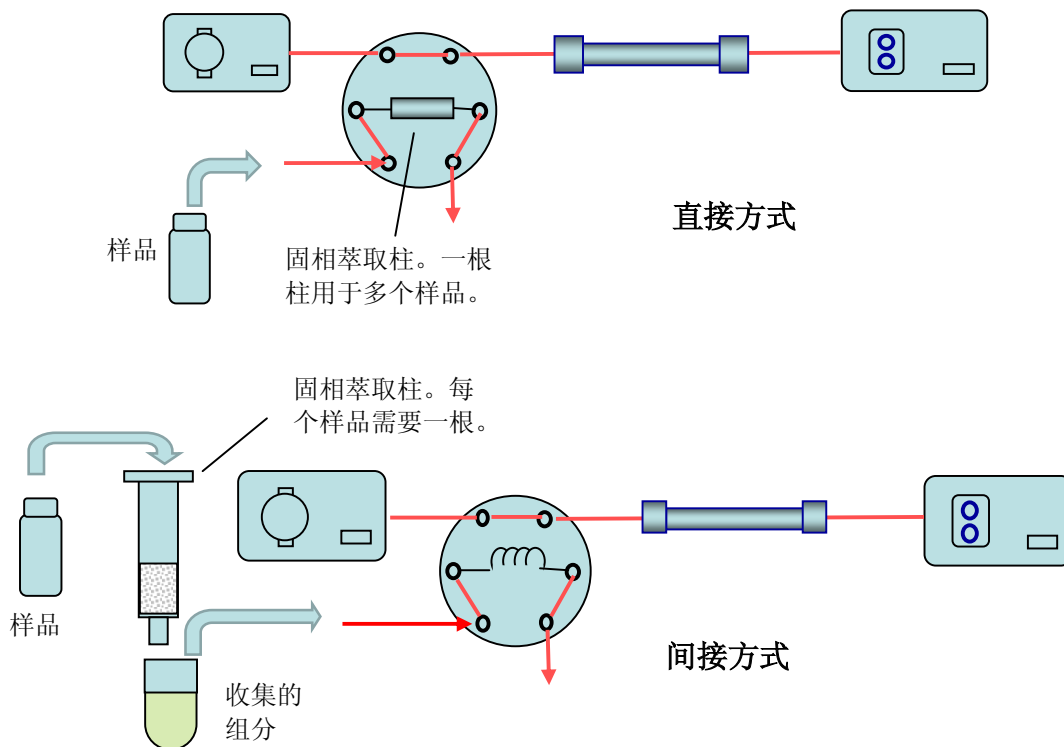


## 基于 SPE-04 固相萃取仪的二阶在线固相萃取和大体积进样

### 固相萃取与色谱分析的结合

固相萃取（SPE）或柱净化与色谱分析的在线结合目前主要有两种方式。一种是使用切换阀，将固相萃取柱和色谱分析柱连接，让色谱流动相把固相萃取柱上富集的样品全部转移到色谱分析柱（直接方式）。另一种是间接方式，采用和离线固相萃取一样的净化方式。样品组分收集后，用萃取仪内置的进样器取 10-20 微升的组分注入色谱分析柱。

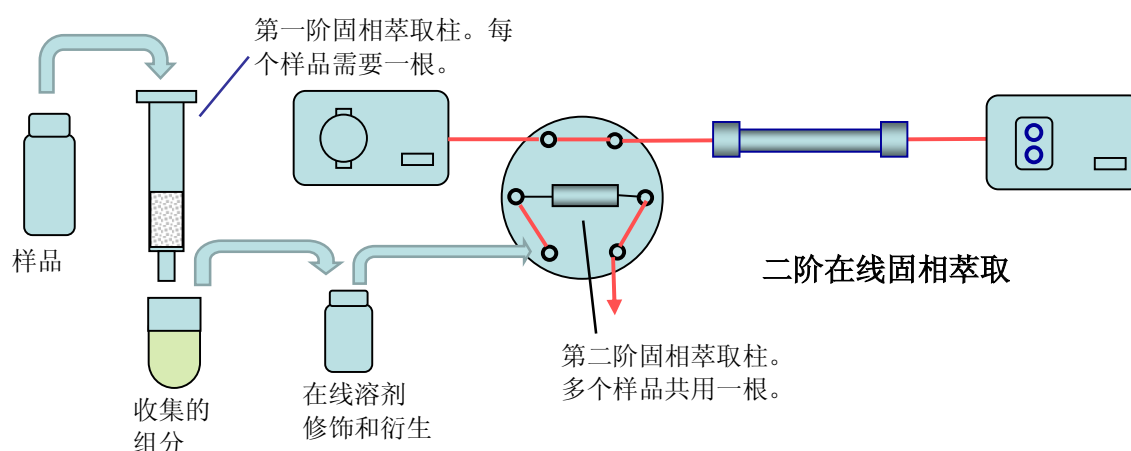


直接方式的在线固相萃取具有灵敏度高和处理速度快的特点。因为固相萃取柱富集的样品全部转移到了色谱分析柱，样品处理步骤也比较简单。以大体积水样的处理为例，离线固相萃取一般要萃取 500 毫升样品。组分收集后会浓缩到 1 毫升，然后取 20 微升进样。色谱分析实际利用的样品只有 10 毫升。如果采用直接方式的在线固相萃取，只要上样 10 毫升，就能获得相同的灵敏度，而样品处理时间可以从 2 小时减少到 20 分钟。直接方式的在线固相萃取要求萃取柱可以多次反复使用，因为连接在高压切换阀上的萃取柱不容易更换。另外使用溶剂的性质要和色谱分析柱匹配，否则色谱峰变宽会

影响分离效果。由于这两条限制，采用的固相萃取柱一般只能是反相柱，而样品的成分要求比较干净。目前这种方式主要是用于饮用水的分析。

使用间接方式的在线固相萃取，可以不受上述两项条件的限制。供选择的固相萃取柱比较多，净化效果也比较好。这种间接在线固相萃取的缺点是灵敏度比较低，因为收集的组分只有一小部分用于色谱分析。因此，间接方式固相萃取比较适合样品成分比较复杂而灵敏度要求不太高的应用。

为了克服上述两种方式的局限，加拿大博朗科技利用 SPE-04 的特有的功能，引进了二阶在线固相萃取。它先采用间接方式的在线固相萃取作为第一阶段的样品净化，组分经过溶剂修饰后再通过直接在线固相萃取进行富集。二阶在线固相萃取的工作步骤如下图所示：



这种二阶在线固相萃取，先用第一阶固相萃取柱去除大部分样品的干扰物。所使用的萃取柱和普通的离线固相萃取一样，可以是 C18、离子交换、石墨化炭黑、亲和色谱等类型。第二阶固相萃取的作用是富集和进一步净化。因为样品已经比较干净，第二阶固相萃取柱的寿命得以显著延长。

## 仪器配置

SPE-04 离线/在线两用固相萃取仪是一个多功能的样品前处理平台。它的功能包括离线固相萃取、直接在线固相萃取、间接在线固相萃取、在线溶剂修饰和控温衍生化、和二阶在线固相萃取。此外 SPE-04 还可以当作自动进样器使用，实现普通的色谱分析进样和大体积进样。本实验通过蜂蜜和自来水中氯霉素的在线分析，展示 SPE-04 的在线样品前处理的潜力，也为用户开发各自的方法提供入门。



本实验所使用的液相色谱仪是安捷伦的 1100，配置为 G1312A 二元泵，G1314A 紫外检测器和 G1322A 脱气机。

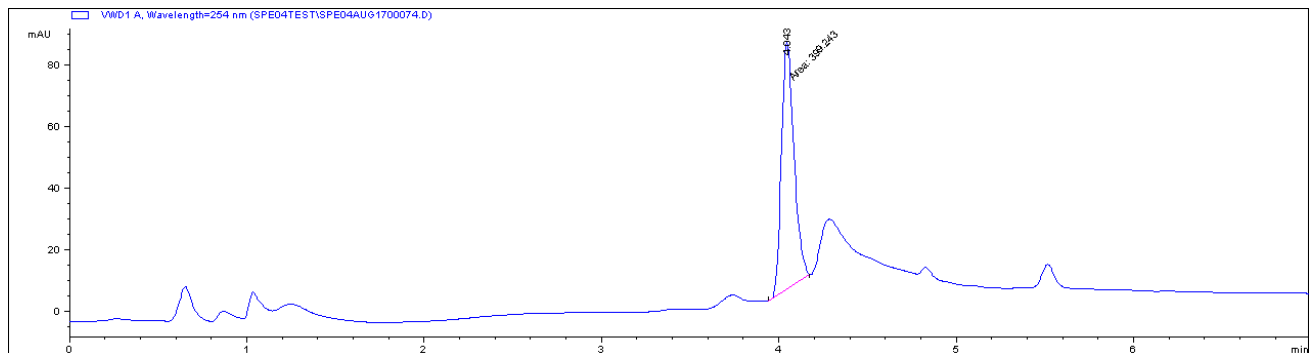
## 材料和方法

所用氯霉素标样来自 SIGMA-ALDRICH，纯度为 98%。用甲醇配成浓度为 1 毫克/毫升，20 微克/毫升，和 2 微克/毫升的标准溶液。第一阶固相萃取柱为博朗科技的 C18 柱，规格为 200 毫克/3 毫升。第二阶固相萃取柱为博朗科技的 Trap N 在线萃取柱，规格为 4.6X10 毫米。色谱分析柱为博朗科技的 PCTsil C18 柱 (4.6X200mm, 5 um) 或 Waters 的 Nova-Pak C18 柱 (3.9X150 mm, 5 um)。色谱泵流速为 1.5 毫升/分。检测器波长为 278 nm。色谱分离使用了三种梯度淋洗方法。方法一使用甲醇和水为流动相，甲醇的浓度 3 分钟内由 10%增加到 70%，维持 3 分钟后在 1 分钟内降回到 10%。方法二使用乙腈和水为流动相，乙腈的浓度 3 分钟内由 10%增加到 70%，维持 3 分钟后在 1 分钟内降回到 10%。方法三使用乙腈和水为流动相，乙腈的浓度 3 分钟内由 10%增加到 80%，维持 4 分钟后在 1 分钟内降回到 10%。所用的蜂蜜样品来自加拿大 McCormick 公司，为纯天然产品。自来水取自温哥华的素里地区，来源为融化的雪水。

## 结果和讨论

### 1. 直接在线固相萃取分析自来水中的氯霉素

因为样品较为干净，使用了直接方式的在线固相萃取。自来水中添加了 40 ppb 的氯霉素。SPE-04 的处理步骤为先用先用 2.5 毫升甲醇活化第二阶萃取柱，然后上样品 10 毫升。用含 10%甲醇的水溶液 7.5 毫升清洗萃取柱后通过阀切换将样品转入色谱分析柱(Nova-Pak C18)。固相萃取各步骤所用流速均为 4 毫升/分。色谱梯度淋洗采用方法一。以下为一个样品分析的色谱图。

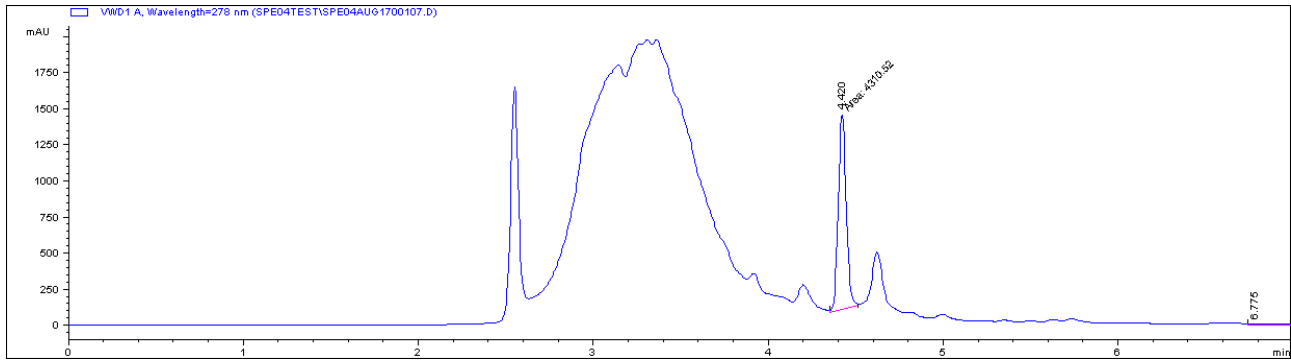


每个样品的固相萃取时间为 10 分钟，色谱分析时间为 7 分钟。因为固相萃取和色谱分析是平行进行，每个样品的处理时间（包括固相萃取和色谱分析）也是 10 分钟。根据峰高估算，方法对氯霉素的检测限为 2 ppb。如果增加进样量，干扰成分也会相应增加。如果需要提高灵敏度，可以通过改进萃取柱的淋洗条件和或使用 LC-MS。

### 2. 直接在线固相萃取分析蜂蜜中的氯霉素

在 50 毫升离心试管中加入 10 克蜂蜜和 40 微克氯霉素（相当于 4 ppm），然后加水到 50 毫升。待蜂

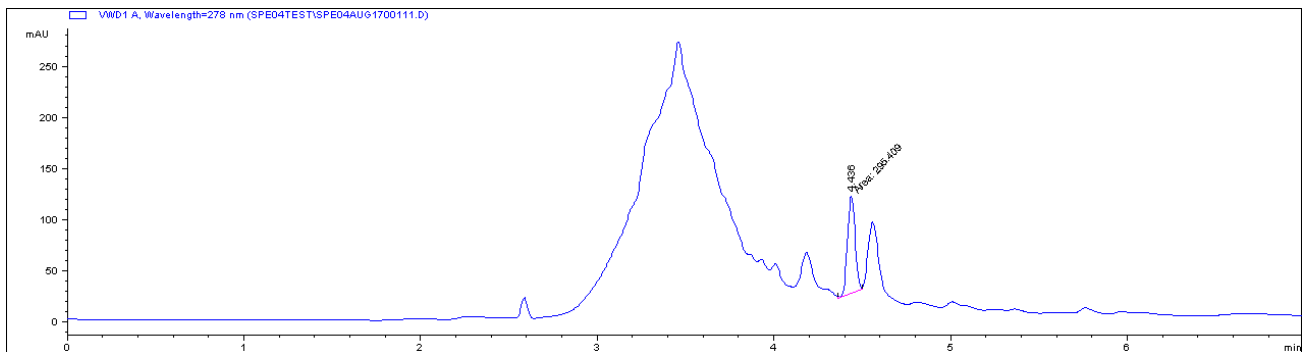
蜜完全溶解后分装到 SPE-04 萃取仪的样品瓶中。SPE-04 的处理步骤为先用 2.5 毫升甲醇活化第二阶萃取柱，然后上样品 5 毫升（相当于 1 克蜂蜜样品）。用含 10% 甲醇的水溶液 7.5 毫升清洗萃取柱后通过阀切换将样品转入色谱分析柱 (PCTsil C18)。固相萃取各步骤所用流速均为 4 毫升/分。色谱梯度淋洗采用方法二。以下为一个样品分析的色谱图。根据峰高估算，方法对氯霉素的检测限为 0.2 ppm。每个样品的处理时间为 10 分钟。



在处理过 20 个样品以后，第二阶萃取柱开始出现堵塞，萃取效率也开始下降。说明蜂蜜样品里有一些成分进入萃取柱后没有清洗干净而逐渐累积。如果使用 LC-MS，每次上样品量可以减少到 0.1-0.2 克，每根二阶萃取柱应该可以处理 100 个蜂蜜样品。从上面的色谱图看，有一个大而宽的干扰峰很难除去，有可能会影响 LC-MS 的离子化的稳定性，需要使用有同位素标记的内标。下面的一个实验是采用二阶在线固相萃取，目的是改进净化效果和延长第二阶萃取柱的使用寿命。

### 3. 二阶在线固相萃取分析蜂蜜中的氯霉素

在 50 毫升离心试管中加入 12 克蜂蜜和 6 微克氯霉素（添加浓度为 0.5 ppm），然后加水到 50 毫升。待蜂蜜完全溶解后分装到 SPE-04 萃取仪的样品瓶中。SPE-04 的处理步骤为先用 2.5 毫升甲醇活化第一阶萃取柱（C18，200 毫克/3 毫升），然后上样品 4 毫升（相当于 1 克蜂蜜样品）。用 7.5 毫升水清洗萃取柱后改用甲醇洗脱，收集 1 毫升组分。取 0.5 毫升组分和 1.2 毫升水混合（溶剂修饰），然后加到第二阶萃取柱。用 0.5 毫升水淋洗第二阶萃取柱以除去可能的样品颗粒，然后通过阀切换将样品转入色谱分析柱 (PCTsil C18)。第一阶固相萃取所用的流速为 5 毫升/分。第二阶固相萃取所用的流速为 4 毫升/分。色谱梯度淋洗采用方法二。以下为一个样品分析的色谱图。



与上面的直接在线萃取的色谱图比较，可以看到将上样量的差异校正后干扰峰减少了三分之二（这里实际进样量为 0.5 克）。由于基线干扰的显著减少，方法的检测限也改进到了 0.02 ppm。另外，第二阶萃取柱的使用寿命得以显著延长，在处理了 60 个样品后仍然没有出现堵塞。

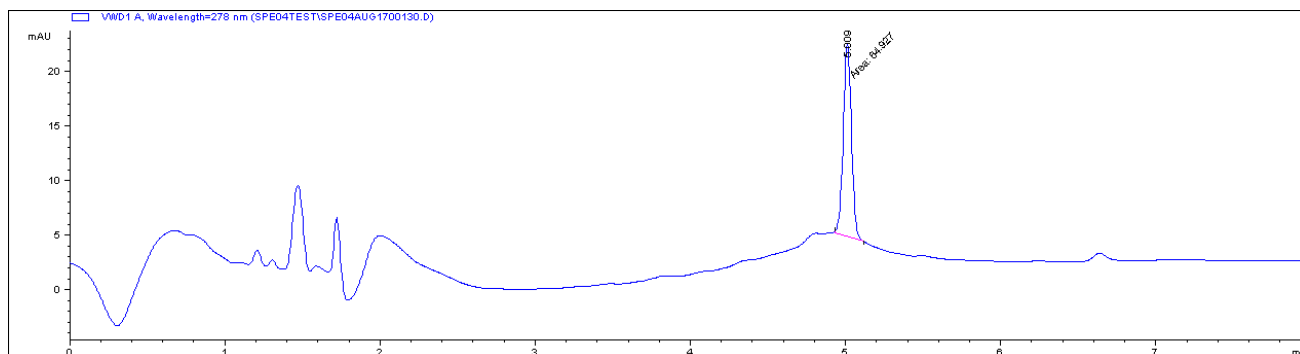
采用二阶在线固相萃取，每个样品的处理时间为 16 分钟。以下是 SPE-04 的具体方法：

No.	操作	流速	体积	解释
1	Elute 1	5	2.5	使用 2.5 毫升甲醇淋洗第一阶萃取柱，流速 5 毫升/分
2	Add samp	5	4.0	把 4 毫升样品加到第一阶萃取柱
3	Elute 2	5	7.5	使用 7.5 毫升水淋洗第一阶萃取柱
4	Elute 1	5	0.1	将淋洗溶剂改为甲醇
5	Collect	5	1.0	继续用甲醇洗脱，收集 1 毫升组分
6	Mix Frac	0	1.2	取 0.5 毫升组分和 1.2 毫升水混合
7	Load Mix	4	1.5	将 1.5 毫升的混合溶液加到第二阶萃取柱
8	Wash 2	4	0.5	用 0.5 毫升水清洗第二阶萃取柱
9	Inject	1	1	切换阀进样和色谱分析触发
10	Wait	1	2.0	等待 2 分钟后开始下一个样品

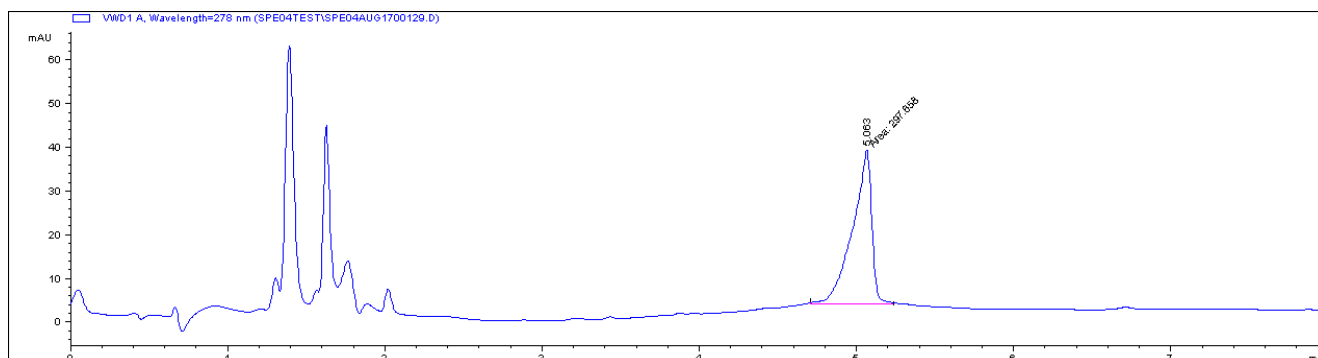
#### 4. 使用 SPE-04 实现大体积进样

液相色谱分析要求样品的溶剂应该和色谱流动相的组成相近，否则容易造成峰变形或变宽。另外在进样量方面，对于 4.6 毫米的色谱柱的进样体积一般为 10-20 微升。如果进样体积过大，不仅不会提高灵敏度，反而会因为峰变宽而影响分离效果。对于像氯霉素一类保留时间短的极性分析物，样品溶剂组成和进样体积的影响尤其明显。在这里通过使用 SPE-04 的在线溶剂修饰功能和第二阶萃取柱的富集功能，可以在样品溶剂不匹配的情况下将进样体积增加到 0.5 毫升而不影响分离效果和峰形。

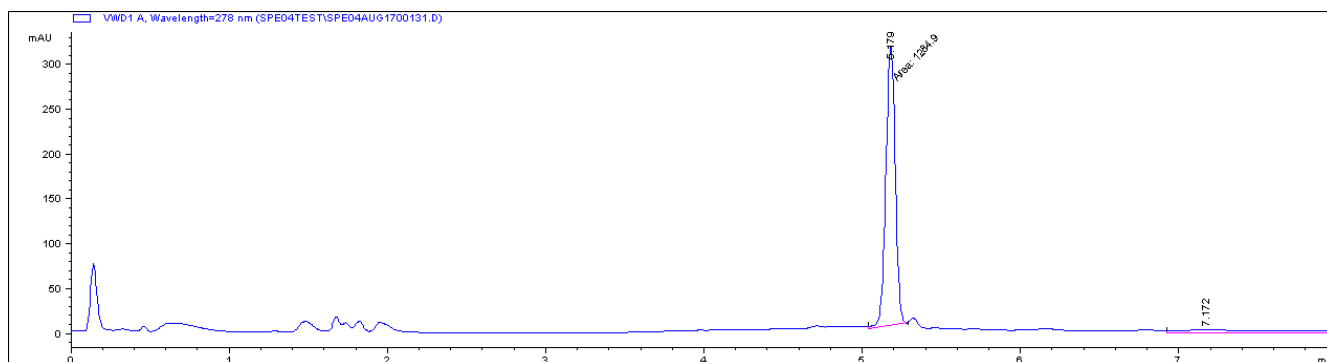
用于本实验的样品为氯霉素浓度为 2 微克/毫升的甲醇溶液。色谱梯度淋洗使用方法三。流动相的起始组成为乙腈+水（10：90）。色谱柱为 PCTsil C18。进样方式分别使用 20 微升进样环，100 微升进样环，和第二阶萃取柱。下面第一个色谱图是使用 20 微升进样环的结果。氯霉素的峰型没有明显变形或扩散。



当进样体积增加到 100 微升时，氯霉素的峰型显著变宽和变形。峰高的增加不到一倍。



使用 SPE-04 的在线溶剂修饰功能和第二阶萃取柱的富集功能进样，样品体积为 500 微升。样品先通过在线溶剂修饰和 1.6 毫升水混合，然后加到第二阶萃取柱。用 0.5 毫升水洗去可能引入的样品颗粒，然后将样品导入色谱分析柱。如下图所示，增加进样体积不会引起峰形改变。



在使用离线固相萃取或 QUECHERS 净化样品时，净化过的溶剂通常需要浓缩或溶剂交换。这一步往往是比较容易引起误差的步骤。如果使用 SPE-04 的大体积进样，这两步都可以避免。

## 5. 讨论

本实验使用的第一和第二阶萃取柱都是 C18。如果第一阶使用其它类型的萃取柱（如 HLB 柱、离子交换柱、石墨炭黑柱、亲和色谱柱），通过二柱互补，净化效果应该更好。这里只是作为一个介绍 SPE-04 功能的入门，所用的方法没有经过仔细的优化。用户可以根据各自的应用要求，开发出可靠的在线分析方法。



### PromoChrom Technologies Ltd

14721 89A Avenue  
Surrey, BC V3R7Z9, Canada  
Tel: (+1)-6042950280  
Email: info@promochrom.com  
www.promochrom.com