有机分析样品前处理方法及应用

徐昕荣

华南理工大学分析测试中心

主要内容

- 1、有机分析样品前处理的常用方法
- 2、有机样品前处理与综合分析应用
- 3、总结

1 有机分析样品前处理的常用方法

- 为什么进行样品前处理
  - 样品形态无法直接上机检测
  - 检测设备灵敏度达不到要求
  - 样品基质干扰

1 有机分析样品前处理的常用方法

常用方法

- 高速离心
- 过滤、超滤
- 选择性沉淀
- 萃取
- 索氏抽提
- 衍生反应
- 加速溶剂萃取（ASE）
- 浓缩样品　　液-固萃取 / 液-液萃取+旋蒸
- 固相萃取/固相微萃取/微波辅助固相微萃取
- 凝胶渗透色谱（GPC）

1 有机分析样品前处理的常用方法

- 根据被测目标的挥发性和所用仪器简单分类

- 测定目标为挥发性有机物（GC、GC-MS）
  - 顶空技术
  - 吹扫捕集
  - 固相微萃取
  - 吸附/热解析

- 测定目标为半挥发性有机物（GC、GC-MS、MS、LC-MS）
  - 溶剂萃取
  - 衍生化反应
  - 固相萃取

- 测定目标为不挥发性有机物（MS、LC-MS）
  - 溶剂萃取
  - 过滤、超滤
  - 固相萃取
  - 凝胶渗透色谱

2 样品前处理与综合分析应用

- 1、猪肉新鲜度分析检验方法研究
- 2、丙尔金的分析检验方法研究
- 3、凉茶中中药成份（金银花和山银花）的检验与鉴定方法研究

2.1 猪肉新鲜度的分析检验方法研究

➢ 样品前处理方法

- 脂质氧化是肉腐败的一个主要原因，通过检测腐败过程中特征挥发性物质，来评价猪肉的新鲜度。
- 选择气相色谱质谱联用来进行检测，前处理方法采用顶空固相微萃取技术。

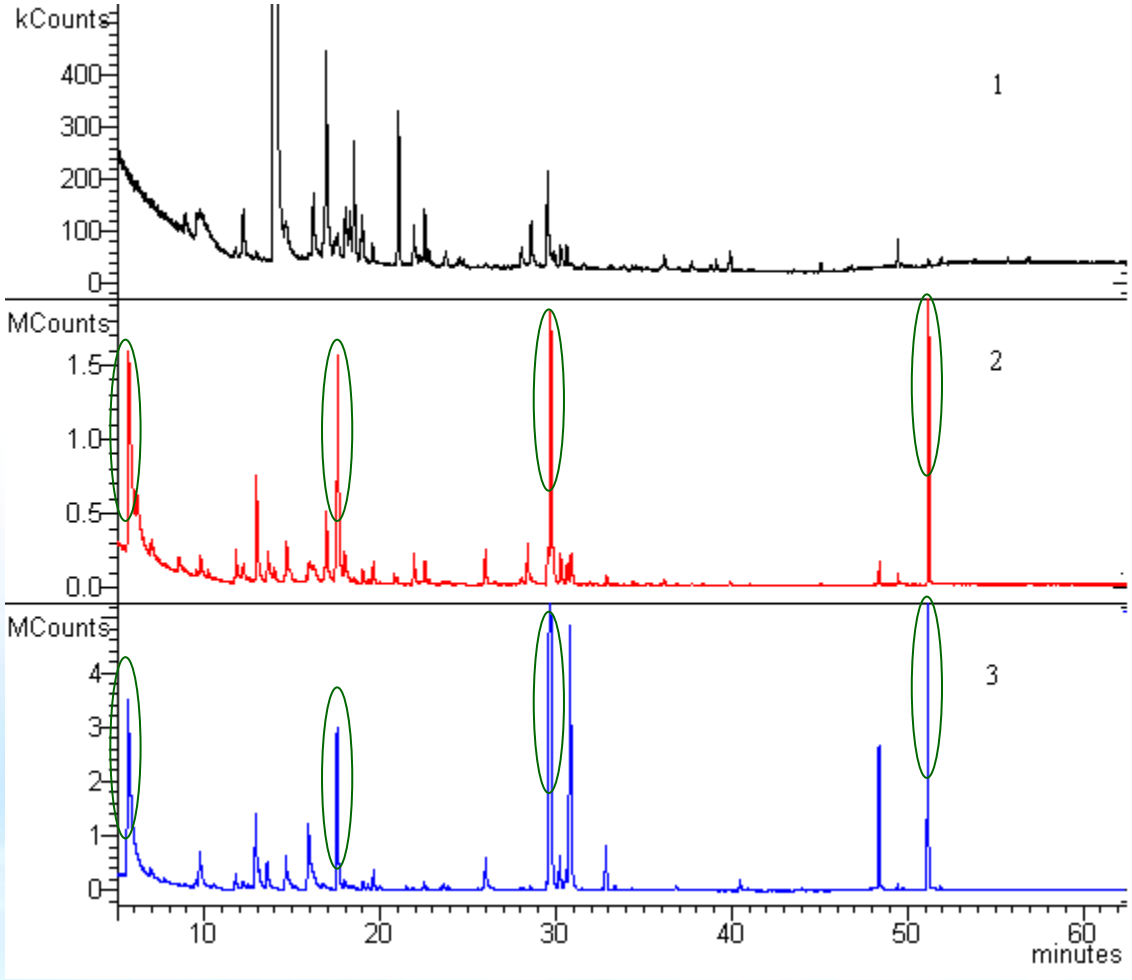
2.1 猪肉新鲜度的分析检验方法研究

➢ 样品前处理操作

- 在 20 mL 顶空瓶中加 1 g 猪肉样品, 将顶空瓶中的肉类样品在 50 ℃, 500 r/min 平衡 30 min, 然后插入 50/30m DVB/CAR/PDMS 纤维头, 于 50 ℃萃取 5 min。

2.1 猪肉新鲜度的分析检验方法研究

实验结果

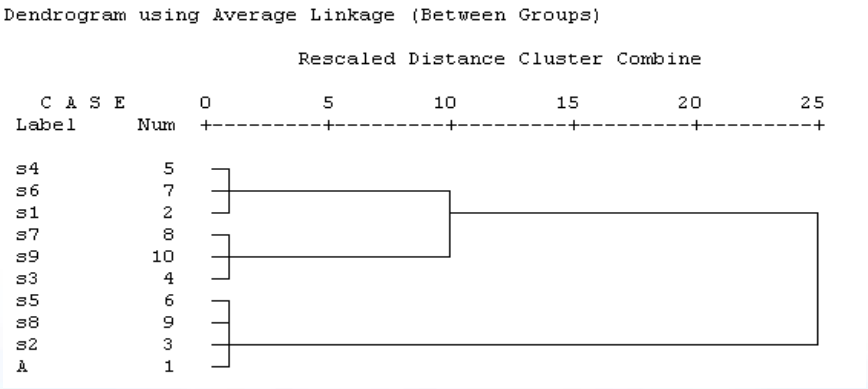


- 当天新鲜猪肉
  （批量样品18个共有峰）
- 室温下放置一天后
  （批量样品30个共有峰）
- 室温下放置两天后
  （批量样品25个共有峰）

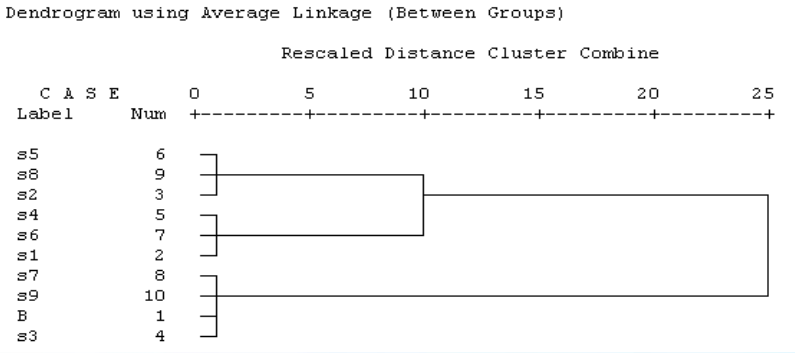
2.1 猪肉新鲜度的分析检验方法研究

➢ 数据处理及谱库建立

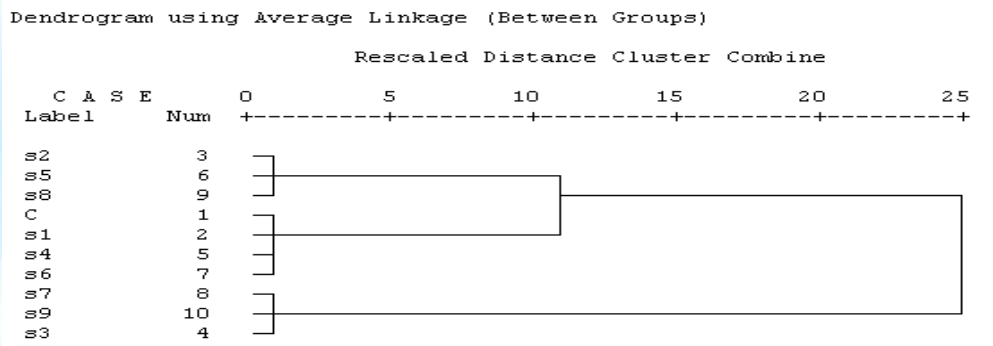
- ➢ 不同新鲜度猪肉样品的相似性分别采用聚类分析法中的欧式距离进行分析。



新鲜猪肉的特征指纹图谱验证聚类分析图



次新鲜猪肉的特征指纹图谱验证聚类分析图



变质猪肉的特征指纹图谱验证聚类分析图

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

新闻

- 2013年4月，广东省检测报告，丙尔金含有75%的氰化金钾和25%的柠檬酸钾。剧毒！！
- 香港中文大学（ASMAC）和福州大学报告结论为，丙尔金为柠檬酸钾和氰化金钾的混合物。

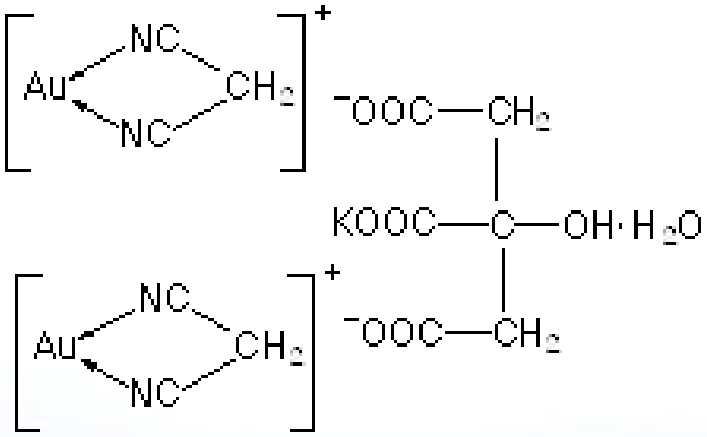
2.2 丙尔金的分析检验方法研究

丙尔金简介

- 2013年3月第21号令，丙尔金可替代氰化金钾及氰化亚金钾镀金工艺。行业革命！
- “丙尔金”无毒！！！
- 年产50吨，将建成完成150吨/年产能，计划建设500吨/年产能。
- 前景是垄断600亿元的市场。
- 恒生科技提供的应用其产品的客户包括海内外知名电镀企业。

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

- **2010年2月24日，电子科技大学微电子与固体电子学院对丙尔金分子式进行鉴定并命名为：一水合柠檬酸一钾二（丙二腈合金）。**



一种镀金用柠檬酸金钾及其制备方法

公开号　101671839

公开日　20100317

申请人　三门峡恒生科技研发有限公司

地址　河南省三门峡市开发区分陕路西砥柱路北

清洁镀金新材料在镀金工艺中的应用

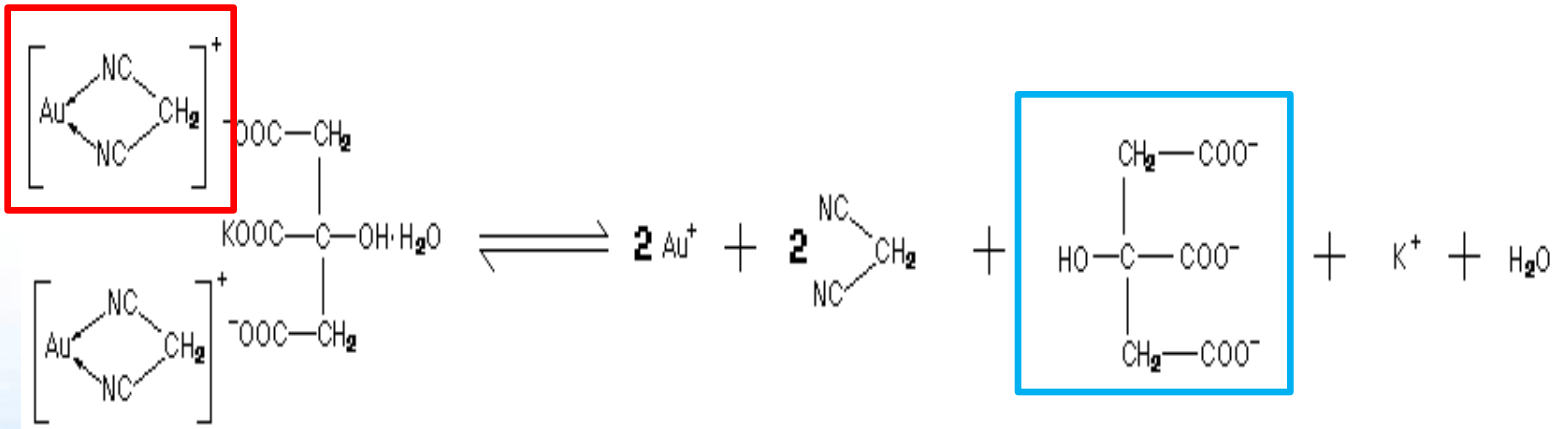
张　磊[1]，　胡文成[2]，　马默雷[1]，　张勇强[3]

（1. 三门峡恒生科技研发有限公司，河南 三门峡　472000；　2. 电子科技大学 微电子与固体电子学院，四川 成都　610054；　3. 四川华丰集团公司，四川 绵阳　621000）

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

➢ 分析方法的建立及前处理方法选择

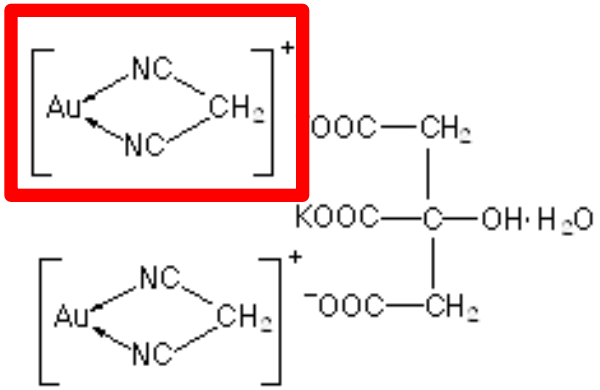
文献报导的丙尔金水解平衡过程如下，无游离氰基产生，因而无毒。



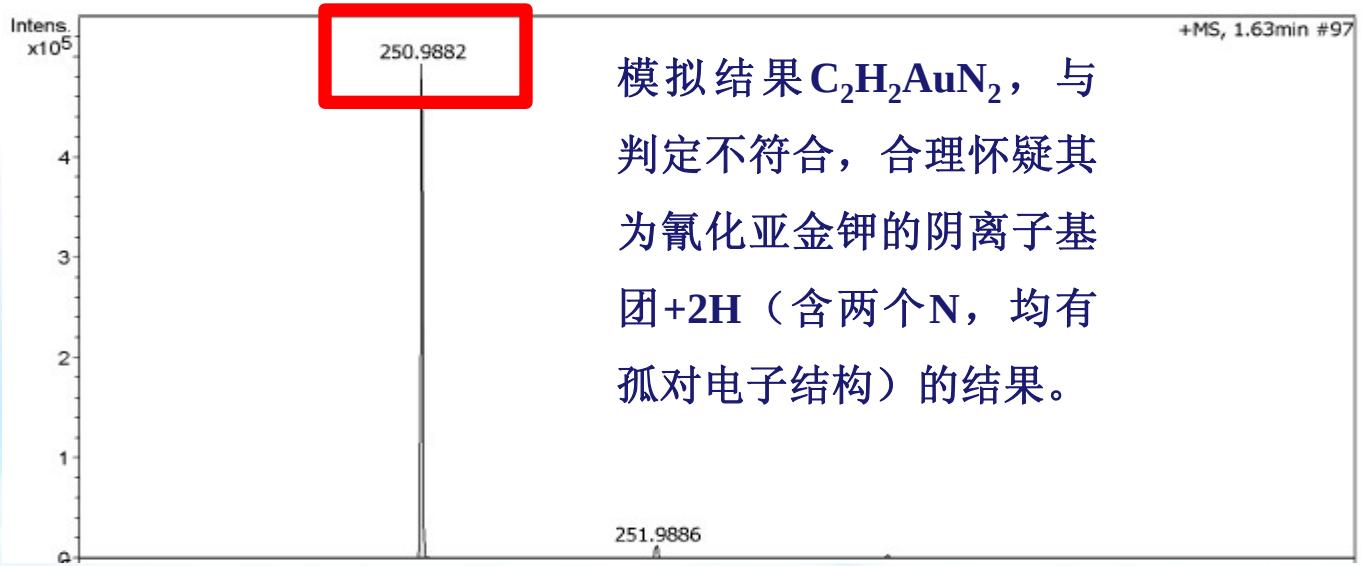
丙尔金阳离子基团稳定，可用质谱进行分析。

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

➢ 实验结果



根据阳离子基团带电情况(M，+1)判断，若该丙尔金样品物质结构信息正确，在正离子模式应为$C_3H_2N_2Au^+$。

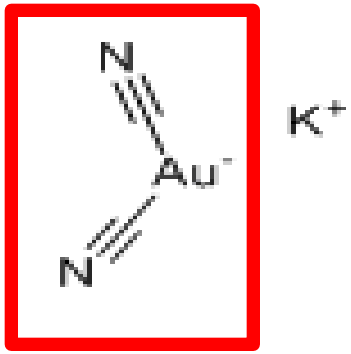


模拟结果$C_2H_2AuN_2$，与判定不符合，合理怀疑其为氰化亚金钾的阴离子基团+2H（含两个N，均有孤对电子结构）的结果。

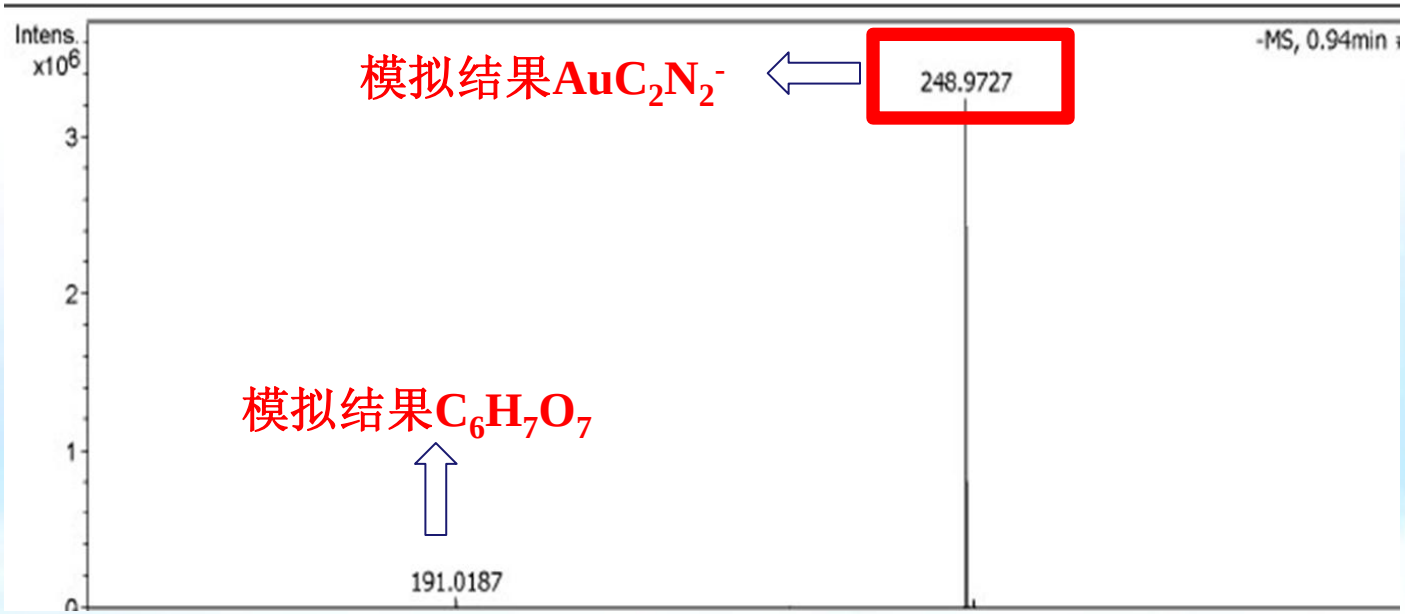
丙尔金样品水溶液，ESI源正离子模式检测结果

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

➢ 实验结果



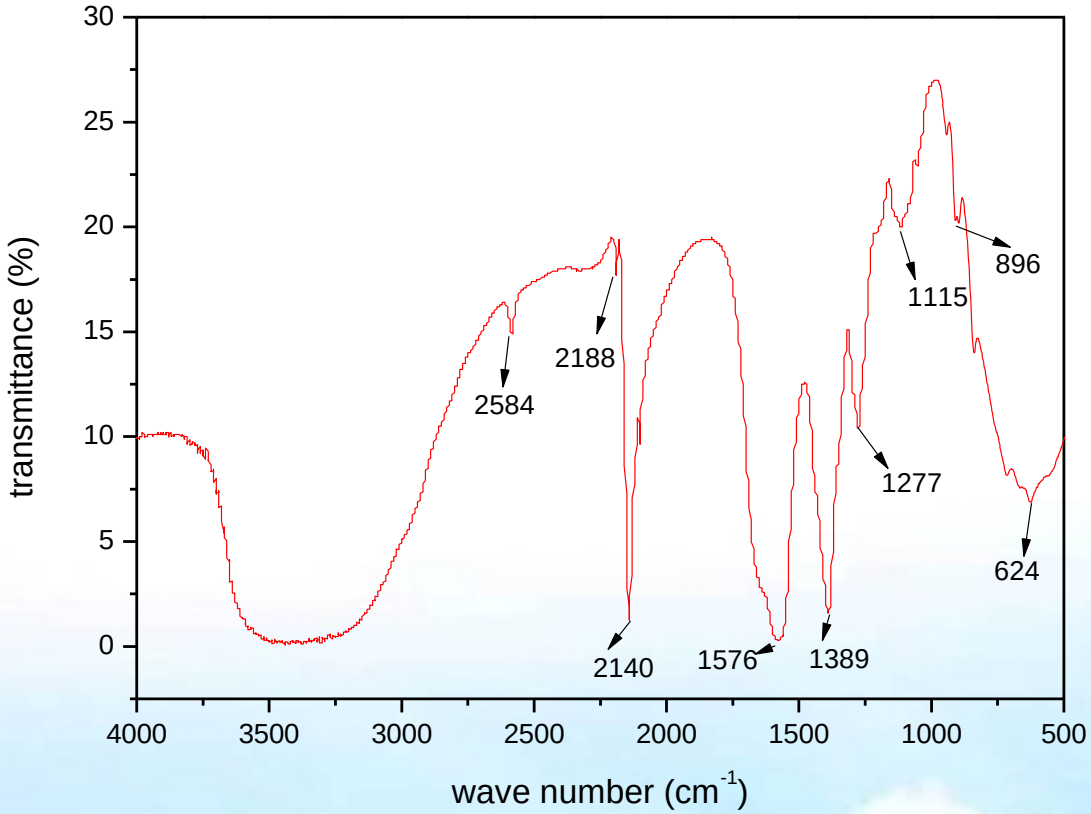
氰化亚金钾为盐类物质，在水溶液中发生水解为$AuC_2N_2^-$，阴离子基团 。该样品与氰化亚金钾质谱图一致。



丙尔金样品水溶液，ESI源负离子模式检测结果

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

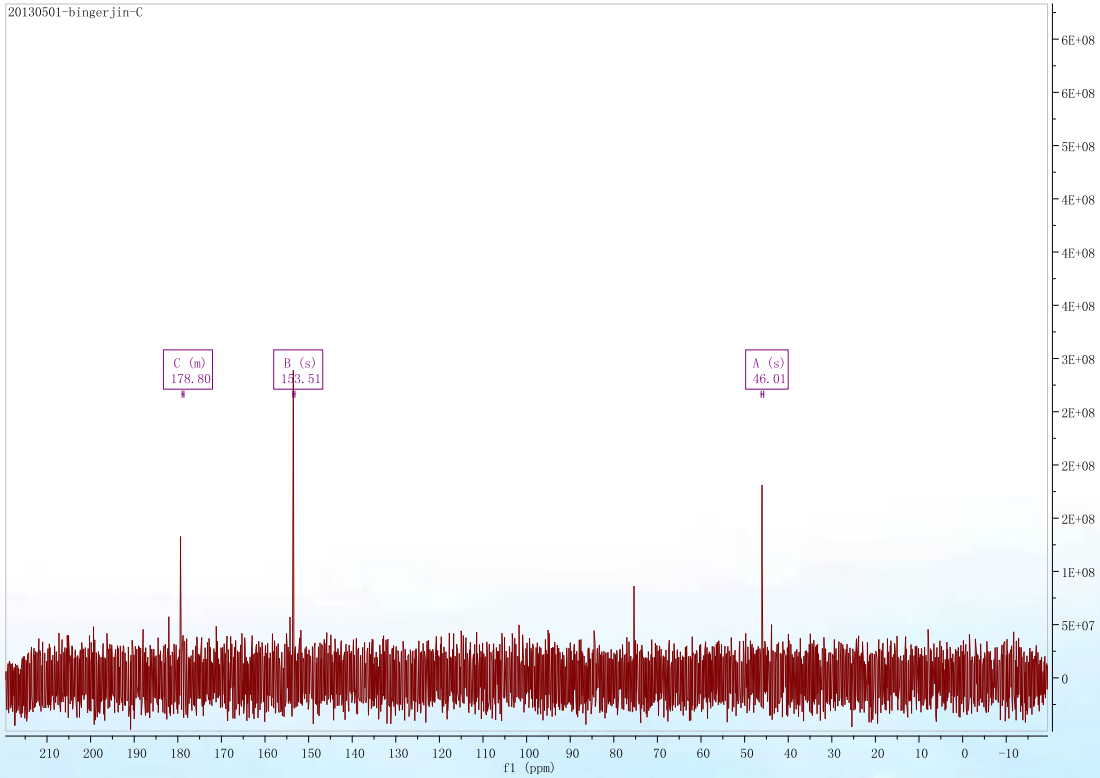
➢ 红外及核磁验证



图谱分析，分别可得出-CN，-OH，-COOH等结构信息。

2.2 丙尔金的分析检验方法研究

➢ 红外及核磁验证



结论：样品与丙尔金报导的C谱不符，非丙尔金。

小结

- 高分辨质谱液质联用，能判别该样品本身是前处理过程的水解产物还是混合物。
- 对于前处理会引起化学变化（水解等）的物质，需要特别关注特征离子的变化情况。
- 对于混合物成分组成的分析工作，样品前处理工作主要在于物质分离方面，排除干扰组分。

研究背景

- 2013年3月，媒体报道，凉茶企业在生产过程中，配方标注的“金银花”可能含不实成分。
- 市场上大多用“山银花”代替“金银花”。
- 金银花与山银花主要在某些物质含量上有差别，而山银花与金银花外观极其相似。
- 广东是凉茶大省，检验分辨方法重要。

分析方法的建立

- 中药指纹图谱是指中药经适当处理后，采用一定的分析手段，得到的能够标示该中药特性的共有峰的图谱，中药指纹图谱能更全面的反应中药全貌。
- 高效液相色谱是非常适合构建中药指纹图谱的一种方法。

实验条件

- 色谱条件：（RRHD) SB-C18 2.1×150mm,1.8μm,1200bar，进样体积为2 μL；

  流动相A：0.1%甲酸/水；流动相B：乙腈；

- 质谱条件：正离子模式，m/z 50-1000全扫描；内标法校正。

➢ 样品前处理方法

➢ 金银花山银花样品提取过程（水提取）：

准确称取广东产金银花和山银花、湖南产金银花和山银花2.0g，分别加入40mL重蒸水，在100℃下提取2h，高速离心，过0.22微米膜去除不溶物质。

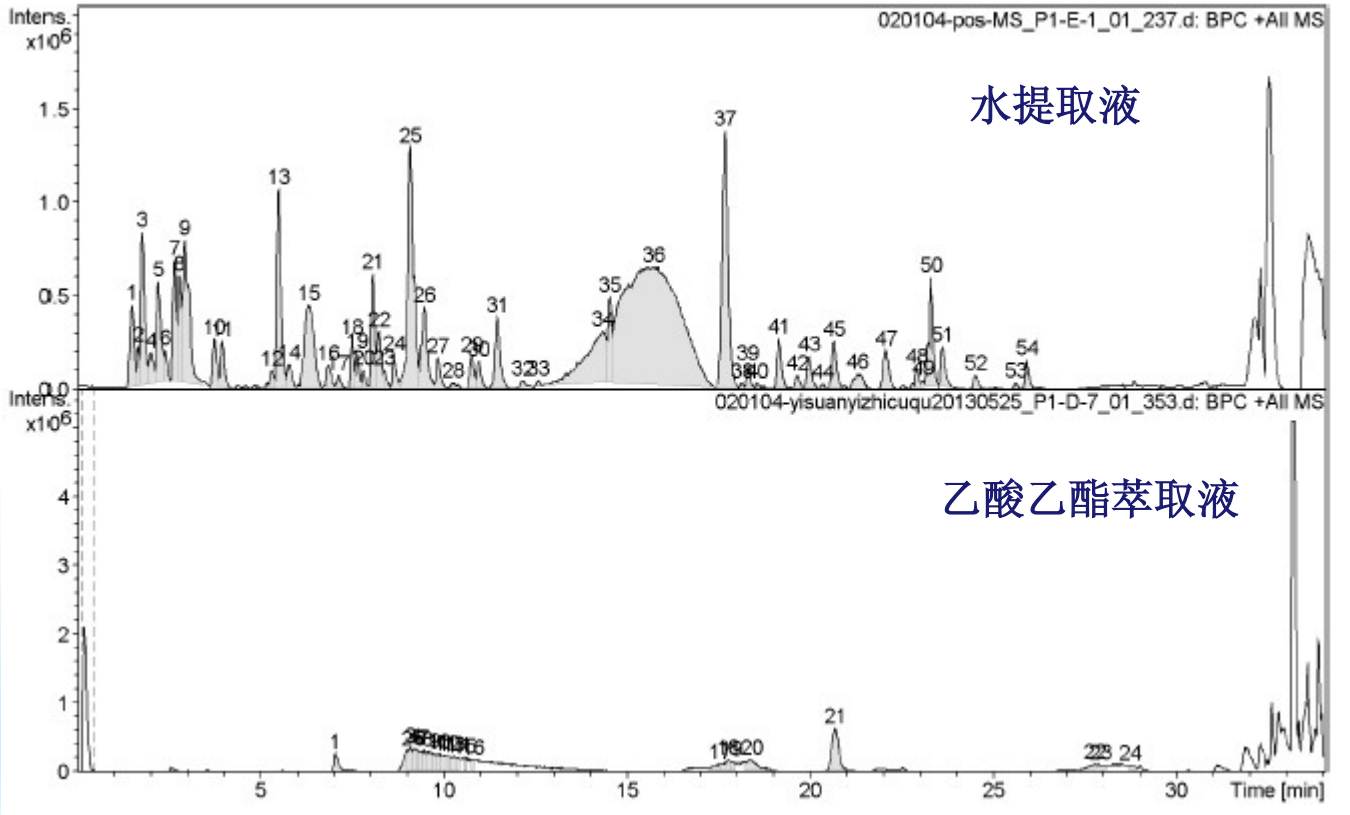
样品前处理方法

凉茶样品前处理（旋蒸加浓）：

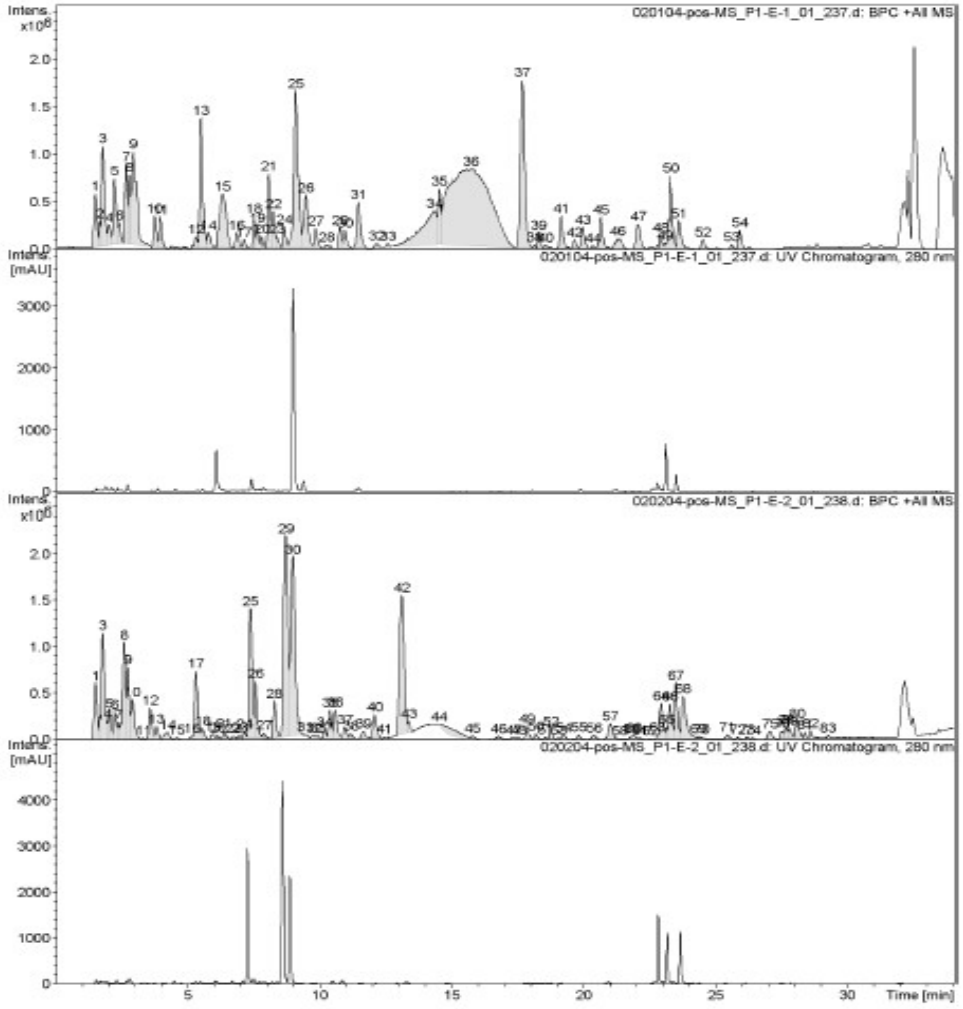
凉茶饮料中，有效药用成分含量过低，在液质联用中响应较弱，需要加浓。旋蒸温度40℃，浓缩样品250mL至25mL。

注意事项：凉茶饮料中含有大量的糖类，浓缩后样品黏度过大，加甲醇降低黏度在进行LC-MS操作。

➢ 样品前处理对比


020104-pos-MS_P1-E-1_01_237.d: BPC +All MS
水提取液
020104-yisuanyizhicuqu20130525_P1-D-7_01_353.d: BPC +All MS
乙酸乙酯萃取液
Intens.
x10^6
Time [min]

➢ 金银花山银花图谱对比



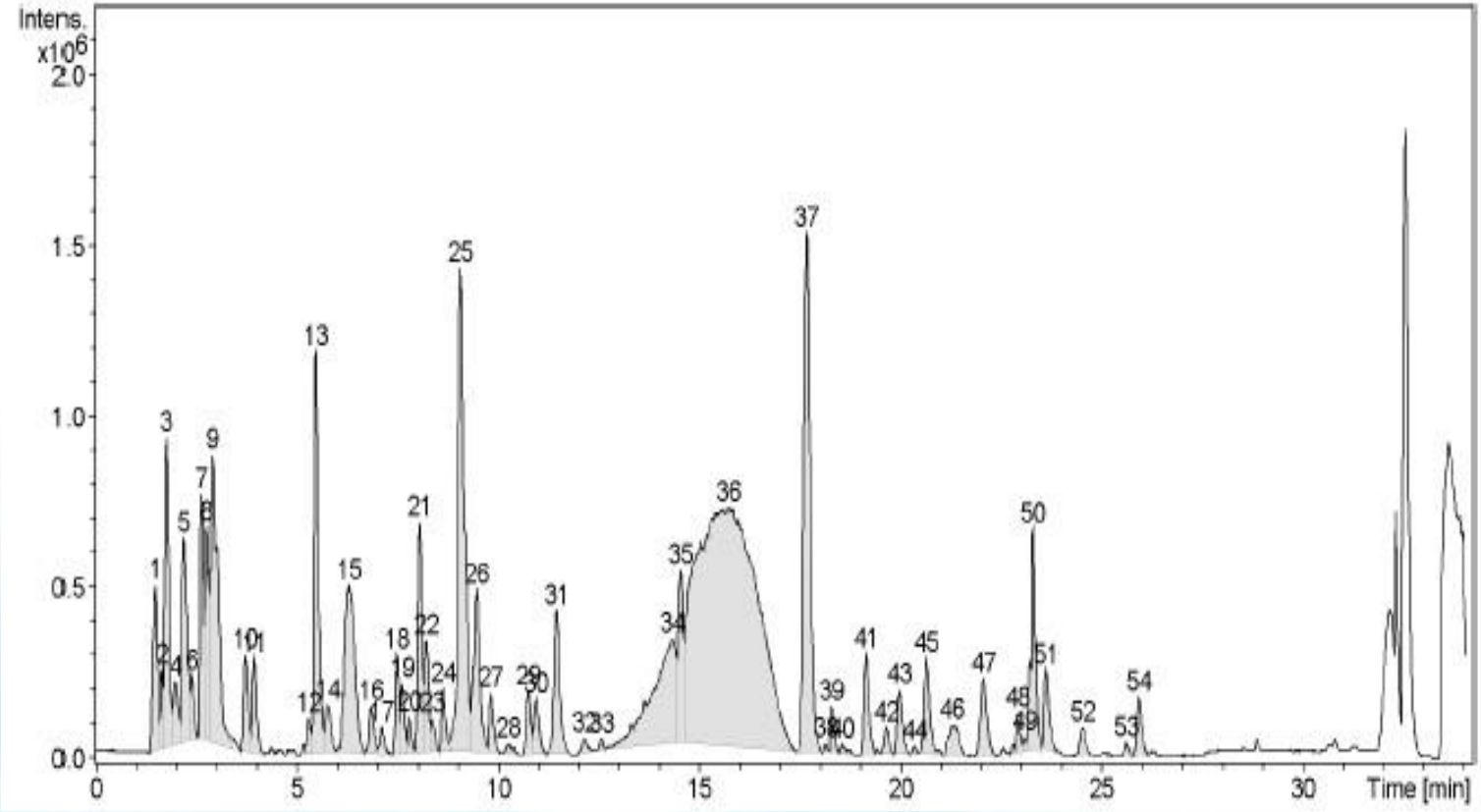
⟹ 金银花离子流图，共54个峰

⟹ 金银花紫外检测图，共10个峰

⟹ 山银花离子流图，共83个峰

⟹ 山银花紫外检测图，共6个峰

实验结果–金银花指纹图谱

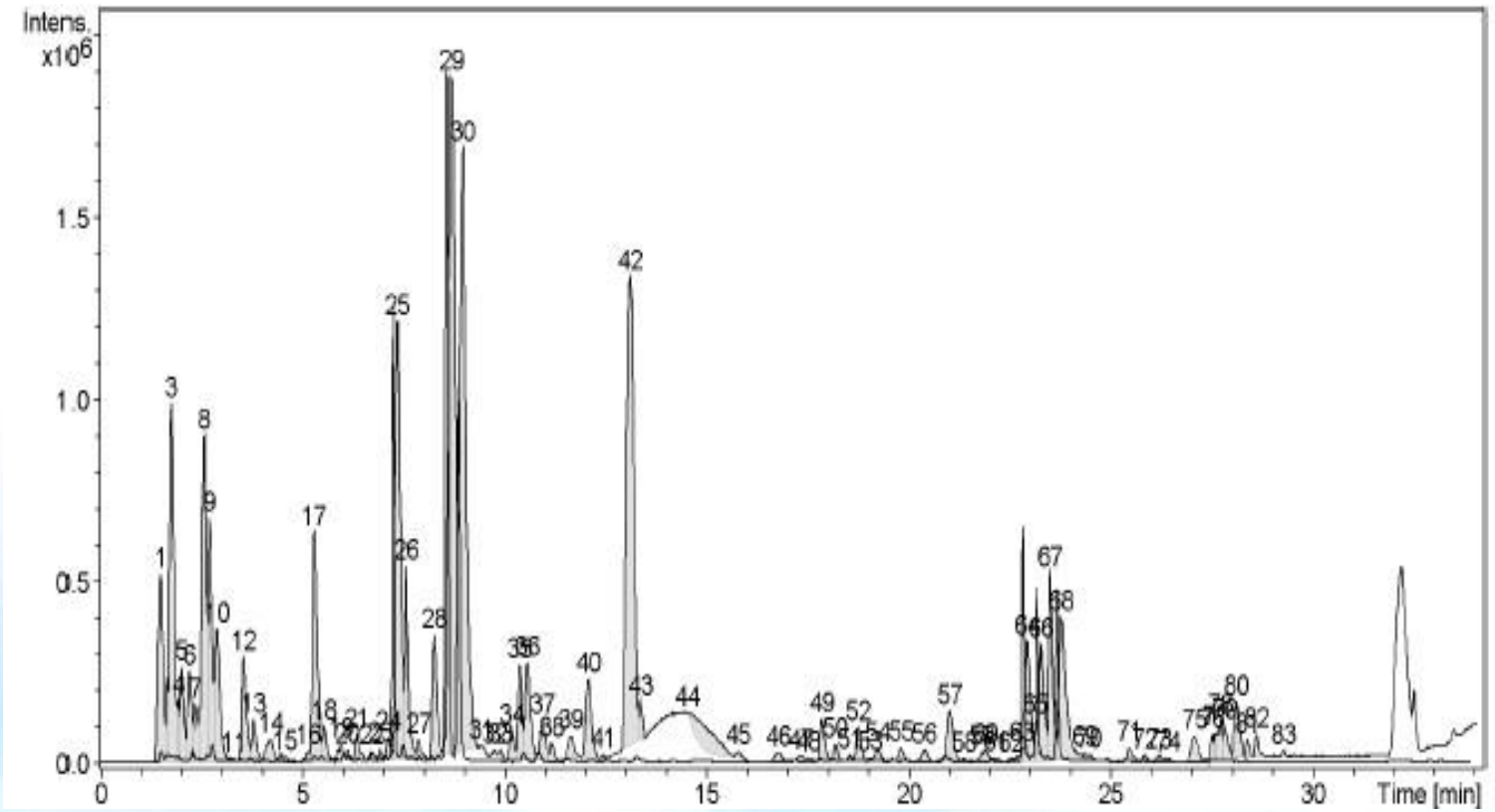


实验结果–金银花指纹图谱

#	RT [min]	Area	S/N	Cmpd.SF
1	1.5	3710015	74.5	
2	1.7	900830	35.0	C 5 H 14 N 1 O 1
3	1.8	6841305	138.9	C 5 H 10 N 1 O 2
4	2	1498224	28.0	C 11 H 20 N 1 O 6
5	2.2	5497904	91.5	C 5 H 6 N 5
6	2.4	971909	28.2	C 11 H 16 N 1 O 7
7	2.7	4630821	109.9	C 5 H 8 N 1 O 3
8	2.8	3879371	95.8	C 5 H 12 N 1
9	2.9	10754230	129.3	C 5 H 12 N 1
10	3.7	2130197	43.2	C 10 H 14 N 5 O 4

根据色谱峰的保留时间，及相应时间对应的准确质荷比的抽提54种成分，判断是否含有金银花。 **Targetanalysis**

实验结果-山银花指纹图谱



实验结果-山银花指纹图谱

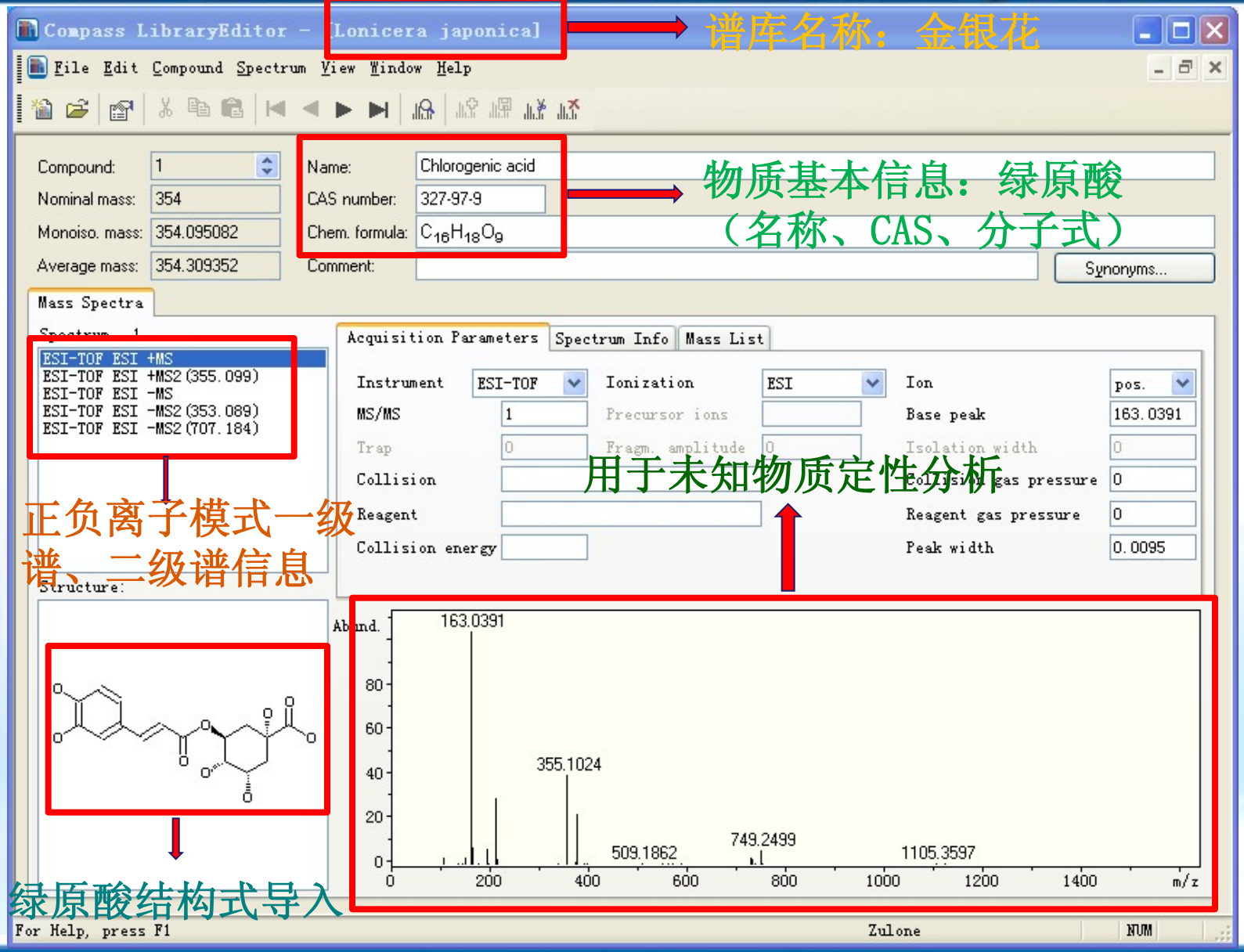
#	RT [min]	Area	S/N	Cmpd.SF
1	1.5	4424594	355.7	C 10 H 23 N 2 O 5
3	1.77	7554275	677.5	C 5 H 10 N 1 O 2
4	1.95	776478	114.2	C 5 H 12 N 1 O 2
5	2.03	1679534	178.4	C 1 H 3 N 21 Na 1 O 1
6	2.22	1940331	171.4	C 11 H 16 N 1 O 7
7	2.37	1025649	108.6	C 11 H 16 N 1 O 7
8	2.58	7641337	616.1	C 5 H 8 N 1 O 3
9	2.72	4832817	460.4	C 5 H 12 N 1
10	2.9	3247714	250.6	C 5 H 12 N 1
11	3.32	68562	6.6	C 6 H 9 O 4

根据色谱峰的保留时间，及相应时间对应的准确质荷比的抽提83种成分，判断是否含有山银花。Targetalysis

数据处理及谱库建立

水提取液的化学成分分析		
No	分子式	化合物
1	C7H12O6	奎宁酸
2	C7H12O6	柠檬酸
3	C16H18O9	新绿原酸
4	C16H18O9	绿原酸
5	C16H18O9	隐绿原酸
6	C17H19O9	3-0-咖啡奎宁酸甲酯
7	C17H24O11	断氧化马钱子苷
8	C21H20O12	异槲皮苷
9	C25H24O12	异绿原酸异构体
10	C25H24O12	异绿原酸C
11	C25H24O12	异绿原酸A
12	C25H24O12	异绿原酸B
13	C65H106O32	灰毡毛忍冬皂苷乙
14	C59H96O27	灰毡毛忍冬皂苷甲
15	C53H86O22	川续断皂苷乙
16	C53H86O22	灰毡毛忍冬次皂苷甲

2.3 凉茶中中药成份（金银花、山银花）的检验与鉴定方法研究



谱库名称：金银花

物质基本信息：绿原酸（名称、CAS、分子式）

正负离子模式一级谱、二级谱信息

用于未知物质定性分析

绿原酸结构式导入

建立金银花及山银花的谱库。无需标品！

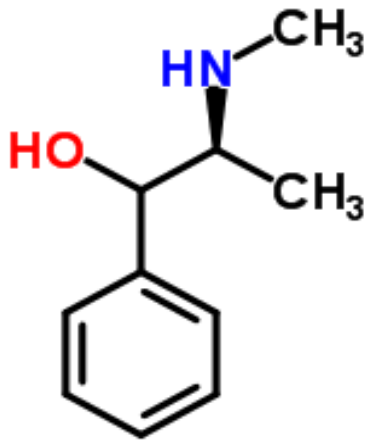
未知成分定性——从分子式到结构式

CompoundCrawler™，在线数据库搜索

ChemSpider | benzenemethanol, alpha-[(1S)...

ChemSpider
Building community for chemists

About | Search | Browse | Services | Help



2D 3D Load Save Zoom

- 1 of 2 defined stereocentres

benzenemethanol, α-[(1S)-1-(methylamino)ethyl]-

8328 (ChemSpider ID)

$C_{10}H_{15}NO$

Similar

Wikibox

Mass

PhysChem Properties

Systematic name

(2S)-2-(methylamino)-1-phenylpropan-1-ol

SMILES and InChIs

小结

- 金银花与山银花主成份一致，含量虽然有差别，却不足以作为定性鉴别的依据；
- 微量或痕量差异组分在样品前处理操作中易流失，有必要简化部分前处理操作，尽可能多的保留物质信息。

3 总结

- 样品前处理原则：根据所选择的原始样品和样品基体的性质，所要获得的信息（分析测定目的），选择恰当的实验仪器，然后决定和制定样品前处理的方法和程序。

- 样品前处理有化学变化的，要充分分析化学变化对分析检验的影响并加以利用。

- 分析检验性质相近，前处理原则是尽量保留样品信息。

- 复杂体系，背景干扰严重，痕量微量成份在分析中一样有价值。

谢谢大家！