

动物样品中酚类化合物测定的气液色谱法*

陈 凡

史 志 诚

(中国科学院西北水土保持研究所)

(西北农学院畜牧兽医系研究生)

提 要

本文报道了制备酚类化合物的三甲基硅(TMS)衍生物和利用气液色谱测定动物样品中的酚类化合物的方法。结果表明,将栎树叶和邻苯三酚饲喂给动物后,尿液和胃液中分别检出一些低分子的酚类化合物。

在众多的酚类化合物中,有一些对动物具有毒性。植物中含有的水解型丹宁是多元酚类化合物,在动物采食后可能经代谢变为一系列低分子的酚类化合物^[1]。因而检测动物尿液和胃液中的酚类物质,有利于了解它们的代谢途径,为研究中毒机理提供方法。酚类化合物的检测方法虽然较多,但气液色谱法的简便、快速和高灵敏度是其他方法无法比拟的。我们采用制备糖类的三甲基硅(TMS)衍生物的方法^[2],使之应用到制备酚类的挥发性衍生物上,然后用气液色谱法测定,并分别对尿中酚类化合物的提取方法,色谱分离条件,定性定量方法等进行了试验,结果判明,牛人工饲喂栎树叶和羊饲喂邻苯三酚后尿液和胃液中含有从一元到三元各种酚类化合物。

一、实验方法

1. 试剂:

六甲基二硅胶,实验试剂,上海试剂一厂出品。

三氟乙酸,分析纯,北京化工厂出品。

苯酚,色标。

间苯二酚,对苯二酚,邻苯三酚, α -萘酚, β -萘酚,均为分析纯。

邻苯二酚,3,5-甲苯二酚,间苯三酚,均为国外进口。

百里酚。

2. 样品处理:

尿液或胃液 10—50 毫升,在 60℃ 水浴上浓缩至干燥,而后分别用乙醚和氯仿(或无水乙醇)各提取 2 次,合并提取液,离心,除去杂质,最后真空抽干(或水浴干燥)。

3. 衍生物制备:

向已知的酚类标样或干燥的分析样品中加入适量的氯仿使之溶解,加入 100 微升的六甲基二硅胶,摇匀,然后加入 10 微升的三氟乙酸,塞上塞子充分摇匀,放置十分钟

* 本文承蒙西北农学院牧医系段得贤教授、化学教研组阎钟付教授和动物生化教研组鲁安太老师审阅,特此一并致谢。

后取样进行色谱分析。

上述的衍生物试剂用量只适用于酚类总量大约在 15 毫克以下，如超过此标准，按比例增加试剂用量。

提取的干燥样品混有一定的杂质，干扰酚的定性，影响测定结果，除在提取时注意克服外，较好的办法是在加入三氟乙酸放置十分钟后，加入适量的蒸馏水，摇匀，然后静置使其分层，吸取氯仿层注入色谱仪。

4. 色谱条件：

色谱仪： SP—02 型

检测器： 氢焰检测器

色谱柱：	I	II
柱 长：	1 米	2 米
内 径：	4 毫米	
固定相：	5 % Apiezon. L	10 % 丁二酸乙醇聚酯
柱 温：	160 °C	150 °C
气化温：	~280 °C	~280 °C
载 气：	40 ml/分	40 ml/分
空 气：	I (预混) 45 ml/分	45 ml/分
	II 700 ml/分	700 ml/分

二、结 果

1. 定性：在选定的两种固定相上，人工配制的十一种酚类化合物都得到顺利的分
离，表 1 是这些酚类的相对保留值。从实验中得知丁二酸乙醇聚酯的分离效果最佳，
而且样品中的杂质对定性影响很小，图 1 是这十一种酚在丁二酸乙醇聚酯柱上的色谱
图。

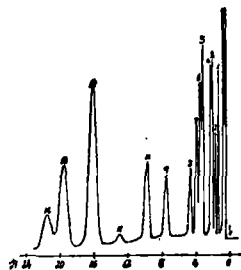


图 1 十一种人工配制的酚的 TMS 衍生物的色谱图
(色谱条件为柱 II，谱峰号见表 1)

表 1 各种酚的 TMS 衍生物的相对保留值

酚的三甲基 硅衍生物	相 对 保 留 值				
	柱 I			柱 II	
	谱峰号	150℃	160℃	谱峰号	150℃
苯 酚	1	0.34	0.36	1	0.58
对 甲 酚	2	0.56	0.58	2	0.75
邻苯二酚	4	1.00	1.00	4	1.00
百 里 酚	5	1.06	1.10	3	0.92
间苯二酚	6	1.36	1.31	5	1.43
对苯二酚	7	1.53	1.48	6	1.56
3,5-甲苯二酚	8	1.87	1.76	7	1.75
邻苯三酚	9	2.64	2.41	8	2.01
间苯三酚	10	4.67	3.85	9	3.43
				10	4.46
α -萘酚	11	5.26	4.50	12	7.38
β -萘酚	12	6.06	5.14	13	8.93
未知 1	3	0.70	0.72		
未知 2				11	6.41
未知 3				14	9.84
邻苯二酚 tr		2'51"	2'23"	2'11"	

2. 定量：在整个研究工作中，酚的总量用化学法测定，本法主要是剖析分析样品中有那些酚类，但为了确定各种酚在动物体内的变化情况而进行了一些定量工作。在测定过程中，采用内标法定量，即在样品中加入一定量的 α -萘酚，按下列公式计算其它各种酚的含量：

$$W_i = \frac{A_i \cdot W_s \cdot f_s}{A_s}$$

其中: A_1, A_2 分别为 α -萘酚和需定量酚的峰面积。
 W_1, W_2 分别为 α -萘酚和需定量酚的重量。
 f_w 为需定量酚与 α -萘酚的相对重量校正因子。

表2列出了9种酚在丁二酸乙二醇聚酯柱上测定的以 α -萘酚为标准的相对重量校正因子, 这些校正因子是用已知的各种酚在前述的实验条件下自行测得的。

3. 在试验中, 曾用栎树叶饲喂牛, 然后分不同时间测定尿液中的酚。实验表明, 在饲喂栎树叶前, 尿液中基本上没有酚, 喂后第五天开始, 尿液中的酚逐渐增加。图2是牛尿液中的酚类物质的色谱图。经鉴定有苯酚、邻苯二酚、对苯二酚、邻苯三酚和间苯三酚, 其它谱峰尚未鉴定出来。

表2 几种酚的相对重量校正因子

化合物名称	f_w
苯酚	0.53
对甲酚	0.46
邻苯二酚	0.42
间苯二酚	0.44
对苯二酚	0.50
3,5-甲苯二酚	0.56
邻苯三酚	0.41
间苯三酚	1.20
β -萘酚	0.86
内标物 (α -萘酚)	1.00

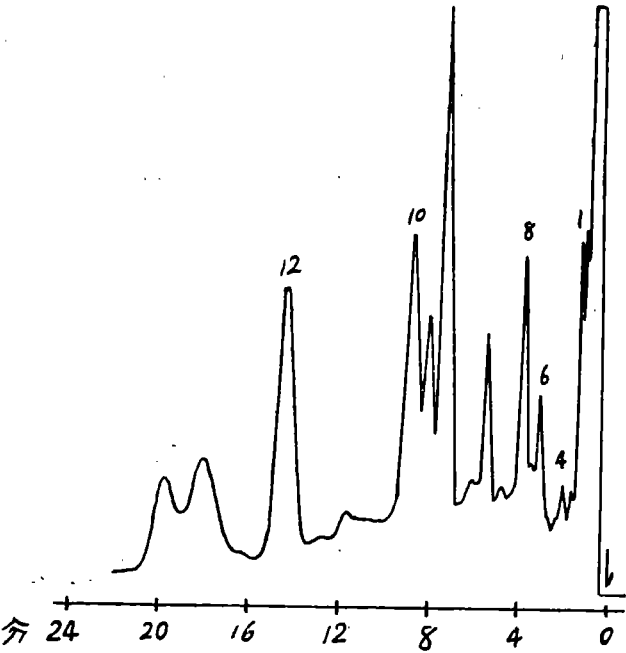


图2 牛饲喂栎树叶后尿液中酚的TMS衍生物的色谱图
(色谱条件为柱II, 色谱峰编号见表1, 其中 α -萘酚为内标物 0.2mg, 其它为未知峰)

给羊喂以邻苯三酚后分别取瘤胃和四胃的胃液，作酚的色谱图，结果在瘤胃液中出现间苯二酚，在四胃液中出现苯酚和其它一元酚（见图3）。带苯环的氨基酸在胃液中也能转变成酚类，鉴于本试验饲喂的饲料游离氨基酸量很少，故对该试验结果影响不大。有苯环氨基酸转变为酚的量，有待今后研究区分。

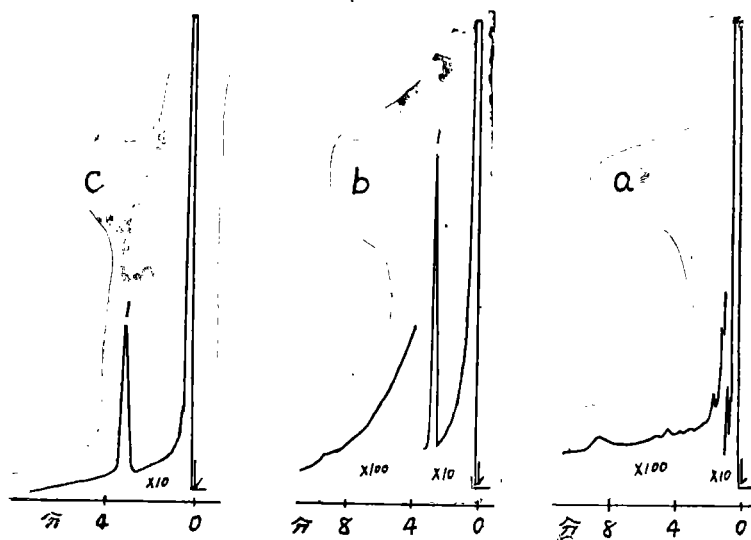


图3 喂邻苯三酚后羊的胃液中酚的TMS衍生物的色谱图
(a 四胃液, b、c 瘤胃液。色谱条件: a、b为色谱柱I, c 为色谱柱II, 谱峰1为间苯二酚)

三、讨 论

1. 用六甲基二硅胺——三氟乙酸制备酚类化合物的TMS衍生物，方法简单可靠。除间苯三酚外，其余的一元、二元、三元酚都只产生一种衍生物，间苯三酚只是在衍生物试剂用量不足的情况下才产生二种衍生物并在聚酯色谱柱上分离开。这一方法制备的酚类衍生物是很稳定的，可在冰箱中长期保存使用。

2. 本文所述的色谱条件，无法分离除苯酚外的一元酚，是其不足之处。样品燃烧后产生的二氧化硅沉积在检测器上，影响仪器的稳定，需经常清洗。

3. 由于各种酚类在不同的溶剂中的溶解度不同，加之动物材料样品中杂质较多，影响到提取，以一元酚最为明显，因而定量还有一定问题，尚须改进。

参 考 文 献

[1] 史忠诚：家畜栎属植物嫩叶中毒机理的研究 I. 病牛尿液中酚性物质的鉴定与气相色谱分析 陕西省畜牧兽医学学会家畜中毒病学术报告会论文 1981.5.

- [2] T.Toba, S.Adachi: Gas—Liquid Chromatography of Trimethylsilylated Disaccharide Oximes 《J.Chromatogr.》 Vol.135 No.2 411—417 1977
- [3] Ira. T.Clark, 《J.Gas.Chromatogr.》 53. 1968
- [4] W.A.Dietz, 《J.Chromatogr.Sci.》 423 1972
- [5] 吴胜哉: 甲酚异构体的气相色谱分析《分析化学》5. 412. 1975

Gas-liquid Chromatography on Determination of the Phenolic Compounds in Samples From Animals

Chen Fan

(Northwestern Institute of Soil
and water Conservation, Academia
Sinica)

Shi Zhicheng

(Dept. of Animal Husbandry
and veterinary, Northwestern
College of Agriculture)

Abstract

The methods of preparing TMS derivatives of the phenolic compounds and detecting them in samples from animals by gas-liquid chromatography were reported in this paper. The results obtained have showed that some lowmolecular phenolic compounds were present in urine and stomach-liquid samples from animals fed with oak leaflet or pyrogallol.