

使用配备 Quick Change 快速切换阀头的 HPLC-ICP-MS 实现元素形态分析方法的自动序列分析

无人值守切换色谱柱和流动相的多元素形态分析



作者

Aimei Zou¹
Shuofei Dong²
Yuhong Chen²
Chee Sian Gan¹

¹ 安捷伦科技（新加坡）有限公司

² 安捷伦科技（中国）有限公司

前言

ICP-MS 是许多行业对各类样品中的多种元素痕量分析的首选技术。而包括 As、Hg、Cr、Se、Br、I、Sn、Pb 和 Sb 在内的多种元素的迁移率、生物利用率和毒性取决于元素的化学形式或形态^[1-6]。由于存在这些差异，可能需要进行形态分析（在通过 ICP-MS 进行测量之前对不同的化学形态进行色谱分离）从而实现风险的全面评估。形态分析对涉及安全问题的样品（如食品、环境样品和消费品）尤其重要。

为确保消费者和环境的安全，许多行业和产品都受到与元素形态有关的法规或指南的约束。例如，对于砷，世界卫生组织 (WHO) 建议食品和饮用水中无机砷 (iAs) 的最高浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)^[2]。欧盟 (EU) 和美国食品药品监督管理局 (US FDA) 均公布了果汁和大米产品中 iAs 的最高浓度。2020 年 8 月，FDA 最终确定了关于婴儿米粉中 iAs 的行业指南，将 iAs 的“干预浓度”限值设定为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)^[3]。包括中

国、日本和菲律宾在内的许多国家/地区均对汞形态，特别是甲基汞进行了立法监管。WHO 规定饮用水中溴酸盐的最高指导浓度为 10 µg/L^[2]。此外，还制定了控制饮用水、水泥、皮革和儿童玩具等产品中六价铬 (Cr(VI)) 含量的法规。Cr(VI) 是有害的，而 Cr(III) 是必需的营养物质，因此有必要通过形态分析确定不同形式的浓度，从而确保符合法规要求。

为了满足当前和未来可能的法规要求，实验室需要快速、自动化、可靠且灵活的方案来测定多种元素的不同形态。连接到 ICP-MS 的高效液相色谱 (HPLC) 凭借其出色的选择性和灵敏度，成为元素形态分析中应用最广泛的技术^[4-10]。通过优化的接口和集成的软件控制，安捷伦 ICP-MS 和 ICP-MS/MS 可与安捷伦 HPLC 系统轻松连接^[7]。联用系统由 Agilent ICP-MS MassHunter 软件控制，简化了方法开发、数据采集和数据报告的工作流程。

HPLC-ICP-MS 方法通常用于检测可以在一根色谱柱上分离的形态，这通常意味着它们被限于测量单个元素的不同形式。但是，实验室通常需要对每个样品中的多种元素进行形态分析，例如监测海产品中的 As、Sn 和 Hg 形态。虽然可以使用相同的色谱柱和流动相成功检测一些不同的元素的形态，但是这种方法可能会因为兼顾不同元素形态，从而导致方法的效能下降。实验室可能还需要针对不同的样品类型运行多种形态分析方法，或在方法开发过程中评估多种色谱柱和流动相。在这些情况下，使用配备 Quick Change 快速切换阀的 HPLC-ICP-MS 系统在不同形态分析方法之间自动切换，可以提高分析效率和灵活性，同时还可实现无人值守的过夜运行。安捷伦提供一系列色谱柱选择阀阀头，它们可以在 2、4、6、8 个色谱柱位置之间进行切换。还提供了溶剂选择阀，可在多达 12 种不同的流动相之间进行切换。

配备 Quick Change 快速切换阀头的集成式 HPLC-ICP-MS 的优势包括：

- 使用不同的色谱柱和流动相实现多种形态分析方法的自动序列分析。这种方法可节省时间、试剂和成本，并通过最大程度减少样品处理来减少错误
- 通过自定义队列顺序，独立控制多达 8 种形态分析方法，从而实现操作的灵活性。通过自动切换色谱柱和溶剂，可以在一个无人值守序列中运行所有方法
- 支持方法开发，尤其是确定用于分离目标形态的最佳色谱柱或流动相。可以在进行新方法开发的同时，在检测序列里运行常规元素形态分析方法

在本研究中，我们使用配备 Quick Change 快速切换阀头的 HPLC-ICP-MS 系统对三种不同形态分析方法进行了自动序列分析测试，以评估该系统的灵活性、性能和稳定性。该套 HPLC-ICP-MS 系统，使用之前研究开发的方法，对无机砷、甲基汞、溴和碘形态进行了测定^[8-10]。

实验部分

试剂与溶剂

本研究中使用的所有试剂均购自 Sigma-Aldrich。将适量的亚砷酸钠和砷酸钠 (ACS 级，纯度 > 99%) 溶于 1% HNO₃ 中，制得 1000 ppm 的 As(III) 和 As(V) 储备液。使用甲基汞 (II) (氯化物) (ACS 级，纯度 > 99.5%) 配制 100 ppm 的储备液。分别以溴化钠、溴酸钠、碘化钾、碘酸钾为原料配制溴化物、溴酸盐、碘化物和碘酸盐的单独溶液 (ACS 级，纯度 > 99%)。将适量的每种卤化物盐溶于 Milli-Q 去离子水 (DIW, 18.2 MΩ·cm) 中，得到每种目标形态浓度为 1000 ppm 的储备液。表 2 列出了三种分析方法以及一种色谱柱冲洗方法中所用流动相的详细信息。

标样配制

使用 DIW 分别稀释每组元素形态的储备液，制得表 1 所列浓度的三个校准标样。

表 1. 配制的 As(III)、As(V)、MeHg(II)、Br⁻、BrO₃⁻、I⁻ 和 IO₃⁻ 标准溶液浓度

校准浓度	As(III)/As(V) 混合物 (ppb)	MeHg(II) (ppb)	Br ⁻ /BrO ₃ ⁻ /I ⁻ /IO ₃ ⁻ 混合物 (ppb)
1	0.5/0.5	0.25	0.5/0.5/0.25/0.125
2	1.0/1.0	0.5	1.0/1.0/0.5/0.25
3	2.0/2.0	1.0	2.0/2.0/1.0/0.5

仪器

本研究使用配备四元泵和 InfinityLab Quick Change 4 色谱柱选择阀快速切换阀头 (部件号 G4237A) 的 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统。使用安捷伦液相色谱连接工具包 (部件号 G1833-65200) 将 HPLC 与 Agilent 7900 ICP-MS 连接。该仪器的示意图如图 1 所示。在序列分析过程中, Agilent ICP-MS MassHunter 软件根据操作人员的设定, 为每种形态分析方法选择合适的 HPLC 色谱柱和流动相, 并在序列中自动切换。

四元泵可处理多达 4 种流动相, 足以用于本研究中测量的 7 种形态 (4 种元素)。对于需要 4 种以上流动相的分析, 可以增加一个 12 位/13 通溶剂选择阀 (部件号 G4235A)。同样, 当实验室需要运行使用多达 8 根不同色谱柱的方法时, 可以使用可选的 Quick Change 8 色谱柱选择阀快速切换阀头 (部件号 G4239C) 代替 4 色谱柱选择阀。

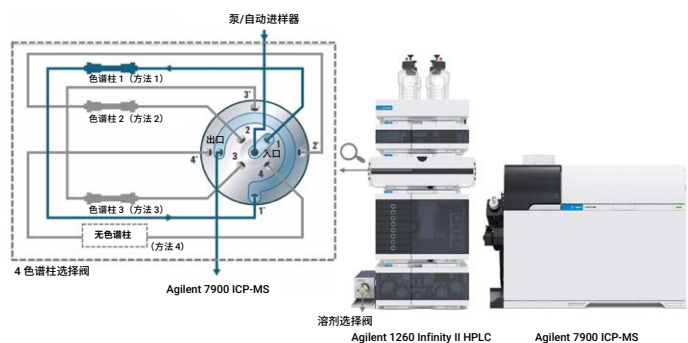


图 1. 本研究中使用的配备 Quick Change 快速切换阀头的 HPLC-ICP-MS 系统示意图。4 色谱柱选择阀阀头和四元泵实现了不同 HPLC 色谱柱和溶剂的自动选择

多序列采集方法

如表 2 所示, 本形态分析序列中包含着被清洗步骤分离的三种分析方法。阀端口 1-3 连接到各自的形态分析方法色谱柱, 阀端口 4 用于使用 DIW 冲洗系统。三种形态分析方法各自的 HPLC 和 ICP-MS 操作条件和参数另行提供^[8-10]。根据不同元素的采集质量数, 每种 HPLC 方法均采用适当的 ICP-MS 运行条件。

表 2. 多方法采集序列中使用的单独方法的详细信息

方法名称	详细信息	阀位置	流动相	色谱柱
形态 1	无机 As(III) 和 As(V) 的形态	1	2.0 mmol/L PBS/0.2 mmol/L EDTA/10 mmol/L CH ₃ COONa/3.0 mmol/L NaNO ₃ /2% 乙醇, 用 NaOH 将 pH 调节为 11.0 运行时间: 10 分钟	阴离子交换色谱柱, 安捷伦部件号 G3288-80000
形态 2	MeHg(II) (CH ₃ Hg) 的形态	2	2% 甲醇/0.5g/L L-半胱氨酸, 用 HCl 将 pH 调节为 2.3 运行时间: 4 分钟	ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 安捷伦部件号 959941-902
形态 3	溴化物、溴酸盐、碘化物和碘酸盐的形态	3	5.0 mmol/L NaH ₂ PO ₄ /15.0 mmol/L Na ₂ SO ₄ /5.0 mmol/L EDTA 运行时间: 8 分钟	阴离子交换色谱柱, 安捷伦部件号 G3268-80001
清洗溶液 4	冲洗 HPLC 系统	4	DIW 运行时间: 10 分钟	无需使用色谱柱

为了证明自动色谱柱切换在常规无人值守分析中的灵活性, 三种形态分析方法在三天时间中以不同的序列顺序运行, 如图 3 所示。在每天的序列开始和每种形态分析方法之后, 采用清洗序列, 用连续的 DIW 流冲洗 HPLC-ICP-MS 10 分钟。对于兼容的色谱柱和流动相, 无需应用单独的清洗序列, 而是在每个批次开始时先运行空白样, 确保更换的新方法的稳定性。通过三天的测试, 评估了砷、汞、溴和碘的形态分析方法的性能, 包括标样的线性关系、回收率和精度。

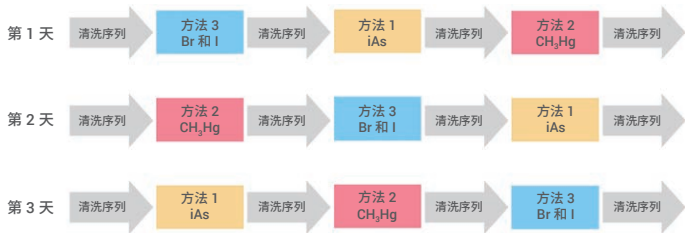


图2. 自动化多方法 HPLC-ICP-MS 序列在三天内的实验流程图

结果与讨论

基于图2所示的工作流程，对配备 Quick Change 快速切换阀头的 HPLC-ICP-MS 系统的性能进行了评估。在三天中，每一天都按照不同的顺序运行三个分析方法批次，并间隔运行清洗序列。每个方法批次包括三个校准浓度的各3次进样，以及空白样品的4次进样，因此三个批次共39次进样。加上图2所示的间隔加入的4次清洗进样，每天的序列总共43次进样。无论方法的运行顺序如何，每个序列均在5.5小时内完成。

以第2天的序列为例，图3概述了由 ICP-MS MassHunter 软件控制的自动化程序和队列顺序。图3中的示意图显示了如何设置基于 Quick Change 快速切换阀的 HPLC-ICP-MS 系统，以用户定义的顺序对多个批次进行常规无人值守分析。与通过手动切换色谱柱单独运行方法相比，在一个 HPLC 系统上依次运行不同方法可以显著提高形态分析的效率并缩短周期。基于切换阀的 HPLC-ICP-MS 系统的灵活性意味着可根据实验室的要求，在一台仪器上依次运行多达8种形态分析方法。

校准的线性

通过在三天内分三个批次测量 As(III) 和 As(V)、CH₃Hg 以及 Br⁻、BrO₃⁻、I⁻、IO₃⁻ 的标准溶液进行校准。每天测量每个校准浓度的三次重复进样。在三天内，所有分析物均具有出色的线性。第1天获得的所有形态的代表性校准曲线均具有出色的线性，R 大于 0.9995 (图4)。

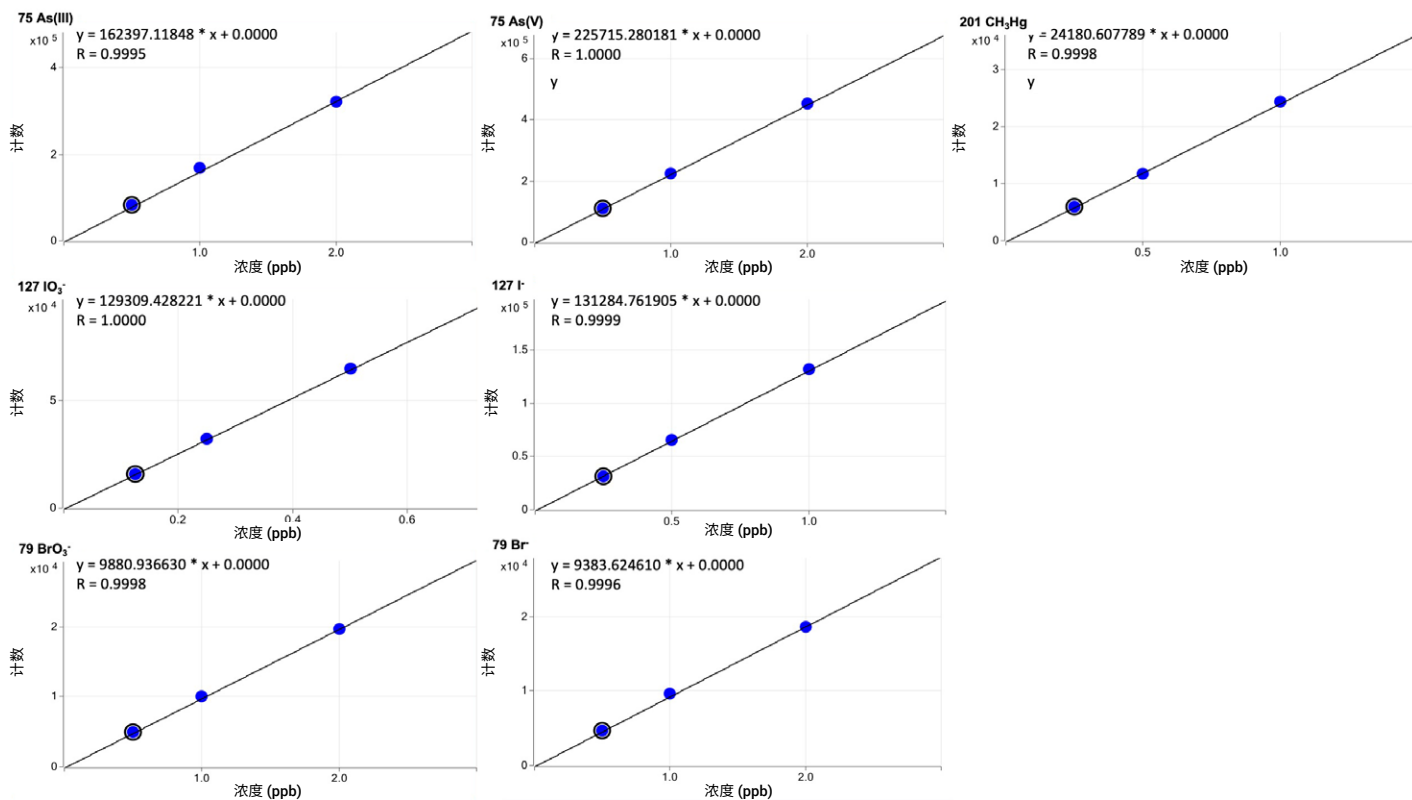
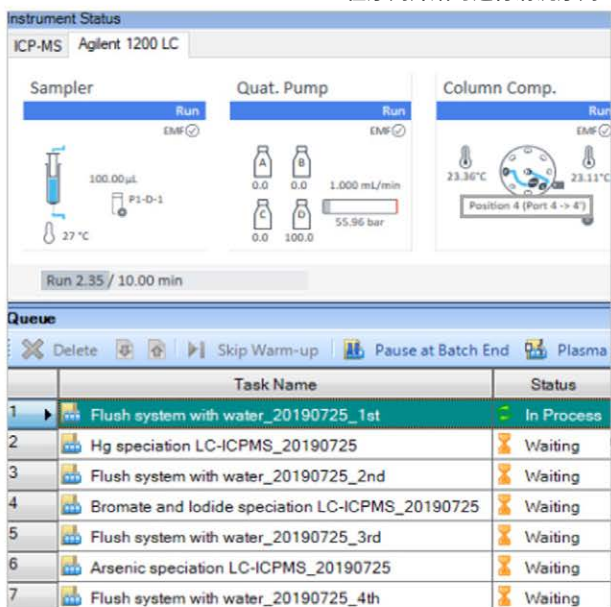
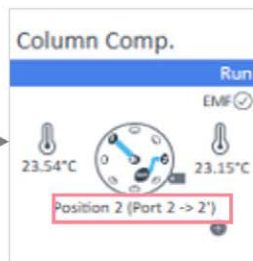


图4. 校准曲线呈良好的线性关系。上图：As(III)、As(V)和CH₃Hg；中图：IO₃⁻和I⁻；下图：BrO₃⁻和Br⁻

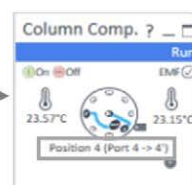
在序列开始时运行清洗序列



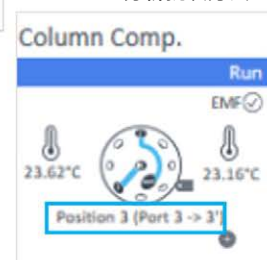
分析批次方法 2



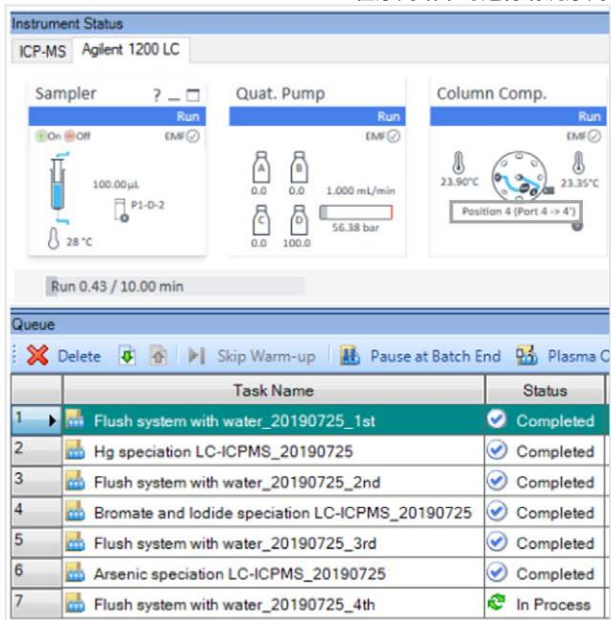
清洗序列



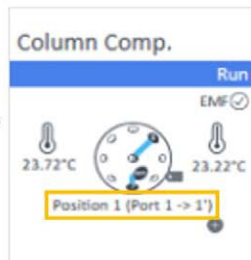
分析批次方法 3



在序列结束时运行清洗序列



分析批次方法 1



清洗序列

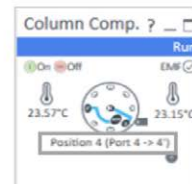


图 3. 由 ICP-MS MassHunter 软件控制的自动化 HPLC-ICP-MS 程序示意图

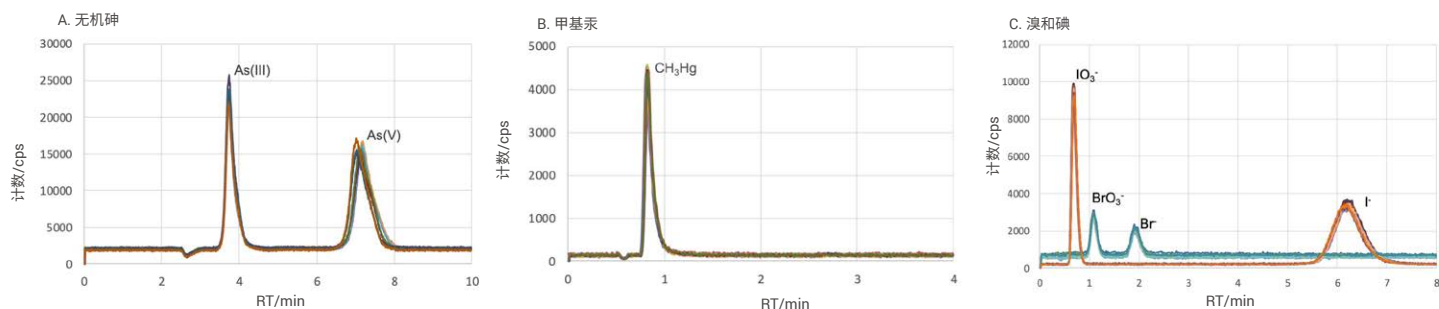


图 5. 9 次进样校准标样 3 得到的 A: 无机砷、B: 甲基汞和 C: 溴和碘形态的叠加色谱图。在三天内表现出出色的保留时间和峰面积稳定性。每幅色谱图 n = 9

所测元素形态的日间稳定性

图 5 显示了三天内 9 次进样校准标样-3 测量 iAs、CH₃Hg、IO₃⁻、I⁻、BrO₃⁻ 和 Br⁻ 得到的叠加色谱图。在每天的序列中，使用最佳色谱柱和流动相条件对所有形态进行了分离和测量，并在运行过程中进行自动切换。三天内的出色重现性证明了配备 Quick Change 快速切换阀的多批次 HPLC-ICP-MS 方法的稳定性和适用性。

标准溶液的回收率

在三种浓度水平下，根据校准曲线的计算浓度与预期浓度的比值，得到所有元素形态的回收率。3 天内测定的所有形态的回收率均处于 90%–110% 的范围内，如图 6 所示。结果证实了基于 Quick Change 快速切换阀的 HPLC-ICP-MS 系统生成数据的稳定性和准确性。

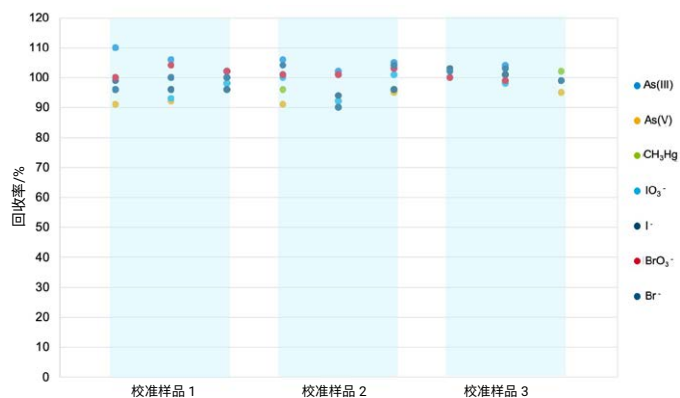


图 6. 三天内三种浓度下测量的所有元素形态的回收率值

精度

根据每个校准浓度的三次重复进样的峰面积测定值的变化，使用日内重现性 (RSD_i) 和日间重现性 (RSD_{IR}) 计算方法精度。通过计算同一天 3 次进样各校准标样得到的峰面积相对标准偏差百分比 (%RSD)，确定日内重现性 (用 RSD_i 表示)。所有形态的 RSD_i 值均 ≤ 8%。

将三天内测量每个浓度水平总共 9 次进样得到的峰面积 %RSD 作为日间重现性 (以 RSD_{IR} 表示)。所有元素形态的 RSD_{IR} 值均 ≤ 10%，如表 3 所示。日间重现性不受形态分析方法的队列顺序影响，证明了基于阀的自动 HPLC-ICP-MS 方法的稳定性。

表 3. 在三种浓度水平下测得的所有元素形态的峰面积日间重现性

校准浓度	峰面积 RSD _{IR} (%)						
	As(III)	As(V)	CH ₃ Hg	IO ₃ ⁻	BrO ₃ ⁻	Br ⁻	I ⁻
校准样品 1	2	6	7	5	4	3	5
校准样品 2	4	6	9	8	6	10	8
校准样品 3	3	4	7	5	5	5	4

交叉污染评估

评估了在每种形态分析方法后，用 DIW 去除液相色谱流路中所有残留或污染物的有效性。图 7 中的色谱图由第 2 天 3 次单独清洗序列运行获得，表明在每次运行中，不同形态分析方法之间的交叉污染降低到了可接受的水平 (< 2%)。

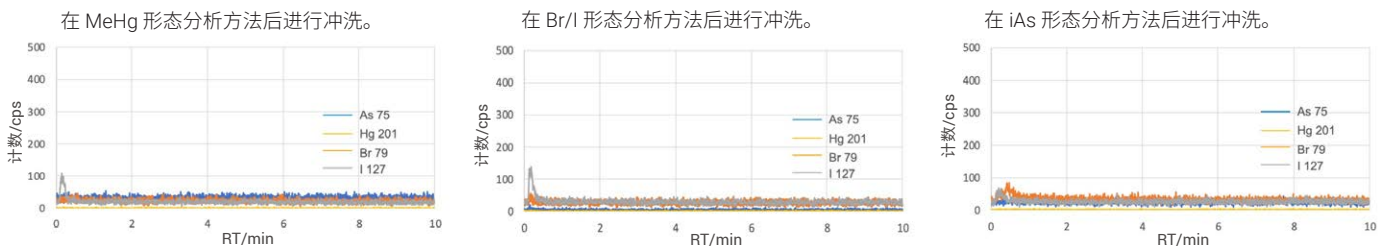


图 7. 清洗序列中的背景信号证实了第 2 天分析方法运行之间的交叉污染极少

结论

应用 Agilent 7900 ICP-MS 与 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱的联用系统，可以自动运行需要不同色谱柱和流动相的多种形态分析方法。HPLC 配备 Agilent Quick Change 色谱柱选择阀快速切换阀头，无需手动断开和重新连接不同的色谱柱。

运行了可测量 As(III) 和 As(V); CH₃Hg; 以及 Br⁻、BrO₃⁻、I⁻ 和 IO₃⁻ 的三种形态分析方法。使用 ICP-MS MassHunter 控制色谱柱选择阀，通过自动定位合适的色谱柱，选择三种形态分析方法和清洗循环的队列顺序。每天运行多种形态分析方法，并在三天内采用不同的方法队列顺序，均获得了出色的精度、回收率、重复性和重现性。

在分析人员完成色谱柱设置和流动相配制，并将样品加载到自动进样器中后，配备 Quick Change 快速切换阀头的 HPLC-ICP-MS 即可运行多达 8 种形态分析方法。可以将多种形态分析方法依次应用于相同的样品，或可以使用不同的方法依次分析不同批次的样品。对于关注多元素形态分析的应用，不同方法之间的自动切换可提高分析效率、缩短周期并降低运行成本，满足许多实验室的重点关注要素。

参考文献

1. P. Apostoli et al., Elemental speciation in human health risk assessment, World Health Organization 2006, accessed November 2020, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc234.pdf>
2. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization; **2017**. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
3. US FDA, Guidance for Industry: Action Level for Inorganic Arsenic in Rice Cereals for Infants, accessed November 2020, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-level-inorganic-arsenic-rice-cereals-infants>
4. K. L. Ackley, J. A. Caruso, Separation Techniques, in: R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann (Eds.), Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology, Wiley, England, **2003**
5. C. A. Ponce de León, M. Montes-Bayón, J. A. Caruso, Elemental Speciation by Chromatographic Separation with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection, *J. Chromatogr. A* 974, **2002**, 1–21
6. M. Marcinkowska, D. Barańkiewicz, Multielemental Speciation Analysis by Advanced Hyphenated Technique – HPLC/ICP-MS: A review, *Talanta*, 161, **2016**, 177–204
7. Handbook of Hyphenated ICP-MS Applications (ICP-MS 联用技术应用手册)，安捷伦出版物，[5990-9473EN](#)
8. M. Tanoshima, T. Sakai, E. McCurdy, 采用 Agilent 8800 ICP-MS/MS 通过 HPLC-ICP-MS 方法进行苹果汁中砷的形态分析，安捷伦出版物，[5991-0622CHCN](#)
9. S. Sannac, Y.H. Chen, R. Wahlen, E. McCurdy, 应用 HPLC-ICP-MS 联用技术进行食品中汞形态分析的优势，安捷伦出版物，[5991-0066CHCN](#)
10. J. Nelson, S.F. Dong, M. Yamanaka, 使用 HPLC-ICP-MS 对婴儿配方奶中的碘和溴进行同步形态分析：在 6.5 分钟内测定四种卤素形态，安捷伦出版物，[5994-0843ZHCN](#)

www.agilent.com

DE44180.0443634259

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 1 月 22 日，中国出版
5994-2943ZHCN