

基于阀切换UHPLC-IC联用技术的实验教学探索

毛侦军*, 顾昊睿, 车海燕, 林旭锋

浙江大学化学系, 国家级实验教学示范中心, 杭州 310058

摘要: 具有阀切换的超高效液相色谱-离子色谱联用(UHPLC-IC)技术适用于同时分析含有机物和无机阴离子的样品, 该联用技术简化了前处理的过程, 消除了复杂基体, 对无机阴离子进行富集, 实现有机物和无机阴离子的同时分析, 提高了色谱分析效率。将阀切换UHPLC-IC联用技术引入到本科生仪器分析实验课堂中, 加深了学生对新型分析技术独特优势的理解, 提高了本科生解决复杂实际问题的能力, 拓宽和提升了仪器分析实验的教学内涵, 有利于创新性和综合性人才的培养。

关键词: 阀切换; 超高效液相色谱; 离子色谱; 仪器分析实验

中图分类号: G64; O6

Exploration on Experiment Teaching of UHPLC-IC Based on Valve Switching Method

Zhenjun Mao*, Haorui Gu, Haiyan Che, Xufeng Lin

National Demonstration Center for Experimental Education, Chemistry Department, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China.

Abstract: The technology of ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC) and ion chromatography (IC) with valve switching method is suitable for the simultaneous analysis of samples containing organic compounds and inorganic anions, which simplifies the pretreatment process, eliminates the complex matrix, enriches inorganic anions, realizes the simultaneous analysis of organic compounds and inorganic anions, and improves the efficiency of chromatographic analysis. The technology of ultrahigh performance liquid chromatography and ion chromatography with valve switching method is introduced into the undergraduate instrument analysis experiment class, which deepens the students' understanding of the special advantages of the new technology, improves the undergraduates' ability to solve complex practical problems, widens the field and enriches the content of instrument analysis experiment. Of course, it is conducive to the cultivation of innovative and comprehensive talents.

Key Words: Valve switching; UHPLC; IC; Instrumental analysis experiment

色谱联用技术是将色谱分离装置与各种检测装置通过接口技术连接后而成的一种新型仪器分析技术^[1], 在分析复杂基质样品方面具有独特的优势, 为复杂体系的分离分析研究提供了一种具有发展前景的新技术, 在实验教学中也取得了良好的效果^[2-5]。有机物和无机阴离子的分离分析分别适用于超高效液相色谱法和离子色谱法, 当有机物和无机阴离子同时存在于一个样品并需进行同时分析时, 一维色谱通常会造有机物和无机阴离子互相干扰, 甚至降低分析效能。分析测试时, 首先需

收稿: 2023-11-01; 录用: 2023-12-18; 网络发表: 2023-12-29

*通讯作者, Email: maozhenjun@zju.edu.cn

基金资助: 浙江省基础公益研究计划资助项目(LTGC24B050003); 浙江大学线上线下混合式课程培育项目; 浙江大学一流课程建设项目

将复杂试样中的有机物和无机阴离子进行分离、富集，再分别经过分析柱分离、检测^[6-9]。而具有阀切换法超高效液相色谱-离子色谱联用(UHPLC-IC)新技术适用于同时分析含有机物和无机阴离子的复杂基质样品，并可有效解决有机物和无机阴离子同时分析时互相干扰及分析效能低的问题。

浙江大学化学实验教学中心为了让学生加深对新型分析技术独特优势的理解，提高本科生解决复杂实际问题能力，在仪器分析实验课程中引入阀切换法UHPLC-IC联用新技术，开设相关探究性系列实验“阀切换法UHPLC-IC联用同时分析有机物和无机阴离子”，并增加学生的动手动脑环节来激发学生的求知欲，通过让学生自组装超高效液相色谱-离子色谱联用仪器，并自行设计仪器参数，对色谱测定的条件进行优化，对试样中的有机物和无机阴离子进行同时检测。阀切换法UHPLC-IC联用新技术经过四年的教学探索和实践，拓宽和提升了仪器分析实验的教学内涵，创新了仪器分析的教学模式，激发了学生的创新意识，提高了学生的综合能力和实践能力。

阀切换法超高效液相色谱-离子色谱(UHPLC-IC)联用技术是利用一个或几个多通阀的组合，通过自动或手动调节多通阀的状态对色谱系统进行切换，以达到复杂组分之间的分离、样品的净化、组分的富集，再经过多种色谱柱分析顺序的改变、流动相和检测器的选择以达到理想的分析效果。已经报道的UHPLC-IC联用技术可应用于食品中香兰素、乙基香兰素及无机阴离子的检测^[10]，药物Lobaplatin中乳酸含量检测^[11]，保健品中叶酸及无机离子的检测^[12]，除草剂中草甘膦异丙铵盐的含量检测等^[13]。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Dionex Ultimate 3000超高效液相色谱仪(美国戴安公司); Dionex ICS 2100离子色谱仪(美国戴安公司); Ultimate® XB-C18色谱柱(100 × 2.1 mm; 1.8 μm)、IonPac® AS 19阴离子交换色谱柱(250 × 4 mm; 5 μm)、Dionex AERS 500抑制器、Dionex DS 6电导池(美国戴安公司)。

氯离子、硝酸根离子、硫酸根离子标准储备液(国药集团化学试剂，分析纯，自制); 尼泊金甲酯(MPB)标准储备液(国药集团化学试剂，分析纯，自制); 爽肤水(国产)。

1.2 标准溶液配制

移取不同体积的标准储备液，用甲醇-水溶液稀释，定容，配制成系列标准溶液(表1)，用于制作标准曲线。

表1 标准溶液及其浓度

标准溶液(mg·L ⁻¹)	标1	标2	标3	标4	标5
Cl ⁻	1.00	5.00	10.00	15.00	20.00
NO ₃ ⁻	1.00	5.00	10.00	15.00	20.00
SO ₄ ²⁻	1.00	5.00	10.00	15.00	20.00
MPB	1.57	7.83	15.65	23.48	31.30

1.3 仪器的自组装

学生需要拆装废旧的六通阀进样器和液相色谱仪高压输液泵，观察它们的内部构造，通过拆装深入观察仪器内部结构，让学生从熟悉仪器的各种功能的零部件出发，加强动手实践和思维训练，从而能够更好地掌握分析仪器的测试原理，搭建起理论学习和动手实践之间对接的桥梁。六通阀进样器是液相色谱定量分析的基础，通过拆装能够感受到机械装置的精巧，也可以看到因操作不当造成部件石墨转子损坏的状况。高压输液泵是高效液相色谱仪最重要的部件，它主要作用是将流动相匀速注入液相色谱系统中，形成稳定的流路。通过拆装高压输液泵，可以看到单向阀的结构，比如精致的柱塞杆和宝石球，加深理解单向阀吸液和排液过程的工作原理。

1.4 色谱条件的优化

以分析实验对象为爽肤水中防腐剂尼泊金甲酯和 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子的分析为例，选择合适的分析柱和流动相，且保证峰型较优，方法稳定且重现性好。经过优化色谱参数，采用的分析柱：XB-C18液相色谱柱(100 × 2.1 mm; 1.8 μm)和IonPac® AS 19阴离子交换色谱柱(250 × 4 mm; 5 μm); 淋洗液1: 流动相A (甲醇, 60%)和流动相B (去离子水, 40%), 流速: 0.7 mL·min⁻¹; 紫外吸收检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 淋洗液2: 15 mmol·L⁻¹的KOH溶液, 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 抑制器电流: 112 mA; 检测池温度: 35 °C

1.5 分析流程

以护肤品爽肤水中防腐剂尼泊金甲酯和 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子同时分析的实验为例，爽肤水经预处理进样后(图1)，首先用强极性溶液作为高效液相色谱仪的洗脱剂，护肤水样品进入到C18色谱柱中，由于C18色谱柱对有机物和无机离子的作用力存在差别，在柱内有机物尼泊金甲酯和 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子会发生分离，此时有机物尼泊金甲酯保留在C18色谱柱里，而 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子快速通过。而后进行第一次阀切换操作(图2)， Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子进入收集环内，开始富集。当待测的 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子完全进入收集环内(图3)，进行第二次阀切换操作。此时可更换C18色谱柱的洗脱剂比例或梯度淋洗，实现有机物的分离，再利用紫外吸收检测器对有机物尼泊金甲酯进行定量检测；同时，使用离子色谱仪内部的高压分析泵，将富集环内的溶液携入离子交换柱实现分离，再通过电导检测器对 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子进行定量检测。

2 结果与讨论

2.1 最佳阀切换时间的确定

阀切换时间的确定是UHPLC-IC联用技术的关键之一，阀切换时间的恰当与否将会影响对无机离子的收集效果和富集程度。确定阀切换时间的原则是在阀切换时间内，待测无机离子全部被收集并且不会扩散，若切换时间过早则收集环中不会收集到离子或收集到部分离子影响分析准确度，若切换时间过晚，则离子会在收集环中扩散以及后续的分选效果变差，甚至会溢出收集环也会影响分析的准确性。根据管路体积和液体流速大致估算，设置第一次阀切换时间为1.5 min，设置第二次阀切换时间分别为1.75、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 min，并使用浓度较高的标准溶液3进样，寻找最佳的第二次阀切换时间(表2)。阀切换时间作为一个有效的评估参数，以优化UHPLC-IC联用系统的工作条件。为了完全收集浓缩柱上的所有无机离子，研究了 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子的峰面积与不同的阀切换时间之间的关系，数据记录在表2中。如表1所示，当第二次阀切换时间从1.75 min增加到3.0 min时， Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子的峰面积都增加，说明3.0 min之前离子未完全被收集；3.0 min后， Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子的峰面积都减少，说明离子在收集环中有一定扩散。因此，选定3.0 min作为第二次阀切换时间，在1.5–3.0 min内富集无机阴离子，三种无机阴离子的峰面积可以达到最大值。

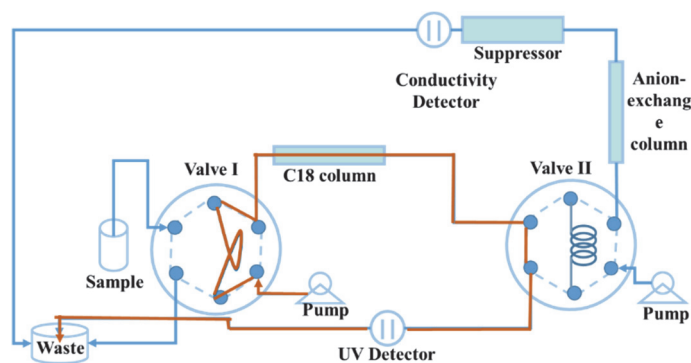


图1 UHPLC-IC联用装置的有机物和无机阴离子分离示意图

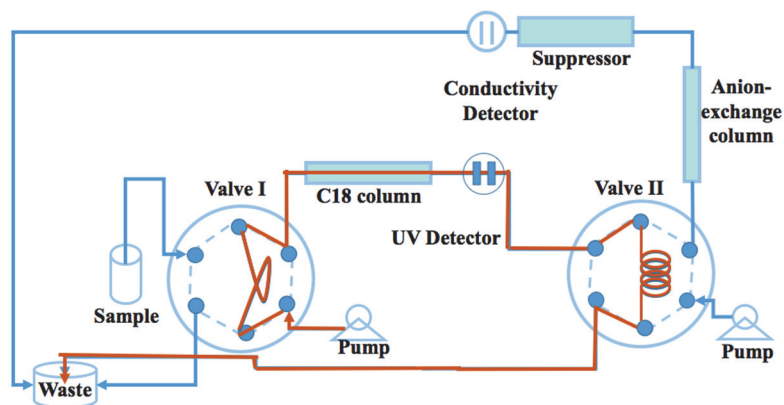


图2 UHPLC-IC联用装置的无机阴离子富集示意图

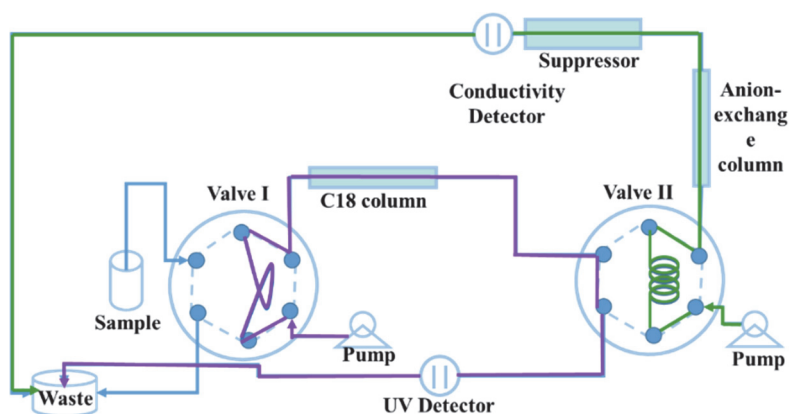


图3 阀切换后有机物及无机阴离子分别鉴定示意图

表2 第二次阀切换时间下的无机阴离子色谱信号强度

无机离子	第二次阀切换时间(min)					
	1.75	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
Cl ⁻	0.0047	0.0057	0.0083	6.7918	3.3876	3.2133
NO ₃ ⁻	0.0018	0.0014	0.0083	3.0036	1.5296	1.4548
SO ₄ ²⁻	0.0044	0.0631	0.2554	1.4528	0.6501	0.6329

2.2 标准曲线的绘制和试样的测定

在最佳实验条件下,测定标准溶液系列中尼泊金甲酯及Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻离子的峰面积,积分,绘制标准曲线。一般要求学生制作的标准曲线的回归系数均达到0.99以上,此时表明该方法线性范围内相关性较好,方法真实可靠。由于护肤品爽肤水是水溶性的,所以样品处理时用甲醇-水溶液稀释并用滤膜过滤即可。根据测定的峰面积和电导率的读数可以计算出待测液中的尼泊金甲酯和Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻离子的浓度,最终测定护肤品爽肤水中尼泊金甲酯的浓度为1234 mg·L⁻¹,Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻离子的浓度分别为206.6、145.4、160.1 mg·L⁻¹,其中尼泊金甲酯符合国家标准中对于防腐剂时用量的限制。因此,该方法能够同时分离分析尼泊金甲酯化合物和无机阴离子,大幅度缩短分析时间,提高色谱分析效率。

2.3 加标回收率与精密度的测定

测定加标溶液的样品中尼泊金甲酯和Cl⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻离子的浓度,平行测定6次,计算加标回收

率和相对标准偏差, 结果见表3。其中, 尼泊金甲酯的平均回收率为94.8%, Cl^- 离子、 NO_3^- 离子和 SO_4^{2-} 离子的平均回收率在92.2%–107.3%, 相对标准偏差在1.6%–3.8%, 实验结果表明该方法重现性好, 准确度和精密度高。因此, 该方法适用于分析爽肤水中尼泊金甲酯和 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 离子的含量。

表3 样品的加标回收率

化合物	原含量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均回收率(%)	RSD (%)
MPB	12.34	7.83	94.8	1.6
Cl^-	2.07	5.00	92.2	2.7
NO_3^-	1.45	5.00	107.3	3.8
SO_4^{2-}	1.60	5.00	97.1	3.1

3 部分学生感言

学生1: 以前, 我只在分析化学II课程中看到过六通阀的原理图, 感觉也“不过如此”。但只有当自己亲手拆装六通阀时才能感觉到, 机械装置设置的精巧, ……。当课堂上的知识, 落实到实际操作中, 我感觉自己多了一份震撼。

学生2: 这个过程让我初步接触到液相-离子色谱联用科研相关方面拓宽了我的知识面, 老师也强调一些学习和工作中的技能……。这个过程是一个团队协作的过程, 需要分工配合, 彼此照应, 是一段既艰难又有欢乐的时光。

学生3: 整个实验于我而言可以分为三个部分, 即实验准备、实验实施和后续工作。在实验准备的过程中, 我学习到了离子色谱的相关知识, 比如离子色谱系统各个部件的功能……。而后在实验实施过程中, 我了解到的则是离子色谱仪的相关操作……, 最让我感慨的可能是过程中的氛围吧……。最后的后续工作同样让我收获颇丰。

学生4: “纸上得来终觉浅, 绝知此事要躬行” 确乎是很好的概括了。根据文献及有关原理示意图, 我对六通阀、十通阀等联用技术中的应用有了初步的模糊了解……, 结合在本学期的分析化学II理论课上学习过的知识, 我对整个检测流程有了更清晰的认识……。然而, 在我第一眼看到HPLC-IC联用仪器的连接部分时, 还是傻眼了。

4 结语

在仪器分析实验课程中引入UHPLC-IC联用新技术, 通过仪器的自组装、设计仪器参数、优化条件, 分析日常生活用品的化学成分, 加深了学生对新型分析技术独特优势的理解, 提高了本科生解决复杂实际问题能力, 拓宽和提升了仪器分析实验的教学内涵, 创新仪器分析的教学模式, 有利于培养学生的学习兴趣和认识仪器创新的重要性, 为创新性和综合性人才的培养拓宽了基础。

参 考 文 献

- [1] 杨洁, 索习东. 上海化工, 2012, 37 (1), 28.
- [2] 邵伟, 张万群, 胡万群, 李维维, 杨凯平, 朱平平. 大学化学, 2022, 37 (4), 2110045.
- [3] 李莲花, 王正平, 吴莉. 大学化学, 2013, 28 (5), 15.
- [4] 李东芹. 实验技术与管理, 2019, 36 (9), 57.
- [5] 王莹, 丁越, 王新宏, 张彤. 实验室研究与探索, 2018, 37 (7), 219.
- [6] 朱海豹, 钱亚玲, 唐红芳, 刘丹华, 阮征, 王晗. 中国卫生检验杂志, 2017, 27 (3), 311.
- [7] 姜新华, 倪承珠, 朱彬和, 赵训燕, 陈素清, 吕伟德, 张嘉捷, 张培敏, 李刚, 朱岩. 色谱, 2016, 34 (4), 442.

- [8] 许竞早, 彭振磊, 张育红, 王川, 金国杰. 色谱, **2018**, *36* (4), 376.
- [9] 贺婕, 余家胜, 黄忠平, 朱作艺, 王慕华, 王娜妮, 张嘉捷, 张培敏, 李刚, 朱岩. 分析化学, **2014**, *42* (8), 1189.
- [10] Wang, F. L.; Zhang, K.; Wang, N. N.; Muhammad, N.; Wu, S. C.; Zhu, Y. *Food Anal. Methods* **2018**, *11* (1), 243.
- [11] Zhao, Z.; Zhu, J.; Xie, Y. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2017**, *138* (10), 316.
- [12] Wang, F. L.; Cao, M. Y.; Wang, N. N.; Muhammad, N.; Wu, S. C.; Zhu, Y. *Food Chem.* **2018**, *239* (15), 62.
- [13] 谢佩瑾, 张钦杰, 孙剑英, 谭头云, 杨洪达, 陈兴隆. 农药, **2017**, *56* (9), 655.