

【论 著】

仪器分析法测定复方化学消毒剂中
邻苯二甲醛的含量王 萍^{1,2}, 李 琳^{1,3}, 赵立文^{1,2}, 周香玉^{1,2}, 李 疆^{1,2}, 杨 屹^{1,3}, 丁晓静^{1,2}

(1 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 2 北京市预防医学研究中心;

3 北京化工大学理学院)

摘要 目的 建立复方化学消毒剂中邻苯二甲醛(OPA)含量测定方法。**方法** 采用液相色谱、气相色谱和毛细管电泳法等 3 种仪器分析技术,对复方消毒剂中 OPA 含量测定结果进行比较和方法验证。**结果** 在 3 种仪器测定方法中,OPA 的峰面积与一定范围内的质量浓度呈良好线性关系。3 种仪器分析法检出限依次为液相色谱法 0.3 $\mu\text{g/g}$ 、气相色谱法 2 $\mu\text{g/g}$ 、毛细管电泳法 2.5 $\mu\text{g/g}$ 。3 种仪器方法定量限依次为液相色谱法 1 $\mu\text{g/g}$ 、气相色谱法 6 $\mu\text{g/g}$ 、毛细管电泳法 8 $\mu\text{g/g}$ 。空白样品不同质量浓度加标回收率范围分别为液相色谱法 88.1% ~ 99.2%,气相色谱法 90.0% ~ 104.0%,毛细管电泳法 85.2% ~ 100.2%。相对标准偏差(RSD)均小于 5%。**结论** 本研究建立的 3 种仪器分析法均可满足复方化学消毒剂中 OPA 含量准确测定的检测需求,测定结果无显著性差异,实验室可根据仪器设备情况选用相应的分析方法。

关键词 液相色谱;气相色谱;毛细管电泳;邻苯二甲醛;复方化学消毒剂

中图分类号:R187.2

文献标识码:A

文章编号:1001-7658(2019)07-0481-04

DOI:10.11726/j.issn.1001-7658.2019.07.001

Determination of o - phthalaldehyde in compound chemical disinfectant by instrumental analysis

WANG Ping^{1,2}, LI Lin^{1,3}, ZHAO Li - wen^{1,2}, ZHOU Xiang - yu^{1,2}, LI Jiang^{1,2}, YANG Yi^{1,3}, DING Xiao - jing^{1,2}

(1 Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013; 2 Beijing Research Center for Preventive Medicine; 3 College of Science, Beijing University of Chemical Technology, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of o - phthalaldehyde (OPA) in compound chemical disinfectant. **Methods** The content of OPA in compound chemical disinfectant was determined by liquid chromatography (LC), gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE), respectively. The results for the three kinds of instruments were compared and verified. **Results** Under the three kinds of instrument conditions, the peak areas of OPA showed a good linear relationship with the mass concentration in a certain range. The limits of detection for the three kinds of instruments were 0.3 $\mu\text{g/g}$ for LC, 2 $\mu\text{g/g}$ for GC and 2.5 $\mu\text{g/g}$ for CE. The limits of quantitation for the three kinds of instruments were 1 $\mu\text{g/g}$ for LC, 6 $\mu\text{g/g}$ for GC and 8 $\mu\text{g/g}$ for CE. The recoveries of blank samples spiked at different mass concentrations were ranging from 88.1% to 99.2% for LC, 90.0% to 104.0% for GC and 85.2% to 100.2% for CE. The relative standard deviations (RSD) were all lower than 5%. **Conclusion** The three instrumental methods established in this study can meet the needs for the accurate determination of OPA content in compound chemical disinfectant. There was no significant difference between the results obtained by the three methods. The appropriate analytical methods can be selected according to the laboratory equipment.

Key words liquid chromatography; gas chromatography; capillary electrophoresis; o - phthalaldehyde; compound chemical disinfectant

邻苯二甲醛(OPA)是一种较新型的消毒剂,对

细菌繁殖体、真菌、分枝杆菌、病毒和细菌芽孢等都有很强的杀灭作用,尤其对耐戊二醛结核分枝杆菌有良好的杀灭作用,与传统的消毒剂戊二醛相比,具有广谱、高效、低腐蚀、刺激性小和使用浓度低等优点^[1]。OPA多用于医疗器械高水平消毒,特别是在

【作者简介】王萍(1965-),女,北京人,本科,主任技师,从事卫生检验工作。

【通讯作者】丁晓静,Email:dxj666@aliyun.com

各种内镜消毒中得到很好的应用^[2]。目前,消毒剂中 OPA 的含量测定方法有滴定法^[3,4]、紫外分光光度法^[4-6]、气相色谱法^[7,8]、液相色谱法^[4,6,8-10]和毛细管电泳法^[11]。滴定法可准确测定单方消毒剂中 OPA 含量,但对于目前最常用的复方消毒剂中 OPA 含量的测定则不能准确定量^[4]。同样,紫外分光光度法也可用于单方消毒剂的测定,但由于复方消毒剂中常加入有紫外吸收的季铵盐等有效成分,因此紫外分光光度法往往测定结果偏高^[4,6],而 2 种色谱法和毛细管电泳法则可以很好地解决复方消毒剂中的干扰问题,但上述 3 种方法的检测结果一致性方面未见文献报道。本研究对文献报道的气相色谱法^[7]、液相色谱法^[9]和毛细管电泳法^[11]分别进行了优化,建立了简便、快速和准确的测定 OPA 的 3 种新方法,并用优化后的 3 种方法对 9 件样品同时进行测定,取得了一致性的检测结果。现将验证结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验样品来自北京某医院和国内两家企业生产的复方邻苯二甲醛产品,标示含量为 5 000 mg/L ~ 6 000 mg/L,共 9 件产品。OPA 标准品为国外进口试剂,纯度 >99%。

试验仪器有 HP 6890 型气相色谱系统, Waters 2695 型高效液相色谱仪配 2998 二极管阵列检测器, P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪配备二极管阵列检测器,均为进口产品; Millipore Milli - Elix/RiOs 型超纯水器, DB - WAX 聚乙二醇毛细管色谱柱(30.0 m × 0.25 mm × 0.25 mm), C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm、粒径 5 μm),均为国外进口产品;未涂层熔融石英毛细管(国产)。

试剂除无水乙醇和色谱纯乙腈外,冰乙酸、硼砂、氢氧化钠、十二烷基硫酸钠(SDS)和聚乙二醇 20 000 均为分析纯,均为市售产品。

1.2 试验方法

1.2.1 气相色谱法 ①标准溶液的配制:称取一定量的 OPA 标准品,用无水乙醇配制质量浓度为 1 000 mg/L 的标准溶液,然后再用无水乙醇在 7 mg/L ~ 200 mg/L 范围内将其稀释成标准系列浓度。②样品溶液的配制:将样品用无水乙醇稀释 100 倍,或者按照样品标识稀释至标准系列范围内。③气相色谱条件:色谱柱用 HP DB - WAX 毛细管色谱柱(30.0 m × 0.25 mm × 0.25 mm);检测器为 FID 检测器;柱温 180 ℃;汽化室温度 210 ℃;检测器温度 230 ℃;流速 1.0 ml/min;分流比为 50 : 1;氢气

30 ml/min,空气 400 ml/min,氮气 40 ml/min;进样体积为 1 μl。④样品测定:在选定的气相色谱条件下,将标准系列及样品溶液依次注入气相色谱仪,用外标法计算出样品中 OPA 含量。

1.2.2 液相色谱法 ①样品稀释液的配制:往 350 ml 浓度为 9 000 mg/L 的冰乙酸中加入 150 ml 的乙腈制得样品稀释液。②标准溶液的配制:称取一定量的 OPA 标准品,用样品稀释液配制质量浓度为 1 000 mg/L 的标准溶液,然后再用样品稀释液在 10 mg/L ~ 200 mg/L 范围内将其稀释成标准系列浓度。③样品溶液的配制:将样品用样品稀释液稀释 100 倍,或者按照样品标识稀释至标准系列范围内。④液相色谱条件:色谱柱为 Shiseido C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈;流动相 B 为水, V(A) : V(B) = 30 : 70。进样量为 5 μl;流速 1.0 ml/min;柱温为 30 ℃;二极管阵列检测器波长为 254 nm。⑤样品测定:在选定的液相色谱条件下,将标准系列及样品溶液依次注入液相色谱仪,用外标法计算出样品中 OPA 含量。

1.2.3 毛细管电泳法 ①分离缓冲液的配制:分别称取硼砂 1.049 g、SDS 1.009 g 和 PEG 20 000 0.75 g,置于同一塑料离心管中,加 40 ml 水溶解,再加水至 50 ml 刻度,混匀,配制成含有 55 mmol/L 硼砂、70 mmol/L SDS 和 15 g/L PEG 20 000 的分离缓冲溶液。②样品稀释液的配制:取 1.44 ml 冰乙酸用水稀释至 500 ml,配制成 50 mmol/L 的乙酸溶液。③样品溶液的配制:将样品用样品稀释液稀释 100 倍,或者按照样品标识稀释至标准系列范围内。④标准溶液的配制:称取一定量的 OPA 标准品,用样品稀释液配制质量浓度为 1 000 mg/L 的标准溶液,然后再用样品稀释液在 8 mg/L ~ 200 mg/L 范围内将其稀释成标准系列浓度。⑤电泳条件:分离柱为未涂层熔融石英毛细管, 50.2 cm(有效长度为 40 cm);电压为 17 kV;进样压力 3.448 kPa,进样时间 12 s;检测波长 214 nm;清洗程序包括新装毛细管在使用前分别用 1 mol/L NaOH 溶液冲洗 20 min,水冲洗 5 min,分离缓冲溶液冲洗 5 min。每次进样前依次用 1 mol/L 氢氧化钠冲洗 1.5 min,水冲洗 1.5 min,分离缓冲溶液冲洗 1.5 min。⑥样品测定:在选定的电泳条件下,将标准系列及样品溶液依次注入毛细管电泳仪,用外标法计算出样品中 OPA 含量。

2 结果

2.1 方法学参数的确定

在选定的最佳仪器条件下,以 OPA 的质量浓度

为横坐标,峰面积(CE 方法为校正峰面积)为纵坐标,绘制校准曲线。检出限和定量限分别以噪音的 3 倍和 10 倍计算。3 种仪器方法 OPA 校准曲线的线性范围、回归方程、相关系数(r)、检出限和定量限详见表 1。结果显示,3 种方法在 10 mg/L ~ 200 mg/L 范围内线性良好,检出限以液相色谱法最低,气相色谱法和毛细管电泳法相差不大,3 种方法检出限及定量限均可满足日常检测的要求。

表 1 3 种检测方法的参数确定结果

检测方法	线性 回归方程	相关 系数 (r)	线性 范围 (mg/L)	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
液相色谱法	$y = 0.273x - 0.046$	0.999 8	7.0 ~ 200	2.0	7.0
气相色谱法	$y = 5.84 \times 10^3 x - 2.88 \times 10^3$	0.999 9	1.0 ~ 200	0.3	1.0
毛细管电泳法	$y = 38.62x - 51.80$	0.999 8	8.0 ~ 200	2.5	8.0

2.2 方法的精密度与准确度

在不含 OPA 的空白样品中分别加入一定量的 OPA 标准进行加标,回收率试验结果表明,3 件空白样品回收率范围液相色谱法为 88.1% ~ 99.4%,气相色谱法在 90.0 % ~ 104.0 %,毛细管电泳法为 85.2 % ~ 100.2% (表 2)。相对标准偏差(RSD)气相色谱法最大,其次为毛细管电泳法,液相色谱法最低,但均 < 5 %。

表 2 3 种方法加标回收率结果 (n = 6)

检测方法	样品 编号	加标量 (mg/L)	平均回收率 (%)	回收率范围 (%)	相对标准 偏差 (%)
气相色谱法	1#	0.5	96.7	90.0 ~ 102.0	4.5
	2#	0.5	98.0	90.0 ~ 102.0	4.7
	3#	0.5	97.3	92.0 ~ 104.0	5.0
液相色谱法	1#	20	93.9	90.5 ~ 95.8	2.0
		40	95.5	93.2 ~ 99.4	2.6
		80	94.0	91.4 ~ 95.8	1.9
	2#	20	91.4	90.1 ~ 93.0	1.0
		40	89.6	88.1 ~ 91.1	1.4
		80	96.6	95.2 ~ 98.1	1.1
	3#	20	97.7	95.0 ~ 99.2	1.6
		40	96.4	91.7 ~ 98.3	2.9
		80	92.7	91.0 ~ 84.1	1.3
毛细管电泳法	1#	20	90.1	87.8 ~ 95.5	3.6
		40	96.9	94.6 ~ 98.3	1.4
		80	97.7	96.8 ~ 100.2	1.3
	2#	20	94.6	91.6 ~ 100.2	3.1
		40	95.0	90.4 ~ 99.2	4.1
		80	98.4	97.9 ~ 99.2	0.5
	3#	20	90.6	85.2 ~ 94.5	4.2
		40	96.6	94.9 ~ 99.0	1.6
		80	97.6	96.0 ~ 99.7	1.3

注:气相色谱法加标量均为 0.5%。

2.3 样品测定结果

分别用 3 种仪器方法对 9 件产品进行 3 次平行测定,结果表明,相对标准偏差均 < 5%,平均值测定结果见表 3。用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,3 种方法测定结果差异无统计学意义, F 值 = 0.218, P 值 = 0.806。

表 3 3 种检测方法测定产品中 OPA 含量

样品 编号	3 种方法测定结果(mg/L)		
	气相色谱法	液相色谱法	毛细管电泳法
1	6 000	5 400	6 100
2	5 300	5 300	5 200
3	6 000	5 900	5 900
4	4 900	5 100	5 000
5	3 800	4 100	4 500
6	4 400	4 600	4 800
7	6 000	5 200	6 000
8	3 300	4 200	4 200
9	4 900	5 100	4 900

3 讨论

文献方法^[7,8]使用 50% 乙醇 - 水溶液稀释样品,以避免 OPA 受乙醇峰的干扰而影响测定。但一般使用毛细管柱会尽量避免样品中含水,因为在一般的溶剂中,水具有最大的气化膨胀体积,易造成样品蒸汽膨胀出衬管形成“倒灌”直接影响重现性,另外由于水能够形成 3 维空间结构的强氢键极性化合物,与毛细管柱内表面的固定相发生亲和作用,使柱效下降。故本研究将 50% 乙醇 - 水溶液更换为无水乙醇,并同时将分流比由文献使用的 30 : 1 改为 50 : 1,这样就避免了乙醇的干扰,获得了满意的结果。

文献报道的液相色谱法^[8,9]用水与一定比例的乙腈作为样品稀释液配制 OPA 标准,OPA 不稳定,需要放置 2 h。本研究使用纯乙腈配制 OPA,尽管灵敏度高且峰形对称,但稳定性依然不好。经过对 OPA 在酸性(乙酸)条件的稳定性进行考察,发现在乙酸条件下 OPA 的稳定性最好,1 h 左右就能够稳定,但峰形较差,因此在乙酸中加入一定量的乙腈,对不同比例的乙腈和乙酸混合溶液溶解 OPA 进行稳定性试验,最终发现 30% 乙腈和 70% 150 mmol/L 乙酸作为 OPA 样品稀释液,峰形和稳定性均可满足分析要求。为进一步考察样品稀释液稀释样品后 OPA 的稳定性,将 9 件样品用 OPA 样品稀释液稀释 100 倍,分别放置一定的时间后进行 OPA 测定,测定结果显示,1 h 后 9 个样品中的 OPA 趋于稳定,比文献^[8,9]的稳定时间减少了 1 h。

离子,对环境影响较小,在水中不会产生毒副产物,其消毒高效、安全、无残留的优势适用于动物养殖。

NDV 与 AIV 均为有囊膜的病毒,低中效消毒剂就可以达到消毒效果^[8]。NDV 病毒虽然只有一个血清型,但不同毒株之间毒力差异较大,致病性千差万别,经过多年疫苗免疫,目前强毒株在禽群内已很少分离到,临床病例多为非典型的温和症状。尽管如此,为稳妥起见本试验依旧选择强毒株 NDV,研究表明,过硫酸氢钾复合粉对禽流感 H9N2 病毒具有较好的杀灭效果,在低浓度短时间内即可将其全部灭活,而新城疫强毒株 1 250 mg/L 稀释浓度 10 min 及以上杀灭效果良好,想要短时间内灭活新城疫强毒则需要提高消毒剂浓度,这与王娟等研究结果一致^[9]。总之,过硫酸氢钾复合粉是一种安全有效的消毒剂,值得在家禽养殖场所推广使用。

本试验所得数据仅为试验条件下对 2 种病毒的杀灭效果进行评价,对其他病原体的杀灭浓度及在规模化养禽场中的应用效果还需结合周边环境、流行的病原微生物种类及性价比等因素进一步验证。

(上接第 483 页)

本实验室曾以胶束电动毛细管色谱分离模式,以 20 mmol/L 硼砂 + 80 mmmol/L SDS 为分离缓冲溶液,实现了 OPA、对氯间二甲苯酚和三氯生的同时分离与测定^[11]。用此方法对 9 件 OPA 的样品进行测定时发现,有的样品存在干扰,尽管改用 254 nm 进行检测可消除部分干扰,但干扰依然存在,且灵敏度显著下降。为此我们对分离缓冲溶液进行了优化,加入了经常被用于改善分离的 PEG 20 000^[12,13],并运用三因素七水平的均匀试验设计方法对缓冲液中的硼砂、SDS 和 PEG 20 000 的浓度进行选择,结果确定分离缓冲液组成为 55 mmol/L Na₂B₄O₇ + 70 mmol/L SDS + 15 g/L PEG 20 000,在此分离缓冲液中 OPA 的峰形最好且分离度最佳。

本研究在已有文献基础上,对上述 3 种仪器方法进行了优化,并用优化的方法对 9 件 OPA 样品进行测定,尽管 3 种方法测定原理不同,但均获得了一致的测定结果,这样可以在遇到重大或可疑样品时,运用不同原理的方法进行互相印证,确保分析结果的准确性。

参 考 文 献

[1] 常文军,蔡全才,徐荷,等. 邻苯二甲醛消毒剂研究进展[J]. 中国消毒学杂志,2004,21(1):72-74.

[2] 徐贤良,杨彬,陈璐,等. 气相色谱法测定消毒剂中邻苯二甲

参 考 文 献

[1] RahimiRad S, Alizadeh A, Alizadeh E, *et al.* The avianinfluenza H9N2 at avian-human interface: A possible risk for thefuture pandemics[J]. J Res Med Sci, 2016, 21(1):51-55.

[2] 张红双,秦梅,柴同杰. 养殖环境生物应激因素对鸡免疫功能和生产性能的影响[J]. 动物医学进展, 2010, 31(s1):23-26.

[3] 史晨捷,郝利华,白瑞,等. 过氧乙酸戊二醛复方消毒剂对 NDV 和 IBDV 的杀灭试验[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(4):33-35.

[4] 于海,孙英峰,常维山. 新城疫不同毒株 EID₅₀ 的测定及增殖速度的比较[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, 26(3):43-44.

[5] 中华人民共和国农业部. 兽用消毒剂鉴定技术规范[S]. 1992.

[6] 陈吕华,沈明亮,云麟. 重视畜禽圈舍及环境消毒是畜牧业健康发展的关键[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(1):86-87.

[7] 董婕,薄洪,董丽波,等. 3 种市售消毒剂对人感染高致病性禽流感 H5 亚型病毒杀灭效果的定量评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(6):463-467.

[8] 阳艳林,隆雪明. 过硫酸钾复合粉消毒作用实验研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 4(3):34-36.

[9] 王娟,卞国志,袁建丰,等. 过硫酸氢钾复合盐对鸡新城疫病毒杀灭效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(8):563-565.

(收稿日期:2019-02-27)

醛含量的不确定度评定[J]. 中国卫生标准管理, 2018, 9(11):141-144.

[3] 林立旺,许能锋,陈菁,等. 复方邻苯二甲醛的研制及消毒性能观察[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(1):21-25.

[4] 宋金武,阙绍辉,蔡建华,等. 消毒剂中邻苯二甲醛含量测定方法比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(5):630-632.

[5] 田佩瑶,李洁,魏建荣,等. 紫外分光光度法快速测定消毒剂邻苯二甲醛[J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(4):43-44.

[6] 陈金龙,帖金凤,王长德. 两种仪器分析方法测定复方邻苯二甲醛含量的比较研究[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(4):396-397.

[7] 周香玉,马腾蛟,赵立文. 毛细管气相色谱法测定消毒产品中邻苯二甲醛[J]. 中国消毒学杂志, 2006, 23(4):308-310.

[8] 吴兆凤,余裕娟,廖如燕. 两种色谱法测定邻苯二甲醛含量比较研究[J]. 中国消毒学杂志, 2015, 32(7):641-643.

[9] 车宜平,丁晓静,赵珊,等. 反相高效液相色谱法快速测定复方化学消毒剂中邻苯二甲醛[J]. 中国消毒学杂志, 2006, 23(3):215-217.

[10] 魏文华,董四平,杨贺乐. 高效液相色谱法测定消毒剂中邻苯二甲醛的含量[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(6):482-483.

[11] 解娜,丁晓静,宋宝花,等. 胶束电动毛细管色谱法同时测定复方化学消毒剂及日化产品中邻苯二甲醛、对氯间二甲苯酚及 3 氯生[J]. 色谱, 2013, 31(1):64-70.

[12] 李佳,丁晓静,李芸,等. 胶束电动毛细管色谱法同时测定西洋参中人参皂苷 Rg1、Re 和 Rb1[J]. 色谱, 2011, 29(3):259-264.

[13] 王茜,丁晓静,王心宇,等. 毛细管电泳法快速测定保健食品中免疫球蛋白 G[J]. 分析化学, 2006, 34(8):1161-1164.

(收稿日期:2018-12-04)