

专用于 UV-Vis 测量的多通道流通池蠕动泵的优势

蠕动泵与手动比色皿测量相比，可节省分析时间并改善测量精度



作者

Wesam Alwan 博士
安捷伦科技有限公司

前言

提高在实验室中执行常规测量的分析系统通量，可节省时间和经费。但是，提高通量不得影响分析准确度或精密度。考虑使用紫外-可见分光光度计的效率时，如果手动填充、取放和清洁比色皿，样品处理通常是主要的限速步骤。

本研究对蠕动泵（用于将液体样品泵送通过分光光度计中的流通池）的使用与手动测量进行了比较。附件 Cary Sipper 蠕动泵可通过分光光度计的软件进行控制，从而集成为分析方法的一部分。

Cary Sipper 蠕动泵的独特之处在于有三个通道，可将三个液体样品同步泵入紫外-可见分光光度计中。它能完美配合 Cary 3500 紫外-可见分光光度计的同步测量功能，从而增强了样品自动化处理的明显优势。

使用常见的分析应用，即市售泡腾片中维生素 C (L-抗坏血酸) 的定量分析，进行了两种方法的比较研究。

实验部分

标样前处理

L-抗坏血酸储备液配制：在 23.5 °C 下将 50.0 mg 纯 L-抗坏血酸溶于 100 mL 0.1 mol/L HCl 中，得到 pH 为 1.5 的 500 mg/L 储备液。然后用 0.1 mol/L HCl 稀释储备液，制得浓度在 0–70 mg/L 之间的八种标样，如表 1 所示。这些标样涵盖约 0–4 个吸光度单位的吸光度范围，该范围代表了常规扫描紫外-可见分光光度计的典型范围。所有测量（使用和不用 Cary Sipper 蠕动泵）采用相同的标准溶液。

表 1. 配制的标样浓度及其平均吸光度 (n = 3)

标样 ID	浓度 (mg/L)	吸光度
标样 1	0	0.0014
标样 2	10	0.5893
标样 3	20	1.1584
标样 4	30	1.7088
标样 5	40	2.2768
标样 6	50	2.8228
标样 7	60	3.4147
标样 8	70	3.9120

样品前处理

市售泡腾维生素 C 片购自当地药房。标签表明，每片含 1000 mg 维生素 C。记录 20 片中每片的重量（表 2），然后用研钵和研杵碾成粉末。对于每个样品，取 5.5–28.0 mg 之间的不同量粉末。将粉末溶于 100 mL 经 Milli-Q 过滤的水中，并在 23.5 °C 下将其 pH 调节至 1.5。由此制得 20 个样品，校准范围为 0–70 mg/L。所有测量（使用和不用 Cary Sipper 蠕动泵）采用相同的样品溶液。

假设每片包含 1000 mg 维生素 C，按照产品标签，计算每种样品溶液中的维生素 C 含量。该计算基于每片的重量和制备各种样品溶液的研磨片剂粉末所用的重量。还计算了各种样品溶液的最终浓度。两种计算值列于表 2 中。

表 2. 20 片维生素 C 中每片的重量以及用于制备各个样品的粉末状片剂的重量

样品编号	片剂重量 (mg)	取用的量 (mg)	样品溶液中的维生素 C 计算含量 (mg)	样品溶液中的维生素 C 计算含量 (mg/L)
1.	4209	16.6	3.9	39.4
2.	4253	19.0	4.5	44.7
3.	4239	28.0	6.6	66.1
4.	4212	11.9	2.8	28.3
5.	4247	5.5	1.3	13.0
6.	4239	18.0	4.2	42.5
7.	4238	22.1	5.2	52.1
8.	4231	16.5	3.9	39.0
9.	4242	28.0	6.6	66.0
10.	4201	7.5	1.8	17.9
11.	4219	18.4	4.4	43.6
12.	4229	18.0	4.3	42.6
13.	4214	6.5	1.5	15.4
14.	4219	24.0	5.7	56.9
15.	4261	20.8	4.9	48.8
16.	4209	13.8	3.3	32.8
17.	4234	15.0	3.5	35.4
18.	4241	13.0	3.1	30.7
19.	4268	17.6	4.1	41.2
20.	4229	8.0	1.9	18.9

仪器

本研究采用 Agilent Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计。Cary 3500 仪器的这一配置最多可同时测量八个比色皿位置（七个样品和一个参比）。对于其中一半的测量，仪器配备 Cary Sipper 蠕动泵（参见图 1），该蠕动泵可同步泵送三种样品溶液通过位于仪器样品室内部的三个流通池。在另一半测量中，手动转移至比色皿中，然后转移至分光光度计中。



图 1. 连接至 Cary 3500 多池紫外-可见分光光度计的 Cary Sipper 蠕动泵附件

将蠕动泵入口管插入包含待分析溶液的 15 mL Falcon 管中，进行蠕动泵测量。然后将溶液泵入单个 10 mm 光程的 390 μL 石英流通池中。在两次扫描之间，使用 Milli-Q 水冲洗流动池，以免交叉污染。将每个标样和样品重复测量三次。

Cary Sipper 蠕动泵在 80 rpm 的固定转速下运行。在测量之前将溶液泵送到流通池中所需的时间称为“填充”时间。随后的无泵送时间段（使溶液静置去除气泡及颗粒干扰）称为“保持”时间。最后设定蠕动泵将冲洗溶液泵送通过流通池的持续时间，称为“冲洗”时间。所有这三个时间均在 Cary UV 工作站软件中进行设置，并可以另存为已存储方法的一部分。

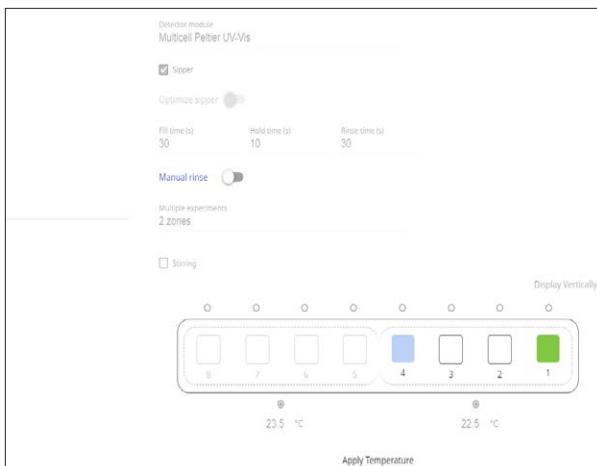


图 2. Cary UV 工作站软件内 Cary Sipper 蠕动泵附件的控制

对于另一半测量，使用标准 10 mm 光程的 3.5 mL 石英比色皿。每次测量后，用样品溶液手动填充这些比色皿，并用 Milli-Q 水进行冲洗。将每个标样和样品重复测量三次。

在两种仪器设置下，使用相同的标样和样品溶液，以便直接比较结果。

使用 Cary UV 工作站软件中的“浓度”应用程序进行测量。该应用程序提供了一种创建校准曲线并基于校准曲线确定样品浓度的方法。

每个标样和样品的波长扫描（使用表 3 中列出的参数）在 350–200 nm 之间进行。样品经过 0.1 mol/L HCl 的基线校正。利用 243 nm 下的峰进行定量分析。然后利用各种标样的吸光度值创建校准曲线。使用相同的仪器参数测量样品，并对每个样品中的维生素 C 含量进行定量分析。

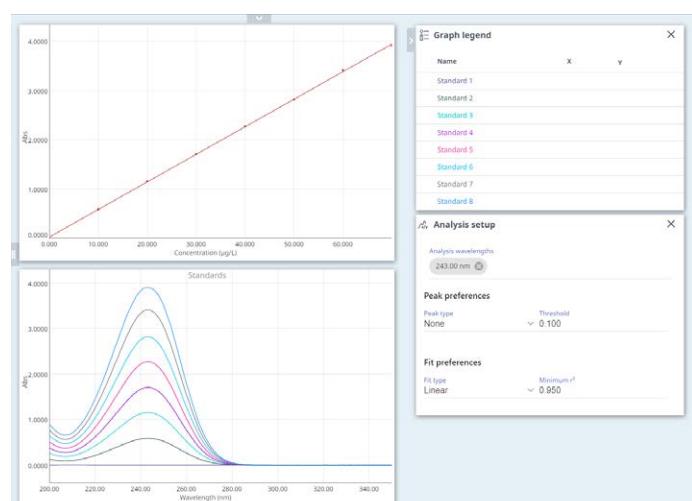


图 3. 每个标准溶液的波长扫描。利用 243 nm 下的吸光度创建校准曲线，随后进行样品定量分析

由于使用 Cary Sipper 蠕动泵可能快于手动填充比色皿，因此执行一系列测量以量化节省的时间。用四种不同的方式测量 30 个溶液（10 个标样和 20 个样品）：

1. 不用蠕动泵，使用单个 3.5 mL 比色皿。每次测量时手动填充、清空和冲洗比色皿

2. 不用蠕动泵，使用三个标准 3.5 mL 比色皿。每次测量时手动填充、清空和冲洗比色皿。使用 Cary 3500 多池仪器的同步测量功能，同步测量所有三个比色皿
3. 用蠕动泵泵送至单个流通池
4. 用蠕动泵泵送至三个流通池

使用表 4 所示的仪器参数进行测量。

表 3. 用于定量测量的仪器参数

参数	设置
波长范围 (nm)	200–350
光谱带宽 (nm)	1
平均时间 (s)	0.1
数据间隔 (nm)	1
流通池体积 (μL)	390
填充时间 (s)	30
保持时间 (s)	10
冲洗时间 (s)	30

表 4. 用于分析速度比较测量的仪器参数

参数	设置
波长范围 (nm)	200–350
光谱带宽 (nm)	1
平均时间 (s)	0.1
数据间隔 (nm)	1
流通池体积 (μL)	390
填充时间 (s)	15
保持时间 (s)	5
冲洗时间 (s)	15

结果与讨论

校准线性

使用 Cary Sipper 蠕动泵由八个标样生成校准曲线的 R^2 值为 0.9997，而通过比色皿测量生成曲线的 R^2 值为 0.9998。Cary 3500 具有超过 3 Abs 的优异光度测量线性，能够测量高浓度液体样品并获得准确的光度测量结果。

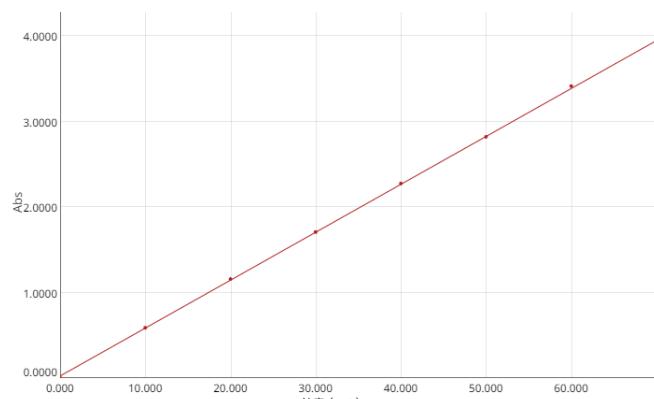


图 4. 使用手动填充的石英比色皿生成的校准曲线

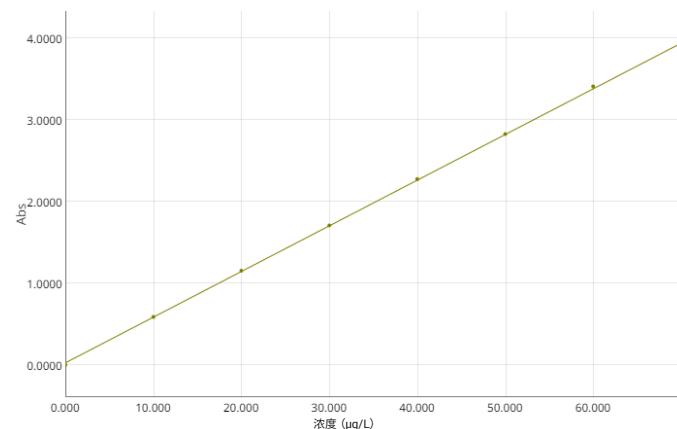


图 5. 使用 Cary Sipper 蠕动泵生成的校准曲线

测量精度

在两种仪器设置下，对 20 个样品溶液分别测量 3 次。使用 Cary Sipper 蠕动泵时，将样品溶液泵入流通池中，进行测量，然后替换为冲洗溶液，最后再次用相同的样品溶液填充流通池。对于 20 个样品中的每个样品，将该过程重复 3 次。使用 3.5 mL 比色皿时，用样品填充比色皿，进行测量，冲洗，然后用另一份相同的样品重新填充。对于 20 个样品中的每个样品，将该过程重复 3 次。

如表 5 所示，两组结果均具有很高的精密度，%RSD 值远低于药典方法中通常规定 2% 的要求。所有六次测量结果的 %RSD 为 0.1869%。

表 5.由 20 个样品测量得到的吸光度数据，其中每个样品在各种仪器设置下测量 3 次最后一列 %RSD 是所有六次测量结果的精密度。

样品	利用蠕动泵得到的测量值		利用手动比色皿得到的测量值		%RSD n = 6
	平均值 (n = 3) (Abs)	%RSD	平均值 (n = 3) (Abs)	%RSD	
1	2.2091	0.0775	2.2153	0.0197	0.1470
2	2.4895	0.3394	2.4763	0.0400	0.3313
3	3.8029	0.0462	3.7888	0.1150	0.1988
4	1.5972	0.1706	1.5912	0.0142	0.2119
5	0.7646	0.0991	0.7666	0.0190	0.1435
6	2.4438	0.0372	2.4353	0.0398	0.1766
7	3.0153	0.1773	3.0050	0.0315	0.1997
8	2.1405	0.2443	2.1333	0.0921	0.2277
9	3.6846	0.1805	3.6816	0.0161	0.1121
10	1.0538	0.1516	1.0581	0.0394	0.2241
11	2.4493	0.2714	2.4367	0.0441	0.3037
12	2.4525	0.2948	2.4351	0.0256	0.3941
13	0.8735	0.1588	0.8722	0.0330	0.1209
14	3.1695	0.2032	3.1676	0.0525	0.1248
15	2.7457	0.1754	2.7409	0.0389	0.1364
16	1.7695	0.2143	1.7631	0.0086	0.2186
17	2.0182	0.1966	2.0190	0.0207	0.1160
18	1.7909	0.1568	1.7863	0.1621	0.1818
19	2.3171	0.0425	2.3193	0.0129	0.0539
20	1.1099	0.0229	1.1098	0.1987	0.1157

表 6.使用两种仪器设置计算出的各样品浓度。由样品浓度计算每片中维生素 C 的含量，并将其与标示的每片 1000 mg 的标签值进行比较（% 差值）

样品 编号	蠕动泵设置			比色皿设置		
	实测浓度 (mg/L)	维生素 C 计算含量 (mg)	计算值与 标签值之差 (%)	实测浓度 (mg/L)	维生素 C 计算含量 (mg)	计算值与 标签值之差 (%)
1	39.00	988.9	1.1	39.12	991.9	0.8
2	44.01	985.1	1.5	43.78	980.0	2.0
3	67.46	1021.3	2.1	67.22	1017.6	1.7
4	28.07	993.6	0.6	27.97	990.2	1.0
5	13.21	1019.7	1.9	13.25	1023.2	2.3
6	43.19	1017.2	1.7	43.05	1013.8	1.4
7	53.40	1023.9	2.3	53.22	1020.6	2.0
8	37.78	968.7	3.2	37.65	965.6	3.6
9	65.35	990.0	1.0	65.30	989.4	1.1
10	18.37	1028.9	2.8	18.46	1033.8	3.3
11	43.29	992.6	0.7	43.07	987.6	1.3
12	43.35	1018.4	1.8	43.05	1011.3	1.1
13	15.15	982.2	1.8	15.13	981.2	1.9
14	56.15	987.1	1.3	56.12	986.6	1.4
15	48.58	995.2	0.5	48.51	993.7	0.6
16	31.15	950.1	5.3	31.05	946.9	5.6
17	35.59	1004.6	0.5	35.62	1005.3	0.5
18	31.53	1028.7	2.8	31.46	1026.3	2.6
19	40.93	992.5	0.8	40.98	993.7	0.6
20	19.37	1024.1	2.4	19.38	1024.4	2.4

样品定量分析

根据比尔-朗伯定律，用每个样品三个吸光度读数的平均值和校准曲线确定每个样品溶液中维生素 C 的浓度。然后利用该浓度计算所测量的各片中维生素 C 的重量。结果如表 6 所示。使用蠕动泵设置计算出的重量与标示重量之间的平均偏差为 1.8%，偏差范围为 0.5%–5.3%。使用比色皿测得的相同 20 个样品的平均偏差为 1.9%，偏差范围为 0.6%–5.6%。结果完全符合 USP 中规定的 $\pm 10\%$ 可接受标准^[1]，表明该片剂符合其标签要求。

测量时间

与手动填充比色皿相比，Cary Sipper 蠕动泵可节省大量时间。如表 7 所示，与使用单个标准比色皿逐个测量样品相比，使用带 3 个流通池的蠕动泵将测量 30 个样品的时间缩短了 65%。在不使用蠕动泵的情况下，与对单个比色皿进行三次填充、排空和重新填充相比，同时测量三个比色皿可节省 24% 的时间。与在 Cary 3500 多池仪器中同时手动使用三个比色皿相比，使用蠕动泵与三个流通池可以使测量速度加快 54%。

表 7. 采用四种不同仪器设置测量 30 个样品所需的时间

操作模式	测量时间 $n = 30$	时间缩短 (%) (与采用单个比色皿的 手动处理相比)
手动比色皿处理		
1. 双池模块 (1 个样品比色皿)	21 min 30 s	
2. 多池模块 (3 个样品比色皿)	16 min 26 s	24%
使用蠕动泵 填充时间 (15 s), 保持时间 (5 s), 冲洗时间 (15 s)		
3. 1 个流通池	19 min 32 s	9%
4. 3 个流通池	7 min 30 s	65%

参考文献

1. Dietary Supplements Compendium, 2019, United States Pharmacopeia, US Government Printing Office: Washington, DC, 2019

结论

本研究对使用 Cary Sipper 蠕动泵泵送溶液以在紫外-可见分光光度计中进行测量与手动填充和排空标准比色皿进行了比较。结果证明，蠕动泵与手动测量的精度相当，且测量速度加快 65%。

使用两种不同设置测得的样品吸光度非常一致。所有六次测量结果的 %RSD 为 0.1869，表明该方法的精密度很高。

当使用 Cary 3500 紫外-可见分光光度计的同步测量功能同步测量三个标准比色皿样品时，比逐个测量三个样品的速度加快了 24%。

蠕动泵设置通过仪器软件进行控制，并可作为仪器方法的一部分进行存储。这样可以确保在分析中采用一致的设置。

结果证明，配备 Cary Sipper 蠕动泵的 Cary 3500 紫外-可见分光光度计是常规测量多个液体样品的理想仪器。它提供了更快的分析速度，并在工作流程中节省了大量的时间。Cary 3500 具有宽吸光度范围，可减少对样品稀释的需要，与使用比色皿手动测量样品相比，可提供更高的精密度和准确度。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE.9264236111

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2020
2020 年 5 月 1 日, 中国出版
5994-1951ZHCN

