

脉冲式安培检测器与色谱联用技术在碳水化合物分析中的应用

George LIMPERT

摘要 对脉冲式安培检测器与色谱联用技术的分离能力进行了简短的总结。那些过去置身于电流测定法研究中的学者们将会赞赏这些新方法。关于新方法的报道与日俱增,同时也正在开发有助于分离测定珍贵样品和标准品的微型系统。而这种方法应用之广应该引起所有分析化学家的注意。

大多数化学家能够模糊地记起他们仪器分析课程中涵盖电化学分析的知识,这部分内容涉及电位法、库仑法、安培法和极谱法。在课程结束时,由于极谱法中所用的汞有毒,通常会由一个毕业生操作极谱仪。完成这门课后,尽管多数化学家可能会用到pH计或者库伦法卡尔-费休水分测定仪,但是从来没有机会真的对这些领域做再次的探索。然而,这些方法本身具有很高的准确度和选择性。本文针对安培检测器与色谱联用而展开,更具体地说是介绍该方法在糖和氨基糖苷类化合物分析中的应用。

安培检测器由来已久,但从未流行使用起来。主要原因在于缺乏其功能方面的知识了解以及早期检测器存在一些设计方面的问题(目前已有改进)。好消息是,这个领域也日渐成熟,同时新进的仪器坚固耐用,操作也方便。

历史上,安培法以好的准确性、精确性和选择性而著名。好的选择性基于以下事实,即只有特定的化合物在如pH和特定的电压条件下,能够响应而发生氧化还原反应。其他化合物在这些条件下无法响应或响应很弱而无法检测。例如,当施加合适的波形后,碳水化合物能够响应,而多数其他类化合物却不能。当安培计与色谱技术联用时,碳水化合物先在色谱上分离,然后被安培计检测,这样使得选择性得到了很大提高。

过去的问题在于工作电极的表面要重复清理。这是因为当化合物发生氧化或还原反应后,工作电极的表面被污染。通常清理过程是用橡皮擦去电极表面的一层膜。这样处理得到的电极表面是不均一的,进而导致测定结果的变化。另外,由于长时间使用导致电极表面变脏后,对化合物的响应区域减

少,测定结果变小。

现在,用于检测碳水化合物的电极是金工作电极,其表面可以通过电势波形而清理,一个波形是指一系列电势台阶,用于电极带电、物质检测、电极清理以及电极表面的恢复^[1]。整个过程需要的时间在毫秒数量级上,贯穿于检测过程中。这样一个重复的清理和检测被称为脉冲,整个过程叫做脉冲式安培检测(PAD)。这种脉冲波形能够确保电极表面的清洁及结果的重复性。因为清理过程会去掉电极表层的原子,这种一次性电极必须两周换一次。总之,相比于几年前,目前安培技术得到了很大的提高。

任何氧化还原反应的产物都可以通过选择合适的电极和色谱柱来分析,表1中简明列出了可被PAD法检测的化合物。

表1 工作电极适用的被分析物

工作电极	被分析物
金	糖, 氨基糖苷类化合物
金	氨基酸类
碳	儿茶酚胺
银	氰化物, 溴化物, 碘化物
银	硫化物, 硫氰酸盐
铂	醇类, 甘油
铂	EDTA, EGTA
碳	酚类
碳	抗氧化剂

这些例子来自于Dionex (Suunnyvale, CA)公司的一次性电极产品手册^[2],但实际上能够应用的要更多。如还有一种硼掺杂的一次性钻石电极。关于这方面的应用有很多例子,发表的文章数量也迅速增长。

作者所在实验室近来更多地关注简单的碳水化合物,如糖通常不能很好地在紫外或者折光检测器上

作者简介

Mr. Limpert is Advisory Scientist, Celsis Analytical Services, 6200 S. Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63123, U.S.A.; tel.: 314-487-6776; fax: 314-487-8991; e-mail: GLimpert@Celsis.com.

该文已获得American Laboratory/Labcompare再版许可。

检测。碳水化合物通常在低波长紫外区有吸收,且会有干扰物导致紫外检测的灵敏度和选择性下降。折光检测器的灵敏度要低一些,需要的样品量也更大一些,同时需要大量很贵的标准品。而脉冲式安培检测器可以在皮摩尔数量级上进行定量。

醇类和胺类能够在电极上被氧化,碳水化合物来自碳和氢元素。而大多数碳水化合物都具有能够被氧化的醇类官能团。脉冲式安培检测器可以选择性地同时很灵敏地检测这些反应,是碳水化合物分析的理想方法。然而,电极将会对所有的碳水化合物都响应,这个问题在与色谱联用后得到了解决,可以对碳水化合物进行快速、灵敏和选择性地测定。

碳水化合物和大多数醇在高pH时可发生离子化。一旦碳水化合物上的醇类官能团得到解离,它们便可以通过离子色谱进行分离。但是高的pH值会损坏硅胶基质的色谱柱;因此,色谱柱是以聚合物为基质。CarboPac系列色谱柱(Dionex)就是基于这种分离思想设计的。表2中给出了碳水化合物的解离pH。

表2 常见的碳水化合物的解离常数(pKa)

糖	pKa
果糖	12.03
甘露糖	12.08
木糖	12.15
葡萄糖	12.28
半乳糖	12.39
己六醇	13.43
山梨醇	13.60
α -甲基葡萄糖苷	13.71

值得注意的是表2中糖和糖醇的解离常数(pKa)差别很大。分离策略中使用解离常数以进一步提高灵敏度。同样,中性和阳离子化合物在此离子色谱柱上不保留,它们最早被洗脱。

将安培测定法应用于糖的分析可以简单而有效地显示PAD强大的检测能力。图1中给出了一个例子,用CarboPac PA1色谱柱分离葡萄糖、果糖和蔗糖。色谱条件是用氢氧化钾溶液作为洗脱液进行等度洗脱。样品的质量浓度从12 $\mu\text{g/mL}$ 到28 $\mu\text{g/mL}$ 。质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 的样品被5次进样来测试系统的适用性。图1给出了质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 样品的色谱图。表3给出了分析结果。

PAD分析法最吸引人的一些特征包括简单的样品预处理,洗脱液易得,以及整个过程不包括色谱条件优化需要的时间不到4 h。

这样一个简单的分析流程可以被广泛应用。许多生物活性化合物都含有一种糖分子,这些糖分子被称为苷。在许多不同类的小分子化合物中都发现有苷,如甜味剂、生物碱、黄酮类、激素和抗生素。分子中的糖对一个药物的活性至关重要。糖能够修饰药物的亲水性,同时可以影响药物在细胞中的膜运输活动,关于这个领域正在进行大量的研究^[3]。

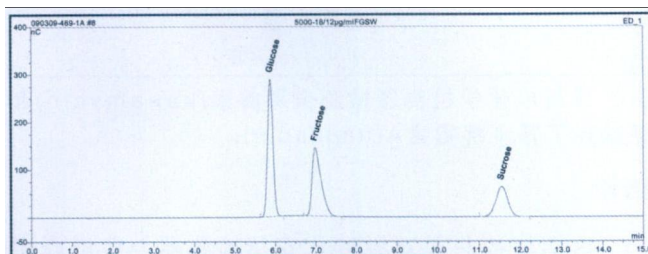


图1 用CarboPac PA1色谱柱分离葡萄糖(glucose)、果糖(fructose)和蔗糖(sucrose);3种糖的质量浓度均为20 $\mu\text{g/mL}$ 。

表3 应用简单糖来测试系统适用性的结果

质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	葡萄糖面积响应值 (nC·min)	果糖面积响应值 (nC·min)	蔗糖面积响应值 (nC·min)
12	45.1585	37.2939	21.0883
16	59.8682	49.9070	28.2239
20	74.6071	62.3916	34.8867
24	88.4638	74.3098	41.2413
28	102.3665	86.3053	47.5139
Correlation, <i>r</i>	0.9999	0.9999	0.9996
RSD (%)			
20 $\mu\text{g/mL}$ std.	0.20	0.21	0.46

如果一个糖苷分子在高pH值的氢氧化物流动相中是稳定的,那么就可以用以上所述的分离方法对其进行定量。若是在碱性条件下不稳定的分子,也可以用安培法定量,但是最初的色谱分离条件就会不一样。然而,令人惊讶的是很多分子在15 min或更短的分析时间内暴露在碱性流动相中仍是稳定的。

美国专利中包含了数种霉菌素类药物,其中许多是氨基糖苷类化合物,可以通过上述的方法进行分析。在美国专利中对它们的分析方法是一样的。本文中对该方法做了一些改进,采用了适合于金工作电极的波形。图2中给出了色谱实验的结果,为了确定该方法的精确度而进行了5次重复实验,两种被分析物卡那霉素(kanamycin)和氨基糖苷卡那霉素A(amikacin)的相对标准偏差分别为1.1%和0.9%。

另外,该方法还有其他一些优点。许多生物活性

化合物中含有不止一个糖分子,通常可以用同样的方法分离和测定其降解产物。Dionex公司在其发表的文章中以链霉素(streptomycin)为例对这点进行了说明^[4]。

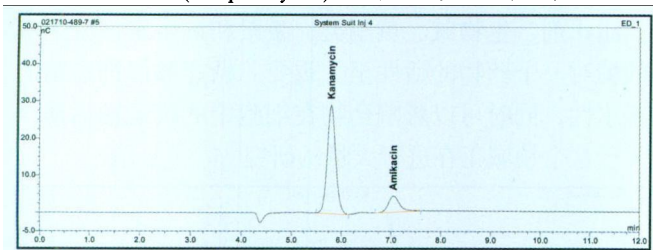


图2 应用电化学检测器检测卡那霉素(kanamycin)和氨基羟丁基卡那霉素A(amikacin)。

结论

这篇概述只是对脉冲式安培检测器与色谱联用技术的分离能力进行了简短的总结。那些过去置身于安培测定法研究中的学者将会赞赏这些新方法。

关于新方法的文章与日俱增,同时也正在开发有助于分离测定珍贵样品和标准品的微型系统。而这种方法的应用之广应该引起所有分析化学家的注意。

参考文献

- [1] Dionex Technical Note 21. Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector, 1998.
- [2] Dionex Technical Note 20. Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector; <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20.pdf>, 1993. Revised 2004.
- [3] Kren V, Martinková L. Glycosides in medicine: the role of glycosidic residue in biological activity. *Curr Med Chem*, 2001, 8: 1313 – 38.
- [4] Dionex Application Note 181. Determination of Streptomycin and Impurities Using HPAE–PAD, 2007.

The Power of Pulsed Amperometric Detection Coupled With Chromatography for Analyzing Carbohydrates

George LIMPERT

This article presents a brief summary of the power of pulsed amperometric detection coupled with chromatography. Those who have been involved in amperometry in the past will really appreciate the new innovations. The breadth of the applications should make any analytical chemist take notice.

新闻动态

气象发展“十二五”规划公布

近日,中国气象局与国家发改委联合印发了《气象发展规划(2011–2015)》。

该规划特别提出要加强利用云水资源。国家发展改革委农经司司长高俊才表示:“我国每年有30万亿从海里和其他地方过来的空中云水资源。但利用率较低,平均约为20%,西北地区平均利用率不到15%。今后,我们要加大人工影响天气的力度,留住更多云水资源。”

目前,我国主要通过传统的高炮、火箭等技术催雨。“十二五”期间,气象局将在此基础上,加大飞机催雨比例,并与发改委一起,在全国建立多个人工增雨区域中心或人工影响天气片区。在技术和机制上实行创新和转变,把更多的空中云水资源降到地面,缓解我国水资源短缺问题。

此外,规划中涉及的其他主要发展指标还包括:气象信息公众覆盖率达到95%以上,公众气象服务满意度保持在85%以上;灾害天气预警信息提前15~30分钟发出;24小时晴雨和暴雨预报准确率分别保持在85%和22%以上,温度24小时预报准确率70%以上;台风路径24小时预报误差减小到100公里以内等。