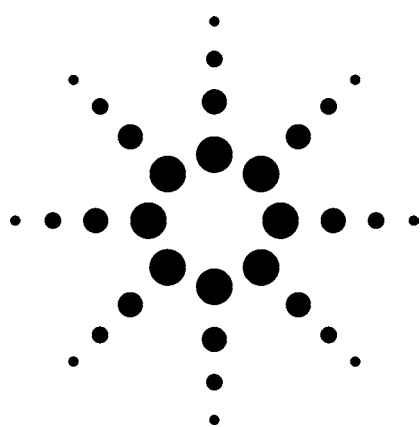




高分离度快速液相色谱和在线痕量富集方法用于 除草剂的快速分析 应用

环境

作者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

环境和食品的安全管理机构正在不断地更新方法来改进检测限和解决干扰化合物的分析问题。EPA 555作为一种特殊的方法被用于分析饮用水中氯酚氧酸类除草剂。其中强制要求的痕量富集步骤对此方法的易用性和可靠性具有显著的影响。该方法使用5- μm 的分析柱和在线痕量富集方法。这里改为采用较小的3.5和1.8- μm ZORBAX快速分离高通量色谱柱和一个安装在柱温箱中带自动切换阀的autoSPE（固体萃取）小柱。用直接将样品注射到autoSPE小柱的进样模式方法，取代EPA方法中指定的上样泵，我们可以显著的减少总体的分析时间并在实际上消除可能存在的样品交叉污染的问题。

引言

在相对干净的基质中进行痕量分析检测是在线SPE方法的极好应用。使用一次性的SPE小柱手动上样，需要在分析之前将样品洗脱到样品瓶内的步骤，相比之

下，在线SPE可以确保100%的样品被转移到分析柱，并可以通过增加转移到色谱柱中待测物的质量来显著的提高灵敏度。在EPA 555方法中，20毫升饮用水经过泵被加载到高效液相色谱系统中一个装有高压切换阀的SPE小柱上。因为很少有自动进样器（如果配置）能够注射这么大的体积，因此样品也必须被泵入小柱中。先前的样品对加样泵的污染是被始终关注的问题，而且足够的冲洗和进空白样就成为整个方法过程中的一个重要部分。

减少取样体积能够满足可用的自动制备型进样器的要求，为了不损失方法的灵敏度，有必要减少分析柱的尺寸，同时保持分离能力。另外使用较小的色谱柱通常还可以减少分析时间和溶剂消耗，以及与质谱检测器离子源之间的兼容性更好。

如果不同色谱柱的长度与粒径的比是相等的，则被认为具有相同的分离能力。通过减少色谱柱的长度和/或内径来可以大大降低色谱柱容积。在后面的例子中，流速通常将会被降低，如等式1所示。



Agilent Technologies

$$\text{Flow}_{\text{col. 1}} \times \left[\frac{\text{Diam}_{\text{column2}}}{\text{Diam}_{\text{column1}}} \right]^2 = \text{Flow}_{\text{col. 2}} \quad (\text{eq. 1})$$

减少长度和内径的综合结果可以体现为溶剂消耗的减少。我们通常是按照色谱柱的尺寸调节进样量，一定比例的进样体积的计算是通过将两个色谱柱的空容积之比乘以最初色谱柱的进样体积得来的，如下面等式2所示。

$$\text{Inj. vol.}_{\text{col. 1}} \cdot \left[\frac{\text{Volume}_{\text{column2}}}{\text{Volume}_{\text{column1}}} \right] = \text{Inj. vol.}_{\text{col. 2}} \quad (\text{eq. 2})$$

小粒径的短色谱柱通常在高的线速度下运行。洗脱速度的提高将会减少绝对峰宽，而且可能需要使用者调节数据采集速率，降低信号过滤参数，从而确保色谱分离在采集的数据文件中被准确的记录下来。

对于梯度洗脱分离，从分析开始，逐渐增加流动相的组成，直到被关注的分析物从色谱柱中洗脱出来，将这种方法成功的转移到较小的色谱柱，需要保持原先的梯度斜率。我们可以表达梯度的斜率如等式3所示。

$$\% \text{ 梯度斜率} = \left[\frac{(\text{End}\% - \text{Start}\%)}{\# \text{Column volumes}} \right] \quad (\text{eq. 3})$$

需要注意的是，使用的是每个色谱柱容积改变的百分比而不是每分钟改变的百分比，这样可以使使用者摆脱通过改变梯度的时间和/或梯度的流速来控制梯度斜率。较大的梯度斜率会产生非常快的梯度且具有最小的分离度，然而较小的梯度斜率会使分离度提高，但同时增加溶剂消耗，灵敏度有所下降。除非在可以接受的操作压力范围内通过增加流速来降低梯度斜率，而不是通过增加梯度时间降低梯度斜率，否则较长的分析时间可能会提高分离度。

因为有效容量因子 k^* 的增加，较小的梯度可以提高分离度。与等度分离中的容量因子 k' 非常相似，较高的 k 值可以直接提高分离度。当 k 值大约达到5–10时的分离度提高的效果是非常显著的，在此之后，提高幅

度很小。在随后的例子中，我们将会见到与前面讨论的计算有关的结果。

实验条件

参数见图1。

系统

Agilent 1200系列高分离度快速液相色谱组成如下：

G1379B微量脱气机

G1312B二元泵SL

G1312A配置溶液选择阀选件的二元泵，或

G1354A四元泵

G1367C HiP ALS自动进样器SL，和

G2258A双定量环制备自动进样器5ml

G1316B配置6通或10通2位切换阀的SL型柱温箱

G1315C SL型UV/VIS DAD，流通池分别如每个色谱图所示

32位ChemStation，版本号B.02.01

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm

Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm

Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 × 80 mm, 1.8 μm

Agilent ZORBAX SB-Aq, 4.6 × 12.5 mm, 5 μm

流动相条件

有机相：乙腈

水相：25 mm磷酸的Milli-Q水溶液

梯度条件

梯度斜率：如图中所标示的，7.8或者是每个色谱柱容积的2.3%。流速和时间分别见每个色谱图。

样品

EPA 555 A组为氯酚氧酸类除草剂（包括毒莠定，草灭平，麦草畏，苯达松，2,4-滴，2,4-滴丙酸，2,4,5-三氯苯氧乙酯，三氟羧草醚），100 μg/mL的甲醇溶液或稀释为20 ng/L（20 ppb）的水溶液并经25 mm磷酸化。

结果

分离最初是在ZORBAX SB-C18色谱柱（4.6 × 250 mm，5-μm）上用浓缩的标样直接进样，柱温为25 °C，使用的条件参考US EPA 555方法（图2）。采用A泵作为上样泵来完成上述痕量富集过程（图3）。然后，按照比例将方法中的流量和时间精确转换到3.0 × 150 mm，3.5-μm色谱柱（图4）并使用5 mL痕量富集进样。最后采用2.1 × 80 mm，1.8-μm的色谱柱（50 mm加30 mm系列柱）验证在少于1.5 mL进样的痕量富集条件下这种分离的可行性。（图5）

上样/冲洗位置

洗脱/分析位置

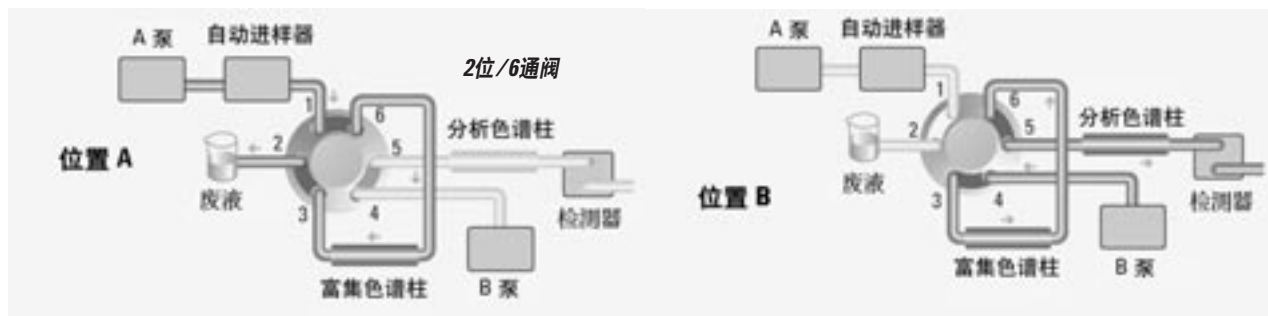


图1. autoSPE痕量富集图解

图1为系统中的组件和色谱柱结构。A泵为上样泵，为了防止进样体积超过G2258A双定量环自动进样器的容量（5 mL），所以A泵使用一条通路进样，另一条通路为25 mm磷酸水溶液。如果使用自动进样器直接进样，A泵将输送出25 mm磷酸。如果A泵配备了脱气机，则样品通路将绕开脱气机组件从而使样品溶液的污染减到最小。为使样品通过A泵，当新的样品流经A泵的时候，阀应该是在B的位置。然后，切换阀到A的位置，再上样所需的20 mL样品。当阀回到B的位置时，分析开始，这时A泵的样品通路将被水或下一个样品适当的冲洗。

图2和3分别显示了直接进样和通过泵进行痕量富集的标准分离。包括色谱柱再生阶段在内，总的分析时间共需要60分钟。将梯度转换到3.0 × 150 mm色谱柱时，因内径变小需要降低流速，而且因为色谱柱长度的变短需要减少梯度时间。由此分析时间从60分钟减少到36分钟，溶剂消耗也按比例从60 mL减少到15.5 mL。

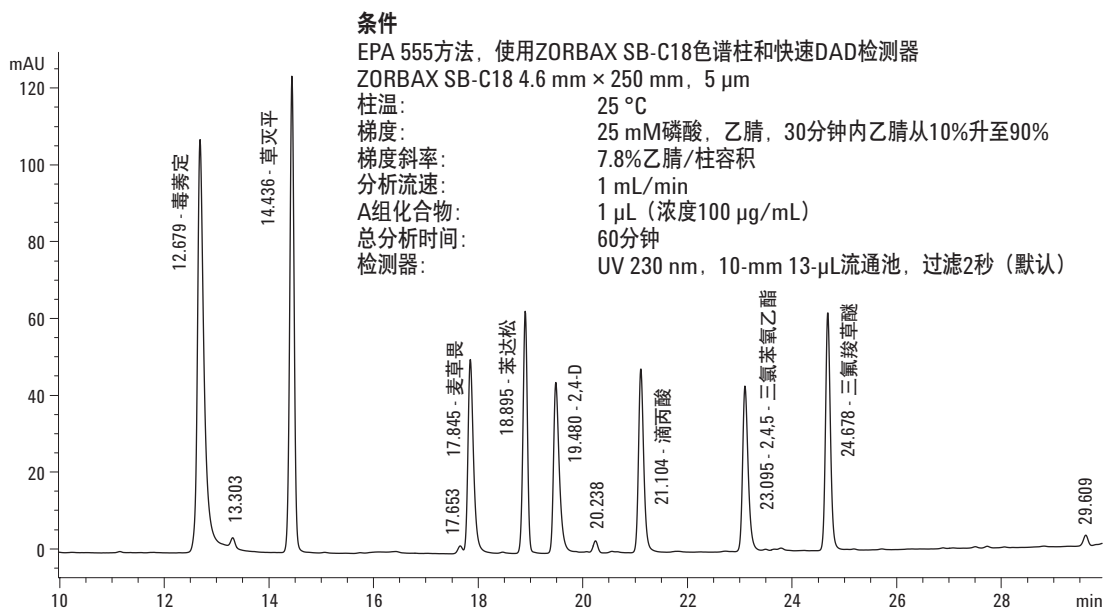
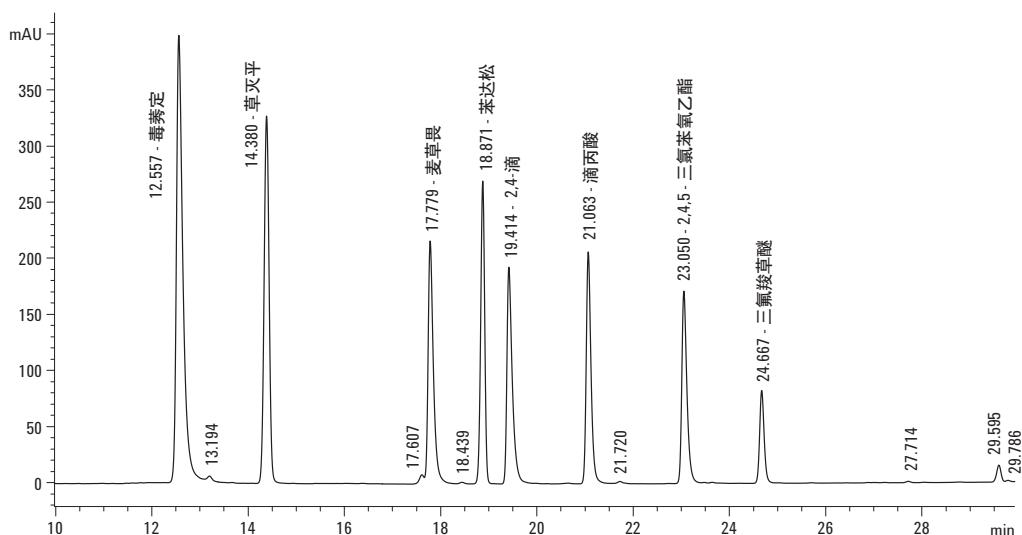


图2. 采用4.6 mm×250 mm, 5 μm ZORBAX SB-C18色谱柱对氯酚氧酸类除草剂梯度分离



条件

EPA 555方法, 使用ZORBAX SB-C18色谱柱和快速DAD检测器

ZORBAX SB-C18 4.6 mm × 250 mm, 5 μm

柱温: 25 °C

梯度: 25 mM磷酸, 乙腈, 30分钟内乙腈从10%升至90%

梯度斜率: 7.8%乙腈/柱容积

分析流速: 1 mL/min

A组化合物: 20 mL (浓度20 μg/L) 痕量富集

总分析时间: 60分钟

检测器: UV 230 nm, 10-mm 13-μL流通池, 过滤2秒 (默认)

图3. 用4.6 mm×250 mm, 5-μm ZORBAX SB-C18色谱柱痕量富集20-ppb溶液 (20 mL)

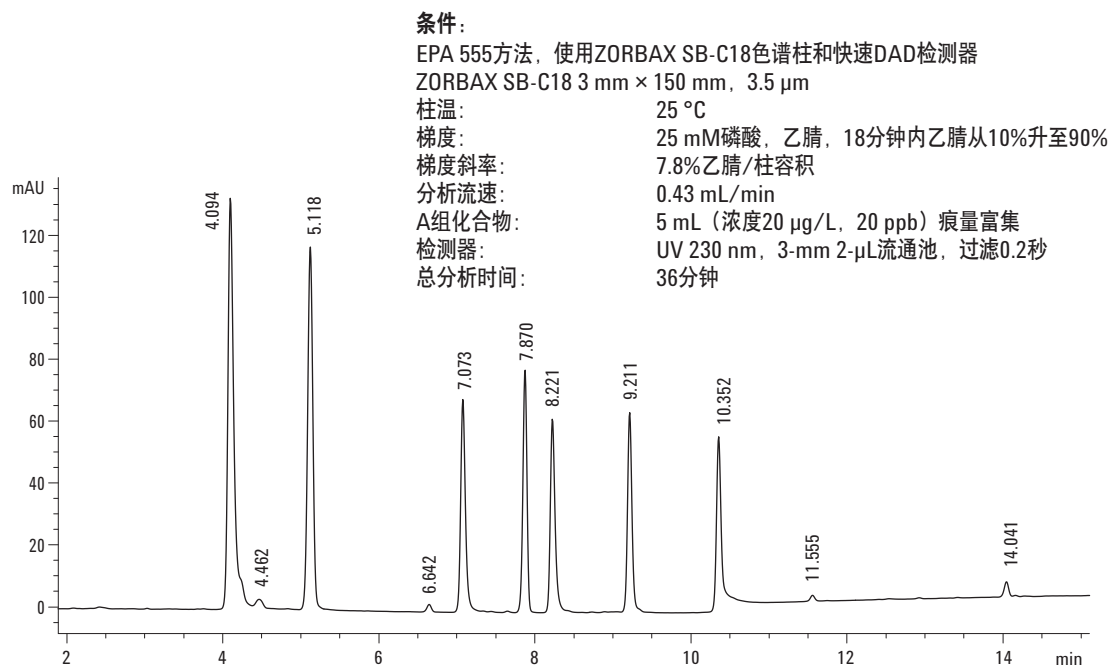


图4. 3.0×150 mm, 3.5-μm ZORBAX SB-C18色谱柱痕量富集20-ppb溶液 (5 mL)

图4中最后的色谱峰由于阀的定时错误而丢失, 这个错误直到实验工作完成后才被发现。8号峰在阀切换到离线状态进行再生和平衡之前没有从痕量富集色谱

柱中被洗脱出来的。需要注意的是, 发生在7号峰之后的基线漂移在其它的autoSPE例子中没有被发现。

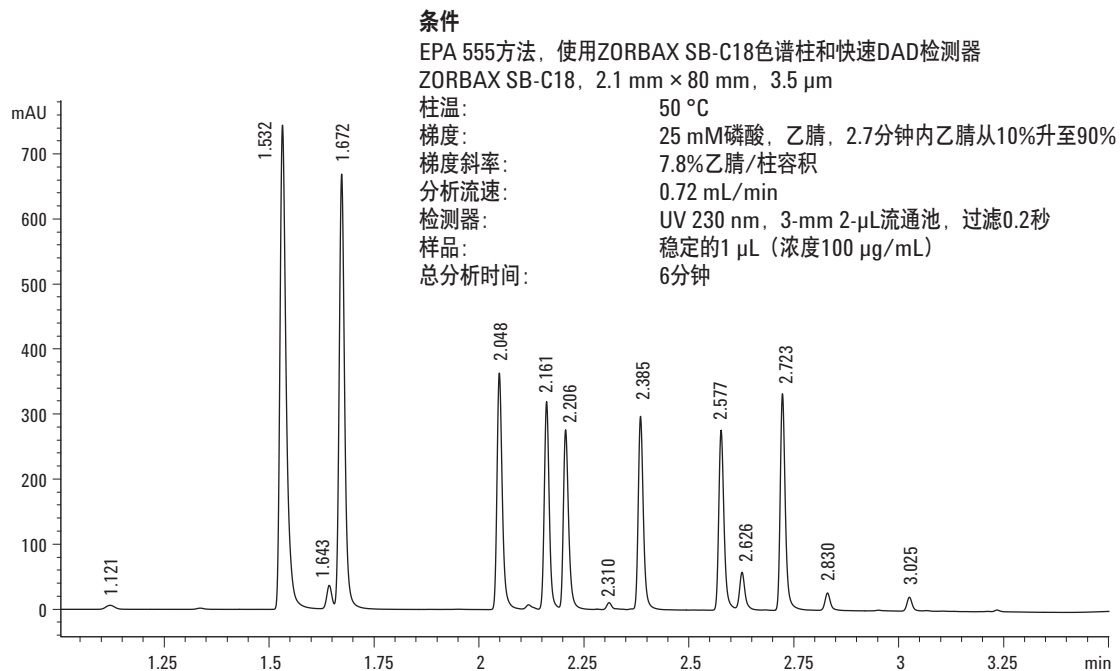


图5. 2.1×80 mm，1.8-μm ZORBAX SB-C18色谱柱高速梯度分离除草剂

在图5中表明使用1200高分离度快速液相所有功能所得到的最高分析速度和分离度。操作压力最高大约在520 bar处。我们保持与最初的4.6 × 250 mm，5-μm色谱柱运行60分钟时相当的分离度，只需要6分钟的分析时间。

结论

通过对许多现有的方法进行改进而提高效率和总体性能是可行的。这里我们看到了可以提高分析速度10倍的潜在可能，并除去了最初方法中设计的上样泵。只需要使用2.1 × 80 mm色谱柱将大约1.3 mL样品溶液注入到autoSPE装置中，就能够替换先前所需的通过泵上样20-mL。该方法能大大改善分析效率而且确保最小的样品交叉污染。

如需详细资讯

关于我们的产品和服务的更多资讯，浏览我们的网站：
www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明规格，如有更改，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2006

中国印刷
2006年8月9日
5989-5176CHCN



Agilent Technologies