

导数色谱法在色谱峰纯度鉴定和定量分析方面的应用

吉 宁 高国强 陈玉英 胡育筑 戴向东 于 娟

(分析化学教研室)

关键词 一阶导数; 色谱峰纯度

随着色谱技术的普及和发展, 气相色谱技术和高效液相色谱技术在药学研究中越来越受到重视。色谱峰纯度鉴定方法、色谱定量方法每年均有较多报道^[1-5]。我们探讨用导数法处理色谱流出曲线, 不仅可以较有效地鉴定色谱峰纯度, 还能在分离度不大时(即相邻两峰尚有部分重叠)较为准确地用峰高法定量。我们还发现气相色谱法使用程序升温技术时, 常会有基线漂移发生, 这时如果应用导数装置处理色谱流出曲线就可改变这一现象。关于用导数法处理色谱流出曲线的理论部分, 已有另文^[6]发表。由我们自制的导数装置, 可进行一阶导数及二阶导数处理, 该装置主要有以下四部分: 反相输入电路和反相输出电路; 一阶微分电路和二阶微分电路, 其简化流程如下:

色谱仪输出的电信号 → 反相输入电路 → 低通滤波电路 → 一阶微分电路 → 反相输出电路 → 色谱记录仪。

1 实验部分

气相色谱仪: 上海分析仪器厂 1001 型; 检测器: 氢火焰离子化检测器; 色谱柱: 不锈钢填充柱, 柱长 2 m, 内径 2 mm; 固定液: PEG-20 M(5%); 担体: 上试 102 担体, 60—80 目; 高效液相色谱仪及紫外检测器(254 nm): 上海科学仪器厂; 记录仪(双笔): 上海大华仪表厂; 色谱柱: 不锈钢柱, 柱长 10 cm,

内径 4.6 mm; 填料: YWG-C₁₈, 10 μm, 天津试剂一厂; 所用试剂除了苯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二甲酯、苯甲酸乙酯为色谱纯外, 其余均为分析纯。

1.1 导数色谱峰高定量法

在气相色谱仪检测器(FID)温度为 200℃, 进样器温度为 190℃, 柱温为 30℃色谱条件下, 吸取 1 μl 甲醇-乙醇-丙醇水溶液进样, 得图 1。

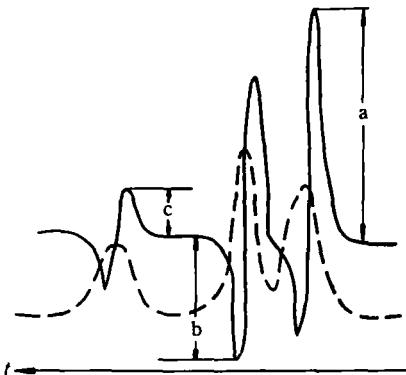


Fig 1. General and first derivative chromatograph of the mixture of α -propanol, ethanol and methanol --- general chromatograph; —— first derivative chromatograph

从图 1 看出, 甲醇以 a 作为定量依据, 乙醇以 b 作为定量依据, 内标正丙醇则以 c 为依据。图 1 中甲醇、乙醇分离尚好, 在此情况下, 对该峰作垂直分割后测量峰高, 误差不应该太大。为了考察不同分离度时普通峰高测量法与一阶导数峰高测量法的差别, 从柱温

30℃一直到柱温 120℃连续做实验而其它条件保持不变,每隔 10℃测定一次结果。当柱温逐渐升高时,甲醇、乙醇分离度越来越差,

当柱温升至 110℃时,肉眼已无法辨别甲醇、乙醇峰是叠加在一起的。测定结果如表 1。

Tab 1. Results of quantitative analysis by general and first derivative chromatography^a

Col. Temp., °C	General chromatography			First derivative chromatography		
	Methanol, %	RE, %	Ethanol, %	RE, %	Methanol, %	RE, %
30	4.08	2.00	4.02	0.50	3.99	0.25
40	3.90	2.50	3.95	1.25	3.97	0.75
50	3.90	2.50	3.93	1.75	3.98	0.50
60	3.81	4.75	3.90	2.50	3.98	0.50
70	3.81	4.75	3.88	3.00	3.96	1.00
80	3.75	6.25	3.88	3.00	3.95	0.75
90	3.72	7.00	3.85	3.75	3.95	1.25
100	3.68	8.00	3.83	4.25	3.95	1.25
110					3.92	2.00
120					3.90	2.50

^a The internal standard is n-propanol

从表 1 的结果不难看出,导数色谱法结果误差较小,并且不象普通色谱法其测定误差与分离度呈密切关系,分离度较差时则测定结果也差。

我们还在高效液相色谱仪上进行了类似的实验。通过改变甲醇和水的比例,得到不同分离度的萘和联苯的色谱峰,从而分别比较用普通色谱峰和导数色谱峰定量结果的准确性,获得了同样的结果。

1.2 色谱峰纯度的鉴定

1.2.1 气相色谱法 在气化室温度为 200℃,进样器温度为 180℃和色谱室温度为 120℃时,吸取甲醇、乙醇和丙醇混合液 0.5 μl 进样分析,得图 2。

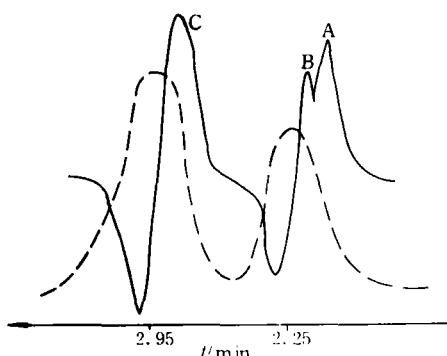


Fig. 2. General and first derivative chromatograph of the mixture of n-propanol, ethanol and methanol --- general chromatograph; —— first derivative chromatograph; A: methanol; B: ethanol; C: n-propanol

图 2 中的普通色谱图上乙醇和甲醇色谱峰重叠,很难看出色谱峰中包含了两个组分,而从相应的一阶导数色谱图中却容易看出有两种组分。为了证实这一点,甲醇和乙醇分别进样,结果证实,当甲醇和乙醇单独进样时,一阶导数色谱图上不再有峰分裂现象。

在色谱室温度为 100℃,进样器和检测器温度不变的条件下,吸取氯仿样品 0.3 μl 进样,得图 3。

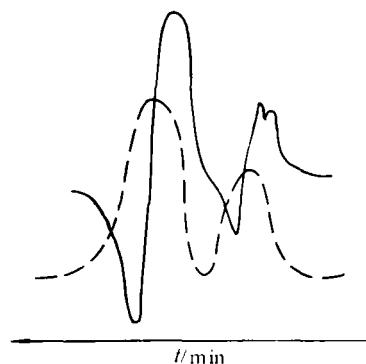


Fig. 3. General and first derivative chromatograph of chloroform (Col. Temp. 100℃) --- general chromatograph; —— first derivative chromatograph

从图 3 的普通色谱图仅能发现在氯仿样品中存在一种杂质,但在导数色谱图中则可看出该氯仿样品中至少还存在有另一杂质。为了证实这一点,将色谱室温度降低为 90℃,其它条件均不改变,再次进样分析,得图 4。

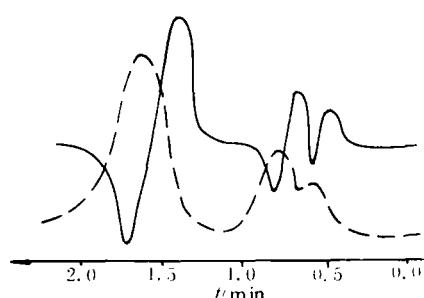


Fig 4. General and first derivative chromatograph of chloroform
---general chromatograph; ——first derivative chromatograph.

图4可以明显地在普通色谱图上看出氯仿样品中第3种杂质的存在,从而证实了由图2得到的推断。

1.2.2 高效液相色谱法 当流动相为100%甲醇时,用萘、联苯混合溶液10.0μl注入液相色谱仪,得到色谱图^[5]。从色谱图上难以看出该峰是由两种组分构成。而从一阶导数色谱图上却容易看出该色谱峰不纯。

将萘和联苯的溶液单独进样考察,发现此时一阶导数色谱图上峰分裂的情况不再出现,因此,可以断定在此条件下色谱图中的一阶导数色谱图确实反映了色谱峰的纯度。

我们又用了苯甲酸乙酯、邻苯二甲酸二丁酯及其混合物进样,得色谱图^[5]。从普通色谱图上看,苯甲酸乙酯和邻苯二甲酸二丁酯完全重叠,但在其一阶导数色谱图上,可以明显地看出苯甲酸乙酯和邻苯二甲酸二丁酯的存在。

1.2.3 校正色谱仪的基线漂移 气相色谱法中的程序升温技术,液相色谱法中的梯度淋洗技术均为解决复杂组分分离分析问题的重要手段,但在使用这些技术时通常伴随着一定程度的基线漂移,而一阶导数色谱法可以克服这种漂移。

吸取戊醇、正己醇、正庚醇、正辛醇、正壬醇、正癸醇的氯仿混合液0.5 μl,注入气相色谱仪,气化器和检测器温度分别为250℃和260℃,色谱室温度条件为:初始温度为

90℃,进样后保持1 min后程序升温,升温速率为20℃/min,升温至180℃,保持15.0 min,同时记录普通色谱图及一阶导数色谱图,如图5。

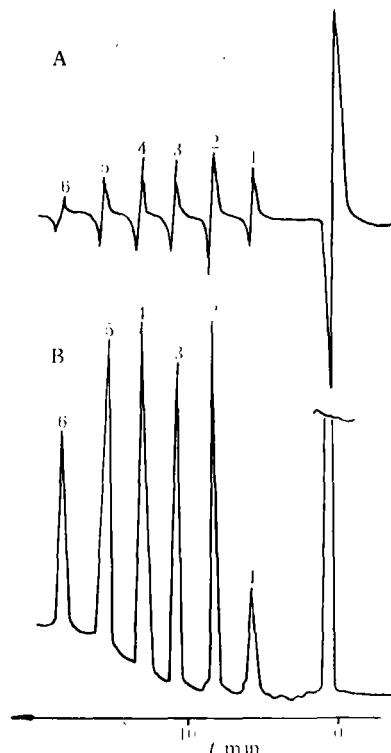


Fig 5. General and first derivative chromatograph of several kinds of *n*-alcohol ($C_5 \sim C_{10}$) in chloroform
1. *n*-Pentanol; 2. *n*-Hexanol; 3. *n*-Heptanol; 4. *n*-Octanol;
5. *n*-Nonyl alcohol; 6. *n*-Decanol; A. first derivative chromatograph; B. general Chromatograph

2 讨 论

导数法采用的导数装置为作者自制,可直接连接在色谱仪检测器上,在获得普通色谱图的同时,得到其导数色谱图。本文所采用的装置价格低廉、使用方便,不失为一个有效而易行的方法。

参 考 文 献

- Fasanmade AA and Fell AF. Three-dimensional derivative spectrochromatograms in high-performance liquid chromatography and their implications for peak homogeneity validation. *Anal Chem Acta*, 1986; 187: 233

- 2 Marr JGO, Horvath P, Clark BJ, et al. Assessment of peak homogeneity in HPLC by computer-aided photodiode array detection. *Anal Proc*, 1986; 23: 254
- 3 Grant A and Bhattacharyya PK. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J Chromatogr*, 1985; 347: 219
- 4 Gemperline PJ, Hamilton JG. Conditions for detecting overlapped peaks with principal component analysis in hyphenated chromatographic methods. *Anal Chem*, 1989; 61: 2240
- 5 吉 宁, 高国强, 陈玉英. 导数色谱法鉴定高效液相色谱峰纯度. 中国药科大学学报, 1991; 22(5): 295

Application of Derivative Chromatography Method in Identification of Chromatographic Peak Purity and Quantitive Analysis

Ji Ning, Gao Guoqiang, Chen Yuying, Hu Yuzhu, Dai Xiangdong, Yu Juan
Department of Analytical Chemistry

The paper reported applications of first derivative chromatography in identification of GC and HPLC peak purity and quantitive analysis. It is found that severely overlapped peaks, which can hardly be validated by general method, can be identified by first derivative chromatography. This method also was successfully used in quantitive analysis, when the resolution of two adjacent chromatographic peaks is lower than 1.5. This method is simple, reliable and easy to operate.

Key words First derivative method; Peak purity

【文摘 016】中药乌蔹莓的显微鉴定研究. 曹沛琴, 宋学华. 基层中药杂志, 1992, 6(2): 4

对乌蔹莓的组织构造等进行了进一步研究, 发现其根茎、叶中的维管束数目及草酸钙簇晶等, 从基部到顶部都有一个逐渐变化的规律, 与文献报道不尽相同, 为正确鉴定乌蔹莓提供了依据。

【文摘 017】促渗剂对事后避孕药膜中左炔诺孕酮透过离体小鼠皮肤的作用. 平其能, 孙国庆, 陈雷等. 中国医药工业杂志, 1993; 24(2): 58

用 HPLC 研究了促渗剂在不同条件下对左炔诺孕酮(1)透过离体小鼠皮肤的作用。如离体皮肤以促渗剂预处理 4h, 显示丙二醇、PVP-油酸对药物自饱和乙醇溶液透皮渗透有明显的促渗效果; 油酸、月桂氮卓酮和邻苯二甲酸二乙酯呈负效应。药物饱和水溶液中的丙二醇等水溶性促渗剂对(1)经未预处理的皮肤的渗透, 则几无促渗作用。骨架型 EVA 左炔诺孕酮膜中加入油酸, 也具有促渗作用, 其它促渗剂的效果与预处理实验结果相似。