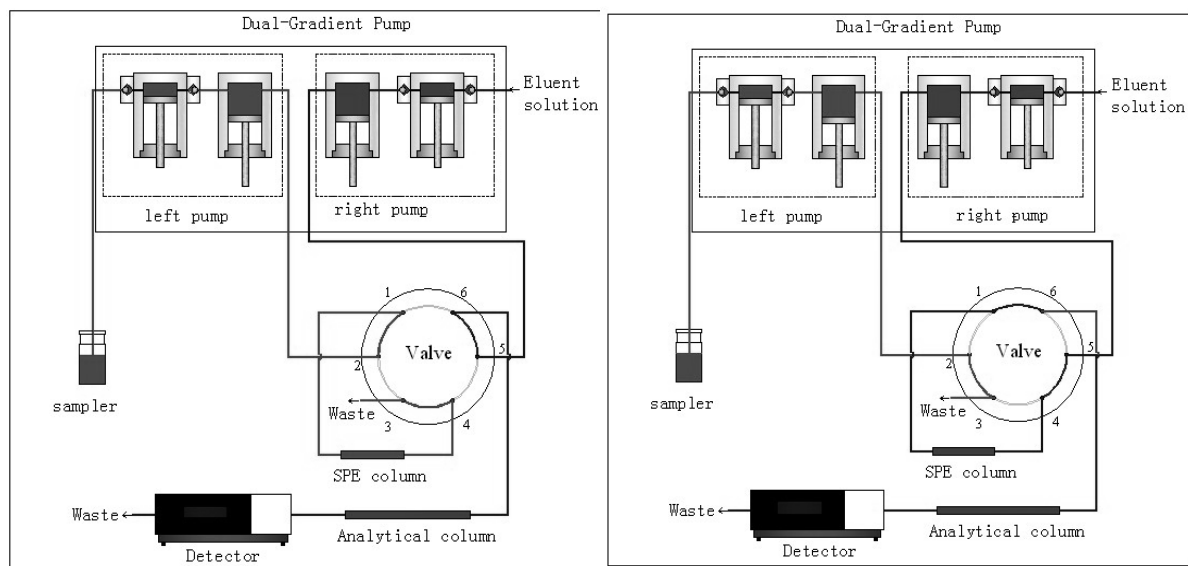


图2 仪器连接图

表 1 淋洗液组成及流速

富集泵(left pump)	分析泵 (right pump)	
用于上样, 流速 1.0 mL/min	流动相 A	H ₂ O
	流动相 B	ACN
	流速	1.0 mL/min

表 2 梯度淋洗条件

时间 (min)	分析泵 (B%)	阀	备注
-15	30	1-2	富集柱富集, 分析柱平衡
0	30	6-1	富集结束, 触发阀切换
1.0	30	6-1	开始信号采集
2.0	30	6-1	梯度洗脱
6.0	100	6-1	
13.0	100	6-1	
13.1	10	6-1	分析结束, 平衡富集柱
15.0	10	6-1	分析完成

样品前处理

将样品通过0.45 μm滤膜过滤，待测。

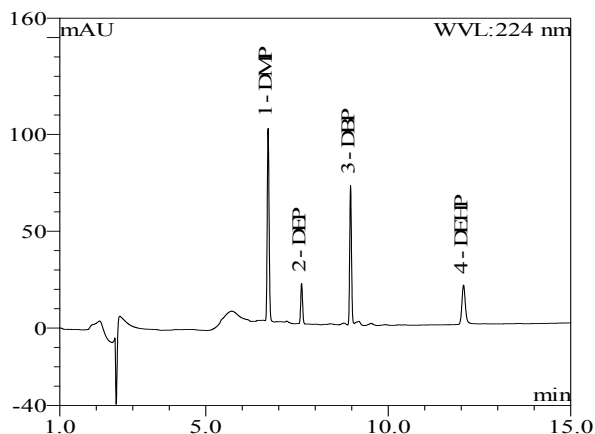


图3 标准溶液色谱图 (待测物浓度均为 10 μg/L)

结果和讨论

IonPac[®] NG1 Guard 柱连接方式

对于富集泵液体与分析泵液体流经 *IonPac*[®] NG1 Guard 柱的方向是否相同，延伸出两种连接方式，一种是富集泵液体与分析泵液体流经 *IonPac*[®] NG1 Guard 柱的方向相反（连接图见图 2），即“反向冲洗”，可有效防止色谱峰扩散；另一种是富集泵液体与分析泵液体流经 *IonPac*[®] NG1 Guard 柱的方向相同（连接图见图 4），即“同向冲洗”，这种连接利用富集柱的分离作用进行初步的分离提纯。本试验对比了两种连接对试验结果的影响，在其他条件均相同的情况下，当采用同向冲洗连接方式时，色谱峰明显变宽拖尾，当采用反向冲洗连接方式时，色谱峰型尖锐且对称性好。故采用反向冲洗连接。

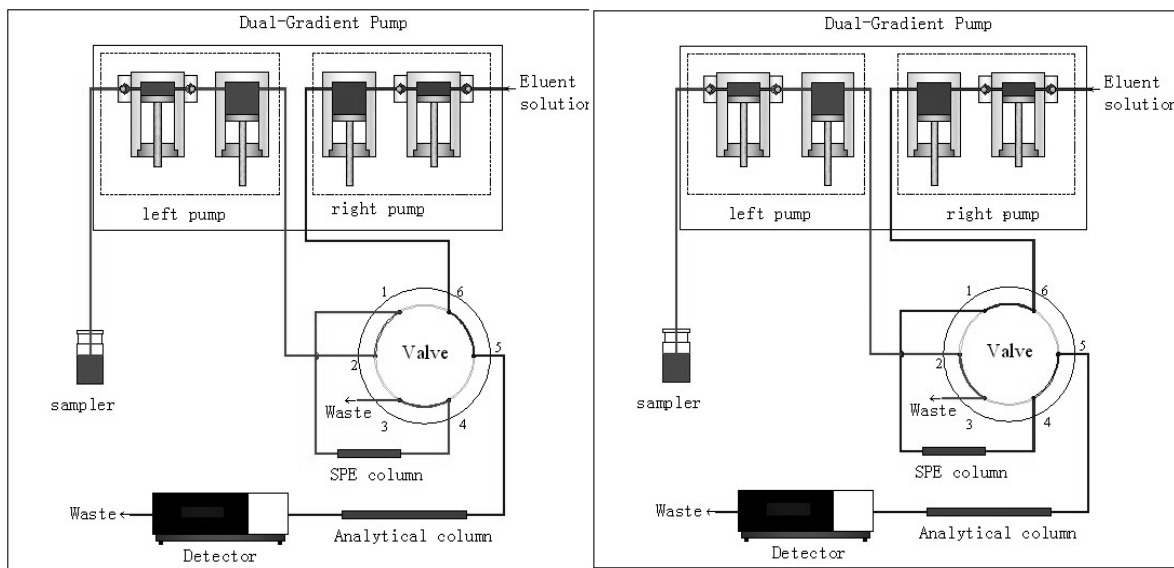


图 4-1 阀 1-2 相通时连接图

图 4-2 阀 1-6 相通时连接图

图 4 “同向冲洗”时连接图

色谱条件的优化

当梯度淋洗有机相（ACN）起始梯度为 50% 时，DMP 色谱峰在梯度峰上，影响定量测定。通过优化，将有机相起始梯度降低为 30%，再延缓有机相比例至 100% 的时间，获得良好的效果。

线性、检出限

按上述色谱条件，以峰面积进行评价，本测定方法在 0.5 μg/L~50 μg/L 浓度范围内，四种邻苯二甲酸酯线性良好，线性相关系数 $R > 0.9991$ ，检测限（按 $S/N = 3$ ）DMP 为 0.1 μg/L，DEP 为 0.25 μg/L，DBP 为 0.10 μg/L，DEHP 为 0.25 μg/L。

实际样品的分析

选取自来水和湖水进行加标回收试验，试验数据见表 3~4，色谱图见图 5~6。从试验数据可以看出，DMP 的加标回收率在 95%~101% 之间，DEP 的加标回收率在 95%~102% 之间，DBP 的加标回收率在 93%~102% 之间，DEHP 的加标回收率在 88%~108% 之间，方法准确性良好。

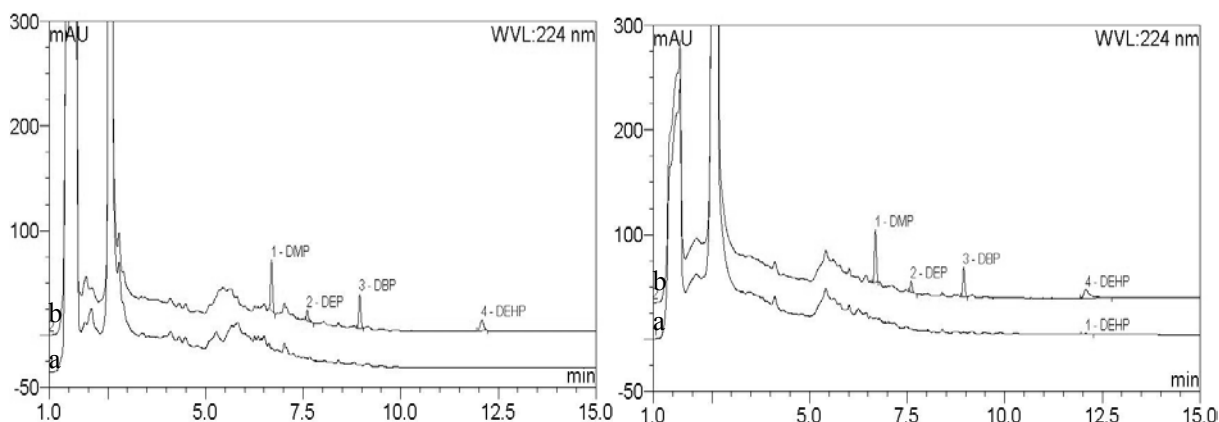


图 5 自来水加标叠加图

(a, 自来水样; b, 自来水加标)

图 6 湖水加标叠加图

(a, 湖水样; b, 湖水加标)

表 3 自来水中四种邻苯二甲酸酯加标回收试验

待测物	测得值 (μg/L)	标准添加值 (μg/L)	加标测得值 (μg/L)	加标回收率 (%)
DMP	未检出	5	4.760	95.2
	未检出	50	49.157	98.3
DEP	未检出	5	4.911	98.2

	未检出	50	48.107	96.2
DBP	未检出	5	5.071	101
	未检出	50	48.363	96.7
DEHP	未检出	5	5.070	101
	未检出	50	49.757	99.5

表 4 湖水中四种邻苯二甲酸酯加标回收试验

待测物	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准添加值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 (%)
DMP	未检出	5	5.040	101
	未检出	50	49.307	98.6
DEP	未检出	5	5.051	101
	未检出	50	47.907	95.8
DBP	未检出	5	4.971	99.4
	未检出	50	46.903	93.8
DEHP	2.44	5	6.856	88.3
	2.44	50	56.153	107

结论

该方法测定时间短,回收率高,样品前处理简单,所需样品量少,可满足现行相关法规对水体中四种痕量邻苯二甲酸酯的同时检测。

参考文献

- [1]. 中华人民共和国国家标准, GB/T 5749-2006 《生活饮用水卫生标准》
- [2]. 中华人民共和国国家标准, GB/T 22048-2008 《玩具及儿童用品 聚氯乙烯塑料中邻苯二甲酸酯增塑剂的测定》
- [3]. 中华人民共和国国家标准, GB/T 21911-2008 《食品中邻苯二甲酸酯的测定》
- [4]. 中华人民共和国环境保护行业标准, HJ/T 72-2001 《水质 邻苯二甲酸二甲(二丁、二辛)酯的测定 液相色谱法》
- [5]. 王心芳. 《水和废水监测分析方法(第四版)》.北京: 中国环境科学出版社, 2002

DGLC-E-A05 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定污水处理厂水样中直链烷基苯磺酸盐 (LAS)

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；荧光检测法；污水；直链烷基苯磺酸盐

DGLC-E-A05 Determination of Linear Alkylbenzene Sulphonate in treatment plant wastewater streams using online solid-phase extraction followed by HPLC with fluorescence detection

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; fluorescence detection; wastewater; linear alkylbenzene sulphonate

引言

表面活性剂为洗涤剂主要活性成分，而直链烷基苯磺酸盐 (LAS, CAS No.68411-30-3) 则是其中使用较为频繁的一种阴离子表面活性剂，市售产品一般是其同系物及异构体的混合物^[1-9]，LAS 结构参见图 1。

近年来出现了数种测定环境样品中 LAS 的分析方法，主要应用在农业土壤和沉积物分析方面。这些方法大多是基于液相色谱，检测器为 DAD (二极管阵列检测器)、FLD (荧光检测器) 或 MS (质谱)。直接注射样品的方法检出限较高，不适合自然水体检测，若要检测则需在分析前需要水样进行富集。固相萃取 (SPE) 技术是最重要的样品富集技术之一，它克服了许多液液萃取的缺点，但其单个样品处理较费时，且 SPE 小柱往往仅能使用一次。而在线固相萃取技术结合高效液相色谱检测的方法则可节约成本，减少手工操作、是一种简便、快速、准确的分析方法。

若要检测则需在分析前需要水样进行富集。固相萃取 (SPE) 技术是最重要的样品富集技术之一，它克服了许多液液萃取的缺点，但其单个样品处理较费时，且 SPE 小柱往往仅能使用一次。而在线固相萃取技术结合高效液相色谱检测的方法则可节约成本，减少手工操作、是一种简便、快速、准确的分析方法。

本文利用双三元高效液相色谱系统 (DGLC-3600)，采用在线固相萃取方式 (Online SPE) 以 IonPac[®] NG1 小柱对样品进行在线富集，后转载到分析柱 Acclaim[®] Surfactant 上进行分离。Chromeleon[®] 软件可以很容易地控制该在线固相萃取高效液相色谱方法所用双三元硬件。与其它分析方法相比，本方法可节省时间及成本、避免接触大量有机溶剂，显著提高分析效率。

测试条件

仪器型号：Ultimate DGP 3600 系统，包含：带有在线脱气单元的双三元梯度泵，配有

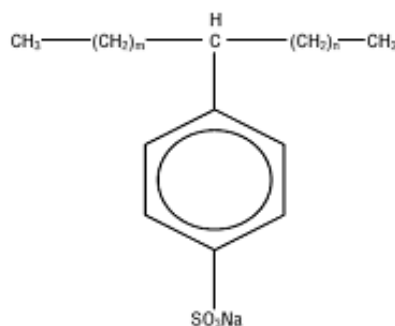


图 1 LAS 结构图

500 μ L 半制备进样组件的自动进样器，带有一个二位十通阀的柱温箱，荧光检测器，系统连接参见图 2。

分析柱: Acclaim Surfactant (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 保护柱: Acclaim Surfactant Guard (4.3mm \times 10 mm)

富集柱: IonPac NG1(5 μ m, 4 mm \times 35 mm)

检测器: 荧光检测器, 0 min: Ex 230 nm, Em 302 nm; 18 min: Ex 221 nm, Em 284 nm

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样量: 0.5–5 mL

淋洗液组成及流速: 见表 1

梯度淋洗条件: 见表 2

表 1 淋洗液组成及流速

富集泵 (left pump)		分析泵 (right pump)	
流动相	H ₂ O	流动相 A	ACN
		流动相 B	100 mmol/L NH ₄ OAc (pH 5 HCl调节)
流速	2.0 mL/min	流速	1.0 mL/min

表 2 淋洗梯度

时间 (min)	分析泵 (B%)	时间 (min)	阀位置
0	50	-10	10-1
20	15	0	1-2
30	15	5.2	10-1

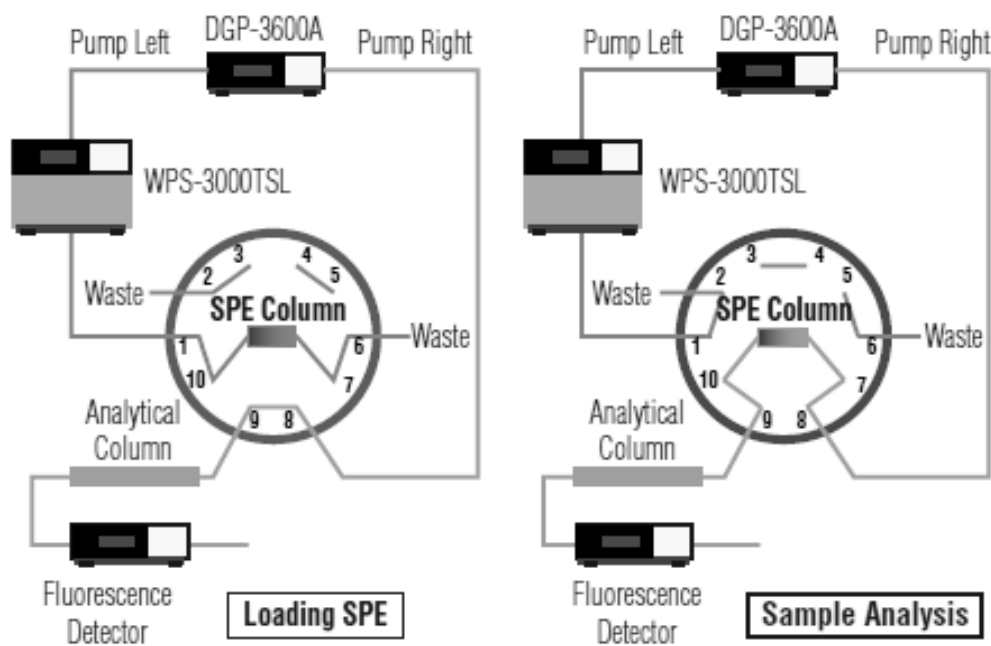


图2 仪器连接图

样品前处理

取污水样品适量，过滤，并尽快测试以防止水样变质。

结果和讨论

在线固相萃取色谱条件优化

通过进不同量的 C10-13 LAS 混标来考察方法的线性，谱图见图 3，线性数据见表 3

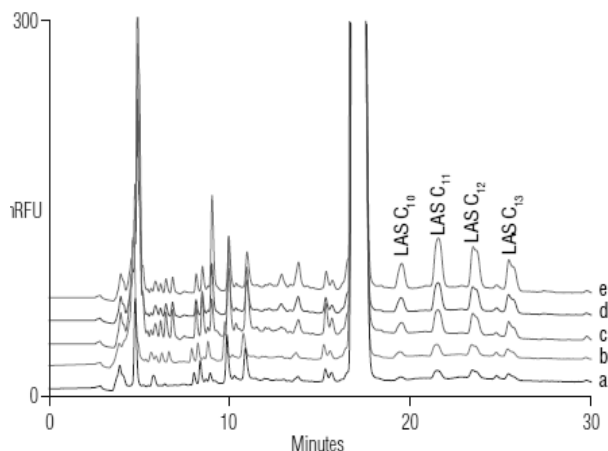


图 3 不同进样体积 C10-13 LAS 色谱图

(LAS 标准品总浓度 58.5 $\mu\text{g/L}$, a-0.5 mL; b-1.0 mL; c-2.0 mL; d-3.0 mL; e-5.0 mL)

重现性、检出限和线性

由于样品中所含 LAS 的浓度范围较宽，所以本实验的方法建立了 0.5mL、5mL 两个不同进样量的标准工作曲线，并分别测得了两个进样量的重现性（表 4）、检出限（表 5）和工作曲线线性情况（表 3）。

表 3 线性数据

SPE 进样量 (mL)	C10 r^2	C11 r^2	C12 r^2	C13 r^2
0.5	0.9967	0.9964	0.9962	0.9935
5	0.9996	0.9988	0.9988	0.9975

表 4 重复性数据

SPE 进样量 (mL)	C10		C11		C12		C13	
	RT RSD	Area RSD	RT RSD	Area RSD	RT RSD	Area RSD	RT RSD	Area RSD
0.5 (n=5)	0.24	1.72	0.22	1.33	0.16	1.39	0.12	3.25
5 (n=3)	0.95	11.1	0.03	9.9	0.04	15.1	0.03	15.4

表 5 LAS 检出限

SPE 进样量 (mL)	C10		C11		C12		C13	
	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD
0.5 (n=5)	5.1	3.29	14.2	3.89	15.4	1.1	12.3	3.86
5 (n=3)	0.19	11.4	0.51	12.1	0.46	12.4	0.31	15.3

实际样品的分析

研究了污水处理厂入水口及出水口中 LAS 总量，进样量 0.5mL，谱图见图 4、图 5。本实验也对 LAS 含量较低的样品进行了研究，进样 5mL，谱图见图 6、图 7。

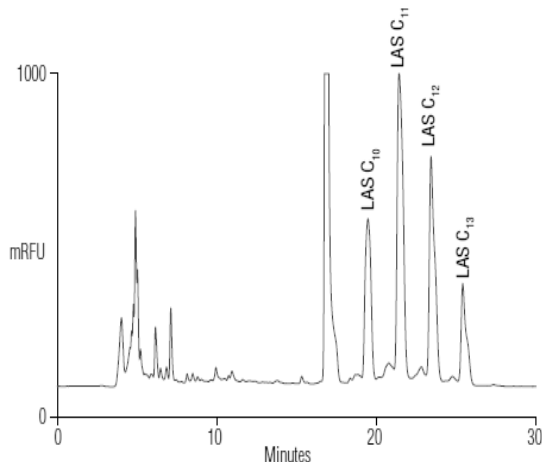


图 4 某城市污水及工业污水处理厂入水口污水样品谱图 (LAS 总量为 8689 $\mu\text{g/L}$)

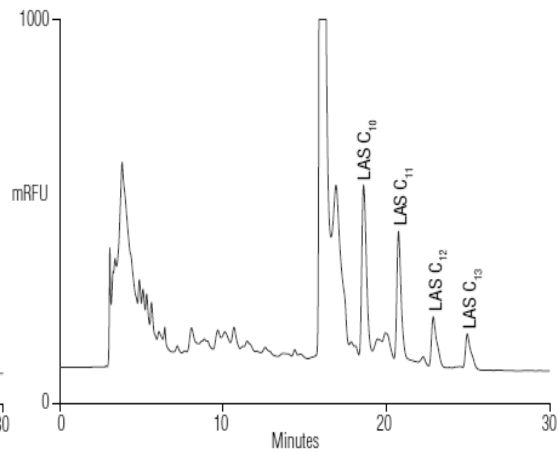


图 5 某城市污水及工业污水处理厂出水口污水样品谱图 (LAS 总量为 740 $\mu\text{g/L}$)

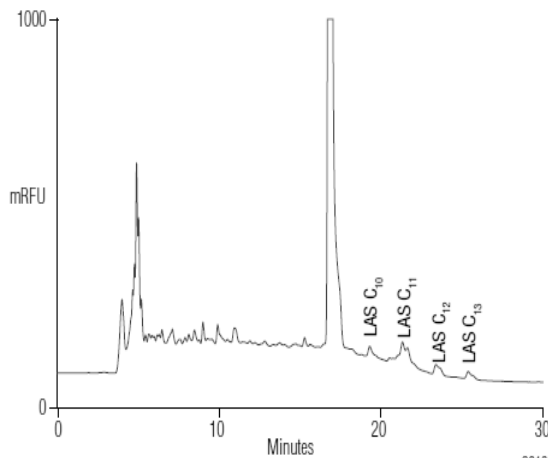


图 6 某污水处理厂出水口污水样品谱图 (LAS 总量为 37.1 $\mu\text{g/L}$)

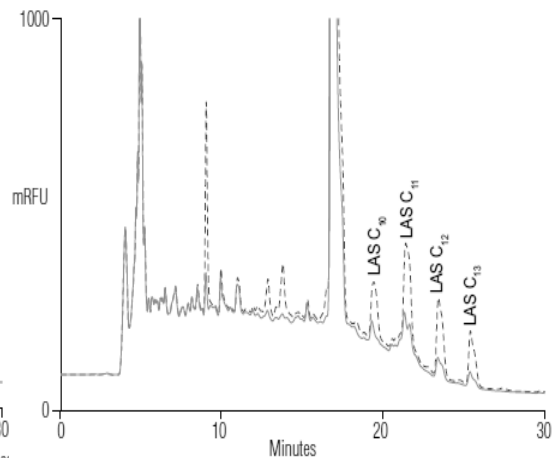


图 7 某污水处理厂出水口低 LAS 含量污水样品加标 117 $\mu\text{g/L}$ 谱图 (实线为样品谱图, 虚线为加标样谱图)

加标回收率

低含量样品添加 117 $\mu\text{g/L}$ 标准品 C10-13 LAS 以研究加标回收率，图 7 中对比了低含量样品及其加标样品的谱图，样品平均加标回收率为 104%，RSD 为 14% (n=3)。

结论

Ultimate 3000 双三元系统结合 Online SPE 方法可成功用于水样中 LAS 的分析，而无需进行手工离线样品前处理。Online SPE 结合荧光检测器检测，可以获得良好的重复性和选择性。5 mL 样品时 LAS C₁₀₋₁₃ 总量的检出限为 0.9 $\mu\text{g/L}$

注意事项

严格以高纯水清洗所有玻璃器皿，并使用高纯度试剂和溶剂，以尽量减少干扰问题。样品必须过滤并在短时间进行分析，以免待测物降解。

参考文献

- [1]. HERA, 2004. Human and Environmental Risk Assessment of Ingredients of Household Cleaning Products: Report for LAS. <http://www.heraproject.com>.
- [2]. Mieure, J.P.; Waters, J.; Holt, M.S.; Matthijs, E. Terrestrial Safety Assessment of Linear Alkylbenzene Sulphonate Chemosphere 1990, 21, 251–262.
- [3]. Klopper-Sams, P.; Torfs, F.; Feijtel, T.C.J.F.; Gooch, J. Effects Assessment for Surfactants in Sludge-Amended Soils: a Literature Review and Perspective for Terrestrial Risk Assessment. Sci. Tot. Environ. 1996, 185, 171–175.
- [4]. De Wolf, W.; Feijtel, T.C.J.F. Terrestrial Risk Assessment for Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) in Sludge-Amended Soils. Chemosphere 1998, 36 (6), 1319–1343.
- [5]. Jensen, J. Fate and Effects of Linear Alkylbenzene Sulphonates (LAS) in the Terrestrial Environment-A Review Sci. Tot. Environ. 1990, 226, 93–111.
- [6]. Jensen, J.; Lokke, H.; Holmstrup, M.; Krogh, P.H.; Elsgaard, L. Effects and Risk Assessment of Linear Alkylbenzene Sulfonates in Agricultural Soil. Probabilistic Risk Assessment of Linear Alkylbenzene Sulfonates in Sludge-Manded Soils. Environ. Toxicol. Chem. 2001, 20 (8), 1690–1697.
- [7]. Fendinger, N.J.; Versteeg, D.J.; Weeg, E.; Dyer, S.; Rapaport, R.A. Environmental Behavior and Fate of Anionic Surfactants. In: Baker LA, editor. Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs. ACS Advances in Chemistry Series American Chemical Society 1994, 528–57.
- [8]. Versteeg, D.J.; Rawlings, J.M. Bioconcentration and Toxicity of Dodecylbenzene Sulfonate (C12LAS) to Aquatic Organisms Exposed in Experimental Streams. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2003, 44, 237–46.
- [9]. Temara, A.; Carr, G.; Webb, S.; Versteeg, D.J.; Feijtel, T. Marine Risk Assesment: Linear Alkylbenzensulphonates (LAS) in North Sea. Marine Pollution Bulletin 2001 42(8), 635–42.

DGLC-E-A06 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定污水处理厂水样中直链烷基苯磺酸盐 (LAS)

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；废水；直链烷基苯磺酸盐

DGLC-E-A06 Determination of Linear Alkylbenzene Sulphonate in treatment plant wastewater streams using online solid-phase extraction followed by HPLC with UV detection

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

引言

直链十二烷基苯磺酸盐 (LAS) 是合成洗涤剂中含有的重要阴离子表面活性剂之一。LAS 进入水体后, 与其它污染物结合形成分散胶体颗粒, 对工业污水和生活污水的物理、化学和生化特性都有很大影响, 并产生潜在的危险。GB 8978-1996 《中华人民共和国国家标准污水综合排放标准》规定 LAS 一级排放限量为 5 mg/L^[1]。

目前测定污水中 LAS 的方法主要有流动注射法和分光光度法。国标 (GB/T 7494-1987) 采用亚甲蓝分光光度法^[2], 操作麻烦, 基体干扰大, 灵敏度低 (试样体积 100mL 时, 方法检出限为 0.05 mg/L)。流动注射法是改进的亚甲蓝方法的自动化版本, 用仪器法代替人工的有机溶剂萃取, 但仍可能存在较大的基体干扰, 易出现假阳性。本文的方法无需多次萃取, 利用在线前处理小柱 NG1 可以有效地纯化、富集 LAS, 大大提高检测灵敏度。戴安公司的 Surfactant 表面活性剂色谱柱可以对不同碳链的 LAS 进行分离和测定, 7.5mL 进样时检出限为 1μg/L。

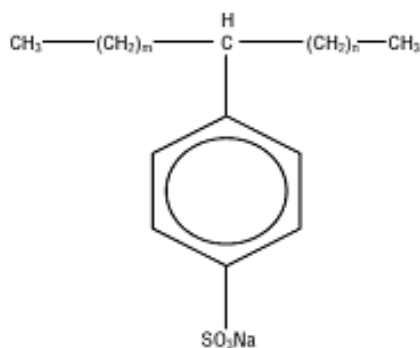


图 1 LAS 结构图

测试条件

仪器型号: Ultimate DGP 3600 系统, 包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵; 配有 2.5 mL 半制备进样组件的自动进样器; 带一个二位六通阀的柱温箱; DAD 检测器。连接图见图 2。

分析柱: Acclaim Surfactant (5 μm, 4.6 mm× 250 mm)

保护柱: Acclaim Surfactant Guard (4.3 mm × 10 mm)

富集柱: IonPac NG1(5 μm, 4 mm× 35 mm)

柱温: 30°C

检测波长: 222 nm

进样量: 7.5 mL

淋洗液组成及流速: 见表 1;

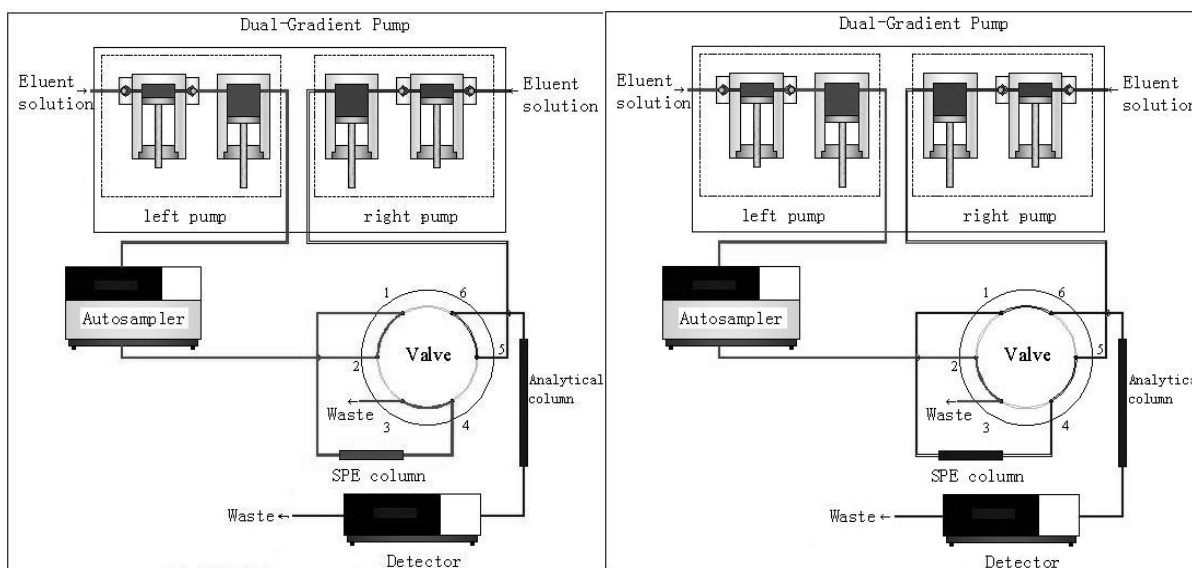
梯度淋洗: 见表 2。

表 1 淋洗液组成及流速

富集泵(Left pump)		分析泵 (Right pump)	
流动相 A	ACN	ACN: 100 mmol/L NH ₄ OAC=	
流动相 B	H ₂ O	(7:3, v/v) (pH=5.0, HCl 调节)	
流速	2.0 mL/min	流速	1.0 mL/min

表 2 梯度淋洗条件

时间 (min)	富集泵 (B%)	时间 (min)	阀位置
0	95	0	1-2
10	95	3	6-1
11	20	8	1-2
20	20	—	1
25	95	—	1
35	95	—	1



2-1 阀1-2位相通时连接图

图2-2 阀1-6位相通时连接图

图2 仪器连接图

样品前处理

取污水样品适量, 过滤, 并尽快测试以防止水样变质。

结果和讨论

标准品色谱图

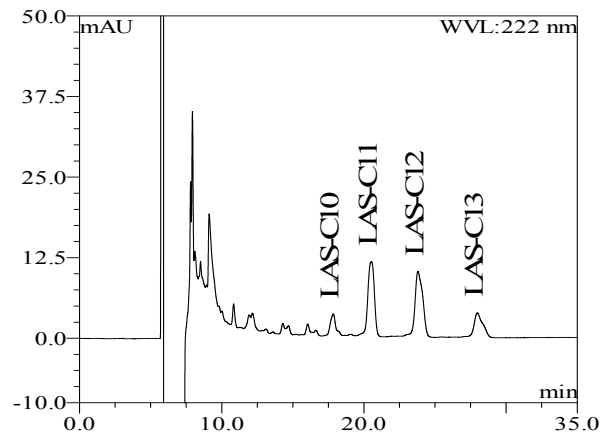


图3 标样色谱图 (LAS总浓度为100 $\mu\text{g/L}$)

检出限和线性

按上述色谱条件,以峰面积进行评价,本测定方法在 50 $\mu\text{g/L}$ ~1 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, LAS 线性良好,相关系数 $r > 0.9995$ 。以 3 倍噪音的峰高为检出限,以 50 $\mu\text{g/L}$ 的谱图为参考标准谱图,获得混标谱图中 LAS-C11 的峰高和基线噪音,计算得到该方法最低检出限为 1 $\mu\text{g/L}$ 。

实际样品的分析

图 4 为某污水处理厂入口水样及其加标样品色谱图重叠图。图 5 为某污水处理厂出水口水样及其加标样品色谱图重叠图。

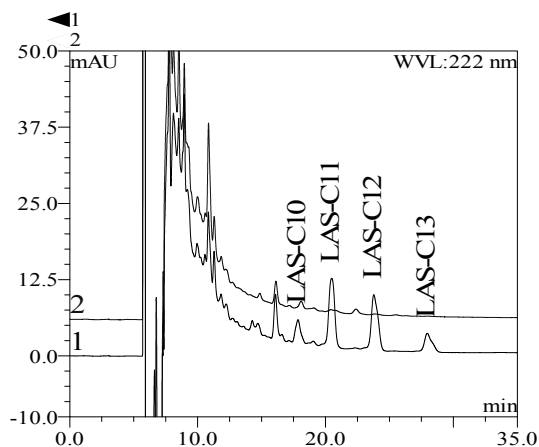


图 4 某污水处理厂入口水样及其加标样品色谱图重叠图
(1-加标图; 2-入口水样)

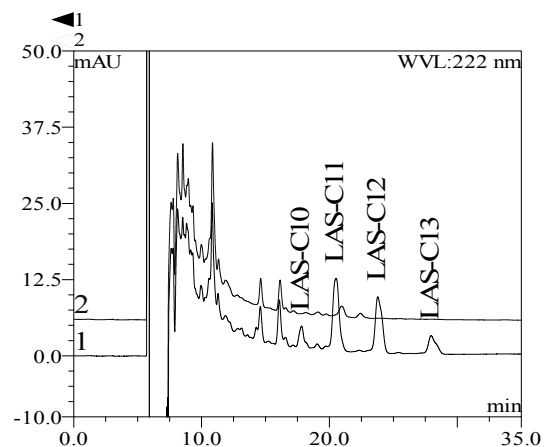


图 5 某污水处理厂出水口水样及其加标样品色谱图重叠图
(1-加标图; 2-出水水样)

加标回收率

称量样品时加入适当体积的标准溶液（1.0 mg/L 和 10 mg/L），以得到加标 100 μg/L 和 500 μg/L 的样品。两个污水处理厂的出、口水样的加标回收率实验结果见表 3。

表 3 LAS 加标回收实验数据

样品名称		测得值 (μg/L)	标准添加值 (μg/L)	加标测得值 (μg/L)	回收率 (%)
污水处理厂 1#	入口	11.35	100	93.92	82.6
	出口	13.82	100	95.82	82.0
污水处理厂 2#	入口	57.7	500	478.2	84.1
	出口	22.32	500	481.8	91.9

结论

本方法适合检测污水处理厂污水中的直链十二烷基苯磺酸盐（LAS），基体干扰少，回收率高。7.5 mL 进样，LAS 总量检出限为 1μg/L，灵敏度高于国标方法。

利用戴安公司双三元液相色谱系统（Ultimate 3000 DGLC），在线固相萃取技术（Online SPE），实现样品在线富集和基体去除，可以实现对低含量样品的准确测定。用作 SPE 柱的 IonPac NG1，兼容 100%水相上样，可反复使用，节约检测成本。

注意事项

严格以高纯水清洗所有玻璃器皿，使用高纯试剂和溶剂，以尽量减少干扰问题。样品必须过滤并在短时间进行分析，以免降解。

参考文献

- [1]. 中华人民共和国国家标准 GB 8978-1996 《中华人民共和国国家标准污水综合排放标准》
- [2]. 中华人民共和国国家标准 GB/T 7494-1987 《水质阴离子表面活性剂的测定亚甲蓝分光光度法国家标准》

DGLC-E-A07 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定水样中痕量莠去津（阿特拉津）

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；环境水；莠去津

DGLC-E-A07 Determination of trace levels of Atrazine in environmental water using online solid-phase extraction followed by HPLC with UV detection

Key words: on-line solid-phase extraction; HPLC; UV detection; environmental water; Atrazine

引言

莠去津（Atrazine）是一种三嗪类除草剂，又名阿特拉津，结构式见图1。已知莠去津是一种内分泌干扰物，莠去津污染是一个普遍而又危险的环境问题。

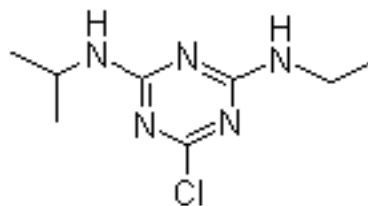


图1 莠去津结构图

《生活饮用水卫生标准》（GB 5749-2006）中规定水质中莠去津的限量为0.002 mg/L^[1]。常规HPLC检测时，需对样品进行有机溶剂液液萃取或者大体积离线固相萃取，前处理较复杂，且所需样品量较大。本方法利用双三元高效液相系统（DGLC-3600），采用在线固相萃取方式（Online SPE）对样品进行富集后再进行HPLC检测。进样2.5mL时，检出限可达0.05 μg/L。该方法显著减少样品使用量，实现自动化样品在线前处理和测定，节省分析时间、避免使用大量有机溶剂，可大大提高分析效率。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系统，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵，配2.5 mL半制备组件的自动进样器，带有一个六通阀的柱温箱，紫外检测器，系统连接参见图2。

分析柱：Acclaim[®] 120 C18 (5μm, 4.6mm×250mm)

富集柱：Acclaim[®] PA Cartridge(5μm, 4.3mm×10mm)

柱温：30℃

检测波长：222 nm

进样量：2.5 mL

淋洗液组成及流速：见表1；

梯度淋洗条件：见表2。

表1 淋洗液组成及流速

富集泵(Left Pump)		分析泵 (Right Pump)	
流动相 A	MeOH	流动相 A	MeOH
流动相 B	H ₂ O	流动相 B	H ₂ O
流速	1 mL/min	流速	1mL/min

表 2 梯度淋洗条件

时间 (min)	富集泵 (B%)	时间 (min)	分析泵 (B%)	时间 (min)	阀位置
0	100	0	30	0	1-2
9	100	15	30	6	6-1
9.5	0	15.1	0	7	1-2
18	0	22	0	—	—
18.5	100	22.1	30	—	—
23	100	30	30	—	—

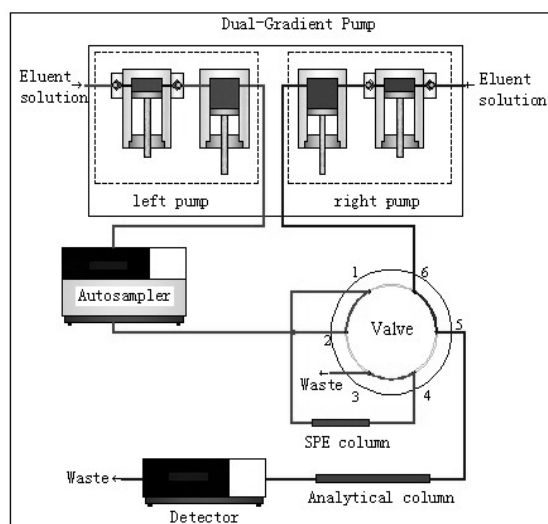


图2-1 阀1-2位相通时连接图

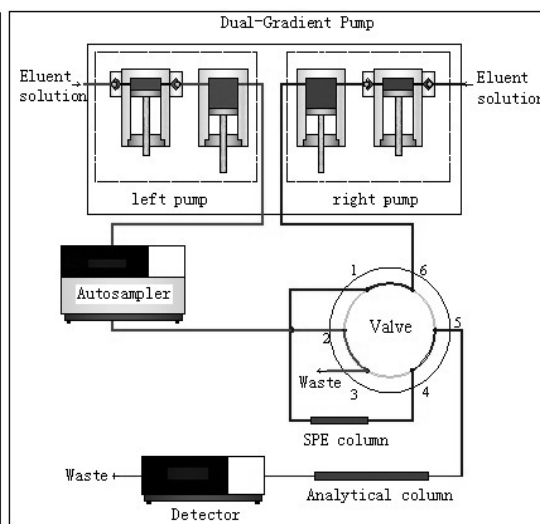


图2-2 阀1-6位相通时连接图

图2 仪器连接图

样品前处理

将水样通过0.22 μm尼龙滤膜过滤，滤液待测。

结果和讨论

标准品色谱图

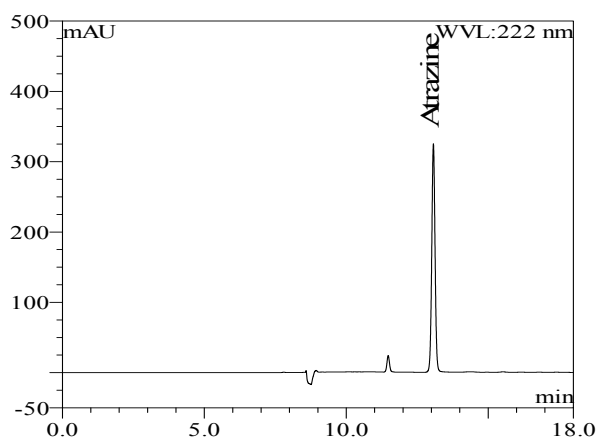


图3 标准溶液色谱图 (浓度 10 μg/L)

线性、检出限

以 0.5、1、2、4、6、8、10 $\mu\text{g/L}$ 7 个浓度的标样色谱峰面积对浓度做工作曲线，具有良好线性，线性相关系数 r 大于 0.9998。以 3 倍信噪比计算检出限，得到该方法最低检出限为 0.05 $\mu\text{g/L}$

实际样品的分析

(1) 自来水及其加标 1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 样品的重叠谱图见图 4，加标回收率见表 3。

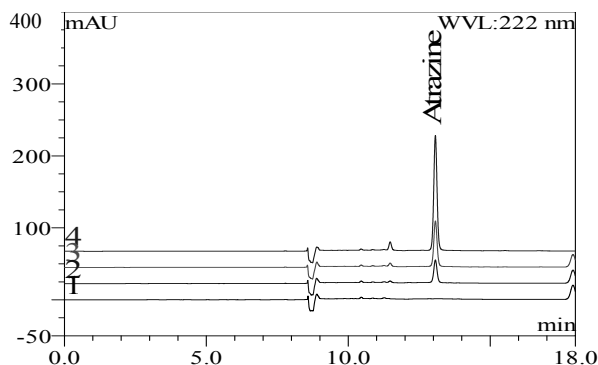


图 4 自来水样品及样品加标对比谱图

(1-自来水; 2-加标 1 $\mu\text{g/L}$; 3-加标 2 $\mu\text{g/L}$; 4-加标 5 $\mu\text{g/L}$)

(2) 河水及其加标 1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 样品的重叠谱图见图 5，加标回收率见表 3。

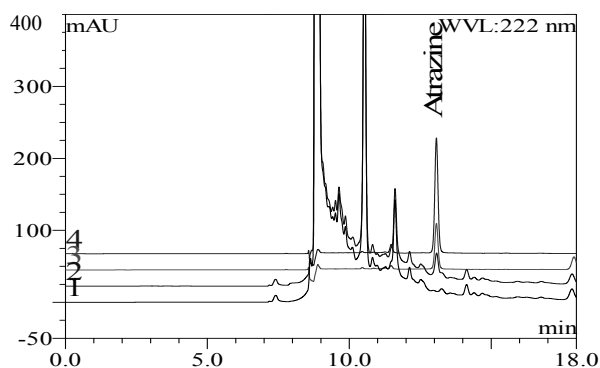


图 5 河水样品及样品加标对比谱图

(1-河水; 2-加标 1 $\mu\text{g/L}$; 3-加标 2 $\mu\text{g/L}$; 4-加标 5 $\mu\text{g/L}$)

表3 莠去津的加标回收实验结果

样品名称	原样含量 (μg/g)	加标量 (μg/g)	测得含量 (μg/g)	加标回收率 (%)
自来水	—	1.003	1.045	104.2
	—	2.005	2.038	101.6
	—	5.006	5.028	100.4
河水	—	1.002	1.091	108.9
	—	2.004	1.971	98.4
	—	5.001	4.971	99.4

结论

本方法利用双三元液相色谱系统的在线固相萃取技术, 实现样品在线富集和基体消除, 避免繁琐的人工样品前处理过程, 大大节省样品使用量 and 时间, 重现性高, 回收率好。

本实验使用半制备进样组件, 一次最大进样量可达2.5 mL, 结合SPE柱的富集功能, 可以实现对低浓度样品的准确测定。水样2.5mL进样, 检出限可达0.05 μg/L, 灵敏度高, 适合水体中莠去津的检测。

参考文献

- [1]. 中华人民共和国国家标准, GB 5749-2006 《生活饮用水卫生标准》

第二部分

双三元液相色谱-在线固相萃取在食品饮料中的应用

DGLC-F-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定食用油 中多环芳烃

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；荧光检测器；食用油；多环芳烃

DGLC-F-A01 Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Edible Oils by HPLC-Fluorescence detection with online solid-phase extraction

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

引言

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

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

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；带有两个六通阀的柱温箱；荧光检测器；自动进样器。连接图见图2。

分析柱：2 根 SUPELCOSIL™ LC-PAH (5 μm , 4.6 mm×250 mm)

富集柱：ChromSpher Pi (3.0 mm×80 mm)

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

自动进样器温度：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：80 μL

淋洗液组成、流速及淋洗梯度条件：

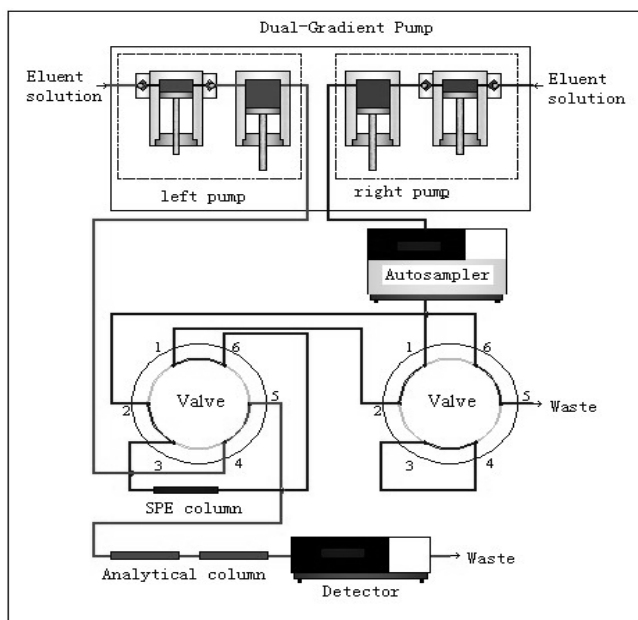


图 1-1 样品富集时连接图

见表 1。检测波长：见表 2。

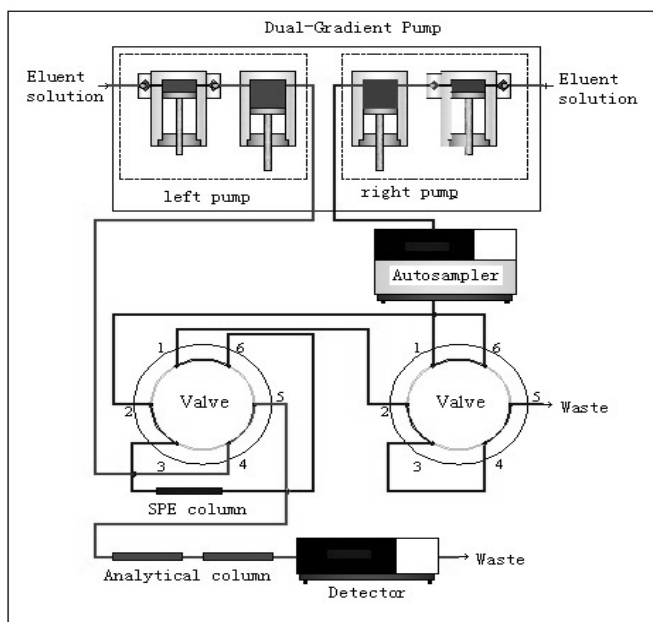


图 1-2 冲洗富集时连接图

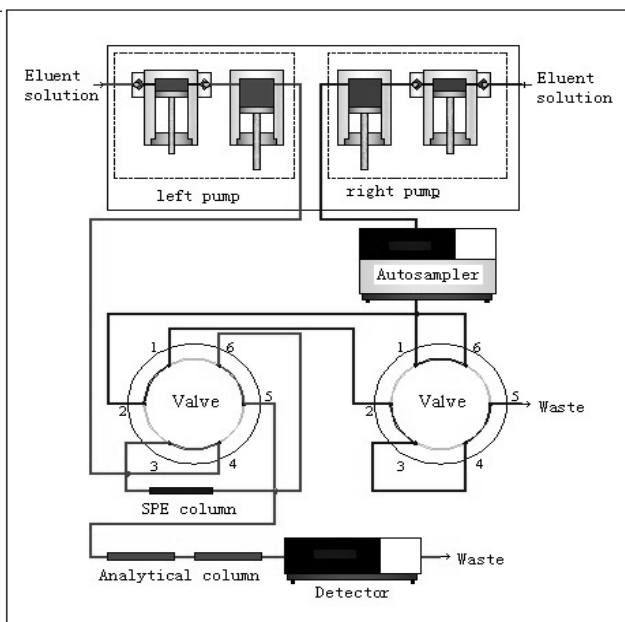


图 1-3 分析时连接图

图 1 仪器连接图

表 1 系统梯度淋洗条件

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

表2 检测波长

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

样品前处理方法

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

结果和讨论

方法的重现性

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

线性、检出限

在上述色谱条件下进行试验, 各PAHs的线性、检出限数据见表3。

表3 PAHs线性、检出限

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

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

实际样品的分析

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

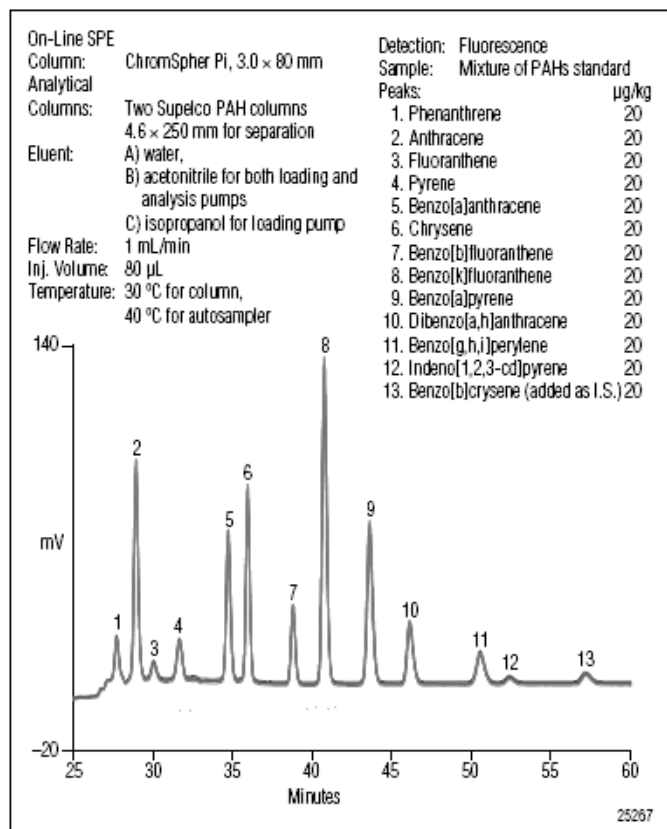


图 2 食用油基质标准溶液色谱图 (20µg/Kg)

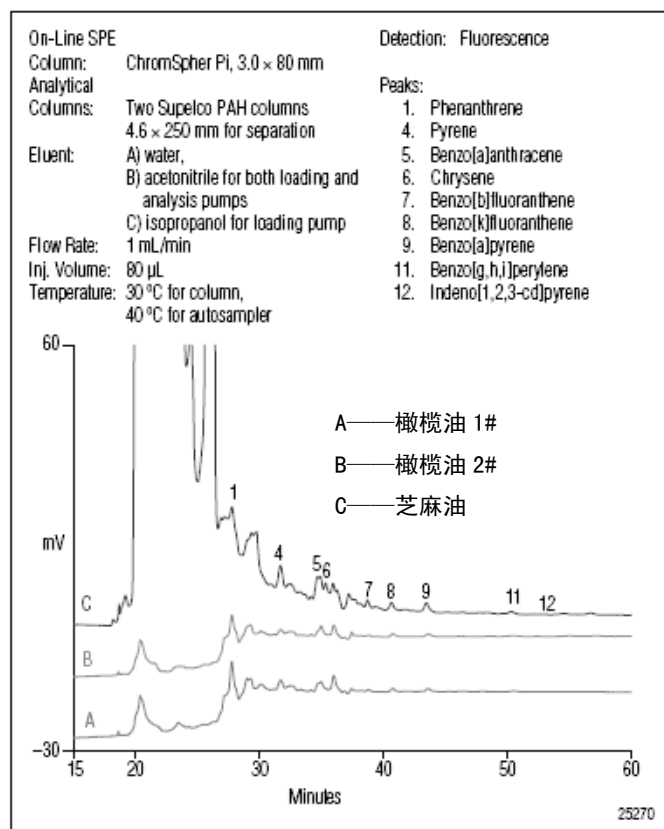


图3 实际样品色谱图

表 4 食用油中多环芳烃含量的测定及加标回收试验

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

结论

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

参考文献

- [1]. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006, Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006, 49, L364, 5–24.
- [2]. Saravanabhavan, G.; Helferty, A.; Hodson, P. V.; Brown, R. S. A Multi-Dimensional High Performance Liquid Chromatographic Method for Fingerprinting Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Alkyl-Homologs in the Heavy Gas Oil Fraction of Alaskan North Slope Crude. *J. Chromatogr., A* 2007, 1156, 124–133.
- [3]. Zuin, V. G.; Montero, L.; Bauer, C.; Popp, P. Stir Bar Sorptive Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mate Teas. *J. Chromatogr., A* 2005, 1091, 2–10.
- [4]. Pino, V.; Ayala, J. H.; Afonso, A.M.; González, V. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Following Micelle-Mediated Preconcentration. *J. Chromatogr., A* 2002, 949, 291–299.
- [5]. Bouvrette, P.; Hrapovic, S.; Male, K. B.; Luong, J. H. Analysis of the 16 Environmental Protection Agency Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by High Performance Liquid Chromatography-Oxidized Diamond Film Electrodes. *J. Chromatogr., A* 2006, 1103, 248–256.
- [6]. Itoh, N.; Aoyagi, Y.; Yarita, T. Optimization of the Dopant for the Trace Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Liquid Chromatography/ Dopant-Assisted Atmospheric-Pressure Photoionization/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2006, 1131, 285–288.
- [7]. Lintelmann, J.; Fischer, K.; Matuschek, G. Determination of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Particulate Matter Using High- Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2006, 1133, 241–247.

DGLC-F-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法 测定饮料中维生素 B12

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱法；紫外检测器；饮料；维生素 B12

DGLC-F-A02 Determination of cyanocobalamin (Vitamin B12) in beverages by HPLC-UV detection with online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV detector; beverages; vitamin B12

引言

维生素 B12 是 B 族维生素中的一种，不存在于植物中，但鱼、蛋、肉、肝中含量丰富，如果严重缺乏，将导致恶性贫血。如摄入过量，也会对人体产生危害。目前市场上一些功能性饮料中添加了维生素 B12，添加量层次不齐，相关人群需斟酌饮用。GB/T5009-217《保健食品中维生素 B12 的测定》中对于饮料样品，取样 20 mL 采用免疫亲合法进行富集、萃取处理，检出限 3.0 $\mu\text{g/L}$ ，处理过程费时耗力。本方法利用双三元液相系统，实现在线富集，大大减少了手工操作，操作简单，灵敏度高，试验成本低。

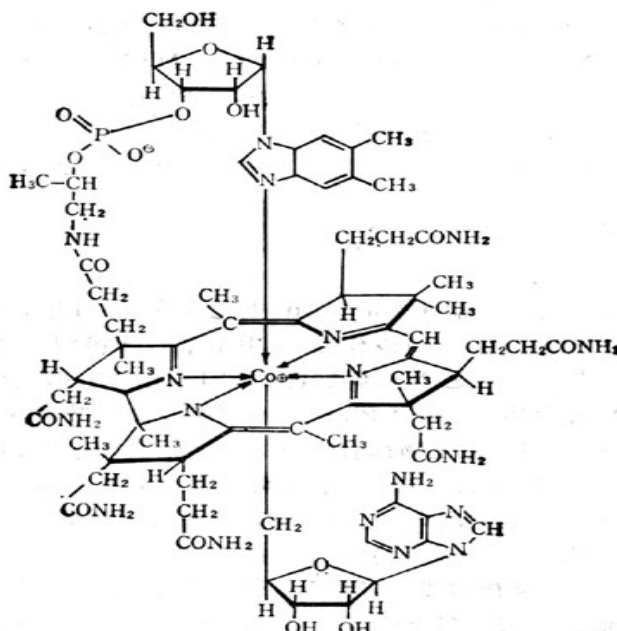


图 1 维生素 B12 结构图

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；配有 2500 μL 半制备进样组件的自动进样器；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器。连接图见图 2。

分析柱：Acclaim[®] PA II (3 μm , 3.0 mm \times 150 mm)

富集柱：Acclaim[®] PA II (3 μm , 4.6 mm \times 50 mm)

柱温：25 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：361 nm

进样量：2.5 mL

淋洗液组成及流速：见表 1；

梯度淋洗：见表 2。

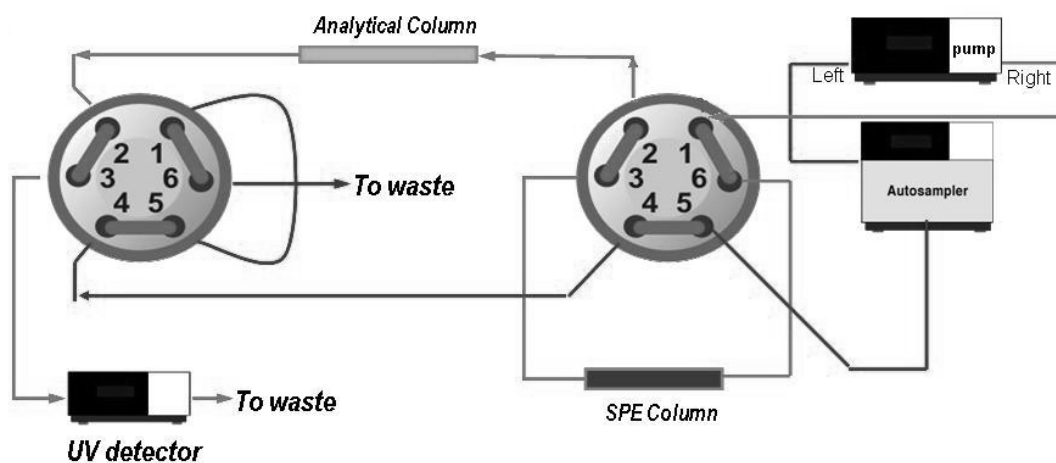


图2 仪器连接图

表 1 淋洗液组成及流速

	left pump	right pump
流动相 A	25 mM 磷酸盐缓冲液 (称取 3.4 g KH ₂ PO ₄ 溶于 1 L 水, 用磷酸调 pH 至 3.2)	
流动相 B	ACN	
流速	富集时: 1 mL/min; 冲洗时: 1.5 mL/min	0.5mL/min

表2 梯度淋洗条件

时间 (min)	Left Pump (for online SPE)			Right Pump (for separation)			Left Valve	Right Valve	
	流速 (mL/min)	A%	B%	流速 (mL/min)	A%	B %			
0.0	1.0	97	3.0	0.5	90	10	6-1	1-2	
7.0		97	3.0						
11.4					90	10			
11.65									6-1
12.0		70	30						
12.15	1.5								1-2
12.5		0	100						
14.0		0	100						
14.1		70	30						
16.0						55		45	
16.5						0		100	
19.0			70		30				
19.1					90	10			
19.5	1.0	70	30						
20.0		97	3.0						

样品前处理方法

将样品通过0.45 μm 滤膜过滤，待测。

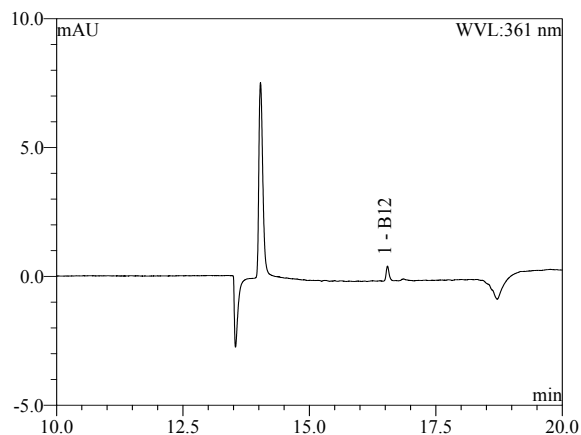


图3 标准溶液色谱图（浓度 0.5 $\mu\text{g/L}$ ）

结果和讨论

进样方式

经试验，发现当直接大体积定量环进样时，实际样品中的杂质成分对维生素 B12 色谱峰干扰很大；当采用传统的在线富集模式进样时，可以去除大多数杂质，但仍无法满足定量的要求。试验在传统的在线富集连接模式的基础上进行了改进（见图 2），整个过程见表 2，在系统中增加了两个阀，使前期条件摸索阶段，只需通过阀切换即可实现对富集柱和分析柱色谱条件的优化。

线性、检出限

按上述色谱条件，以峰面积进行评价，本测定方法在 0.2 $\mu\text{g/L}$ ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内，维生素 B12，线性相关系数 $R > 0.9999$ ，检出限 0.003 $\mu\text{g/L}$ 。

实际样品分析

选取三种饮料进行加标回收试验，试验数据见表 3。从试验数据可以看出，维生素 B12 回收率在 100%~107%，方法准确性良好。

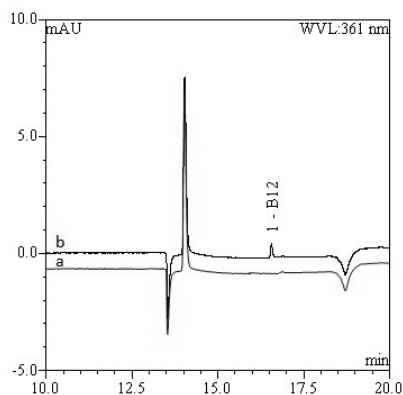


图4 饮料加标叠加图
(a, 饮料; b, 饮料加标)

表3 方法测定的回收率

	测得值 ($\mu\text{g/L}$)	标准添加值 ($\mu\text{g/L}$)	加标测得值 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 (%)
1#	未检出	1.5	1.6	107
2#	未检出	2.0	2.1	105

结论

该方法利用双三元液相系统，实现在线富集，大大减少了手工操作，操作简单，灵敏度高，试验成本低。

参考文献

- [1]. 中华人民共和国国家标准, GB/T5009-217《保健食品中维生素 B12 的测定》

DGLC-F-A03 加速溶剂萃取-在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测 法快速测定谷物或食品中的黄曲霉毒素

关键词：加速溶剂萃取；在线固相萃取；高效液相色谱；荧光检测；谷物；食品；黄曲霉毒素

DGLC-F-A03 Fast determination of Aflatoxins in grains or food using accelerated solvent extraction follow by online solid-phase extraction-HPLC with fluorescence detection

Key words: ASE; online solid-phase extraction; HPLC; fluorescence detection; grains; food; aflatoxins

引言

黄曲霉毒素由生长在土壤和腐烂植被中的黄曲霉菌所产生，是强致癌毒素。未加工食品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2（见图 1）的含量在许多国家都受到监管，例如欧盟对谷物中 B1 的限量为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~8.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，对黄曲霉毒素总量的限量为 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。美国 FDA 对谷物及食品中的黄曲霉毒素总量的限量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。

对于谷物中黄曲霉毒素的检测，常规方法为先进进行索氏提取，提取液经离线 SPE 净化后进行 HPLC 分离检测，该方法操作繁琐，费时费力。

本方法采用 ASE、Online SPE-HPLC 方法，可节省时间和人力，提高样品通量，本方法线性、准确度、精度、回收率都很理想。检测限小于 2 ppb，符合欧盟、US FDA 要求。

测试条件

仪器型号：Dionex ASE 200；Ultimate DGP 3600 系统，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；自动进样器；带有一个六通阀的柱温箱；衍生装置；FLD检测器。连接图见图2。

分析柱：Acclaim[®]120 C18 (3 μm , 4.6 \times 150mm)

富集柱：Venture[™] AF SPE immunoaffinity (15-20 μm , 2.1mm \times 50 mm)

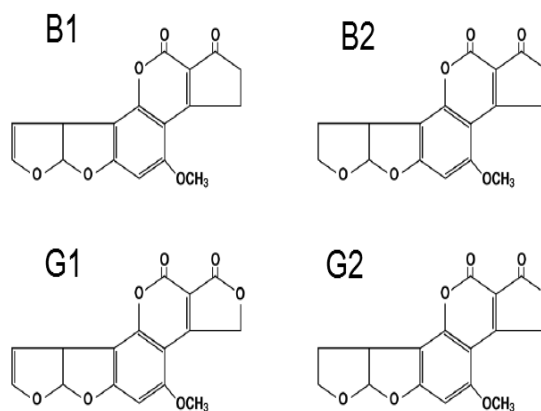


图 1 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 结构图

进样量：5 μ L

淋洗液组成及流速：见表 1；

梯度及阀切换见表 2。

表 1 淋洗液组成及流速

富集泵(Left pump)		分析泵 (Right pump)	
流动相 A	10 mmol/L 磷酸盐+0.15 mol/L NaCl 混合缓冲盐溶液, pH=7	20% ACN+80% H ₂ O	
流动相 B	H ₂ O	22.5/22.5/55 MeOH / ACN / H ₂ O	
流速	1.0 mL/min	流速	1.0 mL/min

表 2 梯度淋洗条件

时间 (min)	阀位置	富集泵(%B)	分析泵 (%B)
0	1_2	0	0
5.0	1_2	0	0
5.1	1_2	100	0
10.0	6_1	100	0
10.1	6_1	0	0
14.5	6_1	0	0
14.6	1_2	0	100
27.6	1_2	0	100
27.7	1_2	0	0
40.0	1_2	0	0

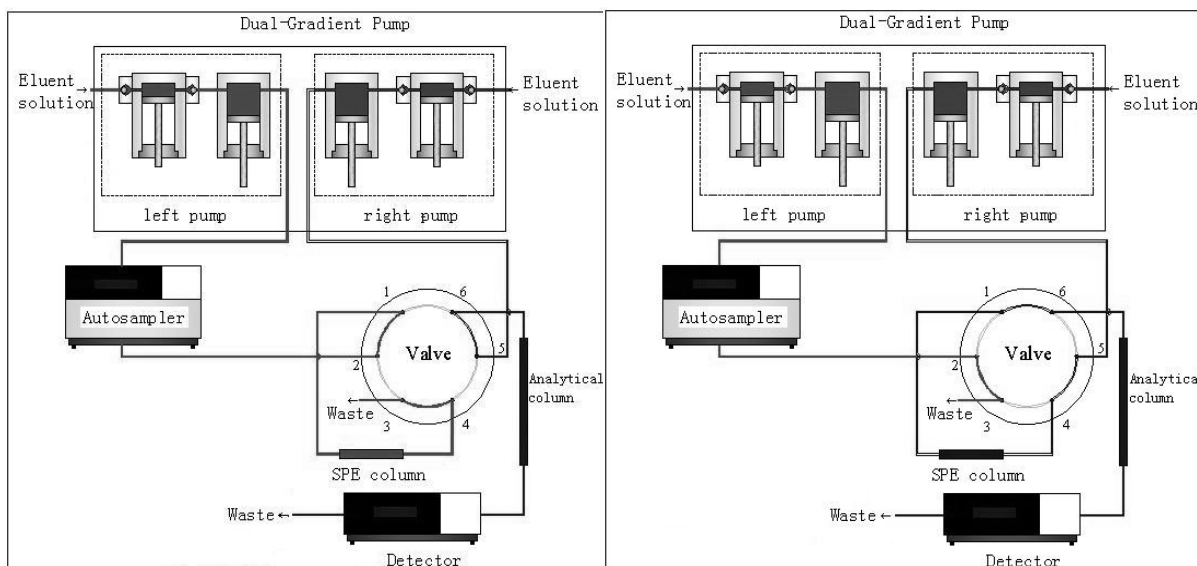


图2-1 阀1-2位相通时连接图

图2-2 阀1-6位相通时连接图

图 2 仪器连接图

SPE 柱 Venture™ AF SPE immunoaffinity column 的固定相选择性的保留目标分析物黄曲霉毒素，富集后的分析物被反冲转载至 Acclaim 120 C18 柱上进行分离。分离之后，B1、

G1 以紫外 254nm 光化学衍生，转化示意图见图 3，从而可用荧光检测器检测这两种黄曲霉毒素。而光化学衍生对 B2、G2 无作用。



图3 B1在紫外光254nm照射下的转化示意图

样品前处理方法

在ASE200上加速溶剂萃取：称取5 g样品与3 g硅藻土混合研磨以除去样品中的水分，并装填萃取池以节省溶剂使用量。处理后的混合物装入22 mL提取池，80℃温度、高压下以体积比50/50的甲醇/乙腈提取5 min，重复提取两次，样品提取溶剂共16.5 mL。而后氮气吹扫120 s以除去样品中残留的溶剂。

结果和讨论

标准品色谱图

本实验开发了一种全自动进行样品除杂及检测的 SPE-LC 方法，图 4 是标样色谱图。

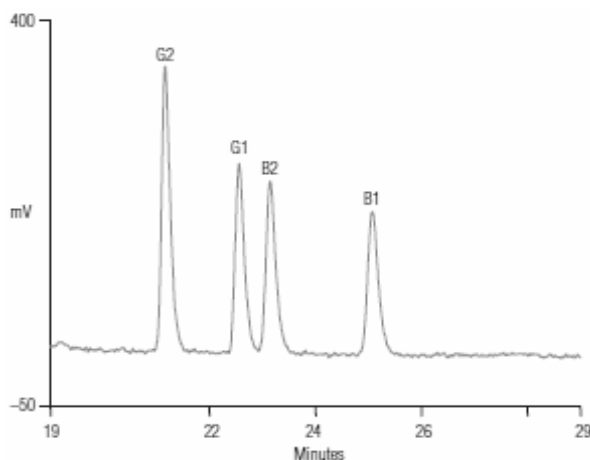


图4 黄曲霉毒素标样色谱图

(发射光信号, G1、B1 浓度 20 ppb, G2、B2 浓度 6 ppb, 进样 5 μ L)

SPE 柱上的回收率

本实验通过对比标准品在分析柱单柱以及在分析柱和 SPE 柱双柱上的出峰情况，研究了黄曲霉毒素在免疫亲和 SPE 柱上的回收率（见表 3）

表 3 黄曲霉毒素的回收率 (n=2)

黄曲霉毒素	直接进样峰面积 (mAU*min)	经 SPE 柱峰面积 (mAU*min)	回收率 (%)
G2	35.58	38.71	108.8
G1	46.67	44	94.3
B2	52.54	54	102.8
B1	72.80	72.8	100.0

线性、精度及检出限

本实验在黄曲霉毒素浓度 0~20 $\mu\text{g/L}$ 范围内做标准工作曲线, 线性、精度及检出限 (S/N=5) 见表 4。精度测定缩使用的混标含有 20 ppb 的 G1、B1 以及 4.5 ppb 的 G2、B2。

本方法线性、精度良好, 检出限满足欧洲立法的规定 (食品中 B1 的限量为 2.0 $\mu\text{g/kg}$, 黄曲霉毒素总量的限量为 4.0 $\mu\text{g/kg}$)。

表 4 线性、精度及检出限 (n=4)

化合物	回归系数 (R2)	保留时间精度 (%RSD)	峰面积精度 (%RSD)	检出限 (ppb)
G2	0.997	0.11	1.28	0.6
G1	0.996	0.15	1.34	2.0
B2	0.996	0.14	1.31	0.6
B1	0.996	0.22	1.52	2.0

实际样品的分析

杏仁和玉米样品经 ASE 萃取后, 进行 SPE-HPLC 分析检测, 样品谱图见图 5, 样品保留时间和峰面积精度与标准品相同。

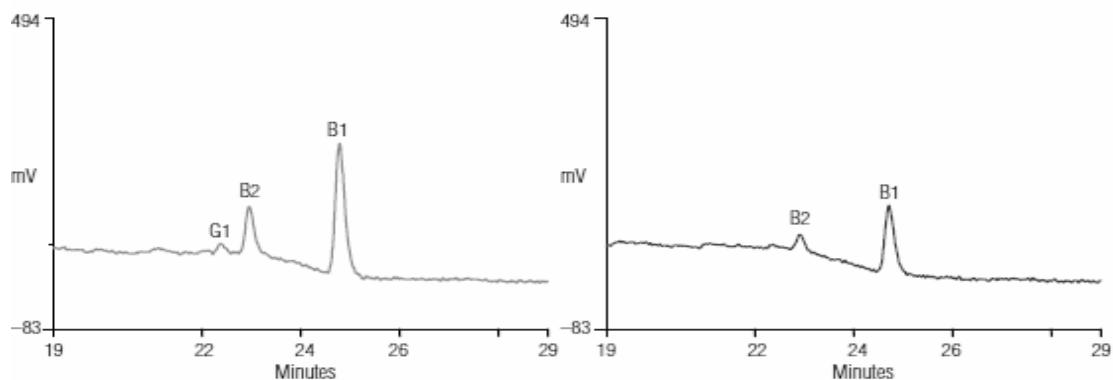


图 5 样品谱图 (左为杏仁; 右为玉米)

结论

ASE提取联合Online SPE-HPLC分析谷物和食品中黄曲霉毒素的方法, 可节省时间和人力, 提高样品通量, 本方法在有效浓度范围内线性、精度、选择性和回收率都很理想。本方法可满足相关法规对食品中黄曲霉毒素的检测要求。

参考文献

- [1]. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Level for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **2006**, 49, L364, 5-24.
- [2]. Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in *Human Food and Animal Feed*. Industry Activities Staff Booklet. U. S. Food and Drug Administration, Washington, DC, 2000.
<http://www.cfsan.fda.gov/~Ird/fdaact.html>(accessed Apr30, 2008).

DGLC-F-A04 在线固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定

白兰地中的多环芳烃

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；荧光检测；白兰地；多环芳烃

DGLC-F-A04 Quantification of PAHs in Cognac by HPLC-Fluorescence detection with online solid-phase extraction with on-line SPE

Key words: on-line SPE; HPLC; Fluorescence detection ; Cognac; PAHs

引言

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) 是一类具有多个苯环的碳氢化合物, 包括萘、蒽、菲、芘等 200 余种。此类化合物广泛存在于环境中, 他们是由煤、石油、木材、烟草、有机高分子化合物等有机物不完全燃烧时产生的, 也可通过原材料、工艺过程带入食品中。大量实验研究证明该类化合物具有强的致癌性。因此, 检测环境、食品中的多环芳烃对于保护人类的健康有重要意义。

目前, 测定多环芳烃的方法主要有 HPLC 法, 如 EPA 8310^[1], EPA 550.1^[2], HJ 478-2009; GC 法, 如 EPA 8100, EPA 8275A 等。无论哪种方法, 都要进行复杂的前处理, 处理程序如下: 取样品 1L, 液液萃取并采用硅胶或弗洛里硅土净化; 或者采用 SPE 离线净化。不仅操作复杂, 而且影响方法的精密度和准确度。

为解决上述方法缺陷, 戴安公司利用双三元高效液相色谱仪提供了在线富集、净化及检测的多环芳烃测定的解决方案^[3]。

测试条件

仪器: Ultimate DGP 3600系列, 包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵; 配有2500 μ L 半制备进样组件的自动进样器; 带有两个六通阀的柱温箱; 荧光检测器。

分析柱: Supelcosil LC-PAH, 2.1 \times 250 mm(Supelco P/N 57945)

富集柱: ChromSpher Pi, 3.0 \times 80 mm (Varian P/N CP28159)

柱温: 27 $^{\circ}$ C

检测波长: 见表 3

进样量: 1 mL

淋洗液组成及流速: 见表 1;

梯度淋洗条件: 见表 2。

表1 淋洗液组成及流速

	left pump (分析泵)	right pump (富集泵)
流动相 A	40%甲醇	
流动相 B	乙腈	
流动相 C	纯水	

表2 梯度淋洗条件

时间 (min)	Left Pump (分析泵)				Right Pump (富集泵)				左阀	右阀
	流速 (mL/min)	A%	B%	C%	流速 (mL/min)	A%	B%	C%		
0.0	0.4	0	60	40	0.35	100	0	0	1-2	10-1
15							100	0		0
15.1							0	60		40
17.8										10-1
23.5										1-2
23.6		0	60	40						
25							0	60	40	
25.1							0	100	0	
35							0	100	0	
35.1							100	0	0	
36					0.20				1-2	10-1
48.6		0	100	0						
82.6		0	100	0						
85										
85.6		0	60	40	0.35					
86										
92.6		0	60	40			100	0	0	

表3 RF 2000波长切换程序

时间(min)	激发波长(nm)	检测波长(nm)
0.00	300	390
41.00	300	480
42.45	300	425
50.98	300	480
52.30	300	425
76.80	300	480
92.6	300	480

样品前处理方法

样品过微孔滤膜，待测。标准品用 40% 乙醇稀释。

结果与讨论

进样方式

进样的基本过程如下：首先将样品注入到 DACC* SPE 柱，用适当的淋洗液冲洗，去除基体和杂质的同时将多环芳烃富集在 DACC SPE 柱上（图 1A）。待净化完毕，经过阀切换，将 DACC SPE 柱上富集的多环芳烃用分析柱的条件冲洗到多环芳烃专用分析柱上（图 1B），然后再次切换回 A 的状态进行分离后用荧光检测器检测。戴安公司采用上述方案对白兰地中多环芳烃进行了测定，取得了良好的效果。

DACC*：donor-acceptor complex chromatography，一种可与多环芳烃选择性结合并同时除去样品中基质的特殊前处理固相萃取（SPE）柱。

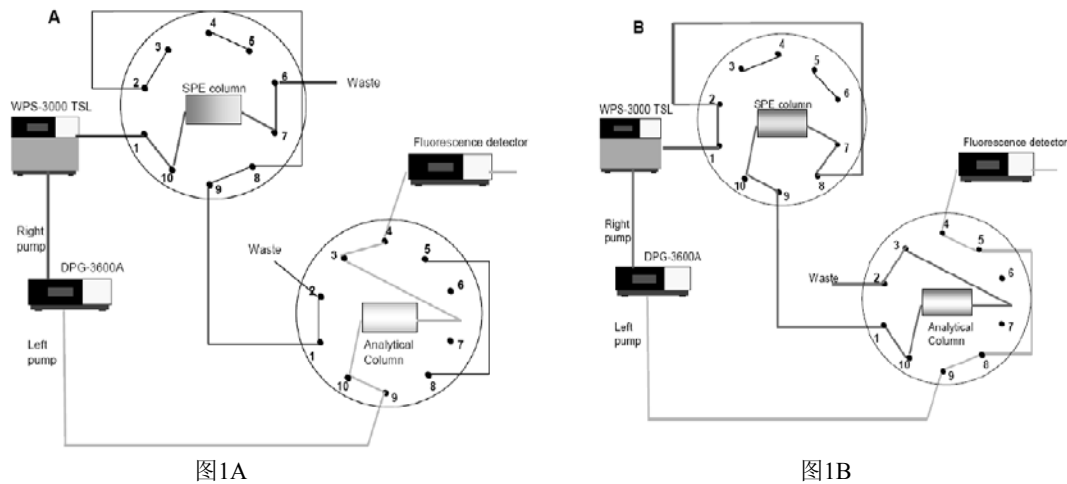


图1 仪器连接图

使用本方法，可以在93分钟内完成白兰地中13中多环芳烃的分析，并且整个过程完全自动进行，无需任何人工进行的前处理步骤（图2，图3）。但当多环芳烃为ng/L级别，基体中某些成分对检测的影响仍不能完全消除（见图3），有待进一步完善。

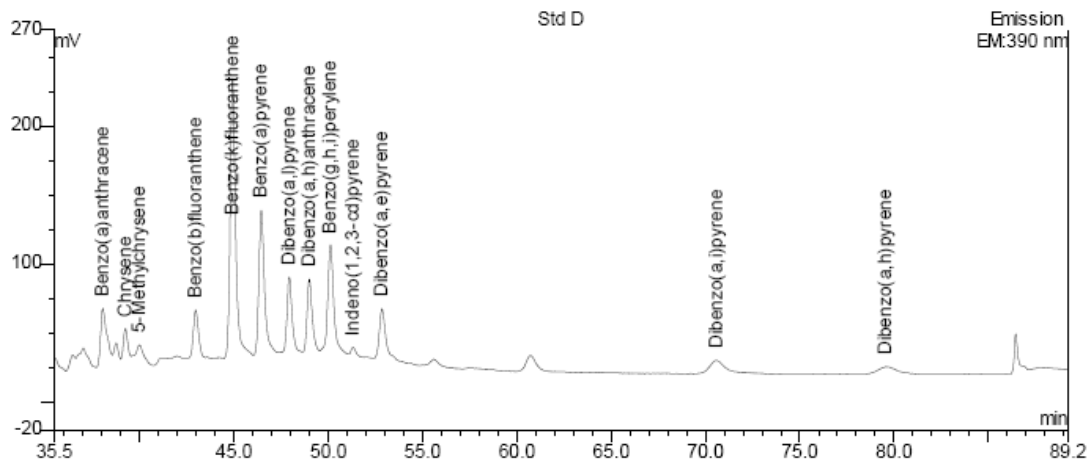


图2 标准溶液色谱图 (80ng/L)

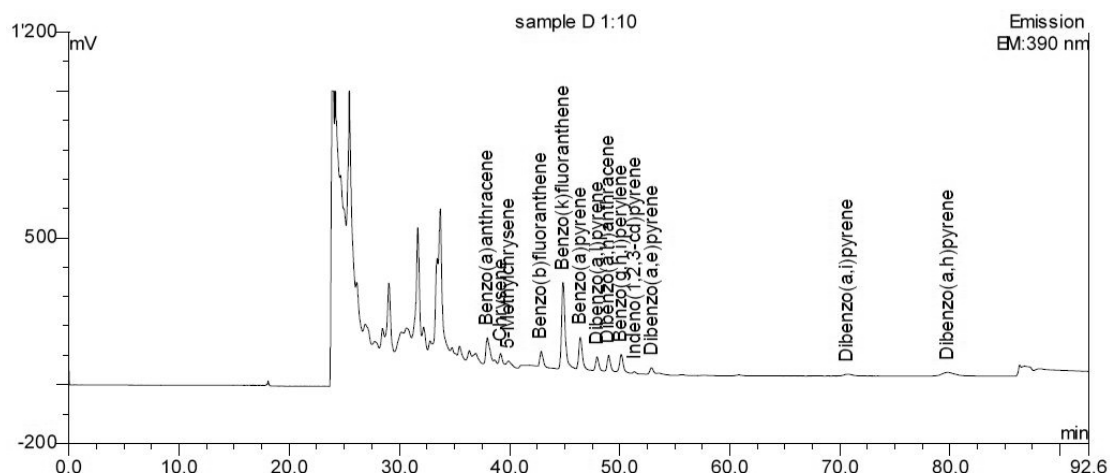


图3 样品加标色谱图

线性范围

取标准溶液梯度稀释成五个浓度，每个浓度进两针，以峰高 (mV) 与浓度 (ng/L) 做线性回归。结果显示本方法线性关系良好，线性范围在 10-160ng/L 之间，相关系数大于 0.9879 (见表 4)。

表 4 标准曲线参数

峰名	相关系数%	截距	斜率
Benzo(a)anthracene	99.89	8.52	0.41
Chrysene	99.97	13.25	0.10
5-Methylchrysene	99.83	2.04	0.12
Benzo(b)fluoranthene	99.89	5.87	0.37
Benzo(k)fluoranthene	99.96	13.65	2.44
Benzo(a)pyrene	99.95	16.04	1.17
Dibenzo(a,l)pyrene	99.97	-0.11	0.73
Dibenzo(a,h)anthracene	99.94	-0.18	0.72
Benzo(g,h,i)perylene	99.95	22.18	0.75
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	99.87	0.53	0.08
Dibenzo(a,e)pyrene	99.96	3.00	0.43
Dibenzo(a,i)pyrene	99.89	-0.99	0.12
Dibenzo(a,h)pyrene	98.79	-5.71	0.13

重复性

采用标准加入法进行重复性试验，14 种多环芳烃的 RSD 在 0.24%-5.54%之间，结果显示重复性良好 (见表 5)

表 5 重复性结果

峰名	加标量	峰面积RSD
Benzo(a)anthracene	177.1*	1.84%
Chrysene	196.4*	0.06%
5-Methylchrysene	98.8	1.96%
Benzo(j)fluoranthene	未检测	
Benzo(b)fluoranthene	119.9	2.68%
Benzo(k)fluoranthene	115.0	0.31%
Benzo(a)pyrene	80.5	1.67%
Dibenzo(a,l)pyrene	64.8	0.42%
Dibenzo(a,h)anthracene	75.2	0.44%
Benzo(g,h,i)perylene	50.8	1.05%
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	69.9	5.45%
Dibenzo(a,e)pyrene	46.1	0.24%
Dibenzo(a,i)pyrene	55.5	0.57%
Dibenzo(a,h)pyrene	153.3	2.14%

结论

本方法省去了液液萃取，离线 SPE 等繁杂操作，实现了在线固相萃取，基体消除和样品分析的全自动化，排除人为误差，获得更精密、准确的结果。

本方法实现 online SPE-HPLC 的关键在于 Dionex 公司的双三元梯度液相色谱仪。该色谱仪的两个梯度泵，并且可以安装双阀。两个泵和两个阀之间可以实现完全的联动操作，因此可以实现一个泵用于固相萃取，另一个泵用于分析的复杂功能。

参考文献

- [1]. U.S. EPA, Method 8310.0, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ground Water and Wastes.
- [2]. U.S. EPA, Method 550.1, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection .
- [3]. Dionex Corporation. Application Note 196, *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Edible Oils by Donor-Acceptor Complex Chromatography (DACC)-HPLC with Fluorescence Detection.*

DGLC-F-A05 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定牛奶中 青霉素 G

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；牛奶；青霉素 G

DGLC-F-A05 Quantification of Penicillin G by HPLC-UV detection in Milk with on-line SPE

Key words: HPLC; UV detection; milk; Penicillin G

引言

青霉素 G 为广谱类抗生素药物，有较强的抗菌消炎作用，广泛应用于畜禽类动物的呼吸、胃肠道等脏器细菌感染的预防和治疗。但青霉素 G 也易于残留于畜禽体内及其相关产品中，如牛奶、肉等。人类食用这类含残留青霉素 G 的产品，会破坏健康人体的正常菌落环境，影响人的身体健康。为保护消费者的食品安全，FDA，欧盟以及我国都规定了动物组织及牛奶中青霉素 G 的最大允许残留量。

但由于牛奶、畜禽产品等基体复杂，测定此类产品中痕量的青霉素 G 时会由于高背景的存在而受到干扰。同时由于复杂的前处理步骤而导致重复性、准确性较差。因此，要获得牛奶中准确的青霉素含量，必须有效除去基质干扰以及简化操作步骤。

戴安公司应用独特的双三元高效液相色谱仪-在线固相萃取技术成功实现了在线基质去除，从而准确测定了牛奶中痕量的青霉素 G。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600系列，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵；配有2500 μ L 半制备进样组件的自动进样器；带有两个六通阀的柱温箱；紫外检测器。

分析柱：Acclaim PA2, 4.6 \times 250 mm(Dionex P/N 063199)

富集柱：LiChrospher RP-8 ADS, 25 μ m, 4 \times 25 mm (Merck P/N 1502090001)

柱温：30 $^{\circ}$ C

进样量：1 mL

检测波长：191 nm

淋洗液组成及流速：见表 1

梯度淋洗条件：见表 2

表1 淋洗液组成及流速

	left pump (分析泵)	right pump (富集泵)
流动相 A	纯水	
流动相 B	乙腈	
流动相 C	0.1%甲酸	

表2 梯度淋洗条件

时间 (min)	Left Pump (分析泵)				Right Pump (富集泵)				左阀	右阀
	流速 (mL/min)	A%	B%	C%	流速 (mL/min)	A%	B%	C%		
0.0	1.0	0	6	94	1.0	50	0	50	1-2	10-1
15						50	0	50		
17									10-1	
19		0	6	94						
20		0	20	80						
21		0	20	80					1-2	
28						0	50	50		
28.1						0	95	5		
32						0	95	5		
32.1						50	0	50	1-2	
34										
35		0	60	40					10-1	
39		0	60	40						
40		0	6	94						
46		0	6	94		50	0	50		

样品前处理方法

取牛奶样品，在14000g下离心15min，取离心后的中间层液体500 μ L，转移到截留分子量为3000道尔顿的超滤杯中（Microcon Ultracel YM-3; 3,000 MWCO; Millipore），14000转离心90 min。取滤液进样。

最近超滤杯的供应商更新了产品，新的产品为Amicon Ultra。这种新产品可以使离心时间减少到30分钟。并且新产品有更大的规格，例如一次可以离心4mL样品的型号。旧的型号可以完全淘汰。

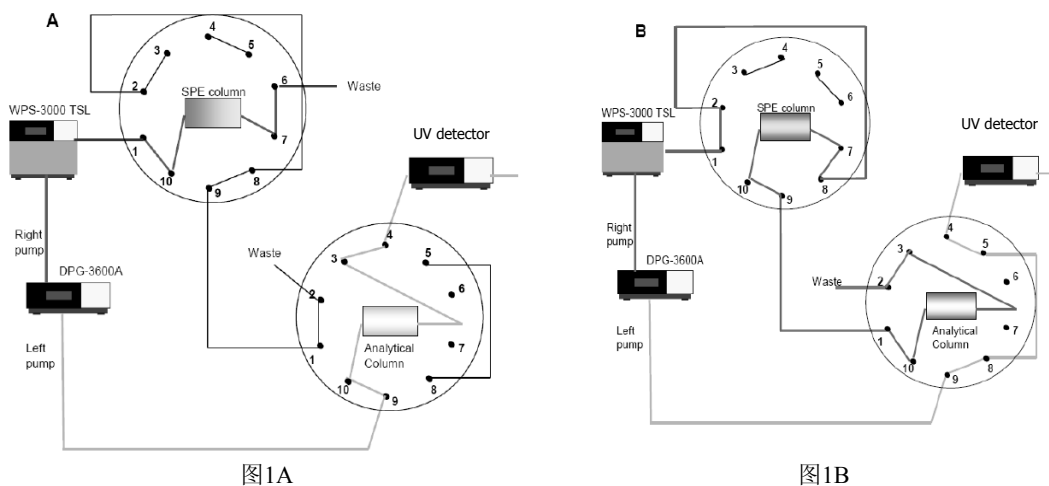


图1 仪器连接图

结论

进样时将青霉素G富集在LiChrospher RP-8 ADS SPE柱上（见图1A），待基质去除完毕，经过阀切换，将青霉素G转移到Acclaim PolarAdvantage II分析柱上（见图1B），再切换到状态A进行分离测定。

适当的前处理（大分子截留超滤）结合在线固相萃取技术（RAM 限制性媒介固相萃取柱），可以用紫外检测器就检测到牛奶中低 $\mu\text{g/L}$ 级别的青霉素G（图2，图3），在 $8\ \mu\text{g/L}$ - $80\ \mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好（相关系数99.87%，图4）。实验中发现在前处理中青霉素有被浓缩的现象，因此建议使用类似于青霉素G且容易被检测的化合物来作为内标物（例如邻苯二甲酸）。另外所选择的波长（191 nm）没有特异性，进一步需要使用质谱检测器。

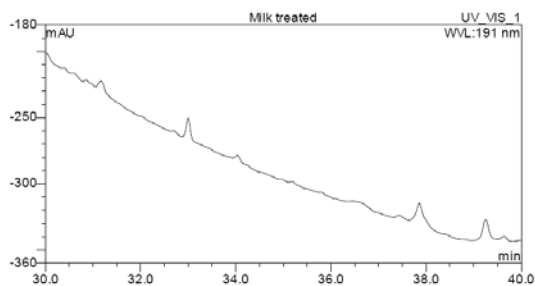


图2 样品色谱图

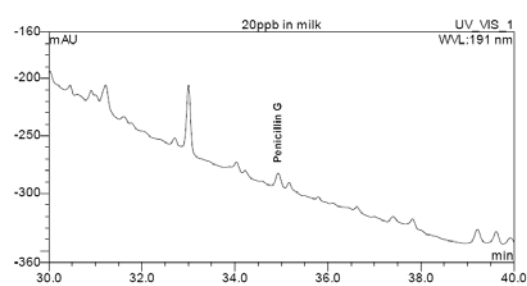


图3 样品加标 20ng/L 色谱图

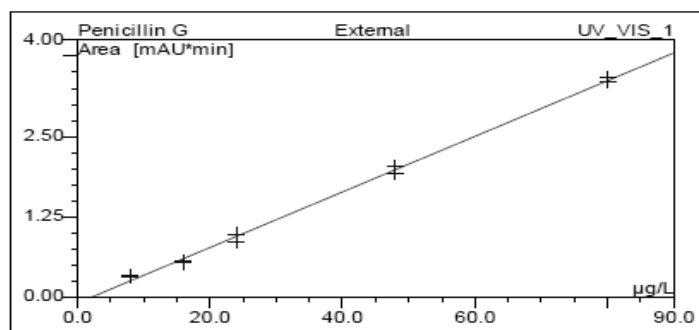


图4 标准曲线

第三部分

双三元液相色谱-在线固相萃取在工业产品中的应用

DGLC-I-A01 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定纺织品

中直链烷基苯磺酸盐(LAS)

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；纺织品；直链烷基苯磺酸盐

DGLC-I-A01 Determination of linear alkylbenzene sulphonate in textile using online solid-phase extraction followed by HPLC with UV detection

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

引言

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

欧盟纺织品生态标准 Eco-Label 明确规定 LAS 为禁用和限制使用的部分纺织品化学品之一。国标 GB/T 23325-2009 检测 LAS 使用昂贵的 LC-MS/MS 连用方法, 检出限仅为 2 mg/kg^[1]。而本方法使用双三元高效液相系统 (DGLC-3600), 采用在线固相萃取 (On-line

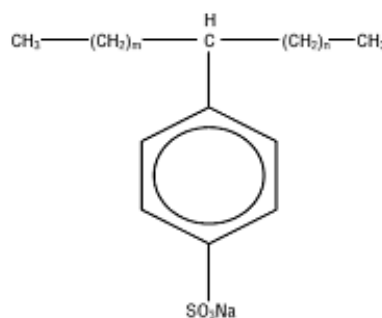


图 1 LAS 结构图

SPE) 技术对样品进行在线富集后再进行 HPLC 检测, 进样 100 μ L 样品即可达到总含量 0.15 mg/kg 的检出限 (通过增大进样体积还可以进一步降低检出限)。该方法能够对含不同碳数的 LAS 进行基线分离, 因而可使用紫外检测器进行直接检测, 而无需使用质谱。该方法可实现样品的自动化前处理, 灵敏度高, 回收率好, 在线 SPE 柱可重复使用, 可大大节约测试成本。

测试条件

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

分析柱: Acclaim[®] surfactant (5 μ m, 250 mm x 4.6 mm)

保护柱: Acclaim Surfactant Guard (4.3 mm x 10 mm)

富集柱: IonPac NG1 (5 μ m, 4 x 35mm)

柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测波长: 225 nm

进样量：100 μL

淋洗液组成及流速：见表 1；

梯度淋洗：见表 2。

表 1 淋洗液组成及流速

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

表 2 梯度淋洗条件

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

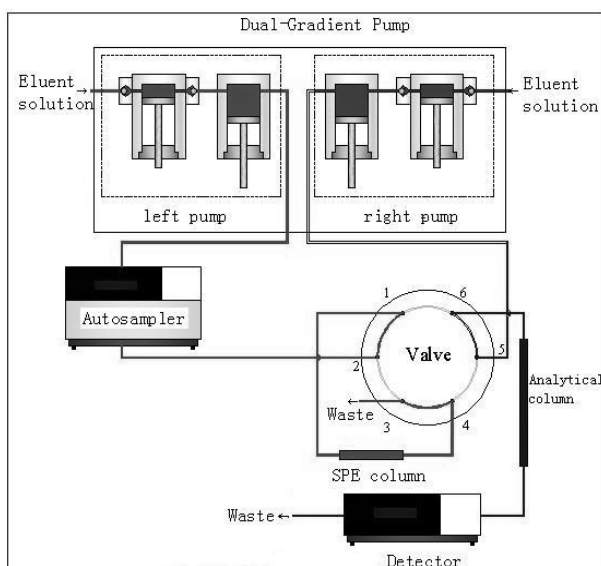


图2-1 阀1-2位相通时连接图

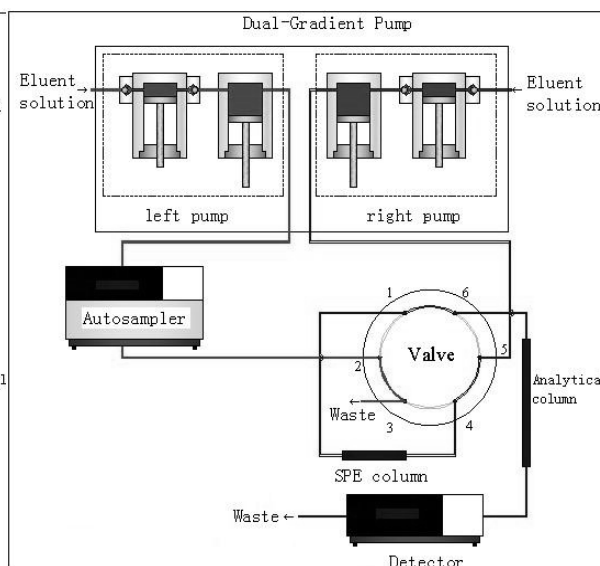


图2-2 阀1-6位相通时连接图

图2 仪器连接图

样品前处理

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

结果和讨论

标准品色谱图

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

C10~C13的色谱峰形并不规则。

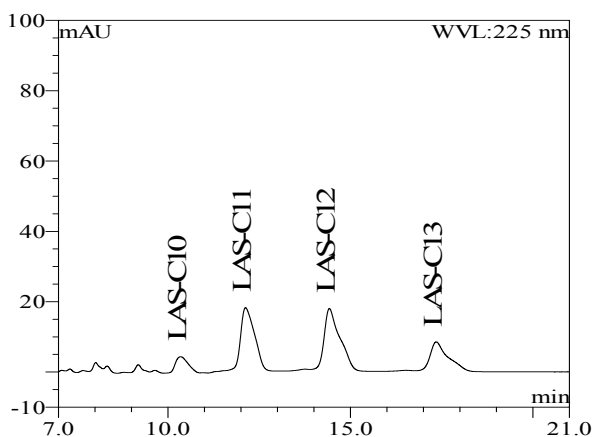


图3 混合标准溶液色谱图 (LAS总浓度为10 μg/mL)

线性、检出限

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

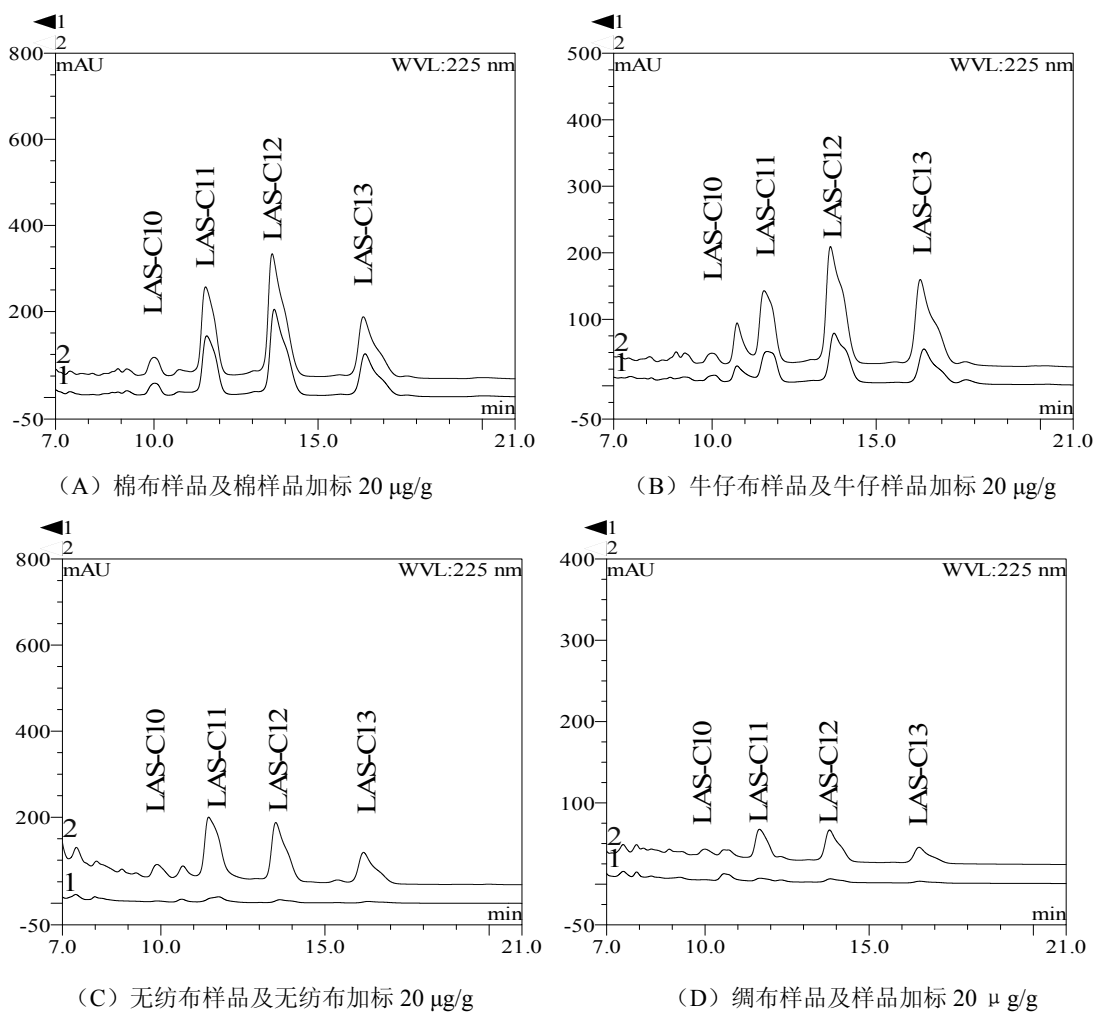


图4 样品及加标样品谱图 (1-样品; 2-样品加标 20 μg/g)

实际样品的分析

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

表 3 样品中 LAS 的加标回收试验（按 LAS 总量计算）

样品名称	测得值 ($\mu\text{g/g}$)	加标量 ($\mu\text{g/g}$)	稀释倍数	加标测得值 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)
棉布	95.05	10	2	105.18	101.3
牛仔布	52.3	10	2	63.23	109.3
无纺布	7.78	20	1	31.57	118.9
绸布	2.84	20	1	25.58	113.7

结论

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

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

参考文献

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

DGLC-I-A02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定 聚合物中偶氮二异丁腈(AIBN)

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；聚合物；偶氮二异丁腈

DGLC-I-A02 Determination of Azodiisobutyronitrile (AIBN) in polymer using online solid-phase extraction followed by HPLC with UV Detection

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

引言

偶氮二异丁腈（AIBN，结构图见图1）常用作醋酸乙烯和丙烯酸酯等聚合或共聚合的引发剂，其加入量直接影响聚合度。AIBN 易燃，有毒，遇热分解放出氮气和含 $-(CH_2)_2-C-CN$ 基团的有机氰化物，对人体危害较大^[1]。

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

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



图1 偶氮二异丁腈（AIBN）结构图

测试条件

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

分析柱：Acclaim[®] 120 C18 (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm)

富集柱：Acclaim[®] 120 C18 (5 μm , 4.3 mm \times 10 mm)

柱温： 20°C

自动进样器温度： 20°C

检测波长：346 nm

进样量：2.5mL

流动相组成及流速：见表 1

阀切换情况：见表 2。

表 1 淋洗液组成及流速

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

表 2 阀切换情况

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

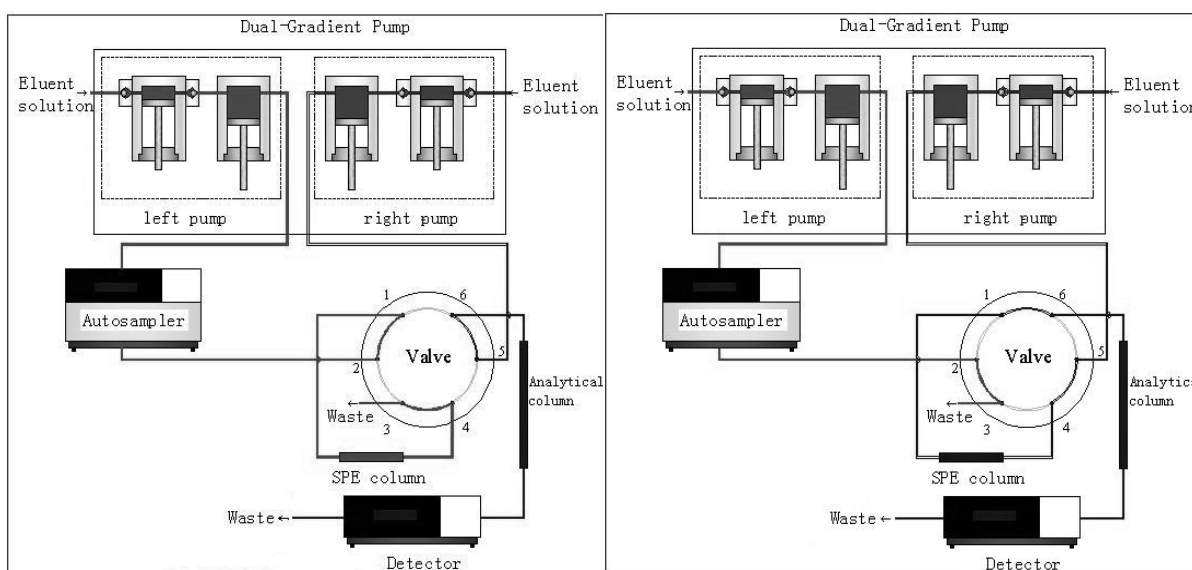


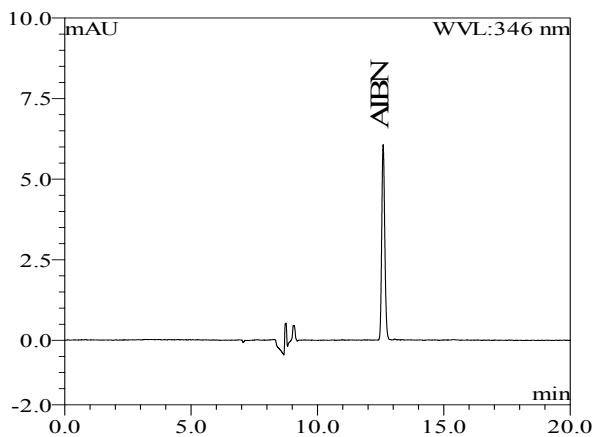
图2 仪器连接图

样品前处理

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

结果和讨论

标准品色谱图

图3 偶氮二异丁腈 (AIBN) 5 μ g/mL

线性、检出限

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

实际样品的分析

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

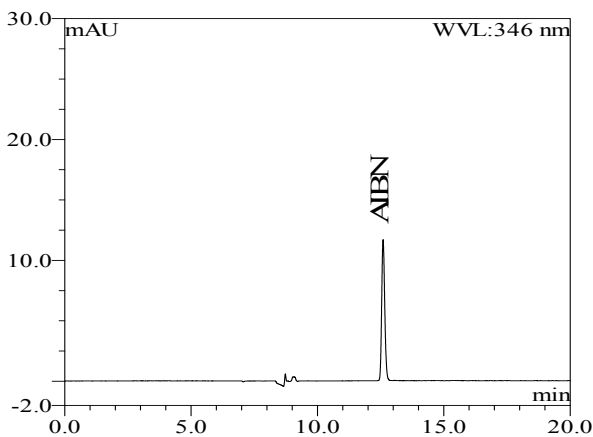


图4 重结晶 AIBN 测试谱图

表3 重结晶 AIBN 溶液 10 μ g/mL 重复数据 (n=3)

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

(2) 聚合物样品及加标样品谱图

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

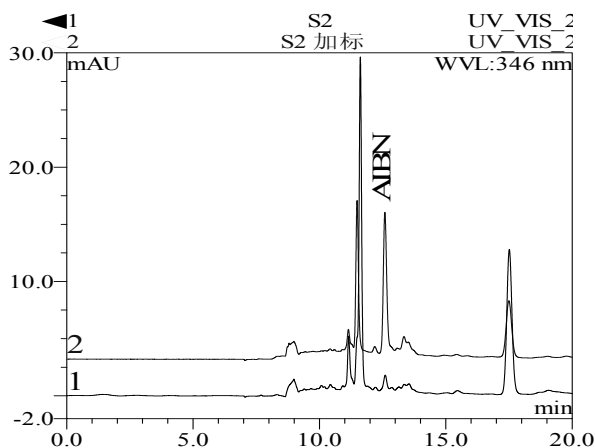


图 5 聚合物样品及样品加标谱图 (1-聚合物; 2-样品加标)

表 4 聚合物样品中 AIBN 的加标回收实验

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

结论

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

注意事项

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

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

参考文献

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

第四部分

双三元液相色谱-在线固相萃取在代谢中的应用

DGLC-M-01 在线固相萃取-高效液相色谱-质谱-质谱检测 法测定鼠血浆中杀鼠灵

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；质谱-质谱检测；鼠血浆；杀鼠灵

DGLC-M-01 Determination of Warfarin in rat plasma by HPLC-MS-MS detection with online solid-phase extraction

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

引言

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

鼠血浆中杀鼠灵的常规分析方法是全血样品经乙酸乙酯提取后，在 C18柱上以甲醇/0.1%乙酸（50+50，v/v）为流动相进行分离，紫外308 nm波长检测，但灵敏度低，方法回收率不高，重现性较差。

本文详细介绍了在线固相萃取（SPE）方法结合 HPLC - MS/MS液质联用方法测定鼠血浆中杀鼠灵的含量。血浆样品在Bio Trap MS C18（4.0 mm×20 mm）柱上富集，之后在Acclaim PA II柱上进行分离。

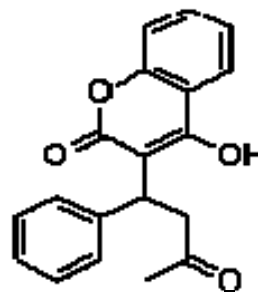


图1 杀鼠灵结构式

测试条件

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

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

富集柱：Bio Trap MS C18（4.0 mm×20 mm）；

柱温：45 °C；

自动进样器温度：15 °C；

进样量：10 μ L；

淋洗液组成及流速：见表 1，等度淋洗；

通阀切换时间见表 2；

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

表 1 淋洗液组成及流速

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

表 2 六通阀切换

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

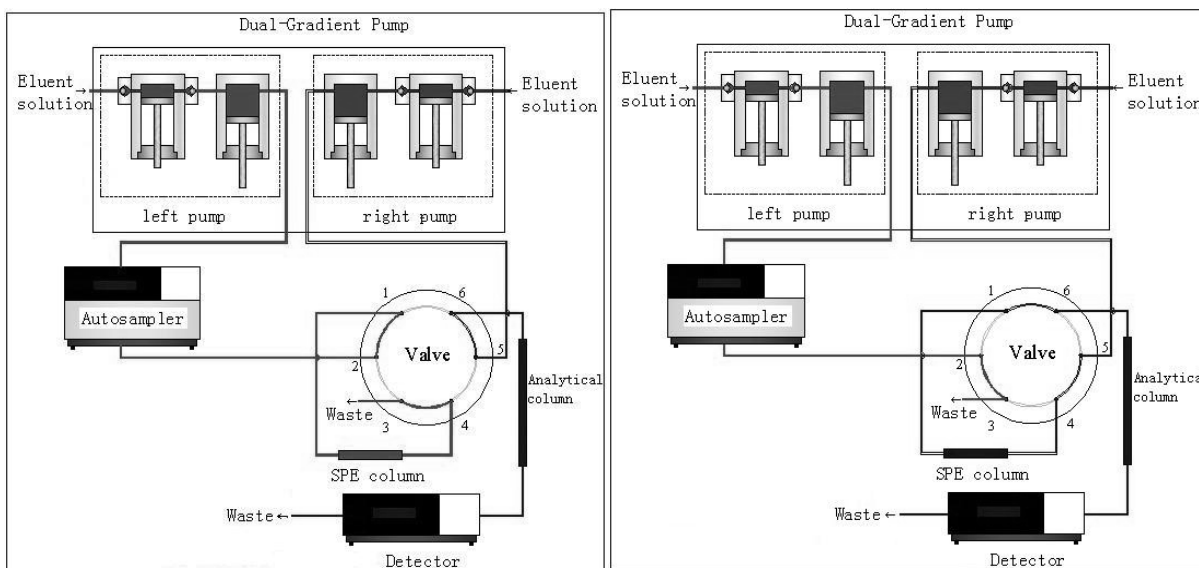


图2 仪器连接图

结果和讨论

标准品色谱图

总离子流图见图 3, 100 ppb 标准品图见图 4。

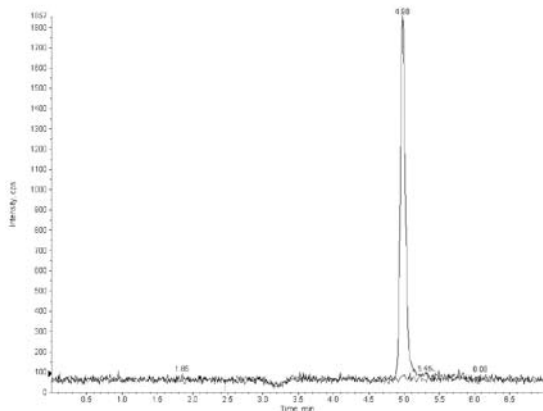


图 3 总离子流图

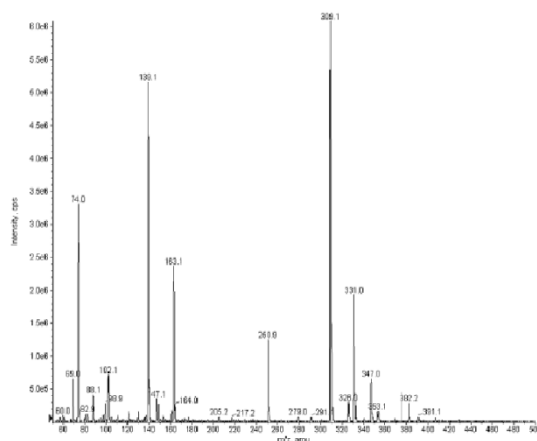


图 4 100 ppb 标准溶液谱图

实际样品的分析

低浓度加标图见图 5。

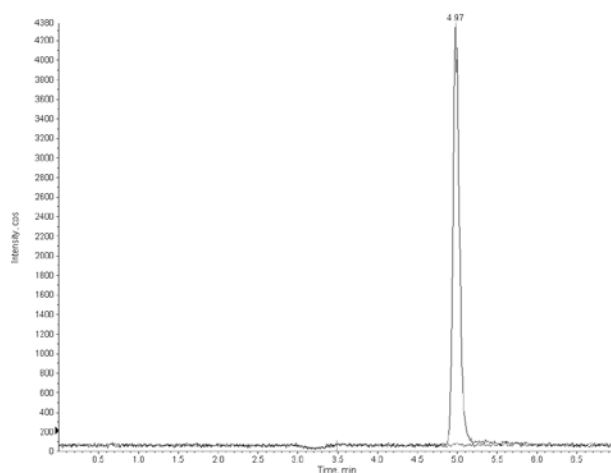


图 5 低浓度加标图

结论

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

DGLC-M-02 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定人血浆 中苯茆醇

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；人血浆；苯茆醇

DGLC-M-02 Determination of Lumefantrine in human blood plasma using on-line solid-phase extraction by HPLC with UV detection

Key words: on-line solid-phase extraction; HPLC; UV detection; human blood plasma; Lumefantrine

引言

苯茆醇是我国军事医学科学院发明的一种疗效好、毒性低的新型抗疟药，其可杀灭疟原虫血液裂殖体，主要用于恶性疟和抗药性恶性疟的治疗^[1,2]。

苯茆醇的分析方法目前主要有非水滴定法、紫外分光光度法、HPLC和TLC法等。

本文详细介绍了在线固相萃取（SPE）方法结合HPLC 紫外检测人体血浆中苯茆醇含量的方法。血浆样品在LiChrospher RP-8 RAM 柱上富集，之后在聚合物基质的IonPac NS 1及其保护柱NG 1上进行分离。此色谱柱固定相具有较强疏水性，总运行时间为22 min。

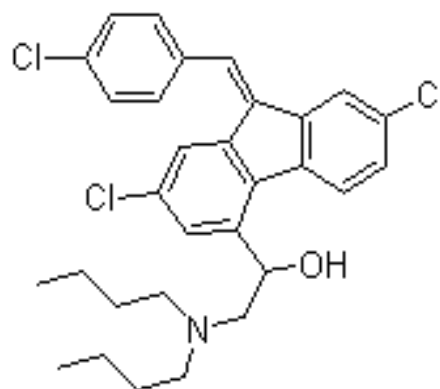


图1 苯茆醇结构图

测试条件

仪器型号：Ultimate DGP 3600 系统，包括有：带在线脱气单元的双三元梯度泵，自动进样器，带有两个二位十通阀的柱温箱，四通道紫外检测器，硬件连接参见图2-1和图2-2；在图2-1中，样品转移到SPE柱上进行浓缩。之后阀切换至图2-2位置，样品从SPE柱转移至保护柱NG1上，之后阀再次切换到图2位置，样品在分析柱NS1上进行分离。

分析柱：Analytical column: IonPac NS1, (10 μm, 4 mm×250 mm)

保护柱：IonPac NG1 (10 μm, 4 mm×35 mm)

SPE柱：LiChrospher RP-8 ADS (25 μm, 4 mm×25 mm) (Merck P/N 1502090001)

柱温：30 °C

检测波长：335 nm

进样量：5 - 50 μL

淋洗液组成及流速：见表1；

梯度淋洗条件：见表2。

表1 淋洗液组成及流速

分析泵(左泵)		富集泵(右泵)	
流动相 A	0.05% TFA 水溶液 (v/v)	流动相 A	水
流动相 B		流动相 B	0.1% TFA 甲醇溶液 (v/v)
流动相 B	MeOH	流动相 C	MeOH
流速	1.0 mL/min	流速	1.0 mL/min

表2 梯度淋洗条件

时间 (min)	富集泵		时间 (min)	分析泵 (B%)	时间 (min)	阀位置	
	(B%)	(C%)				左阀	右阀
0	5	25	0	95	0	1-2	10-1
6	5	25	22	95	6	1-2	1-2
6.1	60	0	—	—	8.4	10-1	1-2
6.5	95	0	—	—	9.6	1-2	1-2
11	95	0	—	—	17	1-2	10-1
13	5	25	—	—	—	—	—
22	5	25	—	—	—	—	—

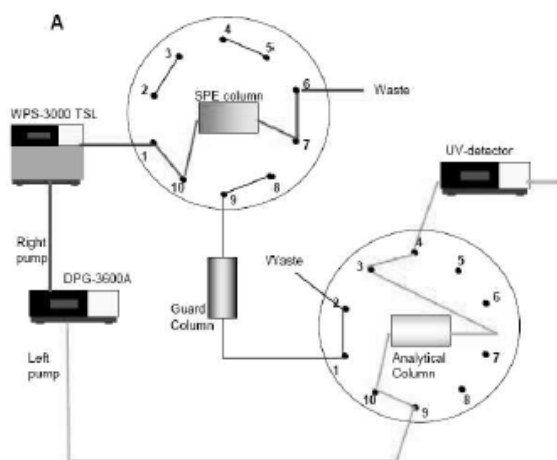


图2-1 SPE柱上样时的连接图

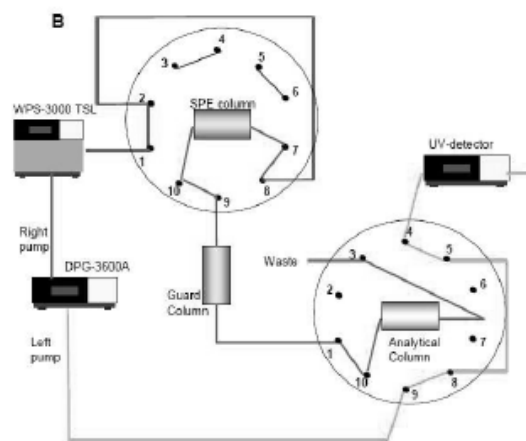


图2-2 样品由SPE柱转移至预柱连接图

图2 仪器连接图

样品前处理

血浆于4 °C下储存，取适量血浆样品，于14000 r/min离心10 min，取上清液过0.45 μm滤膜，待测。

苯芬醇标准品溶解于甲醇/乙酸混合溶液（99.8/0.2，v/v）中。

结果和讨论

标准品色谱图

选取高低两个浓度标准品进样，色谱图如下，高浓度10 μg/mL谱图参见图3，低浓度100 ng/mL谱图参见图4。

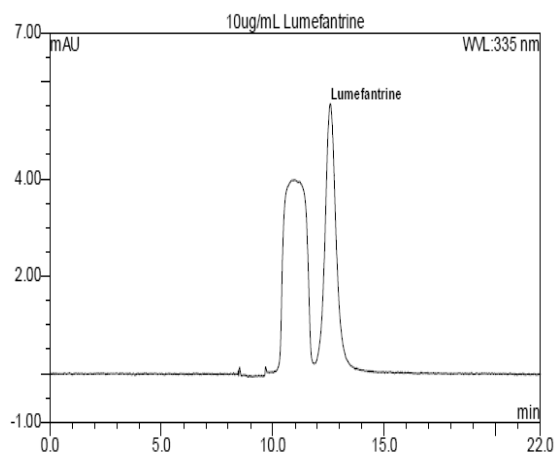


图3 标准溶液色谱图（浓度 10 μg/mL）

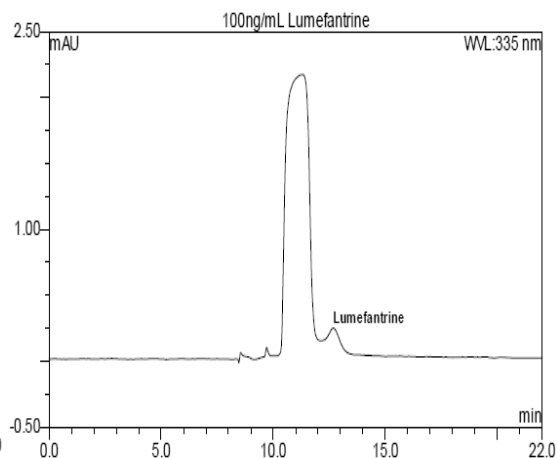


图4 标准溶液色谱图（浓度 100 ng/mL）

实际样品的分析

血浆样品及加标400 ng/mL的样品谱图参见图5和图6。

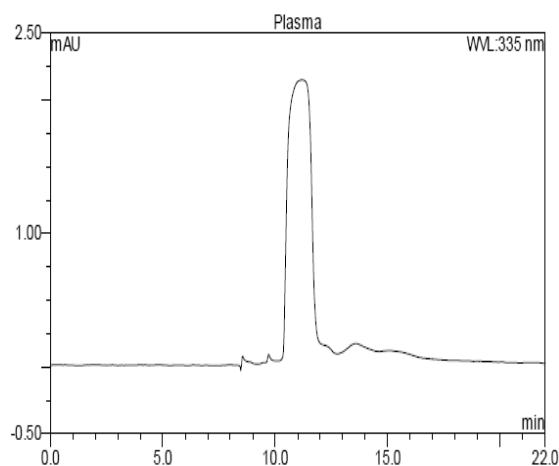


图5 血浆样品谱图

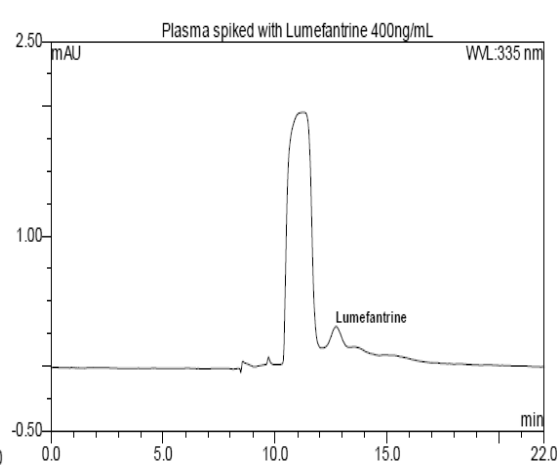


图6 血浆加标色谱图（加标浓度 400 ng/mL）

结论

本方法利用双三元液相色谱系统在线固相萃取技术，可实现样品基质与苯苄醇的分离。人血浆加标样品中可检测出苯苄醇，但在所需的浓度水平不能进行定量。将苯苄醇从SPE柱上洗脱下来的流动相条件（如高比例的甲醇、强酸性）使得后面的色谱分离比较困难。若使用其它选择性的柱子，例如在较高有机相条件下可以有效保留苯苄醇的柱子，则有可能改善分析状况。使用直径较小的分析柱有助于提高灵敏度。

参考文献

- [1]. 邓蓉仙, 滕翕和, 仲景星, 焦岫卿, 王云玲等. 抗疟新药本苄醇及亚油酸胶丸制剂, 国家发明一等奖, 1990
- [2]. 邓蓉仙. 我国近几年抗疟新药研究近展, 中国医药工业志1989, 20: 372

DGLC-M-03 在线固相萃取-高效液相色谱-质谱-质谱检测法测定人血浆中非索非那定

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；质谱-质谱检测；血浆；非索非那定

DGLC-M-03 Determination of Fexofenadine in human blood plasma by HPLC-MS-MS detection with On-Line Solid-Phase Extraction

Key words: on-line Solid-Phase Extraction; HPLC; MS-MS detection; human blood plasma; Fexofenadine;

引言

非索非那定（结构式见图 1）是一种抗组织胺药物，用于治疗花粉热和类似过敏症状。血浆中非索非那定 60-70%的是与血浆蛋白结合的。口服该药物 60 mg 后，1-3 小时内达到血药浓度峰值 209 ng/mL。

本文介绍了在线固相萃取（SPE）结合 HPLC-MS/MS 测定人体血浆中非索非那定含量。血浆样品在 Bio Trap 500 C18 柱上富集，该富集柱具有表面亲水、孔内疏水的特性，对分子量较大的血浆蛋白没有保留，对小分子药物可以进行在线富集。药物富集之后被转载至 Acclaim[®] C8 柱上进行分离。

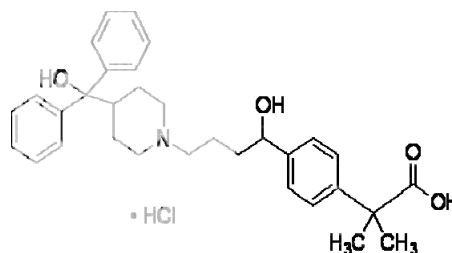


图 1 非索非那定结构式

测试条件

仪器型号：Ultimate DGP 3600 系统。包含带有在线脱气单元的双三元梯度泵；自动进样器；带有一个六通阀的柱温箱；API 2000 三冲四级杆质谱检测器。仪器连接图见图 2-1、图 2-1。

表 1 淋洗液组成及流速

分析泵(左泵)		富集泵(右泵)	
96%水/ 4% 异丙醇/ 0.2% 甲酸		40%10mmol/L NH ₄ OAC / 60% ACN; pH 7.0	
流速	2.0 mL/min	流速	1.5 mL/min

表 2 六通阀切换

时间 (min)	阀位置	描述
0	1-2	清洗及萃取
2.0	6-1	转载及分离
3.2	1-2	再平衡
5.0	1-2	

分析柱: Acclaim® C8, 5 μm, 50 × 4.6 mm

SPE 柱: Bio Trap 500 C18, 20 × 4.0 mm

柱温: 40 °C

自动进样器温度: 15 °C

进样量: 20 μL

淋洗液组成及流速: 见表 1; 等度淋洗;

六通阀切换时间见表 2;

质谱条件: 正离子模式, 分流比: 1: 10,

SRM 检测模式; 盐酸非索非那定质量离子对:

502.3/262.2, 内标物质量离子对: 389.2/201.1

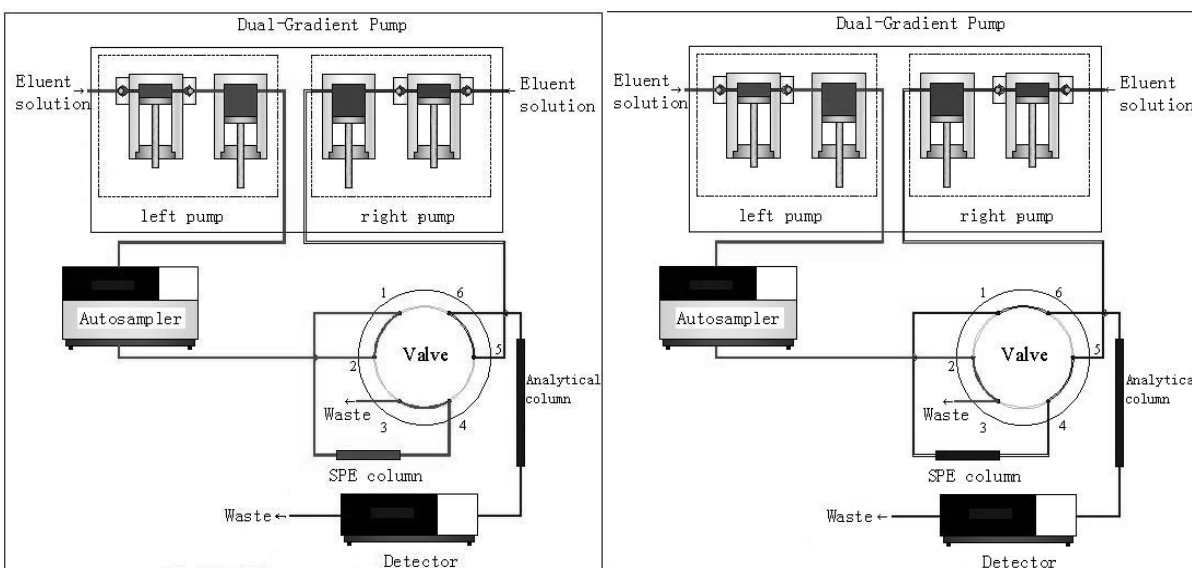


图2 仪器连接图

样品前处理

取 50 μL 内标 (盐酸西替利嗪) 加入到 1000 μL 已添加非索非那定的血浆样品中, 涡旋 30 秒, 10000 r/min 离心 8 min, 取上清液, 进样 20 μL。

结果和讨论

SRM 检测谱图

非索非那定 SRM 色谱图见图 3。包括在线固相萃取, 步骤在内每次测试时间约 5 min。

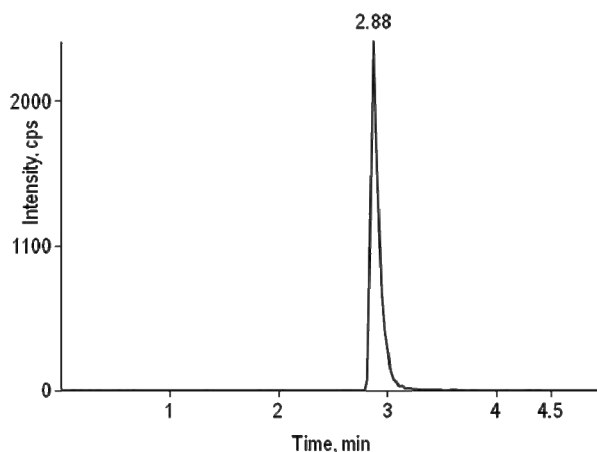


图 3 非索非那定色谱图 (489 ng/mL)

非索非那定保留时间约 2.9 min，内标物盐酸西替利嗪与非索非那定保留时间相同，通过质谱的 SRM 模式可以对其进行选择性检测，质谱图见图 5、图 6。

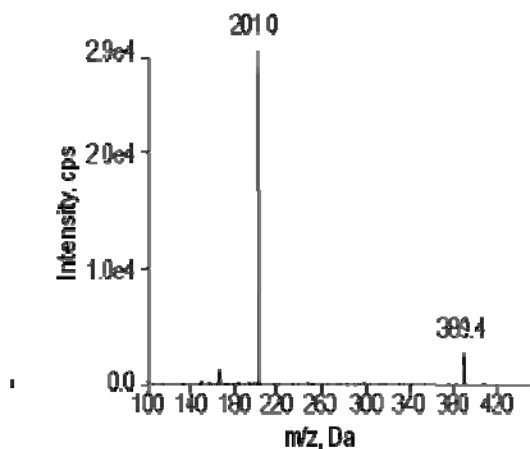


图 5 盐酸西替利嗪 (内标物)

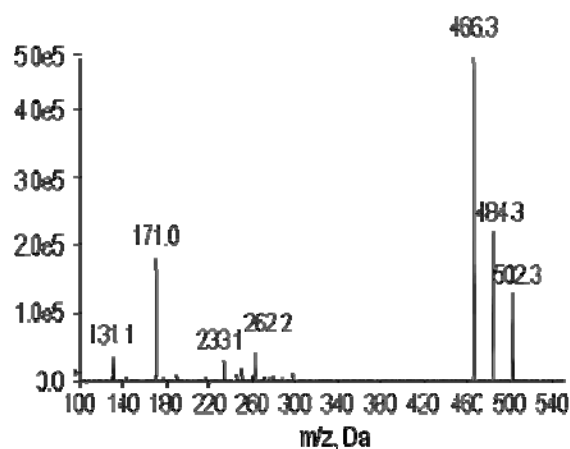


图 6 非索非那定

选择性

(1) 基质的干扰。

本实验选取了 6 种不同来源空白血浆，图 7 是 LQC 标准样品与空白血浆谱图叠加，基线放大图 (图 8) 显示无基质干扰。

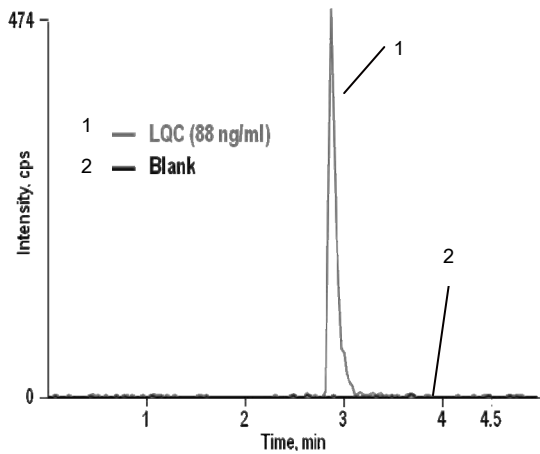


图6 LQC标准样品与空白血浆叠加图

(1. LQC 标准样品; 2. 空白血浆)

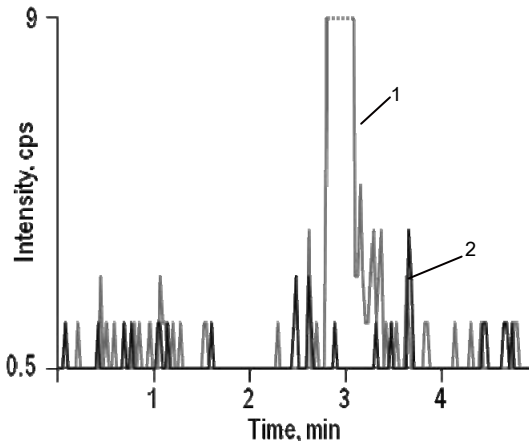
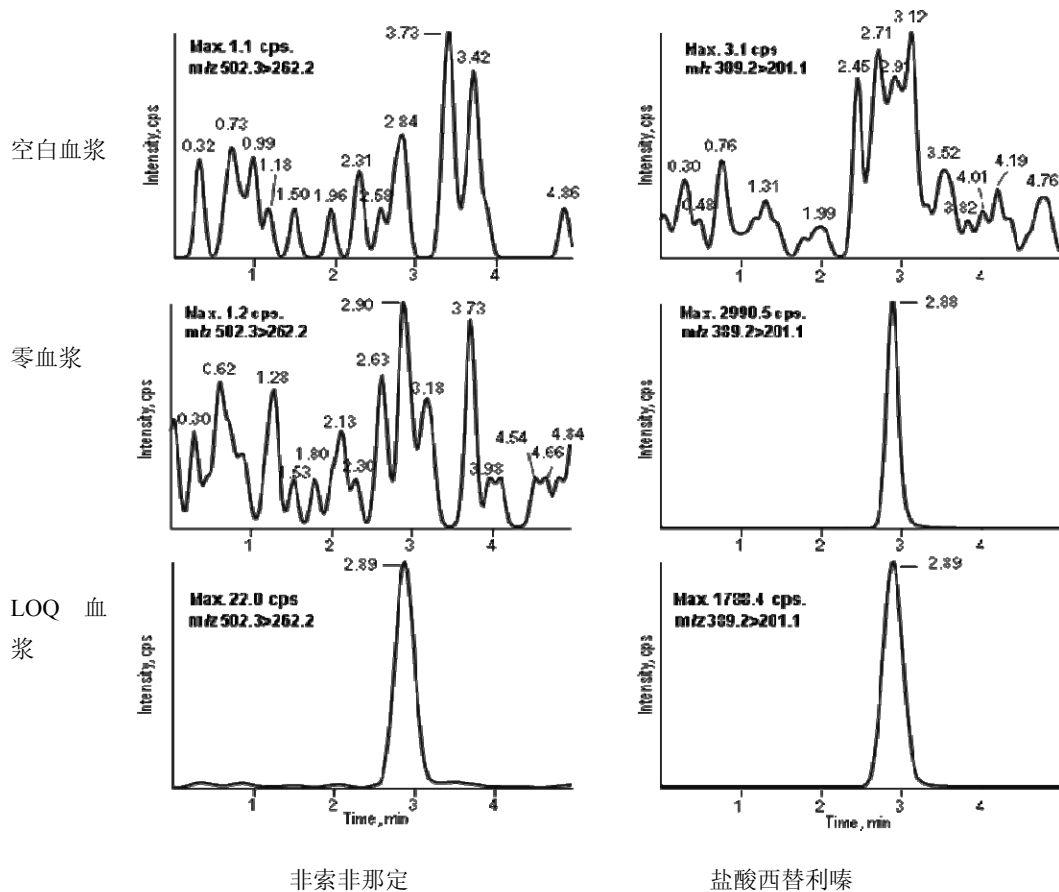


图7 LQC标准样品与空白血浆基线放大图

(1. LQC 标准样品; 2. 空白血浆)

(2) 内标物干扰

SRM 模式对非索非那定和内标物选择性良好 (见图 8)。空白血浆中未检测到非索非那定和内标物。零血浆 (只加内标物的血浆) 中检测到 389/201 的色谱图, 为内标物盐酸西替利嗪的特征峰。LOQ 标准样品中检测到非索非那定和内标物。



非索非那定

盐酸西替利嗪

图8 空白血浆、零血浆和 LOQ 标准样品的质谱图

准确度及精度

为了验证方法适用性,本实验制作了3日内的工作曲线,标准偏差均小于15% (见表3)。含非索非那定 10 ng/mL、30 ng/mL 的 LOQ 标品准确度分别为 88.77%和 96.84%。

表3 非索非那标准曲线数据

实际浓度 (ng/mL)	测定浓度 (ng/mL)			平均值 (ng/mL)	S.D	R.S.D(%)	平均准确 度 (%)
	第一天	第二天	第三天				
9.78	9.11	8.41	8.80	8.77	0.351	4.002	89.67
29.34	28.6	28.61	28.15	28.45	0.263	0.924	96.97
48.90	49.54	49.34	53.33	50.74	2.248	4.430	103.76
146.71	162.08	166.35	162.88	163.77	2.270	1.386	111.63
244.51	259.55	268.04	251.24	259.61	8.400	3.236	106.18
391.22	416.03	396.85	409.92	407.60	9.798	2.404	104.19
586.82	585.68	613.74	626.43	608.62	20.853	3.426	103.71
782.43	828.07	839.98	838.75	835.60	6.550	0.784	106.80
1173.65	1171.68	1136.60	1152.89	1153.72	17.555	1.522	98.30
1760.47	1693.9	1685.55	1662.05	1680.50	16.515	0.983	95.46
r	0.9992	0.9986	0.9985				
斜率	0.001	0.00094	0.00094				
截距	0.00233	0.00283	0.00115				

定量限

低含量样品(含 10 ng/mL 非索非那定)测定精度为 11.21% (符合小于 20 %的规定), 色谱峰信噪比约为 10 (符合大于 5 的规定)。因此, 10 ng/mL 可以被定为定量限。

SPE 柱寿命

本实验使用了两个 BioTrap 500 SPE 柱, 第三天的工作曲线是在新柱上测定后绘制的。实验表明, 新柱与已使用了 800 次的旧柱效果相同。图 10 为旧 SPE 柱分析样品的谱图, 图 11 为使用新柱子测得的谱图。非索非那定与内标物的 SRM 信号比例相同。另外, 研究了非索非那定和内标物在分析柱上的保留时间稳定性。结果显示在每次进样 20 μ L 的情况下, SPE 柱可以使用 800 次以上。

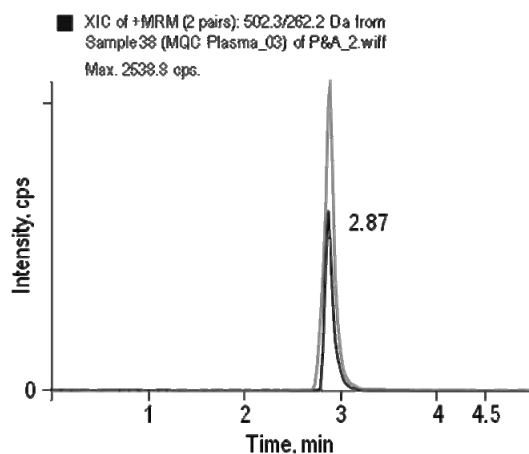


图 10 旧 SPE 柱测得的谱图

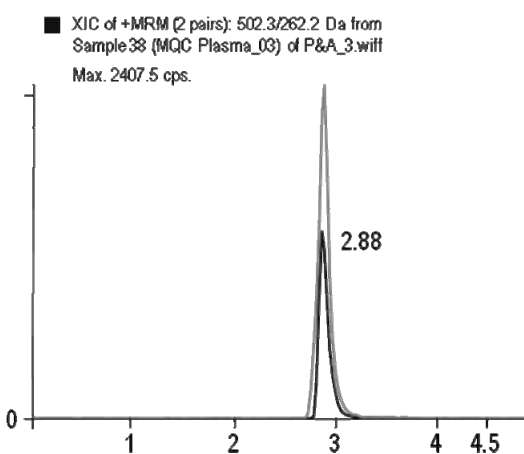


图 11 新 SPE 柱测得的谱图

结论

本研究使用 UltiMate 3000 双三元液相色谱系统,利用在线固相萃取-高效液相色谱-质谱联用法测定人血浆中非索非那定。

全自动在线固相萃取测定血浆中非索非那定,样品前处理程序大大简化,样品通量高,该方法的准确度、精确度和线性相关系数符合 ICH 规定^[1],非索非那定定量限为 10 ng/mL。

参考文献

- [1]. Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). May 2001.

DGLC-M-04 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定鼠血浆

中氢氯噻嗪和尼群地平

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测器；鼠血浆；氢氯噻嗪；尼群地平

DGLC-M-04 Determination of Hydrochlorothiazide and Nitrendipine in rat plasma samples with HPLC-UV detection by online solid-phase extraction

Key words: online solid-phase extraction; HPLC; UV detection; rat plasma; Hydrochlorothiazide; Nitrendipine

引言

在用大鼠进行抗高血压联合用药氢氯噻嗪和尼群地平（结构图见图 1）药代动力学实验中，每次取血量有限，且血药浓度较低，要求最好可同时测定氢氯噻嗪和尼群地平。

此两种药物同时检测的分析方法报道很少，多数是对两药分别建立分析方法^[1, 2]。

原因主要有两个：一，尼群地

平口服吸收存在首过效应，体内血药浓度值低，大约 1-50 ng/mL 在这个检测浓度条件下，多采用液质联用技术进行分析，而此两种药物在质谱工作条件下一个是正离子模式，一个是负离子模式，同时检测不方便；二，尼群地平和氢氯噻嗪极性相差较大，同时提取和分析困难较大。

本文主要介绍使用戴安公司 UltiMate 3000 双三元梯度液相色谱系统对尼群地平和氢氯噻嗪同时测定的方法。

测试条件

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

分析柱：Acclaim[®] 120 C18 (5 μ m, 4.6mm \times 250mm)；

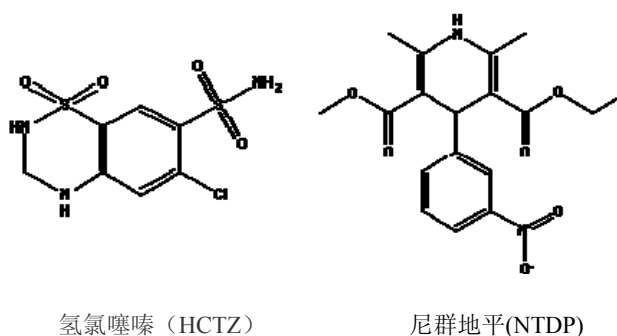


图 1 氢氯噻嗪和尼群地平结构图

富集柱: CAPCELL MF C8 (4.0mm×10mm)

柱温: 30 °C

自动进样器温度: 20.0°C

检测波长: 氢氯噻嗪 271 nm

尼群地平 237 nm

进样量: 100 μL

淋洗液组成及流速: 见表 1;

右泵梯度淋洗条件: 见表 2。

表 1 淋洗液组成及流速

富集泵 (Left Pump)	分析泵 (Right Pump)		
	甲酸水溶液 pH=3.00 流速 1.0 mL/min	流动相 A	ACN
		流动相 B	甲酸水溶液, pH=3.00
	流速	1.0 mL/min	

表 2 右泵梯度淋洗条件

时间	分析泵 (B%)	阀位置	备注
0	80	1-2	进样、富集柱富集, 开始信号采集
1.4	80	6-1	阀切换, 将氢氯噻嗪转载至分析柱
2.5	80	1-2	阀切换, SPE 柱切回到富集流路
9	80	1-2	等度洗脱
10	40	1-2	变化流动相比例
10.5	40	6-1	阀切换, 将尼群地平转载至分析柱
15	40	1-2	阀切换, SPE 柱切回到富集流路
24	40	1-2	等度洗脱
25	80	1-2	分析柱平衡, 为下一针做准备
34	80	1-2	分析完成

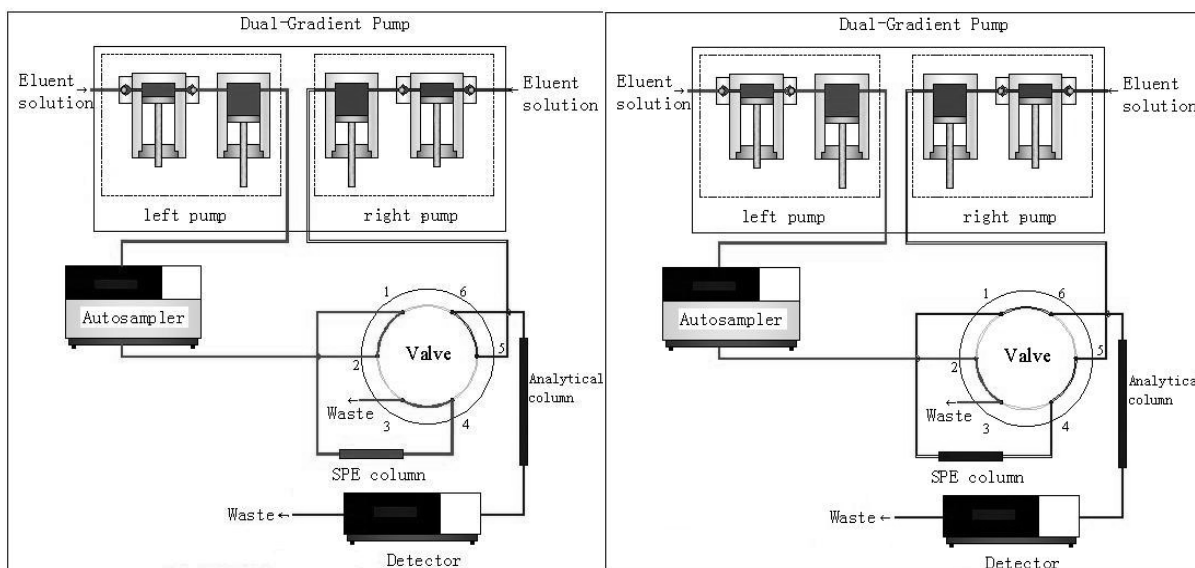


图2-1 阀1-2位相通时连接图

图2-2 阀1-6位相通时连接图

图2 仪器连接图

样品前处理

血浆样品于4℃下，10000 r/min高速离心后，取上清液，用0.22 μm尼龙滤膜过滤，滤液待测。

结果和讨论

色谱柱的选择及色谱条件优化

本实验分别在 CAPCELL MF C8、CAPCELL MF Ph-1 和 CAPCELL MF SCX 三种 SPE 上测试了氢氯噻嗪的保留情况，CAPCELL MF C8 对其保留最好，同时该柱对尼群地平也能非常好的保留，故选择此柱作为在线 SPE 柱。

在流通阀切换时间的确定上，本实验中两次将 SPE 柱切入分析流路分别转载两个组分，原因是氢氯噻嗪（HCTZ）保留较弱，第一次转载时血浆基体不能完全流出（见图 3），当把氢氯噻嗪完全转移至分析柱后马上将 SPE 柱切换到富集流路，使血浆基体完全流出后，再次将 SPE 柱切入分析流路对尼群地平（NTDP）进行转载。

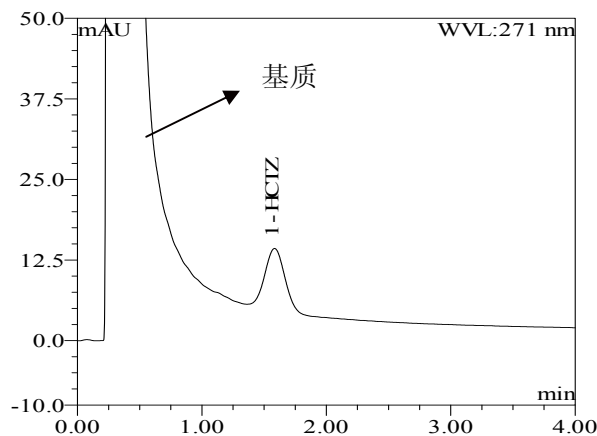


图 3 血浆加标氢氯噻嗪样品在 SPE 柱上流出情况

标准品色谱图

根据优化好的色谱条件，单次进样可同时检测氢氯噻嗪及尼群地平。氢氯噻嗪标准品色谱图如图 4-1，检测波长 271 nm；尼群地平标准品色谱图如图 4-2，检测波长 237 nm。

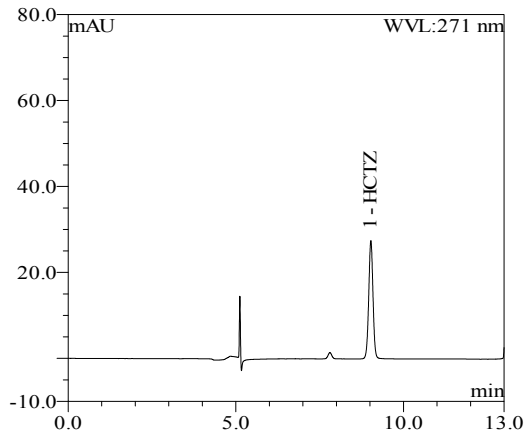


图 4-1 氢氯噻嗪 (3.3 ppm)

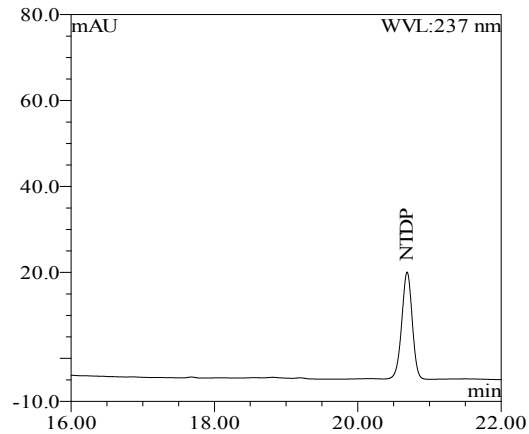


图 4-2 尼群地平 (3.3 ppm)

线性、检出限

取大鼠血浆适量，逐级稀释，配制同时含有尼群地平 and 氢氯噻嗪 5、10、20、50、100、500、2000 ng/mL 的血浆溶液 300 μ L，于 4 $^{\circ}$ C 下 10000 r/min 高速离心，上清液用 0.22 μ m 的微孔尼龙滤膜过滤后，取 100 μ L 血浆进样，进行 HPLC 分析，将测定所得的尼群地平和氢氯噻嗪紫外吸收的峰面积与对应的血药浓度作图，得出尼群地平和氢氯噻嗪血浆中药物浓度的标准曲线，尼群地平和氢氯噻嗪均采用权重 1/C 进行权重分析。尼群地平的标 准曲线为 $A=0.0061C-0.0047$ ， $R=0.9991$ ；氢氯噻嗪的标准曲线为 $A=0.0047C+0.0060$ ， $R=0.9991$ 。

以空白血浆分别加标 5 ng/mL 氢氯噻嗪和 5 ng/mL 尼莫地平样品谱图 为参照，以 3 倍信噪比计算检出限，血样中药品检出限：氢氯噻嗪 2.5 ng/mL，尼莫地平 2 ng/mL。增大血浆进样量，可以检测更低浓度样品。

实际样品的分析

取大鼠血浆进样，色谱图见图 5-1、图 5-2。

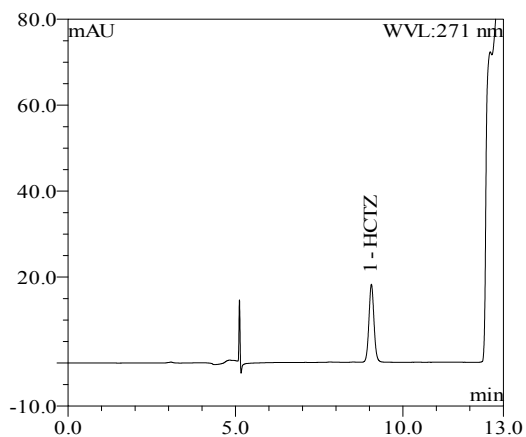


图 5-1 大鼠血浆中氢氯噻嗪

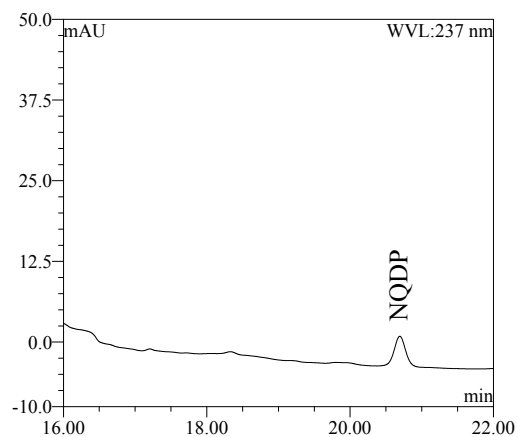


图 5-2 大鼠血浆中尼群地平

精密度与准确度

取大鼠血浆适量,精密配制含有高中低三个浓度的尼群地平和氢氯噻嗪的血浆样品,当天每隔两个小时取 100 μ L 进样,共 3 次,进行 HPLC 分析,考察日内精密度。另选择 2 天,精密配制含有高中低三个的尼群地平和氢氯噻嗪的血浆样品,每天测一次,考察日间精密度。尼群地平测定精密度见表 3,氢氯噻嗪测定精密度如表 4 所示,由表可知样品日间精密度和日内精密度均小于 2.5%,精密度良好,样品测定准确。

表 3 尼群地平精密度 (n=3)

浓度 (ng/mL)	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{C} \pm SD$	RSD (%)	$\bar{C} \pm SD$	RSD (%)
10	9.52 \pm 0.18	1.9%	9.20 \pm 0.20	2.2%
50	52.83 \pm 0.48	0.9%	51.20 \pm 0.51	1.0%
500	496.34 \pm 4.96	1.0%	484.36 \pm 5.81	1.2%

表 4 氢氯噻嗪精密度 (n=3)

浓度 (ng/mL)	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{C} \pm SD$	RSD (%)	$\bar{C} \pm SD$	RSD (%)
20	21.04 \pm 0.21	1.0%	20.82 \pm 0.27	1.3%
200	198.51 \pm 1.59	0.8%	192.11 \pm 1.73	0.9%
2000	2032.54 \pm 10.16	0.7%	2011.13 \pm 20.11	1.0%

回收率

取大鼠血浆适量,精密配制含有高中低三个浓度的尼群地平和氢氯噻嗪的血浆 3 份,取 100 μ L 进样,进行 HPLC 分析。尼群地平的回收率见表 5,氢氯噻嗪回收率见表 6。由表可知尼群地平的回收率较高,重现性好。氢氯噻嗪的回收率在高浓度时稍低,但符合测定要求。分析原因主要是氢氯噻嗪的流出时间与基质流出时间相近,SPE 柱对氢氯噻嗪的保留能力较弱,当大量血浆蛋白存在时,其在 SPE 柱上的保留受基质的干扰,故回收率偏低,对于高浓度样品相对更明显。

表 5 尼群地平回收率 (n=3)

浓度(ng/mL)	$\bar{C} \pm SD$	回收率(%)	RSD (%)
10	9.52 \pm 0.18	92.0%	1.9%
50	52.83 \pm 0.48	104.4%	0.9%
500	496.34 \pm 4.96	94.5%	1.0%

表 6 氢氯噻嗪回收率 (n=3)

浓度 (ng/mL)	$\bar{C} \pm SD$	回收率(%)	RSD (%)
20	21.04±0.21	94.9%	1.0%
200	198.51±1.59	84.9%	0.8%
2000	2032.54±10.16	80.2%	0.7%

结论

本研究利用戴安公司UltiMate 3000 双三元梯度液相色谱系统建立了同时检测氢氯噻嗪和尼群地平的分析方法。该方法方便,准确,重现性好,适合对血浆样品定量分析。用CAPCELL MF C8固相萃取柱对血浆进行在线前处理,避免手动样品前处理带来的误差,样品基质干扰少,此分析方法可以为进一步的药代动力学-药效学联合模型建立提供支持。

参考文献

- [1]. 《中国药典 2005 版》 第二部, 氢氯噻嗪
- [2]. 《中国药典 2005 版》 第二部, 尼群地平

DGLC-M-05 在线固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定 血浆中的抗真菌药

关键词：在线固相萃取；高效液相色谱；紫外检测；血浆；抗真菌药物

DGLC-M-05 Analysis of Antimycotic Drugs in Biofluids by On-Line SPE-LC with UV detection

Key words: on-line SPE; HPLC; UV detection; biofluids; Antimycotic Drugs

引言

以酮康唑为代表的抗真菌药用于抵抗各种真菌疾病。定量测定血浆中此类药物可用于治疗监测。传统测定血浆中此类药物一般要经过沉淀蛋白/离心，液液萃取，过滤以及离线 SPE 处理，操作繁琐、费时，样品通量低，费用高昂。

目前，在线 SPE-HPLC 技术正好可以克服上述缺点。

本文描述了 Dionex 公司提供的在线 SPE-HPLC 技术测定血浆中抗真菌药物的方法。

测试条件

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

在线过滤装置：FK7400（Recipe GmbH，德国慕尼黑）

分析柱：Acclaim 120 C8，3 μm ，150 \times 4.6 mm

保护柱：Acclaim 120 C8，5 μm ，10 \times 4.3 mm

富集柱：LiChrospher ADS RP-4，25 μm ，25 \times 4 mm，截留分子量15000道尔顿

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：260 nm

进样量：100 μL

淋洗液组成及流速：见表 1；

梯度淋洗条件：见表 2。

表 1 淋洗液组成及流速

	left pump (分析泵)	right pump (富集泵)
流动相 A	纯水	
流动相 B	乙腈	
流动相 C	0.01 mol/L 醋酸铵	

表2 梯度淋洗条件

时间 (min)	Left Pump (分析泵)			Right Pump (富集泵)			阀		
	流速 (mL/min)	A%	B%	C%	流速 (mL/min)	A%		B %	C%
0.0	1.2	0	45	55	2	98	2	0	1-2
2.0		0	45	55					
2.1					1				1-6
9.0		0	85	15		98	2	0	
9.1						10	90	0	
10.0		0	45	55		10	90	0	
10.1					2	98	2	0	1-2
13		0	45	55		98	2	0	

样品前处理方法

血浆样品保存在-20℃冰箱中，分析前在 15000 g 下离心 10 min。取上清液，待测。

结论

该方法需要两种关键技术：

一是需要采用限制性媒介固相萃取（RAM-SPE）小柱。此种小柱的填料为多孔硅胶或者交联聚合物，具有体积排阻（SEC）和反相作用（RP），能够阻挡血浆中大分子（如蛋白质，核酸，多糖）进入分析柱并同时保留药物成分，从而降低血浆中大分子的干扰并延长分析柱寿命。

二是需要两个梯度泵以及能与之相应的色谱工作站。两个梯度泵中，一个梯度泵用来做 on-line SPE；一个泵用来平衡分析柱并进行分析。色谱工作站要能够满足控制双泵协同作用、控制阀切换等功能。而戴安公司的双三元高效液相色谱仪以及 Chromeleon 色谱工作站恰恰能满足这个要求。

在线 SPE-HPLC 的基本过程如图 1：样品首先载入 SPE 柱上进行净化富集（图 1 左），净化富集完毕后转移到分析柱上（图 1 中），然后进行分离检测（图 1 右）。

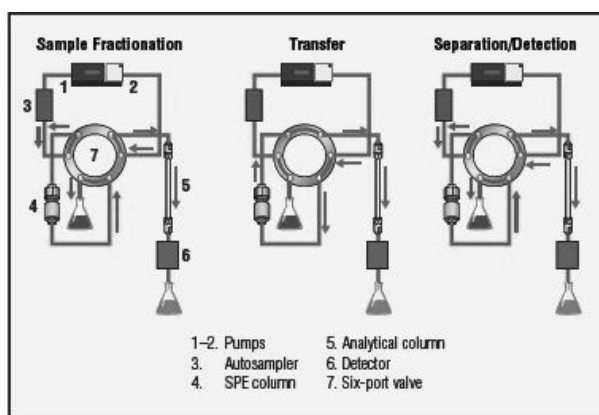
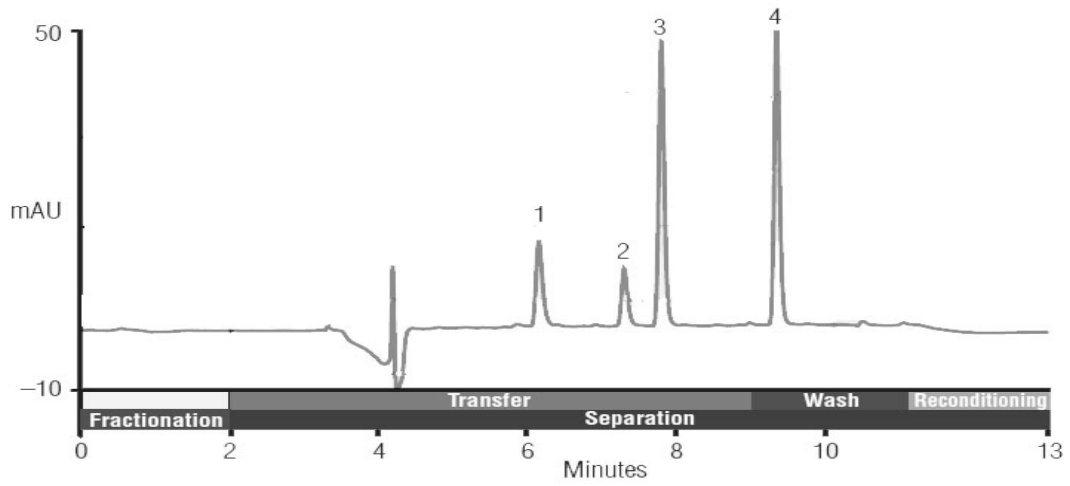


图1 典型的On-line SPE-HPLC过程

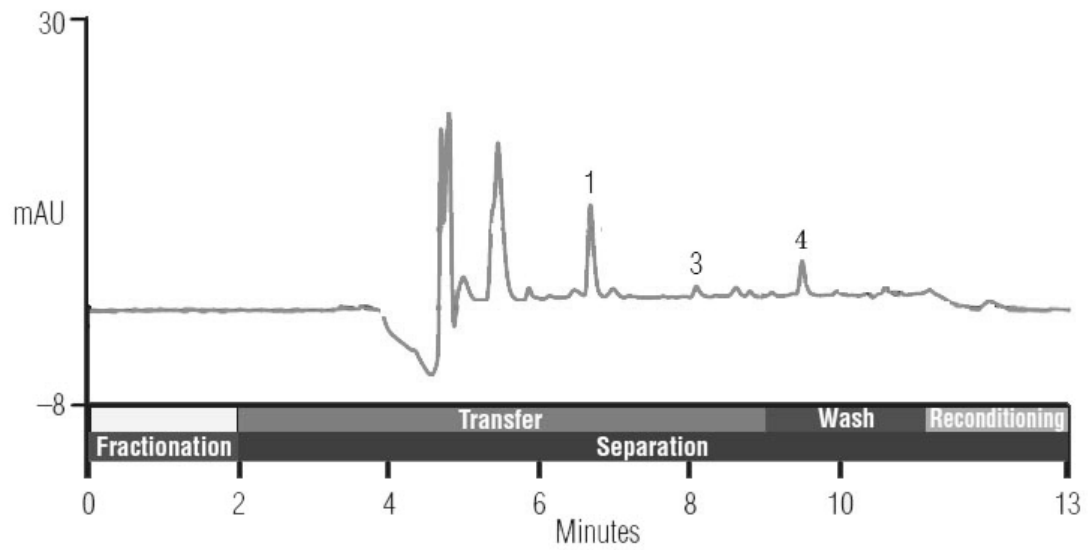
本方法可以使血浆中的四种抗菌素：酮康唑，伏立康唑，伊曲康唑以及其代谢产物 1-羟基伊曲康唑在 13min 中内完成分离（图 2 及图 3）。

使用 RAM-SPE 固相萃取柱，以每针进样 100uL 体积计，可以重复进样 300 次。



1 伏立康唑 1015 $\mu\text{g/L}$; 2 酮康唑 980 $\mu\text{g/L}$; 3 1-羟基伊曲康唑 1254 $\mu\text{g/L}$; 4 伊曲康唑 1327 $\mu\text{g/L}$

图2 空白血浆加标色谱图



1 伏立康唑 322.9 $\mu\text{g/L}$; 3 1-羟基伊曲康唑 24.3 $\mu\text{g/L}$; 4 伊曲康唑 74.3 $\mu\text{g/L}$

图3 服用药物病人血浆色谱图

戴安中国有限公司

香港总部

香港新界葵涌兴芳路223号
新都会广场1座16楼1618-1619室
电话: (852) 24283282
传真: (852) 24287898
E-mail: dionex@dionex.com.hk

北京代表处

北京市朝阳区安定路33号
化信大厦A座606室
邮编: 100029
电话: (010) 64436740
(010) 64436741
传真: (010) 64432350
E-mail: beijing@dionex.com.cn

上海代表处/维修站

上海淮海中路1号
柳林大厦2311室
邮编: 200021
电话: (021) 63735493
(021) 63735348
传真: (021) 63848294
E-mail: shanghai@dionex.com.cn

应用研究中心

北京市海淀区双清路18号
中科院生态环境中心
邮编: 100085
电话: (010) 62849182
传真: (010) 62849239
E-mail: Dionex_App@dionex.com.cn

上海应用中心

上海市张江高科哈雷路
1133办公楼407室
电话: (021) 58957001

维修服务中心

北京市朝阳区安定路33号
化信大厦A座606室
邮编: 100029
电话: (010) 64436740
(010) 62936510
传真: (010) 62923552
E-mail: service@dionex.com.cn

广州联络处/维修站

广州市天河区天府路237号
华建大厦C座906室
邮编: 510630
电话: (020) 85613258
传真: (020) 85613258
E-mail: penghong@dionex.com.cn

成都联络处/维修站

四川省成都市顺城大街308号
冠城广场8楼F座
邮编: 610017
电话: (028) 86528208
传真: (028) 86528204
E-mail: chengdu@dionex.com.cn

广西联络处/维修站

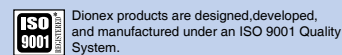
南宁市民族大道38-2号
泰安大厦金座2102室
邮编: 530022
电话: (0771) 5889801
传真: (0771) 5889609
E-mail: liugangqian@dionex.com.cn

戴安公司客户服务专线:

400-610-0104
400邮箱: 400@dionex.com.cn



中文网址: www.dionex.com.cn



Dionex products are designed, developed, and manufactured under an ISO 9001 Quality System.

2011 Dionex Corporation. All trademarks and registered trademarks are the property of Dionex Corporation.

2011年2月印于北京



IC | HPLC | EXTRACTION | PROCESS | AUTOMATION