

HF-LPME 与 HPLC 联用测定 槲皮素 LogD 和富集倍数

宝贵荣^{1,2}, 通拉嘎¹, 李优鑫², 包建民^{1*}

(1. 呼和浩特民族学院化学与环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010050;

2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要:建立了96-孔板中空纤维膜液相微萃取(HF-LPME)与高效液相色谱(HPLC)联用技术测定槲皮素油水分配系数和不同介质中富集倍数的方法。对96-孔板中空纤维膜液相微萃取条件进行优化,优化后的萃取条件为:60%聚丙烯中空纤维膜,萃取溶剂为正辛醇,振荡速度为173 r/min,萃取温度为室温,样品溶液的pH为4.0,萃取时间为90 min。槲皮素在浓度范围内线性关系良好,相关系数 $r^2 \geq 0.9923$,加样回收率 $\geq 93.12\%$ 。槲皮素油水分配系数为2.05,在水溶液中的富集倍数高于血清样品中的富集倍数,而血清样品中加入2%甲醇时富集倍数最大。血清样品中加入2%甲醇时槲皮素富集倍数为99.54,是在水溶液中富集倍数156.01的63.8%。该技术快速、简便,灵敏度高,具有广泛的应用前景。

关键词:中空纤维膜液相微萃取;高效液相色谱;槲皮素

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2021)02-0265-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.02.050

Hollow fiber liquid-phase microextraction coupled with HPLC for determination of Quercetin LogD and enrichment factor

BAO Gui-rong^{1,2}, TONG La-ga¹, LI You-xin², BAO Jian-min^{1*}

(1. College of Chemistry and Environment, Hohhot Minzu College, Hohhot 010050, China;

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A 96-well based hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) coupled with HPLC method is developed to determine the oil-water partition coefficient and enrichment factor of quercetin in different media. Conditions for 96-well hollow fiber liquid phase microextraction are optimized as follows: polypropylene hollow fiber has a porosity of 60%, octanol is used as extraction solvent, pH of sample solution is 4, shaking speed is 173 r·min⁻¹, and the extraction performs for 90 min at room temperature. Calibration curves of quercetin show good linear relationship in the concentration range of 0.921–15 mg·L⁻¹, with a recovery not less than 93.12%. The water-oil partition coefficient of quercetin is 2.05. The enrichment factor of quercetin in water is higher than that in serum samples. When 2% methanol is added into serum samples, the enrichment factor of quercetin is 99.54, reaching the highest, which is equivalent to 63.8% of the 156.01 of quercetin in pure water. In conclusion, this method has a wide application prospect due to low cost, easy, and high sensitivity.

Key words: hollow fiber liquid phase micro-extraction; high performance liquid chromatography; quercetin

槲皮素^[1](Quercetin)[化学名称2-(3,4-二羟基苯基)-3,5,7-三羟基-4H-1-苯并吡喃-4-酮]也被称为栲精或槲皮黄素,是一种广泛存在于植物中的天然黄酮类化合物。水果、蔬菜和谷物中都含有槲皮素,其中荞麦、洋葱和西红柿中槲皮素含量较高。槲皮素具有抗炎、抗氧化、降糖降压、免疫调节、抗肿瘤和清除自由基等多种生物活性和药理作用,

受到医药领域研究者的广泛重视^[2-3]。与此同时,各种槲皮素的分析方法也在不断涌现。总的来说,目前常见的槲皮素分析方法有HPLC、HPLC/MS和CE等技术。无论上述哪种方法,都离不开样品的前处理。

样品前处理是分离、富集复杂样品中的分析物。传统的样品前处理技术有液液萃取、液固萃取、顶空

收稿日期:2020-04-15;修回日期:2020-12-23

基金项目:内蒙古自然科学基金项目(2018MS02007);呼和浩特市科技局项目(2019-农-13)

作者简介:宝贵荣(1976-),女,博士,副教授,研究方向为分析化学和蒙药分析,765633821@qq.com;包建民(1961-),男,博士,教授,研究方向为生物化学、分析化学和蛋白组学,通讯联系人,jbao007@gmail.com。

萃取和固相萃取等。该技术操作烦琐、费时、难以自动化并需要大量的有机溶剂而造成环境污染和威胁研究人员的健康,使得这些方法有一定的局限性^[4]。近年发展起来各种各样微型样品前处理技术^[5],如固相微萃取、液相微萃取、超临界流体萃取、微波助溶剂萃取法等。液相微萃取(liquid phase microextraction, LPME)是微型化的液液萃取,仅需数微升有机溶剂萃取分离富集各类复杂样品中的分析物。液相微萃取^[6]主要有单滴液相微萃取(single-drop microextraction, SDME)、连续流动微萃取(continuous-flow microextraction, CFME)、溶剂棒微萃取(solvent-bar microextraction, SBME)、分散液相微萃取(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)和中空纤维膜液相微萃取(hollow fiber liquid phase microextraction, HF-LPME)。1999年 Pedersen-Bjergaard 等^[7]在单滴液相微萃取的基础上首次提出中空纤维膜液相微萃取。中空纤维膜液相微萃取(HF-LPME)是中空纤维膜的壁孔中充满有机溶剂,再将接受相注入中空纤维膜内腔,最后将中空纤维膜放入样品溶液中萃取并进行分析。中空纤维膜液相微萃取是一种新型、环保的样品前处理技术,具有操作简便、萃取时间短、富集倍数高、廉价^[8]等诸多优点。本文中建立了高通量中空纤维膜液相微萃取技术与 HPLC 联用测定槲皮素的油水分配系数和非平衡条件下血清、水溶液中加入甲醇对富集倍数影响的方法。同时,考察了影响中空纤维膜液相微萃取效率的中空纤维膜、有机溶剂、样品溶液的 pH 和萃取时间等参数。最佳条件下,测定了槲皮素油水分配系数并非平衡条件下血清样品和水溶液中加入不同体积的甲醇对富集倍数的影响。实验结果表明,非平衡条件下血清样品中加入 2% 甲醇时富集倍数最高而水溶液中加入甲醇富集倍数降低。

1 材料

1.1 仪器

1100 型 HPLC(美国 Palo Alto 市 Agilent 公司),包括四元溶剂管理系统、在线脱气机、自动进样器、PDA 检测器;Milli-Q 超纯水装置(美国 Millipore 公司);EL204-LC 分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ-300VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);pHS-3C 精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司);HH-1 水浴锅(金

坛市科技仪器厂)。

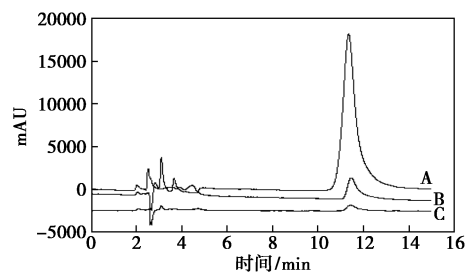
1.2 试剂

槲皮素对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);聚丙烯中空纤维膜(PPHF, ID: 0.90 mm, OD: 1.00 mm, 孔隙率 60%)天津大学化学化工学院膜研究所提供;细聚丙烯中空纤维膜(PPHF1, ID: 0.50 mm, OD: 0.80 mm, 孔隙率 0.2 μm)天津工业大学提供;偏氟乙烯中空纤维膜(PVF, ID: 1.57 mm, OD: 1.96 mm, 孔隙率 23%)天津奥顺达科技有限公司提供;HPLC 甲醇购买于天津市北联精细化学品开发有限公司;磷酸购买于天津光复精细化工研究所;其他化学试剂均购买于天津北联精细化学品开发公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 条件

HYPERASIL ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, ThermoElectron Corporation, USA);流动相为甲醇/水/磷酸(50/49.9/0.1, 体积比);流速为 1 mL/min;检测波长为 360 nm;进样量为 20 μL。上述条件下,槲皮素的 HPLC 图谱见图 1。



A—HF-LPME 有机溶剂中槲皮素的色谱峰;B—样品溶液中槲皮素的色谱峰;C—HF-LPME 样品溶液中槲皮素的色谱峰

图 1 槲皮素(20 μg/mL)的 HPLC 图谱

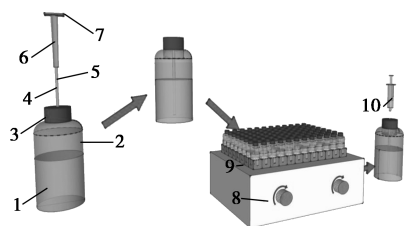
2.2 溶液制备

精密称取适量槲皮素对照品,置于 50 mL 的容量瓶中,以甲醇溶解并配置成浓度为 1 mmol/L 槲皮素储备液,在 4℃ 冰箱中保存。精密称取一定量的槲皮素储备液,用水稀释至所需浓度的工作溶液。

2.3 搭建 96 孔板中空纤维膜液相微萃取装置

96 孔板中空纤维膜液相微萃取装置如图 2。中空纤维膜剪成 25 mm 长,甲醇中超声 30 min,自然晾干备用。中空纤维膜一端加热封死,将另一端紧密套在导入管(移液枪的枪头)的外部。中空纤维膜与导入管之间用环氧树脂固定避免脱落,导入管的另一端固定在 HPLC 瓶盖的中间部位后微量注射

器注入 30 μL 正辛醇。利用 8-通道移液枪在 HPLC 瓶中加入 1.8 mL 样品溶液,随后,将上述中空纤维膜浸入装有 1.8 mL 的样品溶液进行萃取。萃取完毕,用微量注射器抽回 5 μL 正辛醇加入干净的 HPLC 自动进样瓶中,加 300 μL 甲醇复溶,过滤后直接用 HPLC 分析。取出中空纤维膜后样品溶液直接用 HPLC 分析。



1—样品溶液;2—HPLC 进样瓶;3—瓶盖;4—中空纤维膜;
5—有机溶剂;6,7—导入器;8—振荡器;9—96 孔板;
10—HPLC 进样针

图 2 中空纤维膜液相微萃取装置

2.4 中空纤维膜液相微萃取

搭建 96-中空纤维膜液相微萃取系统,优化了中空纤维膜液相微萃取条件:60%聚丙烯中空纤维膜,萃取溶剂为正辛醇,振荡速度为 173 r/min ,萃取温度为室温,样品溶液的 pH 为 4.0,萃取时间为 90 min。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线,检测限与定量限

在优化条件下,分别准确取 0.1、0.25、0.5、1、2、5、10、15 mg/L 槲皮素溶液,按 2.3 方法萃取、分离并进行 HPLC 分析(结果见表 1)。以峰面积为纵坐标,质量浓度(mg/L)为横坐标,绘制槲皮素的标准曲线。槲皮素在 0.921~15 mg/L 浓度范围内呈良好线性关系, $r^2 \geq 0.9923$ 。

将槲皮素溶液稀释,以 3 倍信噪比计算检出限(LOD),以 10 倍的信噪比计算定量限(LOQ),结果见表 1。

表 1 槲皮素在不同样品中的工作曲线数据($n=6$)

相	线性范围/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	方程式	r^2	LOD/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOQ/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
水相	0.1~15	$Y=6686X+894$	0.9986	0.3012	0.921
水相中萃取	0.03~15	$Y=80867X-15361$	0.9988	0.0050	0.018
血清中萃取	0.03~12	$Y=55682X-22302$	0.9923	0.0133	0.041

2.5.2 回收率和精密度试验

槲皮素样品进行加标回收率实验,配置高、中、低 3 个浓度溶液,在最佳条件下平行测定 5 次。槲皮素的加标回收率为 91.12%~96.01%,RSD 在 8.4%以下($n=5$),符合定量分析要求。

2.6 油水分配系数测定

500 mL 水和 50 mL 正辛醇,充分混合,静置 24 h,分取上层和下层,即得正辛醇饱和的水和水饱和的正辛醇。被正辛醇饱和的水稀释槲皮素储备液制备所需浓度,用 0.1 mol/L 盐酸调节 pH 为 4。被水饱和的正辛醇 30 μL 注入中空纤维膜中,采用 2.3 技术样品前处理,在优化条件下进行萃取。萃取完毕,用 HPLC 测定,测得峰面积,外标法计算槲皮素浓度。按照 $\text{Log } K_{ow} = \text{Log } C_{a,eq}/C_{d,eq}$ ($C_{a,eq}$ 、 $C_{d,eq}$ 分别为 HF-LPME 达到平衡时槲皮素在接受相中的浓度、给体相中的浓度)计算槲皮素油水分配系数,结果见表 2。结果表明,中空纤维膜液相微萃取得到的槲皮素油水分配系数与文献值^[9]吻合。

表 2 $\text{Log } K_{ow}$ 的测定结果与文献值比较

化合物	实验 1	实验 2	实验 3	平均值	文献值
槲皮素	2.02	2.03	2.09	2.05	1.81~2.10

2.7 槲皮素在不同介质中的富集倍数

药物在水溶液中的富集倍数高于血清样品,因血清样品中药物与血清中的蛋白质会以一定比率结合,即存在结合型药物和游离型药物。药物与蛋白^[10]之间主要是离子键、氢键和范德华力等作用。结合型药物和游离药物之间是动态平衡,血清样品中加入甲醇提高游离药物浓度。

利用 8-通道移液枪在 96 孔小瓶中加入含 0、2%、20% 甲醇的血清样品溶液,采用 2.3 装置样品前处理,在优化条件下进行 HF-LPME。富集倍数的计算公式为: $EF = C_{a,eq}/C_d$, 式中的 $C_{a,eq}$ 是 HF-LPME 平衡时槲皮素在有机溶剂中的浓度, C_d 是槲皮素在样品溶液中的初始浓度。实验结果见表 3。从表 3 可知,槲皮素水溶液中加入甲醇降低富集倍数,因为水溶液中加入甲醇槲皮素溶解甲醇而降低富集倍数。血清样品中加入 2% 甲醇时富集倍数最高,继续加入甲醇时富集倍数降低。槲皮素是低蛋白结合率药物(蛋白结合率为 16%),因此血清样品中加入 2% 的甲醇足以释放出槲皮素的游离药物,提高富集倍数,继续加甲醇导致槲皮素在甲醇中溶

解而富集倍数降低。

表 3 槲皮素在 6 种不同介质中的富集倍数

药物	水溶液	含 2% 甲醇水溶液	含 20% 甲醇水溶液
EF	156.01	123.65	112.63
药物	血清溶液	含 2% 甲醇血清溶液	含 20% 甲醇血清溶液
EF	78.51	99.54	48.19

3 讨论

3.1 HF 的选择

中空纤维膜是中空纤维膜液相微萃取的核心技术,中空纤维膜的种类、壁厚和孔径都会影响萃取效率^[5]。本文中 3 种不同孔径和壁厚度的中空纤维膜进行比较实验,结果见图 3(a)。结果表明,天津大学化学化工学院膜研究所提供的孔隙率为 60% 的聚丙烯中空纤维膜萃取效率高于其他对比的膜。因此本研究选择孔隙率为 60% 的聚丙烯中空纤维膜。

3.2 萃取溶剂的优化

在中空纤维膜液相微萃取中,选择合适的萃取溶剂能提高萃取效率^[11]。萃取溶剂^[7]必须满足以下特点,不溶于水、挥发性低、与中空纤维膜有兼容性,并对目标物有良好的萃取效率。本试验考察正己醇、癸醇、正戊醇、正辛醇、正庚醇等有机溶剂对萃取效率的影响,结果见图 3(b)。结果表明,正辛醇对槲皮素的萃取效率最高,因此本文中采用正辛醇为萃取溶剂。

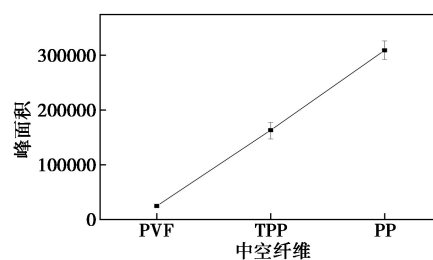
3.3 溶液 pH 的优化

样品溶液的 pH 影响槲皮素的存在形式,进而影响槲皮素的萃取效率^[12]。槲皮素是酸性化合物,化学结构中包含 4、5、7 酚羟基,与相邻的苯环产生 $p-\pi$ 相互作用。槲皮素 $pK_a = 6.44$,样品溶液的 pH 低于槲皮素 pK_a 值,小 1.5~2.0 个单位时槲皮素在样品溶液中分子形式存在,提高萃取效率。槲皮素样品溶液用 0.1 mol/L 氢氧化钠和 0.1 mol/L 盐酸调节 pH 为 2、4、6、8、10,结果见图 3(c)。结果表明,样品溶液为 pH 4 时萃取效率最高,当样品溶液的 pH 调节为 8 以上时,槲皮素的萃取效率急剧下降。综合考虑,本研究选择槲皮素样品溶液的 pH 为 4.0。

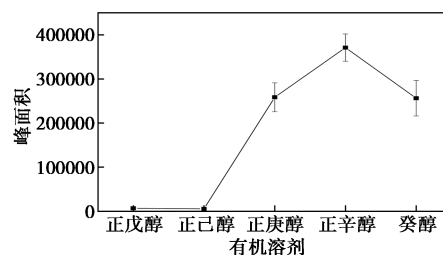
3.4 萃取时间的优化

中空纤维膜液相微萃取是物质传质速率和萃取

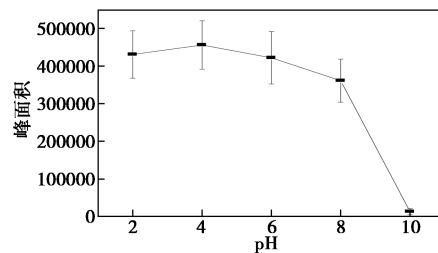
时间之间的动态平衡过程,萃取时间影响萃取效率^[13]。萃取时间长萃取效率高,但萃取时间过长而有机溶剂在样品溶液中溶解或挥发而降低萃取效率。本实验在震荡速度 173 r/min 下考察了萃取时间在 30~120 min 时萃取效率,结果见图 3(d)。从图可知萃取时间的增加而萃取效率提高,萃取时间在 90 min 时基本达到平衡,因此本文中选取萃取时间为 90 min。



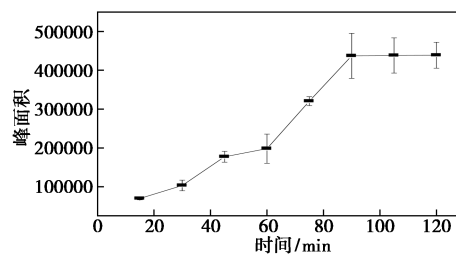
(a) 中空纤维膜的选择



(b) 有机溶剂的选择



(c) pH 的选择



(d) 萃取时间的选择

图 3 HF-LPME 的条件优化

4 结语

建立了 96 孔板中空纤维膜液相微萃取与高效液相色谱连用技术,并测定槲皮素油水分配系数和

非平衡条件下甲醇对不同介质中槲皮素富集倍数的影响。结果表明,该技术是高通量、操作简单、采集、萃取和分析为一体的样品前处理技术。

参考文献

- [1] 颜流水,井晶,黄智敏,等.槲皮素分子印迹聚合物的制备及固相萃取性能研究[J].分析试验室,2006,25(5):97-100.
- [2] 郭瑞霞,李力更,霍长虹,等.槲皮素甲基化衍生物的半合成及构效关系[J].中草药,2013,44(3):359-369.
- [3] 李敏.槲皮素及其糖苷衍生物芦丁对心肌纤维素化的抑制作用及机制研究[D].长春:吉林大学,2014.
- [4] Mohammad Asadl,Shayessthe Dadfarmia,Ali Mohammad Shabani, et al. Hollow fiber liquid phase microextraction method combined with high-performance liquid chromatography for simultaneous separation and determination of ultra-trace amounts of Naproxen and Nabumetone in cow milk, water, and biological samples[J]. Food Anal Method,2016,9:1-11.
- [5] 白小红,胡爽,陈璇.液相微萃取[M].北京:化学工业出版社,2013:123.
- [6] Rafael Venson,Ann-Sophie Korb,Gail Cooper.A review of the application of hollow-fiber liquid-phase microextraction in bioanalytical methods-A systematic approach with focus on forensic toxicology[J]. J Chromatogr B,2019,1108:32-53.
- [7] Pedersen-Bjergaard S,Rasmussen K E.Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis[J].Anal Chem,1999,71:2650-2656.
- [8] Mehdihatami,Khalil Farhadi.Application of hollow fiber-supported liquid-phase microextraction coupled with HPLC for the determination of guaifenesin enantiomer-protein binding[J].Biomed Chromatogr,2012,26:875-880.
- [9] Berman H M,Westbrook J,Feng Z,et al.The protein data bank[J]. Nucleic Acids Res,2000,28(1):235-241.
- [10] Kun Wang,Na Li,Lei Lei.Collection and separation of extract in dispersive liquid-liquid microextraction with hollow fiber[J].Anal Bioanal Chem,2016,408:3359-3367.
- [11] Tung Si Ho,Stig Pedersen-bjergaard,Knut E Rasmussen.Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions[J].Analyst,2002,127:608-613.
- [12] Mohammad Saraji,Batool Malkei,Taghi Khayamian,et al.Electrospray ionization-ion mobility spectrometry in the negative mode combined with hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of diclofenac in urine and plasma samples[J].Chromatographia,2017,80:951-959.
- [13] Guirong Borjihan,Youxin Li,James J Bao,et al.Development of a novel 96-well format for liquid-liquid micro-extraction and its application in the HPLC analysis of biological samples[J].J Sep Sci,2014,37:1155-1161.■

巴斯夫与埃赫曼携手对镍钴冶炼综合体的开发进行评估

近日,巴斯夫与埃赫曼签署协议共同评估开发一座现代化镍钴湿法冶炼综合体的可行性。该合作项目计划建立一座高压酸浸(HPAL)工厂和一座基本金属精炼厂(BMR),其中,高压酸浸工厂将座落于印度尼西亚的维达湾(Weda Bay),而基本金属精炼厂的选址将视可行性研究而定。

高压酸浸工厂将处理维达湾当地矿床开采的矿石,生产镍钴中间体。埃赫曼自2007年购得维达湾矿藏后,已开展大量地质勘探工作,确认这一世界级矿床的潜力,并于2019年底开始采矿业务。建成后的基本金属精炼厂将提供镍和钴,以生产正极材料前驱体(PCAM)及后续的正极活性材料(CAM),最终应用于电动汽车锂离子电池。

确保原材料的供应,尤其是镍,是助力全球电动汽车价值链强劲增长的关键因素。高镍正极活性材料的市场份额正持续上升,以满足对高能量密度电池的需求,同时降低整体电池成本。纵观全球矿藏资源,维达湾在满足上述需求方面极具竞争力。根据国际公认的可持续发展

标准,该规划开发项目每年可从其矿石处理中为巴斯夫提供额外的4.2万t镍和5000t钴。

高压酸浸工厂(HPAL)和基本金属精炼厂(BMR)计划在2025年左右启动,项目首期可行性研究仅需有限资金即将开展。(李天宇)

浙江丰利石墨球形化成套设备持续热销

2021年伊始,山西大同新能源产业城氢都驰拓新能源产业基地再次增加两套由浙江丰利粉碎设备有限公司生产的石墨球形化成套设备,以满足增产石墨粉的需求。

浙江丰利董事长、教授级高级工程师余绍火介绍,石墨球形化成套设备是针对锂离子电池用球形石墨负极材料的专用生产设备,能同时完成球形石墨超微粉体的粉碎、整形;将每道工序通过先进的工艺有机结合,采用独特的整形及分级技术,能使产品粒度分布集中,加工后的产品球形化程度高、振实密度高、粒度分布窄、质量稳定;成套设备采用全自动控制,操作简便,大大降低了能耗,提高了生产效率,是目前海内外石墨球形化领域效率高、运用广的成套设备,已广泛应用于我国的石墨集产地,同时远销德国、瑞士、巴西、日本等国家。(吴宏富)