

超高压液相色谱系统性能特征研究

灵活、高效和耐用的ExionLC™ 2.0 系统

Investigating the performance attributes of an ultra-high pressure liquid chromatography system

Adrian M. Taylor

SCIEX, Canada

成功的质谱分析 (MS) 实验的一个重要方面, 就是将它与某种形式的高质量前端样品分离技术相结合。在大多数情况下, 是通过使用液相色谱法 (LC) 实现的。由于质谱仪的灵敏度、速度和选择性不断提高, 速度更快, 可以实现更强大的液质工作流程。液质用户也需要减少样品制备的工作流程。他们希望在LC-MS系统上进样使用更少的样品, 就能达到检测水平。这会对液相系统施加更大压力, 小于5 µL的进样体积, 液相系统仍要能够处理日益复杂的基质并提供良好的进样重现性。此外, 更灵敏的质谱仪器, 要求液相系统残留保持在更低的水平, 从而降低假阳性结果的风险。

在本篇内容中, 研究了SCIEX ExionLC™ 2.0系统的关键性能属性, 特别是进样线性和精密度。对进样程序也同样进行研究, 以评估各种类型方法的系统残留效应。与典型情况一样, 进行了流

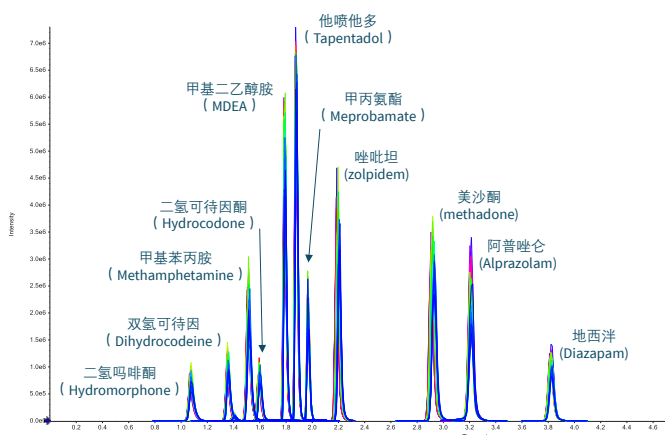


图 1. 保留时间精密度。 使用ExionLC™ 2.0系统, 对法医毒品化合物标准溶液进行100次重复进样, 特定化合物的提取离子色谱的叠加图。100次进样中特定分析物的保留时间变异性 (%RSD) 小于0.3%。

速精密度和结果保留时间的重现性研究。根据具体测试情况, 配备SCIEX Triple Quad™ 5500 系统或单独选配二极管阵列检测器的ExionLC™ 2.0系统被选择作为测试方案。

ExionLC™ 2.0 系统的关键特征

- 二元高压串联活塞泵, 额定压力为860 bar, 流速为0.001至2 mL/min, 给予更大灵活性
- 精准稳定的溶剂流量使得保留时间偏差RSD小于0.3%
- 检测分析时的进样线性相关系数 (r^2) >0.999和对于大多数化合物0.5至50 µL的进样体积精密度的变异系数均小于1% (对于大多数化合物, 0.5至25 µL), 保证精准和准确的定量结果。

- 多重清洗解决方案，可拓展的进样针清洗功能，减少系统残留效应、减少假阳性率，满足重复提取和反复进样的方法
- 能够兼容各种类型UHPLC柱，适合快速分离和高通量
- 基于亚微米（2-3 μm ）级别颗粒填料的色谱柱，在低压条件下实现高分离度和高载样量

方法

材料和解决方案：通过含有尿嘧啶（uracil）（死体积保留标记），苯酚（phenol），对羟基苯甲酸甲酯（Methyl Paraben），羟基苯甲酸乙酯（Ethyl Paraben），对羟基苯甲酸丙酯（Propyl Paraben）、对羟基苯甲酸丁酯（Butyl Paraben）和对羟基苯甲酸庚酯（Heptyl Paraben）的Supelco 高效液相梯度系统诊断混合物（P/N 4-8271），进行进样线性性和精密度的研究。对于残留效应研究，使用咖啡因（caffeine, Millipore Sigma P/N C0750）、双氯苯双胍己烷（chlorhexidine, Millipore Sigma Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material P/N: PHR1421）和阿米替林（amitriptyline, Cerilliant P/N: A-923 1.0 mg/mL in methanol, ampule of 1 mL, certified reference material）。二级溶液配置：4 mg/mL 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡因甲醇水溶液（20%/80%; v/v）；500 ng/ μL 和 1.25 ng/ μL 双氯苯双胍己烷的0.1%甲酸水溶液；285 ng/mL 和 1 ng/mL 的阿米替林甲醇水溶液（20%/80%; v/v）。对于流速精密度测试，使用一种含有18种药物和11种氘代内标的溶液，购买自Cerilliant。

色谱方法：SCIEX ExionLC™ 2.0系统进行液相分离实验。使用2.6 μm 的飞诺美Kinetex C18 色谱柱（2.1 $\times$ 50 mm, P/N: 00B-4462-AN），含有0.1%甲酸的水和0.1%甲酸的乙腈的等度流动相。分析运行时间（包括平衡）为10分钟，以确保良好的重现性。进样速度设置低，速度因子0.1。咖啡因和双氯苯双胍己烷残留效应检测，用带2个低死容积接头的限流器（15米黄色PEEK管，内径为0.18 mm）进行连接，确保在背压约为140 bar的条件下进行测定。对于阿米替林的残留效应和流速精密度测定，用2.6 μm 的飞诺美 Kinetex Phenyl-Hexyl 色谱柱（4.6 $\times$ 50 mm, P/N: 00B-4495-EO）。流动相A为含有甲酸铵的水溶液。流动相B为含有甲酸的甲醇。流速为1 mL/min，液相运行时间为6.5分钟。SCIEX ExionLC™ 2.0 系统进样器，标准配置含有 250 μL 进样针，100 μL 样品定量环，250 μL 缓冲管和 15 μL 针管。对于所有进样，均使用微升进样增强模式，在优化样品消耗同时，使得进样循环时间最短。

质谱和二极阵列检测器条件：紫外可见检测，使用配有集成ExionLC 2.0二极管阵列探测器HS的ExionLC 2.0 系统，检测器配备一个10毫米、10 μL 、300 bar的流量池。对于Supelco 高相液相梯度系统诊断混合物，检测器在254 nm下检测，对于咖啡因实验，在272 nm下检测。

所有二极管阵列检测数据在10 Hz下进行数据采集。

质谱分析使用SCIEX Triple Quad™ 5500系统。离子源采用电喷雾电离（ESI+）模式。双氯苯双胍己烷监测了3个MRM离子对和阿米替林检测2个离子对。

数据采集采用 Analyst 软件1.7.1进行数据采集。值得注意的是，ExionLC 2.0系统也完全支持SCIEX OS 软件进行数据采集。

数据后处理：质谱检测器和二极管阵列检测器数据均使用SCIEX OS 软件 2.0.1进行标准曲线绘制、精密度和准确的计算统计。

进样的线性性和精密度

首先，使用集成的ExionLC 2.0二极管阵列检测器HS检测混合物。取得很好成分分离结果（图2）。

重复进样（n=5），使用微升增强进样模式在0.5和25 μL 宽泛的体积范围内进样测试。针对Supelco高效液相梯度系统诊断混合物中每个组分对应的进样量，测定峰面积并绘制曲线。

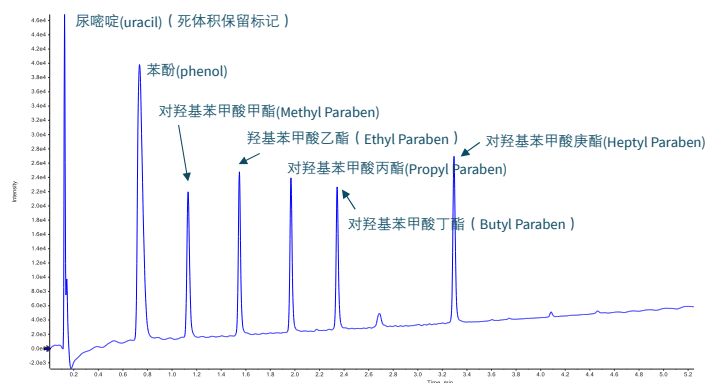


图2. 诊断混合物的高质量分离。254 nm紫外可见光下，梯度洗脱的主要色谱峰顺序从前至后依次为：尿嘧啶、苯酚、对羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯和对羟基苯甲酸庚酯。

图3显示了线性系数 (r^2) > 0.999。

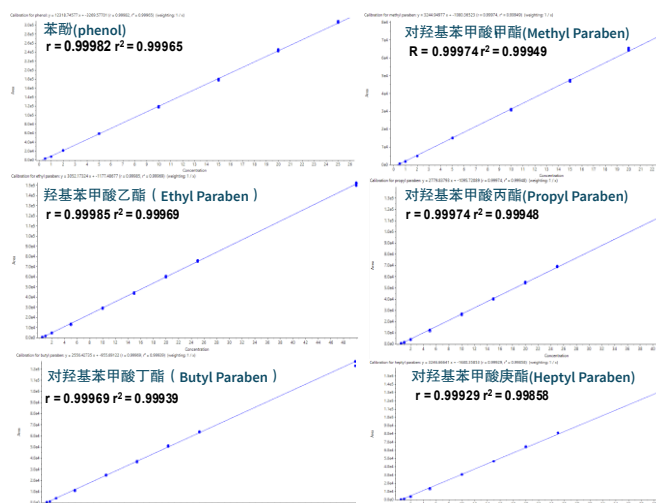


图3. 进样线性。以不同的进样体积 (0.5至25 μL) 5次重复进样检测诊断混合物。对于大多数化合物0.5至50 μL 的进样体积的进样线性相关系数 (r^2) > 0.999 (对于大多数化合物, 都是使用0.5至25 μL 的进样量)。

进样重现性, 同样由上述数据计算所有不同进样量时的重现性数据。即使在进样量非常低时, 数据变异性也很低。图4显示所有进样体积的偏差%CV均低于1%。

优化样本消耗量时, 采用微升进样增强模式作为首选项, 确保不会有过量的样品被使用。进样顺序也已优化, 确保与其它进样模式相比, 进样时间不会受到影响, 可以在17秒内完成。

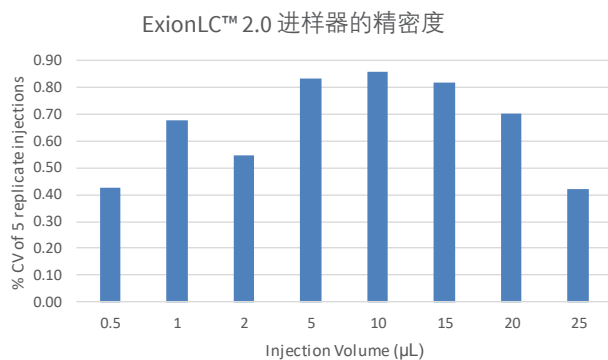


图4. 进样精密度。重复进样梯度系统诊断混合物, 在一系列进样体积中, 计算进样重现性。所有进样量的偏差%CV均小于1%。

进样残留效应检测

为了测定残留效应, 选择了3种易被吸附的化合物: 咖啡因、双氯苯双胍己烷和阿米替林。对于每种化合物, 测定残留效应使用以下6次进样顺序: 空白1, 低浓度标准溶液, 高浓度标准溶液 (高浓度标准, 超过检测器的线性范围), 空白2, 空白3, 空白4。接下来数据用于计算残留效应。

$$\text{Carryover} = \frac{A_{\text{Blank2}} - A_{\text{Blank1}}}{A_{\text{low}} * \left(\frac{C_{\text{high}}}{C_{\text{low}}}\right)} * 100$$

A_{Blank1}	第一次空白进样的峰面积
A_{Blank2}	第二次空白进样的峰面积
A_{low}	浓度标准品的峰面积
C_{high}	高浓度样品
C_{low}	低浓度样品

如图5所示, 紫外检测实验中, 简单清洗循环, 咖啡因的残留量为0.0006%。

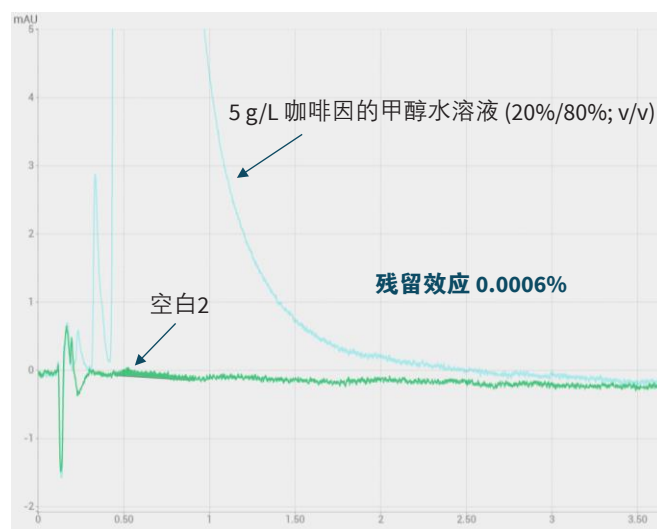


图5. 咖啡因的残留效应。272 nm紫外可见光下, 高浓度标准品与后续空白进样重叠。采用最简单的清洗方法, 残留效应也非常低。

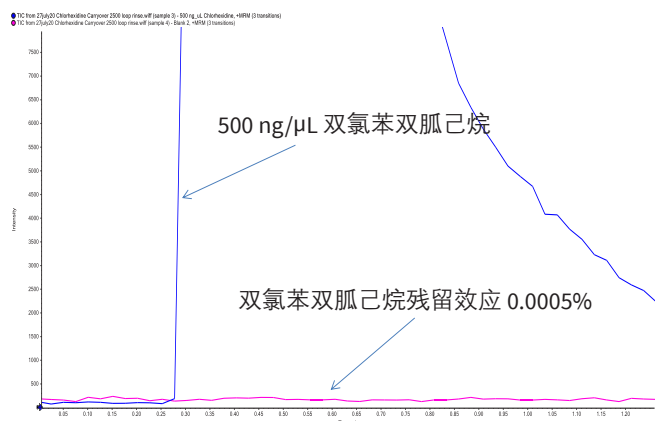


图6. 双氯苯双胍己烷残留效应。提取离子色谱图显示了一个具有挑战性的残留效应例子，残留效应可以忽略不计。

更具挑战性的实验是使用双氯苯双胍己烷测试，这种化合物是出名的有“粘性”。残留效应使用更灵敏的质谱实验进行测量。多重清洗溶液和可拓展的针清洗模式，可以达到预期的效果，但是，自动进样器的灵活性可以支持构建优化的清洗方法。总清洗时间取决于在每个清洗步骤中使用的清洗溶液总体积。对不同的清洗溶剂和传输溶液进行研究，以尽量缩短总清洗时间同时保证最小的残留效应。图6显示了优化清洗溶液体积后，计算双氯苯双胍己烷残留量为0.0005%。

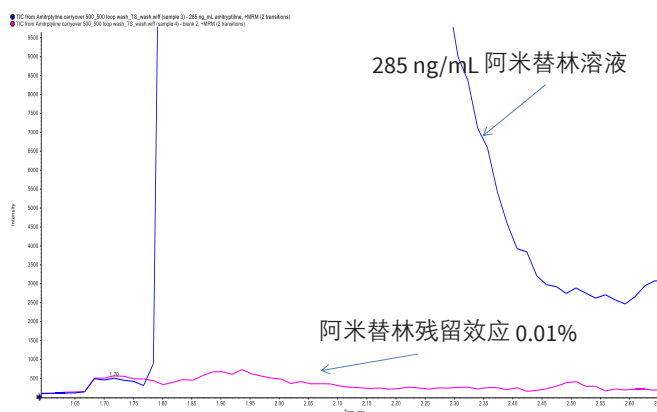


图7. 阿米替林残留效应。提取离子色谱图显示阿米替林在285 ng/mL时的残留效应结果。

对于额外的残留效应测试，1 ng/mL 和285 ng/mL阿米替林10%乙醇溶液，在质谱实验中的MRM离子对，后者离子流强度为2000万（cps）。

图7显示了采用最小体积的清洗溶液，溶液为添加0.1%甲酸的20%乙醇、20%甲酸、40%水和20%异丙醇溶液。高浓度标准溶液进样后，第一次空白进样的阿米替林残留效应大约为0.01%。

流速精密度

图1显示了100次连续进样的重叠色谱图，展示了保留时间稳定性。如中所示图8（顶部），跨范围保留时间的每种分析物的保留时间精密度相对标准偏差小于0.3%。对于大多数测试的化合物，超过100次进样中保留时间偏差均<1秒（图8，底部）。

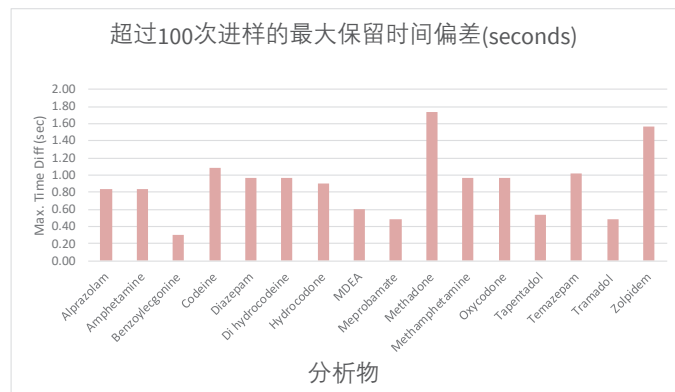
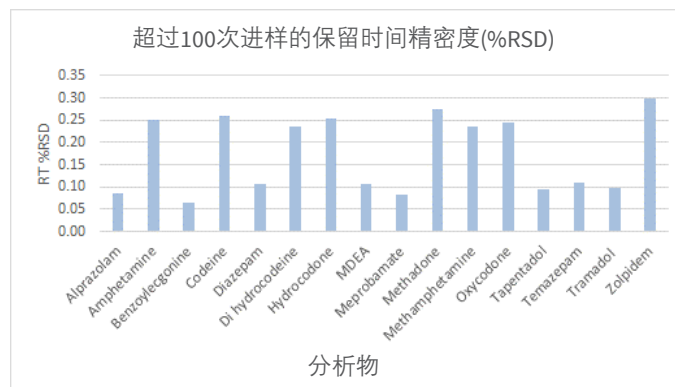


图8. 流速精密度。超过100次进样中，针对每个特定分析物绘图，所有分析物保留时间变异性（%RSD）均为低于0.3%（顶部）。这意味着这些分析物在100次进样中保留时间偏差均少于2秒。

结论

ExionLC™ 2.0系统是一个灵活而稳健的超高效液相色谱（UHPLC）系统，适用于当今具有挑战性的液相色谱质谱联用分析工作流程。

- 自动进样器的高精密度和高准确度也是定量实验中必不可少的。如本文所示，该系统在不同进样体积（0.5–5 µL）测试范围内，可实现进样精密度的标准偏差CV小于1%。进样器进样良好的线性也得到了验证（经回归分析所有分析物线性相关系数（r）均大于0.999）。
- 超低残留效应在许多LC-MS应用中也很关键。灵活的自动取样器清洗选项（具有多个清洗溶液和扩展的针清洗功能）可以减少残留效应，即使对于非常具有挑战性的分析物，残留效应也可以低至0.0005%。
- 在运用多种分析物和基于时间Scheduled MRM™方法进行分析时，保留时间精密度的至关重要。使用拥有高流速精密度的ExionLC 2.0系统可以对测试中的分析物，提供高流速精密度相对标准偏差RSD小于0.3%。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12819-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[SCIEX-China](#)