

## 高效气相色谱仪测定人血浆中硝酸异山梨酯浓度的方法

高效气相色谱仪测定人血浆中硝酸异山梨酯浓度的色谱条件:

- 1、仪器：高效气相色谱仪
- 2、检测器：ECD
- 3、色谱柱：石英毛细管柱 OV-101（25m×0.25mm I.D.，膜厚 0.22um Shimadzu）
- 4、载气：高纯氮气
- 5、载气流速：1.25mL/min
- 6、分流比：1：80
- 7、尾吹气流速：20mL/min
- 8、进样口温度：200℃
- 9、检测器温度：250℃
- 10、程序升温：起始柱温 150℃，保持 9min，以 40℃/min 的速率升至 200℃，保持 7min。

### 一、血浆样品的提取：

精密量取样品血浆 1mL，加入内标溶液 40uL，涡旋处理 10s，加乙酸乙酯 5mL，涡旋处提取 3min，离心（3500rpm）10min，取有机相 4.5mL，于 50℃水浴上用氮气流吹干，残渣加乙酸乙酯 50uL 溶解后，精取 2uL 进样。

### 二、检测器的选择：

- 1、硝酸异山梨酯气雾剂给药后血药浓度很低，最高血药浓度在 10ng/mL 以下，最低定量限至少应达到 0.1ng/mL，FID 检测器无法满足测定要求。
- 2、硝酸异山梨酯的结构中含有两个硝酸酯基，硝酸酯基具有强的亲电性，捕获电子的能力很强，因此在 ECD 上具有很高的响应。
- 3、ECD 为痕量分析检测器，对亲电性物质的检测响应很高，可以达到纳克级水平，故人血浆中硝酸异山梨酯的浓度测定采用 ECD。
- 4、载气和尾吹气的流速：ECD 应使用高纯度的氮气，并需经脱氧脱气、分子筛脱水。载气流速主要从组分分离要求确定，尾吹气根据目标峰的峰形、峰面积或峰高和基线来确定。可通过实验确定。

### 三、色谱柱类型的选择：

- 1、硝酸异山梨酯气雾剂给药后血药浓度很低，最高血药浓度在 10ng/mL 以下，要求方法有很高的灵敏度。
- 2、血浆样品较为复杂，干扰物多，要求有很高的分离效果。
- 3、毛细管柱柱效远远高于填充柱，出峰尖锐，灵敏度高，因此痕量分析中优于填充柱。毛细管柱分离效果远远高于填充柱。故人血浆中硝酸异山梨酯的浓度测定选用毛细管柱。

4、固定相的选择：检测器为 ECD，尽量不要选择含多卤原子的固定相，如甲基三氟丙基聚氧烷（QF-1、OV-210）和聚三氟氯乙烯蜡等。本实验选择了实验室常用的 OV-101 石英毛细管柱。

5、毛细管柱的柱管选择：兼顾柱效和样品容量，选择常规毛细管柱为柱长 25m、内径 0.25mm 和膜厚 0.22um 的石英毛细管柱。

#### 四、内标的选择：

1、体内药物分析中生物样品的处理很复杂，每一步都有可能样品的损失，为校正误差，需在样品处理前加入内标物，一般选择内标法。

2、内标物的选择：本实验选择 3, 5-二硝基氯苯。

(1) 内标物与目标成分的脂溶性、挥发性、在 OV-101 固定液上色谱保留相似。

(2) 3, 5-二硝基氯苯含有二个硝基，与硝酸异山梨酯一样在 ECD 上有很高的响应。

#### 五、柱温的选择：

程序升温：起始柱温 150℃，保持 9min，以 40℃/min 的速率升至 200℃，保持 7min。

1、选择程序升温：硝酸异山梨酯与内标物 3, 5-二硝基氯苯在起始柱温 150℃，保持 9min 内已出峰，恒温条件可达完全分离，实验显示，样品在目标峰与内标物峰之后仍有血浆中其它物质峰，因此后续升温只是为了洗脱出血浆中其它物质，以便下一次进样分析。

2、程序升温方式的选择：恒温-线性升温-恒温。

理由：起始柱温 150℃，保持 9min，使硝酸异山梨酯与 3, 5-二硝基氯苯在该温度下获得完全分离，然后以仪器允许设置的最大升温速率（40℃/min）将柱温升至 200℃并保持 7min 以洗脱本次进样带入的色谱保留较大其它物质，为下一次进样分析做准备。

#### 六、进样口温度（气化室温度）与检测器温度的选择：

进样口温度 200℃，检测器温度 250℃。

1、进样口温度：200℃以上时硝酸异山梨酯破坏较多，200℃以下时硝酸异山梨酯气化不完全，故进样口温度设置为 200℃。

2、检测器温度：一般检测器温度与进样口温度相同，但实验显示，250℃时 ECD 对硝酸异山梨酯的响应最大，本实验 ECD 温度设置为 250℃。

3、最高柱温：为保护检测器，以防柱中流出物在检测器上凝结，污染检测器，检测器温度至少比柱温高 30℃，即本实验柱温最高可设置到 220℃，并减少维持时间。

来源：<http://www.fudizao.com>