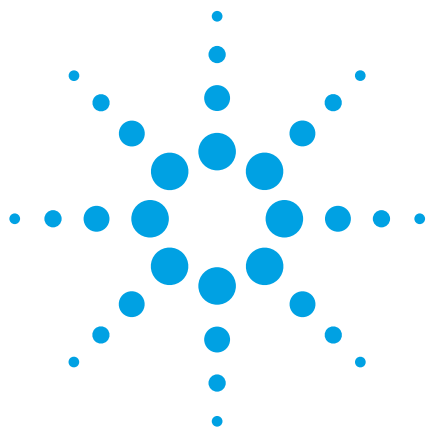




Agilent 1260 Infinity SFC/MS 解决方案

卓越的灵敏度来源于与 Agilent 6100 系列 LC/MS 系统的无缝连接

技术概述

作者

Melissa Dunkle、Gerd Vanhoenacker、

Frank David 和 Pat Sandra

色谱研究所

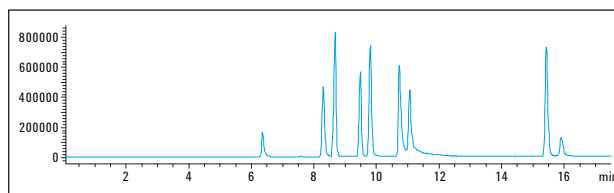
President Kennedypark 26

8500 Kortrijk, 比利时

Martin Vollmer

安捷伦科技有限公司

德国瓦尔德布隆



摘要

超临界流体色谱 (SFC) 与质谱检测 (MSD) 联用能够大大提高 SFC 的适用性。本技术概述介绍了两种仪器配置，在这两种配置中，无论使用的是大气压化学电离源 (APCI) 还是电喷雾离子源 (ESI)，Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 与质谱仪均可实现连接。本测试使用了 Agilent 6130 单四极杆 LC/MS 系统，但也可使用其他的安捷伦单四极杆 LC/MS 系统。

在拟定的配置中，未使用流出物分流。该实验获得了良好的重现性（保留时间 RSD < 0.3%，峰面积 RSD < 10%）和灵敏度（灵敏度比紫外检测器高 10 倍），同时，与 UV/DAD 检测器相比，色谱峰扩散最小。



Agilent Technologies

前言

使用填充柱的超临界流体色谱是液相色谱技术的一个重要补充。经证实，SFC 能够有效进行手性和正相分离。随着 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统的推出，SFC 实现了卓越的分离度、灵敏度和样品通量性能。通过将升压泵与 Agilent 1260 Infinity 二元泵和高性能的背压调节器（位于检测器后方）相结合，提高了 CO₂ 流量控制性能，从而使紫外检测的噪音大大降低，而灵敏度也得到提高。

SFC 与 MS 检测的联用则扩大了 SFC 的应用范围。在这种情况下，主要由 CO₂ 组成的流出物在进入质谱离子源之前被减压。体积膨胀的 CO₂ 产生显著的冷却效应，使得 SFC 与 MS 的连接无法像 LC 与 MS 连接那样简单直接。鉴于此，我们采用了不同的方法，其中包括在背压调节器前后进行分流以及加入液体补偿流。

研究表明，这两种配置均可使系统获得卓越的灵敏度、分辨率和重现性。本文将介绍这两种配置并阐述 SFC/MS 的性能。

实验部分

溶液

各药物组分的储备液用甲醇配制（浓度为 1–5 mg/mL，取决于溶解性）。然后将这些储备液混合，配制成含有 10 种化合物的测试混标。大多数试验均使用浓度为

10 ppm 的溶液，但是，我们仍需配制浓度为 0.1–100 ppm 的系列稀释溶液。峰号、化学名称和分子量见表 1。我们还对负离子模式进行了评估，并使用单独的测试混标（表 2）。各组分的储备液用甲醇配制（浓度为 1–5 mg/mL，取决于溶解性），然后将储备液混合使最终浓度为 10 ppm。

峰号	化学名称	CAS 号	分子量 (g/mol)
1	可可碱	83-67-0	180
2	茶碱	58-55-9	180
3	可的松	53-06-5	360
4	泼尼松	53-03-2	358
5	氢化可的松	50-23-7	362
6	泼尼松龙	50-24-8	360
7	磺胺嘧啶	59-40-5	300
8	磺胺二甲嘧啶	127-79-7	264
9	磺胺胍	57-67-0	214
10	胞嘧啶	71-30-7	111

表 1
含 10 种组分的测试混标

峰号	化学名称	CAS 号	分子量 (g/mol)
1	吉非罗齐	25812-30-0	250
2	氯苯酚	9012-63-9	289
3	布洛芬	15687-27-1	206
4	萘普生	22204-53-1	230
5	3,4,4'-三氯碳酰替苯胺	101-20-2	314
6	华法林	81-81-2	308
7	双氯芬酸	15307-79-6	296

表 2
负离子模式的测试混标

实验条件

所有试验均使用了相同的正相色谱柱 — Agilent ZORBAX RX-SIL, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 色谱柱（安捷伦部件号：880975-901）和相同的改性剂（20 mM 甲酸铵的甲醇溶液）。检测在 UV 254 nm 处进行，MS 扫描采用正离子模式，MS SIM 使用 M+1 离子以正离子模式进行检测。

系统配置

SFC/MS 配置 1

该 SFC/MS 配置去除了背压调节器 (BPR) 后方的排废管，并使用不锈钢 (SS) 毛细管将 BPR 连接到 Caloratherm 加热装置¹，然后再连接到 MSD。加热装置可以防止 CO₂ 进入离子源时由于体积膨胀而导致管线凝冻。从图 1 可以看出，两根 0.12 mm × 400 mm SS 毛细管（部件号：5021-1823）均插入了系统中。其中一根是用来替代系统中最初安装用于连接紫外检测器和 BPR 的大孔径 SS 管线，另一根则是用于将 BPR 的出口连接到 Caloratherm 加热装置。Caloratherm 预热器套管位于安捷伦 SS 毛细管 0.17 mm × 100 mm（部件号：5061-3361）的外围。使用安捷伦 SS 零死体积两通（部件号：0100-0900）连接这两段管线，包含预热器的管线直接连接至 MSD 入口。本设置避开了可直接将流体从 LC/SFC 系统流向排废管或离子源的分流阀。

条件	
色谱柱：	Agilent ZORBAX RX-SIL (4.6 内径 × 250 mm, 5 μm)
超临界流体：	CO ₂
改性剂：	含 20 mM 甲酸铵的甲醇溶液
出口压力：	120 bar
流速：	2.0 mL/min
改性剂梯度：	0-20 min: 5-40%
柱温：	40 °C
进样量：	5 μL
Caloratherm 加热器：	60 °C
补偿流流速：	甲醇, 0.2 mL/min
检测：	DAD, 254 nm
	MS 扫描 80 – 400 amu, SIM (M±1)
	APCI 和 ESI 源
APCI：	毛细管电压：±3000V, 电晕电流：4.0 μA (+), 15.0 μA (-)
	干燥气体：12 L/min, 325 °C
	雾化器：50 psig
	蒸发器：350 °C
ESI：	毛细管电压：±3000V
	干燥气体：12 L/min, 250 °C
	雾化器：35 psig

表 3
实验条件

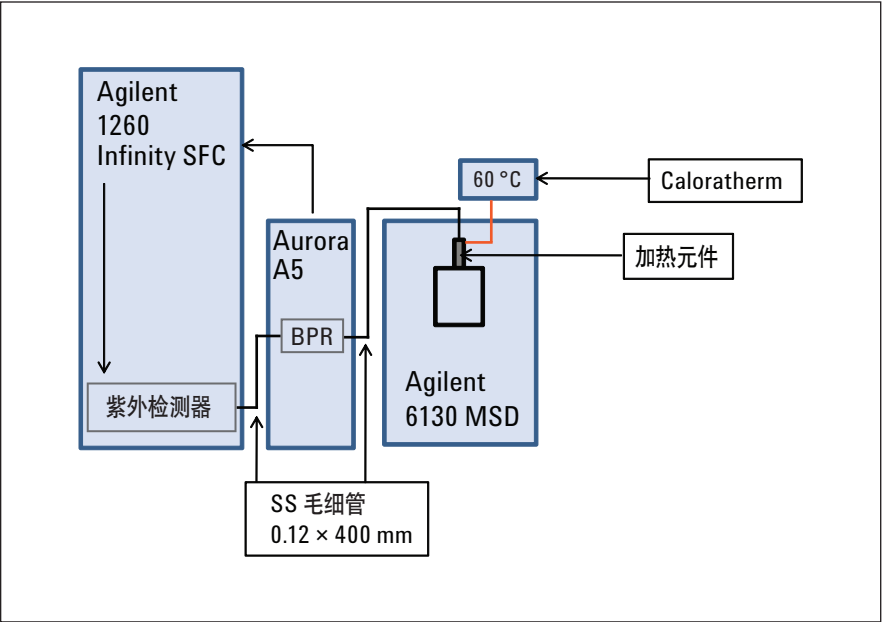


图 1
SFC/MS 配置 1 的示意图

SFC/MS 配置 2

本配置与配置 1 极为相似，但是，该系统在紫外检测器和 BPR 之间加入了补偿流（图 2）。使用 0.12 mm × 105 mm SS 毛细管将紫外检测器（部件号：5021-1820）连接到安捷伦零死体积三通（部件号：0100-0969）。利用 Agilent 1260 Infinity 等度泵提供补偿流，并通过 0.25 mm × 800 mm SS 毛细管（部件号：5065-9930）将其连接至三通。然后使用 0.12 mm × 400 mm SS 毛细管（部件号：5021-1823）将三通连接至 BPR。BPR 后面的所有组件与 SFC/MS 配置 1（图 1）中的相同。所有毛细管均由 SFC/MS 连接工具包（部件号 G4309-68000）提供。

结果和讨论

在 MSD 检测之前加热

对于 SFC/MS 配置 1 和 2，已确定在 MSD 检测之前加热管线会产生显著的差异。

图 3 显示了使用和未使用 Caloratherm 加热器所得的色谱图。两种色谱图的刻度相同，我们可以很容易地看出不安装加热设备时，信号明显较低。噪音和重现性差是由于 CO₂ 体积膨胀导致管线和 MS 入口发生部分凝冻所致。借助配置中的加热装置使管路不发生凝冻，MS 重现性也得到显著改善。因此，我们强烈建议在 MS 入口之前进行加热。本文中的其他试验均配有 Caloratherm 加热设备。

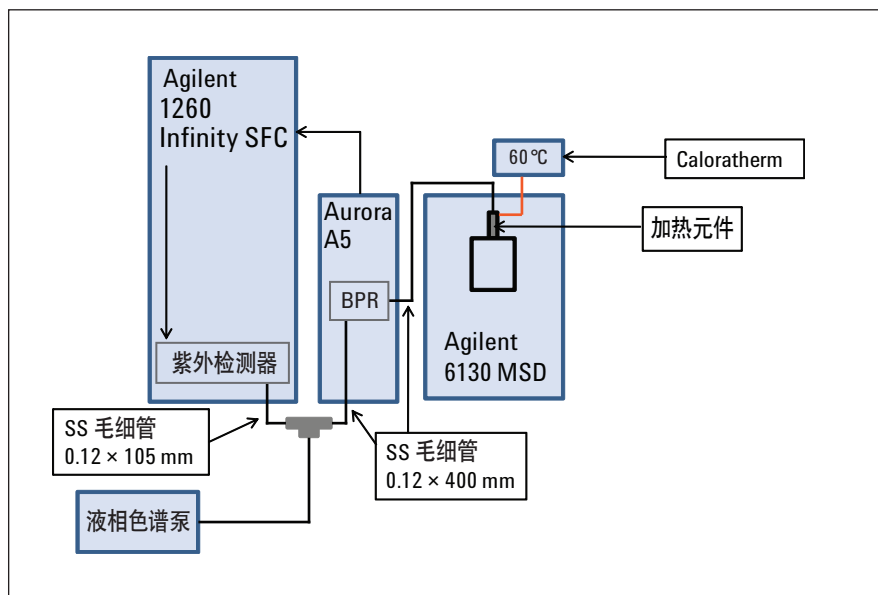


图 2
SFC/MS 配置 2 的示意图

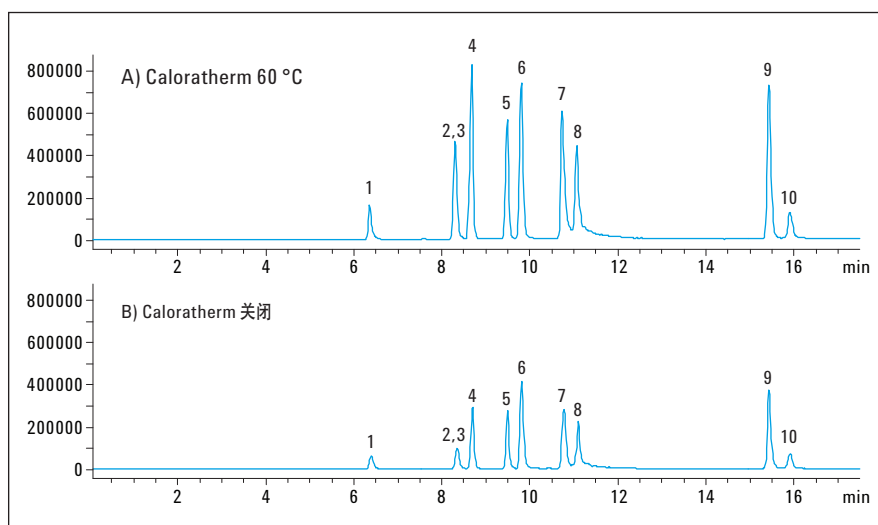


图 3
采用 SFC/MS 配置 2 (APCI) 在开启 (A) 和关闭 (B) Caloratherm 加热装置的情况下分析含有 10 种化合物的测试混标所得的 SIM 色谱图 分离条件和质谱参数列于表 3

SFC/MS 配置 1 与配置 2 的比较

SFC/MS 配置 1 的成本比配置 2 低，因为无需使用单独的液相色谱泵提供补偿流。但使用配置 2 可以获得最佳结果。

采用 SFC/MS 配置 1 可获得具有重现性的 MS 保留时间（在大多数情况下 RSD < 0.3%），但发现 MS 峰面积差异较大，这是由于离开 BPR 的流体未均匀雾化。因此，我们建议将 SFC/MS 配置 1 用于获取定性信息、常规筛查和方法开发等，而不建议用作定量分析。

SFC/MS 配置 2 可提供 RSD 低于 0.3% 的 MS 保留时间重现性，并且 MS 峰面积重现性优于 10% RSD。加入补偿流后，离开 BPR 的流体极有可能变得更加均匀，从而可获得重现性更好的 MS 结果。该配置可获得更好的重现性，因而可用于定量分析。

质谱离子源参数

APCI 和 ESI 离子源均可在 SFC/MS 配置 2 中使用。我们通过设计试验对整个流速和离子源温度范围进行了研究。例如，将干燥气流速设定在 5–12.5 L/min 范围内，干燥气温度设在 200–350 °C 之间，而雾化器温度设在 200–450 °C 之间。在一般的 SFC 分离条件下将含有 10 种化合物的测试混标进样，然后对结果进行分析。经确定，APCI 和 ESI 离子源均可用于 SFC/MS 分析。如同 LC/MS，离子源的选择取决于样品电离。

测定结果表明，使用 APCI 和 ESI 源所得各组分的 MSD 保留时间重现性 < 0.3% RSD，MSD 峰面积重现性 < 10% RSD。使用 APCI 源和 ESI 源所得的结果非常相似，主要的差别在于 ESI 源对某些化合物的电离效果要优于 APCI 源。虽然化合物的保留时间始终保持不变，但不同的离子

源参数仍会导致峰面积发生改变。图 4 和图 5 分别显示了 APCI 和 ESI 离子源在不同的源温度下所得的 TIC。从图 4 中可以看出，所有 TIC 的 y 轴刻度相同，当 APCI 离子源温度为 200 °C 时电离较弱，但是随着温度的增加，电离有所改善。这种影响在使用 ESI 源时也存在，但影响程度较弱。

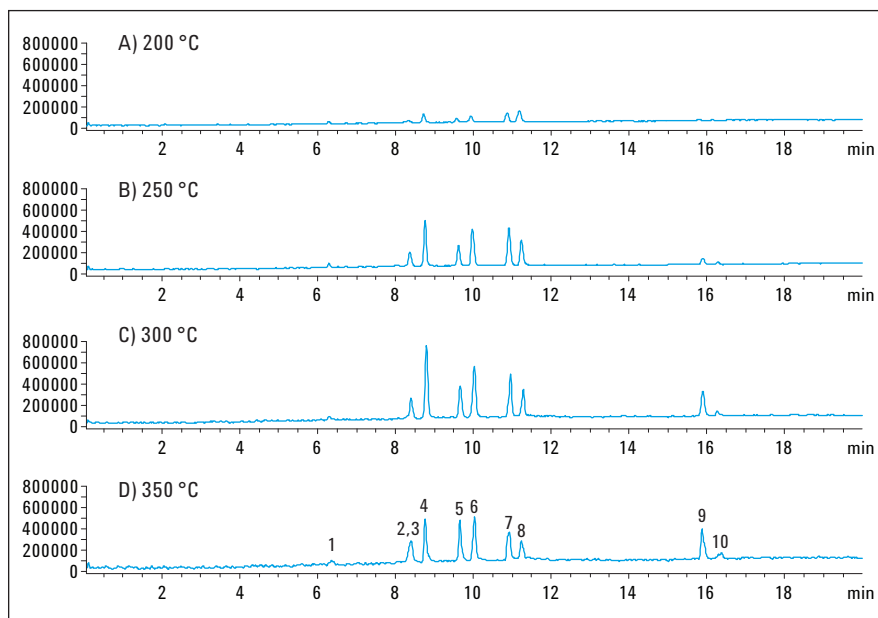


图 4

采用 APCI 源在不同源温度下分析含有 10 种组分的测试混标所得的 TIC。在每种条件下，干燥气体温度与雾化器温度相同：A) 200 °C，B) 250 °C，C) 300 °C 和 D) 350 °C。干燥气流速为 5.0 L/min，雾化器压力为 50 psig。其他分离条件如图 3 中所示

图 5 显示峰 9 和峰 10 在源温度为 200 °C 时均未离子化,但随着温度的增加,这两种化合物离子化增强。这在意料之中,因为电离的好坏依赖于干燥气体流速和离子源温度。对于该混合物,离子源温度为 300–350 °C 时才可使 APCI 和 ESI 电离均获得最佳结果。

SFC/MS 灵敏度

使用相同的含有 10 种组分的测试混标配制浓度为 0.1–100 ppm 的系列稀释溶液,并用 SFC/MS 配置 2 进行分析。采集 UV 和 MS 数据 (APCI) 并进行比较 (图 6)。图 6 显示了浓度为 5 ppm 的含有 10 种组分的测试混标的 UV 和 MS 谱图。UV 和 MS 分析结果表明,分离度和峰宽相差不大。UV 和 MS 检测的线性良好,在大多数情况下, R^2 值为 0.99。UV 和 APCI MS 数据在 0.1–100 ppm 范围之内呈线性,ESI MS 数据在 0.1–10 ppm 范围之内呈线性。根据校准曲线计算出各化合物的检测限 (LOD),结果列于表 5。MSD 对测试混标中所有组分的检测灵敏度约为紫外检测器的 10 倍。

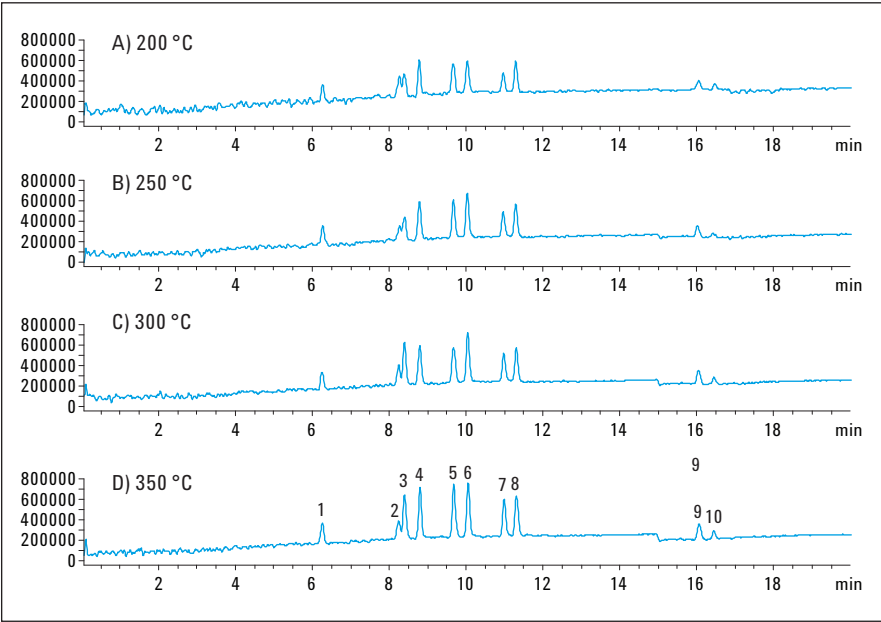


图 5
采用 ESI 源在不同源温度下分析含有 10 种组分的测试混标所得的 TIC: A) 200 °C, B) 250 °C, C) 300 °C 和 D) 350 °C。其他分离条件如图 4 中所示

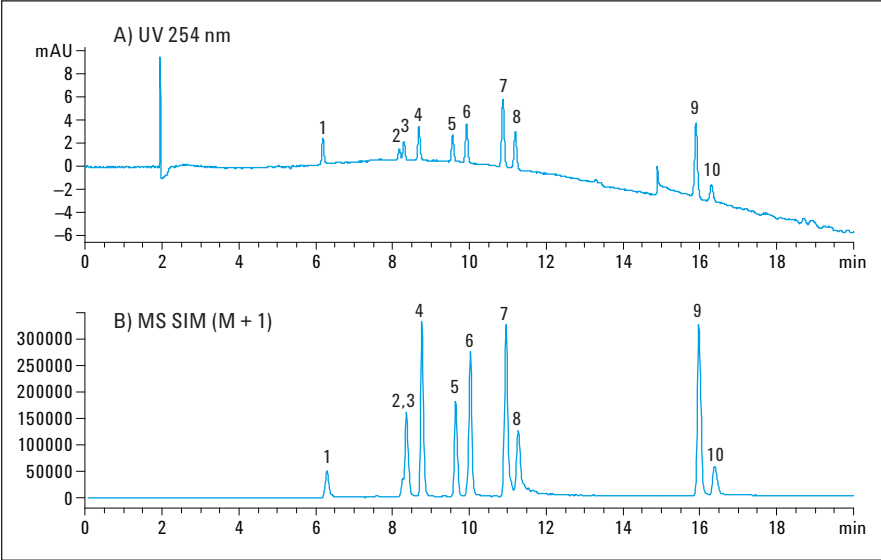


图 6
含有 10 种化合物的测试混标在浓度为 5 ppm 时分析所得的 A) UV 和 B) APCI SIM 色谱图。分离条件如图 3 中所示

SFC 参数

本实验对多个 SFC 参数进行检查以确定使用 MS 检测是否存在限制。改变 SFC 系统的流速和背压，利用含 10 种化合物的测试混标对 1–5 mL/min 范围的流速和 100 – 250 bar 范围的背压进行了分析。

SFC 系统的流速在 1–5 mL/min 范围之内变化，增量为 1 mL/min。经测定，结合补偿流的 SFC/MS 的最大流速为 3 mL/min。

SFC 系统的背压在 100–250 bar 范围内变化，增量为 50 bar。测定结果表明，SFC/MS 系统在所有经测试的背压下运行良好。基线噪音和峰面积重现性在 100 bar 时稍差，但其随着背压的增加而改善。

负离子模式

最后，使用 SFC/MS 配置 2 和 APCI 离子源对负离子模式进行了分析。图 7 显示了使用 APCI 离子源在负离子模式下分析浓度为 10 ppm 的测试混标所得的色谱图。

峰号	名称	紫外	APCI MS		ESI MS	
		LOD (pg)	LOD (pg)	R ²	LOD (pg)	R ²
1	可可碱	500	50	0.9925	50	0.9978
2	茶碱	1250	200	0.9887	50	0.9912
3	可的松	500	25	0.9977	20	0.9942
4	泼尼松	375	20	0.9977	35	0.9978
5	氢化可的松	500	25	0.9989	20	0.9984
6	泼尼松龙	375	25	0.9977	63	0.9957
7	磺胺嘧啶	375	25	0.9991	53	0.9968
8	磺胺二甲嘧啶	500	50	0.9982	50	0.9991
9	磺胺胍	375	20	0.9982	250	0.9869
10	胞嘧啶	500	50	0.9988	165	0.9977

表 5
使用 SFC/MS 配置 2 进行 UV 和 MS 检测所得的 LOD 值

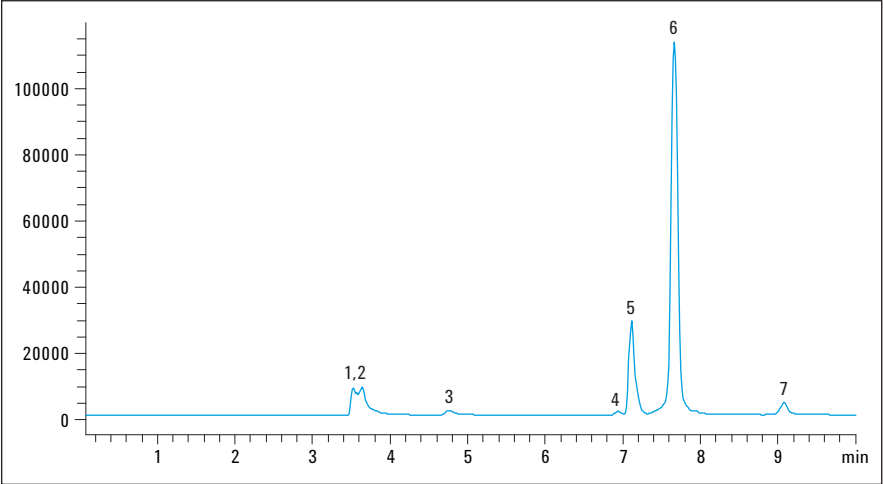


图 7
测试混标在负离子模式下分析所得的 SIM 色谱图。表 3 中列出了分离条件

结论

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统可以与 MS 检测联用。APCI 和 ESI 离子源均可使用，并且还可应用正负离子检测模式。测定结果表明，必须在 MSD 之前加热以防止 CO₂ 体积膨胀而导致管线凝冻，从而获得稳定或可重现的结果。

配置 2 在背压调节器之前添加了补偿流，从而获得了最佳的保留时间和峰面积重现性。此外还获得了良好的灵敏度、线性以及较高的稳定性。我们建议将该配置用于定性和定量分析。

不加入液体补偿流的配置 1 也可使用，但 MS 响应将显示较大差异。

离子源温度或干燥气体流速不存在任何限制，在其整个范围内均可使用。就 SFC 参数而言，在其整个压力和温度范围之内均可使用。但是，目前配置 2 只能使用最高 3.0 mL/min 的流速。

参考文献

1.

Caloratherm（部件号：AG1）和预热器（部件号：AG004）是来自 SandraSelerity Technologies 的产品，可通过 RIC 获得

要了解更多信息，请发邮件至
info@richrom.com

www.agilent.com/chem/lc

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 6 月 15 日，中国印刷
出版号 5990-7972CHCN



Agilent Technologies