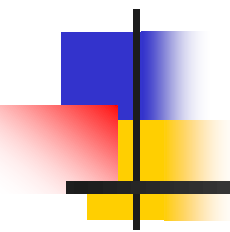


高效液相色谱法测定血浆中 氧氟沙星含量-外标法





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蛋白沉淀法。



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



二、实验原理

常见高效液相检测器类型

1. 紫外检测器
2. 荧光检测器
3. 电化学检测器
4. 示差折光检测器
5. 蒸发光散射检测器
6. 化学发光检测器
7. 质谱检测器



二、实验原理

1. 紫外检测器

- 应用最广泛的检测器
- Lambert-Beer定律，即被测组分对紫外光或可见光具有吸收，且吸收强度与组分浓度成正比
- 优点：灵敏度高，很广泛的线性范围；梯度淋洗
- 缺点：对没有紫外/可见波长吸收的样品无法检测；
- 流动相的选择受到流动相组分对紫外可见光的吸收影响



二、实验原理

2. 荧光检测器

- 物质的分子或原子经光照射后，有些电子被激发至较高的能级，这些电子从高能级跃至低能级时，物质会发出比入射光波长较长的光，这种光称为荧光。荧光检测器就是在样品的激发波长处检测发射光的强弱
- 在样品浓度足够低时，**荧光强度**与入射光强度、量子效率及**样品浓度成线性关系**
- **喹诺酮类药物**、芳香族化合物，如有机胺、维生素、激素、酶
- 优点：**非常高的灵敏度和良好的选择性**，灵敏度要比紫外检测法高**2-3**个数量级。而且所需样品量很小，特别适合于药物和生物化学样品的分析
- 缺点：对样品的选择性较强；其它与紫外检测器相似



二、实验原理

3. 电化学检测器

➤根据电化学原理和物质的电化学性质进行检测的，对具有**氧化还原**性质的化合物，如含硝基、氨基等有机化合物及无机阴、阳离子等物质可采用电化学检测器

➤可分为极谱、库仑、安培和电导检测器等。

前三种统称为伏安检测器，用于具有氧化还原性质的化合物的检测，电导检测器主要用于离子检测。

安培检测器应用较广泛，更以脉冲式安培检测器最为常用



二、实验原理

4. 示差折光检测器

- 基于样品组分的折射率与流动相溶剂**折射率有差异**，当组分洗脱出来时，**会引起流动相折射率的变化**，**这种变化与样品组分的浓度成正比**
- 对于那些**无紫外吸收的有机物**（如高分子化合物、糖类、脂肪烷烃）是比较适合的。在凝胶色谱中是必备检测器，在制备色谱中也经常使用
- 缺点：灵敏度很低；不能用于梯度洗脱系统



二、实验原理

5. 蒸发光散射检测器

➤ 基于溶质的光散射性质

- 色谱柱流出液进入雾化器形成微小液滴，与通入的气体（通常是氮气，有时也用空气）混合均匀，经过加热的漂移管，蒸发除去流动相
- 能检测**不含发色团的化合物**，如：碳水化合物、脂类、聚合物、未衍生脂肪酸和氨基酸、表面活性剂、药物，并在没有标准品和化合物结构参数未知的情况下检测未知化合物
- 响应不依赖于样品的光学特性，任何挥发性低于流动相的样品均能被检测，不受其官能团的影响
- 响应值与样品的质量成正比，因而能用于测定样品的纯度或者检测未知物

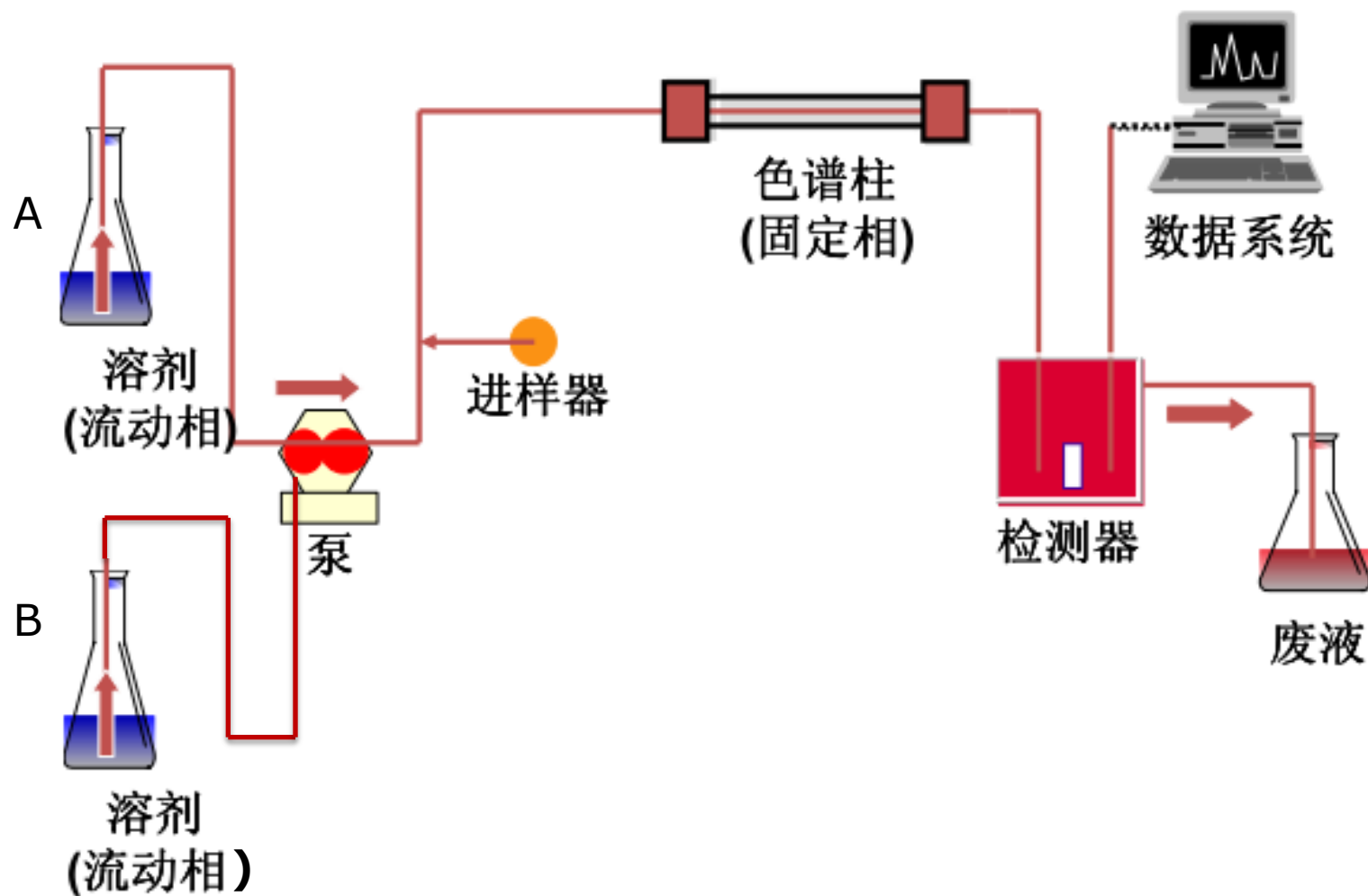


二、实验原理

6. 化学发光检测器

- 基于某些物质在常温下进行化学反应，生成处于激发态的反应中间体或反应产物，当它们从激发态返回基态时，就会发射出光子。由于物质激发态的能量是来自化学反应，所以叫做化学发光
- 当分离组分从色谱柱中洗脱出来后，立即与适当的化学发光试剂混合，引起化学反应，导致发光物质产生辐射，其光强度与该物质的浓度成正比
- 优点：快速、灵敏、设备简单、价廉、线性范围宽

HPLC仪器原理



硬件部分

- 流动相
- 泵（单泵，双泵，四元泵）
- 柱子
- 进样器（手动进样器，自动进样器）
- 检测器（UV，DAD，荧光检测器）

常用术语

软件部分

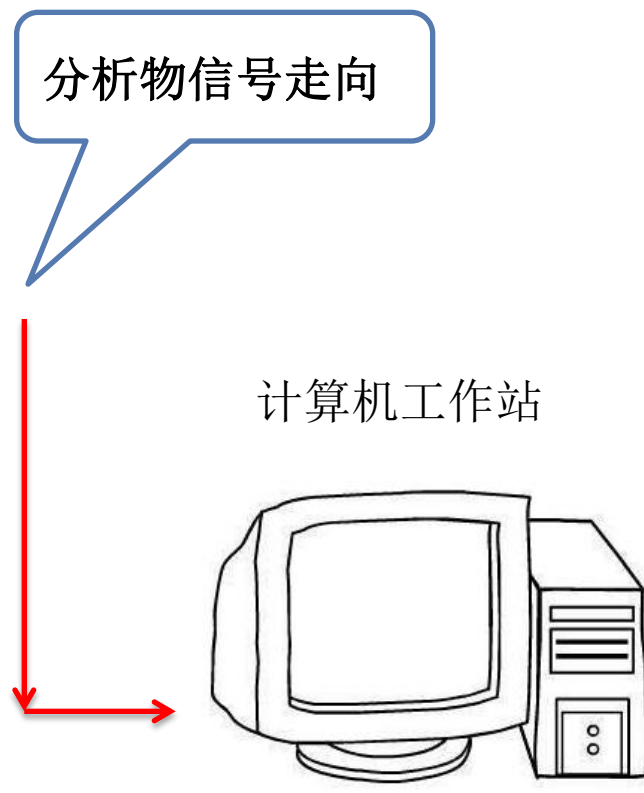
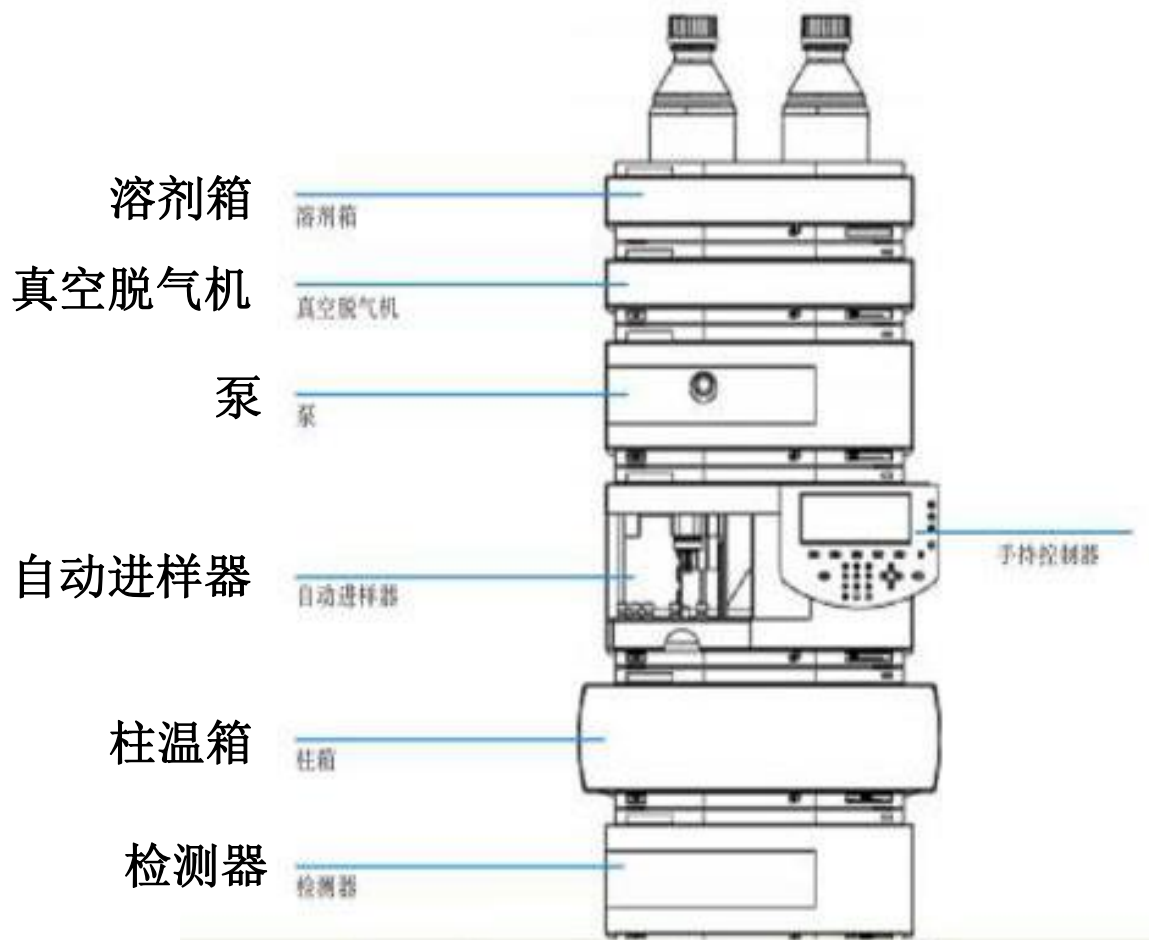
- 工作站（online, offline）
- 方法（Method） 涵盖所有检测参数的设定，进样量、流速、柱温、流动相比例、检测时间、检测器等
- 序列（Sequence） 涵盖进样的信息，样品位置、样品名、进样次数、文件保存路径等-自动进样
- 报告（Report） 将上述信息生成一个文件

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

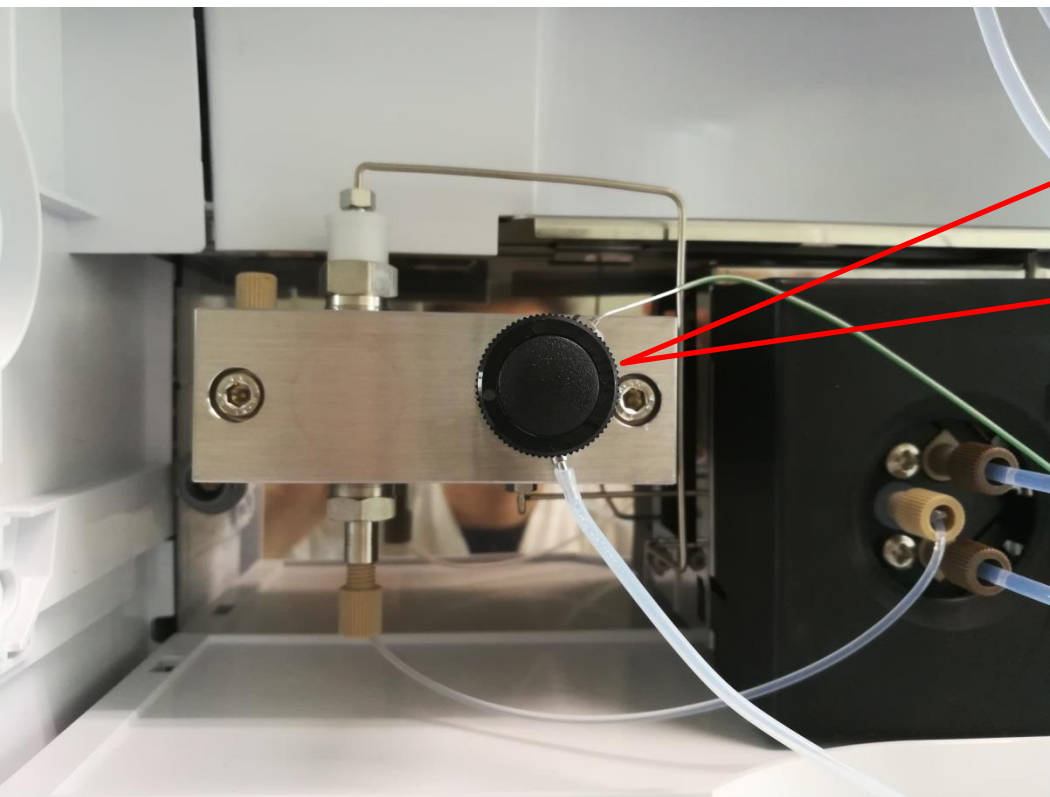


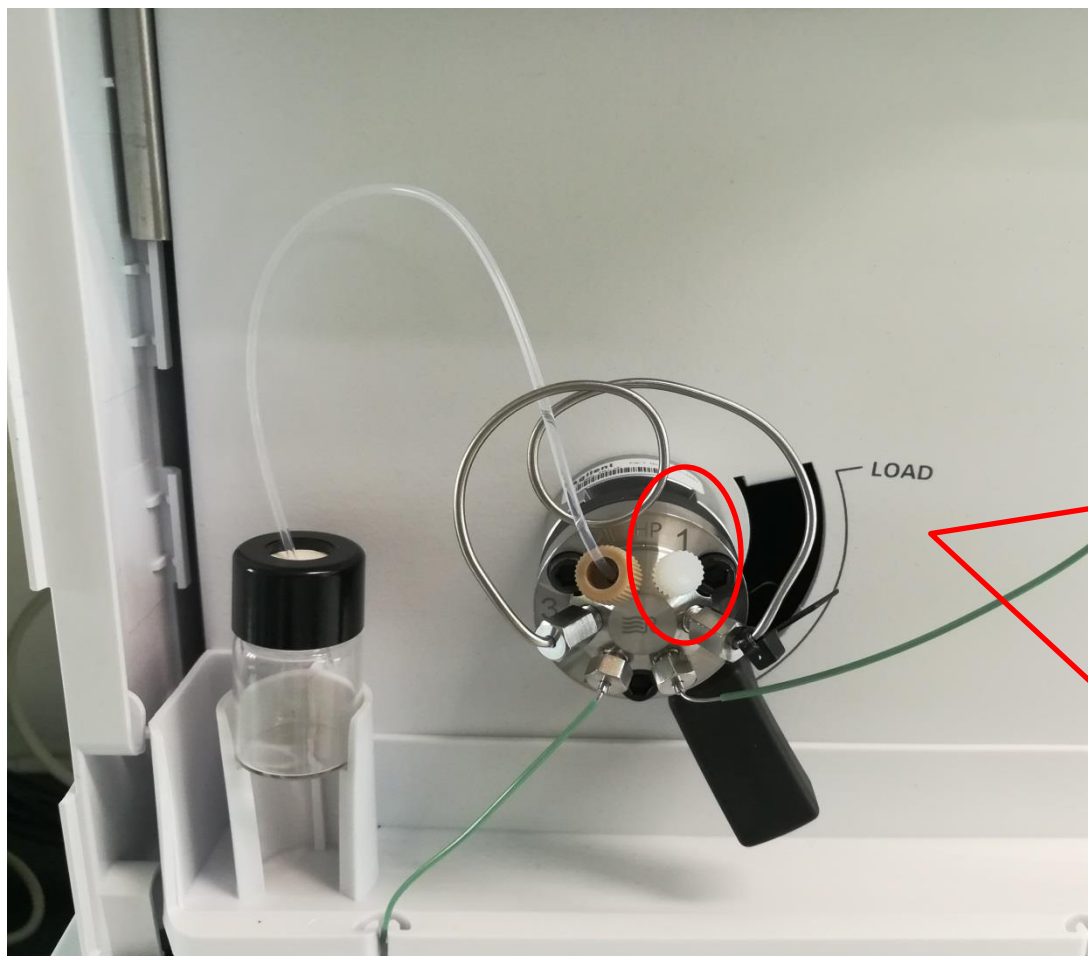
仪器操作



冲洗阀 (purge)

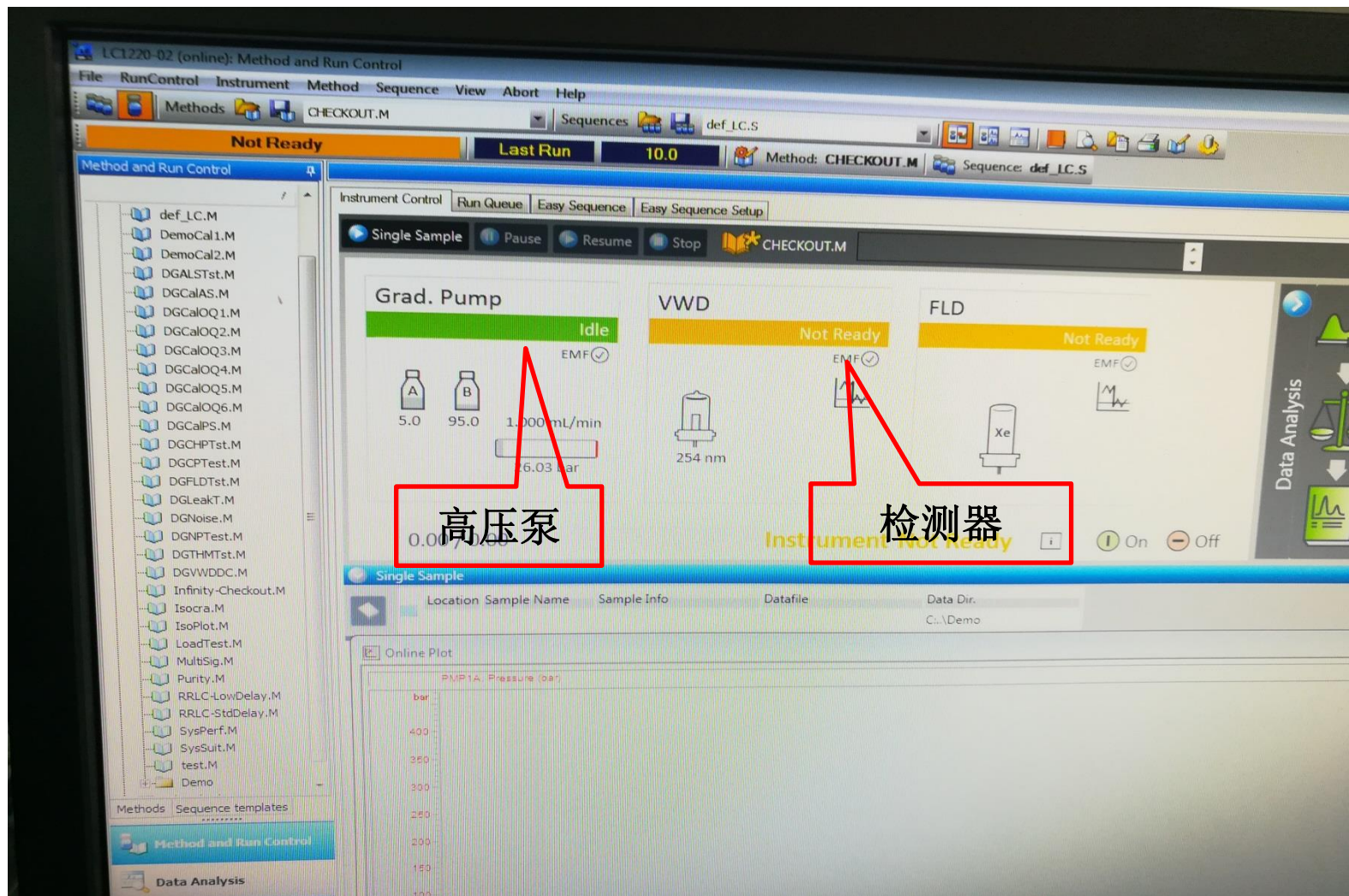
- 顺紧逆松。
- 拧紧，流动相走柱子，拧松走废液，
- 用于排除流路中的气泡

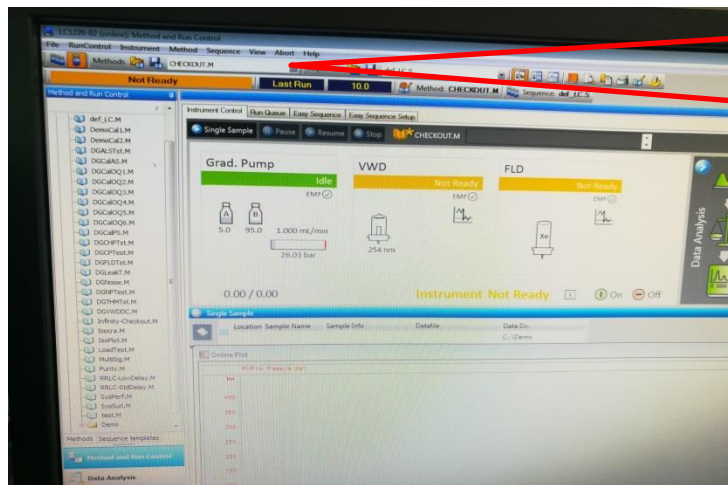




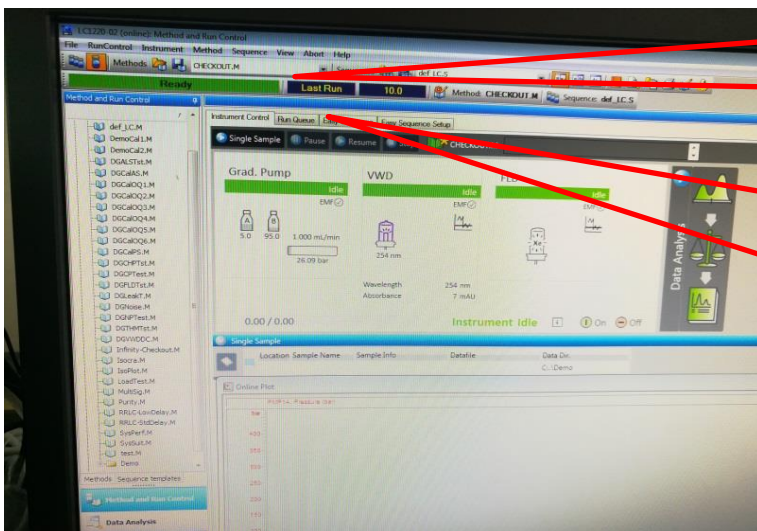
手动进样器

- 进样针置于注射位置，注射器插入针管到底
- 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





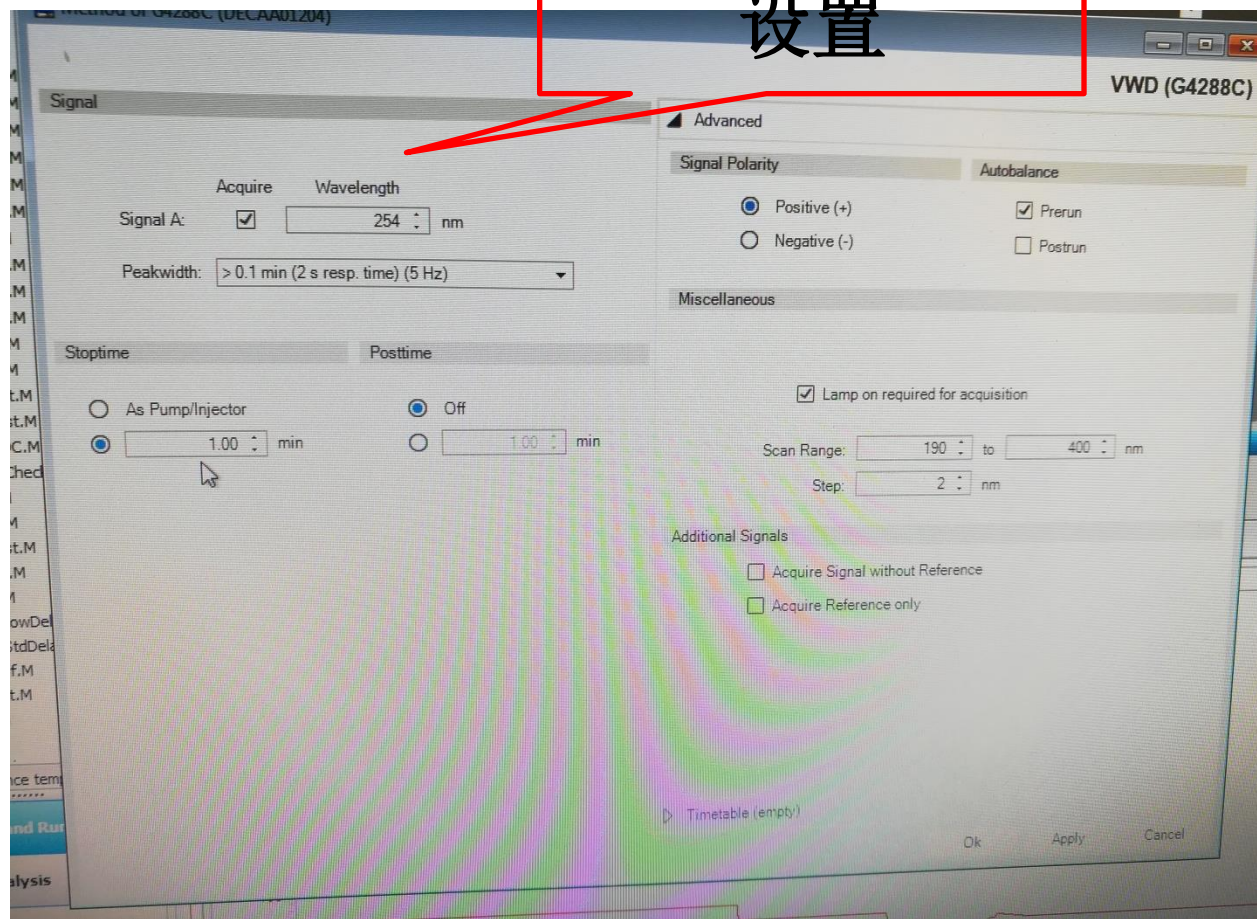
仪器状态
橙色-未就绪，可
能有模块没有打
开

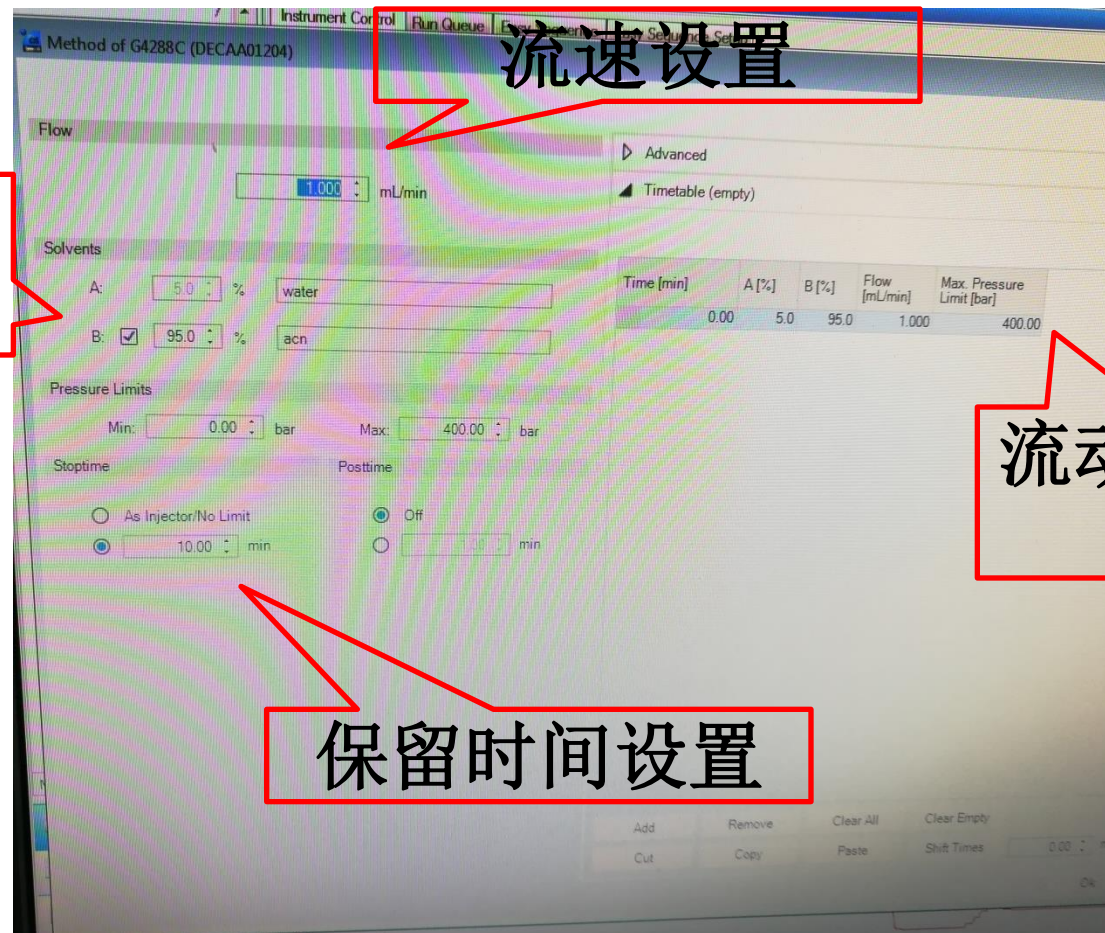


绿色-可以进样

红色-报警，停止使
用
蓝色-正在运行，请
勿改动

紫外检测波长 设置





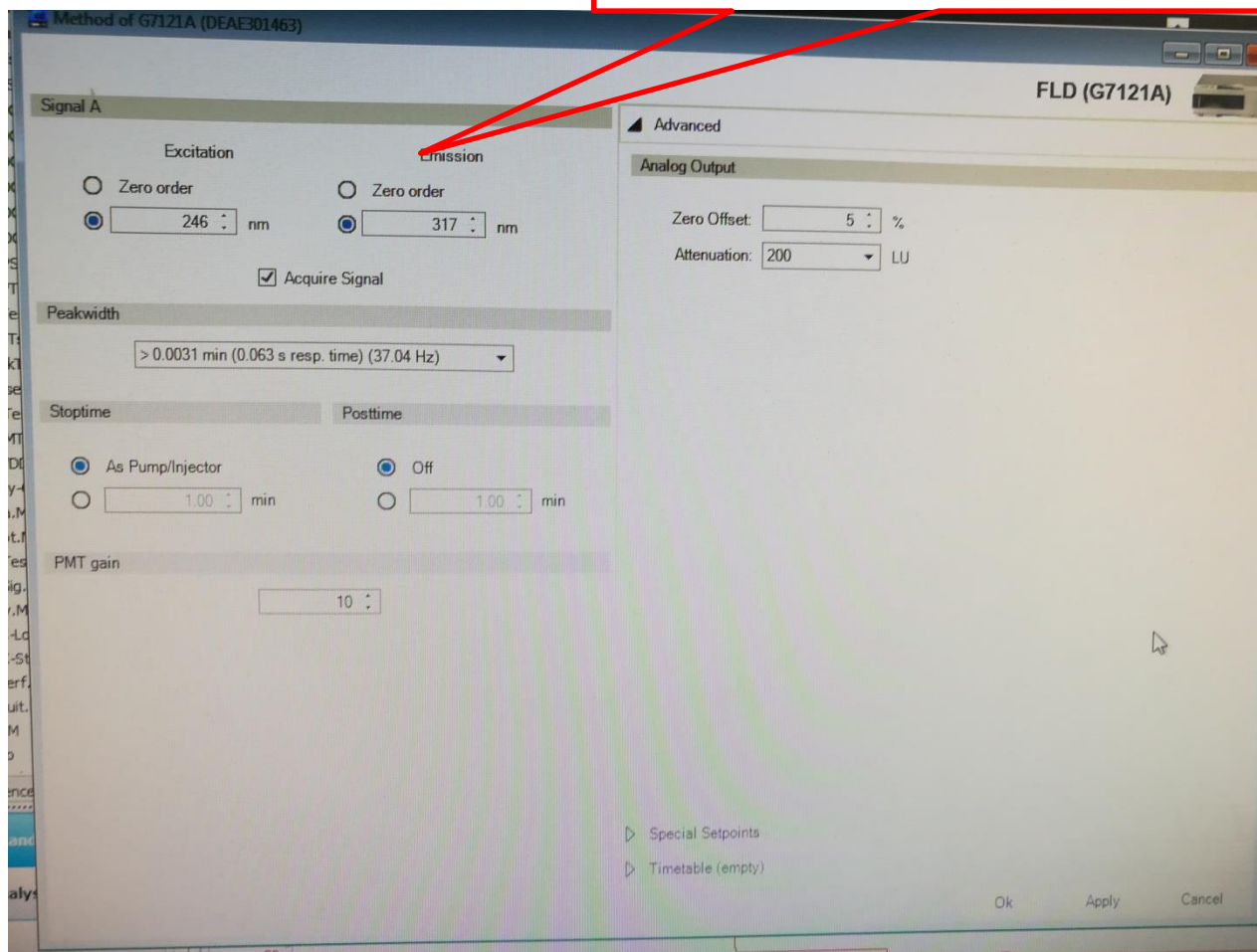
流动相
比例设置

流速设置

流动相梯度
设置

保留时间设置

荧光检测波长设置



Sample Name: new std

样品名

样品位置 (自动)

```

=====
Acq. Operator   : ly                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  :
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)
=====

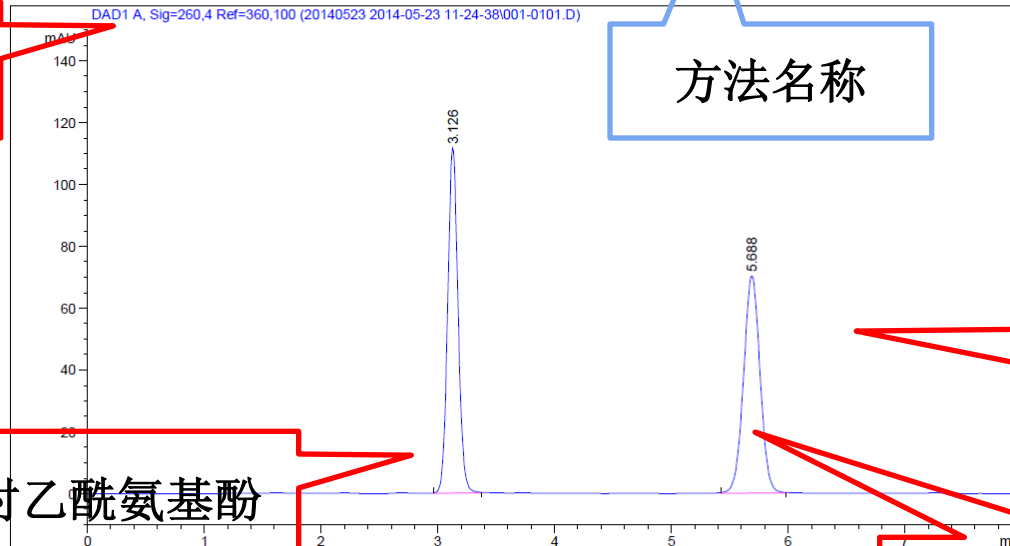
```

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 |

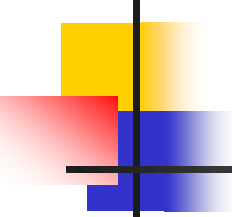
保留时间

峰面积

```

Totals :                               1381.28888  181.90266

```

生物样品前处理

去蛋白（蛋白沉淀法）

A. 目的：可使结合型的药物释放出来，以便测定药物的总浓度；去除蛋白质也可预防提取过程中蛋白质发泡，减少乳化的形成，以及可以保护仪器性能，延长使用期限。

B. 蛋白沉淀法的分类

(a) **有机溶剂沉淀法：**甲醇、乙腈

(b) **中性盐析法：**饱和硫酸铵

(c) **强酸沉淀法：**10%三氯醋酸、6%高氯酸、

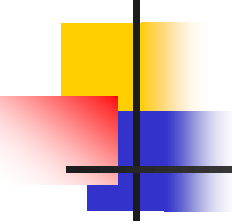
(d) **加热沉淀法**



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；与水不相混溶以及无毒、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



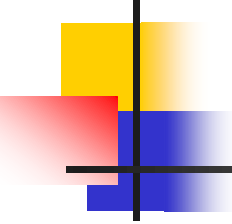
生物样品前处理

液固提取法（柱色谱法）

A. 目的：消除了乳化现象，提取效率高，样品用量少，尤其适于处理挥发性及对热不稳定的药物

B. 小柱的种类

C. 基本步骤



生物样品前处理

固相萃取基本步骤:

活化→上样→淋洗 →洗脱 →吹干

特点 少溶剂、少污染、减少液液萃取的乳化。适合各种液体检材如血、尿、洗胃液、现场水、饮料等，对于肝、肾、胃以及现场上的固体检材，均需制成水液方可进行固相萃取



色谱条件

- 色谱柱: **Eclipse XDB-C18 柱 (250×4.6mm, 5μm)**
- 流动相: **0.2%三氟乙酸溶液 : 甲醇 (V/V) =58:42**
- 柱温: **30℃**
- 流速: **1.0mL/min**
- 进样量: **20μL**
- 荧光检测器: **Ex 298nm Em 500nm**



血样处理（从冰箱中刚取出的 血样要解冻涡旋混匀！）

强酸沉淀法

- 吸取250 μ L血样置于1.5mL离心管中； *做好标记*
- 加入6%高氯酸100 μ L，涡旋混合2min，12000rpm离心10min；取上清液150 μ L置于离心管中

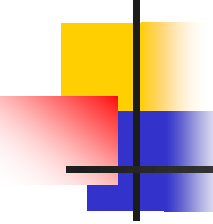
血样处理

有机溶剂沉淀法

- 吸取250 μ L血样置于1.5mL离心管中； *做好标记*
- 加入甲醇500 μ L，涡旋混合2min，12000rpm离心10min；取上清液150 μ L，按下表加入：置于离心管中，混匀，待进样测定。

| 编号 | 处理方法 | 峰形结果 |
|-----|-----------------------|------|
| S-1 | 加液相用水50 μ L | |
| S-2 | 0.2%三氟乙酸水溶液20 μ L | |
| S-3 | 0.2%三氟乙酸水溶液40 μ L | |
| S-4 | 0.2%三氟乙酸水溶液50 μ L | |
| S-5 | ----- | |

讨论1 溶剂的影响



| 编号 | 处理方法 | 峰形结果 |
|-----|-----------------------|------|
| S-1 | 加液相用水50 μ L | |
| S-2 | 0.2%三氟乙酸水溶液20 μ L | |
| S-3 | 0.2%三氟乙酸水溶液40 μ L | |
| S-4 | 0.2%三氟乙酸水溶液50 μ L | |
| S-5 | ----- | |

S-1与S-5，峰形比较，结果显示？是否有加水相的必要？

S-1与S-2/S-4，峰形比较，结果显示？是否有加酸水相的必要？

S-2与S-4，峰形比较，结果显示？峰面积？结论是？



进样检测

- 微量进样器取样为60-70 μ L左右，使用20 μ L定量环进行定量，准确进样体积20 μ L。
- 进样前用甲醇清洗微量进样器5遍以上，然后再吸取样品

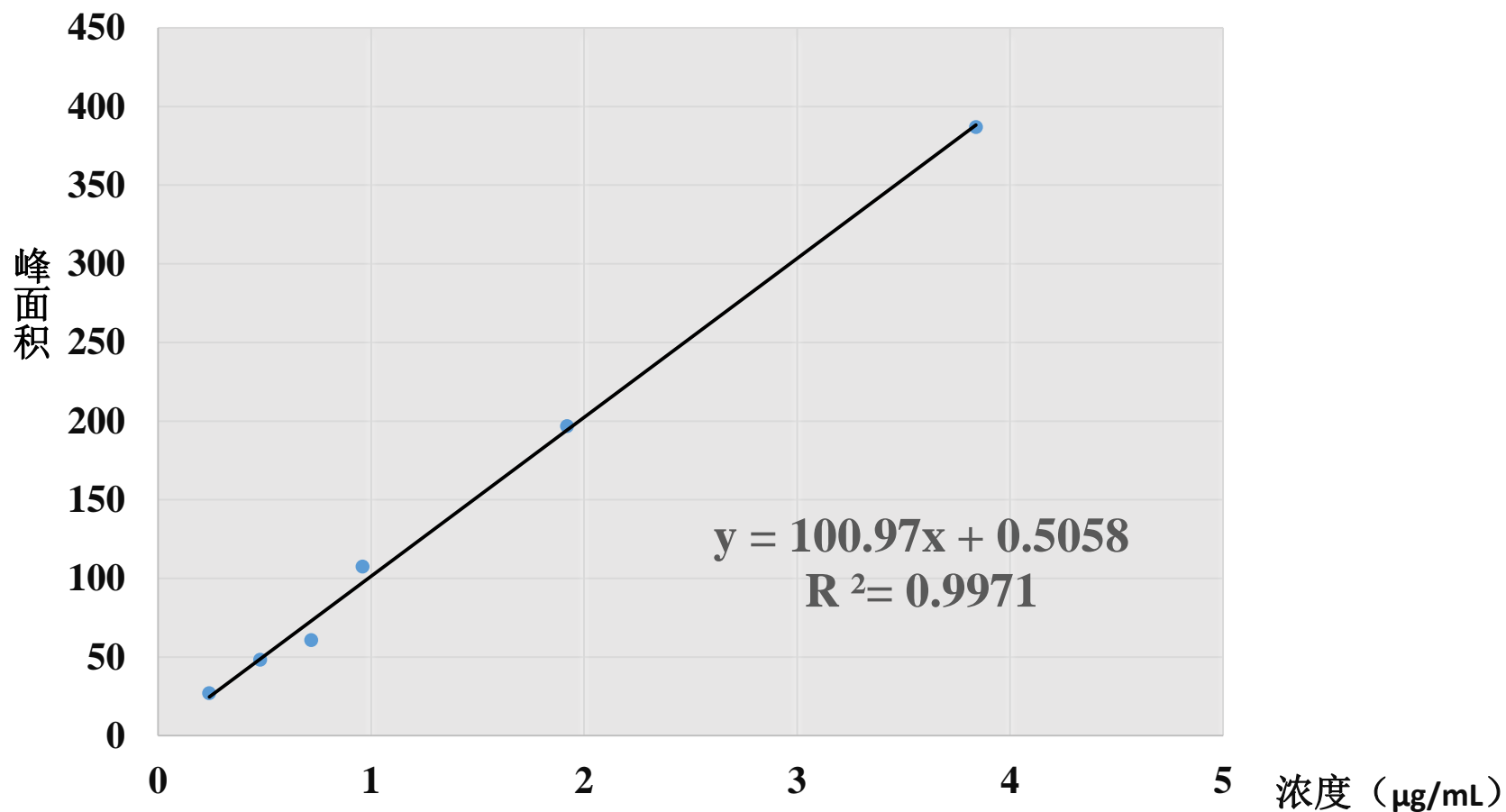
吸取样品时注意排除进样器中的气泡，擦拭进样针。



甲醇沉淀法标准曲线 (Agilent1220)

| 编号 | 浓度C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 峰面积A |
|----|---------------------------------|--------|
| B1 | 0.24 | 27.00 |
| B2 | 0.48 | 48.28 |
| B3 | 0.72 | 60.65 |
| B4 | 0.96 | 107.44 |
| B5 | 1.92 | 196.72 |
| B6 | 3.84 | 386.84 |

甲醇沉淀法预实验结果

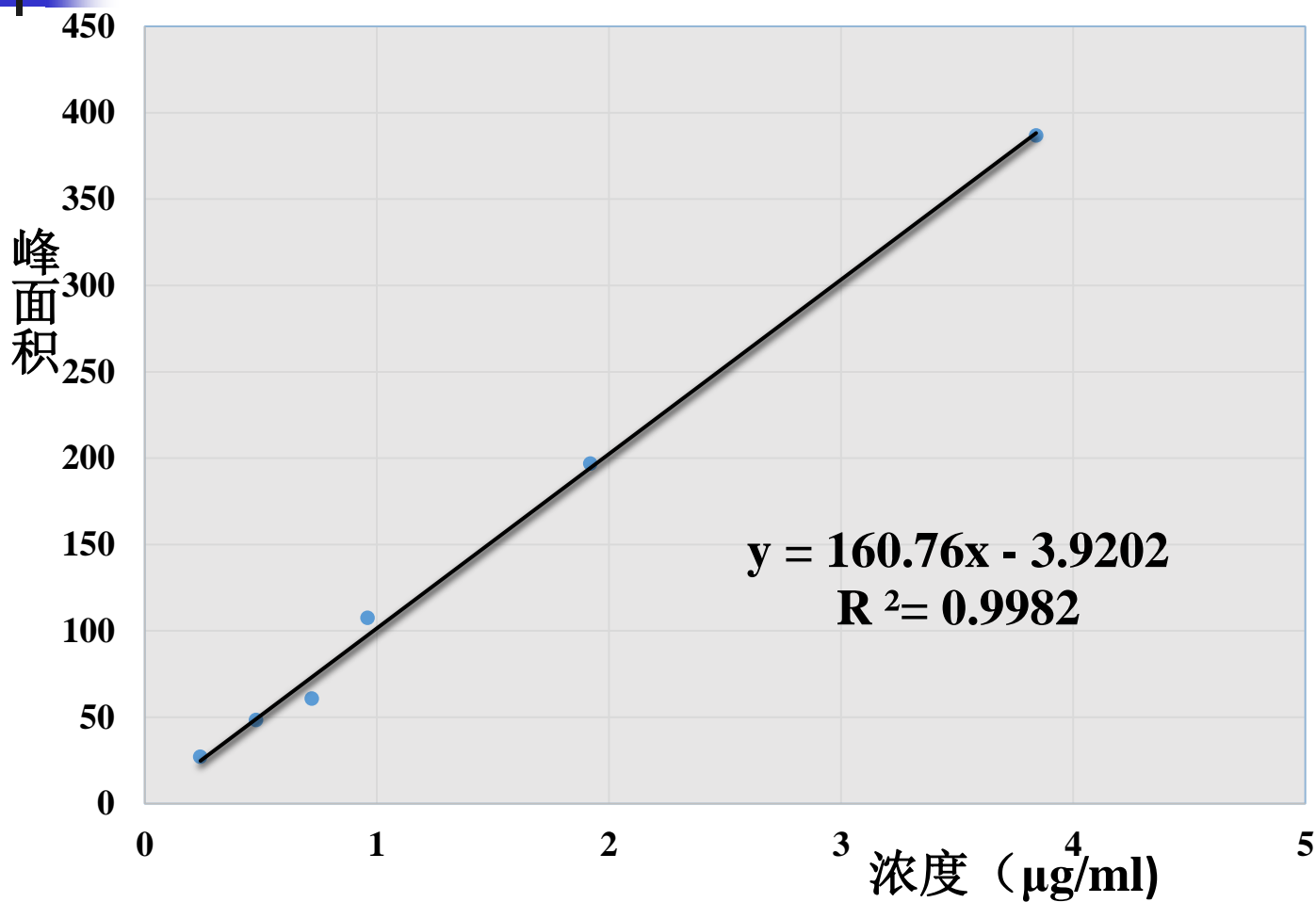




高氯酸沉淀法标准曲线 (Agilent1220)

| 编号 | 浓度C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 峰面积A |
|----|---------------------------------|--------|
| B1 | 0.24 | 37.57 |
| B2 | 0.48 | 71.29 |
| B3 | 0.72 | 104.16 |
| B4 | 0.96 | 146.02 |
| B5 | 1.92 | 321.75 |
| B6 | 3.84 | 607.49 |

高氯酸沉淀法预实验结果





样品点

| 编号 | 理论浓度C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 峰面积A | 实际浓度C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 回收率 (%) |
|-------|--------------------------------------|------|--------------------------------------|------------|
| S4-B4 | 0.48 | | | |
| S2-B2 | 0.72 | | | |
| S3-B3 | 0.96 | | | |



数据说明

- 每台仪器做两根标准曲线（同样处理方法），若线性不好，最多舍弃一个浓度点。
- 高氯酸沉淀法5台仪器（标记1-5），甲醇沉淀法1台仪器（标记6），4人/组。
- 各组请标记好自己的样品名称。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，计算回收率。
- 半个班先去听仪器现场讲解，半个班处理样品。



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蛋白沉淀的原理。

- 三、仪器构件

画出高效液相色谱仪的几个主要模块
色谱条件



实验报告

- 四、实验操作

1. 血样前处理（注明自己组的编号）

- 五、结果与计算

1. 列出样品的保留时间和峰面积；

2. 根据自己组数据，计算线性方程，列出方程和回归系数。

3. 根据线性方程，计算样品的浓度和回收率。

（实验报告后附上自己组的一张色谱图）。



实验报告

■ 六、讨论

- 1、经过实验，2种沉淀方法有什么不同之处？结合两天的甲醇沉淀蛋白法结果，在离心上清液中加入0.2%三氟乙酸的目的是什么？
- 2、为什么蛋白沉淀法常以外标法定量？
- 3、表2中，S1~S3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）。