

水质分析的固相萃取技术 及色谱柱选择

岛津技迹（上海）商贸有限公司
市场部 李桂芳
liguifang@shimadzu-gl.com.cn



内容概览

I 固相萃取技术原理及其在水质分析中的应用

- 固相萃取技术简介
- 分离模式的选择
- SPE方法的通用流程、作用及使用注意事项
- 反相、复合模式SPE通用方法及优化策略
- SPE在水质分析应用中的产品形式



I 如何选择合适的液相色谱柱

- 色谱填料的发展简介
- 反相保留模式
- HILIC模式



色谱的起源

- 1 1906年色谱分析之父Tswett博士利用不同色素在活性碳酸钙与石油醚的共同作用之下的玻璃柱中呈现出不同的运行速度，能使其达到彼此分离。
- 1 茨维特在他的原始论文中，把上述分离方法叫做**色谱法**。
- 1 当今的液相色谱技术正是起源于一项用以净化复杂样品基质的早期SPE试验！

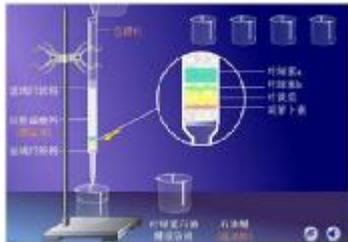
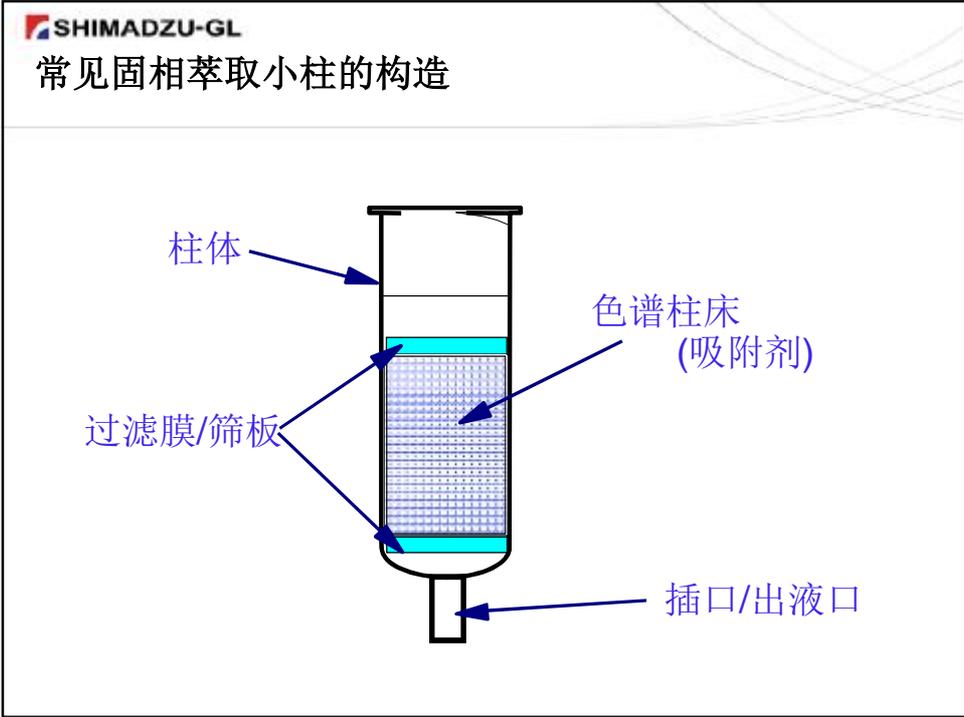


图1: Tswett's 茨维特实验

固相萃取的定义

- n **SPE就是液相色谱**，基本原理相同，只是使用形式与使用原因存在差异。
- n SPE通常是一种使用装在柱芯型装置内的固体颗粒和色谱填充材料对样品中的不同组分进行化学分离的样品制备技术。





SHIMADZU-GL

固相萃取的目的

净化前后比较 → The photographs show a sample vial that is initially cloudy (left) and becomes clear after the extraction process (right).

➤ **去除基质干扰**

➤ **富集目标组分**

经过固相萃取 → The chromatograms show a noisy baseline before extraction (left) and a clean baseline with distinct peaks after extraction (right). The second set of chromatograms shows four peaks labeled 1, 2, 3, and 4, with peak 3 being significantly more prominent after extraction.

2015/5/15

内容概览

I 固相萃取技术原理及其在水质分析中的应用

- 固相萃取技术简介
- **分离模式的选择**
- SPE方法的通用流程、作用及使用注意事项
- 反相、复合模式SPE通用方法及优化策略
- SPE在水质分析应用中的产品形式

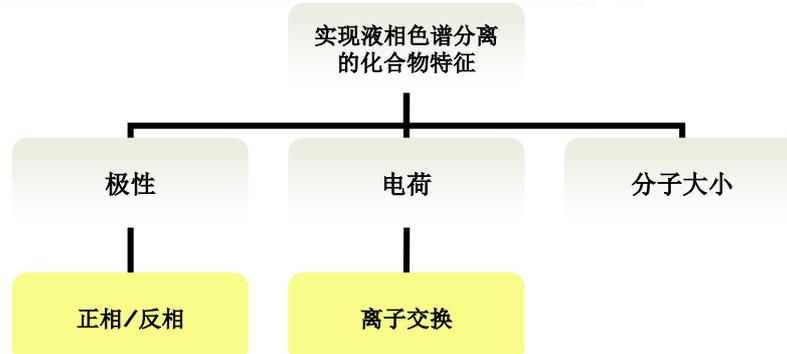


I 如何选择合适的液相色谱柱

- 色谱填料的发展简介
- 反相保留模式
- HILIC模式



液相色谱的分离模式





常用的SPE 吸附剂类型

——按分离模式分类

- n 正相吸附剂
- n 反相吸附剂
- n 离子交换
- n 复合模式 (离子交换+反相)
- n 特殊/专用技术
 - DNPH (醛酮分析柱)、VRA(黄曲霉毒素)、GC-e/NH₂ (用于多农残双层小柱)、石墨化碳和活性碳



基于极性的分离—正相 & 反相

化合物的形为



“性质相近的相互吸引 -- 性质相反的不相互吸引”
 “Likes Like Like -- Opposites Are Not Attracted”

- * 极性化合物吸引其它极性化合物 (相互吸引)
- * 非极性化合物的吸引其它非极性化合物 (相互吸引)
- * 非极性化合物 和 极性化合物之间没有吸引力 (对立排斥)

请记住，基于极性的色谱分离是“相似相容”的原理

注：和磁极的异性相吸、同性相斥正好相反

SHIMADZU-GL

色谱术语-正相色谱

n 色谱分析之父Tswett博士使用一种极性固定相(玻璃柱内的碳酸钙或氧化铝)和一种极性非常弱(非极性)的流动相将多种植物提取物成功分离开。这些色谱条件目前叫做“正相色谱模式”。

为什么它们会分离?

- 蓝色 是非极性 = 最喜欢流动相, 最先流出来
- 红色 是有些极性 = 相对更喜欢固定相, 相对慢一些流出
- 黄色 是极性非常强 = 最喜欢固定相, 最后流出来

固定相 - 极性 (硅胶)

流动相 非极性 (正己烷)

SHIMADZU-GL

正相SPE的作用机理

【正相吸附剂】

- (硅胶)
 - InertSep SI (氨基 + Si)
 - InertSep NH2 (硫酸镁)
 - InertSep FL
 - InertSep FL-PR
- (氧化铝)
 - InertSep AL (氨基 + Si)
 - InertSep CN

作用机理

氢键力

硅胶母体固相

保留: 从弱极性溶剂中吸附极性到中等极性的化合物。通过极性相互作用 (氢键力、 π - π 相互作用、偶极-偶极相互作用力等), 保留目的成分。或通过静电引力保留目的成分。

洗脱: 用极性溶剂 (相对于上样溶剂和清洗溶剂而言) 洗脱。通过静电引力使保留成分洗脱。

SHIMADZU-GL

色谱术语-反相色谱

n “反相”一词描述了一种正好与正相色谱相反的色谱模式，也就是使用一种极性流动相和一种非极性(疏水)固定相。

- 非极性化合物被保留
- 极性化合物不能被很好的保留

为什么它们会分离?

- 蓝色是非极性 = 最喜欢固定相，最后出来
- 红色有一定的极性 = 相对更喜欢流动相，相对早一些流出
- 黄色极性非常强 = 最喜欢流动相，最早流出

SHIMADZU-GL

反相SPE的作用机理

【反相吸附剂】

(N-MA-DVB)	(十八烷基+ Si)
InertSep Pharma	InertSep C18
InertSep PLS-3	(辛基+ Si)
WondaSep HLB	InertSep C8
	(乙基 + Si)
	InertSep C2
(SDB)	(环己基 + Si)
InertSep PLS-2	InertSep CH
	(苯基+Si)
	InertSep PH

作用机理

保留：从强极性的溶剂中吸附非极性到中等极性的化合物。以非极性-非极性相互作用力（疏水性相互作用），范德华力或色散力保留低极性物质。

洗脱：用低极性（相对于上样溶剂和清洗溶剂而言）溶剂进行洗脱。

SHIMADZU-GL

常用的SPE溶剂的性质

极性		洗脱强度	溶剂	水溶性?
非极性	正相	反相		
			Hexane (正己烷)	No
			Isooctane (异辛烷)	No
			Carbon tetrachloride (四氯化碳)	No
			Chloroform (氯仿)	No
			Dichloromethane (二氯甲烷)	No
			Tetrahydrofuran (四氢呋喃)	Yes
			Diethyl ether (乙醚)	No
			Ethyl Acetate (乙酸乙酯)	Poor
			Acetone (丙酮)	Yes
			Acetonitrile (乙腈)	Yes
			Isopropanol (异丙醇)	Yes
			Methanol (甲醇)	Yes
			Water (水)	Yes

极性: 非极性 (↓) 强 (↓) 弱 (↑)

SHIMADZU-GL

选择性

1 选择性是通过固定相和溶剂的选择而获得的。

溶剂	固定相
正己烷	硅胶
异辛烷	弗罗里硅土
四氯化碳	酸性氧化铝
氯仿	碱性氧化铝
二氯甲烷	中性氧化铝
四氢呋喃	氨基基
乙醚	氰基
乙酸乙酯	二醇基
丙酮	硅胶C18,C8,C2
乙腈	InertSep Pharma、WondaSep HLB
异丙醇	复合模式
甲醇	
水	

常用的反相溶剂: 乙腈, 异丙醇, 甲醇, 水

SHIMADZU-GL

比较：正相 SPE/反相 SPE

正相	反相
<p>柱活化平衡（由强到弱）</p> <ul style="list-style-type: none"> 首先用强溶剂(甲醇) 下一步用中等溶剂(乙腈, 乙酸乙酯, 二氯甲烷, 乙醚) 最后用弱溶剂（正己烷） <p>上样（弱溶剂）</p> <ul style="list-style-type: none"> 溶解或者转换到弱溶剂中(正己烷) <p>清洗（中等溶剂）</p> <ul style="list-style-type: none"> 在不洗脱待测物的情况下使用最强的中等溶剂（乙酸乙酯/正己烷, 二氯甲烷/正己烷） <p>洗脱（使用相对较强溶剂）</p> <ul style="list-style-type: none"> 丙酮/正己烷、甲醇/二氯甲烷、甲醇/乙酸乙酯 	<p>柱活化平衡（由强到弱）</p> <ul style="list-style-type: none"> 先使用强溶剂（乙酸乙酯, 乙腈） 再使用中等强度溶剂（甲醇） 最后使用弱溶剂（水） <p>上样（弱溶剂）</p> <ul style="list-style-type: none"> 溶解或转换到弱溶剂中(水、水/甲醇) <p>清洗（中等溶剂）</p> <ul style="list-style-type: none"> 在不洗脱待测物的情况下使用最强的中等溶剂(甲醇/水) <p>洗脱(使用最强溶剂)</p> <ul style="list-style-type: none"> 甲醇、乙腈、甲醇/水、乙腈/水

SHIMADZU-GL

基于电荷的分离—离子交换

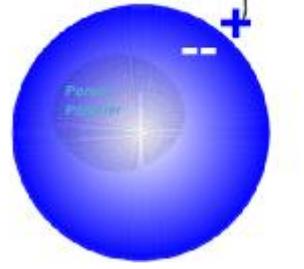
阴离子交换

阴离子交换剂表面吸引阴离子（分析物）



阳离子交换

阳离子交换剂表面吸引阳离子（分析物）



保留：离子交换基团与目的物同时处于解离的状态，在离子强度低的溶液中，形成离子对。（pKa, pKb）

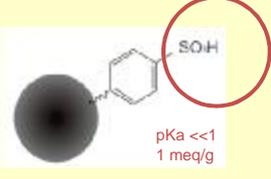
洗脱：官能团又或者使目的物质处于非解离的状态，选择性高的抗衡离子进行交换，高离子强度溶剂洗脱。

SHIMADZU-GL

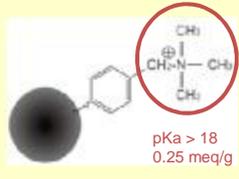
WondaSep 复合模式固相萃取小柱



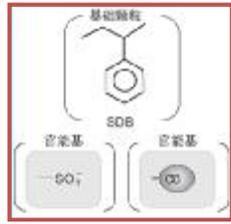
WondaSep HLB
亲水亲脂平衡反相吸附剂



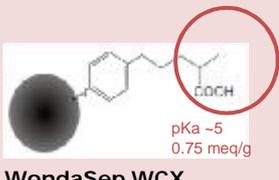
WondaSep MCX
pKa << 1
1 meq/g



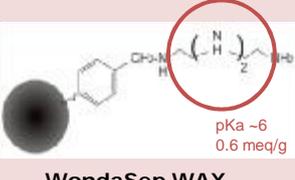
WondaSep MAX
pKa > 18
0.25 meq/g



WondaSep MPC
复合模式强阳离子交换吸附剂



WondaSep WCX
pKa ~5
0.75 meq/g

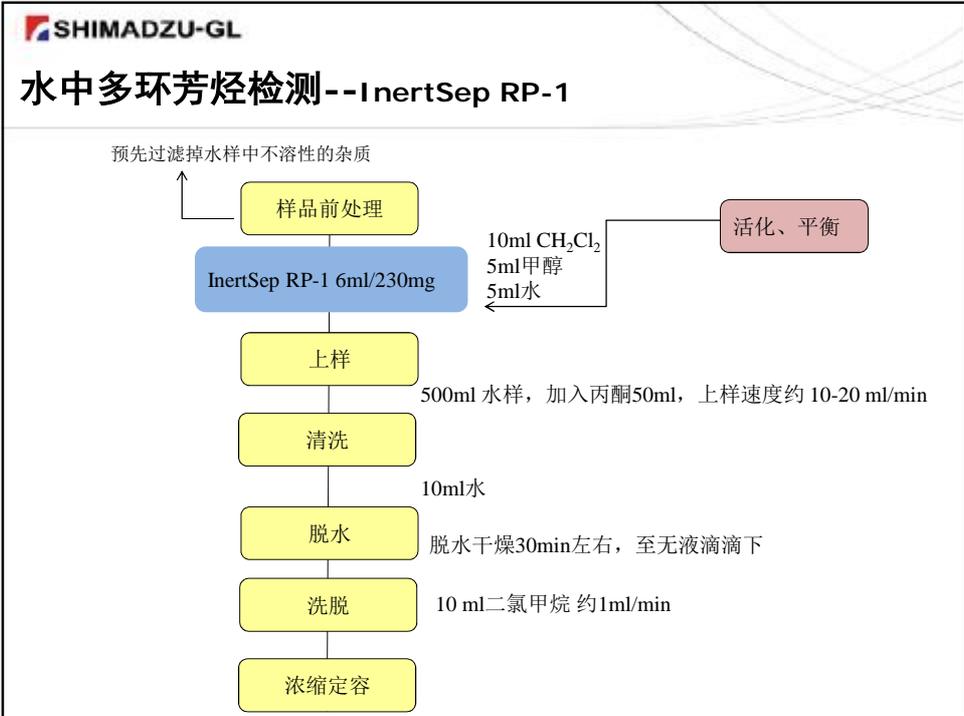
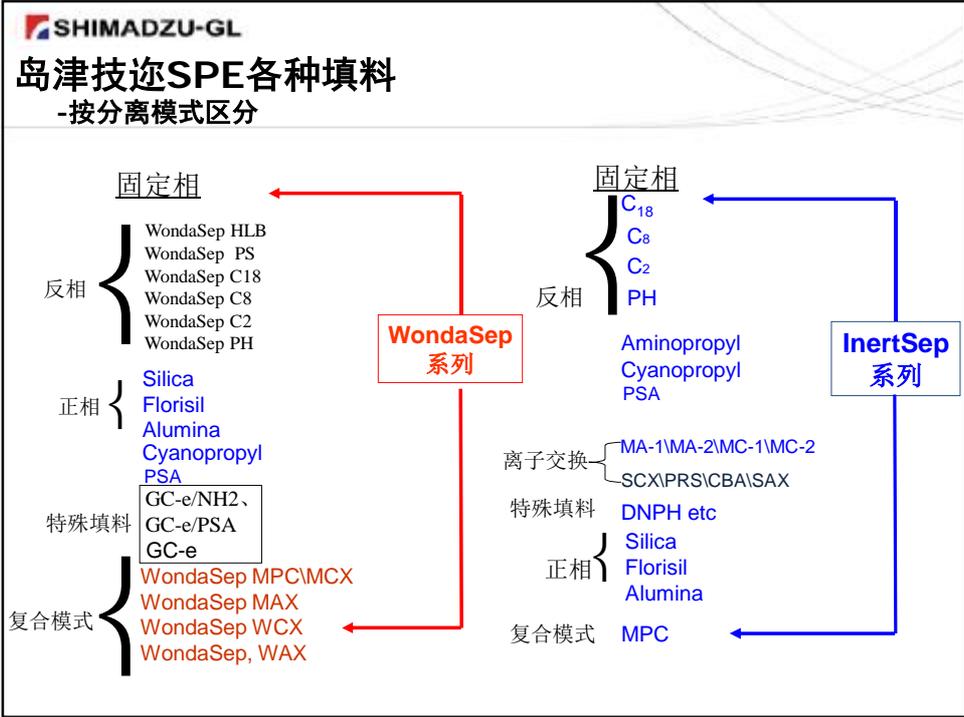


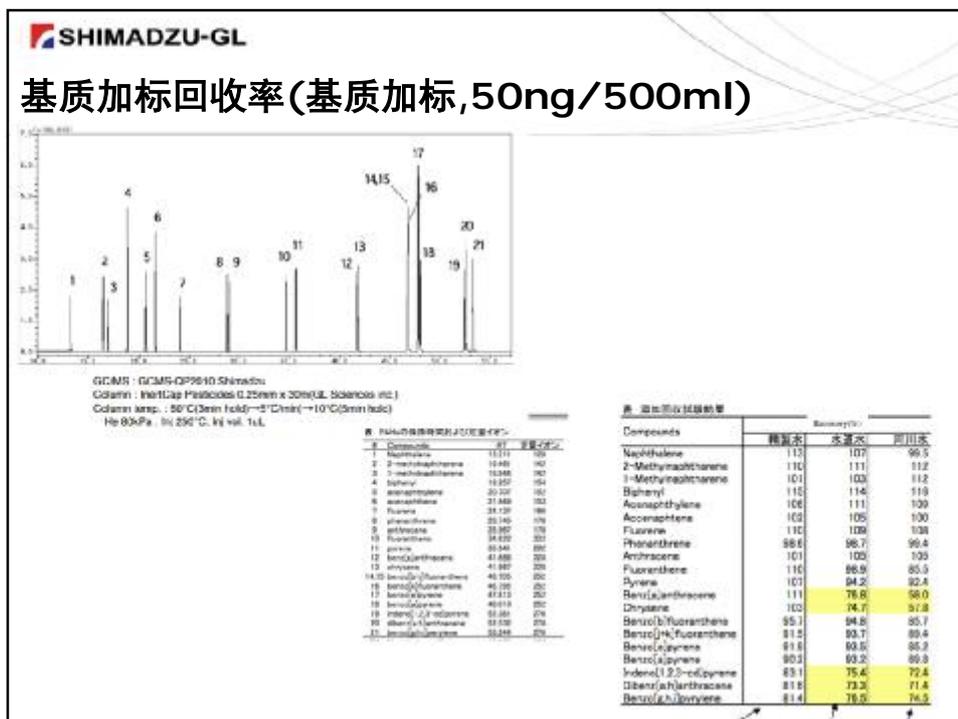
WondaSep WAX
pKa ~6
0.6 meq/g

SHIMADZU-GL

分离模式和吸附剂的选择

	反相	正相	离子交换
分析物	中-低极性	中等-高极性	带电荷、可电离
分离机制	基于疏水性的分离	基于极性的分离	基于电荷的分离
样品基质	水溶液	非极性有机溶剂	水溶液/低离子强度
SPE吸附剂的活化/平衡	1—极性有机溶剂 2—水	非极性有机溶剂	低离子强度缓冲液
初步冲洗步骤	水溶液/缓冲液	非极性有机溶剂	低离子强度缓冲液
洗脱步骤	增加极性有机溶剂的含量	增加混合有机溶剂的洗脱强度	更强的缓冲液-通过调节离子强度或pH值而中和电荷

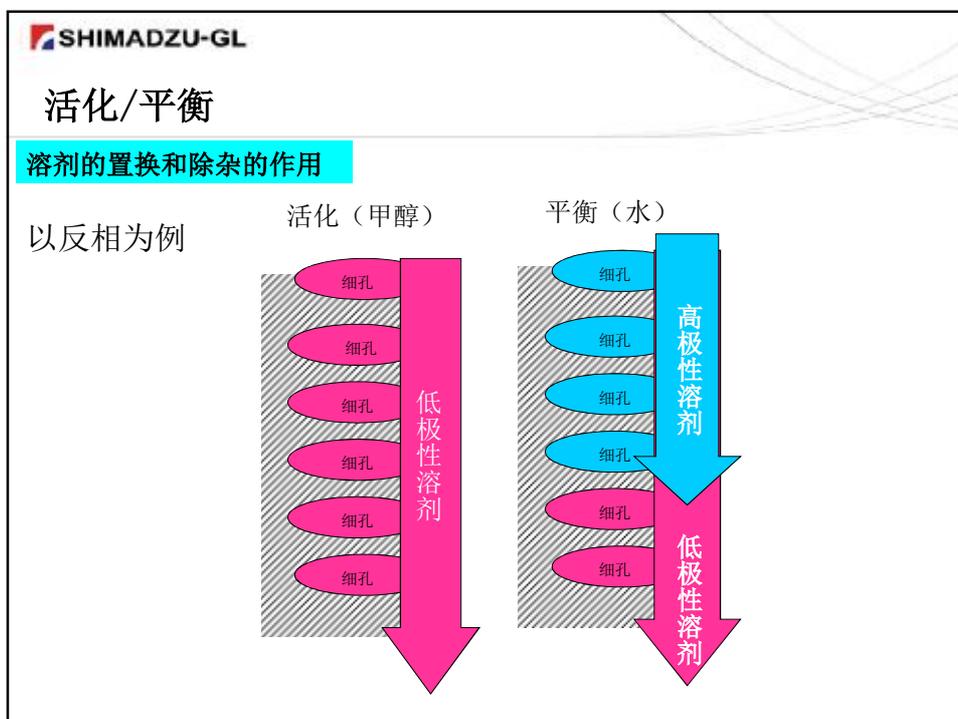
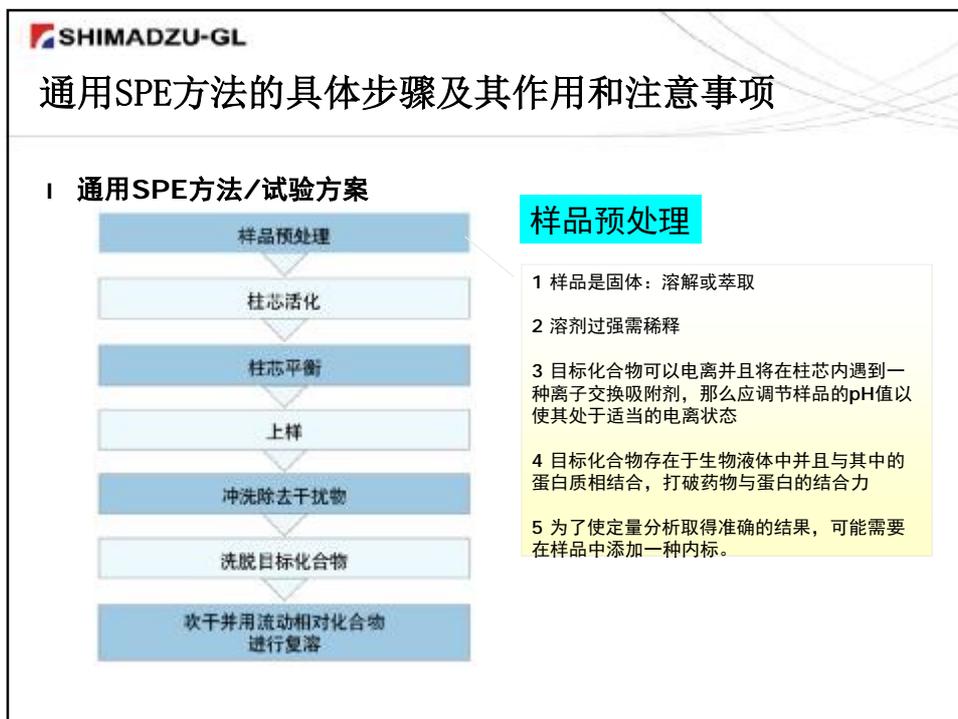




SHIMADZU-GL

内容概览

- 固相萃取技术原理及其在水质分析中的应用
 - 固相萃取技术简介
 - 分离模式的选择
 - SPE方法的通用流程、作用及使用注意事项**
 - 反相、复合模式SPE通用方法及优化策略
 - SPE在水质分析应用中的产品形式**
- 如何选择合适的液相色谱柱
 - 色谱填料的发展简介
 - 反相保留模式
 - HILIC模式



SHIMADZU-GL

去湿现象/干涸效应对SPE的影响



I 对于反相SPE而言，活化和平衡步骤至关重要

活化 (有机溶剂) ← 润湿孔洞

平衡 (水、样品溶剂) ← 有机溶剂将水带进非极性孔内 (水取代有机溶剂)

平衡上样 ← 分析物进入孔内并得以保留 (俘获)

清洗

洗脱

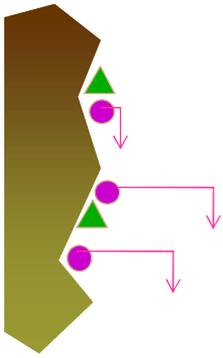
如果在活化和平衡步骤操作不谨慎，特别是当使用真空萃取装置时，有些柱芯的吸附剂孔可能会不到润湿，从而导致化合物的保留能力差和样品回收率变差。

步骤	正相	反相
活化	不需要	始终需要
平衡	建议进行	始终需要

SHIMADZU-GL

清洗：去除干扰物同时不要影响目标物

以反相为例



- 纯水清洗 → 除去极性物质、盐类
- 有机溶剂 / 水清洗 → 增加清洗强度
- 调节清洗溶剂pH值

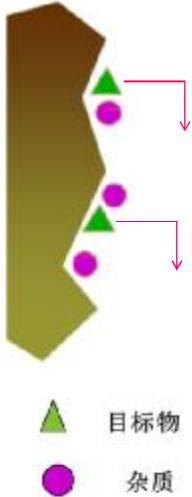
保证回收率的基础上，使用最强溶剂除去干扰物

▲ 目标物

● 杂质

SHIMADZU-GL

洗脱：洗脱目标物同时不要引入干扰物



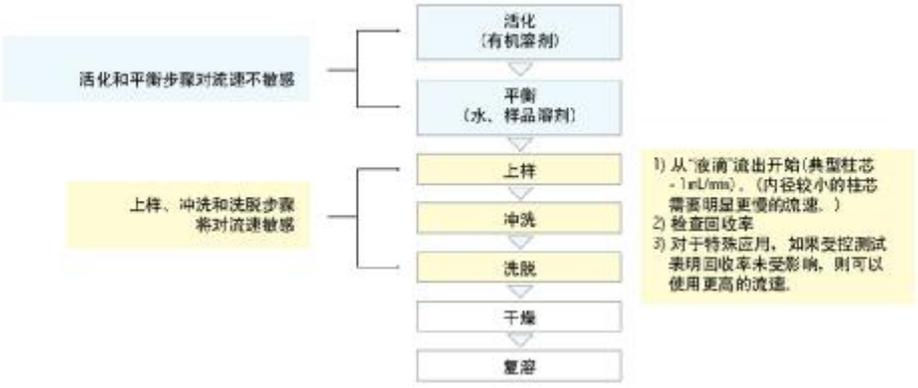
- ρ 洗脱液中有机相的比例
- ρ 洗脱液的体积和洗脱次数
- ρ 调节洗脱溶剂pH值

保证回收率的基础上，使用最低洗脱强度的溶剂洗脱目标化合物，避免干扰物的洗出

▲ 目标物
● 杂质

SHIMADZU-GL

流速控制的重要性

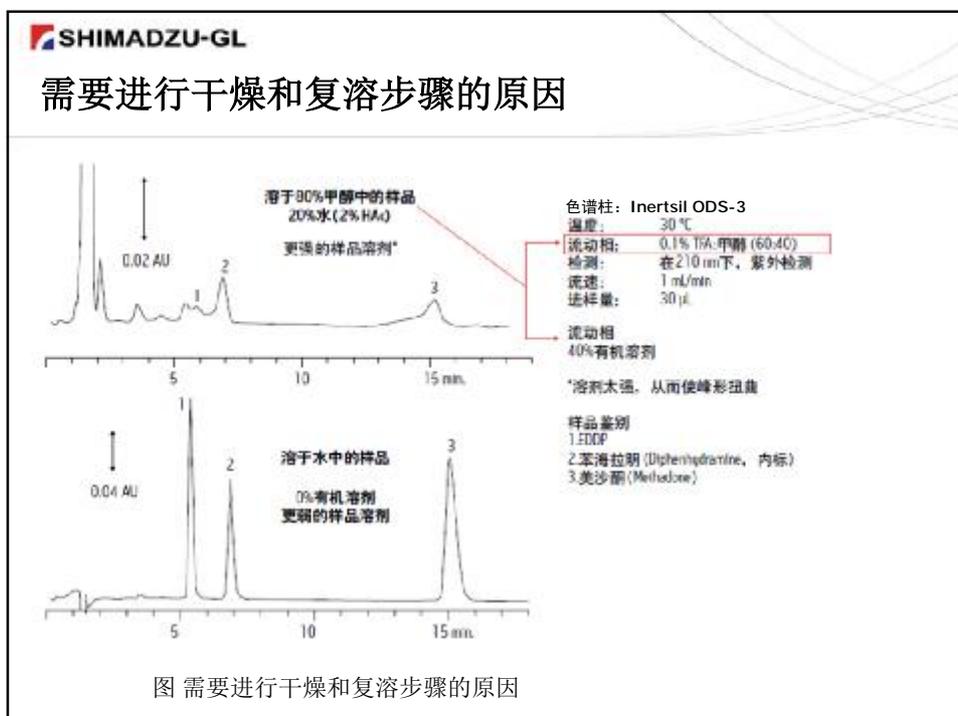
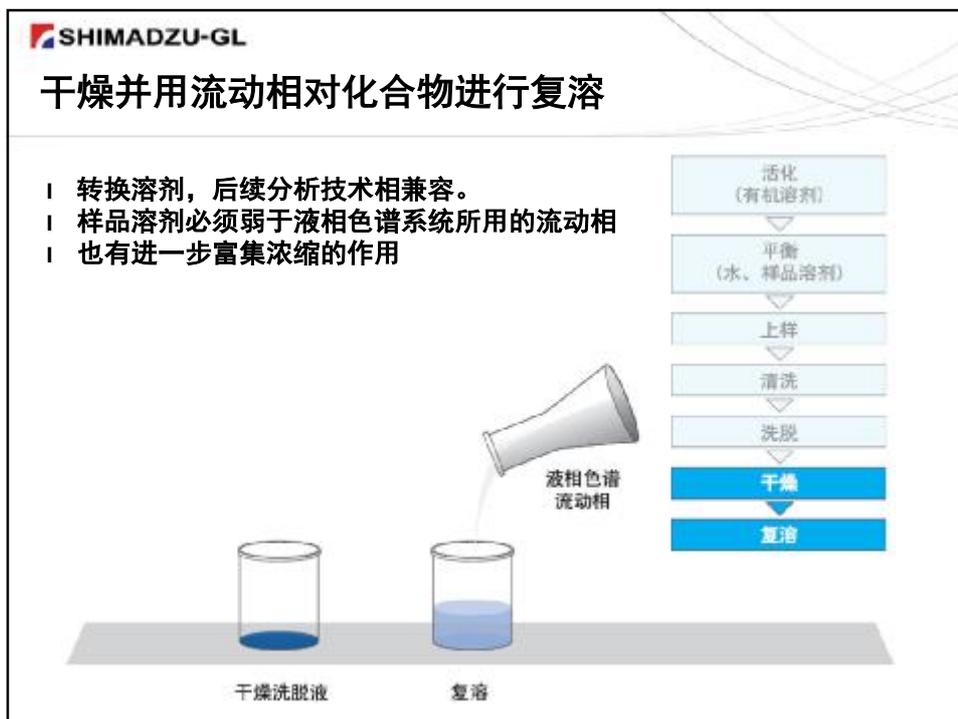


活化和平衡步骤对流速不敏感

上样、冲洗和洗脱步骤对流速敏感

- 1) 从“液滴”流出开始(典型柱芯 - 1μL/min)。 (内径较小的柱芯需要明显更慢的流速。)
- 2) 检查回收率
- 3) 对于特殊应用，如果受控测试表明回收率未受影响，则可以使用更高的流速。

适当的流速控制：流速达到要求的一个很好的指示标记
以液滴形式流出柱芯（不成线）



SHIMADZU-GL

正确的计算SPE方法回收率

第一步 空白样品基质 (无分析物) 第二步 将标准品添加 到样品基质内

10 ng/mL 分析结果 = 10 ng/mL

萃取后样品基质 加标准品 萃取后加标样品 萃取后样品及标准品

$$\% RE = 100 \times \left(\frac{\text{萃取后样品 (及标准品) 的响应值}}{\text{萃取后加标 样品的响应值}} \right)$$

图 计算回收率

图 正确测定回收率

SHIMADZU-GL

基质效应

第一步 空白样品基质 (无分析物) 第二步 将标准品添加 到样品基质内

10 ng/mL 10 ng/mL

萃取后加标的样品 未经萃取的分析标准品

$$\% ME = 100 \times \left(\frac{\text{萃取后加标样品 (及标准品) 的响应值}}{\text{非萃取的分析 标准品的响应值}} - 1 \right)$$

* 基质效应 (ME)

- 两种样品均应溶于相同的溶液内
- 负值 = 抑制
- 正值 = 增强

萃取后加标样品的响应值	非萃取加标样品的响应值	基质效应
相同	相同	0%
较低	较高	离子抑制%
较高	较低	离子增强%

内容概览

I 固相萃取技术原理及其在水质分析中的应用

- 固相萃取技术简介
- 分离模式的选择
- SPE方法的通用流程、作用及使用注意事项
- **反相、复合模式SPE通用方法及优化策略**
- SPE在水质分析应用中的产品形式



I 如何选择合适的液相色谱柱

- 色谱填料的发展简介
- 反相保留模式
- HILIC模式



常用的SPE 吸附剂类型

--按基体类型分类

1 硅胶基体

I 优点

- ∅ 刚性颗粒，在不同溶剂中收缩和膨胀系数很小，在不同溶剂条件上会快速达到平衡
- ∅ 硅胶表面硅醇的是理想的功能性基团键合位点，对于生产更高选择性的吸附剂有更大空间

I 缺点

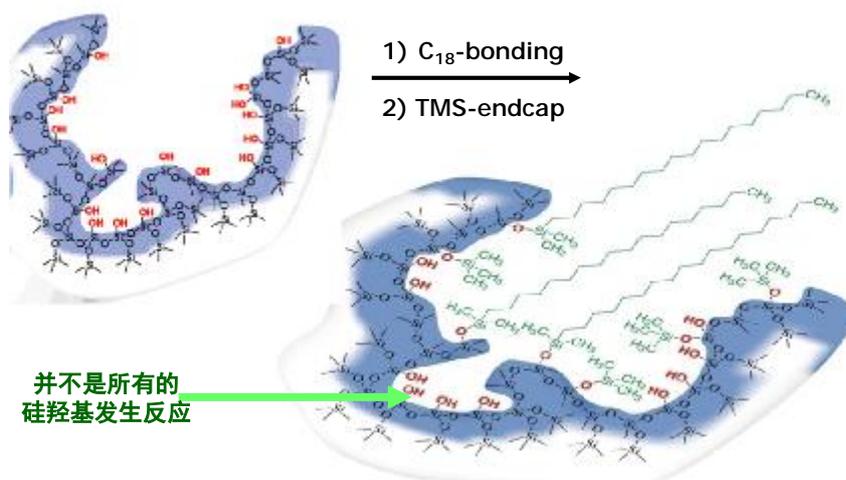
- ∅ pH耐受范围窄(一般2-7.5)
- ∅ 易受硅醇基影响
- ∅ 对硅胶纯度要求高

以硅胶为基质的传统反相吸附剂的局限性

- | 吸附剂的pH应用范围窄(通常为2-7)
- | 吸附剂对极性化合物的保留不佳
- | 由于残余硅醇基的影响，此类吸附剂对碱性化合物的回收率偏低。
- | **吸附剂普遍存在微孔脱水现象** (De-wetting Effect, 前称‘相塌陷’即‘Hydrophobic Collapse’)
 - o 若小柱在平衡或上样期间因流速控制不妥而导致小柱完全干涸时，样品将无法在小柱上进行正常的色谱保留，从而导致回收率偏低或结果不重复。
 - o 当以上状况发生时，常需对样品重新测试

硅胶颗粒的表面处理

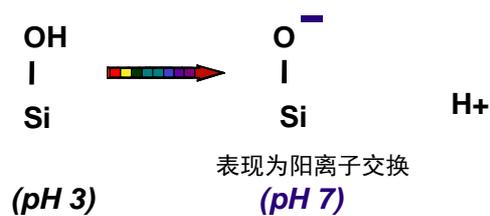
-- 键合和端基封尾



记住：即使在高键合密度下仍有接近~50% 表面硅醇基残留

硅羟基的离子化

I 表面硅羟基的电荷随流动相PH 发生变化



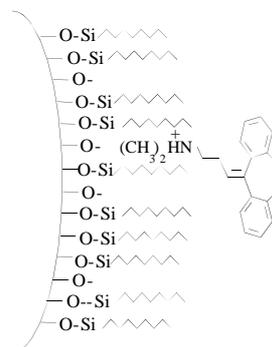
结果：碱性化合物(正电荷)与离子化的硅醇基表面发生强相互作用

次级相互作用力—离子保留模式

带电位点的离子交换作用

流动相pH > 3时：Si - O⁻

带负电的硅醇基与带正电的碱性化合物之间离子交换作用（常称为次级相互作用力），引起碱性化合物峰形拖尾



SHIMADZU-GL

InertSep Pharma(SDB-N-MA)

InertSep Pharma是含N基的苯乙烯二乙烯苯（SDB）异丁烯酸盐（ME）（酯）系的共聚物，是亲水亲脂聚合物反相吸附剂。有30um和60um两种孔径。

“亲水性结构”
提供优良的水可浸润性

“亲脂性结构”
提供反相保留特性

- 无硅醇基活性，对碱性化合物无过强吸附，回收率高
- pH 应用范围 0-14，可利用pH的作用灵活的进行方法开发
- 亲水性结构具有吸水保水的作用，小柱不怕干涸，同时有助于保留亲水性极性化合物
- 极高的比表面积，比硅胶吸附剂用量减少2/3

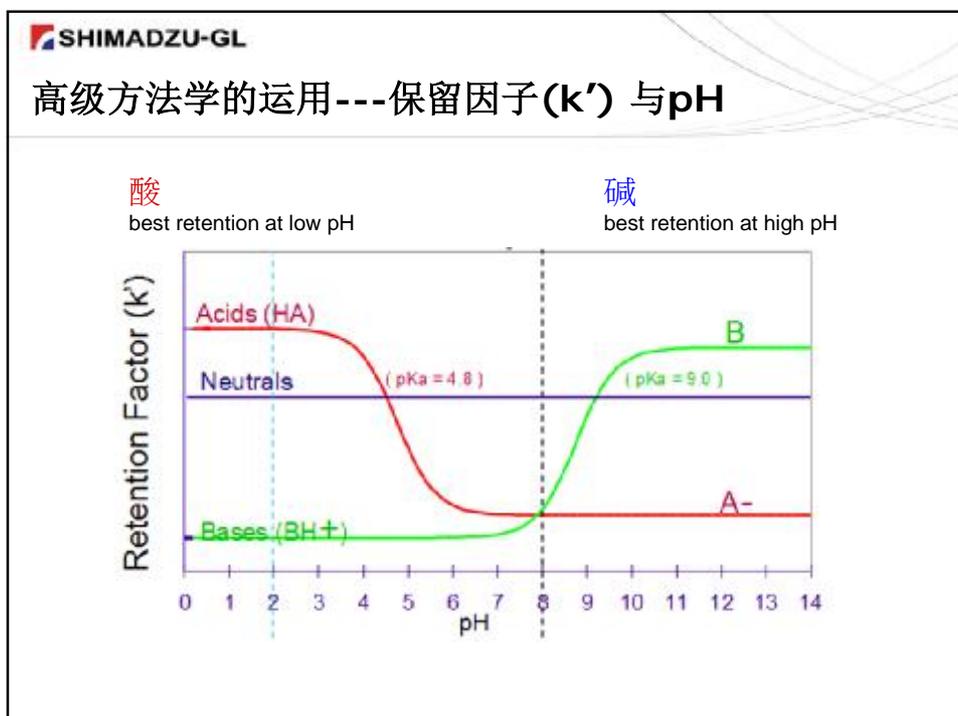
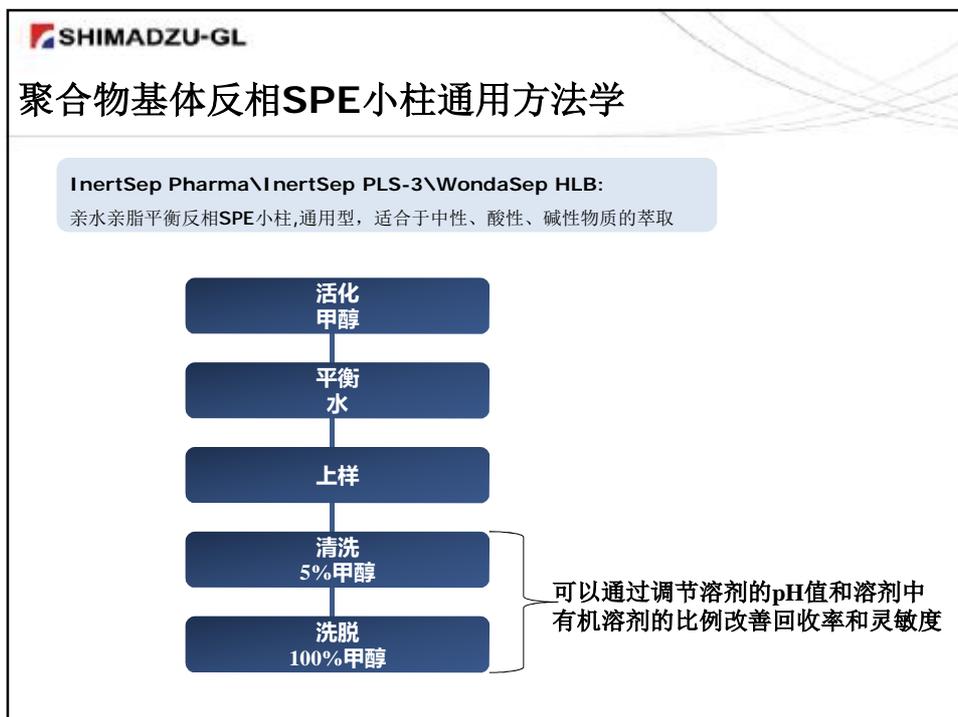
SHIMADZU-GL

聚合物基体反相SPE小柱通用方法学

InertSep Pharma\InertSep PLS-3\WondaSep HLB:
亲水亲脂平衡反相SPE小柱,通用型,适合于中性、酸性、碱性物质的萃取

```

graph TD
    A[活化  
甲醇] --> B[平衡  
水]
    B --> C[上样]
    C --> D[清洗  
5% 甲醇]
    D --> E[洗脱  
100% 甲醇]
  
```



SHIMADZU-GL

环境中双酚A, 雌激素等内分泌干扰物的分析 -1D方法

**InertSep PLS-3
6cc/200mg**

样品制备
pH 2

活化/平衡
3 mL MTBE, 3 mL 甲醇, 3 mL水

上样
500 mL 水

清洗 1
3 mL 5% 甲醇水

洗脱
6 mL 10:90 甲醇/MTBE

挥发复溶定容到1mL

一维方法 (1D) LOQ 50ppt

SHIMADZU-GL

环境中双酚A, 雌激素的分析-2D方法

**InertSep PLS-3
6cc/200mg**

二维优化方法 (2D) LOQ 5ppt

样品制备
pH 2

活化/平衡
3 mL MTBE, 3 mL 甲醇, 3 mL水

上样
500 mL 水

清洗 1
3 mL 40% 甲醇水

重新平衡
3 mL 水

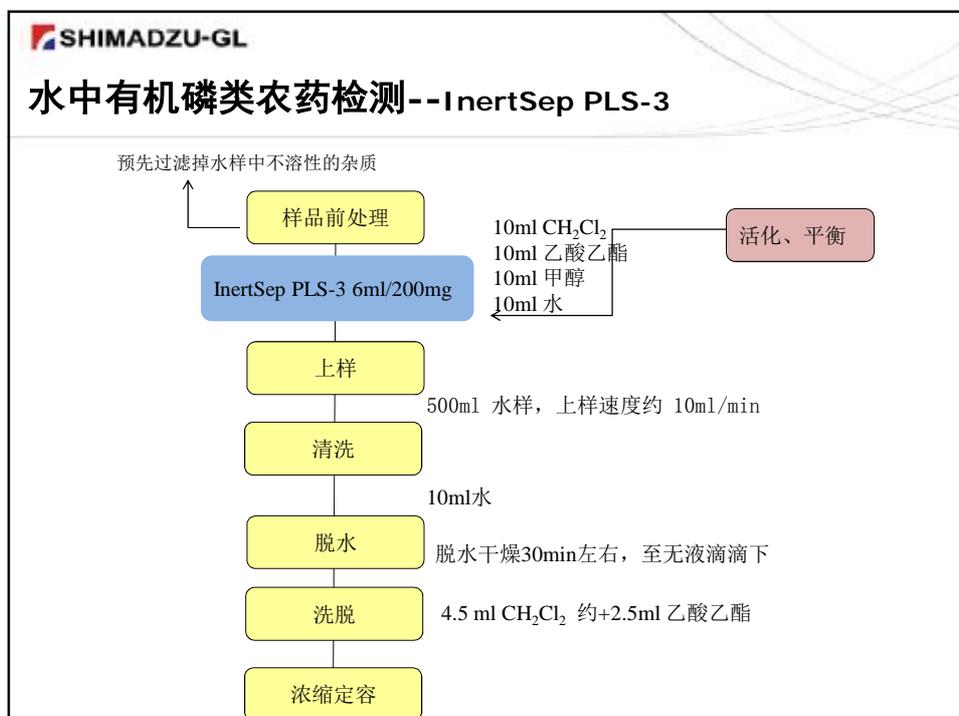
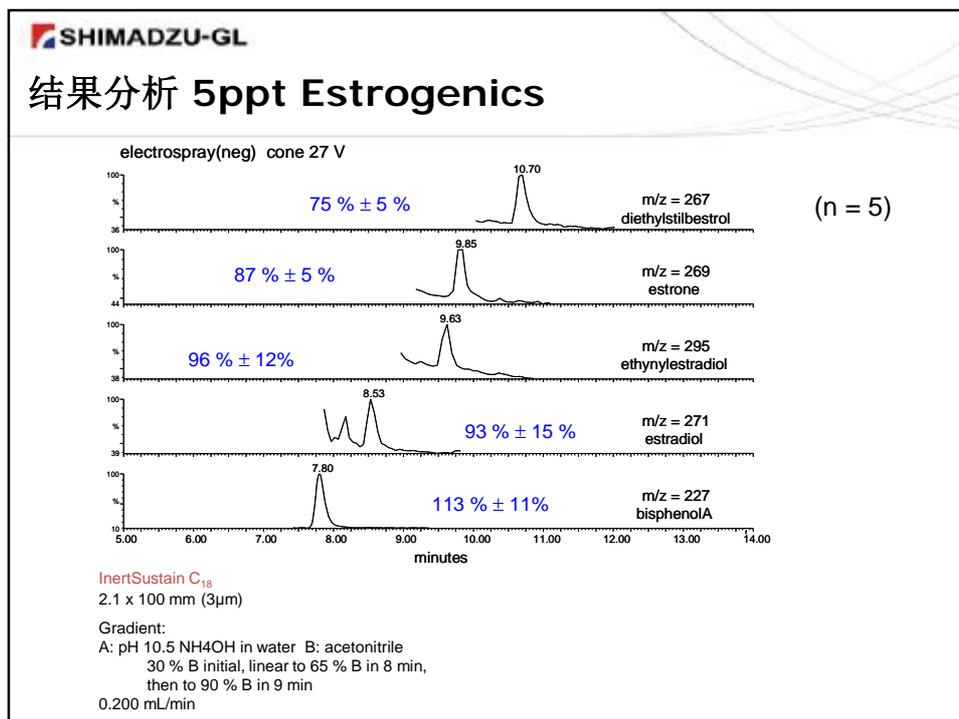
清洗 2
3 mL 10% 甲醇/2% 氨水

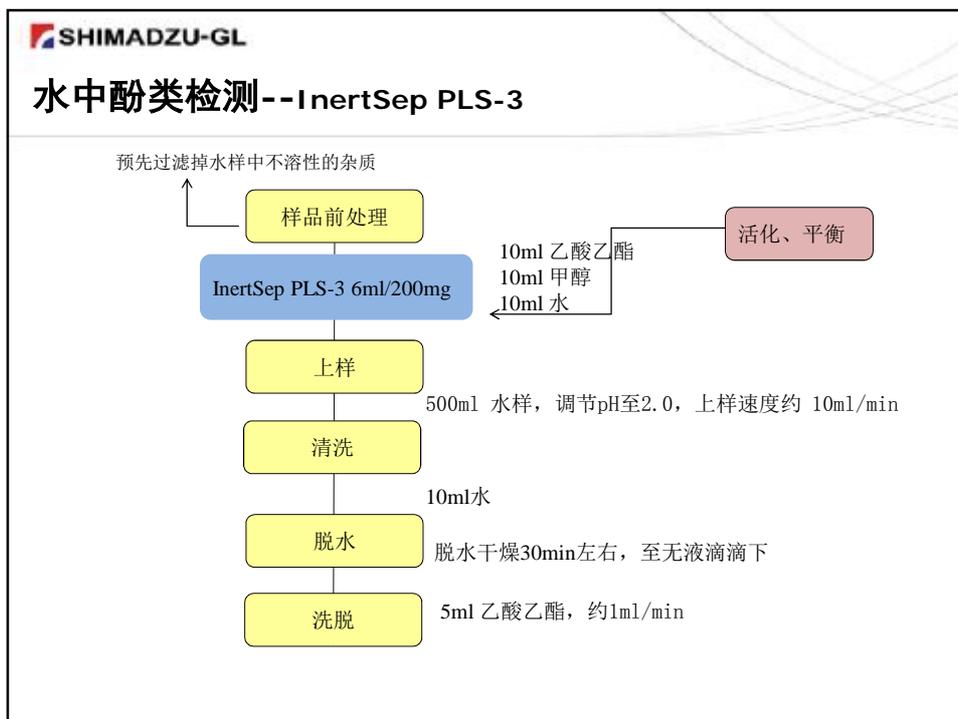
洗脱
6 mL 10:90 甲醇/MTBE

挥发到上样体积

40% 甲醇清洗
去除极性有机干扰物

pH 11 清洗
去除腐殖质干扰物





SHIMADZU-GL

离子交换和复合模式

可离子化合物

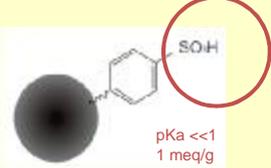
- I 许多环境样品是弱酸(i.e. dinoseb)或弱碱性(i. e. aniline).
 - Ø 弱酸性物在高 pH下离子化
 - Ø 弱碱性物在低 pH下离子化
- I 一些强酸(如. 全氟磺酸)或强碱(如. 洗必太chlorhexidine)除在特殊pH 条件下都离子化
- I 少数季铵盐(如. 矮壮素chlormequat), 在所有pH 条件下都离子化

SHIMADZU-GL

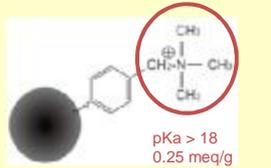
WondaSep 复合模式固相萃取小柱



WondaSep HLB
亲水亲脂平衡反相吸附剂



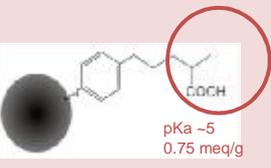
WondaSep MCX
pKa << 1
1 meq/g



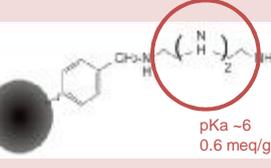
WondaSep MAX
pKa > 18
0.25 meq/g



WondaSep MPC
复合模式强阳离子交换吸附剂



WondaSep WCX
pKa ~5
0.75 meq/g



WondaSep WAX
pKa ~6
0.6 meq/g

SHIMADZU-GL

聚合物基体复合模式SPE柱

- InertSep Pharma\InertSep PLS-3\WondaSep HLB:**
亲水亲脂平衡反相SPE小柱,通用型, 适合于中性、酸性、碱性物质的萃取
- InertSep MPC\WondaSep MPC\WondaSep MCX**
复合模式强阳离子交换SPE小柱, 适合于弱碱性化合物
- WondaSep MAX**
复合模式强阴离子交换SPE小柱, 适合于弱酸性化合物
- WondaSep WAX**
复合模式弱阴离子交换SPE小柱, 适合于强酸性化合物
- WondaSep WCX**
复合模式弱阳离子交换SPE小柱, 适合于强碱性化合物

SHIMADZU-GL
WondaSep MPC 吸附剂上
碱性化合物的作用模式

WondaSep MPC吸附剂
复合模式强阳离子交换吸附剂

反相作用

$pK_a \ll 1$

强阳离子交换作用

普萘洛尔
(碱性药物)

SHIMADZU-GL
WondaSep MPC:
净化和富集碱性化合物的强有力工具

(WondaSep 所有pH下均带负电)

碱 (BH⁺)

碱 (B)

中性化合物

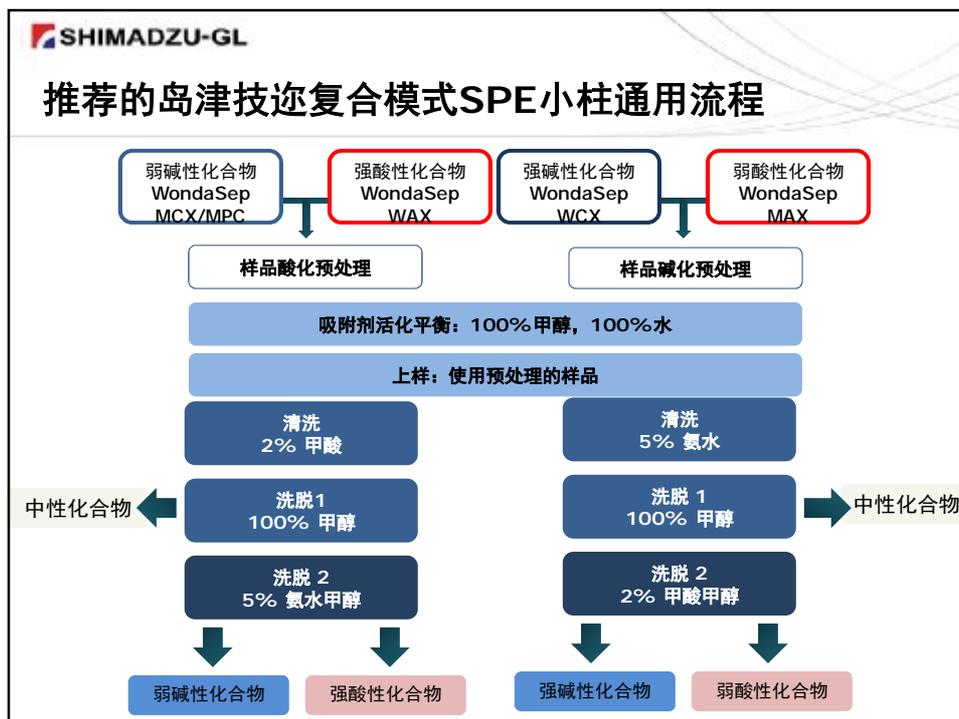
酸 (HA)

酸 (A⁻)

k'

pH

- 样品预处理 (酸化)
- 活化/平衡: 甲醇/水
- 上样
- 清洗1: 2% 甲酸水溶液 (目标锁定)
- 清洗2: 100% 甲醇 (强烈清洗)
- 洗脱: 5% 氨水-甲醇 (目标释放)
- 溶剂蒸发/重新定容 (选项)



SHIMADZU-GL

复合模式SPE是净化可离子化化合物的最佳方式

- 当可离子化合物以完全离子化方式与复合模式吸附剂作用时，离子交换作用成为占主导的作用力。由于离子交换所涉及的能量远比普通疏水作用力（范德华力）高，当用纯有机溶剂淋洗复合模式吸附剂时，处在复合作用模式的离子型化合物将得以完全保留，而那些单纯以疏水性作用为保留机制的物质将被大部去除。
- 经过纯有机溶剂的强烈清洗后，调整pH可使离子化的目标化合物变回电中性状态。这些化合物与复合模式吸附剂的作用随之转变为单纯的疏水性作用。此时增加溶剂强度所淋出的化合物将只是目标化合物和携带同类电荷的物质（完全无中性物质和带相反电荷的物质）。
- 因此，复合模式SPE吸附剂提供了
 - 最清洁的样品
 - 最高的检测灵敏度
 - 最长的柱寿命
 - 最少的系统维护需求

固相萃取小柱在日常检测中的应用—水质分析

项目名称	SPE小柱	色谱柱
水中多环芳烃	WondaSep C18 6ml/1g 或 InertSep PLS-3 6ml/200mg	Inertsil ODS-P
水中酚类	WondaSep C18 6ml/1g 或 InertSep PLS-3 6ml/200mg	InertCap-5MS/Sil
城市供水 有机磷	InertSep PLS-3 6ml/200mg	InertCap / WondaCap 17
地表水、地下水及废水中 多氯联苯	WondaSep C18 6ml/1g	InertCap / WondaCap 1
水中菊酯类	InertSep PLS-3 6ml/200mg	Inertsil ODS-3
饮用水、地表水中 微囊藻毒素	WondaSep C18 6ml/1g 或 InertSep PLS-3 6ml/200mg	Inertsil ODS-3

固相萃取小柱在日常检测中的应用—农兽残

项目名称	SPE小柱
乳制品中三聚氰胺含量测定	InertSep/WondaSep MPC 3ml/60mg
猪肉中 β -受体激动剂的分析	InertSep/WondaSep MPC 3ml/60mg
动物肌肉/水产品/蜂蜜中四环素 土霉素 金霉素 强力霉素的残留分析	InertSep Pharma 3ml/60mg
蜂蜜/禽肉/乳制品/饲料中磺胺类药物分析	InertSep/WondaSep MPC 3ml/60mg
鸡肉组织中硝基呋喃及其代谢物分析	同上
水产品/饲料中孔雀石绿分析	InertSep/WondaSep MPC 3ml/60mg
蜂蜜/牛奶/禽肉中青霉素类抗生素分析	InertSep/WondaSep C18 6ml/500mg
辣椒产品中苏丹红分析	InertSep Al ₂ O ₃ B (碱性氧化铝) 6ml/500mg
坚果 花生等样品中黄曲霉毒素G1 G2 B1 B2分析	InertSep VRA 专用小柱
水果 蔬菜中有机氯分析	InertSep/WondaSep FL-PR 6ml/1g
水果 蔬菜中氨基甲酸酯分析	InertSep/WondaSep NH ₂ 6ml/500mg
茶叶中农残分析	InertSep/WondaSep GC-e/NH ₂ 6ml/500mg/500mg

SHIMADZU-GL

内容概览

I 固相萃取技术原理及其在水质分析中的应用

- 固相萃取技术简介
- 分离模式的选择
- SPE方法的通用流程、作用及使用注意事项
- 反相、复合模式SPE通用方法及优化策略
- **SPE在水质分析应用中的产品形式**



I 如何选择合适的液相色谱柱

- 色谱填料的发展简介
- 反相保留模式
- HILIC模式



SHIMADZU-GL

离线SPE产品形式常见形式—水质分析

I 小柱形式



萃取小柱式:

- 小柱体积 1~35ml, 吸附剂重量 10mg~6g
- 为中等数量样品设计
- 在食品安全、环境分析和学术研究等领域较流行

I 装置



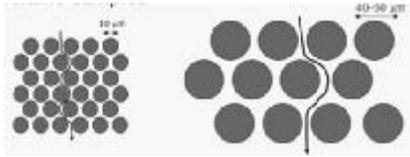
SHIMADZU-GL

离线SPE产品形式常见形式—水质分析

I 固定萃取盘形式 (Disk)



形状: 圆盘径47mm, 90mm
材质: 外壳/PTFE、玻璃纤维





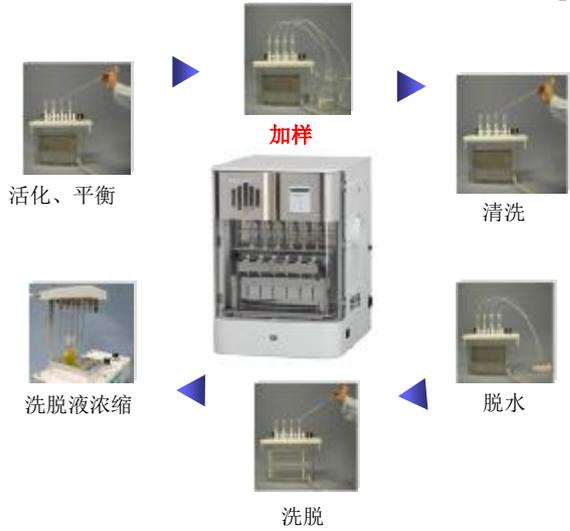

SHIMADZU-GL

全自动固相萃取装置

AQUA Trace ASPE799



Cat.No: 6030-79900



活化、平衡

加样

清洗

脱水

洗脱

洗脱液浓缩

SHIMADZU-GL

内容概览

I 固相萃取技术原理及其在水质分析中的应用

- 固相萃取技术简介
- 分离模式的选择
- SPE方法的通用流程、作用及使用注意事项
- 反相、复合模式SPE通用方法及优化策略
- SPE在水质分析应用中的产品形式



I 如何选择合适的液相色谱柱

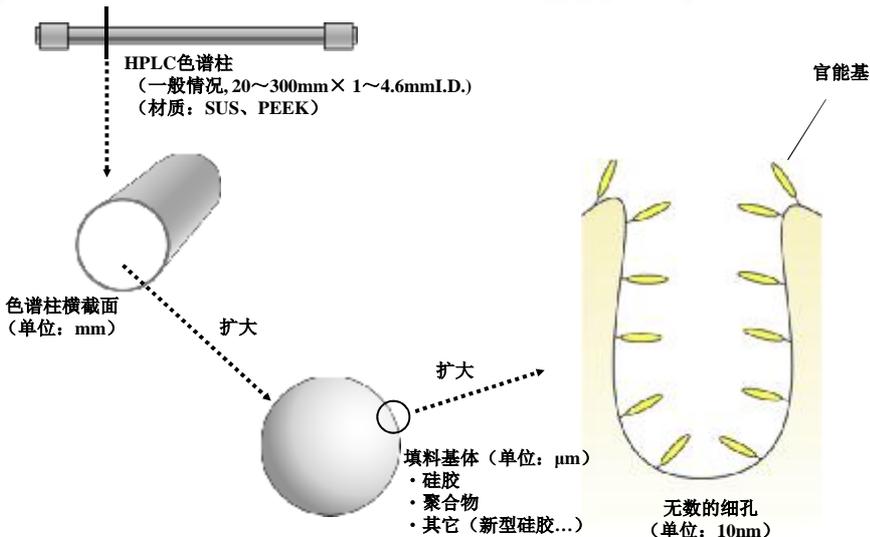
- 色谱填料的发展简介
- 反相保留模式
- HILIC模式



SHIMADZU-GL

色谱柱和填料

--全多孔填料颗粒



HPLC色谱柱
(一般情况, 20~300mm×1~4.6mmI.D.)
(材质: SUS、PEEK)

官能基

色谱柱横截面
(单位: mm)

扩大

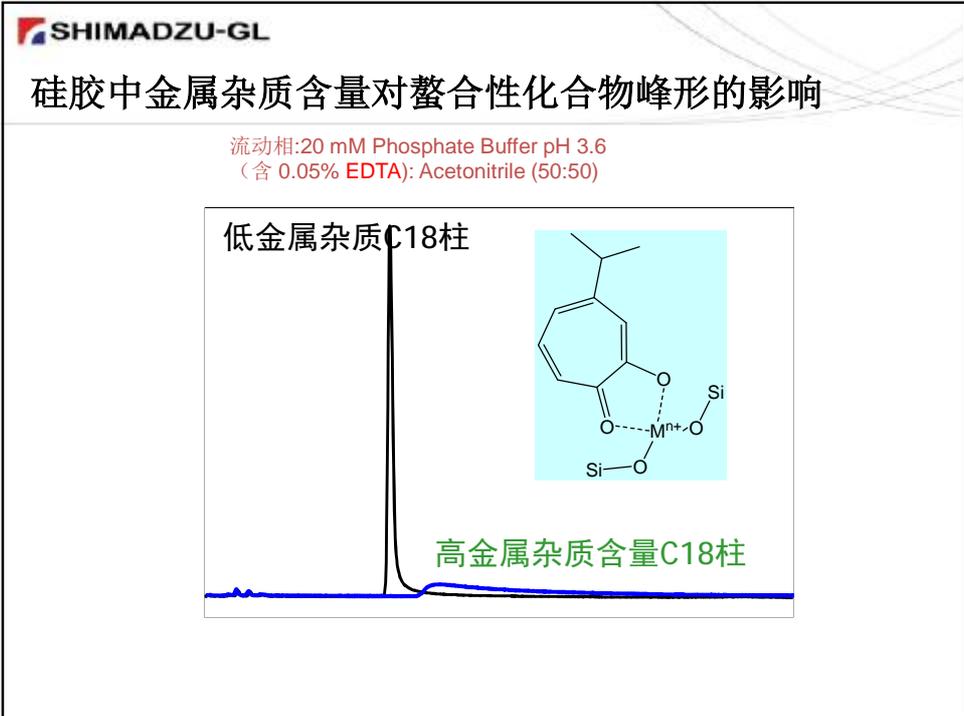
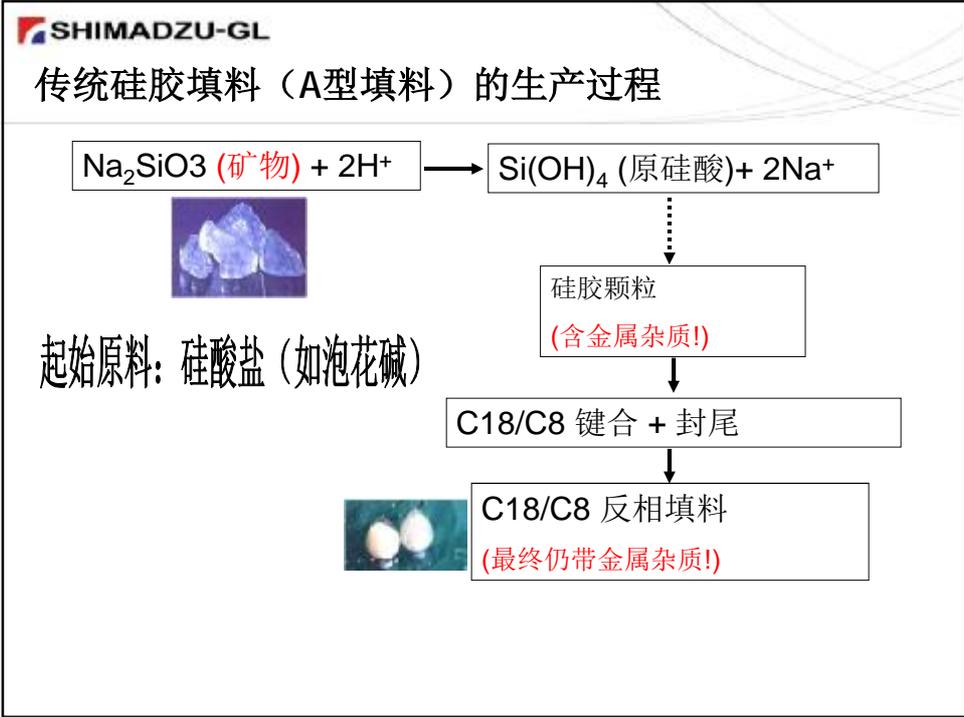
扩大

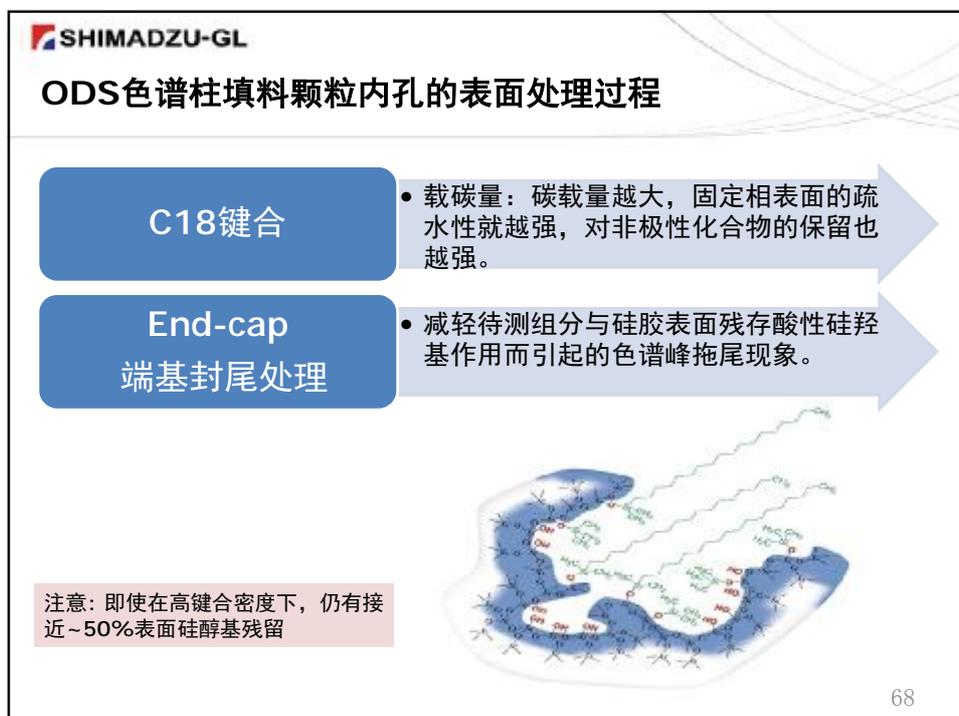
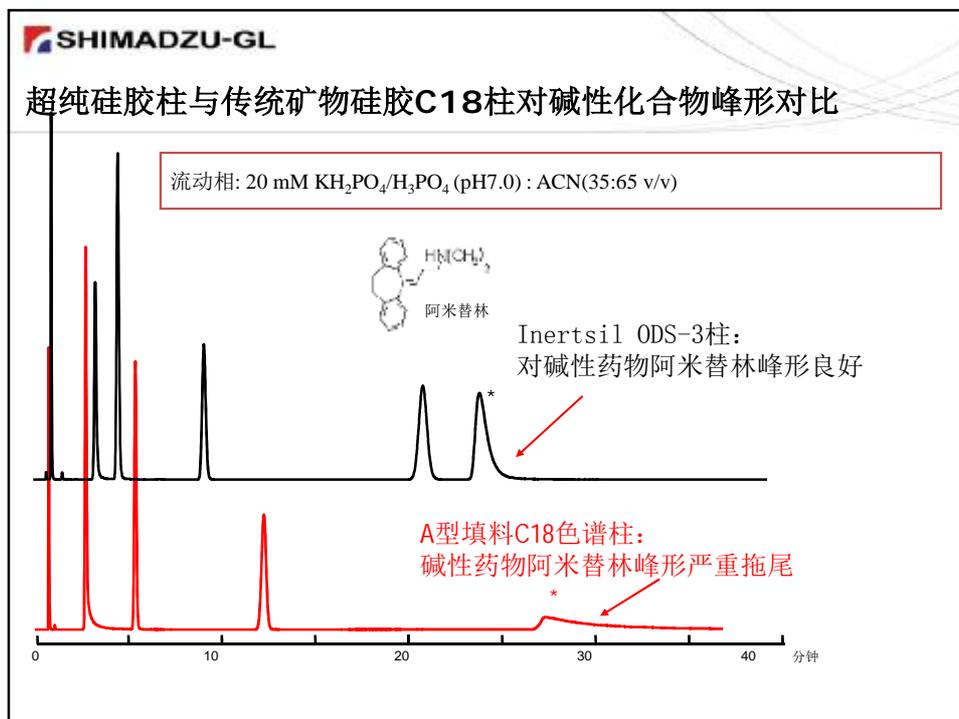
填料基体 (单位: μm)

- 硅胶
- 聚合物
- 其它 (新型硅胶...)

无数的细孔
(单位: 10nm)

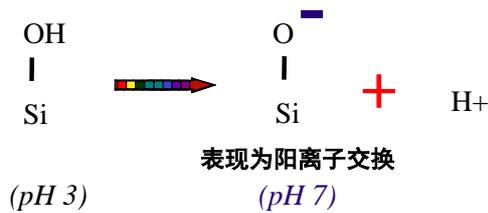
64





不理想的峰形-硅羟基的离子化

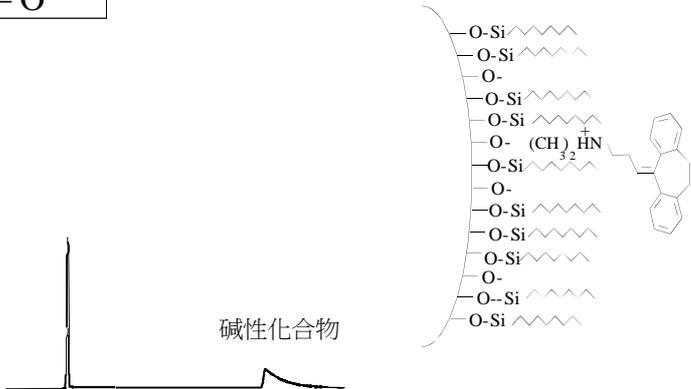
表面硅羟基的电荷随流动相PH 发生变化：
碱性化合物（带正电荷）与离子化的硅醇基发生强相互作用



不理想的峰形： 次级相互作用力—离子保留模式

流动相pH > 3
 Si-O^-

带电位点的离子交换作用



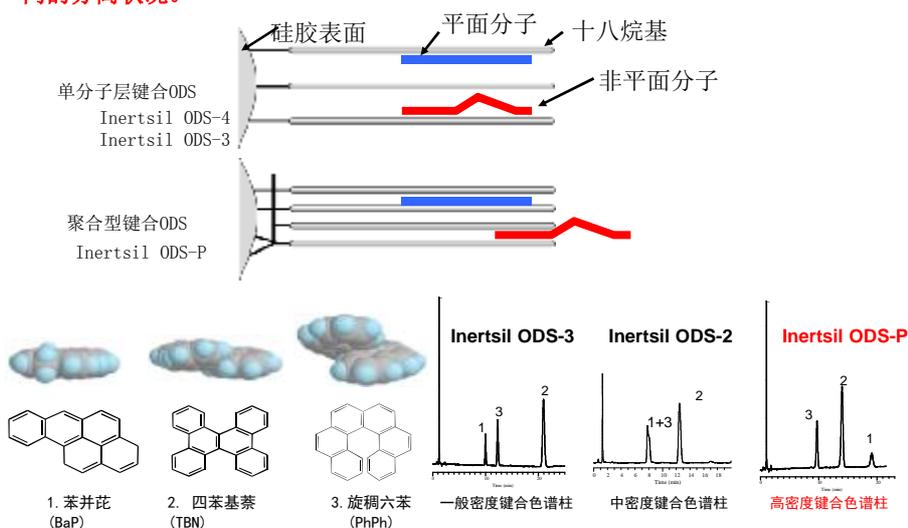
Inertsil 3代高纯度惰性硅胶系列产品

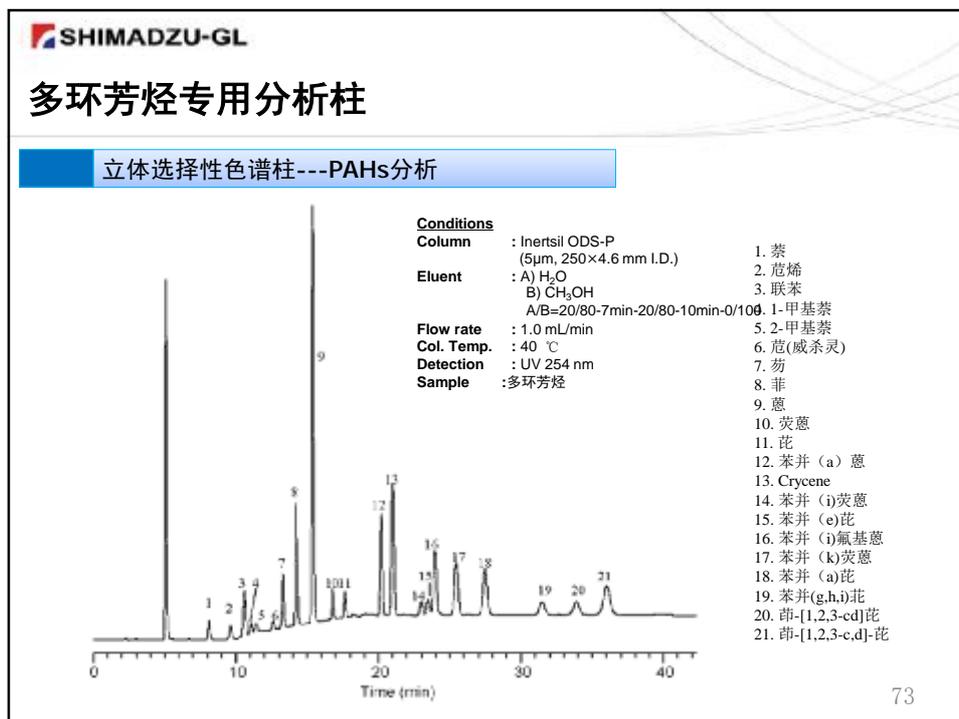
- I 提供通用的分离选择性的反相色谱柱 (Inertsil ODS-3, pH2-7.5)
- I 将分离选择性稍加变化时
 - ∅ 立体选择性 → 使用聚合型键合ODS色谱柱 (Inertsil ODS-P)
 - ∅ 利用 π - π 电子相互作用 → 使用苯基色谱柱 (Inertsil Ph-3)
- I 提高亲水性化合物的反相保留和疏水性成分的出峰速度时
 - ∅ 使用低含碳量的ODS色谱柱 (Inertsil ODS-SP)
- I 提高全部峰的出峰速度时
 - ∅ 使用C8色谱柱 (Inertsil C8-3)
- I 适合于LCMS分析条件, 无需使用TFA, 即可获得碱性化合物尖锐的峰形
 - ∅ 使用Inertsil ODS-4

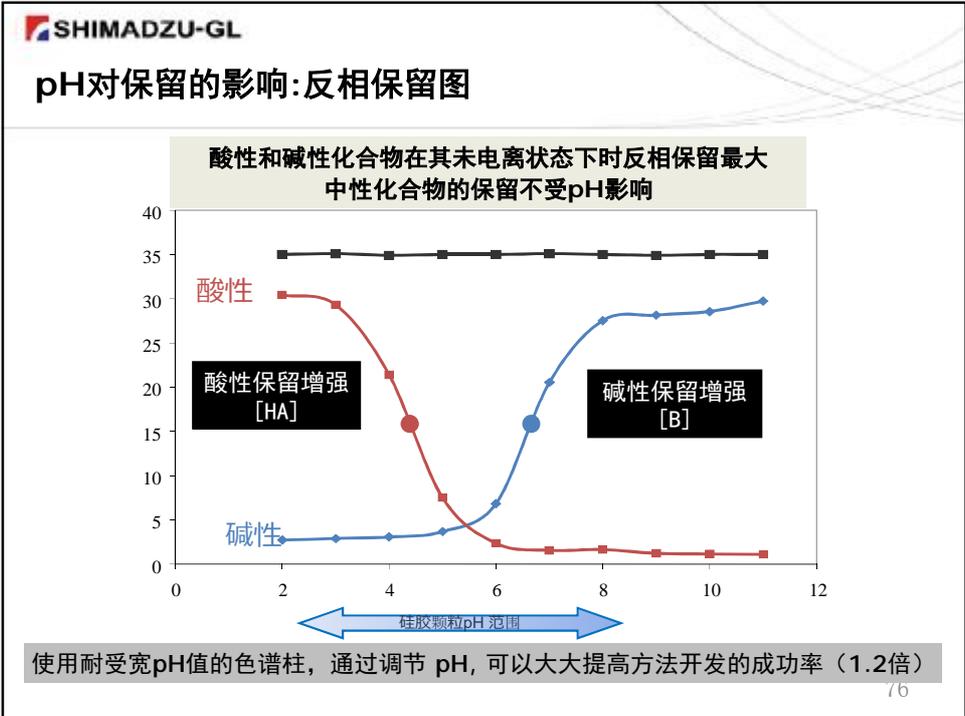
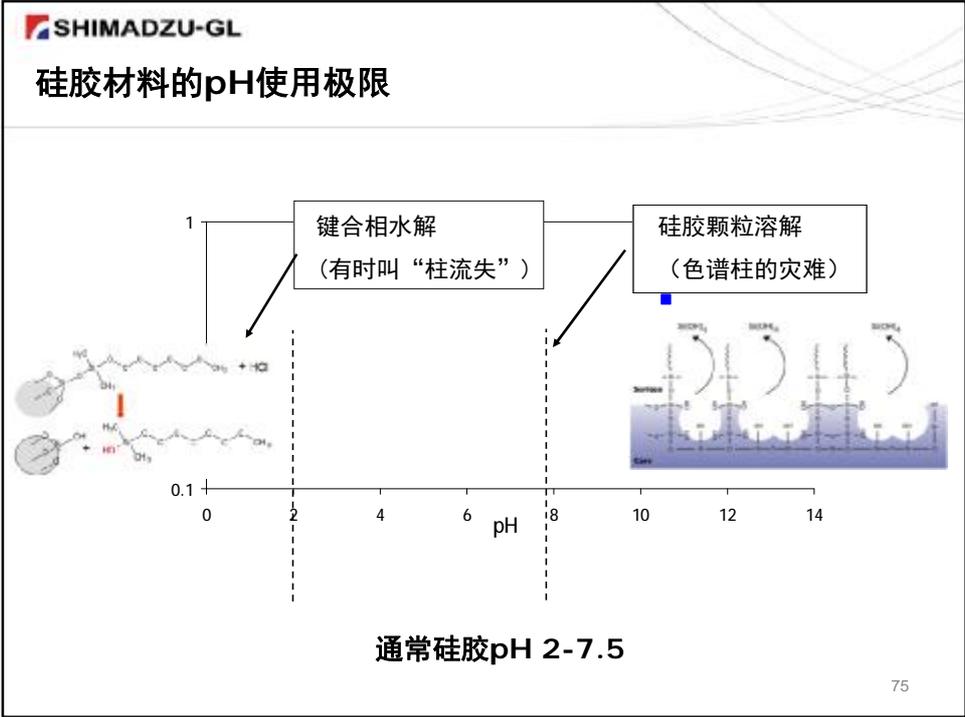
71

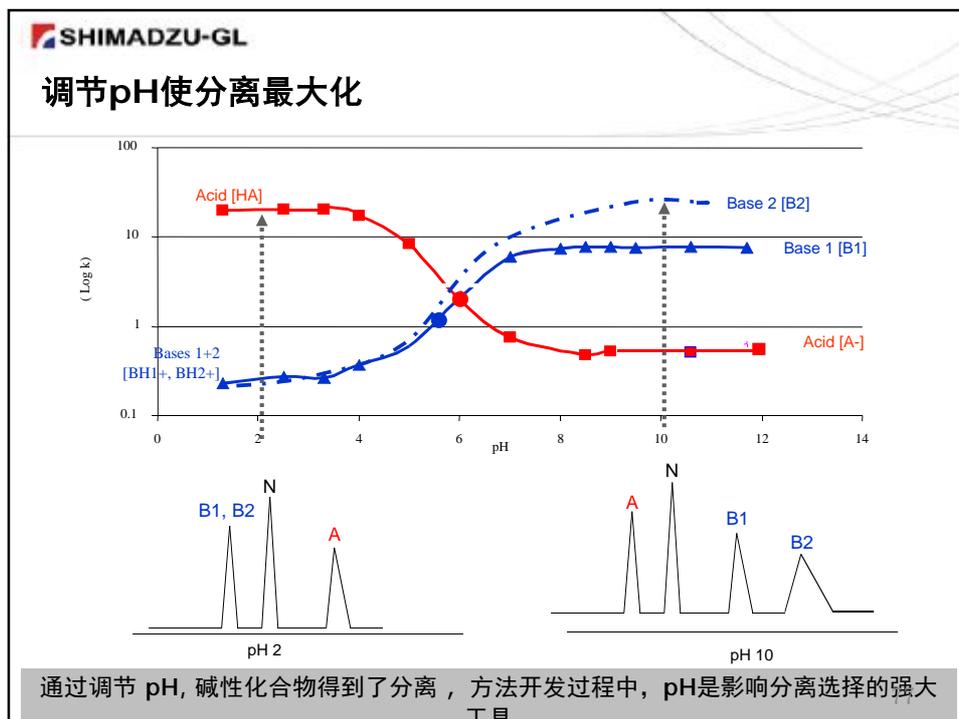
Inertsil ODS-P

使用聚合型键合的ODS色谱柱, 使色谱柱对分子的立体识别能力发生变化, 以得到不同的分离状况。









SHIMADZU-GL

InertSustain 系列色谱柱

高惰性与高保留完美结合的新型色谱柱!

1. 采用ES新型硅胶, 二次封尾, 更高惰性;
2. 宽pH 1-10范围兼容性, 苛刻的流动相条件下更好的耐久性;
3. 粒径2 μ m, 3 μ m, 5 μ m, 满足常规分析到超快速分离;
4. 对于不同选择性有四种固定相可以选择 (C18, C8, Phenyl, NH2, 其中C18为岛津进口仪器标配)

新增InertSustainSwift C18色谱柱

同类产品价格优势明显!

78

全氟化合物背景介绍

- 全氟化合物（PFCs）例如全氟辛烷磺酸（PFOS）和全氟辛酸（PFOA）被认为是继多氯联苯、有机氯农药和二恶英等之后的又一持久性有机污染物（POPs），已逐渐成为国际上环境健康领域的研究热点。
- 被应用在许多家庭用品中——最有名也是应用于各领域最多样变化的的事就是塑料——聚四氟乙烯产品等
- PFCs具有远距离传输能力，已经广泛存在于全世界范围内的环境和生物样品中。
 - 绝大多数美国人血液中均含有约5ppt PFOA



PFOA: Perfluorooctanoic Acid



PFOS: Perfluorooctanesulfonic Acid

PFC分析-样品制备方法InertSep Pharma

InertSep Pharma PFC Method

活化/平衡
5 mL 甲醇/10 mL 水

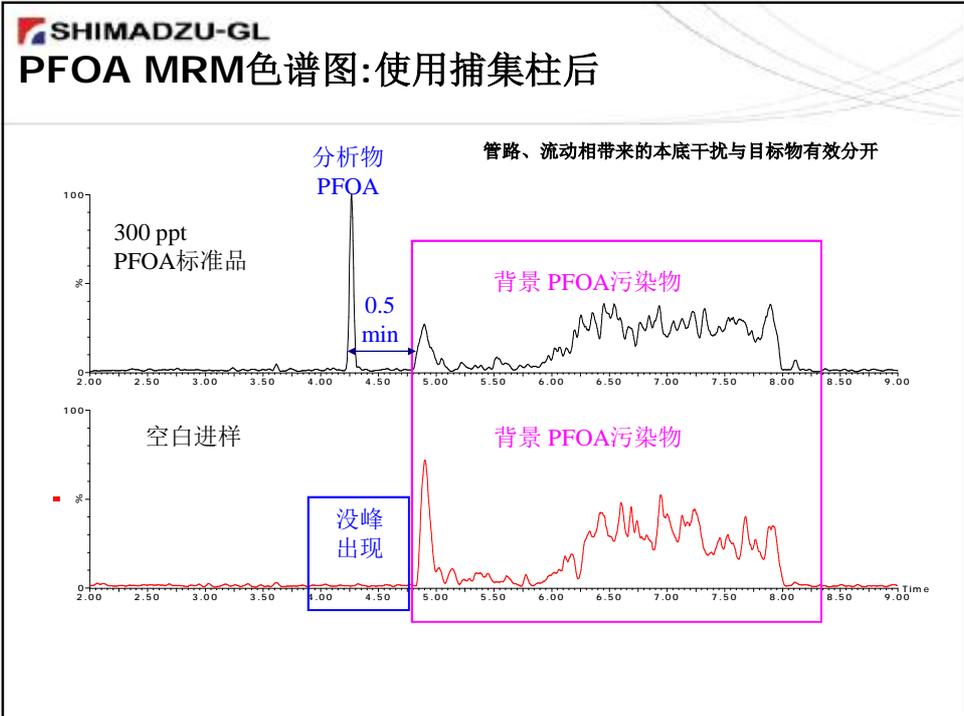
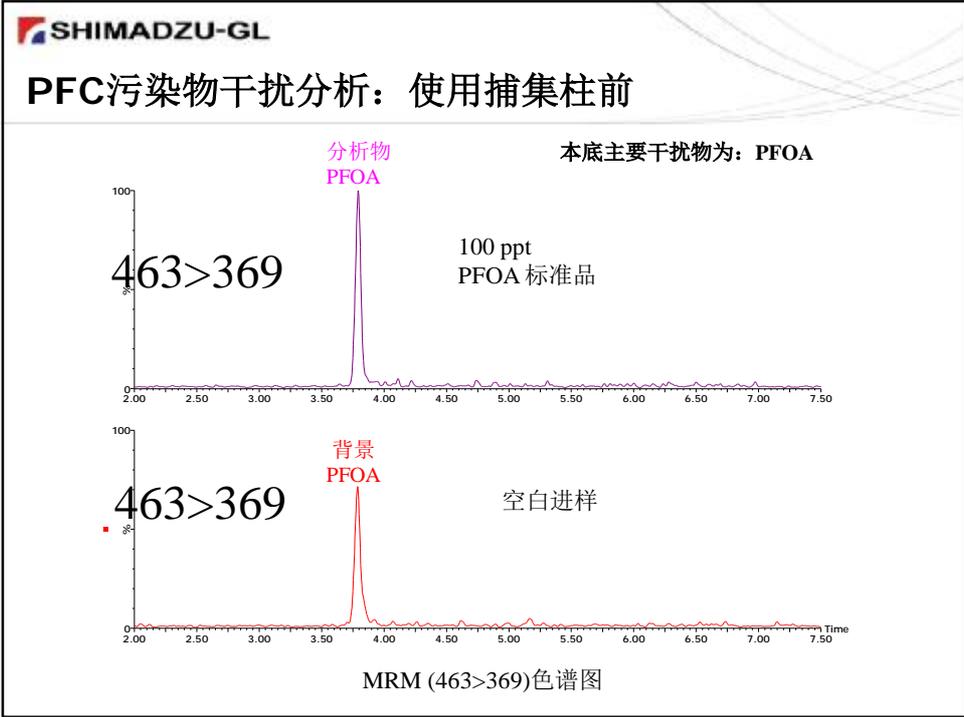
上样
500 mL

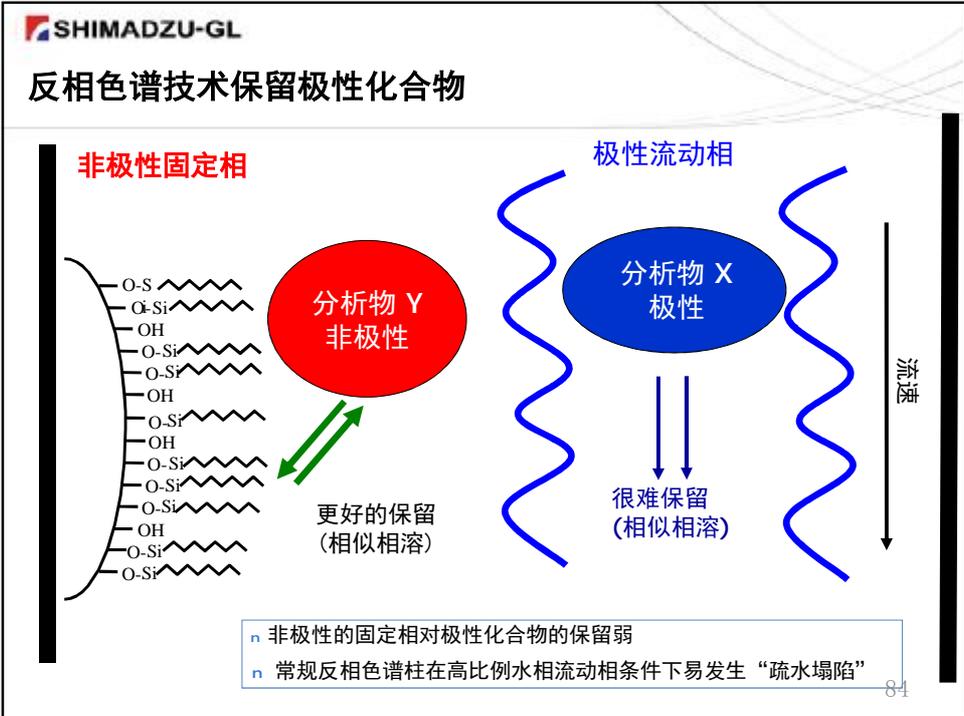
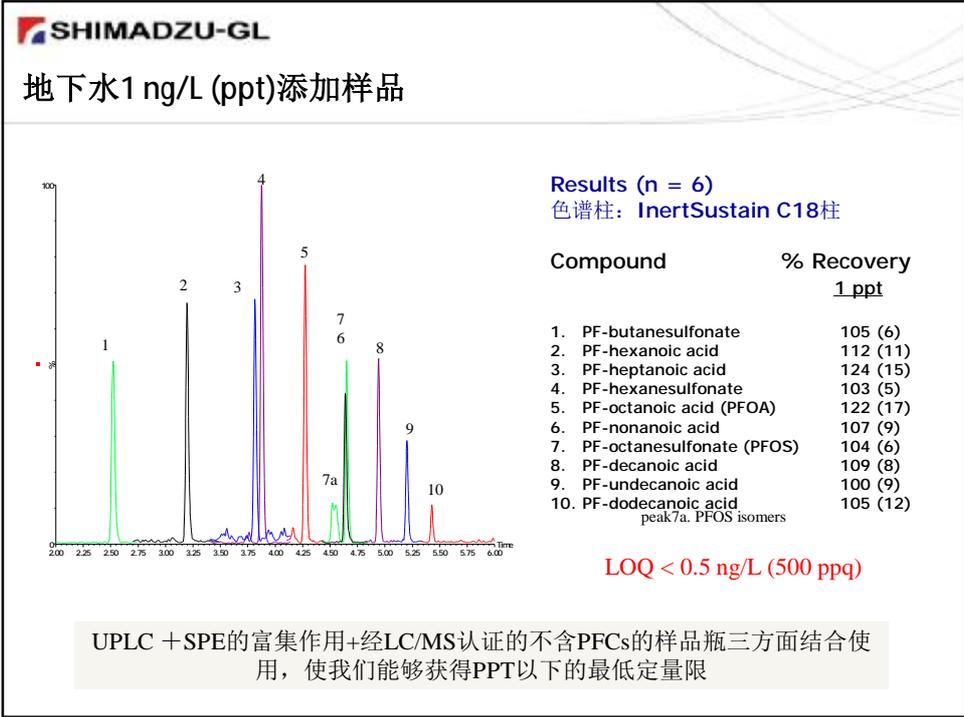
清洗
2 mL 水

用N₂抽干 20 min

洗脱
2 mL 甲醇
蒸干定容到 500 μL
用水稀释至流动相强度

- PFCs在InertSep Pharma 小柱上保留和富集
- 保留的PFCs可以用甲醇洗脱下来
- 洗脱液蒸干重新定容到500 μL
 - PFCs 在分析前通过添加200 μL 2 mM 乙酸胺确保其稳定性
- 洗脱液用水稀释到流动相强度
- 样品待分析





SHIMADZU-GL

您是否花费太多时间寻找用于极性化合物的色谱柱？

端基封尾

配基类型

孔径

配基密度

耐纯水，不会发生“疏水塌陷”
提高极性化合物的反相保留
降低强疏水性化合物的反相保留
梯度分析时可降低平衡时间
峰形尖锐
稳定性好

填料化学:

- 基体: ES新型硅胶
- 孔径: 200Å
- 化学键合基: C18
- 端基封尾: 完全
- 含碳量: 9%
- 推荐pH使用范围: 1~10

InertSustainSwift C18

Si-C18H37

SHIMADZU-GL

InertSustainSwift C18的100%水溶液试验

ODS色谱柱根据疏水性相互作用的强度，在梯度分析时，根据溶剂极性的易融合性，会发生保留时间的批次重现性问题。

↓

最合适的化学处理·含碳量·微孔径

↓

100%水溶液条件也能使用，梯度分析时更快更稳定！

第一次测定

第二次测定
变动率 99.6 (%)

第三次测定
变动率 99.8 (%)

试验顺序

- 1) 100%水溶液送液60分钟
- 2) 分析
- 3) 15分钟后停止送液
- 4) 溶液送液30分钟
- 5) 15分钟后停止送液
- 6) 分析

Conditions

Column : InertSustainSwift C18
(5 μm, 4.6 × 250)

Eluent : 100 % H₂O

Flow rate : 1.0 mL/min

Col. Temp. : 40 °C

Detection : UV 254 nm

Sample : 1.胞嘧啶 2.尿嘧啶
3.鸟嘌呤 4.胸腺嘧啶
5.腺嘌呤

86

考察保留能力和灵敏度： 如果反相保留不能分析，该怎么办呢？

I 反相保留策略保留极性化合物分析

∅ 专门为极性化合物反相保留策略而设计的低碳密度的 C₁₈ 色谱柱

ü **InertSustainSwift C18** (新型硅胶基体)

ü 常用的流动相条件：高比例的水相流动相，甚至是纯水相

- 耐受100%水相流动相不会发生疏水塌陷

如果仍然没有好的保留或者
MS 响应很低怎么办???
尝试 HILIC...

89

什么是HILIC ?

i HILIC - Hydrophilic Interaction Chromatography

(亲水性相互作用色谱)

i HILIC是正相色谱的一个“变种”，它避免了使用与水不相容的有机溶剂，流动相中含有水

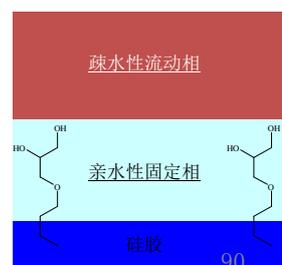
- “反反相色谱”，又称“含水正相色谱”

i 固定相是极性填料

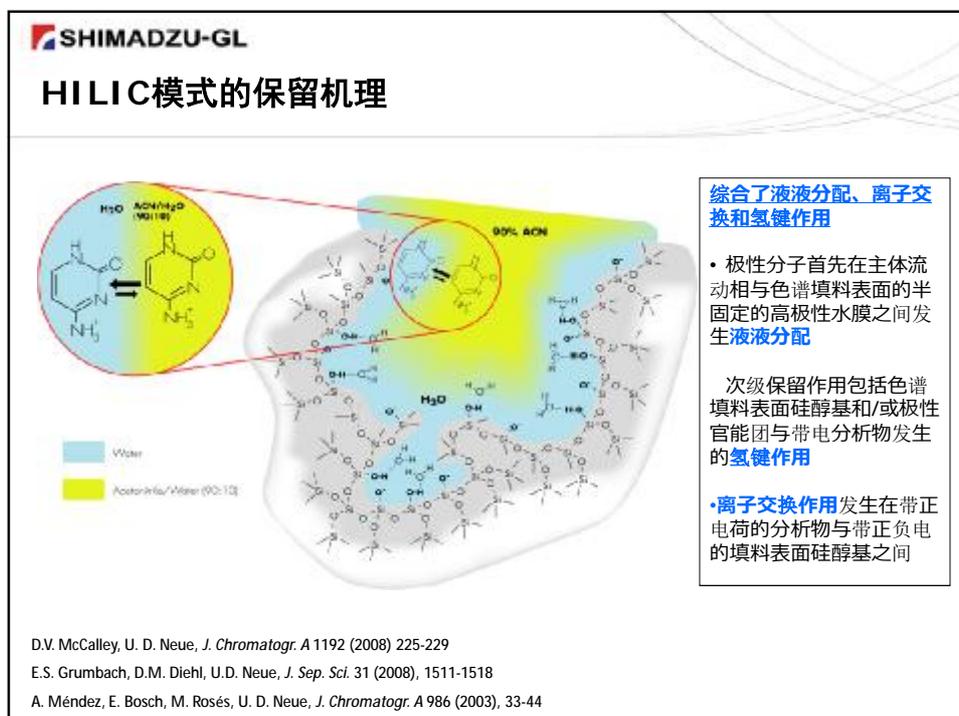
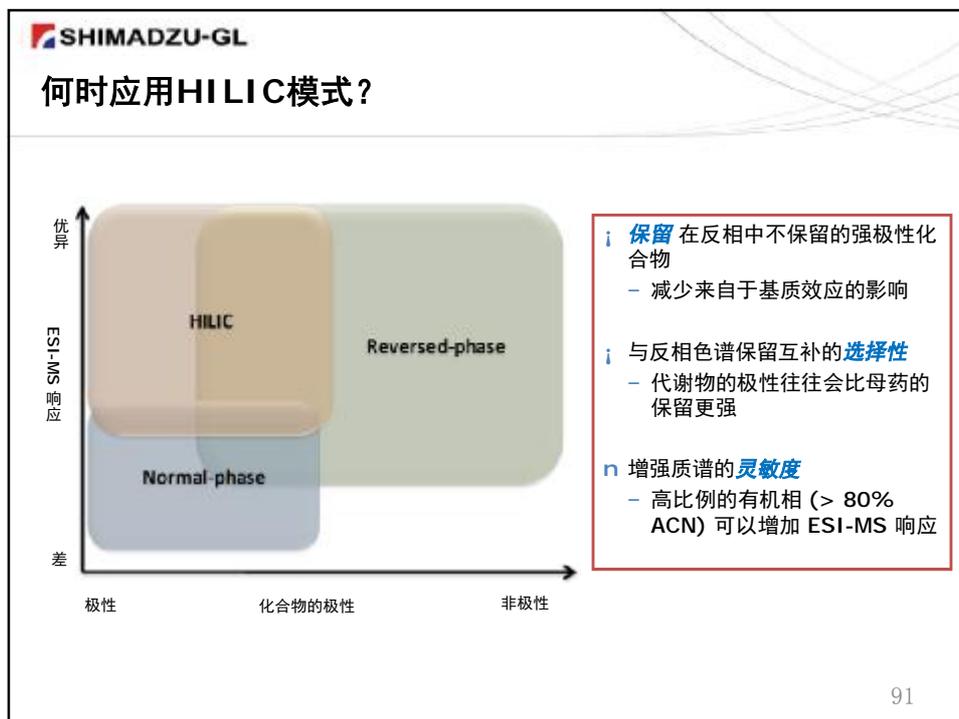
- Silica, cyano, amino, diol, amide

i 流动相含有高比例的有机溶剂 (> 80%) 和少量的水相

- 水（或其它极性溶剂）是强的洗脱溶剂

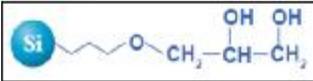
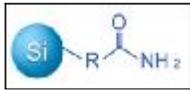


*Alpert, A. J. *J.Chromatogr.* 499 (1990) 177-196.



SHIMADZU-GL

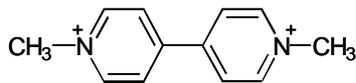
岛津技迹HILIC模式色谱柱

<p>I Inertsil HILIC(二醇基)</p> <p>o 适合于中性、碱性极性化合物的保留。</p>	
<p>I Inertsil NH2(氨丙基)</p> <p>o 也可用作正相柱，糖分析。</p>	
<p>I InertSustain NH2(氨丙基)</p> <p>o 耐久性强于Inertsil NH2，比市售常规氨基柱寿命长3倍，特别适合于做糖分析。</p>	
<p>I Inertsil Amide(烷基酰胺基)</p> <p>o 是对高极性化合物均具有强保留能力的HILIC色谱柱，针对于多样的化合物均能够保留，是HILIC色谱柱的首选</p>	

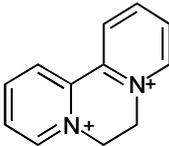
93

SHIMADZU-GL

环境水样中Paraquat和Diquat的分析



Paraquat
(百草枯)



Diquat
(敌草快)

- 最常用的农用除草剂之一
 - 美国paraquat的年用量为300 百万磅以上
- 无论样品前处理和LC/MS分析均极具挑战性
 - 纯以反相机理保留则离不开离子对试剂
 - 以强离子交换机制保留则需用到高盐份去洗脱 (与LC/MS分析不兼容!)



SHIMADZU-GL

选择WondaSep WCX

C[N+]1=CC=C(C=C1)-C2=CC=CC=N2

paraquat

C1=CC=C2C(=C1)N=CN2

diquat

对季铵碱、盐
pKa >10
选择 WondaSep® WCX

样品预处理

激活/平衡
上样

清洗:
5% 氨水

淋洗
100% MeOH

淋出段 2:
2% 甲酸-MeOH

季铵碱、盐

SHIMADZU-GL

经优化的 Paraquat/Diquat SPE方法

(在WondaSep WCX 3 cc 小柱上开发)

样品处理

调水样品 pH至 7

↓

激活/平衡

1 mL methanol/ 1 mL water

↓

上样

up to 25 mL sample

↓

清洗

1 mL pH 7 缓冲液/1 mL methanol

↓

淋出 (目标释放)

1.5 mL ACN/water/TFA 84:14:2

↓

蒸发和重新定容

于0.5 mL 流动相中

SHIMADZU-GL

LC-MS检测方面的考量

虽然借助离子对机制，paraquat 与 diquat 色谱峰形较好，但离子对色谱条件下的MS检测时灵敏度不佳。使用 HILIC保留机制时的MS检测灵敏度则好得多。

右侧是以离子对色谱(图B)和HILIC色谱(图A)模式分析100 ng/mL的paraquat时的检测灵敏度比较。所使用的离子对试剂为50mM的七氟丁酸 (HFBA)。

LC Conditions
 Column: Inertsil HILIC, 2.1 x 150 mm
 Flow: 0.4 mL/min
 Mobile Phase: 40% acetonitrile
 60% aqueous buffer pH 3.7
 (250mM ammonium formate)
 Column Temp: 30 °C
 Sample Temp: 5 °C
 Injection: 10 µL

SHIMADZU-GL

极性化合物保留策略

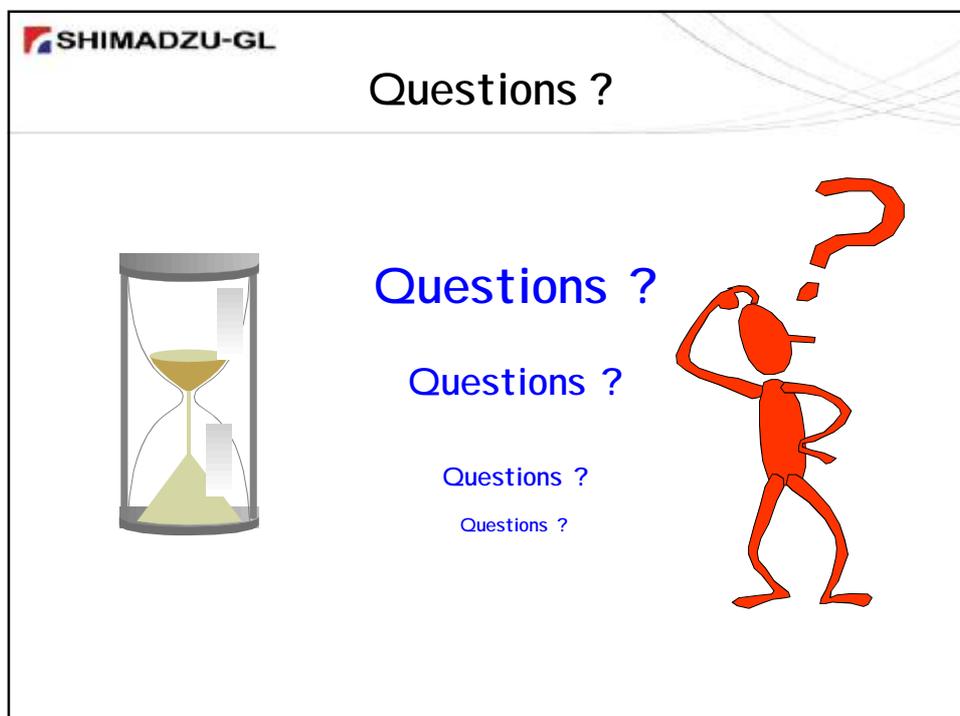
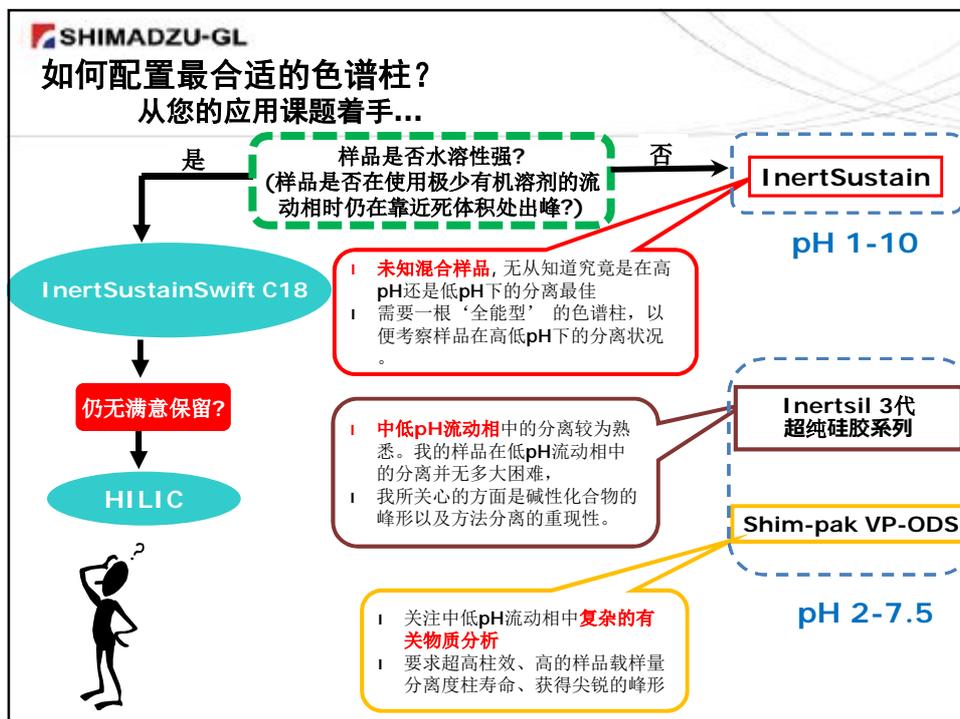
I 反相保留策略保留极性化合物分析

- ∅ 专门为极性化合物反相保留策略而设计的低碳密度的 C₁₈ 色谱柱
 - ü InertSustainSwift C18 (新型硅胶基体，酸性碱性中性极性化合物均适用)
 - ü 耐受100%水相流动相

I 如果仍然没有好的保留或MS响应很低？尝试HILIC模式

- ∅ Inertsil HILIC/NH₂/InertSustain NH₂/Inertsil Amide
- ∅ 对强极性的化合物有好的保留
- ∅ 增加 LC/MS 的灵敏度
- ∅ 高比例有机相直接进样提高样品通量
- ∅ HILIC 模式的分离也有不同的选择性

98



SHIMADZU-GL

联系我们

岛津技迹公司网站：
www.shimadzu-gl.com.cn

岛津技迹800号码：
[800-820-7730](tel:800-820-7730)
[400-920-7730](tel:400-920-7730)



The screenshot shows the Shimadzu-GL website interface. At the top left is the logo. The main navigation bar includes '网站首页', '产品中心', 'InertSearch', '行业应用', '技术支持', and '联系我们'. A search bar is located on the right. Below the navigation is a large banner for 'InertSep & WondaSep 系列固相萃取小柱' with the text '为广大客户提供全面的样品前处理方案和产品'. Below the banner are several small images of laboratory equipment. At the bottom, there is a section for 'InertSearch™ for GC/LC' and a '新闻中心' (News Center) section.

SHIMADZU-GL

基质分散净化策略

“QuEChERS”方法

- n 吸附剂粉末加入样品后振摇
- n 样品过滤和离心
- n 上清液收集后分析

这种模式和Pass-through 净化很相似, 但效果较差

- 基质分散 SPE 是一阶净化 (理论塔板数)
- 通过净化 SPE 是多阶净化

“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”



The image shows laboratory glassware including two vials with blue caps and two test tubes, placed on a surface next to a variety of fresh vegetables like carrots, tomatoes, and bell peppers, illustrating the application of the QuEChERS method in food analysis.

SHIMADZU-GL

“QuEChERS”---常见的产品形式

提取管 (管1)
MgSO₄, 乙酸钠, NaCl, 柠檬酸盐

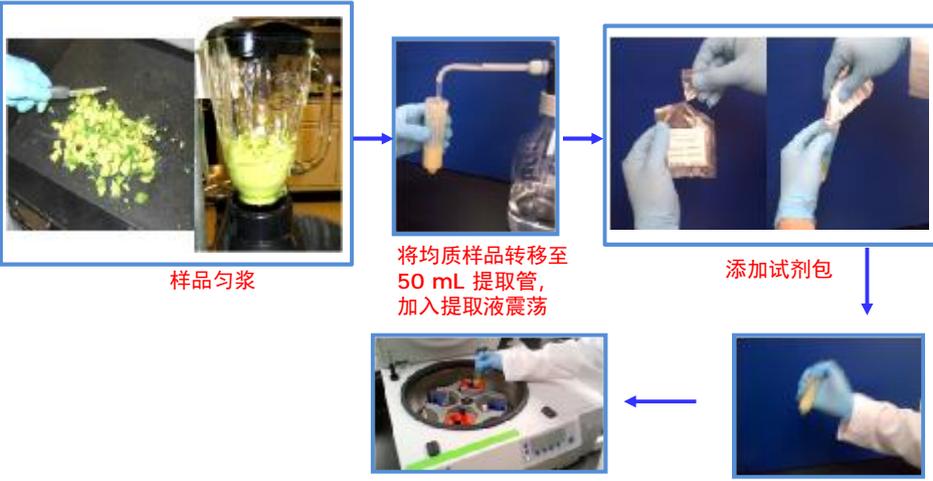
净化管 (管2)
石墨化碳黑(GCB),
PSA, C₁₈, MgSO₄



观看 QuEChERS 操作视频

SHIMADZU-GL

QuEChERS方法-提取/分配





样品匀浆



将均质样品转移至
50 mL 提取管,
加入提取液震荡



添加试剂包



离心, 取上层有
机层进行下一步

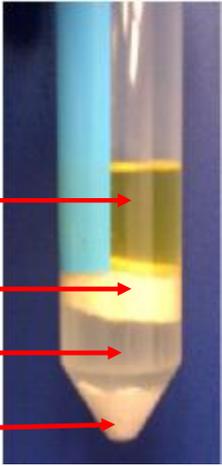


大力振动1分钟

SHIMADZU-GL

第一步提取: 50 mL 管 (管1)

- 水分很重要!!
 - 加入盐后会增强液液分配净化的能力
 - MgSO₄, 乙酸钠, NaCl, 柠檬酸盐
 - 去除不需要的基质
 - 乙腈提取更有效
 - 如果基质中不含水分, 那么加入



乙腈层(待测物)

均质的样品

水层(饱和的缓冲盐+ 离子化/极性待测物)

不溶的缓冲盐

SHIMADZU-GL

QuEChERS方法-净化



取部分上清液 (有机层) 转移至净化管 (管2)

管1

管2

分析物在上清液层

管2

转移上清液于样品瓶中

未净化

SHIMADZU-GL

基质分散SPE 净化 (管 2)

- 提供额外的净化
 - Ø 取 1 mL 乙腈相从Tube 1, 加入 2 mL 含有分散型净化剂的tube 2中
 - Ø 多数提取净化用于 GC-MS
- 吸附剂选择
 - Ø $MgSO_4$ (干燥剂): 去除水分, 这对于 GC 分析很重要
 - Ø PSA: 去除酸性物质/糖
 - ü 不能用于酸性除草剂
 - Ø C_{18} : 去除脂肪, 油, 非极性化合物
 - ü 用于多脂肪基质(鳄梨, 鱼)
 - Ø 石墨化碳黑(GCB): 去除叶绿素 /天然色素 (也可能吸附待测物! --小心)



乙腈层(待测物在这里)

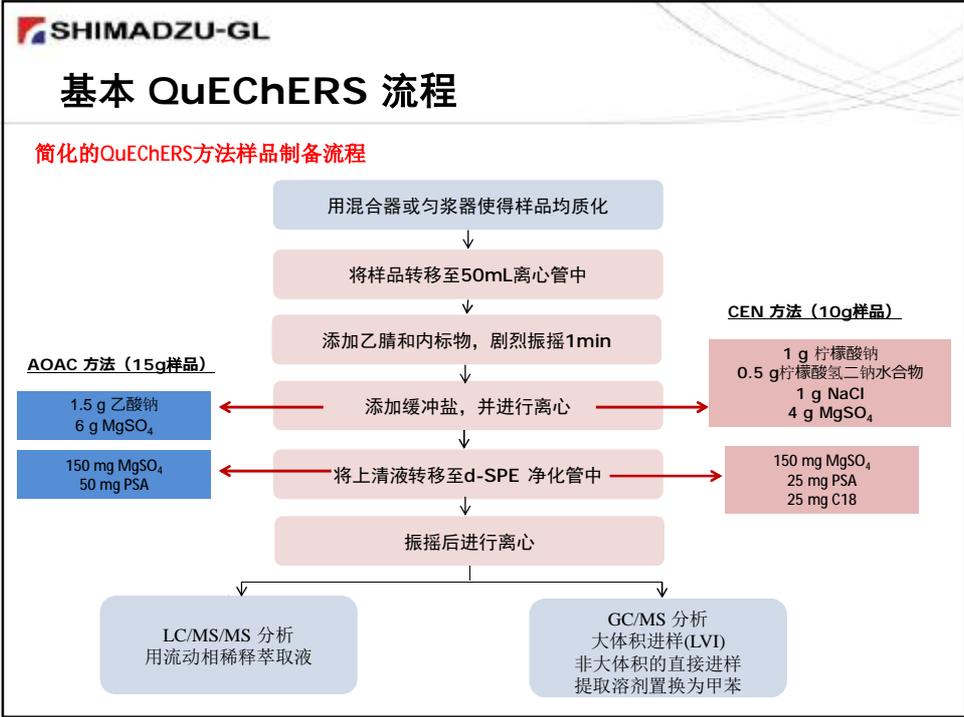
吸附剂(干扰物质)

SHIMADZU-GL

“QuEChERS”---多残留筛查的快速样品制备方法

“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”

- 为现有前处理方法LLE、SPE、GPC提供更多的选择, QuEChERS在很大程度上降低了样品的分析成本
 - Ø 盐析与液液萃取联合的净化方法
 - Ø 高通量的样品制备和筛查方法
- QuEChERS方法在全世界范围内还是一个新方法, 我国NY/T 1380-2007与之非常接近
- 对检测器的要求: MS/MS (高灵敏高选择)、NPD等
- QuEChERS的应用范围正逐步扩展到水果和蔬菜以外。



SHIMADZU-GL

WondaPak QuEChERS 产品

适合于NY/T 1380-2007
蔬菜、水果中51种农药残留的测定 气相色谱-质谱法

货号	描述	包装
5010-050020	醋酸钠缓冲盐试剂包 6g MgSO4, 1.5g NaOAc, 50ml 离心管	50包 & 50支/p
5010-015028	15ml PSA/C18净化管 100mg PSA, 100mg C18, 300mg MgSO4	50/p

适合于美国AOAC 2007.01方法

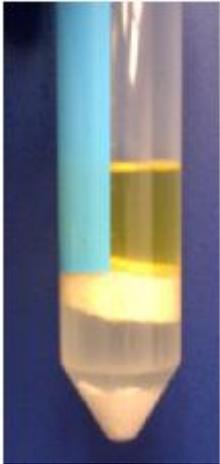
货号	描述	包装
5010-050020	醋酸钠缓冲盐试剂包 6g MgSO4, 1.5g NaOAc, 50ml 离心管	50包 & 50支/p
5010-002031	2ml PSA 净化管 50mg PSA, 150mg MgSO4	100/p
5010-015031	15ml PSA净化管 400mg PSA, 1200mg MgSO4	50/p
5010-002033	2ml PSA/C18 净化管 50mg PSA, 50mg C18, 150mg MgSO4	100/p
5010-015033	15ml PSA/C18 净化管 400mg PSA, 400mg C18, 1200mg MgSO4	50/p
5010-015040	2ml PSA/C18/GC-e 净化管 50mg PSA, 50mg C18, 50mg GC-e, 150mg MgSO4	100/p
5010-015041	15ml PSA/C18/GC-e 净化管 400mg PSA, 400mg C18, 400mg GC-e, 1200mg MgSO4	50/p

适合于欧盟EN 15662方法

货号	描述	包装
5010-050010	柠檬酸盐缓冲盐试剂包 4g MgSO4, 1g 氯化钙, 0.5g柠檬酸氢二钠, 1g柠檬酸钠	50包 & 50支/p
5010-002030	2ml PSA 净化管 25mg PSA, 150mg MgSO4	100/p
5010-015022	15ml PSA 净化管 150mg PSA, 900mg MgSO4	50/p
5010-015020	15ml PSA/GC-e 净化管 150mg PSA, 15mg GC-e, 900mg MgSO4	50/p
5010-015024	15ml PSA/GC-e 净化管 150mg PSA, 45mg GC-e, 900mg MgSO4	50/p
5010-002032	2ml PSA/C18 净化管 25mg PSA, 25mg C18, 150mg MgSO4	100/p
5010-015032	15ml PSA/C18 净化管 150mg PSA, 150mg C18, 900mg MgSO4	50/p

SHIMADZU-GL

QuEChERS 还可以做什么？



- QuEChERS方法已经被证明适用于测定水果蔬菜中的多农残。
- QuEChERS 方法也正在挖掘其在其它类型化合物和其它样品基质中的应用
 - ∅ 化合物能够在提取过程中通过盐析作用液液分配到乙腈层
 - ∅ 样品基质必须适用于乙腈和水提取

SHIMADZU-GL

Questions ?



Questions ?

Questions ?

Questions ?

Questions ?



SHIMADZU-GL

联系我们

岛津技迹公司网站：
www.shimadzu-gl.com.cn

岛津技迹800号码：
[800-820-7730](tel:800-820-7730)
[400-920-7730](tel:400-920-7730)



The screenshot shows the Shimadzu-GL website interface. At the top left is the logo. The main banner features the text '为广大客户提供全面的样品前处理方案和产品' and 'InertSep & WondaSep 系列固相萃取小柱'. Below the banner are several small images of laboratory equipment. A search bar is located at the top right. The bottom section includes a 'InertSearch for GC/LC' search tool and a '新闻中心' (News Center) link.