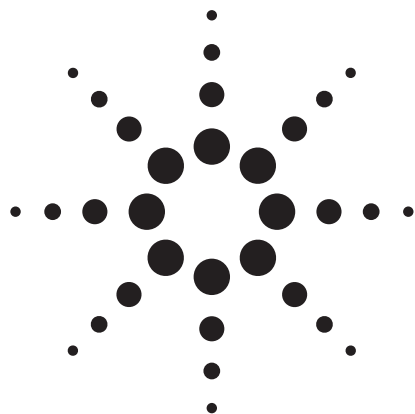
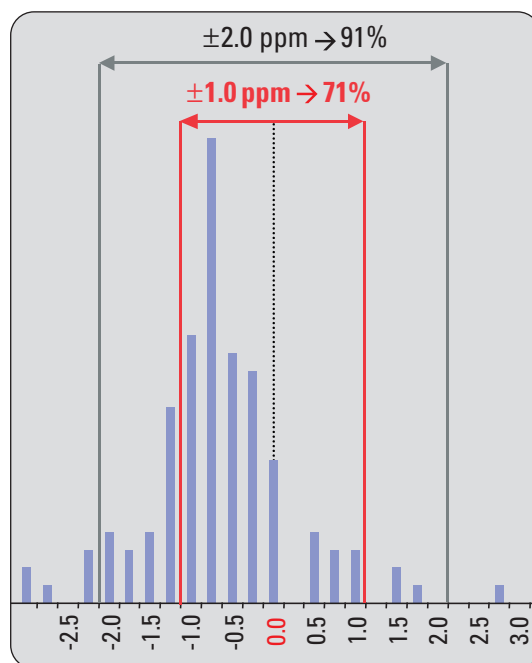




安捷伦 1200 系列高分离度快速 LC 系统与安捷伦 6210 TOF MS 联用 —— 保持最大样品通量的同时获取最完整数据

应用简报

Michael Frank



摘要

快速准确地对筛选目标物中的化合物进行鉴定及定量是制药行业中许多分析实验室的共同任务。质谱法，尤其是精确质量质谱法是化合物鉴定的首选方法。然而，数据质量通常会随样品通量的增加而下降。本文介绍了日处理通量远高于 1000 个样品时如何实现既能采集完整谱图数据，又能得到与 FT-MS 相近的精确质量信息。



Agilent Technologies

引言

LC/MS 分析时，为达到最大样品通量，通常需要降低数据质量。有多种方法可以提高 LC/MS 的样品通量，其中一种就是进行流动注射分析。该方法确实能最大限度地提高样品通量，但由于在整个分析过程中不存在色谱分离，所以离子化过程中发生离子抑制效应的可能性会提高。由于流动注射分析中所有化合物的信号都是重叠的，所以 UV 检测等正交检测方法都不适用。一种解决途径是通过使用 5 μm 填料短柱结合弹道式梯度（流动相）对化合物进行最低限度的分离以提高数据质量，但这并不是最好的办法。有些生产商建立了同时具有共享质谱检测器和共享 UV 检测器的平行工作仪器系统。显然，由于数据采集的总速率被各 LC 通道平分，这种方法同样会导致数据质量的下降¹。

通过采用配备亚 2 μm 填料色谱柱的 LC/MS 系统，可以在缩短分析时间的同时提高色谱分辨率。另外，该系统可以获取完整的 UV 光谱数据和准确质量的质谱数据。

实验部分

安捷伦 1200 系列高分离度快速 LC 系统配置为适合内径 2.1 mm 色谱柱的交替柱再生 (ACR)²。泵设为低延迟体积配置，其内体积仅为约 120 μL 。为了得到最低延迟体积，对其他组件进行优化配置，如采用低延迟体积毛细管配件 (G1316-68744) 和交替色谱柱再生配件 (G1316-68721)。因而，从进样阀开始仅使用了内径为 0.12 mm 的毛细管柱。在柱温箱中使用了最新的内体积为 1.6 μL 的低分散换热器和高压双位 10 通阀。

仪器配置如图 1 所示：

- 将安捷伦 1200 系列微真空脱气机安置在两个安捷伦 1200 系列二元泵 SL 之间，从而避免了过长的管路连接。

- 安捷伦 1200 系列高性能自动进样器 SL。
- 安捷伦 1200 系列柱温箱 SL，配备高压双位 10 通阀，用于交替色谱柱再生。
- 安捷伦 1200 系列二极管阵列检测器 SL，数据采集速率 80 Hz，配有带 0.12 mm 内径连接毛细管的 500 nL 流通池。
- 安捷伦 6210 系列飞行时间质谱，最大数据采集速率 40 Hz，配有双 ESI 电离源，实现对分析物和参考混合物的平行离子化。
- 两根 ZORBAX SB C18 色谱柱，规格为 2.1 mm id x 50 mm, 1.8 μm 。
- 梯度洗脱流动相水相和乙腈中分别含有 0.1% 和 0.08% 三氟乙酸。溶剂无需再过滤。

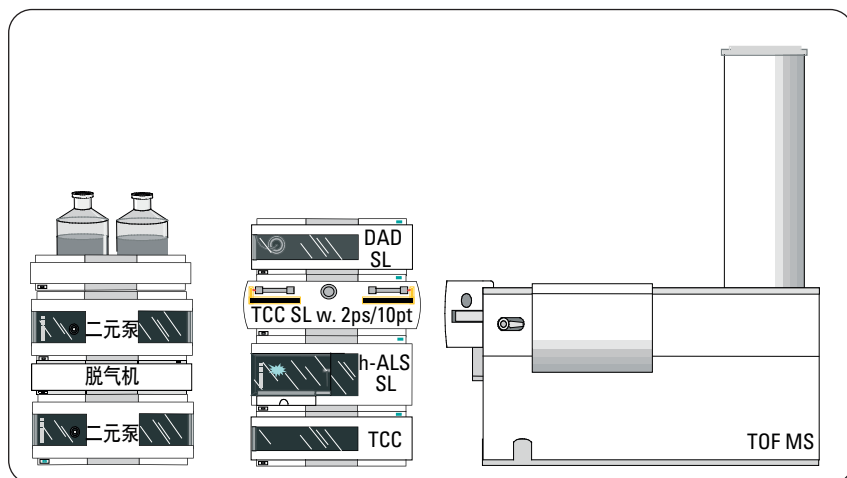


图 1

低延迟体积的安捷伦 1200 系列高分离度快速 LC 系统与安捷伦 6210 TOF-MS 联用，配备内径 2.1 mm 长度范围为 20-50mm 的色谱柱，采用低延迟体积实现快速分析。

仪器控制和数据采集在配有安捷伦 TOF- A02.01 软件的 Hewlett-Packard xw 4300 工作站上进行。工作站采用英特尔双核奔腾 TMD840 CPU，CPU 频率 3.2 GHz。

结果与讨论

通过提高温度，可降低溶剂粘性，从而增大流速，缩短洗脱时间。所用的色谱柱最高温度为 80 °C，在该温度下，流动相流速可达 1.8 ml/min 而泵的压力低于压力限。该条件下 2.1 mm x 50 mm (1.8 μm) 色谱柱中流动相的线速度约为 11 mm/s。再生泵和柱温箱中的双位 10 通阀可以显著缩短循环时间。这是由于在用高有机相溶剂冲洗第一根色谱柱继而用起始浓度梯度洗脱液进行再平衡时，第二根色谱柱可以进行样品的分离。之后切换 10 通阀可实现两根色谱柱流路的互换。有关交替色谱柱再生和时间点设置的问题在另外一篇应用简报中有详细介绍²。尽管流速很快 (1.8 mL/min)，色谱柱流出组分进入质谱检测器之前并不需要分流。标准 ESI 电离源规定流动相流速不能超过 1 mL/min，但如果干燥气温度及流速设到最大并且不出现凝结时，更高的流速也是可以接受的。实际上，在使用 ACR 时，由于平衡是在未连接检测器的色谱柱上完成的，因此可以避免水分的凝结。

Data File	Sample Type	Inj Vol (μl)	Capillary	Fragmentor	Skimmer
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	4000	210	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	3000	210	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	2000	210	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	4000	180	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	3000	180	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	2000	180	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	4000	150	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	3000	150	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	2000	150	60
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	4000	210	40
opt_4000_215_60.wiff	Unknown	1	3000	210	40

图 2 利用 TOF 软件校正各次运行时的 MS 参数。

方法:						
溶剂: A = 水 (0.1% TFA), B = 乙腈 (0.08% TFA)						
温度: 80 °C						
流速: 1.8 mL/min						
梯度:	0.00 min	5%B	再生:	0.00 min	5%B	
	0.50 min	90%B		0.01 min	95%B	
	0.51 min	5%B		0.20 min	95%B	
	0.65 min	5%B		0.21 min	5%B	
				0.65 min	5%B	
停止时间:				无限制		
延后时间:				off		
DAD:	波长:	210 nm (8), 无参比				
	峰宽:	>0.0025 min (响应时间 0.05s), 80 Hz				
	光谱:	no				
	狭缝:	8 nm				
	平衡:	运行前进行				
MS:	扫描范围:	100-1000 m/z				
	采集速率:	5, 20, 30 and 40 cycles/s				
	数据类型:	profile data				
	毛细管电压:	3000 V				
	裂解电压:	180 V				
	Skimmer 电压:	40V				
	载气温度:	350 °C				
		载气流速:	13 L/min			
进样体积:		1µL				
进样器:	重叠进样, 自动延迟体积减少					
	样品冲洗因子 = 10					
进样阀位置:		Next 位置				

表 1 图 3-5 数据所用的 LC/MS 条件。表 2 数据值也应用了上述条件。

通常，使用安捷伦多模式源时，推荐流速为 2 mL/min 以内，即使流动相为纯水时也是如此。使用表 1 中的色谱条件时，洗脱时间达到 0.5 min。在该条件下，39s 内 MS 检测器的峰容量 >40。而相同条件下使用 5 μm 粒径色谱柱时，峰容量仅为现在的一半。

如果所用的化合物浓度具有很强的 UV 响应信号，也未经特殊设置就进到安捷伦 6210 TOF MS 检测器，可能会使检测器饱和。检测器的饱和会产生不准确的质量测定结果。解决办法为人为降低 TOF MS 的灵敏度。而简单利用 TOF 软件功能改变某些 MS 参数，如在工作表中加入一列或多列“MS 参数”就可以轻易达到此目的（图 2）。点击工作表中的“增加列”，然后选择“MS 参数”和需要的参数。由于参考化合物也受该设置的影响，所以其浓度也会增加。只有毛细管电压，碎裂电压和锥孔电压是变化的。表 1 列出了本方法各参数的优化条件。

图 3 是在上述条件 (80 Hz DAD, 30 Hz TOF 数据采集速率) 下对含有 5 个组分

(58 ng/μL 阿替洛尔, 85 ng/μL 去氧苯比妥, 62 ng/μL 美托洛尔, 125 ng/μL 维拉帕米和 75 ng/μL 丙酸倍氯米松) 的样品分析时得到的总离子流图和 UV 图。总离子流图峰宽大于紫外色谱图, 是由于流通池以及 UV 检测器和 ESI 源之间的连接毛细管的额外柱体积造成的。但如图 3 所示, MS 峰的增宽程度很小。在最高数据采集速率 (40 Hz) 时, MS 的半峰宽如图 4 所示, 半峰宽的值仅为 0.34~0.42s。图 5 所示为飞行时间质谱在相同色谱条件, 不同数据采集速率下得到的谱图。

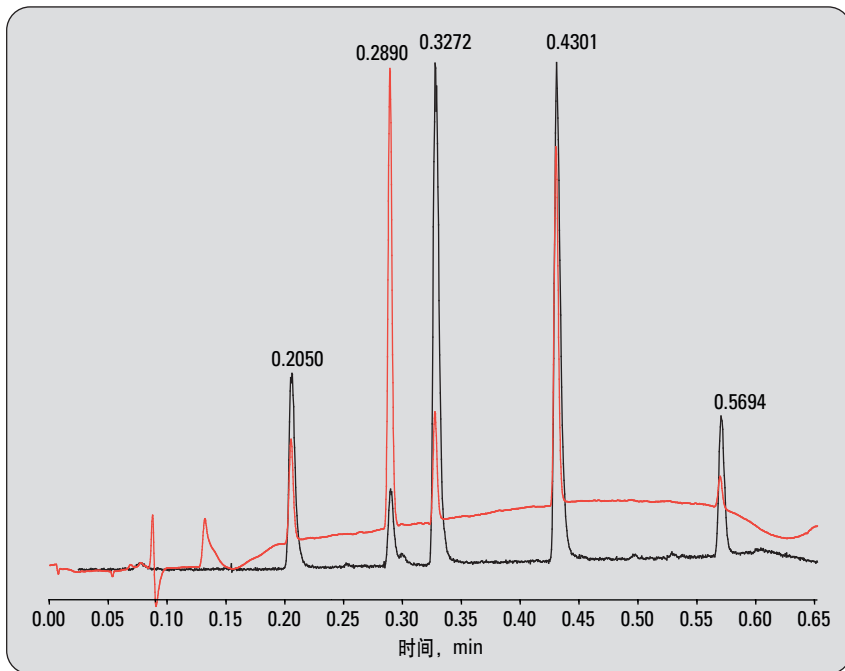


图 3
相应 UV 检测峰 (红色) 和 MS 检测峰 (黑色) 的比较。

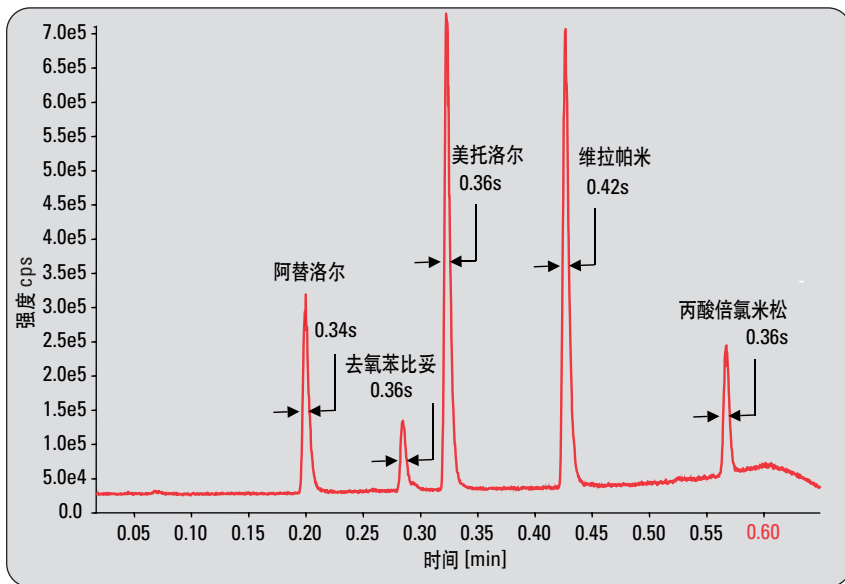


图 4
LC-TOF-MS 分析最高流速时的 MS 总离子流图 (40 Hz TOF 数据采集速率)。

图 5 中清晰显示，随着数据采集速率的提高，峰形和灵敏度显著改善。在数据采集速率为 40 Hz 时，扑米酮峰旁边的小侧峰清晰显示还有一个化合物存在，但当数据采集速率为 5 Hz 时，该物质与扑米酮色谱峰的尾部难以区分。因此如果需要 MS 定量时，高数据采集速率的优势显而易见。

当色谱条件如表 1 所示，单波长数据采集速率为 80 Hz，TOF 质量中心数据 30 Hz 时，循环时间可达到 49s。所得循环时间不仅取决于运行时间（梯度时间加冲柱子和再平衡时间，或安捷伦术语中的停止时间加延后时间），而且很大程度上也取决于仪器的额外时间。主要包括数据系统和各 LC/MS 组件之间信息传输、数据系统将数据录入硬盘以及某些初始化合过程所需的时间。如果电脑的性能不足以处理数据或有其他软件或程序占用电脑资源，数据系统导致的额外时间就会很明显。为降低循环时间，有必要减少数据处理量。

表 2 列举了不同 DAD 和 MS 设置下的循环时间和可能的样品日处理量。由于 MS 数据在采集过程中不断写入硬盘，而 UV 数据有一个缓冲，是在方法停止后才添加到数据文件中，因此，循环时间主要取决于 UV 数据量而非 MS 数据量。循环时间是根据数据采集结束后 WindowsXP™ 操作系统指定的文件关闭时间计算的。

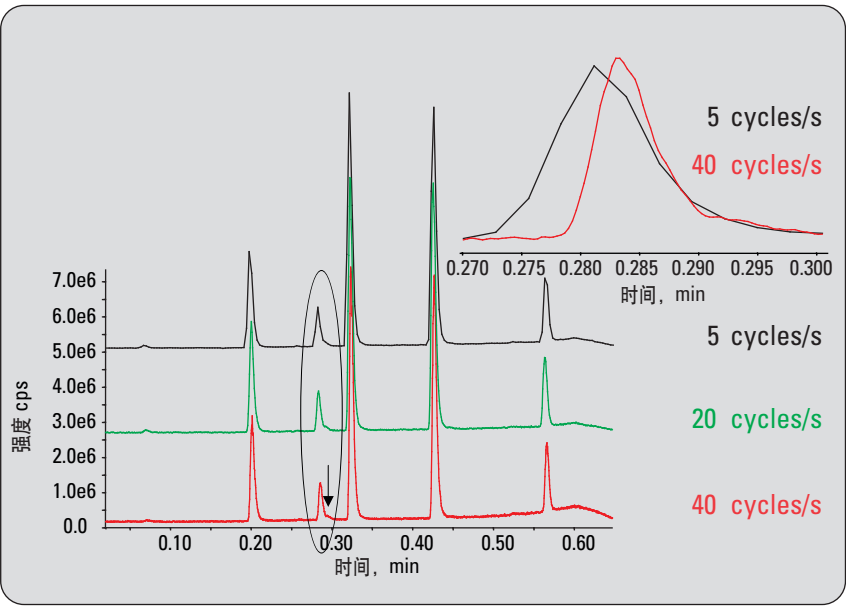


图 5
不同数据采集速率下总离子流图 —— 数据采集速率对 MS 峰形和分辨率的影响。

DAD (80 Hz)		TOF (100 – 1000 Da)		循环时间	通量	
类型	波长	Centroide	Profile	采集速率 [Hz]	[s]	[样品/天]
spectral	190-900 (1)	x	x	20	62	1394
spectral	190-900 (1)			20	62	1394
spectral	190-400 (2)		x	20	59	1464
spectral	190-400 (2)		x	40	59	1464
spectral	190-400 (2)		x	30	58	1490
signal	210/254		x	20	50	1728
signal	210	x		30	49	1763

表 2
不同 DAD 和 MS 数据采集设置对循环时间的影响, 方法停止时间为 0.65 min (39 s), 应用运行前平衡 (约 2 s)。DAD 波长范围栏括号中的数字代表以 nm 为单位的扫描宽度。

使用 TOF 质谱时必须关注其质量准确性。库中 140 个化合物的质谱准确性误差。所示误差值均来源于某自动经验式确认报告，无人干扰。其中 16 种化合物不能在 ESI 正离子模式下被离子化，另有 2 种

化合物可能由于等分子量的共洗脱杂质影响，分别具有 11 ppm 和 15 ppm 的较大误差。循环时间为 90s，这主要是由于采用了必需的进样器程序，该程序能够在样品分析前直接在线稀释样品。色谱条件为 5-100%水-乙腈（0.1%TFA）梯度洗脱，洗脱时间 0.7 min，流速 1.5 mL/min，柱温 60 °C。化合物纯度测定的 UV 数据采集波长为 210 至 500 nm，数据采集速率为 80 Hz。MS 数据采集速率设为 8 Hz 以减小文件大小。扫描范围为 120-1200 Da，毛细管电压 4000 V，裂解电压 215 V。未使用 ACR，MS 分流比为1:7.5。

图 7 所示的样品 MS 误差直方图更具说服力。91% 以上的离子化化合物（包括异常值）的质量准确性误差在 ± 2.0 ppm 范围内。除去异常值，则有高达 93% 的分析样品的质谱准确性误差在 ± 2.0 ppm 范围内。在 ± 1.0 ppm 的范围内，质量准确度类似 FT-MS，为 71%（除去异常值为 72%）。

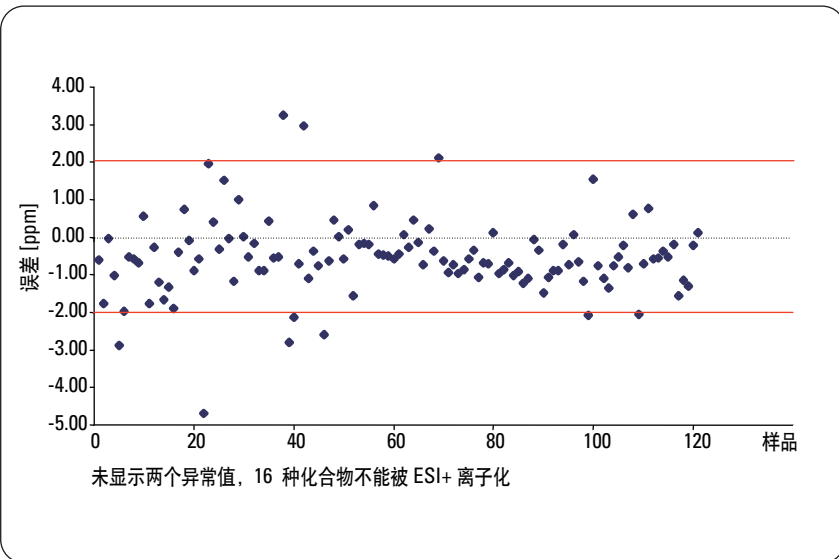


图 6
化学库中一组化合物在快速 LC 条件下分析的质量精度误差。

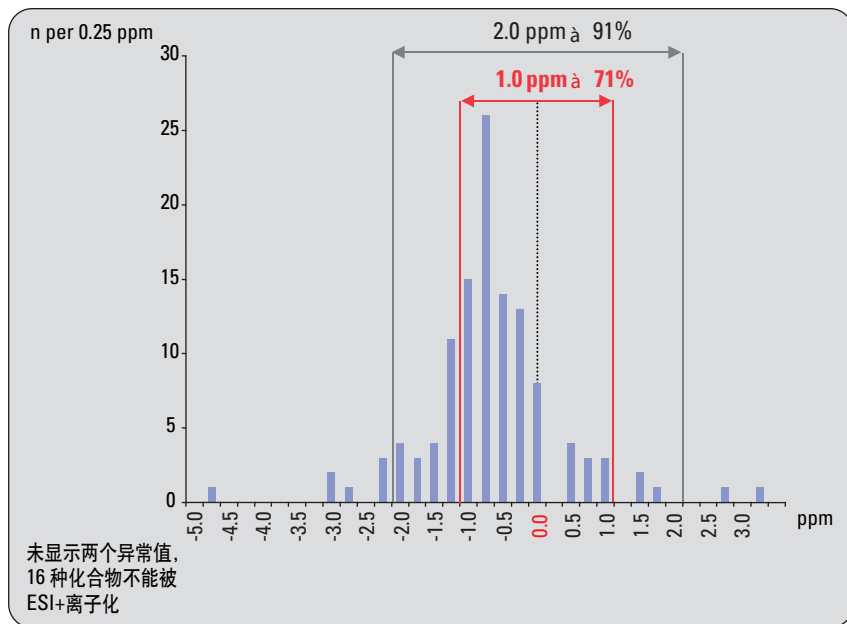


图 7
化学库中一组化合物在快速 LC 条件下分析的质量精度误差直方图。图中所示 ± 1.0 ppm 和 ± 2.0 ppm 误差范围内的样本包括异常值。

总结

安捷伦 1200 系列快速高分离度 LC 系统与安捷伦 6210 系列飞行时间质谱联用可准确地进行样品中化合物的鉴定和纯度测定。这正符合医药公司分析部门的常规高通量分析需求。在 1 min 之内，可得到 190-900 nm 波长范围内，谱带宽度为 1 nm 的高分辨率二极管阵列谱图，数据采集速率为 80 Hz，以及在高数据采集速率下，得到 100-1000 m/z 范围内的完整 MS 谱图，91% 的样品质量误差在 ± 2.0 ppm 之内。

凭借许多优异的特性如交替色谱柱再生、重叠进样、高温、高流速及高数据采集速率，特别是稳定、易于操作的精确质量测定，本系统在样品通量和数据质量方面完胜其他高通量 LC/MS 系统。所得线性速率可高达 11 mm/s，循环时间最快仅为 49s，相应的运行时间仅为 41s。由于色谱柱填料粒径仅为 1.8 μm ，洗脱时间为 39s 时，UV 峰容量仍可达 50，MS 峰容量可达 40。

参考文献

1.

Jeremy R. Kenseth, Shelly J. Coldiron,
“High-throughput characterization and
quality control of small-molecule com-
binatorial libraries”, *Curr. Opin. Chem.
Biol.* 8; 418-423; **2004**.

Jill Hochlowski, Xueheng Cheng,
“Current Application of Mass
Spectrometry to Combinatorial
Chemistry”, *Anal. Chem.* 74,
2679-2690; **2002**.

2.

Udo Huber, „High throughput HPLC –
Alternating column regeneration with
the Agilent 1100 Series valve solu-
tions” (高通量 HPLC——使用安捷伦
1100 系列阀解决方案实现交替色谱柱再
生), 安捷伦应用简报, 出版号
5988-7831EN, **2002**.

本文中大部分数据可见于名为“利用非
多重 DAD-ToF 一天分析 1400 个样品”
的海报 (CO-1152, Pittcon 2006, 奥兰
多, 佛罗里达州, 美国), 作者 Michael
G. Frank, Edgar Naegele (安捷伦科技
公司, 布隆, 德国), Doug McIntyre
(安捷伦科技公司, 圣克拉拉, 美国),
Thilo A. Fligge, Stefan Buehler, Markus
Christ (勃林格-殷格翰制药公司,
Biberach, 德国)

Michael Frank 为安捷伦科技公司应用化
学家, Waldbronn, 德国

www.agilent.com/chem/1200:cn

文中信息如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2006
保留所有权利。除非著作权允许,
未经授权不得复制、改编或翻译。

2006 年 4 月 1 日出版
出版号 5989-4505CHCN



Agilent Technologies