

超临界流体萃取/超临界流体色谱系统 应用文集



前 言

超临界流体 (Supercritical fluid, SCF) 为同时达到并超过临界点温度和压力状态的流体, 其物态和性质介乎于液体和气体之间, 如粘度和扩散系数接近气体, 而密度和溶剂化能力接近液体, 另外, 通过调节压力和温度, 这种物性还会发生变化。很多物质都有超临界流体态, 由于 CO₂ 的临界温度比较低 (31.06℃), 临界压力也不高 (7.38 MPa), 且无毒, 无臭, 无公害, 所以在实际操作中常使用 CO₂ 超临界流体。

超临界流体萃取是国际上最先进的物理萃取技术, 简称 SFE (supercritical fluid extraction), 它是近代化工分离中出现的高新技术, SFE 将传统的蒸馏和有机溶剂萃取结合一体, 利用超临界 CO₂ 优良的溶解力, 实现将基质与萃取物有效分离、提取和纯化。由于超临界 CO₂ 具有类似气体的扩散系数、液体的溶解力, 表面张力为零, 其能迅速渗透进固体物质之中, 提取其精华, 具有高效、避免氧化、纯天然、无化学污染等特点而在众多领域有所应用。超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography; SFC) 以超临界流体做流动相, 依靠流动相的溶剂化能力来进行分离、分析的色谱过程。该技术兼有气相色谱和液相色谱的特点。它既可分析气相色谱不适应的高沸点、低挥发性样品, 又比高效液相色谱有更快的分析速度和条件。常用超临界 CO₂ 流体为流动相, 可与现有多种液相或气相的检测器相连接和匹配, 扩大了 SFC 的应用范围和分析能力, 在定性、定量方面均有所应用。随着认识加深和技术推进, SFC 的应用领域随之得到进一步推广。

Nexera UC 是岛津公司最新推出的一款超临界流体萃取/色谱系统, 利用先进理念和控制技术, 实现超临界流体萃取-超临界流体色谱-质谱联用分析, 此外还可根据应用领域的不同, 组建为 SFC-UV、SFC-MS、手性化合物分析方法开发、离线 SFE、SFC-LC 切换系统等各种不同配置, 满足不同分析目的的需要。

为增进用户对 Nexera UC 系统的了解、认识和熟悉, 岛津企业管理 (中国) 有限公司分析中心整理编写了本册《超临界流体萃取/超临界流体色谱系统应用文集》以飨读者。本册文集介绍了 Nexera UC 系统的多个子系统如: 在线-SFE-

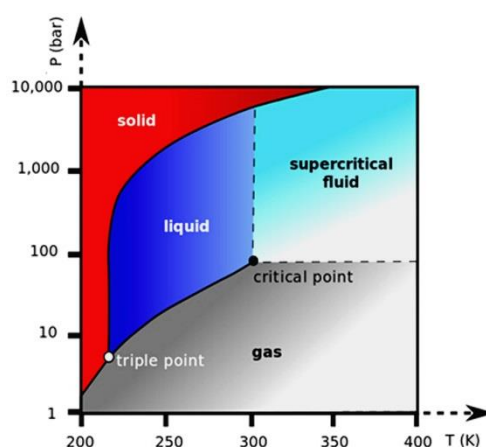
SFC 系统、SFC 系统、手性筛选系统、离线-SFE 系统等，并就各子系统在诸如农残检测、手性拆分、天然产物分析、药物分析等 7 个领域的实际应用例子予以介绍，供收录应用文 17 篇，通过分析实例介绍该产品的性能、详尽的参数设置也为相关领域的客户使用该系统提供参考。本册文集收录之文章除岛津企业管理（中国）有限公司分析中心应用工程师所作之外，还有来源于（株）岛津制作所全球应用开发中心所作之应用新闻以及国内相关合作单位的共同研究成果，在正文中分别列出，在此一并感谢。

知识水平所限，文中难免存有不妥之处，恳请读者匡误斧正。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

Nexera UC 系统介绍

物质的压力和温度同时超过它的临界压力 (P_c) 和临界温度 (T_c) 的状态成为超临界态, 处于超临界状态的物质是一种特殊的流体, 称之为超临界流体 (Supercritical fluid, SCF)。在临界点附近, 该物质有很大的可压缩性, 适当增加压力, 可使它的密度接近一般液体的密度, 因而有很好的溶解其他物质的性能; 另一方面, 超临界态的黏度只有一般液体的 1/12 至 1/4, 但它的扩散系数却比一般液体大 7 至 24 倍, 近似于气体。



由于 CO_2 具有易于达到和控制的临界温度 (31.06°C) 和临界压力 (7.28 MPa), 并且化学惰性、无毒、无臭、无公害等特性, 使得在实际应用中 CO_2 超临界流体在诸如天然产物萃取、化学反应、色谱分离、工业生产等领域拥有广泛的应用前景。

Nexera UC 是 (株式会社) 岛津制作所于 2015 年推出的一款超临界流体萃取/超临界流体色谱系统, 利用岛津公司先进的设计理念和研发技术, 针对在线超临界流体萃取、超临界流体色谱质谱分析、手性化合物分析方法开发等各种不同应用, 满足不同分析目的的需要。



Nexera UC 能够方便用户对多组分进行同时分析, 从样品的前处理、到分离直至分析各步骤均可实现在线自动化。同时, 该系统还可对某些可能因接触空气而氧化或者降解的不稳定化合物实现稳定可靠的分析。此外, 以食品中农药残留的分析为例, 仅仅在预处理阶段, 该系统就可将传统方法需要的 35 分钟缩短至 5 分钟。与传统的人工操作方法相比, 可在提高效率的同时减少人为误差。

Nexera UC 主要特点

(1) 首个商品化的在线 SFE-SFC-MS 系统

超临界流体萃取单元 SFE-30A 中内置 2 个高压阀，通过 SFE 单元萃取的目标化合物可直接在线进样至 SFC 单元，接着通过色谱柱进行分离继而由质谱检测器进行检测。该在线系统兼容用于前处理的 SFE 以及用于分析的 SFC，可自动将固体样品中的目标化合物直接萃取至分析。在农残检测中，这将减少 85% 用于样品前处理的时间。由于自动化萃取在避光且非氧化环境下进行，该系统也有助于抑制不稳定化合物的分解。

(2) SFE 单元可自动连续萃取多达 48 个样品

只需要把用于超临界流体萃取单元 SFE-30A 的萃取器放置于样品架中，就可以实现自动化连续萃取。如果



SFE-30A 和 Rack changer 联合使用，则最多同时放置 48 个样品，实现自动化连续萃取。

(3) 高灵敏度 SFC 和高分辨率结果

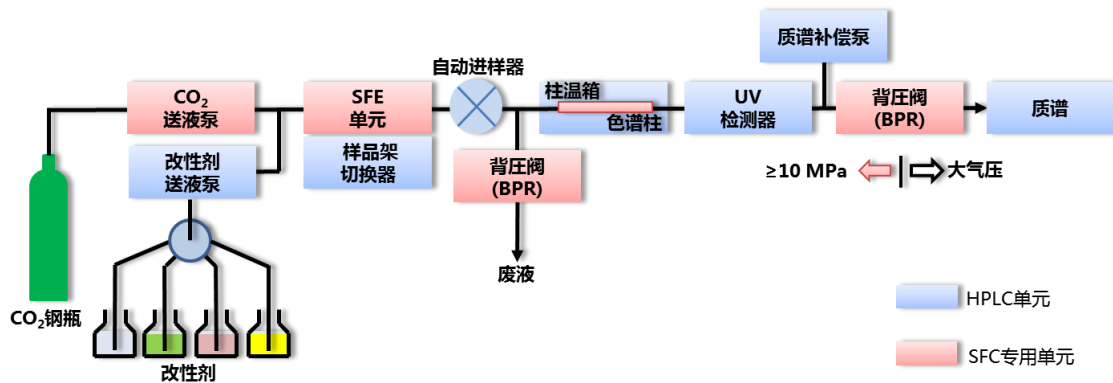
背压控制阀单元 SFC-30A 采用专有的压力控制机制，有效减小脉动和死体积。这使得所有洗脱液都得以进入质谱而无需分流，因此极大的提升了痕量组份分析的灵敏度。此外，CO₂ 输送单元 LC-30AD_{SF} 可耐受 66 MPa 的压力，从保证在高速分离的同时获得高分辨率的结果。

Nexera UC 系统配置及应用领域



Nexera UC 在线 SFE-SFC 分析系统

在线 SFE-SFC 系统可完整执行样品的萃取、分离和检测全过程，与串联四极杆质谱仪联用，可用于农产品中多种农药残留的同时分析。如与自动换架器(Rack Changer) 联用，该系统可同时对多达 48 个样品实现连续分析。



Nexera UC Online-SFE-SFC-MS 流路示意图

SFC-UV 系统为使用 SFC 进行分离、分析的基础配置，使用紫外或二极管阵列检测器。该系统适合使用传统 HPLC 或 GC 分析的样品，尤其像药品中原方法为正相色谱进行分析的样品，如脂溶性维生素等。



Nexera UC SFC-UV 分析系统



Nexera UC 手性筛选系统

手性拆分筛选系统专为手性化合物分析方法开发设计，配合专用软件 Method Scouting solution 使用。通过输液泵的自动混合功能可对最多 4 种改性剂以任意比例混合，对多达 12 根色谱柱进行自动切换，以实现对手性化合物的分析方法筛选。

手性拆分筛选系统专为手性化合物分析方法开发设计，配合专用软件 Method Scouting solution 使用。通过输液泵的自动混合功能可对最多 4 种改性剂以任意比例混合，对多达 12 根色谱柱进行自动切换，以实现对手性化合物的分析方法筛选。

在基本型 SFC-UV 的基础上使用 LCMS/LCMSMS 为检测器，提高检测灵敏度和专属性，为适合 SFC 分离的微量物质的定性/定量分析提供可靠灵敏的分析方法。



Nexera UC UFMS 系统

另外，Nexera UC 系列还拥有专用于进行全处理操作的 Offline SFE 系统，以及可以在 SFC 和 LC 进行切换工作的 SFC-LC 切换系统。功能各异的子系统丰富了 Nexera UC 系列的产品线，为用户根据待测样品类型选择针对性的分析系统提供便利条件。

目 录

前 言.....	I
Nexear UC 系统介绍.....	III
目 录.....	VI
一、农药残留分析.....	1
Nexera UC Online SFE-SFC-MS 系统分析农产品中的残留农药.....	2
Nexera UC Offline SFE-GC/MS 系统分析农产品中的残留农药.....	5
二、手性拆分分析.....	10
Nexera UC 手性筛选系统在手性化合物分离条件自动优化中的应用.....	11
Nexera UC SFC 在农药戊唑醇手性杂质拆分中的应用.....	14
Nexera UC SFC 在 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉异构体手性拆分中的应用.....	18
Nexera UC SFC-PDA 用于手性农药氟胺氰菊酯的拆分.....	22
三、天然产物分析.....	26
Nexera UC SFC 用于五味子药材中木脂素的含量分析.....	27
Nexera UC SFC-MS 用于齐墩果酸与熊果酸的测定.....	32
Nexera UC Online-SFE-SFC/UV 检测木瓜中齐墩果酸和熊果酸.....	35
Nexera UC Offline-SFE 萃取香草兰豆荚中香草醛等化合物.....	42
四、药物杂质分析.....	49
Nexera UC SFC-UV 系统在原料药杂质分析中的应用.....	50
Nexera UC SFC-UV 系统在原料药手性杂质拆分中的应用.....	54
五、脂溶性维生素分析.....	58
Nexera UC Online-SFE-SFC 在脂溶性维生素分析中的应用.....	59
Nexera UC SFC/LCMS-8060 测定血清中的 25-OH 维生素 D3.....	64
六、兽药残留分析.....	68
Nexera UC Online-SFE-SFC-MS 在鸡肉中磺胺类药物残留检测中的应用.....	69
七、其他分析.....	75
Nexera UC Online-SFE-SFC 分析不稳定化合物.....	76
Nexera UC Online-SFE-SFC-PDA 在清洁验证中的应用.....	79

一、农药残留分析

农药残留 (Pesticide residues), 是农药使用后一个时期内没有被分解而残留于生物体、收获物、土壤、水体、大气中的微量农药原体、有毒代谢物、降解物和杂质的总称。农药残留问题是随着农药大量生产和广泛使用而产生的。农药进入粮食、蔬菜、水果、鱼、虾、肉、蛋、奶中, 造成食物污染, 危害人的健康。由于农药残留对人和生物危害很大, 各国对农药的使用都进行严格的管理, 并对食品中农药残留容许量作了规定。随着人们对农药残留危害的认识深入, 农药残留限量要求一步步获得提高, 同时对农药残留检测的前处理方法和检测方法的要求的对应得到提升。



农残检测中常用的前处理手段包括索氏提取法、震荡提取和组织匀浆法、超声提取法、超临界流体萃取法、加速溶剂提取、微波萃取法、基质固相技术、QuEChERS 等方法。这其中的超临界流体萃取尤以超临界 CO₂ 流体的使用居多, 其最大的优点是有机溶剂的使用(基本不用或者极少使用), 而且很容易实现对一些大分子化合物、热敏性和化学不稳定性物质的提取。另外通过少量改性剂的加入来调节超临界 CO₂ 的萃取和分离性能来增大对应化合物的类型和种类, 对中等到弱极性至非极性的农药均有良好的萃取效果。

在农残检测的分析方法方面, 三重四极杆色质联用仪由于具有高效、灵敏、稳定、选择性强等特点在该领域获得广泛使用。超临界流体色谱 (SFC) 具有分离效率高、分析速度快等特点亦可作为 MS 前端同质谱联用, 并由于其分离机理和选择性等特点可对原本需要使用 LCMS 和 GCMS 分别分析的部分化合物实现同时分析, 以提高分析效率。

Nexera UC Online-SFE-SFC-MS 系统, 是岛津首创性的将 SFE 前处理技术和 SFC-MS 分析技术在线联用的分析手段, 解决了从前处理到分离分析过程的衔接问题, 改变了农残检测传统的前处理操作方式, 为这一领域的分析检测提供全新方法。另外, Nexera UC 系列含有 Offline-SFE 系统, 通过自动前处理快速获得待测化合物实现为其他分析手段制备样品的作用。

本节收录使用 Nexera UC 在线 SFE-SFC-MS 系统分析农产品中的残留农药和通过 Nexera UC 离线 SFE-GC/MS 系统分析农产品中的残留农药以供相关领域参考。

Nexera UC Online SFE-SFC-MS 系统分析农产品中的残留农药

摘要 Nexera UC 在线 SFE-SFC-MS 系统是将超临界流体萃取 (Supercritical Fluid Extraction: SFE) 和超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography: SFC) 在线组合的系统, 能够全自动地对目标成分进行萃取至分析等一系列操作。在 SFE 和 SFC 中, 通过在超临界二氧化碳流体中添加极性有机溶剂 (改性剂), 即可对具有宽极性范围的成分进行萃取和分析。日本于 2006 年颁布执行了肯定列表制度。该制度对 800 种以上的农药规定了最大残留限量标准。因此, 需要进行包括样品前处理在内的具有性质各异的多农残同时分析。本文向您介绍使用 Nexera UC 在线 SFE-SFC-MS 系统, 对农产品中残留的农药进行分析的示例。

关键词: Nexera UC 在线 SFE-SFC 农残

在线 SFE-SFC-MS 系统

图 1 是 Nexera UC 在线 SFE-SFC-MS 系统的运行原理。由图可知, 将填充样品的萃取容器固定在 SFE 单元中, 调节温度使容器达到 40°C (图 1A)。向萃取容器中注满超临界二氧化碳流体。在输液泵停流状态下静态萃取目标成分 (图 1B)。然后边向萃取容器注入超临界流体, 边进行动态萃取 (图 1C)。在动态萃取时, 将萃取物导入分析柱中。但是, 因为农产品中含有大量杂质, 如果将萃取物全部导入色谱柱或仪器中, 可能导致色谱柱劣化或污染仪器。为了解决上述问题, 在本系统的动态萃取时, 仅将部分萃取物分流导入分析柱。动态萃取后, 超临界流体只通过分析流路, 在分析柱上完成分离和后续的目标化合物质谱检测 (图 1D)

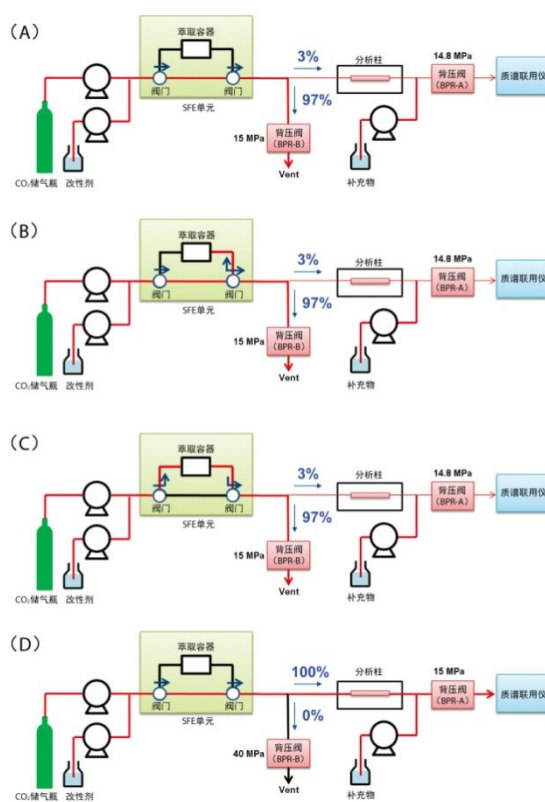


图 1 在线 SFE-SFC 的分析流程

制备样品

作为农产品残留农药分析的预处理方法, QuEChERS 法操作简便、快速, 因此得到广泛应用。但是, 该方法包含多个步骤, 像添加试剂、溶剂萃取、分散固相萃取净化、离心分离。而本系统仅需将搅拌机粉碎的农产品 1g 与脱水剂*1g 混合, 再填入萃取罐即可 (图 2)。由此不仅提高了分析效率, 降低了环境负荷, 而且也避免了预处理中的人为失误。另外, 使用专用的换架器, 还能够进行最多 48 个样品的连续萃取和分析。

* “Miyazaki Hydro-Protect” 专利第 364552 号



图 2 样品制备

农药混合标准样品分析

将含有 510 种农药的混合标准样品添加脱水剂后进行分析。表 1 为分析条件；图 3 为分析结果。由此可知，从萃取至分析的一系列操作均在约 45 分钟内完成。其中 327 种成分在 1~100 ng/g 的浓度范围内具有良好的重复性（在各浓度中，峰面积的相对标准偏差 %RSD 小于 30%）和良好的线性（相关系数 $R^2 = 0.99$ 以上）。由表 2 可知，对宽极性范围的农药能够得到良好的重复性和线性。

表 1 分析条件

SFE		SFC	
改性剂	0.1% 甲酸铵/甲醇	色谱柱	Shim-pack UC-RP (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
流速	5 mL/min	流动相	A-scCO ₂ ; B-0.1% 甲酸铵/甲醇
萃取程序	静态萃取 (0-3 min) 5% 改性剂 动态萃取 (3-6 min) 5% 改性剂	时间程序	0% → 10% B (6-17 min) - 30% B (20 min) → 40% B (20.01-23 min)
萃取温度	40°C	流速	3 mL/min
背压调节器压力	A) 14.8 MPa, B) 15 MPa (分流比: 3%)	柱温	40°C
补偿溶剂	0.1% 甲酸铵/甲醇	背压调节器压力	A) 15 MPa, B) 40 MPa
		补偿溶剂	0.1% 甲酸铵/甲醇
		检测器	LCMS-8050 MRM 模式

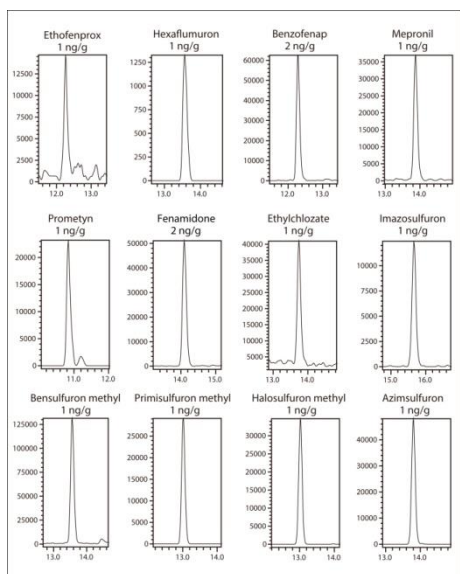


图 4 典型农药的 MRM 色谱图

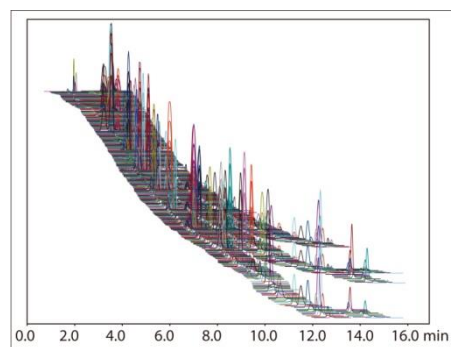


图 3 农药混合标样质谱图

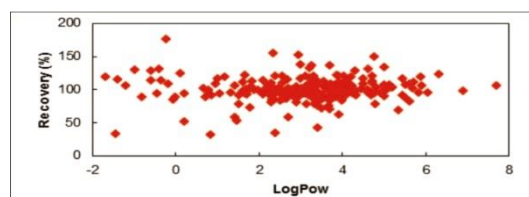


图 5 番茄分析中回收率-LogPow 图

表 2 典型农药的重复性和线性

化合物名	LogPow	重复性 (%RSD,n=5)	线性范围 (ng/g)	R ²
醚菊酯	6.9	6.1	1-100	0.9991
氟铃脲	5.68	6.8	1-100	0.9992
吡草酮	4.69	1.4	2-200	0.999
灭锈胺	3.66	4.6	1-100	0.9993
扑草净	3.34	2.7	1-100	0.9994
咪唑菌酮	2.8	3.0	2-200	0.9991
吡啶酯	2.5	3.0	1-100	0.9996
咪唑磺隆	1.6	6.2	1-100	0.9998
苄嘧磺隆	0.79	8.1	1-100	0.9996
氟嘧磺隆	0.2	5.5	1-100	0.9994
氯吡嘧磺隆	-0.02	5.5	1-100	0.9996
四唑嘧磺隆	-1.4	4.2	1-100	0.9998

番茄分析

向番茄中添加了 10 ng/g 浓度的 510 种成分的农药进行分析。根据所得结果可知，248 种成分具有良好的重复性（峰面积的相对标准偏差 %RSD 小于 20%）和良好的回收率（70~120%）。图 5 为 LogPow 和回收率的示意图。由图可知，宽极性范围的农药分析也具有好的回收率。

本篇据（株）岛津制作所全球应用开发中心（GADC）应用新闻 L-497 中译版改写

Nexera UC Offline SFE-GC/MS 系统分析农产品中的残留农药

摘要 日本于 2006 年颁布执行了日本肯定列表制度。该制度对 800 多种农药规定了最大残留限量标准。因此，需要进行包括样品预处理在内的性质各异的多农残同时分析。在当前食品残留农药的分析中，通常使用 LC/MS 或者 GC/MS 对通过溶剂萃取法萃取出的农药进行分析。但是，溶剂萃取法不仅在预处理操作中需要花费大量的劳力和时间，还需要使用大量有机溶剂。因为二氧化碳低极性、低粘度、高扩散，将超临界二氧化碳流体作为萃取溶剂，进行超临界流体萃取（Supercritical Fluid Extraction, SFE），可以在短时间内进行萃取，并且与当前使用的有机溶剂相比，使用的有机溶剂量少，是一种环保型萃取方法。本文向您介绍通过 Nexera UC 离线 SFE 系统从农产品中萃取出残留农药，然后使用 GC-MS 进行分析的示例。

关键词：Nexera UC 离线 SFE GCMS 农残

离线 SFE 系统

图 1 为 Nexera UC 离线 SFE 系统的运行原理。由图可知，将填充样品的萃取容器固定在 SFE 单元中，调节温度使容器达到 40 °C (图 1A)。向萃取容器中注满超临界二氧化碳流体，保持流体停流状态下静态萃取目标成分(图 1B)。然后向萃取容器注入超临界流体进行动态萃取 (图 1C)。在动态萃取时，将萃取物导入分析柱，然后使用馏分收集器回收包括目标成分的洗脱液(图 1D)。

制备样品

作为农产品残留农药分析的预处理方法, QuEChERS 法操作简便、快速, 因此得到广泛应用。但是, 该方法不仅需要专用试剂盒, 还包含多个步骤, 像

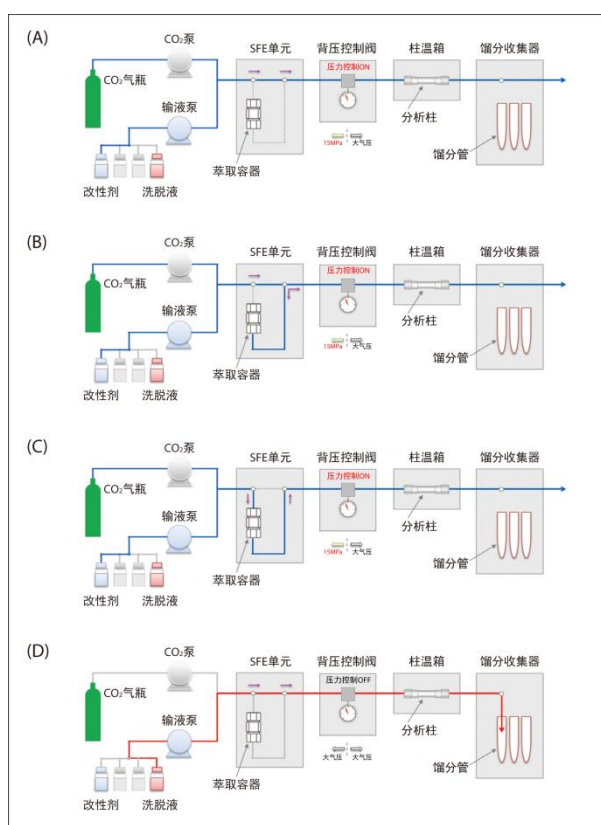


图 1 离线 SFE 工作流程



图 2 样品制备过程

添加试剂、溶剂萃取、基质固相分散萃取、离心分离。而本系统仅需将搅拌机粉碎的农产品 1 g 与脱水剂*1 g 混合，再填入萃取容器即可（图 2）。因此，不仅提高了分析效率，降低了环境负荷，而且也避免了预处理中的人为失误。另外，使用专用的换架器，还能够进行最多 48 个样品的连续萃取和分析。

* “Miyazaki Hydro-Protect” 专利第 3645552 号

表 1 分析条件

[SFE] Nexera UC SFE System		[GC-MS] GCMS-TQ 8040	
溶剂	: A) 超临界 CO ₂ 流体 B) 甲醇	色谱柱	: Rxi®-5Sil MS 30 m × 0.25 mm I.D., df = 0.25 μm
流速	: 5 mL/min	柱温	: 50 °C (1 min) → (25 °C/min) → 125 °C → (10 °C/min) → 300 °C (15 min)
萃取	: 8 min (静态模式 → 动态模式)	载气	: He (恒线速度模式)
萃取容器温度	: 40 °C	线性速度	: 47.2 cm/sec
背压	: 15 MPa	进样模式	: 无分流 (进样时间 1.00 分钟)
色谱柱	: Shim-pack VP-ODS (50 mmL × 4.6 mm I.D., 5 μm)	高压进样	: 250 kPa (1.5 min)
洗脱液	: 丙酮/己烷= 50/50 (2 mL/min, 2 min)	进样体积	: 1 μL
		接口温度	: 250 °C
		离子源温度	: 200 °C
		测定模式	: MRM
		循环时间	: 0.3 秒

糙米分析

向粉碎的糙米中添加 GC/MS 分析用农药的混合标准溶液（林纯药制造 PL2005 农药 GC/MS Mix I~VI, 7），样品加标浓度为 100 ng/g，并进行 SFE 分析。表 1 为分析条件。用洗脱液将得到的萃取液稀释到 2 mL，并使用 GC-MS 进行分析。图 4 为通过 GC-MS 得到的 MRM 色谱图。由图可知，301 种成分均得到了良好的重复性（定量浓度的相对标准偏差% RSD 不到 10%）和良好的回收率（70~120%）。表 2 为 301 种成分的重复性以及回收率。使用本系统进行分析，平均每个样品的自动萃取时间大约为 30 分钟，说明预处理步骤非常简单。

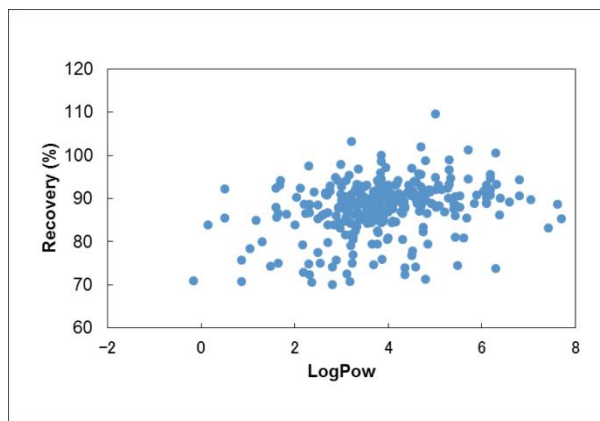


图 3 糙米分析的回收率

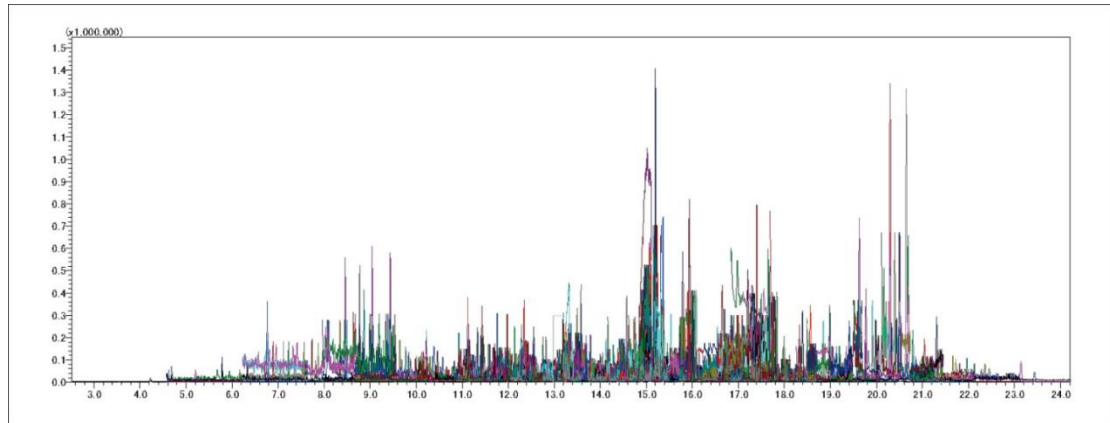


图 4 糙米萃取液的 GC-MS/MS 分析 MRM 色谱图

表 2 重复性以及回收率

Compounds	Repeatability (%RSD, n=6)	Recovery (%)	Compounds	Repeatability (%RSD, n=6)	Recovery (%)
2-Phenylphenol	3.8	87	Pyributicarb	3.1	88.1
Acetochlor	5.9	93.1	Pyridaben	3.1	86.1
Acrinathrin-1	6.8	73.8	Pyridaphenthion	5.4	84.2
Acrinathrin-2	3.1	100.6	Pyrifenoxy-(E)	5.9	85.2
Alachlor	3.6	88.7	Pyrifenoxy-(Z)	7.3	92.9
Allethrin-3,4	5.9	102	Pyrimethanil	6	83.9
Allidochlor	5.3	86.4	Pyrimidifen	4.9	74.2
alpha-BHC	4.6	88.9	Pyriminobac-methyl-(E)	3.9	88.6
alpha-Endosulfan	9.5	98.7	Pyriminobac-methyl-(Z)	5.2	88.6
Ametryn	4.1	86.3	Pyriproxyfen	5.7	92.1
Anilofos	4.7	86.3	Quinalphos	3.3	93.2
Atrazine	4.8	86.7	Quinoxifen	3.2	87.1
Azaconazole	5.5	70.5	Quintozene	6	90.3
Azamethiphos	9.9	78.4	Quizalofop-ethyl	3	86.9
Bromopropylate	4.1	90.9	Resmethrin-1	6.2	88.5
Bromuconazole-1	3.7	80.5	Resmethrin-2	3.3	86.1
Bromuconazole-2	5.3	77.1	Silafluofen	3.7	88.6
Bupirimate	7.9	86.8	Azinphos-ethyl	5.3	84.3
Buprofezin	6.6	88.8	Azinphos-methyl	2.7	83.1
Butachlor	6.4	91.6	Benalaxyl	7	84.9
Butafenacil	4.4	90.4	Benfluralin	5.2	90.1
Butamifos	3.8	90.1	Benfuresate	4.1	91.5
Butylate	4.6	84.7	Benoxacor	3.2	90.8
Cadusafos	4.1	88.1	beta-BHC	5.3	87.8
Cafenstrole	5.1	91.1	beta-Endosulfan	6.5	90.7
Captan	9.1	77.6	Bifenox	4.1	84.5
Carbofuran	4.7	83.3	Bifenthrin	3.3	89.2
Carbophenothion	2.9	91.5	Biphenyl	3.5	80.5
Carfentrazone-ethyl	4.1	96.8	Bromobutide	4.6	90.4
Chinomethionat	4.2	82.1	Bromophos	5.4	90.1
Chlormethoxyfen	5.8	89.8	Bromophos-ethyl	6	86.6
Chlorbenside	3.9	81.1	Diphenamid	5.7	79.3
Chlorbufam	4.2	84.7	Diphenylamine	3.1	91.5
Chlorethoxyfos	4.6	90.3	Disulfoton sulfone	5.2	85
Chlorfenapyr	7.5	86.5	Ditalimfos	3.2	90.1
Chlorfenson	7.7	91.4	Dithiopyr	5.1	90.9
Chlorfenvinphos-(E)	4.4	91.2	Edifenphos	3.5	95.9
Chlorfenvinphos-(Z)	6.5	88.7	Endosulfan sulfate	6.9	95.4
Chlormephos	3.1	89.6	EPN	3.8	88

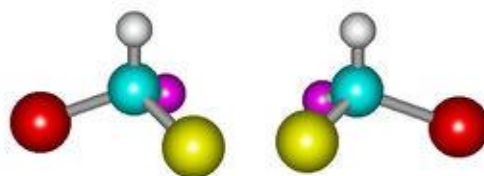
Chlorobenzilate	3.6	92	Epoxiconazole	3.7	83.9
Chloroneb	6	95	EPTC	4.3	81.6
Chlorothalonil	5.3	87.7	Esprocarb	2.7	90.6
Chlorpropham	4.9	88.5	Ethalfuralin	5.3	93.3
Chlorpyrifos	6.2	90.8	Ethion	3.4	93.1
Chlorpyrifos-methyl	5.1	90.5	Ethofumesate	5.7	91.4
Chlorthiophos-2	9.5	88.4	Ethoprophos	4.3	91
Chlorthiophos-3	2.8	92.8	Etobenzanid	3.8	86.6
Chlozolinat	7.8	82.4	Etofenprox	3.8	89.7
Cinidon-ethyl	4.3	88.8	Etoxazole	8.2	87.9
Cinmethylin	9.9	94.5	Etridiazole	3.8	85.3
Clomazone	4.2	88.6	Etrimfos	2.9	87.9
Clomeprop	3.3	89.8	Famoxadone	5.4	71.2
Crimidine	6	80	Fenamidone	5.7	70.1
Cyanofenphos	4.7	91.8	Fenchlorphos	6	92.1
Cyanophos	5	91.3	Fenitrothion	6.9	88.7
Cyflufenamid	8.4	89.6	Fenothiocarb	5.4	88.6
Cyfluthrin-1	5.1	95.6	Fenoxanil	6.2	88.2
Cyfluthrin-2	3.5	94.6	Fenoxaprop-ethyl	4.1	90.5
Cyfluthrin-3	4.9	92	Fenoxycarb	6.9	84.4
Cyfluthrin-4	6	90.8	Fenpropathrin	3.7	91.6
Cyhalofop-butyl	4.2	93.4	Fenpropimorph	4.7	76.8
Cyhalothrin-1	9.1	90.6	Fenthion	3.6	79.5
Cyhalothrin-2	4.5	94.4	Fenvalerate-1	5.2	88.4
Cypermethrin-1	2.8	99	Fenvalerate-2	4.2	95
Cypermethrin-2	3.7	96.6	Fipronil	8.3	86.7
Cypermethrin-3	3.7	93.2	Flamprop-methyl	6.6	85.7
Cypermethrin-4	8.4	93.2	Fluacrypyrim	6.8	97
Cyprodinil	4	80.9	Flucythrinate-1	4	92.8
delta-BHC	2.2	88.2	Flucythrinate-2	3.7	95.7
Deltamethrin-2	3.7	103.2	Flufenpyr-ethyl	1.8	98
Dialifos	3.2	91.4	Flumiclorac-pentyl	5.8	91.8
Di-allate-1	2.5	91.5	Flumioxazin	9.4	75
Di-allate-2	4.7	92	Fluquinconazole	4.3	81.2
Diazinon	7.8	90	Flusilazole	5.5	86.8
Dichlobenil	4	79.8	Fluthiacet-methyl	3.8	79.5
Dichlofenthion	5.2	92.1	Flutolanil	9.6	87.8
Dichlofluanid	3.3	87.2	Fluvalinate-1	2.6	100
Dichlorvos	3.2	83.9	Fluvalinate-2	2.6	98.6
Diclobutrazol	5.2	87	Folpet	5.3	87.7
Diclocymet-1	4.3	83.4	Fonofos	3.8	91.7
Diclocymet-2	5.1	82.2	Formothion	5.3	74.4
Diclofop-methyl	4.4	91	Fosthiazate-2	9.6	93.2
Diethofencarb	4.8	83.8	Furilazole	3.3	92.4
Difenoconazole-1	5.5	74	gamma-BHC	4.1	88.7
Difenoconazole-2	5.2	72.4	Halfenprox	2.3	85.4
Diflufenican	4.4	94.3	Hexaconazole	8.9	85.6
Dimepiperate	2.5	87.8	Indanofan	7.9	86.5
Dimethametryn	6.4	84.8	Indoxacarb	3.7	95.7
Dimethenamid	5.4	88.8	Iprobenfos	4.4	89.5
Dimethipin	9.9	70.9	Iprodione	2.5	92.7
Dimethylvinphos-(E)	4.5	86.8	Iprodione metabolite	3.1	106.2
Dimethylvinphos-(Z)	4.9	86.1	Isazofos	3.7	94.2
Diniconazole	2.3	80.6	Isocarbophos	6.6	84
Dioxabenzofos	4.4	91.5	Isafenphos	3.2	89
Dioxathion	5.4	88.6	Isafenphos oxon	5.2	84.5
Dioxathion deg.	4.4	86.1	Isoprocarb	4.5	86.6
Metominostrobin-(E)	9.6	72.4	Isoprothiolane	7.5	86.1

Metribuzin	6.5	75.1	Isoxadifen-ethyl	5	90.5
Mevinphos-1	9.9	92.3	Isoxathion	6.7	93.2
Mevinphos-2	6	85.4	Kresoxim-methyl	7	89.7
Molinate	3.8	86	Leptophos	3.5	93.3
Myclobutanil	5.9	75.7	Malathion	3.2	93
Naled	6.1	72.8	MCPB-ethyl	3.5	90.3
Nitralin	4.5	94.2	Mecarbam	8.4	97.6
Nitrofen	8.1	88.9	Mefenacet	4.5	75.1
Nitrothal-isopropyl	2.4	90.2	Mefenpyr-diethyl	5	90.4
Oxabetrinil	3.4	91.7	Mepronil	4.2	79.5
Oxadiazon	3.9	94.7	Metalaxyl	7	86.6
Oxpoconazole	6.4	74.7	Methacrifos	5.9	92.3
Oxpoconazole-formyl deg.	9.9	88.9	Methidathion	4.5	86
Oxyfluorfen	8.9	88.3	Methoprene	8.8	109.6
Paclbutrazol	7.5	72.6	Methoxychlor	3.1	90.6
Parathion	6.3	90.1	Metolachlor	2.9	91.1
Parathion-methyl	5.1	90.4	Simazine	5.2	74.9
Penconazole	4.7	85	Simeconazole	6.1	79.1
Pendimethalin	5.1	86.9	Simetryn	5	74.1
Pentoxazone	4.2	95.6	Spirodiclofen	4.6	94.1
Permethrin-1	4.8	89	Sulfotep	3.9	92.9
Permethrin-2	4	88.8	Sulprofos	4.8	74.5
Phenothrin-1	7.4	93.1	Swep	5.3	83.6
Phenothrin-2	2.5	90.2	Tebufenpyrad	3.6	88.8
Phenthoate	2.4	91.7	Tebupirimfos	4.6	89.4
Phorate	4.1	75.9	Tecnazene	3.1	89.5
Phosalone	3.5	88.1	Tefluthrin	4.5	90.1
Phosmet	4.2	84.5	Terbucarb	4	87.6
Phosphamidon-1	8.6	75.8	Terbufos	3.8	77.9
Phosphamidon-2	6.6	70.8	Terbutryn	4.5	86
Picolinafen	4	90.4	Tetrachlorvinphos	3.2	93
Piperonyl butoxide	3.8	89.2	Tetraconazole	7.8	84.3
Piperophos	3.5	88.9	Tetradifon	5.9	89.5
Pirimiphos-methyl	5.7	90.8	Tetramethrin-1	6.9	93.8
Pretilachlor	5.6	89.8	Tetramethrin-2	4.3	90.9
Procymidone	7	91.6	Thenylchlor	3.5	87.3
Profenofos	5.6	94.1	Thifluzamide	5.9	84.6
Prohydrojasmon-1	5.5	87.7	Thiobencarb	3.5	85.6
Prohydrojasmon-2	8.7	88.6	Tolclofos-methyl	3.9	90.6
Prometryn	3	86.8	Tolfenpyrad	3.6	81
Propachlor	4.4	88	Tolyfluanid	5.8	91.1
Propargite-1	9.3	101.3	Triadimefon	3.7	88.3
Propargite-2	9.5	94.5	Triadimenol-1	6.2	70.8
Propazine	4	97.1	Tri-allate	5.3	91.2
Propiconazole-1	6.7	89.4	Triazophos	4.7	89.9
Propiconazole-2	3.2	88.3	Tribufos	6.2	90.6
Propoxur	5.3	83.9	Trichlamide	5.2	85.3
Propyzamide	4.2	81.6	Trifloxystrobin	5.9	90.7
Prothiofos	4	85.5	Trifluralin	3.2	92.5
Pyraclufos	5.1	94.1	Vinclozolin	4.2	89.6
Pyraclostrobin	4.7	93.1	XMC	3.9	86.5
Pyraflufen-ethyl	4.7	92.7	Xylylcarb	4.5	85.3
Pyrazophos	4.2	92.8	Zoxamide	3.6	82.6
Pyrazoxyfen	9.4	91.2			

本篇据（株）岛津制作所全球应用开发中心（GADC）应用新闻 L-502 中译版改写

二、手性拆分分析

有机化合物分子中的不对称碳原子的存在,使之能形成互成镜像,有如左右手的两种立体异构体,又称为对映异构体,化合物的这种特性称之为手性。手性是自然界的一种普遍现象,构成生物体的基本物质如氨基酸、糖类等都是手性分子。



手性异构体(对映体)在药物中占有很大的比例,据统计,已知药物中约有30%~40%是具有手性的。手性物质的对映体之间有许多相同的理化性质,如熔点、溶解度、发生相同类型的化学反应等等,但也有一些理化性质间有极大的差异,如旋光性、气味、与手性物质相互作用产生不同的产物,特别是许多与生物体密切相关的生化反应中,均和物质的手性相关联。目前对物质的手性、物质的手性反应以及物质的手性合成和分离等研究,对人类来讲具有不可轻视的重大意义。

一对对映异构体的混合物称之为外消旋体,而将一个外消旋体的二个对映体分开,使之成为纯净的状态的过程,称为外消旋体的拆分,或称为手性拆分。其方法主要分为两大类:一类是非色谱法,包括结晶、萃取、酶促法;另一类为色谱法,包括薄层色谱、气相色谱、高效液相色谱、超临界流体色谱、毛细管电泳法等。超临界流体色谱(SFC)具有简单、高效、易于变换操作条件等优点,已成为和高效液相色谱(HPLC)及气相色谱(GC)互为补充的拆分方法,相对比下,超临界流体因其具有独特的优越性,应用前景极为广阔。超临界流体色谱手性分离方式主要有手性固定相法和手性流动相添加剂法,其中前者发展更为迅速。目前应用于HPLC和GC的手性固定相均可用于SFC手性拆分。

Nexera UC系列中的手性筛选系统专为手性化合物拆分所设计,专用的方法开发软件自动控制4种改性剂任意比例混合及最多12种色谱柱切换的方式使得手性拆分工作变得简单高效。

本节收录使用Nexera UC手性筛选系统进行化合物拆分的多个案例供读者了解系统的工作方式和参考使用。

Nexera UC 手性筛选系统在手性化合物分离条件自动优化中的应用

摘要 光学活性(手性)物质是分子内具有不对称碳、呈镜像对称而无法完全重合的化合物。以往利用色谱法分离手性化合物以 HPLC 为主,但近年来,使用超临界流体色谱法(Supercritical Fluid Chromatography: SFC)进行分析的方法日益增加。通过 SFC 法对手性化合物进行分析时,主要使用低极性、低粘度、高扩散的超临界二氧化碳作为流动相,向其添加极性有机溶剂(改性剂)来控制溶解性和极性。HPLC 分析中,正相条件实现手性化合物的常规分离和高速分析,还能够减少有机溶剂的使用量,因而分析成本和环境负荷低。但是,使用 SFC 法分析手性化合物时,需要探索各种柱和改性剂,因此需要花费大量人力和时间。本文中的 Nexera UC 手性筛选系统能够最多切换 12 个色谱柱和 4 种改性剂及各种溶液混合比例,自动探索多种分离条件,从而大幅度提高了分析效率。

关键词: Nexera UC 手性拆分 筛选 自动优化

手性筛选系统的分离条件

本实验以奥美拉唑为样品(图 1),使用了 12 根株式会社大赛璐制造的 CHIRALPAK®、CHIRALCEL®系列色谱柱。完备的色谱柱系列拓展了手性化合物分离的应用范围。与具有方法探索功能的 Nexera UC 手性筛选系统组合使用,能够容易地找到最佳手性分离的分析条件。另外,本实验中使用甲醇、乙醇以及乙腈与乙醇的混合溶液等 3 种溶液作为改性剂。表 1 为分离条件。我们根据改性剂(3 种)与色谱柱(12 种)的共计 36 种组合,深入探索了适于手性分离的条件。

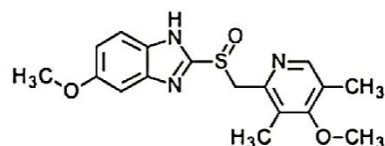


图 1 奥美拉唑

表 1 分析条件

色 谱 柱	: CHIRALPAK®, CHIRALCEL® Series 100 mm L. × 3.0 mm I.D., 3 μm
流 动 相	: A-超临界 CO ₂ 流体; B-改性剂: 甲醇、乙醇、乙腈/乙醇的混合溶液 (3/1 (v/v))
时 间 程 序	: B Conc. 20% (0-8 min) → 40% (8-10 min) → 20%(10 - 14 min)
流 速	: 3 mL/min
柱 温	: 40 °C
进 样 体 积	: 2 μL
背压调节器压力	: 10 MPa
检 测 器	: 光电二极管阵列检测器 (Max Plot 210 - 400 nm)

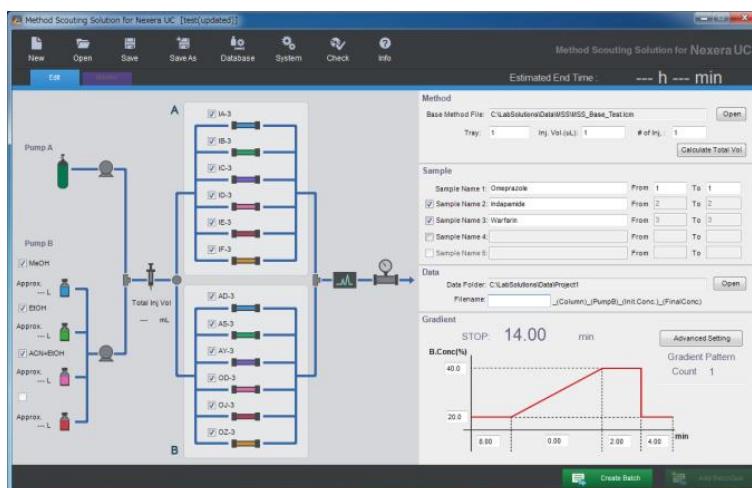


图2 Nexera UC 用 Method Scouting Solution 的操作界面

自动优化奥美拉唑的手性分离条件

图3 为使用 12 根手性色谱柱和甲醇、乙醇以及乙腈/乙醇混合溶液三种改性剂进行分离时得到的 36 种分离结果。由图可知，奥美拉唑在保留时间 8 分钟以内检测到两个能够分离的手性化合物的色谱峰。图4 为通过可选软件得到的分离评估和最优条件的顺序。本软件将自动判断分离度达到标准（本次分析为 1.5）以上的色谱图，并对分离度进行排序。综上所述，在 SFC 手性化合物分析中，使用 Nexera UC 手性筛选系统进行自动优化，可以简化探索分析条件的操作，从而提高了分析效率。

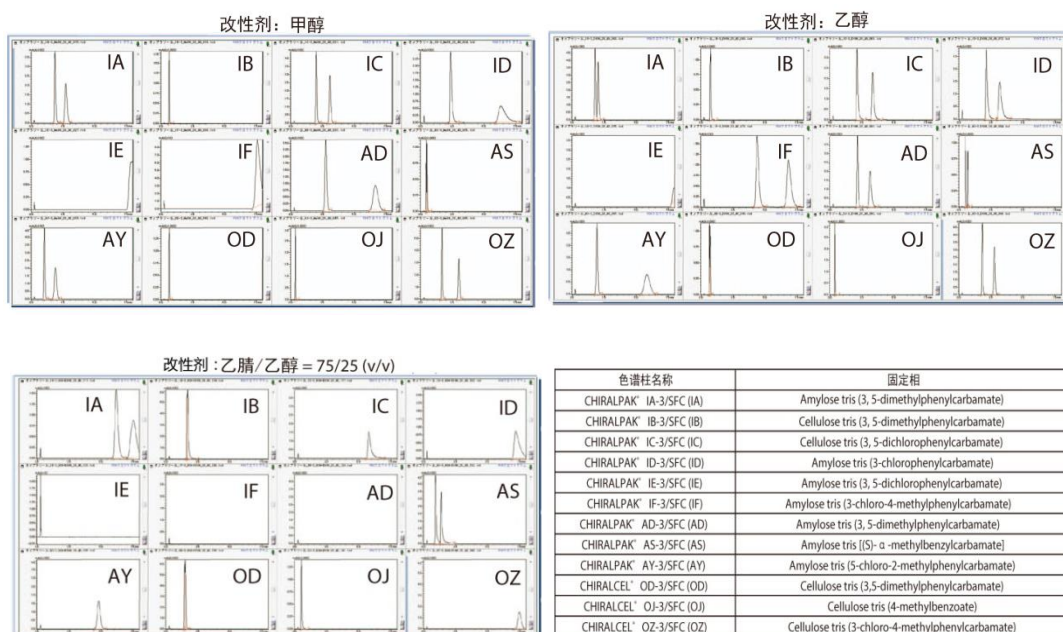


图3 使用 12 根手性色谱柱与 3 种改性剂进行分离比较

Ranking	Run No.	Analytical Condition	Resolution	Separation factor	Symmetry factor		Retention factor		Area%		Peak number
					Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	Peak1	Peak2	
1	32	Omeprazole_OZ-3 MeOH 20 40	7.965	1.921	1.16	1.159	6.583	12.644	49.829	50.171	2
2	17	Omeprazole_IC-3 MeOH 20 40	5.587	1.602	1.387	1.274	8.078	12.937	49.971	50.029	2
3	16	Omeprazole_IC-3 EtOH 20 40	5.382	1.639	1.915	1.661	8.617	14.124	49.984	50.016	2
4	31	Omeprazole_OZ-3 EtOH 20 40	5.377	1.599	1.169	1.162	7.229	11.561	49.778	50.222	2
5	1	Omeprazole_AD-3 EtOH 20 40	3.996	1.509	1.257	1.404	8.779	13.25	50.054	49.946	2
6	8	Omeprazole_AY-3 MeOH 20 40	3.55	2.08	1.178	1.145	3.652	7.597	49.974	50.026	2
7	11	Omeprazole_IA-3 MeOH 20 40	3.428	1.523	1.464	1.312	7.435	11.327	49.973	50.027	2
8	4	Omeprazole_AS-3 EtOH 20 40	2.515	1.673	1.657	1.518	1.244	2.081	49.754	50.246	2
9	10	Omeprazole_IA-3 EtOH 20 40	1.586	1.157	1.322	1.279	7.115	8.234	49.347	50.653	2



第一位分离条件
 色谱柱: CHIRALCEL® OZ-3/SFC
 改性剂: 甲醇
 第二位分离条件
 色谱柱: CHIRALPAK® IC-3/SFC
 改性剂: 甲醇
 第三位分离条件
 色谱柱: CHIRALPAK® IC-3/SFC
 改性剂: 乙醇

图4 分离条件评估结果和基于最优条件的手性分离色谱图

*CHIRALPAK®, CHIRALCEL®为株式会社大赛璐的注册商标。

本篇据 (株) 岛津制作所全球应用开发中心 (GADC) 应用新闻 L-495 中译版改写

Nexera UC SFC 在农药戊唑醇手性杂质拆分中的应用

摘要：本实验使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对戊唑醇两个异构体进行拆分。考察了色谱柱、改性剂、温度及压力对分离的影响，获得最佳分离条件。

关键词：Nexera UC SFC 戊唑醇 药物杂质手性拆分

含手性因素的化学药物对映体在生物体内的药理活性、代谢过程及毒性存在显著的差异。对于手性药物，一个异构体可能是有效的，而另一个异构体可能是无效甚至是有害的。当前手性药物的研究已成为国际新药研究的主要方向之一。

超临界流体色谱（Supercritical Fluid Chromatography, SFC）是以超临界流体为主要流动相，添加改性剂或微量添加剂的二元或三元流动相的新型色谱分离技术。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点，使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。

戊唑醇是一种广谱高效的杀菌剂，既可

对植物体外部的病原菌有防治作用，也可以随着在植物体内部的传导杀死内部病原菌。

戊唑醇分子中含有一个手性中心，含一对对应异构体（图

1），文献报道

其对映体的

抗菌活性存在明显差异，

得到单一构

型的戊唑醇成为必要。

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统，对戊唑醇的两个异构体进行分离，考察了色谱柱、改性剂、柱温及压力对分离的影响。

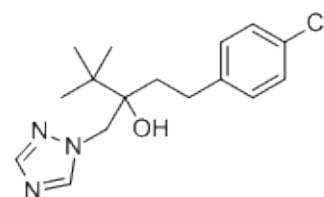


图 1 戊唑醇结构式

1. 实验条件

1.1 仪器 Nexera UC SFC-UV 系统

具体配置为：LC-30AD_{SF}（CO₂ 输液泵），LC-30AD（输液泵），DGU-20A5+DGU-20A3（在线脱气机），SIL-30AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），SFC-30A（背压调节单元），SPD-M20A（紫外检测器），CBM-20A（系统控制器），LabSolutions Ver 5.81（色谱工作站）。

1.2 样品信息

称取一定量戊唑醇加入异丙醇，超声至完全溶解，并用 0.45 μm 的 PTFE 针式滤器过滤得到 2 mg/mL 的戊唑醇样品溶液，上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 色谱柱填料对分离的影响

手性物质的拆分，色谱柱的类型选择十分重要。实验考察了 Daicel 的 6 款键合型手性色谱柱 IA-3、IC-3、ID-3、IE-3、IF-3、IG-3，所用规格均为 4.6 mm I.D.×150 mm L., 3 μm。在 scCO₂-MeOH、scCO₂-EtOH、scCO₂-IPA 体系中对戊唑醇样品进行分析。

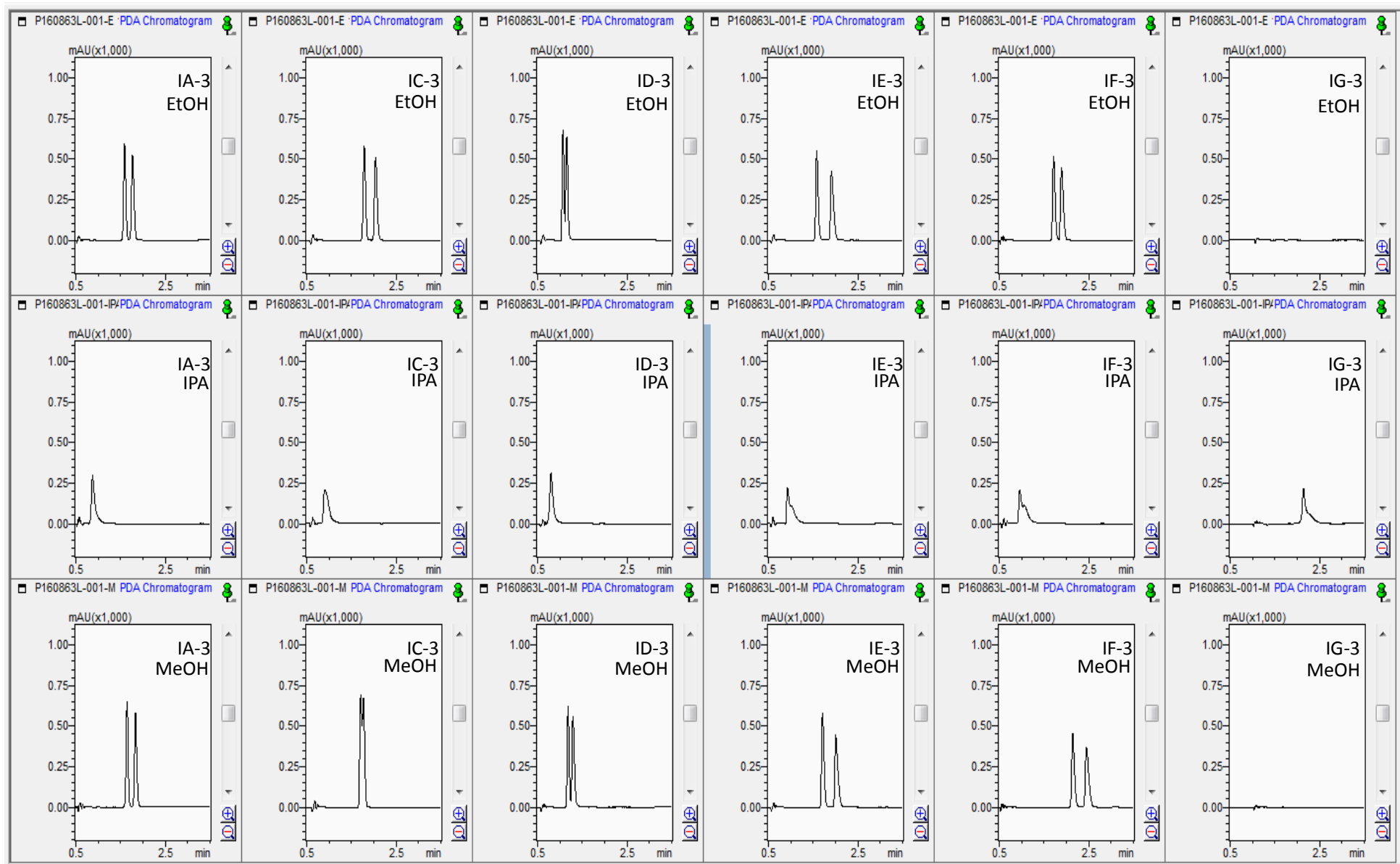


图2 6种键合型手性色谱柱使用乙醇、异丙醇和甲醇改性剂时的分离效果对比图(214 nm)

由上图可知，本例中异丙醇作为改性剂时待测物在各种固定相上表现均不佳，对比 6 种手性固定相发现，IE-3 型在乙醇和甲醇作为改性剂时均可表现出良好的峰形和分离度。

2.2 改性剂对分离的影响

手性物质的拆分，改性剂的种类和比例影响仅次于固定相。选择在 2.1 考察结果中表现良好的 Daicel IE-3 和乙醇改性剂，考察不同比例的乙醇对分离的影响。结果显示当减少改性剂乙醇的比例时，样品的保留时间延长同时分离度增大（见图 3），综合考虑分离结果，选择乙醇改性剂的加入比例为 10%。

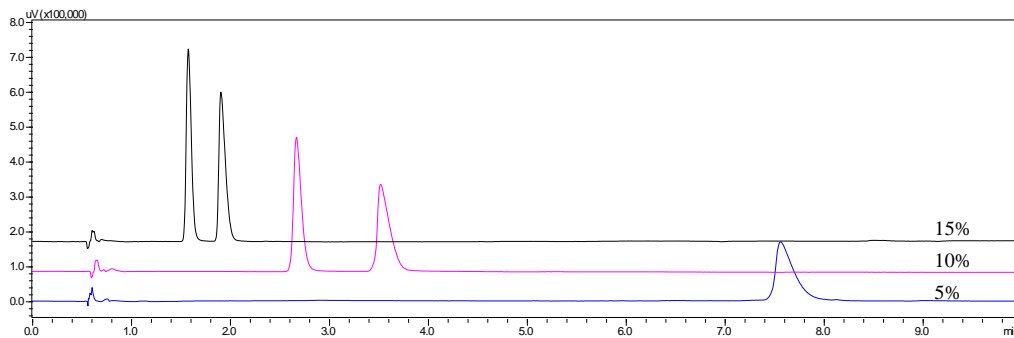


图 3 不同比例改性剂分离效果对比图

2.3 柱温对分离的影响

改变色谱柱的温度可以改变超临界流体的粘度从而对分离产生影响。本文考察了柱温分别为 40℃、35℃和 30℃对分离的影响，结果显示保留时间和分离度均随着温度的升高而减小，而峰 2 随着超临界流体温度升高而拖尾减弱，灵敏度提高（见图 4）。

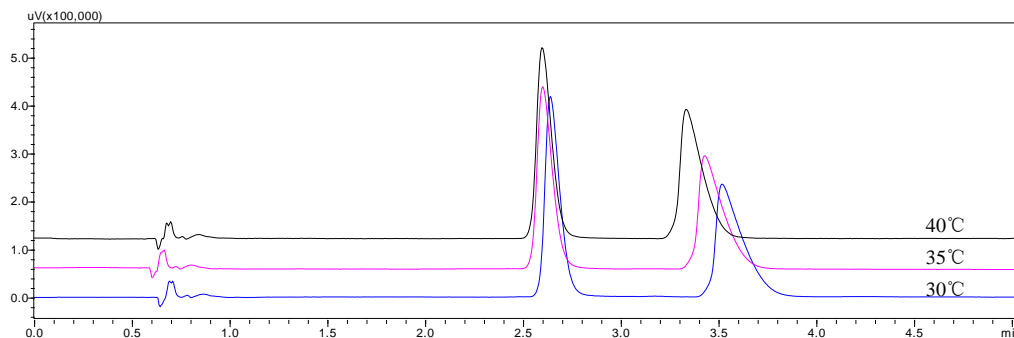


图 4 不同柱温下分离效果对比图

2.4 背压对分离的影响

本文考察了背压分别为 10 MPa、15 MPa、20 MPa 和 25 MPa 对分离的影响，结果显示随着背压的增加，超临界流体密度增大，洗脱能力增强，表现为色谱峰保留时间减小，拖尾减弱。

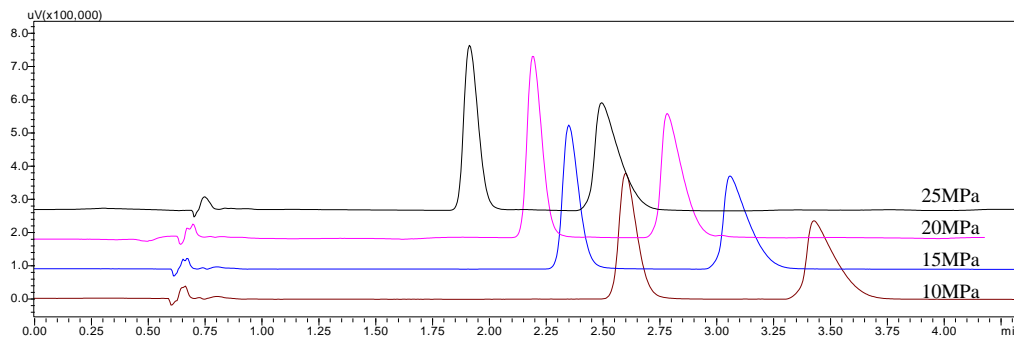


图 5 不同背压下分离效果对比图

综合考虑分离度、分析时间、色谱柱压力等因素，最终确定分析条件如下：

SFC 色谱条件

色谱柱 ChiralPak IE-3 4.6 mm I.D.×150 mm L., 3 μ m
流动相 scCO₂/乙醇=90/10
流速 2 mL/min
柱温 35 $^{\circ}$ C
检测波长 214 nm
背压 10 MPa
进样量 3 μ L

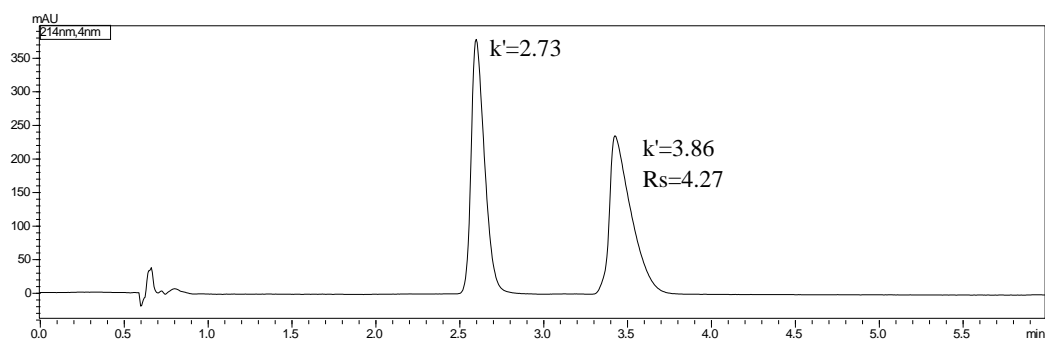


图6 确定条件下戊唑醇样品拆分的色谱图

3. 结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对戊唑醇的两个对映异构体的拆分参数条件进行了研究。优化了色谱柱、改性剂类型及比例、柱温、背压等参数，最终确立了两个对映异构体拆分的最佳条件。由于 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势，使得其在手性拆分方面有广阔的应用前景。

本文与大赛璐药物手性技术（上海）有限公司合作完成

Nexera UC SFC 在 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉异构体手性拆分中的应用

摘要：本实验使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉两个异构体进行拆分。考察了色谱柱、改性剂、温度及压力对分离的影响。结果发现使用 DAICEL OJ-3 色谱柱和甲醇为改性剂时可将两个异构体拆分开来，分离度可达 2.97。

关键词：Nexera UC SFC 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉 手性拆分

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是以超临界流体为主要流动相, 添加改性剂或微量添加剂的二元或三元流动相的新型色谱分离技术。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点, 使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。

2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉在化学上有广泛的应用, 一方面作为手性配体, 在不对称反应中可以协助获得高光学活性化合物; 另一方面, 作为经典的拆分试剂, 易形成非对

映异构体盐, 且解析后回收率高, 广泛应用于外消旋体分子的拆分。

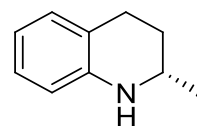


图 1 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉结构式

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统, 对 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉的两个异构体进行分离, 考察了色谱柱、改性剂、柱温及压力对分离的影响。

1. 实验条件

1.1 仪器 Nexera UC SFC-UV 系统

具体配置为: LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-30AD (输液泵), DGU-20A5+DGU-20A3 (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A (背压调节单元), SPD-M20A (二极管阵列检测器), CBM-20A (系统控制器), LabSolutions Ver 5.81 (色谱工作站)。

1.2 样品信息

称取一定量 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉以乙醇溶解, 并用 0.45 μm 的亲水 PTFE 针式滤器过滤得到 7 mg/mL 的 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉供试溶液, 上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 色谱柱填料对分离的影响

手性物质的拆分, 色谱柱的类型选择十分重要。实验考察了 Daicel 的 6 款涂覆型手性色谱柱 AD-3、AS-3、AY-3、OD-3、OJ-3、OZ-3, 所用规格均为 4.6 mm I.D.×150 mm L., 3 μm。在 scCO₂-MeOH、scCO₂-EtOH、scCO₂-IPA 体系中对 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉样品进行分析, 结果显示 OJ-3 表现出了较好的选择性和分离能力 (见图 3)。

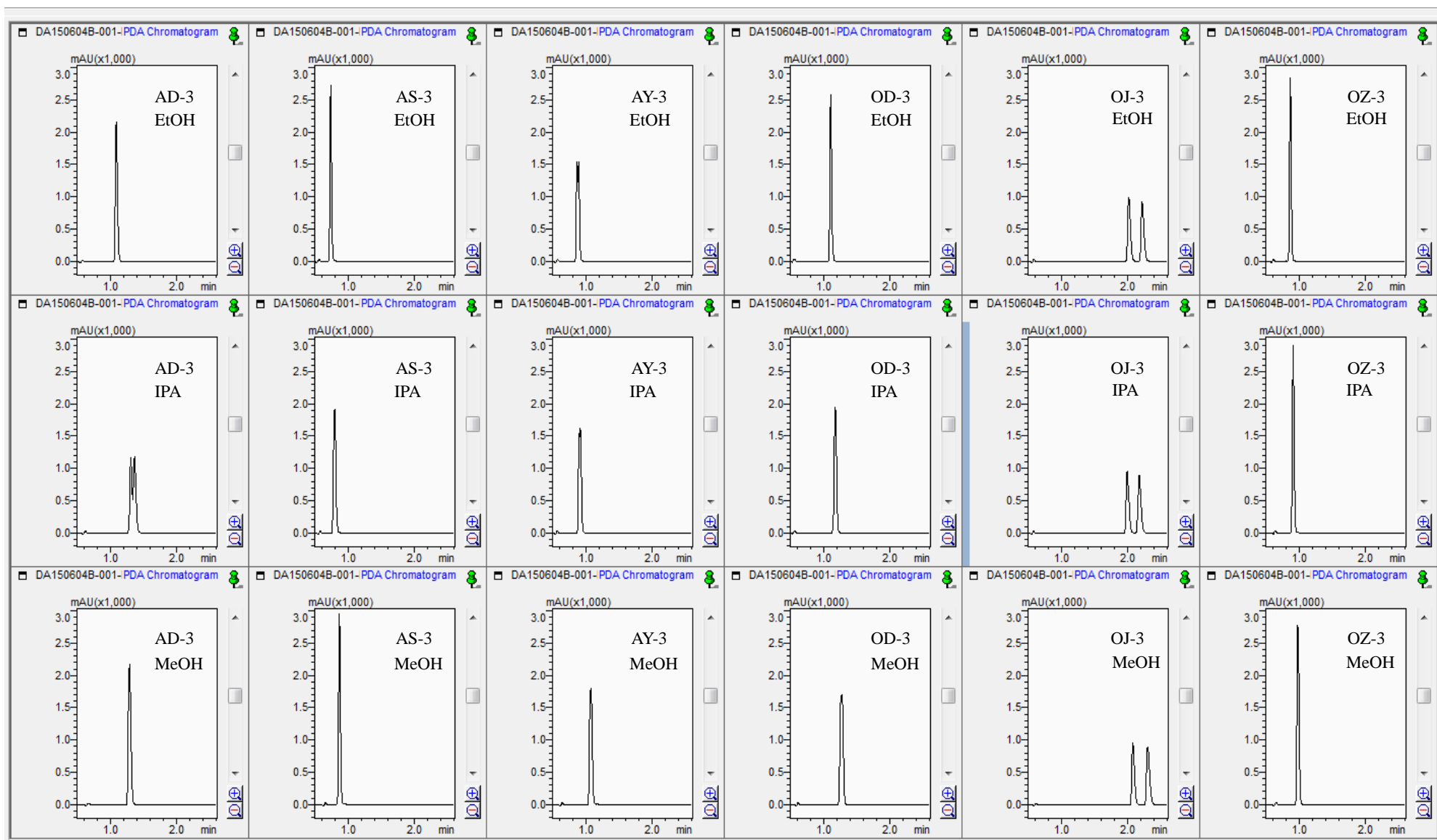


图2 6种涂覆型手性色谱柱分别以乙醇、异丙醇和甲醇为改性剂时分离效果图(254 nm)

2.2 改性剂对分离的影响

手性物质的拆分，改性剂的种类和比例影响也很大。本文考察了在 Daicel OJ-3 色谱柱上 3 种改性剂甲醇、乙醇和异丙醇，及不同比例的甲醇对分离的影响。结果显示甲醇、乙醇和异丙醇对两个异构体的选择性和分离性能相当，且对两个异构体的洗脱能力依次增强，但分离度有所减小（见图 3）。选择相对分离效果较好的甲醇进行改性剂比例对分离结果的考察，当减少改性剂甲醇的比例时，样品的保留时间延长同时分离度增大（见图 4）

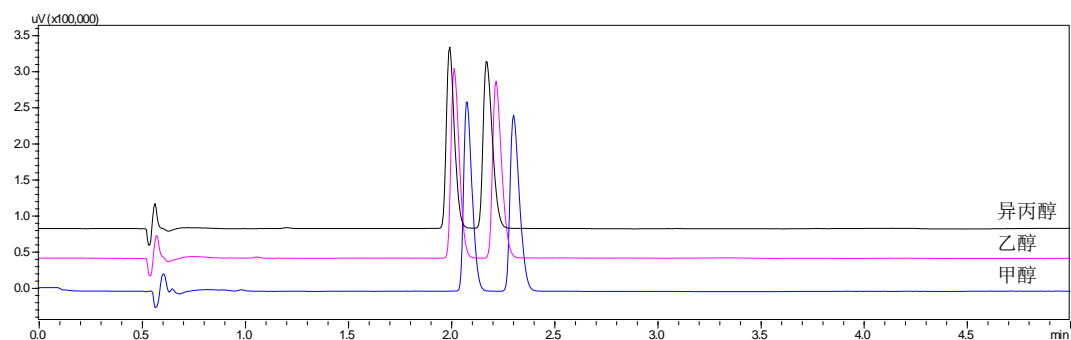


图 3 不同类型改性剂分离效果对比图（254 nm）

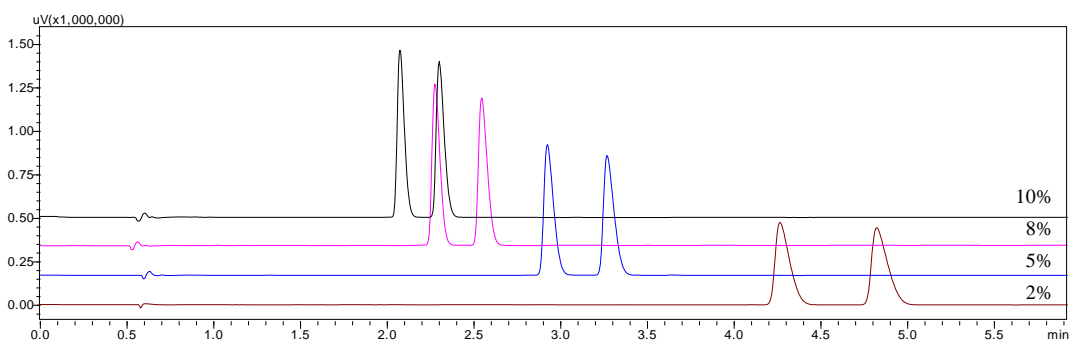


图 4 不同比例甲醇作为改性剂分离效果对比图（254 nm）

2.3 背压对分离的影响

改变背压可以改变超临界流体的粘度从而对分离产生影响。本文考察了背压分别为 10 MPa、15 MPa、20 MPa 和 25 MPa 对分离的影响，结果显示保留时间和分离度均随着背压的增加而减小（见图 5）。

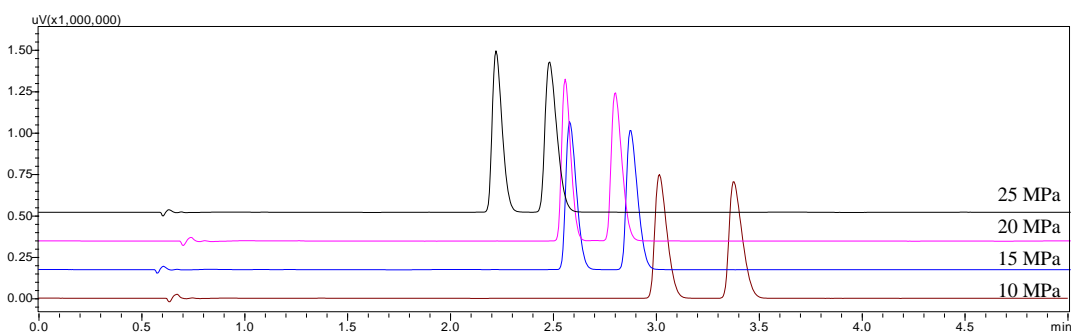


图 5 不同背压下分离效果对比图（254 nm）

考虑分离度、运行成本、分析时间、柱子压力等方面，最终确定分析条件如下：

SFC 色谱条件

色谱柱 CHIRALCEL OJ-3 4.6 mm I.D.×150 mm L., 3 μ m

流动相 scCO₂/甲醇=95/5

流速 2 mL/min

柱温 35°C
检测波长 254 nm
背压 10 MPa
进样量 1 μL

使用上述条件进行测试，结果如图 6 所示，2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉两个异构体的分离度为 2.97。

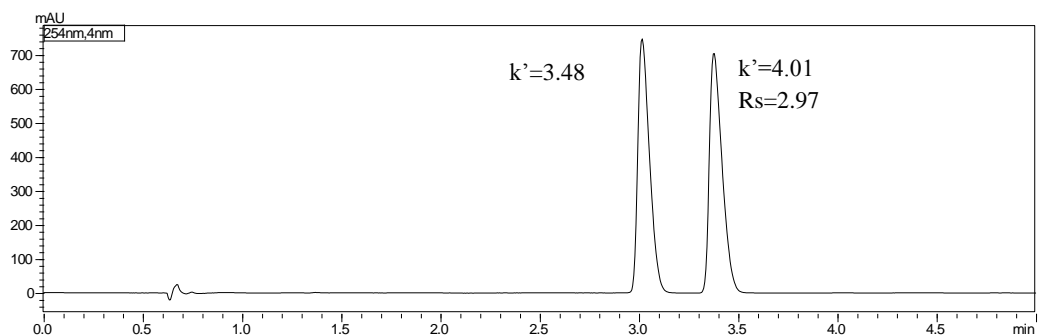


图 6 确定条件下 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉样品拆分的色谱图

3. 结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对 2-甲基-1,2,3,4-四氢喹啉的两个对映异构体的拆分参数条件进行了研究。优化了色谱柱、改性剂类型及比例、背压等参数，最终确立了两个对映异构体拆分的最优条件。由于 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势，使得其在手性拆分方面有广阔的应用前景。

本文与大赛璐药物手性技术（上海）有限公司合作完成

Nexera UC SFC-PDA 用于手性农药氟胺氰菊酯的拆分

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC SFC-PDA 系统建立了手性农药氟胺氰菊酯的拆分方法。考察了色谱柱、改性剂种类及比例、流速、温度、背压对氟胺氰菊酯对映体分离的影响。综合考虑分析时间及分离度, 确定最优条件如下, DAICEL Chiralpak ID-3 色谱柱 (3 mm I.D.×150 mm L., 3 μm), 乙醇作为改性剂, 比例 2% 等度洗脱, 流速 2.0 mL/min, 色谱柱温度 32°C, 背压 10 MPa。分析结果显示, 氟胺氰菊酯 S 和 R 对映体的分离度可达 2.19, 分析时间仅需 4 min。

关键词: Nexera UC SFC-PDA 手性农药 氟胺氰菊酯

氟胺氰菊酯是一种高效、广谱的拟除虫菊酯类杀虫、杀螨剂, 具有胃毒和触杀作用, 对作物安全, 残效期长, 广泛应用于蜂螨防治。氟胺氰菊酯含有 2 个手性中心, 具有两对对映体, 即 4 个光学立体异构体。从 1994 年至今市售和使用的产品则只含有 2 个高活性的异构体, 原药一般为 1:1 的异构体的混合物。生物体中的蛋白质、多糖、核酸和酶等都是不对称的生物大分子, 手性农药进入这些生物体内具有的不对称性环境后, 可以在各种环境载体的选择性作用下被识别, 从而在杀虫、环境毒性、富集、分布、降解和代谢等诸多方面表现出显著的对映体选择差异性。

超临界二氧化碳具有低极性、高扩散等特点, 将超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatogram, SFC)用于手性化合物的拆分, 可以获得更好的分离效果, 并且与当前使用的正相色谱相比, 具有使用溶剂少、环保的特点。本文采用岛津 Nexera UC SFC 系统, 建立了手性农药氟胺氰菊酯的分析方法, 该方法具有分离度好、分析速度快、节省溶剂等特点。

1. 实验条件

1.1 仪器 Nexera UC 系统

具体配置为: LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20AD_{XR} (输液泵, 含 LPGE 低压梯度比例阀), LC-20AD_{XR} (补偿液输送泵), DGU-20A₅ (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A (背压调节单元), CBM-20A (系统控制器), SPD-M20A (二极管阵列检测器), LabSolutions Ver5.86 (色谱工作站)。

1.2 SFC 色谱条件:

色 谱 柱 : DAICEL Chiralpak ID-3 3 mm I.D.×150 mm L., 3 μm
流 动 相 : A-scCO₂; B-EtOH
流 动 相 流 速 : 2.0 mL/min
柱 温 : 32°C
背 压 : 10 MPa
洗 脱 方 式 : 等度洗脱, 2%B 4 min

1.3 目标分析物

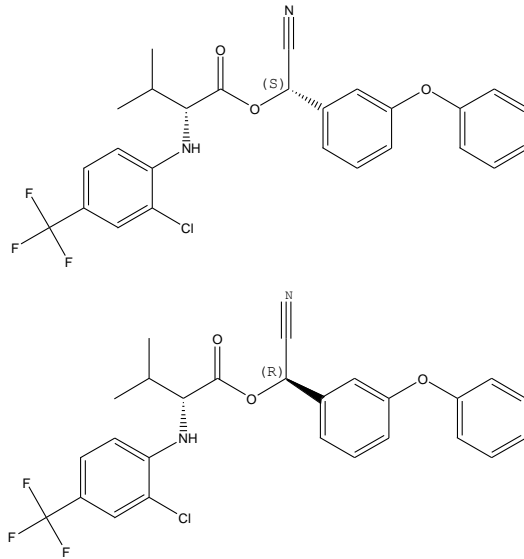


图 1 氟胺氰菊酯异构体的化学结构

2. 结果与讨论

2.1 色谱柱选择

本次试验对比了 DAICEL Chiralpak IC-3 (3 mm I.D.×150 mm L., 3 μm) 和 Chiralpak ID-3 (3 mm I.D.×150 mm L., 3 μm) 两款色谱柱, 在相同条件下, ID-3 色谱柱显示出更好的手性选择性。结果如下图 3 所示。

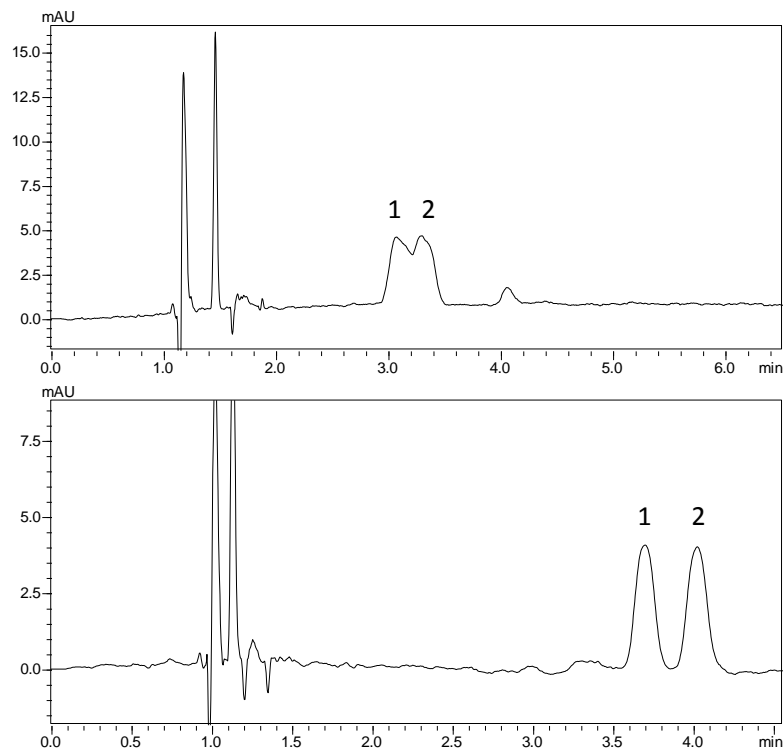


图 2. IC-3 和 ID-3 色谱柱在相同条件下对氟胺氰菊酯手性对映体 (1 和 2) 的分离效果

2.2 改性剂种类对氟胺氰菊酯立体异构体拆分的影响 (甲醇、乙醇、乙腈)

本试验选择拆分效果更好的 Chiralpak ID-3 (ID-3 3 mm I.D.×150 mm L., 3 μm) 色谱柱

进行实验，考察了三种改性剂：甲醇、乙醇、乙腈对氟胺氰菊酯异构体的选择性。结果显示甲醇、乙醇、乙腈对氟胺氰菊酯异构体 S 和 R 均能实现较好的分离， $R_s > 1.5$ 。而乙醇做改性剂分析时间更短，效率更高。结果如下表 1 所示。

表 1. 改性剂种类对氟胺氰菊酯立体异构体拆分的影响

改性剂	k1	k2	α	R_s
甲醇	6.93	8.13	1.17	2.69
乙醇	2.68	3.05	1.14	2.31
乙腈	2.76	3.21	1.16	2.34

2.3 改性剂比例对氟胺氰菊酯异构体分离的影响

考察了改性剂比例在 0%，2%，5%，10% 条件下，氟胺氰菊酯异构体 S 和 R 的分离度。结果如下表 2 所示，改性剂比例为 2% 时能获得最优的分离度。

表 2 改性剂比例对分离度的影响

改性剂种类 改性剂比例(%)	R_s (甲醇)	R_s (乙醇)	R_s (乙腈)
0	/*	/	/
2	2.69	2.31	2.34
5	1.51	1.15	0.43
10	0.17	---	---

注：/：15 min 未洗脱出来；---：未保留

2.4 流速对分离度的影响

设置 1 mL/min、1.5 mL/min、2 mL/min 三个流速，考察不同改性剂条件下的分离度，结果如下表 3 所示。流速增加，不论何种改性剂，氟胺氰菊酯两个对映体的分离度呈下降趋势。

表 3. 流速对分离度的影响

改性剂种类 流速(mL/min)	R_s (甲醇)	R_s (乙醇)	R_s (乙腈)
1	2.69	2.31	2.34
1.5	2.17	2.25	2.15
2	1.99	2.19	2.09

2.5 温度对分离度的影响

设置 30℃、35℃、40℃ 三个柱温，考察不同温度下的分离度，结果如下表 4 所示。温度对氟胺氰菊酯两个对映体分离影响较小。

表 4. 温度对分离度的影响

改性剂种类 温度(℃)	R_s (甲醇)	R_s (乙醇)	R_s (乙腈)
32	1.56	2.31	2.34
35	1.54	2.44	2.19
40	1.67	2.57	2.34

2.6 背压对分离度的影响

设置 10 MPa、12 MPa、15 MPa 三个背压，考察不同背压下的分离度，结果如下表 5 所示。在 10-15 MPa 之间，背压升高，分离度呈下降趋势。

表 5. 背压对分离度的影响

背压(MPa)	改性剂种类	Rs(甲醇)	Rs(乙醇)	Rs(乙腈)
10		2.17	2.31	2.34
12		2.07	1.92	2.00
15		1.57	1.65	1.64

2.7 最佳分离条件

综合考虑分离度与分析时间，得出最佳分离条件：DAICEL Chiralpak ID-3 色谱柱(3 mm I.D.×150 mm L., 3 μm)，乙醇作为改性剂，比例 2% 等度洗脱，流速 2.0 mL/min，色谱柱温度 32℃，背压 10 MPa。在最佳分离条件下，分离度 $R_s=2.19$ ，分析时间仅 4 min，单针分析仅需 0.2 mL 乙醇，如下图 4。

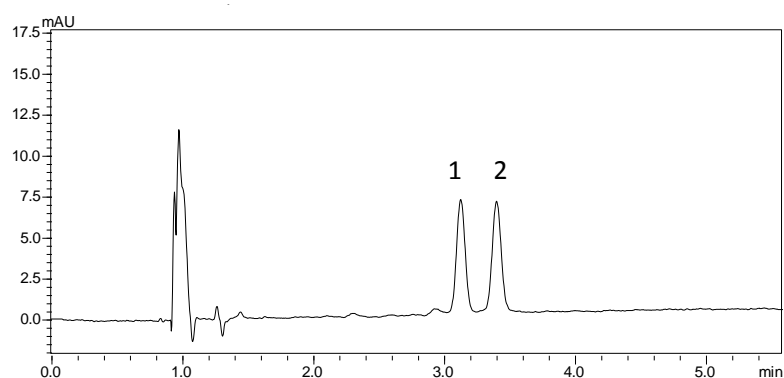


图 3. 氟胺氰菊酯对映体(1 和 2)的最佳分离条件色谱图

3. 结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-PDA 系统优化获得了手性农药氟胺氰菊酯的拆分方法，该方法实现了快速、绿色分离手性农药的目的。该方法可为手性药物的拆分提供参考。

三、天然产物分析

天然产物为存在于自然界陆生动植物、海洋生物及微生物体内的各类物质成分,其具体类型也因不同的学科如药理学、生物学和食品科学等不同而各异。人类社会利用天然产物有着悠久的历史。在中国,从神话时代的神农尝百草到明代李时珍的本草纲目,植物药的神奇功效和人类生活息息相关。随着科技技术和医药科技理论的发展,植物药中的有效成分的秘密逐渐被人们揭开,这其中起着关键作用的一步便是现代化的提取分离手段。



针对天然产物的不同特性,不同机理的分离技术渐次发展开来,像水蒸气蒸馏、精馏、减压蒸馏、有机溶剂萃取、分离蒸馏、膜分离等等。这其中的超临界 CO₂ 萃取分离技术成为天然产物萃取分离的热点领域之一。由于天然产物的活性成分大多对热和氧比较敏感,而且后期的应用大多同人类的生活密切相关,因此,萃取分离要考虑温度、环境以及分离溶剂对产物品质和人体健康的影响。而超临界 CO₂ 萃取技术中所用的主要溶剂为超临界态 CO₂,无毒,不对健康造成影响;不易燃,操作安全;无色无味,不对产物品质产生妨害;常温是气体,在分离产物中无残留;CO₂ 廉价,来源丰富,成本低。以上种种特点使超临界 CO₂ 萃取技术在天然产物有效成分提取领域大受青睐。此外由于超临界 CO₂ 具有溶解性能好、分离效率高、传质阻力小等优势,应用超临界 CO₂ 分离分析技术的超临界 CO₂ 色谱在天然产物样品制备和分析中的应用亦越来越受到重视。

本节所列四篇应用报告,分别介绍岛津 Nexera UC SFC-UV 系统在中药五味子中木脂素成分的定量分析,SFC-MS 及 Online-SFE-SFC/UV 联用系统分别用于齐墩果酸与熊果酸的测定,以及 Offline-SFE 系统和 GCMS 联用提取和检测香草兰豆荚中香草醛等四种物质的方法。

Nexera UC SFC 用于五味子药材中木脂素的含量分析

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC SFC 系统建立了中药五味子中 6 种木脂素的分析方法, 该方法使用 Shim-pack UC-X SIL 2.1×150 mmL 色谱柱, 甲醇为改性剂, 在 10 分钟内完成对五味子甲醇提取物中各成分的分, 其中五味子素等 6 种木脂素分离良好, 在 1.56-100 mg/L 范围内线性良好, 相关系数 r 在 0.9993 以上, 重复性分析结果显示低、中、高三浓度质控样品的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.05~0.58% 和 0.38~4.99% 之间, 五味子素等 4 种化合物的加标回收率在 96~100% 之间。

关键词: Nexera UC SFC 五味子 中药

中药五味子 (*Schisandra chinensis*) 为常用的滋补强壮类药材, 其中含有的联苯环辛烯型木脂素是其药理作用的主要活性物质。结构差异导致不同类型和程度的生物活性是学者们研究的关注方向, 因此木脂素的分离分析是五味子药材研究中的重要领域。

岛津 Nexera UC SFC 系统, 具有系统耐压高、背压阀 (BPR) 内部体积小、灵敏度高、操作界面通用性好等特点。本实验使用该系统建立中药五味子中 6 种木脂素的快速分离分析方法, 其中涉及的方法技术可为五味子及其他类似天然产物中有效成分的分析提供借鉴。

《中国药典 (2015 版)》首次收载超临界流体色谱法 (四部 0531 法) 作为药物分析的可选方法, 岛津 Nexera UC 系统可为相关药物的 SFC 分析方法建立提供帮助。

实验条件

仪器 Nexera UC SFC 系统

具体配置为: LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20ADXR (输液泵, 含 LPGU 低压梯度比例阀), DGU-20A5 (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A (背压调节单元), SPD-M20A (二极管阵列检测器), CBM-20A (系统控制器), LabSolutions Ver 5.8 (色谱工作站)。

样品信息

五味子药材以甲醇超声提取 20 min, 取上清过滤后作为样品使用。另取五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子素、五味子酯甲和五味子醇乙 6 种化合物以甲醇溶解, 配制系列浓度混合标准溶液待用。

表 1 化合物信息

#	化合物中文名	化合物英文名	CAS#	分子式
1	五味子甲素	Schisandrin A	61281-38-7	C ₂₂ H ₂₈ O ₆
2	五味子乙素	Schisandrin B	61281-37-6	C ₂₃ H ₂₈ O ₆
3	五味子丙素	Schisandrin C	61301-33-5	C ₂₂ H ₂₄ O ₆
4	五味子素	Schisandrin	7432-28-2	C ₂₄ H ₃₂ O ₇
5	五味子醇乙	Schisandrol B	58546-54-6	C ₂₃ H ₂₈ O ₇
6	五味子酯甲	Schisantherin A	58546-56-8	C ₃₀ H ₃₂ O ₉

SFC 色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack UC-X SIL 2.1 mm I.D.×150 mm L., 3 μm
 流 动 相 : A-scCO₂; B-甲醇 流 速 : 1.5 mL/min
 柱 温 : 50℃ 检 测 波 长 : 220 nm
 背 压 : 10 MPa 进 样 量 : 1 μL
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 起始比例1%B, 时间程序见表2所示

表2 梯度时间程序

Time	Module	Command	Value
4.0	Pump	Pump B Conc.	3
7.5	Pump	Pump B Conc.	10
8.5	Pump	Pump B Conc.	50
10.0	Pump	Pump B Conc.	50
10.1	Pump	Pump B Conc.	1
12.5	Controller	Stop	

结果与讨论

6 种木脂素的 SFC 分离色谱图

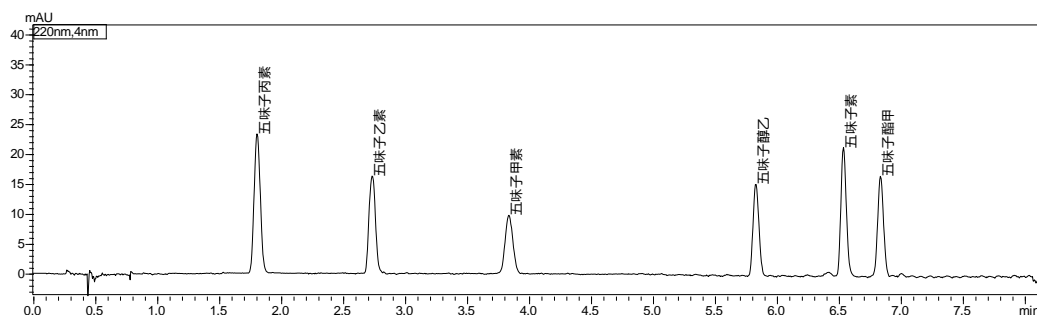
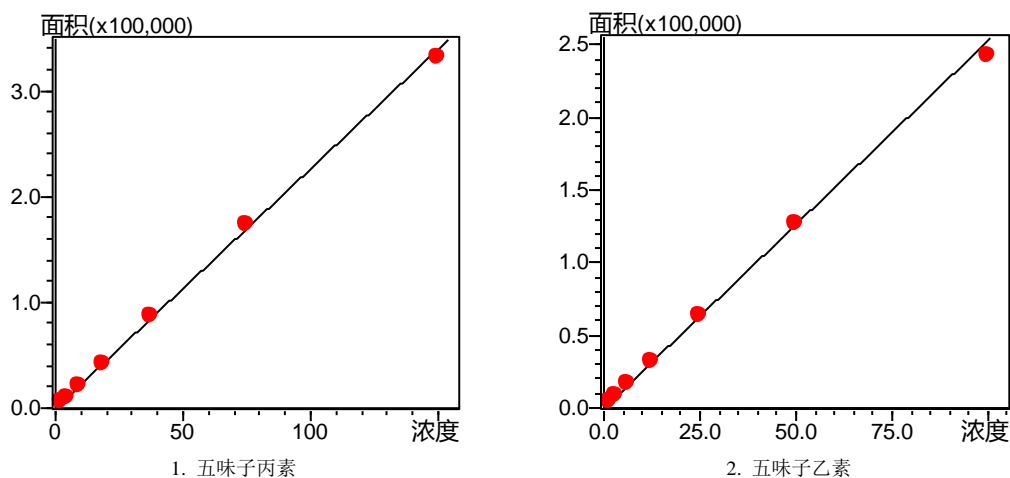


图1 6种木脂素的SFC分离色谱图(检测波长: 220 nm)
 1.五味子丙素, 2.五味子乙素, 3.五味子甲素, 4.五味子素, 5.五味子醇乙, 6.五味子酯甲

6 种木脂素的标准曲线



1. 五味子丙素

2. 五味子乙素

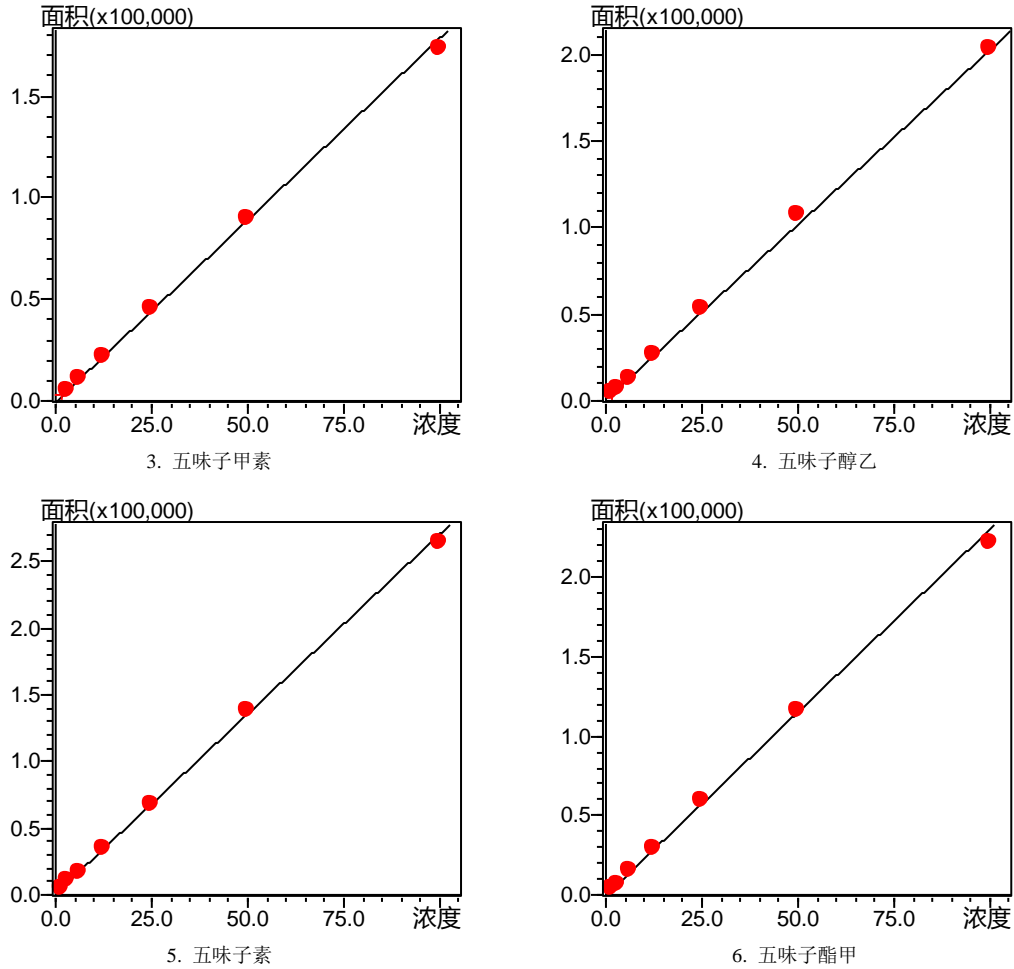


图2 6种木脂素的定量标准曲线

表3 6种五味子木脂素标准曲线信息

#	化合物	标准曲线方程	线性范围 (mg/L)	相关系数	准确度(%)	定量限 (mg/L)
1	五味子丙素	$Y = (2262.20)X + (-83.2883)$	2.34-150	0.9996	96.6-102.5	1.21
2	五味子乙素	$Y = (2530.91)X + (-199.497)$	1.56-100	0.9993	95.7-104.1	1.19
3	五味子甲素	$Y = (1791.54)X + (-579.225)$	3.13-100	0.9998	96.9-101.6	2.74
4	五味子醇乙	$Y = (2011.48)X + (1085.88)$	1.56-100	0.9993	94.8-102.8	1.08
5	五味子素	$Y = (2674.19)X + (658.453)$	1.56-100	0.9996	96.0-103.0	0.81
6	五味子酯甲	$Y = (2306.65)X + (-249.112)$	1.56-100	0.9996	96.1-102.6	1.03

重复性分析结果

表4 重复性分析结果 (RSD%, n=5)

#	化合物	LQC*		MQC*		HQC*	
		保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	五味子丙素	0.58	4.48	0.54	0.74	0.50	0.44
2	五味子乙素	0.39	4.53	0.26	0.81	0.22	0.38
3	五味子甲素	0.18	4.99	0.20	0.64	0.20	0.91
4	五味子醇乙	0.13	4.15	0.12	1.73	0.07	0.68
5	五味子素	0.05	3.80	0.09	1.15	0.06	0.52
6	五味子酯甲	0.09	3.16	0.10	0.93	0.08	0.49

LQC: 五味子甲素、五味子乙素、五味子醇乙、五味子素和五味子酯甲浓度为3.13 mg/L, 五味子丙素为4.69 mg/L;

MQC: 五味子甲素、五味子乙素、五味子醇乙、五味子素和五味子酯甲浓度为25 mg/L, 五味子丙素为37.5 mg/L;

HQC: 五味子甲素、五味子乙素、五味子醇乙、五味子素和五味子酯甲浓度为100 mg/L, 五味子丙素为150 mg/L;

中药五味子提取液分析结果

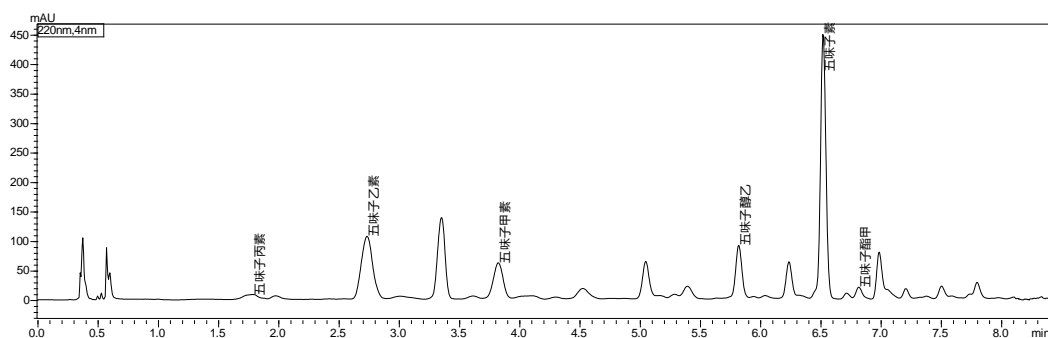


图3 中药五味子甲醇提取液 SFC 分离色谱图 (检测波长: 220 nm)

称取已粉碎的中药材五味子粉末 2.0 g, 加入 20 mL 甲醇, 超声提取 20 min, 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析, 色谱图如图 3 所示, 6 种木脂素含量测定结果见表 5。

表 5 中药五味子中 6 种木脂素的分析结果

#	五味子丙素	五味子乙素	五味子甲素	五味子醇乙	五味子素	五味子酯甲
含量 (mg/g)	0.29	2.80	1.90	1.50	5.30	0.32

五味子药材甲醇提取液 10 倍稀释后对其中含量丰富的五味子乙素、五味子甲素、五味子醇乙和五味子素的加标回收率计算结果如表 6 所示。

表 6 加标回收率结果(n=3)

#	化合物	样品浓度 (mg/L)		加标浓度 (mg/L)	加标样测定浓度 (mg/L)			加标回收率 X% \pm SD	
1	五味子乙素	23.1	23.0	23.0	22.6	44.8	45.6	45.5	98.7 \pm 1.8
2	五味子甲素	15.4	15.2	15.9	23.0	38.2	38.1	38.0	98.3 \pm 1.6
3	五味子醇乙	12.5	13.1	12.7	23.6	36.5	36.2	36.1	99.6 \pm 1.6
4	五味子素	45.4	44.9	44.6	22.8	68.5	66.4	66.1	96.8 \pm 3.5

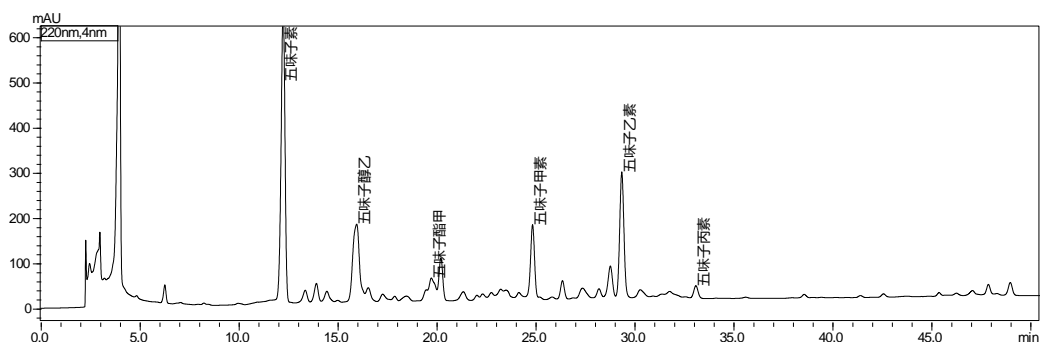


图 4 中药五味子甲醇提取液 HPLC 分离色谱图 (检测波长: 220 nm)

色谱柱: Inertsil ODS-3 4.6mmID \times 250mmL, 5 μm ; 流动相: A-水, B-甲醇; 进样量: 20 μL
梯度程序: 60-80%B(0-20 min)-95%B(45-50min); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

同常规 HPLC 方法分析五味子甲醇提取液结果 (图 4) 相比, SFC 法快速高效, 每针分析时间约为常规方法的 1/5, 以 scCO_2 和少量甲醇为洗脱剂的分离模式, 大大减少了有机溶剂的消耗, 本例中相同样品分析时甲醇消耗量不及常规 HPLC 方法的 5%, 另为关键的是 6 种目标木脂素成分分离度高、杂质干扰少, 定量分析灵敏度优于常规 HPLC 方法。

结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC 系统建立了中药材五味子中 6 种木脂素类化合物快速定量分析方法，结果显示该方法可在 10 min 内完成 6 种化合物的分离，且在各自浓度范围内线性良好，重复性、准确度和回收率表明方法准确可靠，可以为中药五味子中木脂素研究和质量控制的分析方法提供参考，另外可对天然产物中有效成分的 SFC 分析方法建立提供借鉴。

Nexera UC SFC-MS 用于齐墩果酸与熊果酸的测定

摘要：本实验使用岛津Nexera UC SFC-MS系统建立了齐墩果酸和熊果酸的分离测定方法。选择Shim-pack UC-X SIL色谱柱，乙腈作为改性剂，通过优化改性剂比例获得最佳分离效果。分析结果显示，齐墩果酸与熊果酸在6.25-100 µg/mL内线性良好，线性相关系数R大于0.995。

关键词：Nexera UC SFC-MS 同分异构体 齐墩果酸 熊果酸

齐墩果酸(oleanolic acid)和熊果酸(ursolic acid)是结构类似的同分异构体，均为五环三萜类的化合物，用于治疗急、慢性肝炎。齐墩果酸广泛存在于齐墩果、女贞果实中。目前中药材中齐墩果酸和熊果酸的分离主要采用 RP-HPLC，分析时间较长。

超临界二氧化碳具有低极性、高扩散等特点，将超临界色谱(Supercritical Fluid Chromatogram, SFC)用于结构类似物的分析，可以获得更好的分离效果，并且与当前使用的反相色谱相比，具有分析速度快、使用溶剂少、环保的特点。本文采用岛津 Nexera UC SFC-MS 系统，建立了木瓜中齐墩果酸与熊果酸分析方法，该方法具有分离度好、分析效率高、节省溶剂等特点。

1. 实验部分

1.1 仪器 Nexera UC 系统

具体配置为：LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵)，LC-20AD_{XR} (输液泵，含 LPGE 低压梯度比例阀)，LC-20AD_{XR} (补偿液输送泵)，DGU-20A₅ (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱)，SFC-30A (背压调节单元)，CBM-20A (系统控制器)，LCMS-8045 三重四级杆质谱，LabSolutions Ver 5.86 (色谱工作站)。

1.2 SFC 色谱条件：

色 谱 柱	: Shim-pack UC-X SIL 2.1mm I.D.×150 mm L., 3 µm		
流 动 相	: A-scCO ₂ ; B-0.1% 甲酸乙腈		
流 动 相 流 速	: 2.0 mL/min		
质 谱 补 偿 液	: 乙腈	补 偿 液 流 速	: 0.2 mL/min
柱 温	: 35°C	背 压	: A-15MPa
洗 脱 方 式	: 梯度洗脱, 5%B(0min), 15%B(8min), 5%(8.01min), stop(10min)		
进 样 体 积	: 0.2 µL		

1.3 质谱条件：

离 子 源	: ESI (-)	加 热 气 流 速	: 10.0 L/min
雾 化 气 流 速	: 3.0 L/min	干 燥 气 流 速	: 10.0 L/min
D L 温 度	: 250°C	接 口 温 度	: 300°C
加 热 模 块 温 度	: 400°C	扫 描 模 式	: SIM
驻 留 时 间	: 200 ms		

表 1 SIM 参数

物质名称	SIM 离子
齐墩果酸	455.20
熊果酸	455.20

1.4 目标分析物

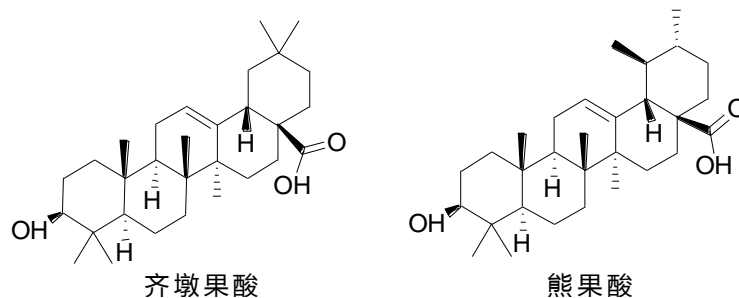


图 1 齐墩果酸和熊果酸的化学结构

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

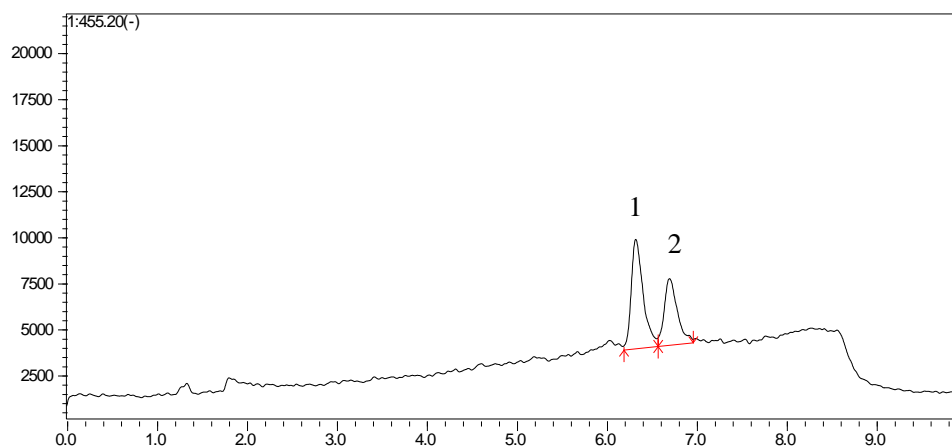


图 2. 齐墩果酸(1)和熊果酸(2)混合标准样品色谱图(12.5 µg/mL)

2.2 线性范围

本试验建立了齐墩果酸和熊果酸的分离方法，取齐墩果酸和熊果酸标准品，用甲醇作为溶剂，稀释成系列浓度样品，建立校准曲线。校准曲线线性关系良好，相关系数大于 0.995，标准曲线准确度在 93.3%~108.1%，结果如下表 2 及图 4 所示。

表 2 齐墩果酸和熊果酸的线性方程及相关系数

物质名称	校准曲线	线性范围 (µg/mL)	准确度(%)	相关系数 R
齐墩果酸	$Y = (3785.39)X + (2435.93)$	6.25-100	93.3-108.1	0.9987
熊果酸	$Y = (3241.10)X + (-12159.8)$	6.25-100	96.5-107.4	0.9999

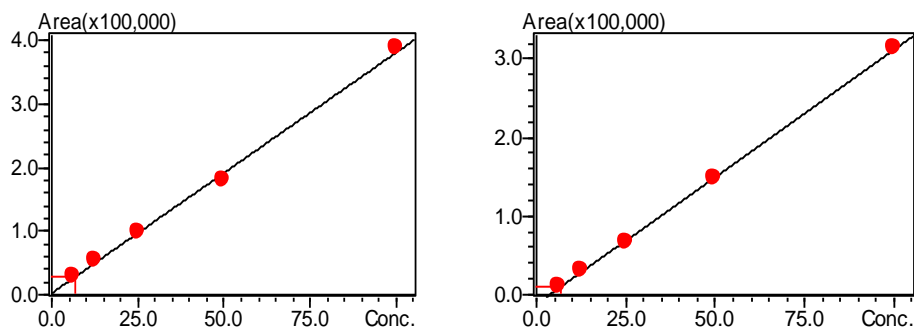


图3 齐墩果酸（左）和熊果酸（右）校准曲线

2.3 重复性

配制低(6.25 $\mu\text{g/mL}$)、中(25 $\mu\text{g/mL}$)、高(100 $\mu\text{g/mL}$)三个浓度下的标准样品，前述条件下连续进样分析 6 针，计算保留时间及峰面积的相对标准偏差。结果如下表 3 所示。

表 3 低、中、高浓度的重复性

物质名称	低(RSD%)		中(RSD%)		高(RSD%)	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
齐墩果酸	0.48	0.44	0.32	0.75	0.68	2.30
熊果酸	0.64	0.49	0.35	0.59	0.71	1.08

2.4 木瓜样品测定

木瓜样品购自北京同仁堂，粉碎后过 120 目筛，取粉末 0.5 g，置于 50 mL 离心管中，加甲醇 25 mL 超声提取 20 min，上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，上机测定。木瓜中齐墩果酸含量约是熊果酸的 11 倍。平行进样 6 针，测定的齐墩果酸和熊果酸均值分别为 66.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 9.9 $\mu\text{g/mL}$ ，RSD 均小于 6%。木瓜中齐墩果酸和熊果酸色谱图如下图 5 所示。

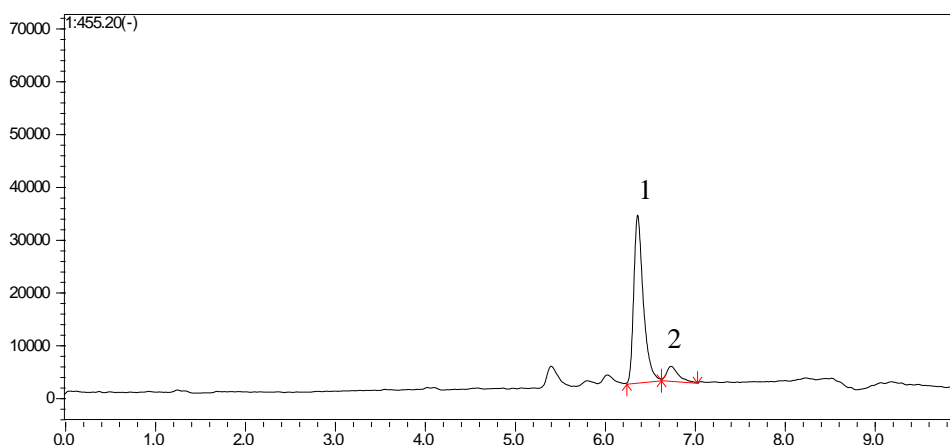


图 5 木瓜样品中齐墩果酸(1)与熊果酸(2)色谱图

3. 结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-MS 系统建立了中药齐墩果酸和熊果酸的分离测定方法，该方法实现了快速分离齐墩果酸和熊果酸，可供中药材的质控人员参考。

Nexera UC Online-SFE-SFC/UV 检测木瓜中齐墩果酸和熊果酸

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC Online SFE-SFC-UV 系统建立了中药材木瓜中齐墩果酸和熊果酸的分析方法, 通过考察色谱柱和流动相, 选择 Shim-pack UC-X Diol 色谱柱和甲醇作为改性剂时可获得两者最佳分离效果。设计单因素考察试验, 对药材粒径、萃取时间、萃取温度、改性剂比例进行考察。单因素优化结果显示, 在药材粒径为 160 目, 萃取时间 3 min, 改性剂浓度 10%, 萃取温度 40℃ 的条件下, 可获得最佳的萃取效果。在最佳萃取条件下, 对同一份空白基质加标样品连续三次萃取, 考察归一化萃取效率, 实验结果显示两种化合物首次萃取效率在 64.6% 以上, 且萃取效率稳定。20 μg 标准品通过 SFE 上样与自动进样器上样峰面积之比 (设置相同的分流比), 考察 SFE 绝对萃取效率, 齐墩果酸和熊果酸分别为 57.5% 和 59.4%, 表明 SFE 系统可以有效的进行样品萃取。齐墩果酸和熊果酸在 5~500 μg 范围内线性良好, $R>0.998$ 。10 mg 和 40 mg 空白基质加标考察方法的回收率和重复性 ($n=5$), 回收率在 96.6~110.2% 之间, 保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.12~0.14% 和 6.17~13.9% 之间。市售某品牌木瓜药材中齐墩果酸和熊果酸的含量测试结果分别为 0.70% 和 0.02%, 满足 2015 版药典的相关规定。

关键词: Nexera UC Online SFE-SFC 木瓜 齐墩果酸和熊果酸

木瓜为蔷薇科木瓜属植物贴梗海棠的果实, 具食用、药用、观赏多种用途, 为传统中药, 临床应用广泛。齐墩果酸和熊果酸是木瓜的主要药效成分。现代临床医学研究表明木瓜中齐墩果酸和熊果酸具有抗癌、提高免疫力、降血脂和降血糖等功效。齐墩果酸和熊果酸为同分异构的五环三萜酸, 性质极为相似, 使用常规液相分离时, 分析时间长且分离度较低。

本实验使用 Online-SFE-SFC/UV 系统开发了木瓜中齐墩果酸和熊果酸的分析方法, 同药典方法相比, 该法前处理简单, 所需样品量少, 方法稳定可靠, 分离度高, 绿色环保。Online SFE-SFC/UV 系统在中药材有效成分含量测定领域具有广阔的应用前景。

1. 实验部分

1.1 仪器

Nexera UC Online-SFE-SFC 系统

具体配置为: SFE-30A (超临界流体萃取单元), LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20AD_{XR} (输液泵, 含 LPGU 低压梯度比例阀), DGU-20A5 (在线脱气机), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A×2 (背压调节单元), SPD-M20A (二极管阵列检测器), CBM-20A (系统控制器), LabSolutions Ver 5.86 (色谱工作站)。

1.2 样品信息

化合物信息见表 1, 化合物结构式如图 1 所示。市售的木瓜药材, 打碎过筛, 一部分作为实际样品待检, 另一部分经多次甲醇超声萃取, 至齐墩果酸和熊果酸未检出, 作为空白基质使用。

标准溶液配制方法如下: 准确称取齐墩果酸和熊果酸各 10 mg, 加入 1 mL 甲醇后用热

水浴超声溶解，作为 10 mg/mL 母液待用。上述母液用甲醇稀释，配制成系列工作溶液。各取 10 μ L 上述工作溶液与 50 mg 空白基质混合均匀后，再加入 5.5 g 无水 Na_2SO_4 混匀装填至 5 mL 萃取罐中压紧，进行分析，获得标准曲线。

实际样品测试 SFE 萃取罐制备方法如下：取 50 mg 木瓜实际样品与 5.5 g 无水 Na_2SO_4 混匀装填至 5 mL 萃取罐中压紧，待检。

表 1 化合物信息

#	中文名	英文名	CAS#
1	齐墩果酸	Oleanic acid	508-02-1
2	熊果酸	Ursolic acid	86598-92-7

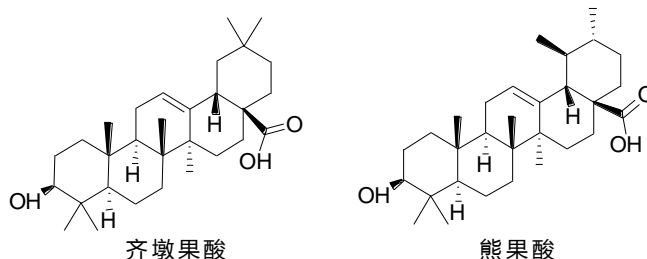


图 1 齐墩果酸和熊果酸的化学结构

1.3 分析条件

SFE 萃取条件:

萃 取 剂 : A- scCO_2 ; B-MeOH	萃 取 剂 比 例 : A/B=90/10(v/v)
萃 取 流 速 : 5 mL/min	动 态 萃 取 : 3 min
静 态 萃 取 : 4 min *	萃 取 背 压 : A-14.8 MPa; B-15 MPa
萃 取 温 度 : 40°C	

注: *包括 1 分钟充填时间

SFC 色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack UC-X Diol 4.6 mm I.D. \times 150 mm L., 3 μ m	流 速 : 3 mL/min
流 动 相 : A- scCO_2 ; B-甲醇	检 测 波 长 : 210 nm
柱 温 : 40°C	
背 压 : A-15 MPa; B-40 MPa	
洗 脱 方 式 : 10% (0-4 min) -5%B(4-7 min)-8%B(17-20 min)-40%B(25-27 min)	

2. 结果与讨论

2.1 Online-SFE-SFC-UV 色谱图

参考 2015 版药典对木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量测定的色谱条件，使用 Inertsil ODS-P(4.6 \times 250 mm, 5 μ m)色谱柱，两者出峰时间为 30 min，分离度为 2.0。使用 Online SFE-SFC/UV 联用系统，齐墩果酸和熊果酸在 Shim-pack UC-X Diol(4.6mm I.D. \times 150 mm L., 3 μ m)色谱柱上选择性良好，出峰时间在 19 min (包含 7 分钟在线萃取时间)，分离度为 2.5，优于常规液相。

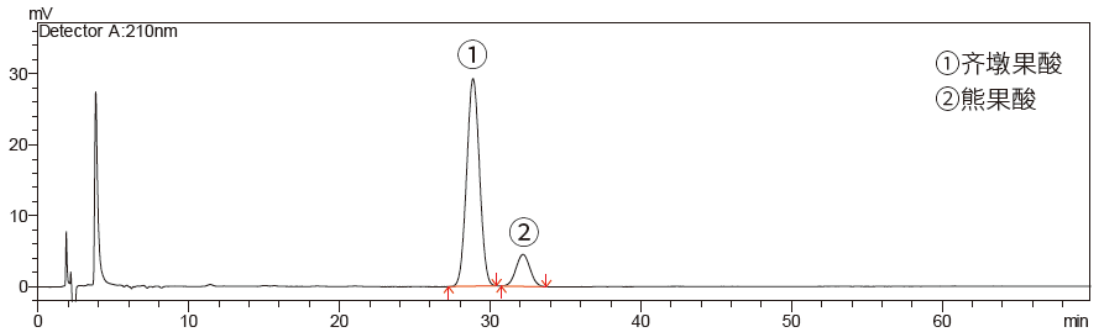


图2 常规液相药典方法分离色谱图

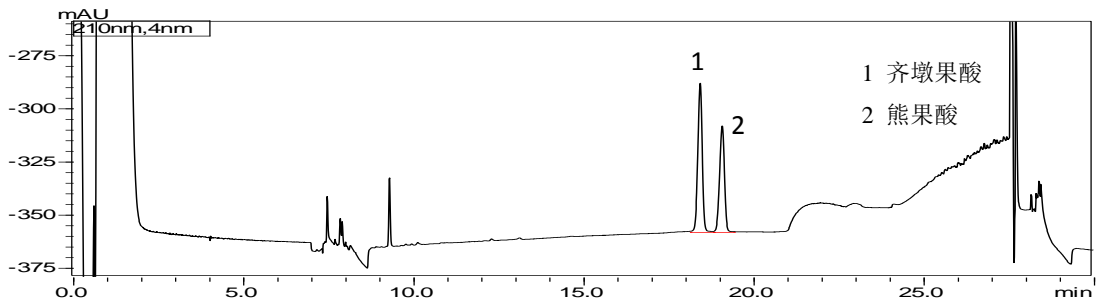


图3 SFE-SFC-UV 联用系统 Shim-pack UC-X Diol 色谱图

2.2 SFE 萃取条件单因素优化

SFE 在线萃取主要是在静态萃取过程中进行,动态萃取更多的是将样品导入色谱柱的过程,因此本实验主要考察了静态萃取的相关参数。由于静态萃取影响因素较多,设计单因素试验,对药材粒径、萃取时间、萃取温度、改性剂比例进行考察。药材粒度考察的四个水平分别为 80 目、120 目、160 目和 200 目。萃取时间考察的五个水平分别为 1、3、5、7、和 9 分钟;萃取温度考察的五个水平分别为 35、40、45、50 和 55℃;改性剂浓度考察的五个水平分别为 5%、10%、15%、20%和 25%。每个条件下,平行制备三份样品。

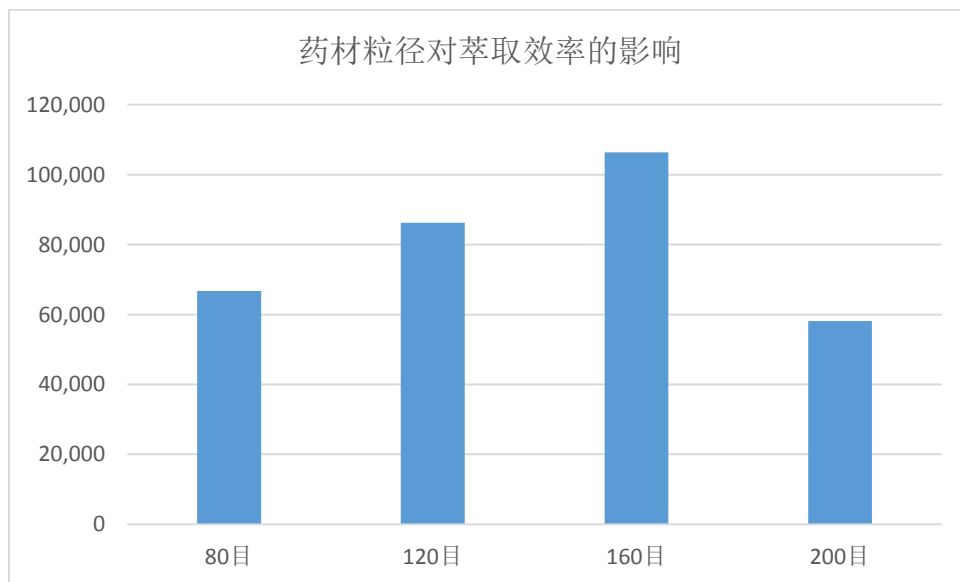


图4 药材粒径对萃取效率的影响

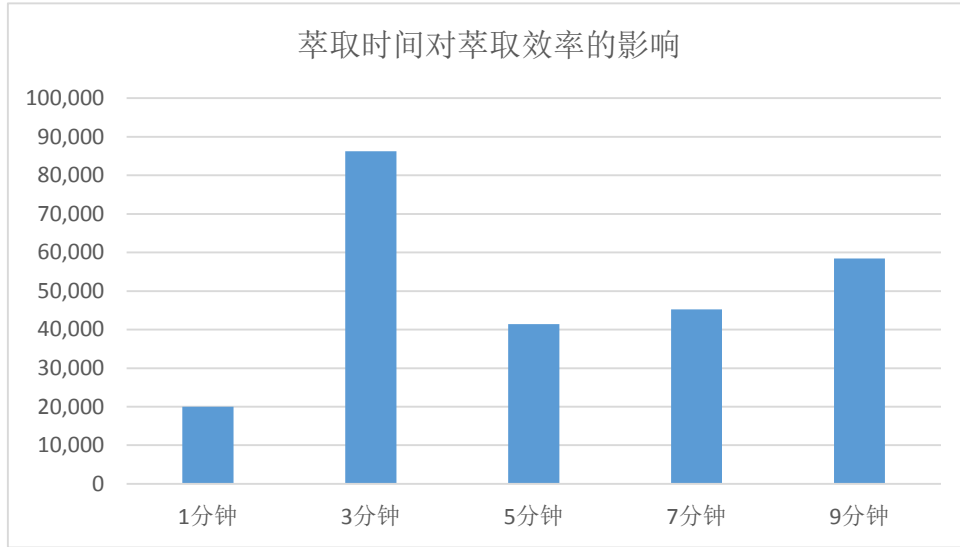


图 5 萃取时间对萃取效率的影响

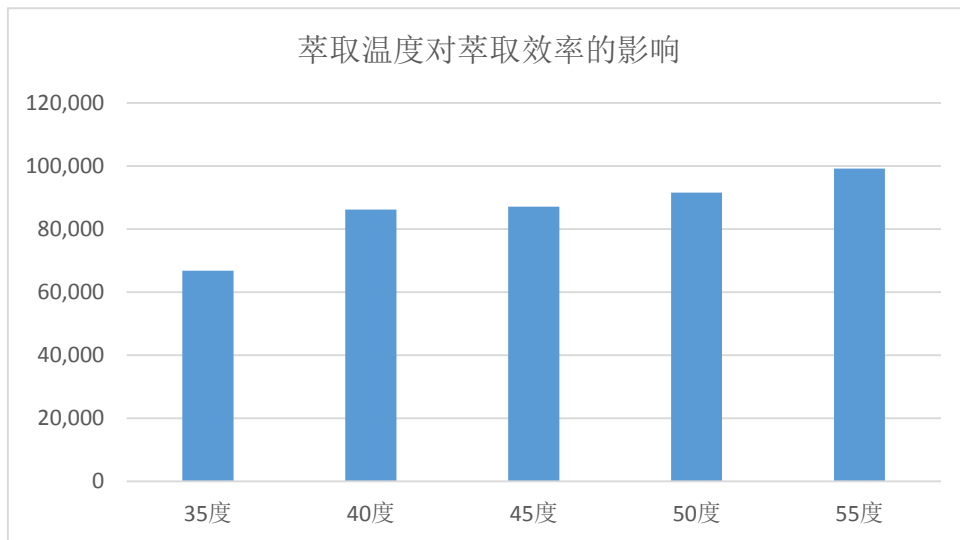


图 6 萃取温度对萃取效率的影响

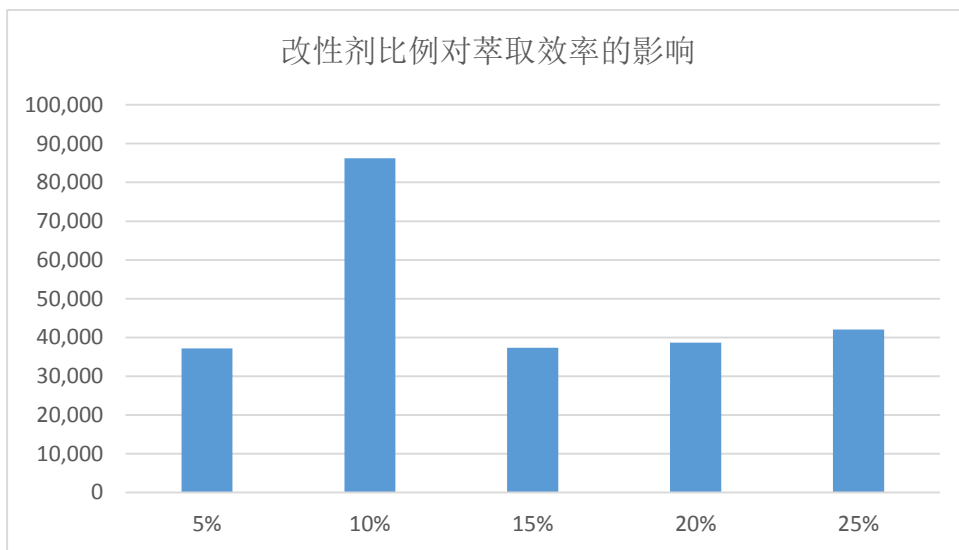


图 7 改性剂比例对萃取效率的影响

单因素优化的实验结果见图 5-8。药材粒径在 160 目时萃取效率最佳。药材粒径过小易堵塞萃取器，粒径过大则与超临界流体不能充分接触，导致萃取效率降低。静态萃取时间为 3 分钟时萃取效率最佳，这可能是由于萃取时间过长导致基质共萃取，反而降低了目标化合物的提取效率，萃取时间过短又不能萃取完全。萃取温度在 40℃ 以上时萃取效率稳定，提升温度对萃取效率的改善不大，但是 SFE 的升温时间明显增加，因此静态萃取温度选择了 40℃。改性剂的选择在 10% 时最佳，这是由于目标化合物极性中等，改性剂比例适中可以提高萃取效率，另外改性剂比例过高，丧失了超临界萃取的优势，转变为加压溶剂萃取。因此静态萃取的改性剂比例选择了 10% 甲醇。

SFE 萃取效率优化对提高化合物萃取效率，尤其对痕量目标组分的萃取尤为关键。另外，对于制备型 SFE，通过优化萃取效率可以提高中药材萃取的收膏率，这具有重要的经济意义。

2.3 归一化萃取效率考察

为考察设定条件下 SFE 对两种化合物的萃取效率，40 mg 标准品空白基质加标制备样品，通过重复对同一萃取罐内容物进行连续三次 Online SFE-SFC-UV 联用分析（如图 9），以每次萃取所得化合物峰面积对三次萃取的峰面积之和做比以表示归一化萃取率。结果显示该条件下 SFE 方式对齐墩果酸和熊果酸的首次归一化萃取率在 64.6~79.2% 之间。对于分析型 SFE-SFC-UV 联用系统，萃取效率的稳定性比高的萃取效率更为重要。平行制备三份样品进行重复性考察，SFE-SFC-UV 系统的萃取重复性良好，实验结果见表 2。

表 2 齐墩果酸和熊果酸的归一化萃取效率 (%)

	样品-1		样品-2		样品-3	
	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸
第一次萃取	75.3	64.6	79.2	67.8	78.9	67.1
第二次萃取	16.9	24.3	15.8	23.1	16.0	23.2
第三次萃取	7.7	11.2	5.0	9.1	5.1	9.7

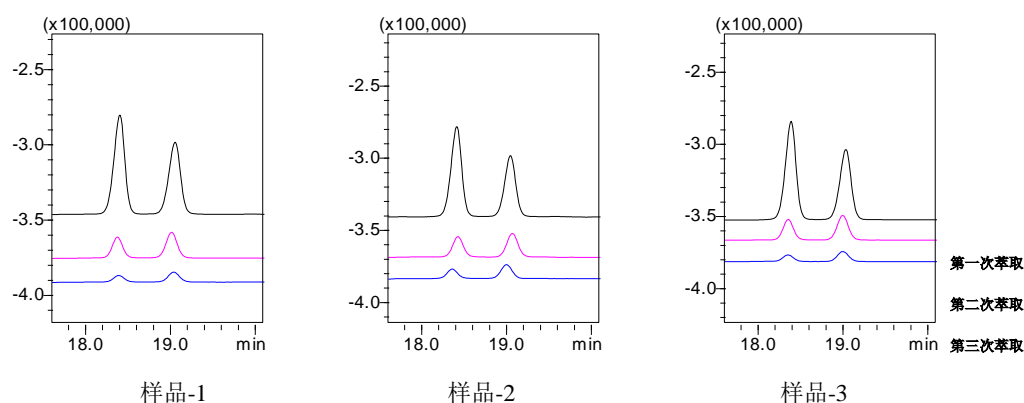


图 8 SFE 连续三次萃效归一化萃取效率考察

2.4 绝对萃取效率考察

设置与 SFE 萃取时相同的分流比，使用 20 μg 标准品通过 SFE 上样与自动进样器上样相比较，两次进样的峰面积之比作为绝对萃取效率，计算齐墩果酸和熊果酸的绝对萃取效率分别为 57.5% 和 59.4%。实验结果见表 3，表明 SFE 设备可以将样品中齐墩果酸和熊果酸有

效地萃取出来。

表 3 齐墩果酸和熊果酸绝对萃取效率(%)考察 (n=2)

峰面积	齐墩果酸	熊果酸
20 µg SFE 萃取进样	13822	12772
20 µg SIL 进样 (相同分流比)	24019	21485
绝对萃取效率%	57.5	59.4

2.5 线性范围

对齐墩果酸和熊果酸进行 Online SFE-SFC-UV 分析, 色谱图如图 4 所示。按照设定时间程序, 分析开始后的 7 min 内为萃取过程, 7 min 后为 SFC 分析, SFE 到 SFC 切换无需过渡, 高效衔接。以萃取罐中化合物的绝对加入量 (µg) 对检测器响应做曲线, 结果如图 10 所示, 两种化合物在 5-500 µg 范围内线性良好, 回归系数 R 分别为 0.9989 和 0.9996。

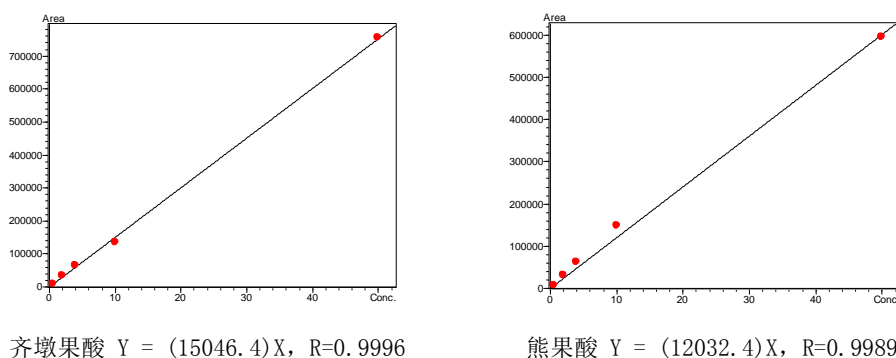


图 9 齐墩果酸和熊果酸的标准曲线

2.6 重复性和回收率

考察绝对加入量在 1 mg 和 40 mg 的条件下, 分别平行制备 5 个萃取罐加入混合标样, 考察 Online SFE-SFC 分析的重复性和回收率, 结果如表 4 所示。分析结果表明, Online SFE-SFC 分析齐墩果酸和熊果酸保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.12~0.14% 和 6.17~13.9% 之间, 加标回收率在 96.6~110.2% 之间, 可以满足定量分析的需求。

表 4 齐墩果酸和熊果酸的加标回收率分析结果 (n=5,%)

	1 mg 加标		40 mg 加标	
	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸
保留时间(RSD%)	0.12	0.14	0.13	0.12
峰面积(RSD%)	13.9	7.45	6.17	10.0
加标回收率 (%)	105.0	110.2	101.7	96.6

2.7 实际样品检测

2015 版药典对木瓜药材的含量测试要求, 齐墩果酸和熊果酸的总量不得少于 0.50%。某

品牌木瓜实际样品色谱图见图 12，对照基质空白的色谱图见图 11。该品牌齐墩果酸和熊果酸的含量测试结果分别为 0.70% 和 0.02%，满足 2015 版药典的相关规定。

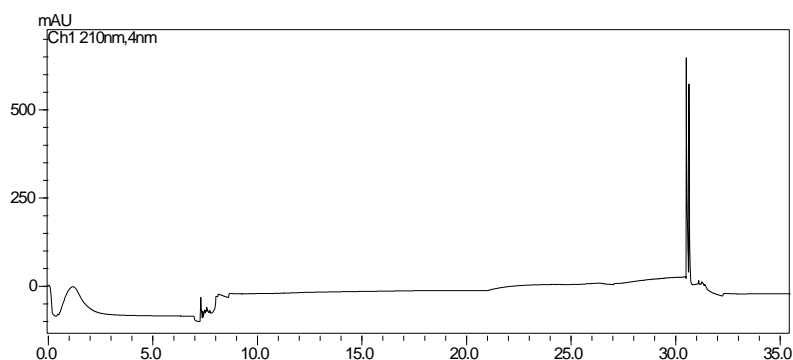


图 10 空白木瓜基质 Online SFE-SFC 色谱图

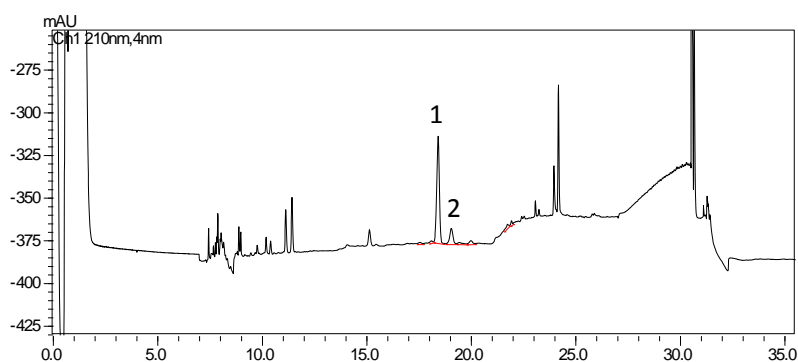


图 11 某品牌木瓜样品 Online SFE-SFC 色谱图（1、齐墩果酸；2、熊果酸）

结论

本文使用岛津 Nexera UC Online SFE-SFC 系统建立了木瓜中齐墩果酸和熊果酸分析方法，该方法实现样品前处理（SFE）和样品分析（SFC）在线联用，简化了前处理操作。具有快速、稳定、所需样品量少、绿色环保等优点。Online SFE-SFC-UV 系统在中药材有效成分含量测定领域具有广阔的应用前景。

Nexera UC Offline-SFE 萃取香草兰豆荚中香草醛等化合物

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC Offline-SFE 和 GCMS-QP2020 系统建立了香草兰中香草醛、对羟基苯甲醛、香草酸、对羟基苯甲酸四种物质萃取及分析方法。本文采用 Nexera UC Offline-SFE 系统萃取，超临界二氧化碳流体作为萃取溶剂进行超临界流体萃取并收集萃取液，GCMS-QP2020 进样定量分析。本文优化了改性剂比例、萃取温度、萃取压力等条件，并在最佳条件下考察了萃取效率和萃取通量。该方法具有萃取速度快、萃取效率高、操作简便等特点。

关键词: Nexera UC Offline-SFE GCMS 香草兰 香草醛

香草兰豆荚通过杀青、发酵、阴干、后熟等工艺加工后的产品香气独特，留香时间长，具有用途广、经济价值高的特点，被广泛应用于高档食品、化妆品、饮料、医药等领域。香草醛是香草兰豆荚中含量最高的香气物质，对整体香气有高达 1/3 的贡献率。此外，有资料表明香草酸、对羟基苯甲醛和对羟基苯甲酸 3 种物质的含量也是衡量整体香气品质的重要指标。香草兰豆荚传统提取方法为乙醇溶剂法，主要有超声法和浸泡法，该方法不仅需要用到大量的溶剂，且耗时较长。

本文采用 Nexera UC Offline-SFE 系统萃取，超临界二氧化碳流体作为萃取溶剂进行超临界流体萃取并收集萃取液，GCMS-QP2020 进样定量分析。本文优化了改性剂比例、萃取温度、萃取压力等条件，并在最佳条件下考察了萃取效率和萃取通量。该萃取方法具有萃取效率高、重复性好、节省溶剂和操作时间、自动化程度高等特点。

1. 实验条件

1.1 仪器

具体配置为：SFE-30A（超临界流体萃取单元），LC-30AD_{SF}（CO₂ 输液泵），LC-20AD_{XR}（输液泵，含 LPGU 低压梯度比例阀），SFC-30A×2（背压调节单元），CBM-20A（系统控制器），LabSolutions Ver5.82（色谱工作站）。GCMS-QP2020（气相色谱串联质谱仪）



Nexera UC



GCMS-QP2020

图 1 萃取和检测系统

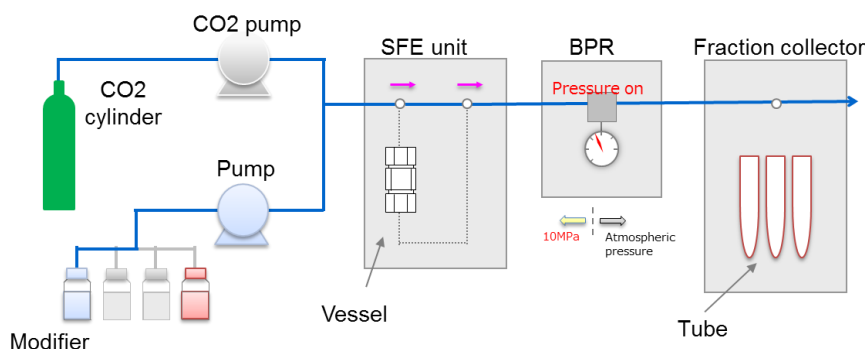


图 2 Nexera UC Offline SFE-SFC 系统及流路示意图

1.2 仪器条件

SFE 萃取条件:

萃 取 剂	: A-scCO ₂ ; B-EtOH	萃 取 剂 比 例	: A/B=90/10(v/v)
萃 取 流 速	: 5 mL/min	动 态 萃 取	: 3 min
静 态 萃 取	: 3 min	萃 取 背 压	: 20 MPa
萃 取 温 度	: 50°C		
萃 取 次 数	: (静态萃取+动态萃取) ×2		

GCMS 条件:

色 谱 柱	: Rtx-1701, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm
柱 温 程 序	: 60°C(1 min) _30°C/min_250°C(2 min)
进 样 口 温 度	: 240°C
载 气	: 氦气
载气控制方式	: 线速度
恒 线 速 度	: 52.5 cm/sec
进 样 方 式	: 分流进样
分 流 比	: 30:1
进 样 量	: 0.4 μL
离 子 化 方 式	: EI
离 子 源 温 度	: 200°C
接 口 温 度	: 240°C
采 集 方 式	: Scan, 选择离子见表 1
质 量 数 范 围	: m/z 45~500 amu

1.3 实验方法

称取一定量的香草兰豆荚放在 5 mL 萃取罐中，按照软件设定的程序进行萃取，并用适量乙醇吸收萃取流出物，定溶到 18 mL 后，取 1 mL 溶液由 GC-MS 分析定量，测定香草醛含量时需稀释 10 倍后分析，并计算每种物质的萃取量。

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

标准品粉末用乙醇溶解并稀释，由 GCMS-QP2020 进样分析，得到色谱图。

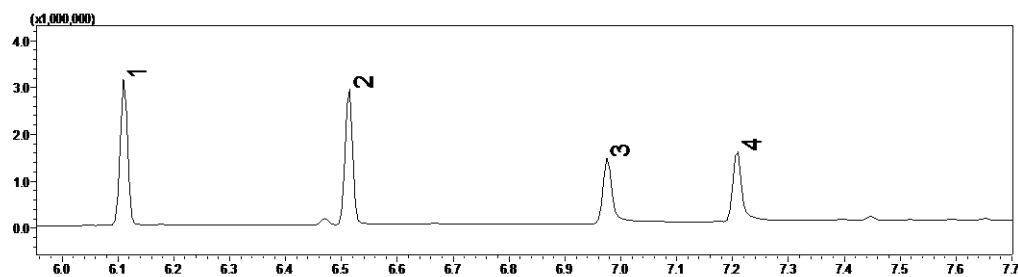


图 3. 50 mg/L 标准品色谱图 (1 香草醛, 2 对羟基苯甲醛, 3 香草酸, 4 对羟基苯甲酸)

表 1. 各化合物名称、保留时间及选择离子

No.	化合物名称	保留时间 (min)	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)
1	香草醛	6.115	152	151、81
2	对羟基苯甲醛	6.515	121	122、93
3	香草酸	6.970	168	153、97
4	对羟基苯甲酸	7.205	121	138、93

2.2 标准曲线

分别配制浓度为 5.0、10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 的香草醛、香草酸、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸混标溶液。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，制作校准曲线，所得校准曲线见图 4，回归方程和相关系数见表 2。

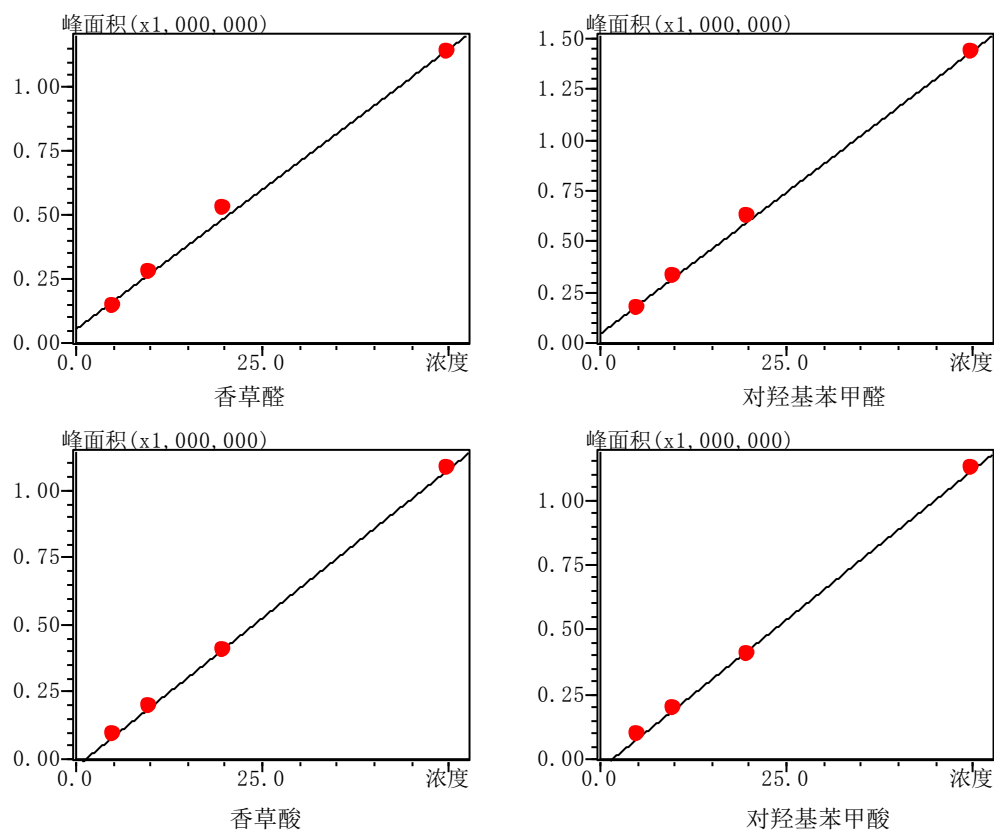


图 4. 四种化合物校准曲线

表 2. 四种化合物线性范围、线性曲线方程及相关系数

No.	化合物名称	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	曲线方程	相关系数
1	香草醛	5~50	$Y = 21921.27X + 53500.97$	0.9987
2	对羟基苯甲醛	5~50	$Y = 27933.12X + 45687.29$	0.9996
3	香草酸	5~50	$Y = 22164.53X - 28416.7$	0.9998
4	对羟基苯甲酸	5~50	$Y = 23062.84X - 37319.6$	0.9993

3. 萃取条件优化

3.1 超临界萃取优化

准确称取 1.00 g 样品装入到萃取罐中,放入 SFE-30A 超临界流体萃取单元中进行萃取。液态 CO_2 和改性剂乙醇经由输液泵输入 SFE 单元的萃取罐中,在设定温度和压力下形成超临界流体,改性剂的加入是为了调整超临界流体的溶解性、极性等性质以改善萃取效果。在稳定的温度和压力保持超临界流体充满萃取罐 3 min 进行静态萃取,再通过 SFE 单元流路切换阀切换,萃取罐中的萃取物在 3 min 内由流经萃取罐的超临界流体洗脱,完成动态萃取。

3.1.1 改性剂比例

考察超临界流体中改性剂加入的比例对四种物质萃取效果的影响。为了保证分析物的萃取量,选择静态萃取和动态萃取交替进行 4 次,分别考察改性剂比例为 0%、5%、10%、15% 条件下四种分析物的萃取量(表 3)。

表 3. 不同改性剂比例下四种分析物的萃取量 (mg/g)

NO.	名称	改性剂比例			
		0%	5%	10%	15%
1	香草醛	6.599	6.623	6.664	6.760
2	对羟基苯甲醛	0.374	0.579	0.582	0.585
3	香草酸	0.338	0.982	1.051	1.084
4	对羟基苯甲酸	0.010	0.278	0.363	0.397



图 5. 不同比例乙醇萃取液(左→右乙醇比例依次为 0%、5%、10%、15%)

随着改进剂比例的加大，极性比较大的化合物的萃取量逐渐提高，但同时也会提取出更多的色素等其他成分（图 5）。因此综合考虑，选择改进剂比例为 10%。

3.1.2 萃取温度

温度和压力的改变影响超临界流体的密度和溶解性。首先以萃取压力 20 MPa、静态动态萃取循环 4 次为基础条件优化萃取温度，四种目标物萃取量见表 4。随着温度增加，四种物质的萃取量略有升高，因此选择 50℃作为萃取温度。

表 4. 不同萃取温度四种分析物的萃取量 (mg/g)

No.	名称	温度		
		40℃	45℃	50℃
1	香草醛	6.413	6.850	6.914
2	对羟基苯甲醛	0.659	0.667	0.694
3	香草酸	1.189	1.173	1.289
4	对羟基苯甲酸	0.421	0.443	0.444

3.1.3 萃取压力

以萃取温度 50℃、静态动态萃取循环 4 次为基础条件优化萃取压力，四种目标物萃取量见表 5。随着压力升高，四种物质的提取效率略有升高，因此选择 20 MPa 作为萃取压力。

表 5. 不同萃取压力下四种分析物的萃取量 (mg/g)

NO.	名称	压力	
		15 MPa	20 MPa
1	香草醛	6.658	6.914
2	对羟基苯甲醛	0.651	0.694
3	香草酸	1.160	1.289
4	对羟基苯甲酸	0.412	0.444

3.1.4 静动态循环萃取次数

增加压力和温度均能够在一定程度上增大超临界流体的密度进而增加分析物的溶解度。在萃取温度 50℃、压力 20 MPa 条件下考察静态和动态萃取循环次数。由表 6 可知，增加萃取循环次数能够有效保证极性化合物的萃取效果，但同时也会导致更多的色素被萃取出来。因此，考虑综合萃取量、萃取时间及色素等杂质的情况，选择静态动态萃取次数为 2 次。

表 6. 不同静态动态萃取循环次数四种分析物的萃取量 (mg/g)

NO.	名称	循环次数			
		1	2	3	4
1	香草醛	5.612	6.593	6.542	6.914
2	对羟基苯甲醛	0.545	0.693	0.730	0.694
3	香草酸	0.741	1.055	1.285	1.289
4	对羟基苯甲酸	0.225	0.309	0.444	0.444

3.2 萃取效率

考察样品的单次萃取效率。对同一个样品连续萃取三次，将三次萃取得到的分析物色谱图进行比较，如图 6 所示。结果表明大部分化合物均能够一次性被萃取出来。

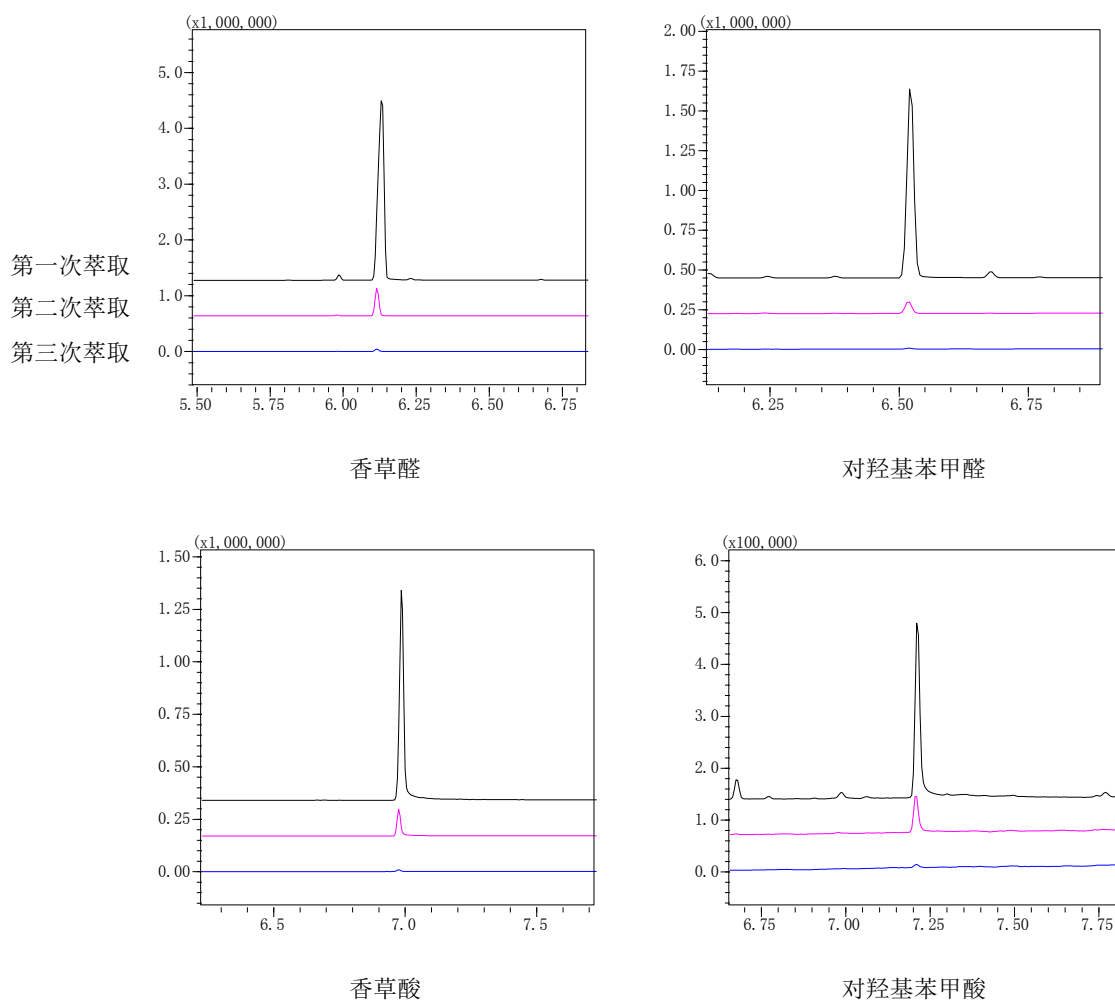


图 6. 连续三次萃取色谱图比较

3.3 稳定性

平行称取两份 1.00 g 样品，放在萃取罐中进行萃取，并计算每次的萃取量。方法萃取效果稳定，重复性好（如表 7）。

表 7. 萃取重复性

NO.	名称	平行 1 (mg/g)	平行 2 (mg/g)
1	香草醛	6.698	6.593
2	对羟基苯甲醛	0.594	0.654
3	香草酸	0.982	0.996
4	对羟基苯甲酸	0.306	0.292

3.4 萃取通量

为了能够增加萃取通量,根据萃取罐的体积尽量多的加入香草兰豆荚粉末,同时注意不要填压过紧,确保超临界流体在样品间流动顺畅。最终加入 2.00 g 香草兰豆荚粉末,采取相同的萃取方法,萃取量见表 8。萃取量与 1.00 g 香草兰豆荚粉末萃取量相当。因此,该方法可以扩展到 2.00 g 样品萃取。



图 7. 1.00 g 和 2.00 g 样品装填在萃取罐中

表 8. 取样量 2.00 g 时萃取量

NO.	名称	萃取量 (mg/g)
1	香草醛	6.829
2	对羟基苯甲醛	0.624
3	香草酸	1.099
4	对羟基苯甲酸	0.339

3. 结论

利用岛津 Nexera UC Offline-SFE 系统和 GCMS-QP2020 气质联用仪,萃取和检测香草豆荚中香草醛、对羟基苯甲酸、香草醛、对羟基苯甲酸四种物质。采用 Nexera UC Offline-SFE 系统萃取,超临界二氧化碳流体作为萃取溶剂进行超临界流体萃取并收集萃取液,GCMS-QP2020 进样定量分析。本文优化了改性剂比例、萃取温度、萃取压力等条件,并在最佳条件下考察了萃取效率和萃取通量。该方法萃取速度快、萃取效率高、操作简便、可实现 2.00 g 样品的快速萃取。

四、药物杂质分析

药物的杂质是指药物中存在的无治疗作用、或影响药物的稳定性和疗效、甚至对人体健康有害的物质。杂质一般来源于药物生产过程中使用的原料中的不纯物、合成中间体、副产物等未在精制时完全除去的物质，还有药物在贮藏过程中，受温度、湿度、日光等外界条件影响下，或因微生物的作用，



引起药物发生水解、氧化、分解和发霉等变化而产生的物质。这些物质的存在不仅影响药物的质量，而且还可以反映出生产贮藏过程中存在的问题。对药物所含杂质进行检查既可保证用药的安全、有效，同时也为生产、流通过程的质量保证和企业管理的考核提供依据。

药物杂质分析方法根据杂质类型和限量不同而有所区别，如无机杂质的分析常用离子色谱法、原子吸收法等，有机杂质种类繁多，常用化学法、光谱法、色谱法等，而其中尤以色谱法最为常用，薄层色谱法（TLC）、气相色谱法（GC）、液相色谱法（HPLC）是有机杂质分析中最为常用的分析方法，其中又以 HPLC 方法灵敏可靠而应用面更为宽广。超临界流体色谱法（SFC）是以超临界流体和少量改性剂为流动相、以正相或反相固定相为色谱柱的色谱分析系统，特别适合于 LogP （亲水亲油平衡值）在 $-2\sim 9$ 之间的化合物的分析，而药物分子由于需要在生物体内进行吸收、分布、代谢、排泄等过程，其 LogP 也恰好在这一范围附近，因此药物及其杂质的分析是适合使用 SFC 方法的。《中国药典（2015 版）》首次收载超临界流体色谱法（四部 0531 法）作为药物分析的可选方法，为药物及其杂质的分析提供一种法定的新手段。

本节收录两篇应用文均使用 Nexera UC SFC——岛津最新的超临界流体色谱系统，进行药物杂质分析的实例，含非手性杂质（Achiral impurity）和手性杂质（Chiral impurity）的分析过程，以供读者参考。

Nexera UC SFC-UV 系统在原料药杂质分析中的应用

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对原料药二乙酰鸟嘌呤及杂质进行分离, 通过考察多种色谱柱和流动相组合, DAICEL DCpak SFC-A 和乙醇为流动相时可获得主药和杂质的最佳分离效果。在此基础上建立杂质 SFC 分析方法, 结果显示杂质在 50~500 mg/L 线性良好, 保留时间和峰面积重复性 RSD 在 0.2% 和 1.5% 以内。

关键词: Nexera UC SFC 药物杂质

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是以超临界流体为主要流动相, 添加改性剂或微量添加剂的二元或三元流动相的新型色谱分离技术。超临界 CO₂ (scCO₂) 以其安全、价廉、无毒、易制得、化学惰性等因素成为 SFC 常用的主要流动相。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点, 使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。

本实验使用的岛津 Nexera UC SFC-UV 系统属于岛津最新的超临界流体色谱仪系列产品, 具有系统耐压高、背压阀 (BPR) 内部体积小、灵敏度高、操作界

面通用性好等特点。本实验对原料药二乙酰鸟嘌呤及杂质进行分离, 通过考察多种色谱柱和流动相组合获得最优分析条件, 并建立杂质 SFC 分析方法, 结果显示线性和重复性等表现良好, 可为进一步开展该类药物定性定量研究提供分离方法的参考。《中国药典 (2015 版)》首次收载超临界流体色谱法 (四部 0531 法) 作为药物分析的可选方法, 岛津 Nexera UC 系统可为相关药物的 SFC 分析方法建立提供帮助。

实验条件

仪器 Nexera UC SFC-UV 系统

具体配置为: LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20AD_{XR} (输液泵, 含 LPGU 低压梯度比例阀), DGU-20A5 (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A (背压调节单元), SPD-20A (紫外检测器), CBM-20A (系统控制器), LabSolutions Ver 5.8 (色谱工作站)。

样品信息

二乙酰鸟嘌呤是重要的医药中间体, 杂质检测是其质量控制的关键。该化合物在常用溶剂中溶解性差, 并且遇水分解, 使得常规的 RP-HPLC 分析不能实现。本实验中以少量 DMSO 溶解该样品后再以 DMSO-ACN (1:1, v/v) 稀释, 经过滤后进样分析。

表 1 化合物信息

#	化合物中文名	化合物英文名	CAS#	分子式
1	乙酰基鸟嘌呤	N2-Acetylguanine	19962-37-9	C ₇ H ₇ N ₅ O ₂
2	二乙酰鸟嘌呤	N(2),9-Diacetylguanine	3056-33-5	C ₉ H ₉ N ₅ O ₃

结果与讨论

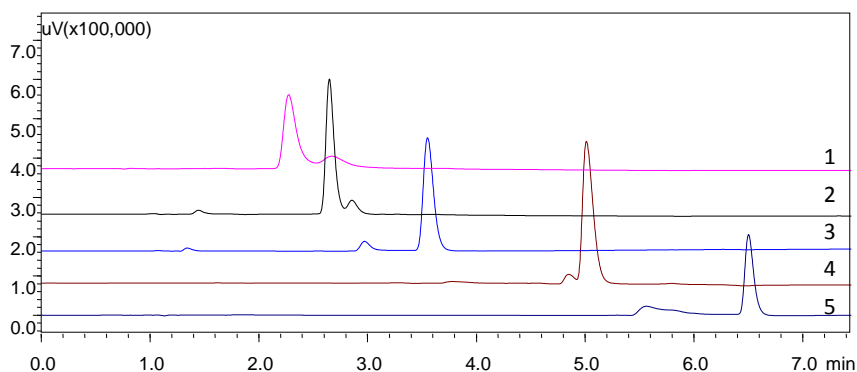


图 1 甲醇为改性剂时不同色谱柱分离效果对比 (检测波长: 264 nm)

1.ODS-P, 2.ODS-4, 3.OD-H, 4.SIL, 5.SFC-A

色谱柱填料对分离的影响

实验考察了 GL science ODS-P、ODS-4、SIL 及 Daisel 的 OD-H 和 SFC-A 五款色谱柱, 所用规格均为 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μ m。在 scCO₂-MeOH 体系中对样品进行分析, 结果显示 ODS-P、ODS-4 和 SIL 对样品中主成分和杂质分离度不佳, OD-H, SFC-A 对该样品中两种成分的分​​离效果较前三款色谱柱好, 如图 1 所示。对比 OD-H, SFC-A 发现, SFC-A 虽然对主成分前的杂质峰形表现较差, 但对该杂质的响应优于其在 OD-H 色谱柱上的表现。

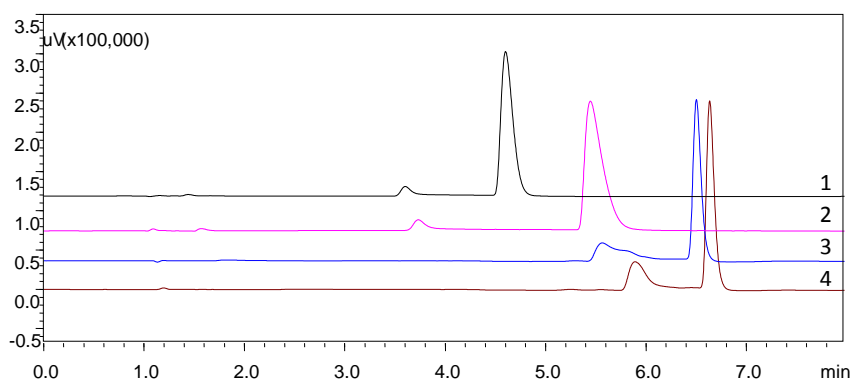


图 2 甲醇和乙醇作为改性剂时分离效果对比 (检测波长: 264 nm)

1.OD-H-甲醇, 2.OD-H-乙醇, 3.SFC-A-甲醇, 4.SFC-A-乙醇

流动相对分离的影响

SFC 分析中, scCO₂ 和少量改性剂构成的混合流体对化合物的色谱保留行为具有显著影响, 因此在色谱柱筛选的基础上对流动相进行优化, 分别选择 scCO₂-MeOH 和 scCO₂-EtOH 在 OD-H 和 SFC-A 色谱柱上进行分析。结果显示在 SFC-A 色谱柱上以 scCO₂-EtOH 进行分离时, 无论是分离度还是杂质响应均为最佳, 因此选择该条件为二乙酰鸟嘌呤样品的分析条件。

超临界流体色谱中, 分离系统背压和柱温通常也是考察的关键。增高背压和提高温度可以改变超临界体的密度和粘度, 进而改变洗脱能力和洗脱效果。本实验中, 背压和柱温对实验结果影响并不显著, 故在此未列出。

SFC 色谱条件

色 谱 柱 : DAICEL DCpak SFC-A 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μ m

流 动 相 : A- scCO_2 ; B-乙醇 流 速 : 3 mL/min
 柱 温 : 40°C 检 测 波 长 : 264 nm
 背 压 : 10 MPa 进 样 量 : 1 μL
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 起始比例5%B, 时间程序见表2所示

表2 梯度时间程序

Time	Module	Command	Value
3	Pump	Pump B Con.	12
6	Pump	Pump B Con.	25
8	Pump	Pump B Con.	25
8	Pump	Pump B Con.	5
10	Controller	Stop	

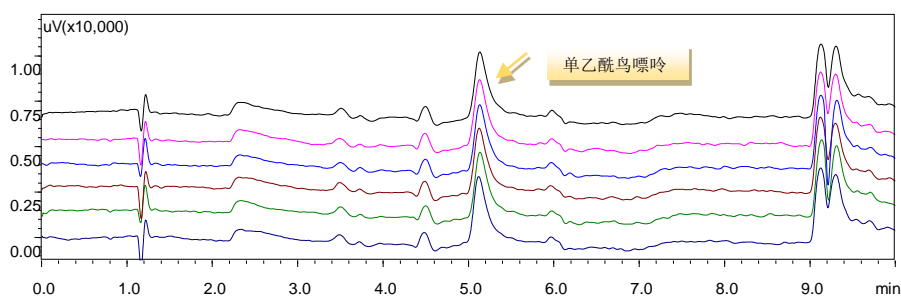


图3 杂质单乙酰鸟嘌呤 (50 mg/L) 重复性分析色谱图 (n=6)

表3 单乙酰鸟嘌呤 (50 mg/L) 重复性分析结果 (n=6)

	保留时间 (min)	峰面积
1	5.135	34,567
2	5.132	33,970
3	5.134	34,476
4	5.128	34,480
5	5.137	33,973
6	5.121	35,047
平均值	5.131	34,419
RSD%	0.11	1.18

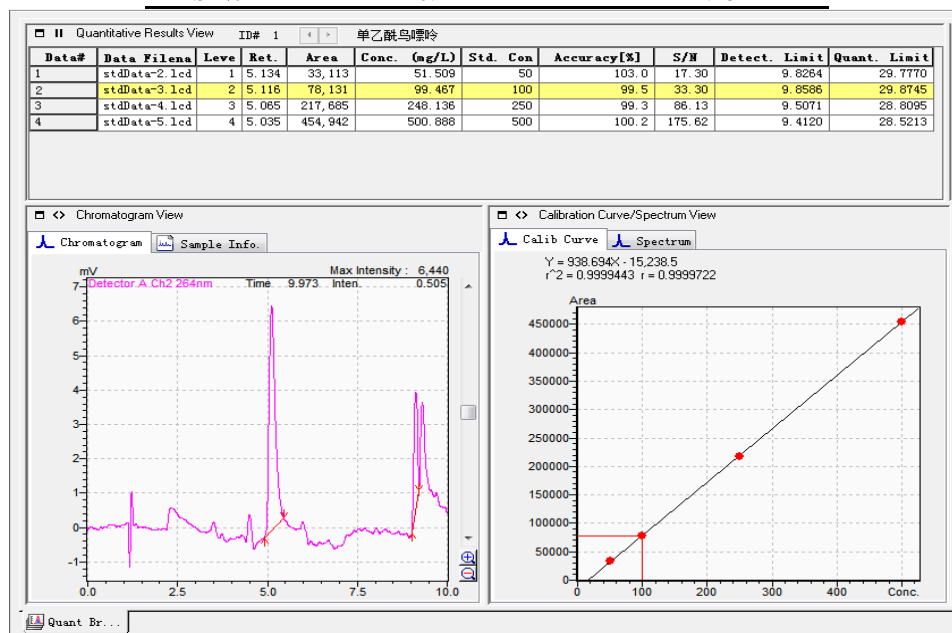


图4 单乙酰鸟嘌呤标准曲线及参数

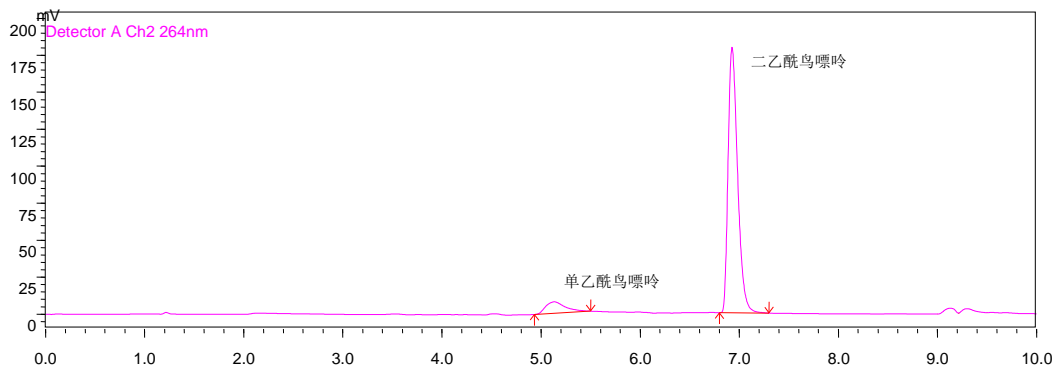


图5 二乙酰鸟嘌呤样品分析结果

结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对药物中间体二乙酰鸟嘌呤中的杂质进行分析，有效避免使用反相色谱分析中该药物不稳定遇水分解的可能，并且 SFC 系统分析速度快、重现性好、灵敏度高、溶剂消耗少并且安全环保，另外使用 $scCO_2$ 、甲醇、乙醇、乙腈等做流动相时和质谱联用也不存在任何障碍，方便 SFC 方法直接移植成为 SFC-MS 方法，可进一步提升检测灵敏度和扩展应用领域。

Nexera UC SFC-UV 系统在原料药手性杂质拆分中的应用

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对原料药 ZYJ-I 手性杂质进行拆分。考察了色谱柱、改性剂及压力对分离的影响。结果发现使用 DAICEL OD-H 色谱柱和甲醇为改性剂时可将两者拆分开, 分离度可达 1.5; 在各个影响因素中色谱柱的影响最大, 改性剂和背压均有一定的影响。同时考察了使用最终条件时系统的精密度, 结果显示仪器精密度良好, 杂质 R-ZYJ-I 的保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.78 和 2.95。

关键词: Nexera UC SFC 药物杂质 手性拆分

含手性因素的化学药物对映体在人体内的药理活性、代谢过程及毒性存在显著的差异。对于手性药物, 一个异构体可能是有效的, 而另一个异构体可能是无效甚至是有害的。当前手性药物的研究已成为国际新药研究的主要方向之一。

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是以超临界流体为主要流动相, 添加改性剂或微量添加剂的二元或三元流动相的新型色谱分离技术。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点, 使得 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势。

ZYJ-I 是一种医用造影剂, 其有效成分为 S-ZYJ-I, 而 R-ZYJ-I 则作为杂质需要被监测。长期以来, 该药物的拆分使用高效液相色谱的方法, 但是拆分效果差。目前未见有报道将两个对映异构体拆分达到基线分离。

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统, 对 ZYJ-I 原料药的手性药物进行分离, 考察了色谱柱、改性剂及压力对分离的影响。Nexera UC SFC-UV 系统是岛津公司最新的超临界流体色谱仪系列产品, 具有系统耐压高、背压阀 (BPR) 内部体积小、灵敏度高、操作界面通用性好等特点。

1 实验条件

1.1 仪器 Nexera UC SFC-UV 系统

具体配置为: LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20AD_{XR} (输液泵, 含 LPGU 低压梯度比例阀), DGU-20A5 (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A (背压调节单元), SPD-20A (紫外检测器), CBM-20A (系统控制器), LabSolutions Ver 5.8 (色谱工作站)。

1.2 样品信息

称取 5 mg R-ZYJ-I 和 5 mg S-ZYJ-I 置于 10 mL 容量瓶中, 用乙醇定容, 超声至完全溶解, 得到 0.5 mg/mL 的标准品溶液, 上机分析。

2 结果与讨论

1.1 色谱柱填料对分离的影响

手性物质的拆分, 色谱柱的类型选择十分重要。实验考察了 Daicel 的两款手性色谱柱 AD-H 和 OD-H, 所用规格均为 4.6 mm I.D.×150 mm L., 5 μm。在 scCO₂-MeOH 体系中对 R-

ZYJ-I 和 S-ZYJ-I 混合标准品进行分析，结果显示 AD-H 色谱柱对样品没有任何分离能力，OD-H 色谱柱表现出了较好的分离能力（见图 2）。

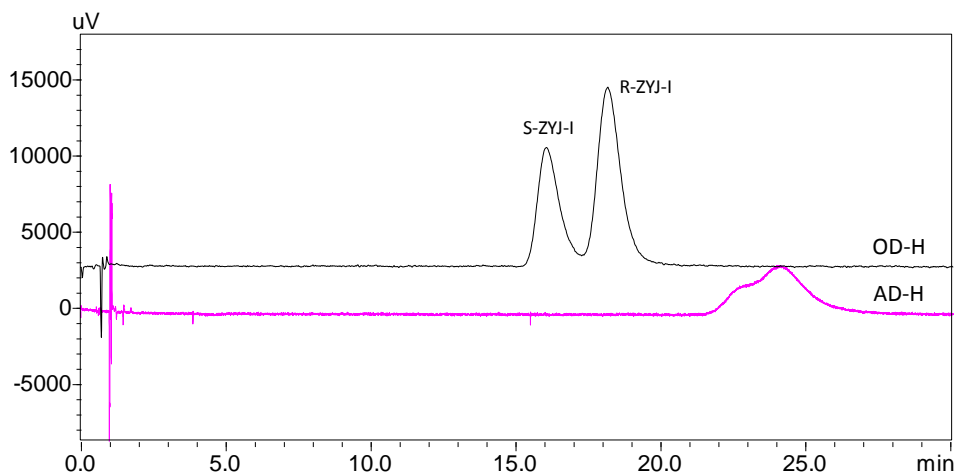


图 2 不同色谱柱分离效果对比图

2.2 改性剂对分离的影响

手性物质的拆分，改性剂的种类和比例影响也很大。本文考察了两种改性剂甲醇和乙醇，及不同比例的甲醇对分离的影响。结果显示甲醇相比乙醇对两个手性物质的分离能力相当，但甲醇的洗脱能力更强（见图 3），从而可以提高分析效率，节省运营成本；当增加改性剂甲醇的比例时，样品的保留减弱、分离度减小（见图 4）。

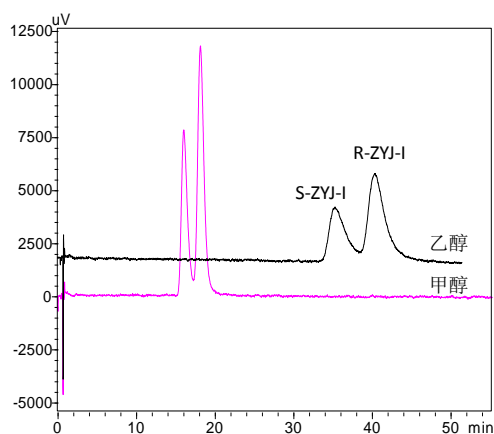


图 3 不同类型改性剂分离效果对比图

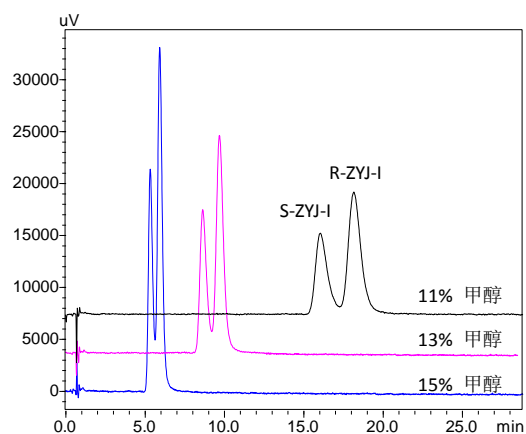


图 4 不同比例改性剂分离效果对比图

2.3 背压对分离的影响

改变背压可以改变超临界流体的粘度从而对分离产生影响。本文考察了背压分别为 15 MPa、20 MPa 和 25 MPa 对分离的影响，结果显示保留时间和分离度均随着背压的增加而减小（见图 5）。

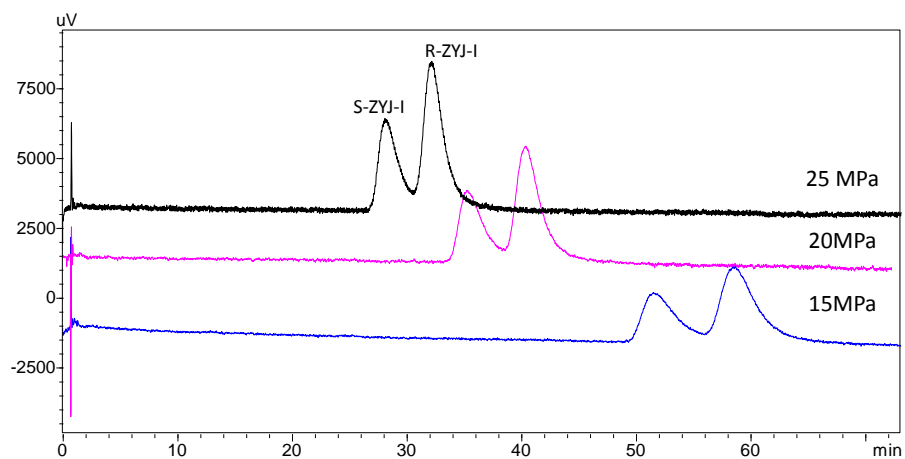


图 5 不同背压下分离效果对比图

考虑分离度和运行成本等方面，最终确定分析条件如下：

SFC 色谱条件

色 谱 柱	: DAICEL OD-H 4.6 mm I.D.×150 mm L., 5 μm	流 速	: 3 mL/min
流 动 相	: scCO ₂ /甲醇=89/11	检 测 波 长	: 242 nm
柱 温	: 40°C	进 样 量	: 5 μL
背 压	: 20 MPa		

使用上述条件进行测试，结果如图 6 所示，两者的分离度为 1.5。

同时考察了该条件下杂质 R-ZYJ-I 的精密度，重复 6 针进样，仪器精密度良好，保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.78 和 2.95，结果列于表 1。

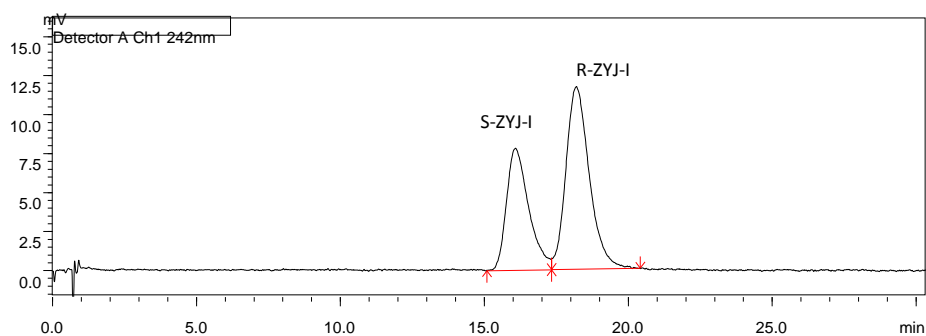


图 6 最优条件下 ZYJ-I 手性物质拆分的色谱图

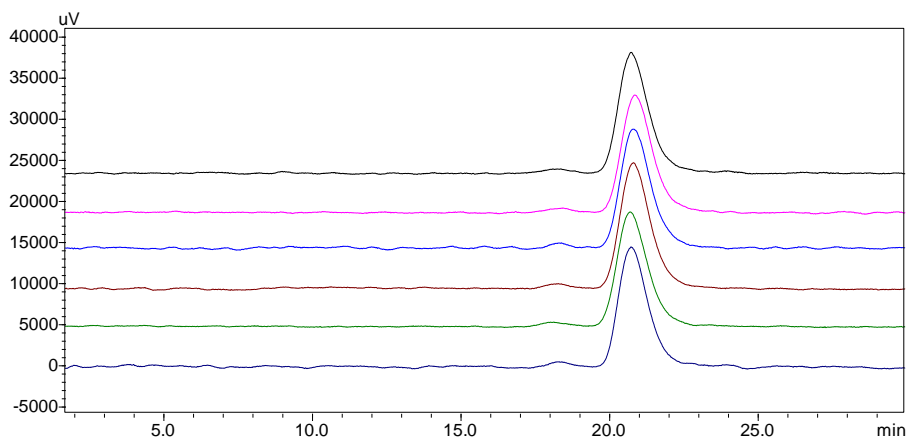


图 7 R-ZYJ-I 重复 6 针色谱图

表1 R-ZYJ-I (0.5 mg/mL) 重复性分析结果 (n=6)

	保留时间 (min)	峰面积
1	20.717	1,013,150
2	20.786	1,041,992
3	20.777	1,039,973
4	20.761	1,087,075
5	20.755	1,001,589
6	20.704	1,057,297
平均值	20.750	1,040,179
RSD%	0.158	2.95

结论

本文使用岛津 Nexera UC SFC-UV 系统对原料药 ZYJ-I 的两个对映异构体的拆分参数条件进行了研究。优化了色谱柱、改性剂类型及比例、背压等参数，最终将两个对映异构体拆分开来。由于 SFC 分析具有快速、高效、高分离等优势，使得其在手性杂质拆分方面有广阔的应用前景。

五、脂溶性维生素分析

维生素是一类维持动物体正常生命形态的基本微量物质，其中脂溶性维生素如维生素 A、维生素 E 等由于化学结构关系，疏水性强、易溶于低极性有机溶剂中。该类物质常用的分析检测手段因化合物而异，如《中国药典（2015 版）》中维生素 A 用反相液相色谱，维生素 D

常用正相液相色谱法，维生素 E 使用气相色谱法等，方法多样使得同时检测此类化合物成为相关检测领域方法开发的难点。

超临界流体色谱（Supercritical Fluid Chromatography, SFC）是以超临界流体和少量改性剂为流动相的新型色谱分离技术。超临界 CO₂（scCO₂）以其安全、价廉、无毒、易制得、化学惰性等因素成为 SFC 常用的主要流动相。超临界流体具有低黏度、高扩散性和高溶解性等特点，使得 SFC 分析，尤其对中低极性化合物分析具有快速、高效、高分离等优势。

Nexera UC Online SFE -SFC 系统是岛津最新的超临界流体色谱产品，有效的将 SFE 和 SFC 实现了在线联用，简化和统一了前处理手段，具有萃取率高、重复性好、节省溶剂和操作时间、操作界面通用性好等特点。本篇章收录使用 SFC 系统进行脂溶性维生素分析的应用文章，其中一篇使用 Nexera UC Online SFE -SFC 系统建立了维生素 A 醋酸酯等多种脂溶性维生素的分析方法，另一篇使用 Nexera UC UFMS 系统建立了维生素 D3 的质谱分析方法，以供相关读者参考使用。



Nexera UC Online-SFE-SFC 在脂溶性维生素分析中的应用

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC Online-SFE-SFC 系统建立了维生素 A 乙酸酯等五种脂溶性维生素分析方法, 通过考察色谱柱和流动相, 选择 GL science ODS-P 色谱柱和甲醇作为改性剂时可获得各化合物最佳分离效果。分析结果显示, 维生素 A 乙酸酯等化合物 SFE 的萃取率在 86~94% 之间, 维生素 A 乙酸酯等四种化合物在 2.8~55.6 μg 、维生素 E 乙酸酯在 5.6~112 μg 范围内线性良好, $R^2 > 0.997$, 回收率在 90~101% 之间, 保留时间和峰面积重复性 RSD 在 0.03~0.24% 和 4.1~13% 以内, 可以作为该类药品及膳食补充剂的维生素检测方法使用。

关键词: Nexera UC SFC 脂溶性维生素

本实验使用该系统开发了药品和保健食品中脂溶性维生素的检测方法, 同传统和先行标准方法相比, 该法前处理准备简单, 可同时检测多种脂溶性维生素, 且方法有效可靠, 为多种脂溶性维生素的同时检测提供有效的分析手段, 可对该类物质的定量研究提供参考。

实验条件

仪器 Nexera UC Online-SFE-SFC 系统

具体配置为: SFE-30A (超临界流体萃取单元), LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20AD_{XR} (输液泵, 含 LPGU 低压梯度比例阀), DGU-20A5 (在线脱气机), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A \times 2 (背压调节单元), SPD-20A (紫外检测器), CBM-20A (系统控制器), LabSolutions Ver 5.8 (色谱工作站)。

样品信息

本实验中共使用五种脂溶性维生素建立了分析方法, 具体化合物信息如表 1 所示。取维生素 A 乙酸酯等标准品以正己烷溶解后, 用乙醇稀释, 配制成系列浓度样品加入萃取罐中进行分析, 获得标准曲线。另选择市售的维生素 A、维生素 E 胶丸和多维元素片, 进行简单前处理。对胶丸样品取出内容物少量以正己烷稀释后滴入萃取罐进行分析, 多维元素片刮去薄膜包衣研碎成粉后称取少量到萃取罐进行分析。

表 1 化合物信息

#	中文名	英文名	CAS#	缩略
1	维生素 A 乙酸酯	Vitamin A acetate	127-47-9	VAA
2	维生素 A 棕榈酸酯	Vitamin A palmitate	79-81-2	VAP
3	维生素 E 乙酸酯	Vitamin E acetate	7695-91-2	VAE
4	维生素 D2	Vitamin D2	50-14-6	VD2
5	维生素 D3	Vitamin D3	67-97-0	VD3

SFE 萃取条件:

萃 取 剂 : A-scCO₂; B-MeOH

萃 取 流 速 : 5 mL/min

萃 取 剂 比 例 : A/B=98/2(v/v)

静态萃取 : 3 min
萃取温度 : 50°C

动态萃取 : 3 min
萃取背压 : A-14.8 MPa; B-15 MPa

SFC 色谱条件

色谱柱 : GL Science ODS-P 4.6 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm
流动相 : A-scCO₂; B-甲醇 流速 : 3 mL/min
柱温 : 40°C 检测波长 : 325 nm, 284 nm
背压 : 10 MPa
洗脱方式 : 梯度洗脱, 0%B(6 min)-2%B(9 min)-10%B(16 min)-50%B(16.1-17 min)

结果与讨论

超临界流体萃取

待测样品装入到萃取罐中, 放入 SFE-30A 超临界流体萃取单元中进行萃取。液态 CO₂ 和改性剂甲醇以 98/2 (v/v) 经由输液泵输入 SFE 单元的萃取罐中, 在设定温度和压力下形成超临界流体, 甲醇的加入是为了调整超临界流体的溶解性、极性性质以改善萃取效果。在稳定的温度和压力保持超临界流体充满萃取罐 3 min 进行静态萃取, 然后通过 SFE 单元流路切换阀切换, 萃取罐中的萃取物在 3 min 内由流经萃取罐的超临界流体

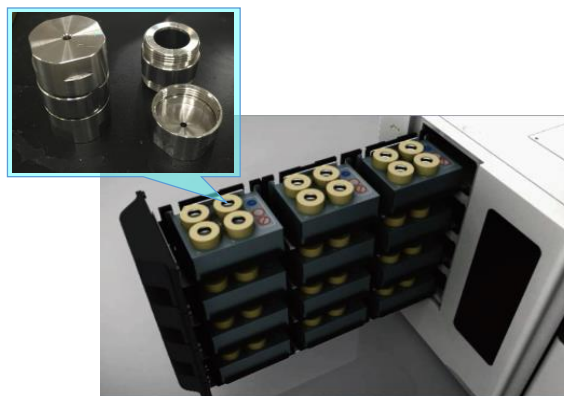


图 1 超临界流体萃取罐及换架器

体洗脱, 完成动态萃取。动态萃取过程中, 萃取物直接进入后续 SFC 系统, 全萃取过程完成后进行 SFC 分析, 从而实现 SFE-SFC 的在线联用方式, 见图 2 所示。

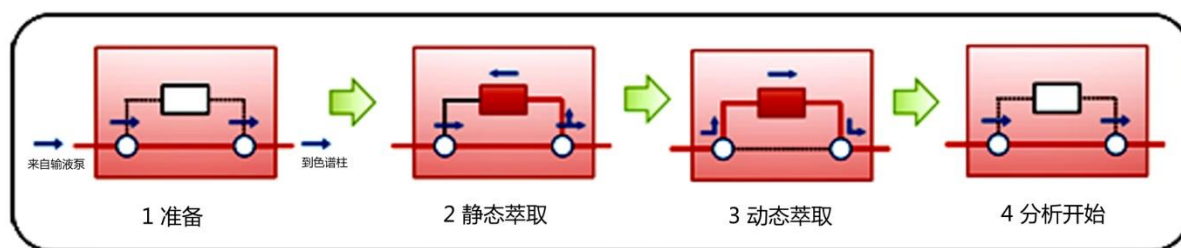


图 2 超临界流体萃取过程示意图

为考察设定条件下 SFE 对五种化合物的萃取效率, 通过重复对同一萃取罐内容物进行多次 SFE-SFC 联用分析 (如图 3), 计算各化合物峰面积并记录于表 2, 以首次萃取所得化合物峰面积对三次萃取的峰面积合计做比以表示萃取率, 结果显示该条件下 SFE 方式对以上五种化合物的萃取率在 86~94% 之间。结果显示, 首次萃取的萃取效率同化合物在该条件下的保留时间呈负相关, 即表示保留时间短、易洗脱、易溶于超临界流体中的物质, 在同等分析条件下具有较高的萃取效率。

表 2 五种化合物 SFE 萃取率 (%)

	VAA	VEA	VAP	VD2	VD3
第一次萃取	94.2	88.6	89.3	86.2	86
第二次萃取	5.8	10.1	9.7	11.6	12
第三次萃取	0	1.3	1	2.2	2

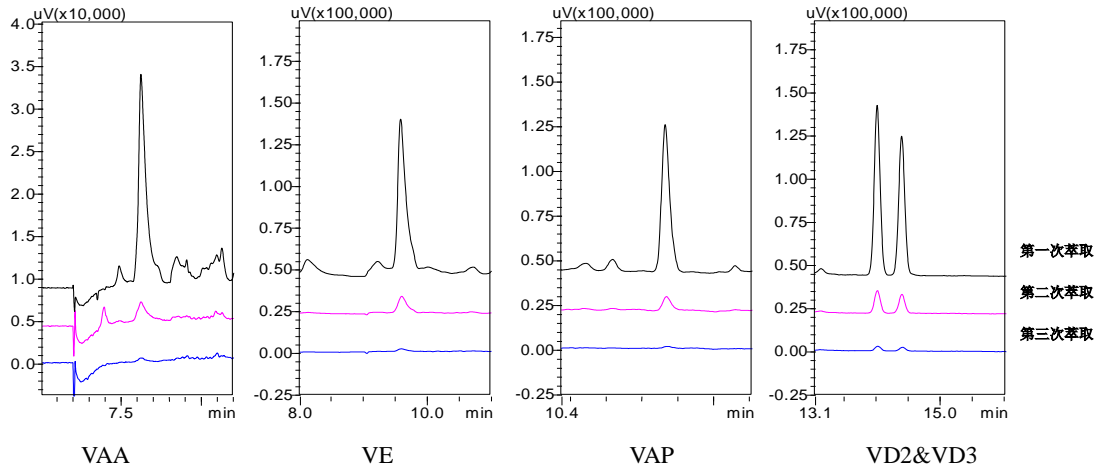


图 3 SFE 萃取效率考察

(检测波长: VAA-325 nm; VE, VAP, VD2&VD3-284 nm)

超临界流体色谱

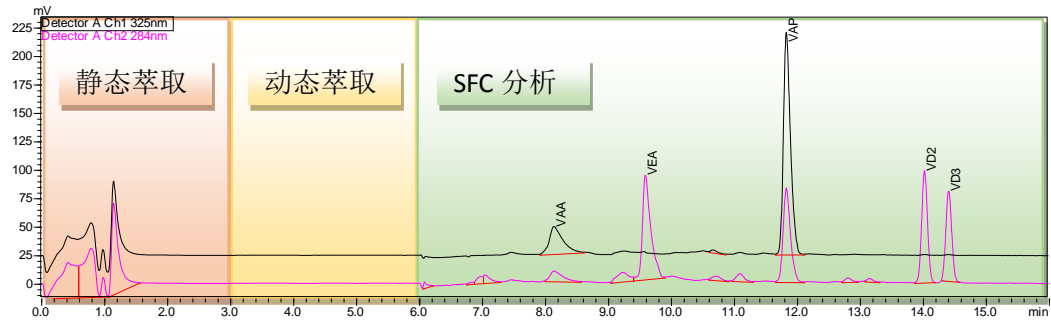


图 4 五种维生素的 Online SFE-SFC 色谱图

对维生素 A 乙酸酯等五种脂溶性维生素进行 Online SFE-SFC 分析, 色谱图如图 4 所示。按照设定时间程序, 分析开始后的 6 min 内为萃取过程, 6 min 后为 SFC 分析, SFE 到 SFC 切换无需过渡, 高效衔接。以萃取罐中化合物的绝对加入量 (μg) 对检测器响应做曲线, 结果如图 5 所示, 五种化合物在各自加入量范围内线性良好, 回归系数 R^2 在 0.997-0.999 之间。

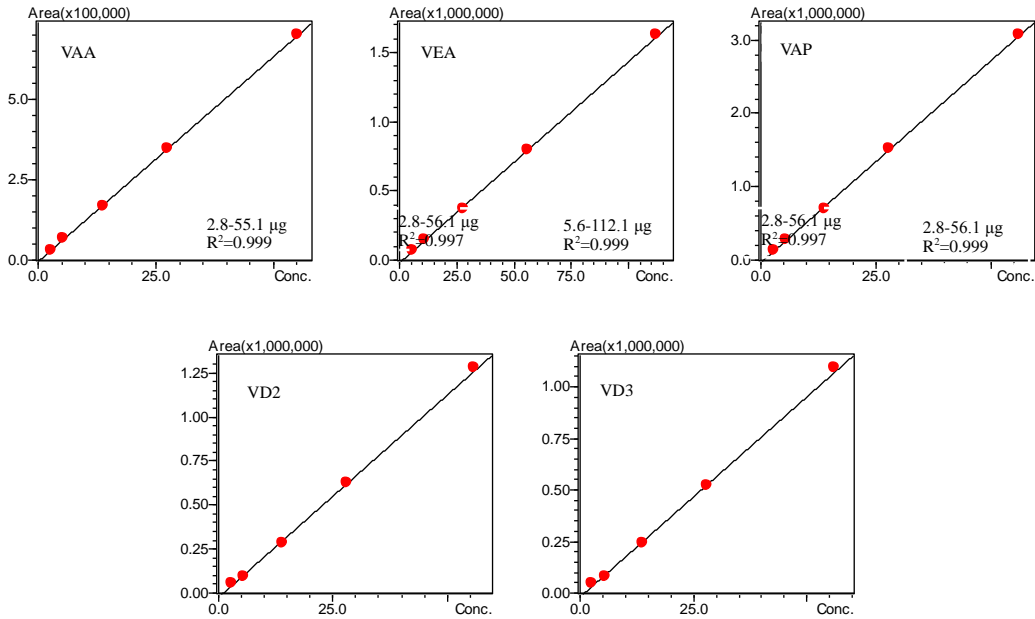


图 5 五种脂溶性维生素样品标准曲线

重复性和回收率

取 6 个萃取罐加入相同量的五种维生素混合标样，考察 Online SFE-SFC 分析的重复性和回收率，结果如表 3 所示。分析结果表明，Online SFE-SFC 分析五种脂溶性维生素保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.03~0.24%和 4.1~13.0%之间，加标回收率在 90~101.1%之间，可以满足定量分析的需求。

表 3 五种脂溶性维生素重复性和回收率分析结果 (n=6,%)

	VAA	VAE	VAP	VD2	VD3
保留时间(RSD)	0.24	0.15	0.10	0.04	0.03
峰面积(RSD)	13.0	5.2	4.1	4.5	5.9
回收率	94.4	101.1	100	90.5	90.5

实际样品

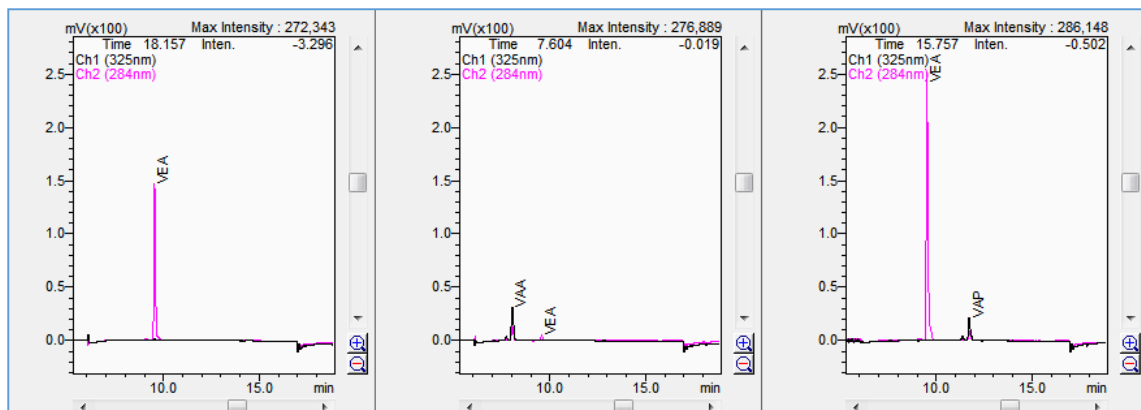


图 6 脂溶性维生素类药品和保健食品 Online SFE-SFC 色谱图
(左: VE 胶丸; 中: VA 胶丸; 右: 多维片)

结论

本文使用岛津 Nexera UC Online SFE-SFC 系统建立了维生素 A 乙酸酯等五种脂溶性维生素分析方法，该方法实现样品前处理（SFE）和样品分析（SFC）在线联用，将原本需要多种前处理和分析手段才能分析的多种脂溶性维生素实现了同时分析。Online SFE-SFC 分析方式可以作为此类脂溶性维生素的快速检测手段，该方法可为食品药品生产、检验行业及部门提供参考。

Nexera UC SFC/LCMS-8060 测定血清中的 25-OH 维生素 D3

摘要: 本文建立了一种使用岛津超临界色谱仪 Nexera UC 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用同时测定血清中 25-OH 维生素 D3 的含量, 方法快速, 安全。进样量低, 使用内标法在 0.9 ng/mL~90.0 ng/mL 浓度范围内绘制标准曲线, 线性良好, 相关系数为 0.9993。对高中低三质控样品进行批次内以及批件监测, 重现性低于 4.68%, 重现性良好。

关键词: 超临界色谱 三重四极杆质谱仪 25-OH 维生素 D3

维生素 D (Vitamin D) 是儿童生长发育过程中必不可少的微量营养素, 儿童处于生长发育的重要阶段, 受到饮食习惯、饮食结构及生活方式等因素的影响, 易出现维生素 D 水平异常, 从而导致“隐性饥饿”。25-羟基维生素 D3 是维生素 D3 的一种活性形式, 维生素 D3 是胆固醇的衍生物, 其主要的活性形式是 1,25-二羟维生素 D3。定量测定儿童维生素 D 浓度, 动态监测血清维生素 D 水平变化, 可用于儿童不同阶段体检时儿童维生素 D 营养状况监测, 有助于儿童生长发育相关的影响因素分析及营养指导方案制定。同时血清维生素 D 监测有助于相关疾病病程监测、病因和影响因素分析, 可用于儿童佝偻病、呼吸道感染、支气管哮喘、肥胖、I 型糖尿病等疾病的病程监测、病因及影响因素分析, 有助于临床治疗干预方案的制定和疾病预防。目前多使用液相色谱质谱联用技术进行 25-羟基维生素 D3 的测定, 使用 C8 色谱柱进行大体积进样分析。本文使用普通 C18 色谱柱, 小体积进样即可实现分析检测, 节省了样品消耗量, 减少受检者采血损耗和痛苦。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超临界色谱仪 Nexera UC 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD_{SF} 超临界 CO₂ 输液泵, LC-20AD_{XR} 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, CTO-20A 柱温箱, SFC-30A 超临界色谱背压调节单元, CBM-20A 系统控制器, SIL-30AC 自动进样器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

超临界色谱条件

色 谱 柱: GL Science Inertsil® ODS-4

时间程序: 见下表

3.0×50 mm, 2 μm

改 性 剂: 0.1%FA 甲醇 (Pump B)

流 速: 1.5 mL/min

出口压力: 10 MPa

进样体积: 1 μL

柱 温: 45.0°C

洗脱方式: 梯度洗脱

Time	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	7
1.00	Pumps	Pump B Conc.	7
3.00	Pumps	Pump B Conc.	19
3.01	Pumps	Pump B Conc.	60
4.00	Pumps	Pump B Conc.	60
4.01	Pumps	Pump B Conc.	7
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8060	加热模块温度:	300℃
离子源:	APCI(+)	接口温度:	150℃
离子源接口电压:	+4.7 kV	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
雾化气:	氮气 2.7 L/min	驻留时间:	100 ms
干燥气:	氮气 4.8 L/min	延迟时间:	10 ms
碰撞气:	氩气	MRM 参数:	见表 1
脱溶剂管温度:	200℃		

表 1 化合物 MRM 参数

化合物名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
25-OH VitD3	19356-17-3	401.20	383.40	-29.0	-11.0	-15.0
			365.45*	-15.0	-12.0	-14.0
25-OH VitD3-d3	—	404.20	386.35	-30.0	-10.0	-20.0

*为定量离子对

2 方法和结果

2.1 对照溶液与内标溶液的配制

以纯甲醇作为稀释剂，对 1.0 mg/mL 25-OH VitD3 及其 d3 内标化合物进行稀释，目标化合物稀释为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、及 100.0 ng/mL 储备液。内标化合物稀释为 200.0 ng/mL 储备液。取各系列浓度储备液 90 μ L 及内标溶液 10 μ L 混合，最终得到终浓度为 0.9、1.8、4.5、9.0、18.0、45.0、90 ng/mL 对照品溶液，内标浓度为 20 ng/mL。

2.2 样品制备

样品前处理方法：取 100 μ L 人血清，加入 10 μ L 内标储备溶液，甲醇 200 μ L，涡旋 1 min，加入正己烷 400 μ L，涡旋 1 min。4℃下 12000 rpm 离心 10 min，回收上清液。室温 N₂ 吹干，100 μ L 甲醇溶解残渣，直接上样分析。

2.3 25-OH VitD3 分析色谱图

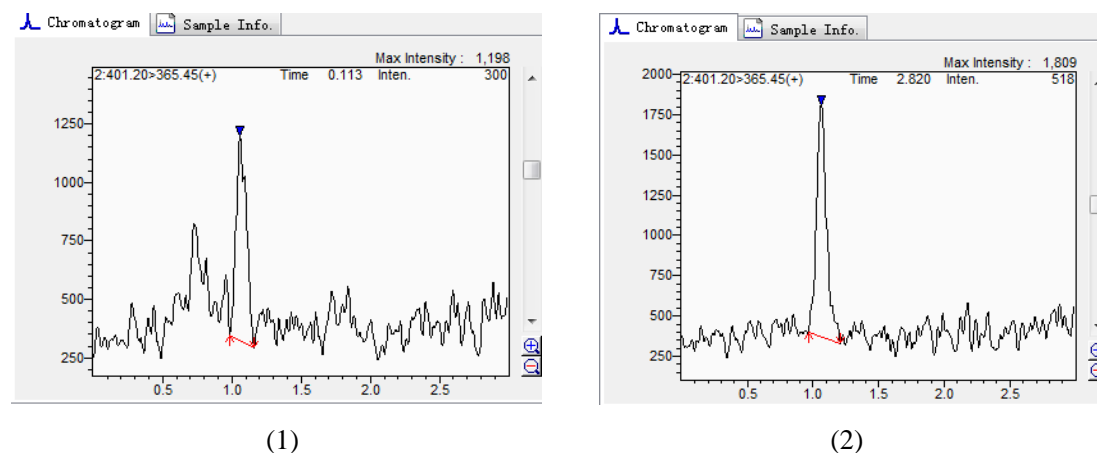


图 1 0.9 ng/mL(1)及 1.8 ng/mL(2) 25-OH VitD3 分析色谱图

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

按“2.1 对照溶液与内标溶液的配制”进行处理后进样。记录成分与内标的峰面积比值，以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线，结果如下所示。

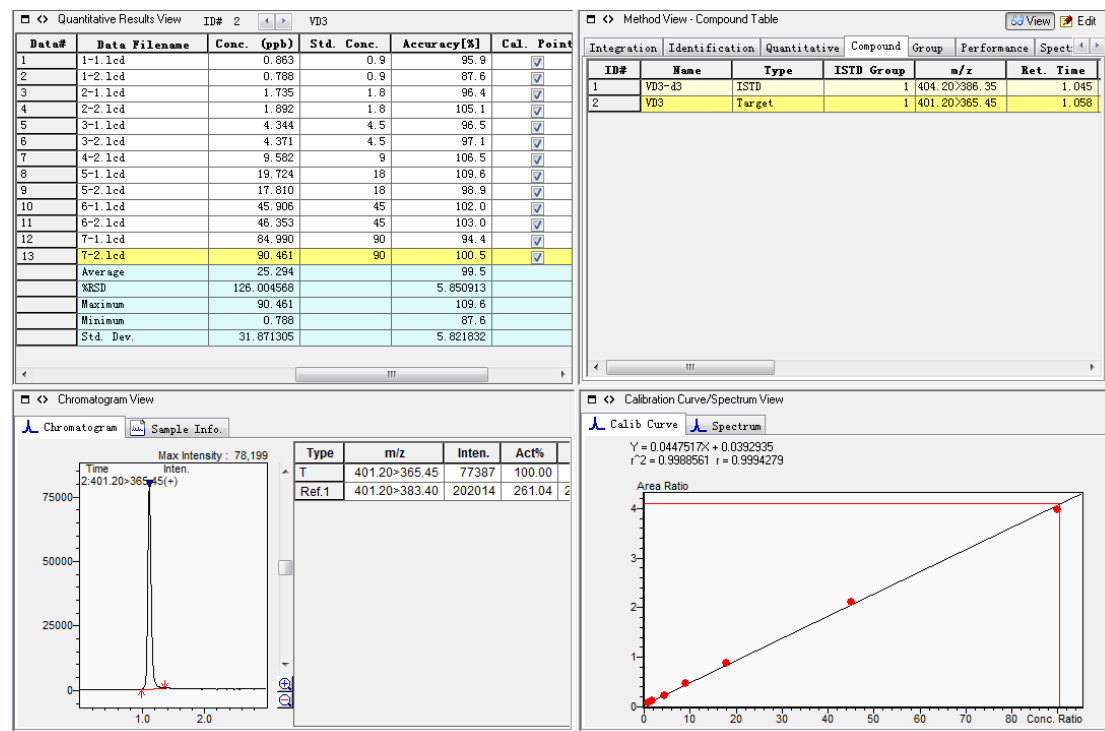


图 2 25-OH VitD3 线性关系及准确性

2.4.2 准确度及精密度

按“2.1 对照溶液与内标溶液的配制”配制 25-OH VitaD3 高中低浓度 QC 样品，1.0、10.0、80.0 ng/mL。每个浓度进行 6 个样本分析，连续分析三批根据标准曲线，计算 QC 样品的测定浓度，与配制浓度做比，求得准确度及精密度，结果如表 3。

表 3 精密度及准确度结果

基质	加入量 (ng/mL)	批内精密度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)	RSD (%)	批间精密度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)	RSD (%)	准确度 (%)
血清	1.0	1.092 ± 0.043	4.13	1.040 ± 0.049	4.68	95.5~115.0
	10.0	9.734 ± 0.317	3.26	9.637 ± 0.322	3.83	94.9~101.9
	80.0	80.964 ± 1.746	2.70	81.059 ± 0.802	2.62	98.5~101.8

2.5 样品测试结果

对 3 份来源不同的血清样品，按“2.2 样品制备”项下进行处理，进行双样本分析血清中 25-OH VitD3 的浓度，测定结果见表 4:

表 4 样品测试结果

浓度 (ng/mL)	来源 A	来源 B	来源 C
样本 1	30.64	14.81	11.29
样本 2	31.34	14.67	11.06

3 结论

采用岛津公司 Nexera UC 系统及 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪建立分析人血清中 25-OH VitD3 含量的方法。方法快速, 简单, 线性良好, 重现性好, 样品消耗量少。使用超临界色谱进行分离, 分离速度快, 溶剂消耗小, 环境友好。方法能准确测定血清中 25-OH VitaD3 含量, 所测数据可对临床检查及用药方案给予指导性意见。

六、兽药残留分析

兽药在防治动物疾病、提高生产效率、改善畜产品质量等方面起着十分重要的作用。然而，由于养殖人员对科学知识的缺乏以及一味地追求经济利益，致使滥用兽药现象在当前畜牧业中普遍存在。滥用兽药极易造成动物源食品中有



害物质的残留，这不仅对人体健康造成直接危害，而且对畜牧业的发展和生态环境也造成极大危害。在动物源食品中较容易引起兽药残留量超标的兽药主要有抗生素类、磺胺类、呋喃类、抗寄生虫类和激素类药物。磺胺类药物主要通过输液、口服、创伤外用等用药方式或作为饲料添加剂而残留在动物源食品中。在近 15 年~20 年，动物源食品中磺胺类药物残留量超标现象十分严重，多在猪、禽、牛等动物中发生。

为了强兽药残留监控，保障动物产品质量安全，建立便捷高效、准确可靠的动物源性食品前处理方法和分析检测方法是国家相关职能部门及相关领域分析工作者共同追求的目标。样品前处理技术是农兽药残留分析的关键步骤,直接影响检测的结果，目前兽药残留检测中常用的样品前处理方法有液-液萃取、固相萃取、QuEChERS 等；分析方法包括 HPLC、LC-MS、LC-MS/MS、GCMS 等方法，随着技术发展和控制标准的提高，LC-MS/MS 的分析方法越来越多的应用到兽残检测领域，有专家喻之为“金标准”。然而传统前处理方法往往存在耗时长、操作步骤多等缺点，其中人为参与过程增大了测定结果不确定性。

Nexera UC Online-SFE-SFC/MS 系统是岛津推出的在线超临界流体萃取-超临界流体色谱/质谱联用系统。其利用超临界流体萃取（SFE）具有快捷、高效、处理简便、污染小等特点亦可作为兽残样品前处理的手段，超临界流体色谱-质谱联用（SFC-MS）进行快速高效分离和检测。本节收录使用该系统进行鸡肉中磺胺类药物残留检测的应用报告以供读者参考。

Nexera UC Online-SFE-SFC-MS在鸡肉中磺胺类药物残留检测中的应用

摘要: 本实验使用岛津 Nexera UC Online-SFE-SFC-MS 系统建立了鸡肉中磺胺类药物残留检测的分析方法, 选择 Shim-pack UC-X SIL 色谱柱, 甲醇作为改性剂, 通过优化改进剂比例获得最佳分离效果。分析结果显示, 13 种磺胺类药物 SFE 的萃取率在 50.18~63.52% 之间, 稳定性考察中, 保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.041~0.095% 和 6.789~11.830% 之间。磺胺邻二甲氧嘧啶和磺胺间二甲氧嘧啶在 5~100 ng 范围内, 其余磺胺类药物在 5~200 ng 范围内线性良好, 相关系数 R 大于 0.995, 加标回收率在 77.3%-117.1% 之间。

关键词: Nexera UC SFE-SFC-MS 磺胺类药物残留 鸡肉

磺胺类药物是农业生产中常用兽药。农业生产中常以亚治疗浓度的药物做为饲料添加剂来预防疾病的发生, 提高饲料的转化率和促进动物生长, 其中常用的就有十几种。其不合理的使用很容易造成耐药菌增加, 而且动物性食品中残留的药物可能对人体的健康造成潜在的危害。

超临界二氧化碳具有低极性、高扩散等特点, 将超临界二氧化碳流体作为萃取溶剂

进行超临界流体萃取 (Supercritical Fluid Extraction, SFE), 可以大大缩短萃取时间, 并且与当前使用的溶剂萃取法相比, 具有使用溶剂少、环保的特点。

本文采用岛津 Nexera UC Online-SFE-SFC 系统, 建立了动物源性食品中磺胺类药物残留的分析方法, 该方法具有萃取效率高、重复性好、节省溶剂和操作时间、自动化程度高等特点。

1. 实验条件

1.1 仪器 Nexera UC 系统

具体配置为: LC-30AD_{SF} (CO₂ 输液泵), LC-20AD_{XR} (输液泵, 含 LPGE 低压梯度比例阀), LC-20AD (补偿液输送泵), DGU-20A5 (在线脱气机), SFE-30A (超临界流体萃取单元), SIL-30AC (自动进样器, 5 μL 定量环), CTO-20AC (柱温箱), SFC-30A × 2 (背压调节单元), CBM-20A (系统控制器), LCMS-8050 (三重四极杆质谱仪), LabSolutions Ver 5.86 (色谱工作站)。



图 1 Nexera UC Online SFE-SFC-MS 系统

1.2 SFE 萃取条件:

萃取剂 : A-scCO₂; B-MeOH
 萃取流速 : 5 mL/min
 静态萃取 : 4 min
 萃取温度 : 45℃
 萃取剂比例 : A/B=90/10(v/v)
 动态萃取 : 3 min
 萃取背压 : A-15.0 MPa; B-15.4 MPa

1.3 SFC 色谱条件:

色谱柱 : Shim pack UC-X SIL 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm
 流动相 : A-scCO₂; B-MeOH
 流动相流速 : 3 mL/min
 质谱补偿液 : 20 mM 乙酸铵甲醇溶液
 柱温 : 32℃
 洗脱方式 : 梯度洗脱, 10%B(7 min)-20%B(17 min)-40%B(19-20 min)*
 * 7 min 之前为 SFE 提取过程
 补偿液流速 : 0.2 mL/min
 背压 : A-15 MPa; B-40 MPa

1.4 目标分析物

表 1 磺胺类药物质谱参数

No.	名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias
1	磺胺嘧啶	Sulfadiazine	251.1	156.0	-17	-14	-16
			251.1	108.1	-17	-23	-20
3	磺胺吡啶	Sulfapyridine	250.2	156.0	-17	-15	-16
			250.2	92.1	-17	-26	-10
3	磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	265.1	156.0	-18	-17	-16
			265.1	92.1	-18	-29	-18
4	磺胺甲噻二唑	Sulfamethizole	271.1	156.1	-19	-15	-28
			271.1	108.1	-19	-22	-19
5	磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	279.2	186.1	-19	-16	-20
			279.2	92.1	-19	-30	-18
6	磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxy pyridazine	280.9	156.1	-18	-17	-16
			280.9	92.1	-18	-30	-18
7	磺胺氯吡嗪	Sulfachloropyridazine	284.9	156.1	-19	-14	-16
			284.9	92.1	-19	-31	-17
8	磺胺邻二甲氧嘧啶	Sulfadoxine	311.1	156.1	-22	-18	-30
			311.1	108.1	-22	-26	-20
9	磺胺间二甲氧嘧啶	Sulfamethazine	311.0	156.1	-21	-21	-16
			311.0	92.1	-21	-31	-18
10	磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	254.2	156.1	-17	-14	-16
			254.2	92.1	-17	-27	-10
11	磺胺喹噁啉	Sulfaquinolone	301.0	156.0	-20	-15	-16
			301.0	92.1	-20	-31	-19
12	磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	281.0	108.0	-14	-26	-20
			281.0	156.0	-14	-18	-30
13	磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	281.0	156.0	-14	-18	-30
			281.0	108.0	-14	-29	-21
14	磺胺邻二甲氧嘧啶-D3	Sulfadoxine-D3	314.1	156.0	-17	-14	-16
			314.1	108.0	-17	-23	-20

2. 结果与讨论

2.1 标准品的色谱图

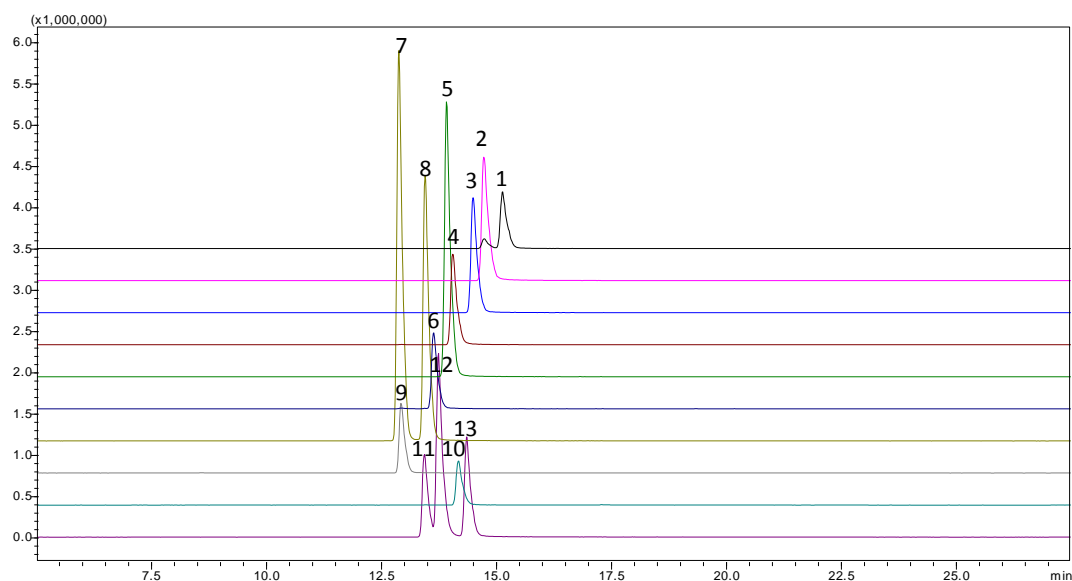


图 2. 磺胺类药物色谱图 (20 ng, 5 min-27.5 min)

(图中峰号依次对应为: 1 磺胺嘧啶, 2 磺胺吡啶, 3 磺胺甲基嘧啶, 4 磺胺甲噻二唑, 5 磺胺二甲嘧啶, 6 磺胺氯哒嗪, 7 磺胺邻二甲氧嘧啶, 8 磺胺间二甲氧嘧啶, 9 磺胺甲恶唑, 10 磺胺喹噁啉, 11 磺胺甲氧哒嗪, 12 磺胺间甲氧嘧啶, 13 磺胺对甲氧嘧啶)

2.2 标准曲线

本实验中针对 13 种磺胺类药物建立了分析方法, 具体化合物信息如表 1 所示。取磺胺类标准品, 用甲醇做溶剂, 稀释成系列浓度样品加入萃取罐中进行分析, 采用磺胺间二甲氧嘧啶-D₃ 为内标 (50 ng), 建立标准曲线。标准曲线线性关系良好, 相关系数均大于 0.995, 标准曲线准确度在 90.5%-115.2%之间。

表 2. 标准曲线及相关系数

No.	名称	线性范围 (ng)	线性方程	相关系数	Accuracy (%)
1	磺胺嘧啶	5-200	$Y = (0.0944151)X + (0.000698749)$	0.9997	95.9-103.5
2	磺胺吡啶	5-200	$Y = (0.194423)X + (0.00119763)$	0.9991	93.6-103.0
3	磺胺甲基嘧啶	5-200	$Y = (0.191910)X + (-0.00154979)$	0.9993	95.9-107.8
4	磺胺甲噻二唑	5-200	$Y = (0.159397)X + (-0.00575447)$	0.9982	91.0-115.2
5	磺胺二甲嘧啶	5-200	$Y = (0.380121)X + (0.00703148)$	0.9965	92.9-110.0
6	磺胺甲氧哒嗪	5-200	$Y = (0.0877322)X + (0.00199301)$	0.9998	96.4-103.5
7	磺胺氯哒嗪	5-200	$Y = (0.112623)X + (0.000409920)$	0.9994	93.7-104.5
8	磺胺邻二甲氧嘧啶	5-100	$Y = (0.565106)X + (-0.000880027)$	0.9996	96.8-106.0
9	磺胺间二甲氧嘧啶	5-100	$Y = (0.494316)X + (0.00859373)$	0.9998	96.4-102.8
10	磺胺甲恶唑	5-200	$Y = (0.0958925)X + (0.000938959)$	0.9997	96.4-105.5
11	磺胺喹噁啉	5-200	$Y = (0.0726394)X + (-6.23389e-005)$	0.9992	93.7-105.4
12	磺胺间甲氧嘧啶	5-200	$Y = (0.276390)X + (9.59051e-005)$	0.9993	94.9-103.3
13	磺胺对甲氧嘧啶	5-200	$Y = (0.192781)X + (-0.00281988)$	0.9977	92.8-109.1

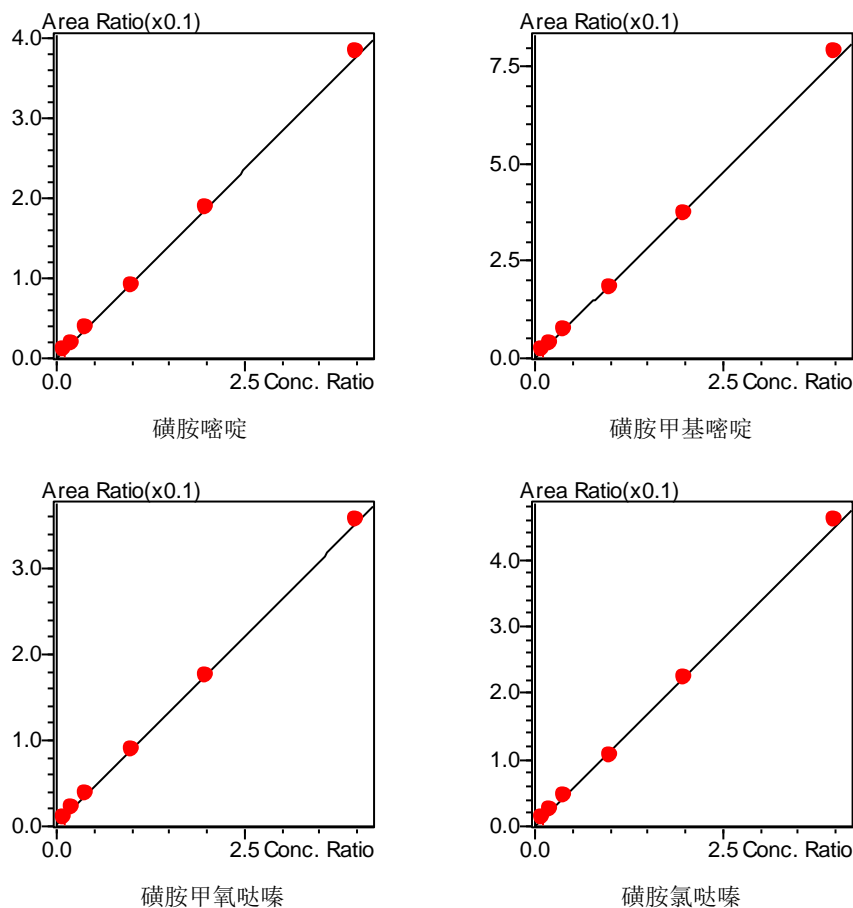


图 3. 部分磺胺类物质标准曲线

2.3 重复性

取 5 个萃取罐加入相同量的磺胺类混合标样, 考察 Online SFE-SFC-MS 分析的重复性, 结果如表 3 所示。分析结果表明, Online SFE-SFC-MS 分析磺胺类物质时, 保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.041~0.095% 和 6.789~11.830% 之间。

表 3. 保留时间和峰面积重复性 RSD% (n=5)

No.	化合物名称	保留时间	峰面积
1	磺胺嘧啶	0.061	9.247
2	磺胺吡啶	0.059	10.611
3	磺胺甲基嘧啶	0.071	9.234
4	磺胺甲噻二唑	0.041	11.830
5	磺胺二甲嘧啶	0.062	10.309
6	磺胺甲氧嘧啶	0.060	9.664
7	磺胺氯嘧啶	0.062	11.349
8	磺胺邻二甲氧嘧啶	0.078	9.082
9	磺胺间二甲氧嘧啶	0.086	10.187
10	磺胺甲恶唑	0.073	10.123
11	磺胺喹噁啉	0.071	9.089
12	磺胺间甲氧嘧啶	0.058	11.481
13	磺胺对甲氧嘧啶	0.044	9.491

2.4 回收率

称取空白鸡肉样品 0.5 g，加入各磺胺类药物 100 ng 和内标 50 ng，加入 1 g 吸水剂与样品充分混合后，装入萃取罐进行分析，加标回收率如表 4 所示。由表可知，样品加标回收率在 77.3%-117.1%之间，相对标准偏差在 2.17%-12.91%，能够满足样品定量分析的要求。

表 4. 加标回收率 (n=3)

N0.	名称	平均回收率/%	相对标准偏差/%
1	磺胺嘧啶	77.3	8.15
2	磺胺吡啶	79.1	7.88
3	磺胺甲基嘧啶	104.5	6.34
4	磺胺甲噻二唑	116.5	5.21
5	磺胺二甲嘧啶	91.7	5.97
6	磺胺甲氧哒嗪	99.4	3.97
7	磺胺氯哒嗪	87.9	9.43
8	磺胺邻二甲氧嘧啶	117.1	2.17
9	磺胺间二甲氧嘧啶	94.8	5.57
10	磺胺甲恶唑	75.3	6.07
11	磺胺喹噁啉	92.4	8.94
12	磺胺间甲氧嘧啶	89.1	10.51
13	磺胺对甲氧嘧啶	78.9	12.91

2.5 萃取效率

为考察设定条件下 SFE 对磺胺类药物的萃取效率，通过重复对同一萃取罐内容物进行多次 SFE-SFC-MS 联用分析（如图 4），计算各化合物萃取率并记录于表 5，每次萃取化合物峰面积对多次萃取的峰面积和做比表示萃取率。

表 5. 磺胺类药物萃取效率 (%)

N0.	名称	第一次	第二次	第三次	第四次
1	磺胺嘧啶	59.61	32.38	6.93	1.09
2	磺胺吡啶	61.62	30.82	6.54	1.02
3	磺胺甲基嘧啶	59.16	32.92	6.91	1.02
4	磺胺甲噻二唑	50.18	35.40	11.39	3.04
5	磺胺二甲嘧啶	60.80	31.91	6.35	0.95
6	磺胺甲氧哒嗪	61.33	31.08	6.57	1.01
7	磺胺氯哒嗪	61.22	31.24	6.57	0.96
8	磺胺邻二甲氧嘧啶	60.63	31.85	6.63	0.89
9	磺胺间二甲氧嘧啶	63.52	29.68	5.95	0.85
10	磺胺甲恶唑	58.54	32.79	7.48	1.18
11	磺胺喹噁啉	61.21	31.72	6.19	0.89
12	磺胺间甲氧嘧啶	60.78	31.79	6.43	1.00
13	磺胺对甲氧嘧啶	59.41	33.06	6.49	1.03

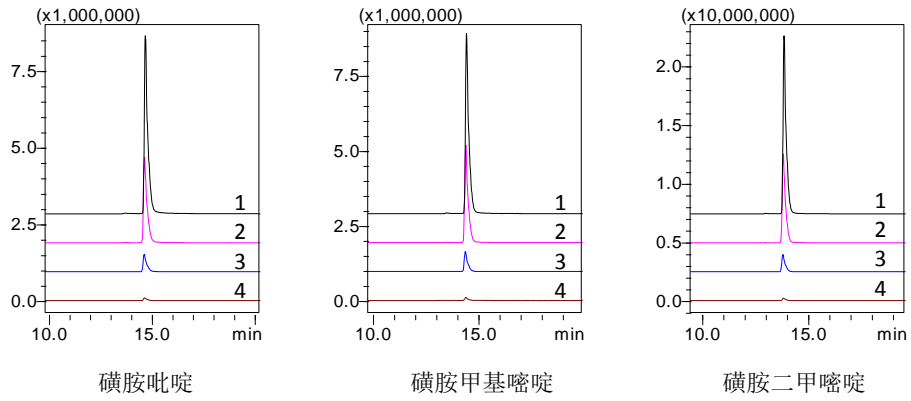


图 4. SFE 萃取效率考察
 (图示 1-4 依次为第一至第四次萃取结果)

3. 结论

本文使用岛津 Nexera UC Online SFE-SFC-MS 系统建立了鸡肉中磺胺类药物残留检测的分析方法，该方法实现样品前处理（SFE）和样品分析（SFC）在线联用，简化了鸡肉样品的前处理过程。Online SFE-SFC-MS 分析方式可以磺胺类药物残留检测的快速检测手段，该方法可为生产行业、检验行业及部门提供参考。

七、其他分析

Nexera UC Online-SFE-SFC 是岛津推出的全新机种，创新性的将超临界流体萃取（SFE）和超临界流体色谱（SFC）进行在线联用，实现了快速高效前处理和准确可靠分析的有机结合，简化了前处理过程和步骤、提高样品分析效率、节省前处理操作费用和有机溶剂消耗，为相关领域提供了全新的样品前处理+样品分析方法。另外超临界流体（SCF）的特性和 Nexera UC 系统的特点使得一些使用传统方法不易检测或无法准确获得的样品分析得以实现和成为可能。



本节收录使用 Nexera UC Online-SFE-SFC 系统对辅酶 Q10 类不稳定化合物和制药领域清洁验证两篇应用文，对具体方法和过程予以探讨，供相关领域读者了解和参考。

Nexera UC Online-SFE-SFC 分析不稳定化合物

摘要 超临界流体是粘度小、扩散系数高、溶解性强的流体，兼有气体和液体的双重性质和优点。因为二氧化碳的临界点低（31.1°C，7.38 MPa），操作条件温和，且无色、无毒、无味、不易燃、化学惰性，作为介质被广泛用于各种领域。在超临界流体萃取（Supercritical Fluid Extraction: SFE）和超临界流体色谱（Supercritical Fluid Chromatography: SFC）中通常将其作为萃取剂。一直以来我们是在离线模式下进行 SFE 和 SFC 分析。并且 SFE 和 SFC 分别作为预处理方法和分析方法，被归属于完全不同的工作流程。而在 Nexera UC 中，将 SFE 和 SFC 在线连接，对预处理到分析的工作流程进行了整合。本文向您介绍使用 NexeraUC 的在线 SFE-SFC 进行分析的示例。

关键词： 在线 SFE-SFC 不稳定化合物 辅酶 Q10

在线 SFE-SFC

图 1 为在线 SFE-SFC 分析的流程图。由图可知，该分析系统是对当超临界流体通过萃取容器进行萃取后，将得到的样品在线导入 SFC 用分析柱中，然后直接进行分离并检测的方法。如图 1 所示，在萃取至分析的一系列操作中，均通过 SFE 单元内置阀进行流路切换。萃取处理有两种方式，即将超临界流体导入萃取容器后以静置状态进行萃取的静态萃取（Static extraction）和向萃取容器中注入流体后带出萃取物的动态萃取（Dynamic extraction）。对于在线 SFE-SFC，将样品导入分析柱的操作属于动态萃取。因为在线 SFE-SFC 分析无需进行复杂的预处理，即可完成从萃取至分离检测的流程，并且实现了自动化，从而大幅度减少了操作步骤。另外，由于能够在避光、无氧、无水的环境下进行分析，所以对于易光解、易氧化以及易水解等不稳定化合物的分析非常有效。如果使用离线 SFE，无需使用溶液制备样品，因此目标成分不会发生稀释，从而可以实现高灵敏度分析。

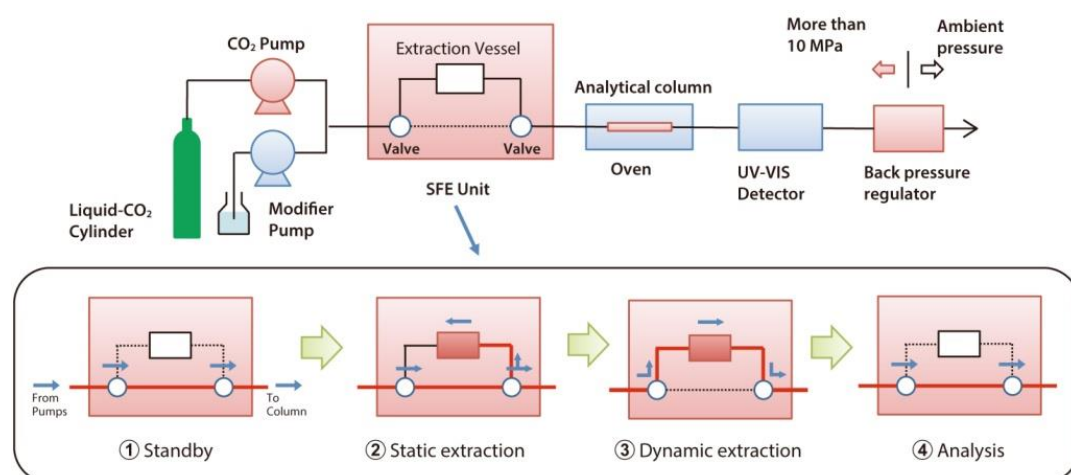


图 1 在线 SFE-SFC 系统流程图

对还原型辅酶 Q10 进行在线-SFE-SFC 分析

图 2 为还原型辅酶 Q10 (泛醇) 的结构式。由此可知, 其易被氧化而变为氧化型辅酶 Q10 (泛醌)。本例中, 分别通过溶剂萃取 SFC 分析和在线 SFE-SFC 分析对营养补充剂中所含的还原型辅酶 Q10 进行了分析。图 3 为溶剂萃取-SFC 分析的预处理操作流程;

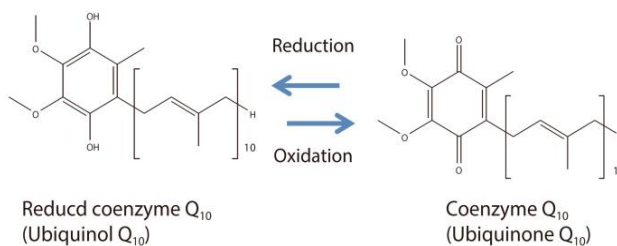


图 2 辅酶 Q10 结构及转化关系

表 1 为分析条件; 图 4 为分析营养补充剂和氧化型辅酶 Q10 标准样品得到的色谱图。

表 1 溶剂萃取-SFC 分析条件

系 统	: Nexera UC SFC-UV 系统
色 谱 柱	: Shim-pack UC-RP (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 3 μm)
柱 温	: 40 °C
改 性 剂	: 甲醇
流 速	: 3 mL/min
时 间 程 序	: 5 % (0 min)→50 % (5-8 min)
背压调节器压力	: 10 MPa
检 测 器	: UV-VIS (220 nm)
进 样 体 积	: 1 μL

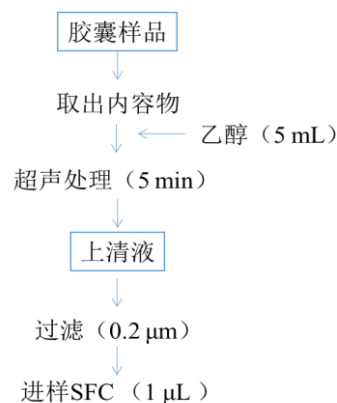


图 3 溶剂萃取操作过程

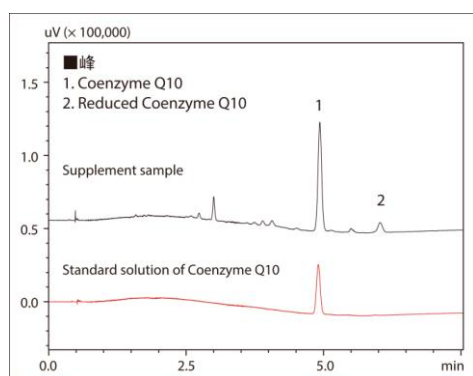


图 4 通过溶剂萃取-SFC 分析得到的色谱图

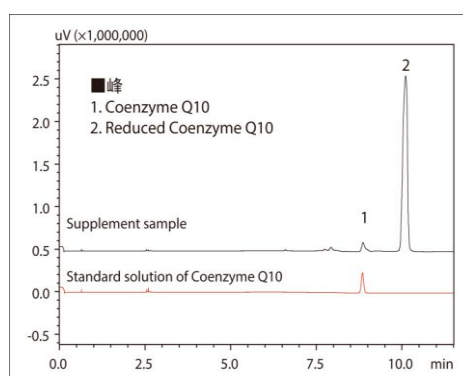


图 5 通过在线 SFE-SFC 分析得到的色谱图

分别将营养补充剂的胶囊内容物和氧化型辅酶 Q10 标准样品溶液 5 μL 滴在滤纸上, 再用打孔器对滤纸打孔, 将打下的滤纸装入萃取容器后进行在线 SFE-SFC 分析。表 2 为在线 SFE-SFC 的分析条件, 图 5 为分析营养补充剂和氧化型辅酶 Q10 标准样品得到的色谱图。

表 2 在线 SFE-SFC 分析条件

系统	Nexera UC 在线 SFE-SFC-UV 系统
SFE	
萃 取 容 器	: 0.2 mL
改 性 剂	: 甲醇 (添加比例 5%)
萃 取 流 速	: 3 mL/min

背压调节器压力	:	10 MPa
萃取程序	:	静态萃取 (0-2 min) → 动态萃取 (2-4 min)
SFC		
色谱柱	:	Shim-pack UC-RP (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 3 μm)
柱温	:	40°C
流动相	:	A-超临界 CO ₂ 流体; B-甲醇
流速	:	3 mL/min
时间程序	:	5% (4 min) → 50% (9-13 min)
背压调节器压力	:	10 MPa
检测器	:	UV-VIS (220 nm)

综上所述，在溶剂萃取-SFC 分析中，还原型辅酶 Q10 在萃取时被氧化而变为氧化型辅酶 Q10，而使用在线 SFE-SFC 分析中待测成分并不发生变化，可以直接进行萃取、分离和检测。由此可知，使用在线 SFE-SFC 能够对不稳定的化合物以原始状态有效地进行分析。

本篇据 (株) 岛津制作所全球应用开发中心 (GADC) 应用新闻 L-496 中译版改写

Nexera UC Online-SFE-SFC-PDA 在清洁验证中的应用

摘要 为确保医药产品的质量和安全，对仪器进行清洁验证是非常重要的工序。一般使用拭子（布制擦拭材料）擦拭仪器的相关部位，再使用总有机碳分析仪（TOC）或高效液相色谱（HPLC）对擦拭部分进行分析。近年来由于实现了单体化合物分析，所以通过 HPLC 进行评估的方法被广泛采用。在分析前，需要对擦拭部分进行萃取。预处理方法采用超临界萃取（SFE），可以简便迅速地萃取目标成分。而且，在 SFE 后通过在线使用超临界色谱法（SFC）进行分析，只需在 SFE 中设置样品便可获得分析结果，从而一次性完成从预处理到分析的工作流程。本文向您介绍以烷基苯磺酸钠为分析目标，在方法开发第一步使用 Nexera-UC 手性筛选系统进行色谱柱选择流程。

关键词： 在线 SFE-SFC-PDA 清洁验证 烷基苯磺酸

选择分析色谱柱

在超临界色谱法（SFC）分析中，选择样品最适合的色谱柱是影响分析结果可靠性的重要因素。在此，我们在表 1 以及图 1 所示的条件下，使用 4 种色谱柱进行了烷基苯磺酸钠的 SFC 分离，将峰形最好的 Shim-pack UCX-SIL 作为分析用色谱柱。另外，从梯度分析模式的角度考虑，可知根据烷基苯磺酸钠侧链长度相异的性质，如果设置的梯度不足，峰会显著扩展，因此为了确保定量结果，需设置斜率大的梯度程序。根据上述信息，对使用 Shim-pack UCX-SIL 的条件进行优化，对拭子进行了在线-SFE-SFC 分析。

表 1 用于选择色谱柱的 SFC 分析条件

色谱柱	Shim-pack UCX 系列色谱柱 (250 mm L. ×4.6 mm I.D., 5 μm) (i) UCX-RP (极性基团键合的 ODS 色谱柱), (ii) UCX-GIS (ODS), (iii) UCX-SIL, (iv) UCX-DIOL
流动相	A:超临界 CO ₂ 流体; B:甲醇
时间程序	图示
流速	3.0 mL/min
柱温	40℃
背压	15 MPa
检测器	UV-VIS (220 nm)
进样体积	图示

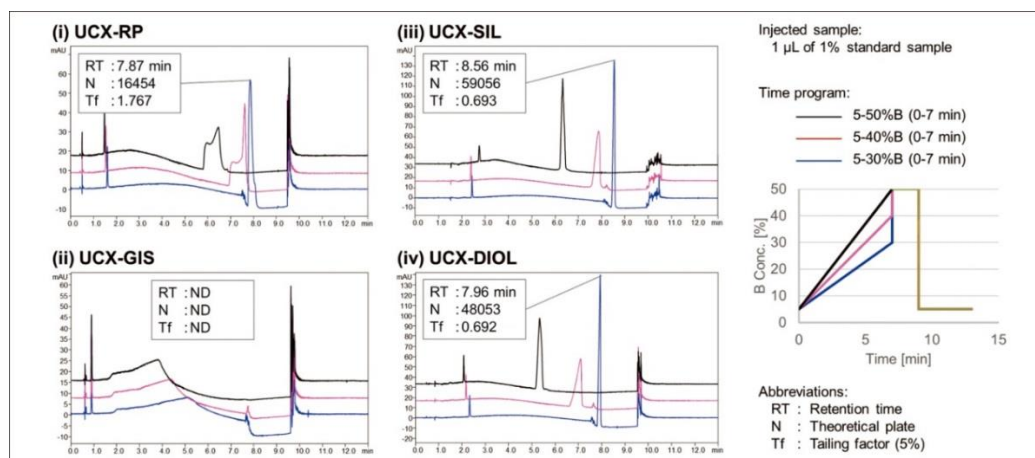


图 1 烷基苯磺酸钠标准样品在 4 种色谱柱上的 SFC 分离结果比较

对含烷基苯磺酸钠的拭子进行在线-SFE-SFC 分析

使用方法开发系统选择的 Shim-pack UCX-SIL 作为分析色谱柱, 对在线 SFE-SFC 分析中的各种条件进行优化, 按照表 2 中所示的条件进行分析。

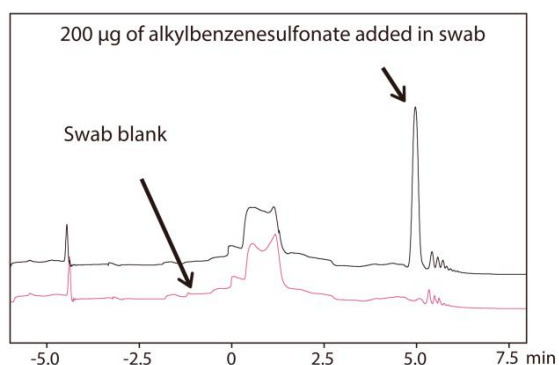


图 2 烷基苯磺酸钠的在线 SFE-SFC 分析

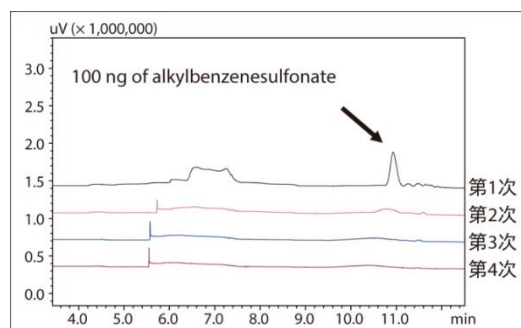


图 3 在线 SFE 提取效率

表 2 在线 SFE-SFC 用分析条件

[制备样品]	
使用拭子蘸取溶有 10~500 µg 标准样品的甲醇溶液, 将拭子放入萃取容器后放置到 SFE 单元。	
[静态萃取]	
萃取时间	: 3 min
流动相	: A:超临界 CO ₂ 流体; B: 0.1%(w/v) 甲酸铵/甲醇
B Conc.	: 10%
流速	: 3.0 mL/min
背压	: 15 MPa
[动态萃取]	
萃取时间	: 3 min
流动相	: A:超临界 CO ₂ 流体; B:甲醇
B Conc.	: 10%
流速	: 3.0 mL/min
背压	: 15 MPa
[SFC]	
色谱柱	: Shim-pack UCX-SIL (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 µm)
流动相	: A:超临界 CO ₂ 流体; B:甲醇
时间程序	: 10 %B (0-2 min), 10-60 %B (2-7 min), 60 %B (7-9 min), 10 %B (9-13 min)
流速	: 3.0 mL/min
柱温	: 40°C
背压	: 15 MPa
检测器	: UV-VIS (220 nm)

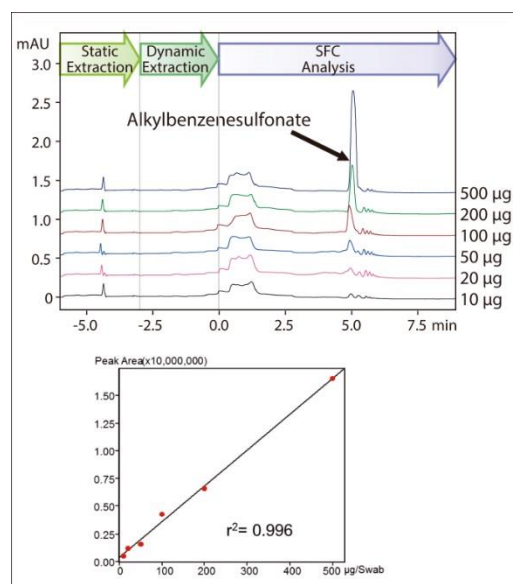


图 4 在线 SFE-SFC 分析线性结果

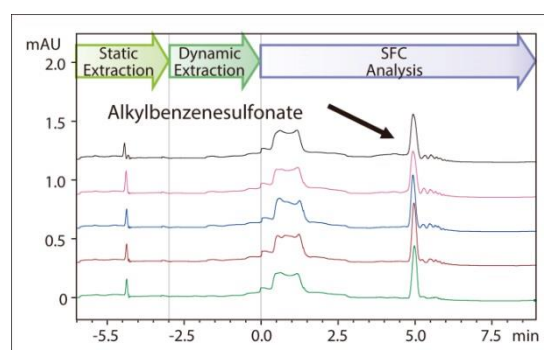


图 5 在线 SFE-SFC 重复性分析结果

由图 2 可知，表面活性剂烷基苯磺酸钠的色谱峰分离良好。图 3 为添加了 100 ng 烷基苯磺酸钠的同一拭子的多次 Online-SFE-SFC 分析结果。由图可知，在第二次萃取后未能检测到烷基苯磺酸钠的峰，因此可以判断，只要进行一次 SFE 几乎就可以完全萃取。向拭子添加 10~500 μg 的烷基苯磺酸钠，线性由图 4 所示。该范围内的相关系数为 0.996。图 5 为连续测定添加了 100 μg 烷基苯磺酸钠的拭子得到的结果。由图可知包含整个萃取过程，保留时间的重复性为 0.19 % RSD，面积重复性为 5.76 % RSD。由此可知，Nexera-UC 在线 SFE-SFC 系统非常适合该类样品分析。

本篇据（株）岛津制作所全球应用开发中心（GADC）应用新闻 L-499A 中译版改写



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

⊕ 岛津企业管理 (中国) 有限公司 / 岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F
 邮政编码: 100020
 电话: (010) 8525-2310/2312
 传真: (010) 8525-2326/2329

上海

上海市淮海西路 570 号红坊 E 楼
 邮政编码: 200052
 电话: (021) 2201-3888
 传真: (021) 2201-3555

沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
 邮政编码: 110001
 电话: (024) 2383-6735
 传真: (024) 2383-6378

四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层
 邮政编码: 610015
 电话: (028) 8619-8421/8422
 传真: (028) 8619-8420

武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦1座41层4116室
 邮政编码: 430022
 电话: (027) 8555-7910
 传真: (027) 8555-7920

广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼
 邮政编码: 510010
 电话: (020) 8710-8603
 传真: (020) 8710-8698

西安

西安市南二环西段88号老三届世纪星大厦24层G座
 邮政编码: 710065
 电话: (029) 8838-6016
 传真: (029) 8838-6497

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座
 邮政编码: 830000
 电话: (0991) 230-6271/6272
 传真: (0991) 230-6273

昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室
 邮政编码: 650021
 电话: (0871) 315-2987
 传真: (0871) 315-2991

南京

南京市中山南路 49 号商茂世纪广场 23 层 A1 座
 邮政编码: 210005
 电话: (025) 8689-0278
 传真: (025) 8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室
 邮政编码: 400010
 电话: (023) 6380-6057/6058
 传真: (023) 6380-6551

深圳

深圳市福田区福华一路98号卓越大厦15楼1号
 邮政编码: 518040
 电话: (0755) 8340-2852
 传真: (0755) 8389-3100

河南

郑州市郑东新区金水东路21号永和国际广场A区14层1405、1406室
 邮政编码: 450046
 电话: (0371) 8663-2981/2983
 传真: (0371) 8663-2982

香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City.
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong
 电话: (00852) 2375-4979
 传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知