技术概述

Agilent
Trusted Answers

柱流失对 GC/MS 数据有何影响以及如何控制柱流失?

前言

了解柱流失

柱流失仍然是质谱 (MS) 数据中最常见但易被误解的现象之一。柱流失会导致色谱基线升高并产生质谱干扰，从而降低数据的质量和可信度。要了解柱流失，首先必须考虑柱流失的来源。虽然色谱柱具有丰富的固定相类型，但目前最常用的色谱柱（例如 1、5 和 624）仍属于涂壁开管柱 (WCOT)。这些色谱柱由熔融石英管（具有不同的内径，以 mm 为单位）组成，内部涂覆有固定相薄膜（具有不同的厚度，以 µm 为单位），如图 1 所示。涂覆的固定相会与分析物相互作用，形成色谱的选择性和保留特性；但这些特性也是柱流失的根源。

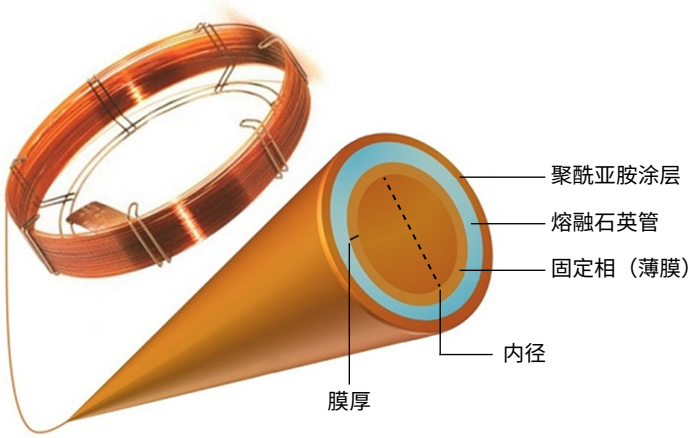


图 1. WCOT 熔融石英气相色谱柱的示意图以及典型的色谱柱属性

色谱柱固定相可由具有聚硅氧烷骨架的各种极性的液体聚合物制成。加热时，固定相聚合物的末端开始向后弯曲并自我攻击，这种现象称为“backbiting”。这会导致热力学稳定的环结构开始被释放出来，进而导致噪音增加、基线升高，如图 2 所示。然后这一过程重复。温度越高，反应越快，因此在 300 °C 以上的温度下基线会升高。

对于低信噪比分析物而言，基线升高程度增加可能会带来问题，因为此时峰积分会对数据质量产生不良影响。稳定、平坦的基线有助于峰积分的准确度和重现性。当使用高灵敏度检测器（例如 MS）时，检测器灵敏度的提高会导致检测到的背景噪音和柱流失增加，因此过多的柱流失会影响痕量化合物检测的灵敏度。

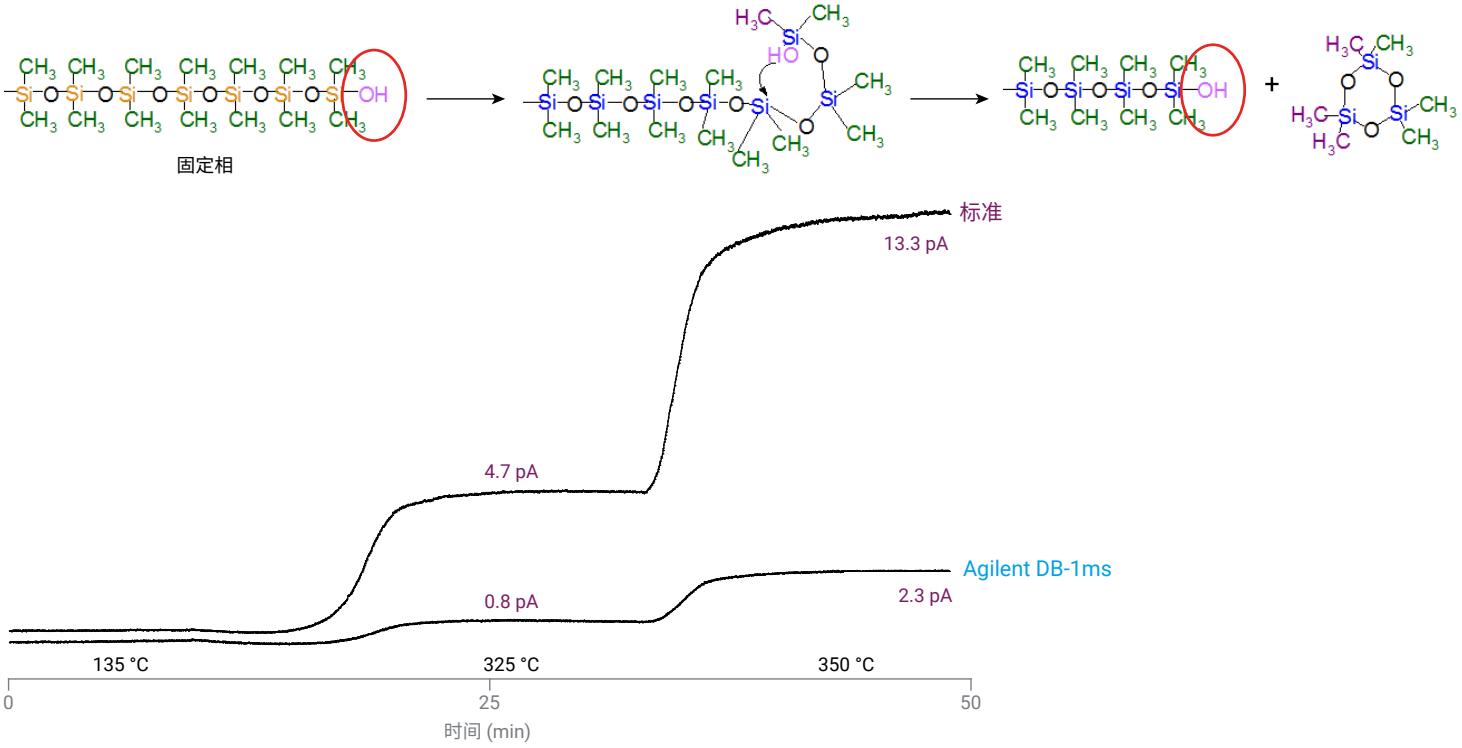


图 2. 柱流失机制，以及“标准”色谱柱与 Agilent J&W DB-1ms 色谱柱的柱流失特性比较

当由于“backbiting”而释放的环结构进入 MS 时，它们也会在离子源中电离，并且可能在质谱图中产生干扰离子。即使是具有不同极性的色谱柱固定相，也很有可能在质谱图中观察到 m/z 207 和 281 离子，如图 3 所示。这些额外的柱流失离子可能会影响分析物的谱图可靠性。因此，强烈建议在 GC/MS 分析中使用低流失色谱柱，对于高灵敏度 GC/TQ 和 GC/Q-TOF 仪器而言尤其如此。

在色谱柱的温度上限下运行

由于温度会显著影响柱流失程度，因此观察气相色谱柱的温度程序非常重要。每款气相色谱柱都有相应的最高允许工作温度 (MAOT)，该温度根据色谱柱固定相的类型而有所不同。这是为了防止色谱柱过早损坏而规定的最高操作温度。最高温度通常用两个数字表示，例如 325/350 °C。第一个较小的数字为恒温分析时的 MAOT。第二个较高的数字为使用程序升温时的 MAOT。在操作限值内运行柱温箱程序，有助于延长色谱柱使用寿命并降低柱流失的影响。

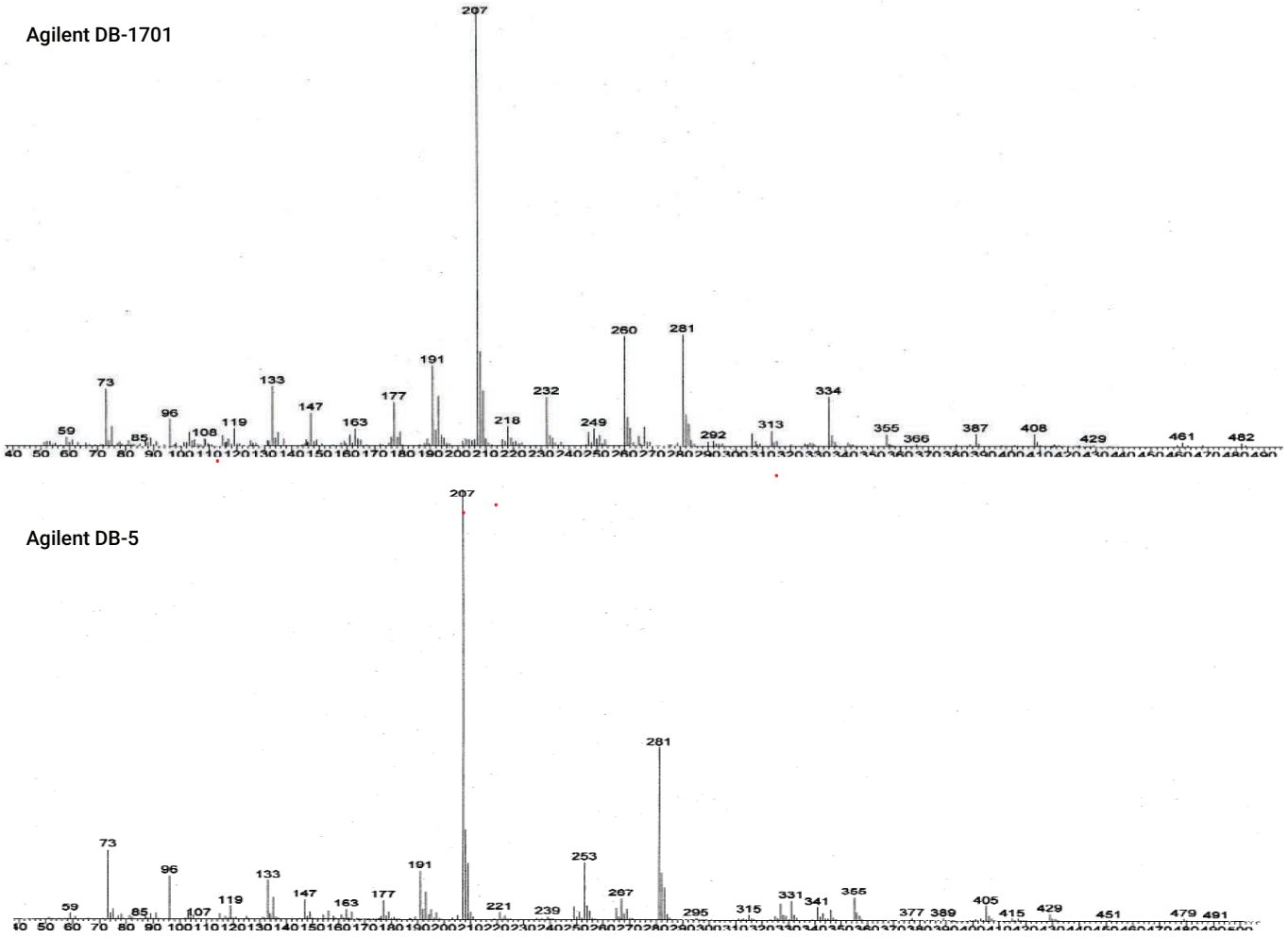


图 3. 具有不同极性的两种气相色谱柱固定相的柱流失质谱图示例[1]

选择专为气质联用系统而设计的色谱柱

1991 年，安捷伦推出了第一款专为低流失 MS 应用而设计的色谱柱 — Agilent J&W DB-5ms。这款色谱柱很快成为 GC/MS 应用的行业标准。如今，GC/MS 灵敏度已大幅提高，并且随着更高灵敏度和精确质量功能的不断进步，这项技术将继续发展。Agilent J&W DB-5Q 和 HP-5Q 气相色谱柱采用超低流失聚合物，可满足现代串联和飞行时间质谱仪的灵敏度和谱图要求。与常规 GC/MS 色谱柱相比，J&W HP-5Q 色谱柱的柱流失明显更低，可获得更稳定的基线，从而实现准确积分，在低信噪比情况下尤其如此。HP-5Q 色谱柱还可显著减少柱流失干扰离子，从而确保分析物的谱图保真度。

实验部分

使用配备火焰离子化检测器 (FID) 的 Agilent 8890 GC 和 Agilent 5977 B 系列 GC/MSD 采集数据。使用 Agilent OpenLab ChemStation 和 MassHunter 采集软件进行数据采集。此外，还使用配备 FID 的 Agilent Intuvo 9000 气相色谱系统来采集数据。将 J&W DB-5Q 和 J&W HP-5Q 气相色谱柱与各种常规的市售 5ms 气相色谱柱进行比较。

表 1 至 8 概述了各种方法的参数。

表 1. 方法 A 的 Agilent 8890 GC 参数

Agilent 8890 GC	
进样口	300 °C，分流模式，分流比 20:1
进样量	0.5 mL
进样口衬管	安捷伦超高惰性低压降分流进样口衬管（部件号 5190-2295）
载气节省	开启，3 min 后 20 mL/min
隔垫吹扫流量	3 mL/min
柱温箱	90 °C (0.5 min)，以 20 °C/min 升至 330 °C (10 min)，以 10 °C/min 升至 340 °C (10 min)，以 10 °C/min 升至 350 °C (30 min)
色谱柱	
载气	氦气，2.0 mL/min，恒流
色谱柱	– Agilent J&W DB-5Q, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 122-5532Q） – Agilent J&W HP-5Q, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 19091S-433Q） – 常规 5ms 色谱柱 X，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm – 常规 5ms 色谱柱 Y，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm
进样口连接	分流/不分流进样口
出口连接	FID

表 2. 方法 A 的 FID 参数

设置	条件
温度	325 °C
H_2 流量	30 mL/min
空气流量	400 mL/min
尾吹气	N_2
尾吹气流量	25 mL/min，色谱柱 + 尾吹气 = 恒定值

表 3. 方法 B 的 Agilent 8890 GC 参数

Agilent 8890 GC	
进样口	300 °C，不分流模式
进样量	0.5 mL
进样口衬管	安捷伦超高惰性低压降分流进样口衬管（部件号 5190-2295）
进样压力	12.37 psi
分流出口吹扫流量	100 mL/min，1.0 min 时
隔垫吹扫流量	3 mL/min
柱温箱	70 °C (1.0 min)，以 20 °C/min 升至 200 °C，以 10 °C/min 升至 330 °C (10 min)，以 10 °C/min 升至 340 °C (10 min)
色谱柱	
载气	氦气，1.3 mL/min，恒流
色谱柱	– Agilent J&W DB-5Q, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 122-5532Q） – 常规 5ms 色谱柱 X，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm – 常规 5ms 色谱柱 Y，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm
进样口连接	分流/不分流进样口
出口连接	MSD

表 4. 方法 B 的 MSD 参数

参数	值
型号	Agilent 5977B GC/MSD
离子源	XTR
模式	扫描 (40–500 amu)
溶剂延迟	4.0 min
离子源温度	300 °C
四极杆温度	175 °C
增益	1.0

表 5. 方法 C 的 Agilent 8890 GC 参数

Agilent 8890 GC	
进样口	250 °C，分流模式，分流比 100:1
进样量	1.0 mL
进样口衬管	安捷伦超高惰性低压降分流进样口衬管（部件号 5190-2295）
载气节省	开启，3 min 后 20 mL/min
隔垫吹扫流量	3 mL/min
柱温箱	50 °C，以 30 °C/min 升至 350 °C (150 min)，以 30 °C/min 升至 50 °C (10 min)
色谱柱	
载气	氦气，2.0 mL/min，恒流
色谱柱	– Agilent J&W HP-5Q, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 122-5532Q） – 常规 5ms 色谱柱 X，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm – 常规 5ms 色谱柱 Y，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm – 常规 5ms 色谱柱 Z，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm
进样口连接	分流/不分流进样口
出口连接	FID

表 6. 方法 C 的 FID 参数

设置	条件
温度	325 °C
H_2 流量	30 mL/min
空气流量	400 mL/min
尾吹气	N_2
尾吹气流量	25 mL/min，色谱柱 + 尾吹气 = 恒定值

表 7. 方法 D 的 Agilent Intuvo 9000 GC 参数

Agilent 9000 GC	
进样口	300 °C，分流模式，分流比 236:1
进样量	0.5 mL
进样口衬管	安捷伦超高惰性低压降分流进样口衬管（部件号 5190-2295）
载气节省	开启，3 min 后 20 mL/min
隔垫吹扫流量	3 mL/min
芯片式保护柱	300 °C，恒温
总线温度	300 °C
柱温箱	65 °C (11 min)，以 20 °C/min 升至 350 °C (30 min)
色谱柱	
载气	氦气，3.27 mL/min，恒流
色谱柱	– Agilent J&W DB-5Q, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 122-5532Q-INT） – Agilent J&W DB-5ms 超高惰性 Intuvo 色谱柱，30 m × 0.25 mm, 0.25 µm（部件号 122-5532UI-INT）
进样口连接	分流/不分流进样口
出口连接	FID

表 8. 方法 D 的 FID 参数

设置	条件
温度	325 °C
H_2 流量	30 mL/min
空气流量	400 mL/min
尾吹气	N_2
尾吹气流量	25 mL/min，色谱柱 + 尾吹气 = 恒定值
检测器 1 尾部 D1	320 °C

结果与讨论

温度上限下的柱流失特性比较

为比较 HP-5Q 色谱柱与常规 5ms 色谱柱的热稳定性，将色谱柱安装在配备双分流/不分流进样口和双 FIDs 的 8890 气相色谱系统上，同时进行实验。确认色谱柱连接正确、无泄漏且经过老化后，将柱温箱温度逐渐升高至 330 °C 和 340 °C，并分别保持 10 min。然后，将柱温箱温度逐渐升高至最终温度 350 °C（色谱柱固定相的程序化 MAOT），并保持 30 min。如图 4 所示，DB-5Q 和 HP-5Q 在温度上限下均保持超低 FID 响应，两者在 340 °C 时的柱流失水平均保持在 1.0 pA 以下。此外，使色谱柱在 350 °C（程序升温最高温度）下运行 10 小时，DB-5Q 和 HP-5Q 的柱流失水平均保持在 2.0 pA 以下，而常规 5ms 色谱柱 X 和 Y 的流失水平分别为 10 pA 和 4 pA，证明 DB-5Q 和 HP-5Q 气相色谱柱具有更高的热稳定性。

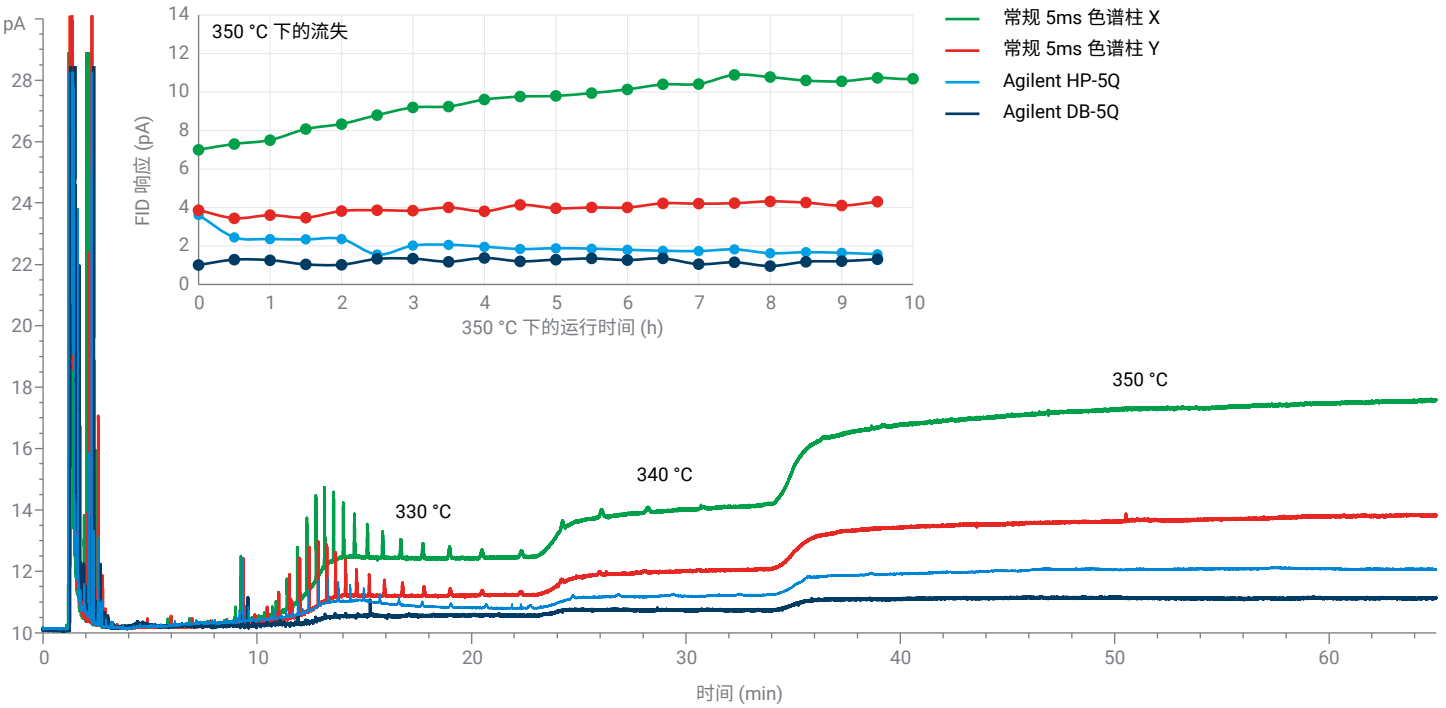


图 4. 使用 GC 方法 A 在 FID 上采集的两种常规 5ms 色谱柱与 Agilent J&W HP-5Q 和 DB-5Q 气相色谱柱的流失特性比较

更高的热稳定性可减少质谱干扰

当使用单四极杆质谱仪时，可通过色谱图中没有出峰的区域的质谱图快照来了解柱流失所造成的质谱干扰。将两根常规 5ms 色谱柱和一根 DB-5Q 色谱柱安装到 5977 系列 GC/MSD 中，并使用 8890 气相色谱系统和方法 B 进行比较。在 330 °C 温度下，于空白基线（无色谱峰干扰）上升处获取质谱图，在不缩放的情况下对质谱图进行比较。如图 5 所示，与 DB-5Q 相比，使用常规 5ms 色谱柱 Y 和 X 时离子 *m/z* 207 和 281 的丰度更高。质谱图干扰离子减少，证明了 DB-5Q 在接近色谱柱使用温度上限的 GCMS 高灵敏度痕量分析应用中，具有更好的热稳定性。

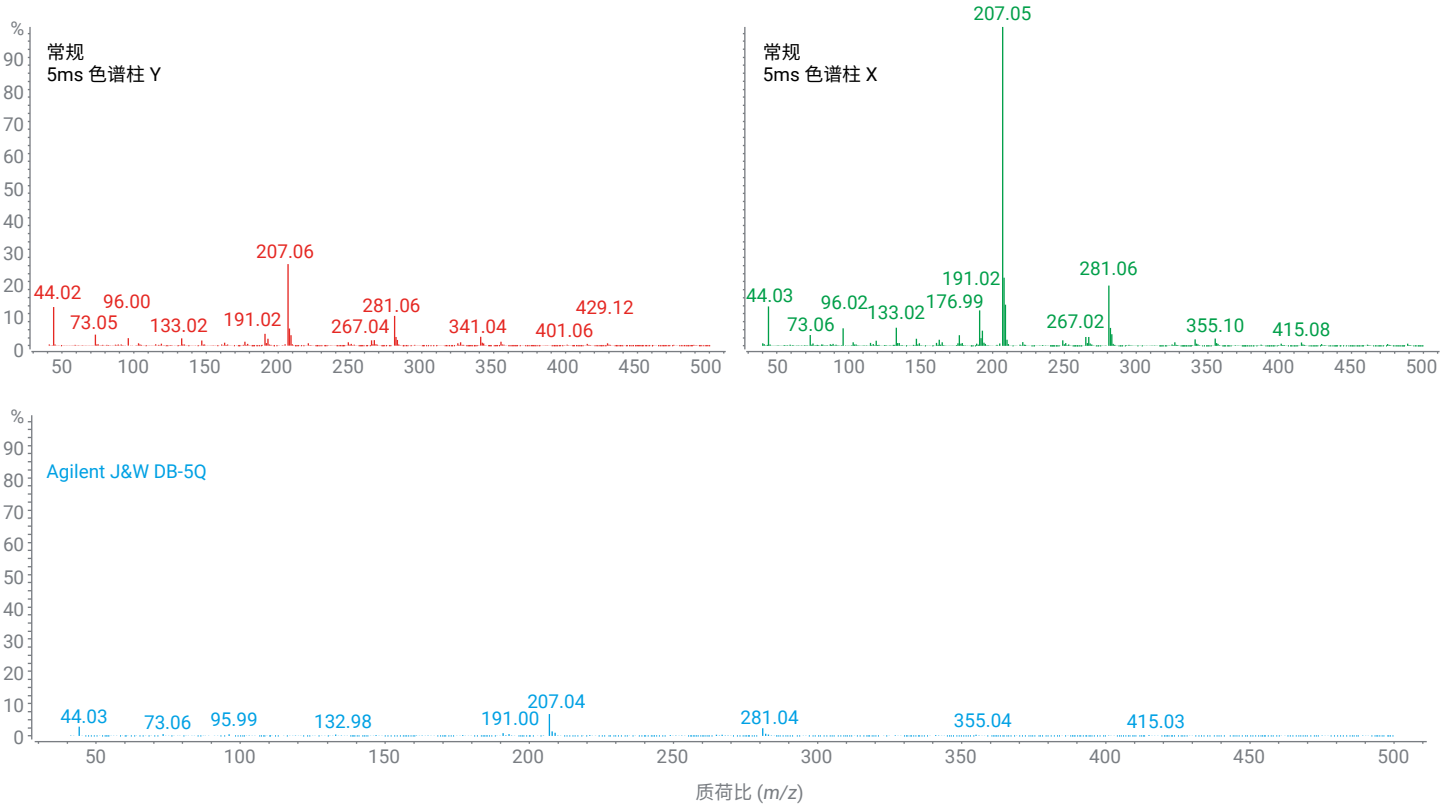


图 5. 使用 Agilent 5977 B 系列 GC/MSD 和 8890 气相色谱系统，按照方法 B 在 330 °C 下采集的常规 5ms 色谱柱 X 和 Y 以及 Agilent J&W DB-5Q 气相色谱柱的柱流失质谱图

正确老化气相色谱柱

首次将色谱柱安装到气相色谱进样口和检测器上时，对色谱柱进行老化非常重要。老化可以防止基线噪音过高，延长色谱柱使用寿命，并为每次运行提供准确的结果。切割并安装好色谱柱后，打开载气并将柱温箱温度设置为 40 °C。在升高温度之前清除色谱柱中的水分和氧气，将大幅减少固定相降解。吹扫完成且确认无泄漏后，在开启柱流速的情况下将温度升高至色谱柱耐受最高温度，但不得超过特定色谱柱固定相和配置的 MAOT。最初，基线将会升高；但是，当色谱柱保持在执行分析所需的最高温度时，基线将会下降并变得稳定和水平。当基线处于水平状态时，表示色谱柱已完成老化。虽然对于不同的色谱柱固定相老化时间可能有所不同，但一般而言，色谱柱固定相的热稳定性越高，老化色谱柱所需的时间越短。

通常，非极性色谱柱（例如 5% 苯基键合相）的老化时间为 2 h。如图 6 所示，HP-5Q 在 350 °C 下进行老化时，1 h 内即可获得水平基线，而常规 5ms 色谱柱 Z 则需要 2 h 才能完成老化。老化 HP-5Q 气相色谱柱所需的时间更短，可以更快速地恢复运行并有助于提高仪器分析效率。

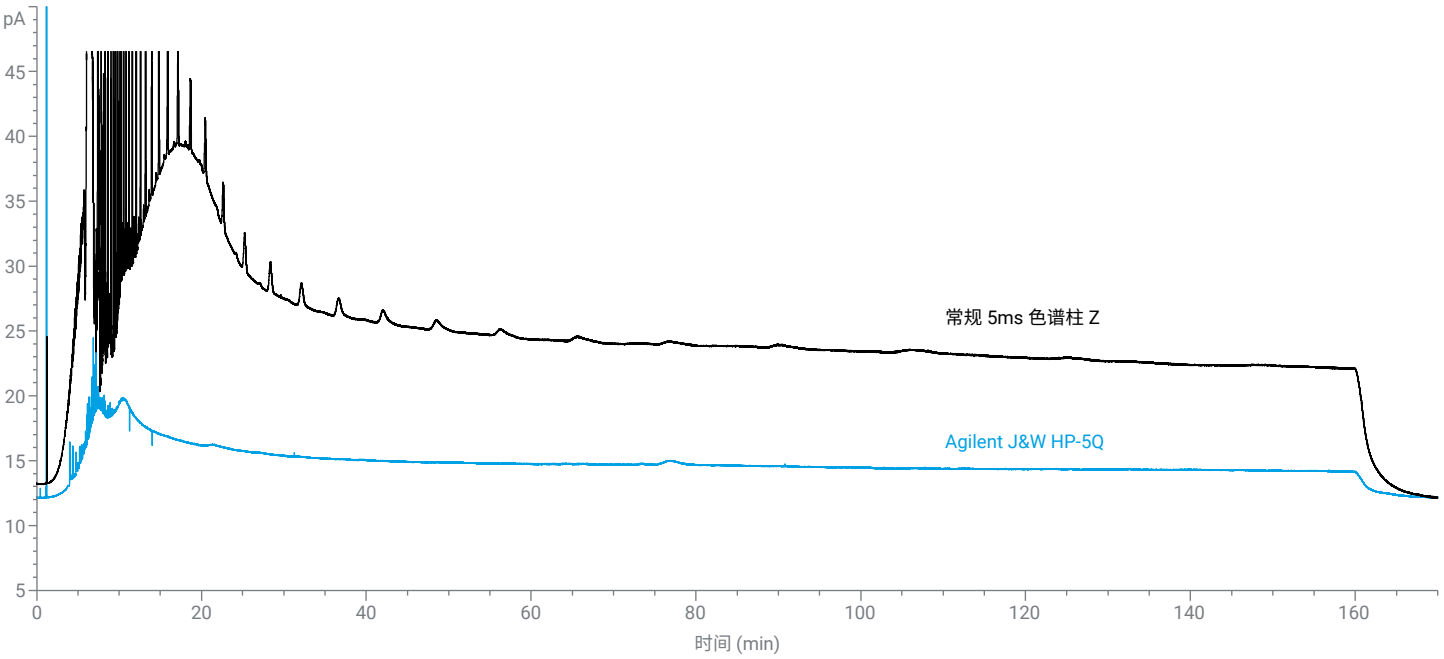


图 6. 利用 FID 按照方法 C 在 350 °C 下采集的常规 5ms 色谱柱 Z 和 Agilent J&W HP-5Q 的老化曲线

柱流失如何影响基线稳定性

在大多数色谱图上，很容易看到柱流失对程序升温方法中高温段的影响，同时，色谱柱热稳定性也会通过基线稳定性对运行开始时间产生影响。GC 采集程序将使用许多指标来确定仪器何时准备好开始下一次进样，例如*柱温箱温度设定值已就绪并平衡*，或者*进样口温度已就绪*。一旦这些参数达到其设定值，即可开始新的进样周期。然而，这并不能说明基线是否已恢复至预期基线。传统的空气浴柱温箱，例如 8890 气相色谱系统所配备的柱温箱，分析周期之间可能需要较长的时间，因为在高温运行后，需要较长的时间才能达到较低的柱温箱温度设定值并实现平衡。因此，上述现象在空气浴柱温箱中并不常见。

然而，Intuvo 9000 气相色谱系统采用快速加热和冷却循环，分析周期之间的时间缩短，这可能导致 GC 在“准备就绪”时，色谱柱基线并未恢复到预期基线，如图 7 所示。

在图 7A 中，在 Agilent J&W DB-5ms UI 上使用常规测试混合物（称为 UBER 混合物）进行初始进样。在所有化合物流出后，将柱温箱温度升高至 350 °C 并保持 30 min。此分析完成后，序列移至下一行，当 GC 表明系统准备就绪时，将执行下一次进样并采集数据。如图 7B 所示，在运行开始时基线仍在下降，表明色谱柱在高温下保持一段时间后，尚未恢复正常。基线的变化导致化合物积分失真，从而导致定量不准确以及早出峰的化合物峰形不佳。

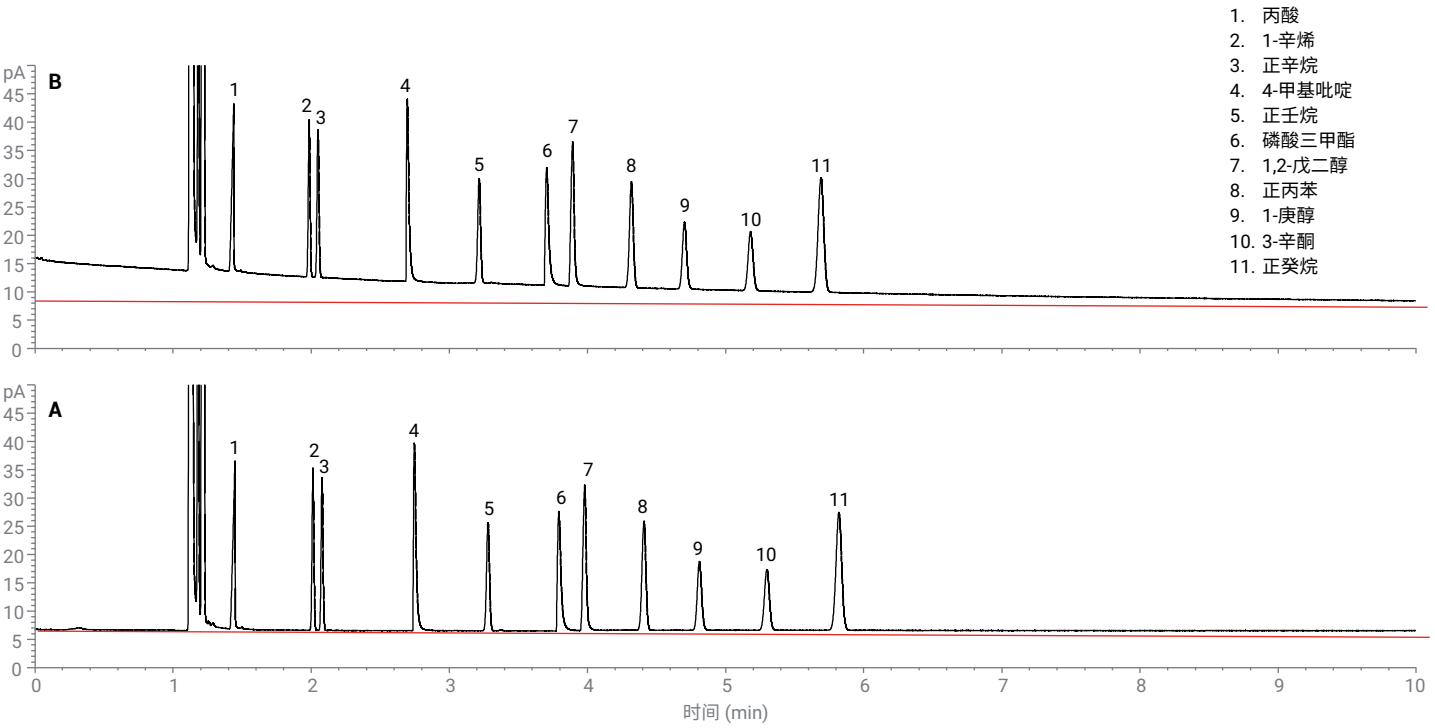


图 7. (A) 在 Agilent J&W DB-5ms Intuvo 气相色谱柱上分析 UBER 测试混合物的初始进样。(B) 将柱温箱温度循环升至 350 °C 后，后续进样 UBER 测试混合物的分析结果

在图 8 中，使用 DB-5Q Intuvo 气相色谱柱进行了相同的测试。由于热稳定性提高和超低的柱流失，在测试混合物的后续进样开始时，基线并未升高。这表明 DB-5Q Intuvo 色谱柱更高的热稳定性不仅可以保持较低的整体柱流失，而且即使在使用 Intuvo 9000 气相色谱系统的快速冷却功能时也能实现低流失。

结论

虽然柱流失是一种正常现象，但可以采用多种方法来减少其对分析和所用检测器灵敏度的影响。随着 Agilent J&W DB-5Q 和 HP-5Q 气相色谱柱的推出，改进的色谱柱技术提高了热稳定性，大大减少了柱流失。高温下，因色谱柱固定相“backbiting”产生的干扰离子显著减少，可以提高质谱仪的灵敏度。因此 DB-5Q 和 HP-5Q 色谱柱非常适合于 GC/MS GCQQQ 和 GC Q-TOF 等高灵敏度仪器使用。

参考文献

1. Reese, A.; Vickers, A.; George, C. GC Column Bleed: A Mass PerSPECtive（气相色谱柱流失：与质量的关系），*安捷伦科技公司*，出版号 B-0442，**2001**

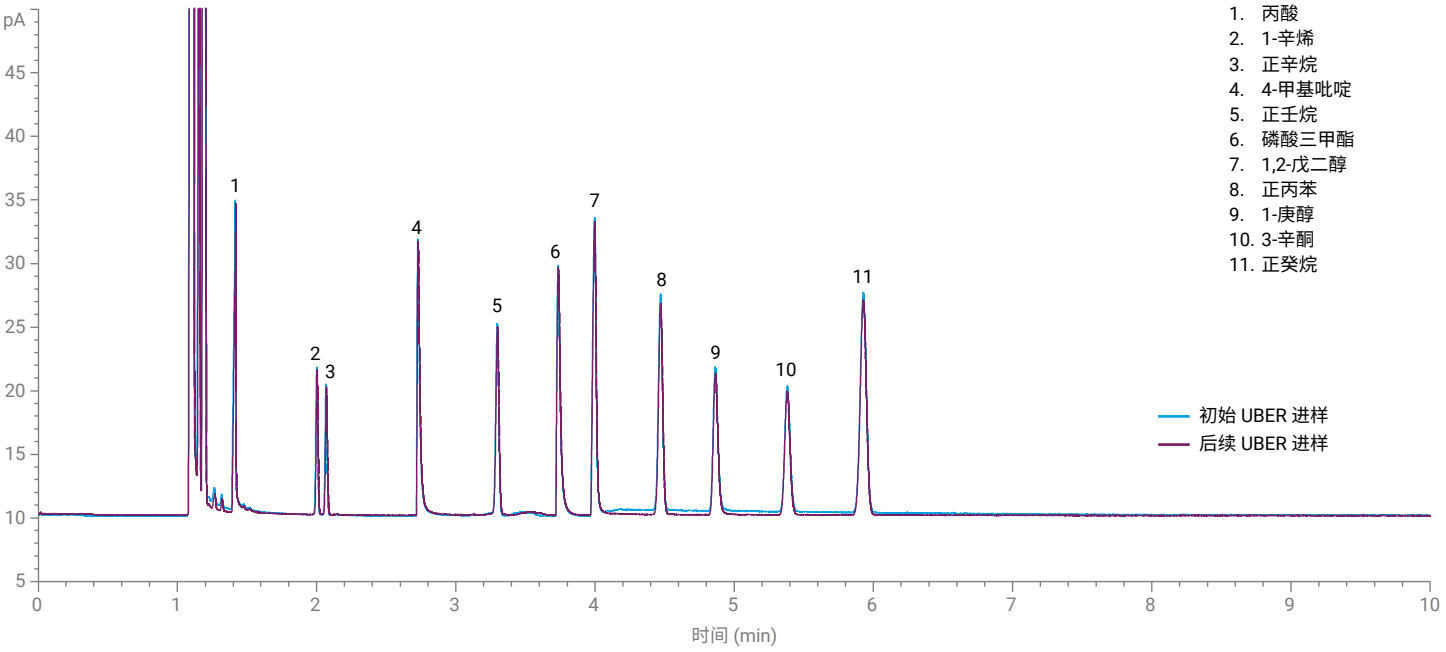


图 8. UBER 测试混合物在 Agilent J&W DB-5Q Intuvo 气相色谱柱上的初始分析结果以及在色谱柱于最高温度 350 °C 下保持 30 min 后的分析结果

www.agilent.com

DE63295737

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，2024

2024 年 6 月 25 日，中国出版
5994-7586ZHCN

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

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

Agilent
Trusted Answers