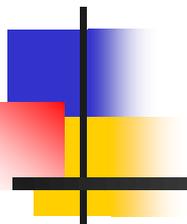


# 高效液相色谱法测定血浆中 氧氟沙星含量（内标法）

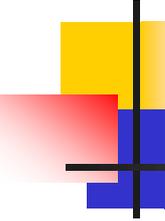




# 一、实验目的

---

- 掌握高效液相色谱法的分离原理、仪器构件及使用方法。
- 掌握生物样品前处理技术之液液提取法。
- 掌握内标一点定量法。



## 二、实验原理

输液系统

进样和分离  
系统

检测系统

数据处理和显  
示系统

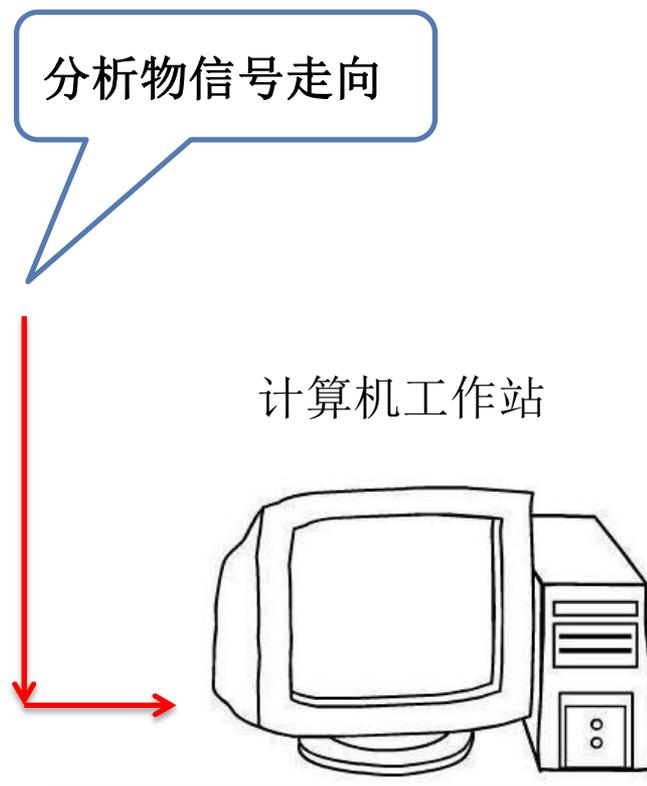
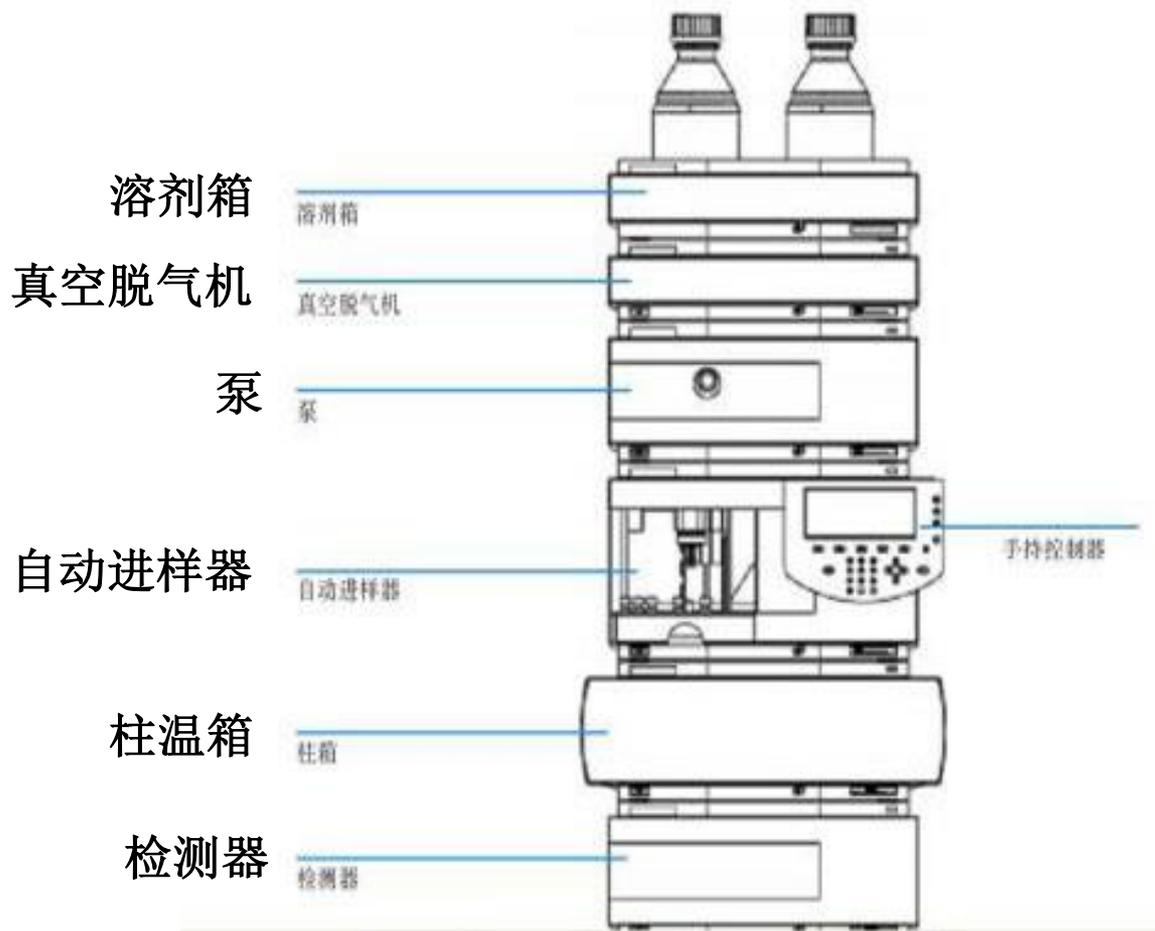
高压泵、进样器、色谱柱、检测器、数据处  
理器和显示器

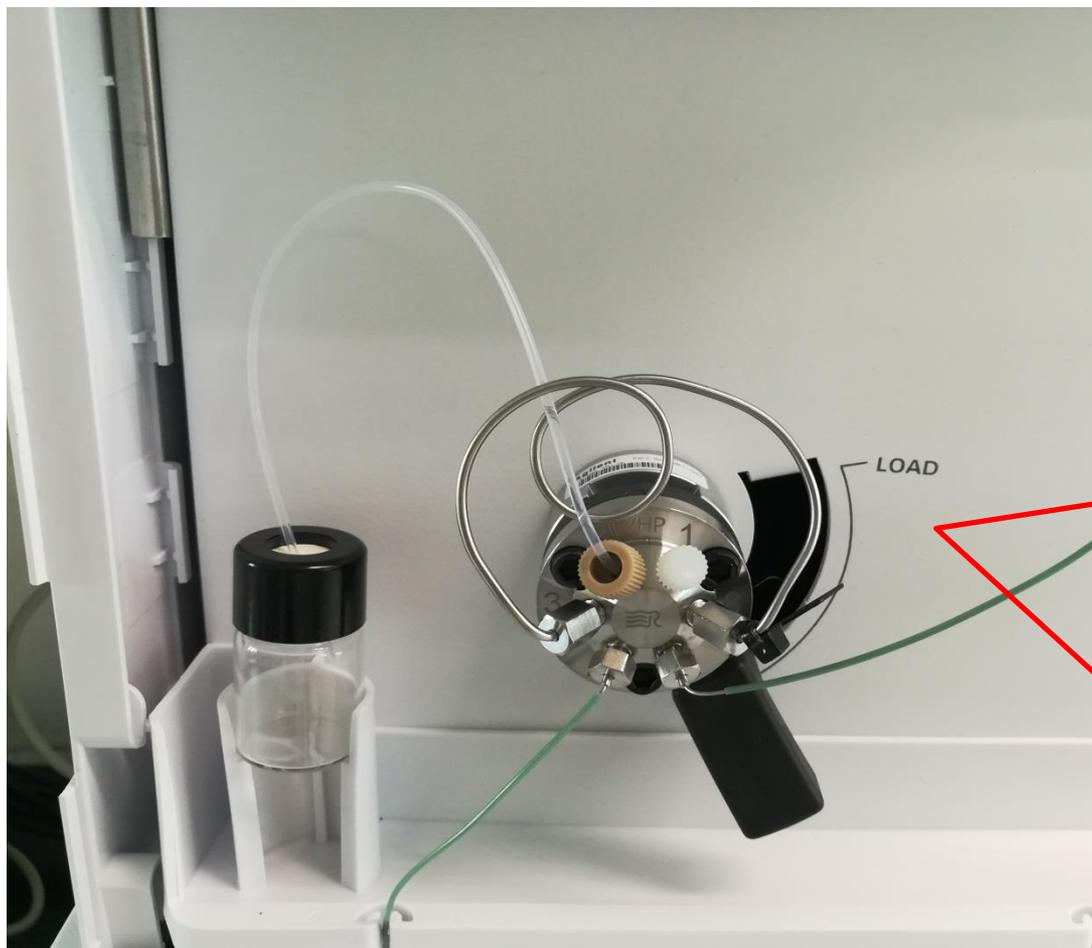
# 常用术语

## 操作部分

- ▶ 脱气（排除系统中的气泡）
- ▶ 平衡（活化柱子）
- ▶ 按方法开始实验
- ▶ 冲洗柱子（防止柱子堵塞）
- ▶ **Standby/Off**（实验结束后停止）

# 常用术语





## 手动进样器

- 进样针置于注射位置，进样时扳至 **load** 位置，进样后扳于 **inject** 位置5秒后，再取下进样器
- 不用时处于 **inject** 位置

Sample Name: new std

样品名

样品位置

```

=====
Acq. Operator   : ly                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 1
Injection Date  : 5/23/2014 11:24:54 AM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\2014-05-23 11-24-38\20140513.M
Last changed   : 5/23/2014 11:24:37 AM by ly
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\DEF.LC.M
Last changed   : 5/23/2014 3:18:11 PM by ly
                (modified after loading)
=====

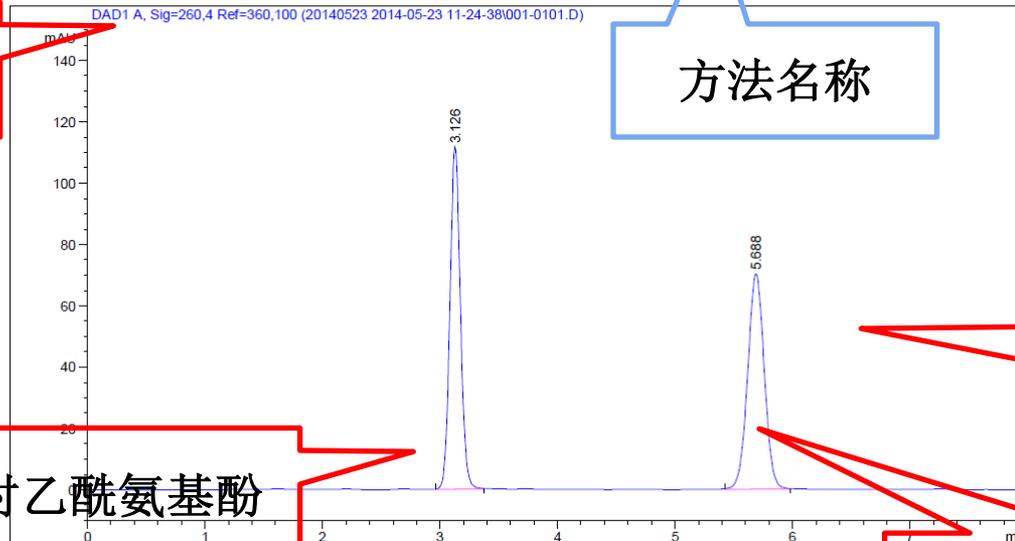
```

文件名称

进样量

检测波长

方法名称



色谱图

对乙酰氨基酚

非那西丁 (内标)

Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=260,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.126	BB	0.0960	689.19470	111.64135	49.8950
2	5.688	BB	0.1529	692.09418	70.26131	50.1050

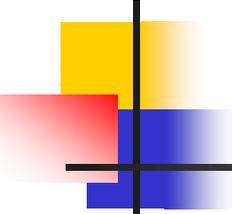
保留时间

峰面积

```

Totals :                               1381.28888  181.90266

```



# 生物样品前处理

---

## 液液提取（有机溶剂提取法）

- A. **目的：**一次即可除去大部分杂质
- B. **有机溶剂的特性：**对被测组分的溶解度大：沸点低，易于浓集、挥散；与水不相混溶、化学稳定、不易乳化等。最常用的溶剂是乙醚、氯仿和乙酸乙酯等。
- C. **有机溶剂相和水相的体积：**一般有机相与水相（体液样品）容积比1:1或2~5:1。
- D. **水相的pH值：**生物样品宜在碱性或近中性提取，生物基质中内源性物质多为酸性，在碱性下不易被萃取出来



# 内标法测定生物样品中药物含量

---

## 内标法优点：

进样量不超量时，重复性及操作条件对结果无影响  
只需待测组分和内标物出峰，与其他组分是否出峰无关，  
适合测定微量组分，分为工作曲线法和内标一点法；

## 内标法缺点：

制样要求高；找合适内标物相对困难。



# 内标法测定生物样品中药物含量

---

## 内标物的选择

- 对内标物要求：

内标物须为原样品中不含组分；

内标物与待测物保留时间应接近且 $R > 1.5$ ；

内标物为高纯度标准物质，或含量已知物质。



# 高效液相色谱法测定血浆中氧氟沙星含量

---

## 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C18 柱 (250×4.6mm, 5 $\mu$ m)

流动相: 0.2%三氟乙酸溶液 : 甲醇 (V/V) =58:42

流速: 1.0mL/min

进样量: 20 $\mu$ L

荧光检测器: Ex 298nm Em 500nm

保留时间: 氧氟沙星3.0min, 环丙沙星 (内标) 4.2min



# 高效液相色谱法测定血浆中氧氟沙星含量

血样处理（从冰箱中刚取出的血样要解冻涡旋混匀！）

## ■ 液液提取法

### 做好标记

吸取内标液（ $125\ \mu\text{g}/\text{L}$ ） $20\ \mu\text{L}$ 置于 $5\text{mL}$ 离心管中，然后加入 $250\ \mu\text{L}$ 血样，涡旋混匀；

加入二氯甲烷 $2.5\text{mL}$ ，涡旋混合 $2\text{min}$ ， $3600\text{rpm}$ 离心 $10\text{min}$ ，吸取下清液 $1\ \text{mL}$ 置于 $10\text{mL}$ 尖底离心管中， $50^\circ\text{C}$ 水浴下挥干，残渣用 $100\ \mu\text{L}$ 流动相溶解进样。



# 高效液相色谱法测定血浆中氧氟沙星含量

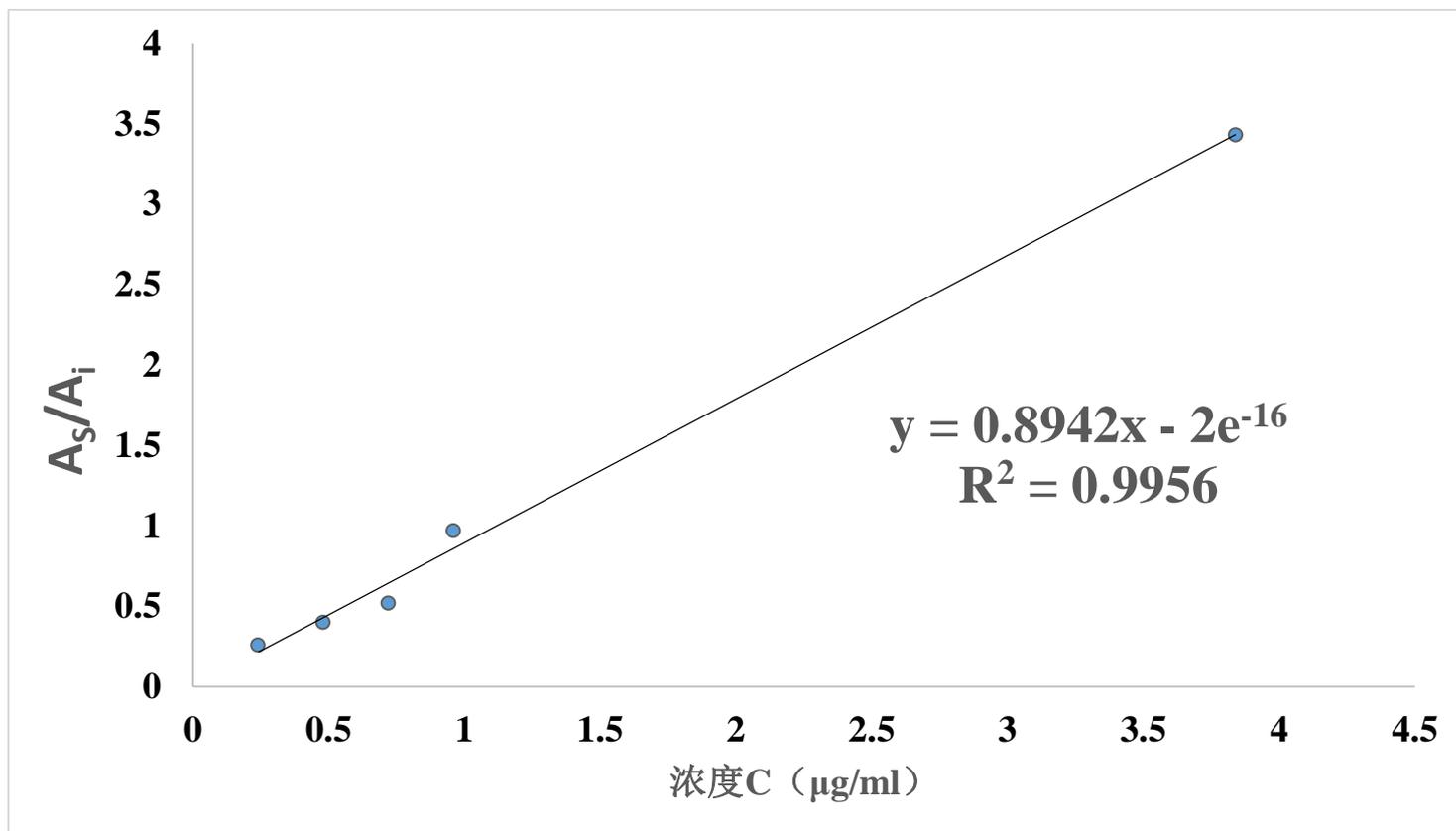
---

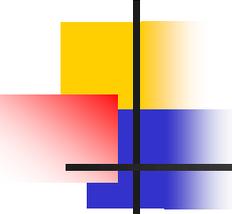
## 进样检测

- 进样体积70~80 $\mu$ L，用微量进样器取样

*吸取样品时注意排除气泡*

# 液液提取法标准曲线 (Agilent1220)





## 标曲点

编号	理论浓度C ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	样品峰 面积A	内标峰 面积A	计算浓度C ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
B1	0.24			
B2	0.48			
B3	0.72			
B4	0.96			
B5	1.92			
B6	3.84			



## 样品点

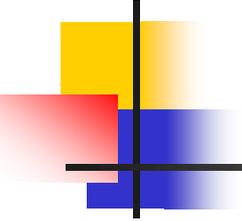
编号	理论浓度C ( $\mu\text{g/mL}$ )	样品峰 面积A	内标峰 面积A	计算浓度C ( $\mu\text{g/mL}$ )	回收率 (%)
S3	1.15				
S4	1.75				
S5	3.40				



## 数据说明

---

- 八个人一台仪器，四到五人一组做一根标曲和一个样品点，相当于每台仪器做两根标准曲线，若线性不好,可参考同组另一根标曲同浓度结果。如果不行，可舍弃两个浓度点。
- 各组请标记好自己的样品名称，每台仪器样品用A、B、C.....标记，组内用大小写进行区分。
- 根据标曲计算你的样品实际浓度，然后根据给出的理论浓度计算含量



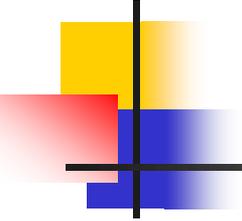
# 实验报告

---

- 一、实验目的
- 二、实验原理

有关高效液相色谱的原理和生物样品前处理中液液提取的原理和内标物选择原理。

- 三、实验操作
  1. 血样前处理（注明自己的编号）
  2. 色谱条件



# 实验报告

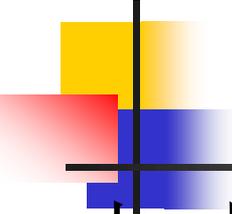
---

## ■ 四、结果与计算

1. 分别列出标准品和内标物、样品和内标物的保留时间和峰面积；

2. 根据所得数据，以标准品和内标物的峰面积比值和相应浓度计算线性方程，列出方程和回归系数。

3. 根据线性方程，计算一个样品的浓度，并给出准确度是否符合要求的结论。（实验报告后附上自己组一张色谱图）



# 实验报告

---

## 七、思考题

1. 紫外检测器与荧光检测器的适用范围？
2. 外标法与内标法的区别是什么？
3. 表2中，S4~S5的测定方法的准确度是否符合要求？

（请查阅2015版药典中“生物样品定量分析方法验证”指导原则）