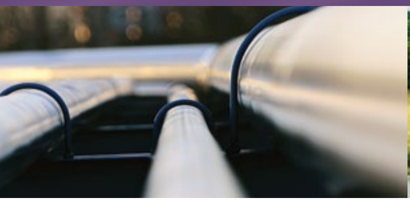
AGILENT 7696A 样品制备工作台应用文集

一致、准确、安全的样品前处理

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

目录

如需搜索随附应用简报中的词语或短语，请单击下方的搜索按钮，打开 Acrobat 中的搜索窗口。

搜索

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：
agilent.com/chem/workbench

下面的目录已链接到本文集的对应部分。单击文本可跳转到特定部分

前言 4

■ 能源与化工 6

■ 能源与化工应用简报 7

Agilent 7696A 工作台在复杂样品自动化制备中的应用 8

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台进行复杂样品的自动化制备 18

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台自动制备标样和样品进行喷气燃料中脂肪酸甲酯 (FAME) 的 GC/MS 分析 20

Agilent 7696A 样品前处理工作台对样品进行自动化预处理，满足 EN14105:2011 方法：气相色谱分析生物柴油 32

■ 环境 42

■ 环境应用简报 43

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台自动净化样品进行矿物油（烃油指数）的分析 44

使用 Agilent 7696A 工作台自动样品净化操作制备废油中的 PCB 萃取液 50

使用 Agilent J&W DB-35 ms 超高惰性色谱柱和 DB-XLB 色谱柱对水中低于 μg/L 级的有机氯农药和除草剂进行GC/μECD 法分析 56

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备符合 EPA 方法 8270 的 AOA 标样 68

基于 Agilent 7696A 样品制备工作台的气相色谱／三重四极杆质谱进行雌酮分析 72

（续）

目录

如需搜索随附的应用简报中的词语或短语，请单击下方的搜索按钮，打开 Acrobat 中的搜索窗口。

搜索

■ 食品检测 78

■ 食品检测应用简报 79

婴儿奶瓶浸出的双酚 A 的分析 80

糖果中色素添加剂的分析 92

通过自动样品制备测定三文鱼油中的脂肪酸甲酯 (FAMEs) 104

使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪定量分析甜菊叶子中的甜菊糖和甜叶菊甙 A 108

采用自动样品制备测定橄榄油中的脂肪酸甲酯 (FAME) 112

■ 制药 120

■ 制药应用简报 121

眼药水制剂质量控制中的自动化样品前处理 122

■ 常规应用 130

■ 常规应用简报 131

Agilent 7696A 样品制备工作台：如何通过连续稀释自动制备样品序列，进行火焰离子化检测器性能评价 132

使用安捷伦样品制备工作台进行自动化的质量控制检测 136

利用批量模式的样品前处理提高分析效率 138

■ 备件快速参考指南 142

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：
agilent.com/chem/workbench

提高手动样品制备及标样开发的可靠性

手动样品制备不仅繁琐，而且具有内在的变异性，这会导致耗时的重复工作，浪费消耗品，并存在样品可能未按方案规定或法规要求进行制备的不确定性。

Agilent 7696A 样品制备工作台——业内独一无二的样品前处理独立仪器能够轻松解决这些问题。

Agilent 7696A 样品制备工作台可自动完成样品前处理工作流程中容易出错的重复性步骤。它将精密的自动化操作与简单直观的软件整合在一起，确保样品处理的一致性，消除了不同分析员操作带来的差异，使化学家们得以专注于其他更关键的工作任务。

此外 7696A 样品制备工作台能够减少废液，同时避免样品制备过程中步骤遗漏而导致的再进样，从而降低分析成本。它还可放置在大多数的通风橱内，最大限度降低对有害化学品和试剂的接触。

更多信息

单击查看下列内容。

- 7696A 样品制备工作台网页
- 7696A 样品制备工作台产品样本
- 7696A 在线计算器

海报

- 采用 EN14105:2011 方法分析生物柴油的自动化气相色谱样品制备
- 通过自动样品制备提高数据质量

视频

- 7696A 样品制备工作台：工作原理
- 7696A 工作台的好评：气相色谱研究所
- 7696A 工作台的好评：食品安全与健康研究所

（续）

扩展的性能消除更多单调的步骤，从而提高工作效率。

7696A 样品制备工作台拥有全新的自动化技术，可避免称重、稀释以及制备衍生物等步骤带来的误差，大大增强了 7696A 的性能。这些技术包括：

- 高精度称重台板—可读取小数点后五位数，能精确称量直接放入气相色谱或液相色谱样品瓶中的物质。符合 ASTM 和 EN 石化分析标准。
- 液相色谱样品瓶架—可直接将样品瓶放置到自动进样器上，有效避免放置和转移样品瓶时出错。
- 稀释向导—可加快方法开发，最大程度减少鼠标操作，还可自动为校准曲线标样制备和其他重复的稀释步骤创建一系列标准流程。

内容提要

本文集重点介绍了 Agilent 7696A 样品制备工作台在各种行业、样品类型以及样品制备技术等方面的应用。您还会发现一些技巧和技术，它们将帮助您：

- 在最小的体积下保持精密度
- 最大限度减小分析员之间的差异
- 减少成本高昂的重复工作
- 降低健康和安全风险
- 通过称重技术提高准确度、精密度和重现性
- 确保数据安全以及气相色谱和液相色谱样品制备的无缝可追溯性

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：
agilent.com/chem/workbench

能源与化工

确保为挥发性和非挥发性样品（汽油到重油）提供精确的样品称重和稀释

精密的样品前处理可最大限度降低最终结果出现误差的可能性。通过自动化操作可获得这样的精密度，而且不受时间的影响。以下应用介绍了如何使用工作台自动完成各种单调的工作任务，例如，各种挥发性化合物样品的稀释、航空燃料中脂肪酸甲酯 (FAME) 的衍生化以及采用 EN14105:2011 方法对生物柴油进行分析等等。

返回目录
查看应用简报

能源与化工

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：
agilent.com/chem/workbench

返回目录
返回行业简介

下面的目录已链接到本文集的对应部分。单击文本可跳转到特定部分

Agilent 7696A 工作台在复杂样品自动化制备中的应用 8

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台进行复杂样品的自动化制备 18

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台自动制备标样和样品进行喷气燃料中脂肪酸甲酯 (FAME) 的 GC/MS 分析 20

Agilent 7696A 样品前处理工作台对样品进行自动化预处理，满足EN14105:2011方法：气相色谱分析生物柴油 32

使用独立操作的 Agilent 7696A 工作台自动完成复杂、多步骤样品前处理工作

应用简报

生物燃料和替代能源

作者

James D. McCurry 博士
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

在本应用简报中，使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台进行自动化多步骤样品前处理，并选择 ASTM 方法 D6584 作为测试用例验证该工作台的各项性能。此方法要求在气相色谱分析前，对非挥发性污染物进行复杂的衍生化。采用该工作台对多种不同类型的生物柴油以及用于定量目标污染物的校准标样进行前处理。经该工作台制备的样品获得的结果与手动制备的样品所得结果几乎完全相同。利用该工作台制备的样品所获得结果具有很高的分析精度，完全符合行业标准。为了进一步测试该工作台，化学分析人员们对生物柴油样品进行了分组自动化前处理操作。各组之间所获得的分析结果几乎完全相同，并具有非常高的分析精度。

Agilent Technologies

前言

在分析化学领域，样品前处理过程可以很简单，只加入某种溶剂即可完成；也可以很复杂，来进行化学反应以利于后续的仪器测量。样品前处理对任何化学测量过程而言都是至关重要的组成部分，然而很少有化学分析人员喜欢做这个工作，尤其是当这一过程非常复杂、烦琐，并且需要操作许多危险化学品的时候。因此，手动样品前处理可能导致多种误差及较差的精度。为了减少误差、提高精度，许多手动样品的前处理需要使用大量的化学品和昂贵的定容玻璃器皿来完成，以使样品的处理、配制和测量变得简单。

ASTM 方法 D6584 是复杂手动样品前处理的一个典型例子。该方法可测量 B100 生物柴油中的游离甘油和总甘油含量以确保获得良好的产品质量 [1]。由于生物柴油中的各种甘油均不挥发，因此不能使用气相色谱 (GC) 进行测量。方法 D6584 介绍了使用三甲基硅烷化试剂对这些化合物进行衍生化，以便于进行 GC 分析的样品前处理方案。但该样品前处理方案的步骤复杂、耗时，并且需要使用具有毒性和气味恶劣的吡啶溶剂。这也是该方案不受广大从事生物柴油分析的化学分析人员欢迎的原因。

Agilent 7696A 样品前处理工作台是一款专为自动化样品前处理设计的独立仪器 [2,3]。它采用两个 7693A 进样塔，在 2 mL 样品瓶间定量移取液体。装有不同化学资源、标准品和样品的样品瓶被固定在三个 50 位的样品盘上。样品盘室配备有用于移动样品瓶的机械臂、涡旋混合台板以及样品加热台板。

设计 7696A 工作台的程序

ASTM D6584 的前处理程序可以概括为六个步骤，如表 1 所示。手动完成此前处理程序需要耗费大量的标准品、试剂、溶剂和一次性玻璃器皿。由于安捷伦工作台采用较小的 2 mL 样品瓶，可使此程序的消耗减小 10 倍。该工作台还使用两个移液注射器移取液体，从而避免了一次性玻璃器皿的耗费。表 1 还列出了如何对每个步骤进行缩放以适应该工作台所用的 2 mL 样品瓶。

在建立工作台样品前处理程序前，首先确定制备生物柴油样品所需的化学资源和这些资源在工作台样品盘上的位置。表 2 列出了各种资源、它们的样品盘位置和用于分配各资源的移液注射器参数。工作台软件还可显示各个资源在样品盘中的图形化顶视图，如图 1 所示。在此示例中，我们显示了位于样品盘位置 1 至 10 的 10 个样品，以及将要用于各个样品的 10 个正庚烷样品瓶。正庚烷样品瓶存放于样品盘位置 101 至 110。

表 1. ASTM 方法 D6584 对生物柴油中的甘油采用六步衍生法制备样品，以便通过高温气相色谱进行分析。由于 Agilent 7696A 样品前处理工作台使用 2 mL 样品瓶，因此必须将手动样品前处理程序的制备规模按 10:1 的比例缩小

步骤	手动样品前处理（采用 15 mL 样品瓶）	按 10:1 的比例缩小→	工作台样品前处理（采用 2 mL 样品瓶）
1	将 10 mg B100 加入带 Teflon 螺口盖的 15 mL 样品瓶中		将 10 mg B100 加入带 Teflon 螺口盖的 2 mL 样品瓶中
2	向样品瓶中加入 100 µL ISTD1 溶液（丁三醇）		向样品瓶中加入 10 µL ISTD1 溶液（丁三醇）
3	向样品瓶中加入 100 µL ISTD2 溶液（甘油三癸酸酯）		向样品瓶中加入 10 µL ISTD2 溶液（甘油三癸酸酯）
4	向样品瓶中加入 100 µL 衍生化试剂 (MSTFA) 并混合		向样品瓶中加入 10 µL 衍生化试剂 (MSTFA) 并混合
5	在室温下反应 15 min		在室温下反应 15 min
6	向样品瓶中加入 8 mL 正庚烷并混合		向样品瓶中加入 800 µL 正庚烷并混合

表 2. 将生物柴油中的甘油完全衍生化需要四种化学资源。化学资源、样品盘位置和注射器参数均在工作台软件中设置。注射器吸取速度是指将每种资源吸入到注射器中的速度。注射器推出速度是指将资源移入 2 mL 样品瓶中的速度

化学资源	样品盘位置	注射器规格 (µL)	注射器吸取速度 (µL/min)	注射器推出速度 (µL/min)
ISTD1（1000 µg/mL 丁三醇的吡啶溶液）	51	100	250	500
ISTD2（8000 µg/mL 甘油三癸酸酯的吡啶溶液）	52	100	250	500
MSTFA 衍生化试剂	53	100	250	500
正庚烷	101–110	250	500	2000

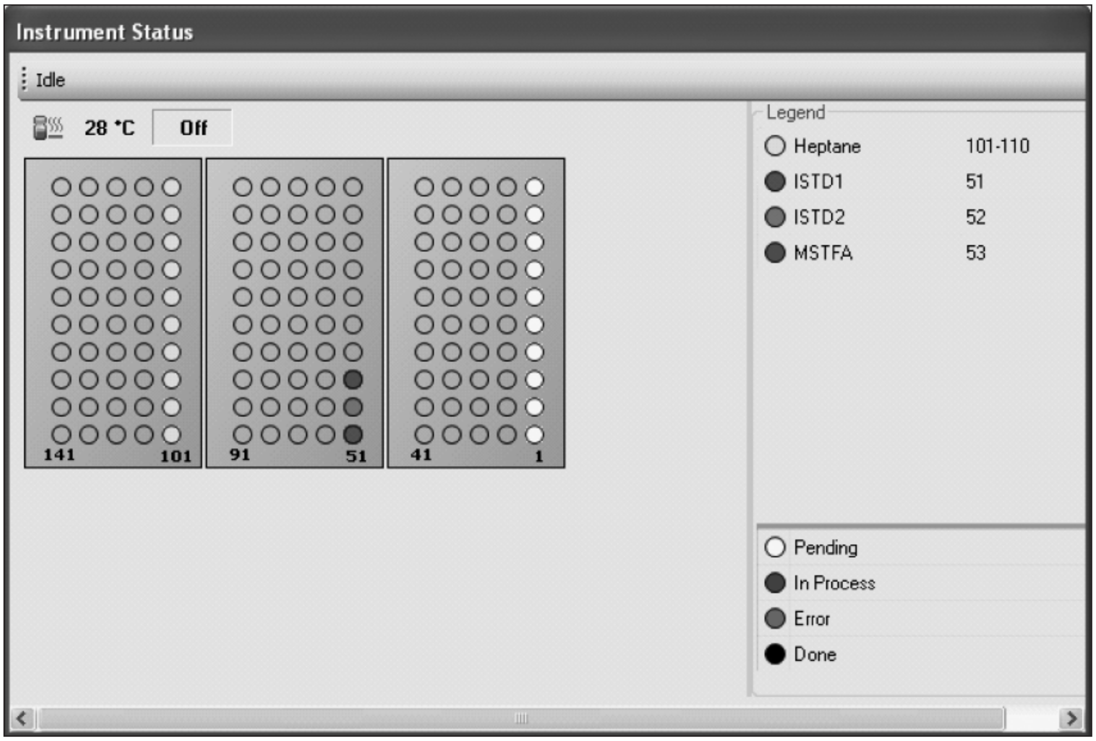


图 1. 工作台软件可提供样品盘中每种化学资源的顶视图。在此示例中，除了化学资源外，10 个样品分别位于样品盘位置 1 至 10

样品称量操作不能在工作台上进行，因为其未配备分析天平。由于称量 10 mg 的生物柴油非常困难，因此使用 Eppendorf Reference 可调量程移液器 (10–100 µL) 移取样品。通过手动移取 11.4 µL 生物柴油置于去皮重的 2 mL 样品瓶中，并记录精确到 0.1 mg 的重量，从而完成 10 mg 生物柴油的称量。

为了模拟手动样品前处理工作流程，针对表 2 中列出的每个步骤创建各个工作台方法。例如，我们创建了称为 ADD_ISTD1.M 的方法，以向每个样品中加入第一内标溶液 (ISTD1)，再使用方法 ADD_ISTD2.M 加入第二内标 (ISTD2)。通过这种方式，我们需要做的只是在更换到不同资源时使用溶剂清洗注射器。这样可大大减少所需的清洗溶剂用量，并且可以在再次填充清洗溶剂容器之前制备更多的样品。包括注射器清洗步骤在内的工作台样品前处理最终“脚本”列于表 3 中。要运行完整的样品前处理程序，需根据图 2 中所示的工作台顺序队列运行每个方法。

表 3. 示出样品制备方案中每个步骤的最终“脚本”以及执行每个操作所需的相应工作台方法

步骤	生物柴油制备方案	方法名称	备注
1	向每个样品瓶中加入 10 µL ISTD1 溶液	ADD_ISTD1.M	使用后塔的 100 µL 注射器
2	清洗 100 µL 注射器	Wash_Back.M	后塔中的溶剂容器
3	向每个样品瓶中加入 10 µL ISTD2 溶液	ADD_ISTD2.M	使用后塔的 100 µL 注射器
4	清洗 100 µL 注射器	Wash_Back.M	后塔中的溶剂容器
5	向每个样品瓶中加入 10 µL MSTFA 并混合	ADD_MSTFA.M	使用后塔的 100 µL 注射器
6	清洗 100 µL 注射器	Wash_Back.M	后塔中的溶剂容器
7	在室温下反应 15 min	Reaction.M	对所有样品应用一个 15 min 的等待时间
8	向每个样品瓶中加入 800 µL 正庚烷并混合	ADD_Heptane.M	使用前塔的 250 µL 注射器

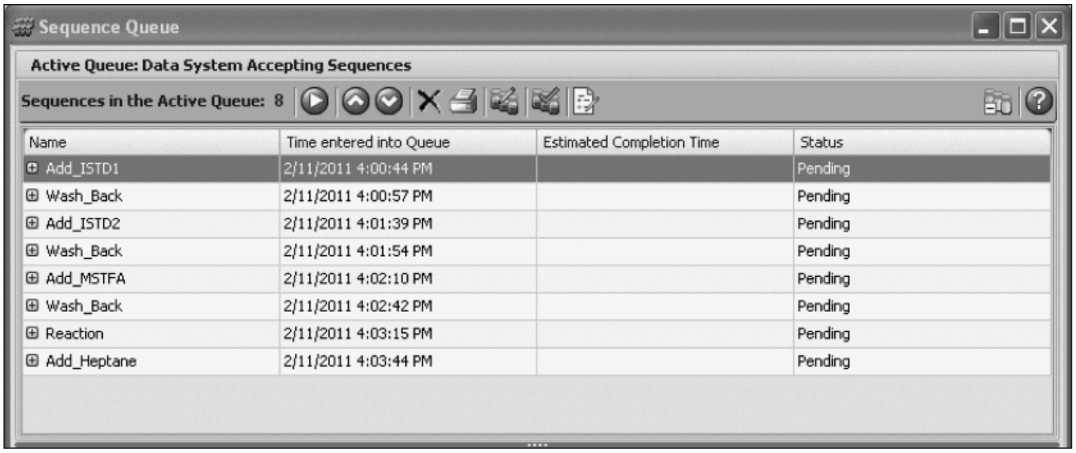


图 2. 使用工作台顺序队列运行表 3 中所示的工作台方法

实验部分

配置 Agilent 7890A 气相色谱以运行 ASTM D6584。具体配置参数列于表 4 中。用于分析生物柴油样品和标准品的气相色谱条件示于表 5 中。

气相色谱校准标样的前处理

ASTM D6584 还需要通过与样品所用相同的前处理程序对五种校准标样进行衍生化。在运行任何样品之前，先对标样进行气相色谱分析，并评估校准曲线的线性。分别采用手动操作并通过工作台按照与样品相同的方案制备校准标样。将手动制备所得到的校准曲线用于定量手动制备的生物柴油样品。而通过工作台得到的校准曲线则用于定量使用工作台制备的样品。

手动样品前处理和工作台样品前处理的对比

许多用户想问的第一个问题就是“经过缩放的工作台样品前处理程序所得到的结果是否与手动样品前处理程序的结果一致？”。为了回答这个问题，我们分别采用手动 ASTM 方案和工作台制备两种不同类型的生物柴油样品。其中一种生物柴油样品来自于当地的小生产商，以菜籽油为原料。另一种样品来自国家生产商，以大豆油为原料。对于手动和工作台方案，根据 ASTM 方法制备生物柴油样品，并且每个样品重复分析两次，以评估重复性（单用户精度）。

多用户精度 — 重现性

为了评估多用户精度，为四个化学分析人员分别提供了大豆油生物柴油样品、校准标样以及包含表 2 中所列化学资源的工作台。要求他们每个人都要根据表 3 列出的样品前处理步骤开发并应用自己的一套工作台方案，并使用各自的工作台制备大豆油生物柴油样品的平行样，再进行气相色谱分析。

表 4.　采用 ASTM 方法分析样品的气相色谱仪器配置

标准 Agilent 7890A 气相色谱硬件	
G3440A	Agilent 7890A 系列气相色谱
选件 122	冷柱头进样口，带 EPC 控制
选件 211	毛细管火焰离子化检测器，带 EPC 控制
G4513A	Agilent 7693A ALS
色谱柱	
分析柱	用于分析甘油酯的 Select Biodiesel 15 m × 0.32 mm 内径 × 0.1 µm 膜 （部件号 cp9078）
数据系统	安捷伦多技术 ChemStation
耗材	
5181-1267	10 µL Teflon 固定自动进样器进样针
标样和试剂	
5190-1408	生物柴油 D6584 校准标样试剂盒
5190-1407	生物柴油 MSTFA 试剂盒
	试剂级正庚烷

表 5.　ASTM 方法 D6584 的气相色谱仪器条件

冷柱头进样口	
初始温度	50 °C
程序升温	柱箱跟踪模式
色谱柱流速	氦气，3 mL/min，恒流
柱温	
初始温度	在 50 °C 下保持 1 min
升温速率 1	以 15 °C/min 升温至 180 °C，保持 0 min
升温速率 2	以 7 °C/min 升温至 230 °C，保持 0 min
升温速率 3	以 30 °C/min 升温至 380 °C，保持 10 min
火焰离子化检测器	380 °C

结果

气相色谱校准标样的前处理

图 3 示出了甘油、甘油单油酸酯、甘油二油酸酯和甘油三油酸酯的五个浓度水平的校准曲线。用于创建这些曲线的五个标样均通过安捷伦工作台进行制备。甘油曲线用于定量生物柴油样品中的游离甘油。甘油单油酸酯曲线用于定量样品中的单甘酯，甘油二油酸酯曲线用于定量样品中的所有甘油二酯，甘油三油酸酯曲线用于定量样品中的所有甘油三酯。同时也通过手动操作制备相同的校准标样，并创建校准曲线。在表 6 中，我们对全部四种化合物的手动制备标样和工作台制备标样的校准模型进行了对比。手动制备标样和工作台制备标样生成了几乎完全相同的曲线，并且工作台制备标样的相关系数 (r^2) 超出了 ASTM 标准中至少为 0.99 或更大的相关系数要求。

表 6.　如每种化合物的斜率和截距所示，手动和工作台前处理方案所得到的校准曲线非常相似。两种前处理方法均满足相关系数值 (r^2) 为 0.99 或更大的 ASTM 要求

	手动前处理			工作台		
化合物	**斜率**	**y 轴截距**	**r^2**	**斜率**	**y 轴截距**	**r^2**
甘油	1.0433	0.0028	0.9997	1.1027	0.0049	0.9995
甘油单油酸酯	1.3446	–0.0171	0.9997	1.3786	0.0044	1.0000
甘油二油酸酯	1.2176	–0.0010	0.9999	1.2086	–0.0014	0.9999
甘油三油酸酯	0.8303	–0.0018	0.9965	0.8703	0.0030	1.0000

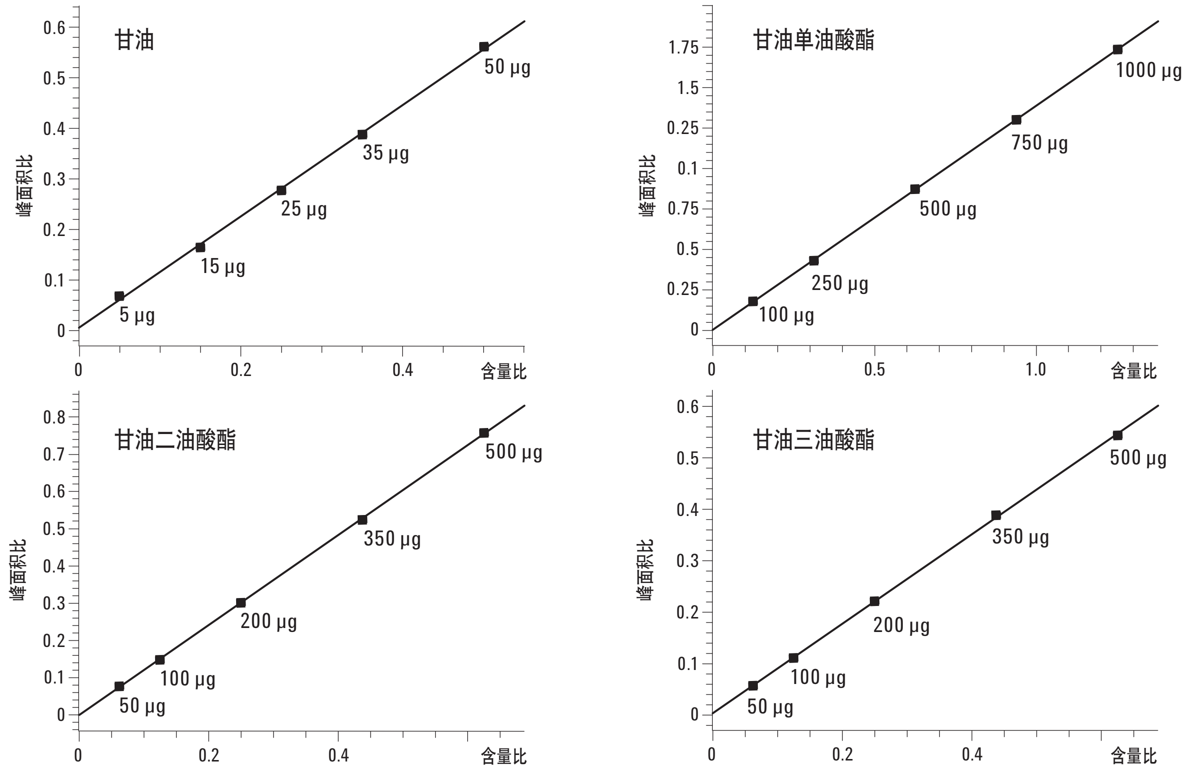


图 3.　使用工作台制备的标样的校准曲线。

手动样品前处理和工作台样品前处理的对比

根据 ASTM 方法 D6584 对手动制备的生物柴油样品和利用工作台制备的生物柴油样品进行分析。图 4 展示了手动前处理程序和工作台前处理程序所得到的生物柴油样品 1（菜籽油）的色谱图对比。两张色谱图上几种甘油酯洗脱的区域看起来是一样的。对所有样品中的游离甘油和总甘油进行定量分析，结果列于表 7 中。

工作台样品前处理程序与手动前处理程序得到的结果相同。制备两种样品，并分别重复分析两次，以确定样品前处理程序的重复性。重复性 (r) 用于通过测定每个样品的重复分析之间的差异来衡量单个操作者的精度。如表 7 所示，该分析中使用工作台制备的样品超过了 ASTM 规定的重复性最低要求。这表明，将规模缩小 10 倍后，通过工作台制备的样品仍可轻松获得与手动制备的样品同样精确的结果，而后者需要耗费大量化学品、试剂和溶剂。

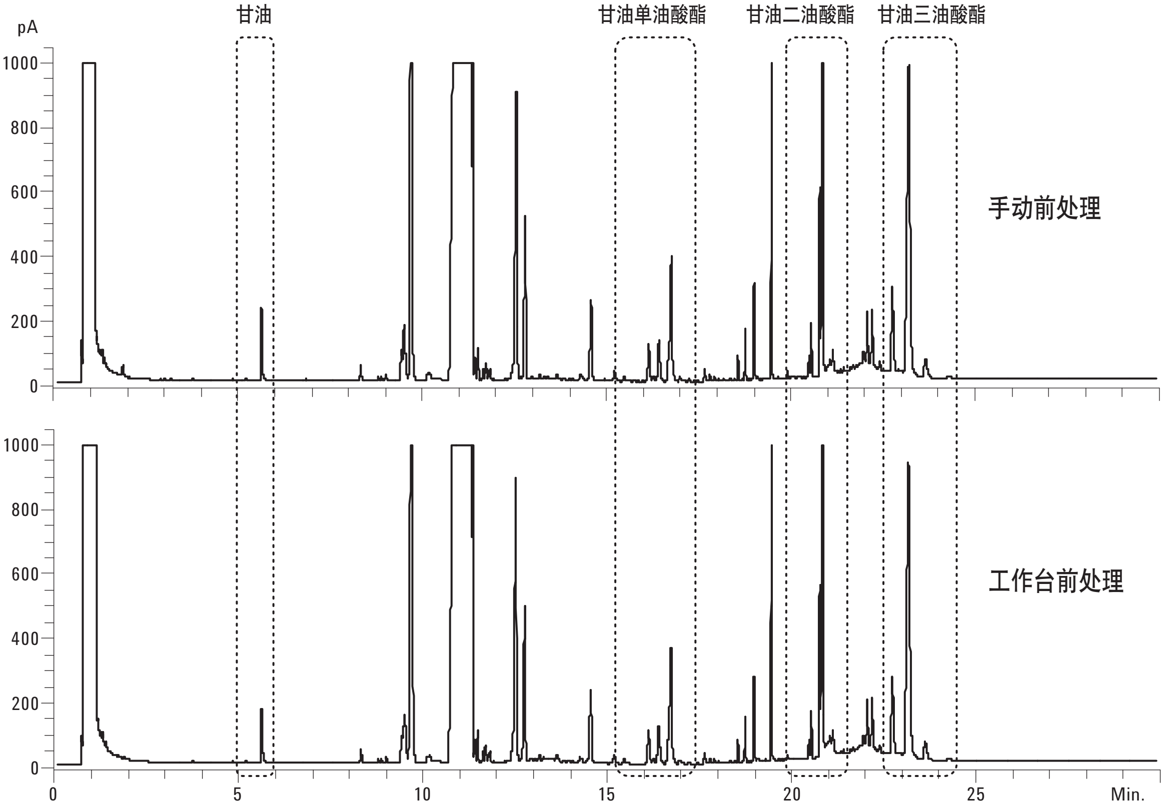


图 4. 通过手动方式和使用安捷伦工作台制备的菜籽油生物柴油样品数据对比。这些色谱图上甘油、甘油单油酸酯、甘油二油酸酯和三油酸甘油酯分离的四个区域非常相似

表 7. 两种不同类型的生物柴油的工作台样品结果均与手动制备的样品结果几乎完全相同。工作台样品所得到的精度（重复性）完全符合 ASTM 标准

生物柴油样品 1（菜籽油）

	手动前处理			工作台前处理			重现性 (r)
	平行样 1	平行样 2	r	平行样 1	平行样 2	r	性能指标
游离甘油	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.58E-04
甘油单油酸酯	0.169	0.169		0.168	0.163		
甘油二油酸酯	0.282	0.286		0.291	0.286		
甘油三油酸酯	0.533	0.536		0.565	0.554		
总甘油	0.984	0.991	0.007	1.023	1.003	0.020	0.083

生物柴油样品 2（大豆油）

	手动前处理			工作台前处理			重现性 (r)
	平行样 1	平行样 2	r	平行样 1	平行样 2	r	性能指标
游离甘油	0.008	0.008	0.000	0.008	0.008	0.000	0.002
甘油单油酸酯	0.138	0.144		0.141	0.140		
甘油二油酸酯	0.022	0.023		0.022	0.021		
甘油三油酸酯	0.009	0.009		0.006	0.005		
总甘油	0.177	0.184	0.007	0.176	0.174	0.002	0.046

多用户精度 — 重现性

图 5 显示了四个化学分析人员分别在四天时间里制备的相同大豆油生物柴油样品的分析结果。每个化学分析人员所得到的色谱图几乎完全相同。表 8 示出了每个化学分析人员获得的定量结果，以及对不同组之间精度的评估（重现性）。这些结果显示，多个化学分析人员在建立用于制备同一样品的自动化工作台方案时，可获得非常高的精度水平。

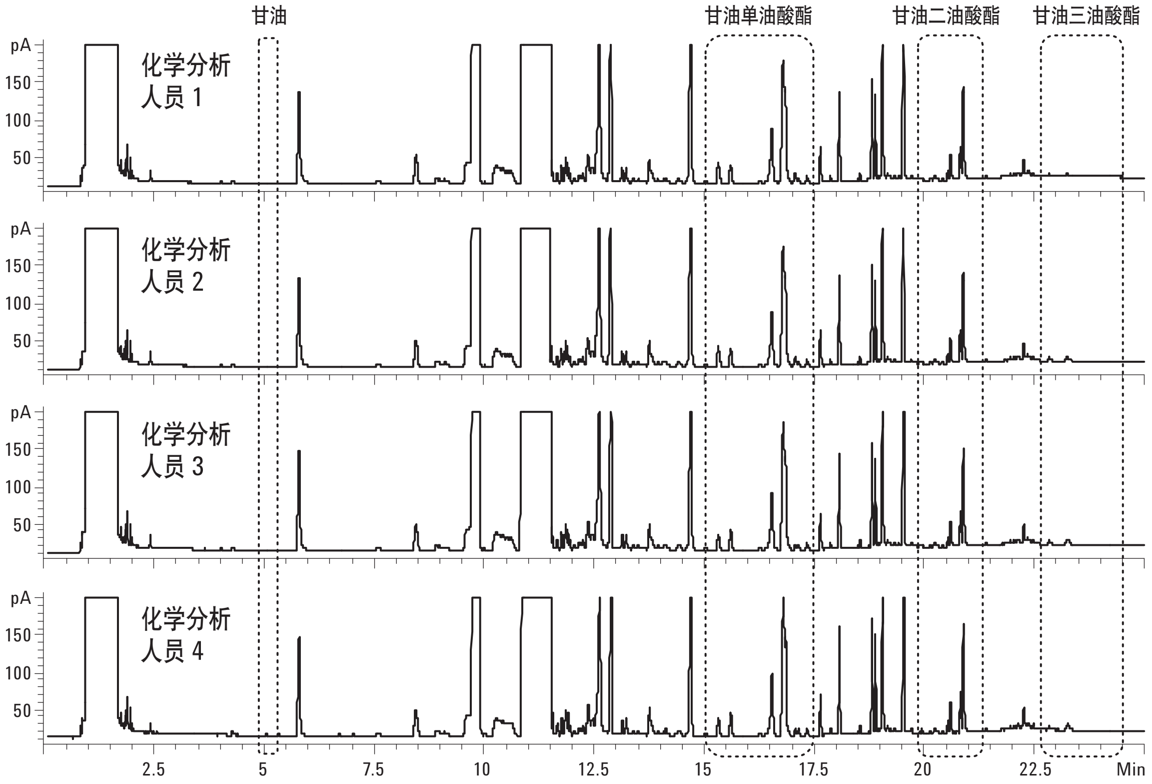


图 5. 四个化学分析人员分别在四天时间里制备的大豆油生物柴油样品的数据对比。每个化学分析人员均建立了自己的工作台样品前处理方案，然后根据 ASTM 方法 D6584 进行分析。所得结果几乎完全相同

表 8. 每个化学分析人员通过使用安捷伦工作台进行自动化样品前处理，获得了几乎相同的结果。其精度（重现性）完全符合针对多个操作者的 ASTM 标准

	化学分析人员 1			化学分析人员 2			重现性	ASTM R
	平行样 1	平行样 2	平均值	平行样 1	平行样 2	平均值	(r)	性能指标
游离甘油	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.007
甘油单油酸酯	0.107	0.114	0.111	0.109	0.118	0.113		
甘油二油酸酯	0.032	0.034	0.033	0.033	0.036	0.034		
甘油三油酸酯	0.009	0.009	0.009	0.008	0.009	0.008		
总甘油	0.152	0.161	0.156	0.154	0.166	0.160	0.005	0.094
	化学分析人员 3			**化学分析人员 4**			**重现性**	**ASTM R**
	平行样 1	**平行样 2**	**平均值**	**平行样 1**	**平行样 2**	**平均值**	**(r)**	**性能指标**
游离甘油	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.000	0.007
甘油单油酸酯	0.116	0.114	0.115	0.113	0.114	0.113		
甘油二油酸酯	0.033	0.033	0.033	0.032	0.033	0.032		
甘油三油酸酯	0.007	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006		
总甘油	0.160	0.157	0.159	0.155	0.157	0.156	0.004	0.091

结论

本文证实了可通过 Agilent 7696A 工作台实现自动化的复杂、多步骤的样品前处理方案。通过工作台制备的样品所获得的分析结果与传统的手动样品前处理程序得到的分析结果一致。即使将前处理步骤缩放到 2 mL 样品瓶中，工作台制备的样品仍能实现极高的定量精度。而由于工作台的样品制备规模的减小，使得溶剂、试剂和校准标样的用量也减小了 10 倍。此外，无需使用一次性玻璃器皿和昂贵的定容玻璃器皿。

参考文献

1. “D6584 Test Method for Determination of Free and Total Glycerine in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography”, ASTM International: 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, USA, 2010
2. “Agilent 7696A 样品前处理工作台”，安捷伦科技公司，出版号 5990-6908CHCN，2011 年 1 月 28 日
3. Rebecca Veeneman 和 Dale Snyder，“自动样品制备改善数据质量”，安捷伦科技公司，出版号 5990-6874CHCN，2010 年 12 月 10 日

更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2012
2012 年 4 月 27 日，中国印刷
5990-7525CHCN

Agilent Technologies

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台进行复杂样品的自动化制备

在分析化学中，样品制备可以是简单的稀释也可以是多步骤的衍生化，以改善仪器的测定结果。虽然样品制备对任何化学测定都是至关重要的，但很少有化学分析工作者愿意做这一工作，尤其是当这一过程较为复杂，并且需要使用许多危险化学品时。ASTM 方法 D6584 就是一个复杂样品制备的例子：该方法用于 B100 生物柴油中的丙三醇含量的测定[1]。方法要求在 GC 分析前对不挥发的丙三醇进行衍生化。该样品制备步骤复杂，耗时并且需要使用毒性较大、有明显恶臭气味的吡啶。

安捷伦 7696A 样品制备工作台是一款独立的，专为自动化样品预处理设计的仪器[2,3]。其具备制备复杂样品的能力，如 ASTM D6584，已通过商品化生物柴油得到了验证。工作台制备样品测得的结果与人工制备样品的结果一致（图 1）。使用自动样品制备工作台，即使是缺乏这方面预处理经验的实验室也能取得精确一致的结果。图 2 为 4 个无任何生物柴油样品处理经验的操作者使用 7696A 工作台制备样品测得的结果。如需获得有关此应用更全面详尽的信息请参考安捷伦出版物 No. 5990-7525CHCN。

主要优势

- 无需前处理经验即可获得与人工样品制备相同的结果
- 更少的资源消耗
- 更少昂贵试剂的使用
- 更少暴露于有毒化学品
- 更多时间用于关键性工作（如方法开发，数据审阅）

[1] “D6584 Test Method for Determination of Free and Total Glycerine in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography,” ASTM International: 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, USA, 2010

[2] 安捷伦 7696A 样品制备工作台 安捷伦科技 出版号：5990-6908CHCN, 2011年1月28日

[3] “自动化样品制备提高数据质量”, Rebecca Veeneman 和 Dale Synder, 安捷伦科技, 出版号：5990-6974CHCN, 2010年12月10日

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台进行复杂样品的自动化制备

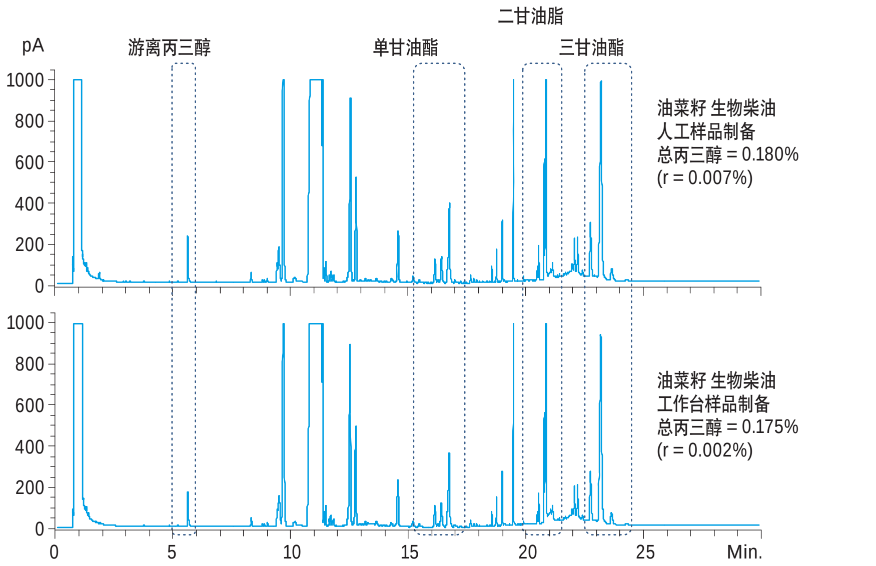


图 1. 工作台样品制备结果与人工样品制备取得相同的结果，并且具有更高的精密度。每个样品均测定平行样以计算重复性（r）

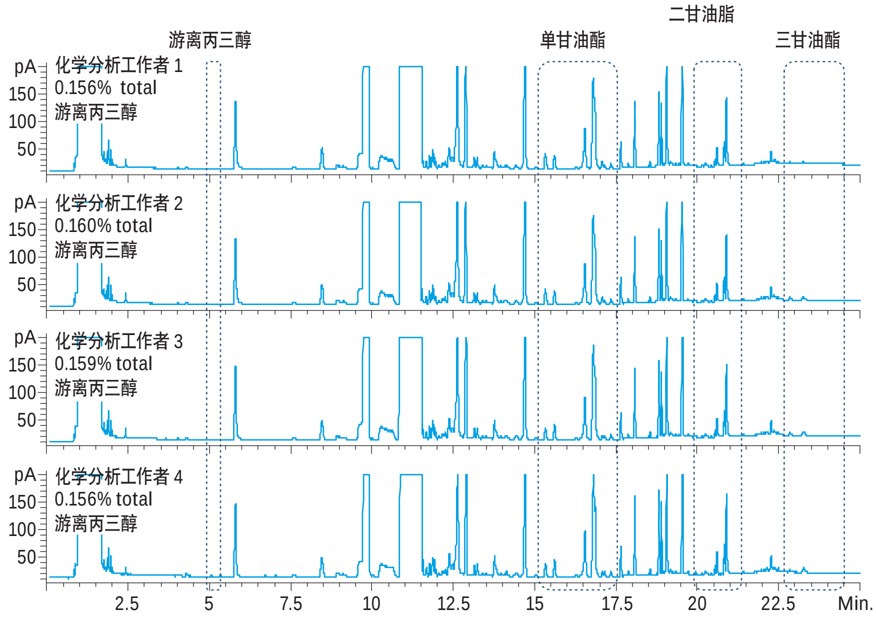


图 2. 四个操作者使用安捷伦 7696A 工作台制备大豆柴油样品的测定结果比较

更多信息:
www.agilent.com / chem / cn

电子邮件:
info_agilent@agilent.com

联系您所在地区的客户服务:
www.agilent.com / chem / contactus

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2011

2011年6月8日 中国印刷
5990-8204CHCN

Agilent Technologies

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台自动制备标样和样品进行航空燃料中脂肪酸甲酯 (FAME) 的 GC/MS 分析

应用简报

燃料

作者

James D. McCurry，博士
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE
19808

摘要

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台自动制备标样和样品，进行航空燃料中总脂肪酸甲酯 (FAME) 的 IP585 GC/MS 分析。与手动样品制备相比，工作台在节约 10 倍的试剂和标样的基础上，可以获得更好的分析结果。使用工作台制备 GC/MS 校准标样无需重复操作，满足所有性能要求，节约了大量的实验室时间。工作台制备的航空燃料样品，在不同 FAME 浓度水平污染分析中的精密度远远超过了方法要求。工作台制备的样品与手动制备的样品相比，前者对已知浓度 FAME 分析结果具有更高的回收率。

Agilent Technologies

前言

Energy Institute 方法 IP585，使用 GC/MS 测定市售航空燃料中的痕量脂肪酸甲酯 (FAME) [1]。FAME 污染多发生在使用多产品管道 (MPP) 同时运输生物柴油和航空燃料的时候。Joint Inspection Group (JIG)，作为航空燃料的生产和消费集团，建立了不超 5 mg/kg 的总 FAME 限值。安捷伦近期出版的报告对使用安捷伦 5975C 系列 GC/MSD 运行 IP585 方法 [2] 的操作和性能进行了详细的介绍。

和大多数仪器测定相同，校准标样和样品的成功配制对获得高质量结果起着至关重要的作用。方法 IP585 中，使用带刻度的微升移液器制备 1 mL 的校准标样，使用微升进样针将含有 1000 mg/mL 十七酸甲酯-d33 (C17:0d33) 的内标液添加到各校准标样和样品中。由于移取体积很小，对标样和样品制备的准确度要求较高，需要大量技巧性操作。更好的方法是进行自动化样品制备，使用精确至微升体积的仪器实现液体分配和混匀的高准度和高精度操作。

安捷伦 7696A 样品制备平台是一款独立操作的仪器，专门用于进行样品的自动化制备，其使用两个安捷伦 7693A 进样塔在 2 mL 样品瓶间进行体积转移，装有不同试剂资源、标样和样品的试剂瓶排列于 3 个 50 位样品盘上。样品盘配有一个机械臂、一个涡旋混和台和一个样品加热台。使用安捷伦工作台制备校准标样证明比手动制备标样可获得更好的校准结果。此外，工作台在 2 mL 样品瓶中制备样品与手动制备样品得到的定量结果相同 [3]。在本应用报告中，使用安捷伦 7696A 工作台制备了 11 个校准标样和 3 个航空燃料样品，每个都包含了不同浓度的 FAME 污染物。标样和样品的体积从 1 mL 缩小了 10 倍，变为 100 µL，以节约试剂资源如溶剂、储备液和内标溶液。使用 IP585 方法，对工作台制备的分析结果和手动制备的分析结果进行了精密度的比较。

工作台自动化制备程序设计

线性稀释法制备校准标样

IP585 方法中使用 10 个工作校准标样 (WCS) 校准整个 GC/MS 系统。每个 WCS 包含六种不同浓度的 FAME，如表 1 所示。表 2 列出了人工线性稀释的操作方案，手动制备 WCS 各 1 mL 的校准液。工作台的自动化制备，将每个校准液的最终体积从 1 mL 缩小到 100 µL，如表 3 所示。在工作台软件中定义四种试剂资源（表 4）进行标样制备。第一个试剂为 10 个空的样品瓶，用于盛装最后的 WCS。第二个试剂为 1000 µL 99% n-C_{12}，作为稀释溶剂。第三个试剂为 1000 µL 工作标准溶液 (WSS)。最后一个试剂为 500 µL 的内标溶液。图 1 为使用工作台软件进行自动化校准标样制备的试剂布局。

表 1.　　航空燃料中总脂肪酸甲酯定量所用的化合物

化学名称	通用名	符号	分子式	分子量
十六酸甲酯	棕榈酸甲酯	C16:0	$C_{17}H_{34}O_2$	270.45
十七酸甲酯	珠光脂酸甲酯	C17:0	$C_{18}H_{36}O_2$	284.45
十八酸甲酯	硬脂酸甲酯	C18:0	$C_{19}H_{38}O_2$	298.50
十八酸甲酯	油酸甲酯	C18:1	$C_{19}H_{36}O_2$	296.49
十八烷二烯酸甲酯	亚油酸甲酯	C18:2	$C_{19}H_{34}O_2$	294.47
十八烷三烯酸甲酯	亚麻酸甲酯	C18:3	$C_{19}H_{32}O_2$	292.45

95% 用于生产生物燃料的普通原材料中均能检出这六种脂肪酸甲酯

表 2.　　手动线性体积稀释法制备 1 mL 工作校准标样 (WCS)

工作标准溶液 (WSS) 体积 (μL)	n-C_{12} 溶剂 体积 (μL)	内标 (ISTD) 体积 (μL)	FAME 各组分 最终浓度 (mg/kg)
1000	0	10	100
800	200	10	80
600	400	10	60
400	600	10	40
200	800	10	20
100	900	10	10
80	920	10	8
60	940	10	6
40	960	10	4
20	980	10	2
0	1000	10	0

表 3.　　安捷伦工作台线性体积稀释法自动化制备 100 µL 工作校准标样 (WCS)

工作标准溶液 (WSS) 体积 (µL)	n-C_{12} 溶剂 体积 (µL)	内标 (ISTD) 体积 (µL)	FAME 各组分 最终浓度 (mg/kg)	工作校准液 (WCS)
100	0	1	100	高浓度标液 5
80	20	1	80	高浓度标液 4
60	40	1	60	高浓度标液 3
40	60	1	40	高浓度标液 2
20	80	1	20	高浓度标液 1
10	90	1	10	低浓度标液 5
8	92	1	8	低浓度标液 4
6	94	1	6	低浓度标液 3
4	96	1	4	低浓度标液 2
2	98	1	2	低浓度标液 1
0	100	1	0	空白

表 4.　　工作台自动制备 IP585 校准标样的试剂资源布局

试剂资源	试剂资源类型	样品瓶范围	用量
工作校正标样 (WCS)	空瓶	51-60	1
n-C_{12} 溶剂	化学试剂	61	1000 µL
工作标准溶液 (WSS)	化学试剂	71	1000 µL
内标 (ISTD)	化学试剂	81	500 µL

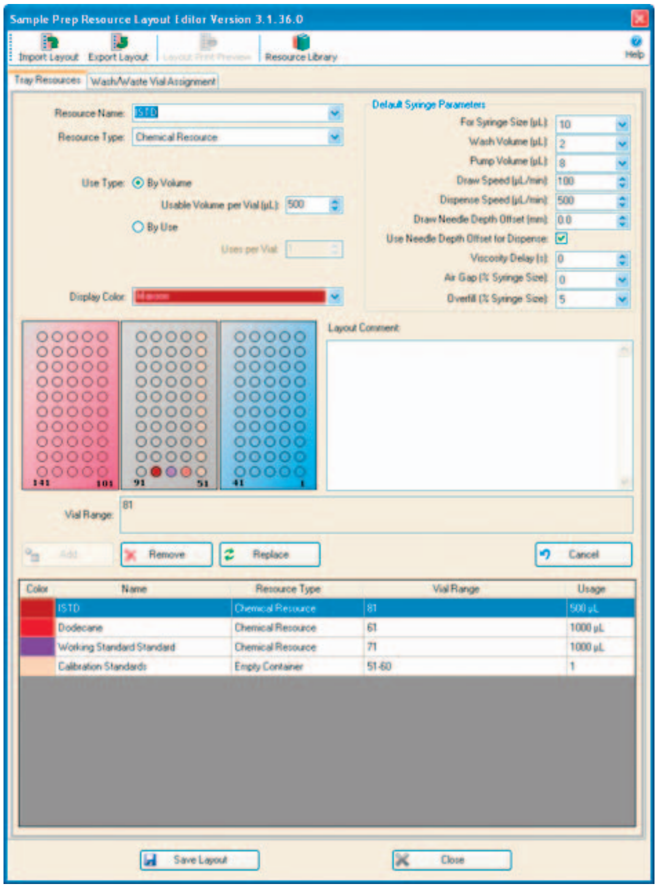


图 1.　　工作台自动制备 IP585 校准标样的试剂资源布局。自动化制备得到的 10 个校准标样分别位于样品盘上 51 位到 60 位样品瓶

根据图中所示的试剂资源布局，使用两种安捷伦工作台方法制备表 3 中的标样系列。“IP585_Low.M”用于制备 2 到 10 mg/kg 的低浓度标样，“IP585_High.M”用于制备 20 到 100 mg/kg 的高浓度标样。表 5 和表 6 分别列出了每个方法各步骤的制备细节。用户可以使用工作台软件上图形化的“拖-放”界面简单快速地建立方法。图 2 例举了 IP585_Low.M 的方法设定过程。

表 5.　安捷伦工作台自动制备低浓度工作校正标样 (WCS) 各 100 µL

步骤	安捷伦工作台操作	详细说明	进样针
1	清洗	用溶剂清洗 250 µL 进样针	250 µL
2	添加	100 µL n-C_{12} 加入到低浓度空白（样品瓶 1）	250 µL
3	添加	98 µL n-C_{12} 加入到低浓度标样 1（样品瓶 51）	250 µL
4	添加	96 µL n-C_{12} 加入到低浓度标样 2（样品瓶 52）	250 µL
5	添加	94 µL n-C_{12} 加入到低浓度标样 3（样品瓶 53）	250 µL
6	添加	92 µL n-C_{12} 加入到低浓度标样 4（样品瓶 54）	250 µL
7	添加	90 µL n-C_{12} 加入到低浓度标样 5（样品瓶 55）	250 µL
8	清洗	用溶剂清洗 25 µL 进样针	25 µL
9	添加	2 µL WSS 加入到低浓度标样 1（样品瓶 51）	25 µL
10	添加	4 µL WSS 加入到低浓度标样 2（样品瓶 52）	25 µL
11	添加	6 µL WSS 加入到低浓度标样 3（样品瓶 53）	25 µL
12	添加	8 µL WSS 加入到低浓度标样 4（样品瓶 54）	25 µL
13	添加	10 µL WSS 加入到低浓度标样 5（样品瓶 55）	25 µL
14	清洗	用溶剂清洗 25 µL 进样针	25 µL
15	添加	1 µL ISTD 加入到低浓度空白（样品瓶 1）	25 µL
16	添加	1 µL ISTD 加入到低浓度标样 1（样品瓶 51）	25 µL
17	添加	1 µL ISTD 加入到低浓度标样 2（样品瓶 52）	25 µL
18	添加	1 µL ISTD 加入到低浓度标样 3（样品瓶 53）	25 µL
19	添加	1 µL ISTD 加入到低浓度标样 4（样品瓶 54）	25 µL
20	添加	1 µL ISTD 加入到低浓度标样 5（样品瓶 55）	25 µL
21	清洗	用溶剂清洗 25 µL 进样针	25 µL
22	混匀	低浓度空白（样品瓶 1）1500 rpm 下振荡 30s	
23	混匀	低浓度标样 1（样品瓶 51）1500 rpm 下振荡 30s	
24	混匀	低浓度标样 2（样品瓶 52）1500 rpm 下振荡 30s	
25	混匀	低浓度标样 3（样品瓶 53）1500 rpm 下振荡 30s	
26	混匀	低浓度标样 4（样品瓶 54）1500 rpm 下振荡 30s	
27	混匀	低浓度标样 5（样品瓶 55）1500 rpm 下振荡 30s	

表 6.　安捷伦工作台自动制备高浓度工作校正标样 (WCS) 各 100 µL

步骤	安捷伦工作台操作	详细说明	进样针
1	清洗	用溶剂清洗 250 µL 进样针	250 µL
2	添加	100 µL n-C_{12} 加入到高浓度空白（样品瓶 2）	250 µL
3	添加	80 µL n-C_{12} 加入到高浓度标样 1（样品瓶 56）	250 µL
4	添加	60 µL n-C_{12} 加入到高浓度标样 2（样品瓶 57）	250 µL
5	添加	40 µL n-C_{12} 加入到高浓度标样 3（样品瓶 58）	250 µL
6	添加	20 µL n-C_{12} 加入到高浓度标样 4（样品瓶 59）	250 µL
7	清洗	用溶剂清洗 25 µL 进样针	250 µL
8	添加	20 µL WSS 加入到高浓度标样 1（样品瓶 56）	250 µL
9	添加	40 µL WSS 加入到高浓度标样 2（样品瓶 57）	250 µL
10	添加	60 µL WSS 加入到高浓度标样 3（样品瓶 58）	250 µL
11	添加	80 µL WSS 加入到高浓度标样 4（样品瓶 59）	250 µL
12	添加	100 µL WSS 加入到高浓度标样 5（样品瓶 60）	250 µL
13	清洗	用溶剂清洗 25 µL 进样针	25 µL
14	添加	1 µL ISTD 加入到高浓度空白（样品瓶 2）	25 µL
15	添加	1 µL ISTD 加入到高浓度标样 1（样品瓶 56）	25 µL
16	添加	1 µL ISTD 加入到高浓度标样 2（样品瓶 57）	25 µL
17	添加	1 µL ISTD 加入到高浓度标样 3（样品瓶 58）	25 µL
18	添加	1 µL ISTD 加入到高浓度标样 4（样品瓶 59）	25 µL
19	添加	1 µL ISTD 加入到高浓度标样 5（样品瓶 60）	25 µL
20	清洗	用溶剂清洗 25 µL 进样针	25 µL
21	混匀	高浓度空白（样品瓶 2）1500 rpm 下振荡 30s	
22	混匀	高浓度标样 1（样品瓶 56）1500 rpm 下振荡 30s	
23	混匀	高浓度标样 2（样品瓶 57）1500 rpm 下振荡 30s	
24	混匀	高浓度标样 3（样品瓶 58）1500 rpm 下振荡 30s	
25	混匀	高浓度标样 4（样品瓶 59）1500 rpm 下振荡 30s	
26	混匀	高浓度标样 5（样品瓶 60）1500 rpm 下振荡 30s	

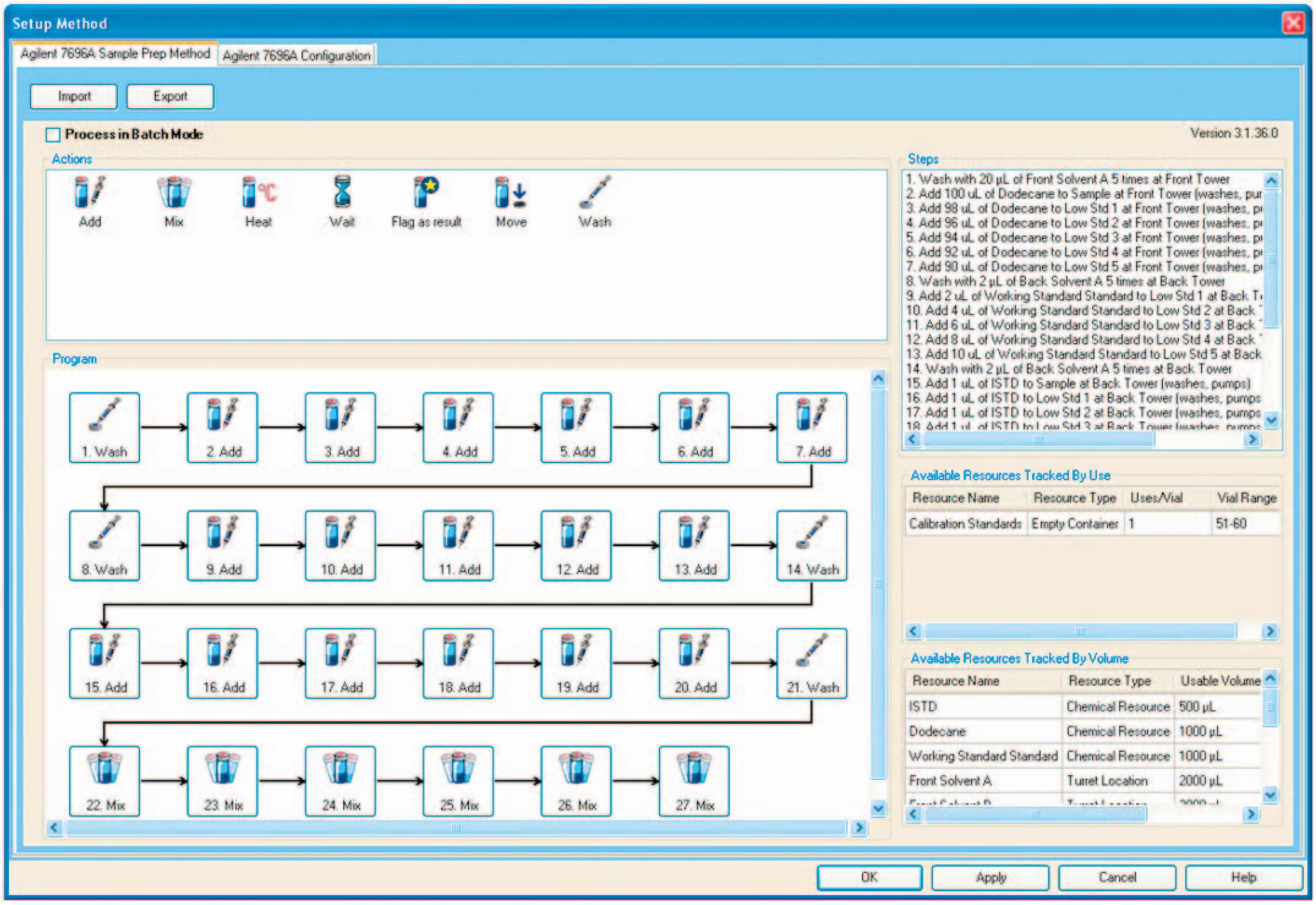


图 2.　　使用安捷伦工作台方法 IP585_Low.M 制备 5 个浓度的低浓度标样。方法的每一步都通过图形化的“拖-放”操作实现

使用安捷伦工作台的批处理模式进行航空燃料的样品制备

IP585 方法中，将 1 mL 燃料加入到 2 mL 样品瓶中，再加入 10 µL 内标。实验人员手动操作的流程为，先向每个样品瓶中分别加入燃料样品，然后再向每个样品中分别加入内标。该流程可通过安捷伦工作台软件的批处理功能实现高效化。批处理模式中，要确保所有样品全部完成上一个制备步骤后，才开始执行下一步操作，这样可最大化节约样品制备时间。只需在试剂更换时清洗进样针，同样也节约了溶剂消耗，减少了废弃试剂的产生。

工作台制备航空燃料样品只需两种试剂资源：装填燃料样品的样品瓶和装填内标溶液的单个样品瓶。该应用报告中对 10 个独立的燃料样品进行了制备，分别位于样品盘的第 51 位到 60 位。为消除制备过程中可能存在的任何交叉污染，每个样品瓶只使用 1 次。内标置于样品盘的第 81 位。在样品制备过程中，10 个空的 2 mL 加盖样品瓶分别列于样品盘的第 1 到第 10 位（图 3）。工作台 IP585_Samples.M 方法的批处理模式将 100 µL 各燃料样品加入到各自独立的空样品瓶中，再加入 1 µL 内标液进行混匀。图 4 为燃料样品制备的批处理模式图示。

实验

手动制备工作校正标样 (WCS) 和样品

按表 2 中所述，使用 1000 µL 刻度移液管和 25 µL 进样针将 10 个校正标样和一个溶剂空白手动制备到 2 mL 样品瓶中，再将 3 种燃料样品各取 1 mL 到 3 个样品瓶中，分别加入 10 µL 内标。这些样品中含有已知量的总 FAME，同时制备平行样以进行整体重复性测试。每个标样和样品均进行手动振荡混匀。

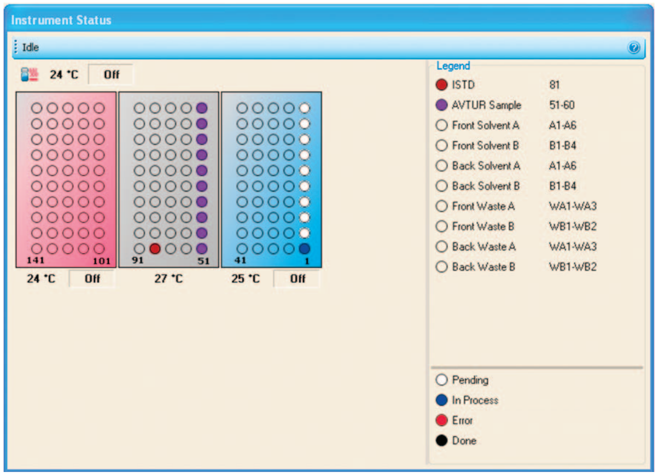


图 3.　　安捷伦工作台自动化制备 10 个燃料样品的试剂资源布局。第 1 位到第 10 位的空样品瓶用于样品制备结束后，盛装 100 mL 各燃料样品和内标

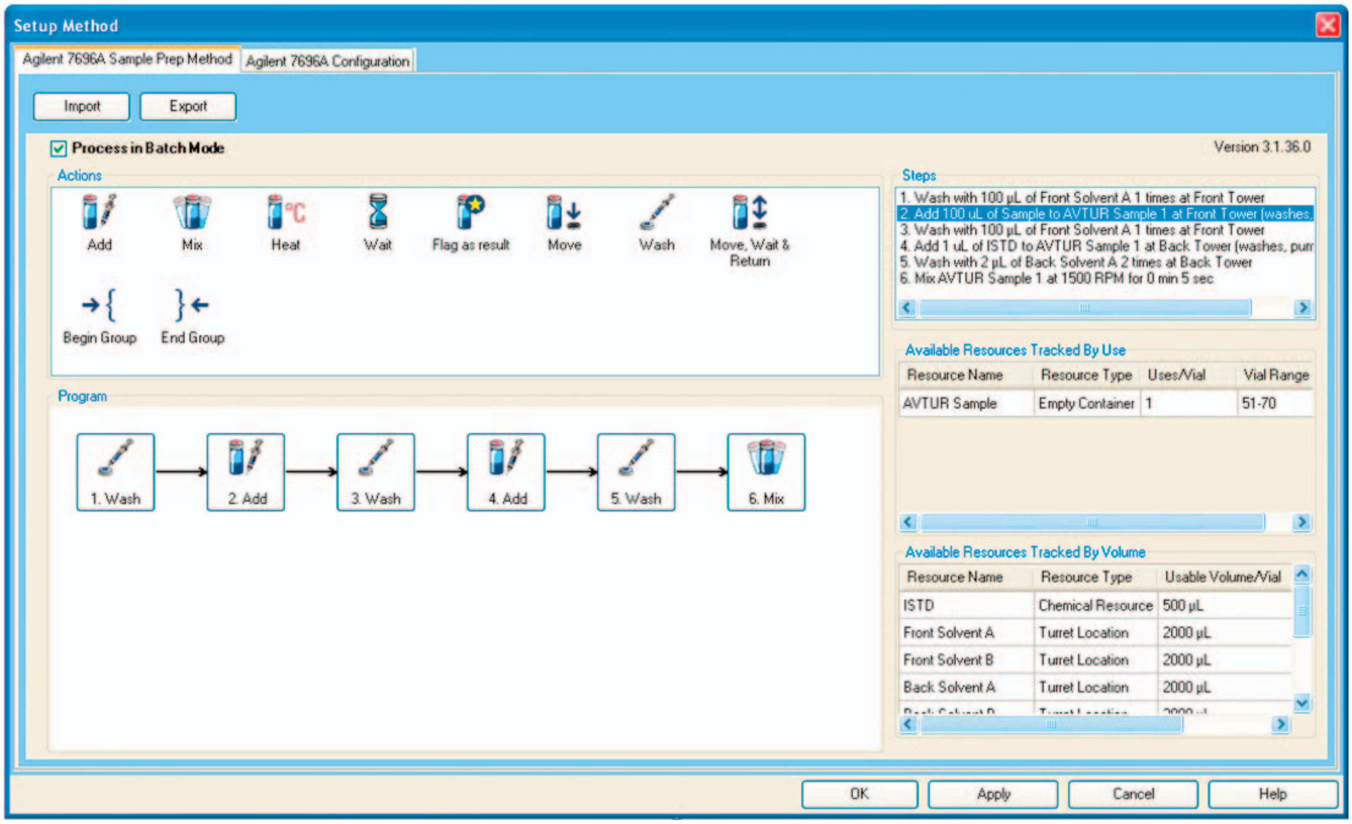


图 4.　　安捷伦工作台的批处理模式制备 10 个燃料样品。10 个样品均完成上一步操作后才执行下一步操作。该有效的处理流程极大地节约了时间和试剂使用量

自动化制备校正标样和航空燃料样品

安捷伦工作台的前后进样塔分别配置了 250 µL 进样针和 25 µL 进样针。250 µL 进样针的取样速度为 500 µL/min，进样速度为 1000 µL/min。25 µL 进样针的取样速度为 100 µL/min，进样速度为 500 µL/min。两个进样针的进样深度均设置为 0 mm，这样分配液体时，针尖可无限接近样品瓶底部，以确保样品全部转移到样品瓶中，得到精密度最佳的结果。该报告中使用高回收样品瓶，因为其 V 形底部可确保 GC/MS 自动进样器准确移取到小至 100 µL 体积的标样和样品。

使用工作台的序列设计按照 IP585_Low.M 和 IP585_High.M 方法分别制备 5 个低浓度标样和 5 个高浓度标样。完成 GC/MS 校准分析后，使用工作台的批处理模式方法 IP585_Samples.M 对 3 个燃料加标样品进行平行样的制备。

航空燃料中 FAME 的 GC/MS 分析

根据方法 IP585 要求，将安捷伦 5975C GC/MS 系统配置安捷伦 7693A 自动液体进样器。该配置如表 7 所示，各仪器操作条件见表 8。在运行样品和标样前，对 5975C 质谱进行自动调谐。首先运行校正标样和 n-C_{12} 试剂空白，并在运行燃料样品前对低浓度标样和高浓度标样的线性分别进行评估。在成功校准的基础上，可对燃料样品的平行样进行 GC/MS 分析。对单个的 FAME 峰进行定量，将单个 FAME 的含量进行叠加即得每个样品中总的 FAME 含量。

表 7.　　GC/MS 分析航空燃料中 FAME 的仪器配置

仪器	说明
安捷伦 5975C 系列 MSD	质谱仪配备惰性离子源
安捷伦 7890A GC 系统	配备 100 psi 的分流/不分流进样口和质谱接口
安捷伦 7693A 自动液体进样器	配有 150 位样品瓶架的自动液体进样器，适用于安捷伦 7890A GC
G1701EA	MSD 化学工作站软件，用于数据采集和分析

表 8.　　GC/MS 仪器条件

气相色谱仪条件	
进样口温度	260 °C
进样模式	不分流
进样口衬管	不分流衬管、单细径锥、带玻璃毛（部件号 50623587）
进样量	1 uL
色谱柱	HPINNOWAX、50mx0.2mm、0.4µm（部件号 19091N205）
色谱柱载气流速	氦气、0.6 mL/min、恒流
柱箱程序升温	
初始温度	150 °C 保持 5 min
柱箱升温程序 1	12 °C /min 升温到 200 °C 保持 17 min
柱箱升温程序 2	3 °C/min 升温到 252 °C 保持 6.5 min
质谱接口	260 °C
质谱仪条件	
离子源	70 eV 电子电离源
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
溶剂延迟	20 min

结果

手动制备标样和安捷伦工作台自动化制备标样的校准曲线的性能比较

将手动制备和工作台制备的两套校正标样用 5975C GC/MS 系统运行分析。图 5 和图 6 分别为工作台制备的 FAME 单组分的低浓度标样和高浓度标样的校准曲线。所有曲线经强制过零点回归分析后线性关系良好。手动制备标样和工作台制备标样的曲线的结果比较见表 9。对于低浓度校准，手动制备标样和工作台制备标样的曲线的斜率非常接近，所有组分的相关系数 (R^2) 均满足方法的要求，大于 0.985。对于高浓度校准，除了亚油酸甲酯 (C18:2) 和亚麻酸甲酯 (C18:3) 外，均表现出了相同的性能。该应用中，工作台制备标样的校准曲线更容易达到方法要求。而手动制备标样的线性不能满足要求。因此，只能在手动重新制备高浓度标样并且线性满足要求后，才能运行手动制备的燃料样品，这无疑使手动样品制备又消耗了大量的时间。另一方面，既然工作台制备标样的曲线自始至终都具有良好的线性，工作台制备的样品也可以立即进行分析。

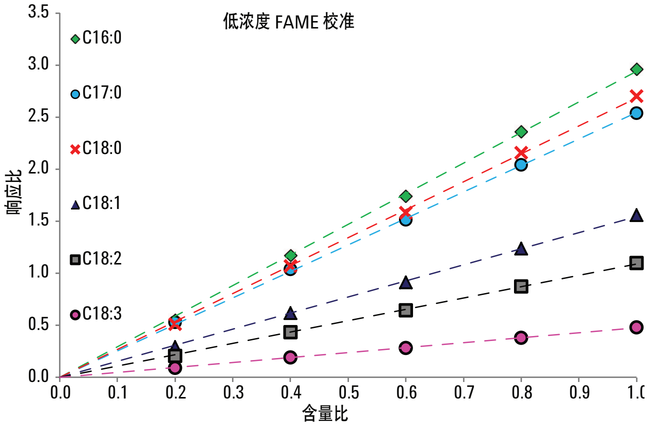


图 5. 使用安捷伦工作台制备的 2 mg/kg、4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg 和 10 mg/kg FAME 的低浓度校准曲线。根据方法规定，曲线回归强制过零点。每条曲线均满足线性要求，$R^2 > 0.985$

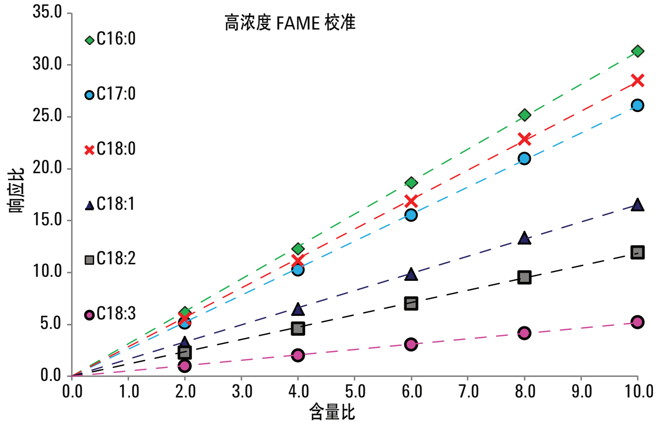


图 6. 使用安捷伦工作台制备的 20 mg/kg、40 mg/kg、60 mg/kg、80 mg/kg 和 100 mg/kg FAME 的高浓度校准曲线。根据方法规定，曲线回归强制过零点。每条曲线均满足线性要求，$R^2 > 0.985$

表 9. 手动制备标样和工作台自动化制备标样的校准曲线的斜率和相关系数 (R^2) 比较

高浓度校准 (2–10 mg/kg)

	斜率		R^2	
FAME	**手动制备**	**工作台制备**	**手动制备**	**工作台制备**
C16:0	2.941	2.941	1.000	0.999
C17:0	2.441	2.544	1.000	1.000
C18:0	2.664	2.684	1.000	0.999
C18:1	1.539	1.545	1.000	0.999
C18:2	1.105	1.090	1.000	0.999
C18:3	0.478	0.475	1.000	0.999

低浓度校准 (20–100 mg/kg)

	斜率		R^2	
FAME	**手动制备**	**工作台制备**	**手动制备**	**工作台制备**
C16:0	4.962	3.127	0.985	1.000
C17:0	4.777	2.606	0.985	1.000
C18:0	4.815	2.840	0.985	1.000
C18:1	2.510	1.653	0.985	1.000
C18:2	1.713	1.184	0.984	0.999
C18:3	0.705	0.516	0.983	0.999

手动制备高浓度的 C18:2 和 C18:3 FAME 标样的校准的相关系数 R^2 不能满足大于 0.985 的要求

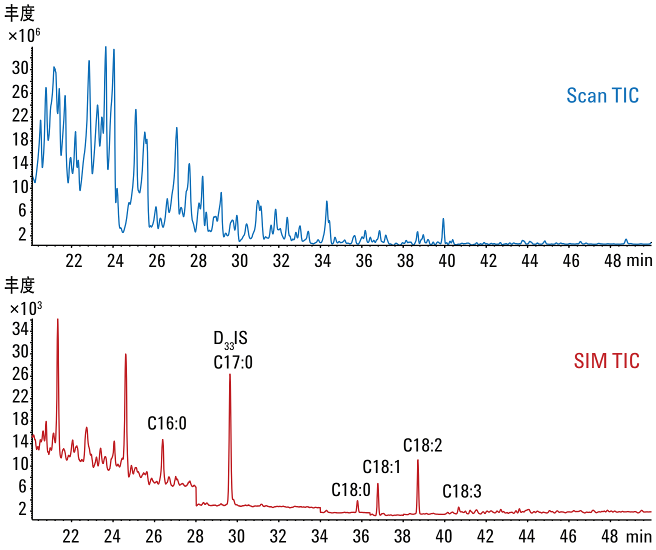


图 7. 工作台制备含 5 mg/kg 总 FAME 的燃料样品的 SIM/SCAN GC/MS 谱图

手动样品制备和工作台样品制备的比较

图 7 为航空燃料中 FAME 分析的典型 GC/MS SIM/SCAN 谱图。手动制备样品和工作台制备样品的分析结果比较见表 10、11 和 12。对每组平行样，均计算了总 FAME 含量的重复性 (r)，并与 IP585 方法发表的规范进行比较。重复性用于测量精密度，通过计算同一个操作者在同一天使用同一台仪器对相同样品的两个平行样进行测定的差值而得。对于 5 mg/kg FAME 的加标样（表 11），手动制备样品的重复性不能满足 IP585 的方法要求，因此，此结果为无效结果。对所有工作台制备的样品，重复性均优于方法规定的数值。此外，工作台制备样品的结果更接近于在燃料样品中加标的 FAME 总量。

表 10. 1 mg/kg FAME 燃料加标样品的手动制备分析结果和工作台制备分析结果的比较

1 mg/kg 燃料加标 —— 手动制备

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	总 FAME
平行 1	0.8	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.3
平行 2	0.8	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.3
						均值	1.3
						r (**计算值**)	0.0
						r (IP585)	0.7

1 mg/kg 燃料加标 —— 工作台制备

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	总 FAME
平行 1	0.8	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.3
平行 2	0.7	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	1.2
						均值	1.3
						r (**计算值**)	0.1
						r (IP585)	0.7

表 11. 5 mg/kg FAME 燃料加标样品的手动制备分析结果和工作台制备分析结果的比较

5 mg/kg 燃料加标 —— 手动制备

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	总 FAME
平行 1	1.1	0.0	0.3	0.4	3.8	1.2	6.8
平行 2	0.5	0.0	0.2	0.9	2.6	0.7	4.9
						均值	5.9
						r (**计算值**)	1.9
						r (IP585)	1.4

5mg/kg 燃料加标 —— 工作台制备

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	总 FAME
平行 1	0.5	0.0	0.1	0.9	2.7	0.5	4.7
平行 2	0.6	0.0	0.2	0.9	2.7	0.6	5.0
						均值	4.9
						r (**计算值**)	0.3
						r (IP585)	1.3

表 12. 40 mg/kg FAME 燃料加标样品的手动制备分析结果和工作台制备分析结果的比较

40 mg/kg 燃料加标 —— 手动制备

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	总 FAME
平行 1	4.4	0.0	1.7	7.9	24.0	4.1	42.1
平行 2	4.7	0.0	1.8	8.3	25.1	4.3	44.2
						均值	43.1
						r (**计算值**)	2.1
						r (IP585)	7.5

40 mg/kg 燃料加标 —— 工作台制备

	C16:0	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	总 FAME
平行 1	4.8	0.0	1.8	8.3	25.4	4.2	41.4
平行 2	4.3	0.0	1.7	7.9	24.0	4.1	39.1
						均值	40.2
						r (**计算值**)	2.3
						r (IP585)	7.1

结论

研究表明，安捷伦工作台自动化制备的校正标样和样品应用于 IP585 GC/MS 方法测定航空燃料中的 FAME 取得了成功的结果。通过比较表明，手动样品制备技术在处理微量的样品和试剂时很难达到令人满意的分析结果。该应用表明，与手动样品制备相比，工作台自动化样品制备可获得更佳的方法性能。使用工作台制备样品无需进行重复操作，节约了大量的时间，并且节约了 10 倍的溶剂和试剂。

参考文献

1. “IP 585/10 “Determination of fatty acid methyl esters (FAME), derived from bio-diesel fuel, in aviation turbine fuel – GC-MS with selective ion monitoring/scan detection method”, The Energy Institute, London, UK.

2. “GC/MS Analysis of Trace Fatty Acid Methyl Esters (FAME) in Jet Fuel Using Energy Institute Method IP585”, James D. McCurry, Agilent Technologies, Agilent Publication Number 5990-6974EN, November 10, 2011.

3. “自动样品制备改善数据质量”，Rebecca Veeneman 和 Dale Synder，安捷伦出版号 5990-6874CHCN，2010 年 12 月 2 日。

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息，请访问
www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司

2012 年 1 月 12 日 中国印刷
5990-9717CHCN

Agilent Technologies

Agilent 7696A 样品前处理工作台对样品进行自动化预处理，满足 EN14105:2011 方法：气相色谱分析生物柴油

应用简报

燃料

作者

James D. McCurry 博士

安捷伦科技有限公司

2850 Centerville Rd

Wilmington, DE

19808

摘要

最新修订的欧盟方法 EN14105 描述了手动制备标样和样品的过程，以对 B100 生物柴油中的甘油污染物进行气相色谱分析，该方法步骤繁琐且复杂。而 Agilent 7696A 样品前处理工作台成功地对该方法中的标样和样品进行了自动化前处理，同时试剂用量和化学废弃物均减少了 10 倍。采用工作台制备的标样校准性能已超过了该方法的指标要求。利用工作台对市售生物柴油样品进行前处理，获得了极高的精度，远远高于方法的性能指标。

Agilent Technologies

前言

在遵循欧盟法规的国家，B100 生物柴油的质量通过测定燃料中的游离甘油和总甘油以及单脂肪酸甘油酯、二脂肪酸甘油酯和三脂肪酸甘油酯的含量来控制。气相色谱 (GC) 方法 EN14105 可用于分离和定量这些化合物。由于甘油、单脂肪酸甘油酯和二脂肪酸甘油酯都是不挥发的，因此该方法介绍了一种复杂的程序，在 GC 分析前将这些化合物衍生化以生成挥发性的硅烷化物质。2011 年，欧洲标准化委员会 (CEN) 对此方法进行了更新，改善了 GC 性能、甘油酯定量以及整体精度 [1]。本应用简报介绍了使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台对校准标样和样品进行自动化前处理，再通过 Agilent 7890A 系列气相色谱系统进行分析。

该工作台是一款专为自动化样品前处理而设计的独立仪器。它采用两个 Agilent 7693A 进样塔，在 2 mL 样品瓶间定量移取液体。装有不同化学资源、标样和样品的样品瓶置于三个 50 位的样品盘上。样品盘配备有机械臂、涡旋混合台板以及样品加热台板。在生物柴油分析中，工作台可成功用于 ASTM 方法 D6584 中样品的前处理，该方法与 EN14105 方法相似 [2]。在相关应用简报中，使用工作台制备的样品所得分析结果与手动制备样品获得的结果一致。

安捷伦工作台更新的最新版本 Easy SamplePrep (ESP) 软件，可以使化学资源和时间得到更有效的利用。作为其核心部分，ESP 提供了一个简单的软件平台，允许用户使用代表工作台各个操作的拖放图标来快速建立样品前处理方法。ESP 中新的 **"Batch Mode（批量模式）"** 的操作模式，可以让工作台在进行下一个操作前对所有样品重复相同的操作。对于可采用批量模式的方法而言，可以显著提高清洗溶剂和废液的利用率并缩短样品前处理时间 [3,4]。

实验部分

EN14105 校准标样的工作台前处理

工作台在后进样塔处配备有蓝色系列 25 µL 气密进样针（部件号 G4513-80241），在前进样塔处配备有蓝色系列 500 µL 气密进样针（部件号 G4513-60561）。用于制备标样和样品的化学资源列于表 1 中。用于制备标准甘油酯溶液的三种参考甘油酯纯化合物购于 Nu-Chek Prep (www.nu-chekprep.com)。每种化学资源分别存放在单独的 2 mL 高回收率样品瓶中（部件号 5183-2030），使用带 PTFE 内衬隔垫的螺口盖（部件号 5040-4682）密封。

表 1. 用于方法 EN14105:2011 的化学资源和标样

资源	说明	供应商
庚烷	毛细管气相色谱级	Sigma Aldrich 部件号 H9629
甘油储备液	0.5 mg/mL 吡啶溶液	Sigma Aldrich 部件号 44892-U
丁三醇溶液	1 mg/mL 吡啶溶液	部件号 5982-0024
MSTFA（N-甲基-N三甲基硅烷基三氟乙酰胺）	硅烷化试剂	部件号 5190-1407
标准甘油酯溶液	2.5 mg/mL THF溶液	Nu-Chek Prep
单脂肪酸甘油酯保留时间标样	10 mg/mL 吡啶溶液	部件号 5190-1410
吡啶	无水级	Sigma Aldrich 部件号 270970

利用 Agilent ESP 软件在工作台中对化学资源进行布局并分配初始属性。此资源布局如表 2 所述，并以图示形式显示于图 1 中。

表 2. 用于制备图 1 中所示标样和样品的安捷伦工作台化学资源

资源名称	资源类型	使用类型	用量 (μL)	样品瓶范围
庚烷	化学资源	按体积	1000	81–95
甘油贮备液	化学资源	按体积	1000	61
丁三醇溶液	化学资源	按体积	1000	62
MSTFA	化学资源	按体积	1000	63
标准甘油酯溶液	化学资源	按体积	1000	64
单脂肪酸甘油酯保留时间标样	化学资源	按体积	1000	65
吡啶	化学资源	按体积	500	71
空样品瓶				51–55

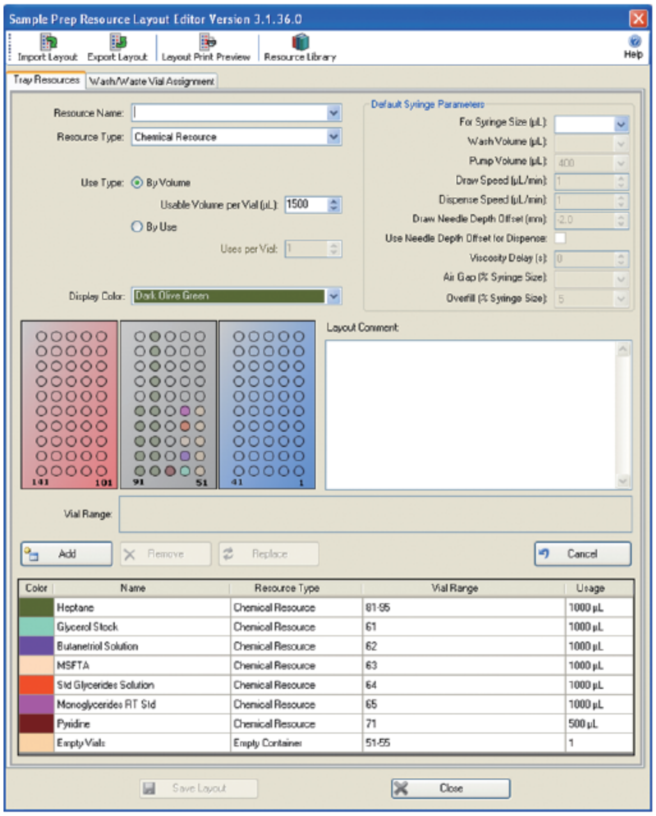


图 1. 用于根据方法 EN14105 制备标样和样品的 Easy Sample Prep (ESP) 软件布局

EN14105 方法要求使用线性稀释法配制五个校准标样。四个标样含有不同含量的甘油以及相同量的内标 1,2,3-丁三醇。第五个校准标样含有三种单脂肪酸甘油酯，通过保留时间对比，定性生物柴油中的这些化合物。EN14105 方法介绍了用于制备大约 10 mL 校准标样的步骤。由于工作台使用 2 mL 样品瓶，因此该方法的自动化所需体积将缩小 10 倍 [2]。表 3 描述了用于制备这五个校准标样的 37 个步骤。因为是线性稀释，批量模式未能用于标样的前处理（图 2）。特别值得注意的是，将参数 Needle Depth Offset（针头深度偏移）设置为 0，同时结合使用高回收率样品瓶，以确保制备这些标样所需的小体积液体完全混合。在分配每个资源时，额外使用 5% 的溢出体积，以消除进样针内可能产生气泡造成的潜在误差。

EN14105 中 B100 生物柴油样品的工作台前处理

EN14105 方法要求称量 100 mg 生物柴油样品置于反应样品瓶中进行硅烷化。由于工作台的样品制备规模缩小了 10 倍，因此只需称量 10 mg 样品置于 2 mL 高回收率样品瓶中。因为未配备分析天平，在工作台上不能自动进行样品称量。由于称量 10 mg 生物柴油非常困难，因此使用 Eppendorf Reference 可调量程移液器 (10–100 µL) 移取样品。通过手动移取 11.5 µL 生物柴油置于去皮重的 2 mL 高回收率样品瓶中，并记录精确到 0.01 mg 的重量，从而完成 10 mg 生物柴油的称量。

表 3.　用于根据方法 EN14105 制备校准标样的工作台方法

步骤	工作台操作	说明	进样针	抽取速度 (µL/min)	推出速度 (µL/min)	针头深度补偿 (mm)	粘度延迟 (s)	溢出 %
1	清洗	用 5 µL 丁三醇清洗进样针三次	25 µL	250	1000		0	
2–6	添加	将 8 µL 丁三醇分别加入 1、2、3、4、5 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
7	清洗	用溶剂 A 清洗进样针	25 µL	250	1000		0	
8	清洗	用 5 µL 甘油储备液清洗进样针	25 µL	250	1000		0	
9	添加	将 1 µL 甘油储备液加入 1 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
10	添加	将 4 µL 甘油储备液加入 2 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
11	添加	将 7 µL 甘油储备液加入 3 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
12	添加	将 10 µL 甘油储备液加入 4 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
13	添加	将 5 µL 甘油单油酸酯保留时间标样加入 5 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
14	添加	将 20 µL 甘油酯标样加入 5 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
15	添加	将 20 µL 吡啶加入 5 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
16	清洗	用溶剂 A 清洗进样针三次	25 µL	250	1000		0	
17–21	添加	将 15 µL MSTFA 分别加入 1、2、3、4、5 号空样品瓶中	25 µL	250	1000	0	2	5
22–26	混合	将 1、2、3、4、5 号空样品瓶在 2,500 RPM 下混合 15 s						
27	静置	15 min						
28–32	添加	将 800 µL 庚烷分别加入 1、2、3、4、5 号空样品瓶中	500 µL	1250	5000	0	2	5
33–37	混合	将 1、2、3、4、5 号空样品瓶在 2,500 RPM 下混合 15 s						

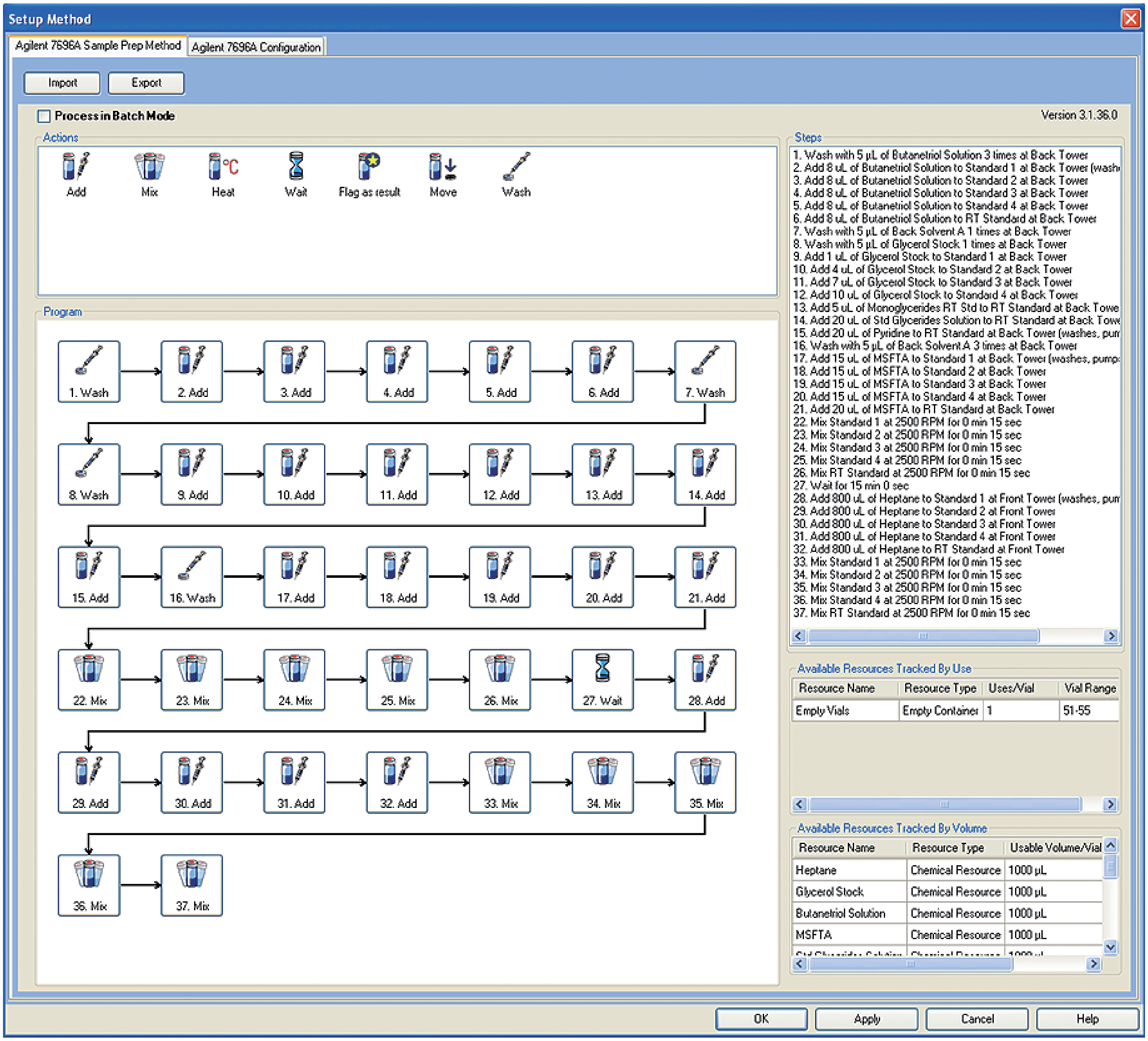


图 2.   用于根据方法 EN14105 制备校准标样的 Easy Sample Prep (ESP) 软件方法

通过向样品中加入固定体积的丁三醇储备液、标准甘油酯储备液、吡啶和 MSTFA，对非挥发性组分进行衍生化，以进行 EN14105 方法中的样品前处理。15 min 后，向混合物中加入庚烷以淬灭反应。由于工作台使用的是 2 mL 样品瓶，每种试剂的加入体积都缩小了 10 倍。此样品前处理过程的每个步骤列于表 4 中。使用 ESP 软件创建批量模式方法进行样品前处理可以同时节约时间和资源。此批量模式方法如图 3 所示。

标样前处理和样品前处理均使用相同的资源布局，因此工作台可以利用 ESP 软件顺序队列同时运行两个方法。在本应用简报中，一共对 10 份大豆油衍生的 B100 生物柴油平行样进行了前处理，以评估工作台样品前处理的精度。

表 4.　工作台用于制备 EN14105 方法中生物柴油样品的十个步骤

步骤	工作台操作	说明	进样针	抽取速度 (μL/min)	推出速度 (μL/min)	针头深度偏移 (mm)	粘度延迟 (s)	溢出 %
1	清洗	用 5 μL 丁三醇清洗进样针三次	25 μL	250	1000		0	
2	添加	向每个样品中加入 20 μL 吡啶	25 μL	250	1000	0	2	5
3	添加	向每个样品中加入 8 μL 丁三醇	25 μL	250	1000	0	2	5
4	添加	向每个样品中加入 20 μL 甘油酯标样	25 μL	250	1000	0	2	5
5	添加	向每个样品中加入 20 μL MSTFA	25 μL	250	1000	0	2	5
6	混合	将每个样品在 2500 RPM 下混合 15 s						
7	静置	15 min						
8	清洗	用 200 μL 溶剂 A 清洗进样针一次	25 μL	250	1000		0	
9	添加	向每个样品中添加 800 μL 庚烷	500 μL	1250	5000	0	2	5
10	混合	将每个样品在 2500 PRPM 下混合 15 s						

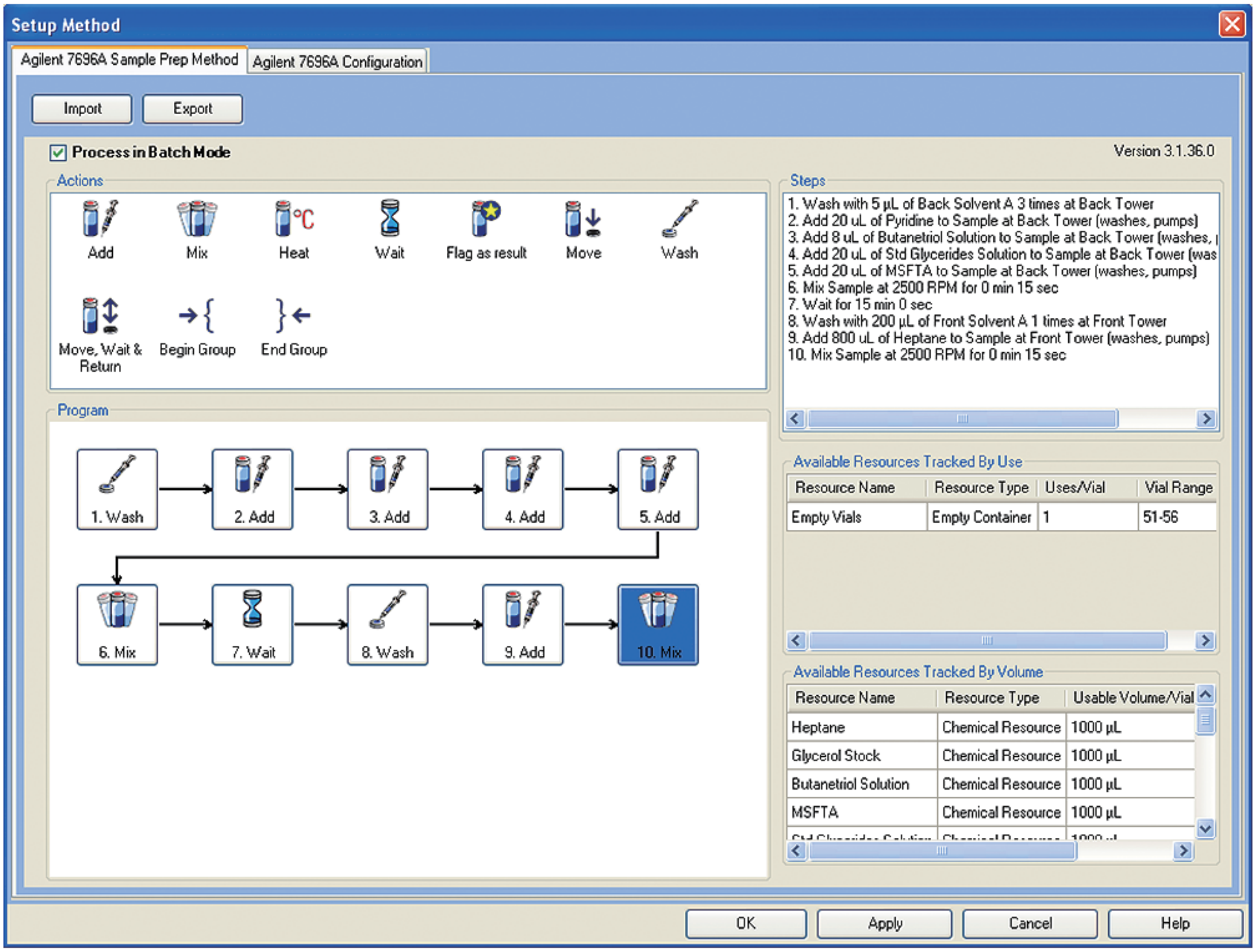


图 3.　用于根据 EN14105 制备生物柴油样品的 Easy Sample Prep (ESP) 软件**批量模式**方法

工作台制备的标样和样品的 GC 分析

按照 EN14105:2011 的要求，对 Agilent 7890A 气相色谱系统 (GC) 进行配置。表 5 列出了仪器配置和仪器操作条件。在该系统上对每个标样和每个样品进样一次，进样量为 1 µL。使用 Agilent OpenLab CDS ChemStation 控制 7890A 气相色谱系统、采集数据并进行数据分析。

表 5. 根据方法 EN14105:2011 分析工作台制备标样和样品的 Agilent 7890A 气相色谱系统的配置和操作条件

仪器配置	
G3440A	Agilent 7890A 系列气相色谱系统
选件 122	冷柱头进样口，带 EPC 控制
选件 211	毛细管火焰离子化检测器，带 EPC 控制
G4513A	Agilent 7693A ALS
色谱柱	用于分析甘油酯的 Select Biodiesel
	15 m × 0.32 mm，0.1 µm 膜厚（部件号 cp9078）
数据系统	Agilent OpenLab CDS 化学工作站 C.01.03

GC 操作条件	
冷柱头进样口	
初始压力	氦气，11.353 psi
初始温度	50 °C
程序升温	柱箱跟踪模式
色谱柱流速	氦气，5 mL/min，恒流
柱温	
初始温度	在 50 °C 下保持 1 min
升温速率 1	以 15 °C/min 升温至 180 °C，保持 0 min
升温速率 2	以 7 °C/min 升温至 230 °C，保持 0 min
升温速率 3	以 10 °C/min 升温至 370 °C，保持 10 min
火焰离子化检测器	380 °C

结果与讨论

工作台制备的 EN14105 标样

通过标样的保留时间数据确定三种单脂肪酸甘油酯和甘油酯标样的保留时间。该色谱图示于图 4 中。使用四种甘油校准标样所获得的数据制作甘油校准曲线。该曲线示于图 5 中。其相关系数为 1.000，完全满足 EN14105 方法对相关系数优于 0.9 的要求。

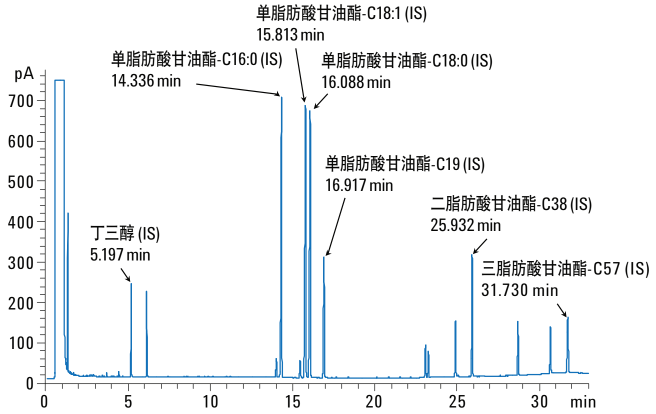


图 4. 使用工作台制备的保留时间鉴定标样。除了加入三种单脂肪酸甘油酯外，此混合液中还加入了四种内标（丁三醇、单脂肪酸甘油酯-C19、二脂肪酸甘油酯-C38 和三脂肪酸甘油酯-C57）溶液

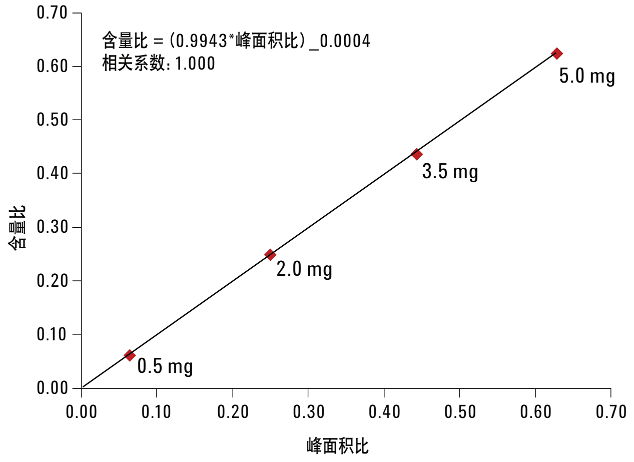


图 5. 使用四个工作台制备校准标样所获得的数据制成的甘油校准曲线。相关系数值超过了 EN14105 方法中规定的不低于 0.9 的要求

工作台制备的 B100 生物柴油样品

图 6 显示了单个样品的色谱图与 10 个工作台制备样品的叠加色谱图的对比。这 10 个叠加的色谱图在保留时间和峰响应上与单个样品的色谱图几乎一致。这一结果以图形化方式显示出了工作台制备样品所具有的精度。图 7 更具体地展示了四个定量区域。此外，这些工作台制备的 10 个生物柴油样品的叠加色谱图，显示出几乎一致的结果。在甘油和单脂肪酸甘油酯区域中，只对已识别出的峰进行定量和报告。在二脂肪酸甘油酯和三脂肪酸甘油酯区域中，将各自对应区域洗脱出来的所有峰作为二脂肪酸甘油酯和三脂肪酸甘油酯进行定量和报告。

在确定最终结果前，必须计算色谱柱的性能控制以进行分析。此性能控制通过计算二脂肪酸甘油酯-C38 内标和三脂肪酸甘油酯-C57 内标的相对响应因子 (RRF) 而得。对于三脂肪酸甘油酯而言，RRF 系数必须低于 1.8 才能达到理想的检测效果。如图 6 所示，每个经工作台制备的样品均通过了此色谱柱性能控制测试。

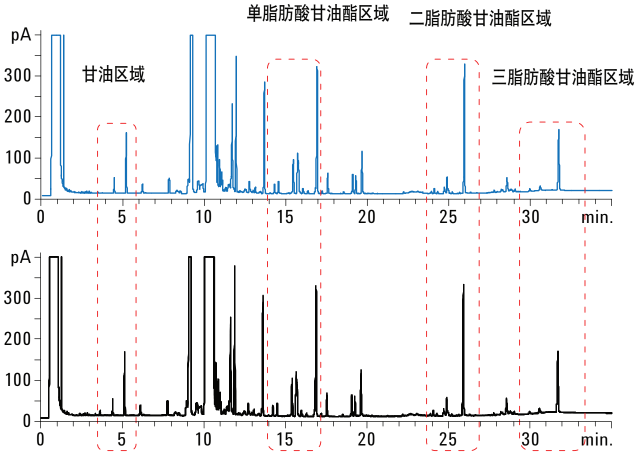


图 6.　上图是使用安捷伦工作台制备的 B100 样品单次运行得到的色谱图。甘油和甘油酯的每个定量区域都用红色标记出来。下图是使用工作台制备的 10 个样品得到的叠加色谱图

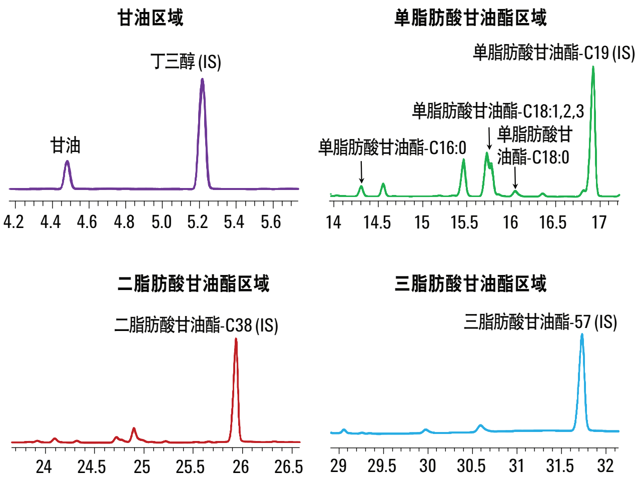


图 7.　图 5 中识别出的四个定量区域的放大图。请注意，这些图是使用工作台制备的 10 个样品的叠加色谱图

表 6.　色谱柱性能控制参数

样品	A_{DiC38}/M_{DiC38}	A_{TriC57}/M_{TriC57}	RRF
SRM01	24.4	16.5	1.5
SRM02	24.4	16.4	1.5
SRM03	24.4	16.4	1.5
SRM04	24.4	16.4	1.5
SRM05	24.5	16.5	1.5
SRM06	24.6	16.5	1.5
SRM07	24.5	16.0	1.5
SRM08	24.9	16.0	1.6
SRM09	24.9	16.0	1.6
SRM10	25.0	16.2	1.5

作为对色谱柱性能的控制，内标甘油二脂肪酸酯-C38 和甘油三脂肪酸酯-C57 的相对响应因子 (RRF) 必须小于 1.8。工作台制备的所有 10 个生物柴油样品均满足此要求。(A = 峰面积，M = 化合物质量)

在符合甘油校准和色谱柱性能控制标准的条件下，对 10 个经工作台制备的生物柴油样品中游离甘油、单脂肪酸甘油酯、二脂肪酸甘油酯、三脂肪酸甘油酯和总甘油的含量进行测定。这些结果示于表 7 中。通过每个组分计算得到的低 RSD 值可以看出，这 10 个结果之间具有出色的一致性。EN14105:2011 方法中对单个用户和多个实验室间的精度做出了完整规定。在此应用简报中，单用户精度可以通过结果得出并与方法中的要求进行对比。

单用户精度又称为重复性 (r)。重复性表示同一操作者使用同一设备对相同的测试材料进行两次测试所得结果之间的差异。EN14105 方法中对样品中每个组分的测定结果的重复性做出了要求。根据这一规定，我们取差异最大的两个结果 SRM01 和 SRM10 进行计算。将每个结果差异的绝对值与方法要求的最小差异进行比较。如表 8 所示，使用工作台制备的样品完全满足方法中对于生物柴油所有成分定量分析结果的重复性要求。

表 7. 使用安捷伦工作台制备的十个 B100 生物柴油样品的分析结果

		重量 %				
样品	**样品重量 (mg)**	**游离甘油**	**单脂肪酸甘油酯**	**二脂肪酸甘油酯**	**三脂肪酸甘油酯**	**总甘油**
SRM01	10.90	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM02	10.40	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM03	10.63	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM04	9.59	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM05	11.12	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM06	9.93	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM07	10.46	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM08	9.66	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM09	9.74	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM10	10.01	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
	平均值	**0.017**	**0.39**	**0.14**	**0.19**	**0.157**
	标准偏差	**0.000**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.000**
	RSD	**1.871%**	**0.00%**	**0.00%**	**0.00%**	**0.202%**

表 8.　使用安捷伦工作台制备的两个 B100 生物柴油样品间的分析精度，用重复性 (r) 表示。每个成分的重复性（r 计算值）均高于 EN 14105:2011 方法的规定（r 规定值）

	重量 %				
样品	**游离甘油**	**单脂肪酸甘油酯**	**二脂肪酸甘油酯**	**三脂肪酸甘油酯**	**总甘油**
SRM01	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM10	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
r 计算值	**0.001**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.001**
r 规定值	**0.003**	**0.04**	**0.02**	**0.02**	**0.020**

结论

Agilent 7696A 样品制备工作台可以根据经修订的欧盟方法 EN14105:2011 成功进行标样和样品的自动化前处理，以对生物柴油中的甘油污染物进行气相色谱分析。由于工作台使用 2 mL 样品瓶，EN14105 前处理的规模缩小了 10 倍。这有助于降低该分析的试剂成本，并减少废弃化学品的生成。通过工作台制备的校准标样满足方法规定的所有性能指标。使用工作台制备的 10 个生物柴油样品平行样经 GC 分析后，结果表现出相当高的精度，超过了 EN14105 方法的要求。

参考文献

1. DIN EN14105:2011-07 “Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, and triglyceride contents”, European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17: B-1000 Brussels
2. “Agilent 7696A 工作台在复杂样品自动化前处理中的应用”，James D. McCurry，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-7525CHCN，2011 年 3 月 1 日
3. 利用批量模式的样品前处理提高分析效率，Rebecca Veeneman，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-9271CHCN，2011 年 12 月 21 日
4. “使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台自动制备标样和样品进行航空燃料中脂肪酸甲酯 (FAME) 的 GC/MS 分析”，James D. McCurry，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-9717CHCN，2012 年 1 月 12 日

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2012

2012 年 4 月 27 日，中国印刷
5990-9893CHCN

Agilent Technologies

环境

高重现性的稀释和自动化的最终净化操作远超方法质量控制要求

环境实验室每天需要完成大量的分析任务并生成大量的样品分析报告，因此，在简单的样品前处理过程中很容易发生步骤的遗漏。自动化可有效避免由于稀释校准溶液、添加内标或添加替代物等造成的简单误差。在某些情况下，油的最终样品净化也可实现自动化。将分析员从这些单调的工作中解脱出来可大大提高他们的工作效率，使其能够专注于实验室中更为重要的任务。

返回目录
查看应用简报

环境

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：agilent.com/chem/workbench

返回目录

返回行业简介

下面的目录已链接到本文集的对应部分。单击文本可跳转到特定部分

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台自动净化样品进行矿物油（烃油指数）的分析 44

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台自动净化废油中的 PCB 萃取物 50

使用 Agilent J&W DB-35ms 超高惰性色谱柱和 DB-XLB 色谱柱对水中低于 μg/L 级的有机氯农药和除草剂进行 GC/μECD 法分析 56

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备符合 EPA 方法 8270 的 AQA 标样 68

基于 Agilent 7696A 样品制备工作台的气相色谱/三重四极杆质谱进行雌酮分析 72

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台自动净化样品进行矿物油（烃油指数）的分析

应用报告

自动样品制备

作者

Frank David, Karine Jacq, and
Bart Tienpont
Research Institute for Chromatography,
President Kennedypark 26,
B-8500 Kortrijk, Belgium

Peter Mrozinski
Agilent Technologies,Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808,
USA

摘要

通常水样中的矿物油（或称碳氢油，烃油）通过液液萃取后，经 Florisil 净化，使用 GC-FID 测定。本文使用安捷伦 7696A 样品制备工作台，可以自动完成样品液液萃取后的干燥和净化操作。通过高效的净化步骤，可使矿物油测定获得较高的回收率和优异的重复性。萃取液通过 GC-FID 测定，结合低热容（LTM）GC，可实现样品的自动化和高通量分析。

Agilent Technologies

前言

烃类的环境污染物，如柴油或机油一般可以通过 GC-FID 测定。该方法又被称为烃油指数（HOI）、矿物油或石油烃总量（TPH）测定，是环境分析的重要应用之一。水样样品处理的第一步是用一种沸点在 36 °C 和 69 °C 之间的非极性（烃类）溶剂如正己烷进行液液萃取（LLE）。第二步，萃取液用无水硫酸钠干燥，并通过 Florisil 净化，去除萃取液中低极性的共提取溶质如脂类。最后将萃取液氮吹浓缩或进行 Kuderna-Danish 装置处理，上 GC-FID 分析 [1]。

使用分散型 SPE（d-SPE）取代传统的色谱柱或者固相萃取可以使样品净化步骤简单化。在 d-SPE 中，只有少量的吸附剂被添加到样品中。基体溶质（在此报告中多为 LLE 萃取液中共提取的低极性溶质）因结合到到吸附剂上而从溶液中去除。净化过的萃取液经 GC-FID 分析和测定。为了确保净化效果，萃取液在 d-SPE 处理前要预先经 Florisil 干燥。

然后将矿物油萃取液经 GC-FID 分析。通常使用 10–30 m 的薄涂层色谱柱，分析时间一般为 30 min。有最新资料表明，可以通过低热容（LTM）技术显著提高分析通量 [2]。

该研究报告详细阐述了使用安捷伦 7696A 样品制备工作台自动化完成烃油指数测定的样品干燥和分散型 SPE 操作。在上工作台操作前，先将液液萃取得到的萃取液浓缩至 1–1.5 mL（可通过旋转蒸发或者氮吹）。然后将这部分萃取液转移到预装了吸附剂的自动进样器样品瓶中，用无水硫酸钠和 Florisil 进行干燥和净化，最终的萃取液使用具备 LTM 技术的 GC-FID 进行分析。

实验部分

化学品和测试试剂

柴油和机油比例 1:1 的混合样品（每个组分含量 5000 μg/mL，环己烷溶液）用做矿物油的测试样品。包含了 C10 到 C40 偶数碳正构烷烃的烷烃混标液（每个组分浓度为 50 μg/mL，正己烷溶液）用于重复性测试和 GC-FID 校准。

按照 ISO9377 的方法，硬脂酸十八醇脂用于评价净化步骤的性能。其贮备液为 2000 μg/mL 的丙酮溶液。

从以上储备液中分别制备含烷烃各组分和硬脂酸十八醇脂分别为 5 ng/μL 和 80 ng/μL 的正己烷校准溶液，同样，制备矿物油含量和硬脂酸十八醇脂含量分别为 400 ng/μL 和 80 ng/μL 的正己烷校准溶液，这些溶液都用于直接进样。

在丙酮中制备两种加标溶液。将加标溶液加入到 900 mL 水样中，再用 50 mL 正己烷进行萃取。将正己烷萃取液在 Turbovap 系统上用氮吹浓缩至 10 mL。将该萃取液分装到几个样品瓶中，以进行 7696 工作台的重复性测试。第一种加标溶液含有 50 μg 的各种正构烷烃和 800 μg 的硬脂酸十八醇脂，第二种加标溶液含 4000 μg 的矿物油和 800 μg 硬脂酸十八醇脂。假设液液萃取回收率为 100%，10 mL 正己烷萃取液中的溶质浓度应和校准溶液的浓度相同。

使用无水硫酸钠和 Florisil 分别对正己烷萃取液进行干燥和净化，硫酸钠和 Florisil 首先要在 140 °C 下烘烤过夜。

首先，将 20 mg（± 2 mg）无水硫酸钠加到一系列 1.5 mL 高回收样品瓶中，瓶体标记为“Dry”。然后，在另一系列 1.5 mL 高回收样品瓶中加入 30 mg（± 2 mg）Florisil，瓶体标记为“Clean-up”。所有样品瓶均需加螺纹盖防潮。

样品制备

将水样样品的正己烷萃取液装入到 1.5 mL 高回收样品瓶中，和“Dry”样品瓶系列、“Clean-up”样品瓶系列以及装有 200 μL 内插管的空样品瓶（用于装最终的萃取液）一起码放在样品瓶架上。

前进样塔装配 500 μL 的自动进样针，后进样塔装配 250 μL 的自动进样针，用正己烷做清洗进样针的溶剂。

图 1 列举了 7696 工作台瓶架上的样品瓶布局。

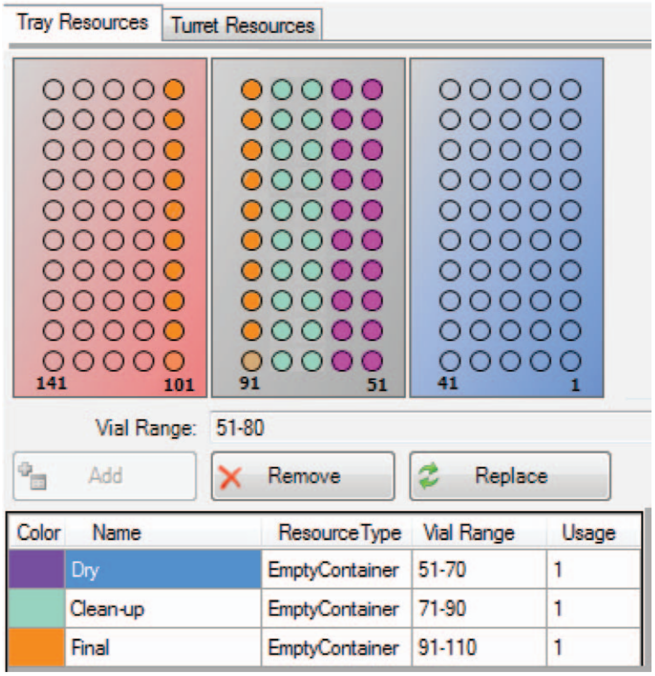


图 1. 安捷伦 7696 样品制备工作台样品瓶布局

工作台制备样品步骤可归纳如下（括号内斜体字为解释说明）：

1. **通过前进样塔向“Dry”样品瓶中加入 500 µL 样品**
   （将等量的萃取液加入到无水硫酸钠中）
2. **将“Dry”样品瓶混匀 1 min（双方向混匀，2,000 rpm，每震动 4s 静置 1s）**
   （该混匀步骤可以使样品和吸附剂充分接触，彻底去除水分）
3. **通过后进样塔向“Clean-up”样品瓶中加入 350 µL“Dry”中的萃取液**
   （将等量的干燥萃取液加入到 Florisil 中）
4. **将“Clean-up”样品瓶混匀 1 min（双方向混匀，2,000 rpm，每震动 4s 静置 1s）**
   （该混匀步骤可以使样品和吸附剂充分接触，彻底去除极性组分）
5. **通过后进样塔向最终的空样品瓶中加入 150 µL“Clean-up”中的萃取液**
   （将最终萃取液转移到样品瓶中等待进一步的 GC-FID 分析）
6. **将最终的样品瓶标记为最终结果**

仪器配置

分析使用安捷伦 7890 GC 系统执行。GC 配有 SSI 进样口，LTM II 柱箱门和 FID 检测器。使用 0.32 mm × 10 m，0.10 µm DB-5HT 色谱柱（部件号：123-5701LTM）进行分离。

表 1 为分析所用色谱条件汇总（也可见参考文献 [2]）

表 1. 色谱条件

进样	1 µL，不分流（0.4 min 吹扫延迟）350 °C 分流/不分流衬管（部件号：5183-4647）
载气	氦气，9 mL/min，恒流
GC柱箱温度	340 °C 恒温
LTM	40 °C (0.5 min)，200 °C/min 升至 240 °C， 再以 100°C/min 升至 340 °C（0.5 min） 分析时间：3 min
FID	340 °C，氢气 40 mL/min，空气 400 mL/min

结果和讨论

测定水样中矿物油的第一步操作是对样品进样液液萃取。对大体积（900 mL）水样一般使用 50 mL 溶剂（正己烷）萃取，该步骤只能人工完成。接着萃取液在 Turbovap 系统（Zymark）上氮吹得到的浓缩液。取 1–2 mL 浓缩液到 2 mL 自动进样器的样品瓶中，然后按照 7696 工作台的样品制备步骤进行。

安捷伦 7696 样品制备工作台的样品制备步骤如图 2 所示。第一步中，使用硫酸钠对等量的正己烷萃取液进行干燥，这一步至关重要，因为即使是极痕量的水分也会降低后续的净化效果。然后将干燥过的等量萃取液转移到装有 Florisil 的样品瓶中。并且 Florisil 吸附剂需要在 140 °C 活化预处理以去除残留水分。本文还对 Florisil 的最少使用量进行了确认，当使用量少于 20 mg 时，无法获得满意的净化效果，实验确定 Florisil 吸附剂的安全剂量为 30 mg（± 2 mg）。

待萃取液和 Florisil 充分混匀后，将上清液转移到装有 200 µL 内插管的空样品瓶中，用于快速 GC-FID 分析。由于样品瓶内装有 150 µL 萃取液，所以该方法还可根据需要实现大体积进样。

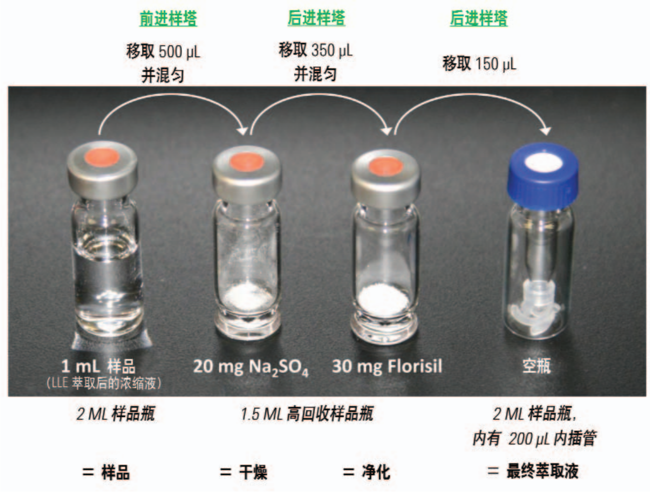


图 2. 工作台不同净化操作中使用的 2 mL 样品瓶

1. 水样的正己烷萃取原液

2. 转移到装有 Na_2SO_4 的样品瓶后（干燥）

3. 转移到装有 Florisil 的样品瓶后

4. 最终萃取液

图 3 为矿物油样品的典型色谱图。上图为未经净化样品的色谱图（在萃取液中浓度为 400 µg/mL）。向矿物油样品中加入了一定量的硬脂酸十八醇脂（在萃取液中浓度为 80 µg/mL），该化合物作为低极性的干扰模拟物，在 C38 附近出峰。

图 3 中下图为经过净化处理的样品色谱图（理论上和上图的浓度相同），很显然，上下两图的矿物油谱图相似，而下图中硬脂酸十八醇脂几乎全部被消除（峰面积小于未经净化的硬脂酸十八醇脂峰面积的 5%）。

对 6 个含各种烷烃（5 µg/mL）和硬脂酸十八醇脂（80 µg/mL）的正己烷溶液进行了重复样品制备和测定，以测试 7696 工作台制备样品的重复性。表 2 给出了 4 种正构烷烃和硬脂酸十八醇脂的峰面积。RSD% 通常在 1% 左右（C40 为 2.5%），回收率（计算净化后样品的峰面积和原样品峰面积比得到）高于 80%，硬脂酸十八醇脂的回收率均值（n=6）为 1.9%，低于 5%。

表 2. 几种正构烷烃和硬脂酸十八醇脂的峰面积重复性以及相对于未净化样品直接进样得到结果的回收率

化合物	平均响应	SD	RSD (%)	回收率 (%)
C10	58.1	0.542	0.93	99.6
C20	62.7	0.612	0.97	99.8
C30	60.4	0.656	1.09	101.1
硬脂酸十八醇脂	**16.0**	**2.792**	(17.5)	**1.9**
C40	50.5	1.293	2.56	86.4

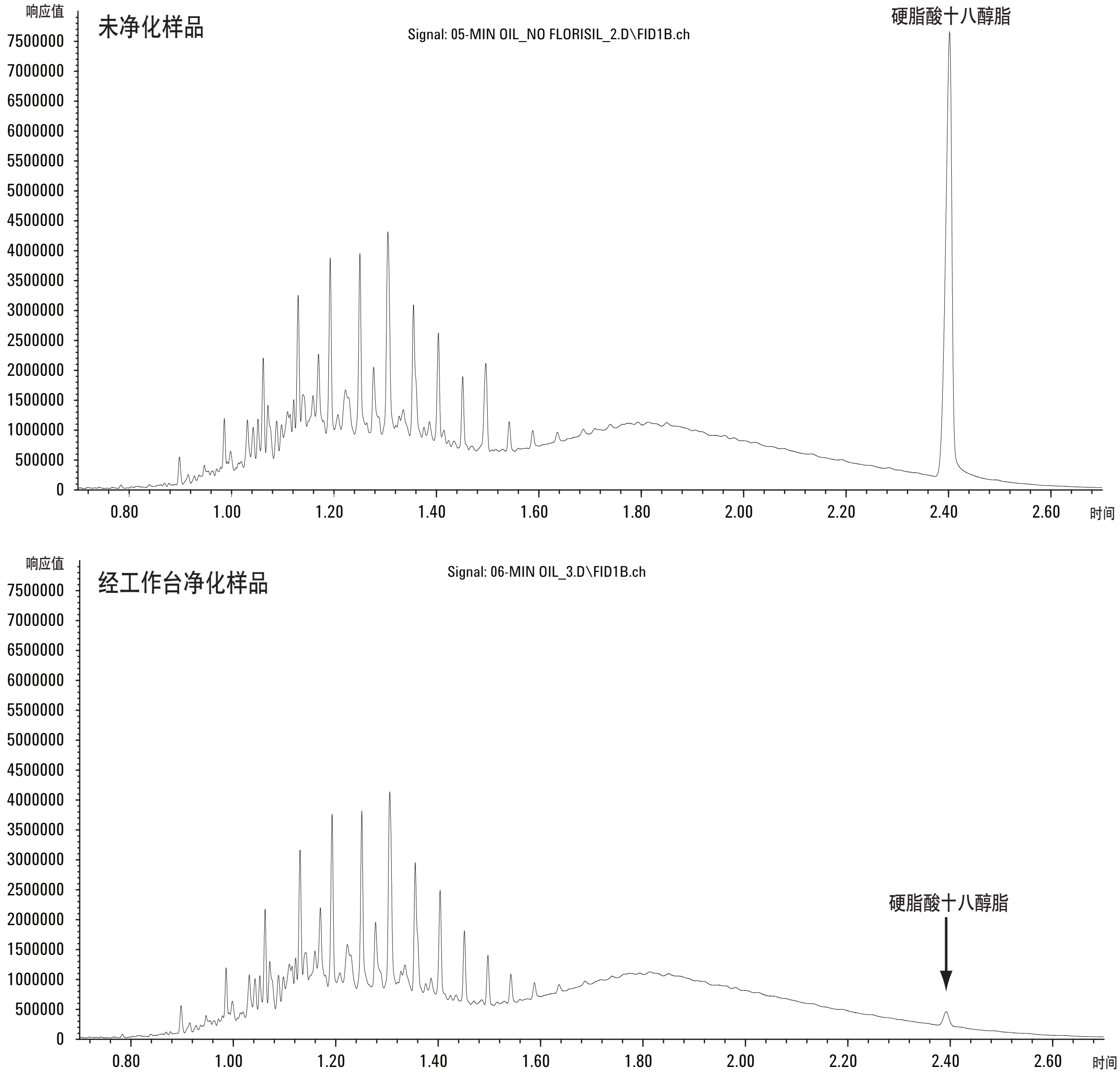


图 3． 含有 400 ng/μL 矿物油和 80 ng/μL 硬脂酸十八醇脂的正己烷萃取液的 GC-FID 色谱图，该萃取液从水样中萃取得到。上图：样品未经净化直接进样；下图：经过安捷伦 7696 样品制备工作台干燥和净化处理后

对含有矿物油（400 μg/mL）和硬脂酸十八醇脂（80 μg/mL）的水样萃取液进行了相同的实验，结果见表 3。

这些数据说明，矿物油的峰面积重复性结果非常好（RSD < 1%），硬脂酸十八醇脂的去除效率也很高（平均回收率为 2.3%，小于 5%）。并且矿物油的回收率高于 95%（标准规定在 80% 和 110% 之间）。

表 3. 矿物油和硬脂酸十八醇脂峰面积的重复性（n = 10）以及相对于未净化样品直接进样得到结果的回收率

	峰面积		回收率（%）	
	矿物油	**硬脂酸十八醇脂**	**矿物油**	**硬脂酸十八醇脂**
无净化步骤	9342.0	895.4		
1	9760.9	20.6	104.5	2.3
2	9745.4	20.6	104.3	2.3
3	9602.1	19.7	102.8	2.2
4	9839.3	16.4	105.3	1.8
5	9841.8	23.0	105.3	2.6
6	9704.5	18.1	103.9	2.0
7	9800.4	16.6	104.9	1.8
8	9745.4	23.0	104.3	2.6
9	9735.6	19.6	104.2	2.2
10	9658.4	31.6	103.4	3.5
均值	**9743.4**	**20.9**	**104.3**	**2.3**
标准偏差	**75.4**		**0.8**	
RSD (%)	**0.77**		**0.77**	

结论

将小型化分散型 SPE 净化方法配置到安捷伦 7696A 样品制备平台上，可实现样品净化的自动化操作，进行水样中矿物油的测定。其中通过液液萃取得到正己烷萃取液经过干燥和净化后，得到的样品使用 GC-FID 进行分析。

自动化的样品预处理方法结合高效的净化步骤和低热容（LTM）GC，在获得较高的回收率和良好的重现性的同时，还保证了矿物油测定高通量的分析效率。

参考文献

1. International standard ISO 9377-2, Water Quality, Determination of hydrocarbon oil index, part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography, 2000.
2. F. David, K. Jacq and R.L. Firor, High Throughput Mineral Oil Analysis by GC-FID Using the Agilent Low Thermal Mass (LTM II) System, 9/2011, Agilent Technologies publication 5990-9104EN

更多信息

关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 12 月 13 日，中国印刷

5990-9163CHCN

Agilent Technologies

使用安捷伦 7696A 工作台自动样品净化操作制备废油中的 PCB 萃取液

应用报告

自动样品制备

作者

Frank David, Bart Tienpont, and
Karine Jacq
Research Institute for Chromatography
Pres. Kennedypark 26,
B-8500 Kortrijk,
Belgium

Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

本报告对固体废弃物，包括以石油为基质的废油、变压器油和矿物油中含有的多氯联苯（PCBs）进行了筛查。通常样品经色谱柱、固相萃取（SPE）或分散型固相萃取（d-SPE）净化处理后，使用 GC-ECD 或者 GC-MS 进行分析检测。通过硅胶或者酸化硅胶净化去除样品中的极性组分，以防其干扰 PCB 分析或者污染分析系统。

一个使用 SiOH/H_2SO_4 吸附剂的小型分散型 SPE 方法被配置到安捷伦 7696A 样品制备工作台系统上，可使萃取液得到有效净化，并且重复性良好。与 GC-ECD、GC-MS 或者 GC-MS/MS 联用，同时使用反吹功能，可对废油中 PCBs 实现功能强大、结果准确的自动化测定。

Agilent Technologies

前言

对矿物油（包括变压器油、废油或固体废弃物）中的 PCBs 进行测定是环境实验室的常规工作。将油样稀释/溶解后，需要进行样品净化以去除大多数的基质。具有代表性的净化方法有传统色谱柱净化或者固相萃取（SPE）。其中有多种 SPE 方法获得应用并制成专用的净化管，用于废油和矿物油中 PCB 的测定。例如，根据 EN 12766，使用酸化的硅胶/阴离子交换树脂（SiOH-H_2SO_4/SAX）和硅胶（SiOH）的复合体作为净化介质。油样的正己烷溶液流经净化管，PCB 随正己烷迅速流出，而极性基质化合物则被保留在 SPE 净化管中 [1]。

使用分散型固相萃取 [2] 可将固相萃取方法小型化并简单化。和 SPE 不同，分散固相萃取是将吸附剂加到萃取液中，和样品混合均匀。极性干扰物被吸附在活性吸附剂上，而非极性溶质仍留在溶液中。农残分析中著名的 QuEChERS 即使用相同的方法进行样品净化 [3]。

该报告将分散型 SPE 方法小型化后配置到安捷伦 7696 样品制备工作台上实现了自动化操作。从含有油样并可能含有 PCBs 的萃取液/溶液中，移取等量萃取液到样品瓶中，瓶中提前装有一定量已称重的吸附剂，将样品瓶涡旋处理，取等量上清液到另一个装有硅胶的样品瓶中做进一步净化，最后，将此样品瓶中含有 PCB 的上清液再转移到一个空的样品瓶中，以备 GC-ECD，GC-MS 或 GC-MS/MS 分析。

以上的净化步骤只是去除了极性化合物的干扰，PCB 萃取液中仍存在着非极性化合物，这些化合物对 PCB 测定的干扰虽然较小，但分子量特别大的化合物会在分析系统中蓄积，造成色谱柱和离子源的污染。因此，建议使用应用报告 5989-7601 EN [4] 中应用的反吹功能。

实验部分

试剂

报告中使用 BCR 基准样品对净化方法进行评价。BCR-449（IRMM，Geel，比利时）是一种废矿物油样品，含有高浓度（mg/kg）的 PCBs。以此油为基础制备 100 mg/mL 的正己烷溶液。

八氯萘（Sigma-Aldrich，Beerse，比利时）用作内标溶液使用。其储备液为 10 ppm 的异辛烷溶液。

文中一共使用了 3 种吸附剂，包括 44% H_2SO_4 涂层的硅胶（Bondesil-SAX，40UM，部件号：12213041，安捷伦科技）和清洗过的硅胶（Bondesil-SI，40UM，部件号：12213001，安捷伦科技）。对第一列 2 mL 样品瓶，各加入 100 mg H_2SO_4 涂层的硅胶和 100 mg SAX，瓶上标记为“SiH”。对第二列 2 mL 样品瓶，加入 100 mg 清洗过的硅胶，瓶上标记为“SiOH”。所有样品瓶均要加螺纹盖防潮。所有吸附剂重量在 100 mg ± 5 mg 的范围内。

样品制备

将等量的废油溶液移取到 2 mL 样品瓶中，并且随着移取液体积的减少，可在样品瓶中使用 100 μL 的内插管。将装有酸化的硅胶/SAX（SiH）的 2 mL 样品瓶和装有清洗过硅胶（SiOH）的 2 mL 样品瓶和装有 100 μL 内插管的空样品瓶分别排列在架子上，正己烷和内标溶液的试剂瓶也放置在架子上。图 1 为 7696 工作台的样品瓶布局举例。

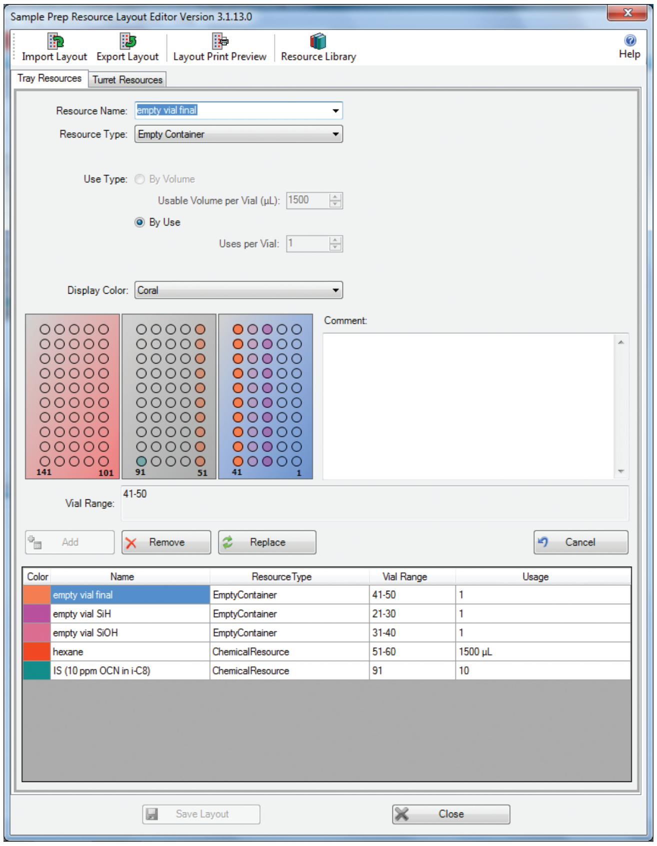


图 1.　安捷伦 7696 样品制备工作台的样品瓶布局

工作台制备样品可归纳为以下几步：

1　**通过前进样塔向 SiH 样品瓶中加入 50 uL 废油样品（10% 的废油正己烷溶液）**
（部分样品被加入到装有酸化硅胶和 SAX 吸附剂的样品瓶中）

2　**通过前进样塔向 SiH 样品瓶中加入 1350 uL 正己烷**
（加入额外的正己烷溶剂）

3　**通过前进样塔向 SiH 样品瓶中加入 150 uL 内标液**
（加入内标，最后总体积为 1.5 mL，相应地含有 5 mg 油样和 1500 ng 内标）

4　**在 4000 RPM 下混合 SiH 样品瓶 5 min**
（涡旋可以使吸附剂和样品充分混匀）

5　**静置 2 min**
（使极性组分充分吸附到吸附剂上）

6　**通过前进样塔向 SiOH 样品瓶中加入 1000 uL SiH 瓶中的上清液**
（将上清液转移到二次净化样品瓶中）

7　**在 4000 RPM 下混合 SiOH 样品瓶 5 min**
（涡旋可以使吸附剂和样品充分混匀）

8　**静置 2 min**
（使极性组分充分吸附到吸附剂上）

9　**通过前进样塔向最终的样品瓶中移取 200 uL SiOH 瓶中的上清液**
（将净化后的萃取液转移到装了内插管的样品瓶中）

10　**将最终的样品瓶标记为最终结果**

仪器配置

分析使用安捷伦 7000 三重串联四级杆 GC/MS 系统执行。GC 配置 MMI 进样口。通过 0.25 mm × 30 m，0.25 µm DB-5MS 色谱柱（部件号：122-5532）进行组分分离。色谱柱出口在 28 kPa 恒压下与 Quick-Swap 连接器相连。MS 传输线的熔融石英限流管为 0.17 m × 110 µm。

分析所用色谱条件汇总于表 1。

表 1　色谱条件

进样	1 µL，脉冲不分流
进样口温度	初始 85 °C（0 min），以 720 °C/min 升到 325 °C（5 min）
载气	氦气，1 mL/min 恒流
	反吹气流 2 mL/min
柱箱温度	初始 80 °C（1 min），以 10 °C/min 升到 305 °C，保持 7.5 min
MS	MRM 模式
	CE 25 V，每个转换驻留时间 100 ms
	三氯联苯：256.0 > 186.0; 258.0 > 186.0
	四氯联苯：293.8 > 222.0; 291.8 > 222.0
	五氯联苯：325.8 > 256.0; 327.8 > 256.0
	六氯联苯：359.9 > 289.9; 361.9 > 289.9
	七氯联苯：393.8 > 323.8; 395.8 > 323.8
	八氯萘（内标）：404.0 > 404.0（CE 0V）
反吹	23.5 min 后开始

结果和讨论

在安捷伦 7696 样品制备工作台上进行的样品制备过程如图 2 所示。废矿物油的溶液因为石油成分的存在，呈暗褐色。将含有约 5 mg 废矿物油的样品转移到盛有 100 mg SiOH/H_2SO_4 + 100 mg SAX 吸附剂的样品瓶后，溶液颜色变得清澈很多，而吸附剂变成了黑色，这个步骤去除了大部分的样品基质，在整个净化过程中非常重要。在第二步净化操作中，残余的污染物被吸附到硅胶上。最后，净化液被转移至样品瓶的内衬管中，该溶液澄清透明，充分说明了净化过程十分的高效。

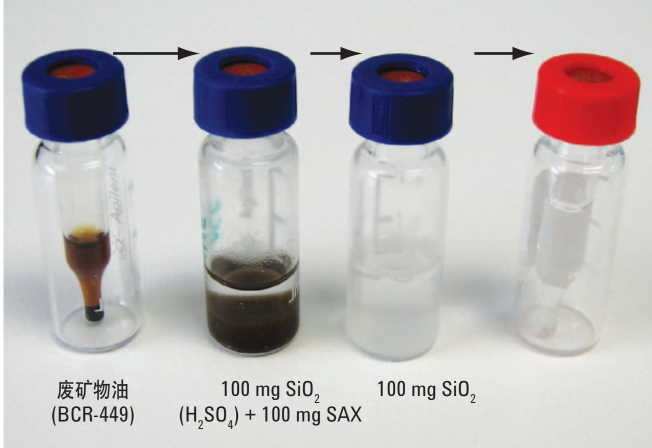


图 2.　7696 样品制备工作台不同净化操作中使用的 2 mL 样品瓶

图 2 从左到右

1. 废矿物原油的正己烷溶液
2. 将废油转移到 SiH 样品瓶后（污染物被酸化硅胶/SAX 复合材料吸附）
3. 将一级净化萃取液转移到 SiOH 样品瓶后
4. 最终萃取液

获取的最终萃取液经 GC-MS/MS 分析。如图 3 所示为 5 个等量 BCR-499 基准样品在 MRM 捕集模式下得到的总离子流色谱图，样品制备方法如前所述。内标物质在 22.8 分钟洗脱，并且 PCBs 易于检测。 从色谱图中可以看出该方法的重复性非常好。

表 2 列出了 6 种目标化合物的相对峰面积的重复性，RSD% 一般在 5% 左右。

表 2.　相对峰面积的重复性

溶质	保留时间 (min)	相对峰面积 (溶质/内标)	RSD (%)
PCB52	15.463	0.027	4.51
PCB101	17.151	0.037	6.10
PCB118	18.326	0.105	9.76
PCB153	18.731	0.086	4.54
PCB138	19.246	0.095	5.58
PCB180	20.448	0.026	4.03
OCN (IS)	22.849		

使用 GC - ECD 或 GC - MSD 分析可得到同样的结果。

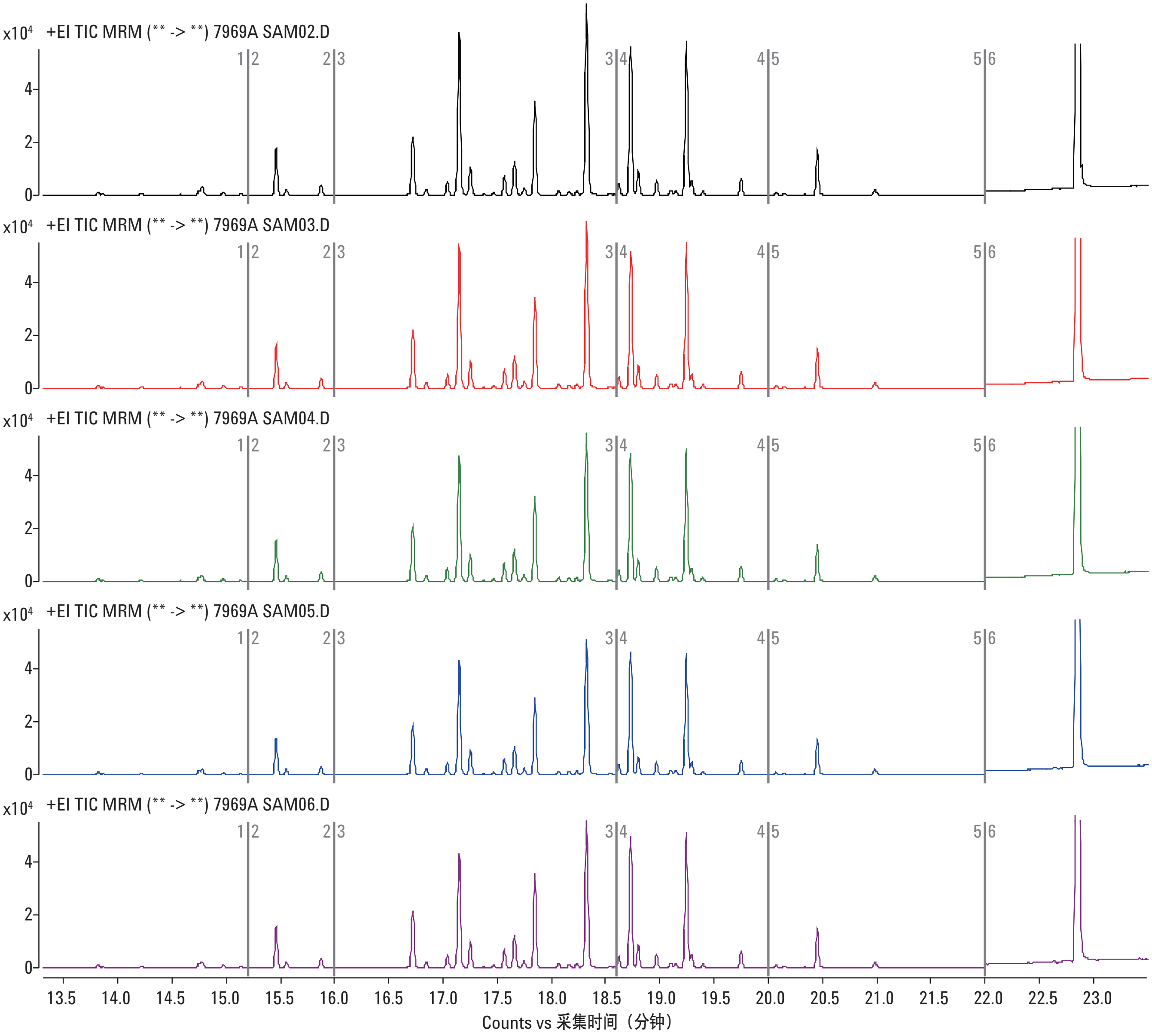


图 3. 废油中的 PCBs 萃取液在 MRM 模式下得到的 GC-MS/MS 总离子流图

应该引起注意的是，在 PCB 萃取液中，仍旧存在某些非极性基质。这些化合物不能被样品净化中的两种吸附剂去除。在利用 GC-ECD，采用 SIM 模式的 GC-MS 或是采用 MRM 模式的 GC-MS/MS 进行分析时，虽然不会对萃取液中共萃取的其他溶质进行检测，但是他们的存在终究会污染进样口、色谱柱，最终污染检测器，因此，正如参考文献所述 [4]，还是建议要进行反吹操作。

结论

将小型化分散型 SPE 方法配置到安捷伦 7696A 样品制备平台上，可自动化进行样品净化，测定废矿物油中的 PCBs。先后使用了 SiOH/H_2SO_4 + SAX 复合型吸附剂和清洗过的硅胶吸附剂进行两级 d-SPE 净化操作。萃取液可得到高效的净化且该方法重复性良好。与 GC-MS 或者 GC-MS/MS 结合，同时使用反吹功能，可对废油中 PCBs 实现功能强大、结果准确的自动化测定。

参考文献

1. 有关废油中 PCBs 的样品制备和分析方面的信息，可以参考标准方法 DIN EN 12766 和 DIN EN 61619。
2. P. Sandra and F. David, The 1999 Belgian Dioxin Crisis: the Need to Apply State-of-the-Art Analytical Methods. Chapter 40 (pages 643–652) in A Century of Separation Science,Ed. H.J. Issaq, Publisher: Marcel Dekker, New York, 2002, ISBN 0-8247-0576-9
3. 更多有关 QuEChERs 的信息，请参考: http://quechers.cvua-stuttgart.de/
4. F. David and M.S. Klee, GC/MS Analysis of PCBs in waste Oil Using the Backflush Capability of the Agilent QuickSwap Accessory, 11/2007, Agilent application note 5989-7601 EN

更多信息

这些数据代表了典型的结果。有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 12 月 9 日，中国印刷
5990-9164CHCN

Agilent Technologies

使用安捷伦 J&W DB-35ms 超高惰性色谱柱和 DB-XLB 色谱柱对水中低于 μg/L 级的有机氯农药和除草剂进行 GC/μECD 法分析

应用报告

环境保护

作者

Doris Smith and Ken Lynam

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Rd

Wilmington, DE 19808

摘要

本文中使用安捷伦 SPEC C18AR 液固萃取（LSE）膜盘成功提取了水中的有机氯农药残留和除草剂。使用双柱配置的 GC/μECD 系统进行检测，安捷伦 J&W DB-35ms UI 超高惰性色谱柱用于初步分析，DB-XLB 色谱柱用于进一步确认。该方法为浓度接近或低于最大污染限值的含氯有机物提供了高度灵敏和高度一致的分析方案。根据预估的分析物萃取浓度，方法使用的校准范围为 1 到 100 ng/mL 。研究分别对一个 0.01 μg/L 的加标水样和一个自来水样进行了提取和分析，以测试该分析方案的有效性。

前言

农药和除草剂在农业生产和日常生活中普遍使用。在很多环境的地下水和地表水中都检出有农药残留。喷洒农药过后的残留物经地表径流渗透过土壤进入到地下水，进而进入到供水系统。由于农药对健康和环境会造成严重的影响，因而人类饮用水污染问题受到越来越多的关注。长期使用污染水所导致的潜在健康问题包括肝脏损伤和致癌几率加大，最近的研究表明饮用污染水还可能导致内分泌紊乱[1,2]。欧盟（EU）和美国环保局（EPA）已经立法规定了饮水中农残的最大允许浓度值[2,3,4]。

Agilent Technologies

色谱柱和衬管的惰性对获得高度一致和可靠的分析结果有非常关键的影响，尤其是在分析具有挑战性的农残如异狄氏剂和 DDT 时，因为这些化合物非常容易和衬管或色谱柱上的活性点发生反应 [5,6]。最大限度地降低分析路径的活性是法规要求的痕量分析获得准确结果的关键。该研究采用了安捷伦超高惰性的色谱柱和衬管，以确保分析路径的全程惰性。

使用 GC/μECD 双色谱柱配置对有机氯农残进行了定量。安捷伦 J&W DB-35ms 超高惰性色谱柱用来进行初步分析，而 J&W DB-XLB 色谱柱用于进一步确认，与初步分析用的色谱柱相比，其极性较弱的固定相有助于分析物的识别。

DB-35ms 超高惰性色谱柱对有机氯农药具有良好的选择性，可实现 EPA508.1 方法中 37 种农药和除草剂的高效分离。EPA508.1 方法推荐使用五氯硝基苯和 4,4'-二溴联苯分别作为内标物和替代标准物。但因为这两种化合物和我们的目标物在色谱柱上共流出，本研究改用 CLP 农残分析中常用的替代标准物四氯间二甲苯（TCMX）和十氯联苯，从而很好地解决了共流出的问题。

校准曲线的制备需要大量的时间并消耗大量的试剂。人工的样品制备过程更是容易产生误差，使结果的重复性和精密度变差。安捷伦 7696A 样品制备工作台可以自动化完成多种样品制备操作，同时显著降低溶剂消耗和样品制备的时间。安捷伦 7696A 样品制备工作台在多个样品制备应用中表现出了极高的精密度和重复性，有效降低了随机误差的产生[8,9,10]。

有机氯农药和除草剂通过液-固萃取的方式从水中萃取出来。由于目标分析物的浓度可能为痕量水平，因而需要大量的水样以萃取出足够检出量的农药。现行方法的样品体积为 1L，使用传统的萃取方法萃取时会耗费大量的时间，而安捷伦 SPEC C18AR 47 mm LSE 萃取盘可以在加速萃取的同时有效地保留目标化合物。

实验部分

本研究使用配置了双 μECD 检测器和 7683B 自动进样器的安捷伦 7890A GC 进行样品分析。使用惰性三通装置按照 1:1 的比例将流出物分流到初级色谱柱和确认色谱柱。表 1 为该研究所采用的气相色谱条件，表 2 为研究所需的流路耗材，表 3 为样品制备所需耗材。

表 1. 色谱条件

色谱柱 1	安捷伦 DB-35ms UI 30 m × 0.32 mm，0.25 μm（部件号 123-3832UI）
色谱柱 2	安捷伦 DB-XLB 30 m × 0.32 mm，0.5 μm（部件号 123-1236）
GC/μECD	安捷伦 7890 系列 GC
进样器	安捷伦 7683 自动液体进样器，5.0 μL 锥形进样针（部件号 5181-1273）
CFT 装置	惰性三通（部件号 G3184-60065）
分流比	1:1
保留间隙柱	5 m × 0.32 mm 内径的去活熔融石英管
进样口	2 μL 不分流；250 °C；
吹扫气流速	60 mL/min， 0.5 min
载气	氦气，平均流速：35 cm/s（80 °C）
柱温箱	80 °C（0.5 min）， 26 °C/min 到 175 °C， 6.5 °C/min 到 235 °C，15 °C/min 到 300 °C（6 min）
μECD	340 °C，恒定柱流 + 尾吹（N_2）= 30 mL/min

表 2. 流路耗材

样品瓶和瓶盖	MS-认证的棕色钳口玻璃样品瓶和瓶盖套装（部件号 5190-2283）
样品瓶内插管	250 μL，玻璃/聚合物支脚（部件号 5181-8872）
进样针	5 μL，锥形（部件号 5181-1273）
隔垫	高级绿色隔垫（部件号 5183-4759）
进样口衬管	超高惰性单锥衬管（部件号 5190-2292）
垫圈	0.5 mm 内径短圈；85% Vespel/15% 石墨垫圈（部件号 5062-3514）
CFT 接头	内螺帽（部件号 G2855-20530）
CFT 垫圈	SilTite 垫圈，0.32 mm 内径（部件号 5188-5362）
20 倍放大器	20 倍放大环（部件号 430-1020）

表 3. 样品制备耗材

SPEC 膜盘	安捷伦 SPEC C18AR 47 mm（部件号 A74819）
SPEC 膜盘多管系统	SPEC 6 位装置（部件号 A712） SPEC 支架（部件号 A713） SPEC 1 L 溶剂瓶（部件号 A714）

试剂和化学品

所有试剂均为 ACS 级或者 Ultra Resi 级。乙酸乙酯（EtOAc）、甲醇（MeOH）和二氯甲烷（$MeCl_2$）来自于 JT Baker，通过 VWR International（West Chester, PA）购得。盐酸（HCl）和亚硫酸钠（Na_2SO_3）购于 Sigma-Aldrich（St. Louis, MO）。EPA508.1 标准品和替代标准品购于 Ultra Scientific（North Kingstown, RI, USA）。

溶液和标准品

配制 50 mg/mL 的亚硫酸钠水溶液。该溶液在采样过程中加入到水样中以消除残余氯。按照 1:1 的比例配制乙酸乙酯和二氯甲烷的混合溶液，只需等量混合两种溶剂。

将 25 mL HCl 滴加到装有约 22 mL 水的 50 mL 容量瓶中，容量瓶置于冷水浴中，边滴边冷却，滴加完成待溶液冷却至室温后，加水定容至刻度，充分混匀，配制成 6 N 的 HCl 溶液。

将市售的农药原液用乙酸乙酯稀释成浓度为 1 µg/mL 的初级标准溶液，该溶液用于添加到水样中，用于方法分析。用乙酸乙酯配制 1 µg/mL 的替代标准溶液，并在萃取前加入到水样中。

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台，以乙酸乙酯为溶剂，通过标准和替代标准的初级溶液制备浓度从 1 到 100 ng/mL 的校准系列溶液。

样品制备

使用安捷伦 SPEC C18AR 47 mm 固-液萃取膜盘对 1L 水样进行萃取，将萃取液吹干、浓缩后利用 GC 进样分析。图 1 为液固萃取（LSE）样品制备的流程图。

向 1 L 水样中加入 1 mL 50 mg/mL 的亚硫酸钠溶液，以消除残留的氯。用 6 N HCl 溶液调节水样的 pH 至 2 以下。向溶液中加入适量的农药标准溶液，配成含分析物浓度 0.01 µg/L 的质控样品（QC）。

安装好真空多管抽滤装置，将 SPEC 膜盘皱面向上放置在过滤头上，用 5 mL 1:1 的乙酸乙酯和二氯甲烷混合溶液浸润活化 1min，然后在真空下缓慢抽滤。再加入 5 mL 甲醇，继续缓慢抽滤。注意抽滤结束后在膜盘上保留一浅层甲醇防止膜盘变干。最后，用 5 mL 水冲洗膜盘，缓慢真空抽虑后，在膜盘上保留一浅层溶液防止膜盘变干。

将 5 mL 甲醇加入到 1 L 水样中充分混匀。加入适量的替代标准溶液，振荡。将水样以 75-100 mL/min 的速度抽滤通过萃取膜盘，水样抽滤结束后，继续抽滤 10min 以干燥膜盘。

将滤液瓶取出，换上装有收集管的烧瓶，将收集管与膜盘基座的流出端相连，将过滤装置重新安装好。用 5 mL 乙酸乙酯冲洗样品收集瓶，并用一次性移液管转移到膜盘上。真空缓慢抽滤洗脱溶剂。然后换用 5 mL 二氯甲烷重复洗脱步骤。使用一次性玻璃移液管移取 3 mL 乙酸乙酯:二氯甲烷为 1:1 的溶液淋洗滤层，重复此操作两次。

使洗脱液流经装有 5 到 7g 无水硫酸钠的玻璃干燥管进行干燥。用 3 mL 乙酸乙酯:二氯甲烷为 1:1 的溶液冲洗干燥管两次。将萃取液和淋洗液收集到一个浓缩管中，用 Labconco CentriVap 离心浓缩仪（78100 系列）浓缩至约 0.8 mL，浓缩过程中，用乙酸乙酯冲洗浓缩管内壁 2-3 次。最后用乙酸乙酯将萃取液体积定容至 1.0 mL，并转移至自动进样器的样品瓶中，利用 GC 进样分析。

样品萃取步骤

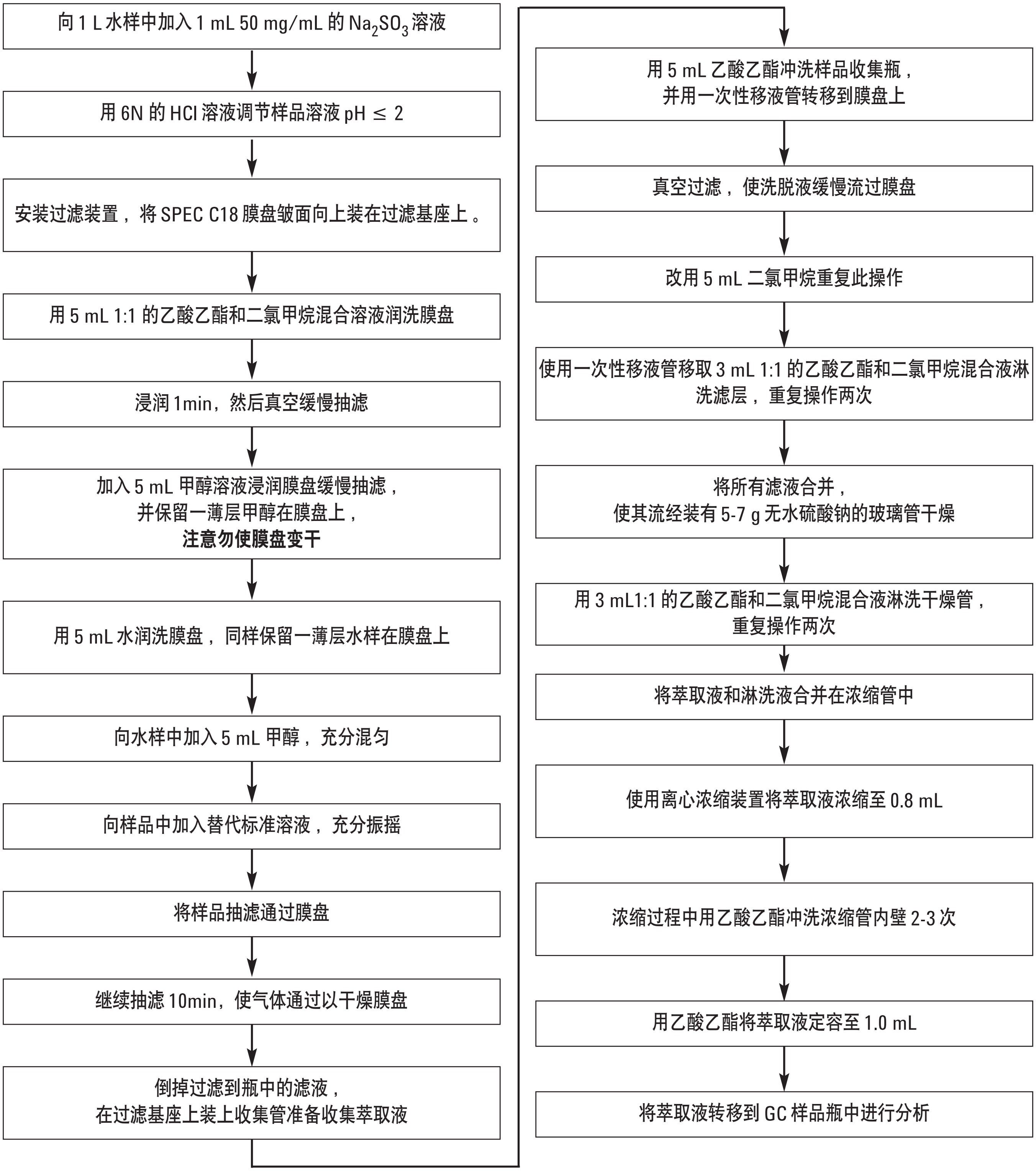


图 1. 水中有机氯农药的萃取流程图

结果和讨论

37 种目标有机氯农残和除草剂在安捷伦 DB-35ms UI 初级色谱柱和 DB-XLB 确认色谱柱上实现分离，并且仅需不到 23 min 时间。图 2 为 50 ng/mL 的农残标准品乙酸乙酯溶液在双柱系统的 GC/μECD 上获得的色谱图。图 3 中部分色谱图的放大视图显示的是 10 ng/mL 的 EPA 508.1 农残标准品在 DB-35ms UI 色谱柱上表现出良好的响应和分离效果。图 4 展示了 DB-XLB 色谱柱的分离性能和选择性的不同，充分显示了其作为确认色谱柱的优势所在。

EPA 508.1 有机氯农残和除草剂的分离

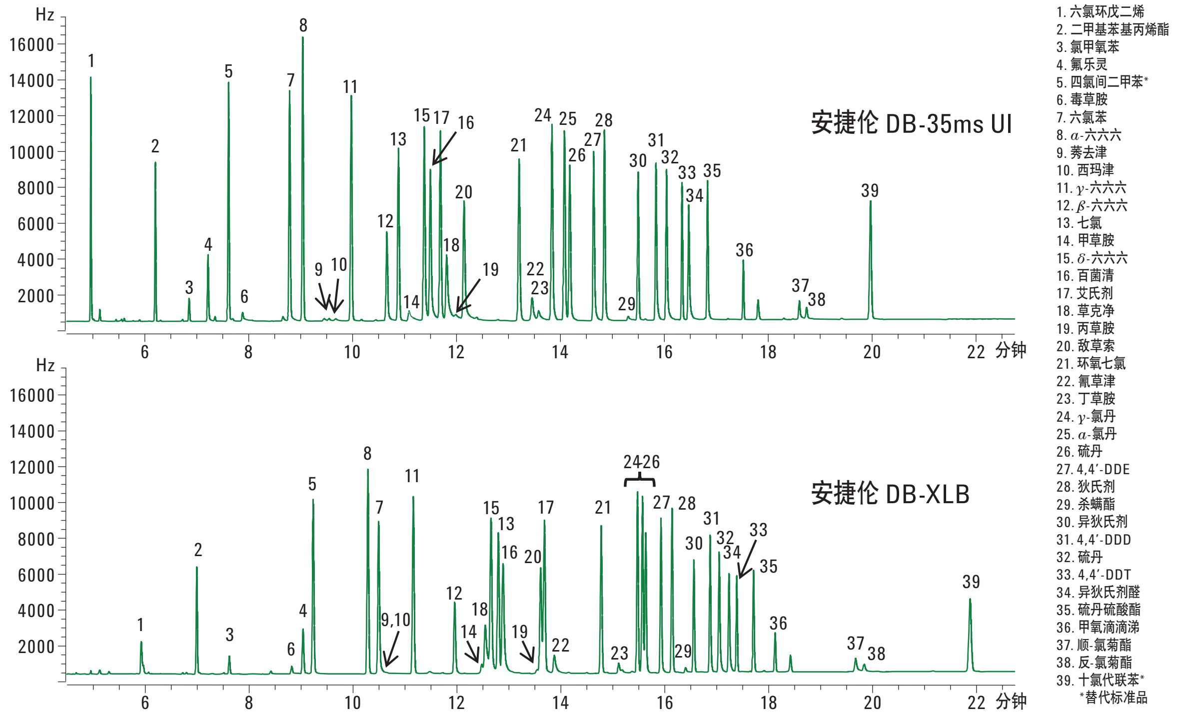


图 2. GC/μECD 分析 50 ng/mL 农残标准品在双柱 J&W DB-35ms UI 30 m×0.32 mm，0.25 μm 色谱柱（部件号 123-3832UI）和 DB-XLB 30 m×0.32 mm，0.5 μm 色谱柱（部件号 123-1236）上的色谱图。该标液为农残标准物质的乙酸乙酯溶液，使用安捷伦 7696A 样品制备工作台制备，色谱分析条件参考表 1

EPA 508.1 低浓度农残在安捷伦 DB-35ms UI 色谱柱上的峰形和分离效果

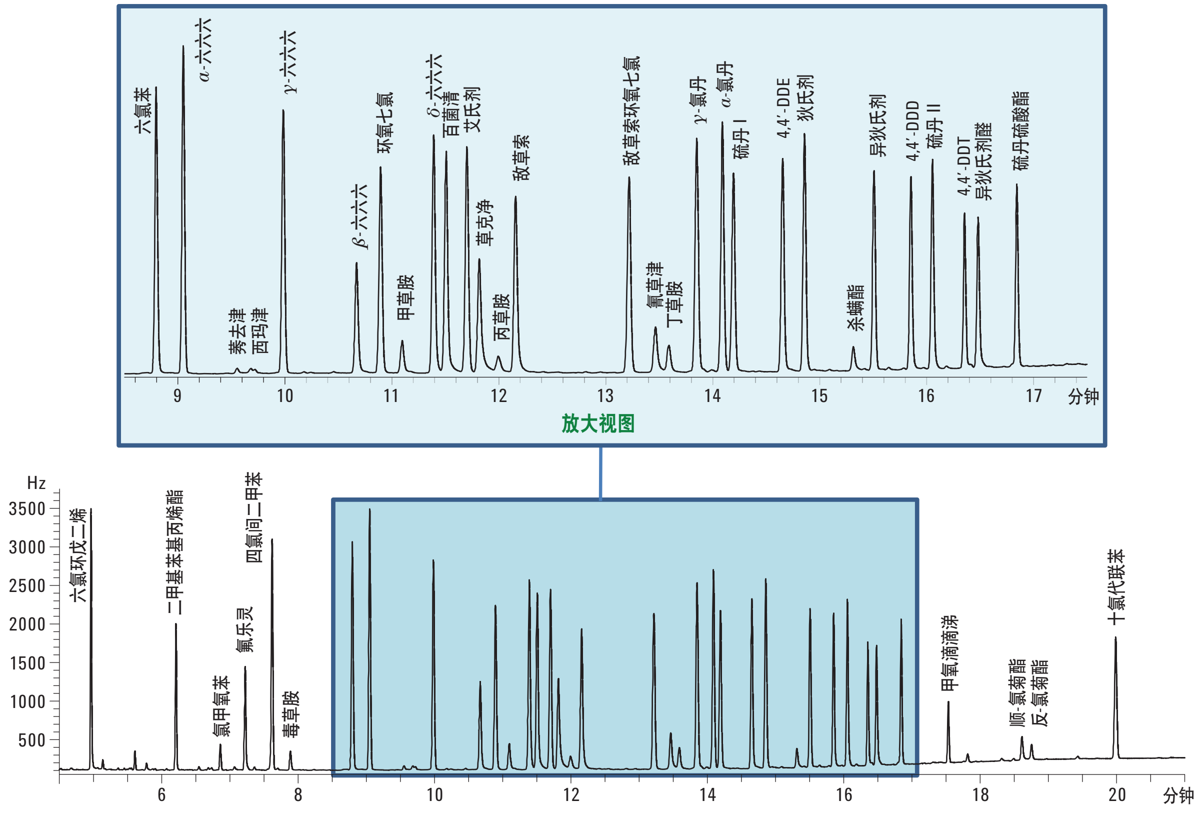


图 3 GC/μECD 分析 10 ng/mL 有机氯农残标准品在 DB-35ms UI 30 m×0.32 mm，0.25 μm 色谱柱上谱图的部分放大视图。色谱分析条件参考表 1

EPA 508.1 低浓度农残标准品在 DB-XLB 色谱柱上的峰形和分离效果

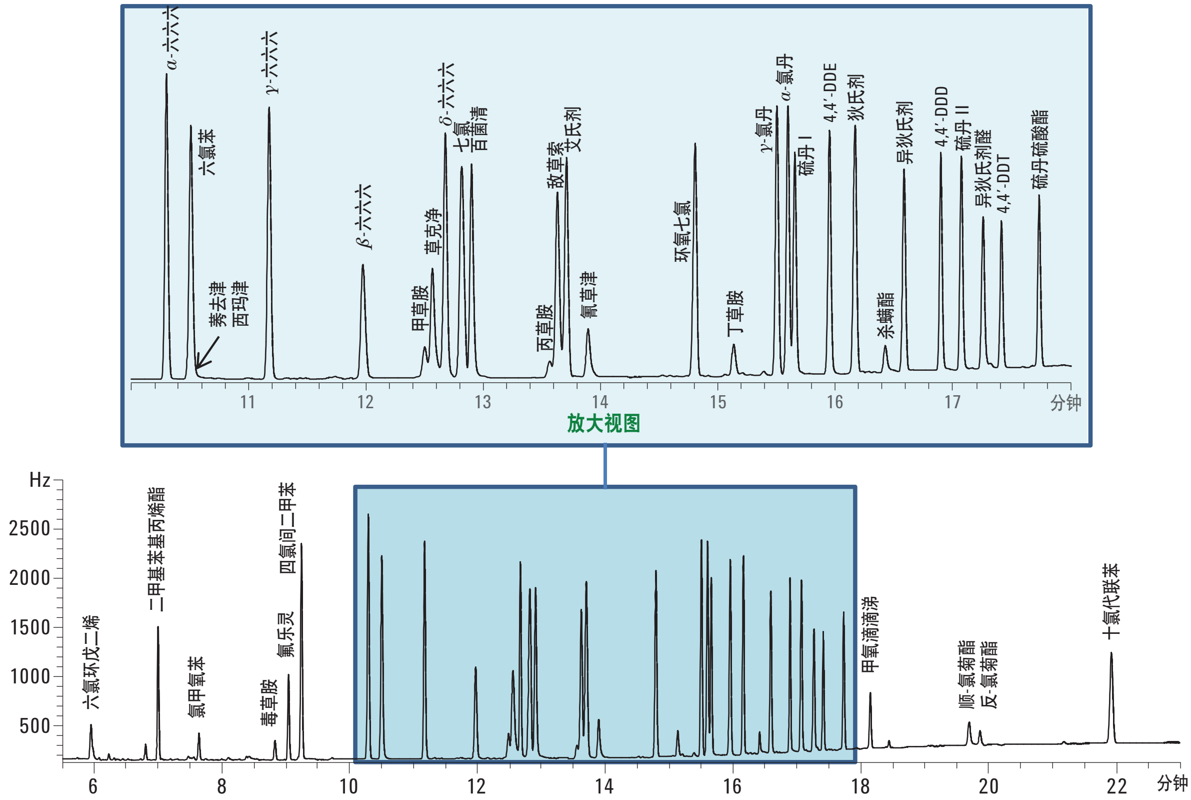


图 4 GC/μECD 分析 10 ng/mL 有机氯农残标准品在 DB-XLB 30 m×0.32 mm，0.5 μm 色谱柱上谱图的部分放大视图。色谱分析条件参考表 1

为测试方法的线性，制备了 7 个浓度水平的校准曲线。校准曲线的线性用相关系数（R^2）来表示，可用其来评估气相色谱色谱柱性能的好坏。将市售原液配制的初级标准溶液乙酸乙酯逐级稀释，配制成 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 和 100 ng/mL 共 7 个浓度的标准样品溶液，使用安捷伦 7696A 样品制备工作台进行此标准样品制备操作。

如果得到非线性的响应则意味着目标物发生分解或者在进样口或色谱柱上产生了吸附作用。该研究中，使用 DB-35ms UI 和 DB-XLB 色谱柱，在整个线性范围内获得的相关系数 $R^2 \geq 0.993$，农残各组分的相关系数值参见表 4.

表 4. GC/μECD 分析 EPA 508.1 有机氯农残各组分校准曲线的相关系数（R^2）

线性结果

分析物	R^2 Agilent DB-35ms UI	R^2 DB-XLB
六氯环戊二烯	0.9996	0.9930
二甲基苯基丙烯酯	0.9982	1.0000
氯甲氧苯	0.9982	0.9981
氟乐灵	0.9976	0.9976
四氯间二甲苯（ss）	0.9997	0.9997
毒草胺	0.9996	0.9986
六氯苯	0.9996	0.9991*
α-六六六	0.9998	1.0000
莠去津	0.9941	*
西玛津	0.9971	*
γ-六六六	0.9999	0.9998
β-六六六	0.9998	0.9999
七氯	0.9999	0.9998
甲草胺	0.9986	0.9989
δ-六六六	0.9999	0.9996
百菌清	1.0000	1.0000
艾氏剂	0.9998	0.9994
草克净	0.9997	0.9985
丙草胺	0.9973	0.9987
DCPA	0.9996	0.9998

分析物	R^2 Agilent DB-35ms UI	R^2 DB-XLB
敌草索环氧七氯	0.9998	0.9998
氰草津	0.9994	0.9998
丁草胺	0.9990	0.9992
γ-氯丹	0.9998	0.9999
α-氯丹	0.9998	0.9998
硫丹 I	0.9998	0.9997
4,4′-DDE	0.9998	0.9998
狄氏剂	0.9998	0.9999
杀螨酯	0.9940	0.9985
异狄氏剂	0.9998	0.9996
4,4′-DDD	1.0000	0.9999
硫丹 II	0.9999	0.9999
4,4′-DDT	0.9993	0.9996
异狄氏剂醛	1.0000	0.9999
硫丹硫酸酯	0.9997	0.9997
甲氧滴滴涕	0.9993	0.9982
顺-氯菊酯	0.9992	0.9992
反-氯菊酯	0.9988	0.9995
十氯代联苯（ss）	0.9998	0.9997

（ss）-替代标准品　* 共流出

该方法对痕量水平的有机氯农残检测具有很高的灵敏度。欧盟规定水中单个组分的农药残留限值为 0.1 μg/L [3]。为确保达到该检测水平，要求检测方法的检出限（LOD）必须低于此限值。图 5 为 0.01 μg/L 加标水样的萃取液在 DB-35ms UI 色谱柱和 DB-XLB 色谱柱上的谱图结果。该加标水样农残浓度比上述限值低 10 倍，同时也接近并低于 EPA 建立的饮水最高污染浓度（MCLs）限值[1]。

使用安捷伦 SPEC C18AR 液-固萃取膜盘进行样品萃取可有效保留和富集加标水样中的有机氯农残。为测定水中规定的 MCLs 水平的痕量农残组分，需要将大量水样浓缩至农残可检测水平。使用 47 mm 超大 C18 膜盘可以对 1L 水样以 75-100 mL/min 的速度进行萃取，这样可以在 10min 内完成水样处理，节约了样品制备时间，提高了样品分析通量。

GC/μECD 分析空白水样和加标水样萃取液的色谱图对比

1. 六氯环戊二烯
2. 二甲基苯基丙烯酯
3. 氯甲氧苯
4. 氟乐灵
5. 四氯间二甲苯*
6. 毒草胺
7. 六氯苯
8. α-六六六
9. 莠去津
10. 西玛津
11. γ-六六六
12. β-六六六
13. 七氯
14. 甲草胺
15. δ-六六六
16. 百菌清
17. 艾氏剂
18. 草克净
19. 丙草胺
20. 敌草索
21. 环氧七氯
22. 氰草津
23. 丁草胺
24. γ-氯丹
25. α-氯丹
26. 硫丹 I
27. 4,4′-DDE
28. 狄氏剂
29. 杀螨酯
30. 异狄氏剂
31. 4,4′-DDD
32. 硫丹 II
33. 4,4′-DDT
34. 异狄氏剂醛
35. 硫丹 sulfate
36. 甲氧滴滴涕
37. 顺-氯菊酯
38. 反-氯菊酯
39. 十氯代联苯*

*替代标准品

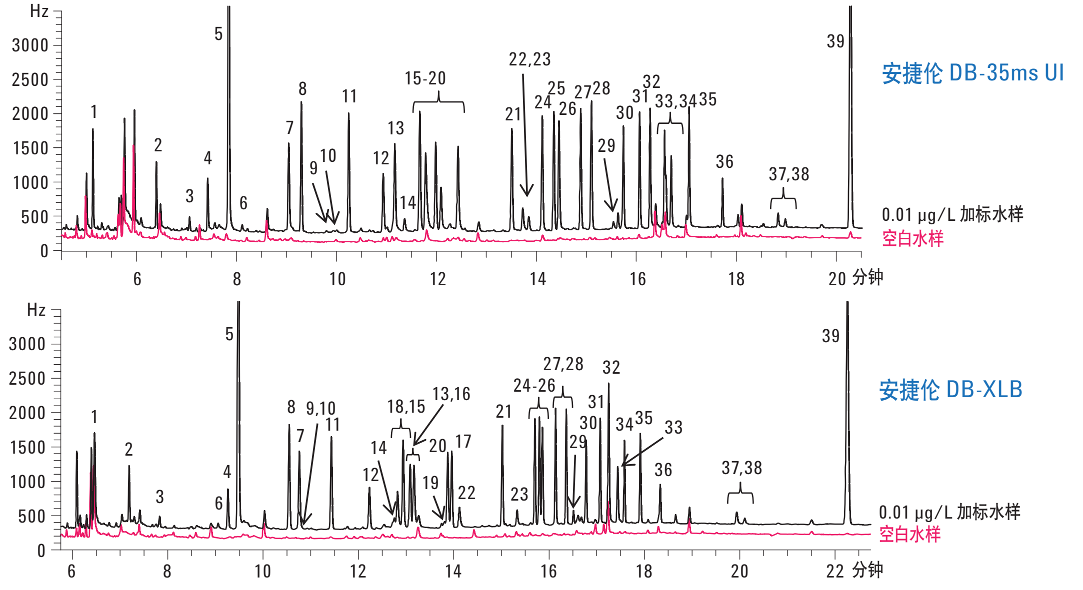


图 5. GC/μECD 分析 0.01 μg/L 加标水样和空白水样萃取液在 DB-35ms UI 30 m×0.32 mm，0.25 μm 色谱柱（部件号 123-3832UI）和 DB-XLB 30 m × 0.32 mm，0.5 μm 色谱柱（部件号 123-1236）上的色谱图对比。样品制备流程参考图 1，色谱条件参考表 1

使用该方法还对某饮水水样中的有机氯农残进行了分析。自来水样品采集和制备流程参照图 1，色谱分析条件参照表 1。在本研究的标定范围内未检出自来水中存在目标有机氯农残。样品的 GC/μECD 色谱图如图 6 所示。

GC/μECD 分析空白水样和饮用水水样萃取液的色谱图对比

1. 六氯环戊二烯
2. 二甲基苯基丙烯酯
3. 氯甲氧苯
4. 氟乐灵
5. 四氯间二甲苯*
6. 毒草胺
7. 六氯苯
8. α-六六六
9. 莠去津
10. 西玛津
11. γ-六六六
12. β-六六六
13. 七氯
14. 甲草胺
15. δ-六六六
16. 百菌清
17. 艾氏剂
18. 草克净
19. 丙草胺
20. 敌草索
21. 环氧七氯
22. 氰草津
23. 丁草胺
24. γ-氯丹
25. α-氯丹
26. 硫丹 I
27. 4,4′-DDE
28. 狄氏剂
29. 杀螨酯
30. 异狄氏剂
31. 4,4′-DDD
32. 硫丹 II
33. 4,4′-DDT
34. 异狄氏剂醛
35. 硫丹 sulfate
36. 甲氧滴滴涕
37. 顺-氯菊酯
38. 反-氯菊酯
39. 十氯代联苯*

*替代标准品

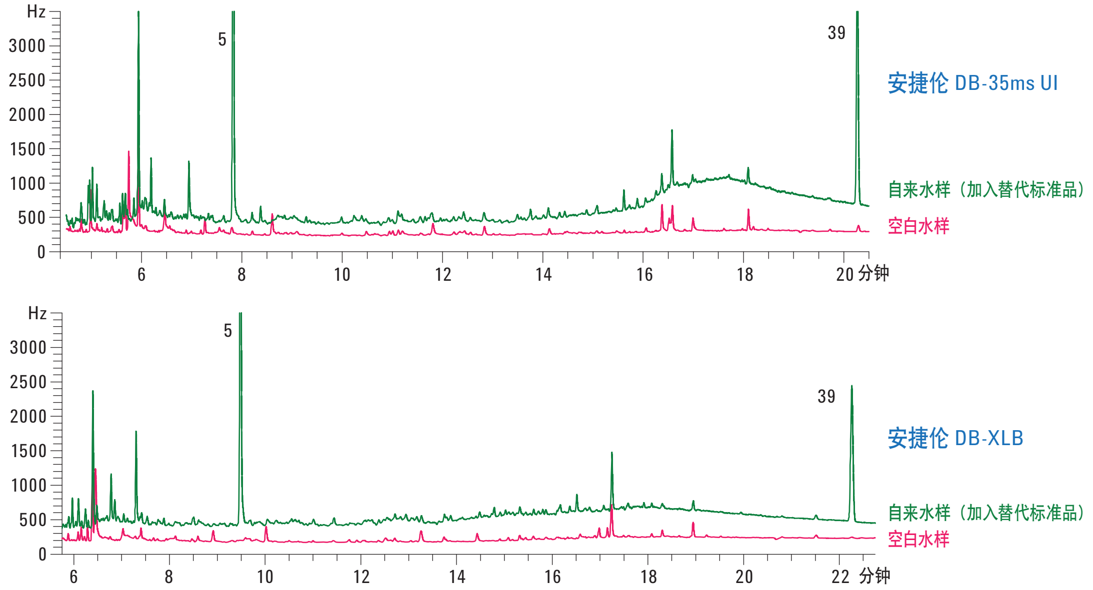


图 6. GC/μECD 分析自来水水样和空白水样萃取液在 DB-35ms UI 30 m×0.32 mm，0.25 μm 色谱柱（部件号 123-3832UI）和 DB-XLB 30 m × 0.32 mm，0.5 μm 色谱柱（部件号 123-1236）上的色谱图对比。样品制备流程参考图 1，色谱条件参考表 1

结论

该应用报告开发了一种有效的分析方法用于萃取并检测水中低于 μg/L 级的有机氯农残和除草剂。安捷伦 J&W DB-35ms UI 毛细管色谱柱可高效实现 37 种目标物的分析，并在低浓度下提供卓越的灵敏度和可靠的定量水平。目标物在安捷伦 DB-XLB 色谱柱上的分离提供了高度一致的分析结果。

使用安捷伦 SPEC C18AR 47 mm 液-固萃取膜盘可从水中成功萃取和富集农残组分，在提高痕量组分检测性能的同时，有效地降低了样品制备时间。使用安捷伦 7696A 样品制备工作台制备的标准样品的校正曲线在双柱分析系统的整个线性范围内相关系数 $R^2 \geq 0.993$。

使用该方法可检测水中低于 EU 和 EPA 最大允许限值 10 倍浓度的农残。使用该方法成功制备并分析了 0.01 μg/L 的加标水样，充分说明了使用安捷伦 J&W DB-35ms UI 色谱柱和安捷伦 DB-XLB 色谱柱的双柱设计进行低浓度有机氯农残分析的高效性。对某自来水样品的检测，在本方法的线性范围内，未检出有任何有机氯农残。

致谢

作者衷心感谢 Dr. Joan Stevens 对安捷伦 LSE 萃取处理的帮助和建议。

参考文献

1. Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambré C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD.（2000）Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Crit. Rev. Toxicol. 30（1）:71-133.

2. EPA. List of Drinking Water Contaminants & MCLs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, Retrieved October 14, 2003 from http://www.epa.gov/safewater/mcl.html#mcls.

3. ECC Council Directive 80/778/ECC. Official Journal of the European Communities, No. L 229, August 30, 1980, p 11.

4. EEC. Drinking Waters Directive, Official Journal N229/11, Directive 80/778/EEC, 1988.

5. Ken Lynam，Doris Smith.使用安捷伦 J&W DB-35ms 超高惰性气相色谱柱进行具有挑战性的农药分析（2010）.安捷伦科技,出版号:5990-6595CHCN.

6. Limian Zhao, Allan D. Broske（2010）.采用气相色谱和活性化合物评估超高惰性衬管去活技术.安捷伦科技,出版号:5990-7380CHCN.

7. US EPA 1995. Method 508.1. Determination Chlorinated Pesticides, Herbicides, and Organohalides by Liquid-Solid Extraction and Electron Capture Gas Chromatography. Revision 2.0.

8. 安捷伦 7696A 样品制备工作台产品简介（2011）. 安捷伦科技, 出版号:5990-6908CHCN.

9. Rebecca Veeneman , Dale Snyder（2010）自动化样品制备提高数据质量. 安捷伦科技,出版号:5990-6974CHCN.

10. James D. McCurry（2011）,安捷伦 7696A 工作台在复杂样品自动化制备中的应用.安捷伦科技,出版号:5990-7525CHCN.

更多详细信息

有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 1 月 24 日，中国印刷
5990-9735CHCN

Agilent Technologies

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备符合 EPA 方法 8270 的 AQA 标样

应用简报

环境

作者

Darren DeBoo
GEOAnalytical, Inc.
俄亥俄州特温斯堡
美国

Peter Mrozinski
安捷伦科技（中国）有限公司
特拉华州威明顿市
美国

摘要

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备的校准标样的相对响应因子的重现性和回收率符合 EPA 方法 8270 实验室制定的分析质量保证标准。

前言

分析质量保证 (AQA) 对于任何分析实验室的正确操作至关重要，无论是商业实验室、政府实验室还是科研实验室都如此。数据的可靠性取决于分析过程是否严格遵循各种不同的操作过程，尤其是那些受美国环境保护总署 (EPA) 管控的分析。其中最常见的两个过程是使用校准曲线和测量加标样品的回收率。

通过制备一系列标样来建立校准曲线，标样浓度接近于未知物中待测物的预测浓度。偏离最佳拟合线的单个校准点用于评估校准的精度。该精度直接取决于标样原材料的质量以及制备校准标样的准确性和重现性。测量加标样品中待测物的回收率是评估分析效率和精度的又一方法，该回收率也取决于所使用的校准标样的质量。

校准标样通常是手动制备，包括繁琐而耗时的移液步骤，其精度取决于操作者的技术水平和人为误差出现的几率。此外，操作人员可能会接触有毒化学品。自动剂量分配系统避免了操作过程中的人为误差，确保制备的校准标样的准确性和精度。

Agilent Technologies

本应用简报验证了 Agilent 7696A 样品制备工作台具有自动制备校准标样的能力，满足 AQA 对校准曲线精度和回收水平的要求。检测半挥发性有机化合物的 (SVOC) EPA 方法 8270 作为一种示范模型。该方法使用气质联用 (GC/MS) 技术分析 EPA 管控的 90 种 SVOC 固体、液体和气体样品。

按照该自动化方法制备的校准标样满足实验室 AQA 对 13 种校准检验化合物 (CCC) 的校准曲线平均相对响应因子 (RRF) 的相对标准偏差的要求。这 13 种化合物的回收率也在允许的限值内。此外，制备的样品也满足该方法对系统性能化合物 (SPCC) 和非 CCC 化合物的其他所有要求。

实验部分

标样和试剂

农药级和更高等级的二氯甲烷用于制备校准标样。SVOC 标样购自 Sigma-Aldrich 和 Restek，浓度为 1000 μg/mL。氘化内标和替代标样也购自 Restek。

仪器

在 Agilent 7696A 样品制备工作台上采用表 1 设置制备校准标样，然后采用 GC/MS 系统进行分析。

表 1.　Agilent 7696A 样品制备工作台设置

前进样针	500 μL
后进样针	100 μL
加热器设定点	室温
加热器补偿	0 °C
泵的数量	2
洗针体积	400 μL
抽吸速度	800 (μL/min)
分液速度	2500 (μL/min)
针取样深度偏移量	0 mm
粘度延迟	4 秒
针溢出	5% 的针容量
气隙	0% 的针容量
样品处理方案	顺序

在样品制备工作台上制备校准标样

在工作台上顺序地制备校准标样。首先将不同量的二氯甲烷移取到样品瓶中，然后将不同量的 SVOC 标准工作溶液移取到相同的样品瓶中，使每个样品瓶的总容量为 1 mL，八个校准标样的浓度范围为 0.5 到 80 μg/mL。在每次移取步骤前，都要用 400 μL 的二氯甲烷清洗进样针。

结果

校准曲线

图 1 为采用 GC/MS 分析 SVOC 校准标样的总离子流图，通过对每个峰进行积分，可以获得每个峰面积与浓度的关系。校准曲线上每个浓度的响应因子等于峰面积除以校准标样的浓度。RRF 等于校准标样的响应因子除以内标的响应因子。

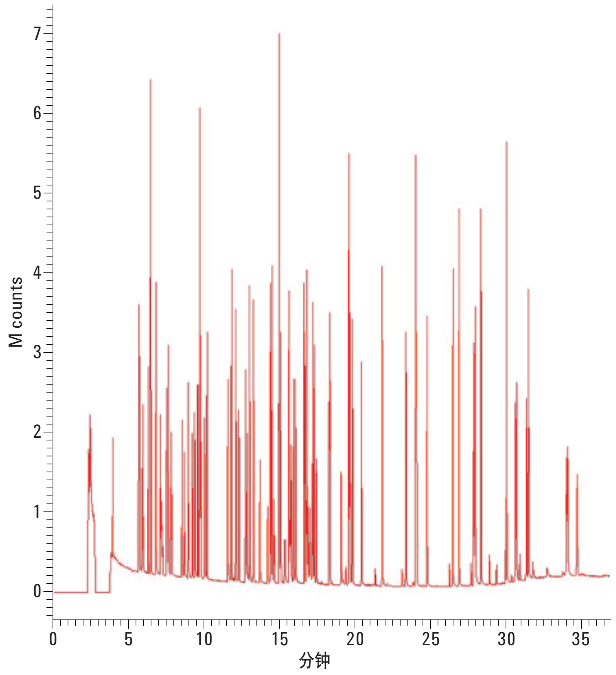


图 1.　遵循 EPA 方法 8270 的 GC/MS 总离子流图 (TIC)，校准混标浓度为 10 μg/mL

通过计算用于生成校准曲线的所有浓度校准标样的 RFF 得出平均 RFF。通过重复分析获得每个平均 RFF，而相对标准偏差 (RSD) 也通过对每次重复分析计算得出。实验室的 AQA 标准要求计算 13 种 CCC 的 RSD，而且该值必须小于 30%。表 2 说明了使用工作台制备的 CCC 的所有 RRF 满足质量标准的要求。事实上，8/13 种 CCC 的 RSD ≤10%。

回收率

使用工作台制备的标样的校准曲线测得加标校准标样的回收率。实验室的 AQA 标准要求所有的回收率在 80% 到 120% 范围内。表 3 显示了所有回收率均满足此标准，7/13 种 CCC 的回收率在 95% 到 100% 的范围内。高回收率证明了使用自动化工作台系统制备的标样的校准曲线获得了高的定量准确性。

表 3. 加标校准标样的回收率

校准检验化合物	% 回收率
苯酚	114.21
1,4-二氯苯	97.28
2-硝基酚	99.69
1,2,4-二氯苯酚	108.1
六氯丁二烯	98.53
4-氯-3-甲基苯酚	96.33
2,4,6-三氯苯酚	95.71
苊烯	92.92
亚硝基二苯胺	97.70
五氯酚	115.06
荧蒽	89.91
邻苯二甲酸二正辛酯	108.55
苯并[a]芘	99.05

表 2. 校准曲线上的相对响应因子 (RRF)、平均 RRF 和 % RSD

	校准曲线上每个浓度 (µg/mL) 的 RRF									
校准检验化合物	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20	50	80	平均 RRF	%RSD
苯酚	1.581	1.502	1.597	1.722	1.413	1.342	1.053	1.082	1.412	17.1
1,4-二氯苯	1.600	1.618	1.848	1.725	1.710	2.074	1.722	2.030	1.791	10.0
2-硝基酚	0.119	0.113	0.106	0.114	0.116	0.111	0.126	0.109	0.114	5.3
2,4-二氯酚	0.330	0.306	0.332	0.330	0.338	0.293	0.299	0.280	0.314	6.8
六氯丁二烯	0.227	0.230	0.241	0.265	0.283	0.261	0.283	0.312	0.263	11.2
4-氯-3-甲基苯酚	0.417	0.416	0.420	0.422	0.442	0.379	0.438	0.464	0.425	5.8
2,4,6-三氯苯酚	0.529	0.495	0.476	0.460	0.477	0.451	0.410	0.403	0.463	9.1
苊烯	2.195	2.137	1.960	2.012	2.062	1.914	1.962	2.389	2.079	7.6
亚硝基二苯胺	0.868	0.795	0.721	0.673	0.650	0.646	0.658	0.678	0.711	11.3
五氯酚	0.157	0.140	0.129	0.136	0.128	0.118	0.094	0.088	0.124	18.8
荧蒽	1.006	0.961	0.948	0.920	0.956	0.990	0.972	1.147	0.988	7.1
邻苯二甲酸二正辛酯	2.038	2.557	2.825	3.159	3.281	3.471	4.018	--	3.050	21.2
苯并[a]芘	1.092	1.080	1.069	0.984	0.951	0.914	0.987	1.060	1.017	6.6

结论

制备高准确性和精度的校准标样无疑是每个分析实验室所必需的。这特别适用于环境实验室的 EPA 方法。由于方法 8270 需要分析大量化学性质不同的化合物，因此该方法极具挑战性。安捷伦样品制备工作台为分析实验室提供了获得 EPA 方法 8270 报告结果所需的高精度和准确性，避免了繁琐而耗时的手动制备校准标样的过程以及随之产生的人为误差。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本资料中的信息、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，2012

2012 年 8 月 17 日，中国印刷
5991-0973CHCN

Agilent Technologies

基于 Agilent 7696A 样品制备工作台的气相色谱/三重四极杆质谱进行雌酮分析

应用简报

作者

Peter Mrozinski
美国
特拉华州威尔明顿
安捷伦科技公司

Selene Hernandez Ruiz 博士
美国
亚利桑那州图森市
亚利桑那大学
化学与环境工程系

Anthony Macherone 博士
美国
特拉华州威尔明顿
安捷伦科技公司

摘要

内分泌干扰物（包括新型污染物或持久性有机污染物）在临床化学、工业性接触、药物发现和开发以及环境检测等许多实验室和交叉学科中的分析需求越来越大。这些实验室面临的巨大需求不仅给分析测量工具增添了负担，也对样品制备的高准确度和重现性提出了新的挑战。本应用简报将简要描述利用自动化工作流程将 Agilent 7696A 样品制备工作台应用于 GC/MS/MS 分析的样品制备步骤。

Agilent Technologies

前言

目前，对准确分析地下水、地表水以及饮用水水源中所含雌激素、雄激素、黄体酮、皮质类固醇和糖皮质激素等内分泌干扰物 (EDC) 的需求呈逐渐增长的趋势。环境中的这些化合物主要来源于人及农畜的人为医源性激素治疗。通常，无法通过传统的污水处理工艺完全降解排泄物中的未代谢母体药物及其代谢物。因此，这些化合物会存在于河流等淡水水体中并转移到地质含水层。这些物质即使处于 ppt 级也会造成不利的影响，包括但不限于：鱼类及两栖动物雌雄比例失调、鱼类可逆型雌性化、抑制繁殖、形态学发生改变（如雌雄同体的发生率升高）以及信息素反应紊乱等等。这些化合物经过数十年的广泛使用已成为威胁人类健康的一类无处不在的持久性有机污染物。因此，有关这类物质在环境中转移和归趋的研究就显得尤为重要。本应用简报描述了如何在 7696A 样品制备工作台上实现校准物制备及衍生化等一系列自动化样品制备过程，通过 GC/MS/MS 来进行一组已知内分泌干扰物的分析。

实验部分

标准品和试剂

雌酮 (E1)、BSFTA/TCMS (99%/1%)、无水乙腈和无水吡啶购自 Sigma-Aldrich（美国）。E1 储备液在无水乙腈中制得，并用于配制制备校准物所需的工作液。

仪器

可通过 Agilent 7696A 样品制备工作台来配制校准标准样，并进行分析物的自动衍生化。测量实验则通过 Agilent 7890A 系列气相色谱联用 Agilent 7000B 三重四极杆 GC/MS 来完成。气相色谱配有多模式进样口 (MMI) 和 Agilent 7693A 150 位自动进样器。进样模式为冷不分流进样；离子源为 EI 源。仪器条件如表 1 和表 2 所示。

表 1. GC/MS 条件

气相色谱运行条件	
分析柱	两根 15 m HP-5MS UI 柱（部件号 19091S431UI），采用安捷伦吹扫 Ultimate 接头（部件号 G1472A）串接
进样体积	2 µL
进样模式	采用多模式进样口 (MMI) 的冷不分流进样
进样口温度	在 70 °C 下保持 0.01 min 以 450 °C/min 升至 280 °C，保持 3 min
载气节省	20 mL/min（3 min 后）
吹扫气流	1.5 min 时 30 mL/min
制冷	开
制冷温度	72 °C
故障检测	30 min
超时检测	在 10 min 时
柱箱温度	120 °C 保持 0.5 min，以 40 °C/min 升至 240 °C，保持 0 min 以 5 °C/min 升至 280 °C，保持 3.75 min
载气	氦气恒流模式 色谱柱 1：0.8 mL/min 色谱柱 2：1.0 mL/min
平均速度	23.498 cm/s
传输线温度	280 °C
运行时间	15.25 min
质谱条件	
调谐	atunes.eiex.tune.xml
增益因子	50
采集参数	多反应监测 (MRM)
碰撞气体	1.5 mL/min
淬灭气体	2.25 mL/min
溶剂延迟	6.0 min
MS 温度	离子源 300 °C 四极杆 150 °C

表 2. MRM 参数

时间段	开始时间	化合物名称	母离子 (*m/z*)	子离子 (*m/z*)	驻留时间 (ms)	碰撞能量 (V)
1	10.5	E1	342.0	257.0	150	15
1	10.5	E1	342.0	244.0	150	15

使用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备样品

Trinh 等人 (2011) 的研究表明：在样品浓缩 1000 倍（1.0 L 样品体积浓缩至 1.0 mL）的前提下，E1 的方法检测限接近 1.0 ng L-1。对于该评估，采用 7696A 样品制备工作台配制了五种不同浓度的校准物，浓度分别为：1.0、2.5、5.0、10.0 和 50.0 ng/mL。对于衍生化反应，同样也在 7696A 样品制备工作台上配制体积百分比为 10/10/80 的 BSTFA + TCMS/无水吡啶/无水乙腈储备试剂，然后加入干燥后的校准物中，加热至 60 °C 反应 30 min。

结果与讨论

7696A 样品制备工作台样品制备

7696A 样品制备工作台的自动化大大缩短了分析人员在样品制备上耗费的时间，在保证人工制备所具有的回收率和精度的同时消除了采样误差的可能性。在本应用简报中，在 1.0 ng/mL 的浓度下（1 pg 柱上样量）重复进样三次确定回收率为 133.37%，五个水平平均精度的 RSD 为 5.162%（范围 3.32%-6.89%）。表 3 和表 4 给出结果。图 1 显示了 1.0 ng/mL 浓度下或柱上样量为 1 pg 时 E1 的定量和定性 SRM 谱图。

表 3. 1.0 ng/mL（1 pg 柱上样量）低浓度校准物的信噪比以及 % 回收率

名称	样品类型	级别	E1 方法实验浓度	峰面积	E1 最终浓度	信噪比
Std_1_1	Cal	1	1.0 ng/mL	48.18	1.29	11.20
Std_1_2	Cal	1	1.0 ng/mL	42.01	0.94	9.00
Std_1_3	Cal	1	1.0 ng/mL	45.97	1.17	12.40
		% 回收率			113.37	

表 4. 5 种不同浓度下校准物的 %RSD (n=3)

名称	样品类型	级别	实验浓度	E1 峰面积
Std_1_1	Cal	1	1	48.18
Std_1_2	Cal	1	1	42.01
Std_1_3	Cal	1	1	45.97
		% RSD		6.89
Std_2_1	Cal	2	2.5	65.86
Std_2_2	Cal	2	2.5	65.75
Std_2_3	Cal	2	2.5	59.74
		% RSD		5.49
Std_3_1	Cal	3	5	134.20
Std_3_2	Cal	3	5	147.65
Std_3_3	Cal	3	5	137.09
		% RSD		5.07
Std_4_1	Cal	4	10	184.80
Std_4_2	Cal	4	10	167.32
Std_4_3	Cal	4	10	173.81
		% RSD		5.04
Std_6_1	Cal	5	50	931.48
Std_6_2	Cal	5	50	874.49
Std_6_3	Cal	5	50	887.74
		% RSD		3.32

GC/MS/MS 分析

对于本研究，在 1.0 - 50.0 ng/mL 范围内的五个浓度水平下分别重复进样三次。图 2 为共 15 个进样所得的校准曲线，相关系数 R^2 为 0.996。

仪器检出限

Wells 等人 (2011) 指出：若样本集小于 30，可用单尾 Students-t 分布来估算仪器检出限 (IDL)。对于 99% 的置信度和 n-1 的自由度，本研究对应的 Students-t 表值为 6.965。将低浓度校准物对应的 6.965 和 6.89% RSD 代入 IDL 方程（式 1），估算出柱上 E1 的 IDL 为 0.48 pg。该值与 Trinh 等人 (2011) 测定的 0.7 ng L-1 的方法检测限（99% 置信度，n=7）非常吻合。

$$IDL_{\%RSD} = \frac{(6.965 \times 6.89\% \times 1.0\ \text{pg})}{100} = 0.48\ \text{pg}$$

公式 1.　基于 1.0 ng/mL 校准物的峰面积 % RSD (n=3) 估算的 IDL

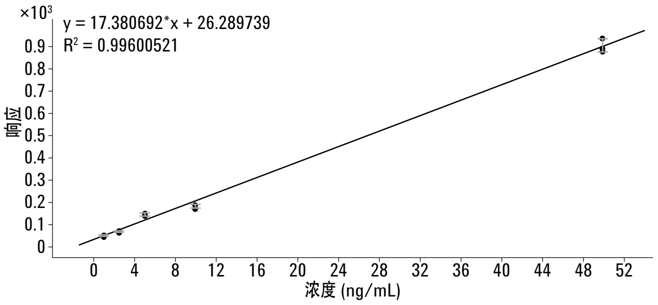


图 2.　E1 校准曲线：在五种浓度下重复进样三次

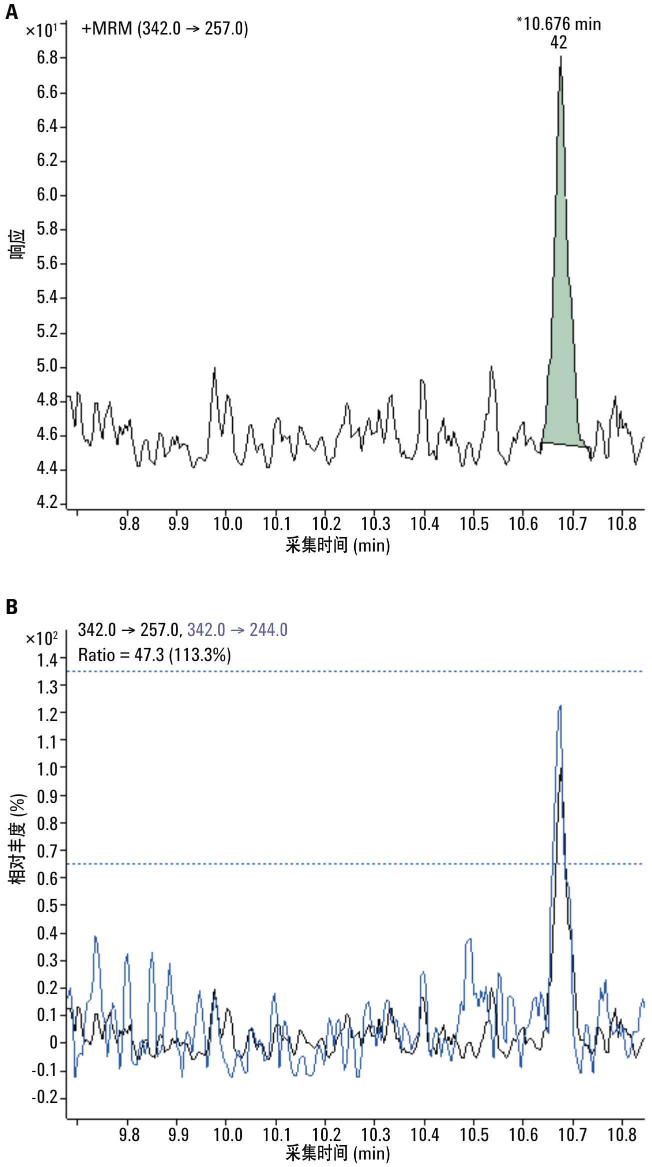


*图 1.　**A** 显示了定量 SRM 342 → 257；**B** 显示了定性 transition SRM 342 → 244。**B** 中的虚线代表了确认离子比率的容许不确定度。信噪比计算所对应的噪音区域为 10.4 至 10.6 min。*

结论

Agilent 7696A 样品制备工作台可进行准确的样品、校准物或质控样品的制备，另外，它还自带衍生化功能，适用于自动化工作流程分析雌激素及其他内分泌干扰物。本应用简报阐述了自动化样品衍生化过程及其之后通过气相色谱-三重四极杆质谱进行分析的过程的有效性。我们在校准浓度范围内获得了优异的回收率和精度，所测定的 IDL 也与文献中报道的 MDL 值很好地吻合。

参考文献

1. Trinh T., *et al.* "Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry". *J. Chrom A*, 1218 (2011) 1668–1676.

2. Wells G、Prest H、Russ CW. "Why use signal-to-noise as a measurement of MS performance when it is often meaningless"（既然通常无意义为何要用信噪比作为衡量 MS 性能的指标），安捷伦应用简报 5990-8341EN。安捷伦科技（中国）有限公司，2011

更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2013
中国印制
2013 年 1 月 9 日
5991-1695CHCN

Agilent Technologies

食品检测

确保样品稀释和脂肪酸甲酯 (FAME) 衍生化的精密度

脂肪酸甲酯 (FAME) 衍生过程中的步骤虽不复杂却很容易出错。自动化步骤将分析员解脱出来，使他们可以将精力集中到数据和结果上，消除了手动操作带来的潜在误差。

返回目录
查看应用简报

食品检测

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：
agilent.com/chem/workbench

返回目录
返回行业简介

下面的目录已链接到本文集的对应部分。单击文本可跳转到特定部分

婴儿奶瓶浸出的双酚 A 的分析 80

糖果中色素添加剂的分析 92

通过自动样品制备测定三文鱼油中的脂肪酸甲酯 (FAME) 104

使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪定量分析甜菊叶子中的甜菊糖和甜叶菊甙 A 108

采用自动样品制备测定橄榄油中的脂肪酸甲酯 (FAME) 112

安捷伦应用解决方案

婴儿奶瓶浸出的双酚 A 的分析

应用简报

消费品

作者

Syed Salman Lateef
安捷伦科技有限公司
印度班加罗尔

摘要

双酚 A 可以从食品容器的塑料表面浸出，在多种基质如血浆、尿液和地下水中均被检出。它是一种内分泌干扰物，能够模拟婴儿自身的激素（如雌激素），可能会对健康产生不良影响。本应用简报将介绍一种婴儿奶瓶中提取的双酚 A 及其结构类似物双酚 F 的定量方法。我们使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱，在 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统上开发了此方法。通过部分方法验证以确证方法的线性、稳定性及峰面积和保留时间的精密度。使用 Agilent 7696A 样品制备工作台自动进行系列稀释，可节省分析时间。结果表明，双酚 A 的定量限 (LOQ) 为 1.06 ng/mL。样品回收率研究表明，所得双酚 A 的回收率为 80%。利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统将本方法转移至超高效液相色谱 (UHPLC)。UHPLC 方法所采用的实验条件相同，色谱峰更窄更高，分离度更好，并且信噪比也有所改善。这两种方法均可应用于双酚 A 的定量分析，实现食品容器（例如，婴儿奶瓶）的质量控制。

Agilent Technologies

前言

双酚 A (BPA) 是一种用于制造聚碳酸酯塑料和环氧树脂的单体。在不同环境条件下，如受热或改变 pH，痕量 BPA 能够从聚碳酸酯塑料表面浸出，最终进入到人体中。BPA 在诸如尿液、地下水和血浆等不同基质中被检出。基于在阈值以上可观察到毒性作用的假设，美国国家环境保护局 (US EPA) 规定每人每天的 BPA 参考剂量 (RfD) 为 50 µg/kg.bw[1]。使用聚碳酸酯塑料制造的奶瓶对儿童具有潜在的风险。在本应用简报中，我们使用市售的结构类似的化合物双酚 F (BPF)（图 1）与 BPA 一同分析以确定分离效率。

Ballesteros-Gomez *等人*对用于分离、鉴别和定量 BPA 的分析方法进行了综述[2]。此外，ASTM 标准检测方法 D 7574-09 利用离线 SPE 法从环境水样中提取双酚 A[3]。BPA 是一种荧光化合物，荧光检测器 (FLD) 可以灵敏地测定奶瓶浸出的 BPA 浓度。本应用简报介绍了一种结合离线 SPE 和 (U) HPLC/FLD 对 BPA 和 BPF 同时定量分析的方法。

实验部分

仪器和软件

Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器和恒温器 (G1367E, G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (TCC) (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1312B)，配有 8 µL 流通池

UHPLC 分析由 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统实现，该系统包括如下模块：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器和恒温器 (G4226A, G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1312B)，配有 8 µL 流通池

软件：

- 安捷伦化学工作站 B.04.02

样品前处理：

- Agilent 7696A 样品制备工作台

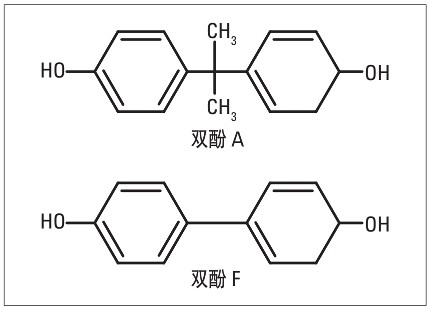


图 1
双酚 A 和双酚 F 的分子结构

试剂与材料

使用的所有化学品和试剂均为 HPLC 级。所用纯净水来自 Milli Q 水纯化系统（Millipore Q-POD Element，美国）。超梯度级乙腈和甲醇购自 Lab-Scan（泰国曼谷）。磷酸氢二钾购自 Fluka（德国）。双酚 A 和双酚 F 标准品购自 Sigma-Aldrich（印度）。购买的不含 BPA 的奶瓶为美国制造，另外三个不同品牌的聚碳酸酯奶瓶为本地生产。

色谱参数

使用 Agilent 1260 和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的反相液相色谱的色谱参数如表 1 所示。

参数	Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统		Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
色谱柱：	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱 4.6×100 mm，5 µm 粒径（部件号 959996 902）		Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱，4.6×100 mm，1.8 µm 粒径（部件号 959964 902）
TCC 温度：	40 °C		
FLD:	激发波长：230，发射波长：316		
FLD 采集速率，增益：	9.26 Hz, 15		
样品恒温箱：	4 °C		
流动相 A：	10 mM 磷酸二氢钾的水溶液		
流动相 B：	100% 乙腈		
梯度：	时间 (min)	%B	
	0	5	
	2	5	
	2.1	35	
	12.5	35	
	12.6	70	
	17	70	
	18.1	5	
	23	5	
流速：	0.9 mL/min		
进样量：	20 µL 使用流动相 A 于冲洗口清洗进样针 5 s		

表 1
Agilent 1260 Infinity LC 和 Agilent 1290 Infinity LC 系统所用的色谱参数

标样的制备

准确称取 BPA 和 BPF 并分别用 100% 甲醇溶解，获得各浓度约为 300 µg/mL 的储备液，不使用时置于 4 °C 下保存。使用由 5% 乙腈和 95% 10 mM 磷酸二氢钾水溶液组成的稀释缓冲液对储备液进行稀释，新鲜配制成浓度为 400 ng/mL 的 BPA 和 BPF 溶液。随后各线性浓度溶液由 400 ng/mL 的溶液稀释配制而成，如表 2 所示。该连续稀释过程在 Agilent 7696A 样品制备工作台上实现。在第一序列，将 400 µL 稀释溶液加入到所有样品瓶中。在第二序列，取 300 µL 400 ng/mL 溶液加入到第一序列的浓度 7 样品瓶中，并涡旋 15 s。通过从前一浓度样品瓶中取 300 µL 加入到下一个浓度样品瓶中进行连续稀释。注意，除了分别运行这两个序列外，这些步骤也可以在一个方法中编程并在一个序列中运行表 3 中列出了 Agilent 7696A 样品制备工作台设置的进样参数。有关如何进行 7696A 样品制备工作台的设置在安捷伦应用简报[5] 中进行了详述[4]。

样品前处理

按照图 2 所示的流程从聚碳酸酯奶瓶中提取 BPA。使用 SPE 接头（部件号 12131001）和外径为 3 mm 的管线（部件号 5062-2483）上样至 Agilent Bond Elut Plexa SPE 柱 (200 mg, 6 mL)（部件号 12109206）。使用安捷伦 20 位真空多管萃取装置（部件号 12234104) 进行 SPE。我们遵循了 ASTM 方法[3] 中所述的样品处理注意事项。使用最后一步所得物的复溶溶液直接进行样品分析（图 2）。

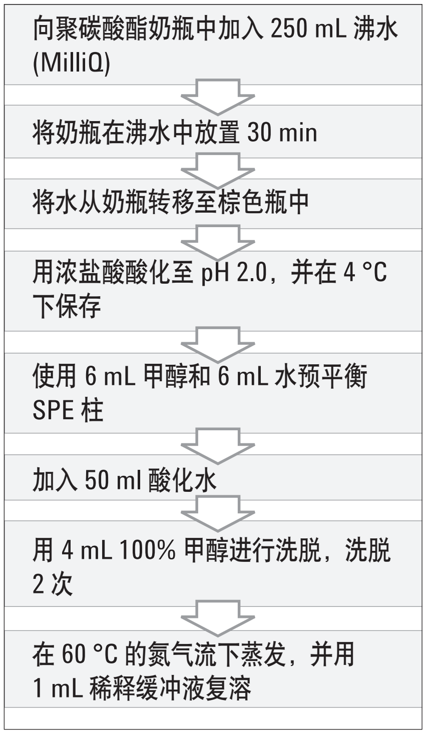


图 2
从奶瓶中提取 BPA 并使用 SPE 进行样品前处理

线性浓度	双酚 A (ng/mL)	双酚 F (ng/mL)
LOD	0.195105	0.195105
1	1.06224	1.06224
2	2.478559	2.478559
3	5.783305	5.783305
4	13.49438	13.49438
5	31.48688	31.48688
6	73.46939	73.46939
7	171.4286	171.4286

表 2
双酚 A 和双酚 F 的稀释表

	溶液预冲洗 1	分液冲洗	分液泵	分液设置
泵送或清洗次数	1	1	3	
冲洗体积 (µL)	50	50	20	
抽取速度 (µL/min)	1250	1250	1250	1250
分液速度 (µL/min)	2500	2500	2500	2500
针深度偏差 (mm)	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0
粘性延迟 (s)	0	0	0	0
转动架上的溶剂	A			
空气间隙（% 进样针体积）	0			0

表 3
Agilent 7696A 样品制备工作台所用的 500 µL 注射器参数

步骤

在确立线性范围之前，将奶瓶提取物的复溶溶液进行进样分析以测定 BPA 的近似浓度。首先注入 20 µL 流动相 A 作为空白，然后平行测定 6 次各线性浓度样品。各浓度下的峰面积和保留时间 (RT) 数据用于计算相对标准偏差值 (RSD)。将在线性范围之内的各浓度下的平均峰面积针对浓度作图得出校准曲线。以较低线性浓度溶液的进样分析确定 BPA 和 BPF 的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

为了评估方法的稳定性，对方法的 6 个关键参数进行了考察：

- 流速 ±2%
- 柱温 ±2.5%
- 进样量 ±5%
- 激发和发射波长 ±3%
- 阶梯梯度 ±10%
- 缓冲液浓度 ±10%

对于稳定性考察的每个参数，重复 7 次分析浓度为 30 ng/mL 的 BPA 和 BPF 标准溶液。

为进行回收率研究，我们按照图 2 所述从不含 BPA 的奶瓶中提取样品。向 50 mL 此样品中加入低浓度或更高浓度的 BPA 和 BPF。将加标样品进行 SPE 处理，再利用校准曲线测定所得样品的浓度，然后，将理论浓度与实测浓度值相比得出回收率。

最后，使用标准 HPLC 方法分析 3 个不同品牌的奶瓶，测定两种双酚的浸出浓度。

然后，将方法转移至 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，使用相同的实验条件在 1.8 µm 色谱柱上进行分析，测试方法的分离度和灵敏度。对该方法各标准品的 LOD、LOQ、线性也进行了评估，并利用峰面积和 RT RSD 考察了方法的精密度。

结果与讨论

分离和检测

在方法开发过程中，使用酸性和碱性流动相在 C18 柱上测试 BPA 和 BPF 的分离情况。此外，在确定最终方法之前，还对从奶瓶提取的水样进行了检测。

使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱作进一步实验研究。TCC 在较低温度 (35 °C) 时，BPA 与相邻洗脱的杂质达到最佳分离，但是在分析基质样品时发现 TCC 为 40 °C 时更有利。采用线性梯度可将两种双酚分离，但是，初步的方法稳定性研究表明，对梯度进行修改后，分离度会出现较大的变化。因此采用阶梯梯度方法，该方法可获得相对稳定的结果。ASTM 方法建议低温保存双酚，因此，在分析过程中自动进样器温度保持在 4 °C。图 3 显示了使用最终方法分离两种双酚所得的色谱图。

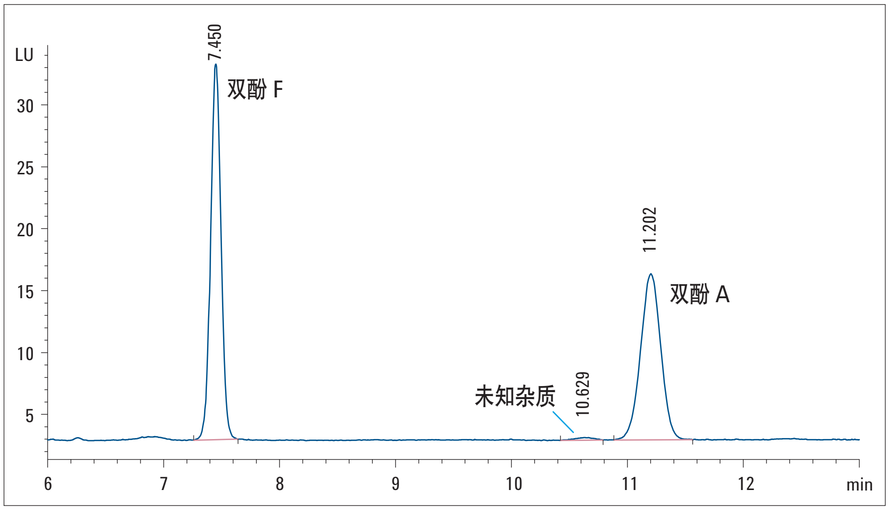


图 3
使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱分离 30 ng/mL 的双酚 F 和双酚 A。使用 FLD 采集色谱图，设置为：激发波长 230 nm 和发射波长 316 nm

检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ)

信噪比 (S/N) >3 时的分析物浓度定义为 LOD，S/N>10 时的分析物浓度定义为 LOQ。使用峰间比值法计算噪音。图 4 显示了 LOQ 浓度的 BPA 与空白（流动相）进样的叠加色谱图。对于 BPA，LOD 为 0.19 ng/m，S/N 为 4.3；LOQ 为 1.06 ng/mL，S/N 为 15.1。

线性

校准曲线线性范围内的各浓度溶液（见表 2）由 Agilent 7696A 样品制备工作台制备。该工作台可自动进行样品处理，提供一致性结果。它可以制备线性范围内的多组样品，只需重新运行该程序。从 BPA 的 LOQ 浓度开始各线性浓度溶液的分析。表 4 中列出了 LOD 和 LOQ 值以及线性结果。通过增加进样量可以进一步减小 LOD 和 LOQ 值，但这在该应用中没有必要，因为研究发现奶瓶的分析结果均在线性范围之内。

保留时间 (RT) 和峰面积的精密度

在线性浓度范围内测定了峰面积精密度，以 RSD(%) 表示。BPA 和 BPF 在线性浓度 1 (L1) 时，所得的 RSD 最大值分别为 5.6% 和 7.2%。同样，BPA 和 BPF 的 RT 精密度计算结果显示 RSD 最大值分别仅为 0.14% 和 0.11%。峰面积 RSD 值的示意图如图 5 所示。

SI 号	名称	LOD ng/mL	信噪比	LOQ (ng/mL)	信噪比	线性范围	R^2 值	浓度水平数
1	双酚 F	0.19	5.1	0.46	12.4	1.06 –171.43	0.99999	7
2	双酚 A	0.19	4.3	1.06	15.1	1.06–171.43	0.99998	7

表 4

BPA 和 BPF 的 LOD、LOQ 和线性。采用 Agilent 7696A 样品制备工作台进行样品前处理。从聚碳酸酯奶瓶检测所得的 BPA 的浓度均在线性范围之内

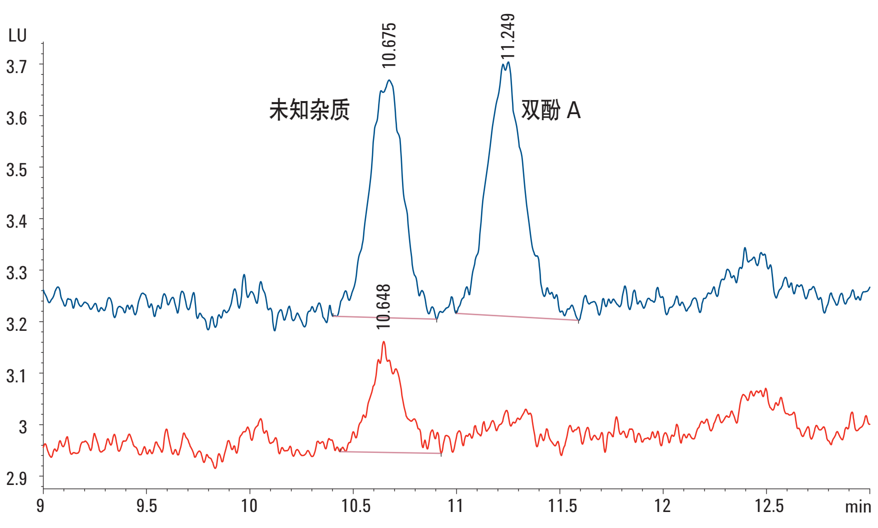


图 4

浓度为 1.06 ng/mL 的 LOQ 浓度溶液进样 20 µL，所得双酚 A 谱图与空白进样的叠加色谱图。在此浓度下的信噪比为 15

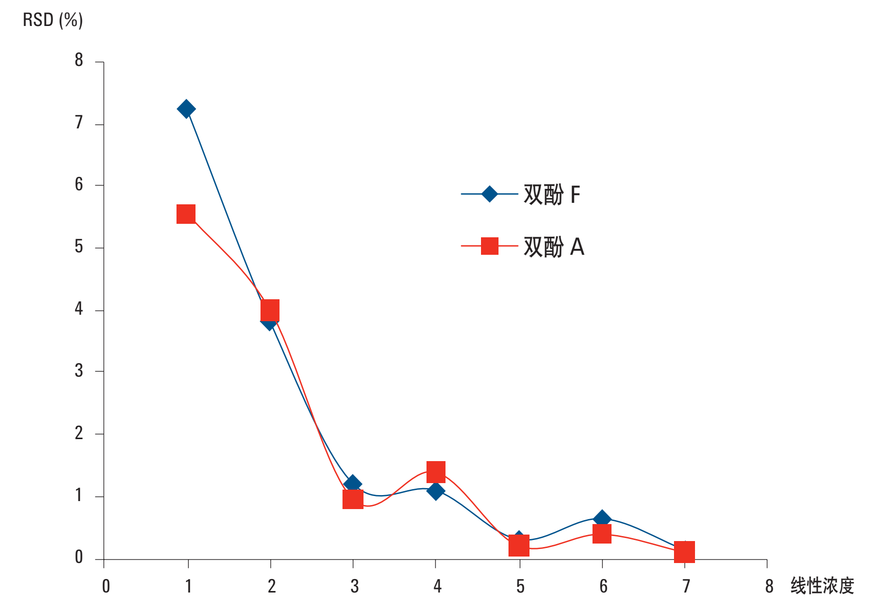


图 5

各浓度下，BPA 和 BPF 重复测定 6 次所得的峰面积精密度，以 RSD(%) 表示

稳定性

使用浓度为 30 ng/mL 的 BPA 和 BPF 标准溶液进行方法稳定性测试。分别改变 6 个重要方法参数（流速、柱温、进样量、激发和发射波长、阶梯梯度和缓冲液浓度）并采集 7 次重复进样的数据。对最后 6 次重复进样所得的化合物峰面积进行比较分析。峰面积和保留时间的允许偏差分别设定为 ± 5% 和 ± 3%。

稳定性测试结果见表 5。红色数字表示结果超出了允许偏差。+2% 的流速变化量导致两种双酚的峰面积有所降低。特别是对于双酚 A，2.5% 柱温变化量使其峰面积出现负偏差。BPA 与杂质（见 RT 10.6，图 3）的分离度显示，升高温度时结果较差，而温度降低至 35 °C 时，结果得到改善。柱温为 40 °C 时，可较好地进行样品分析。稳定性结果表明在分析过程中保持柱温恒定非常重要。研究发现 FLD 激发波长为 230 nm 和发射波长为 316 nm 时较为理想，可获得最大的峰面积。设定发射波长为 316 nm 时，方法较稳定，因为 3 nm 的变化量不会使峰面积百分比偏离允许限度。但是，我们需要控制激发波长。缓冲液浓度的改变也很关键，10% 的偏差使 BPA 和 BPF 的峰面积均减少。稳定性结果表明，方法在正常使用时是稳定的。即使故意改变方法参数，也能最大程度地保持性能不受影响。当然，有些参数非常关键，必须仔细控制。

样品基质回收率

以不含 BPA 的奶瓶为空白基质。通过加标实验测定 BPA 和 BPF 的回收率，平行测试两次。将含 BPA (30 ng) 和 BPF (30 ng) 的低浓度标准溶液分别加入到 50 mL 不含 BPA 的奶瓶提取物中。将含 BPA (50 ng) 和 BPF (50 ng) 的另一份高浓度标准溶液分别加入到 50 mL 不含 BPA 的奶瓶水样提取物中。按照上文所述，从水样中提取分析物。使用水样线性曲线（见“线性”部分），将峰面积转化为浓度值。将测得的高浓度值和低浓度值与理论值相比较。回收率结果如表 6 所示。结果显示，BPA 回收率在高浓度下为 80%。该回收率高于 ASTM 方法中报告的结果，后者报告的单个实验室所得平均回收率为 70%。

化合物名称	低浓度回收率 (%)	高浓度回收率 (%)
双酚 F	70.2	75.9
	70.1	74.1
双酚 A	76.9	79.6
	75.1	81.1

表 6
平行两次的加标实验所得的回收率结果

参数	变化		BPF % 峰面积	BPF % 保留时间	BPA 与未知杂质的分离度	BPA % 峰面积	BPA % 保留时间
流速：0.9 mL/min ± 2%	高：	0.92 mL/min	-4.6	-1.2	1.9	-5.1	-1.2
	低：	0.88 mL/min	0.1	1.9	1.9	-1.9	2.2
TCC：40 °C ± 2.5%	高：	41 °C	-4.2	-0.4	1.7	-5.0	-0.6
	低：	39 °C	-3.1	0.9	2.1	-10.0	1.3
进样器：20 µL ± 5%	高：	21 µL	2.6	0.2	1.9	0.0	0.2
	低：	19 µL	-7.6	0.1	1.9	-9.8	0.1
波长：230–316 ±3 nm	233–316		-2.2	0.0	1.9	-5.7	0.0
	227–316		-7.0	0.2	1.9	-4.6	0.2
	230–319		-3.2	0.1	1.9	-4.5	0.1
	230–313		-3.5	0.1	1.9	-3.0	0.1
阶梯梯度起点：2 min ±10%	高：	2.2 min	-3.8	2.9	1.9	-4.1	2.0
	低：	1.8 min	-3.3	-2.4	1.9	-3.8	-1.5
缓冲溶液浓度：10 mM ±10%	高：	11 mM	-4.2	0.2	1.9	-6.0	0.2
	低：	9 mM	-5.9	0.1	1.8	-9.8	0.1

表 5
与标准方法对比时的方法可靠性测试结果，溶液浓度为 30 ng/mL。表格中的红色数值表示超出 5% 峰面积允许限度的偏差和超出 3% 保留时间允许限度的偏差

样品分析

使用萃取程序和开发的色谱方法测定奶瓶中 BPA 和 BPF 的含量。奶瓶标记为品牌 1、品牌 2 和品牌 3，平行分析测定 2 次。将分析结果与样品分析前所绘制的校准曲线相对比。空白水样经 SPE 处理后显示不含有 BPA，这表明实验中所用的塑料无 BPA 浸出[3]。在 3 个不同品牌的奶瓶中检出了不同含量的 BPA（见图 6A）。将标准溶液所得的 BPA 发射光谱图与样品的 BPA 光谱图叠加。由谱图可见，它们存在很好的重叠，从而确证了 BPA 的存在（见图 6B）。对不同品牌奶瓶的分析表明，高浓度为 4 ng/mL，低浓度为 0.5 ng/mL（见表 7）。这些结果与 Sun 等人以前研究的结果相一致，其结果为 0.6 ng/mL[5]。

如果体重 10 kg 的婴儿用品牌 2 奶瓶喝奶 250 mL，那么婴儿每天摄入的 BPA 数量为 0.1 µg/kg.bw。此数值低于 EPA 确定的参考剂量 50 µg/kg/day，但根据一些其它的研究[6]，这也是需要引起关注的。此外，结果还显示在所有奶瓶中均未检出 BPF。

化合物名称	BPF (ng/mL)	BPA (ng/mL)
品牌 1	0	0.76
	0	0.52
品牌 2	0	4.26
	0	4.46
品牌 3	0	2.08
	0	2.58

表 7
用 250 mL 水从不同品牌奶瓶中提取的 BPA 和 BPF 的浓度

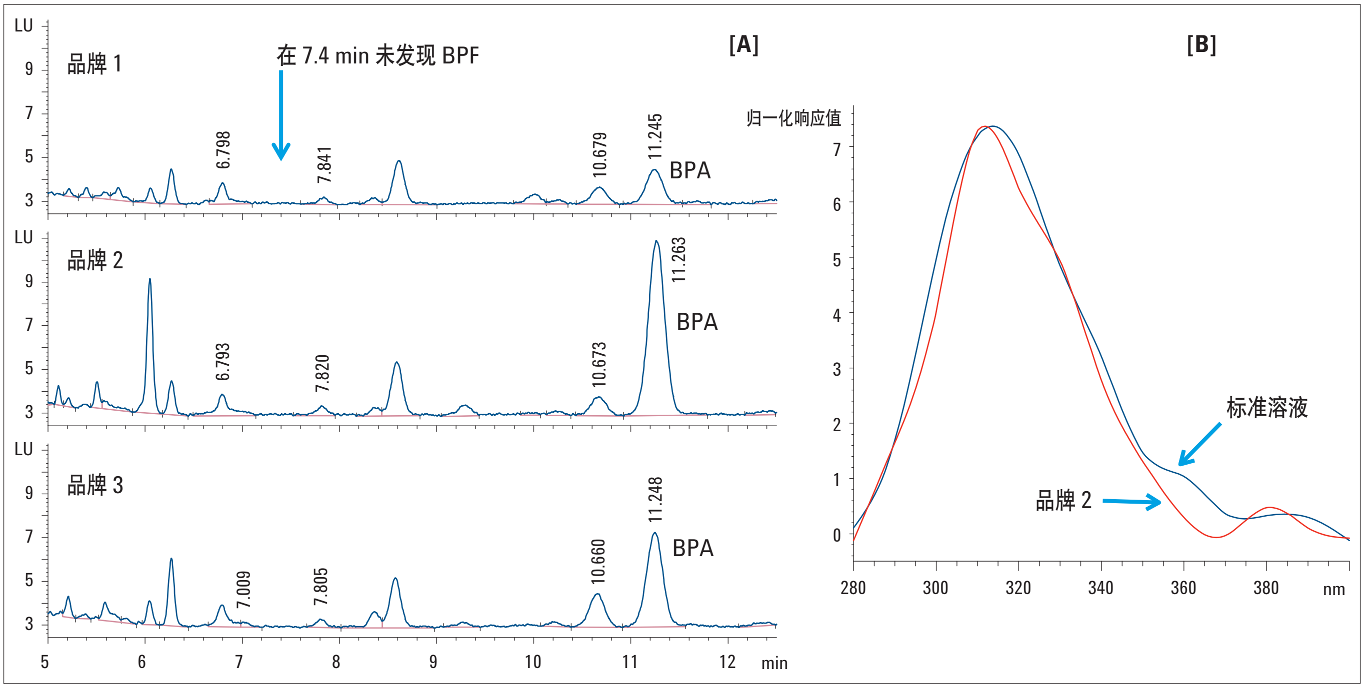


图 6
[A] 对 3 个不同品牌奶瓶进行 BPA 和 BPF 分析的叠加色谱图。[B] 标准溶液与从品牌 2 样品提取的 BPA 的叠加发射光谱图

UHPLC 方法

在 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统上将 HPLC 方法转化为 UHPLC 方法，并保持相同的运行时间，如图 7 所示。方法转化的目的是为了研究这两种方法对分离度和灵敏度的影响。UHPLC 方法采用相同的流动相、梯度和检测器设置。其所用色谱柱的尺寸也保持不变，但粒径从 5 µm 减小到 1.8 µm。由于 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的延迟体积较低，UHPLC 方法中色谱峰提前 1.2 min 洗脱出来。相比 HPLC 方法，UHPLC 方法所获得的色谱峰更窄，分离度更佳。在最低线性浓度 L1 和最高线性浓度 L7 下，比较所得色谱峰的特性（如峰面积、峰高、峰宽、分离度和 S/N），结果见表 8。结果显示，BPA 分离度从 HPLC 方法中的 1.9 增加到 UHPLC 方法中的 2.5。信噪比几乎翻倍，提高了灵敏度，因此重新定义了 LOQ 和 LOD。

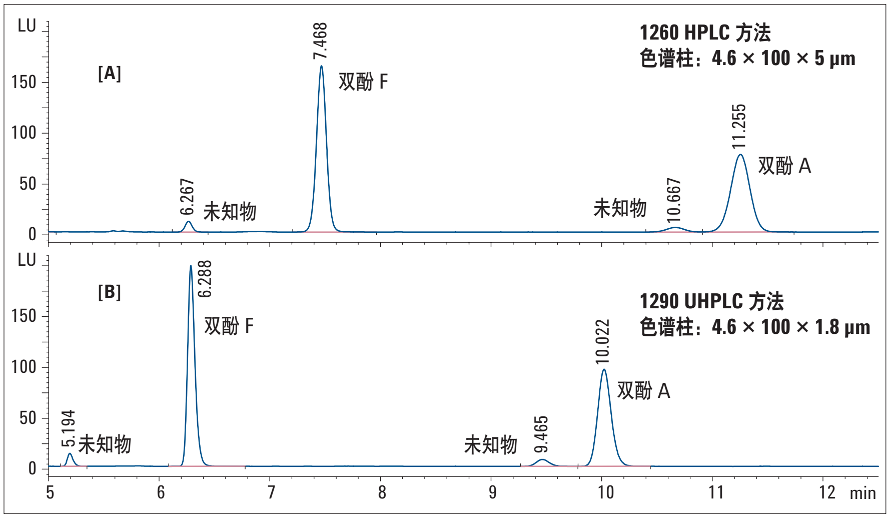


图 7

在 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×100 色谱柱上，使用 HPLC 方法 [A] 和 UHPLC 方法 [B] 分离浓度 7 的标准溶液 BPA 和 BPF 的叠加色谱图。HPLC 方法所用色谱柱粒径为 5 µm，UHPLC 方法为 1.8 µm

化合物名称（浓度）	HPLC 方法					UHPLC 方法				
	峰面积	半峰高处的峰宽	峰高	分离度	信噪比	峰面积	半峰高处的峰宽	峰高	分离度	信噪比
BPF (L7)	1037.0	0.10	163.7	-	3683.0	930.5	0.07	199.6	-	6784.8
BPA (L7)	934.1	0.19	76.3	1.9	1715.7	825.8	0.13	96.4	2.5	3276.7
BPF (L1)	7.5	0.10	1.1	-	27.4	7.2	0.07	1.4	-	42.6
BPA (L1)	8.1	0.20	0.6	1.8	15.1	9.4	0.14	1.0	2.5	31.6

表 8

对 HPLC 和 UHPLC 方法在第 1 线性浓度和最后线性浓度所得的峰面积、半峰高处的峰宽、峰高、分离度和信噪比进行比较。UHPLC 方法较 HPLC 方法具有更好的灵敏度和分离度

结果发现，使用相同校准浓度（见表 2）校准 BPA 和 BPF 时线性更出色，BPF 的 R^2 值为 0.99991，BPA 的 R^2 值为 0.99993。计算所有浓度下峰面积和 RT 的 RSD (%) 偏差。结果显示，在 UHPLC 方法中峰面积的偏差 RSD (%) 相对较低。如图 8 所示，浓度 1 的 BPA 的 RSD (%) 值为 3.0%。BPA 和 BPF 的保留时间的 RSD 最大值均小于 0.1%。

结论

使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱对双酚 A 和双酚 F 进行分离和定量。采用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备校准标准溶液。完成了方法开发并进行了部分验证。利用该方法定量测定了不同品牌奶瓶的双酚 A 和双酚 F，其回收率为 80%。该方法可应用于 BPA 和 BPF 的含量测定，从而对奶瓶进行质量控制。保持检测器和方法条件不变，将此方法转移至 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，可有效地执行分析。HPLC 和 UHPLC 方法均具有良好线性，并且所得结果的精密度高。与 HPLC 方法相比，UHPLC 方法显示了更出色的分离度和信噪比，更窄的峰宽，并且峰高也有所增加。

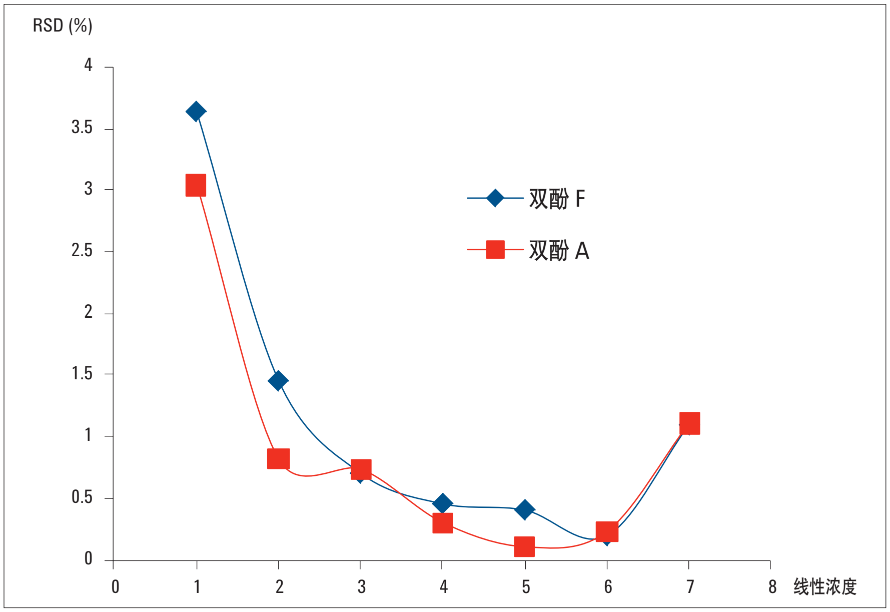


图 8
利用 UHPLC 测得的 BPF 和 BPA 的峰面积精密度，以 RSD (%) 表示。各浓度重复测定 6 次

参考文献

1. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Bisphenol A. (CASRN 80-05-7), http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm

2. A.Ballesteros-Gomez; S. Rubio; D.Perez-Bendito, "Analytical methods for the determination of bisphenol A in food," j. Chrom A, 1216: 449-469, **2009**

3. ASTM method,"Standard Test Method for Determination of Bisphenol A in Environmental Waters by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry," D7574-09

4. W.D. Snyder，"Agilent 7696A 样品制备工作台：如何通过连续稀释自动制备样品序列，进行火焰离子化检测器性能评价"，安捷伦应用简报，出版号 5990-6850CHCN，**2010**

5. Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, K. Nakashima, "High-Performance Liquid Chromatography with Peroxyoxalate Chemluminescence Detection of Bisphenol A Migrated from Polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride as a label," J.Chrom B, 749: 49-56, **2000**

6. S.K. Ritter, "Debating BPA's Toxicity. The Precautionary Principle Serves as a Dividing Line in Arguments Over the Safety of Bisphenol A," Chemical & Engineering News, 89: 14-19, **2011**

www.agilent.com/chem/lc

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 12 月 1 日，中国出版
出版号 5990-9398CHCN

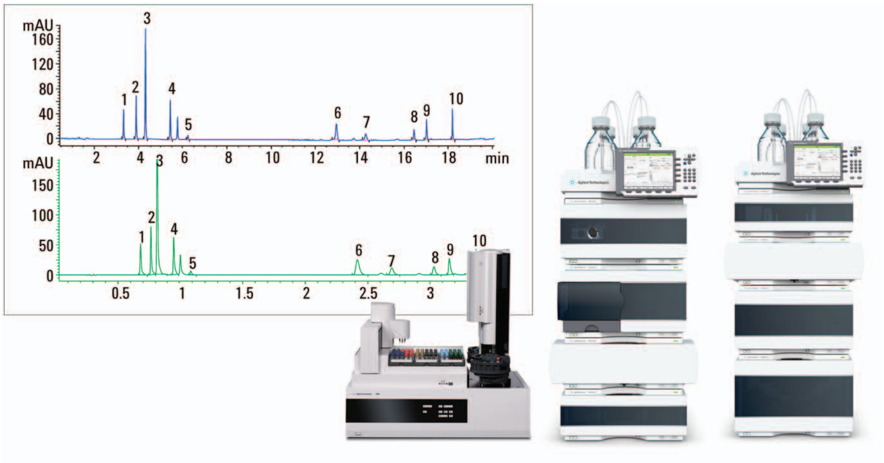
Agilent Technologies

安捷伦应用解决方案

糖果中色素添加剂的分析

应用简报

食品检验



作者

Siji Joseph,
安捷伦科技有限公司
印度班加罗尔

摘要

合成或人工色素在食品和饮料中作为添加剂，可以改善产品的外观。在本研究中，我们开发了一种稳定的反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 方法，实现了 10 种合成色素的同时测定。采用配有 Agilent Poroshell EC-C18 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统实现分离和定量分析。通过部分验证确定了方法的稳定性。通过分析糖果中的色素添加剂，证明了该方法定量分析食品基质中人工色素的适用性。最后，将 HPLC 方法有效转换为一个耗时短的超高压液相色谱 (UHPLC) 方法，采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，实现更快速的分析，且不损失分离度。采用 Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD)，可以选择不同的波长，实现在不同色素各自的最大吸收波长处进行定量测定。采用两种方法，分别确定了每种色素的检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、精密度、准确度和线性。在分析工作流程中采用 Agilent 7696A 样品制备工作台，帮助在 LOD、LOQ 和线性研究中进行样品前处理。

Agilent Technologies

前言

色素添加剂是指加入食品中使其带颜色的任何染料、色素或物质[1]。当前有主要来源于植物或动物的天然和合成色素添加剂。如：姜黄和藏红花。合成色素是化学合成的色素，如酒石黄和靛胭脂[2]。在食品中加入色素有许多原因。其中包括补偿因长期储存出现的褪色、纠正颜色的自然变化，以及使无色食品着色等。实际上，色素添加剂是市场上大多数包装食品不可避免的一类成分[1]。研究业已证明，人工色素暴露量超出每日摄入限量将会导致儿童产生多动症和其他不安行为[3]。美国食品药品监督管理局 (FDA) 已经制定了相关条例，旨在控制和确保食品中仅含有允许使用的色素添加剂。这就强调了使用精确的分析技术对色素进行鉴别和定量分析的重要性。

在本文中，我们采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱，开发了一个反相高压液相色谱方法。食品色素的水溶性使反相 HPLC 成为分析这些物质的理想技术。

方法

仪器与软件

Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统包括如下模块：

- Agilent 1260 Infinity 四元泵和真空脱气机 (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity 高效自动进样器 (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- 带最大光强流通池（60 mm 光程）(G4212-60007) 的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱，4.6 x 150 mm，2.7 µm (693975 902)

开发和运行 UHPLC 分析所使用的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统包括：

- 集成了真空脱气机 (G4220A) 和 100 µL Jet Weaver 混合器的 Agilent 1290 Infinity 二元泵
- Agilent 1290 Infinity 高效自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- 带最大光强流通池（1.0 µL 扩散体积，10 mm 光程）(G4212-60008) 的 Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱，内径 2.1 mm，柱长 75 mm，采用 2.7 µm 颗粒填充 (697775-902)

两套系统均采用安捷伦化学工作站（B.04.02 版）进行控制。

系列线性浓度稀释样品采用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备。

试剂与材料

所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水使用 Milli Q 水纯化系统（Millipore Elix 10 型，美国）制备。甲醇为超梯度级，购自 Lab-Scan 公司（泰国曼谷）。磷酸氢二钠和正磷酸购自 Fluka 公司（德国）。二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Qualigens 公司（印度）。酒石黄、苋菜红、靛胭脂、胭脂红 4R、日落黄 FCF、红色酸性染料、固绿 FCF、酸性蓝/亮蓝、胭脂红 3R，以及赤藓红 B 标准品购自 Aldrich 公司（印度）。用于回收率和定量分析的糖果购自本地。

色谱参数

反相液相色谱和 UHPLC 中使用的色谱参数见表 1。

色素标准溶液

称取各标准品约 20 mg，分置于 10 mL 容量瓶中，分别制备酒石黄、苋菜红、靛胭脂、胭脂红 4R、日落黄 FCF、红色酸性染料、固绿 FCF、酸性蓝/亮蓝、胭脂红 3R，以及赤藓红 B 的标准储备液。于每个容量瓶中加入 300 µL DMSO，将流动相 A 和 B 按照 80:20 的比例预混合的溶液作为稀释剂。需要时超声处理。

混合标准溶液和线性浓度

精确量取各标准溶液约 100 µL 并混合，加入稀释剂至 2000 µL，得到每种色素浓度均为 200 ppm 的色素标准混合溶液。使用 Agilent 7696A 样品制备工作台连续稀释该 200 ppm 标准混合溶液，制备系列线性浓度的标准溶液。线性标准溶液的浓度范围为 0.01 ng/µL – 200 ng/µL（10 个浓度水平及各重复 6 次）。

参数	Agilent 1260 Infinity 四元液相色谱系统	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18， 4.6 x 150 mm，2.7 µm （部件号 N693975-902）	Agilent Poroshell 120 EC-C18， 2.1 x 75 mm，2.7 µm （部件号 697775-902）
柱温箱	45 °C	45 °C
进样量	5 µL（洗针进样，针冲洗口启动 5 秒）	1 µL（洗针进样，针冲洗口启动 5 秒）
样品恒温箱	5 °C	5 °C
流动相 A	10 mM Na_2HPO_4，pH 7	10 mM Na_2HPO_4，pH 7
流动相 B	甲醇	甲醇
梯度程序	0 min：5% B	0 min：5% B
	4 min：30% B	0.15 min：5% B
	10 min：40% B	0.5 min：30% B
	14 min：40% B	2.3 min：40% B
	18 min：95% B	2.6 min：40% B
	22 min：95% B	3.25 min：95% B
	22.1 min：5% B	4.00 min：95% B
		4.01 min：5% B
后运行时间	5 min	1 min
流速	1.2 mL/min	0.7 mL/min
流通池	60 mm 光程（部件号 G4212-60007）	10 mm 光程（部件号 G4212-60008）
数据采集	288 nm：靛胭脂	288 nm：靛胭脂
	428 nm：酒石黄	428 nm：酒石黄
	484 nm：日落黄 FCF	484 nm：日落黄 FCF
	511 nm：胭脂红 4R 和胭脂红 3R	511 nm：胭脂红 4R 和胭脂红 3R
	520 nm：苋菜红和红色酸性染料	520 nm：苋菜红和红色酸性染料
	530 nm：赤藓红 B	530 nm：赤藓红 B
	626 nm：固绿 FCF 和酸性蓝	626 nm：固绿 FCF 和酸性蓝
采集速率	20 Hz，0.013 min 峰宽 （0.25 s 响应时间）	80 Hz，0.003 min 峰宽 （0.062 s 响应时间）

表 1

Agilent 1260 Infinity 系统和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统使用的色谱参数

用于色素定量分析和回收率研究的样品前处理

使用不同类型的样品（即包含不同色素的糖果）进行色素定量分析和回收率研究。依次向 2 g 糖果中加入 400 µL DMSO 和 20 mL 稀释剂，提取其中的色素，过程非常简单。超声处理并采用带有 C0650 转子的 Beckman Coulter Allegra X22R 离心系统，以 8300 rcf 的离心力离心 10 min 后，溶液通过 0.25 µm PTFE Agilent Econofilter 注射式过滤器滤膜过滤，滤液待分析。使用加标和不加标的糖果样品进行回收率研究。样品加标采用柱上浓度为 25 ng 的标准混合溶液。提取过程如前所述。

预防措施

为了延长化合物在溶液中的稳定性，不使用时，所有制备的溶液用铝箔包裹，并于冰箱暗处 4 °C 贮存。分析期间，可恒温的自动进样器样品盘保持在 5 °C。

步骤

表 2 所示的系列浓度校准溶液是采用稀释剂系列稀释 200 ng/µL 标准混合溶液而得。在两个系列溶液的配制中，采用带 500 µL 注射器的 Agilent 7696A 样品制备工作台来配制线性浓度的溶液。在第一序列，向每个样品瓶中加入一定量的稀释剂；在第二序列，将 250 µL 200 ng/µL 的溶液加入样品瓶并涡旋 15 s。注意,除了分别运行这两个序列外，这些步骤也可以在一个方法中编程并在一个序列中运行。取上一个浓度的溶液 250/100 µL 置于下一个浓度的样品瓶中进行系列稀释。Agilent 7696A 样品制备工作台设置的注射器参数见表 3。Agilent 7696A 样品制备工作台[4] 的设置在安捷伦应用简报（出版号 5990 6850CHCN）中有详细描述。

进样分析 5 µL 含有 DMSO 的稀释液作为空白，然后依次进样分析系列浓度的各校准溶液，每个浓度平行分析 6 次。用每个浓度的峰面积和保留时间 (RT) 数据来计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD) 值。并以较低线性浓度溶液的进样分析确定 LOD 和 LOQ。以各色素每个线性浓度峰面积的平均值对其相应浓度作图，构建线性曲线。

初始浓度 (ppm 或 ng/µL)	吸取体积 (µL) (第二序列)	制备的稀释剂 (µL) (第一序列)	总体积 (µL)	所得溶液的浓度 (ng/µL)	5 µL 进样量时的柱上量 (ng)	浓度编号
200	250	250	500	100	500	10
100	100	400	500	20	100	9
20	250	250	500	10	50	8
10	100	400	500	2	10	7
2	250	250	500	1	5	6
1	100	400	500	0.2	1	5
0.2	250	250	500	0.1	0.5	4
0.1	100	400	500	0.02	0.1	3
0.02	250	250	500	0.01	0.05	2
0.01	100	400	500	0.002	0.01	1

表 2

制备系列浓度校准溶液的稀释详情

参数	溶剂预清洗 1	分液冲洗	分液泵	分液设置
泵送或清洗次数	1	1	2	
冲洗体积 (µL)	250	250	50	
抽吸速度 (µL/min)	500	500	500	500
分液速度 (µL/min)	2500	2500	2500	2500
针取样深度偏移量 (mm)	-1	-1	-1	-1
黏性延迟 (s)	1	1	1	1
转动架上的溶剂	A			
气隙 (% 注射器体积)	0			0

表 3

Agilent 7696A 样品制备工作台注射器参数

通过改变 6 个关键的方法参数来评估方法的稳定性。平行 6 次进样分析含每种色素各约 30 ng（柱上量）的标准混合溶液，利用获得的数据来研究方法的稳定性。分别进样分析 2 g 糖果中加标 25 ng 色素添加剂标准品和不加标的样品溶液，来研究方法的回收率。利用所有 10 种色素标准品的特征图谱建立其 UV 谱库。连同保留时间，该谱库可用来鉴定糖果中的色素添加剂。

该方法可有效转换到 UHPLC。评价了每种色素的 LOD、LOQ 和线性，方法精密度通过峰面积和 RT 的 RSD 来确定。同时还绘制了所有色素使用 UHPLC 方法的线性曲线。UHPLC 方法可使分析更快速，并且不损失分离度。

结果与讨论

分离与检测

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18（150 mm x 4.6 mm，2.7 µm）色谱柱，这 10 种色素在 20 min 内实现了良好分离。不同的色素具有不同的最大吸收波长。这 10 种色素的色谱流出曲线见图 1，色素列表及其各自的最大吸收波长见表 4。我们使用化学工作站软件中的峰纯度功能检查各色谱峰的纯度，从而评价了方法的专属性。通过对精密度、线性范围、准确度、专属性、回收率和稳定性进行研究来验证本方法。

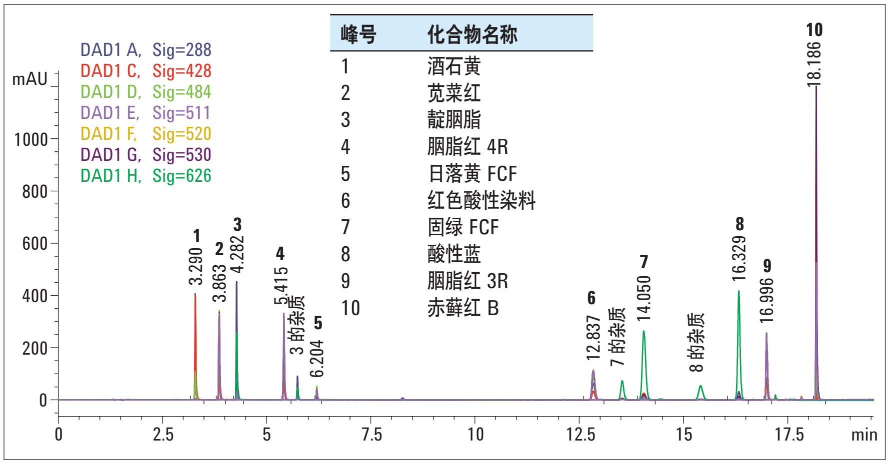


图 1

使用 15 cm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分离 10 种色素。谱图是在 7 个不同波长下分析叠加生成

SI 编号	化合物名称	分子式	分子量	保留时间	最大吸收波长
1	酒石黄	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	534.36	3.29	428
2	苋菜红	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604.47	3.86	522
3	靛胭脂（靛蓝）	$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$	466.35	4.28（杂质 5.74）	288 和 612
4	胭脂红 4R（胭脂红 SX）	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	604.47	5.41	510
5	日落黄 FCF	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	452.37	6.20	482
6	红色酸性染料	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	502.43	12.83	518
7	固绿 FCF	$C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$	808.85	14.04（杂质 13.52）	622
8	酸性蓝/亮蓝	$C_{37}H_{34}Na_2N_2O_9S_3$	792.85	16.32（杂质 15.40）	628
9	胭脂红 3R	$C_{19}H_{16}N_2Na_2O_7S$	494.45	16.99	512
10	赤藓红 B	$C_{20}H_8I_4O_5$	835.89	18.18	530

表 4

色素列表及每种色素的最大吸收波长

检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ)

信噪比 (S/N) > 3 时的分析物浓度定义为 LOD，S/N > 10 时的分析物浓度定义为 LOQ。测得的每种色素的 LOD 和 LOQ 值见表 5。作为一个实例，图 2 展示了胭脂红 4R LOQ 浓度（柱上量 0.1 ng）时与空白的叠加色谱图。

线性

所有制备的线性浓度溶液平行进样分析 6 次，利用峰面积响应及其相应的浓度值来构建每种色素从 LOQ 浓度到最高浓度的线性曲线。获得的所有色素的相关系数见表 5。

峰号	化合物名称	LOD (ng)	LOQ (ng)	总浓度水平数 (n=6)	柱上量线性范围 (ng)	线性方程	R^2 值
1	酒石黄	0.05	0.1	8	0.1 - 100	y = 15.477x - 5.7137	0.9993
2	苋菜红	0.1	0.25	7	0.25 - 100	y = 12.686x - 5.8682	0.9993
3	靛胭脂	0.05	0.1	8	0.1 - 100	y = 16.723x - 5.9163	0.9993
4	胭脂红 4R	0.05	0.1	8	0.1 - 100	y = 13.168x - 5.0258	0.9993
5	日落黄 FCF	0.25	0.5	8	0.5 - 1000	y = 1.8621x + 7.2227	0.9992
6	红色酸性染料	0.25	0.5	8	0.5 - 1000	y = 10.018x + 41.05	0.9993
7	固绿 FCF	0.1	0.25	7	0.25 - 100	y = 31.981x - 14.22	0.9993
8	酸性蓝	0.05	0.1	8	0.1 - 100	y = 36.351x - 12.193	0.9994
9	胭脂红 3R	0.1	0.25	9	0.25 - 1000	y = 11.324x + 39.972	0.9992
10	赤藓红 B	0.05	0.1	8	0.1 - 100	y = 40.628x - 10.168	0.9997

表 5

所有 10 种色素的 LOD、LOQ 和线性结果。通过进样 2.5 µL 0.1 ng/µL 的标准溶液得到柱上量 0.25 ng 的浓度

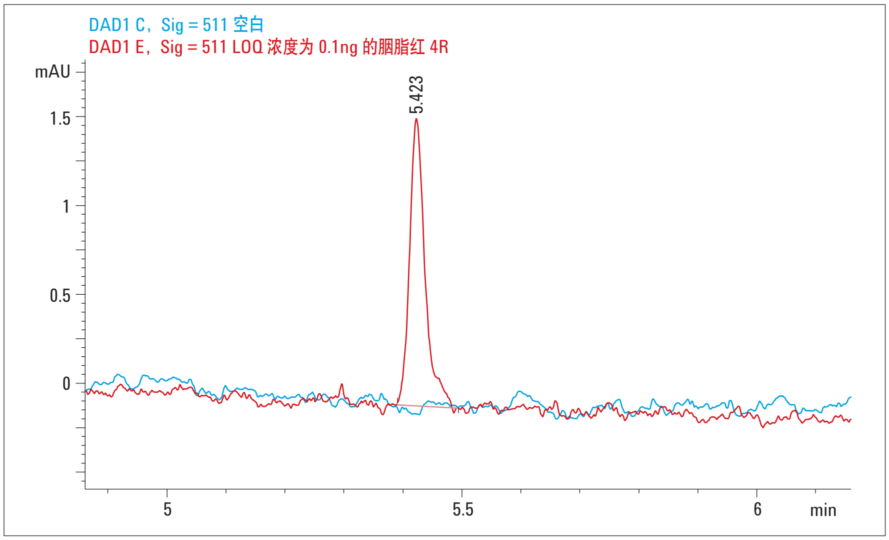


图 2

LOQ (0.1 ng) 浓度下胭脂红 4R 与空白的叠加色谱图

保留时间和峰面积的精密度

为了确定方法的精密度，计算了所有 10 种色素在 1、10 和 100 ng（柱上量）浓度时，保留时间 (RT) 和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 值。最高的峰面积 RSD 值是 1.19%（1 ng 浓度的红色酸性染料），RT 的 RSD 是 0.09%（10 ng 浓度的酒石黄）。10 种色素的峰面积 RSD 值图示见图 3，RT 的 RSD 值图示见图 4。

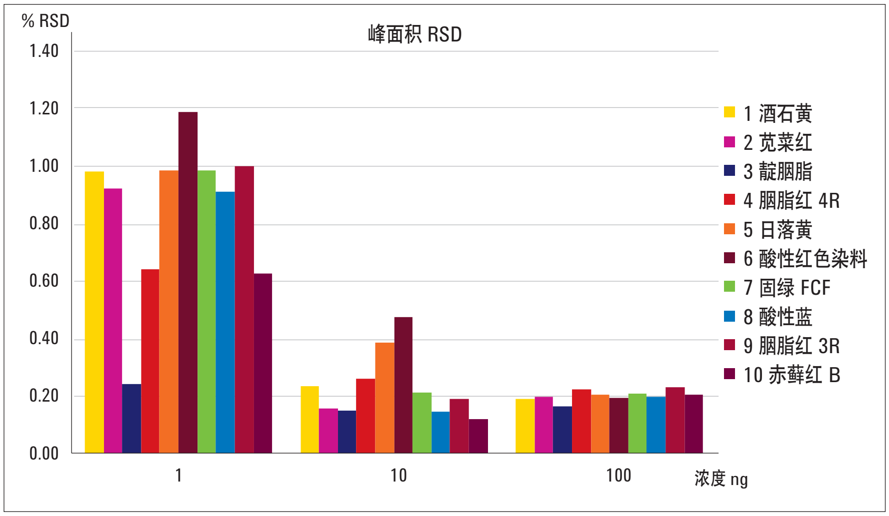


图 3

所有色素在 1 ng、10 ng 和 100 ng（柱上量）浓度时优异的峰面积 RSD 值

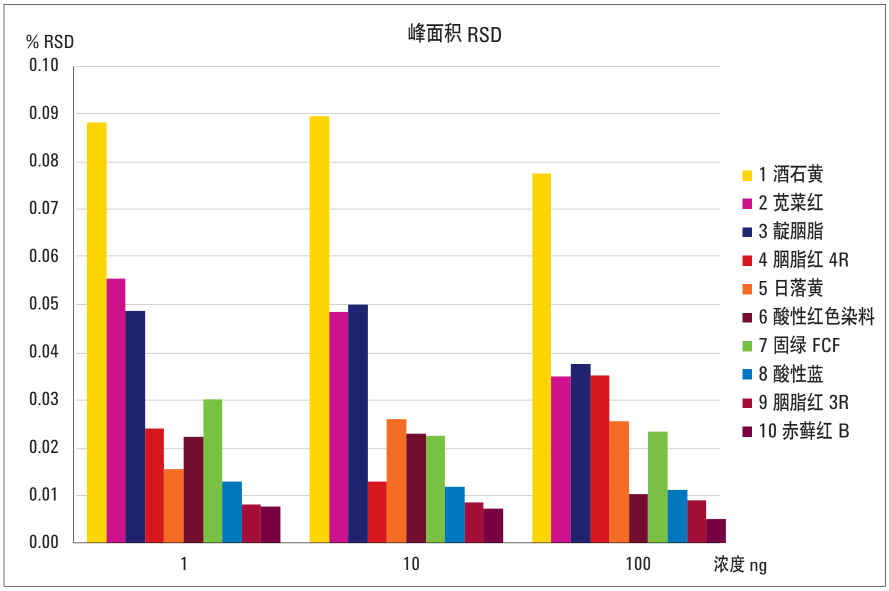


图 4

所有色素在 1 ng、10 ng 和 100 ng（柱上量）浓度时优异的 RT RSD 值

稳定性

通过有意改变 6 个关键的方法参数来评价方法的稳定性。计算了所得峰面积和保留时间的偏差，并与原始方法的结果进行比较。平行 6 次进样测定了色素标准品的加标混合溶液。保留时间和峰面积的允许偏差分别设定为 ± 3% 和 ± 5%。本研究中使用的稳定性测试条件见表 6，稳定性研究的结果见图 5 和 6。

SI 编号	参数（实际值）	测量偏差	修改值
1	流速 (1.2)	2%	1.224 mL/min 1.176 mL/min
2	进样量 (5 µL)	2%	5.1 µL 4.9 µL
3	波长（288、428、484、511、520、530、626 nm）	(±) 3 nm	波长（291、431、487、514、523、533、629 nm） 波长（285、425、481、508、517、527、623 nm）
4	Ph (7.0)	(±) 0.15	10 mm 缓冲液 pH 7.15 10 mM 缓冲液 pH 6.85
5	柱温 (45 °C)	(±) 2 °C	47 °C 43 °C
6	梯度陡度（6.25，4 min 内 5 – 30，13.75，4 min 内 40 – 95）	~10%	6.75，4 min 内 5 – 32；14.25，4 min 内 38 – 95； 5.75，4 min 内 5 – 28；13.25，4 min 内 42 - 95

表 6

本研究使用的稳定性测试条件

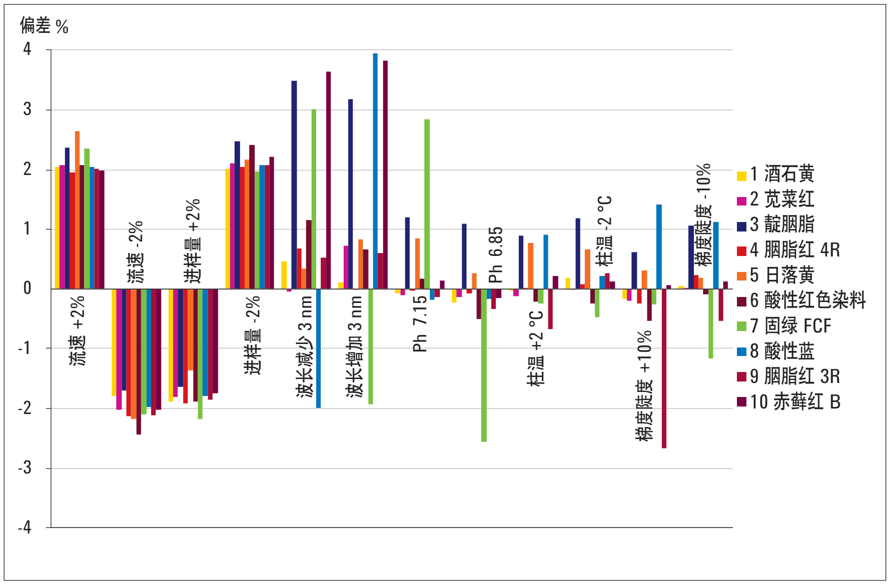


图 5

采用峰面积计算的稳定性测试结果汇总

对于所有改变的参数，所有 10 种色素峰面积的偏差均在允许的限度内。另外，在该稳定性研究中改变流速、进样量和流动性的 pH 值时，其偏差也在允许的限度内。但是，提高柱温后，有两种化合物的 RT 偏差超出了允许的限度。当柱温降低时，有三个化合物的 RT 偏差超出了允许的限度。对保留时间有很大影响的一个关键参数是梯度斜率。当梯度斜率变化 ±10% 时，我们观察到超过 5 种化合物的 RT 偏差超过了允许的限度。稳定性结果表明，该方法正常使用时是可靠的，刻意改变参数在很大程度上不会对方法性能产生影响。

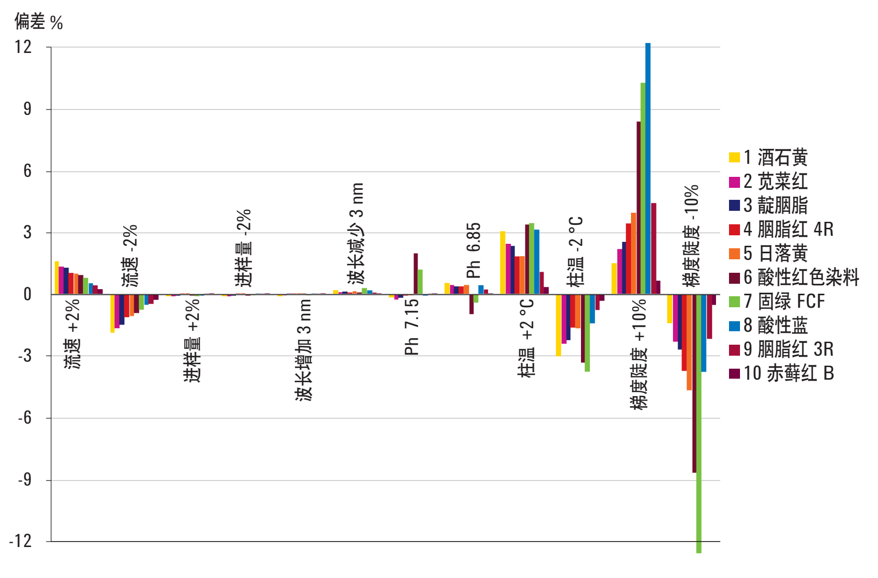


图 6

采用保留时间计算的稳定性测试结果汇总

糖果中色素的回收率

采用标准添加法[5] 进行 5 种不同颜色糖果中多种色素的回收率分析。分析中采用所有 10 种色素柱上量均为 25 ng 的标准混合溶液。对加标样品、未加标样品和标准品色谱图上各色素的峰面积分别进行计算。加标与未加标样品间检测器响应的差值与标准品色谱图的响应进行比较，即得回收率，用百分数表示。糖果中所有色素的回收率均大于 98%。加标或未加标红色糖果提取样品，以及标准混合溶液的色谱图见图 7。

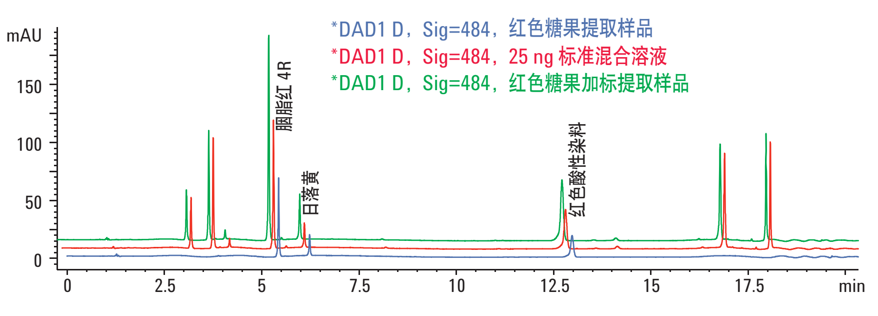


图 7

加标、未加标红色糖果提取样品以及标准混合溶液的叠加色谱图

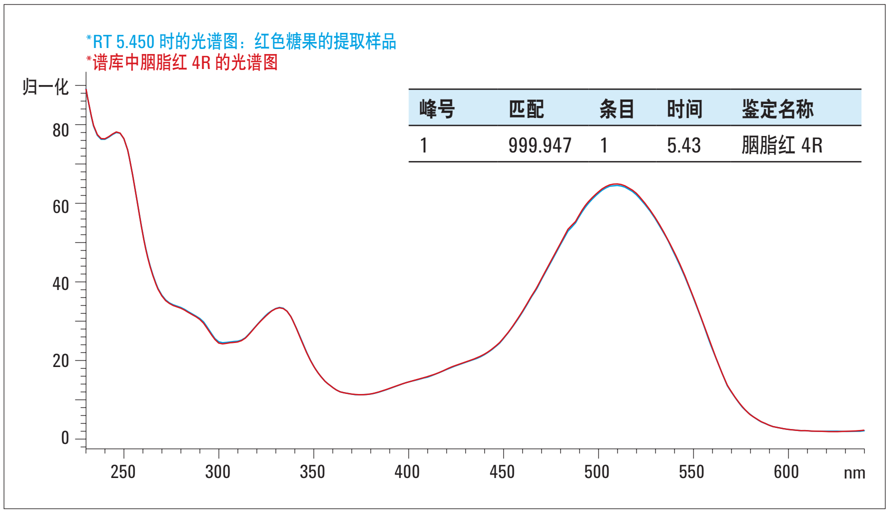
糖果中色素添加剂的定量分析

采用峰面积响应，我们测定了不同颜色糖果中的色素。通过得自线性曲线的线性方程进行浓度计算。另外，我们通过在自己创建的 UV 谱库中进行光谱匹配来鉴定化合物。分别计算出 1 g 5 种不同糖果中色素的含量，见表 7。红色糖果中，胭脂红 4R 色谱峰与谱库光谱的匹配情况见图 8。

样品号	糖果的颜色	成分	测得量 (µg/g)
糖果_1	蓝色	酸性蓝	44.7
糖果_2	黄色	酒石黄	61.7
糖果_3	绿色	酒石黄	52.5
		酸性蓝	10.9
糖果_4	橙色	酒石黄	24.8
		胭脂红 4R	26.9
		日落黄 FCF	43.3
糖果_5	红色	胭脂红 4R	27.5
		日落黄 FCF	38.3
		红色酸性染料	20.6

表 7

计算的 1 g 糖果中色素的含量



峰号	匹配	条目	时间	鉴定名称
1	999.947	1	5.43	胭脂红 4R

图 8

红色糖果中胭脂红 4R 色谱峰与谱库光谱的谱图匹配

UHPLC 方法

我们采用二极管阵列检测器，开发了一种分离 10 种色素的 UHPLC 方法。与需要 21 min 才能完成的 HPLC 梯度洗脱相比，UHPLC 方法拥有优异的分离度，并且可节省大约 81% 的分析时间，以及 89% 的溶剂（图 9）。固绿 FCF 峰及其杂质峰（13.526 分钟的峰）之间的分离度是 HPLC 方法中所有峰里最低的，因此，我们在很短的运行时间内，通过监控 UHPLC 结果中的该分离度来评价色谱峰的整体分离度。使用 HPLC 方法，该分离度为 3.71，而使用耗时短的 UHPLC 方法，该值大于 1.8。测得的 UHPLC 方法的 LOD、LOQ 和线性结果见表 8。为了评价方法的精密度，计算了柱上量为 10 ng 浓度样品的 RT 和峰面积的 RSD 值。对于日落黄，最高的峰面积 RSD 是 0.84%，RT 的 RSD 是 0.04%。结果见图 10。所得峰面积和 RT 的低 RSD 值证实了该方法的精密度良好。这些结果也证明了所开发 UHPLC 方法的可靠性。使用该方法有望实现糖果样品中色素的快速定量分析。

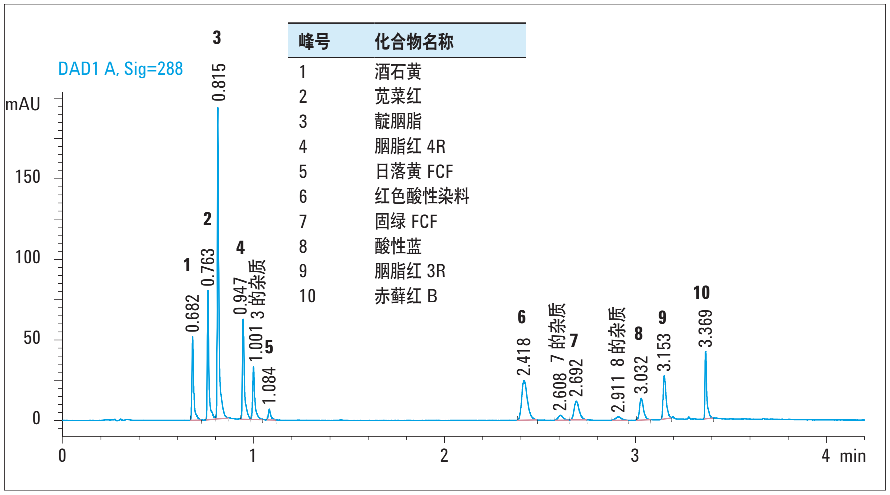


图 9

通过采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的 UHPLC 方法分离 10 种色素

峰号	化合物名称	LOD (ng)	LOQ (ng)	总浓度水平数 (n=6)	柱上量线性范围 (ng)	线性方程	R^2 值
1	酒石黄	0.05	0.1	9	0.1 - 200	y = 4.6746x + 2.5573	0.9998
2	苋菜红	0.1	0.25	8	0.25 - 200	y = 3.7682x + 0.585	0.9996
3	靛胭脂	0.05	0.1	9	0.1 - 200	y = 4.3278x + 3.0266	0.9998
4	胭脂红 4R	0.1	0.25	8	0.25 - 200	y = 3.9616x + 1.4427	0.9997
5	日落黄 FCF	0.5	1	6	1 - 200	y = 0.6479x + 0.8958	0.9993
6	红色酸性染料	0.25	1	6	1 - 200	y = 3.8231x + 0.5447	0.9996
7	固绿 FCF	0.1	0.25	8	0.25 - 100	y = 9.008x + 3.0979	0.9998
8	酸性蓝	0.1	0.25	8	0.25 - 100	y = 10.083x + 14.681	0.9991
9	胭脂红 3R	0.1	0.25	8	0.25 - 200	y = 4.1461x + 0.4156	0.9995
10	赤藓红 B	0.05	0.1	9	0.1 - 100	y = 11.354x + 11.912	0.9996

表 8

采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的 UHPLC 方法的 LOD 和 LOQ 值

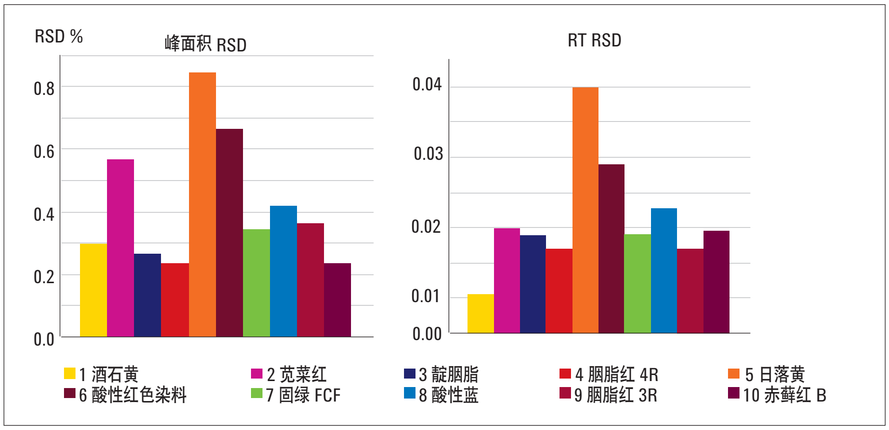


图 10

在柱上量 10 ng 浓度水平，所有 10 种色素 UHPLC 结果的峰面积和 RT RSD 值。进样量为 1 µL（重复 6 次）

结论

使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分离和定量分析了 10 种色素。采用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统，我们开发了一种稳定的、20 min 内可以完成的 HPLC 梯度洗脱方法。对方法进行了部分验证，论证了其定量分析多种色素的适用性，如酒石黄、苋菜红、靛胭脂、胭脂红 4R、日落黄 FCF、红色酸性染料、固绿 FCF、酸性蓝/亮蓝、胭脂红 3R，以及赤藓红 B。方法简便快速、专属性强、灵敏度高，还具有良好的精密度、线性和回收率。所建立方法可有效用于 5 种不同颜色糖果基质中多种色素的定量分析。随后，该方法被转换为一个耗时短的，仅需要 4 min 即可完成的 UHPLC 方法，使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，可节省大约 81% 的分析时间和 89% 的溶剂。使用 Agilent 1260 和 1290 Infinity 液相色谱系统的这些方法可用于色素的常规准确分析。Agilent 7696A 样品制备工作台的使用大大简化了线性研究中的样品前处理。优异的线性结果证实了 Agilent 7696A 样品制备工作台不仅能够提供非常精确的结果，而且还能减少操作误差。

参考文献

1.
U.S. Food and Drug Administration. Food Ingredients and Colors, International Food Information Council (IFIC). November 2004; revised April **2010**.

2.
The role of natural color additives in food allergy. Christine d. Lucas, john b. Hallagan, International Association of Color Manufacturers, 1620 I Street, NW, Suite 925, Washington DC, USA, **2006**.

3.
Smart GuideTo Food Dyes: Buying foods that can help learning. David Wallinga, M.D., Director of the Institute for Agriculture and Trade Policy's Food and Health Program, with the assistance of Robin Schow, **2009**.

4.
W.D. Snyder，“Agilent 7696A 样品制备工作台：如何通过连续稀释自动制备样品序列，进行火焰离子化检测器性能评价”，安捷伦应用简报，出版号 5990-6850CHCN，
2010.

5.
Duncan Thorburn Burns, Klaus Danzer, and Alan Townshend, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 11, pp. 2201–2205, **2002**.

www.agilent.com/chem/cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 1 月 1 日，中国印刷
5990-9525CHCN

Agilent Technologies

通过自动样品制备测定三文鱼油中的脂肪酸甲酯（FAMEs）

应用报告

区域

作者

Norbert Helle and Monika Bzduch,
TeLA GmbH Bremerhaven
Rebecca Veeneman,
Agilent Technologies, Inc.

前言

本文中使用安捷伦 7696A 样品制备工作台对脂肪酸（FAs）进行自动衍生化处理。由于游离脂肪酸在气相色谱上易产生拖尾，通常将脂肪酸转换成脂肪酸甲酯（FAMEs）的形式进行测定。人工样品衍生化既费时重复性又差。而自动衍生化操作不仅节约了大量时间，而且极大地提高了结果的重复性。尤其对某些高度不饱和脂肪酸，人工衍生化过程中，反应温度和时间的微小变化都会对重复性产生负面影响。

三文鱼油是一种生产多不饱和 Ω-3 脂肪酸的优质原料。其中两种主要的脂肪酸-廿碳五烯酸（EPA）和二十二碳六烯酸（DHA）已经被确认是影响健康的重要因素，其与心脏的正常功能密切相关。EPA 和 DHA 的浓度是三文鱼油胶囊质量好坏的关键性指标。本应用重点阐述了使用安捷伦 7696A 样品制备平台对三文鱼油胶囊中的 EPA 和 DHA 进行衍生化和测定。

Agilent Technologies

材料和方法

在 2 mL 自动样品瓶中称量 10 mg 三文鱼油用于样品制备。用 500 µL 甲基叔丁基醚（TBME）稀释样品，采用安捷伦 7696A 样品制备工作台的液体配制模块，在工作台的涡旋混合器上将样品混和 90 s。将 250 µL 混匀的样品转移至另一空的样品瓶中，加入 125 µL 三甲基氢氧化硫（TMSH）衍生化溶液 [MachereyNagel，Düren]，再将此样品瓶在工作台的涡旋混合器上混匀。将混合液在单瓶位加热器上 80 °C 加热 5 min。安捷伦 7696A 样品制备工作台的自动化操作流程图见图 1。

文中使用的气相色谱条件如表 1 所示。

表1　　GC/FID 工作条件

色谱峰

C14:0	肉豆蔻酸
C16:0	棕榈酸
C16:1	棕榈油酸
C18:0	十八烷酸
C18:1	油酸
C18:2	亚油酸
C20:0	花生酸
C18:3	γ-亚麻酸
C20:1	顺9-二十碳烯酸
C18:3	亚麻酸
C22:1	芥酸
C20:4	花生四烯酸
C20:5	廿碳五烯酸
C24:1	神经酸
C22:6	二十二碳六烯酸

GC 色谱条件

仪器	安捷伦 6890 系列 GC
色谱柱	HP 88，100 m × 250 µm，0.20 µm
进样体积	2 µL
进样口	分流/不分流，分流比 50:1
载气	H_2
柱箱温度	70 °C–260 °C
载气流速	1.4 mL/min
检测器	250 °C，FID
	H_2：40 mL/min
	空气：450 mL/min
	补偿气流，N_2：45 mL/min

安捷伦工作台操作程序

向样品中加入 500 µL TBME

↓

混匀样品：3000 rpm，3 圈，双向，25 s

↓

静置 15 s

↓

将 250 µL 混匀的样品转移至另一空样品瓶中

↓

向其中加入 125 µL TMSH

↓

混匀该样品： 3000 rpm，3 圈，双向

↓

80°C 下加热样品瓶 5 min

↓

标记此样品瓶为“结果”

图 1　　安捷伦 7696A 样品制备工作台制备样品的流程图

结果和讨论

图 2 为 7696A 自动化制备三文鱼油样品后分析得到的 FAMEs 分离谱图。该谱图的分离度可明确识别出所有 FAMEs。最受关注的两种主要脂肪酸的保留时间分别为 35.07 min（EPA）和 40.55 min（DHA）。除了含有 23.7% EPA 和 20.0% DHA 外，三文鱼油中还含有不饱和脂肪酸油（12%），亚油酸（11%）和棕榈油酸（8%），饱和脂肪酸的含量相对较低，棕榈酸和硬脂酸的含量分别为 4% 和 5%。

重复性检验：将 10 个独立的三文鱼油样品分别进行衍生化和测定，以验证自动样品制备和色谱分析的重复性。正如图 3 所示，均获得了良好的重复性结果。

EPA 和 DHA 几次测定的绝对峰面积的标准偏差均小于 1%（EPA 0.51%，DHA 0.78%）。此外，EPA 和 DHA 的相对浓度差别比较恒定，得到相对标准偏差分别为 EPA，0.85% 和 DHA，1.22%。10 个样品中均未测定到离群值。

使用安捷伦 7696A 样品制备工作台制备样品的总过程仅耗时 20 min，而人工衍生化过程根据实验室工作人员的熟练程度不同最长可达 2 个小时。

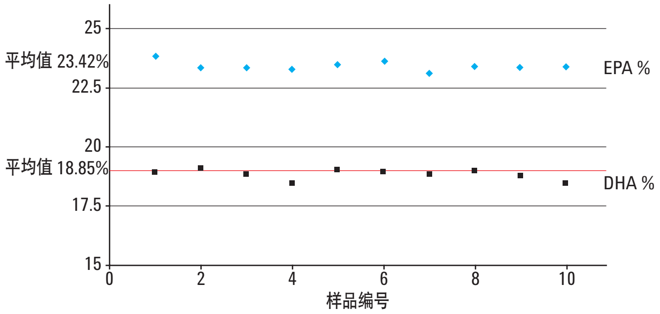


图 3　　三文鱼油中 FAME 自动化测定的重复性数据

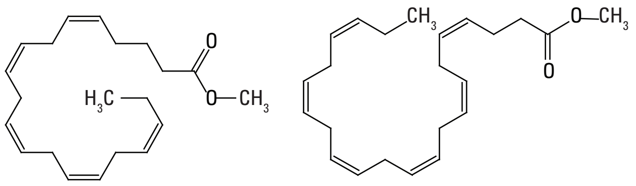


图 4　　EPA 甲酯（左）和 DHA 甲酯（右）的结构图

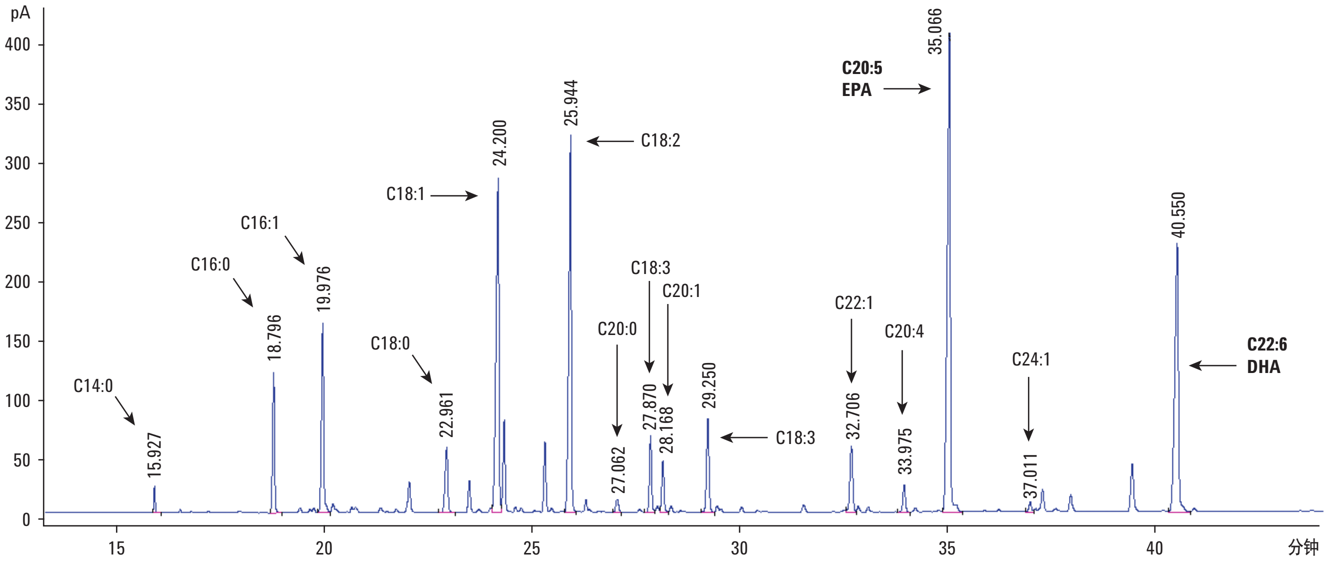


图 2　　使用安捷伦 7696A 工作台制备三文鱼油样品后经 GC/FID 检测得到的色谱图

表 2　　三文鱼油样品脂肪酸的构成

C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C18:3	C20:1	C18:3	C22:1	C20:4	C20:5	C24:1	C22:6
0.71	4.68	7.95	3.54	12.95	13.86	0.36	2.61	1.71	3.33	3.35	0.87	23.79	0.36	19.93

结论

自动化样品衍生是一种简便、快速并可靠的处理方法。尤其对那些多不饱和脂肪酸含量较高的样品，自动样品制备比人工样品制备更加可靠。

参考文献

1. Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) (ISO 12966-3:2009)

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦科技公司对本资料中所包含的错误，以及由于使用本资料所引起的相关损失不承担责任。

本书中的信息、说明和性能指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司

2012 年 1 月 30 日，中国印刷
5990-9799CHCN

Agilent Technologies

使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪定量分析*甜菊叶子*中的甜菊糖和甜叶菊甙 A

应用简报

食品检测与农业

作者

Srividya Kailasam
安捷伦科技有限公司
印度班加罗尔

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪对*甜菊叶*提取物中的甜菊糖和甜叶菊甙 A 进行定量分析。研究表明，Agilent ZORBAX 糖分析柱最适用于这两种目标物的分离。通过验证几个重要参数的稳定性后确定了线性动态范围。使用 Agilent 7696A 样品制备工作台进行校准溶液的制备。两种分析物在 1-1000 µg/mL 浓度范围之内线性良好，R^2 值大于 0.9999。测定两种化合物的 LOD 和 LOQ 均为 1.0 µg/mL。加标样品具有良好的回收率。

前言

从植物*甜菊叶*中提取的二萜糖苷（甜菊糖和甜叶菊甙）作为合成甜味剂的替代品应用于食品和饮料中。由于这些化合物为非营养性物质（零热量）并且具有高效价（甜菊糖是蔗糖的 300 倍，甜叶菊甙是蔗糖的 400 倍），因此，过去一直将甜菊叶提取物用于糖尿病的治疗[1, 2]。测定各种糖苷的相对含量对表征甜菊提取物非常重要，这将影响产品的质量。此前发表的应用简报表明，使用 Agilent ZORBAX 糖分析柱可对浓度在 70-700 µg/mL 范围之内的这两种二萜糖苷进行定量[3]。在本应用简报中，我们将介绍使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪进行部分方法验证并对*甜菊叶*提取物中浓度高达 1000 µg/mL 的甜菊糖和甜叶菊苷 A 进行定量分析。

Agilent Technologies

方法

仪器和软件

安捷伦液相色谱系统包括如下模块：

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 脱气机 (G1379B)
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器 (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器温控器 (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity DAD (G4212B)，配备最大光强为 60 mm 的高灵敏度流通池

软件： 安捷伦化学工作站

样品前处理： Agilent 7696A 样品制备工作台

试剂与材料

本研究中使用了甜叶菊甙 A、甜菊糖和*甜菊叶* (Sigma) 和乙腈 (Labscan)。

色谱参数

色谱柱	Agilent ZORBAX 糖分析柱，4.6 × 150 mm，5 µm 粒径（部件号 843300-908）
流动相：	A：水 30%
	B：乙腈 70%
进样量	5 µL
ALS	6 °C
恒温箱流速	1.0 mL/min（等度分析）
色谱柱	30 °C
温度检测器	205 nm，4 nm BW；参比波长：无；PW > 0.25 s (20 Hz)

标样

储备液用 30% 水和 70% 乙腈的混合溶液配制。以各分析物浓度为 100 µg/mL 的溶液进行方法验证。使用各标准品浓度为 0.5、1.5、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1000 µg/mL 的溶液制备校准曲线，以 30% 水和 70% 乙腈为溶剂。

采用 Agilent 7696A 样品制备工作台[4]依次稀释浓度为 2000 µg/mL 的甜叶菊甙 A 和甜菊糖储备液，得到一系列各标准品浓度为 1.0、2.5、5、10、25、50、100、250、500 和 1000 µg/mL 的校准标准溶液，以 30% 水和 70% 乙腈的混合溶液为溶剂。表 1 显示了工作台方法中所用的进样参数。

样品前处理

将*甜菊叶*粉碎并称取约 0.1 g 粉末至 20 mL 玻璃瓶中。向玻璃瓶中加入 10 mL 30% 水和 70% 乙腈的混合溶液，然后涡旋。超声提取 60 min。瓶中内容物离心，并用 30% 水和 70% 乙腈的混合溶液将上清液稀释 10 倍。向稀释 10 倍的等分样品中加入浓度为 2000 µg/mL 的甜叶菊甙和甜菊糖储备液，以测试分析物回收率。加标样品中各分析物的最终浓度为 100 µg/mL。取不加标和加标样品溶液 5 µL，进样分析。

	溶液预冲洗 1	分液冲洗	分液泵	分液设置
冲洗次数	1	1	2	-
冲洗体积 (µL)	100	50	50	-
抽取速度 (µL/min)	1000	200	200	200
推出速度 (µL/min)	1000	200	200	200
针取样深度偏移量 (mm)	0	-2	-2	-2
粘度延迟 (s)	-	0	0	0
托架放置溶剂	A	-	-	-
空气间隙（% 进样体积）	-	-	-	0

表 1
500 µL 进样参数

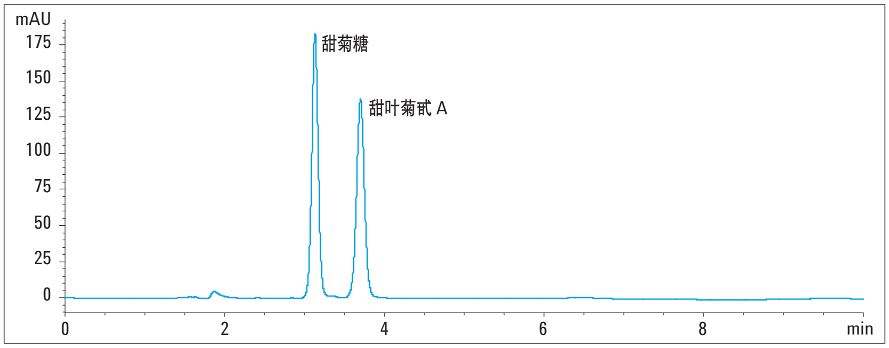


图 1
浓度为 100 µg/mL 的校准标准溶液的色谱图

结果和讨论

分离

经过对多种固定相和色谱条件测试之后，发现 Agilent ZORBAX 糖分析柱最适用于甜叶菊苷 A 和甜菊糖的分析。典型的浓度为 100 µg/mL 的校准标准溶液色谱图如图 1 所示。

检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ)

以峰高除以 0.1 至 0.4 min 之间的峰值噪音测定 LOD 和 LOQ 值。结果表明，甜菊糖和甜叶菊甙在浓度为 1 µg/mL 时，信噪比为 56.2 和 43.7。由于在 0.5 µg/mL 浓度下未观察到有效峰，因此，选择 1 µg/mL 作为本方法的 LOD 和 LOQ。

线性

校准样品使用 Agilent 7696A 样品制备工作台配制，以测试方法的线性。用峰面积响应对分析物浓度绘制曲线，表明两种分析物在浓度 1.0-1000 µg/mL 之间呈线性。表 2 中列出了甜菊糖和甜叶菊苷 A 的校准数据。我们研究发现配制校准标准溶液时，使用 7996A 样品制备工作台代替手动稀释，R^2 值会有所提高。

保留时间和峰面积的精密度

手动稀释配制两种分析物浓度范围为 0.5-1000 µg/mL 的校准样品。试验表明，浓度为 0.5 µg/mL 的校准样品峰太小，无法进行积分。所有其他校准标准溶液进样 10 次，最后 6 次进样用于计算峰面积和保留时间的 RSD 值。结果表明，两种化合物在所有校准浓度下，其保留时间的 RSD 约为 0.13%。除甜菊糖在浓度为 1.5 和 2.5 µg/mL 时 RSD 大于 5% 之外，两种化合物在各个浓度下峰面积的 RSD 均小于 4%。

稳定性

在初步的方法开发之后，我们对一组方法参数进行系统地改变，以测试方法的稳定性。根据所观察到的参数变化对结果的影响，我们监测了保留时间和峰面积的偏差。表 3 显示了根据参数变化所带来的分析物保留时间和峰面积的百分偏差。结果表明，保留时间的偏差在所有参数变化的设定限度 3% 之内；同时，除检测波长之外，峰面积的偏差在所有参数变化的设定限度 5% 之内。

分析物	R^2	线性回归
甜菊糖	0.99991	面积 = 9.86* 浓度 + 20.18
甜叶菊苷	0.99995	面积 = 9.50* 浓度 + 13.30

表 2
使用 Agilent 7696A 样品制备工作台配制的甜菊糖和甜叶菊苷标准溶液的校准数据

	甜菊糖		甜叶菊甙 A	
改变的参数	保留时间的偏差 (%)	峰面积的偏差 (%)	保留时间的偏差 (%)	峰面积的偏差 (%)
流速 - 2% (0.98 mL/min)	2.51	1.36	2.75	1.79
流速 + 2% (1.02 mL/min)	-2.31	-2.55	-2.48	-2.48
柱温 - 5% (28.5 °C)	-0.33	0.33	-0.47	-0.22
柱温 + 5% (31.5 °C)	-1.04	-0.73	-1.5	- 0.96
进样量 - 5% (4.8 µL)	-0.54	-3.81	-0.93	-3.73
进样量 + 5% (5.2 µL)	-0.85	4.33	-1.36	3.76
检测波长 - 3 nm (202 nm)	-1.16	19.09	-1.78	17.06
检测波长 + 3 nm (208 nm)	-1.30	-31.33	-2.01	-31.40

表 3
方法稳定性：方法参数的改变对保留时间和峰面积的影响

样品基质加标回收率

不加标和加标*甜菊叶*提取物的叠加色谱图如图 2 所示。表 4 显示了加入到稀释提取物中的分析物的良好回收率。

结论

在本应用简报中，我们介绍了从甜菊叶中提取的两种二萜糖苷甜菊糖和甜叶菊苷 A 的检测和定量。本方法具有良好的稳定性、灵敏性和重现性。使用 Agilent 7696A 样品制备工作台进行样品稀释以配制校准标准溶液。两种分析物的峰面积在 1-1000 µg/mL 浓度范围之内呈线性，R^2 值大于 0.9999。因此，7696A 样品制备工作台适合于 QC 环境中的常规应用，以减少因手动误差所致的差异。此外，加入到经稀释的甜菊提取物中的两种分析物的回收率良好。

参考文献

1. N. W. Megeji, J. K. Kumar, Virendra Singh, V. K. Kaul and P. S. Ahuja, “Introducing Stevia rebaudiana, a natural zero-calorie sweetener”, CURRENT SCIENCE, 88 (5), 801-804, **2005**

2. N. Kolb, J. L. Herrera, D. J. Ferreyra, and R. F. Uliana, “Analysis of Sweet Diterpene Glycosides from Stevia rebaudiana: Improved HPLC Method”, J. Agricultural and Food Chem, 49, 4538-4541, **2001**

3. “使用 ZORBAX 选择性色谱柱对甜菊甜味剂进行等度分析”，安捷伦应用简报，出版号 5990-3933CHCN，**2010**

4. “Automated Sample Preparation of Headspace Standards Using the WorkBench”（使用Agilent 7696 工作台进行顶空进样的自动化样品前处理的操作规程），安捷伦应用简报，出版号 5990-9025EN，**2011**

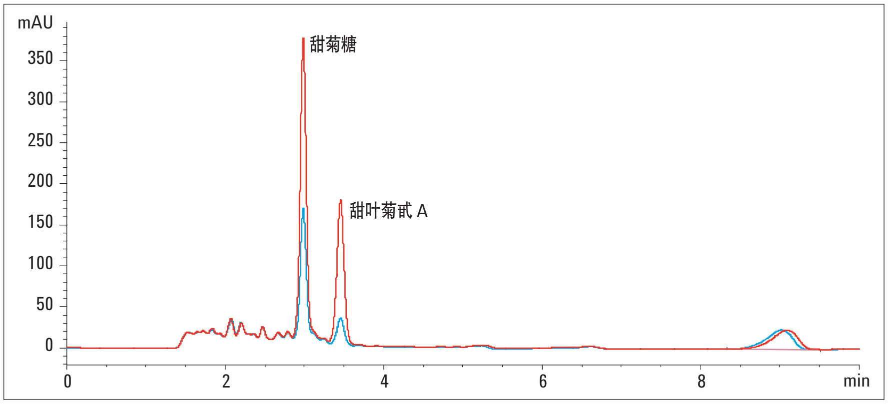


图 2
加标和不加标甜菊叶提取物的叠加色谱图

	提取物稀释 10 倍的浓度 (µg/mL)	提取物稀释并加标的浓度（第 2 等分提取物）(µg/mL)	提取物稀释并等分加标的浓度 (µg/mL)	回收率
甜菊糖	84.30	100	192.83	108.53%
甜叶菊苷	21.56	100	114.57	93.01%

表 4
计算得出的不加标和加标的经稀释的甜菊提取物样品的浓度和回收率

www.agilent.com/chem/cn

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 12 月 1 日，中国印刷
出版号 5990-9524CHCN

Agilent Technologies

采用自动样品制备测定橄榄油中的脂肪酸甲酯（FAME）

应用简报

食品检测

作者

Ramon Hernandez & Pablo Castillo
Lab de Microbiologia de Andaluza
Instrumentatcion 西班牙

Enrique Longueira & Jose Pineda
Laboratorio Químico Microbiológico，
S.A.
Murcia
西班牙

Rebecca Veeneman
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road
Wilmington，DE 19808
美国

摘要

测定橄榄油中的脂肪酸（FA）有多种不同的方法。本应用介绍了如何在碱性催化反应后进行分析以及使用安捷伦 7696A WorkBench 样品制备工作台制备样品的优势。

前言

脂肪酸的分析在橄榄油工业中非常普遍且通常采用气相色谱分析。因为这类物质的强极性和高沸点，通常会得到较差的峰形和糟糕的重现性。为了避免这些问题，很多方法采用了衍生反应将脂肪酸变成脂肪酸甲酯（FAME），从而更容易实现色谱分离并得到更好的峰形。

衍生反应种类众多，其中最普遍的是使用正己烷和氢氧化钾（KOH）在甲醇中进行碱性催化反应。该方法快速、简单，可以得到游离脂肪酸无法获得的优异结果。

Agilent Technologies

实验

材料

所用试剂包括购自 Baker 公司的正庚烷（也可以采用正己烷）、甲醇（色谱纯）和氢氧化钾。将 11.2 g KOH 溶解在 100 mL 甲醇中制备得到 2N 的 KOH。

正庚烷和水用作 7696A 样品制备工作台的清洗溶剂。移取 KOH 溶液的注射器必须用两种溶剂进行清洗，首先用水洗掉 KOH，然后再用正庚烷清洗。移取正庚烷的注射器单独采用正庚烷进行清洗。

仪器

碱性衍生化分析橄榄油中脂肪酸的方法通常是在 20 mL 试管中加入 100 mg 样品，然后再加入 10 mL 正庚烷和 100 µL KOH。本研究对 WorkBench 样品制备工作台的应用进行了测试，工作台使用的样品瓶为 2 mL，因此，所有试剂用量都缩小了 10 倍。

碱性催化反应为单一步骤，几分钟之内即可完成。

样品制备工作台用于自动化制备所有进行 GC/MS 分析的样品。

方法如下所示：

软件提供的资源管理器界面可以显示所有样品瓶和试剂的布局（见图 1）。

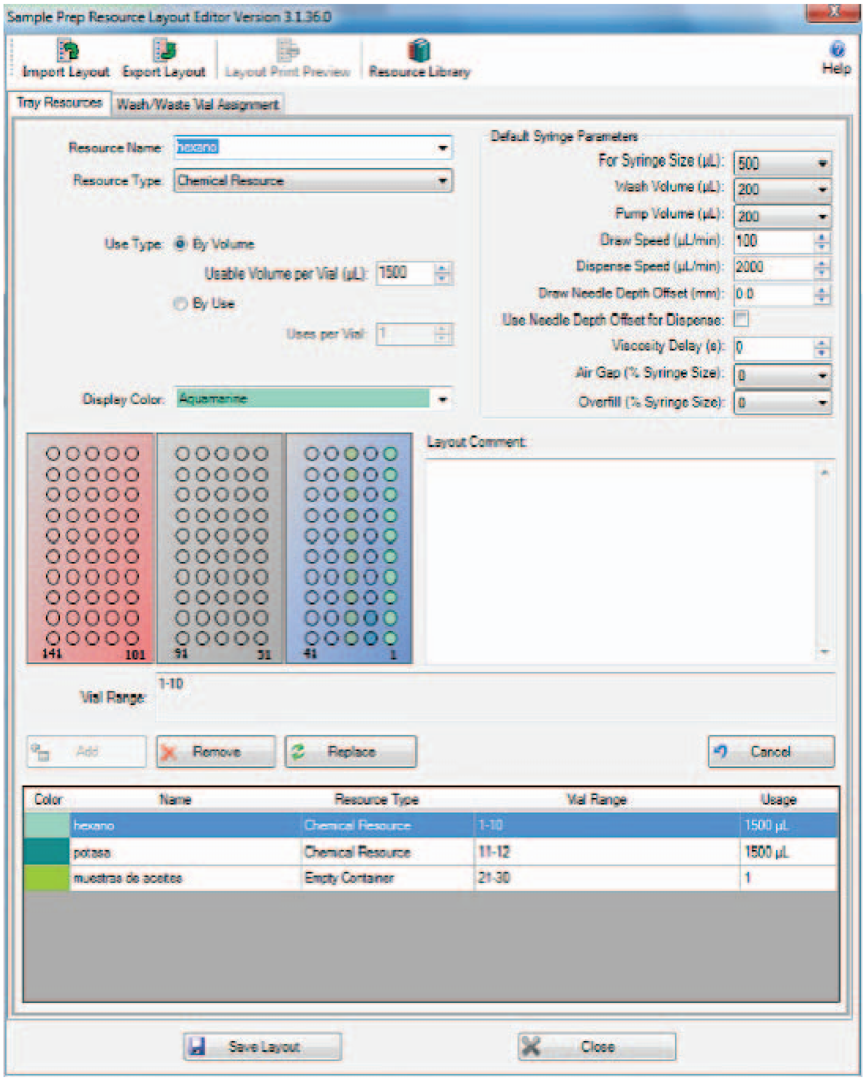


图 1.　试剂资源布局

图 2 显示了制备样品所用的方法。

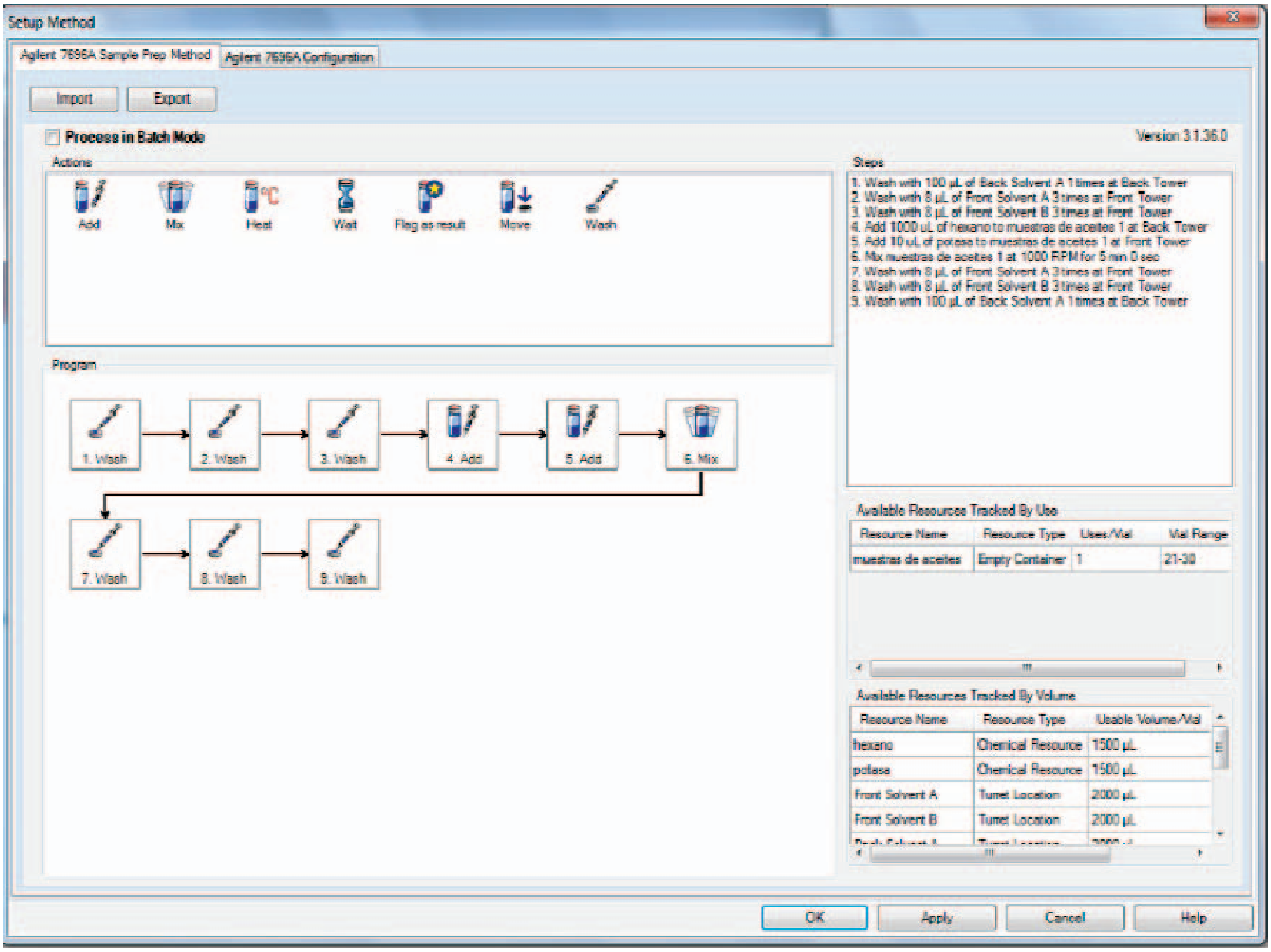


图 2. 安捷伦 7696A 样品制备方法

在其中一个样品瓶盘上，放置了三行 2 mL 样品瓶，一行样品瓶装有正庚烷，一行装有 KOH，一行各装有一滴约 10 µL 橄榄油（需分别称重示）。样品制备工作台使用两个注射器分别加入两种试剂：1 mL 正庚烷和 10 µL KOH。都加入完成后，将样品瓶振荡 10 min。

样品瓶混合完成后，取上层有机相进样到 GC，配置 250 °C 的分流/不分流进样口，和 MSD 相连。色谱柱为 HP88（60 m × 250 µm，0.2 µm），柱流量 1 mL/min。柱箱的程序升温为 175 °C 保持 5 min，以 5 °C/min 升到 250 °C，以获得最佳的脂肪酸分离效果。进样口采取 100:1 的分流模式，所有分析均采用 SIM 和 SCAN 两种模式进行采集。

结果和讨论

为评估使用工作台制备样品的重现性和准确度，将 10 个工作台制备的样品注射进样到 GC/MS。表 1 列出了结果。

此应用报告对橄榄油中四种主要组分的结果进行了对比。色谱图如图 3 所示，各组分的峰面积见表 2。

首先，对装有橄榄油样品的 10 个样品瓶进行称重，称重结果见表 1。

表 1.　10 个样品的重量

样品瓶	橄榄油重/mg
1	12.9
2	13.4
3	14.8
4	14.5
5	14.2
6	14.7
7	13.2
8	14.9
9	13.8
10	13.6

这些样品瓶随后被放置在工作台的样品盘上，根据程序设定的加入量自动加入各试剂。

一旦样品制备完毕，即按上述仪器条件注射进样到 GC/MS 进行分析，图 3 为分析结果。

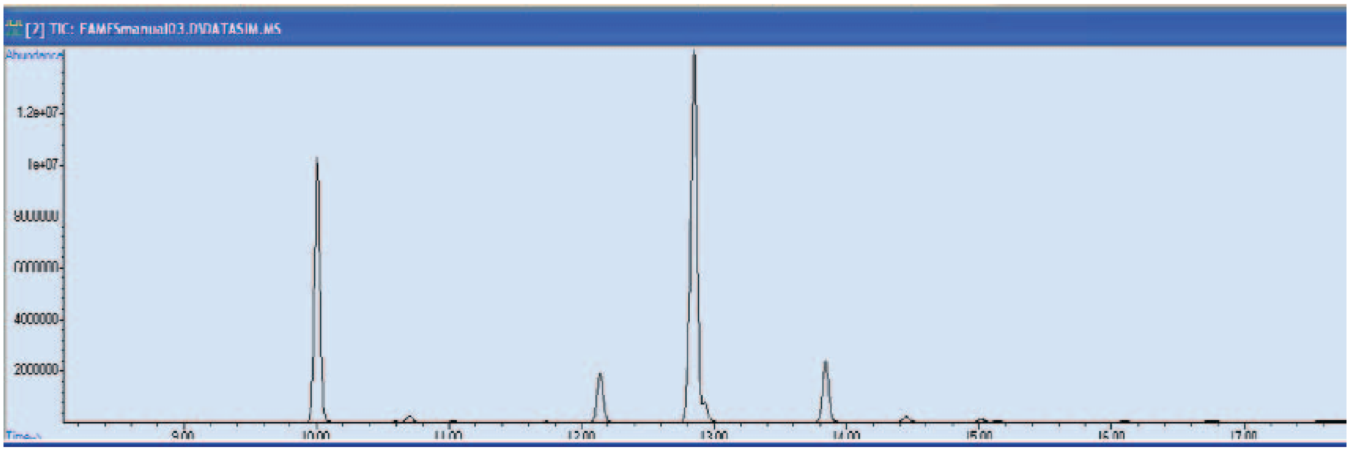


图 3.　SIM 模式下的色谱图

表 2.　橄榄油中四个主要组分的峰面积

样品	棕榈酸甲酯 9.99 min	硬脂酸甲酯 12.128 min	油酸甲酯 12.844 min	亚油酸甲酯 13.83 min
1	317343837.0	63331226.0	569320584.0	80584679.0
2	373510457.0	74825501.0	660064790.0	94609910.0
3	389137859.0	74174710.0	683431450.0	98106712.0
4	350160186.0	69553324.0	621849766.0	88281829.0
5	350311578.0	69513586.0	622622625.0	88233984.0
6	363692227.0	71973045.0	643859326.0	91639831.0
7	298792007.0	58778562.0	534781631.0	74997383.0
8	376569059.0	74878674.0	666439996.0	95109185.0
9	352698458.0	68424565.0	654254324.0	82569566.0
10	351745852.0	70145747.0	602155656.0	86951448.0
均值	**350409359.2**	**69188856.3**	**622601967.1**	**87561952.4**
相对标准偏差	**27119463.9**	**5161865.2**	**46358289.5**	**7182432.9**
%RSD	**7.7**	**7.5**	**7.4**	**8.2**

样品中四个组分单位橄榄油质量的峰面积见表 3。

表 3. 每毫克橄榄油中各组分的峰面积

样品	棕榈酸甲酯 9.99 min	硬脂酸甲酯 12.128 min	油酸甲酯 12.844 min	亚油酸甲酯 13.83 min
1	24600297.4	4909397.4	44133378.6	6246874.3
2	27873914.7	5583992.6	49258566.4	7060441.0
3	26293098.6	5011804.7	46177800.7	6628831.9
4	24155874.9	4796781.0	42886190.8	6088402.0
5	24669829.4	4895323.0	43846663.7	6213660.8
6	24740967.8	4896125.5	43799954.1	6234002.1
7	22635758.1	4452921.4	40513759.9	5681619.9
8	25273091.2	5025414.4	44727516.5	6383166.8
9	25557859.3	4958301.8	47409733.6	5983301.9
10	25863665.6	5157775.5	44276151.2	6393488.8
均值	**25097420.2**	**4954369.4**	**44585290.7**	**6272059.8**
相对标准偏差	**1391411.9**	**284657.5**	**2430391.6**	**371694.7**
%RSD	**5.5**	**5.7**	**5.5**	**5.9**

表 4 为 10 个样品中，每种 FAME 的峰面积百分比。

表 4. 每个组分所占的峰面积百分比

样品	棕榈酸甲酯 9.99 min	硬脂酸甲酯 12.128 min	油酸甲酯 12.844 min	亚油酸甲酯 13.83 min
1	30.8	6.1	55.2	7.8
2	31.0	6.2	54.9	7.9
3	31.3	6.0	54.9	7.9
4	31.0	6.2	55.0	7.8
5	31.0	6.1	55.1	7.8
6	31.1	6.1	55.0	7.8
7	30.9	6.1	55.3	7.8
8	31.0	6.2	54.9	7.8
9	30.5	5.9	56.5	7.1
10	31.7	6.3	54.2	7.8
均值	**31.0**	**6.1**	**55.1**	**7.7**
相对标准偏差	**0.3**	**0.1**	**0.6**	**0.2**
%RSD	**1.0**	**1.9**	**1.0**	**2.9**

本实验对两种剂量的试剂加入法——原剂量方法（100 mg 橄榄油）和 WorkBench 工作台剂量方法进行了对比。采用此两种试剂加入法人工制备样品得到的结果分别见表 5 和表 6。

表 5.　使用原始试剂加入法得到的每毫克橄榄油中各组分的峰面积

样品	棕榈酸甲酯 9.99 min	硬脂酸甲酯 12.128 min	油酸甲酯 12.844 min	亚油酸甲酯 13.83 min
1	2674181.8	529275.8	4610749.8	674892.3
2	2562129.3	505970.3	4442449.3	648040.5
3	2596966.1	511187.6	4504510.0	655770.4
4	2388663.8	466760.2	4168008.4	601931.7
5	2721157.8	535230.9	4722598.6	688465.5
6	2789232.0	549999.6	4813189.6	704034.8
7	2330855.0	453164.1	4057061.6	589335.4
8	2645696.1	528725.3	4579552.0	669544.2
9	2650632.8	520264.3	4600138.2	668931.5
10	2660736.3	520639.8	4632201.2	671882.6
均值	**2594658.8**	**510416.9**	**4501404.4**	**655410.2**
相对标准偏差	**142531.1**	**30276.4**	**236121.4**	**36110.5**
%RSD	**5.5**	**5.9**	**5.2**	**5.5**

可以看到，%RSD 结果与工作台自动化制备样品所得结果相近。

按与工作台制备样品相同的试剂量人工制备样品：将一滴橄榄油滴加到 2 mL 样品瓶中，称重，使用安捷伦注射器加入 1 mL 正庚烷和 10 µL KOH 的甲醇溶液，人工轻微震荡混匀。分析结果见表 6。

表 6.　使用工作台剂量方法人工操作得到的每毫克橄榄油中各组分的峰面积

样品	棕榈酸甲酯 9.99 min	硬脂酸甲酯 12.128 min	油酸甲酯 12.844 min	亚油酸甲酯 13.83 min
1	24414278.4	4280301.6	34483064.7	5405051.1
2	21953969.5	4385041.9	34340981.7	5496525.8
3	25176754.2	4987565.4	39311102.4	6258162.4
4	23806050.0	4723341.1	36249791.4	5917479.9
5	23413864.7	4659269.7	36103230.9	5862013.3
6	22388861.8	4441774.0	34988087.2	5625015.1
7	23345774.4	4655270.9	36540218.6	5654628.9
8	21758664.6	4326697.7	31010500.3	5465899.5
9	22268704.8	4448969.7	34833834.8	5598507.6
10	21726270.7	4324528.6	34099881.5	5188441.0
均值	**22970768.0**	**4513461.5**	**35078976.3**	**5633014.3**
相对标准偏差	**1194355.0**	**226067.9**	**2129375.1**	**301856.8**
%RSD	**5.2**	**5.0**	**6.1**	**5.4**

如上所示，%RSD 值与使用工作台自动化制备样品的值相似。

结论

安捷伦 7696A 样品制备工作台是一款使用起来非常方便、简单、可靠的工具，可以自动化完成类似样品制备这样的实验室典型操作。本应用报告中的结果详细论证了使用工作台操作样品进行分析的重现性。无论是原始剂量试剂加入法还是工作台剂量试剂加入法，人工样品制备得到的结果与工作台自动化制备得到的结果非常相近。

更多信息

本文中的数据仅代表测定的典型结果。有关产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2012

2012 年 7 月 19 日，中国印刷
5991-0761CHCN

Agilent Technologies

制药

用于确认滴眼管给药准确性的自动化高精度称重

给药设备必须能够均匀地提供药物，确保用药量合适。本应用中，带有称重台板的工作台可自动检测给药量，便于人们进行精确的重量−重量计算。

返回目录
查看应用简报

制药

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：
agilent.com/chem/workbench

返回目录
返回行业简介

下面的目录已链接到本文集的对应部分。单击文本可跳转到特定部分

眼药水制剂质量控制中的自动化样品前处理 122

眼药水制剂质量控制中的自动化样品前处理

应用简报

作者

Bart Tienpont, Maria Rambla Alegre,
Frank David 和 Pat Sandra
气相色谱研究所
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

摘要

在眼药水制剂质量控制方法中使用带称重站的 Agilent 7696A 样品前处理工作台。自动化样品前处理包括通过称重和稀释过程制备含两种活性成分的校准标样（四个水平）以及眼药水制剂样品。两个序列全自动化。分析结果具有极佳的重现性和线性。

前言

使用带称重站的 Agilent 7696A 样品前处理工作台测定眼药水制剂中的两种活性成分——地塞米松和氯霉素。地塞米松是最有效的皮质类固醇之一，它的药效比泼尼松龙强 5-14 倍，比可的松和氢化可的松强 25-75 倍。将广谱抗菌素氯霉素加入到地塞米松中之后能有效治疗前葡萄膜炎（虹膜炎、虹膜睫状体炎）。治疗炎症的眼药水制剂可能含有地塞米松和氯霉素中的一种或两种，而且通常是一种粘性的水溶液。

典型的分析 QC 步骤包括：1）制备含活性成分的四个水平的校准标样系列水溶液（水相流动相）以及 2）用水（水相流动相）稀释一定量的眼药水制剂。如表 1A 所示，样品前处理通常是在容量瓶中进行的，最开始需分别制备含地塞米松和氯霉素的两种储备溶液。制得的校准溶液中含有这两种成分，其中地塞米松浓度介于 16-64 µg/mL，氯霉素介于 80-320 µg/mL。通常使用水相流动相将样品稀释 25 倍。样品前处理完成后，使用 HPLC 对校准标样和样品进行紫外检测分析。由于标准溶液不稳定，因此通常在每次样品分析时现配现用。

本应用简报介绍了校准标样的自动化制备以及样品的自动稀释。常规方法布局见表 1B。使用称重站来追踪精确的校准标样浓度并测量样品量。

实验部分

化学试剂

地塞米松和氯霉素均购自 Sigma-Aldrich（比利时贝尔塞）。水和乙腈 (AcCN) 为 HPLC 级（BioSolve，荷兰）。磷酸和氢氧化钠购自 Sigma-Aldrich。

配置

Agilent 7696A 样品前处理工作台配有两个 Agilent 7693A 自动液体进样器。前进样口带一个强化进样针架和一根 500 µL 进样针（部件号 G4513-60561）。后进样口带一个强化进样针架和一根 50 µL 进样针（部件号 5183-0314）。

工作台方法

资源布局

图 1 所示为工作台的资源布局。流动相 A（0.3% 磷酸水溶液，用氢氧化钠调至 pH = 3）和乙腈作为“化学资源”分别置于 81-150 和 71-72 位。前后进样塔样品瓶 A1 和 B1 中的溶剂均为水。制备标准稀释用的样品瓶定义为 Empty Container（空容器）。

工作台方法程序步骤

制备四种校准标样的 7696A 样品前处理工作台程序见图 2。称重完空样品瓶后，暂停系统以加入固体标样。然后，继续运行自动程序，添加溶剂以制备四个水平的校准标样。将固体标样稀释 6 倍得到最低水平校准标样。

表 1A.　传统的样品前处理（USP 或 EP 方法）

	代码	制备储备溶液	目标浓度 (µg/mL)
校准标准品	DEX Stck	称取 10 mg 地塞米松于 25 mL 样品瓶 + 加 25 mL 水	400
	CLO Stck	称取 10 mg 氯霉素于 25 mL 样品瓶 + 加 25 mL 水	400
		制备标准溶液	**目标浓度 (µg/mL) 地塞米松/氯霉素**
	LVL1	1 mL Dex Stck + 5 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	16/80
	LVL2	2 mL Dex Stck + 10 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	32/160
	LVL3	3 mL Dex Stck + 15 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	48/240
	LVL4	4 mL Dex Stck + 20 mL CLO Stck 于 25 mL 流动相	64/320
		制备眼药水制剂样品	
样品	SAM	1 mL 或 1 g 眼药水样品 + 25 mL 流动相	

表 1B.　Agilent 7696A 样品前处理工作台样品前处理

	代码	制备储备溶液	目标浓度 (µg/mL)
校准标准品	DEX Stck-1	称取 4 mg 地塞米松于 2 mL 样品瓶* + 加 1 mL AcCN	4000
	DEX Stck	150 µL DEX Stck-1 + 1350 µL 流动相（稀释 10 倍）	400
	CLO Stck-1	称取 4 mg 氯霉素于 2 mL 样品瓶* + 加 1 mL AcCN	4000
	CLO Stck	150 µL CLO Stck-1 + 1350 µL 流动相（稀释 10 倍）	400
		制备标准溶液	**目标浓度 (µg/mL) 地塞米松/氯霉素**
	LVL1	20 µL Dex Stck + 100 µL CLO Stck + 380 µL 流动相	16/80
	LVL2	40 µL Dex Stck + 200 µL CLO Stck + 260 µL 流动相	32/160
	LVL3	60 µL Dex Stck + 300 µL CLO Stck + 140 µL 流动相	48/240
	LVL4	80 µL Dex Stck + 400 µL CLO Stck + 20 µL 流动相	64/320
		制备成品样品	
样品	SAM	1 滴眼药水样品* + 1 mL 流动相（大约 35–40 mg）	

*Agilent 7696A 样品前处理工作台暂停时，手动添加固体粉末或粘稠液体。在这之后进行称重。

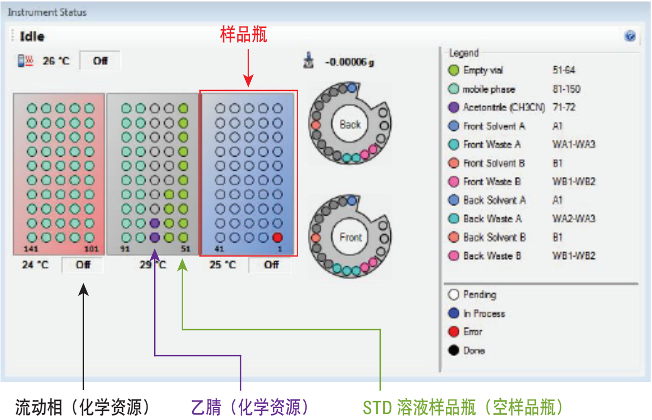


图 1.　Agilent 7696A 样品前处理工作台资源布局，用于地塞米松和氯霉素的梯度稀释

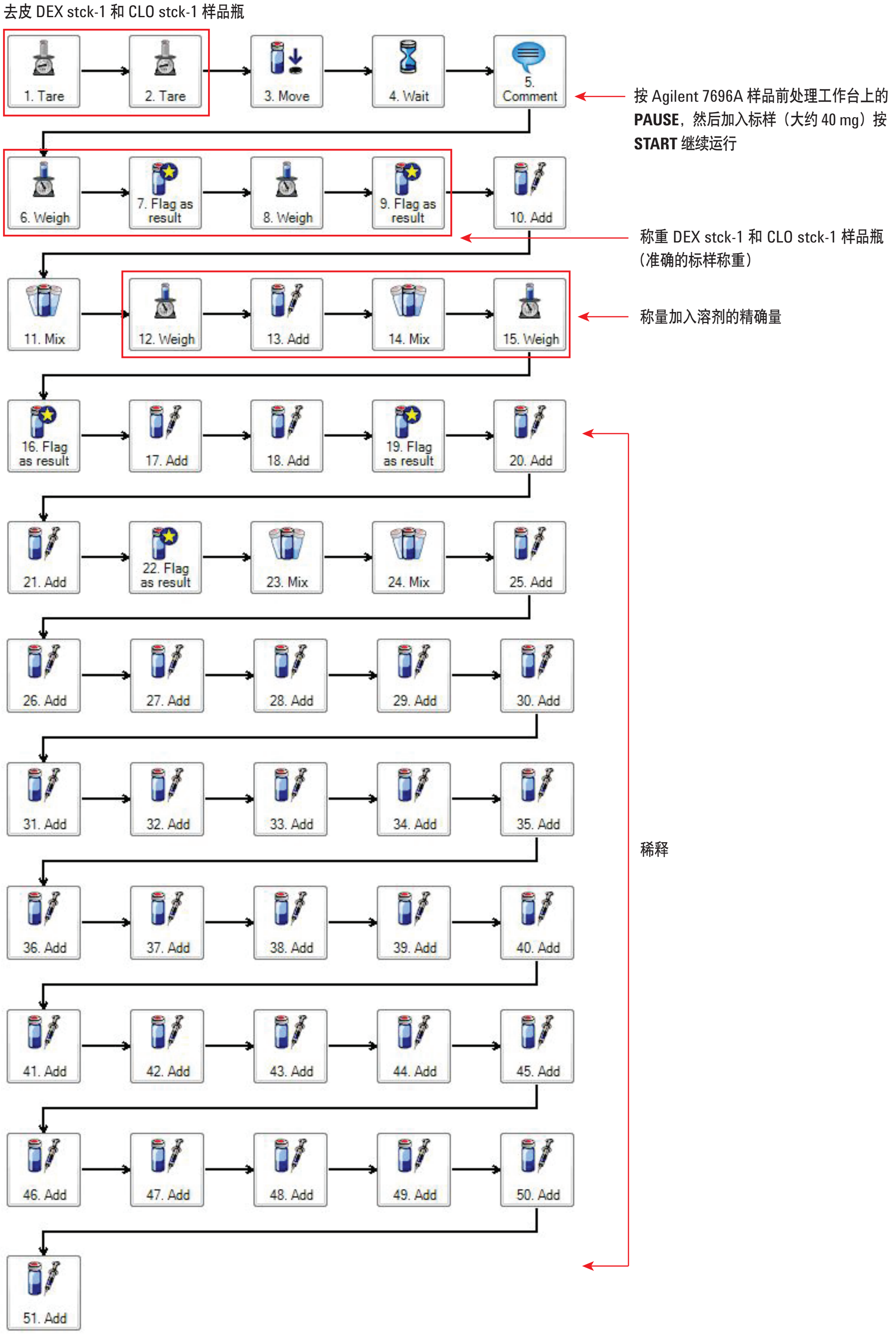


图 2.　Agilent 7696A 样品前处理工作台校准标样制备的方法设置流程图

另外制备一个样品稀释的序列：将空样品瓶去皮并暂停系统。向每一个样品瓶中加入一滴粘性样品。这时需要手动操作，因为样品比较粘稠，无法使用注射器转移液体。然后继续启动工作台。再次称重样品瓶（图 3），计算精确的样品量并记录在序列报告中。最后，加入溶剂稀释样品（见图 4 中的方法布局）。

可以在一个序列中对校准标样制备和样品前处理进行编程。

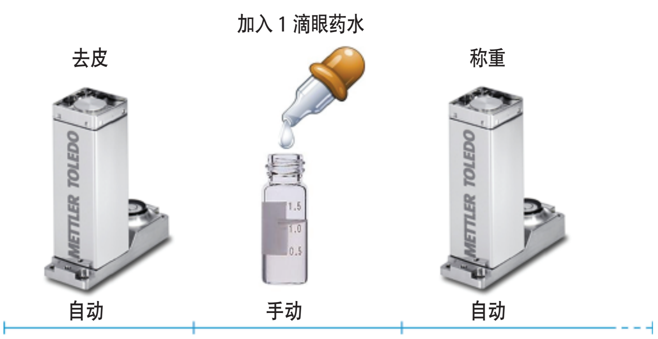
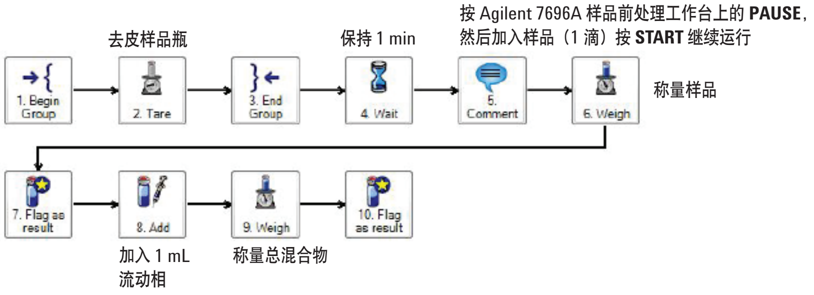


图 3. 去皮、样品添加以及样品量称量的图解说明



1. 开始一个组
2. 去皮样品
3. 结束该组
4. 等待 1 min
5. 按工作台上的 **PAUSE** 加入样品后按 **START**
6. 称重样品
7. 将样品标记为 RESULT（结果）
8. 向前进样塔的样品中加入 1000 µL 流动相（清洗，泵）
9. 称量样品
10. 将样品标记为 RESULT（结果）

图 4. 用于样品的 Agilent 7696A 样品前处理工作台方法设置

HPLC 分析实验条件

使用 Agilent 1290 Infinity HPLC 系统进行分析。使用 Poroshell 120 色谱柱（2.1 mm × 400 mm，2.4 µm dp（部件号 695775-902））进行分离。流动相 A 为 0.3% 磷酸水溶液（使用氢氧化钠调至 pH=3），流动相 B 为乙腈。采用 20% B (0 min)-50% B (5 min) 的梯度条件。流速为 0.5 mL/min。进样量为 1 µL，紫外检测波长为 254 nm。

结果与讨论

四种校准水平的叠加谱图见图 5。校准曲线见图 6。地塞米松和氯霉素的线性都非常出色 ($R^2 > 0.999$)。

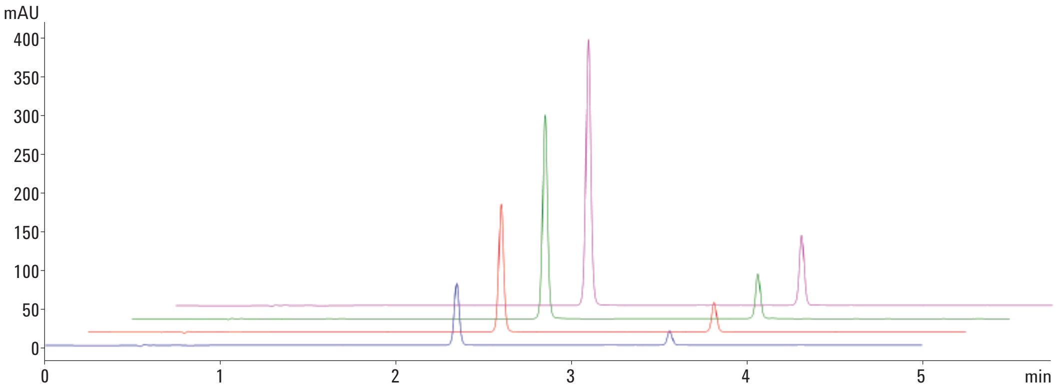


图 5. 四种校准水平的氯霉素 (2.35 min) 和地塞米松 (3.55 min) 的谱图（叠加图，X/Y 轴偏置）

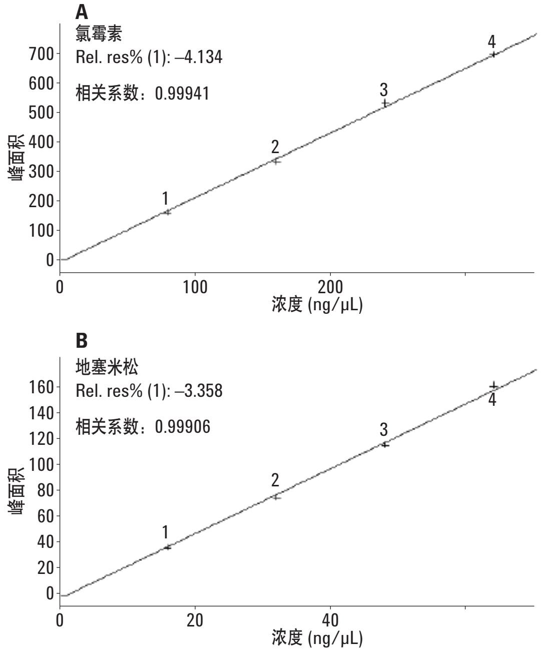


图 6. 使用 Agilent 7696A 样品前处理工作站自动校准标样制备获得的氯霉素 (2.35 min) 和地塞米松 (3.55 min) 的校准曲线

通过制备稀释 6 倍的最低校准样品评估了样品前处理的重现性。叠加谱图见图 7，可以看出重现性非常出色，氯霉素和地塞米松的 RSD 分别为 1.5% 和 2.7%。

另外，对三种类型的样品进行了分析。谱图见图 8。样品 A 含地塞米松，样品 B 含氯霉素，样品 C 则同时含有地塞米松和氯霉素。检测了三种样品中活性成分的准确量（测定值为标签浓度的 90%-105%）。对同一个序列里制备的三种不同类型样品的分析表明没有发生交叉污染（只含地塞米松的样品中没有氯霉素，*反之亦然*）。

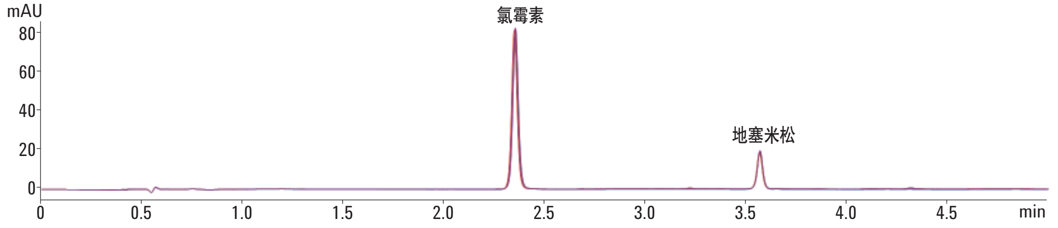


图 7. 使用 Agilent 7696A 样品前处理工作站自动校准标样制备获得的 6 种单独的氯霉素 (2.35 min) 和地塞米松 (3.55 min) 的 6 个叠加谱图。氯霉素和地塞米松的相对标准偏差分别为 1.5% 和 2.7%

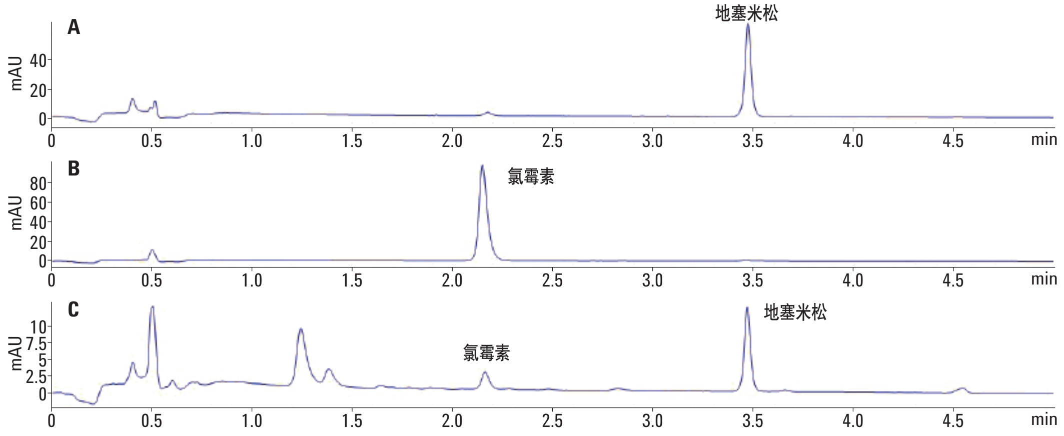


图 8. 三种类型眼药水制剂的谱图

样品前处理的重现性见表 2，该表给出了样品 B 的实测浓度、样品重量以及氯霉素的最终浓度。该样品稀释了 6 倍。实测量的相对标准偏差低于 1%。

除了这些定量数据外，值得注意的是总溶剂消耗量大大减少了，没有使用容量瓶，而且几乎没有浪费任何溶液。

表 2. 眼药水制剂类型 B 样品前处理的重现性

	实测浓度 (µg/mL)	样品重量 (mg)	校正浓度 (µg/mg)
SAM-rep01	124	27.72	4.59
SAM-rep02	121	26.95	4.61
SAM-rep03	114	25.41	4.61
SAM-rep04	103	23.07	4.57
SAM-rep05	143	32.58	4.53
SAM-rep06	138	31.27	4.53
		RSD (%)	**0.74**

结论

带称重站的 Agilent 7696A 样品前处理工作台可成功地自动进行校准样品前处理和样品稀释。样品的粘稠特性使得我们无法使用注射器进行体积稀释，但是通过使用称重站，可以精确测定样品的质量。稀释之后，能够准确测定活性成分。

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2014
2014 年 2 月 6 日，中国印刷
5991-3591CHCN

Agilent Technologies

常规应用

Agilent 7696A 样品制备工作台可自动完成样品前处理工作流程中容易出错的重复性步骤。

它将精密的自动化操作与简单直观的软件整合在一起，确保样品处理的一致性，消除了不同分析员操作带来的差异，使化学家们得以专注于其他更关键的工作任务。

返回目录
查看应用简报

常规应用

多次运行后仍保持样品前处理的一致性和重复性。请访问：agilent.com/chem/workbench

返回目录
返回行业简介

下面的目录已链接到本文集的对应部分。单击文本可跳转到特定部分

Agilent 7696A 样品制备工作台：如何通过连续稀释自动制备样品序列，进行火焰离子化检测器性能评价 132

使用安捷伦样品制备工作台进行自动化的质量控制检测 136

利用批量模式的样品前处理提高分析效率 138

Agilent 7696A 样品准备工作台：如何通过连续稀释自动制备样品序列，进行火焰离子化检测器性能评价

应用报告

作者

W. Dale Snyder

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808

USA

前言

较之分析人员可能希望的更为经常发生的挑战，是需要通过连续稀释准备一组样品，连续稀释是用一个已知浓度的样品进行准备一组稀释样，每一个稀释样都是按照一定的稀释系数不同于前一个，且每一个样品都是用序列中前一个样品进行稀释制备的。这一工作可以用于以特定的分析物校准仪器，或者评价检测器的性能，如：线性、灵敏度和最小检测限 (MDL)。如果样品随着时间不断变化，它们可能就需要每周甚至每天进行准备；为了使手动配制中误差最小化，或者为了减少烦人的稀释频率，用户通常准备比需要量更大的样品，这样会导致不必要的浪费和费用。

Agilent 7696A 样品准备工作台通过精确的自动连续稀释程序，解决了这一问题，以至可以程序式地准备浓度范围跨越大的的少量样品；连续稀释的样品制备方法：开始先在一个空的样品瓶中注入一定体积的溶剂，然后注入一定体积的样品，混合后，然后重复这一步骤，在一个新的样品瓶中注入溶剂和一定量前一个瓶中稀释过的样品。例如需要一组样品评价火焰离子化检测器 (FID) 的性能，每次要把前次样品稀释十倍，起始样品是正构烷烃，如正十三烷 (C_{13})，每次稀释包含 90% 的溶剂和 10% 的前次样品 (v:v)，在这一应用中需要准备一组 7 个或 8 个样品以证明 FID 的线性为 7 个数量级。如下所述，8 组测试样品在两周时间内完成，其中 3 组样品是手动制备，5 组样品是用 Agilent 7696A 样品准备工作台完成，每个样品的总体积为 1 mL 或 0.5 mL，所有 8 组样品无论是用样品称重还是用 FID 性能测试，其重复性都很好。

Agilent Technologies

实验

用 Agilent 7696A 样品准备工作台制备一组 8 个样品，每个样品以稀释前个样品 10 倍得到，使用两个序列，这样样品能够在每次稀释后进行称重，第一序列所用的方法是向每一个瓶中加入固定量的溶剂，第二个序列是手动制备含 10% 的 C_{13} 溶液，然后往下一个样品瓶中加足够的溶剂制备成比上一个样品瓶小十倍的浓度，混合好以后取一定分数量的新鲜样品来制备这一组的下一个稀释样品，一直到制备出 8 个样品，称量每个空瓶的重量，然后在进行完每个序列以后进行称重，以评价两个序列的重复性；用手动方法也进行相同样品的制备以便进行比较。

硬件配置

Agilent 7696A 样品准备工作台装配 2 个 Agilent 7693A 自动液体进样器，后进样器包含一个大容量进样针支架，包含 500 µL 进样针（部件号 G4513-60561），前进样器使用标准型进样针支架，装有 100 µL 进样针（部件号 G5183-2042），后进样器用于溶剂注入到每一个空的样品瓶中（第一个序列），前进样器用于把样品从前一个样品瓶转移到下一个样品瓶（第二个序列）。

样品制备

T 所使用的两个方法不同点只在于所制备稀释样品的体积，第一个使用 900 µL 溶剂 + 100 µL 样品，第二个使用一半的体积，450 µL 溶剂 + 50 µL 样品。

单一的 Agilent 7696A 样品准备工作台资源布局是用于两个序列：

资源布局：

样品瓶的范围	名称	类型	使用
2-9	MT 样品瓶	空的	1 使用/样品瓶
12-19	溶剂	化学品源	1 使用/样品瓶

所需单一样品是一个 10% C_{13} 的异辛烷溶液，制备方法是在 1 mL 容量瓶中注入 100 µL C_{13}，然后用异辛烷稀释到刻度处*。

第一个序列是把 900 µL 溶剂加到一个空瓶中进行制备 1 mL 样品 (900 µL+100 µL) 的（见附录进样针参数），这一序列指定瓶位为 2 到 9。

第二个序列是按照下列步骤进行样品稀释的（参见附录进样针参数）：

步骤	功能
1	加 100 µL 样品（前面）到样品瓶 2 中
2	把样品瓶 2 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s
3	从样品瓶 2 中取 100 µL 样品注入到样品瓶 3 中
4	把样品瓶 3 以 1500 RPM 转速混合0 min 5s
5	从样品瓶 3 中取 100 µL 样品注入到样品瓶 4 中
6	把样品瓶 4 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s
7	从样品瓶 4 中取 100 µL 样品注入到样品瓶 5 中
8	把样品瓶 5 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s
9	从样品瓶 5 中取100 µL 样品注入到样品瓶 6 中
10	把样品瓶 6 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s
11	从样品瓶 6 中取 100 µL 样品注入到样品瓶 7 中
12	把样品瓶 7 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s
13	从样品瓶 7 中取 100 µL 样品注入到样品瓶 8 中
14	把样品瓶 8 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s
15	从样品瓶 8 中取 100 µL 样品注入到样品瓶 9 中
16	把样品瓶 9 以 1500 RPM 转速混合 0 min 5s

结果

在两周的时间内，进行 8 个样品的连续稀释，三个手动稀释（两个为 1 mL，一个为 0.5 mL）；5 个用 Agilent 7696A 样品准备工作台进行稀释（三个为 1 mL，两个为 0.5 mL）。

表 1. 溶剂加入的重复性（8 个样品的平均值）

类型	手动	手动	手动	7696A	7696A	7696A	7696A	7696A
体积 (mL)	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5
平均重量 (g)	*	0.6165	0.6151	0.3089	0.6176	0.6195	0.6180	0.3088
%SD	*	0.17	0.26	0.11	0.16	0.09	0.06	0.17

* 没有测定

除去最后一个样品，所有其他样品的第二步的重复性都是 ±1 µL；除了最后一个样品，每个样品都是用来制备下一个样品的，重量不会改变，因为都是加入同样的体积然后再从每一个样品进行转移的；平均重量的变化，不管是制备 1 mL 还是 0.5 mL，都等于 ±1 µL，最后一个样品增加的体积对 1 mL 和 0.5 mL 分别为 100 µL 或 50 µL。

Agilent 7696A 样品准备工作台对 1 mL 的一组样品的运行时间为 49 min，对 0.5 mL 的一组样品的运行时间为 41 min，手动制备样品的时间没有测定。

* 溶液是从 10% C_{13} 开始稀释的，不是从 100% C_{13} 开始，这是为了避免溶液体积消减，因为在两个纯化合物混合时会发送溶液体积减少。

FID 性能的重复性

遵循近似于 ASTM 的方法 [1] 评价 FID 的线性、灵敏度和 MDL，主要的不同是使用液体样品，而 ASTM 指定使用气体样品，所有对制备的测试都在同一个 FID 上进行；无论是用 Agilent 7696A 样品准备工作台制备还是手动制备，线性的结果（图 1）都是基本没有差别的，平均灵敏度和 % SD 分别为 26.3 和 2.4，这是在单个 FID 上重复运行取得的非常好的性能，大的 MDL 分布（表 2）是由于天与天之间 C_{13} 洗脱物的检测器平均噪音变化所致，结果见表 2 和图 1。

表 2. FID MDL

制备类型	手动	手动	手动	7696	7696	7696	7696	7696
体积 (mL)	0.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5
灵敏度 (ma-s/gC)	27.2	25.7	25.8	26.8	26.8	25.5	26.6	25.5
MDL (pgC/s)	0.96	1.14	1.66	0.92	0.68	1.31	1.23	1.15

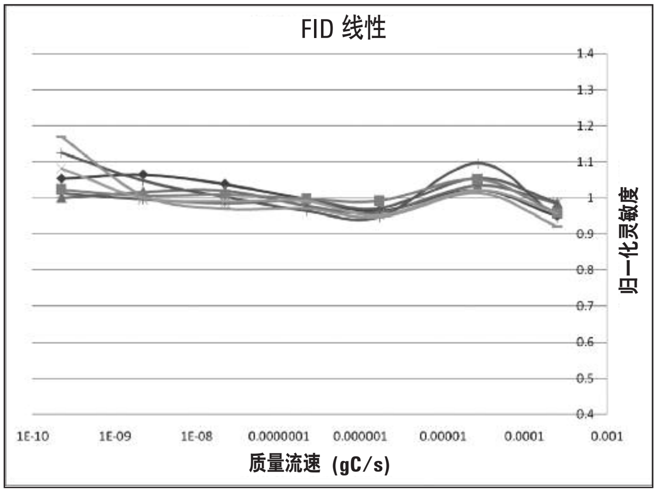


图 1. 所有 8 次运行的线性曲线重叠图

结论

Agilent 7696A 样品准备工作台简化了一组样品连续稀释的制备过程，用户可以仅在需要时制备新鲜的样品，无须制备大于分析所需要的体积量，这样可以减少制备样品的烦琐，操作人员出错的机会，试剂的消耗及废料处理的费用，并且可以取得更好的重复性。

附录

500 µL 进样针参数：

	后进样塔	溶剂预洗 1	溶剂预清洗 2	排出清洗液	排液泵	排液参数设定	溶剂后清洗 1	溶剂后清洗 2
泵或清洗次数					3			
清洗容积 (µL)					50			
抽吸速度 (µL/min)					1250	1250		
排液速度 (µL/min)					3000	3000		
针深度偏差 (mm)					0	0		
粘性延迟 (s)					2	2		
转动架上的溶剂								
气隙 (% 进样针体积)						0		

100 µL 进样针参数：

	后进样塔	溶剂预洗 1	溶剂预清洗 2	排出清洗液	排液泵	排液参数设定	溶剂后清洗 1	溶剂后清洗 2
泵或清洗次数		1		1	2			
清洗容积 (µL)		10		20	10			
抽吸速度 (µL/min)		300		300	300	300		
排液速度 (µL/min)		6000		6000	6000	6000		
针深度偏差 (mm)		0		0	0	0		
粘性延迟 (s)		2		2	2	2		
转动架上的溶剂		A						
气隙 (% 进样针体积)						0		

参考文献

1. ASTM E594-96 (2006) 用于测试气相色谱或超临界流体色谱用的火焰离子化检测器的标准操作规程

www.agilent.com/chem

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相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和性能指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2010

2010 年 11 月 10 日美国印刷
发行号 5990-6850CHCN

Agilent Technologies

使用安捷伦样品制备工作台进行自动化的质量控制检测

质量控制

安捷伦 7696A 样品制备工作台的高准确度、可靠性和易于使用的特性为标准品的生产提供了准确无误的质量控制样品制备技术

对相关标准样品进行可靠、准确的校准是任何运行气相色谱/质谱联用仪的实验室必须执行的操作。ULTRA Scientific 使用严格的质量控制流程确保其产品的准确性和可靠性，作为权威认证标准品供应商现在更是遵循标准物质生产者能力认可准则（ISO Guide 34）的品质要求，提供经认证的分析标准品。

ULTRA Scientific 的生产程序要求从整体过程到均匀性监测均采取随机抽样，以确保混标中各组分浓度的准确性。组成混标的各组分浓度通过精密的稀释和添加内标物，从各自的校准曲线计算而得。相同的内标物以规定的量加入每个样品瓶中，通过气相色谱图得到混标中某个标准物质的峰面积与内标物峰面积的比值，再将此比值代入之前运行得到的校准曲线中，即得该标准物质的浓度，通过此法测得的标准溶液中各组分的实际浓度具有高度的准确性。

一直以来，ULTRA Scientific 都是通过人工添加内标物进行质量控制操作。最近该公司使用安捷伦样品制备工作台对挥发性混标和半挥发性混标都进行了自动化配制测试。结果表明，大多数情况下，工作台可提供与人工制备水平相当甚至更准确的测定结果。即便对挥发性组分，由于工作台在加入内标物时会刺穿样品瓶密封垫而可能会造成组分损失，测定结果仍十分精确。

样品制备工作台对于需要可靠和准确移液的自动化应用来说，是一款非常有用的工具，包括生产环节中的质量控制过程。

主要优势：

- 消除了人工制备中固有的随机误差
- 准确度与人工制备相当或更胜一筹
- 可将质控方法存于工作台软件中便于快速调用
- 界面友好的软件模板易于操作
- 条形码阅读器便于样品追踪

该报告由 ULTRA Scientific 公司的 Scott A. Lorimer 和安捷伦科技的 Jared Bushey 合作出版。

使用安捷伦工作台制备质量控制样品的方法

方法步骤：

1. 向后进样塔上的空样品瓶 1 中加入 315 µL 二氯甲烷（挥发性标准物质）或甲醇（半挥发性标准物质）。
2. 向前进样塔上的空样品瓶 1 中加入 35 µL 样品。
3. 向前进样塔上的空样品瓶 1 中加入 35 µL 联苯（挥发性标准物质）或氟代苯（半挥发性标准物质）作为内标物。
4. 以 2000 转/分钟的转速混匀空样品瓶 1，自旋 5 秒，双向旋转 2 圈。
5. 标记空样品瓶 1 为“结果”。

工作台配置：

前进样针规格	100 µL
后进样针规格	500 µL
条形码加热器	50 ° C

根据下式计算 QC 样品中各组分的含量：

$$\left(\frac{\left(\frac{\text{组分峰面积}}{\text{内标峰面积}}\right)_{\text{样品}}}{\left(\frac{\text{组分峰面积}}{\text{内标峰面积}}\right)_{\text{校准标准样品}}}\right) \times (\text{内标物浓度})_{\text{样品}}$$

一次生产运行中 QC 样品的准确度结果分析*

挥发性标准物列表

标准物质	人工制备误差 %	工作台制备误差 %
2-甲基吡啶	-1.1960	0.6202
苯乙酮	-3.2765	0.3384
N-亚硝基哌啶	-3.3925	-2.6848
分特拉明	0.9115	1.0354
N-亚硝基二丁胺	-0.2920	0.2560
1,2,4,5-四氯苯	-0.8785	0.8129
1-氯萘	9.4015	0.1805
五氯苯	-2.2000	0.7535
二苯胺	-0.0380	-0.4711
非那西汀	-2.1165	2.0917
4-氨基联苯	-9.6435	5.1187
五氯硝基苯	-2.5130	1.0443
拿草特	-3.7865	2.5000
对二甲氨基偶氮苯	2.1465	3.1419
7,12-二甲基苯并[α]蒽	-1.5785	0.0849
3-甲基胆蒽	1.6965	-0.4717
二苯并(A,J)丫啶	2.2478	1.7602

半挥发标准物列表

标准物质	人工制备误差 %	工作台制备误差 %
1,1-二氯乙烯	-7.7578	-1.0566
反式-1,2-二氯乙烯	-1.4115	-3.8288
顺式-1,2-二氯乙烯	3.0163	-1.6658
苯	3.1771	-0.5289
三氯乙烯	3.2273	-5.9651
顺式-1,3-二氯丙烯	5.7795	-4.1192
甲苯	4.5507	-1.5242
反式-1,3-二氯丙烯	6.4737	-2.8953
四氯乙烯	4.1876	-4.7692
氯苯	7.0025	-1.8823
乙苯	6.4856	-0.9086
间/对二甲苯	6.5132	-1.9300

*准确度定义为由校准曲线得到的样品中的指定组分测定值与实际值之间的误差 %

更多信息：
www.agilent.com/chem/cn

Email：
customer-cn@agilent.com

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus:cn

本书中的信息、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，2012

2012 年 1 月 6 日，中国印刷
5990-9671CHCN

Agilent Technologies

利用批量模式的样品前处理提高分析效率

应用简报

作者

Rebecca Veeneman
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Rd.
Wilmington，DE 19808
USA

摘要

使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台进行批量模式的样品前处理，可使时间和资源都得到极大的节约。本应用简报在非批量模式和批量模式下执行了常规的样品前处理工作，并将完成每个样品所需的清洗溶剂用量和时间进行了对比。

Agilent Technologies

前言

Agilent 7696A 自动化样品前处理工作台可以针对气相色谱 (GC) 或液相色谱 (LC) 分析执行多种样品前处理任务。工作台包括两个液体分配模块、一个可达到 80 °C 的样品瓶加热器、一个样品瓶涡旋混合器和条形码读取器（图 1）这一装置可以进行稀释/等分、液体添加、样品加热、液液萃取和样品混合等操作。可对单个样品架进行加热或冷却。此样品前处理仪器在脱机设置下执行任务，而不必安装在气相色谱系统的顶部，并实现与 7693A 自动液体进样器 [1] 相同的准确度和精度。

图 1.　Agilent 7696A 样品前处理工作台

Agilent 7696A 样品前处理工作台使用 Easy SamplePrep 模式极大地简化了样品前处理的设定过程。Easy SamplePrep (ESP) 具有基于图标的程序设定功能和资源管理器。利用拖放编辑器，用户可以通过像遵循实验室记录本上的方案和说明那样的方式创建样品前处理方法。ESP 还可以通过文本方式显示样品前处理步骤。ESP 操作有两种模式，分别是批量模式和非批量模式。非批量模式单独地按顺序处理每个样品，也就是对一个样品执行所有步骤，完成该样品的前处理后再转到下一个样品。相反，批量模式则是平行处理所有样品，即对所有样品执行完一个步骤后，再进行下一个样品前处理步骤，从而在大致相同的时间里完成所有样品的前处理。

使用非批量和批量两种模式为脂肪酸的酯化进行自动化前处理 [2]。记录每个操作模式的清洗溶剂用量以及完成样品前处理所需的时间。

结果与讨论

批量模式处理显著地节省了时间和资源（表 1）。使用 [2] 中所述的方法对六个样品进行前处理，在非批量模式下每个样品需要 45 min（完成所有六个样品共需 270 min）。当使用软件中的批量模式时，所有六个样品在 138 min 内便完成了前处理，平均每个样品耗时 23 min。对于批量模式而言，节省时间的最大原因是可以将所有样品都转移到加热样品架上，静置反应 20 min，然后将所有样品返回原位。在该模式下，所有样品可以同时进行反应（加热），相较之下，非批量模式采用的是单个样品瓶加热器，需要将样品单独反应/加热 20 min。

表 1.　时间和资源节省量

批次规格 n = 6	非批量模式	批量模式	改善度
程序步骤数	12	12	n/a
清洗步骤	9	9	n/a
总清洗次数	54	9	1/n（n 倍）
总耗时	4.5 h	2.3 h	~50%
每个样品耗时	45 min	23 min	~50%
清洗溶剂体积	15.3 mL	2.55 mL	1/n（n 倍）

同样地，在清洗溶剂用量方面，批量模式的优势也显而易见。使用批量模式处理样品，仅需要九个清洗步骤，共消耗溶剂 2.6 mL。在非批量模式下制备六个样品，仍采用九个清洗步骤，但需要重复六次，一共 54 步，消耗溶剂 15.3 mL。对比之下，使用批量模式处理样品，清洗溶剂的用量减少了六倍。

结论

通过对比使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台开发的样品前处理方法的批量模式处理和非批量模式处理，证实了使用批量模式处理样品的优势。批量处理节约了每个样品的处理时间。在本例中，批量模式使样品处理加快了两倍。此外，批量模式显著减少了清洗溶剂的消耗。使用批量模式，清洗步骤减少了 n 倍（n 为样品数量），清洗溶剂的用量也减少了 n 倍。如果样品为六个，相当于清洗溶剂用量节约了 6 倍，即 2.6 mL，而在非批量模式下则需要 15.3 mL。这会使资源得到大幅的节省，尤其是在仪器分析通量增高的情况下。

参考文献

1. Susanne Moyer、Dale Synder、Rebecca Veeneman 和 Bill Wilson，“Typical Injection Performance for the Agilent 7693A Autoinjector”（Agilent 7693A 自动进样器的典型进样性能），安捷伦科技有限公司，出版号 5990-4606EN

2. Rebecca Veeneman，“Improving the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters Using Automated Sample Preparation Techniques”（使用自动化样品前处理技术改善脂肪酸甲酯的分析能力），安捷伦科技有限公司，出版号 5990-6873EN

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2011
2011 年 12 月 21 日，中国印刷
5990-9271CHCN

Agilent Technologies

Agilent 7696A 样品制备工作台备件

快速参考指南

适用于安捷伦仪器的安捷伦备件

安捷伦一直致力于优化实验室的分析效率，因此我们列出了 Agilent 7696A 样品制备工作台最常订购的备件和部件清单。该型工作台以独立仪器的形式，将繁琐的 HPLC、GC、LC/MS 和 GC/MS 样品制备步骤转换为自动化操作。

样品瓶

描述	颜色	单位	部件号
2 mL 广口螺纹口样品瓶	透明	100/包	5182-0714
		1000/盒	5183-2067
	透明，带书写签	100/盒	5182-0715
		1000/盒	5183-2068
	棕色	100/包	5188-6535
		1000/盒	5188-6536
	琥珀色，带书写签	100/包	5182-0716
		1000/盒	5183-2069

螺口盖

描述	隔垫类型：	单位	部件号
彩色螺纹盖套装	PTFE/硅橡胶	每种颜色 50/包：蓝色，绿色，红色，浅蓝绿色，紫色	5040-4682
预穿孔	PTFE/白色硅橡胶	100/包	5183-2074

推杆

描述	体线圈	部件号
推杆，PTFE 头，固定针头，23/42/HP	500	G4513-60561
推杆，PTFE 头，固定针头，23-26s/42/HP	100	G4513-80222
推杆，PTFE 头，固定针头，23-26/42/HP	10	G4513-80203

标签和色带

描述	单位	部件号
用于 2 mL 样品瓶的色带和标签	2500/卷	5190-3177
仅适用于 2 mL 样品瓶的标签	2500/卷	5190-3180
条形码标签打印套件 包括用于打印条形码标签的打印机、软件、模板和标签	1	G9201AA

安捷伦备件帮助您获得需要的结果

安捷伦的备件和附件，在细节处体现非凡。我们的所有产品都经过仪器设计团队的设计或挑选，按照我们要求的技术指标生产，并在各种不同的条件下进行严格测试。这些努力的成果——获得 ISO 9001 认证——确保了每一个部件的最佳性能。

为何要冒着破坏分析结果的风险而去使用非安捷伦原厂部件？

www.agilent.com/chem/supplies:cn

节省查找样品瓶和密封件的时间

使用在线交互工具轻松快速查找最适合您应用的样品瓶和密封件：

www.agilent.com/chem/SelectVials

www.agilent.com/chem/cn

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

2013 年 7 月 15 日，中国印刷

5991-2500CHCN

Agilent Technologies

分析结果的可靠性取决于样品前处理过程

Agilent 7696A 样品制备工作台将精密的自动化操作与简单直观的软件整合在一起，帮助您：

- 自动化完成重复性的手动样品制备步骤
- 大幅节省玻璃器皿、溶剂、试剂和溶剂处理的成本，精密度和重现性同样出色
- 显著减少因分析人员之间的操作差异而导致的重复工作
- 提高工作效率并降低样品的分析成本
- 最大程度减少与有害化学品的接触
- 自动确认分液重量

更多信息

如需了解有关 Agilent 7696A 样品前处理工作台的更多信息，请访问
agilent.com/chem/workbench

查找当地的安捷伦客户中心：
agilent.com/chem/contactus

安捷伦客户服务中心：免费专线：
800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：
customer-cn@agilent.com

在线询价：
agilent.com/chem/quote:cn

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Printed in China, February 13, 2015
5991-4741CHCH

Agilent Technologies