



应用文集

超临界流体色谱



Agilent Technologies

利用最先进的 SFC 扩展应用范围

随着技术的进一步发展，超临界流体色谱 (SFC) 越来越受到色谱工作者的关注。全新 Agilent InfinityLab SFC 解决方案使您能够比以往更快速、更高效地分离和定量分析复杂混合物。在实验室中配置 SFC 可为您提供一种与正相或反相液相色谱正交的技术，使您能够扩展当前的应用范围。

Agilent InfinityLab SFC 解决方案优势概览

最大程度提高分析效率

- 实现比 HPLC 快 10 倍的分析速度
- 采用注入进样消除样品溶剂效应
- 进样量范围为 0.1–90 μL

最大程度提高仪器效率

- 利用超临界流体色谱的完全正交性
- 在同一系统上比较 SFC 和 UHPLC 结果

最大程度提高实验室效率

- 将购买溶剂和处理废液的成本降低至 1/5
- 避免使用有毒溶剂
- 使实验室更清洁、更环保

内容提要

本文集介绍了 SFC 的功能和应用范围。首先介绍了全新 Agilent InfinityLab SFC 解决方案的最新技术进步，然后提供了制药、生物制药、食品和法医学以及能源与化工等应用领域的实例。

所有应用文献均可从安捷伦网站下载。只需搜索每个应用文献末尾的出版号即可。或者，您可以使用安捷伦应用查找工具搜索 SFC 应用文献：www.agilent.com/chem/sfc-applications

		安捷伦出版号	页码
1	Agilent InfinityLab SFC 解决方案的性能特点		
1.1	SFC Multisampler 性能评估 介绍了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的进样原理。在各种进样量下测定进样线性 and 精密度。还使用咖啡因作为示例测定了交叉污染。	5991-7623ZHCN	8
1.2	SFC 的新进样参数 介绍了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的注入速度和灌注体积对分离的影响。展示了使用不同进样量得到的紧邻洗脱的化合物的分离结果，并提供了优化指南。	5991-7626ZHCN	15
1.3	加快无改性剂的 SFC 分离速度 在分离中使用纯 CO ₂ 通过反压和流速梯度聚焦后洗脱化合物。对早洗脱化合物的分离能力保持不变。运行时间大幅缩短，且峰形得到显著改善。	5991-8492ZHCN	24
1.4	SFC 与 UHPLC 正交分离 介绍了 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统的设置。展示了性能数据，并使用一种农药混合物作为应用示例证明了两种操作模式的正交性。	5991-8276ZHCN	30
1.5	SFC 中的高精度温度控制 介绍了柱后温度对检测器噪音的影响，并使用 Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱对这一温度进行了优化。结果表明，检测器噪音在各种柱温下均保持稳定。	5991-7625ZHCN	41

2 制药与生物制药应用			
2.1	手性分离方法开发 利用 Agilent ChemStation 方法筛选向导开发手性分离方法。Agilent 1260 Infinity II SFC 系统配备四根手性柱和一个选择阀，可自动筛选多组不同的等度分离条件。	5991-7624ZHCN	49
2.2	大分子肽和小分子肽的分离 介绍了二肽和三肽以及肽的 SFC 分离。利用 Agilent MassHunter Bioconfirm 软件测定肽的分子量并对具有不同电荷态的大分子肽进行解卷积。	5991-6435ZHCN	55
3 食品检测与农业应用			
3.1	蔬菜中农药的分析 介绍了利用 SFC 与三重四极杆质谱检测优化复杂食品基质中农药的分离方法。利用软件辅助的批次比较确定最佳条件，以鉴定具有最低基质影响的梯度。	5991-5443ZHCN	63
3.2	农药分析方法开发 介绍了利用 SFC 与三重四极杆质谱检测开发用于水果和蔬菜中农药分析的分离方法。利用最终方法在一次分析中测定 200 多种农药。	5991-6151ZHCN	71
3.3	测定橄榄油中的维生素 E 介绍了利用 SFC 实现生育酚和生育三烯酚的所有异构体的快速、高分离度分离。测定了检测限和定量限 (LOD 和 LOQ) 以及保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD)。	5991-5499ZHCN	85
3.4	植物油中抗氧化剂的分析 介绍了利用 SFC 和 UHPLC 与单四极杆质谱检测分析植物油中的抗氧化剂。实现了良好的峰面积重现性和灵敏度，证明混合型系统适用于定性和定量分析。	5991-1546ZHCN	89

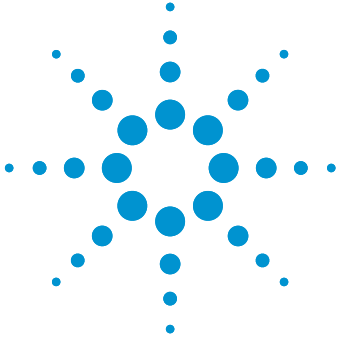
4 法医毒理学与兴奋剂检测应用			
4.1	<p>血液中 D-安非他明和 L-安非他明的分离</p> <p>介绍了用于血液样品中 D-安非他明和 L-安非他明的手性分离方法的开发。使用三重四极杆质谱系统实现了对两种手性对映体形式的定量分析。</p>	5991-8262ZHCN	99
4.2	<p>安非他明相关的滥用药物的分离</p> <p>介绍了使用 SFC 和手性柱分离安非他明相关药物的结构异构体和 对映异构体。使用单四极杆和三重四极杆质谱实现了定性检测和 定量测定。</p>	5991-8416ZHCN	107
4.3	<p>滥用药物的定量测定</p> <p>介绍了使用 SFC 与三重四极杆质谱分离 25 种滥用药物。所有化 合物均获得了 30 pg/mL 的检测限，并且校准曲线表现出优异的 线性相关性。</p>	5991-6747ZHCN	117
4.4	<p>尿液中 β-受体阻滞剂的测定</p> <p>介绍了一系列极性药物化合物的分离。展示了所有 β-受体阻滞剂 测定的性能数据，例如线性、检测限和定量限以及保留时间和峰 面积的精密度。</p>	5991-6437ZHCN	125

用于司法鉴定。

5 能源与化工应用			
5.1	<p>E7 液晶混合物的分析</p> <p>介绍了使用 SFC 与紫外检测定量分析 E7 液晶混合物中的化合物。实现了 2.25 分钟的运行时间，比通常使用的传统反相 HPLC 分离快约 20 倍。</p>	5991-6436ZHCN	132
5.2	<p>异丙甲草胺对映体过量的测定</p> <p>利用 Agilent ChemStation 方法筛选工具开发用于测定异丙甲草胺对映体过量的方法。采用该方法比较通过外消旋和立体选择性合成获得的立体异构体的比率。</p>	5991-5618ZHCN	137
5.3	<p>变性乙醇中烯烃含量的测定</p> <p>介绍了对变性乙醇中烯烃含量的测定。部署配备自动色谱柱切换的 SFC/FID 系统，该系统在检测线性和保留时间精密度方面符合 ASTM D7347-07 的要求。</p>	5991-7271ZHCN	142
5.4	<p>柴油燃料中芳烃含量的测定</p> <p>介绍了对柴油燃料中芳烃含量的测定。利用 SFC/FID 系统实现的准确度和线性符合 ASTM D5186 的要求，并提供了更快速、更经济有效的方案，以替代基于 HPLC 的方法 D1319 和 D2425。</p>	5991-5682ZHCN	152

第 1 章

AGILENT INFINITYLAB SFC 解决方案的性能特点



在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱

在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统中对 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 进行性能评估

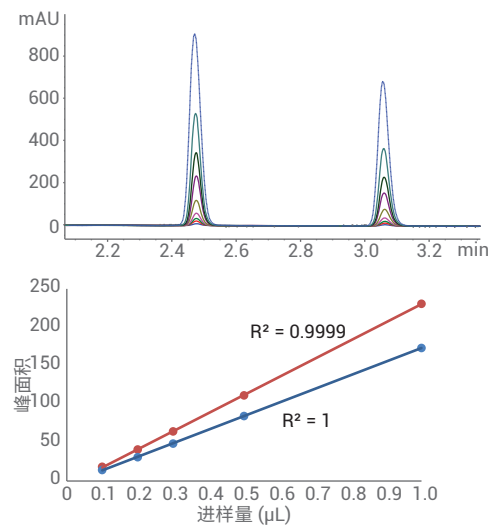
技术概述

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本技术概述展示了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的进样原理。在 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 中，在大气压条件下抽取样品，加压至系统压力，并通过超快速注射过程进样。数据表明，1260 Infinity II SFC Multisampler 能够在极高的精度下以灵活的样品体积进样，并在宽体积范围内具有优异的线性。



Agilent Technologies

前言

与经典 HPLC 仪器的可变样品引入（其中填充有流动相的进样流路可以不受影响地处于大气压下）相比，SFC 仪器必须避免在进样流路中使用环境压力下的流动相，以防止致密的 CO₂ 蒸发。进样流路中 CO₂ 的蒸发可能导致样品完全损失或进样不完全。因此，在 SFC 中首选固定定量环方法，该方法将之前填充的定量环切换至加压的 CO₂ 流中。虽然这种方法使满环进样获得了良好的峰面积精密度，但是它需要过量填充定量环，因此会浪费样品。当用于部分环填充时，需要复杂的操作，并且会牺牲精度性能。

本技术概述展示了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的进样原理。1260 Infinity II SFC Multisampler 相比于广泛使用的固定定量环方法（其中过量填充定量环导致样品浪费，而部分定量环进样导致进样精度不佳），能够在极高的精度下以灵活的样品体积进样。在 1260 Infinity II SFC Multisampler 中，在大气压条件下抽取样品，加压至系统压力，然后通过超快速注射过程进样至分析流路中。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)

仪器设置

1260 Infinity II SFC Multisampler 直接连接至 SFC 泵和下游色谱柱。通过工厂安装的管路完成所有必要的冲洗和清洗步骤。只需连接两种溶剂：一种溶剂用于冲洗和注入过程，另一种用于进样针清洗。

色谱柱

Agilent ZORBAX Rx-Sil,
4.6 × 150 mm, 5 μm

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3

样品

咖啡因和可可碱溶液（各自浓度均为 250 mg/L 的甲醇溶液），咖啡因溶液（0.5 g/100 mL 的甲醇溶液）以及可可碱溶液（250 mg/L 的甲醇溶液）。

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

结果与讨论

固定定量环方法作为最先进的技术被用于 SFC 仪器的进样。该方法能够在高精度下以固定体积进样，但是通过部分环填充进样的体积存在精度不佳的问题。无法使用在 HPLC 仪器进样中广泛应用的可变定量环概念，因为液态 CO₂ 不能处于大气压下。否则将由于蒸发而导致样品部分或完全损失。为克服这一缺点，在用于 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统的 1260 Infinity II SFC Multisampler 中推出了灵活的进样原理。

安捷伦的注入进样技术可提供加压样品，该样品通过注射过程在色谱柱之前被注入 CO₂ 流中。在抽取样品前，通过注入溶剂冲洗，对连接的定量环、针头和针座进行清洗，同时将 SFC 泵连接至色谱柱。在抽取灵活的样品体积后，在定量环中将样品加压至系统压力。包含样品的加压定量环连接至来自分析型 SFC 泵并流向色谱柱的 CO₂ 流。在该位置处，可通过注射过程以可变的进样速度（注入速度）对样品进样。为了将全部样品冲洗出定量环，可指定过量填充体积（灌注体积）。

SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	2.5 mL/min
等度洗脱	12% B
停止时间	6 分钟
梯度洗脱	4 分钟内 B 从 5% 升至 35%
停止时间	6 分钟
后运行时间	2 分钟
大体积进样的梯度	0–1 min 时 B 为 1% 1.1 min 时 B 为 5% 4 min 时 B 为 35%
停止时间	6 分钟
后运行时间	2 分钟
反压调节器 (BPR) 温度	60 °C
BPR 压力	130 bar
柱温	40 °C
进样量	0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 和 10.0 µL
大体积进样	10、20、30、40、50、60、70 和 80 µL
注入溶剂	甲醇
灌注体积	4 µL
注入速度	400 µL/min（最高进样量 10 µL），100 µL/min（用于 10 µL 以上的大体积进样）
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
检测	272 nm/带宽 4 nm；参比 360 nm/带宽 100 nm；标准高压 SFC 流通池；数据采集速率 10 Hz

由两个仪器参数控制进样：注入速度和灌洗体积。对于标准进样 (0.1–10 μL)，注入速度通常应高于 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (默认 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，最高达 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$) 以避免峰展宽。可能使用较低的注入速度，将进样捕集到初始等度步骤中。由于可能发生样品损失，因此灌洗体积不应低于 2 μL (默认 4 μL)。可使用较高的值以冲洗出粘性化合物或包含复杂基质的样品。这些参数对色谱性能的影响在另一篇安捷伦技术概述中有更详细的讨论¹。

为确定 1260 Infinity II SFC Multisampler 的性能，在 0.1 μL 至 10.0 μL 的进样量范围内，在等度和梯度洗脱条件下对进样线性和峰面积精度进行测定 (图 1、2 和 3)。在两组实验中，采用默认的灌洗体积和注入速度 (参见方法)。这样可确保样品快速进样至 CO_2 流中，并保证样品从进样定量环中完全冲洗出来。在等度条件下，两种化合物得到完全分离，并且在 0.1–10.0 μL 的所有进样量下均获得了优异的峰形 (图 1A)。计算不同进样

量范围内的进样线性：0.1–10.0 μL 、0.1–1.0 μL 和 1.0–10.0 μL 。在所有情况下，均获得了优异的进样线性，所分析的两种化合物的 $R^2 > 0.9995$ (图 1B 至 1D)。梯度分离的结果也表明，在 0.1 μL 至最高达 10.0 μL 的所有测试的进样量下均获得了优异的峰形 (图 2A)。在 0.1–10.0 μL 、0.1–1.0 μL 和 1.0–10.0 μL 的所有测试的进样量范围内，两种化合物的进样线性均非常优异， $R^2 > 0.9999$ (图 2B 至 2D)。

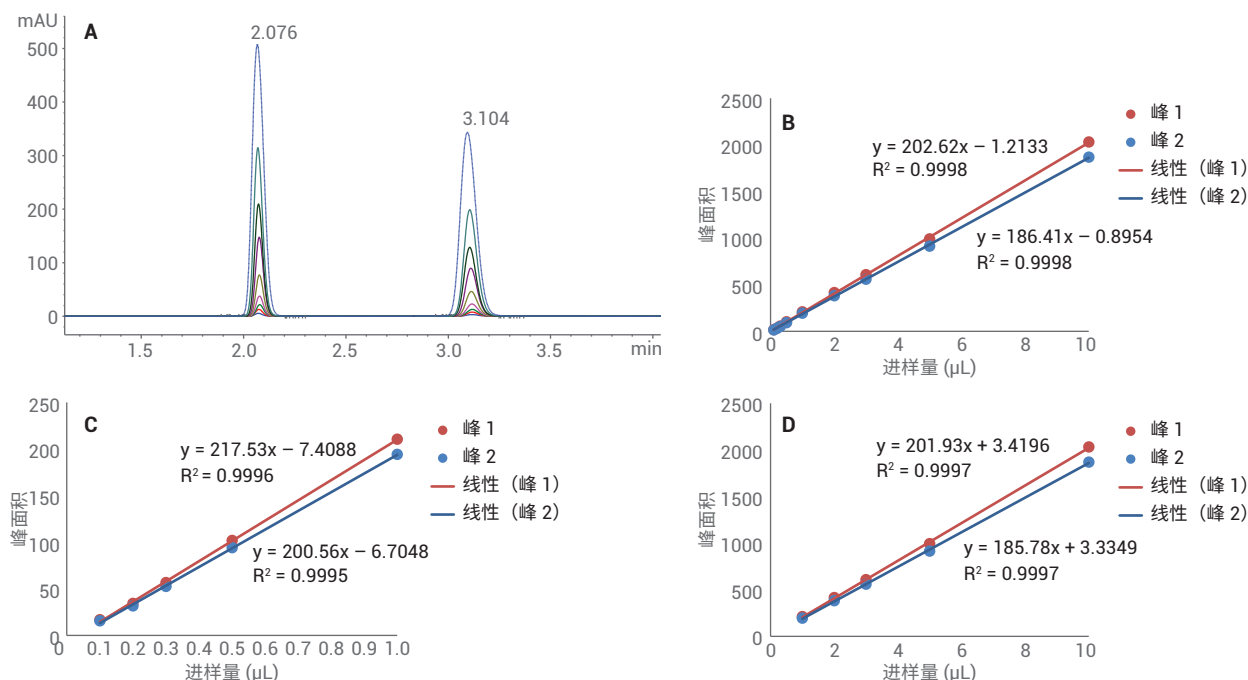


图 1. 在等度洗脱条件下得到的峰 1 和峰 2 的进样线性。A) 等度分离色谱图。峰 1：咖啡因，2.076 分钟。峰 2：可可碱，3.104 分钟。进样量：0.1–10.0 μL 。B) 0.1–10 μL 进样量范围内的线性。C) 0.1–1.0 μL 进样量范围内的线性。D) 1.0–10 μL 进样量范围内的线性。 R^2 通常高于 0.9995

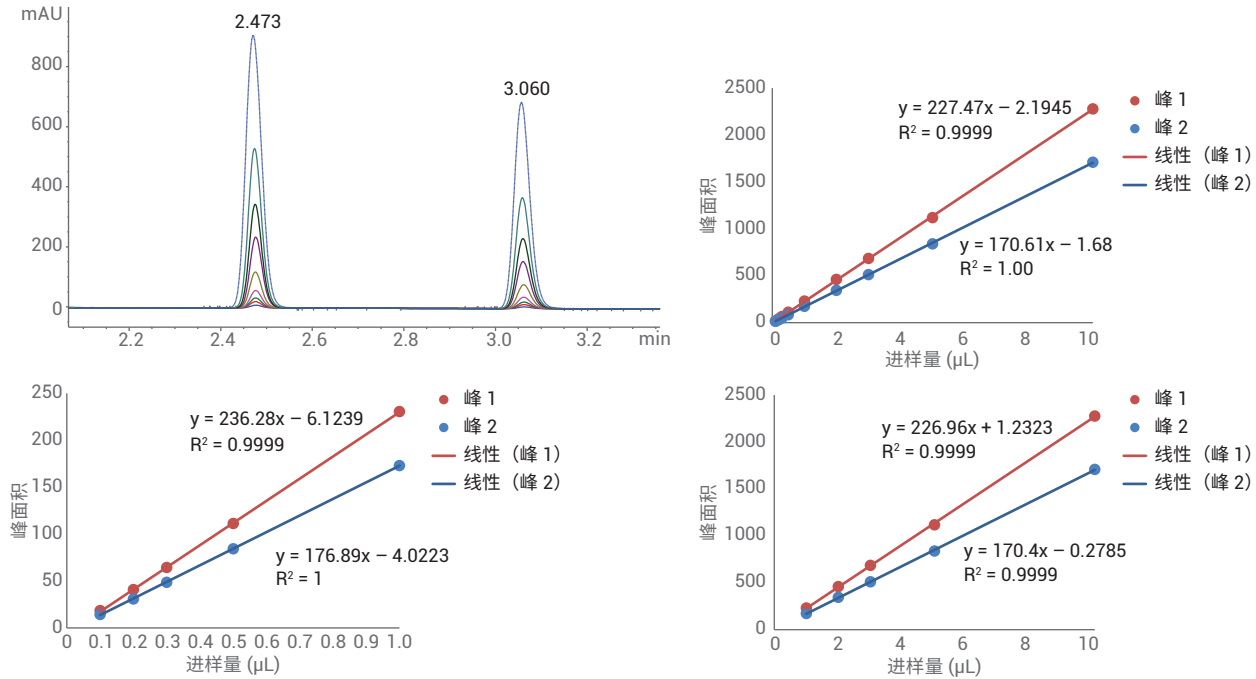


图 2. 在梯度洗脱条件下得到的峰 1 和峰 2 的进样线性。A) 梯度分离色谱图。峰 1：咖啡因，2.473 分钟。峰 2：可可碱，3.060 分钟。进样量 0.1–10.0 µL。B) 0.1–10 µL 进样量范围内的线性。C) 0.1–1.0 µL 进样量范围内的线性。D) 1.0–10 µL 进样量范围内的线性。R² 通常高于 0.9999

在等度和梯度实验中，通过 10 次重复测定的结果来计算所有进样量下的峰面积 RSD 值（图 3）。对于两种化合物，等度分离的峰面积 RSD 从最低进样量 (0.1 µL) 的 3.0%–3.5% 开始（图 3A），而梯度分离的峰面积 RSD 从最低进样量 (0.1 µL) 的 2.0%–2.5% 开始（图 3B）。在两种情况下，当进样量增加至高于 0.5 µL 后，RSD 值均降至 0.3% 及更低。对于所有更高的进样量（最长达 10.0 µL），RSD 值保持在 0.3% 以下。

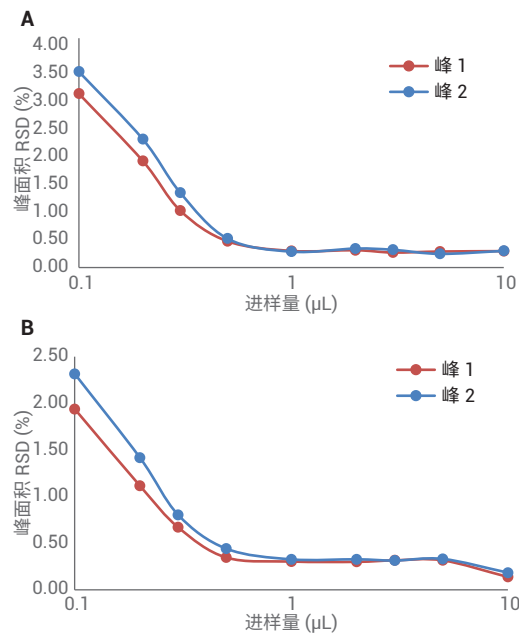


图 3. 在 A) 等度和 B) 梯度分离条件下，采用 0.1–10 µL 的进样量得到的峰 1 和峰 2 的峰面积 RSD

在最高达 10 μL 的进样范围之外，SFC Multisampler 还能支持更大的进样量。为此，它安装有 100 μL 样品定量环。从 100 μL 定量环体积中减去所使用的灌洗体积，即可计算出可进样的样品体积。为证明这一能力，将可可碱溶液（250 mg/L 的甲醇溶液）的进样量从 10 μL 提高至 80 μL 。将大体积甲醇溶液样品（它是一种

强洗脱溶剂）缓慢进样至 CO_2 流中（100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）。完成注入过程后，将改性剂浓度从 1% 快速提高至 5%，并启动洗脱梯度。可可碱的峰高和峰宽随进样量的增加而增加（图 4）。采用较高的进样量时，峰高未大幅增加，但是随着峰宽的增加，峰面积呈线性增加（参见图 4 中的表格）。进样量与峰面积之间表现出优异的线性相关

性，相关系数高达 0.9999（图 4B）。半峰高处的峰宽从 10 μL 进样量下的 0.04 分钟增加至 80 μL 进样量下同样可接受的 0.1 分钟，表明在所有进样量下均获得了对称的峰形（参见图 4 中的表格）。根据所有进样量下的峰面积计算相对标准偏差，得到了优异的峰面积 RSD，其值通常为 0.3% 或更低（图 4C）。

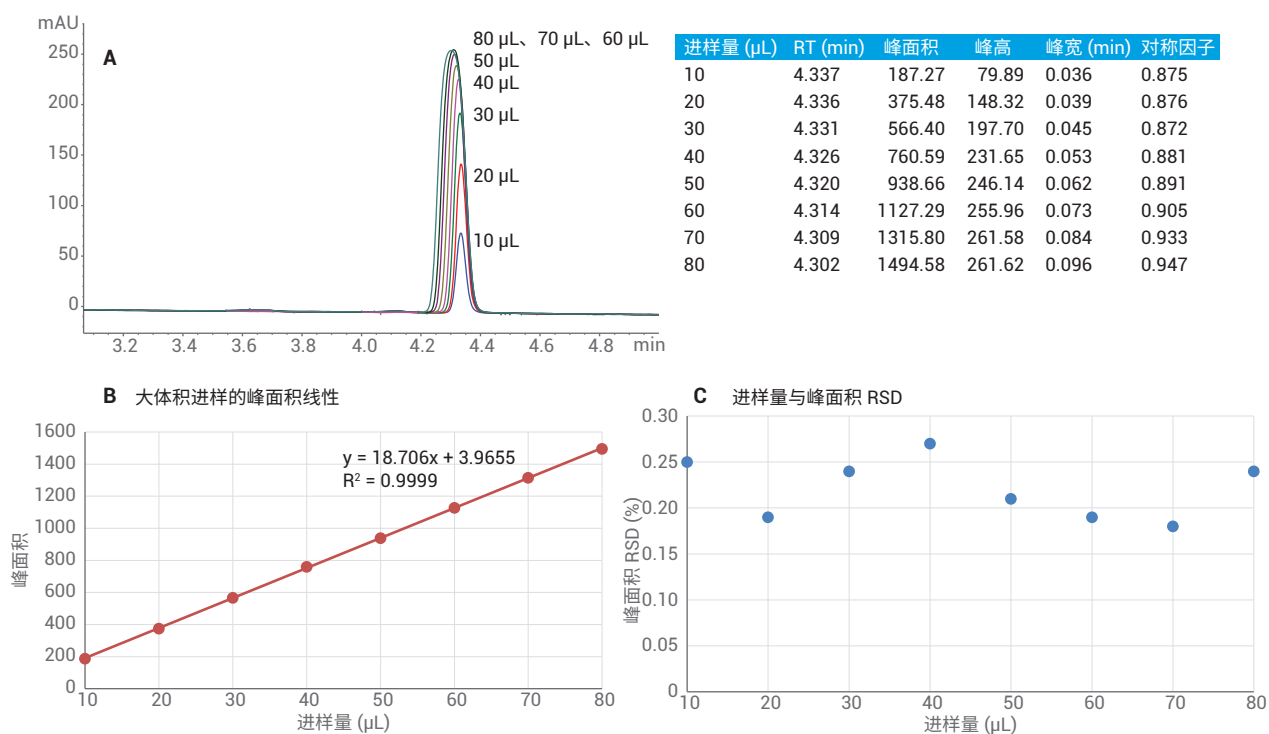


图 4. 大体积进样结果

- A) 在进样量为 10–80 μL 的条件下获得的样品的叠加色谱图
 B) 采用大体积进样获得的峰面积线性， $R^2 = 0.9999$
 C) 在每种大体积进样量下，由 10 次重复进样的结果计算出的峰面积 RSD (%)
 表) 在大体积进样条件下测得的所有参数汇总

最后，考察了进样分析高浓度咖啡因样品（5 g/L 的甲醇溶液，进样量 5 μ L）所引起的 1260 Infinity II SFC Multisampler 的交叉污染行为。通过高浓度咖啡因样品进样后的首次空白进样来测定交叉污染。按照与高浓度咖啡因的峰面积相比的峰面积百分比计算得出的交叉污染为 0.0014%（14 ppm）。在高浓度咖啡因样品进样后的第二次空白进样中未检测到交叉污染（图 5）。

结论

本技术概述讨论了在极高精度下具有灵活进样量的 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的性能结果。在进样量 0.5 μ L 和 10 μ L 之间获得的峰面积 RSD 通常低于 0.3%。即使采用更低的进样量（低至 0.1 μ L），也获得了通常低于 2.5% 的峰面积 RSD。结果证明，进样线性通常优于 0.9995。即使对于高达 80 μ L 的进样量，也可获得低于 0.3% 的优异的峰面积 RSD 值。采用大体积进样所获得的峰面积线性也极其出色。灵活的样品引入仅表现出 14 ppm 的可忽略不计的交叉污染。这一性能与通常使用的满环模式下的固定定量环自动进样器的性能相当，但是具有可变量环自动进样器的高灵活性。

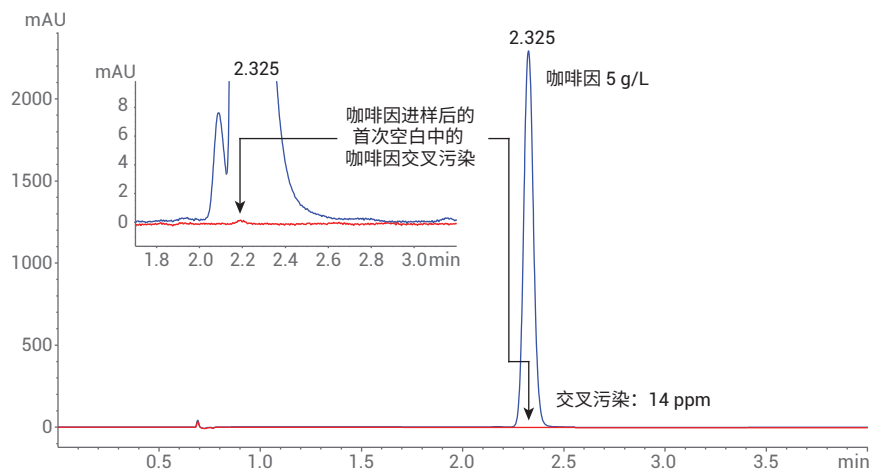


图 5. 通过进样高浓度咖啡因样品（5 g/L 的甲醇溶液，进样量 5 μ L）测定 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的交叉污染。通过高浓度咖啡因样品进样后的首次空白进样来测定交叉污染。在高浓度咖啡因样品进样后的第二次空白进样中未检测到交叉污染。由于咖啡因的进样量达到检测器的非线性范围，因此通过从小体积进样的结果外推来计算 5 μ L 进样量下正确的峰面积

参考文献

1. Naegele, E. 注入速度和灌注体积 — SFC 的新进样参数, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-7626ZH-CN, 2017

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

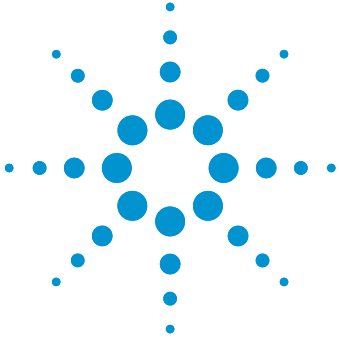
在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-7623ZH-CN



注入速度和灌洗体积

超临界流体色谱的新进样参数

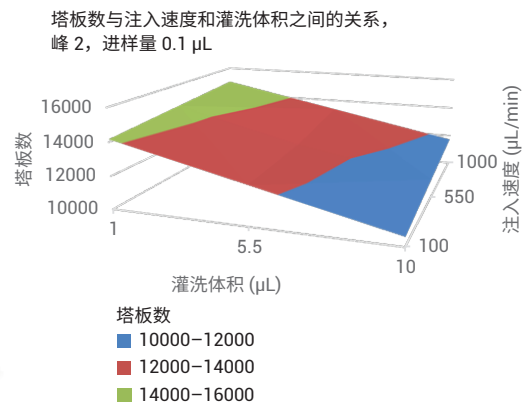
技术概述

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本技术概述展示并讨论了注入速度和灌洗体积这两个进样参数对色谱分离度的影响。这些参数由 Agilent 1260 Infinity II 超临界流体色谱 (SFC) Multisampler 引入。展示了在分析型 SFC 中常用的不同进样量下，它们对紧邻洗脱的化合物的等度分离的影响，并提供了优化指南。



Agilent Technologies

前言

Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 为 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统提供了灵活的进样量¹。1260 Infinity II SFC Multisampler 支持的样品体积范围从可能的 0.1 µL 进样量开始。由于 1260 Infinity II SFC Multisampler 具有 100 µL 的样品定量环，因此能够支持更大的进样量。根据 1260 Infinity II SFC Multisampler 的进样原理，引入两个额外的进样参数，即注入速度和灌洗体积。注入速度等于样品引入的速度，而灌洗体积是添加到样品栓末尾的冲洗体积。

本技术概述展示并讨论了在不同注入速度和灌洗体积值下采用不同的样品体积进样所获得的色谱结果。展示了所获得的等度分离结果，并讨论了线性和峰面积精密度等性能参数。根据所得结果，提供了指南和默认参数。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)

仪器设置

1260 Infinity II SFC Multisampler 直接连接至 SFC 泵和色谱柱。通过工厂安装的管路完成所有必要的冲洗和清洗步骤。只需连接两种溶剂：一种溶剂用于冲洗和注入过程，另一种用于进样针清洗。

色谱柱

Agilent ZORBAX RX-SIL, 4.6 × 150 mm, 5 µm (部件号 883975-901)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3

SFC 方法

参数	描述
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	2.5 mL/min
等度洗脱	12% B 停止时间：6 分钟
反压调节器 (BPR)	60 °C, 130 bar
柱温	40 °C
进样量	0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 µL
注入溶剂	甲醇
灌洗体积	4、3、2、1、0 µL
注入速度	1000、400、200、100、50 µL/min
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
二极管阵列检测器	254 nm/4 nm；参比 360 nm/100 nm， 数据采集速率：10 Hz，标准高压 SFC 流通池

样品

SFC 校验标样 (部件号 5190-0584)，包含茶碱、咖啡因、胸腺嘧啶和可可碱 (250 µg/mL 的甲醇溶液)

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。

结果与讨论

注入进样技术可提供加压样品，该样品通过注射过程在色谱柱之前被注入流动相流中¹。由两个仪器参数控制进样：注入速度和灌洗体积。注入速度可以被描述为注射器将样品注入流动相流中的速度。灌洗体积是在样品之后注入的溶剂栓，以完全冲洗出样品。两个参数都会影响色谱分析。

在不同进样量下，注入速度对分离的影响

测试了注入速度对色谱分析的影响。采用了分析工作中常用的进样量范围 (0.1–10.0 μL)、各种注入速度值 (1000、400、200、100 和

50 $\mu\text{L}/\text{min}$) 和恒定的灌洗体积 (4 μL)。采用实验部分所述的等度分离方法得到的分离结果表明，测试样品中的四种化合物得到清晰的分离 (图 1A–D)。

0.1、1.0、5.0 和 10.0 μL 的进样量作为示例示出。在高达 5 μL 的进样量下，色谱峰得到基线分离 (图 1C)，在最高进样量 10.0 μL 下，这些色谱峰开始形成峰谷 (图 1D)。针对整个进样量范围内所采用的设置，测定进样线性 (图 2) 以作为性能指标。

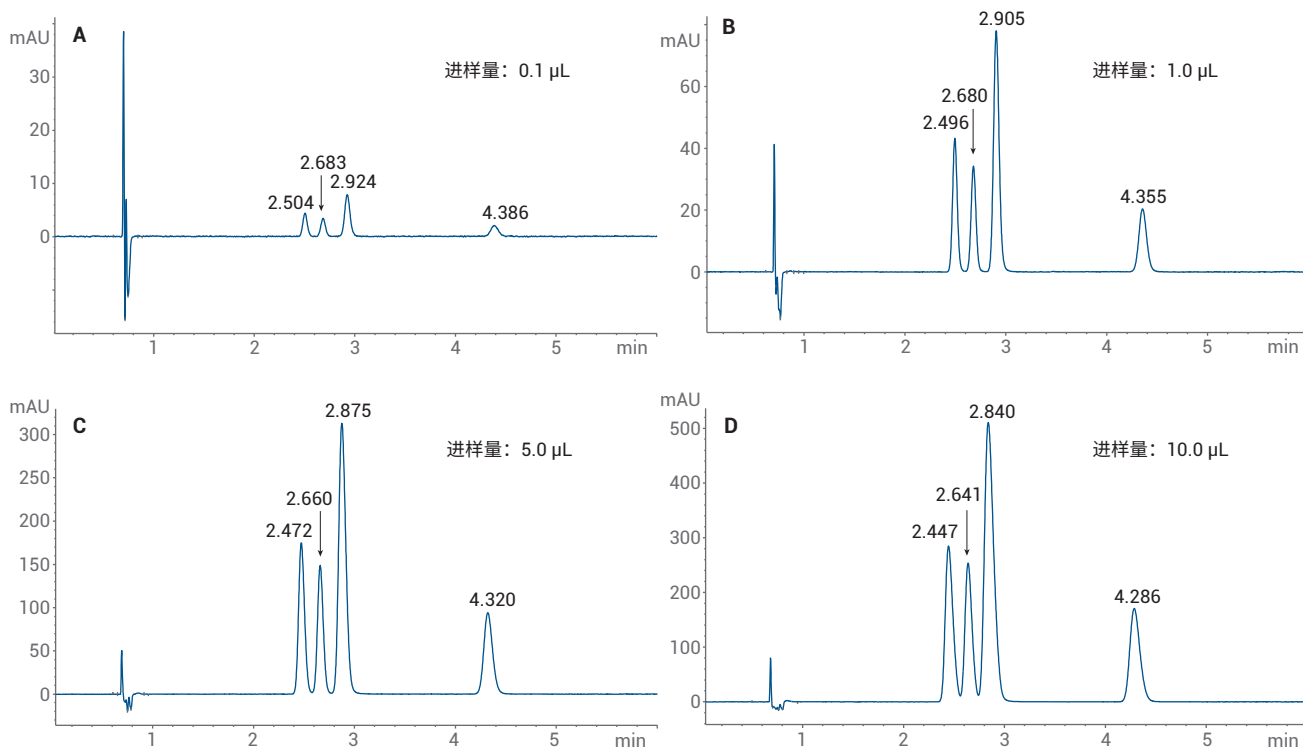


图 1. 在 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度和 4 μL 的灌洗体积下，采用不同的进样量获得的结果：A) 0.1 μL ，B) 1.0 μL ，C) 5.0 μL ，D) 10.0 μL

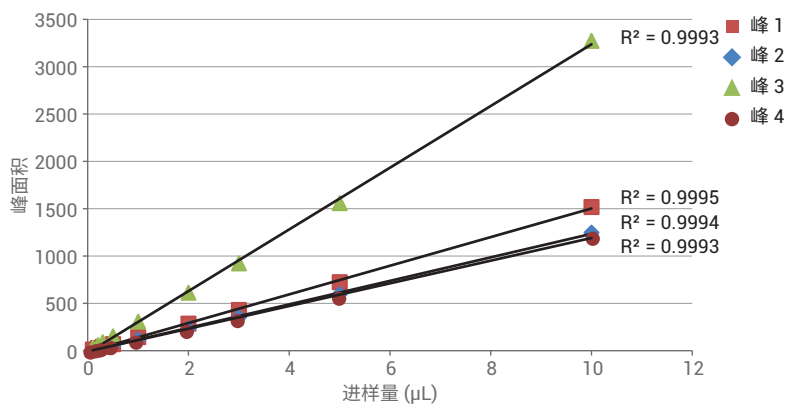


图 2. 在 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度和 4 μL 的灌洗体积下，化合物 1 至 4 的进样量线性

所有色谱峰在整个进样量范围内均表现出优异的线性， R^2 通常高于 0.999。在每种进样量下多次进样以测定峰面积的相对标准偏差 (RSD)，并作为另一项性能指标。通常，峰面积 RSD 从最低进样量 (0.1 μL) 时的 3.0%–3.5% 开始，并在进样量高于 0.5 μL 时降至 0.3% 或更小。对于所有更高的进样量 (最高达 10.0 μL)，RSD 值保持在

0.3% 或更小。有关详细讨论，请参见安捷伦技术概述¹。

在进一步的实验中，我们评估了与最大可进样的样品体积相关的注入速度限制，并减小了注入速度。图 3 显示了在等度分离条件下，注入速度相对于进样量减小时所产生的色谱性能限制。在 10 μL 的进样量和 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度下，前三个峰开始出现共

洗脱。当进样量为 5 μL 及更低时，这些峰仍得以分离 (图 3, A1 和 A2)。在 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度下，当进样量为 5 μL 时开始发生共洗脱。当进样量为 3 μL 及更低时，分离度得以保持 (图 3, B1 和 B2)。比较结果表明，在 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的最低注入速度下，当进样量为 3 μL 时发生共洗脱，在进样量为 1 μL 及更低时获得了良好的分离度 (图 3, C1 和 C2)。

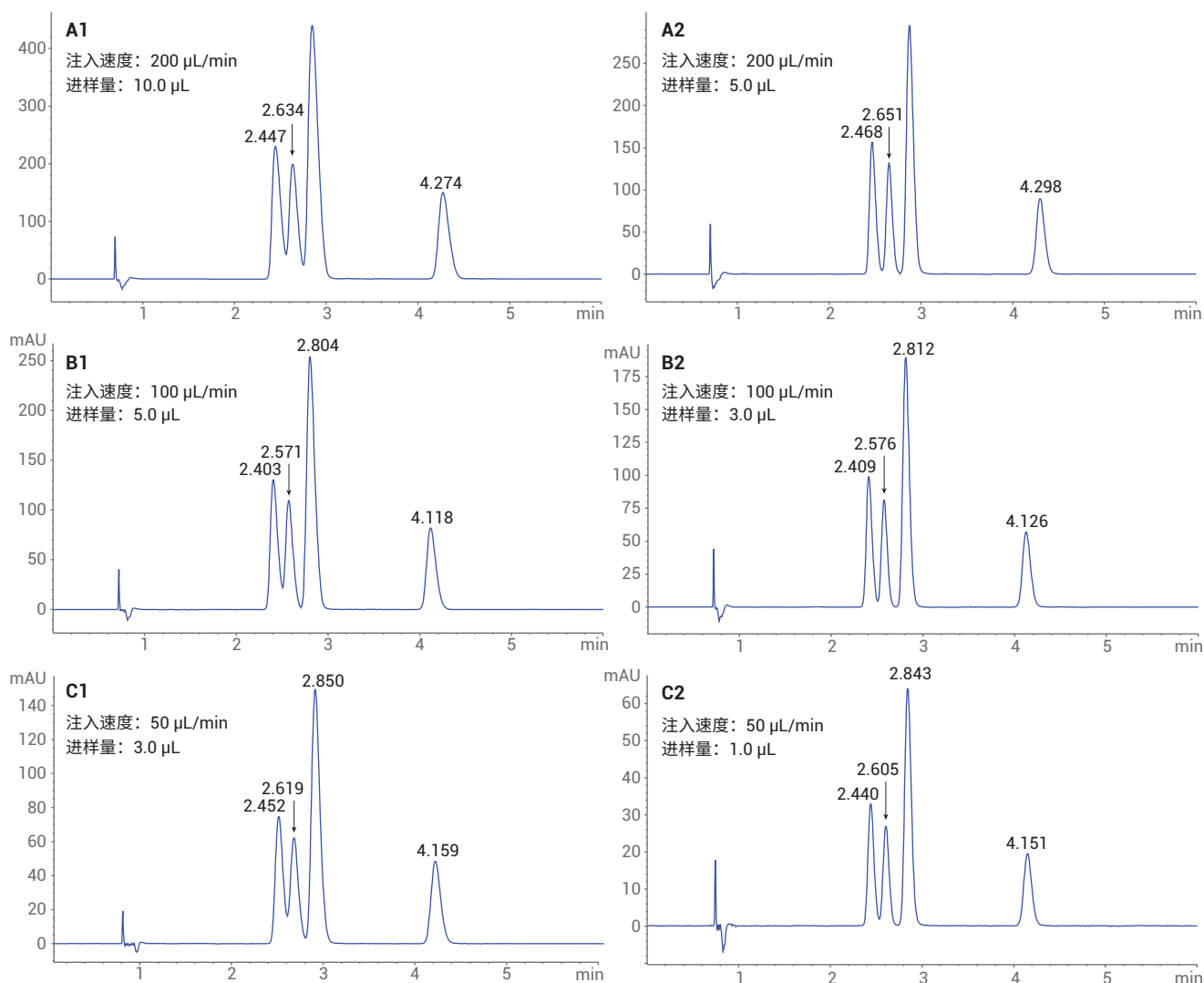


图 3. 在等度分离条件下，色谱性能限制取决于注入速度和进样量。A) 在 10 μL 的进样量和 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度下，前三个峰开始出现共洗脱 (A1)。当进样量为 5 μL 时，这些峰仍得以分离 (A2)。B) 在 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度下，当进样量为 5 μL 时开始发生共洗脱 (B1)，而在 3 μL 的进样量下分离度仍能得以保持 (B2)。C) 比较结果表明，在 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的最低注入速度下，当进样量为 3 μL 时开始发生共洗脱 (C1)，而在进样量为 1 μL 时获得了良好的分离度 (C2)。

根据在所有实验条件下所采用的注入速度（表 1），确定了 0.1 μL 至最大进样量范围内的进样线性。

所获得的进样线性通常优于 0.9995。如果在线性计算中包括较高的进样量，将观察到 R^2 值有所降低，这是因为色谱分离效果下降，如图 3 所示。

定量分析的另一个重要值是峰面积 RSD。当实验采用较高注入速度时，在进样量高于 0.5 μL 时，峰面积 RSD 下降至 0.3% 或更小。图 4 给出的示例为 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的低注入速度下，进样量从低至 0.1 μL 到最高 2 μL 时所获得的结果。

在所述的全部实验中，峰 4 不受其他化合物共洗脱效应的影响，因为它洗脱时间较晚且与其他峰间隔较远。因此，该峰可用于考察不同进样量下注入速度对典型峰参数的影响。例如，在固定进样量下，峰高随注入速度减小而大幅降低，采用大体积进样时此现象尤为明显（图 5）。

当注入速度为 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时，峰高分别在进样量高于 3 μL 和 5 μL 时开始受到影响。相反，当注入速度高于 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时，峰高无进一步改善，意味着峰展宽效应较小。

表 1. 在 0.1 μL 至最大进样量范围内，进样线性取决于所采用的注入速度

注入速度 ($\mu\text{L}/\text{min}$) 和最大进样量 (μL)	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4
500/10	0.9995	0.9994	0.9993	0.9993
200/5	1.0000	0.9999	0.9998	0.9997
100/3	0.9999	0.9999	1.0000	1.0000
50/1	0.9998	0.9998	1.0000	1.0000

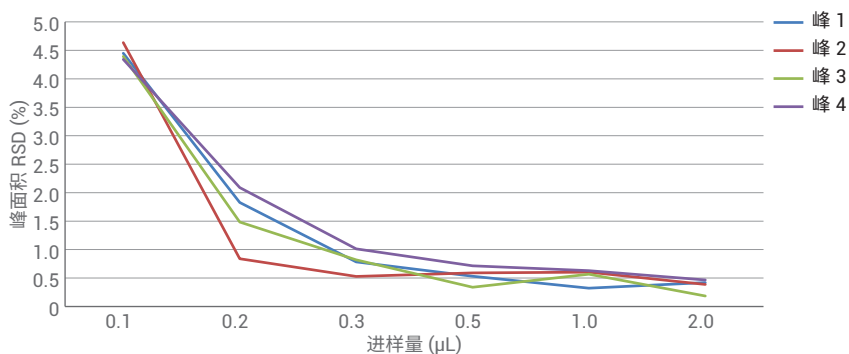


图 4. 在 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度下，0.1–2 μL 进样量范围内的峰面积 RSD 值

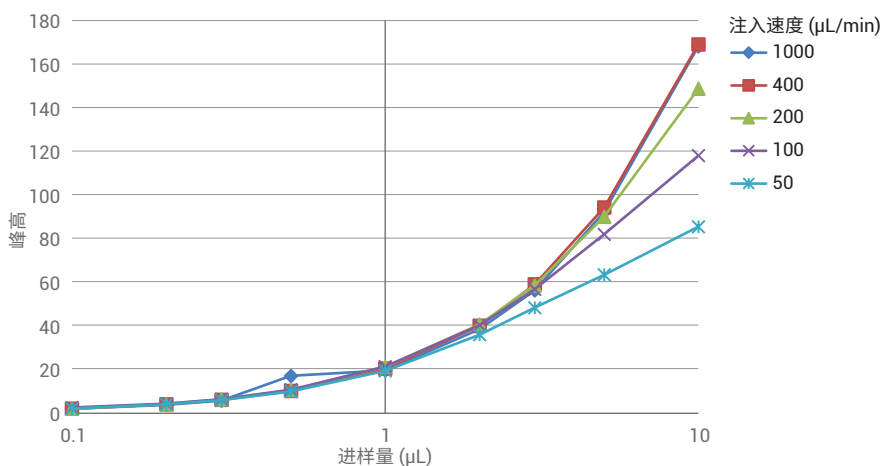


图 5. 峰 4 的峰高与不同进样量下采用的注入速度之间的关系

图 6 为对比图，展示了不同注入速度下，峰宽随进样量增加而增加。在较低进样量（最高 0.5 μL ）条件下，峰宽不断增加，但几乎与注入速度无关。在较高进样量条件下，当进样量高于 2 μL 和 5 μL 且注入速度分别为较低的 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时，峰宽大幅增加。在 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的较高注入速度下，进样量对峰宽的影响几乎相同。

作为最后一个峰参数，我们讨论了峰对称性（图 7）。对于低进样量，采用不同注入速度得到的峰对称性通常为 0.9 左右。对于高进样量，对称性值开始降低，意味着峰开始拖尾，采用较低的注入速度时尤其如此。

在不同进样量下，灌洗体积对分离的影响

第二个参数，即灌洗体积，可确保全部样品都从定量环毛细管转移至色谱柱。进行小样品体积进样时，足够的灌洗体积对于避免样品损失尤为重要（图 8）。

例如，采用 4 μL 的灌洗体积能够将 0.1 μL 的样品体积完全转移至色谱柱。作为一个极端的例子，也可能在不采用任何灌洗体积的情况下进行小体积进样，但是样品会发生部分损失。图 9 显示了整个测试范围内进样量和灌洗体积间的结果。

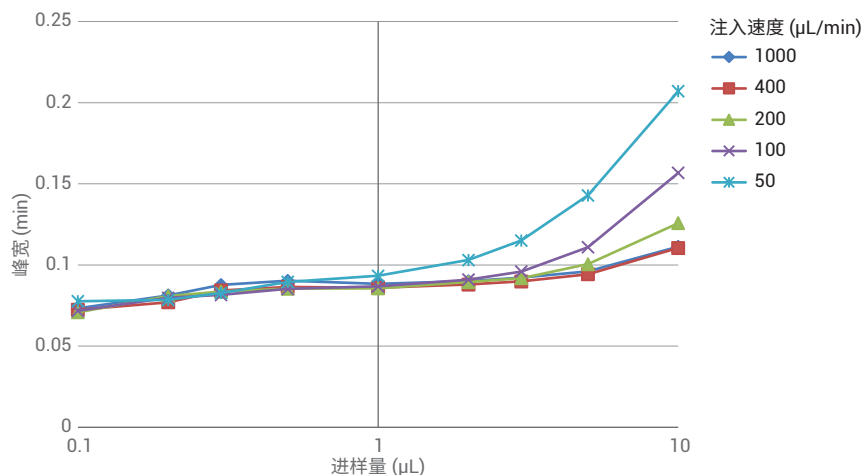


图 6. 峰 4 的峰宽与不同进样量下采用的注入速度之间的关系

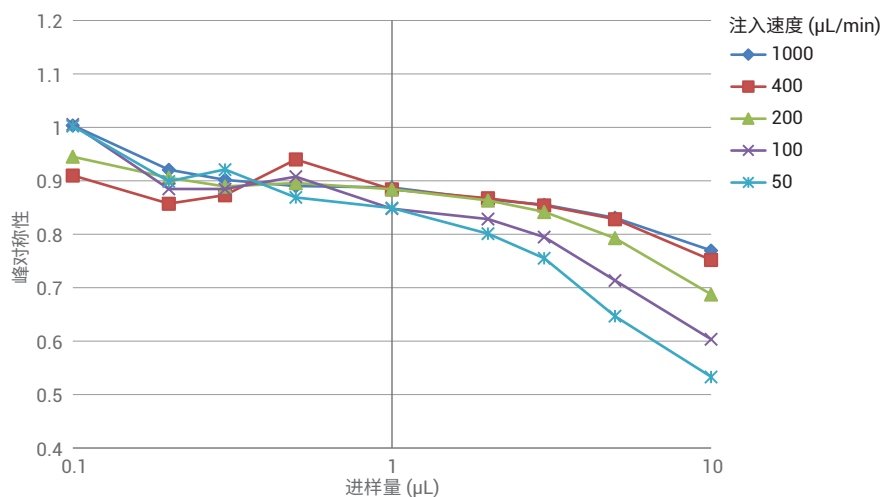


图 7. 峰 4 的峰对称性与不同进样量下采用的注入速度之间的关系

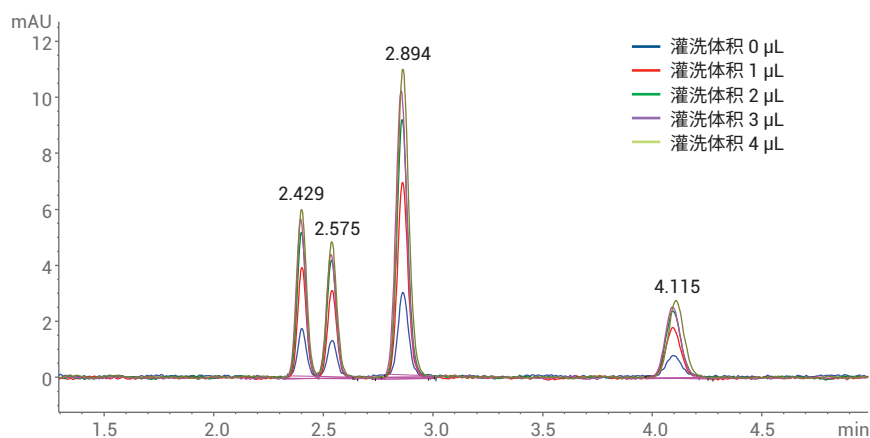


图 8. 进样量为 0.1 μL 时，灌洗体积对样品引入的影响

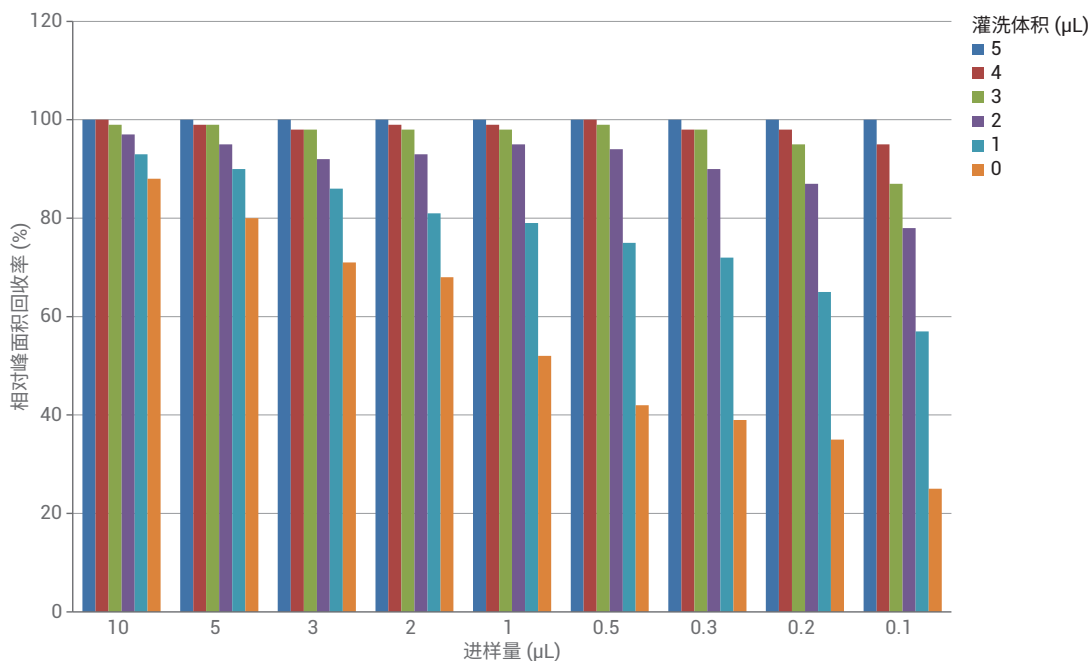


图 9. 不同进样量下，灌洗体积对样品引入的影响对比。展示了在不同灌洗体积下获得的峰 4 的相对峰面积回收率。利用在 5 μL 灌洗体积下获得的峰面积作为基础，并假定此时样品完全转移至洗脱液中并到达色谱柱

从图中可以看出，在 0.1 μL 的最低进样量和无灌洗体积条件下，仅检测到大约 20% 的较小的峰面积。在不采用灌洗体积时，当进样量增加至 10 μL 时，检测到的峰面积提高至 90% 左右。采用 4 μL 的灌洗体积，能够将小体积样品转移至溶剂流中。采用 3 μL 和 4 μL 的灌洗体积，可确保在整个进样量范围内获得良好的样品转移率。利用 5 μL 的灌洗体积作为此处计算的基础。相比于 5 μL 的灌洗体积，采用 4 μL 的灌洗体积通常可以获得高于 98% 的回收率。

注入速度、灌洗体积和进样量对以色谱塔板数表示的色谱性能的综合影响

建立实验设计 (DOE) 矩阵，以证明注入速度、灌洗体积和进样量参数对色谱性能的综合影响。综合影响以色谱塔板数的形式表示。该 DOE 矩阵是基于本技术概述中前面部分所述的结果。采用 100 μL/min 和 1000 μL/min 分别作为该 DOE 矩阵中注入速度范围的下限和上限。对于灌洗体积，则采用 1 μL 和 10 μL 分别作为其下限和上限，并分别与注入速度值进行组合。此外，创建了一种采用 550 μL/min 中点注入速度和 5.5 μL 中点灌洗体积的方法。将所得的五种方法（所用的其他方法参数如实验部分所述）与 0.1 μL、5.05 μL 和 10 μL 进样量相结合。

将这些方法组成一个序列，其中从一次运行到下一次运行时，通常所有参数都会改变。在该序列中应用三次中点方法，从而得到 17 个序列行，其中每个运行都重复 10 次。利用咖啡因和可可碱混合物（250 mg/L 的甲醇溶液）作为测试样品。咖啡因洗脱的 k' 约为 2，可可碱洗脱的 k' 约为 4。图 10 汇总了结果的 3D 图。

例如，在图 10-A1 中，可以看出 0.1 μL 的最低进样量下不同参数的一般性影响。在最大注入速度和最低灌洗体积下，获得了最多的塔板数。塔板数通常随注入速度降低而减少，相反，塔板数随灌洗体积的减小而增加。后洗脱的峰表现出相同的行为，但塔板数更少（图 10-A2）。对于更高的进样量，在相同的注入速度和灌洗体积条

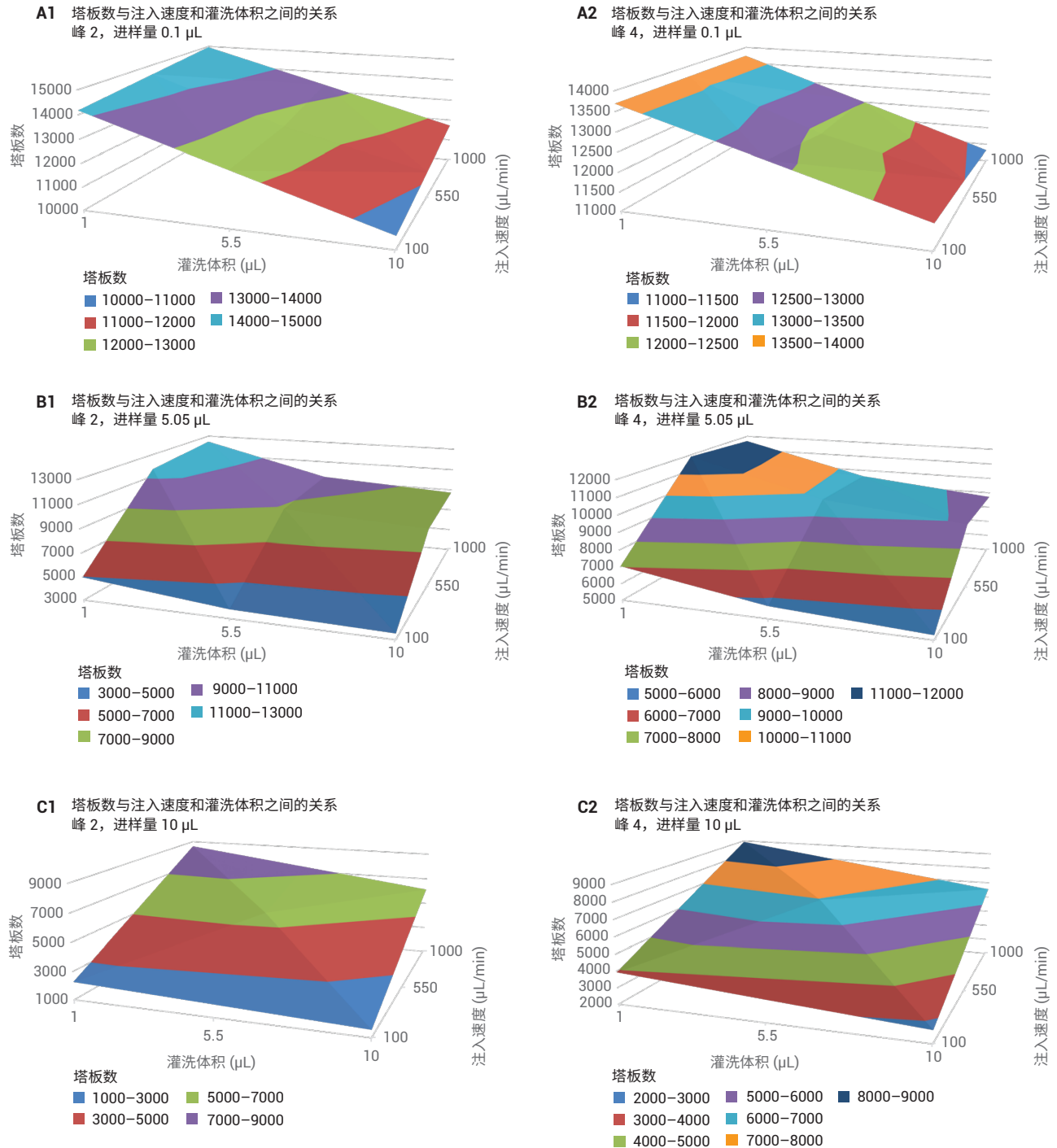


图 10. 在注入速度、灌洗体积和进样量的 DOE 空间图中, 以色谱塔板数表示的色谱性能比较。采用两种化合物作为示例, 即咖啡因 (峰 2, $k' = 2$) 和可可碱 (峰 4, $k' = 4$)。注入速度范围: 100–1000 $\mu\text{L}/\text{min}$, 灌洗体积范围: 1–10 μL , 中点: 注入速度 550 $\mu\text{L}/\text{min}$, 灌洗体积 5.05 μL 。A) 进样量 0.1 μL 。B) 进样量 5.05 μL 。C) 进样量 10 μL (所示颜色表示具有共同塔板数范围的区域)

件下，获得的塔板数更少。当注入速度降至 550 $\mu\text{L}/\text{min}$ 以下时，这一效应更占据了主导地位（图 10-B1 和 10-B2）。当进样量为 10 μL 时，两个峰表现出相同的行为，但塔板数更少（图 10-C1 和 10-C2）。从这些寻求最佳色谱性能的实验中，可以得出以下结论：如果分离条件处于 3D 图的左上部，则可以获得更高的色谱性能。这意味着注入速度通常应高于 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，且应采用较低的灌洗体积。如前文所述，在 0.1–10 μL 的进样量范围内，最佳灌洗体积应当为 3–4 μL 。在较低的进样量（最高 5 μL ）下，以塔板数为指标的色谱性能更出色。考虑到前文所述的峰面积 RSD，进样量应介于 0.5 μL 和 5 μL 之间。

总结

在前文所述的实验中获得的结果针对的是等度分离。等度洗脱表现出比梯度洗脱更明显的效应。在梯度洗脱中，化合物通常聚集于色谱柱前端，随后在梯度中开始洗脱。通常，等度洗脱在主要的 SFC 应用（对映异构体的分离）中具有重要作用²。根据实验结果，建议采用 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的注入速度和 4 μL 的灌洗体积作为这些参数的起始值。若进行大体积进样，且必须在色谱柱前端进行初始富集¹，则采用较低的注入速度将非常有用。

如果样品中包含粘性化合物或高浓度污染性基质，则可以采用较高的灌洗体积。

结论

本技术概述介绍了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 所采用的注入速度和灌洗体积对色谱性能的影响。通过一系列实验结果对这些参数的建议默认值进行了解释说明。证明了使用这些建议的参数值能够使 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 实现最佳的色谱性能。

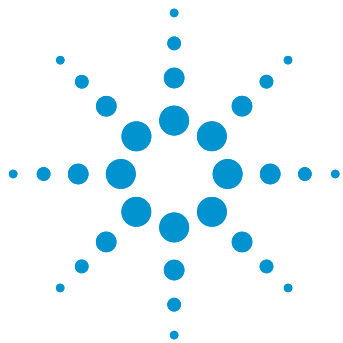
参考文献

1. Naegele, E. 在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱，*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5991-7623ZHCN，2017
2. Naegele, E. 在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统上进行手性多色谱柱方法开发，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-7624ZHCN，2017

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-7626ZHCN



利用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统加快无改性剂的 SFC 分离速度

使用反压和流速梯度聚焦后洗脱化合物

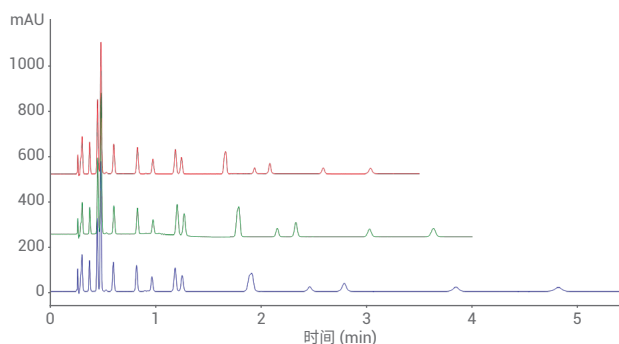
技术概述

作者

Matthias Kamuf, Andreas Borowiak, Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

超临界流体色谱 (SFC) 涵盖各种分析物极性和应用范围。例如, SFC 使用专门的 CO₂ 实现对高疏水性化合物的无改性剂分离, 这使得 SFC 成为一项真正的绿色分离技术。相反, 有一个普遍现象是, 等度分离可能由于各种谱带展宽过程导致后洗脱化合物的峰展宽。本技术概述介绍了在采用纯 CO₂ 进行分离时使用流速梯度和反压梯度聚焦后洗脱化合物, 同时保持对早洗脱分析物的分离能力。使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统的整个压力范围, 能够大幅缩短运行时间并显著改善峰形。



Agilent Technologies

前言

SFC 是一种通用的色谱技术，其应用已在各种分析物极性和应用领域中得到证明。这些应用涵盖广泛，例如用纯 CO₂ 分离饱和烃和芳烃¹，或用强洗脱改性剂分离小分子肽²，有时甚至还含有少量的水。有关 SFC 应用的完整概述，请参见《安捷伦 SFC 基础导论》³。

使用无改性剂的方法（避免使用有机溶剂）分离疏水性化合物的可能性，使 SFC 成为一种真正的绿色分离技术，特别是因为 CO₂ 符合 Capello 先前提出的“绿色溶剂”的定义⁴。纯 CO₂ 的分离问题在于它们的等度性质，各种谱带展宽过程通常会导致后洗脱化合物出现峰展宽。在 SFC 中，可以采用反压和流速梯度来影响系统压力和 SFC 色谱柱的压降，并提高流动相的洗脱强度，进而显著缩短运行时间，尤其是对于后洗脱的化合物。系统压力可能会影响反相液相色谱分离的保留特性，甚至影响选择性⁵。流速和压力对 SFC 的关键色谱参数影响更大，因为它们也会改变超临界 CO₂ 的粘度和密度⁶。SFC 中这些色谱参数的相互作用尚不完全清楚。压力和流速梯度也可以在梯度运行中使用改性剂，以微调保留特性和选择性。由于增加反压会导致系统压力成比例升高，因此，更大的系统压力范围（在最高 5 mL/min 的流速下压力上限可达 600 bar）将有利于采用反压或流速梯度进行快速分离。

为考察反压和流速梯度的影响，使用包含 16 种多环芳烃 (PAH) 的混合物。之前利用 SFC 并使用含有特定百分比水含量的甲醇作为改性剂，对该混合物进行了分离⁷。PAH 存在于煤和原油中，或者在含碳材料的不完全燃烧过程中形成，导致其大量存在于环境中。因此，PAH 被美国国家环境保护局 (EPA) 列为首要污染物。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)，配备高压 SFC 流通池

等度分离方法

参数	值
SFC 流速	2.5 mL/min
流动相	100% CO ₂
柱温	40 °C
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	150 bar
总运行时间	5.5 分钟；无后运行时间
进样量	1.0 µL
注入速度	1000 µL/min
灌洗体积	4.0 µL
注入溶剂	MTBE
进样针清洗	使用 MTBE 清洗 3 s
二极管阵列检测器	全谱，数据采集速率 20 Hz，狭缝宽度 8 nm，波长 223 ± 4 nm，参比 360 ± 100 nm

- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，带有四色谱柱选择阀 (G4237A)

仪器设置

所用的设置为安装有四色谱柱选择阀的 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统的推荐配置。本技术概述未使用任何特殊改进或模块。反压梯度也适用于进行了固件升级 (A/B/C/D 07.13 或更高版本) 和驱动程序更新 (A.02.16 或更高版本) 的旧版控制模块。

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3
- 安捷伦液相色谱驱动程序包 A.02.16
- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块，固件版本 07.20

色谱柱

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 µm (部件号 693975-302(T))

采用反压梯度的 SFC 分离方法

- 初始等度分离方法
- BPR 压力:
 - 0.0–1.0 分钟: 150 bar
 - 1.0–1.5 分钟: 150–300 bar
 - 1.5–4.0 分钟: 300 bar

采用流速梯度的 SFC 分离方法

- 初始等度分离方法
- SFC 流速:
 - 0.0–1.0 分钟: 2.5 mL/min
 - 1.0–1.5 分钟: 2.5–4.0 mL/min
 - 1.5–3.5 分钟: 4.0 mL/min

化学品和样品

甲醇购自 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)。甲基叔丁基醚 (MTBE) 购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

使用包含 16 种化合物的安捷伦 PAH 混标 (部件号 8500-6035)，其中包含萘、萘烯、蒽、苯并[a]蒽、苯并[b]荧蒽、苯并[ghi]花、苯并[a]芘、蒽、二苯并[a,h]蒽、荧蒽、芴、茚并[1,2,3-cd]芘、蔡、菲和芘，各自标称浓度为 500 µg/mL。用 MTBE 将原始溶液稀释 10 倍，得到标称浓度为 50 µg/mL 的稀释溶液。利用该稀释溶液开展实验。

结果与讨论

初始方法开发

之前的固定相筛选表明 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱是理想的色谱柱选择，因为该色谱柱能够保证所有化合物均在适当的时间窗口内洗脱并具有较低的反压。2.5 mL/min 的初始流速是总运行时间和分离度之间的一种良好的平衡，特别是对于早洗脱的化合物。

鉴于纯 CO₂ 分离的等度性质以及前两种化合物较差的保留特性，有必要在此应用中优化注入进样参数，即，将注入速度提高至 1000 µL/min (默认值为 400 µL/min)。为保持注入溶剂和样品溶剂的一致性，采用 MTBE 作为溶剂。之前已经讨论过灌注体积和注入速度对色谱性能的影响⁸。4 µL 的标准灌注体积与 1000 µL/min 的最大注入速度的组合对色谱分析无任何影响，因此将其应用于所有分离。根据获得的所有化合物的谱图信息得出，波长 223 ± 4 nm 与参比波长 360 ± 100 nm 能够使所有 PAH 获得良好的检测器响应。图 1 显示了由所开发的等度型方法获得的色谱图。

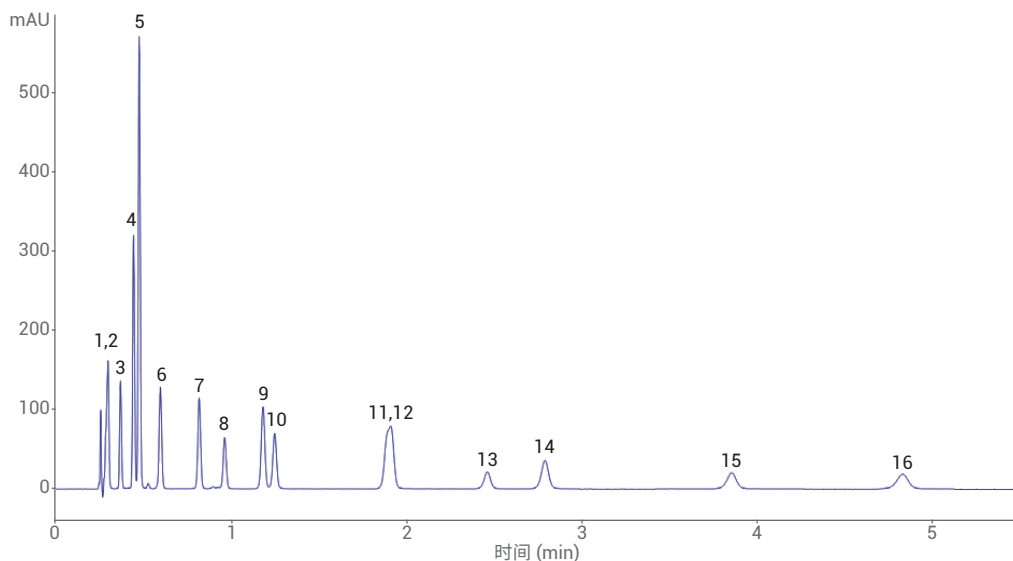


图 1. PAH 标样的初始分离方法。该方法成功分离出 16 种化合物中的 10 种，而化合物 4 和 5 仅得到部分分离。化合物 1 和 2 以及化合物 11 和 12 发生共洗脱。流动相: 100% CO₂，等度，不使用改性剂

16 种化合物中的 10 种得到完全分离，同时有两种 PAH 得到部分分离 ($R_s = 1.54$)，四种 PAH 发生共洗脱 (化合物 1 和 2，化合物 11 和 12)。为进一步加快分析速度，对流速和反压梯度进行了考察。为了不影响早洗脱化合物的分离，尤其是关键峰对 1 和 2 以及 4 和 5 的分离，流速和反压梯度在 1 分钟后开始。

表 1 列出了分离的关键特性参数。对于 1 μL 进样量，保留时间 RSD 值通常在 0.1% 左右，而峰面积 RSD 值通常低于 1%。仅后洗脱化合物的峰面积 RSD 显著升高，极有可能是由于峰展宽和信噪比降低。

通过反压梯度聚焦

增大反压使 CO_2 的密度和粘度更高，从而提高了流动相的洗脱强度。为聚焦介于 1–1.5 分钟之间的后洗脱化合物，采用 150–300 bar 的反压梯度，相当于反压变化速率为 5 bar/s，得到大约 515 bar 的最终系统压力。

聚焦后洗脱化合物使峰面积 RSD 显著降低至 1% 以下，低于等度条件下的结果。总运行时间仅 3.62 分钟，缩短了近 25%，同时峰形得到有效改善 (图 2)。

分离在保留时间和峰面积精密度方面具有高重现性 (表 2)。定义参比波长来补偿不断变化的反压，对于最大程度减小检测器噪音至关重要。此外，不足为奇的是，反压的变化导致检测器响应降低多达 10 mAU，这极有可能是 CO_2 的密度变化造成的。这一现象降低了一次运行中峰面积的可比性。

通过流速梯度聚焦

由于溶剂的线速度较高且整个色谱柱上的压降增加，导致流动相的密度和洗脱强度增加，因此利用流速梯度能够更快洗脱强保留的化合物。

将流速梯度程序设定在 1 分钟至 1.5 分钟之间，流速从 2.5 mL/min 增加至 4 mL/min。这使系统的总压力达到 550 bar 左右。与反压梯度相比，流速梯度仅增加柱前端的系统压力，而反压通过 BPR 模块得以保持。这样减小了对检测器流通池中流动相的粘度和密度的影响，并使基线更稳定。总运行时间仅 3.03 分钟，缩短了 37%，并使后洗脱化合物获得了最佳峰形 (图 2)。与反压梯度相比，流速梯度使保留时间更长且峰面积 RSD 更高 (表 2)。

表 1. 等度条件下 PAH 标样分离的关键参数。对于 1 μL 进样量，保留时间 RSD 值通常在 0.1% 左右，而峰面积 RSD 值通常低于 1%。未测定共洗脱峰 1 和 2 以及峰 8 (与杂质共洗脱) 的峰面积 RSD。所列出的值按 10 次进样的平均值来计算

编号	RT (min)	峰面积 (mAU*s)	峰高 (mAU)	对称性	峰宽 (min)	塔板数	分离度	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1,2	0.303	197.50	168.69	1.62	0.03	1500	1.87	0.10	共洗脱
3	0.374	100.94	137.68	0.95	0.02	5634	2.77	0.12	0.52
4	0.448	246.53	317.98	0.86	0.02	7576	3.65	0.11	0.61
5	0.480	447.47	565.48	0.87	0.02	8415	1.54	0.10	0.63
6	0.600	133.03	127.83	0.95	0.03	7832	3.04	0.07	0.65
7	0.820	128.34	114.17	0.93	0.03	12400	7.79	0.07	0.92
8	0.965	82.12	63.85	1.07	0.04	14504	4.72	0.08	与杂质共洗脱
9	1.185	150.44	103.24	0.97	0.04	15427	6.24	0.11	0.63
10	1.251	106.18	69.37	0.96	0.04	15966	1.71	0.10	0.93
11,12	1.910	263.05	78.30	1.69	0.09	8995	10.96	0.07	共洗脱
13	2.459	56.28	21.32	1.04	0.08	21899	7.47	0.05	1.81
14	2.787	105.17	35.39	1.02	0.09	21847	4.62	0.06	1.85
15	3.846	77.25	19.61	1.10	0.11	24303	12.16	0.06	1.56
16	4.816	90.59	18.50	1.12	0.14	25676	8.86	0.06	3.36

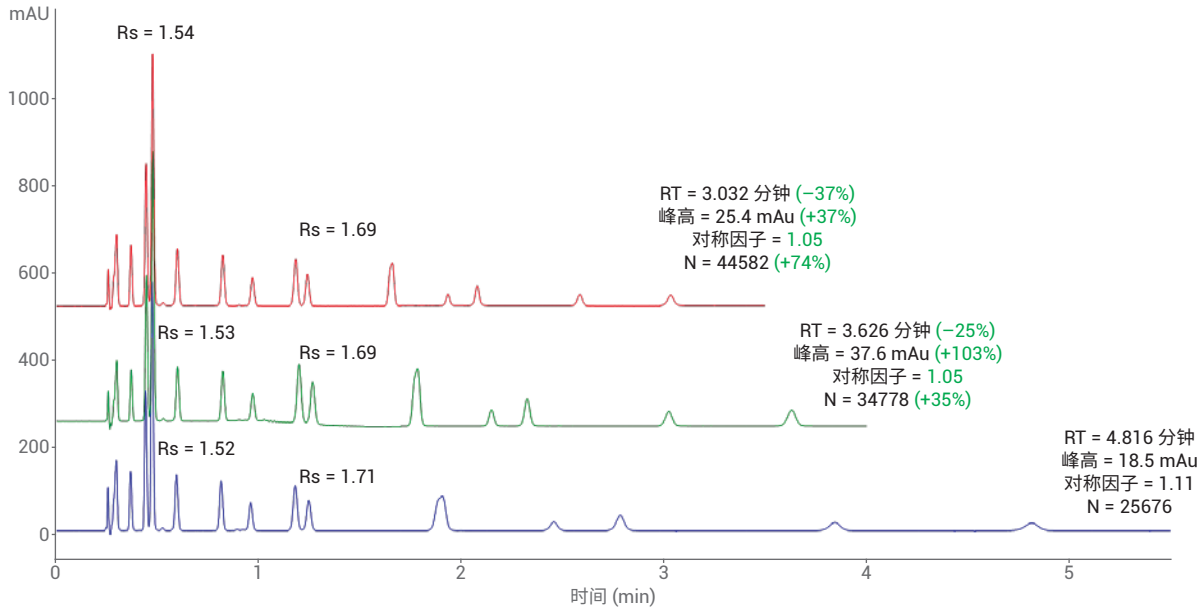


图 2. 在等度条件下使用纯 CO₂ 得到的运行结果比较：最后一个峰在不聚焦的情况下在 4.816 分钟后洗脱（蓝色），采用反压梯度时在 3.626 分钟后洗脱（绿色），使用流速梯度时在 3.032 分钟后洗脱（红色）。总体而言，采用反压梯度能够使运行时间缩短 25%，而采用流速梯度能够使运行时间缩短 37%

表 2. 采用等度分离以及梯度分离所获得的保留时间和峰面积 RSD。未测定共洗脱峰 1 和 2 以及峰 8（与杂质共洗脱）的峰面积 RSD。所列出的值按 10 次进样的平均值来计算

编号	等度运行		流速梯度		BPR 梯度	
	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1,2	0.10	共洗脱	0.21	共洗脱	0.15	共洗脱
3	0.12	0.52	0.21	0.82	0.11	0.46
4	0.11	0.61	0.26	2.09	0.15	0.60
5	0.10	0.63	0.24	0.68	0.14	0.62
6	0.07	0.65	0.27	0.88	0.17	0.98
7	0.07	0.92	0.25	0.94	0.12	0.75
8	0.08	与杂质共洗脱	0.25	与杂质共洗脱	0.11	与杂质共洗脱
9	0.11	0.63	0.22	0.85	0.09	0.80
10	0.10	0.93	0.20	1.04	0.09	1.03
11,12	0.07	共洗脱	0.13	共洗脱	0.07	共洗脱
13	0.05	1.81	0.15	1.08	0.08	0.88
14	0.06	1.85	0.16	1.21	0.07	0.74
15	0.06	1.56	0.17	2.07	0.07	0.72
16	0.06	3.36	0.18	1.59	0.07	0.80

两种技术的对比

表 2 比较了所有可分离化合物的关键特性参数，如保留时间 RSD 和峰面积 RSD。两种技术各有其优缺点。

虽然采用反压梯度能够获得更出色的保留时间和峰面积 RSD，但是它会造成本基线降低，并且由于流动相密度改变而导致峰高和峰面积发生非线性升高。这样将降低一次运行中峰面积的可比性。但是，考虑到反压梯度的陡度为 5 bar/s，分析的重现性仍然很出色。流速梯度能够缩短分析时间并提供更出色的峰形，但是会导致保留时间 RSD 升高。一次运行中峰面积的可比性不受影响。

结论

本技术概述展示了在充分利用现代化的先进 SFC 仪器和色谱柱的情况下，无改性剂的 SFC 分离成为经典 LC 或 SFC 的绿色替代方案的可能性。利用流速梯度和反压梯度均成功实现了后洗脱化合物的聚焦，这两种技术各有其优缺点。典型的保留时间 RSD 约为 0.1%，而峰面积 RSD 通常低于 1%。

显然，在分析过程中改变反压能够为 SFC 方法开发带来更高的灵活性。反压和流速梯度均需要较大的系统压力范围。Agilent 1260 Infinity II SFC 系统在最高 5 mL/min 的流速下压力上限可高达 600 bar，为两种技术提供了必要的灵活性。

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱进行分离。InfinityLab Poroshell 色谱柱在 SFC 应用中极具价值，因为它们具有优异的性能和柱效，同时产生的反压适中。该色谱柱支持上限为 600 bar 的压力范围内的快速分析，使 1260 Infinity II SFC 系统成为真正的一体式解决方案。

参考文献

1. Noll-Bochers, M.; Hoelscher, T.; Naegele, E.; Becker, M. 根据 ASTM D5186 测定柴油燃料中的芳烃含量, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5682ZHCN, **2015**
2. Naegele, E. 利用超临界流体色谱分离大分子肽和小分子肽并利用质谱进行检测, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-6435ZHCN, **2016**
3. Berger, T. 超临界流体色谱, *安捷伦科技公司基础导论*, 出版号 5991-5509CHCN, **2015**
4. Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents, *Green Chem.* **2007**, 9, 927-934
5. Fallas, M. et al. Investigation of the effect of pressure on retention of small molecules using reversed-phase ultra-high-pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2008**, 1209, 195-205
6. Lessellier, E.; West, C.; Schmid, M. G. The many faces of packed column supercritical chromatography – a critical review, *J. Chromatogr. A* **2015**, 1382, 2-46
7. Vollmer, M. Agilent 1260 Infinity Hybrid SFC/UHPLC System (Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5990-9514EN, **2011**
8. Naegele, E. 注入速度和灌注体积, *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-7626ZHCN, **2017**

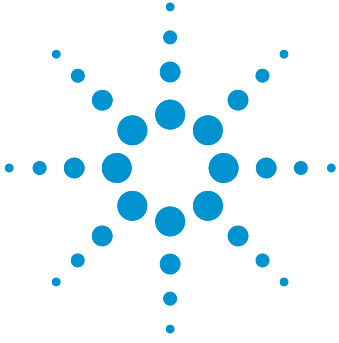
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-8492ZHCN



Agilent Technologies



使用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统进行正交色谱分离

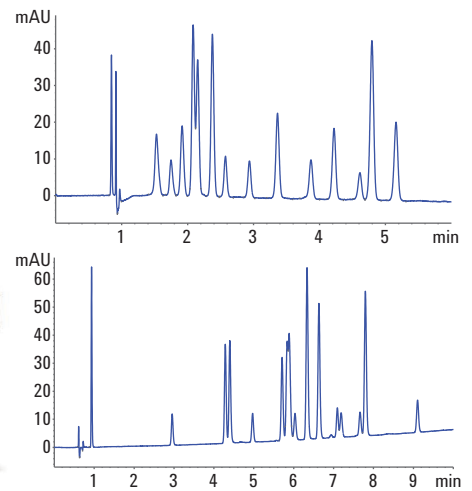
技术概述

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本技术概述详细介绍了如何设置带有或不带质谱系统的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统。文中将展示性能数据并讨论两种操作模式。作为应用示例，将展示 SFC 模式和 UHPLC 模式下的农药混合物分离，并将讨论分离的正交性。



Agilent Technologies

前言

对给定的复杂样品同时进行基于 SFC 的分离和基于 UHPLC 的分离，将能获得有关样品成分的互补信息。这两种分离技术采用不同的分离机制（基于分析物在完全不同的流体介质和固定相中的相互作用），是真正意义上的正交技术。反相分离通常使用疏水性固定相和有机-水性液相，而 SFC 通常使用与正相分离类似的极性固定相和 CO₂/有机液相。

为避免单独购买 SFC 和 UHPLC 仪器的负担，Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统在一台仪器中同时提供了 SFC 和 UHPLC 功能。这两种技术共享自动进样器、柱温箱和检测器等常见的模块化部件。此类仪器的设置非常简单，只需通过一个阀即可在两种技术之间进行切换。这使得 SFC 和 UHPLC 均具有高可靠性和稳定性。此外，可添加质谱系统以改善所采集的数据的质量。SFC 模式中，该质谱系统在分流条件下与辅助泵配合使用，而在 UHPLC 模式中则采用全流条件。

本技术概述通过展示保留时间、峰面积精度和线性数据，证明了 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统在 SFC 和 LC 模式下的性能。作为两种技术正交性的示例，将展示并讨论在 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统上利用两种分离技术进行的复杂农药混合物的分离。

实验部分

用于农药分离的 SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	2.5 mL/min
梯度	6 分钟内 B 从 5% 升至 25% 停止时间：6 分钟 后运行时间：2 分钟
反压调节器 (BPR) 温度	60 °C
BPR 压力	140 bar
柱温	40 °C
进样量	1.0 µL
注入溶剂	甲醇
灌注体积	4 µL
注入速度	400 µL/min
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
DAD	254 nm/带宽 4 nm；参比 360 nm/带宽 100 nm 标准高压 SFC 流通池
数据采集速率	20 Hz

用于农药分离的 LC 方法

参数	值
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	2.5 mL/min
梯度	6 分钟内 B 从 15% 升至 70% 停止时间：6 分钟 后运行时间：3 分钟
柱温	40 °C
进样量	1.0 µL
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
DAD	254 nm/带宽 4 nm；参比 360 nm/带宽 100 nm 标准高压 SFC 流通池
数据采集速率	20 Hz

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (MCT) (G7116A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀 (部件号 5067-4287)
- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 2 位/10 通阀 (G4232B)
- Agilent 1260 Infinity II 等度泵 (G7110B) 和 SFC/MS 分流器套装 (G4309-68715)
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6150 单四极杆液质联用系统

仪器设置

为了将 SFC 系统转换为 SFC/UHPLC 混合型系统，添加了一台四元或二元 UHPLC 泵并通过 2 位/10 通阀连接，能够在 SFC 和 LC 模式之间直接切换 (图 1 和 2)。大容量柱温箱 (MCT) 配备用于色谱柱切换的 4 位/10 通四色谱柱选择阀，例如从典型的 SFC 色

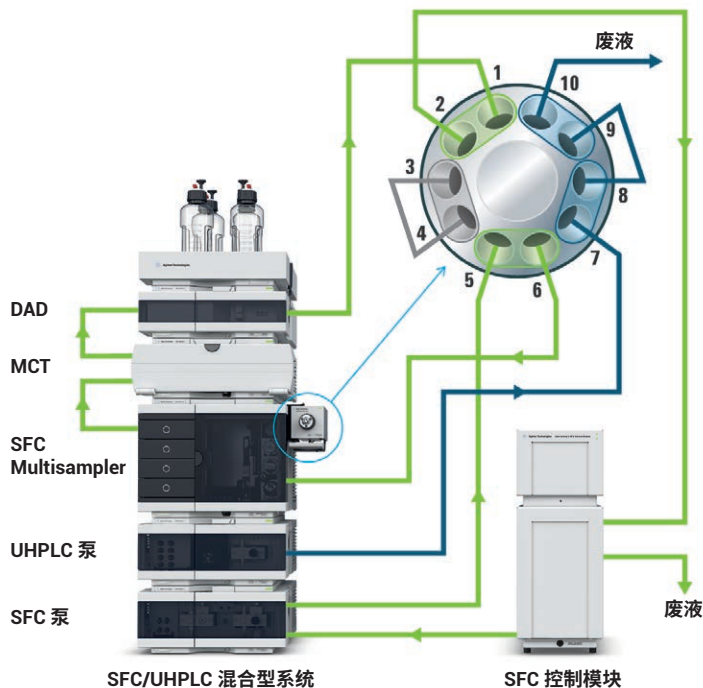


图 1. 处于 SFC 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统。SFC 控制模块连接至 SFC 泵和共享模块 (绿色管线)。UHPLC 泵连接至废液位置 (蓝色管线)

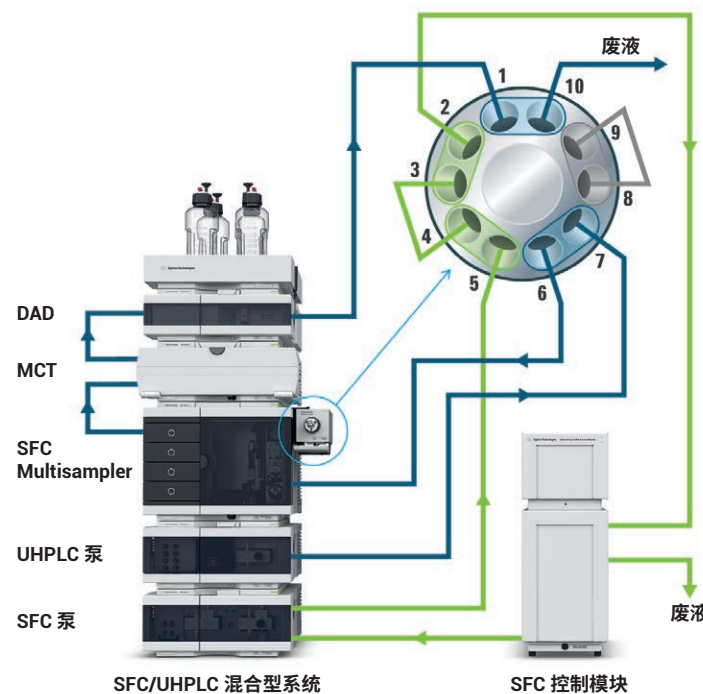


图 2. 处于 UHPLC 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统。UHPLC 泵连接至共享模块 (蓝色管线)。SFC 泵直接连接至环路 (绿色管线) 中的 SFC 控制模块

谱柱切换为典型的分析型 UHPLC 色谱柱（在图 1 和 2 中未示出）。图 1 和 2 中圈出的是 2 位/10 通阀处的管路。图 1 所示的阀位置将 SFC 泵和 SFC 控制模块连接至仪器的共享模块。在流过自动进样器、容纳 SFC 色谱柱的柱温箱以及检测器后，CO₂ 流重新连接至用于反压调节的 SFC 控制模块。在此位置处，四元 UHPLC 泵连接至废液。

将 2 位/10 通阀切换至 UHPLC 位置后，四元泵将连接至共享模块（图 2）。为维持反压，将 SFC 泵直接连接至 SFC 控制模块。

SFC/UHPLC 混合型仪器与质谱仪的额外连接不会增加复杂性。只需在 2 位/10 通阀处对管路进行重新连接，将 SFC 辅助泵接入系统中并使液流能分流至 MS，同时使 UHPLC 的液流能全部进入 MS 即可（图 3 和 4）。在此情况下，在 SFC 模式中，CO₂ 流连接至第一个分流器，以便在通过共享模块后引入补偿流。第二个分流器在 SFC 控制模块的反压调节器和 MS 之间进行液流分流（图 3）。在 UHPLC 模式中，四元泵连接至共享模块，并直接连接至 MS 以实现全流运行（图 4）。为了在 UHPLC 模式中使用分流方法，端口 1-2 处的桥接毛细管可替换为分流器并用于 UHPLC 模式中。

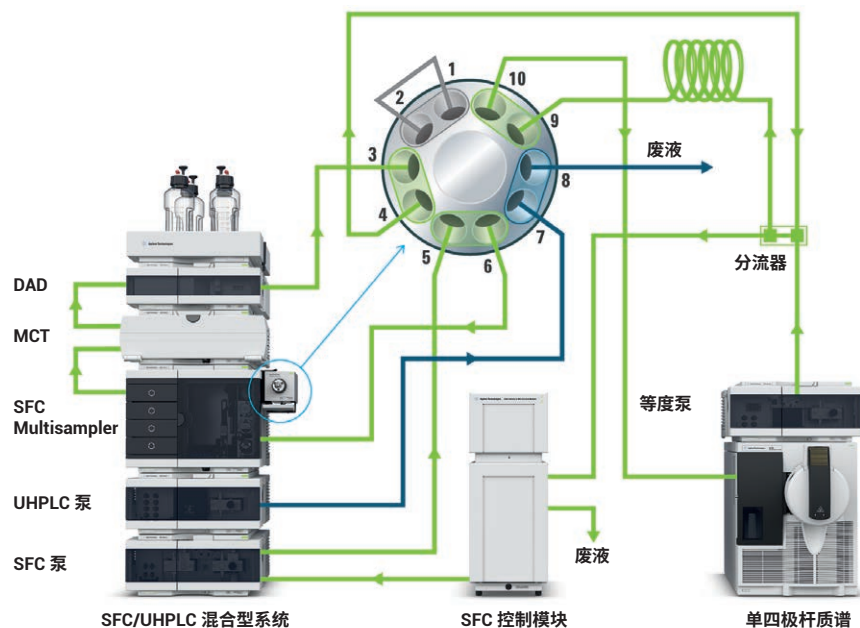


图 3. 处于 SFC/MS 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC/MS 混合型系统。SFC 控制模块连接至 SFC 泵和共享模块（绿色管线）。UHPLC 泵连接至废液位置（蓝色管线）。CO₂ 流连接至第一个分流器，以便在通过共享模块后引入补偿流。第二个分流器在 SFC 控制模块的反压调节器和 MS 之间进行液流分流（绿色毛细管盘管：50 μm，100 cm，产生限制以防止减压）

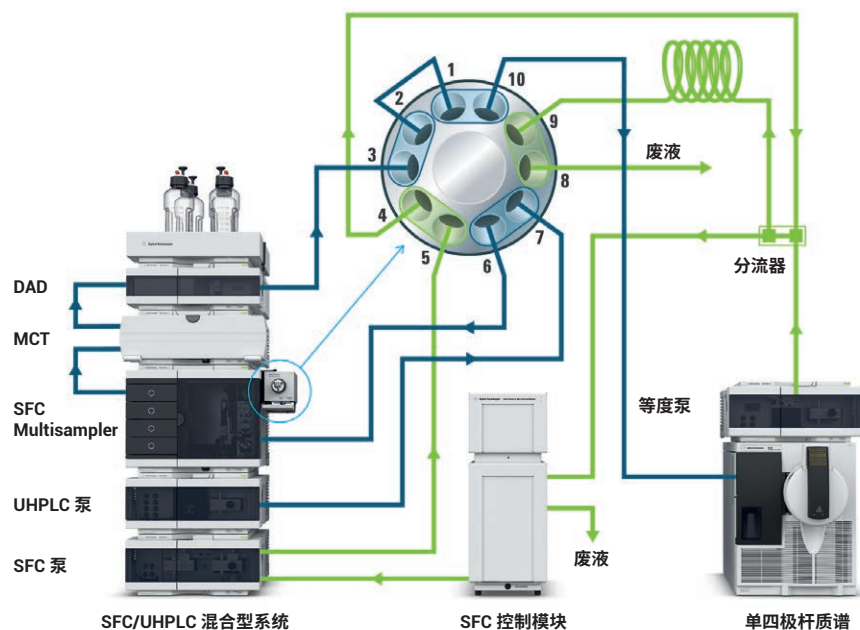


图 4. 处于 UHPLC/MS 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC/MS 混合型系统。UHPLC 泵连接至共享模块（蓝色管线）并直接流至 MS。SFC 泵直接连接至环路（绿色管线）中的 SFC 控制模块，该环路中包括分流器（绿色毛细管盘管：50 μm，100 cm，产生限制以防止减压）

色谱柱

- SFC 模式:**
 Agilent ZORBAX RX-SIL,
 4.6 × 150 mm, 5 μm
 (部件号 883975-901)
- SFC 模式:**
 Agilent ZORBAX NH₂,
 4.6 × 150 mm, 5 μm
 (部件号 883952-708)
- LC 模式:**
 Agilent ZORBAX SB C18,
 4.6 × 150 mm, 3.5 μm
 (部件号 883975-902)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 修订版 C.01.07 SR3

样品

- 咖啡因溶液 (0.5 g/100 mL 的甲醇溶液)
- SFC 校验混标 (茶碱、咖啡因、胸腺嘧啶、可可碱; 溶于甲醇中, 各自浓度为 250 mg/L)
- 农药溶液, 1 mg/mL (甲醇溶液), 具有同等体积的混合物 (表 1)

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

质谱条件

参数	值
采用安捷伦喷射流离子源进行电喷雾电离	
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	35 psi
补偿流速	0.3 mL/min, 甲醇 + 3% 水 + 0.1% 甲酸
单四极杆的 MS 参数	
ESI 极性	正离子
扫描	180–450 m/z
驻留时间	200 ms
碎裂电压	70 V
增益	1.0

表 1. 复杂测试样品中的 15 种农药, 用于证明 SFC 模式和 UHPLC 模式的正交分离性能。各化合物的保留时间表明, 化合物在所用条件下发生了漂移。使用单四极杆 MS 完成各个化合物的鉴定 (参见实验部分以及图 3 和图 4)

编号	名称	化学式	m/z [M+H] ⁺	SFC RT (min)	LC RT (min)
1	扑草净	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	242.10	1.528	5.880
2	另丁津	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.11	1.748	7.190
3	特丁津	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	230.11	1.917	7.664
4	莠去津	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	216.10	2.084	6.035
5	溴谷隆	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	259.00	2.153	6.632
6	噻唑隆	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	222.06	2.153	5.710
7	利谷隆	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249.02	2.375	7.798
8	脱乙基特丁津	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	202.08	2.572	4.971
9	脱乙基莠去津	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	188.06	2.939	2.954
10	环嗪酮	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	253.16	3.362	4.400
11	尼莫地平	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₇	419.18	3.870	9.107
12	绿麦隆	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	213.08	4.220	5.838
13	硝苯地平	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	347.10	4.613	7.095
14	敌草隆	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.02	4.795	6.333
15	甲氧隆	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	229.07	5.161	4.286

结果与讨论

在 SFC/UHPLC 混合型系统中，两种分离原理通过专用模块和共享模块得以组合。对于该系统的概念验证，仪器在两种模式下都必须具有优异的性能并且与单独的 SFC 和 UHPLC 仪器具有相同的性能水平。为证明这一性能，测定了峰面积和保留时间的相对标准偏差以及进样线性。

SFC 模式下的性能

在测定峰面积 RSD、保留时间 RSD 和进样线性数据时，SFC/UHPLC 仪器根据图 1 所示的配置和阀位置在 SFC 模式下运行。将实验部分所述的咖啡因样品作为测试标样，使用 Agilent ZORBAX Rx-SIL 色谱柱进行色谱分析，采用甲醇作为 CO₂ 的改性剂并使用等度条件（12% 甲醇，其他相关条件请参见实验部分的方法参数）。为评估分析范围，所用的进样量为 0.1–10 μL (n = 10)。进样量为 0.1 μL 时，计算得出的峰面积 RSD 约为 1.2%；进样量高于 0.5 μL 时，峰面积 RSD 降低至 0.3% 以下，进样量高达 10 μL 时，峰面积 RSD 保持在 0.2% 左右（图 5A）。在整个进样量范围内得到的峰面积表现出优异的线性，R² = 0.9999（图 5B）。计算得出的平均保留时间 RSD 值为 0.08%。这些值与通过 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统测得的相应值一致¹。利用 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 进行的注入进样（已引入此系统）能够实现灵活的进样量。为优化注入进样过程，引入了两个新的进样参数：注入速度和灌洗体积²。通过 SFC

Multisampler，能够实现超过 10 μL 且最高大于 90 μL（100 μL 减去灌洗体积）的大体积进样，同时可保持同样出色的性能¹。

UHPLC 模式下的性能

为通过实验测定 UHPLC 条件下的峰面积 RSD、保留时间 RSD 和进样线性，采用图 2 中所示的设置和阀位

置。在 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱上采用等度条件（14% 乙腈，有关其他条件，请参见实验部分的方法参数）对咖啡因样品（与 SFC 条件下使用的样品相同）进行色谱分析。不同的是，将 1260 Infinity II SFC Multisampler 切换至 UHPLC 模式，将注入进样模式切换为标准流通式进样模式。

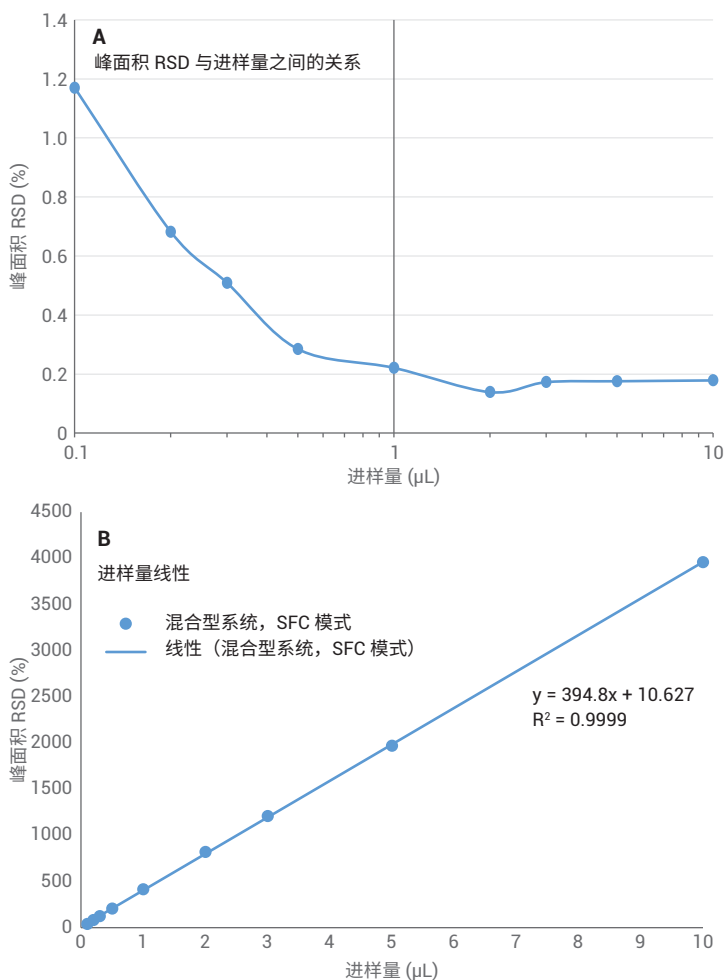


图 5. SFC 模式下的性能。A) 峰面积 RSD 与进样量 (0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5 和 10 μL) 之间的关系。进样量大于 0.5 μL 时，峰面积 RSD 通常低于 0.3%。B) 0.1–10 μL 进样量范围内的峰面积线性，R² = 0.9999

在进样量为 0.1–10 μL 的分析范围内得到的结果表明，在高于 0.5 μL 的所有进样量下得到的 RSD 为 0.2% 或更低（图 6A）。该范围内的进样量线性通常为 $R^2 > 0.9999$ （图 6B）。为评估 UHPLC 条件下大体积进样的影响，用水按 1:10 的比例稀释咖啡因样品，并在 10–100 μL 的进样量范围内进样。测得的峰面积 RSD 通常低于 0.12%，并且进样量线性优于 $R^2 > 0.9999$ （图 7）。分析范围内所有进样的平均保留时间 RSD 值通常为 0.08%，并且在进样量范围内该值保持不变。这些结果与之前通过单独的 UHPLC 系统得到的结果一致³。

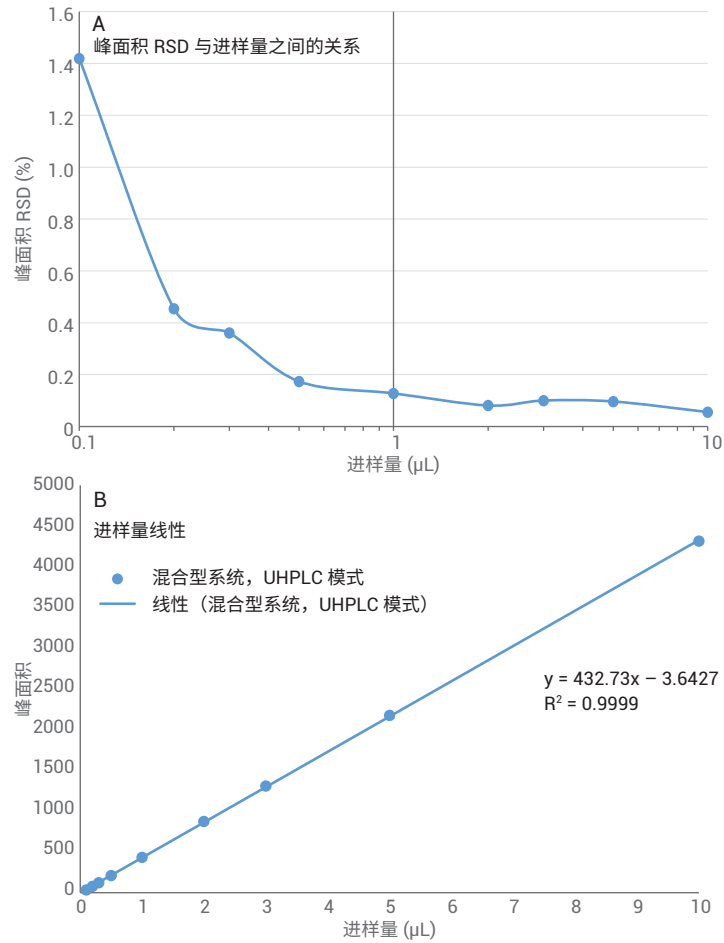


图 6. UHPLC 模式下的性能。A) 峰面积 RSD 与进样量 (0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5 和 10 μL) 之间的关系。进样量大于 0.5 μL 时，峰面积 RSD 通常低于 0.2%。B) 0.1–10 μL 进样量范围内的峰面积线性， $R^2 = 0.9999$

SFC 和 UHPLC 模式的快速切换

SFC/UHPLC 混合型系统具有能在两种模式下运行样品的优势，并通过单独的 SFC 和 UHPLC 方法来实现，该系统包括通过 2 位/10 通阀切换 SFC 控制模块、1260 Infinity II SFC Multisampler、泵和完整液流的所有必要配置，如图 1 和 2 所示。

在 UHPLC 和 SFC 的切换过程中因结冰引起的系统堵塞这一典型问题是使用反相 HPLC 后残留的水栓引起的。由 UHPLC 切换为 SFC 之前，可使用有机溶剂（如甲醇）冲洗仪器来避免这一问题。对于 1260 Infinity II SFC Multisampler，如果方法设置中的模式从 UHPLC 更改为 SFC，则这一过程可通过特殊的自动冲洗程序自动完成。这样省去了单独的冲洗方法，并清除了共用的 Multisampler 中的水性溶剂，该溶剂可能是最大系统死体积（即 100 μL 流通式样品定量环）中的残留物。建议在两种模式下均使用单独的专用色谱柱。根据所选的 SFC 方法或 UHPLC 方法，通过位于 MCT 中的色谱柱选择阀来切换色谱柱。为证明 SFC 和 UHPLC 之间的切换效果，在一个序列内设置重复运行 SFC 和 UHPLC（图 8）。整个序列在运行过程中没有任何问题，并获得了具有高重现性的峰面积和保留时间，如图 8 所示。

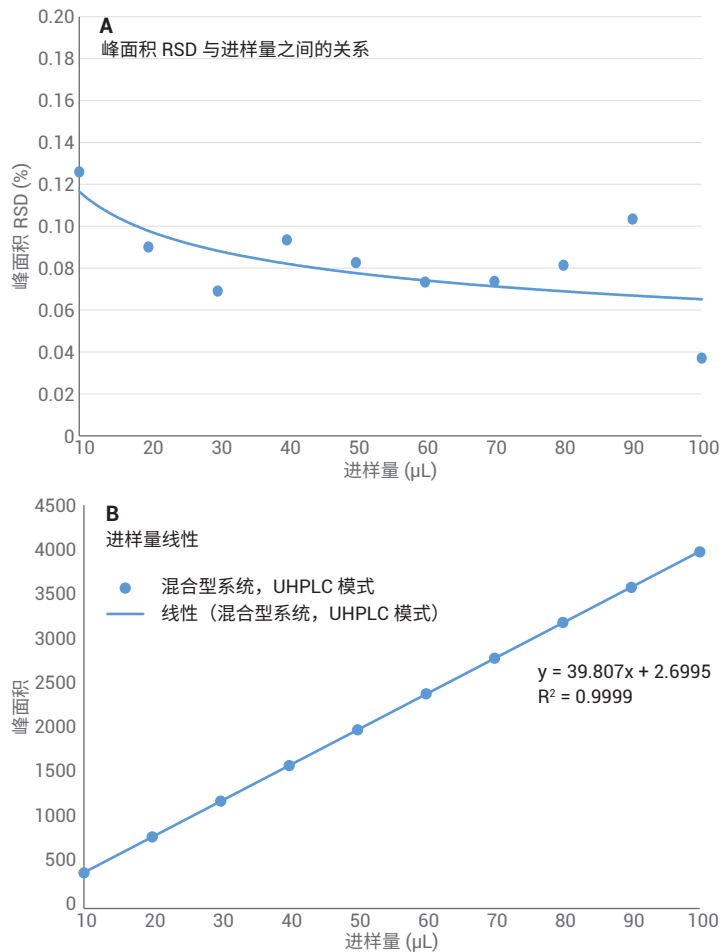


图 7. 在 UHPLC 模式下进行大体积进样的性能。A) 峰面积 RSD 与进样量（10–100 μL ，以 10 μL 递增）之间的关系。峰面积 RSD 通常低于 0.12%。B) 10–100 μL 进样量范围内的峰面积线性， $R^2 = 0.9999$

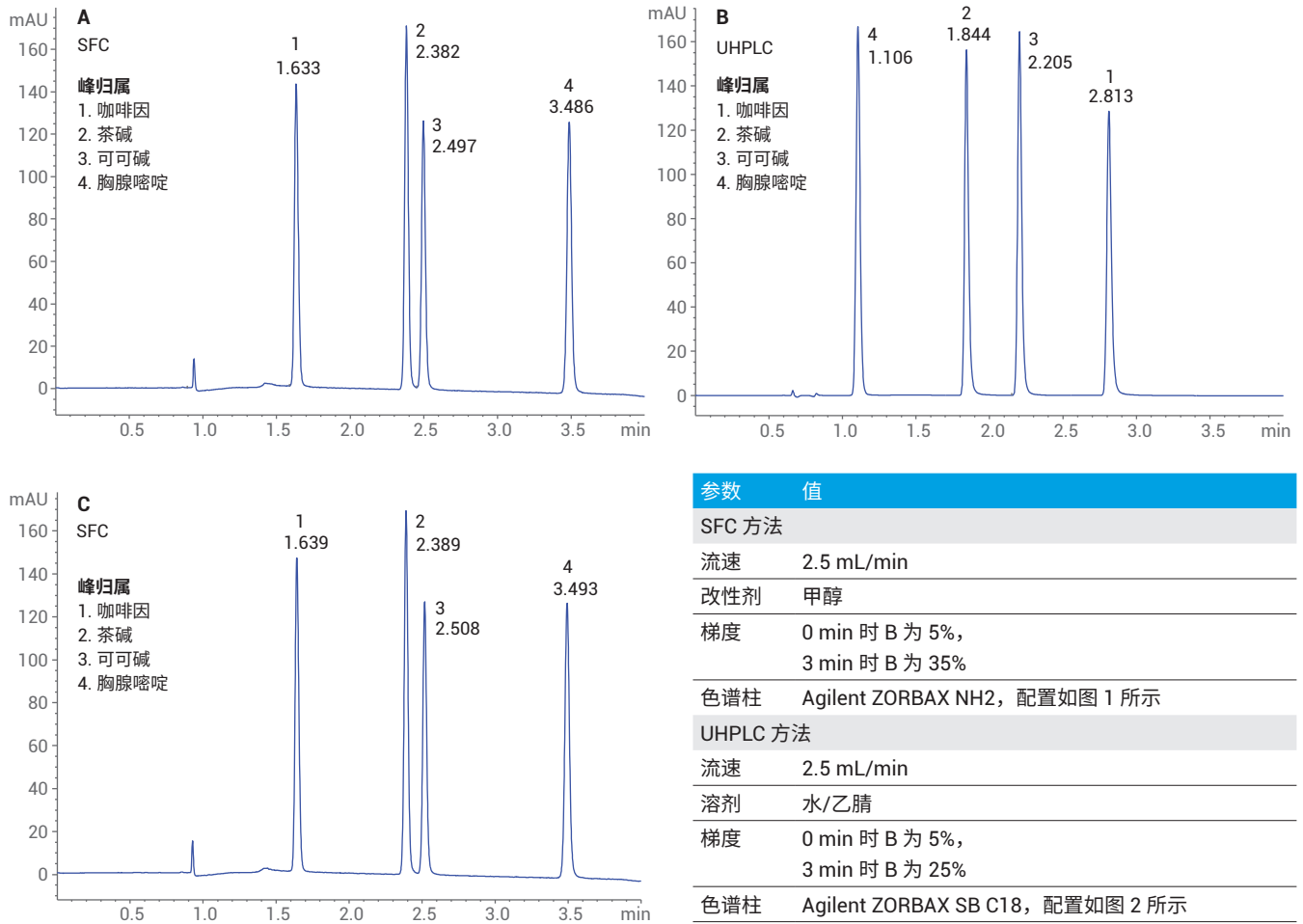


图 8. 在 SFC/UHPLC 混合型系统上进行多次 SFC 和 UHPLC 运行的序列。该序列从重复的 SFC 运行开始 (A)，然后将方法切换为所述的 UHPLC 方法设置，继续执行重复的 UHPLC 运行 (B)。最后，在序列结束时切换回 SFC 模式方法，完成多次 SFC 运行 (C)。为平衡各自的色谱柱，在序列中每个 SFC 模式或 UHPLC 模式开始时执行空白运行。其他参数与实验部分中列出的方法相同。利用 4 位/10 通四色谱柱选择阀在不同方法中切换色谱柱。根据 SFC 或 UHPLC 方法选择 SFC 控制模块模式和 Multisampler 模式的配置

SFC 和 UHPLC 模式的正交分离

在一套混合型系统中组合使用 SFC 和 UHPLC 的优势之一，是能够使用一套系统以经济有效的方式利用正交分离技术测量给定的样品。由于采用了正交分离技术，能够分离出那些在使用单一色谱分离技术时由于共洗脱而被隐藏的化合物。作为示例，在 SFC 和 UHPLC 条件下对包含 15 种农药（表 1）的复杂样品进行测定。在 SFC

条件下，使用氨基相并以甲醇作为改性剂完成测定；在 UHPLC 模式中，在 C18 固定相和水/乙腈的反相条件下完成测定（图 9 和图 10）。在 SFC 条件下，化合物能够在 6 分钟的运行中得到分离（图 9）。在所选的分离条件下，化合物 5 和 6 发生完全共洗脱，并且还和化合物 4 发生部分共洗脱。所有其他化合物均实现了基线分离。在反相条件下对同一样品进行

分离，结果表现出完全不同的选择性（图 10）。从图中可以看出，在 SFC 条件下共洗脱的化合物 4、5 和 6 现在得到了分离。但是，在这些条件下，化合物 12 和 1 几乎为完全共洗脱。此外，比较两幅色谱图可以看出选择性完全不同。例如，在 SFC 条件下最后洗脱的化合物 15 在反相 UHPLC 条件下第二个洗脱出来。

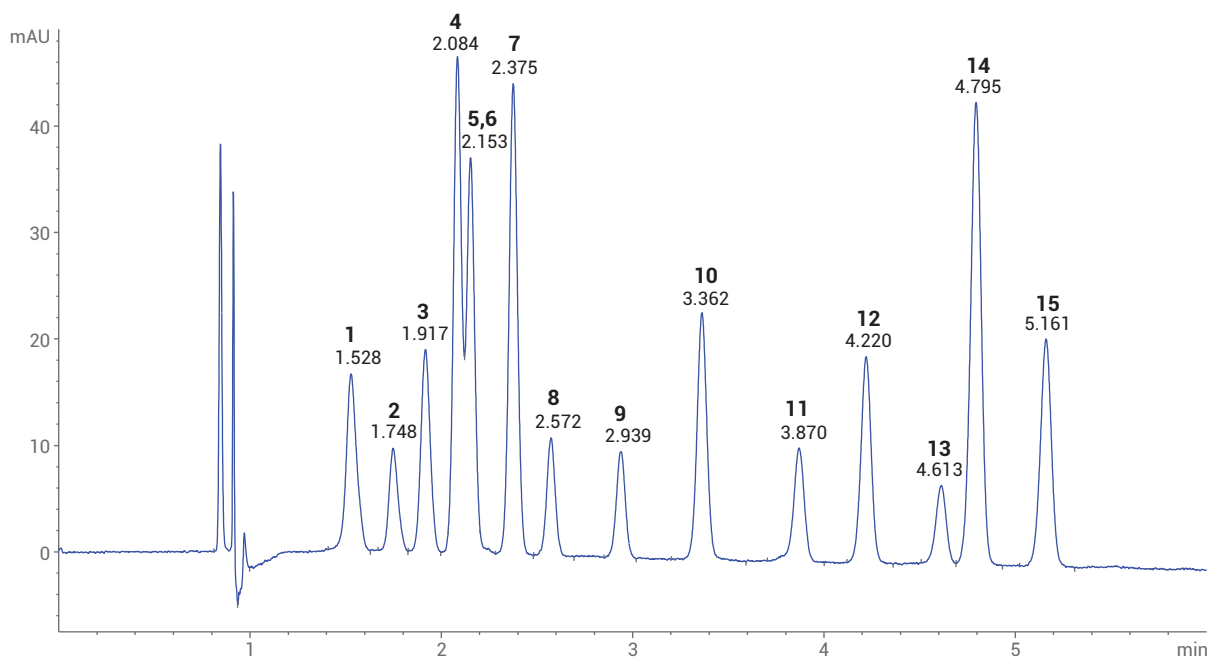


图 9. 在 SFC 模式下，在氨基固定相色谱柱上采用甲醇作为改性剂（参见实验部分）分离包含 15 种农药的复杂样品

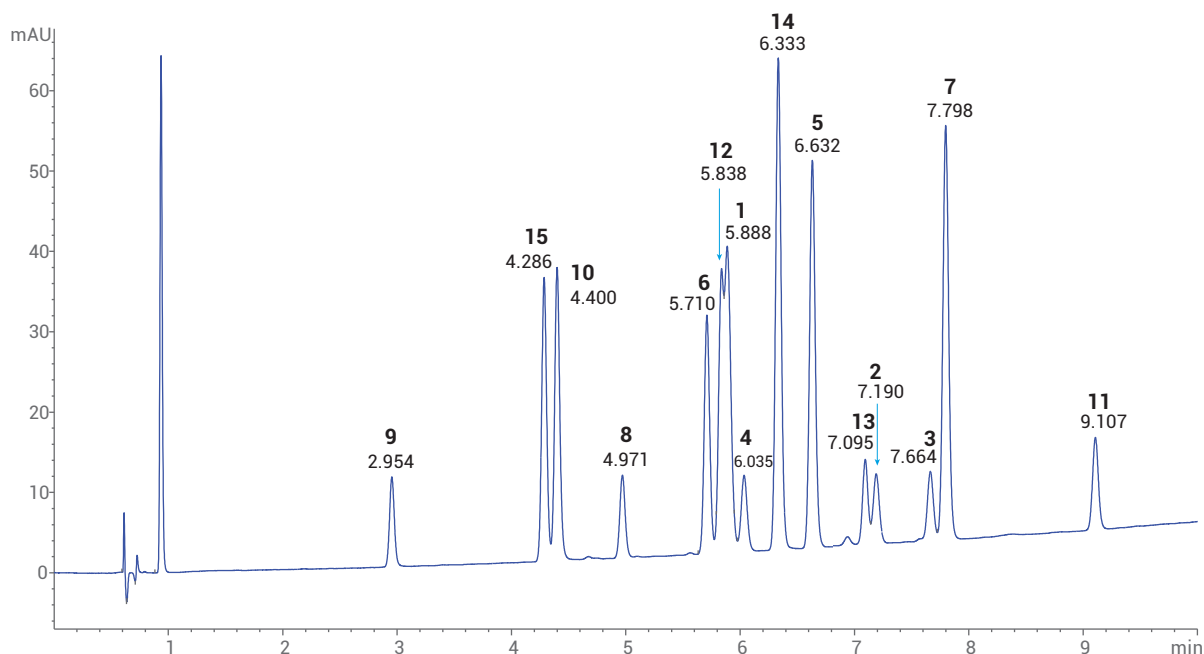


图 10. 在 UHPLC 模式下，在 C18 固定相色谱柱上采用水/乙腈作为溶剂（参见实验部分）分离包含 15 种农药的复杂样品

结论

本技术概述证明了 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统的 SFC 模式和 UHPLC 模式可提供与单独的 SFC 和 UHPLC 仪器相同的性能。利用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统测得的峰面积 RSD、保留时间 RSD 和线性值与单独的 SFC 和 UHPLC 仪器测得的值处于同一水平。证明了能够在 SFC 和 UHPLC 模式之间进行切换（甚至可在一个序列内切换），并提供了正交分离复杂样品的示例。

参考文献

1. Naegele, E. 在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱 — 在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统中对 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 进行性能评估, *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-7623ZHCN, 2017
2. Naegele, E. 注入速度和灌洗体积 — SFC 的新进样参数, *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-7626ZHCN, 2017

3. Huesgen, A. G.; Schneider, S. Performance Characteristics of the Agilent 1290 Infinity II Multisampler (Agilent 1290 Infinity II Multisampler 的性能特点), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-5348EN, 2014

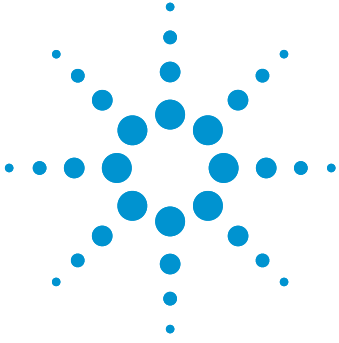
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-8276ZHCN



Agilent Technologies



使用 Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱实现超临界流体色谱的高精度温度控制

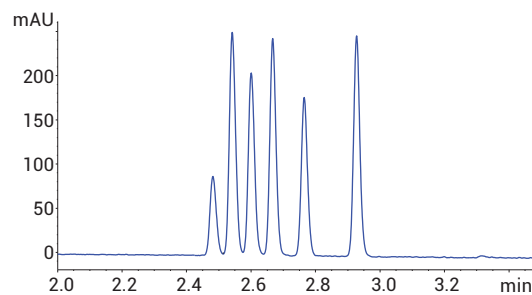
技术概述

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本技术概述展示了 Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱在 Agilent InfinityLab 超临界流体色谱 (SFC) 解决方案中的应用。介绍了柱后温度如何影响二极管阵列检测器的噪音以及如何优化这一温度。根据所得到的设定值，对不同柱温下的噪音进行了测量，结果表明，在宽柱温范围内噪音表现出良好的稳定性。对于一些保留时间对温度敏感的化合物而言，获得了出色的保留时间稳定性。



Agilent Technologies

前言

LC 和 SFC 系统中使用的先进的二极管阵列检测器具有高灵敏度，因此，最大程度减小检测器噪音对于获得最佳性能至关重要。除电子噪音外，所有液相色谱检测系统中的典型检测器噪音可能是由示差折光效应引起的。这些效应主要由所用的溶剂混合不充分以及色谱柱和检测器流通池之间的温度差异引起。后者可通过将色谱柱洗脱物的温度调节至 SFC 中检测器流通池的温度来进行补偿。因此，需要高度准确且稳定的温度控制。此外，色谱柱本身也需要高度准确且稳定的温度。稳定的柱温至关重要，因为当柱温发生细微变化时，某些化合物的保留时间会发生显著漂移。Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱可同时控制两个温度，即决定柱温的柱前温度以及将色谱柱洗脱物调节至检测器流通池温度的柱后温度。

本技术概述展示并讨论了这两种温度的影响，提供了最大程度减小检测器噪音的优化过程，并展示了在宽柱温范围内得到的噪音结果。使用保留特性对温度变化敏感的化合物证明了柱温本身的影响。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)

仪器设置

为最大程度减小检测器噪音，需要将柱后温度优化至尽可能接近检测器流通池温度。为此，引导色谱柱洗脱物穿过热交换器（内部体积 3 μ L），其中热交换器的温度被设置为检测器流通池的温度。利用另一个具有相同内部体积的热交换器完成柱前温度调节。为此，使用了 Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱中两个独立的热交换模块（参见结果与讨论部分）。

色谱柱

- Agilent ZORBAX RxSil, 4.6 \times 150 mm, 5 μ m (用于测量噪音)
- Agilent ZORBAX RxSil, 3.0 \times 100 mm, 1.8 μ m (用于测量温度稳定性)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3

样品

样品为以下六种化合物的混合物：磺胺地托辛、磺胺氯吡嗪、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲嘧啶和磺胺嘧啶（各 10 mg 溶于 25 mL 甲醇中，在混合物中具有相同的体积）。

用于噪音测量的 SFC 方法

参数	描述
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	2.5 mL/min
等度洗脱	20% 改性剂
停止时间	60 分钟
反压调节器 (BPR)	60 °C, 140 bar
柱温	20–60 °C (间隔 5 °C)
柱前热交换器	3 µL
柱后温度	42 °C
柱后热交换器	3 µL
进样量	0.0 µL (空白运行)
注入溶剂	甲醇
灌洗体积	4 µL
注入速度	400 µL/min
二极管阵列检测器	254 nm/4 nm, 参比: 360 nm/60 nm, 狭缝宽度 16 nm, 数据采集速率 5 Hz, 标准高压流通池

用于温度稳定性测量的 SFC 方法

参数	描述
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	1.5 mL/min
梯度	0 min 时 B 为 5% 4 min 时 B 为 40%
反压调节器 (BPR)	60 °C, 140 bar
柱温	20–80 °C (间隔 10 °C)
柱前热交换器	3 µL
柱后温度	42 °C
柱后热交换器	3 µL
进样量	10.0 µL
注入溶剂	甲醇
灌洗体积	4 µL
注入速度	400 µL/min
二极管阵列检测器	270 nm/4 nm, 参比: 360 nm/60 nm, 狭缝宽度 16 nm, 数据采集速率 10 Hz, 标准高压流通池

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

结果与讨论

为确定最佳温度，在 35–45 °C（间隔 1 °C）的柱后温度范围内对检测器噪音进行测量，该温度范围是检测器流通池的典型温度范围。利用实验部分所述的 SFC 方法进行测量（柱温 40 °C）。测得的检测器噪音的数据点连线表明，在 38–44 °C 的柱后温度范围内，峰间噪音表现为 60 μ AU 的最小值（图 1）。利用热电偶直接测量检测器流通池的表面温度，结果表明流通池温度为 42 °C。在所有进一步实验中，均保持 42 °C 的柱后温度设置。

在 20–60 °C（间隔 5 °C）之间的不同柱温下完成一组共九次运行。每次运行时间为 1 小时，并重复测定一次，以此测得检测器噪音。在分析过程中，每 10 分钟测定一次噪音，并由 Agilent ChemStation 报告为峰间噪音。最后，对一次运行中所获得的所有峰间噪音值取平均值，并显示在表明柱温与峰间噪音关系的图中（图 2）。该图显示，峰间检测器噪音在整个柱温范围内保持恒定，并且通常在 65 μ AU 左右。

当需要实现高灵敏度时，例如在杂质分析中测定浓度为 0.1% 或更低浓度的杂质时，获得最低的检测器噪音尤为重要。这一结果通过分离主要化合物与其浓度为 0.1% 的杂质得到了证明，其中主要化合物的峰仍处于检测器的线性范围内（图 3）。

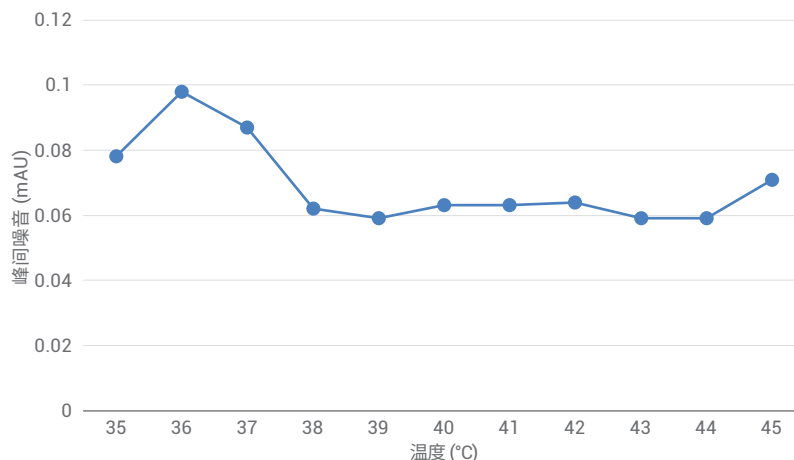


图 1. 确定可最大程度减小检测器噪音的柱后温度设置（参见于噪音测量的 SFC 方法）

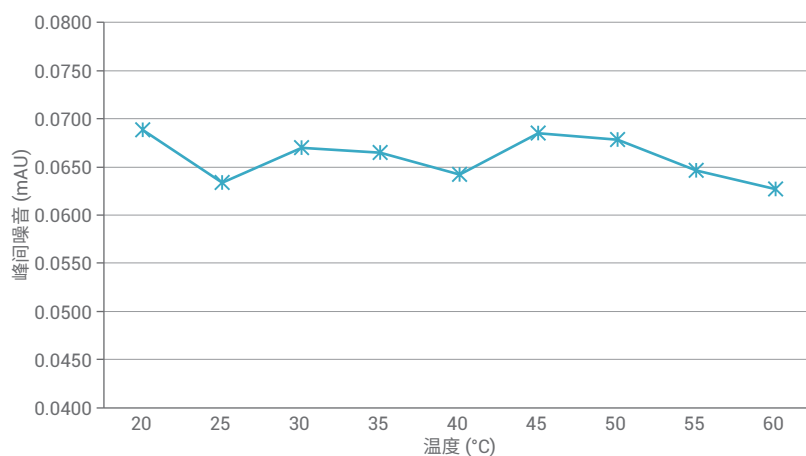


图 2. 峰间噪音与柱温之间的关系，结果表明在宽柱温范围内具有恒定的检测器噪音（参见于噪音测量的 SFC 方法）

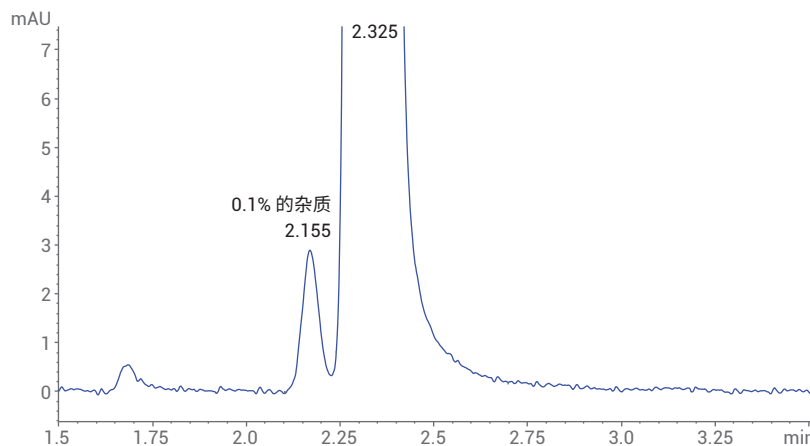


图 3. 在具有最小噪音的 SFC 系统上检测到的 0.1% 的低浓度杂质与主峰的对比

为评估柱温和柱前温度调节的稳定性，使用包含六种化合物的混合物。该混合物中包含保留特性对温度非常敏感且共洗脱具有温度依赖性的化

合物。在给定的条件下，六种化合物在 30 °C 的柱温下得到清晰的分离 (图 4)。

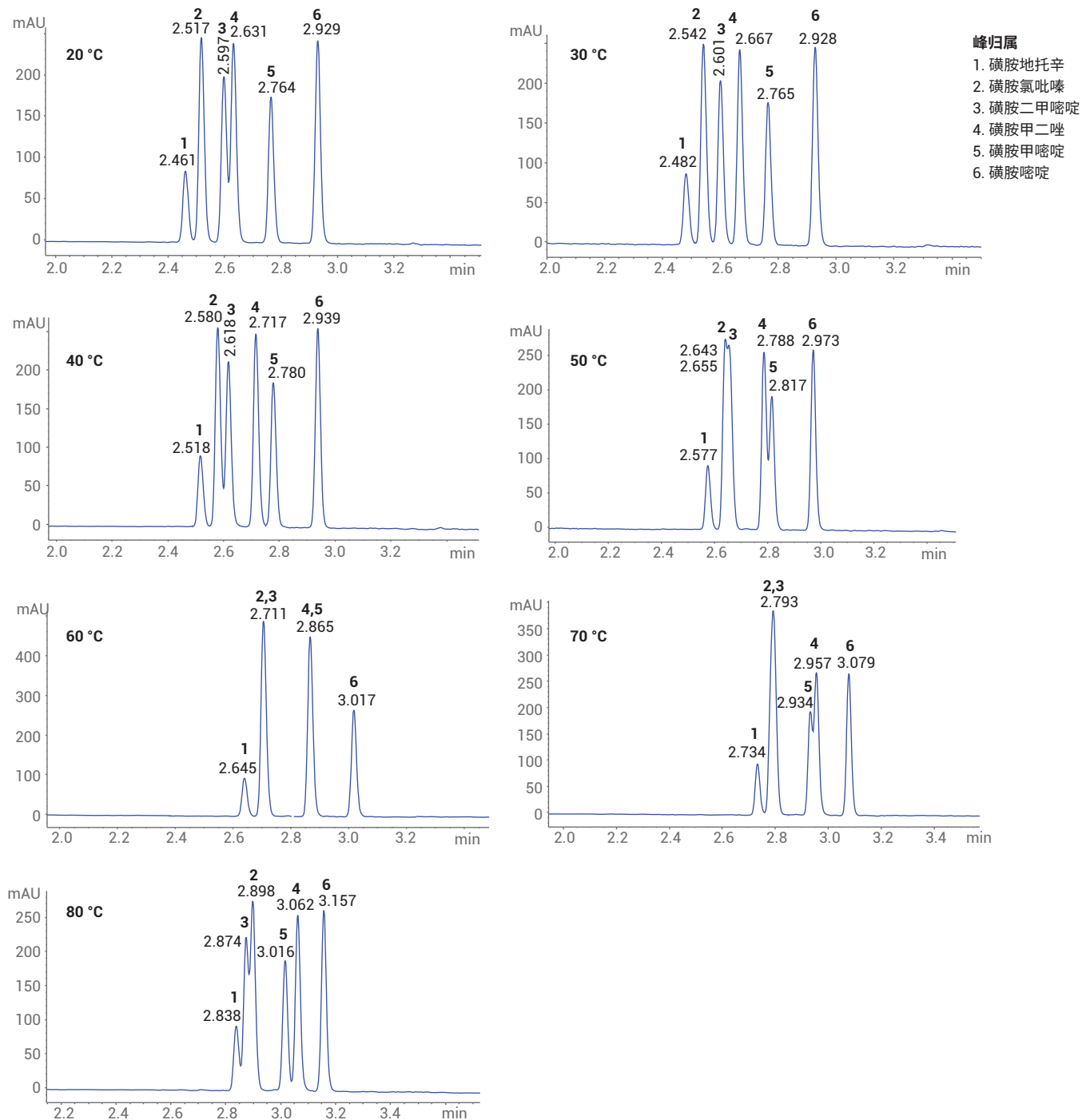


图 4. 六种化合物的洗脱行为与温度之间的关系。在 30 °C 下获得了最佳分离。在所有其他温度下保留时间均随温度变化出现漂移，甚至发生完全共洗脱和洗脱顺序颠倒 (参见用于温度稳定性测量的 SFC 方法)

在较低的柱温 (20 °C) 下, 峰 4 的保留时间减小, 并开始与峰 3 共洗脱。在较高的柱温 (40 °C) 下, 峰 2 和峰 4 的保留时间显著增加。在 50 °C 的柱温下, 峰 2 和峰 3 完全共洗脱。在 60 °C 的柱温下, 峰 4 和峰 5 也同样发生完全共洗脱。在更高的柱温 (70 °C) 下, 峰 4 和峰 5 开始再次分离, 但洗脱顺序相反。在实验所用的最高柱温 (80 °C) 下, 峰 4 和峰 5 再次表现出良好的分离。在该柱温下, 峰 2 和峰 3 也开始再次分离, 但与峰 1 发生部分共洗脱。为了更好地理解温度依赖性变化的整体情况, 对保留时间与温度作图 (图 5)。该图清楚地显示, 峰 4 和峰 5 在 60 °C 下完全重叠, 并且洗脱顺序在该温度上下发生颠倒。化合物 2 和 3 在 50–70 °C 的较宽温度范围内发生共洗脱, 并且洗脱顺序在该范围上下发生颠倒。在 80 °C 下, 化合物 1、2 和 3 的峰彼此紧邻洗脱, 未实现分离。

柱前加热温度的精密度和温度稳定性反映在保留时间 RSD 值中, 对所有化合物, 在每个所采用的柱温下运行 10 次, 计算得出这些值。为了解全面概况, 对所有数据点作图 (图 6)。图中显示, 在每个柱温下, 所有六种化合物的保留时间 RSD 差值通常分布在约 0.003%–0.01 % 的小范围内。例如, 对于常用柱温 40 °C 而言, RSD 介于 0.014% 和 0.022% 之间。表 1 汇总了所有的保留时间实测值和计算得到的 RSD 值。

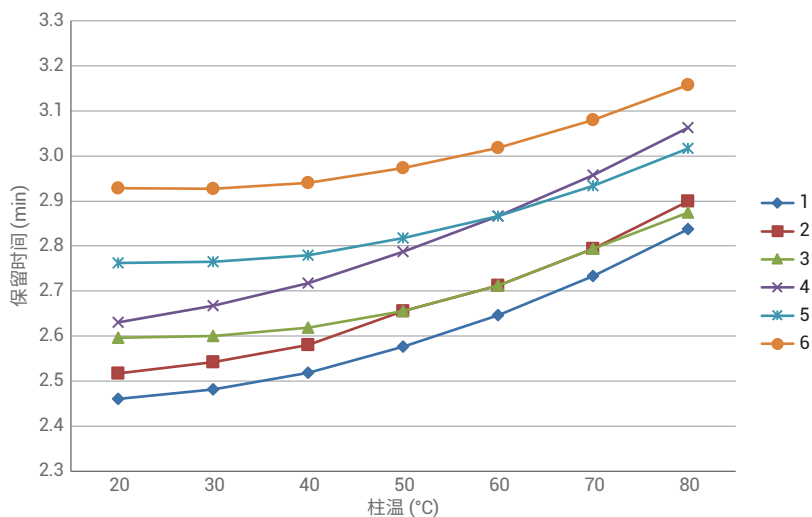


图 5. 保留时间与柱温之间的关系, 结果表明, 混合物中六种化合物的保留时间均发生了变化

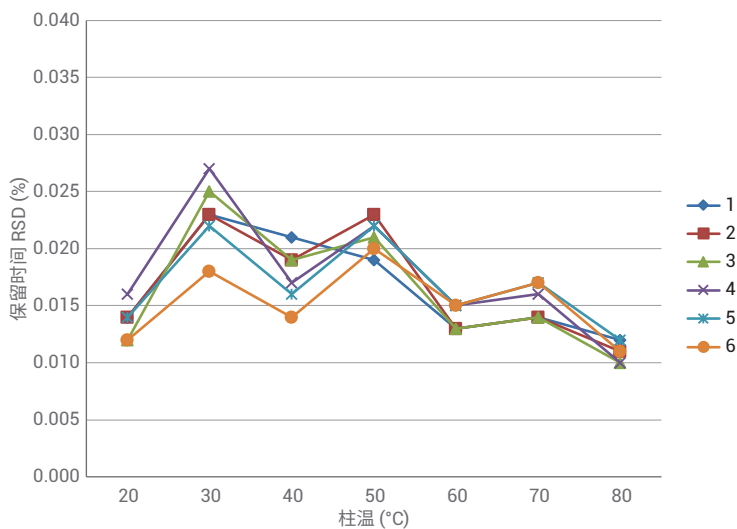


图 6. 在不同柱温下获得的六种化合物的保留时间 RSD (在每个温度水平下运行 10 次)

表 1. 在所有测量的温度水平下，所有六种化合物的平均保留时间和保留时间 RSD 值（每个温度水平下运行 10 次，参见用于温度稳定性测量的 SFC 方法）

化合物	20 °C		30 °C		40 °C		50 °C		60 °C		70 °C		80 °C	
	RT	RSD (%)	RT	RSD (%)	RT	RSD (%)	RT	RSD (%)	RT	RSD (%)	RT	RSD (%)	RT	RSD (%)
1	2.460	0.014	2.482	0.023	2.518	0.021	2.577	0.019	2.646	0.013	2.734	0.014	2.838	0.012
2	2.517	0.014	2.542	0.023	2.581	0.019	2.655	0.023	2.712	0.013	2.794	0.014	2.899	0.011
3	2.596	0.012	2.600	0.025	2.619	0.019	2.656	0.021	2.712	0.013	2.794	0.014	2.875	0.010
4	2.630	0.016	2.667	0.027	2.718	0.017	2.788	0.022	2.866	0.015	2.957	0.016	3.063	0.010
5	2.763	0.014	2.765	0.022	2.780	0.016	2.818	0.022	2.866	0.015	2.934	0.017	3.017	0.012
6	2.928	0.012	2.927	0.018	2.940	0.014	2.974	0.020	3.018	0.015	3.080	0.017	3.158	0.011

结论

本技术概述介绍了用于确定柱后温度的过程，以最大程度减小因色谱柱洗脱物和检测器流通池之间的温度差异引起的检测器噪音。对色谱柱洗脱物采用最佳柱后温度后，在 20–60 °C 的宽温度范围内测得的峰间检测器噪音约为 65 μ AU。这一低噪音水平非常优异，能够确保以高灵敏度测量浓度为 0.1% 甚至更低浓度的杂质。通过分析一组对温度非常敏感的化合物，测定柱温（通过柱前加热实现）的稳定性。在 20–80 °C 范围内获得的保留时间 RSD 值通常介于 0.010%–0.025% 之间。使用 Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱进行色谱柱加热和柱后温度调节，可实现这些优异的峰间噪音和保留时间 RSD 值。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

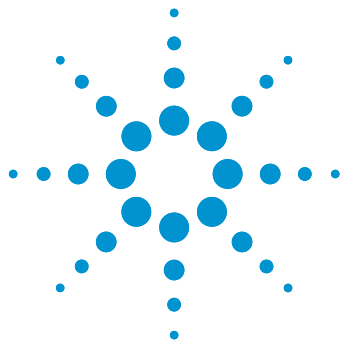
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-7625ZH-CN



Agilent Technologies

第 2 章

制药与生物制药应用



在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统上进行手性多色谱柱方法开发

应用简报

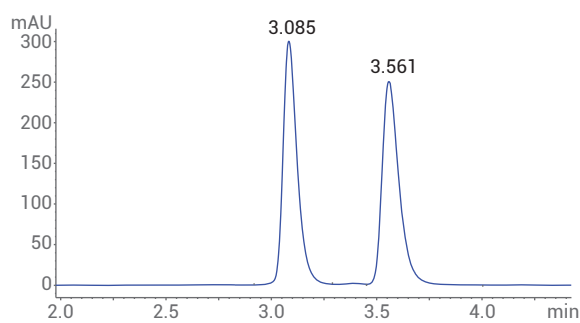
小分子药物

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了 Agilent ChemStation 方法筛选向导在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统上开发手性分离方法方面的应用。该 SFC 系统配备四色谱柱选择阀和四根不同的手性柱，用于不同等度分离条件下的筛选运行。



Agilent Technologies

前言

现代化 SFC 仪器的主要应用领域之一是分离对映异构体。在 SFC 仪器上，手性分离通常比正相 HPLC 上的经典分离过程快 10–20 倍。此外，用于 SFC 分离的溶剂危害较小，并且废液处理的成本低于正相溶剂。

本应用简报介绍了用于手性药物化合物对映异构体分离的软件辅助的方法开发。为此，使用四根手性柱，并在不同的等度溶剂组成条件下进行筛选。利用 Agilent ChemStation 方法筛选向导自动创建必要的方法以及所有冲洗和平衡步骤。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)

此外，运行 SFC 系统进行自动化方法开发需要使用以下部件：

- Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀（部件号 5067-4287）

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通阀 (G4235A)
- 利用四色谱柱选择阀进行方法开发的毛细管工具包（部件号 5067-6596）

仪器设置

Agilent SFC 二元泵配有 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通阀，支持在 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件的“仪器配置”对话框中选择最多 12 种不同的溶剂。这些溶剂在“泵设置”对话框中进行定义。对于“结果与讨论”部分所述的实验，仅使用其中一种溶剂。

Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀，并且色谱柱在 OpenLAB CDS ChemStation 版软件的“仪器配置”对话框中进行设置。借助方法开发毛细管工具包，可使用最多四根色谱柱。在“色谱柱表”中输入色谱柱，并在 MCT 对话框中进行分配。所有色谱柱

SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇 + 0.1% 二乙胺
SFC 流速	2.0 mL/min
等度洗脱	15%、20%、25% 和 30% 改性剂
停止时间	12 分钟
反压调节器 (BPR) 温度	60 °C
BPR 压力	140 bar
柱温	30 °C
进样量	5 µL
注入溶剂	甲醇；注入速度 400 µL/min；灌注体积 4 µL
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
二极管阵列检测器	230 nm/带宽 4 nm；参比 360 nm/带宽 100 nm；数据采集速率 10 Hz

均可与 ID 标签（部件号 5067-5917）配套使用，以便在 ChemStation 中自动识别并在 MCT 对话框中进行分配。

使用方法筛选向导创建色谱柱和梯度筛选以及仪器冲洗和色谱柱平衡所需的所有方法（图 1）。

色谱柱

- Chiral Technologies, Chiralpak IA, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IB, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IC, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak ID, 4.6 × 250 mm, 5 µm

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，版本 C.01.07 SR3，包括 LC 和 CE 驱动程序 A.02.16 以及 Agilent ChemStation 方法筛选向导 A.02.07 版。

样品

心得安，1 mg/mL 的甲醇溶液。

方法筛选向导设置

Step 2 of 8: Define screening campaign base

Screening methods are based upon the following method:
(Please make sure that this method has been saved.)
C:\CHEM32\2\METHODS\SFC Chiral MSW.M

Screening parameters / Modifications of the base method:

Column Screening
 Solvent Screening
 Gradient Screening
 Temperature Screening

Step 3 of 8: Set up column screening

Use	Name	Serial No.	Diameter [mm]	Length [mm]	Particle Size [µm]	Void Vol [mL]	Max Temp [°C]	App Max Temp [°C]	Min pH	Max pH	Max pressure [bar]	Eq. Factor	Color Code	Path	Column Host
<input checked="" type="checkbox"/>	Chiralpak IA	autoID-14	4.600	250.000	5.000	1.000	40.0	40.0	2.0	9.0	300	1.000	Blue	1	MCT1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chiralpak IB	autoID-15	4.600	250.000	5.000	1.000	40.0	40.0	2.0	9.0	300	1.000	Green	2	MCT1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chiralpak IC	autoID-16	4.600	250.000	5.000	1.000	40.0	40.0	2.0	9.0	300	1.000	Light Blue	3	MCT1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chiralpak ID	autoID-17	4.600	250.000	5.000	1.000	40.0	40.0	2.0	9.0	300	1.000	Red	4	MCT1

Step 4 of 8: Set up solvent gradient screening

Gradient	Run Time [min]	Post Time [min]	Flow [mL/min]
<input checked="" type="checkbox"/> Gradient 1	12.00	0.00	2.000
<input checked="" type="checkbox"/> Gradient 2	12.00	0.00	2.000
<input checked="" type="checkbox"/> Gradient 3	12.00	0.00	2.000
<input checked="" type="checkbox"/> Gradient 4	12.00	0.00	2.000

4 of 4 gradients selected.

Step 5 of 8: Review and select methods

#	Use	Method	Column	Gradient	Temp [°C]
1	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0001.m	Chiralpak IA (autoID-14)	Gradient 1	30.0
2	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0002.m	Chiralpak IA (autoID-14)	Gradient 2	30.0
3	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0003.m	Chiralpak IA (autoID-14)	Gradient 3	30.0
4	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0004.m	Chiralpak IA (autoID-14)	Gradient 4	30.0
5	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0005.m	Chiralpak IB (autoID-15)	Gradient 1	30.0
6	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0006.m	Chiralpak IB (autoID-15)	Gradient 2	30.0
7	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0007.m	Chiralpak IB (autoID-15)	Gradient 3	30.0
8	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0008.m	Chiralpak IB (autoID-15)	Gradient 4	30.0
9	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0009.m	Chiralpak IC (autoID-16)	Gradient 1	30.0
10	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0010.m	Chiralpak IC (autoID-16)	Gradient 2	30.0
11	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0011.m	Chiralpak IC (autoID-16)	Gradient 3	30.0
12	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0012.m	Chiralpak IC (autoID-16)	Gradient 4	30.0
13	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0013.m	Chiralpak ID (autoID-17)	Gradient 1	30.0
14	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0014.m	Chiralpak ID (autoID-17)	Gradient 2	30.0
15	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0015.m	Chiralpak ID (autoID-17)	Gradient 3	30.0
16	<input checked="" type="checkbox"/>	Injection0016.m	Chiralpak ID (autoID-17)	Gradient 4	30.0

图 1. 方法筛选向导能够通过一套包含 10 步的程序设置所述的手性筛选方案

例如，该设置在第 2 步定义不同的筛选选项，此处为色谱柱和梯度筛选。所有其他参数将用作所选主方法中的设置。在第 3 步中，将选择色谱柱进行色谱柱筛选。此处将定义一些参数，例如最大压力和最高温度，随后与最终方法进行比较以消除不兼容性。第 4 步定义所用的梯度，此处选择了四种等度条件。第 5 步中能够对将要创建的方法进行审查。其他步骤（未示出）将定义冲洗和平衡方法以及样品位置

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

结果与讨论

在本文所述的手性筛选方案中，利用四根不同的手性柱，并以强洗脱溶剂甲醇作为改性剂。该方案的目标是鉴别出一种快速分析方法，能够在最长 6 分钟的分析时间内使心得安对映异构体获得良好的基线分离。因此，使用包含 15%、20%、25% 和 30% 甲醇的等度溶剂组成。在手性柱 IA 上，可以看出采用 30% 甲醇时，两种对映异构体就已经开始分离，其保留时间分别为 3.25 分钟和 3.41 分钟。然而，直至甲醇含量降至 15% 时才接近基线分离，两者的保留时间分别为 7.68 分钟和 8.36 分钟。遗憾的是，所得到的峰形不佳，峰高降低，且绝对分析时间相对较长（图 2）。

筛选结果表明，采用手性柱 IB 实现了良好的分离（图 3）。在甲醇含量为 30% 时，对映异构体得到良好的基线分离，其保留时间分别为 4.49 分钟和 5.44 分钟。随着甲醇改性剂含量降低，两个峰的保留时间和距离增加，但是峰形仍然比较理想。

采用手性柱 IC 并以甲醇作为改性剂时，无法分离心得安对映异构体（图 4）。

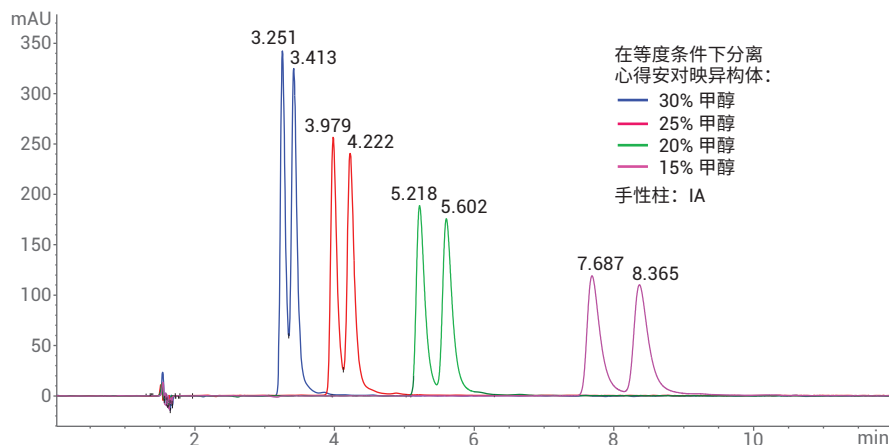


图 2. 采用甲醇作为改性剂时，心得安对映异构体在手性柱 IA 上的分离

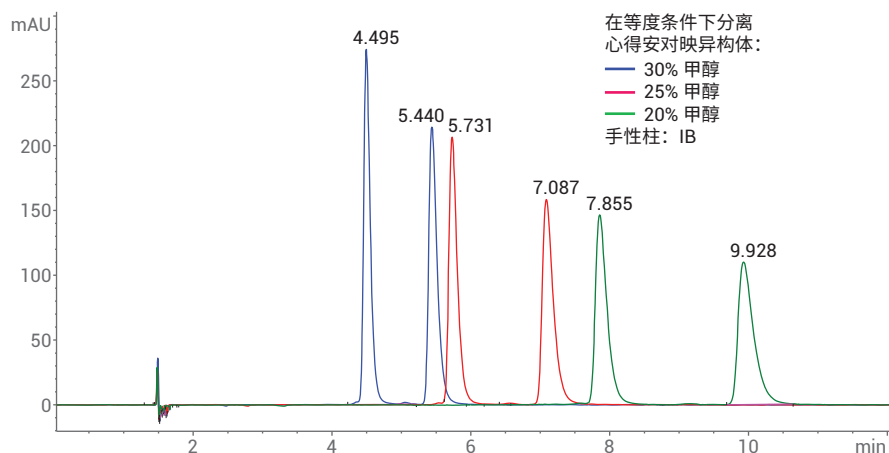


图 3. 采用甲醇作为改性剂时，心得安对映异构体在手性柱 IB 上的分离

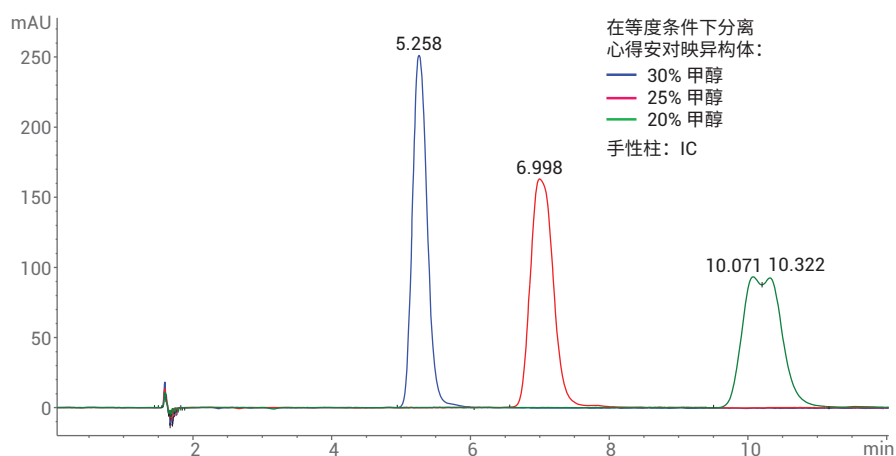


图 4. 采用甲醇作为改性剂时，心得安对映异构体在手性柱 IC 上的分离

在手性柱 ID 上, 当甲醇含量为 30% 时, 心得安对映异构体在 3.0 分钟时开始分离, 并且在甲醇含量为 25% 时在半峰高处存在一个峰谷 (图 5)。在此色谱柱上无法实现真正的基线分离。

为进行进一步优化, 选用手性柱 IB, 因为即使在高甲醇含量下, 该色谱柱所得到的色谱峰之间也有较大的间距, 便于加快分离速度。当流速从 2.0 mL/min 提高至 2.5 mL/min 并且柱温从 30 °C 升至 40 °C 时, 保留时间的范围从 4.0–6.0 分钟漂移至 3.0–3.7 分钟 (图 6)。这使得最终分析时间缩短至 4 分钟, 并且计算得出的保留时间 RSD 值分别为 0.11% 和 0.13%。

获得了良好分离的对映异构体还便于在分析型系统上轻松将其纯化, 并将光学纯形式的对映异构体收集到单个烧瓶中。为优化分离过程以获得最高产率, 使用高浓度溶液或大体积进样。在本例中, 使用 SFC Multisampler 能够实现 80 μ L 的大体积进样¹。本实验的目的是找出一种能够以高浓度使色谱柱过载, 但是仍然能够实现充分分离以收集馏分的方法 (图 7)。所鉴别出的方法使用等度溶剂组成并以 25% 甲醇作为改性剂, 在严重过载的色谱柱上使对映异构体在 5.9 分钟和 6.8 分钟处发生基线分离, 从而实现最佳的馏分收集。

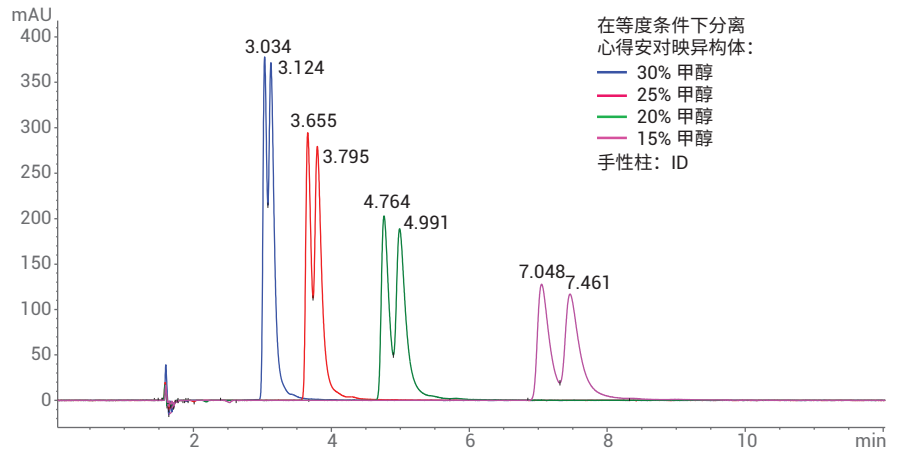


图 5. 采用甲醇作为改性剂时, 心得安对映异构体在手性柱 ID 上的分离

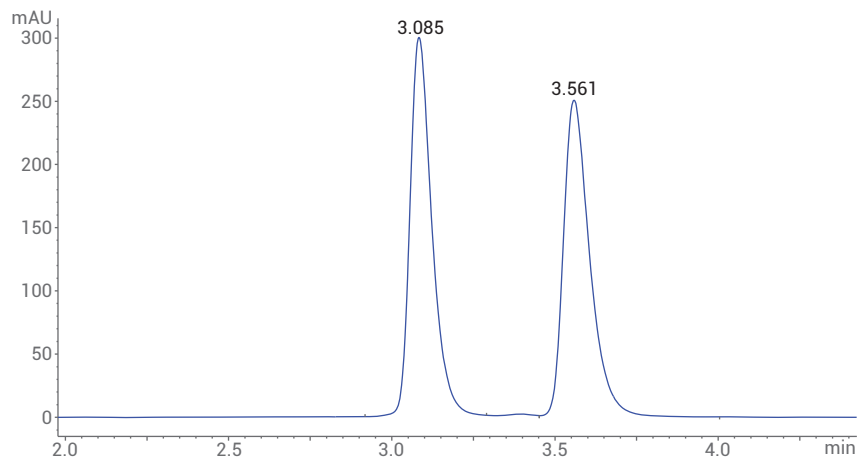


图 6. 最终速度经优化的心得安对映异构体分析分离方法 (流速: 2.5 mL/min, 温度: 40 °C, 有机溶剂: 30% 甲醇)

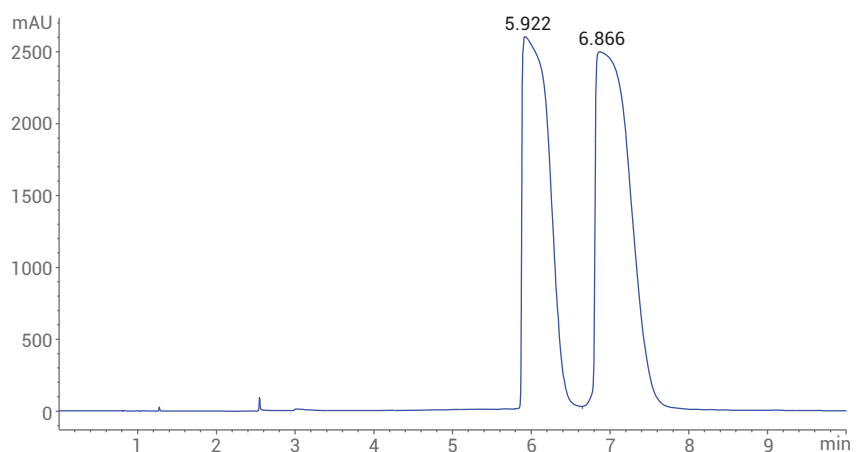


图 7. 用于心得安对映异构体的分析型制备分离的色谱柱过载实验。进样量为 80 μ L, 并且在采用 25% 甲醇时在等度条件下实现了基线分离 (注入速度: 100 μ L/min, 梯度: 0 分钟时 5% B, 1.0 分钟时 5% B, 1.1 分钟时 25% B, 停止时间: 10 分钟)

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统与安捷伦方法筛选向导进行软件辅助的方法开发。在不同等度条件下对四根手性柱进行了自动筛选，快速鉴别出了最佳分离条件。对鉴别出的条件进行快速优化后，能够在 4 分钟内实现两种对映异构体的分离。这一分离速度通常比利用正相色谱分离对映异构体的经典方法快 10 倍。最后，结果表明所鉴别出的方法还可用于对映异构体的分析型制备分离。

参考文献

1. Naegele, E. 在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱, *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-7623ZHCN, 2017

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

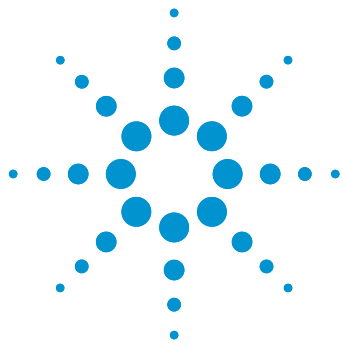
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-7624ZHCN



Agilent Technologies



利用超临界流体色谱分离大分子肽和小分子肽并利用质谱进行检测

应用简报

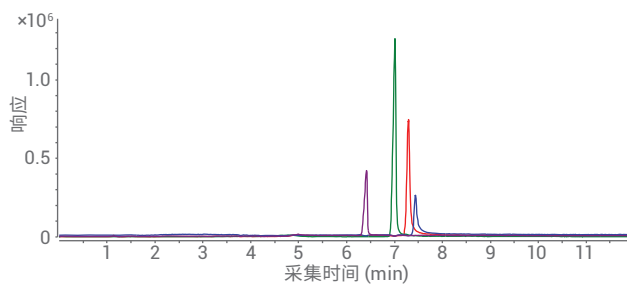
生物制剂与生物仿制药

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了超临界流体色谱 (SFC) 在分离二肽和三肽以及肽方面的应用。还表明了利用 SFC 能够分离小分子肽和大分子肽。采用质谱仪进行检测。对于具有不同电荷态的大分子肽，利用 Agilent MassHunter Bioconfirm 软件进行解卷积以测定肽的分子量。



Agilent Technologies

前言

如今，超临界流体色谱 (SFC) 可应用于不同分析领域 (如制药行业)。一家大型制药公司所撰写的科学综述中记录了这些应用¹。他们展示了 SFC/MS 在高通量 SFC/APPI-MS、超快速 SFC/MS、手性 SFC/MS 和 SFC/MS 分析肽和蛋白质方面的成功应用。在生物学上具有重要意义的跨膜蛋白质包含横跨细胞膜的由氨基酸组成的高疏水性螺旋结构区域。它们通常不溶于水，并且难以通过 RP-HPLC 进行分析。现在，SFC 已成功应用于分离高疏水性肽 (如短杆菌肽) 和内在膜蛋白 (如细菌视紫红质)^{1,2}。已报道了对长达 40 mer 且序列中包含各种碱性和酸性氨基酸的肽的分析³。

本应用简报介绍了利用 SFC 分离包含相似氨基酸序列的小分子肽和亲水性肽，并利用质谱对它们进行检测。作为大分子肽分离的示例，展示了对大分子肽胰岛素的分子量的测定。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A)，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity DAD，配备高压 SFC 流通池
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 安捷伦分流器套装 G4309-68715

仪器设置

图 1 显示了 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置。

色谱柱

Princeton Chromatography Inc.,
2-乙基吡啶柱，4.6 × 250 mm，5 μm

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件，07.01 版
- Agilent MassHunter 定性分析软件，07.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件，07.00 版
- Agilent MassHunter Bioconfirm 软件，07.00 版
- Skyline 软件，MacCoss 实验室软件，华盛顿大学，3.1 版，适用于肽的定量分析和靶向蛋白质组学⁴

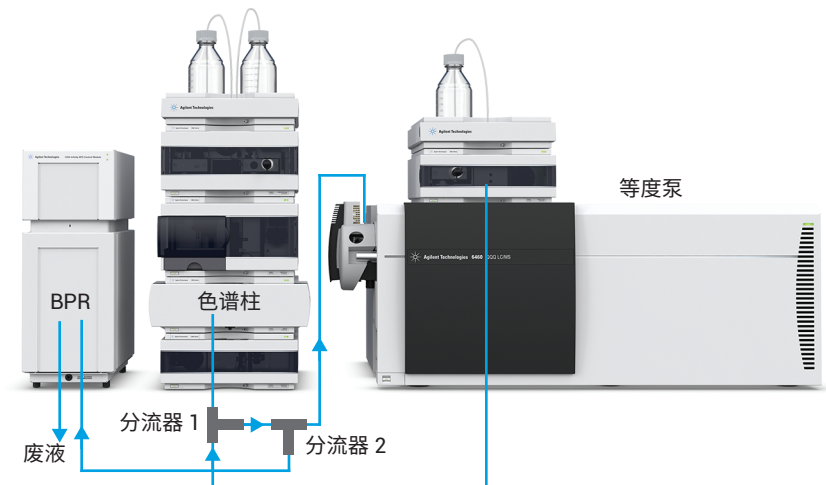


图 1. Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的配置。色谱柱直接连接至分流器组件中的分流器 1 (BPR = 反压调节器，不使用紫外检测器，分流器套装部件号 G4309-68715)

SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
SFC 梯度 1	0 分钟, 5% B; 10 分钟, 50% B
SFC 梯度 2	0 分钟, 25% B; 10 分钟, 75% B
停止时间	10 分钟
后运行时间	2 分钟
改性剂	甲醇 + 0.1% 三氟乙酸
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	150 bar
柱温	40 °C
进样量	5 µL, 定量环过量填充三倍

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS

参数	值
补偿流组成	甲醇/水 (95/5) + 0.1% 三氟乙酸
补偿流流速	0.5 mL/min

质谱方法

参数	值
电离模式	正离子
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
碎裂电压	130 V
用于分析肽的 SIM 模式	见表 1
用于分析血管紧张素 II 的 MRM 模式	离子对 1: 532.7 → 784.4, CE: 17 eV 离子对 2: 532.7 → 647.3, CE: 17 eV
扫描模式, 用于胰岛素	400–1600 m/z

表 1. 所分析的肽的分子量以及用于 SIM 检测的 m/z

肽	分子量	m/z
Gly-Tyr	238.2	239.2
Val-Tyr-Val	379.5	380.5
亮氨酸脑啡肽	555.3	556.3
甲硫氨酸脑啡肽	573.2	574.2
血管紧张素 I	1296.5	433.2
血管紧张素 II	1046.2	524.1
血管紧张素 III	931.1	466.5
血管紧张素 IV	774.9	388.5

标准溶液

用补偿溶剂将所有肽样品配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液, 并稀释或混合得到最终浓度为 100 µg/mL 的溶液。

化学品

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。所有溶剂均为 LC/MS 级。甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

结果与讨论

首先，利用 SFC 开发用于分析二肽和三肽以及小分子肽的肽分离方法。作为示例，在 2-乙基吡啶柱上，采用在 10 分钟内从 5% 升至 50% 的甲醇梯度对二肽和三肽进行分离（图 2A）。两种小分子肽得到明显的基线分离，且峰形尖锐。使用亮氨酸脑啡肽和甲硫氨酸脑啡肽作为小分子肽的示例。酪氨酸残基与吗啡的 3-羟基类似，对 δ -阿片受体起作用。两者均采用与用于小分子肽的相同的方法进行分离（图 2B）。在所选条件下，亮氨酸脑啡肽在 6.78 分钟处洗脱，而甲硫氨酸脑啡肽在 7.11 分钟处洗脱，两者均得到尖锐且基线分离的峰。所用的所有二肽和三肽以及脑啡肽五肽均以单电荷离子形式通过 SIM-MS 进行检测（表 1）。根据重复进样结果测得的保留时间精密度和峰面积精密度的分别优于 0.05% 和 1.75%（表 2）。

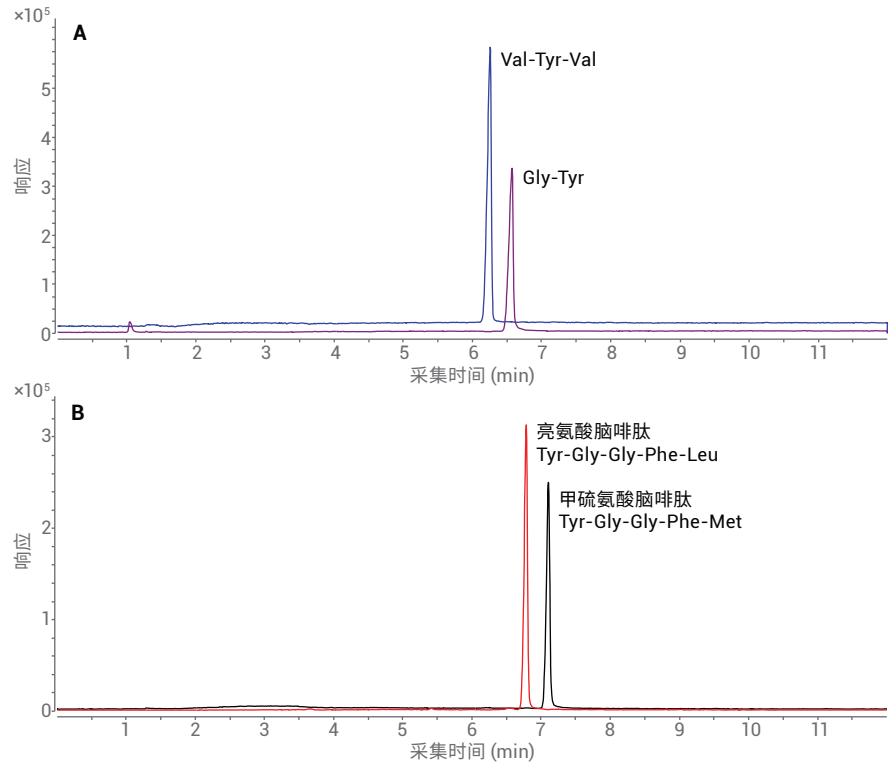


图 2. 利用 SFC 分离二肽和三肽以及肽（梯度 1），并利用 SIM-MS 进行检测。A) 二肽 Gly-Tyr 和三肽 Val-Tyr-Val 的分离（有关氨基酸的缩写，请参见表 4）。二肽 Gly-Tyr 在 6.59 分钟处洗脱，三肽 Val-Tyr-Val 在 6.25 分钟处洗脱，两者得到基线分离。B) 五肽亮氨酸脑啡肽（6.78 分钟）和甲硫氨酸脑啡肽（7.11 分钟）的分离

表 2. 二肽和三肽以及五肽亮氨酸脑啡肽和甲硫氨酸脑啡肽的保留时间、峰面积和 RSD 值

	Gly-Tyr		Val-Tyr-Val		甲硫氨酸脑啡肽		亮氨酸脑啡肽	
	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
平均值	6.596	1495481	6.254	2338841	7.107	892900	6.782	1094260
RSD (%)	0.03	1.74	0.03	1.53	0.04	1.48	0.04	1.36

作为更复杂的示例，采用前面开发的方法通过 SFC 分离不同的血管紧张素肽。血管紧张素 I 是由蛋白质血管紧张素原释放出的一种十肽，并且其本身没有活性。血管紧张素 I 的氨基酸进一步裂解，将释放出活性最高的血管紧张素 II 以及活性较低的血管紧张素 III 和 IV。在利用 SFC 对这些血管紧张素肽进行分离时，血管紧张素 IV 在 6.39 分钟处首先洗脱，然后血管紧张素 III 在 6.98 分钟处洗脱，血管紧张素 II 在 7.27 分钟处洗脱，最后血管紧张素 I 在 7.41 分钟处洗脱。在这一分离过程中，血管紧张素 II、III 和 IV 得到明显的基线分离，并且仅血管紧张素 I 和 II 表现出部分共洗脱，因为它们发生了一定程度的拖尾（图 3）。对样品重复进样分析十次，结果表明，保留时间和峰面积 RSD 分别低于 0.2% 和 2%（表 3）。利用 SIM-MS 对分离出的血管紧张素肽的三电荷和双电荷离子进行检测（表 1）。

如果根据目标肽设置离子对，则本研究中所用的 SFC 与三重四极杆质谱仪的组合能够实现肽的定量分析。作为示例，利用 Skyline 软件开发用于主要的活性血管紧张素 II 肽的动态 MRM (DMRM) 和 MRM 方法。该软件根据 Roepstorff 和 Pohlman⁵ 提出的肽碎裂方式创建可能的碎片离子（图 4）。自动创建三重四极杆采集方法，其中包含这些碎片的质量数和用于优化的不同碰撞能量。所采集的数据提供了具有最高强度的碎片及其最佳碰撞能量（图 5A）。肽碎裂情况、碰撞能量优化的所有重复测定以及自动生成的最终 DMRM 和 MRM 结果（图 5B）可一目了然地显示在 Skyline 软件中。

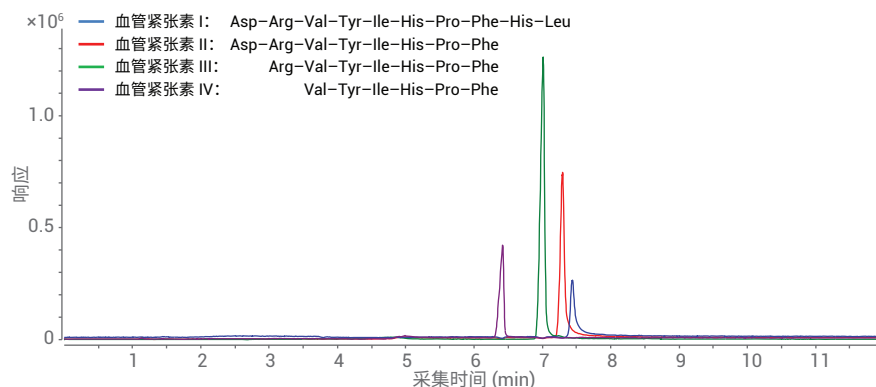


图 3. 利用 SFC 分离血管紧张素 I、II、III 和 IV（梯度 1）

表 3. 血管紧张素肽的保留时间、峰面积和 RSD 值

	血管紧张素 I		血管紧张素 II		血管紧张素 III		血管紧张素 IV	
	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
平均值	7.415	1544293	7.270	3327340	6.988	5476613	6.395	1802408
RSD	0.15	1.91	0.16	1.83	0.19	1.43	0.19	1.10

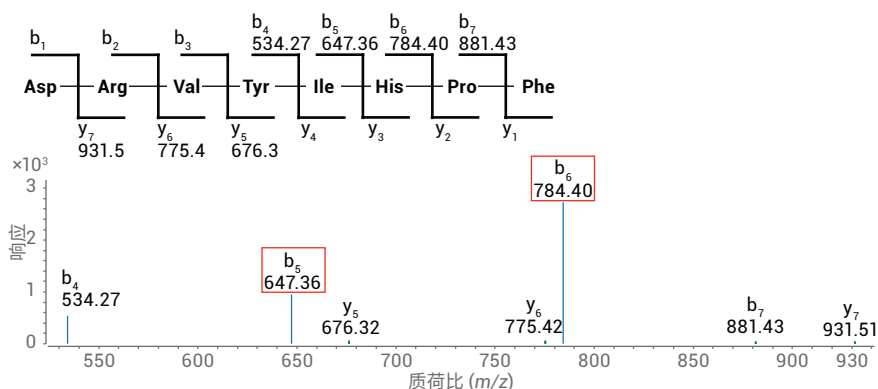


图 4. 血管紧张素 II 的碎裂方式示意图 (MW = 1046.2, $[M+2H]^{2+} = 532.7$) 以及由 MS/MS 谱图中鉴定出的碎片离子。最终 DMRM 和 MRM 方法使用碎片离子对 532.7 → 784.4 和 532.7 → 647.3

最后，作为大分子肽的示例，利用 SFC/MS 对胰岛素进行了分析。胰岛素是一种分子量为 5808 的肽分子，包含 51 个氨基酸。它是由分别包含 21 个和 30 个氨基酸的两条肽链组成的异质二聚体。这两条肽链通过两个半胱氨酸二硫键 (Cys-Cys) 连接。将溶于甲醇/水/三氟乙酸中的胰岛素溶液进样至 2-乙基吡啶柱，在所应用的梯度 2 条件下，在中间 4.987 分钟处洗脱为单峰 (图 6A)。提取质谱图表现出 $[M+4H]^{4+}$ 和 $[M+5H]^{5+}$ 两种电荷态，质量数分别为 1162.4 和 1452.6 (图 6B)。对电荷态质谱图进行解卷积后，测得的双链肽的分子量为 5807.3 (图 6C)。

表 4. 蛋白氨基酸与三字母缩写和代码

名称	缩写	代码
丙氨酸	Ala	A
半胱氨酸	Cys	C
天冬氨酸	Asp	D
谷氨酸	Glu	E
苯丙氨酸	Phe	F
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
赖氨酸	Lys	K
亮氨酸	Leu	L
甲硫氨酸	Met	M
天冬酰胺	Asp	N
脯氨酸	Pro	P
谷氨酰胺	Glu	Q
精氨酸	Arg	R
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
缬氨酸	Val	V
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y

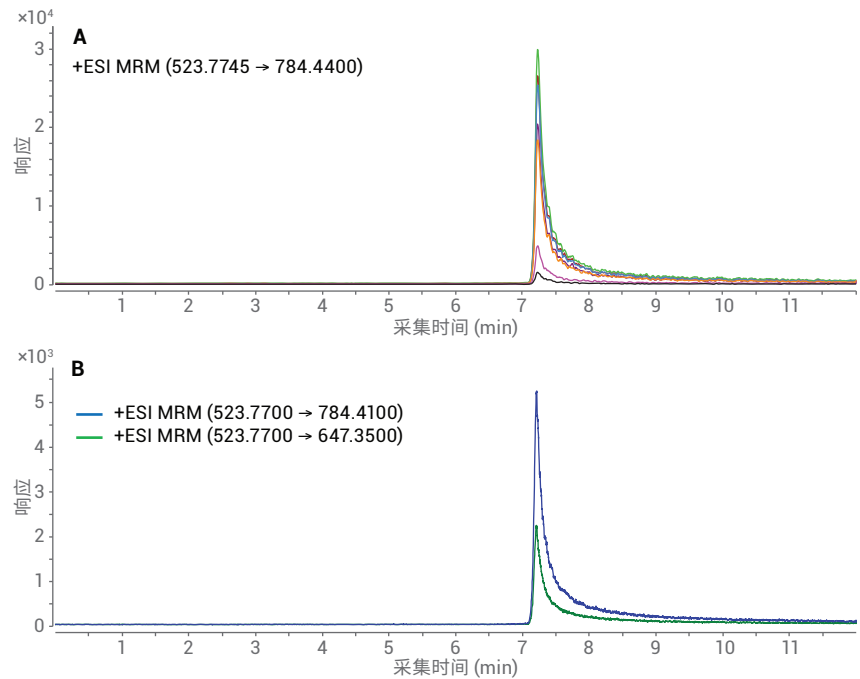
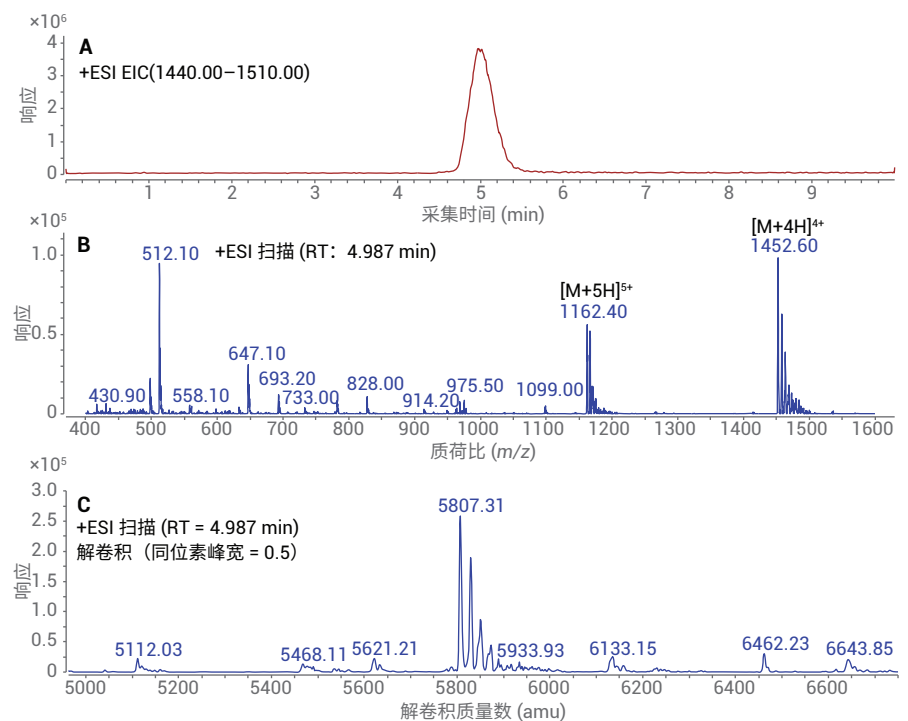


图 5. 碰撞能量优化和最终 MRM 测量。A) 离子对 523.77 → 784.44 的碰撞能量优化。B) 最终 MRM 测量，采用离子对 532.7 → 784.4 和 532.7 → 647.3

图 6. 利用 SFC/MS 分析胰岛素。A) 在 SFC 条件下，采用梯度 2 时，胰岛素从 2-乙基吡啶柱上洗脱得到的提取离子色谱图。B) 4.987 分钟处的胰岛素的质谱图，表现出两种电荷态，即 $[M+4H]^{4+}$ 和 $[M+5H]^{5+}$ 。C) 胰岛素的解卷积质谱图，表明分子量为 5807.3

结论

本应用简报介绍了利用 SFC/MS 对二肽和三肽、小分子肽和大分子肽的分析。在改性剂含量通常高达 50% 的梯度中，肽发生洗脱。测得的保留时间 RSD 通常低于 0.2%，并且峰面积 RSD 通常低于 2%。作为示例，借助 Skyline 软件创建了用于八肽血管紧张素 II 的 MRM 方法。本研究证明了 SFC/三重四极杆组合对肽的分析能力。最后，利用 SFC/MS 对大分子肽胰岛素进行了分析，并对测得的电荷态进行解卷积实现了对分子量的测定。

参考文献

1. Bolanos, B.; *et al.* SFC/MS in drug discovery at Pfizer, La Jolla, *International Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *238*, 85–97
2. Zang, X.; *et al.* Membrane Protein Separation and Analysis by Supercritical Fluid Chromatography – Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 2590–2598
3. Zheng, J.; *et al.* Feasibility of Supercritical Fluid Chromatography Mass Spectrometry of Polypeptides with up to 40-mers. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1535–1545
4. Agilent Triple Quadrupole LC/MS Peptide Quantitation with Skyline – Workflow Guide (利用安捷伦三重四极杆 LC/MS 并借助 Skyline 进行肽定量分析 — 工作流程指南), 安捷伦科技公司, 出版号 5990-9886EN, **2012 年 4 月**
5. Roepstorff, P.; Pohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

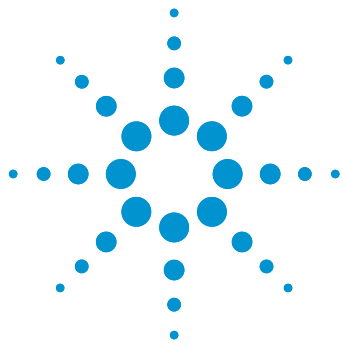
© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-6435ZHCN



Agilent Technologies

第 3 章

食品检测与农业应用



使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱检测分析蔬菜中的农药

应用简报

食品检测与农业

作者

Edgar Naegele 和 Thomas Glauner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了对分离方法的优化，该方法利用超临界流体色谱 (SFC) 与三重四极杆质谱检测来测定复杂食品基质中的农药。利用不同陡度的多个梯度分析其中加入了不同浓度的多农药标准品的蔬菜基质。利用软件辅助的批次比较确定最佳分离条件，以鉴定具有最低基质影响的梯度。



前言

农药广泛用于各种植物食品（如蔬菜、水果、玉米和谷物）的生产过程，以防止各种害虫。在植物类食品上市之前，必须对其中可能存在的农药残留进行检测，这些农药残留必须满足法定限值要求¹。因此，必须对完整的植物食品样品进行提取并将其转换为可分析的形式，通常是溶于有机溶剂中的溶液。这一提取过程主要通过 QuEChERS 程序完成²。现有技术是利用 HPLC 与三重四极杆质谱检测来分析这类样品。遗憾的是，在样品前处理过程中，不仅提取了残留农药，还提取了组成基质的天然固有化合物。当农药和基质化合物同时从 HPLC 色谱柱上洗脱下来时，它们将在质谱仪的离子源中竞争电离。这妨碍了对复杂食品基质中农药的准确定量分析。如果存在的基质化合物大大过量，则它们可能完全抑制农药的电离。

所有化合物在色谱柱上获得良好的分离可有助于避免这种情况，并能对分析物的质谱检测产生巨大的影响。因此，精心优化分离过程与调整质谱参数同样重要³。为比较几种分离条件，可执行批量分析，并且鉴别出最佳条件以实现最优且最广泛的检测。

在本应用简报中，首先优化了超临界流体色谱 (SFC) 分离并对不同的分离条件进行了批次比较，然后利用 SFC 和三重四极杆质谱检测复杂食品基质中的农药。对使用质谱分析植物食品样品中的农药而言，采用 SFC 作为前端分离技术的优势体现在分离速度、正交选择性以及对样品前处理过程中所用有机溶剂的进样耐受性这几方面。

实验部分

仪器

所有实验均在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 上完成，该系统包括：

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 自动进样器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 分流器套装 (G4309-68715)

仪器设置

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置如图 1 所示。色谱柱直接连接至分流器组件，该分流器组件包含两个组合分流器、一个额外的单向阀用于防止 CO₂ 流回辅助泵以及一个溶剂过滤器。在第一个分流器处，来自等度泵的补偿液被引入流路中。该分流器通过内径为 0.12 mm 的短毛细管连接至第二个分流器。在这里，液流被分为两部分，一部分进入质谱仪，另一部分进入 SFC 模块的反压调节器 (BPR)。利用新开发的内径为 50 μm 且长度为 1 米的不锈钢毛细管实现与质谱仪的连接，该毛细管包含在分流器套装中。分流比取决于该限流毛细管产生的反压和 BPR 所设置的压力。根据经验，SFC 反压为 120 bar 时，分流至离子源的 SFC 流量约 0.45 mL/min，反压为 200 bar 时，分流至离子源的流量约 0.6 mL/min。由于电喷雾质谱检测取决于浓度，因此对信号强度无影响。

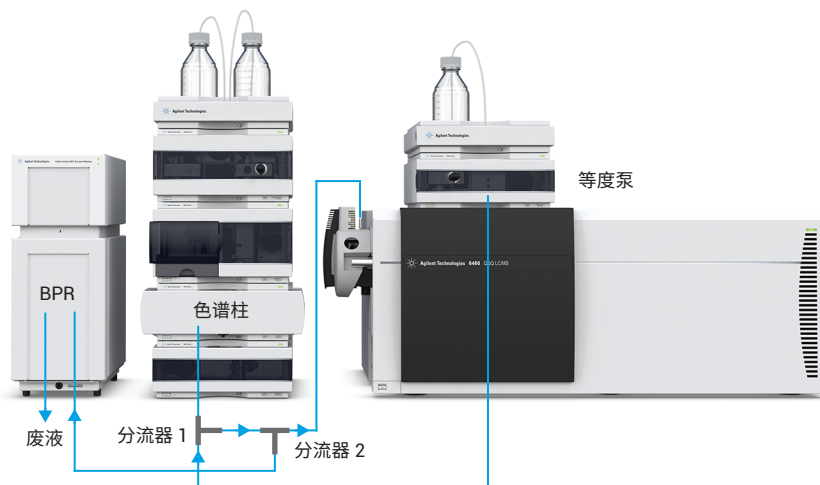


图 1. Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的配置。色谱柱直接连接至分流器组件中的分流器 1

色谱柱

Agilent ZORBAX NH2, 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 883952-708)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件, 06.00 版, 包括 SFC 附加软件
- Agilent MassHunter 定性分析软件, 06.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件, 07.00 版

标准品

包含 17 种农药的乙腈溶液 (各自浓度为 10 ng/μL) 混标购自 LGC Standards GmbH (农药混标 44, 部件号 18000044; Mercatorstrasse 51, 46485 Wesel, Germany)。在本研究中, 未考察固有的农药降解产物脱乙基莠去津, 因为它与蔬菜和水果无关, 而是莠去津在土壤和水中的降解产物。

化学品

所有溶剂均为 LC/MS 级。乙腈和甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
SFC 梯度 1	0 分钟, 2% B; 5 分钟, 20% B; 5.1 分钟, 50% B 停止时间 7 分钟 后运行时间 2 分钟
SFC 梯度 2	0 分钟, 2% B; 10 分钟, 20% B; 10.1 分钟, 50% B 停止时间 12 分钟 后运行时间 2 分钟
SFC 梯度 3	0 分钟, 2% B; 15 分钟, 20% B; 15.1 分钟, 50% B 停止时间 17 分钟 后运行时间 2 分钟
SFC 梯度 4	0 分钟, 2% B; 8 分钟, 12% B; 8.1 分钟, 50% B 停止时间 10 分钟 后运行时间 2 分钟
改性剂	甲醇
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	120 bar
柱温	40 °C
进样量	5 μL, 定量环过量填充 3 倍

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS

参数	值
补偿流组成	乙腈 + 0.2% 甲酸
补偿流流速	0.5 mL/min
流速梯度	0 min 时, 0.5 mL/min; 5、10、15 或 8 min 时, 0.3 mL/min

质谱方法

参数	值
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
MRM 条件	见表 1

表 1. 所用混合物中固有农药化合物的 MRM 条件，由 MRM 优化程序获得（驻留时间 10 ms，碰撞池加速电压 5 V）

	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (eV)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (eV)
异丙甲草胺	284.1	90	252.1	12	176.1	24
吡啶草胺	278.1	70	210.1	4	134.1	20
溴谷隆	259.0	85	170.0	16	148.1	12
环嗪酮	253.1	85	171.1	12	71.1	32
利谷隆	249.0	85	181.1	12	159.9	16
氟草津	241.1	100	214.1	12	104.1	32
敌草隆	233.1/235.1	95	72.1	20	72.1	20
甲氧隆	229.1/231.1	135	72.1	16	72.1	16
特丁津	230.1	55	174.1	12	104.1	32
另丁津	230.1	85	174.1	12	104.1	36
噻唑隆	222.1	65	165.1	12	150.0	36
莠去津	216.1	85	174.0	16	104	28
绿谷隆	215.1	95	148.0	16	125.9	12
绿麦隆	213.1/215.1	65	72.1	20	72.1	20
异丙隆	207.1	95	165.0	12	72.1	20
西玛津	202.1	105	132.1	16	124.1	16

样品前处理

芝麻菜购自当地蔬菜水果店。根据官方的柠檬酸盐缓冲 QuEChERS 方案，使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒（部件号 5982-5650）萃取样品。称取 10 g 均质芝麻菜样品至 50 mL 聚丙烯管中，并加入 10 mL 乙腈，用手剧烈振摇萃取 1 分钟。加入包含 4 g 无水 MgSO₄、1 g NaCl 和 1.5 g 缓冲柠檬酸盐的萃取盐包后，将混合物再次振摇 1 分钟，然后以 3000 rpm 的转速离心 5 分钟。

在相分离后，将 6 mL 上层乙腈相转移至 Agilent BondElut QuEChERS EN 分散式 SPE 管（部件号 5982-5256），该管中包含用于样品净化的 150 mg N-丙基乙二胺 (PSA) 和 15 mg 石墨化炭黑以及用于除水的 900 mg 无水 MgSO₄。将管密封，并再次振摇 1 分钟。然后，以 3000 rpm 的转速将管离心 5 分钟。将 4 mL 最终提取物转移至干净的聚丙烯样品瓶中。为改善目标农药的稳定性，将 40 μL 甲酸加入最终提取物中。

结果与讨论

为评估基质效应，在芝麻菜样品的最终 QuEChERS 提取物中加入农药溶液，并使浓度达到 10、20 和 100 ppb。选择 10 ppb 作为最低加标浓度，因为在所采用的所有梯度条件下，能够对标准溶液中各自浓度为 10 ppb 的所有农药实现正确的检测。10 ppb 的浓度也是蔬菜和水果中农药检测的典型性能要求。所用的芝麻菜基质是蔬菜和水果分析中比较复杂的基质之一。在此次对比中，采用梯度 1 作为参比分离。为了进行比较，将分析时间从 10 分钟增加至 15 分钟，由此生成梯度较低的其他两种梯度，同时保持有机改性剂的最终最高含量。在最平缓的梯度（梯度 3）下，采用约 10% 的有机改性剂时，具有最高保留特性的农药化合物在 7.5 分钟时洗脱。因此，在最佳梯度 4 下，有机物含量在 8 分钟内增加至最终浓度，即 12% 的甲醇。随后，将有机物含量增加至 50%，以除去色谱柱中剩余的基质化合物。图 2 显示了在梯度 4 的条件下，混标中浓度为 10 ppb 的 16 种标准农药混合物的分离结果。

为评估不同梯度下的基质效应，对加标芝麻菜提取物与校准标样的分离进行比较。在 MassHunter 定量分析软件中，将浓度为 10 ppb 的标准溶液设置为 100%，并用作单点校准。通过这种方式，在批处理表格中标记出加标样品的峰值强度变化以进行快速批量查看。将该表格转换为图 3 所示的柱状图，一目了然地显示出结果。在比较通过梯度 1 分析的纯标准溶液与通过相同梯度分析的基质中的加标样品时，由于存在基质抑制，因此化合物的强度通常有所降低。

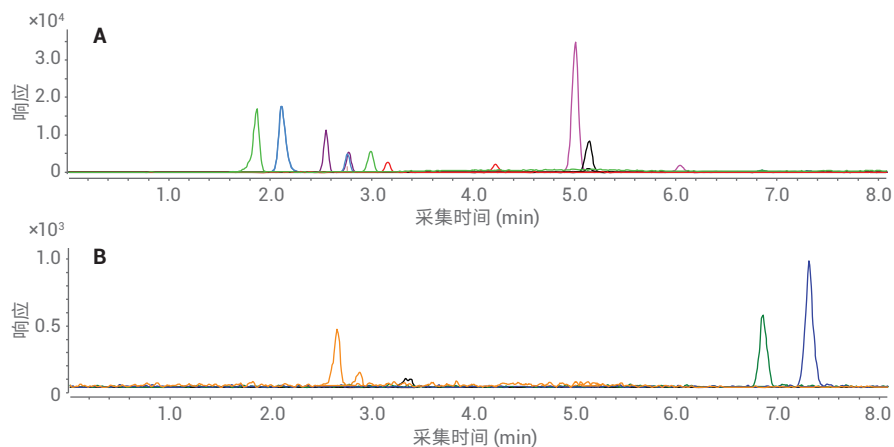


图 2. A) 利用梯度 4 对浓度为 10 ppb 的所有 16 种标准农药化合物的分离。B) 浓度为 10 ppb 时，丰度最低的五种农药化合物

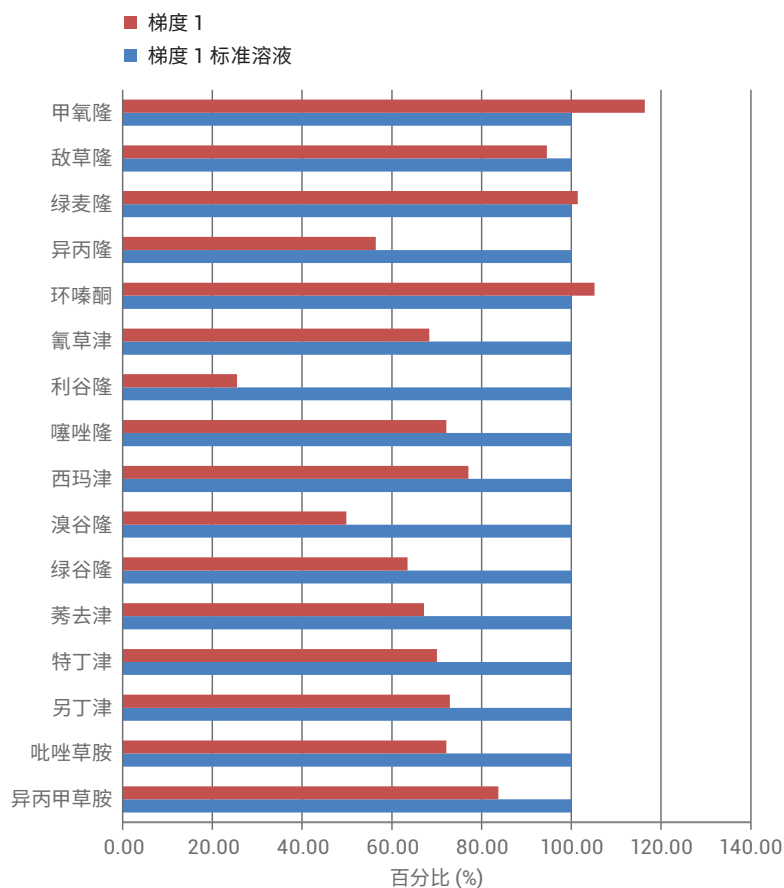


图 3. 芝麻菜基质（红色）与标准溶液（蓝色）中 16 种农药化合物的基质抑制效应对比

将梯度改为有机改性剂以较低的陡度增加，可以改善目标化合物与基质化合物的分离，并减小由高丰度基质化合物引起的抑制效应，从而获得更高的信号强度。

为了证明这一点，还采用梯度 2、3 和 4 对所述加标样品和标准品进行了分析。利用 MassHunter 定性分析软件对完整批次的样品和标准品进行比较。利用在各个梯度下获得的标准品的峰面积值作为单点校准的基础，对加标样品进行比较。基质效应的比较显示在图 4 所示的图表中。从中可以看出，对于大多数化合物而言，平缓的梯度 2、3 和 4 相比于最快的梯度 1 信号强度有所改善。通常，最平缓的梯度 4 可提供最高的信号强度。例如，农药化合物异丙隆的色谱图显示，采用梯度 2 至 4 获得的加标基质样品的响应相比于采用初始梯度 1 所获得的色谱图有所增强（图 5）。这种信号增强可能是由于目标化合物与基质背景获得了更出色的分离，由此实现了更高的电离产率。氰草津、莠去津和特丁津这三种化合物除外，它们在采用梯度 1 时获得了更高的强度。然而，由于采用梯度 4 使大多数化合物获得了更高的强度，并且大多数化合物的回收率介于 70% 和 120% 之间，因此利用该梯度进行后续实验。

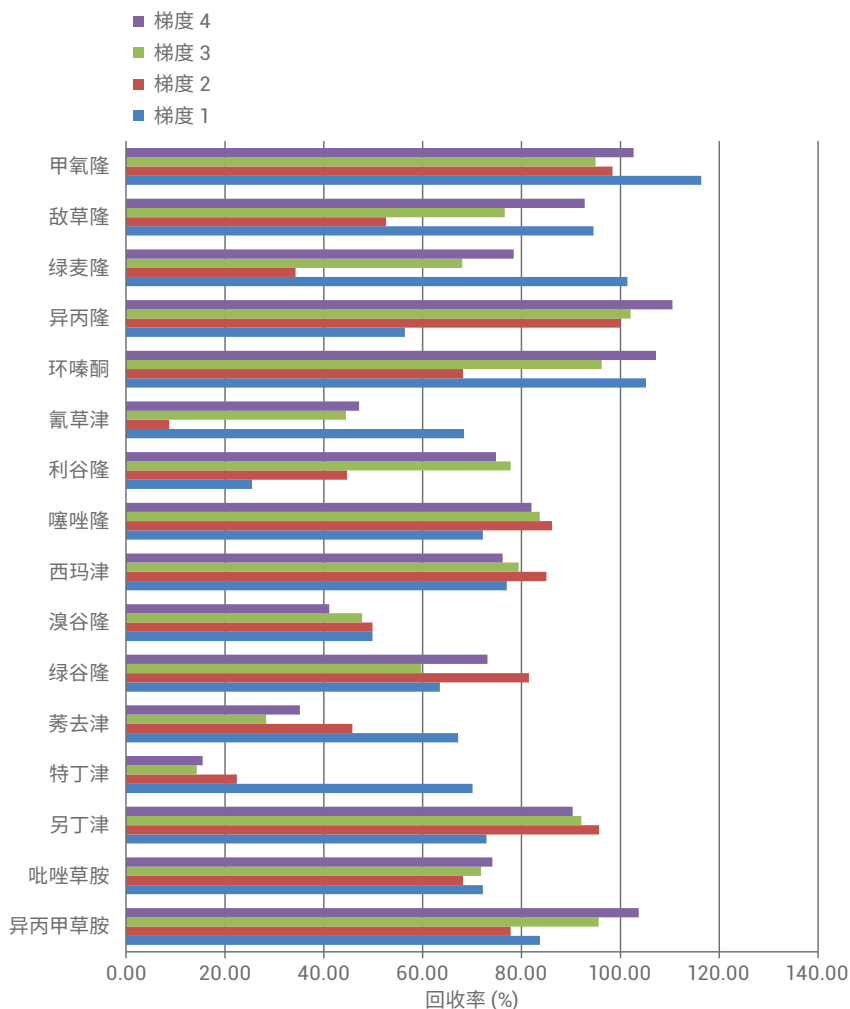


图 4. 在不同陡度的不同梯度下获得的基质效应对比。对于大多数化合物而言，采用梯度 4 所获得的基质效应最低

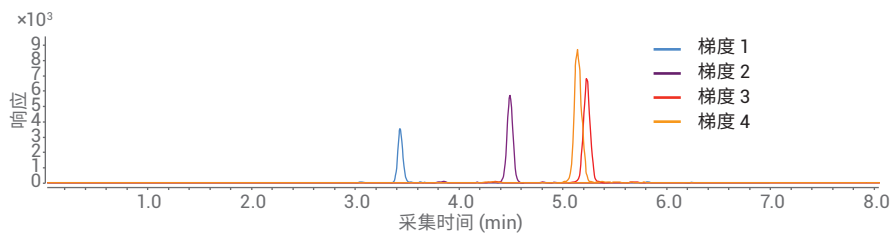


图 5. 在所用的四种不同陡度的梯度下获得的异丙隆的信号强度

最后，在梯度 4 的条件下，基于浓度为 10、20 和 100 ppb 的溶剂校准完成对芝麻菜提取物的定量分析。利用芝麻菜基质中标浓度相同的化合物作为样品。对实测浓度的比较显示出以相对百分比表示的基质效应（图 6）。根据 SANCO 指南 SANCO/12571/2013，表观回收率 70%–120% 是可接受的⁴。在考察的浓度范围内，每种化合物的基质效应非常类似（图 6）。与溶剂校准进行比较时，所检测的大多数化合物的回收率都处于 70%–120% 的可接受范围。两种化合物莠去津和特丁津的定量分析回收率低于 50%。稀释是最大程度减小复杂样品中基质效应的通用方法。以 1:10 的比例使用乙腈对农药加标浓度为 100 ppb 的 QuEChERS 提取物进行稀释，莠去津和特丁津的回收率分别为 87% 和 85%，处于可接受的范围。所有化合物的校准线性、计算得出的定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD) 汇总于表 2 中。

结论

本应用简报证明了在利用 SFC 与三重四极杆质谱仪测量蔬菜和水果样品中的农药时，优化 SFC 分离对样品基质的影响的重要性。优化所用的梯度可改善分析物与高丰度基质化合物之间的分离，有助于降低检测限。检测的所有农药均满足所需的 10 ppb 的 LOQ，并且基于溶剂校准，大多数化合物定量分析的回收率均处于所需的 70%–120% 范围内。此外，SFC 仪器的优势在于，分离速度更快，并提高了直接来自 QuEChERS 样品前处理的溶于纯有机溶剂中的样品的可用性。

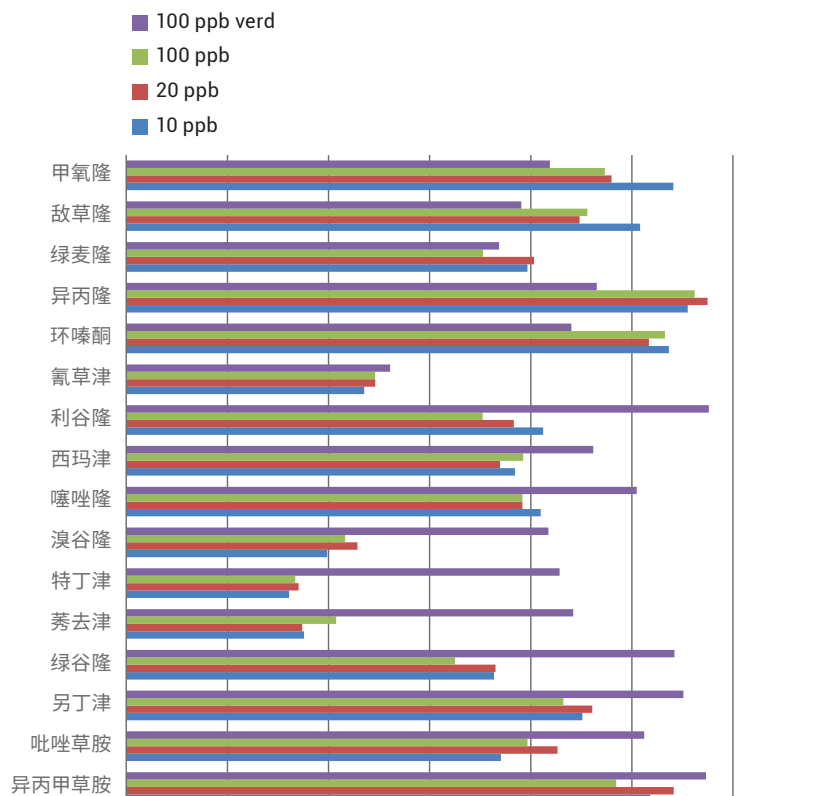


图 6. 加标样品与标准溶液校准的对比。基质效应通常在 70%–120% 范围内。另外，可通过样品稀释最大程度减小基质效应

表 2. 校准结果汇总，显示了各种化合物的线性、LOQ 和 LOD

10 ppb	RT	LOD	LOQ	R ²
异丙甲草胺	1.869	0.08	0.25	0.9991
吡唑草胺	2.117	0.12	0.40	0.9990
另丁津	2.554	0.55	1.83	0.9993
绿谷隆	2.647	1.77	5.90	0.9993
莠去津	2.754	0.06	0.20	0.9993
特丁津	2.776	0.08	0.25	0.9995
溴谷隆	2.866	2.49	8.30	0.9991
噻唑隆	2.993	0.05	0.18	0.9994
西玛津	3.158	0.24	0.80	0.9995
利谷隆	3.307	3.00	10.00	0.9990
氟草津	4.219	0.20	0.66	0.9992
环嗪酮	5.006	0.03	0.10	0.9995
异丙隆	5.142	0.04	0.13	0.9998
绿麦隆	6.046	0.23	0.77	0.9991
敌草隆	6.846	0.87	2.90	0.9992
甲氧隆	7.287	0.30	1.00	0.9992

参考文献

1. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107, **2009**
2. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., Schenk, F.J., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International* **2003**, Vol. 86, No. 2, 412-431
3. Naegele, E., Analysis of Pesticides by Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry - Optimizing the Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System in Combination with the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS (利用超临界流体色谱/质谱分析农药 — 优化 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的组合), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5256EN, **2014**
4. European Commission: Health & Consumer Protection Directorate – Safety of the Food Chain: Chemicals, Contaminates and Pesticides, Guidance Document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013, rev.0

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

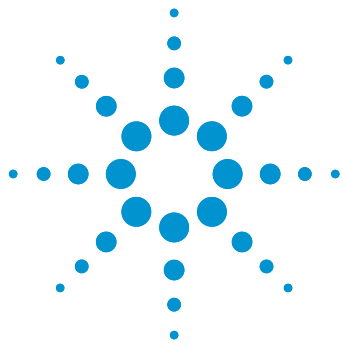
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-5443ZHCN



Agilent Technologies



使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱检测开发多农药分析方法

应用简报

食品检测与农业

作者

Edgar Naegele 和 Thomas Glauner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统结合 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪开发用于多农药分析的超临界流体色谱 (SFC) 方法。利用最终的多农药分析方法在一次分析中测定 200 多种农药。在不同的水果和蔬菜基质中加入处于相关浓度范围内的各种浓度的农药，并对其定量分析。展示并讨论了各个校准和性能数据。



Agilent Technologies

前言

如今，市面上销售的农药化合物有数百种，它们在全球范围内用于保护植物食品（如蔬菜、水果、玉米和谷物）免受各种害虫影响。在植物类食品上市之前，必须对其中可能存在的农药残留进行检测，并且这些农药残留必须满足法定限值要求¹。大量可能的农药-基质组合使得用于定量测定食品中农药的方法必须能对可能的化合物范围实现最广泛的覆盖。通常利用 HPLC 方法与质谱相结合来对这些化合物进行分析，其中化合物通过液相色谱分离，并利用三重四极杆质谱法在多反应监测 (MRM) 模式下进行选择检测。之前介绍了对农药的超临界流体色谱 (SFC) 分离方法的优化、对其质谱检测的优化以及基质化合物的影响^{2,3}。

与 HPLC 相比，SFC 能够使用更经济的溶剂（如二氧化碳）和危害较小的溶剂（如甲醇或乙醇），降低溶剂废液处理成本，并缩短分析时间。必须对完整的植物食品样品进行提取并将其转换为可分析的形式，通常是溶于有机溶剂中的溶液。该提取主要通过 QuEChERS 程序完成⁴，并利用 HPLC/三重四极杆质谱对最终提取物进行分析。虽然纯溶剂（如乙腈）中的样品提取物在 HPLC 中通常会影晌早洗脱化合物的峰形，但是它们可直接用于 SFC 进样。

本应用简报介绍了在优化多农药标准品的 SFC 分离后，利用 SFC 与三重四极杆质谱检测复杂食品基质中的 200 多种残留农药。在植物食品样品的农药分析中，采用 SFC 作为质谱分析的前端分离技术的优势体现在分离速度、与液相色谱的正交选择性以及对样品前处理过程中所用有机溶剂的进样耐受性这几方面。展示了所选的各种化合物的检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、线性、保留时间和峰面积 RSD 数据。

实验部分

仪器

所有实验均在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 上完成，该系统包括：

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 自动进样器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 分流器套装 (G4309-68715)

仪器设置

图 1 显示了 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置。色谱柱直接连接至分流器组件，该分流器组件包含两个组合分流器、一个额外的单向阀用于防止 CO₂ 流回辅助泵以及一个溶剂过滤器。在第一个分流器处，来自等度泵的补偿流被引入流路中。该分流器通过内径为 0.12 mm 的短毛细管连接至第二个分流器。在这里，液流被分为两部分，一部分进入质谱仪，另一部分进入 SFC 模块的反压调节器 (BPR)。利用内径为 50 μm 且长度为 1 m 的专用不锈钢毛细管实现与质谱仪的连接，该毛细管包含在分流器套装中。分流比取决于该限流毛细管产生的反压和 BPR 所设置的压力。通常，SFC 反压为 120 bar 时，分流至离子源的 SFC 流量约 0.45 mL/min，反压为 200 bar 时，分流至离子源的流量约 0.6 mL/min。由于电喷雾质谱检测取决于浓度，因此对信号强度无影响。

色谱柱

Agilent ZORBAX NH₂, 4.6 × 150 mm, 5 μm (部件号 883952-708)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件，06.00 版，包括 SFC 附加软件
- Agilent MassHunter 定性分析软件，07.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件，07.00 版

标准品

利用安捷伦 LC/MS 农药全套测试混标 (部件号 5190-0551) 作为混标。该混标包含八种子混合物, 总共 254 种农药化合物。储备液中包含各自浓度为 100 ppm 的农药。用乙腈将该储备液稀释为 1 ppm 的工作储备液。

化学品

所有溶剂均为 LC/MS 级。乙醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

样品前处理

水果和蔬菜购自当地蔬菜水果店。根据官方的柠檬酸盐缓冲 QuEChERS 方案, 使用 Agilent BondElut QuEChERS 试剂盒 (部件号 5982-5650) 萃取样品。称取 10 g 均质样品至 50 mL 聚丙烯管中, 并加入 10 mL 乙腈, 用手剧烈振摇萃取 1 分钟。加入包含 4 g 无水 MgSO_4 、1 g NaCl 和 1.5 g 缓冲柠檬酸盐的萃取盐包后, 将混合物再次振摇 1 分钟, 然后以 4000 rpm 的转速离心 5 分钟。

在相分离后, 将 6 mL 上层乙腈相转移至 Agilent BondElut QuEChERS EN 分散式 SPE 管 (部件号 5982-5056), 该管中包含用于样品净化的 150 mg N-丙基乙二胺 (PSA) 以及用于除水的 900 mg 无水 MgSO_4 。将管密封, 并再次振摇 1 分钟。然后, 以 4000 rpm 的转速将管离心 5 分钟。将 4 mL 最终提取物转移至干净的聚丙烯样品瓶中。为改善目标农药的稳定性, 将 40 μL 甲酸加入最终提取物中。

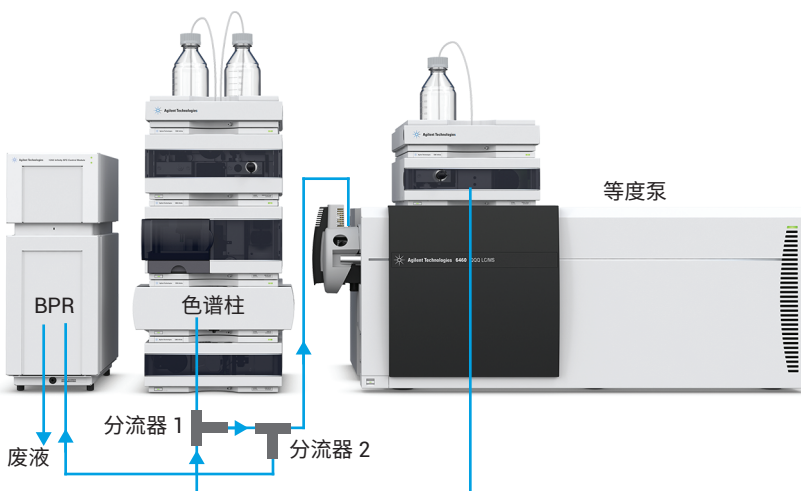


图 1. Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的配置。色谱柱直接连接至分流器组件中的分流器 1 (BPR = 反压调节器, 不使用紫外检测器, 分流器套装部件号 G4309-68715)

SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
SFC 梯度	0 分钟, 2% B 10 分钟, 10% B 14 分钟, 26% B 14.1 分钟, 50% B 停止时间 20 分钟 后运行时间 2 分钟
改性剂	甲醇
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	120 bar
柱温	40 °C
进样量	5 μL , 定量环过量填充 3 倍

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS

参数	值
补偿流组成	甲醇/水 (95/5), 0.5 mmol/L 甲酸铵 + 0.2% 甲酸
补偿流流速	0.5 mL/min

质谱方法

参数	值
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
DMRM 条件	见附录表 1, 其中显示了详细的保留时间、保留时间窗口、碎裂电压和碰撞能量

结果与讨论

安捷伦 LC/MS 农药全套测试混标包含八种子混合物，其中每种子混合物各自包含约 33 种化合物。利用这些混合物开发并优化 SFC 分离方法。选择氨基固定相色谱柱是基于之前的多农药样品分析方法开发工作方面的经验。选择乙醇作为改性剂，是由于它的洗脱强度低于甲醇，能够实现更宽的洗脱范围²。

在第一个实验中，采用陡峭的梯度（改性剂在 10 分钟内增加至 50%）洗脱不同子混合物中的农药，以了解哪种农药能够通过所选的色谱柱固定相和改性剂组合洗脱。由于大多数化合物在 SFC 条件下的洗脱行为容易在有机改性剂（即使含量较低）中发生细微变化，因此还利用在 10 分钟内从 2% 增加至 10% 的梯度对子混合物进行测试。在这些条件下，195 种化合物被洗脱下来。当改性剂在 14 分钟内增加至 26%，然后在 14.01 分钟时增加至 50% 并在该浓度下保持至 20 分钟，另有 28 种化合物洗脱下来。总体而言，在混合物固有的 254 种化合物中，

223 种化合物被洗脱下来并通过 MRM 检出。在剩余的 31 种化合物中，有些化合物仅在负离子模式条件下电离，而其他化合物未洗脱得到良好的峰形，因为它们似乎不太适合所选的色谱柱固定相和改性剂组合。在该组化合物中，存在几种磺酰胺类除草剂化合物。为提高最终方法的灵敏度，将 MRM 方法转换为动态 MRM (DMRM) 模式方法，其中采用两倍峰宽的窗口在各自的保留时间处对各种化合物进行测量。图 2 显示了在 20 分钟内分离 223 种化合物所得到的 DMRM 色谱图。图 3 显示了化合物在整个分析时间内的分布。

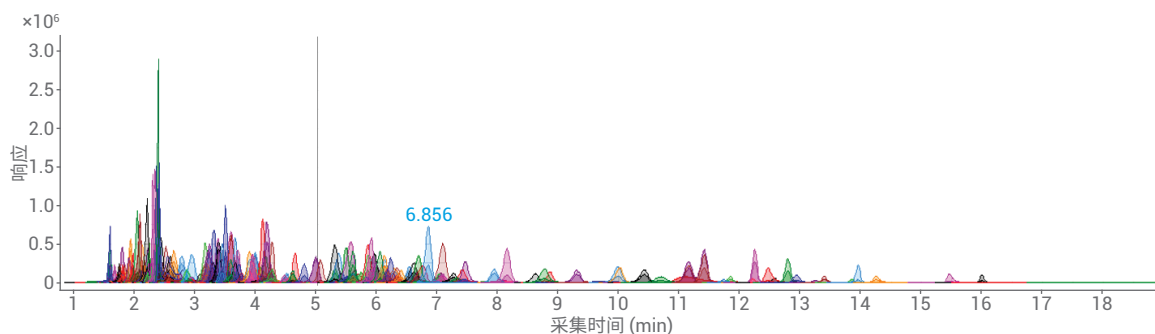


图 2. 利用 DMRM 测量安捷伦 LC/MS 农药全套测试混标中的 223 种农药。采用 2%–10% 乙醇作为有机改性剂时，其中 195 种化合物在 10 分钟内从氨基固定相色谱柱上洗脱下来，而有机改性剂增加至 50% 时，另有 28 种化合物在 20 分钟内洗脱下来

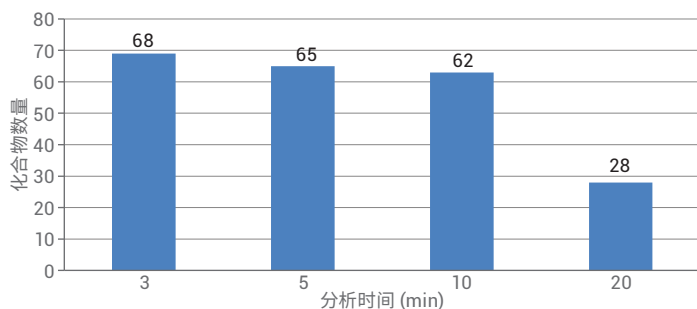


图 3. 农药洗脱时间在总分析时间中的分布。第一个化合物在 1.5 分钟处被洗脱。68 种化合物在前 3 分钟内洗脱下来，另外 65 种化合物在 3 分钟至 5 分钟之间洗脱下来，还有 62 种化合物在 5 分钟至 10 分钟之间洗脱下来。总体而言，采用 2%–10% 乙醇梯度时，195 种化合物在 10 分钟内洗脱下来。洗脱广泛分布于前 10 分钟内

对于测量的全部 223 种农药，它们的 LOQ 分布如图 4 所示。共有 102 种农药的 LOQ 为 0.5 ppb（信噪比 (S/N) 大于 10），并有 167 种农药的 LOQ 为 1 ppb 或更低。在 223 种化合物中，仅有 7 种农药的 LOQ 为低于 10 ppb。然而，所有农药的 LOD 均低于 10 ppb，因此满足法规要求¹。在 LOQ 至最高 100 ppb 的范围内，创建所有化合物的校准曲线。所有化合物均表现出 $R^2 = 0.999$ 或更出色的线性。图 5 显示了保留时间精密度的分布。在 165 种化合物中，大多数化合物的保留时间精密度优于 1% RSD。图 6 显示了峰面积精密度的分布。总体而言，162 种化合物的峰面积 RSD 低于 5%，并且大多数化合物的 RSD 介于 2% 和 5% 之间。

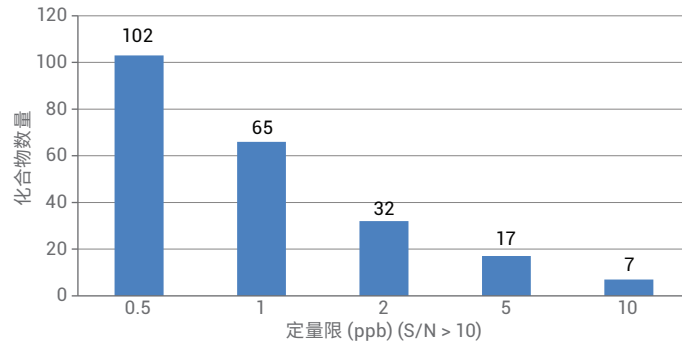


图 4. 所检测的农药的 LOQ 分布。102 种农药的 LOQ 为 0.5 ppb 且 S/N > 10，并且 167 种农药的 LOQ 为 1 ppb 或更低。在 223 种农药化合物中，仅有七种化合物的 LOQ 为 10 ppb

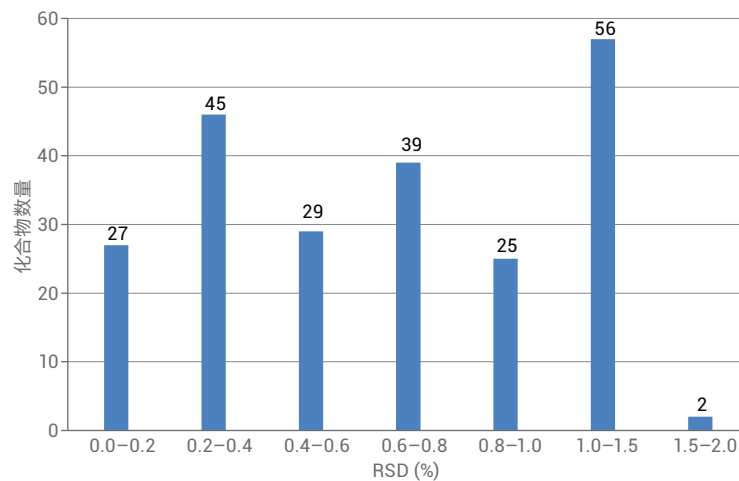


图 5. 保留时间精密度的分布。有 165 种化合物的保留时间精密度低于 1% RSD

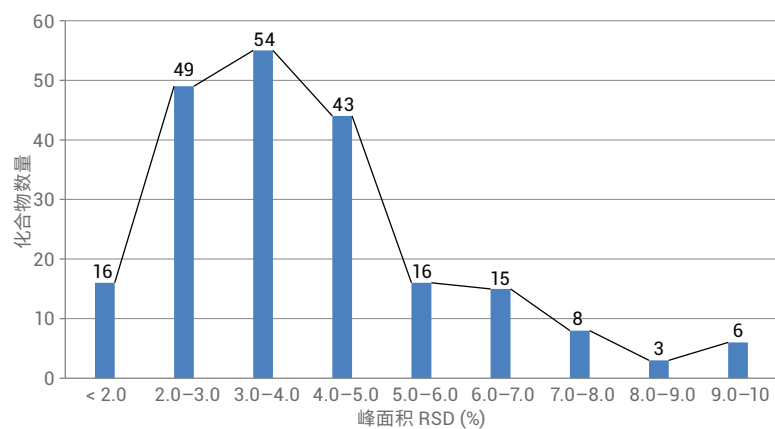


图 6. 峰面积精密度的分布。有 162 种化合物的 RSD 低于 5%，且大多数化合物的 RSD 介于 2% 和 5% 之间

作为示例，对图 7 所示的化合物予以更详细的讨论。第一个示例是环氧嘧磺隆。它属于磺酰脲类除草剂，并在 SFC 分析中表现出良好的色谱行为。最低的校准浓度为 10 ppb，计算得出的 LOQ 为 0.14 ppb，LOD 为 0.04 ppb，且线性为 $R^2 = 0.99993$ (图 7A)。第二个示例是甲胺磷，其广泛用于保护水稻。它是一种高极性化合物，在反相 HPLC 分离中进样分析纯 QuEChERS

提取物时，由于洗脱较早，通常会观察到峰展宽。QuEChERS 样品前处理得到纯乙腈的最终提取物。与 HPLC 不同，该溶液可直接用于 SFC，且不影响峰形。在 SFC 条件下，该化合物在 7.055 分钟处洗脱。校准浓度为 10 ppb 时的结果以及校准曲线如图 7B 所示。计算得出的 LOQ 为 0.38 ppb，LOD 为 0.13 ppb，且线性为 $R^2 = 0.99991$ 。

作为实际样品的示例，根据先前文献所述的 QuEChERS 程序⁴对草莓、苹果和番茄进行萃取，并直接进样分析所获得的乙腈提取物。在这部分实验中，在 10–100 ppb 的范围内对所有 223 种农药进行校准，其中 10 ppb 值为法规规定的最高可接受的农药残留浓度。在测量的 223 种农药中，仅检出五种浓度接近 LOD 的农药：戊唑醇、三唑醇、氯虫苯甲酰胺、肟菌酯和啶酰菌胺。

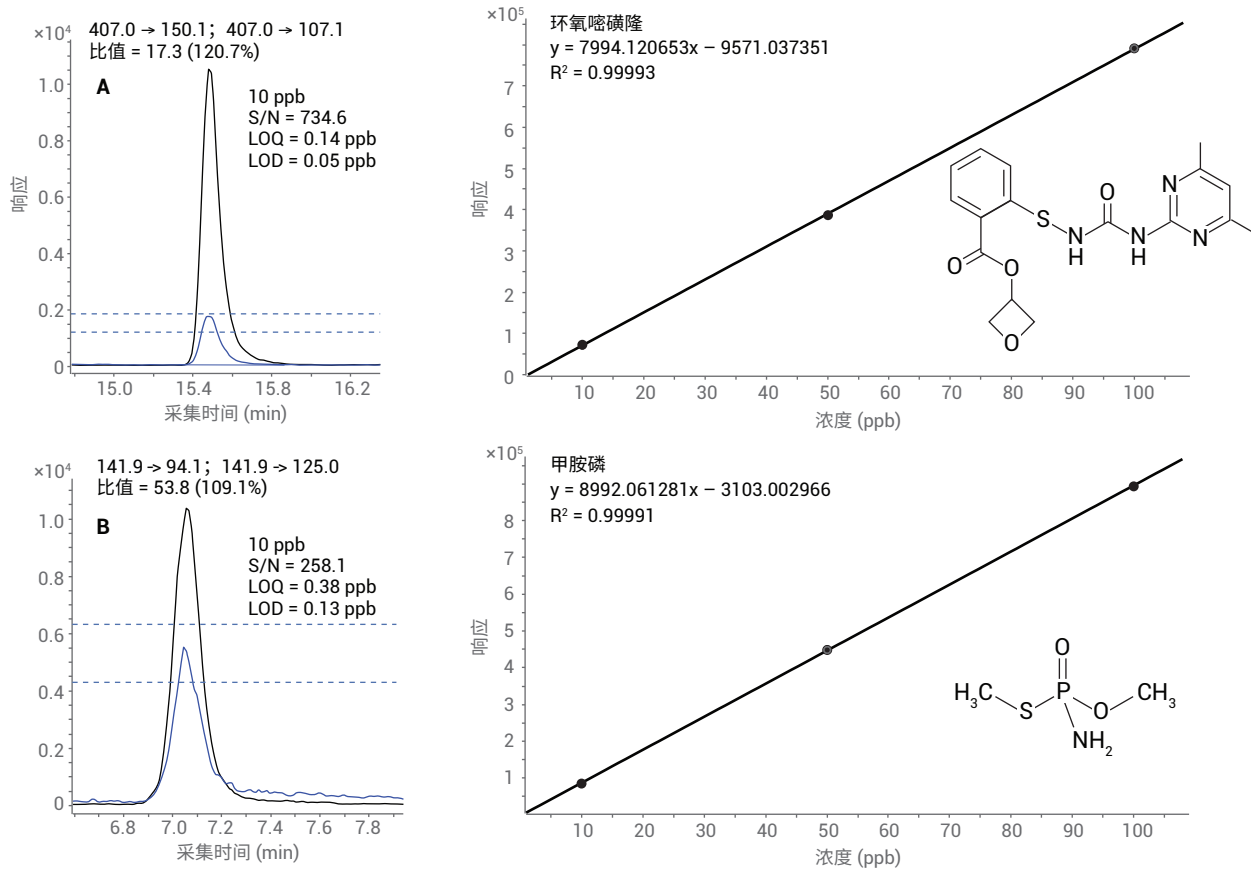


图 7. (A) 环氧嘧磺隆，最低校准浓度为 10 ppb，且 S/N = 734.6，LOQ = 0.14 ppb，LOD = 0.05 ppb，线性为 0.99993。(B) 甲胺磷，最低校准浓度为 10 ppb，且 S/N = 258.1，LOQ = 0.38 ppb，LOD = 0.13 ppb，线性为 0.99991

三唑醇是一种内吸性杀菌剂，主要用于防止锈病和白粉病，例如用于水果、葡萄和番茄。三唑醇是三唑酮的代谢物，但是其本身也可用作活性成分。通常，它与其他杀菌剂（如戊唑醇）结合使用。在番茄样品中，检测到低浓度的三唑醇（图 8）。最低校准浓度为 10 ppb，且 $S/N = 971.2$ ， $LOQ = 0.1$ ppb， $LOD = 0.03$ ppb（图 8A）。在番茄中检出的三唑醇残留浓度为 1.36 ppb（图 8B）。浓度为 10、50 和 100 ppb 的三唑醇的校准曲线表现出良好的线性， $R^2 = 0.99929$ 。在草莓样品中检出的另一种低浓度农药残留是啶酰菌胺。检测到它的浓度为 0.75 ppb，非常接近估算的 LOD。啶酰菌胺广泛用作保护水果、蔬菜和酿酒葡萄的杀菌剂。根据美国国家环境保护局 (EPA) 的简报⁵，啶酰菌胺具有一定的致癌性，但是对人类的致癌性可能性较小。可接受的每日最大剂量为 0.04 mg/kg。然而，番茄中的三唑醇以及草莓中的啶酰菌胺的最小报告限值 (MRL) 明显较高（分别为 1000 ppb 和 500 ppb）。这些示例展示了该方法用于分析复杂食品基质中的痕量残留农药的性能。

通过比较加标基质样品与标准品，对相应基质的影响进行了考察。大多数化合物的回收率处于 70%–120% 范围内，根据 SANCO 方法验证指南该范围是可接受的⁶。这一点在之前的工作中也有介绍⁴。例如，对于草莓基质，在 10 ppb 的浓度下，所测量的 223 种化合物中有 193 种化合物的回收率处于 70%–120% 范围内（图 9）。考虑到基质效应，可通过化合物添加进行基质校准，以进一步改善这些结果。此外，可采用标准加入法来补偿基质效应。

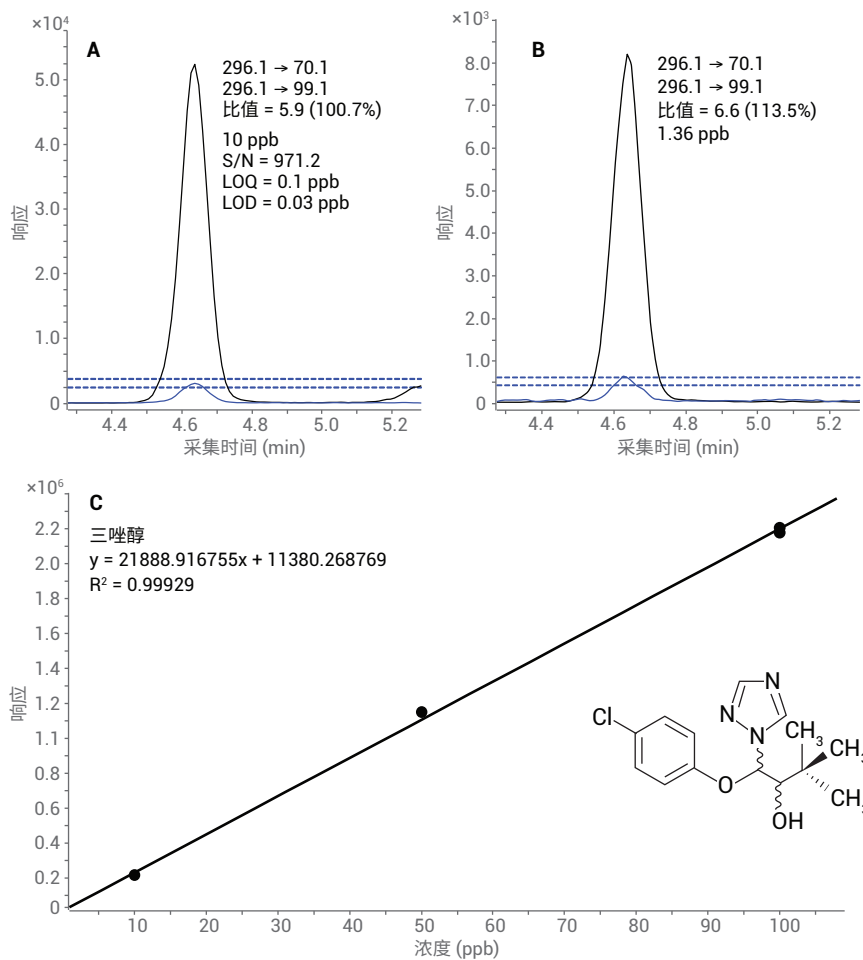


图 8. 番茄中的三唑醇残留。A) 最低校准浓度为 10 ppb，且 $S/N = 971.2$ ， $LOQ = 0.1$ ppb， $LOD = 0.03$ ppb。B) 在番茄中检测到的三唑醇残留浓度为 1.36 ppb。C) 浓度为 10、50 和 100 ppb 的三唑醇的校准曲线

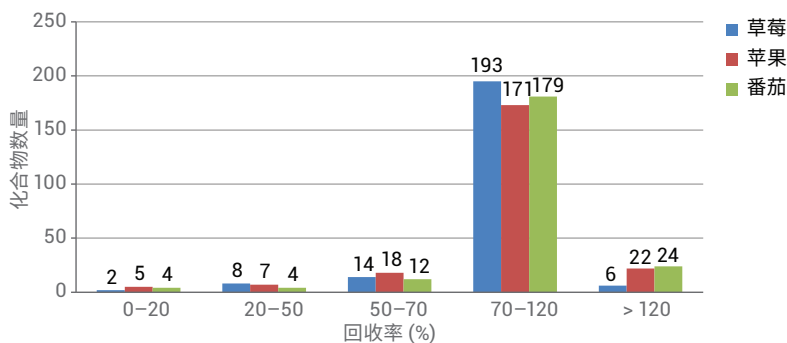


图 9. 农药回收率的分布。大多数化合物的回收率处于 -30% 至 +20% 的所需范围

图 10 显示了苹果中肟菌酯的标准加入法结果，该结果使用 Agilent MassHunter 定量分析软件的内置功能计算得出。校准曲线中的方形符号对应于样品，而圆形符号示出各种加标浓度。虽然外部校准法得到的肟菌酯最终浓度为 8.1 ppb，但是标准加入法得到的浓度为 11.3 ppb。这表明基质抑制效应能够导致结果比实际值偏低近 30%。对于苹果中的肟菌酯，MRL 显著高于 (700 ppb) 默认的 10 ppb MRL，因此不必报告 MRL 超出情况。

结论

本应用简报介绍了利用 SFC 与三重四极杆质谱联用开发用于测定 223 种农药化合物的多农药残留分析方法。在该方法中，将有机改性剂浓度在 10 分钟内由 2% 增加至 10%，195 种农药化合物中的大多数化合物均在 10 分钟内被洗脱。与常用的 HPLC 方法相比，该方法通过聚焦这些农药，在测量相同数量的化合物时，能够大大缩短分析时间。测得的目标农药的典型 LOQ 等于或低于 1 ppb，并且校准线性优于 $R^2 = 0.999$ 。利用 SFC/MS 能够直接从有机样品提取物中轻松分离并测定标准反相 HPLC/MS 难以测定的极性农药化合物。基质效应与之前报道的结果处于相同范围内，并且建议使用基质校准或内标来补偿特定化合物的强基质效应。

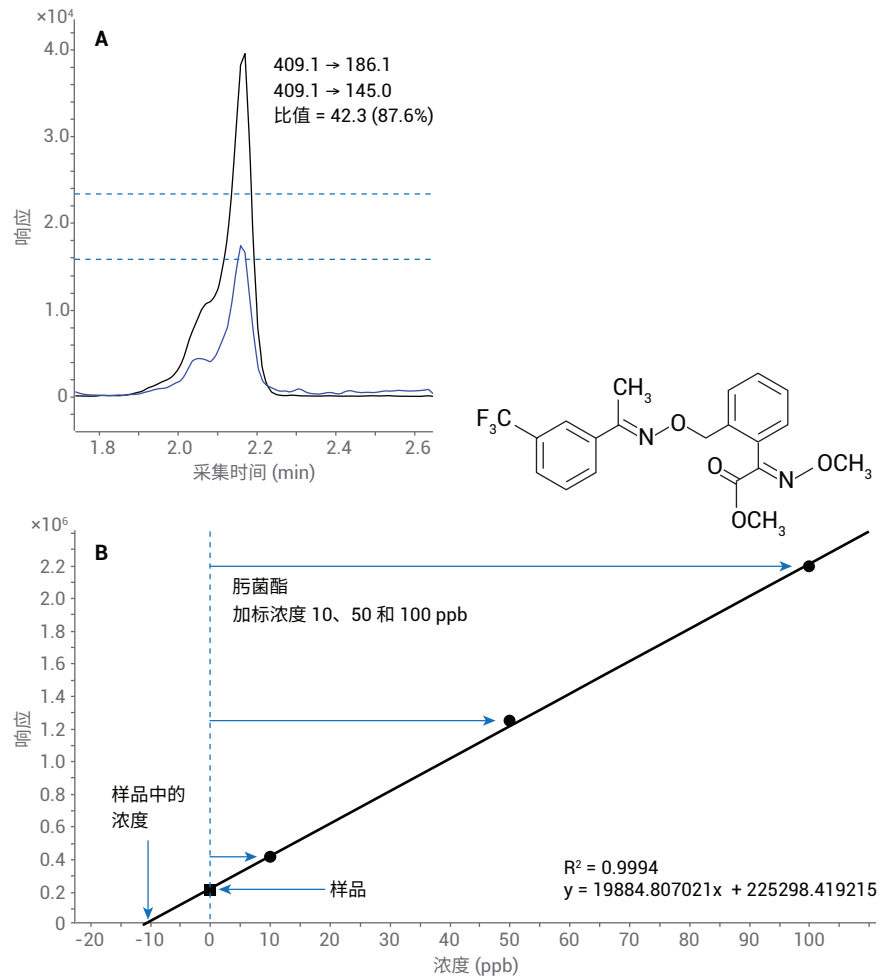


图 10. 苹果中的肟菌酯残留。A) 通过外部校准法检测到的番茄中的肟菌酯残留浓度为 8.1 ppb。B) 肟菌酯的校准曲线，标准加入浓度为 10、50 和 100 ppb。采用此方法得到的结果为 11.3 ppb

参考文献

1. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107/2009
2. Naegele, E., Analysis of Pesticides by Supercritical Fluid Chromatography/Mass Spectrometry - Optimizing the Agilent 1260 Infinity Analytical SFC System in Combination with the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS (利用超临界流体色谱/质谱分析农药 — 优化 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的组合), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5256EN, **2014**
3. Naegele, E., Glauner, T. 使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱检测分析蔬菜样品中的农药, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5443ZHCN, **2015**
4. Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenk, F.J., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International*, **2003**, Vol. 86, No. 2, 412–431
5. United States Environmental Protection Agency: Pesticide Fact Sheet Boscalid, 2006 年 7 月, 最后更新日期 2011 年 12 月 11 日
6. European Commission: Health & Consumer Protection Directorate – Safety of the Food Chain: Chemicals, Contaminates and Pesticides. Guidance Document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013, rev.0

附录

表 1. 测量的 223 种农药的动态 MRM 方法信息, 包括保留时间、分子和碎片离子质量数以及碎裂电压、碰撞能量和碰撞池加速电压

编号	化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速电压 (V)
1	虫螨畏	1.56	241	55	209.1	0	125.1	28	3
2	唑草酮	1.61	412	150	366	15	346.1	20	3
3	二甲戊乐灵	1.61	282.1	85	212.1	5	194.1	15	3
4	敌敌畏	1.62	220.9	100	109	12	79	24	4
5	草达灭	1.62	188.1	90	126	10	83.2	15	3
6	二嗪农	1.63	305.1	105	169	20	153.1	20	4
7	马拉硫磷	1.65	331	80	126.9	5	99	10	3
8	恶草酮	1.65	345	90	303	10	220	15	3
9	苜蓿丹	1.66	252.1	90	128.1	5	91.1	20	3
10	甲基嘧啶磷	1.67	306	130	164.2	20	108.1	30	3
11	辛硫磷	1.72	299.1	70	129.1	4	77.1	24	3
12	甲基立枯磷	1.76	300.9	115	269	10	125	15	3
13	联苯菊酯	1.78	440.2	100	181	5	–	–	4
13	联苯菊酯	1.78	442.2	100	–	–	181	5	4
14	乙硫磷	1.81	385	95	199	4	143	20	4
15	灭蚜磷	1.85	330	70	227	0	97.1	45	3
16	速灭磷	1.85	225	65	193.1	0	127	10	3
17	灭线磷	1.89	243	90	131	15	97	30	4
18	啶硫磷	1.89	299	90	163	20	147	20	7
19	甲基毒死蜱	1.90	322	110	290	10	125	25	4
20	稻丰散	1.90	321	75	247	4	79.1	48	3

表 1. 测量的 223 种农药的动态 MRM 方法信息, 包括保留时间、分子和碎片离子质量数以及碎裂电压、碰撞能量和碰撞池加速电压 (续)

编号	化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速电压 (V)
21	克螨特	1.93	368.1	80	231.2	5	175.1	10	3
22	甜菜味	1.97	287	80	259.1	0	121.1	10	3
23	异恶草松	1.98	240	70	125.1	15	89.1	45	3
24	乙氧喹	1.98	218	120	174	30	160	35	3
25	氟噻草胺	2.00	364	90	194.2	5	152.1	15	3
26	丙氧喹啉	2.03	372.9	85	331	12	289	24	3
27	异噁唑草酮	2.04	359.8	95	250.9	20	220	35	3
28	胺丙畏	2.05	282.1	125	156	10	138	15	3
29	三唑酮	2.06	294.1	90	197.1	10	69.1	20	3
30	异丙甲草胺	2.13	284.1	100	252.2	10	176.1	20	3
31	醚菌酯	2.14	314.1	85	267.1	0	222.2	10	3
32	丙溴磷	2.15	374.9	120	347	5	304.9	15	3
33	肟菌酯	2.19	409.1	110	186.1	10	145	45	3
34	马拉氧磷	2.20	315.1	85	127	4	99	20	3
35	吡氟草胺	2.21	395	150	266	25	246	40	3
36	杀扑磷	2.25	302.9	55	145	0	85.1	15	3
37	二甲草胺	2.26	256	120	224	10	148	25	3
38	醚菊酯	2.27	394.2	100	177.2	10	107.1	45	3
39	吡丙醚	2.28	322.1	110	185.1	20	96.1	10	3
40	丁硫克百威	2.30	381.1	105	160.1	8	118.1	16	3
41	呋线威	2.30	383.1	110	252.1	5	195.1	15	3
42	苯胺灵	2.33	180.1	60	138.1	4	120	12	3
43	喹氧灵	2.33	308	115	197	35	162	45	7
44	对甲抑菌灵	2.37	346.9	70	238.1	0	137	25	3
45	吡螨胺	2.39	334.1	145	145.1	25	117.1	40	3
46	毒虫畏	2.39	358.9	105	170	40	155.1	8	4
47	吡唑草胺	2.41	278	70	210.1	0	134.1	15	3
48	螺螨酯	2.42	411.1	110	313	5	71.2	15	3
49	啶氧菌酯	2.44	368.1	70	205.1	0	145.1	20	3
50	抗蚜威	2.45	239.1	100	182.2	10	72.1	20	3
51	螺甲螨酯	2.47	388.2	110	273	10	255	25	3
52	伏杀磷	2.49	368	70	182	10	111.1	45	3
53	喹螨醚	2.50	307.2	105	161.1	10	57.1	25	3
54	噻螨酮	2.50	353	90	228.1	10	168.1	25	3
55	丙硫克百威	2.51	411.1	95	252.1	10	195.1	20	3
56	螺环菌胺	2.55	298.2	125	144.2	15	100.2	35	3
57	氟吡酰胺	2.56	377.1	120	359	24	238	32	3
58	唑螨酯	2.59	422.1	135	366.1	15	135.1	30	3
59	啶草酯	2.60	444	125	371	10	100.2	15	3
60	苯霜灵	2.62	326.1	90	294.2	5	148.1	15	4
61	丙环唑	2.70	342	115	158.9	30	69.1	15	4
62	DEET	2.71	192.14	110	119	16	91.1	32	3
63	甲霜灵	2.76	280.1	95	220.1	10	160.1	20	3

表 1. 测量的 223 种农药的动态 MRM 方法信息, 包括保留时间、分子和碎片离子质量数以及碎裂电压、碰撞能量和碰撞池加速电压 (续)

编号	化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速电压 (V)
64	茚虫威	2.82	528	110	203	45	149.9	20	3
65	霜脲氰	2.83	199	50	128	0	111.1	15	3
66	噻嗪酮	2.85	306.1	105	201.2	5	116.1	10	3
67	草达津	2.95	230.1	105	202.1	15	99	25	3
68	乙啶磺酸酯	2.97	317.1	125	166.1	20	108.1	25	4
69	亚胺硫磷	3.03	317.9	70	160	10	133	40	3
70	硫硅菌胺	3.03	268	135	252.1	5	139	15	3
71	啉霉胺	3.05	200.1	120	107.1	20	82.1	25	3
72	苯螨特	3.08	364.1	80	198.1	4	104.9	20	3
73	涕灭威-碎片	3.16	116	70	89.1	4	70.1	4	3
74	四螨嗪	3.16	303	110	138	10	102.1	40	3
75	丙炔氟草胺	3.23	355.1	100	327.1	20	299	28	3
76	乙霉威	3.25	268.1	70	226	0	124	30	3
77	乙基谷硫磷	3.28	346.05	70	132	8	97	32	3
78	氟啶唑	3.28	376	120	349.1	16	307	24	4
79	苯氧威	3.29	302.1	90	116.1	5	88.1	15	3
80	氟环唑	3.34	330	100	121.1	20	101.1	45	4
81	氟醚唑	3.34	372	130	159	30	70.1	20	4
82	丁酮威	3.35	213	70	156.1	5	75	10	3
83	氟丁酰草胺	3.37	356	145	162.1	25	91	30	3
84	溴谷隆	3.37	259	120	170	15	148	10	3
85	戊菌唑	3.4	284	70	159	30	70.1	15	3
86	氟硅唑	3.42	316	120	247.2	15	165.1	25	4
87	猛杀威	3.42	208.1	80	151	0	109.1	10	3
88	啉菌环胺	3.43	226.1	140	93.1	40	77.1	45	3
89	甲基吡啶磷	3.44	325	120	182.9	12	111.9	40	4
90	磷胺	3.44	300.1	110	174.1	8	127	16	3
91	谷硫磷	3.46	318.02	60	261	0	132	8	3
92	蝇毒磷	3.46	363	120	307	16	226.9	28	4
93	双硫磷	3.47	467	155	419	20	124.9	44	3
94	氟菌唑	3.48	346	85	278.1	5	73.1	10	3
95	哒螨灵	3.49	365.1	80	309.1	10	147.1	25	3
96	水胺硫磷	3.54	231	100	121	20	65	40	3
97	噻唑磷	3.55	284	90	228.1	5	104.1	20	3
98	戊炔草胺	3.59	256	105	190	10	173	20	3
99	苯菌酮	3.6	409	110	226.9	25	209.1	10	3
100	螨蟎胺	3.61	219	95	171	25	144	35	3
101	扑灭通	3.62	226.2	100	184	16	142.1	24	3
102	稻瘟灵	3.63	291.1	80	231	8	188.8	20	3
103	仲丁威	3.70	208.1	65	152.1	5	95.1	10	3
104	三唑磷	3.70	314	110	162.1	15	119.1	35	3
105	肟草酮	3.71	330.1	170	284.2	5	138.1	15	3
106	呋霜灵	3.72	302.1	110	242.1	10	95	27	3

表 1. 测量的 223 种农药的动态 MRM 方法信息, 包括保留时间、分子和碎片离子质量数以及碎裂电压、碰撞能量和碰撞池加速电压 (续)

编号	化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速电压 (V)
107	丙森锌	3.74	321.1	80	203.1	0	119.1	20	3
108	混杀威	3.77	194.1	80	137	4	122.1	28	3
109	兹克威	3.82	223.1	110	166.1	12	151	24	3
110	阿扎康唑	3.83	300	130	230.8	16	158.9	32	3
111	残杀威	3.83	210.1	55	168.1	0	111.1	10	3
112	嘧菌胺	3.88	224	140	209.1	16	106.1	25	3
113	氟霜唑	3.89	325	90	261.1	5	108.1	10	3
114	糠菌唑	3.98	377.9	115	159	35	70.1	20	4
115	盖草津	4.10	272.2	140	198	24	169.9	28	3
116	克百威	4.11	222.1	80	165.1	5	123.1	20	3
117	噻唑隆	4.11	222	90	165	15	150	35	3
118	利谷隆	4.14	249	100	182.1	10	160	15	3
119	唑菌胺酯	4.18	388	95	194.1	5	163.1	20	3
120	苯醚甲环唑	4.20	406	120	337.1	15	251.1	25	3
121	密草通	4.24	226.2	100	170.1	16	67.9	50	3
122	灭害威	4.34	209.1	105	152	12	137.2	24	3
123	苯线磷	4.39	304.1	120	217.1	20	202	35	3
124	咪鲜胺	4.39	376	70	308	5	266	10	3
125	灭虫威	4.40	226.1	70	169.1	0	121.1	15	3
126	苯锈定	4.43	274	120	147	30	86	25	3
127	腈菌唑	4.50	289.1	110	125	35	70.1	15	3
128	烯草酮	4.67	360.1	100	268.2	10	164.1	15	3
129	抑霉唑	4.69	297	115	201	15	159	20	4
130	氟吡菌胺	4.72	382.9	110	172.9	25	144.9	45	3
131	三唑醇	4.78	296.1	70	99.1	10	70.1	5	3
132	鱼藤酮	4.79	395	145	213.1	20	192.1	20	3
133	环莠隆	4.84	199.2	120	88.9	12	72.1	28	3
134	烯酰吗啉	5.05	388	145	301.1	20	165.1	30	3
135	醚菌胺	5.16	327.1	115	205.1	5	116	20	3
136	己唑醇	5.27	314	95	159	30	70.1	15	4
137	杀铃脲	5.34	359	90	156	10	139	35	3
138	多效唑	5.46	294.1	115	125	40	70.1	20	3
139	涕灭威	5.49	208	70	116	0	89.1	10	3
140	灭藻醌	5.49	208	125	88.9	44	76.9	44	3
141	萎锈灵	5.51	236	105	143	10	93	40	3
142	戊唑醇	5.69	308.1	100	125	40	70.1	20	4
143	嘧菌酯	5.75	404	110	372.2	10	344	25	3
144	腈苯唑	5.78	337.1	145	125.1	35	70.1	15	4
145	二氧威	5.81	224	80	167	10	123	10	3
146	久效磷	5.89	224	65	193.1	0	127	10	3
147	联苯三唑醇	5.91	338.1	70	269.2	0	70.1	0	3
148	氟苯嘧啶醇	5.99	331	130	268.1	20	81.1	30	4
149	咪唑菌酮	6.05	312.1	100	236.2	10	92.1	25	3

表 1. 测量的 223 种农药的动态 MRM 方法信息, 包括保留时间、分子和碎片离子质量数以及碎裂电压、碰撞能量和碰撞池加速电压 (续)

编号	化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速电压 (V)
150	粉唑醇	6.05	302	90	123	30	70.1	15	3
151	比锈灵	6.14	218.1	145	125	16	96.9	28	3
152	丁噻隆	6.18	229.1	105	172.1	12	116	24	3
153	氧化乐果	6.19	214	80	125	20	109	25	3
154	多杀菌素 A	6.19	732.4	155	142.1	30	98.1	45	3
155	联苯肼酯	6.23	301.1	95	198.2	5	170.1	15	3
156	氟酚奴隆	6.23	510.9	138	158	20	141	45	3
157	叶菌唑	6.25	320.1	130	125.1	40	70.1	20	4
158	烯唑醇	6.27	326	75	159	28	70.1	28	4
159	多杀菌素 D	6.30	746.5	145	142.1	35	98	55	3
160	双苯氟脲	6.31	493.1	90	158.1	20	141.1	45	3
161	吡喃草酮	6.33	342.1	130	250.2	10	166.1	20	3
162	环唑醇	6.36	292.1	100	125.1	35	70.1	15	3
163	烯效唑	6.36	292.1	135	125	36	70	24	4
164	种菌唑	6.39	334.1	115	125	45	70	25	4
165	乐果	6.41	230	70	199	0	125	20	3
166	棉铃威	6.45	400.1	130	238	4	91	50	3
167	双炔酰菌胺	6.52	411.9	110	356.1	5	328.1	10	3
168	甲萘威	6.54	202	65	145	0	127.1	25	3
169	除虫脲	6.55	311	80	158	10	141	35	3
170	氟虫脲	6.68	489	100	158	15	141	45	3
171	恶霜灵	6.88	279.1	70	219.1	5	132.1	35	3
172	灭菌唑	6.92	318.1	90	125.1	40	70.1	10	4
173	氟啶菌酯	6.94	459	130	427.1	15	188.1	40	3
174	螺虫乙酯	7.13	374.1	120	330.1	10	302.1	10	3
175	蚜灭磷	7.17	288.1	95	146	8	146	8	4
176	戊菌隆	7.21	329.1	120	218.1	10	125	25	3
177	甲胺磷	7.26	141.9	85	125	10	94.1	10	3
178	敌草隆	7.27	235	110	72.1	20	-	-	3
178	敌草隆	7.27	233	110	-	-	72.1	20	3
179	噁唑菌酮	7.27	392.1	85	331.2	0	238.2	10	3
180	伏草隆	7.27	233.1	105	72.1	15	46.2	15	3
181	苯酰菌胺	7.32	336	120	187	20	159	45	3
182	多菌灵	7.50	192	105	160.1	15	132.1	30	3
183	灭多威	7.58	162.9	50	106.1	5	88.1	0	3
184	啶酰菌胺	7.68	343	145	307.1	12	271	28	3
185	高灭磷	7.73	183.9	70	143	0	125	15	3
186	氟啶虫酰胺	7.98	230	110	203	15	174	15	3
187	氟铃脲	8.09	461	120	158	15	141	45	3
188	三环唑	8.28	190	130	163	20	136	30	4
189	异恶草胺	8.30	333.2	100	165	16	150	48	3
190	甲磺草胺	8.31	404	110	306.9	28	273	36	3
191	绿麦隆	8.85	213.1	120	140	20	72	20	3

表 1. 测量的 223 种农药的动态 MRM 方法信息，包括保留时间、分子和碎片离子质量数以及碎裂电压、碰撞能量和碰撞池加速电压（续）

编号	化合物名称	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 1 (m/z)	碰撞能量 (V)	子离子 2 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速电压 (V)
192	环草定	8.93	235.2	85	153.1	15	136	35	3
193	杀线威	9.17	237	60	90.1	0	72.1	15	3
194	氟氟虫脲	9.45	507	150	287.1	20	178.1	20	3
195	虫酰肼	9.45	353	95	297.2	0	133.1	15	3
196	莫西菌素	10.16	640.4	148	622.2	12	528.2	4	3
197	苯噻草酮	10.18	203.1	100	175.1	15	104.1	20	3
198	非草隆	10.25	165.1	180	76.9	32	72	16	3
199	枯草隆	10.27	291	130	164	10	72.1	20	3
200	硫双威	10.28	355	82	108.1	10	88.1	10	3
201	甲氧虫酰肼	10.56	369.2	85	313.2	0	149.1	10	3
202	苯磺隆	11.08	396	110	181.1	15	155.1	5	3
203	噻菌灵	11.24	202	130	175.1	25	131.1	35	3
204	甜菜安	11.47	318.1	80	182.2	5	136.1	25	3
205	甜菜宁	11.47	318.1	90	168.1	4	136	20	3
206	霜霉威	11.88	189.1	90	144	5	102.1	15	3
207	赛唑隆	11.98	265.1	120	207.9	12	57	32	3
208	啶虫脒	12.06	223	80	126.1	2	90.1	35	3
209	氯虫苯甲酰胺	12.31	483.9	105	452.9	15	285.9	10	3
210	麦穗宁	12.34	185.1	145	157.1	20	156.1	30	3
211	环酰菌胺	12.56	302	130	97.2	20	55.1	40	3
212	吡蚜酮	12.84	218	110	105.1	20	78.1	45	3
213	乙菌定	12.87	210.1	145	140.1	20	98.1	25	3
214	氟蚁脲	12.99	495.2	200	323	36	170.9	48	3
215	吡虫啉	13.48	256	80	209.1	10	175.1	15	3
216	噻虫嗪	13.69	292	85	211.1	5	181.1	20	3
217	杀草敏	13.93	222	130	104.1	25	77.1	35	3
218	噻虫啉	14.15	253	100	126	20	90.1	40	3
219	烯啶虫胺	14.60	271.1	95	225.2	3	56.1	30	3
220	环氧嘧磺隆	15.57	407	120	150.1	15	107.1	45	3
221	氯吡脲	16.02	248.1	110	129	16	92.9	40	3
222	甲基二磺隆	16.30	504.1	125	182.1	25	139.1	45	3
223	醚苯磺隆	17.86	401.9	130	167.1	10	141	10	3

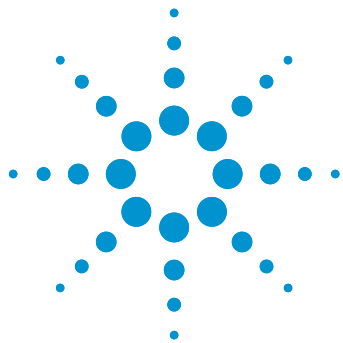
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-6151ZHCN



Agilent Technologies



使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统测定橄榄油中的维生素 E

快速、高分离度分离生育酚和生育三烯酚的所有异构体

应用简报

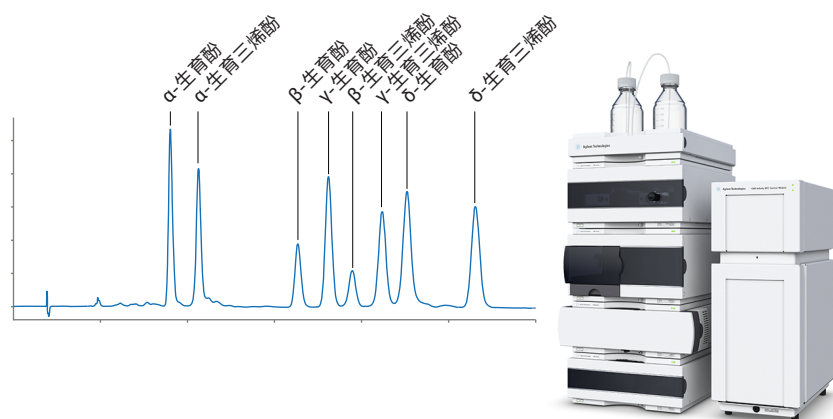
食品检测与农业

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型超临界流体色谱 (SFC) 系统通过 SFC 分离八种生育酚和生育三烯酚化合物。生成所有化合物的校准曲线，并对实际初榨橄榄油样品进行分析。测定了检测限和定量限 (LOD 和 LOQ) 以及保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD)。



Agilent Technologies

前言

超临界流体色谱 (SFC) 是一种通用的工具，能够替代目前为止首选正相液相色谱 (LC) 系统所实现的分离。SFC 的优势在于，与正相 LC 相比，其分离速度快得多，且精密度更高。此外，SFC 无需使用有害溶剂。

脂溶性维生素是能够通过 SFC 进行分离的一类典型化合物。这类化合物包括维生素 E 系列。生育酚及其不饱和和相关化合物生育三烯酚属于这个系列，它们具有各种异构体形式，包括 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚和生育三烯酚。这些化合物具有高生物活性和抗氧化剂潜力，并且是对人类健康有益的营养物质。维生素 E 及其他健康物质的天然来源之一是由橄榄树 (*Olea europaea* L.) 的果实获得的初榨橄榄油^{1,2}。通常，橄榄油中约 95% 的维生素 E 是 α -生育酚²。对生产橄榄油的国家/地区而言，橄榄油是具有重要经济价值的商品，因此人们开发出各种橄榄油分析方法以确保其真实性和质量³。

本应用简报介绍了利用 SFC 分析橄榄油中的维生素 E 化合物，相比于广泛使用的正相 LC，SFC 的分析时间更短且精密度更高。

实验部分

仪器

所有实验均采用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A)，该系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (TCC)

SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	乙醇
SFC 流速	4.5 mL/min
梯度	0 分钟时 3% B，6 分钟时增加至 4.5% B
停止时间	6 分钟
后运行时间	2 分钟
BPR 压力	210 bar
BPR 温度	60 °C
柱温	50 °C
进样量	5 μ L，定量环过量填充 3 倍，用己烷在样品瓶中清洗进样针
DAD (紫外-可见)	波长 295 nm，带宽 4 nm 参比 550 nm，带宽 100 nm 狭缝 8 nm 数据采集速率 10 Hz

色谱柱

Agilent ZORBAX NH₂, 4.6 \times 150 mm, 5 μ m (部件号 883952-708)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.06

标准品

生育酚和生育三烯酚混合溶液标准品 (溶于己烷) 购自 LGC Standards (Teddington, UK)。

样品

天然橄榄油购自当地超市。用己烷将橄榄油稀释至 100 mg/mL，直接用于分析。

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

结果与讨论

利用氨基固定相色谱柱和 4.5 mL/min 的流速分离四种生育酚异构体和四种生育三烯酚异构体化合物。所用梯度的有机相组成接近等度行为，乙醇含量仅从 3% 增加至 4.5%。该梯度能够分离早洗脱化合物，并缩短后洗脱化合物的保留时间，从而得到更尖锐的峰。优化的反压 210 bar 和较高的 50 °C 柱温还有助于提高后洗脱化合物的分离度。图 1 显示了在 6 分钟的分析时间内分离标准储备液中生育酚和生育三烯酚化合物得到的色谱图。

为校准所有化合物，使用 1:2 的稀释模式将储备液（浓度 1）稀释得到六种浓度（表 1）。

由浓度 5 的稀释液所获得的峰表明信噪比 (S/N) 约为 10，将该浓度用作校准曲线的最低浓度并计算定量限 (LOQ)。利用浓度 6 下测得的峰计算检测限 (LOD)，取 S/N 比为 3。LOQ 通常小于 23 µg/mL，LOD 小于 7 µg/mL (表 2)。

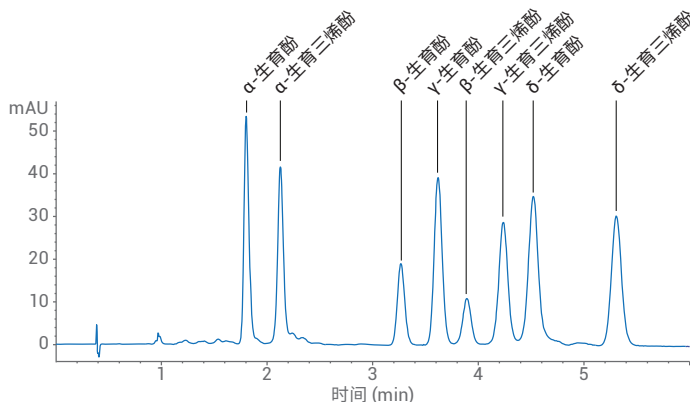


图 1. 利用 SFC 分离 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚和 α 、 β 、 γ 、 δ -生育三烯酚的混合物

表 1. 使用 1:2 的稀释模式所得到的各种化合物的校准浓度

	浓度 1 (µg/mL)	浓度 2 (µg/mL)	浓度 3 (µg/mL)	浓度 4 (µg/mL)	浓度 5 (µg/mL)	浓度 6 (µg/mL)
α -生育酚	463.00	231.50	115.75	57.88	38.94	14.46
α -生育三烯酚	447.00	223.15	111.75	55.88	27.94	13.96
β -生育酚	203.00	101.50	50.75	25.34	12.69	4.23
γ -生育酚	430.00	215.00	107.50	53.75	26.88	13.44
β -生育三烯酚	135.00	67.50	22.50	11.25	5.65	2.81
γ -生育三烯酚	467.00	233.50	116.75	58.37	29.18	14.59
δ -生育酚	423.00	211.50	105.75	52.88	26.44	13.22
δ -生育三烯酚	414.00	207.00	103.50	51.75	25.88	12.94

表 2. 各种生育酚和生育三烯酚的保留时间和峰面积相对标准偏差以及 LOQ、LOD 和线性

	保留时间	保留时间 RSD	峰面积 RSD	LOQ (µg/mL)	LOD (µg/mL)	R ²
α -生育酚	1.799	0.24	5.75	18.11	5.43	0.9997
α -生育三烯酚	2.124	0.31	4.89	22.88	6.87	0.9991
β -生育酚	3.273	0.23	5.59	14.58	4.38	0.9999
γ -生育酚	3.624	0.27	6.45	22.03	6.62	0.9998
β -生育三烯酚	3.884	0.23	6.27	14.79	4.44	0.9992
γ -生育三烯酚	4.240	0.16	5.04	35.58	10.68	0.9991
δ -生育酚	4.517	0.14	6.62	27.54	8.27	0.9998
δ -生育三烯酚	5.302	0.14	5.58	27.53	8.27	0.9999

图 2 显示了在浓度 1 至浓度 5 下获得的所有化合物的峰的叠加图。所有校准的线性均处于良好范围， R^2 优于 0.999。在统计评估中，将按照 1:10 的比例稀释的储备液进样分析 10 次，并计算保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD)。保留时间的 RSD 通常优于 0.3%，且峰面积的 RSD 优于 6% (表 2)。较高的峰面积 RSD 值可以解释为，生育酚和生育三烯酚在液相色谱系统的锈钢毛细管上发生了降解或吸附⁴。

最后，对特级初榨橄榄油样品进行测量以测定维生素 E 化合物的含量。用己烷稀释橄榄油并直接进样分析。色谱图显示，仅 1.79 分钟处的 α -生育酚为可量的主峰，而 3.6 分钟处存在极小的 γ -生育酚的峰 (图 3)。所测量的橄榄油中 α -生育酚的最终浓度为 184.8 mg/kg。

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对橄榄油中维生素 E 化合物 (如生育酚和生育三烯酚) 的定量分析。结果表明，四种生育酚异构体和四种生育三烯酚异构体在 6 分钟的分析时间内完成了分离，比常用的正相 LC 方法快大约 5 倍。另一方面，正相分离中所用的有机溶剂为有害溶剂，相比之下，SFC 分离中使用的是乙醇改性剂。获得的 LOQ 通常小于 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，LOD 小于 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，且 R^2 优于 0.999。

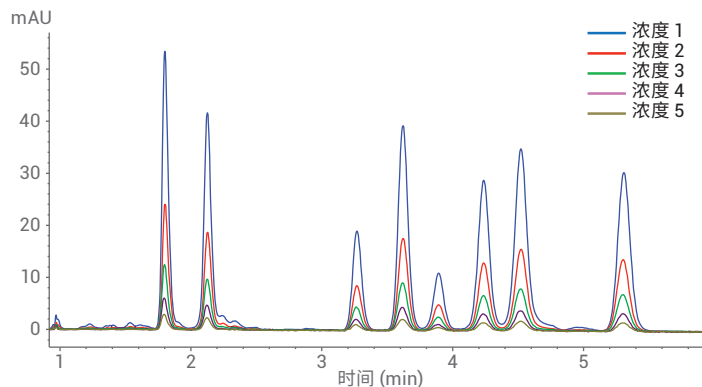


图 2. 用于生成 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚和 α 、 β 、 γ 、 δ -生育三烯酚的校准曲线的各校准浓度下的叠加谱图。(有关化合物名称，请参见图 1；有关化合物浓度，请参见表 1。)

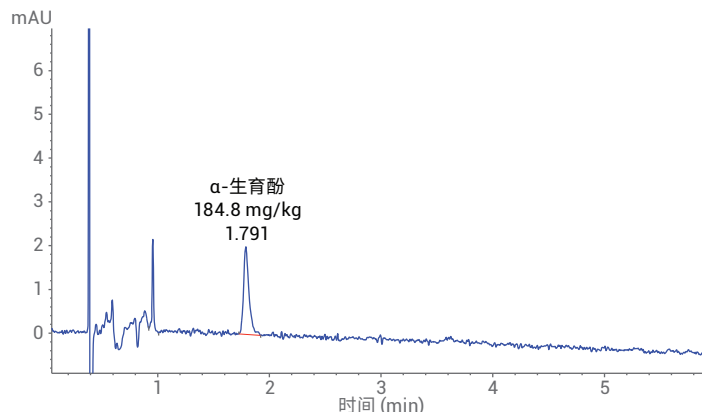


图 3. 特级初榨橄榄油样品的测量以及 α -生育酚的浓度测定

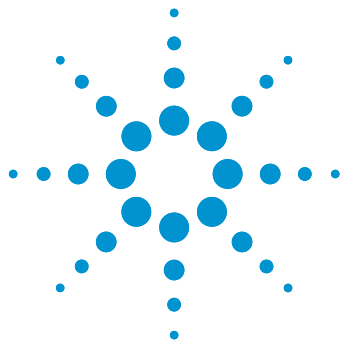
参考文献

- Owen; *et al.* Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene, *Food and Chemical Toxicology* **2000**, *38*, pp 647-659
- Cunha; *et al.* Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, pp 3351-3356
- Aparicio, R; Aparicio-Ruiz, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques, *Journal of Chromatography A* **2000**, *881*, pp 93-104
- Cort; *et al.* Stability of Alpha- and Gamma-Tocopherol: Fe^{3+} and Cu^{2+} Interactions, *Journal of Food Science* **1978**, *43*, pp 797-798

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-5499ZHCN



使用 Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统与质谱检测分析植物油中的抗氧化剂

应用简报

食品分析与农业

作者

Maria Rambla-Alegre,
Melissa N. Dunkle,
Gerd Vanhoenacker,
Frank David 和 Pat Sandra
色谱研究所
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Martin Vollmer
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany



摘要

本应用简报展示了 SFC 和 UHPLC 在植物油样品的抗氧化剂分析中的互补性。Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统与单四极杆质谱检测相结合，能够在超临界流体色谱 (SFC) 和超高效液相色谱 (UHPLC) 之间自动切换，同时利用这两种技术进行分析。

实现了良好的质谱峰面积重现性 (RSD < 5.0%) 和灵敏度，证明该系统可用于定性分析以及定量分析。使用标准溶液和植物油展示了性能数据。采用简单的甲醇萃取法，植物油样品中的所有抗氧化剂均获得了良好的回收率。

前言

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC-MS 系统代表了先进的填充柱 SFC，可提供类似于 HPLC 的灵敏度、600 bar 的性能范围以及出色的仪器和方法稳定性，这些均在基于液相色谱的系统上实现，该系统实现了真正的模块化且具有高灵活性¹。

使用填充柱的 SFC 是液相色谱技术的一个重要补充。尤其在手性和正相分离方面，SFC 展示了其应用潜力。本应用简报介绍了通过在 SFC 和 UHPLC 模式之间进行切换，在一个运行序列中获得有关分析物混合物的互补性数据。采用此混合型系统可避免投资两个独立的系统，消除了系统之间变异性的影响，大大节省了成本和实验室空间¹。

维生素 E 作为抗氧化剂具有重要作用。不同的立体异构体（同效维生素）在各种植物油中非常常见，展示了维生素的活性差异。本应用简报介绍了使用 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC/MS 系统在 SFC/MS 和 LC/MS 模式下对植物油中 14 种抗氧化剂的分析。由于母育酚（生育酚和生育三烯酚）的生物活性和化学性质各不相同，因此单独测定并定量分析各种同效维生素非常重要。八种母育酚只能在 SFC-MS 模式下得到完全分离。在这种情况下，利用 SFC 进行分离显著快于使用 UHPLC 分离。

实验部分

溶液

用甲醇配制各种抗氧化剂的储备液（浓度为 1–5 mg/mL，取决于溶解

度）。然后将这些储备液混合，配制成含有 14 种化合物的测试混标。大多数实验均使用浓度为 100 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。表 1 列出了色谱峰归属、化学名称和分子量。对于加标样品，在萃取之前，加入溶于溶剂中的抗氧化剂储备液。

油样品购自当地超市。称取 100 mg 油样品并加入 1 mL 溶剂，对油样品和加标油样品进行萃取。将该混合物涡旋混合 30 秒，静置 2 分钟后，再次涡旋混合 30 秒。然后将样品在 5000 × g 下离心 5 分钟，并将上清液转移至自动进样器样品瓶中以备进样。

峰归属	化学名称	CAS	分子量 (g/mol)	供应商
1	没食子酸丙酯 (PG)	121-79-9	212.2	Sigma
2	叔丁基氢醌 (TBHQ)	1948-33-0	166.2	Sigma
3	6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸 (TROLOX)	53188-07-1	250.3	Sigma
4	丁基羟基苯甲醚 (BHA)	25013-16-5	180.2	Sigma
5	没食子酸辛酯 (OG)	1034-01-1	282.3	Sigma
6	丁羟甲苯 (BHT)	128-37-0	220.3	Sigma
7	没食子酸月桂酯 (LG)	1166-52-5	338.4	Sigma
8	δ -生育三烯酚 (δ -TT)	25612-59-3	396.6	Cayman Chem.
9	γ -生育三烯酚 (γ -TT)	14101-61-2	410.6	Cayman Chem.
10	α -生育三烯酚 (α -TT)	58864-81-6	424.7	Cayman Chem.
11	δ -生育酚 (δ -TP)	119-13-1	402.6	Cabiochem
12	γ -生育酚 (γ -TP)	54-28-4	416.7	Calbiochem
13	β -生育酚 (β -TP)	148-03-8	416.7	Calbiochem
14	α -生育酚 (α -TP)	59-02-9	430.7	Calbiochem

表 1
分析的抗氧化剂

系统配置

只需添加一个包含通用阀驱动 (G1170A) 和阀头 (G4232B) 的 2 位/10 通阀以及第二个泵 (G1311B), 即可将 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 转化为混合型 SFC/UHPLC 系统。该系统可在 UHPLC 模式 (图 1a) 或 SFC 模式 (图 1b) 下运行。通过切换 2 位/10 通阀, 即可完成两种模式之间的交替, 可以在相应方法开始时作为方法参数对其进行编程¹。柱温箱配备 2 位/6 通色谱柱切换阀, 该阀能够针对各种模式选择合适的色谱柱。

将 SFC 与 MS (或 ELSD) 联用时, 应考虑进行一些改进²。将毛细管加热装置安装于质谱进样口的正前方。在 SFC 模式下, 主要由二氧化碳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, 导致传输线冷冻。另外, 在紫外检测器和 BPR 之间将补偿流加入系统中。需要使用这一额外的补偿流来获得最佳的保留时间和峰面积重现性。

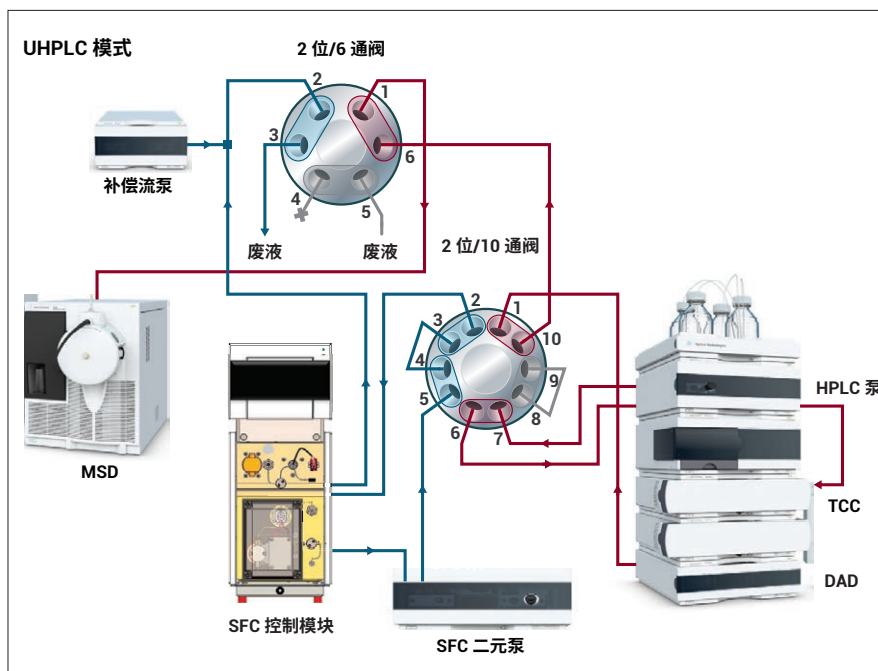


图 1a
混合系统在 UHPLC/MS 模式下的示意图

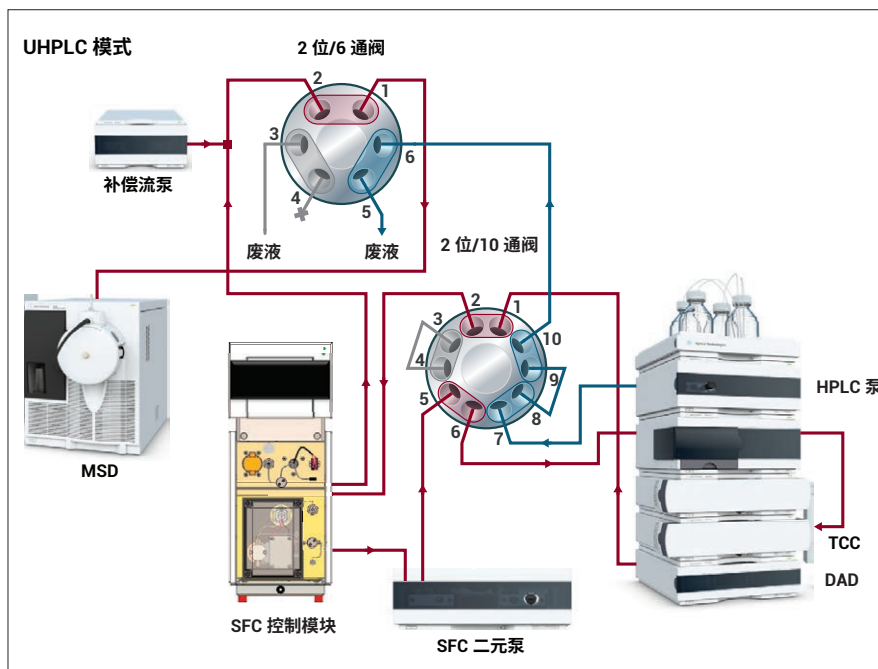


图 1b
混合系统在 SFC/MS 模式下的示意图

将 0.12 mm × 105 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5021-1820) 从紫外检测器连接至安捷伦零死体积 T 形管 (部件号 0100-0969)。利用 Agilent G1311B 泵供应补偿流, 并使用 0.25 mm × 800 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5065-9930) 将该泵连接至 T 形管。利用 0.12 mm × 400 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5021-1823) 将 T 形管连接至 BPR。Caloratherm 预加热器套管位于 0.17 mm × 10 mm 不锈钢毛细管 (部件号 5061-3361) 的外围, 并且包含预加热器装置的管线直接连接至质谱进样口。此外, 需要添加如图 1a 和 1b 所示的 2 位/6 通阀, 在质谱检测之前连接来自 SFC 和 UHPLC 的流路。

借助 SFC 配置中的加热装置和补偿流, 将不会发生冷冻, 并且将显著改善质谱重现性。

实验条件

表 3 列出了用于分离包含 14 种组分的抗氧化剂混合物和植物油样品的方法参数。

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统

G4309A	Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统	
G1311B	Agilent 1260 Infinity 四元泵 (可用 G1312B、G1310B、G4220A/B 和 G4204A 替代)	
G1170A	Agilent 1290 Infinity 阀驱动	
G4232B	2 位/10 通阀阀头, 600 bar	
G6130B	单四极杆 LC/MS	
G4231A	2 位/6 通阀阀头, 600 bar	
G1170A	Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (需要第二个阀驱动来支持 2 位/6 通阀阀头)	
AG1	Caloratherm ²	可通过 RIC 获得 ¹
AG004	预加热器 ²	可通过 RIC 获得 ¹

¹ 联系 info@richrom.com 获取更多信息

² 可使用 G1316A 或 G1316C 热交换器替代毛细管加热器

表 2
系统模块

条件	UHPLC 模式	SFC 模式
进样量:	15 µL (柱头进样 5 µL)	15 µL (柱头进样 5 µL)
色谱柱:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm (部件号 695775-902)	Agilent ZORBAX Rx-SIL, 4.6 × 250 mm, 5 µm (部件号 880975-901)
BPR:	90 bar*	120 bar
SFC 流速:	-	2 mL/min
UHPLC 流速:	0.4 mL/min	1 mL/min
超临界流体:	-	CO ₂
改性剂:	(A) 0.1% FA 的水溶液 (B) 0.1% FA 的甲醇溶液	甲醇
UHPLC 梯度:	15 分钟内 20%–100% B (总共 25 分钟)	
SFC 梯度:		3%–12% B (0–25 分钟)
柱温:	30 °C	50 °C
补偿流流速:		0.1% FA 的甲醇溶液, 0.8 mL/min
Caloratherm:		60 °C
DAD:	292/10 nm, 参比 400/50 nm	292/10 nm, 参比 400/50 nm
APCI:	毛细管电压 ± 4000 V 电晕电流 = 4.0 µA (+), 20 µA (-) 干燥气 = 6.0 L/min, 325 °C 雾化器压力 = 55 psig 蒸发器温度 = 350 °C	毛细管电压 ± 4000 V 电晕电流 = 4.0 µA (+), 20 µA (-) 干燥气 = 6.0 L/min, 325 °C 雾化器压力 = 60 psig 蒸发器温度 = 350 °C

* 仅用于维持 BPR 的正常运行。该压力不应用于 UHPLC 色谱柱

表 3
混合型系统的实验条件

结果与讨论

对包含 14 种组分的抗氧化剂混合物进行分析，以证明 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC/MS 系统的易用性、互补性和性能。采集紫外和质谱数据 (APCI)，利用质谱数据确认化合物身份。图 2 显示了抗氧化剂混标 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在 UHPLC 模式下的分离结果。

建立校准曲线，结果表明在 SFC 和 LC 模式下均获得了优异的线性。表 4 汇总了 UHPLC 结果。

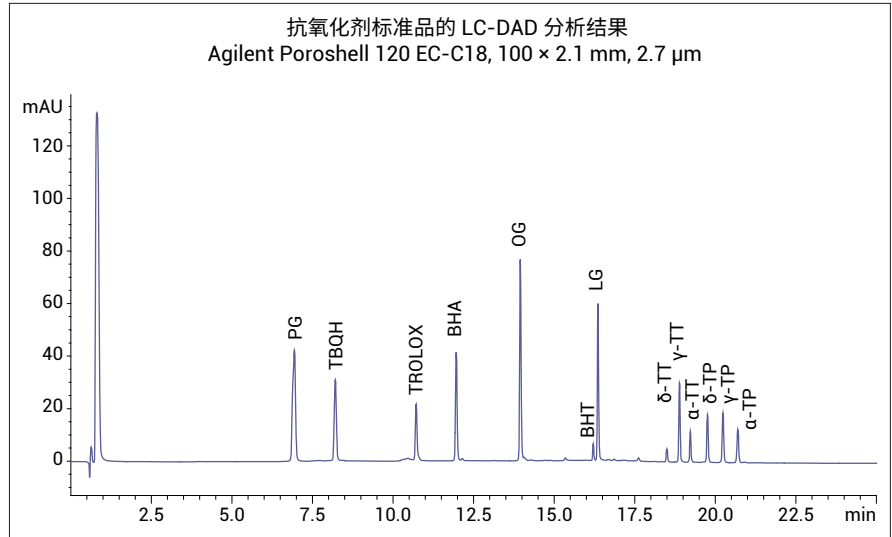


图 2
利用 LC-DAD 分析 14 种抗氧化剂的混合物 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 所得到的结果

	线性 (R^2) ¹	重现性 (% RSD) ²	重现性 (% RSD) ³	回收率 5 mg/kg (%)	重现性 (% RSD)	回收率 100 mg/kg (%)	重现性 (% RSD)
PG	0.99977	3.7	4.11	102.8	2.0	103.3	0.7
TBHQ	0.99807	4.4	4.8	72.6	20	87.2	23
TROLOX	0.99969	5.0	4.3	94.9	17	92.6	6
BHA	0.99978	0.7	2.1	105.2	4.5	100.8	1.2
OG	0.99978	3.0	4.5	101.2	1.6	104.0	1.2
BHT	0.99981	4.9	1.7	104.7	5.6	99.4	2.0
LG	0.99974	0.8	1.4	99.97	7.2	104.4	0.9
δ -TT	0.99965	4.5	2.2				
γ -TT	0.99969	1.8	2.5				
α -TT	0.99953	2.1	2.5				
δ -TP	0.99972	1.8	2.3				
γ -TP 和 β -TP	0.99987	1.8	2.7				
α -TP	0.99943	1.3	2.6				

¹ 0.1、0.5、1、5、10、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液，每种浓度进样 1 次 (UV)

² 6 次连续进样，0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

³ 6 次连续进样，25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

* 未计算生育酚和生育三烯酚的回收率，因为它们已经存在于油样品中

表 4
LC 模式方法性能数据

使用抗氧化剂标准溶液和加标油样品考察方法的重现性和线性。所有抗氧化剂的检测限等于或低于 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这相当于油或脂肪样品中的 1 mg/kg 左右或更低。对油样品和加标油样品的提取物进行分析，以确定回收率和准确度（图 3）。在油样品中加入 5 mg/kg 和 100 mg/kg 的各种抗氧化剂，并对提取物中的检出量与相同浓度的标准溶液进行比较。

紫外和质谱结果获得了类似的分离度和峰宽，并在 0.1–100 ppm 范围内表现出良好的线性。对于测试混标中的所有组分，MSD 的灵敏度比紫外检测的灵敏度高出 10 倍左右。因此，利用 APCI MS 确认峰的归属。需要重点注意的是，加标样品中的两种化合物（TBHQ 和 TROLOX）在序列分析过程中略有分解，导致这些化合物的回收率较低。

尽管 LC 方法的性能出色，但是并非所有生育酚都得到分离（ β -TP 和 γ -TP 发生共洗脱）。另外，观察到某些其他共洗脱现象（BHA 和 α -生育酚，图 4）。利用 SFC-MS 模式实现了八种母育酚的完全分离，该模式能够用于分析不同油提取物（煎炸油、葵花籽油、菜籽油和 Tocomix）中的各种母育酚。Tocomix 是葵花籽油中母育酚的一种商业化混合物（AOMS, S.A., Argentina）。

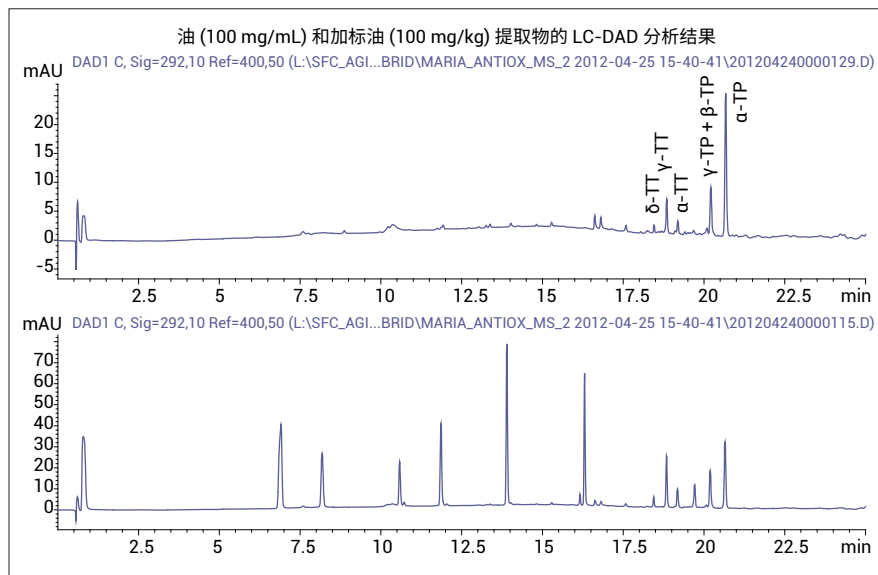


图 3 利用 LC 方法分析油 (100 mg/mL) 和加标煎炸油 (100 mg/kg) 提取物所得到的结果

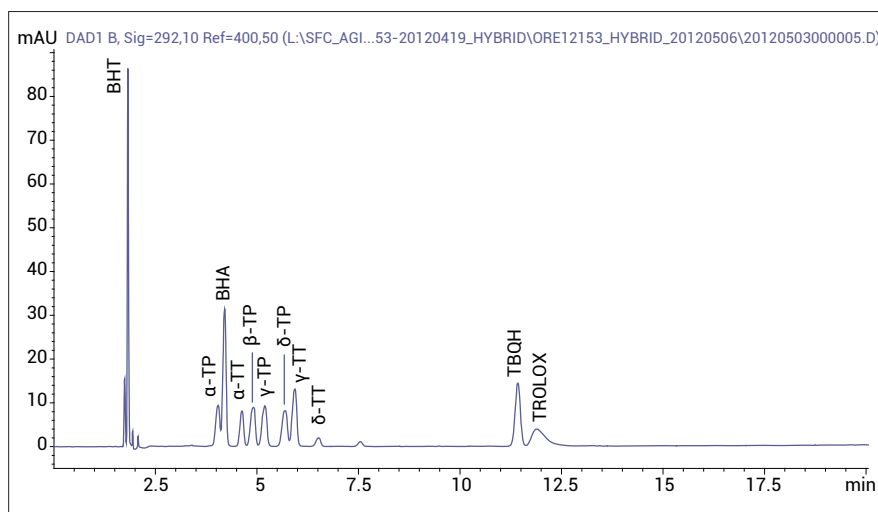


图 4 利用 SFC-DAD 分析 14 种抗氧化剂的混合物 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 所得到的结果

生育酚和生育三烯酚的极性主要受色原烷醇环中甲基基团数量的影响，并且在较小程度上受甲基基团空间效应的影响以及生育三烯酚的不饱和侧链相比于生育酚而言极性略有提高的影响。最难分离的化合物是 β -母育酚和 γ -母育酚（图5和6），因为它们的环结构中具有三个甲基基团。 $[M-H]^+$ 离子的APCI质荷比(m/z)对于 α -、 β -、 γ -和 δ -生育酚分别为429、415、415和401，对于 α -、 β -、 γ -和 δ -生育三烯酚分别为423、409、409和396。

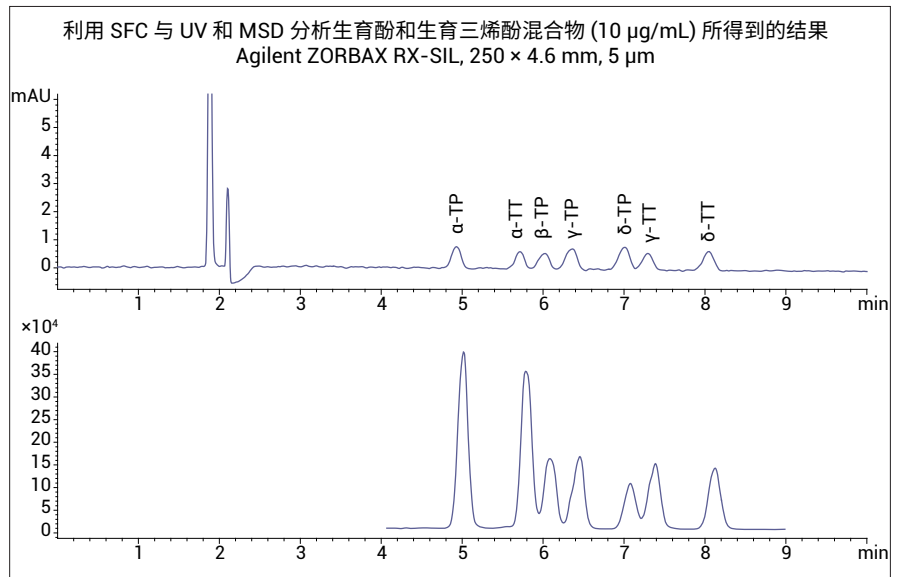


图5
利用 SFC 与 UV 和 MSD 分析生育酚和生育三烯酚混合物 (10 µg/mL) 所得到的结果
(β -生育三烯酚无纯标准品可用)

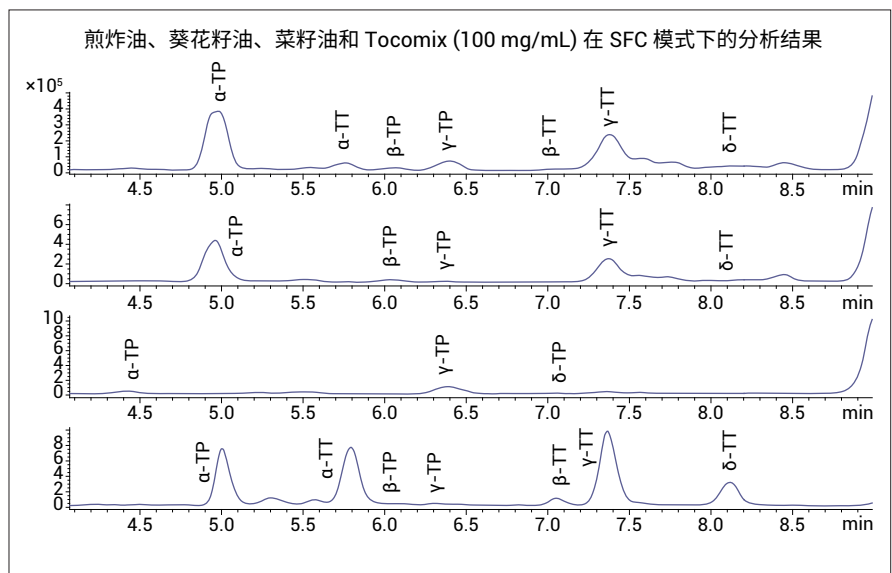


图6
煎炸油、葵花籽油、菜籽油 (100 mg/mL) 和 Tocomix 在 SFC 模式下的分析结果

图 7 显示了利用 SFC-APCI 分析得到的煎炸油样品中 α -生育酚的质谱图。选择离子 m/z 429 进行进一步分析，该离子归属于 α -生育酚的初始质子化以及随后的脱氢作用所形成的 $[M-H]^+$ ^{4,5}。

执行分离时，在 UV 和 MSD 中获得了相似的分度。在 0.1–50 ppm 的范围内表现出良好的线性， R^2 值为 0.99。总体而言，LC/MS 模式和 SFC/MS 模式的检测限 (LOD) 处于相同的数量级。结果表明，两种技术对复杂的分析物混合物具有出色的分离能力和良好的重现性。需要注意的是，生育酚和生育三烯酚只能在 SFC-MS 模式下得到完全分离。

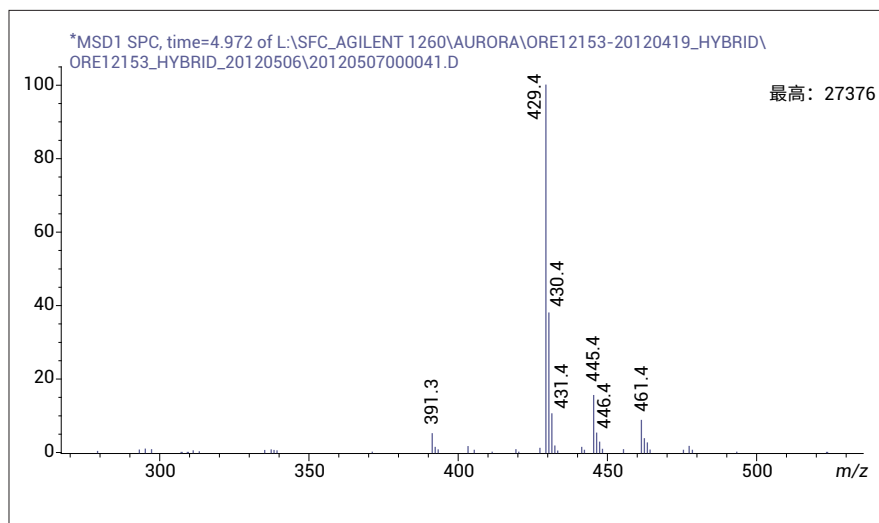


图 7
利用 SFC 模式得到的煎炸油中 α -生育酚的质谱图

	线性 (R^2) ¹	重现性 (% RSD) ²	重现性 (% RSD) ³	煎炸油 ⁴		葵花籽油 ⁴		菜籽油 ⁴		Tocomix	
				回收率 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (ppm)	RSD (%)
δ -TT	0.99993	3.3	2.7	24	5.5	9	4.9	-	15.4	4.2	
β -TT*	不适用	不适用	不适用	-	-	-	检出				
γ -TT	0.99975	4.6	4.4	96	1.7	70	6.0	-	43.3	5.2	
α -TT	0.9994	3.9	2.9	19	4.3	-	-	20	4.6		
δ -TP	0.99942	3.8	4.4	-	-	0.5	5.8	-			
β -TP	0.99764	4.7	4.7	3	5.8	9	5.6	-	0.4	4.4	
γ -TP	0.99805	3.3	4.0	42	6.0	2.1	5.4	40	5.3	0.2	5.3
α -TP	0.99692	2.1	4.5	165	3.2	124	4.0	2.5	2.9	16.4	3.6

¹ 0.1、0.5、1、5、10、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液，每种浓度进样一次 (MS)

² 6 次连续进样，0.5 $\mu\text{g/mL}$

³ 6 次连续进样，25 $\mu\text{g/mL}$

⁴ 6 次连续进样

* 无定量数据。无可用的纯标准物质

表 5
SFC 模式方法性能数据

结论

Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC/MS 系统可在一台仪器上由 SFC 和 UHPLC 获得互补性数据，是一种出色的分析解决方案。对不同来源的植物油样品以及加标植物油样品进行萃取，并计算抗氧化剂的回收率。所有抗氧化剂均获得了良好的回收率。

利用 UHPLC 对酚类抗氧化剂进行分析。在该模式下，并非所有生育酚都能得到分离。仅在执行 SFC-MS 模式时，同效维生素才得以完全分离。良好的灵敏度和高稳定性证明，混合型 SFC/UHPLC/MS 非常适合在定量以及定性分析中分离并检测所有抗氧化剂异构体。

参考文献

1. M. Vollmer, M. Becker. Agilent 1260 Infinity Hybrid SFC/UHPLC System (Agilent 1260 Infinity 混合型 SFC/UHPLC 系统)，安捷伦科技公司出版号 5990-9514EN，**2012**
2. M. Dunkle, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, M. Vollmer. Agilent 1260 Infinity SFC/MS 解决方案，安捷伦科技公司出版号 5990-7972CHCN，**2011**
3. G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, M. Vollmer. Ultrafast analysis of synthetic antioxidants in vegetable oils using the Agilent 1290 Infinity LC (使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统对植物油中的合成抗氧化剂进行超快速分析)，安捷伦科技公司出版号 5990-4378EN，**2009**
4. C. Lauridsen, S.W. Leonard, D.A. Griffin, D.C. Liebler, T.D. McClure, M.G. Traber. *Analytical Biochemistry* 289 89-95 (**2001**)
5. R. Andreoli, P. Manini, D. Poli, E. Bergamschi, A. Mutti, W. M. A. Niessen. *Anal. Bioanal. Chem* 378 987-994 (**2004**)

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/sfc

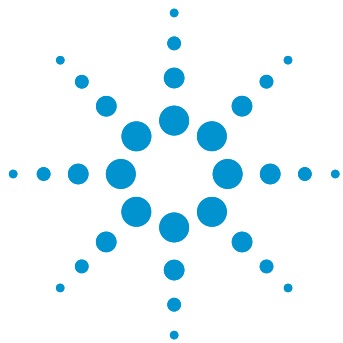
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-1546ZHCHN



Agilent Technologies

第 4 章

法医毒理学与兴奋剂检测应用



D/L-安非他明手性分离方法的开发

利用 SFC/MS 对真实的全血样品进行定量测定

应用简报

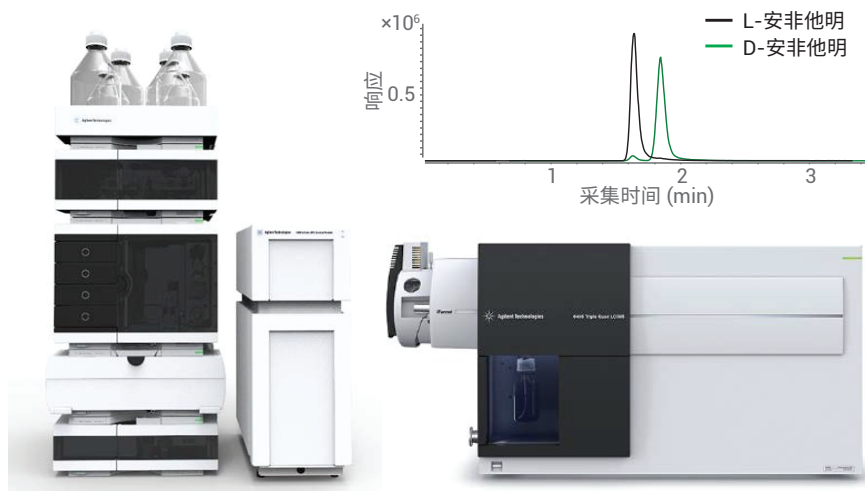
法医毒理学，刑侦学

作者

Melanie Muelek, Herbert Godel,
Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统开发 D/L-安非他明的手性分离方法。研究证明 Agilent 6495 三重四极杆质谱系统可用于这两种手性对映体形式的定量分析。介绍了方法开发过程，并利用最终分析方法确定校准曲线和三重四极杆质谱的定量限。展示了对经过处理的真实全血样品的分析。



前言

化合物 D/L-安非他明具有两种手性对映体形式（图 1）。D-安非他明异构体的活性更高，在制药过程中以纯对映体形式生产¹。

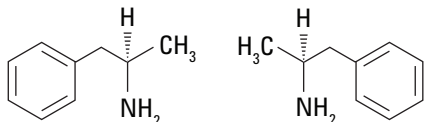


图 1. D-安非他明和 L-安非他明的化学式

在法医毒理学中，可利用色谱法（如 HPLC 与质谱联用法）对体液中的安非他明进行定性和定量测定²。

本应用简报介绍了使用三重四极杆质谱仪开发用于分离并定量测定 D-安非他明和 L-安非他明的快速分析 SFC/MS 方法。该分析方法能够区分医用 D-安非他明的量与非法来源的 D/L-安非他明的量。最后，通过分析真实的提取全血样品，对该方法在法医毒理学领域的应用进行验证。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC/MS 系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (MCT) (G7116B)，带有四色谱柱选择阀
- Agilent 1260 Infinity II 等度泵 (G7110B) 和 SFC/MS 分流器套装 (G4309-68715)
- 采用安捷伦喷射流和 iFunnel 技术的 Agilent 6495 三重四极杆 MSD

仪器设置

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统与安捷伦 LC/MS 系统的推荐配置如之前所述³。

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3
- Agilent MassHunter 三重四极杆采集软件，B.08.02 版
- Agilent MassHunter Optimizer 软件，B.08.02 版
- Agilent MassHunter 离子源和 iFunnel Optimizer 软件，B.08.02 版

- Agilent MassHunter 定量分析软件，B.08.00 版
- Agilent MassHunter 定性分析软件，B.07.00 SP1 版

色谱柱

- Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H 150 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H 250 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK IA 250 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK IC 250 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK ID 250 × 4.6 mm, 5 μm

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。

样品

根据所述校准曲线的相关浓度，在甲醇中用各种储备液（储备液：分析物浓度为 1 ppm 的甲醇溶液）配制 D-安非他明、L-安非他明和 D/L-安非他明溶液。

提供经处理的真实全血样品（参见“致谢”部分）。

样品前处理

用乙腈通过蛋白质沉淀法对真实的全血样品进行处理，并在分析前用流动相 B（乙醇 + 0.1% NH₃ 水溶液）按 1:1000/1:100/1:10 的比例进行稀释。

最终 SFC 方法

参数	值
SFC 流速	4 mL/min
改性剂	乙醇 + 0.1% 氨水
等度	10% 改性剂
柱温	20 °C
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
总运行时间	3 分钟
进样量	5 µL
注入速度	400 µL/min
灌洗体积	4 µL
进样针清洗	3 秒, 甲醇

三重四极杆质谱方法

参数	值
补偿流组成	甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸
补偿流流速	0.4 mL/min
采用安捷伦喷射流离子源进行电喷雾电离	
干燥气	170 °C, 16 L/min
鞘气温度	300 °C, 9 L/min
雾化器	60 psi
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	500 V
iFunnel	高压 RF: 80, 低压 RF: 60
质谱参数	
ESI 极性	正离子
扫描类型	MRM
离子对	2
分析周期	502 ms
ΔEMV	+200 V

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速器电压 (V)
D/L-安非他明	136.1	119.1	250	380	7	1
D/L-安非他明	136.1	91.1	250	380	17	1

结果与讨论

利用外消旋安非他明标准溶液 (100 ppb) 对四种不同的手性固定相色谱柱和两种有机改性剂进行筛选 (参见“实验部分”色谱柱 2 至 5)。由于安非他明是一种碱性化合物,因此在甲醇和乙醇中加入 0.1% 氨水 (碱性添加剂) 并将其用作 CO₂ 改性剂。在初始方法开发步骤中,在所有色谱柱上分别进行不同的等度分离。实验结果表明,色谱柱 2 上实现了初始分离 (图 2)。两种对映体的分离性能均随着改性剂用量的减小而增强。在所选条件下,采用甲醇无法实现基线分离。

为获得更出色的安非他明分离效果,在色谱柱 2 上对洗脱强度较弱的乙醇溶剂进行了测试 (图 3)。当改性剂浓度低于 10% B 时,两个对映体获得了清晰的分离。当改性剂浓度为 10% B 时,对映体在 3.5 至 4.5 分钟之间洗脱;当改性剂浓度为 6% B 时,对映体在 7 至 9 分钟之间洗脱。

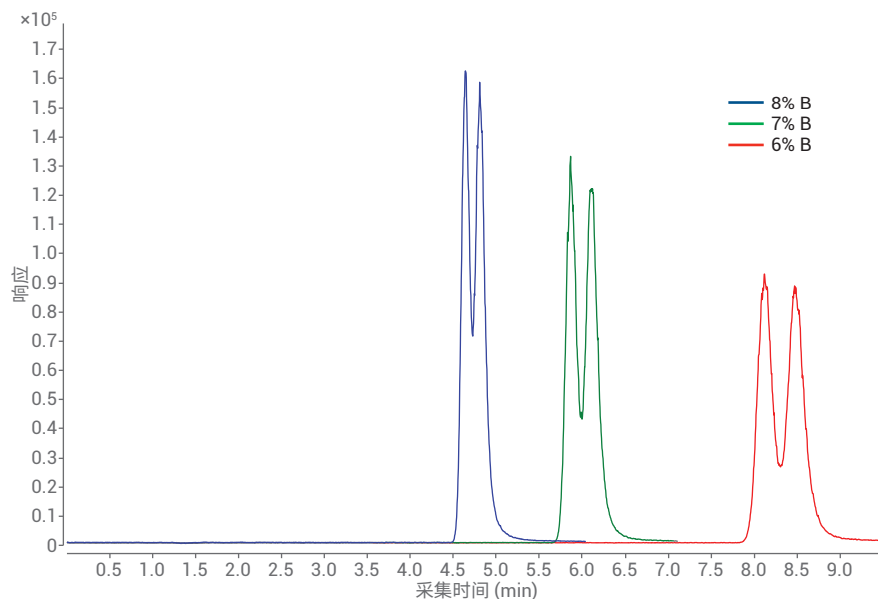


图 2. 使用不同改性剂含量 (改性剂 B: MeOH + 0.1% 氨水, 流速: 3 mL/min, 柱温: 20 °C, 色谱柱: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm, 5 μm) 对 D/L-安非他明对映体 (100 ppb) 的手性分离

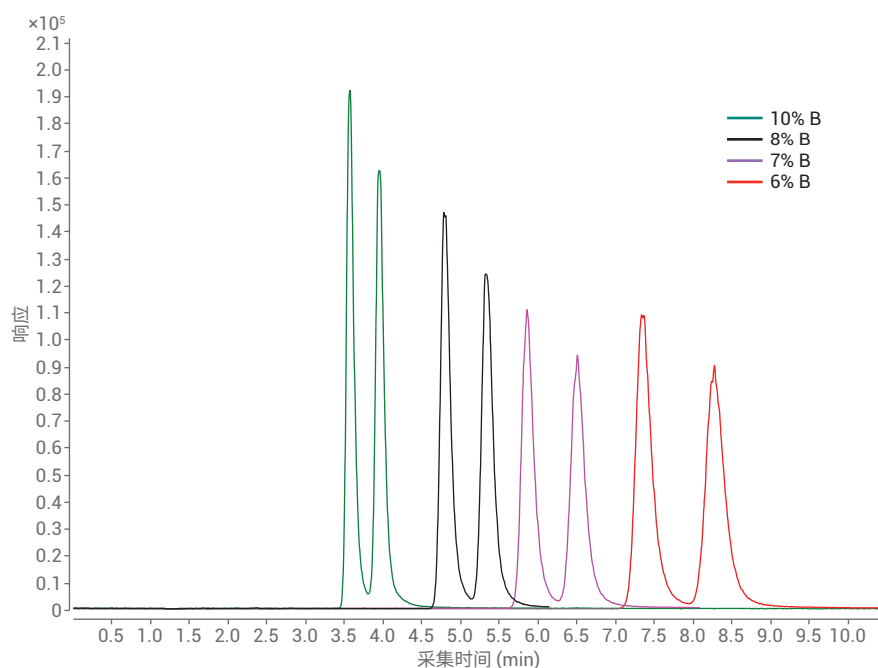


图 3. 使用不同改性剂含量 (改性剂 B: EtOH + 0.1% 氨水, 流速: 3 mL/min, 柱温: 20 °C, 色谱柱: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm, 5 μm) 对 D/L-安非他明对映体 (100 ppb) 的手性分离

在最终步骤中，将流速从 3 mL/min 提高至 4 mL/min，对方法运行时间进行优化。提高流速后，导致对映体在 2.5 至 3.2 分钟之间洗脱（图 4）。为进一步缩短运行时间，采用固定相、内径和粒径相同而柱长更短的色谱柱（色谱柱 1，图 5）。将 250 mm 色谱柱改为更短的 150 mm 色谱柱，将使两种对映体在 1.5 至 2.1 分钟之间提前洗脱。此外，对不同的温度（40、30、20 °C）进行测试，结果发现采用 20 °C 的柱温能够获得最高的分离度（数据未示出）。

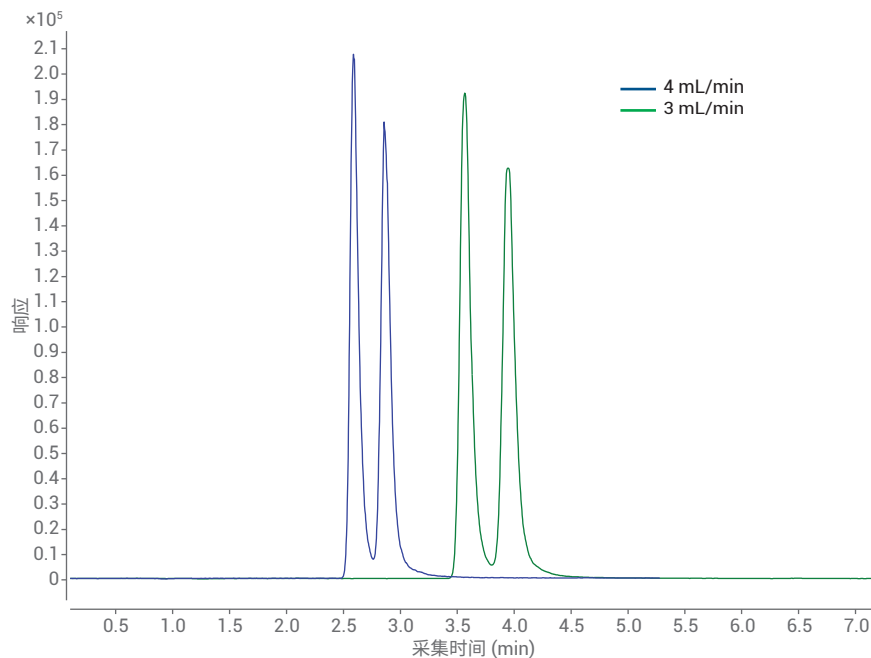


图 4. 使用不同流速（改性剂 B: 10% EtOH + 0.1% 氨水，流速：3 mL/min 和 4 mL/min，柱温：20 °C，色谱柱：CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm, 5 μm）对 D/L-安非他明对映体（100 ppb）的手性分离

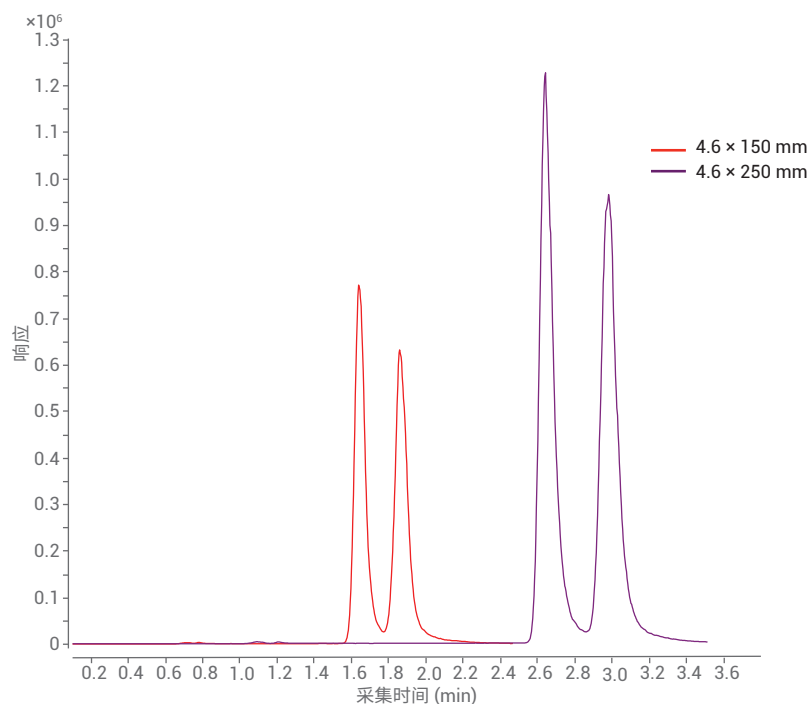


图 5. 使用不同色谱柱尺寸（改性剂 B: 10% EtOH + 0.1% 氨水，流速：4 mL/min，柱温：20 °C，色谱柱：CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm 和 4.6 × 150 mm, 5 μm）对 D/L-安非他明对映体（100 ppb）的手性分离

最后，在转移到质谱仪离子源的过程中添加补偿溶剂以实现适当的电离，这一优化步骤用于获得最高灵敏度。为此，对不同的反压设置进行测试，因为借助分流器设置，反压可调节色谱柱洗脱物转移到离子源的量（图 6）。对于最终方法，采用的反压为 200 bar。还考察了添加的补偿溶剂（甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸）对流速的影响，但由于对灵敏度几乎没有影响，因此流速仍保持在 0.4 mL/min。对质谱的所有离子源参数进行全面优化，以获得最高的灵敏度（参见“实验部分”）。

为最终确认 SFC/MS 方法，对市售纯对映体形式中的 D-安非他明和 L-安非他明标准品单独进行了分析。单个峰来自相应的对映体：1.632 分钟洗脱的 L-安非他明和 1.860 分钟洗脱的 D-安非他明（图 7）。

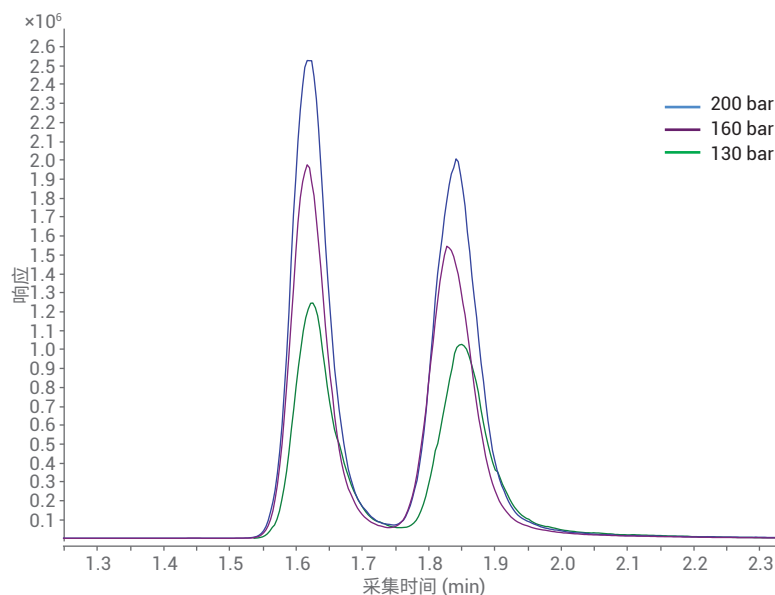


图 6. 优化 SFC 反压设置以最大程度提高质谱灵敏度

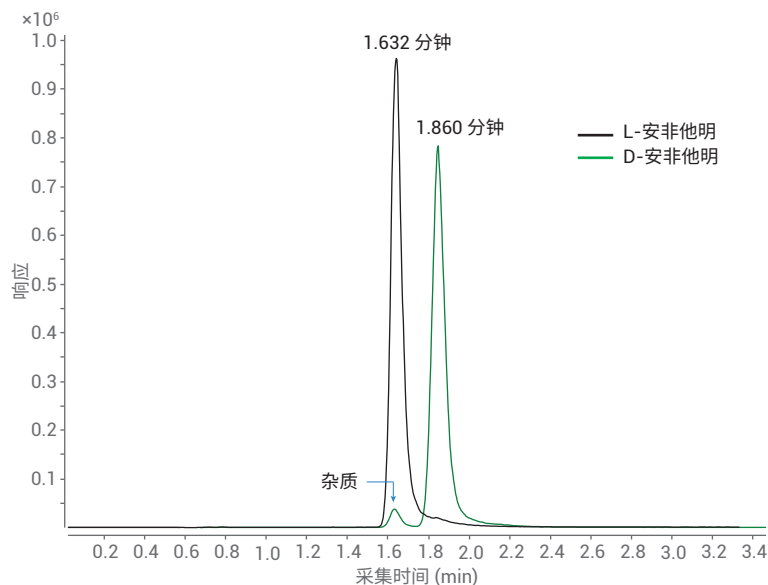


图 7. 利用所开发的手性方法对市售光学纯 D-安非他明和 L-安非他明标准品 (100 ppb) 的手性分离结果。箭头指示 D-安非他明标准品中的 L-对映体杂质

为定量测定 D-安非他明和 L-安非他明，分别绘制 100 ppt 至 100 ppb 的校准曲线，结果呈现出优异的线性（图 8）。根据信噪比 (S/N) 为 10 时的浓度，确定定量限 (LOQ) 为 100 ppt，并确定检测限 (LOD) 为 40 ppt (S/N = 3)。L-安非他明和 D-安非他明的线性系数分别为 0.9998 和 0.9996。

为证明所开发 SFC/MS 方法的能力，使用所开发的方法对按照“实验部分”所述步骤制备的实际全血样品进行测量。用改性剂 B 按 1:10、1:100 和 1:1000 的比例对血液样品进行稀释（图 9 和表 1）。表 1 列出了测得

的样品中的 D-安非他明和 L-安非他明的峰面积和峰高等详细信息，并证明安非他明在体内以外消旋形式存在，其主要来源于非药用毒品。图 9 显示了 1:1000 和 1:10 稀释液所对应的色谱图。

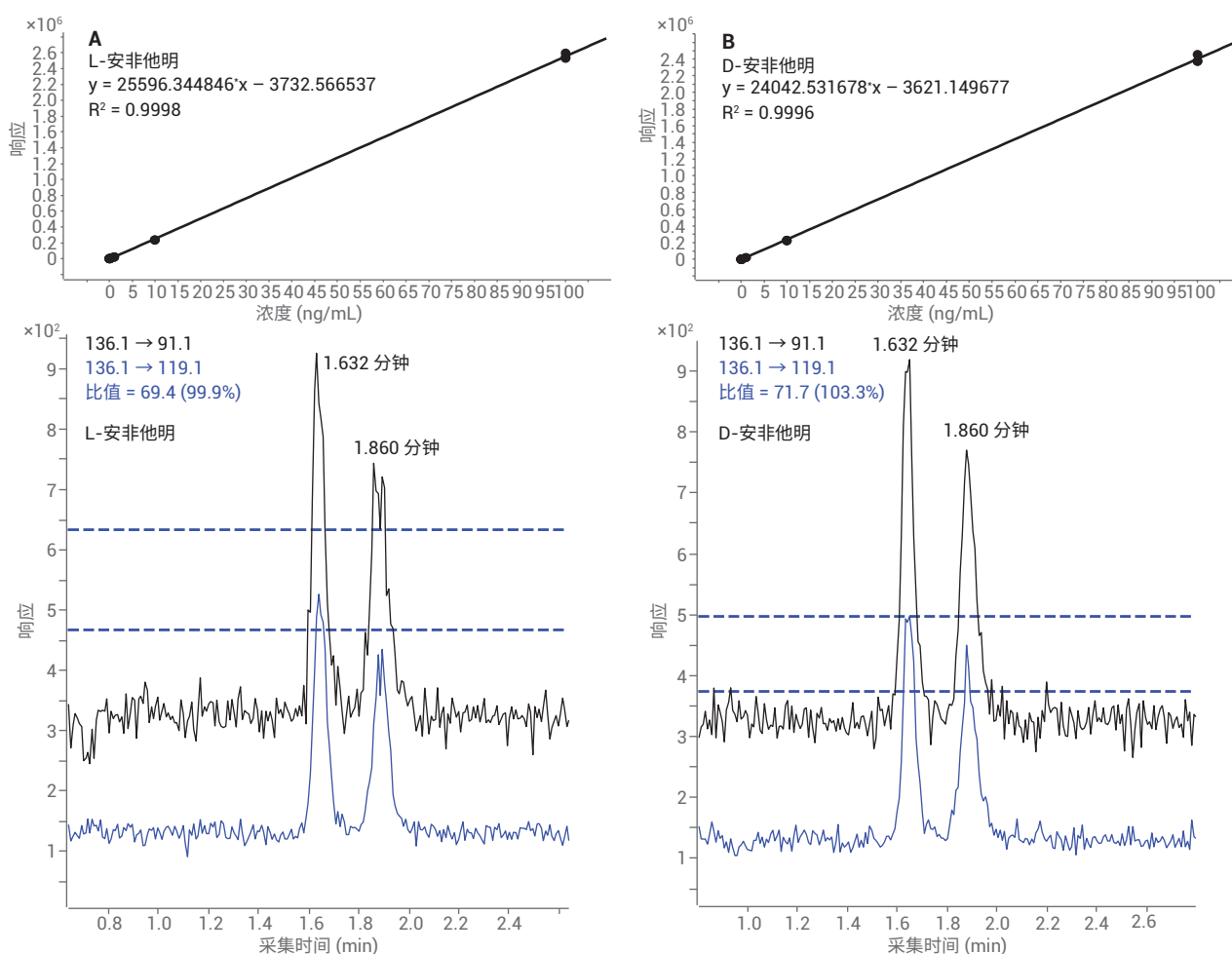


图 8. 校准曲线以及 100 ppt 的 L-安非他明在保留时间 1.632 分钟处 (A) 和 D-安非他明在保留时间 1.860 分钟处 (B) 的定性/定量离子信号。获得的 D-安非他明和 L-安非他明之间的分离度大于 1，总运行时间为 3 分钟

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 快速分离 D/L-安非他明对映体并使用 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪进行高灵敏度定量测定的方法开发。SFC 分离能够在 3 分钟的总运行时间内完成，表明分析时间很快。定量测定的 LOQ 低于 100 ppt。最后，表明所开发的方法成功应用于可靠测定全血制备样品中的安非他明。

致谢

感谢瑞典林雪平国家法医学委员会的 Martin Josefsson 和 Markus Roman 提供经处理的真实全血样品。

参考文献

1. Heal, D. J; et al. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *Journal of Psychopharmacology* **2013**, 27 (6), 479–496
2. Kde Mariotti, C.; et al. Simultaneous analysis of amphetamine-type stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicology* **2014**, 38(7), 432–437
3. Use of the SFC-MS Splitter Kit G4309-68715 (SFC-MS 分流器套装 G4309-68715 的使用), 安捷伦科技公司技术简报, 出版号 G4309-90130, **2015**

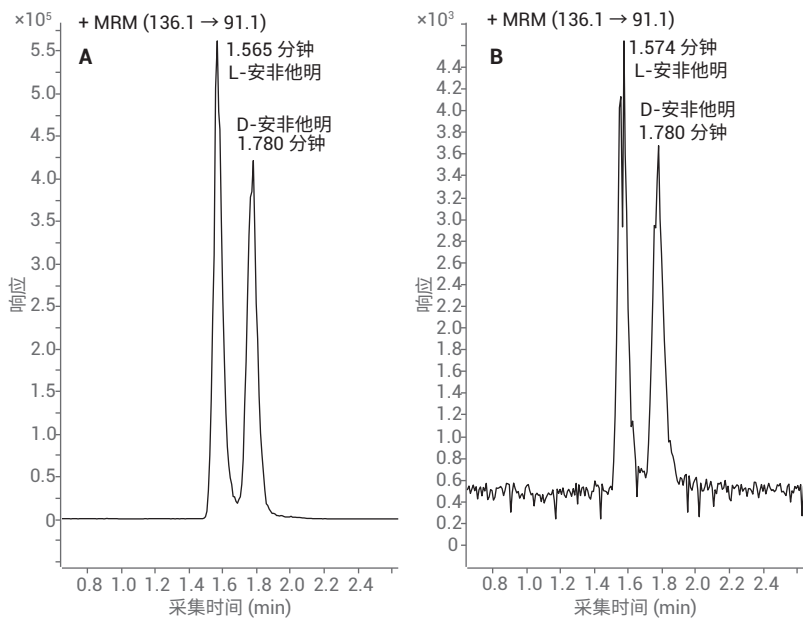


图 9. 用改性剂按 1:10 (A) 和 1:1000 (B) 比例稀释的经处理实际全血样品中的 D/L-安非他明

表 1. 用改性剂按 1:10、1:100 和 1:1000 的比例稀释制得的实际全血样品中 D-安非他明和 L-安非他明的详细测量结果

名称	L-安非他明结果			D-安非他明结果		
	RT	峰面积	峰高	RT	峰面积	峰高
Case 2 Dil 1_1000	1.574	14605.41	4129.08	1.780	14342.73	3159.12
Case 2 Dil 1_100	1.574	178409.64	48475.84	1.780	165744.26	34952.28
Case 2 Dil 1_100	1.574	165569.54	45037.95	1.780	154606.59	35124.32
Case 2 Dil 1_100	1.565	156671.29	44736.99	1.780	139086.04	32365.24
Case 2 Dil 1_10	1.565	2073946.07	561571.92	1.780	1780961.78	417402.00

www.agilent.com

用于司法鉴定。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-8262ZHCN

应用简报

法医毒理学 - 刑侦学



安非他明相关药物的对映体及其结构异构体的分离

使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 分离并联用质谱仪进行检测



作者

Melanie Muelek, Herbert
Godel, Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了对安非他明相关药物的对映体及其位置异构体以及相同化合物对映体的分离。使用手性柱和 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统进行该分离。采用 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪和 Agilent 6150 单四极杆质谱仪，实现对结构异构体以及对映体的定性检测和定量测定。

前言

异构化合物 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 是结构与安非他明相关的致幻剂，在化学类别上属于苯并咪喃化合物（图 1）¹。这三种化合物是包含一个手性中心的结构异构体；因此，各自存在两种对映体形式。

本应用简报介绍利用手性色谱法对这些结构异构体及其对映体的分离。使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统与质谱联用系统实现该分离，其中质谱用于定性和定量测定。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC/MS 系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT) (G7116A)，配备
- Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀 (部件号 5067-4287)
- Agilent 1260 Infinity II 等度泵 (G7110B) 和 SFC/MS 分流器套装 (G4309-68715)
- 采用安捷伦喷射流和 iFunnel 技术的 Agilent 6495 三重四极杆 MSD
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6150 单四极杆 MSD

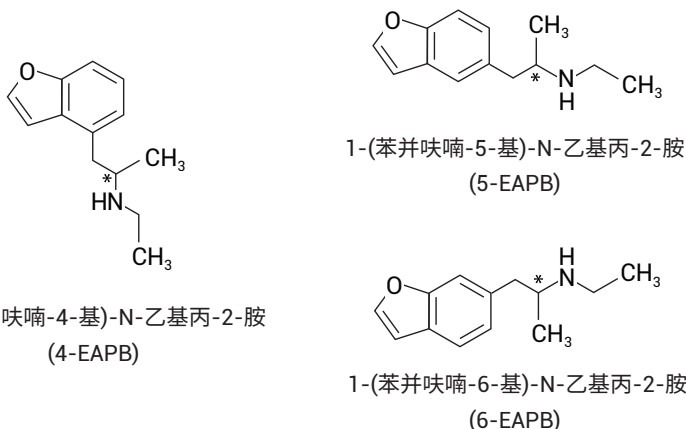


图 1. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的化学式。每种异构化合物还具有一个立体中心（星号），因此各自存在两种对映体形式

在色谱柱 1 上分离所有六种异构体（对映体和结构异构体）的 SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
改性剂	甲醇 + 0.1% 氨水
等度	10% 改性剂
柱温	20 °C
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
总运行时间	7 分钟
进样量	5 µL
注入速度	400 µL/min
灌洗体积	4 µL
进样针清洗	3 秒，甲醇

在色谱柱 2 上分离三种结构异构体的 SFC 方法

参数	值
SFC 流速	2.5 mL/min
改性剂	甲醇 + 0.1% 氨水
等度	11% 改性剂
柱温	30 °C
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
总运行时间	3.5 分钟
进样量	1 µL
注入速度	400 µL/min
灌洗体积	4 µL
进样针清洗	3 秒，甲醇

仪器设置

Agilent 1260 Infinity II 分析型 SFC 系统与安捷伦 LC/MS 系统的推荐配置如之前所述²。

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 修订版 C.01.07 SR3
- MassHunter LC/TQ 采集软件, B.08.02 版
- MassHunter Optimizer 软件, B.08.02 版
- MassHunter 离子源和 iFunnel Optimizer 软件, B.08.02 版
- MassHunter 定量分析软件, B.08.00 版
- MassHunter 定性分析软件, B.07.00 SP1 版

色谱柱

1. Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H, 250 × 4.6 mm, 5 μm
2. Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-3, 150 × 4.6 mm, 3 μm

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。

样品

单独的 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 储备液 (1 ppm 的甲醇溶液) 分别经稀释后使用, 如文本中所概述。

三重四极杆质谱仪和单四极杆质谱仪所用的质谱方法

参数	值
补偿流组成	甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸
补偿流流速	0.4 mL/min
采用安捷伦喷射流离子源进行电喷雾电离	
干燥气	150 °C, 11 L/min
鞘气温度	350 °C, 12 L/min
雾化器	45 psi
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	0 V
iFunnel*	高压 RF: 90 低压 RF: 70
三重四极杆参数	
ESI 极性	正离子
扫描类型	MRM
离子对	2
分析周期	502 ms
ΔEMV	+200 V
单四极杆参数	
ESI 极性	正离子
扫描类型	SIM (m/z 204.1)
驻留时间	590 ms
碎裂电压	70 V
增益	1.0

* 仅用于三重四极杆系统

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速器电压 (V)
4/5/6-EAPB	204.1	159.1	250	380	12	1
4/5/6-EAPB	204.1	131.1	250	380	22	1

结果与讨论

分离对映体并用三重四极杆质谱仪进行定量测定

选择之前开发的用于 D-安非他明和 L-安非他明的手性分离方法³ 作为开发 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 六种异构体分离方法的起点。该方法有望实现全部六种可能立体异构体的分离 (图 2)，其中全部六种异构体在 2.8 分钟至 6.0 分钟之间获得了部分分离。由于分离不完全，因此需对该分离进行进一步优化。

图 2 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20 °C
流动相	10% B (EtOH + 0.1% 氨水)
流速	4 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

下一步改变改性剂 B 的乙醇含量，但结果表明分离效果未得到改善。降低改性剂 B 的含量导致保留时间延长，同时峰展宽、分离度降低，对于后洗脱的峰而言尤其如此 (数据未示出)。还考察了柱温对对映体分离的影响 (图 3)。

图 3 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20、30、40、45 °C
流动相	10% B (EtOH + 0.1% 氨水)
流速	4 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

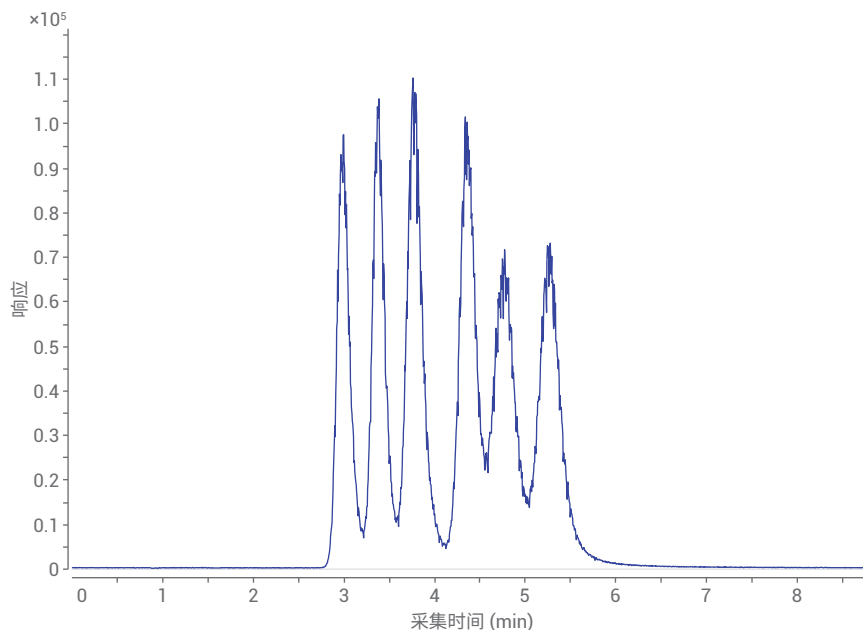


图 2. 用于分离 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种异构体的初始方法

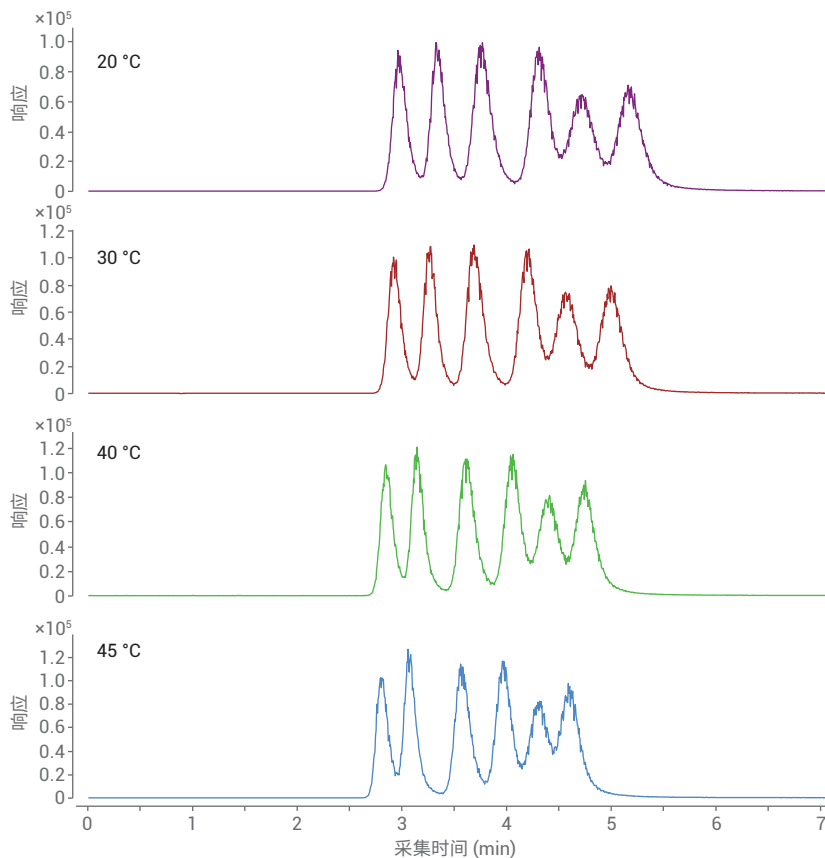


图 3. 取决于柱温的 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 所有六种异构体的分离

在 20–30 °C 的较低柱温下获得了最高分离度，而使用较高温度时，分离度有所下降。还测试了不同溶剂，以改善六种异构体之间的分离度。采用甲醇代替乙醇作为改性剂时，色谱峰洗脱时间更早（介于 2.0 和 3.5 分钟之间），且获得了更出色的峰形。然而，峰仍未得到完全分离（图 4）。

图 4 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20 °C
流动相	10% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	4 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

最后，发现用 10% 甲醇（含 0.1% 氨水）作为改性剂，在 3 mL/min 的流速下可获得最佳分离效果（图 5）。

图 5 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20 °C
流动相	10% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	3 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

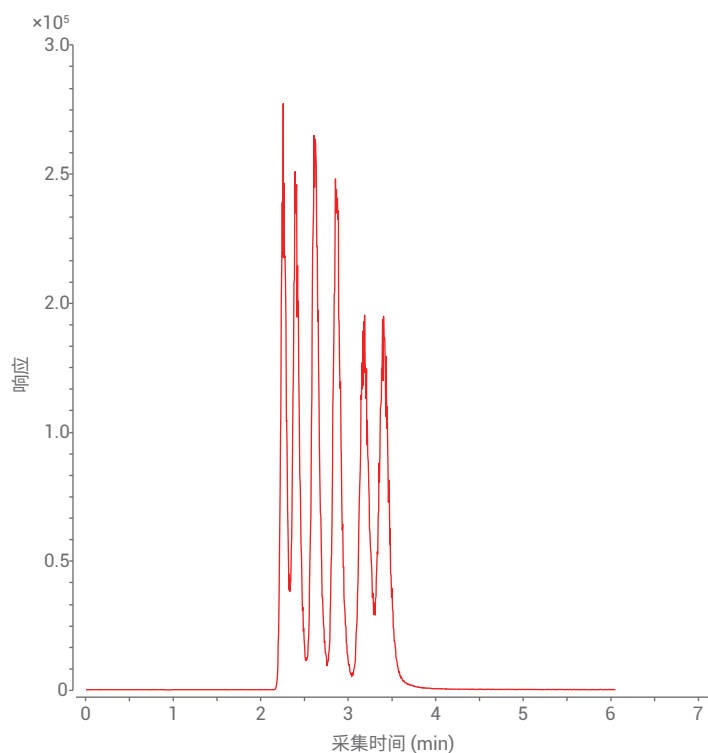


图 4. 采用甲醇作为改性剂分离 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种异构体的方法

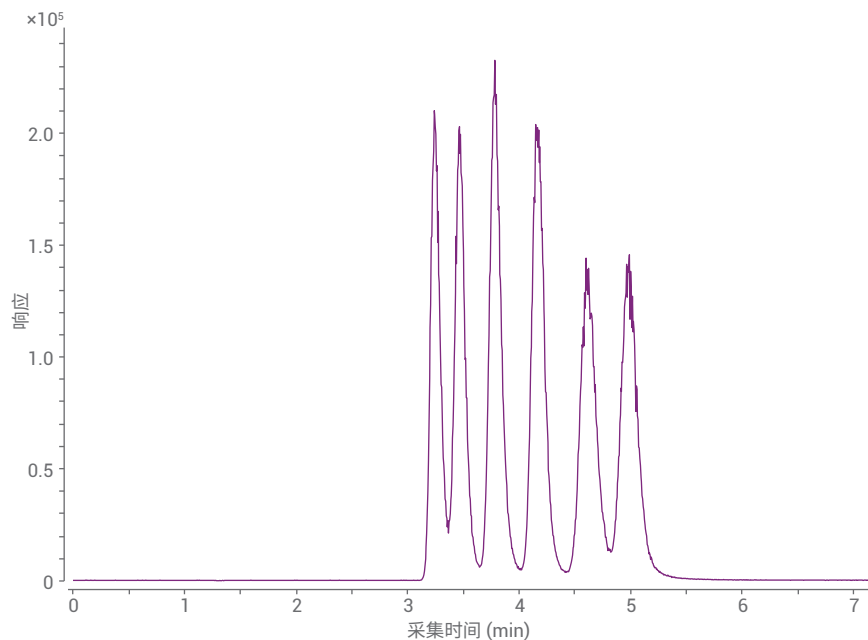


图 5. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种异构体的优化分离效果

化合物在 3.2 至 5.5 分钟之间洗脱。通过比较 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的外消旋单标,对化合物进行鉴定(图 6)。在优化的条件下:

- 4-EAPB 在 3.1 至 3.7 分钟之间洗脱
- 5-EAPB 在 3.6 至 4.6 分钟之间洗脱
- 6-EAPB 在 4.4 至 5.4 分钟之间洗脱

具体而言,利用所开发的方法成功实现了 5-EAPB 和 6-EAPB 的分离,达到方法开发的目的。

对质谱离子源和所有相关质谱参数进行优化后,绘制 100 ppt 至 100 ppb 之间的 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的校准曲线(图 7),其中每种校准浓度重复测定三次。4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的线性 R^2 值分别为 0.9998、0.9993 和 0.9990。在信噪比(S/N)为 10 的条件下,确定定量限(LOQ)为 100 ppt。在 S/N 为 3 的条件下,确定检测限(LOD)为 30 ppt。

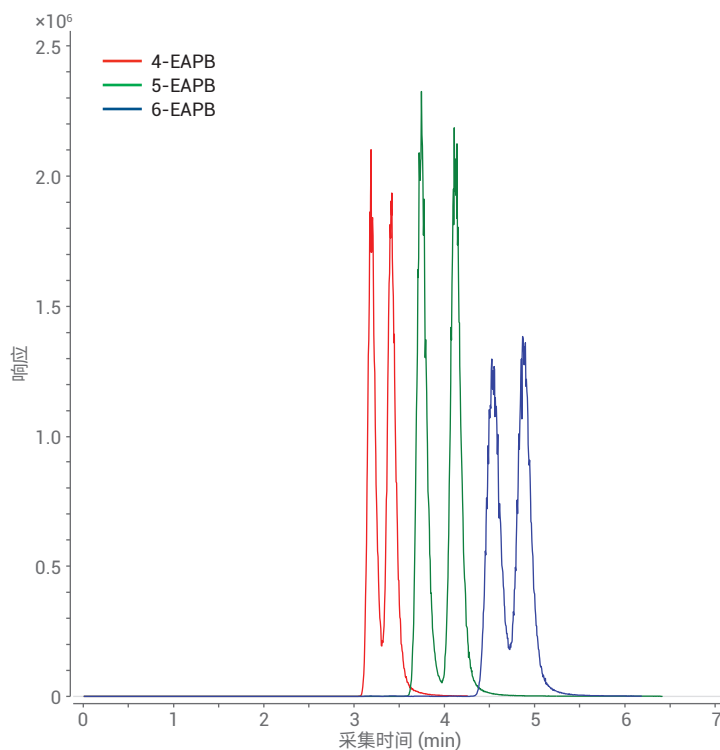


图 6. 通过进样对映化合物 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 外消旋单标对其进行鉴定

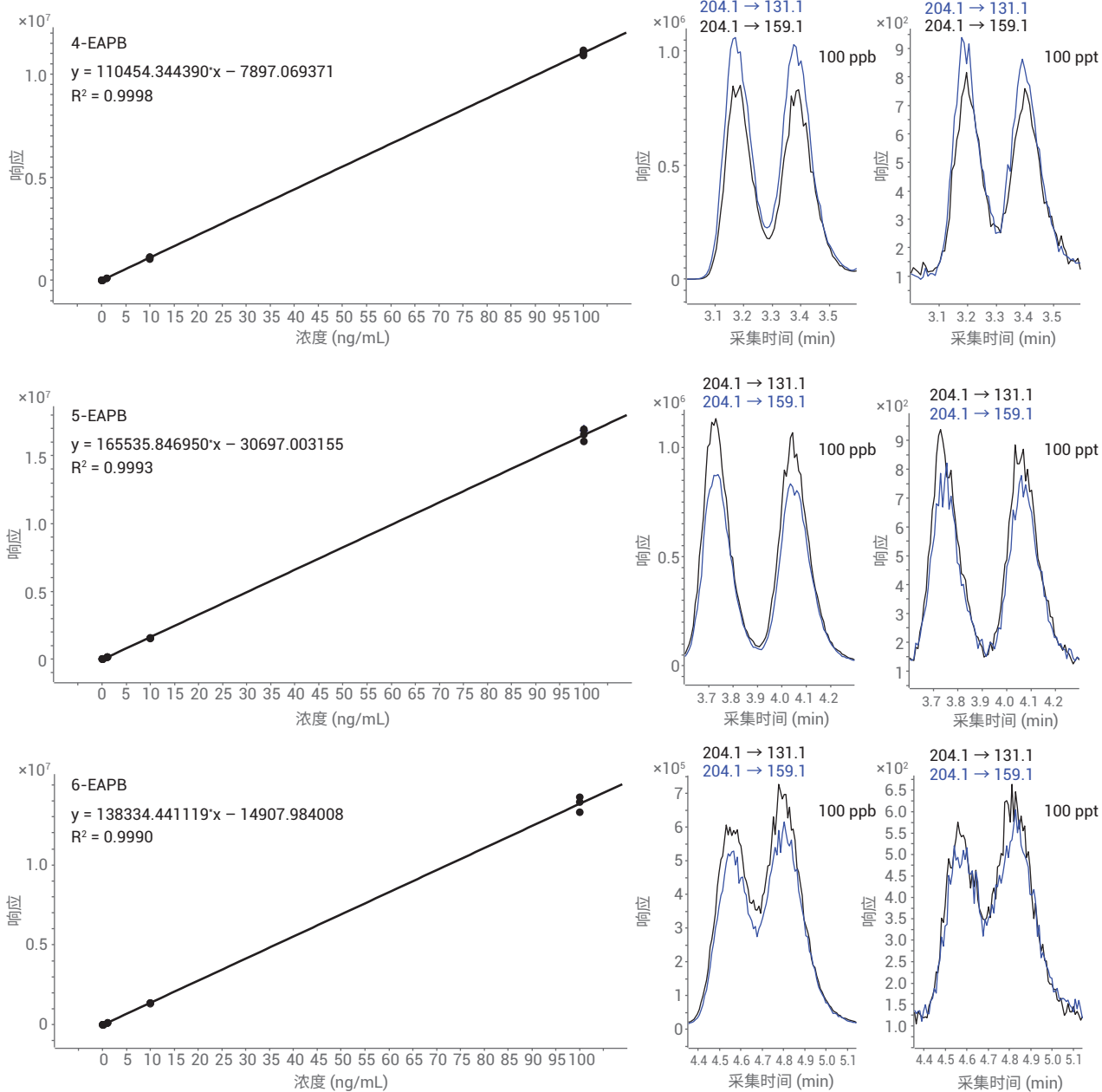


图 7. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 在 100 ppt 至 100 ppb 之间的校准曲线。100 ppb 和 100 ppt (LOQ) 下的定量离子对和定性离子对显示在各个校准曲线旁

利用单四极杆质谱仪对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的位置异构体进行分离

测定 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的另一种可能性是对结构异构体的非手性分离。遗憾的是，现有分离方法均无法采用非手性固定相并分离所有三种结构异构体。通常，4-EAPB 能够得到分离，但另外两种异构体 5-EAPB 和 6-EAPB 完全共洗脱或分离不完全。为解决这一问题，试图在手性固定相上仅分离异构体而不分离对映体。

初始实验采用 CHIRALPAK AD-3 色谱柱并以甲醇作为流动相（甲醇含量 15%，含 0.1% 氨水），结果表明三种结构异构体获得一定程度的分离，但是对映体未得到分离（图 8）。为改善三种异构体的部分分离情况，逐步将甲醇含量降至 1%。结果发现，用 11% 甲醇（含 0.1% 氨水）作为改性剂，能够使三种化合物实现充分分离并获得可接受的峰宽和运行时间（图 9）。

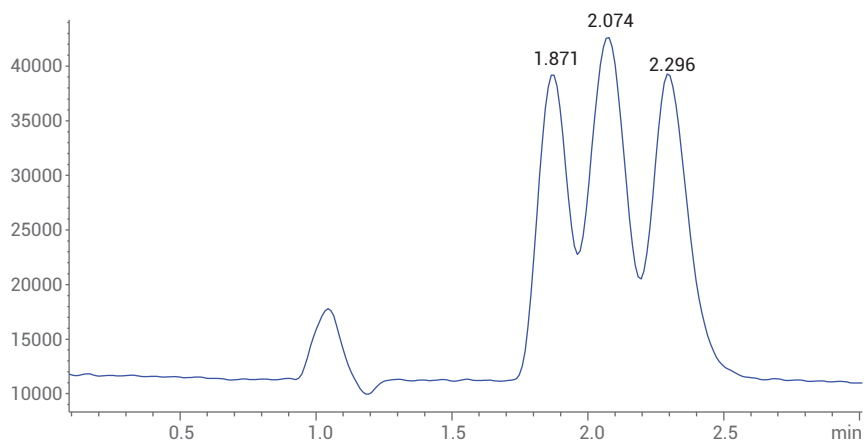


图 8. 采用 15% 甲醇作为改性剂对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体的分离

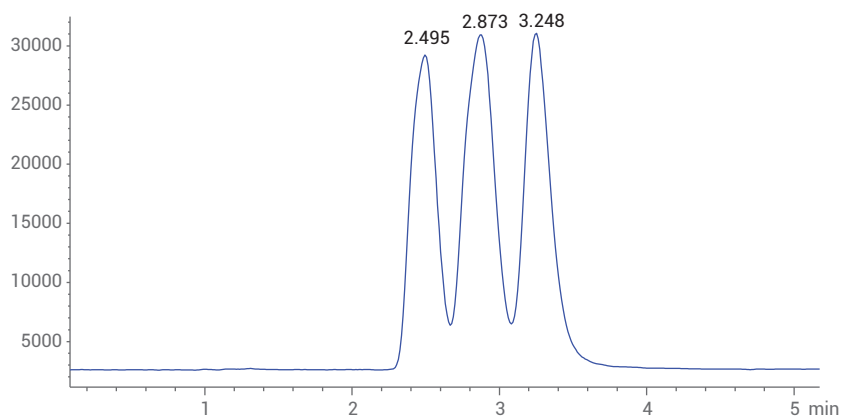


图 9. 采用 11% 甲醇作为改性剂对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体的分离

图 8 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm
柱温	30 °C
流动相	15% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	2 mL/min
进样量	1 μL
样品	浓度各为 100 ppb 的甲醇溶液

图 9 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm
柱温	30 °C
流动相	11% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	2 mL/min
进样量	1 μL
样品	浓度各为 100 ppb 的甲醇溶液

通过提高流速将运行时间缩短至 3.5 分钟，由此得到最终方法（图 10）。进样分析三种非手性异构体的单标，对化合物的特性进行确认（图 11）。4-EAPB 在 2.15 分钟洗脱，5-EAPB 在 2.50 分钟洗脱，而 6-EAPB 在 2.83 分钟洗脱。该方法采用 SFC 与 SIM 模式下运行的单四极杆质谱仪相结合，能够用于 EAPB 的快速定性检测。为实现正确的定量分析，可采用 SFC 与选择性更高的三重四极杆质谱仪相结合的方法。

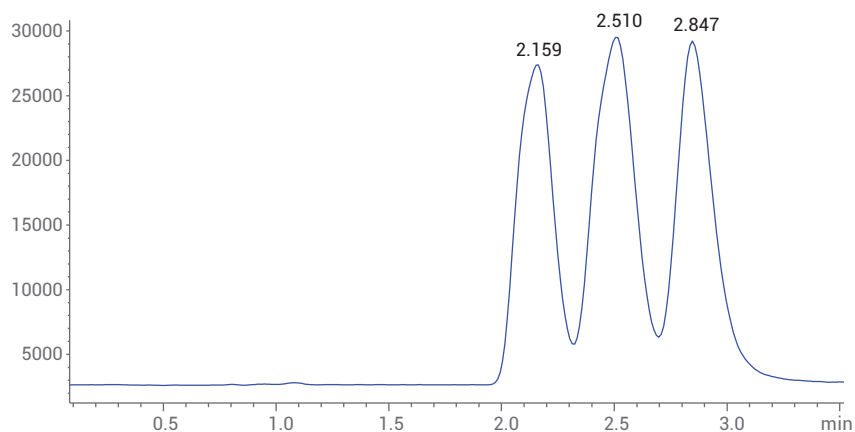


图 10. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体的最终分离方法

图 10 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm
柱温	30 °C
流动相	11% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	2.5 mL/min
进样量	1 μL
样品	浓度各为 100 ppb 的甲醇溶液

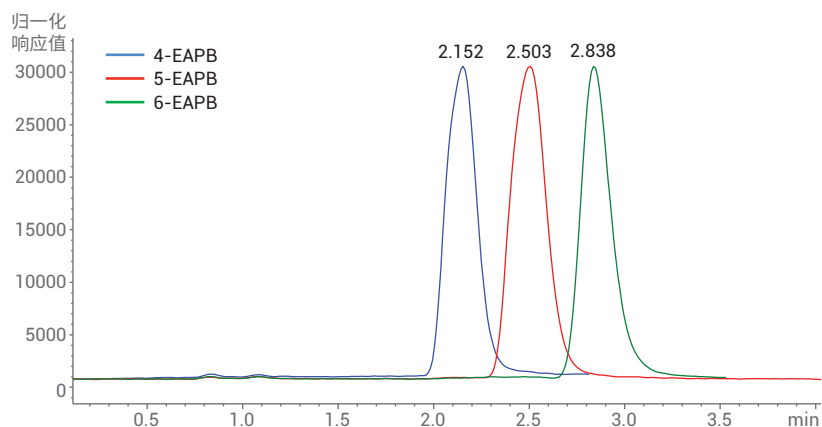


图 11. 采用最终方法分离 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体单标样品所得到的叠加谱图

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种可能异构体的分离以及仅对三种相应结构异构体的分离。将 SFC 与单四极杆质谱仪或三重四极杆质谱仪联用，实现了检测和定量测定。采用三重四极杆质谱仪绘制用于定量分析的校准曲线，结果表现出优异的线性 ($R^2 > 0.9990$) 和灵敏度。确定的 LOQ 为 100 ppt，LOD 为 30 ppt。

参考文献

1. Taschwer, M.; Hofer, M. G.; Schmid, M. G. Enantioseparation of benzofurys and other novel psychoactive compounds by CE and sulfobutylether β -cyclodextrin as chiral selector added to the BGE. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 19, 2793–2799
2. The use of the SFC-MS Splitter Kit G4309-68715 (SFC-MS 分流器套装 G4309-68715 的使用)，安捷伦科技公司技术简报，出版号 G4309-90130，**2015**
3. M. Muelek, H. Godel, E. Naegele. D/L-安非他明手性分离方法的开发，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8262ZHNCN，**2017**

致谢

感谢瑞典林雪平国家法医学委员会的 Martin Josefsson 和 Markus Roman 提供样品。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

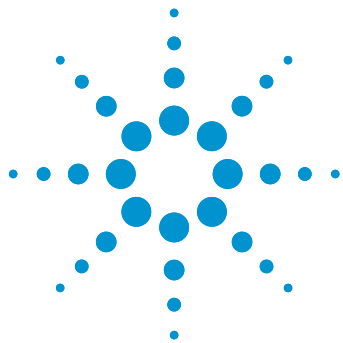
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

用于司法鉴定。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 11 月 1 日，中国出版
5991-8416ZHNCN



使用超临界流体色谱与三重四极杆质谱定量测定药物

应用简报

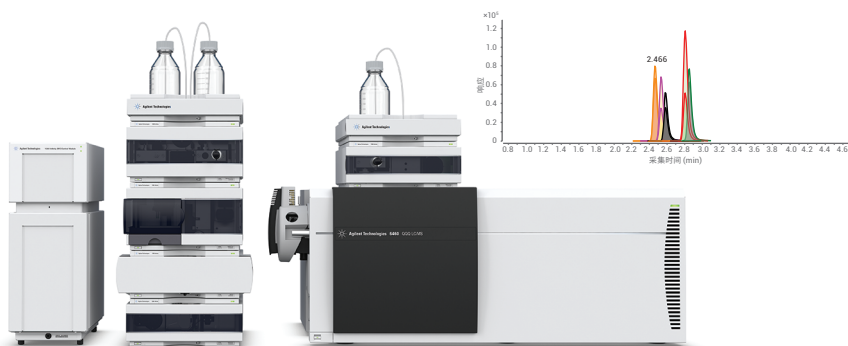
法医毒理学

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱仪相结合，快速分离 25 种药物并实现检测限低至 30 pg/mL 的定量分析。对于所有化合物，校准曲线均表现出优异的线性相关性。对重复测量的统计评估表明，所有 25 种化合物均具有最高的精度和准确度。最后，介绍了对尿液样品中安非他明类化合物的测定。



前言

在法医毒理学的多个应用领域中，对多个法医学目标化合物进行了筛查和定量分析。这些领域包括兴奋剂检测、尸检法医毒理学、药物检测甚至爆炸残留物的测定等等。

药物类别本身在化学性质方面也是多种多样的，这对于分离和检测来说非常重要。化学结构的范围从简单的芳香胺和多环芳香苯二氮卓类到复杂的类吗啡结构，甚至包括四氢大麻酚 (THC) 等疏水化合物。到目前为止，用于一览式定量筛查所有化合物类别的挑战性分离是通过反相 HPLC/MS 完成的¹。

本应用简报介绍了利用超临界流体色谱 (SFC) 在一次定量筛查运行中对不同类别药物的分离。利用 SFC 进行定量筛查可以在几分钟的较短运行时间内完成，与三重四极杆质谱相结合可获得最高的灵敏度。本应用简报中所用的测试集包括安非他明类、苯二氮卓类、吗啡、吗啡类似物和 THC 等

25 种化合物。在绘制校准曲线并进行统计评估后，对加标生物样品进行分析，重点关注安非他明类化合物。在本研究中，对以下目标化合物进行了筛查：

- **安非他明** — 一种中枢神经系统兴奋剂，用途包括被大学生滥用作考试辅助手段²，因为它具有提高成绩的作用^{3,4,5}。然而，较大剂量的安非他明可能会产生严重的副作用，并可能损害认知功能并导致肌肉快速分解⁶
- **甲基苯丙胺** — 也是一种中枢神经兴奋剂。滥用（尤其是吸食透明晶体冰毒）可能导致强烈的副作用，如精神病、偏执、幻觉、横纹肌溶解和脑出血⁷
- **安非他明衍生物** — 3,4-亚甲二氧基苯丙胺 (MDA)、3,4-亚甲二氧基-甲基苯丙胺 (MDMA) 和 3,4-亚甲二氧基-N-乙基苯丙胺 (MDEA) 属于安非他明衍生化

合物。它们属于精神药物。从药理学上讲，它们可用作血清素、去甲肾上腺素和多巴胺释放药物

图 1 给出了化学式。相关化学和毒理学信息可公开获取⁸。

实验部分

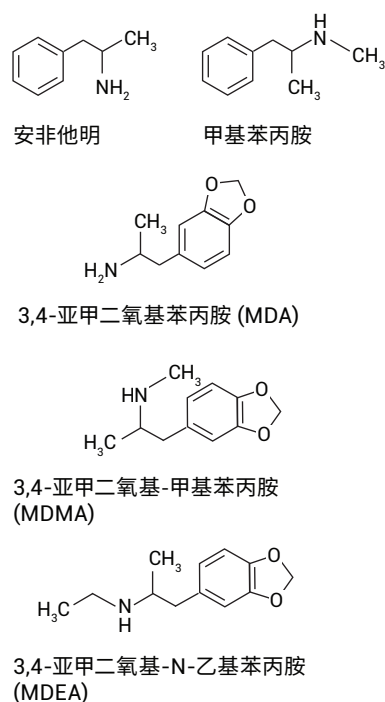


图 1. 本研究中使用的安非他明类化合物的化学结构

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A):

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器, 配备高压 SFC 流通池
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 安捷伦分流器套装 (G4309-68715)

仪器设置

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置在之前的研究中已有描述⁹。

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C8, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 828975-906)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件, 07.01 版

- Agilent MassHunter 定性分析软件, 07.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件, 07.00 版
- Agilent MassHunter MRM 和 Source Optimizer 软件, 07.00 版

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS:

- 补偿流组成: 甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸
- 补偿流流速: 0.3 mL/min

标准品

利用安捷伦 LC/MS 法医毒理学测试混标作为标准储备液。该混合物含浓度为 1.00 μg/mL 的 25 种化合物, 均

以甲醇为溶剂。用甲醇按 1:10 的比例稀释得到用于生成校准曲线的储备液 (100 ng/mL)。

化学品

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。所有溶剂均为 LC/MS 级。甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

样品前处理

向尿液样品中加入安捷伦 LC/MS 毒理学测试混标 (100 ng/mL) 中固有的全套化合物, 用甲醇按 1:5 的比例进行稀释, 涡旋混合, 然后在 14000 g 下离心 5 分钟。对上清液进行过滤, 并将滤液直接进样分析。

SFC 方法

参数	描述
SFC 流速	2 mL/min
SFC 梯度	0 分钟 - 2% B, 5 分钟 - 25% B
停止时间	5 分钟
后运行时间	2 分钟
改性剂	甲醇 + 0.2% 甲酸 (FA) + 10 mmol/L 甲酸铵
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
柱温	60 °C
进样量	1 μL, 定量环过量填充 3 倍

质谱方法

参数	描述
电离模式	正离子
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	500 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
MRM 条件	见表 1, 其中显示了母离子、碎片离子、碎裂电压和碰撞能量详细信息。系统在动态 MRM 模式下运行以确保获得最佳灵敏度

结果与讨论

使用 100 ng/mL 的稀释液开发 25 种药物的色谱分离方法。该溶液还用于通过 MRM Optimizer 软件和 Source Optimizer 软件对补偿流、安捷伦喷射流和质谱条件进行优化。

最终 SFC 方法采用 2%–25% 甲醇（含甲酸和甲酸铵）的梯度，在 5 分钟的运行时间内对 25 种化合物进行分离（图 2）。从色谱柱上洗脱下来的第一种化合物是 0.99 分钟洗脱的 THC，最后一种洗脱的化合物是 4.05 分钟洗脱的土的宁。表现出最高强度的化合物是 2.95 分钟洗脱的美沙酮。

利用 100 ng/mL 溶液，并用甲醇按 1:5:2 的稀释模式进行稀释，为固有化合物绘制单独的校准曲线。对所有化合物测量的稀释系列样品的浓度低至 0.01 ng/mL，用于确定各种化合物的定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。该方法对检测的化合物表现出极高的灵敏度，LOQ 低于 100 pg/mL，LOD 低于 30 pg/mL，且所有化合物均具有良好的线性相关性（表 2）。为进行统计评估，将 10 ng/mL 的校准溶液进样分析 15 次。计算得出的保留时间相对标准偏差 (RSD) 通常低于 0.3%，峰面积 RSD 处于低于 4% 的良好范围内。计算得出的浓度精度低于 3.5%，对应的浓度准确度介于 95% 和 105% 之间。

表 1. MRM 条件：母离子、碎片离子、碎裂电压和碰撞能量（按保留时间排序，见表 2）。由 MRM 方法得到最终 DMRM 方法

化合物	母离子	碎裂电压 (V)	定量离子	CE	定性离子	CE
THC	315.2	150	193.2	20	123.3	30
替马西洋	301.1	117	255.1	29	177	45
氯硝西洋	316.1	110	270	24	214	40
地西洋	285.1	169	193	45	154	25
劳拉西洋	321	102	275	21	194	49
硝西洋	282.1	148	236.1	25	180	41
普罗地芬	354.2	153	167	29	91.1	45
奥沙西洋	287	150	269	12	241	20
可卡因	304.2	138	182.1	17	77	61
维拉帕米	455.3	158	165	37	150	45
曲唑酮	372.2	159	176	25	148	37
羟考酮	316.2	143	298.1	17	256.1	25
哌替啶	248.2	128	220.1	21	174.1	17
MDEA	208.1	107	163	9	105	25
海洛因	370.2	149	268.1	37	165	61
PCP	244.1	86	91	41	86.1	9
安非他明	136.1	66	119.1	5	91	17
MDA	180.1	61	163	5	105	21
甲基苯丙胺	150.1	92	119	5	91	17
MDMA	194.1	97	163	9	105	25
美沙酮	310.2	112	265.1	9	105	29
阿普唑仑	309.1	179	281	25	205	49
可待因	300.2	158	165.1	45	58.1	29
氢可酮	300.2	159	199	29	128	65
土的宁	335.2	195	184	41	156	53

缩写：四氢大麻酚 (THC)，3,4-亚甲二氧基-N-乙基苯丙胺 (MDEA)，苯环己哌啶 (PCP)，3,4-亚甲二氧基苯丙胺 (MDA)，3,4-亚甲二氧基-甲基苯丙胺 (MDMA)

表 2. 25 种药物的保留时间、保留时间 RSD 和峰面积 RSD 以及 10 ng/mL 下的浓度精度和准确度。LOD 和 LOQ, 各种化合物在 100 ng/mL 至 LOQ 浓度范围内的校准曲线的线性

化合物	RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	线性相关系数 R ²	浓度精度 (%)	浓度准确度 (%)
THC	0.997	0.44	4.34	60	200	0.9994	3.78	101.7
替马西洋	1.498	0.44	2.59	40	130	0.9951	2.42	105.5
氯硝西洋	1.642	0.39	2.66	100	300	0.9982	4.25	102.4
地西洋	1.668	0.41	3.81	30	100	0.9997	3.79	101.2
劳拉西洋	1.742	0.32	4.78	300	1000	0.9975	5.15	106.9
硝西洋	1.768	0.37	1.64	20	65	0.9993	3.91	110.9
普罗地芬	1.771	0.27	2.43	15	40	0.9996	1.61	106.9
奥沙西洋	1.862	0.23	2.04	150	500	0.9952	2.15	105.8
可卡因	1.994	0.39	1.42	10	40	0.9998	1.27	98.5
维拉帕米	2.147	0.29	3.09	< 5	10	0.9998	1.99	105.6
曲唑酮	2.370	0.25	4.04	< 5	10	0.9993	3.61	112.1
羟考酮	2.478	0.29	3.65	40	130	0.9951	5.34	105.8
哌替啶	2.494	0.26	4.53	6	20	0.9951	2.42	105.5
MDEA	2.506	0.18	3.48	< 5	10	0.9956	3.31	104.1
海洛因	2.518	0.27	3.53	40	150	0.9983	3.18	106.3
PCP	2.550	0.22	2.73	15	55	0.9991	2.34	110.1
安非他明	2.592	0.17	3.34	20	70	0.9943	2.29	93.1
MDA	2.631	0.16	4.34	60	200	0.9995	2.86	95.2
甲基苯丙胺	2.839	0.15	4.67	< 5	10	0.9983	4.24	105.5
MDMA	2.900	0.16	3.13	10	30	0.9991	2.69	105.6
美沙酮	2.947	0.15	2.86	10	30	0.9998	2.43	102.4
阿普唑仑	3.228	0.13	2.13	10	30	0.9995	2.89	105.8
可待因	3.290	0.19	4.39	20	50	0.9931	3.83	111.8
氯可酮	3.631	0.21	2.91	25	80	0.9931	2.73	112.3
土的宁	4.055	0.13	1.15	50	150	0.9992	1.28	100.3

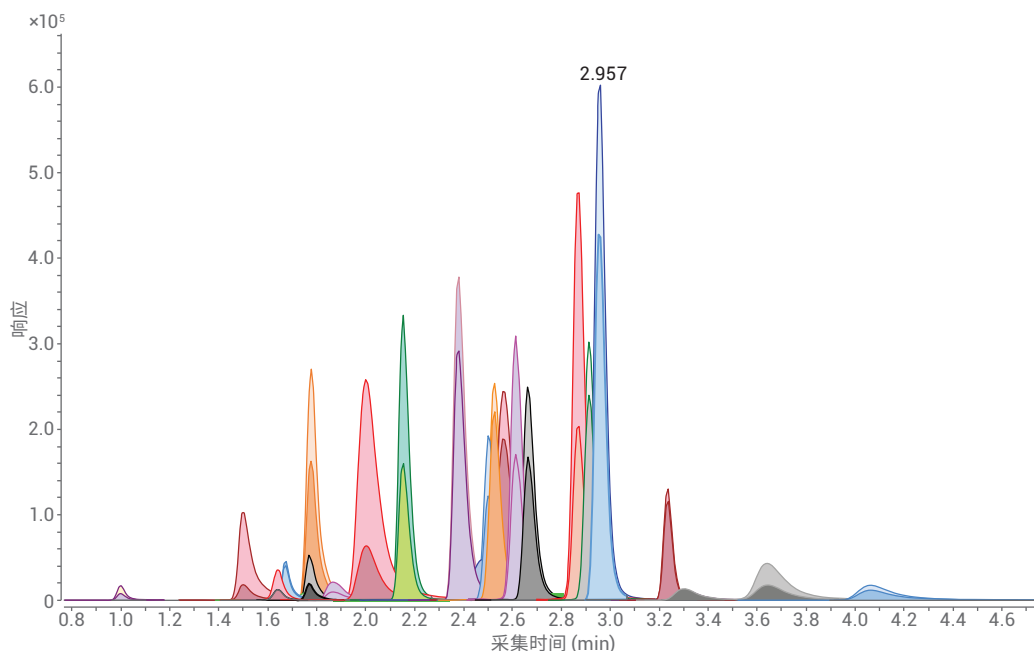


图 2. 用 SFC 分离法在 5 分钟的运行时间内对含 25 种药物的混合物进行分离并用 DMRM 进行检测

作为示例，对加标尿液样品中的安非他明类化合物进行更详细的分析。样品加标浓度为 100 ng/mL，用甲醇按 1:5 的比例进行稀释，得到最终浓度 20 ng/mL，并将其进样分析，如“实验部分”所述。在较短的梯度条件下（甲醇含量在 5 分钟内从 2% 增加至 25%），五种安非他明化合物在 2.4 至 3.1 分钟之间洗脱（图 3）。为进行更精确的评估，将样品进样分析 10 次。由重复进样分析计算得出的保留时间和浓度的 RSD 分别为 0.4% 以下和 3% 以下。浓度准确度处于 82%–101% 的范围内，这对于定量分析来说非常出色（表 3）。

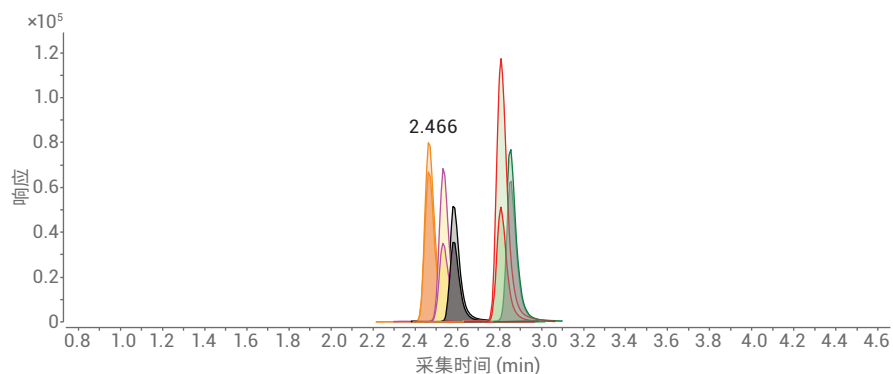


图 3. 加标尿液样品（100 ng/mL，用甲醇按 1:5 的比例稀释）中 20 ng/mL 的安非他明类化合物（安非他明、甲基苯丙胺、MDA、MDMA 和 MDEA）

表 3. 利用 SFC/三重四极杆质谱仪得到的加标和经稀释的尿液样品中安非他明的定量测量结果

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	实测浓度 (ng/mL)	浓度精度 RSD (%)	浓度准确度 (%)
MDEA	2.466	0.42	19.61	2.75	97.98
安非他明	2.554	0.42	16.41	3.03	82.05
MDA	2.595	0.37	20.19	1.37	100.95
甲基苯丙胺	2.813	0.21	17.27	1.75	86.35
MDMA	2.860	0.17	17.71	2.16	88.55

作为示例，浓度范围为 0.2 ng/mL 至最高 100 ng/mL 的 MDA 获得的校准曲线表现出高达 0.9995 的优异线性系数。由浓度为 20 ng/mL 的所测样品获得的定量离子和定性离子表现出良好的峰形，它们的比例处于预期范围内（图 4）。

结论

本应用简报介绍了利用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对大量药物的快速分离。将 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪相结合，能够实现快速筛查和定量分析。所有化合物均在较短的 5 分钟梯度条件下得到洗脱和分离，并获得了较高的保留时间和峰面积精度（分别为 0.3% 和 4%）。所有校准曲线均表现出优异的线性，LOD 低于 30 pg/mL，证明可实现高灵敏度分析。浓度精度低于 3.5%，准确度介于 95% 和 105% 之间。通过定量分析加标尿液样品中的安非他明类物质，展示了对法医毒理学样品的分析性能。结果证明，加标化合物的浓度以优异的浓度精度和准确度测得。

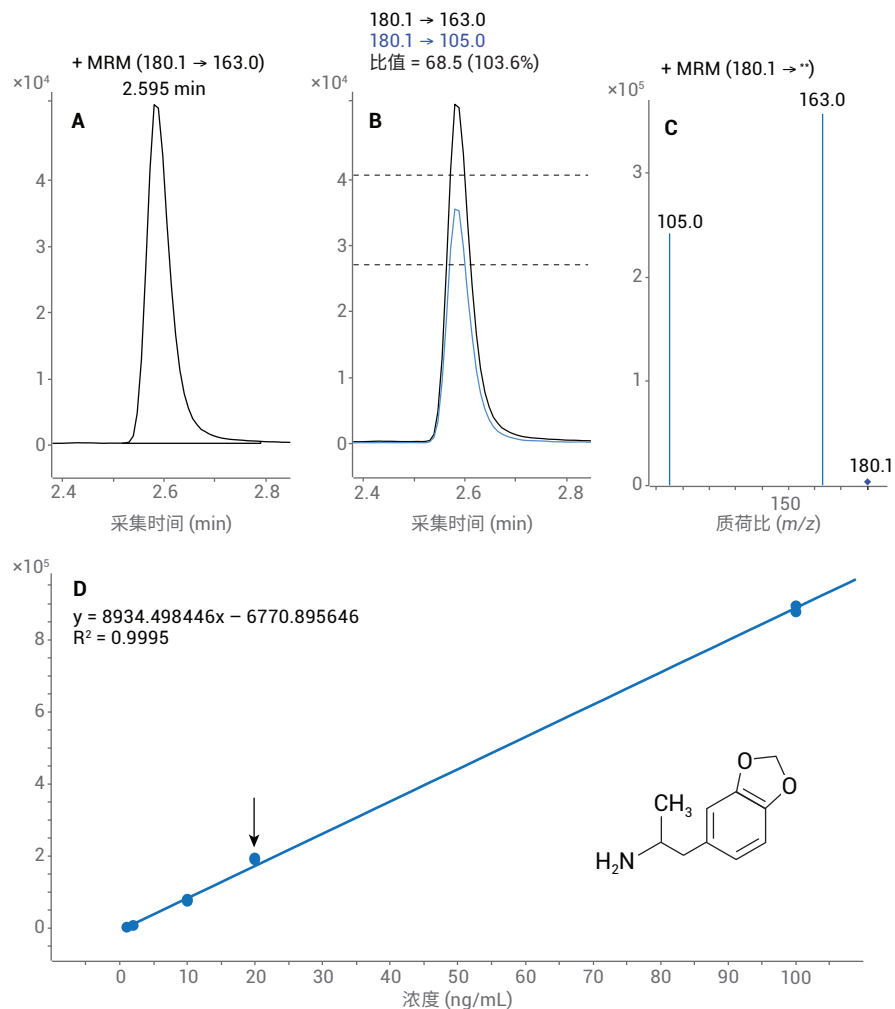


图 4. 加标尿液样品中 MDA 的定性测量。A) 浓度为 20 ng/mL 的 MDA 的定量离子。B) 定量离子、定性离子及其比例。C) MDA 的 MS/MS 谱图。D) MDA 在 0.2 ng/mL 至 100 ng/mL 之间的校准曲线，线性相关系数为 0.9995。实测浓度如箭头所示

参考文献

1. Stone, P. J. W. An Application Kit for the Screening of Samples for Analytes of Forensic and Toxicological Interest using LC/QQQ MS/MS with a Dynamic MRM Transition Database (采用配备动态 MRM 离子对数据库的 LC/MS/MS 筛查样品中法医毒理学目标分析物的应用套装), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-4254EN, **2009**
2. Heal, D. J.; et al. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *J. Psychopharmacol.* June **2013**, 27(6), 479–496
3. Malenka, R. C.; Nestler, E. J.; Hyman, S. E. Chapter 13: Higher Cognitive Function and Behavioral Control. In *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*; by Sydor, A.; Brown, R. Y. McGraw-Hill Medical, New York, USA, 2009; 2nd ed., p. 318, 321
4. Wood, S.; et al. Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. *Pharmacol. Rev.* **2014**, 66(1), 193–221
5. Twohey, M. Pills become an addictive study aid. *JS Online*, 26 March **2006**, archived from the original on 15 August 2007, retrieved 2 December 2007
6. Westfall, D. P.; Westfall, T. C. Miscellaneous Sympathomimetic Agonists. In *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics* by Brunton, L. L.; Chabner, B. A.; Knollmann, B. C. McGraw-Hill, New York, USA, 2010; 12th ed
7. Rusyniak, D. E. Neurologic manifestations of chronic methamphetamine abuse. *The Psychiatric clinics of North America* **2013**, 36, 2, 261–275
8. www.wikipedia.org (2015 年 12 月访问)
9. Naegele, E., Glauner, T. 使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与三重四极杆质谱检测开发多农药分析方法, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-6151ZHCN, **2015**

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

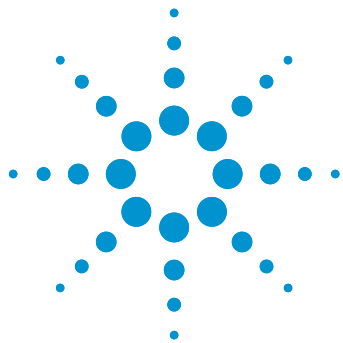
用于司法鉴定。

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-6747ZHCN



Agilent Technologies



使用超临界流体色谱和质谱测定尿液中的 β -受体阻滞剂

应用简报

兴奋剂检测

作者

Maria Kristina Parr 教授
柏林自由大学
药学院
德国柏林

Edgar Naegele 和 Bernhard Wuest
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了利用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对一系列极性药物化合物的分离。重点关注所用化合物库中包含的大量 β -受体阻滞剂。对于所有 β -受体阻滞剂，讨论了线性、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 以及保留时间 RSD 和峰面积 RSD 等性能数据。最终，对其中加入 β -受体阻滞剂的尿液样品进行了分析。



前言

在被世界反兴奋剂机构 (WADA) 列为禁用物质的庞大极性化合物库¹ 中, 有一部分已在 HILIC 条件下得到分析²。

在本研究中, 利用超临界流体色谱 (SFC) 对该化合物系列进行了研究, 以评估对此类极性化合物的分析能力以及三重四极杆质谱对它们的检测性能。由于兴奋剂检测分析的样品量很大, 因此需要一种快速分析已知兴奋剂化合物的方法。SFC 凭借其快速分离能力, 可以在应对该应用领域中的样品数量方面发挥重要作用。在评估过程中, 利用所用化合物库中固有的 13 种 β -受体阻滞剂, 测定样品定量分析的典型检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、保留时间 RSD 和峰面积 RSD 以及精度和准确度数据。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A):

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器, 配备高压 SFC 流通池
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (G6460C)
- Agilent 1260 Infinity 等度泵 (G1310B)
- 安捷伦分流器套装 G4309-68715

仪器设置

图 1 显示了 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的推荐配置。

色谱柱

Agilent ZORBAX NH2, 4.6 × 150 mm, 5 μ m (部件号 883952-708)

软件

- 适用于三重四极杆质谱仪的 Agilent MassHunter 数据采集软件, 07.01 版
- Agilent MassHunter 定性分析软件, 07.00 版
- Agilent MassHunter 定量分析软件, 07.00 版

通过分流和补偿流将 SFC 连接至 MS

补偿流组成

甲醇/水 (95/5), 0.5 mmol/L 甲酸铵 + 0.2% 甲酸

补偿流流速

0.5 mL/min

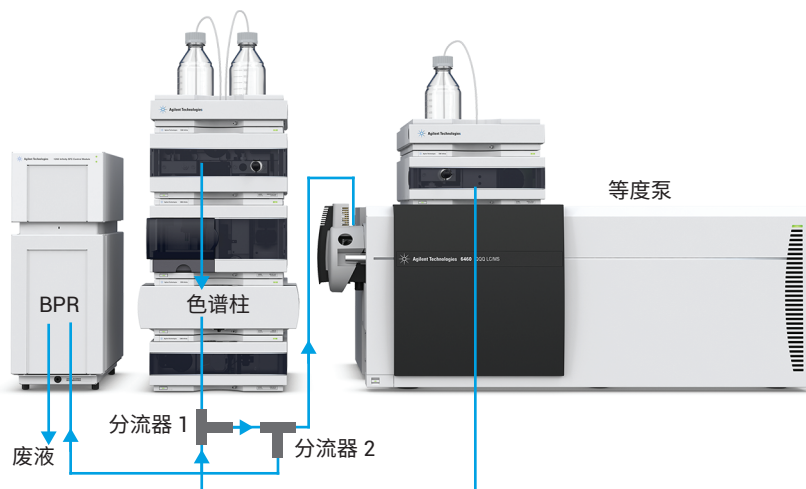


图 1. Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统的配置。色谱柱直接连接至分流器组件中的分流器 1 (BPR = 反压调节器, 不使用紫外检测器, 分流器套装部件号 G4309-68715)

标准品

化合物库由极性药物化合物组成，其中包括 13 种 β -受体阻滞剂，每种化合物浓度分别为 1 mg/mL，溶于乙腈中。用甲醇制得 1:100 的稀释液，配制用于所述研究的储备液。

化学品

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。所有溶剂均为 LC/MS 级。甲醇购自德国 J.T. Baker 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

样品前处理

向尿液中加入喷布洛尔 (250 ng/mL)，用甲醇按 1:5 的比例进行稀释，涡旋混合，然后在 14000 g 下离心 5 分钟。对上清液进行过滤，并将滤液直接进样分析。

SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
SFC 梯度	0 分钟, 2% B; 10 分钟, 50% B
停止时间	10 分钟
后运行时间	2 分钟
改性剂	甲醇 + 0.1% 甲酸 (FA)
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	150 bar
柱温	40 °C
进样量	5 μL , 定量环过量填充三倍

质谱方法

参数	值
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	25 psi
MRM 条件	见表 1, 其中显示了详细的保留时间、保留时间窗口、碎裂电压和碰撞能量

表 1. 用于研究 β -受体阻滞剂的 MRM 条件，列出了母离子质量数、碎片离子质量数以及碎裂电压和碰撞能量

	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	定量离子	CE (V)	定性离子	CE (V)
喷布洛尔	292	113	236	12	74	20
阿普洛尔	250	11	116	16	56	28
氧烯洛尔	266	113	116	12	72	16
比索洛尔	326	141	116	16	74	28
艾司洛尔	296	121	145	24	56	32
心得安	260	95	116	16	56	28
塞利洛尔	380	136	251	20	74	32
醋丁洛尔	337	145	116	20	56	28
奈必洛尔	406	151	151	28	44	44
心得乐	249	110	116	16	56	28
索他洛尔	273	83	255	8	133	28
阿替洛尔	267	110	145	28	56	28
纳多洛尔	310	88	254	12	56	36

结果与讨论

在氨基色谱柱上，采用甲醇（含 0.1% FA）作为改性剂，梯度从 2% 开始并在 10 分钟内增加至最高 50%，对 44 种药物混合化合物中固有的 13 种 β -受体阻滞剂进行分离。在该梯度条件下，所有 44 种化合物均可得到分离。在本例中，仅监测并详细讨论 13 种 β -受体阻滞剂（图 2）。

这些 β -受体阻滞剂在 4.68 至 7.38 分钟之间洗脱，共洗脱效应极小。药物混合物中第一种洗脱的化合物在保留时间 2.27 分钟处洗脱，最后一种洗脱的化合物在 8.19 分钟洗脱。

绘制所有 β -受体阻滞剂 1000 ng/mL 至 1 ng/mL（在改性剂中）的校准曲线，以测量线性、LOQ ($S/N > 10$) 和

LOD ($S/N > 3$)（表 2）。典型 LOD 低于 1.5 ng/mL，典型 LOQ 低于 5 ng/mL。所有化合物均获得了线性校准， R^2 优于 0.9990。

将浓度为 100 ng/mL 的校准标样进样分析 10 次，便于统计评估（表 2）。测得的保留时间 RSD 通常低于 0.25%，峰面积 RSD 低于 5%。

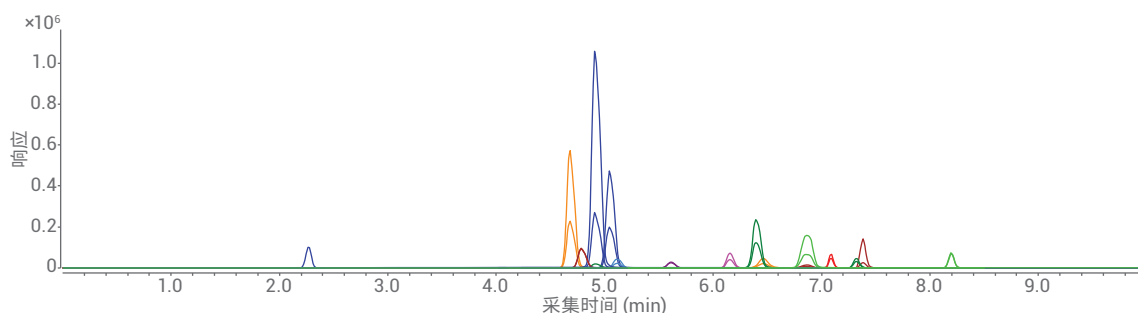


图 2. 包含 44 种化合物的混合物中 13 种 β -受体阻滞剂的分离。用于分离所有化合物的梯度为：甲醇含量在 10 分钟内从 2% 增加至 50%。最早洗脱的化合物保留时间为 2.270 分钟，最晚洗脱的化合物保留时间为 8.198 分钟。 β -受体阻滞剂在 4.68 至 7.38 分钟之间洗脱

表 2. 13 种 β -受体阻滞剂的保留时间、保留时间和峰面积的 RSD 以及 LOD、LOQ 和线性。利用 1 至 1000 ng/mL 之间绘制的校准曲线计算得到 LOD 和 LOQ。将浓度为 100 ng/mL 的校准标样进行分析 10 次，由此计算得出 RSD

化合物	RT (min)	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R^2
喷布洛尔	4.680	0.18	3.54	0.20	1.60	0.9994
阿普洛尔	4.784	0.16	4.42	1.50	5.00	0.9990
氧烯洛尔	4.912	0.16	2.76	0.10	0.25	0.9992
比索洛尔	5.045	0.15	3.00	0.19	0.60	0.9991
艾司洛尔	5.111	0.15	6.83	1.41	4.71	0.9992
心得安	5.611	0.18	8.05	1.71	5.70	0.9997
塞利洛尔	6.158	0.26	3.29	0.37	1.25	0.9998
醋丁洛尔	6.397	0.26	1.68	0.66	2.19	0.9997
奈必洛尔	6.463	0.24	5.31	2.85	9.52	0.9996
心得乐	6.854	0.28	3.67	3.64	10.90	0.9994
索他洛尔	7.088	0.24	6.29	5.51	18.38	0.9995
阿替洛尔	7.322	0.28	3.73	1.98	6.66	0.9995
纳多洛尔	7.383	0.29	2.53	0.41	1.38	0.9997

作为实际样品的示例，将喷布洛尔以 250 ng/mL 的浓度加入尿液中，并按照“实验部分”所述的步骤进行样品前处理。由于纯水溶液样品不能进样至 SFC 中，因此用甲醇按 1:5 的比例对样品进行稀释。为定量测定喷布洛尔，绘制溶剂中浓度为 1000 ng/mL 至 2 ng/mL 范围内的校准曲线（图 3A）。测得稀释样品的平均浓度为 45.59 ng/mL，测得的样品浓度为

228.45 ng/mL。该化合物在 4.53 分钟洗脱，获得了良好的信号强度（图 3B），且定量/定性离子比处于预期范围内（图 3C）。为进行统计评估，将样品进样分析 10 次，计算得出的保留时间 RSD 和峰面积 RSD 分别为 0.14% 和 2.29%。计算得出的浓度精度和准确度分别为 2.28% 和 91.38%。

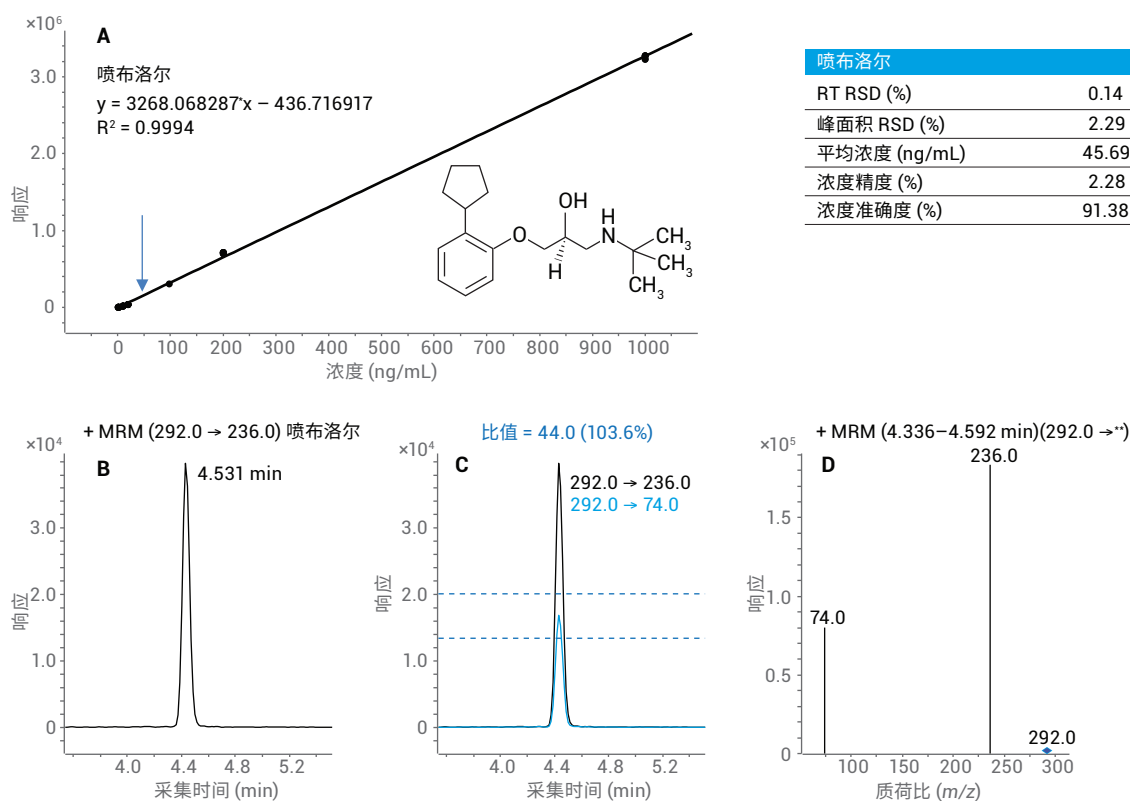


图 3. 尿液中喷布洛尔的测定。A) 喷布洛尔在 2 至 1000 ng/mL 之间的校准曲线。稀释样品中测得的浓度如箭头所示。B) 稀释样品中喷布洛尔的定量离子对。C) 所测样品的定量/定性离子比。D) 样品中测得的喷布洛尔的 MRM 离子对。内插表格中示出由样品进样分析 10 次计算得出的保留时间 RSD 和峰面积 RSD 以及平均浓度、浓度精度和浓度准确度

结论

本应用简报证明利用 SFC 能够在较短的运行时间内分离大量高极性药物化合物。将 SFC 与三重四极杆质谱仪结合使用所得的检测结果表明，检测限通常低于 1.5 ng/mL。保留时间 RSD 低于 0.25%，峰面积 RSD 低于 5%。

结果证明，通过用有机溶剂稀释实际水溶液样品，能够对样品中的药物化合物进行测量，并获得足够高的灵敏度以及浓度精度和准确度。

参考文献

1. The World Anti-Doping Code, The 2015 Prohibited List International Standard, World Anti-Doping Agency, Montreal, Canada, 20 September 2014, Available at www.wada-ama.org (2015 年 11 月 1 日访问)
2. Mazzarino, M.; et al. Screening and confirmation analysis of stimulants, narcotics and beta-adrenergic agents in human urine by hydrophobic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 8156–8167

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

用于司法鉴定。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

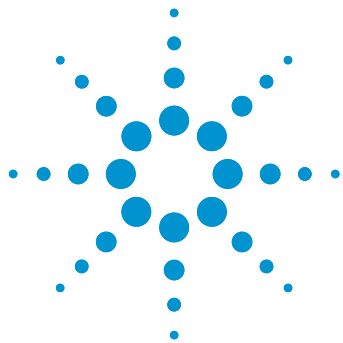
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-6437ZHCN



Agilent Technologies

第 5 章

能源与化工应用



利用超临界流体色谱与紫外检测定量分析 E7 液晶混合物中的化合物

应用简报

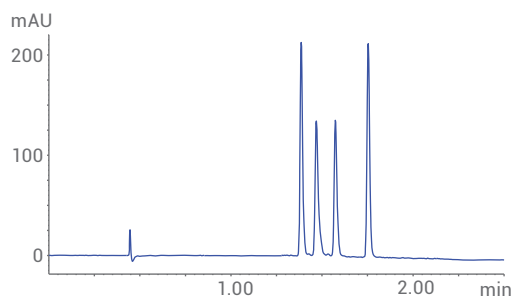
专用化学品

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报展示了 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对液晶化合物进行定量分析的能力。证明该系统能够在几分钟内完成对商业化液晶混合物的快速分离。利用紫外检测器完成检测，并介绍了对 E7 混合物的组成的相对定量分析。结果得到统计评估的支持。



Agilent Technologies

前言

液晶是一类物理性质介于固态和液态之间的物质^{1,2}。生理学家 Friedrich Reinitzer 于 1888 年在胆固醇衍生物中发现了一些化学和生物化合物的液晶状态³。他观察到此类化合物具有两个熔点。在第一个熔点下，化合物熔化成浑浊液体，在第二个熔点下熔化成透明液体。这项工作由物理学家 Otto Lehmann 继续进行，他对液晶在偏振光下的行为进行了研究⁴。20 世纪初，化学家 Daniel Vorländer 制造出大量合成液晶⁵。

液晶可以在热致、溶致和金属相中获得。热致液晶包括（例如）棒状有机分子。它们随温度的变化发生相变，成为液晶相。通常，在特定温度范围以下，热致液晶表现为固体，而在该温度范围以上则表现为液体。在液晶性范围内，它们可能表现出某些向列相和近晶相。在向列相中，棒状分子通常沿它们的轴排列并且与磁场和电场对准。在近晶相中，分子按层排列。

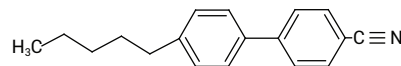
通常，向列相范围远高于室温。但是，某些分子或混合物的向列相温度范围处于使用液晶显示器 (LCD) 所需的温度范围内。LCD 由两个玻璃层之间夹一层液晶以及电极和两个偏振滤光片组成。根据电场以及液晶取向不同，LCD 可以切换为高度透明的开启 (ON) 状态或散射光的关闭 (OFF) 状态⁶。

氰基联苯和氰基三联苯类化合物包含在所需温度范围内呈现向列相的液晶。可通过合成仅在脂肪族结构单元的长度上有所不同的化合物，或通过混合不同的液晶化合物，对它们的性质进行设计。常用的液晶 4-氰基-4'-戊基联苯 (5CB) 长约 20 埃 (Å)，在 18 °C 下发生相变成为向列相，并在 35 °C 下发生相变呈各向同性状态⁷。广泛使用的 E7 液晶混合物 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 就是这样一个例子 (图 1)。它具有较高的双折射率和正介电各向异性，因此可广泛用于聚合物 LCD 中⁸。E7 混合物的组成对于液晶的物理性质和特性至关重要。即使微小的组成变化也会影响（例如）向列相转变为各向同性的温度 (T_{NI})。

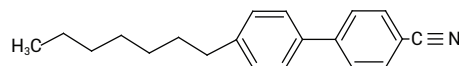
通常利用反相高效液相色谱 (HPLC) 与紫外 (UV) 或质谱 (MS) 检测相结合，对液晶化合物和混合物进行分析。液晶混合物的典型反相 HPLC 分离需要约 1 小时的分析时间^{9,10}。

本应用简报介绍了利用 Agilent 1260 分析型 SFC 系统在较短的分析时间内实现对液晶化合物混合物的分离。在 UV 检测后创建相应的校准曲线，实现对所有化合物的定量分析。展示了对市售液晶混合物的含量的相对定量结果。

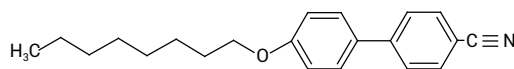
4-氰基-4'-正戊基联苯 (5CB)
CAS 号: 40817-08-1



4-氰基-4'-正庚基联苯 (7CB)
CAS 号: 41122-71-8



4-氰基-4'-正辛氧基联苯 (8OCB)
CAS 号: 52364-73-5



4-氰基-4'-正戊基三联苯 (5CT)
CAS 号: 54211-46-0

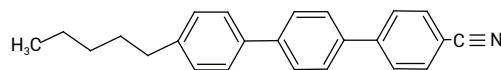


图 1. 本研究使用的氰基联苯和氰基三联苯的化学结构，这些化合物包含于市售 E7 液晶混合物中

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A), 包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- Agilent 1260 Infinity DAD, 配备高压标准 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C8, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 828975-906)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 修订版 C.01.07

样品

将图 1 所示的所有液晶化合物 (各 10 mg) 溶于 10 mL 庚烷/乙醇 (90/10)。最终混合储备液中各种化合物的浓度为 200 μg/mL。用庚烷作为稀释剂并按 1:2 的稀释模式稀释制得校准标样, 创建校准曲线。

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	乙腈
SFC 流速	2.5 mL/min
梯度	0 分钟时 1% B, 1.5 分钟时 13% B
停止时间	2.25 分钟
后运行时间	1 分钟
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	100 bar
柱温	60 °C
进样量	1 μL, 定量环过量填充 9 倍
用庚烷/乙醇 (90/10) 在样品瓶中清洗进样针并冲洗定量环	
检测	280 nm/带宽 4 nm; 参比 360 nm/带宽 100 nm; 数据采集速率: 20 Hz

结果与讨论

由液晶化合物 5CB、7CB、8OCB 和 5CT 的单独储备液制得混合储备液。利用该溶液开发 SFC 分离方法。根据各个谱图, 确定用于检测所有化合物的单一波长为 280 nm, 在该波长下, 所有化合物均具有足够高的响应。所开发的方法使四种相似的化合物在 1.38 分钟和 1.73 分钟之间分离

(图 2)。5CB 和 7CB 的区别在于烷基链的长度相差一个 -CH₂CH₂- 结构单元。它们得到了基线分离, 保留时间分别为 1.38 分钟和 1.46 分钟。采用快速梯度, 其中改性剂浓度在 1.50 分钟内从 1% 增加至 13%, 整体分析时间为 2.25 分钟。在 SB-C8 色谱柱上进行这一分离时, 利用乙腈作为中等极性改性剂。

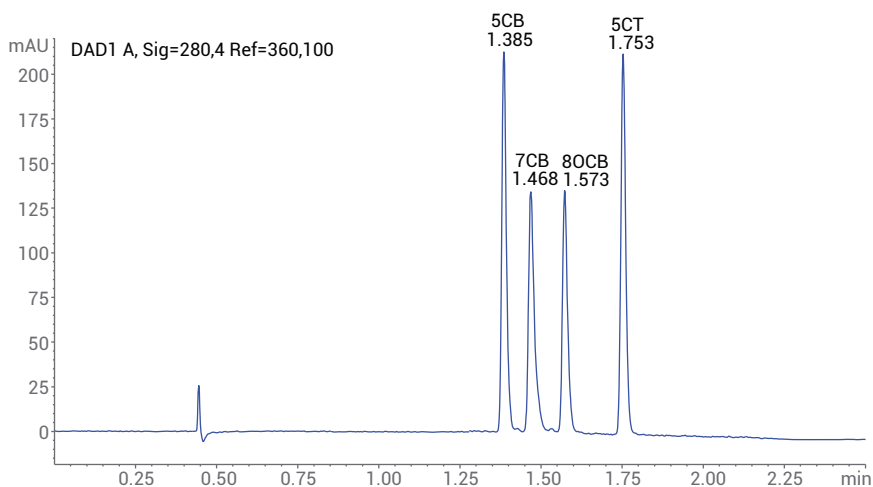


图 2. 采用快速梯度并在较短的分析时间内获得的液晶化合物 5CB、7CB、8OCB 和 5CT 的混合物 (各自浓度为 50 μg/mL) 的分离结果

还利用混合储备液按 1:2 的稀释模式将各种化合物的浓度稀释至最低 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ，由此生成各种化合物的校准曲线。各种化合物的校准曲线均表现出优于 0.99990 的线性（图 2）。将 50 $\mu\text{g/mL}$ 的校准稀释液进样分析 10 次，从而对最重要的结果进行统计评估（表 1）。保留时间 RSD 通常低于 0.24%，证明即使这些保留时间短的化合物也获得了出色的保留时间精密度。实测含量的精密度介于 1.75% 和 1.97% 之间，并且计算得出的准确度约为 98%。化合物洗脱得到尖锐的峰，半峰高处的典型峰宽约为 0.015 分钟（0.9 秒），所有峰的分离度均高于 3。

表 1. 对 50 $\mu\text{g/mL}$ 液晶混合物进行统计评估得到的结果，显示了保留时间 RSD、浓度精密度、峰宽和峰分离度

	5CB				7CB			
	RT (min)	含量 (mg/mL)	峰宽	分离度	RT (min)	含量 (mg/mL)	峰宽	分离度
均值	1.384	48.72	0.015		1.466	49.06	0.018	3.01
RSD (%)	0.25	1.97	1.09		0.24	1.95	1.69	1.29
	8OCB				5CT			
	RT (min)	含量 (mg/mL)	峰宽	分离度	RT (min)	含量 (mg/mL)	峰宽	分离度
均值	1.571	49.04	0.016	3.56	1.751	48.61	0.016	6.61
RSD (%)	0.24	1.75	1.09	1.31	0.21	1.76	1.01	1.01

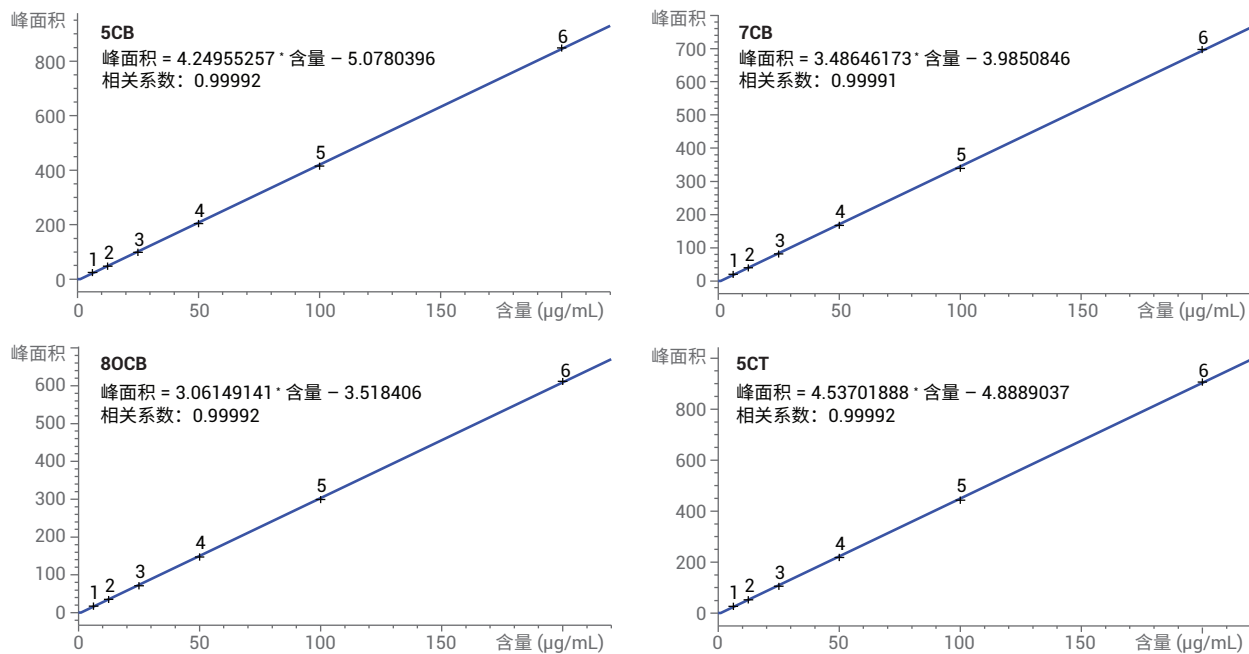


图 3. 混合物中浓度为 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 至 200 $\mu\text{g/mL}$ 的液晶化合物 5CB、7CB、8OCB 和 5CT 的校准曲线，线性优于 0.99990

所用的化合物均可以 E7 液晶混合物的形式购买得到。该混合物的组成包括 51 wt.% (重量百分比) 的 5CB、25 wt.% 的 7CB、16 wt.% 的 8OCB 和 8 wt.% 的 CT。该组成对于确保其所需的物理性质至关重要⁸。所开发的方法能够用于 (例如) E7 液晶混合物的生产质量控制。为快速决定化合物组成是否处于允许误差范围内, 可以在 ChemStation 中生成显示峰面积百分比的报告, 或者可利用智能报告器基于上述校准对报告进行定制。图 4 显示了典型 E7 混合物的色谱图。

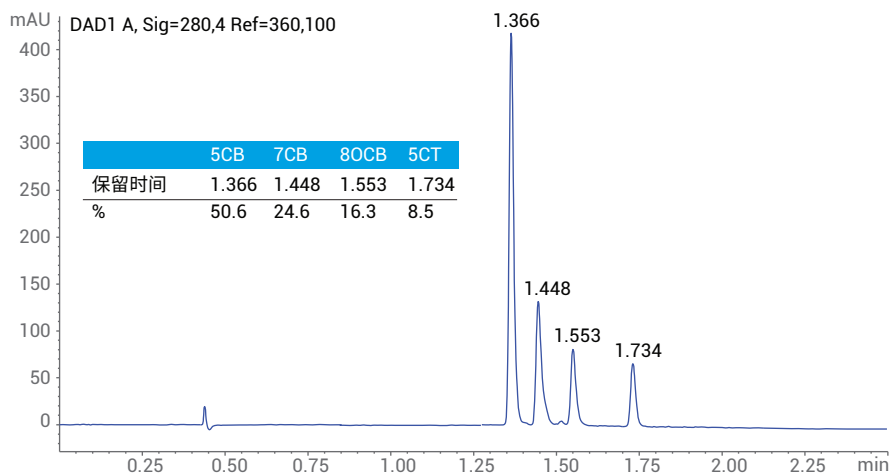


图 4. E7 液晶混合物的色谱图。所需组成为 51 wt.% 的 5CB、25 wt.% 的 7CB、16 wt.% 的 8OCB 和 8 wt.% 的 CT

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统对液晶化合物混合物的分离。结果证明, 在技术上极为重要的四种液晶化合物的混合物能够在很短的分析时间 (2.25 分钟) 内获得基线分离。本方法的分析速度比通常所用的传统 RP-HPLC 分离技术快大约 20 倍。保留时间 RSD 低于 0.25%, 校准曲线线性优于 0.99990。展示了对商业化 E7 液晶混合物的组成的定量测定结果。

参考文献

- Chandrasekhar, S. In *Liquid Crystals*; 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1992; ISBN 0-521-41747-3
- https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_crystal (2015 年 11 月 1 日访问)
- Reinitzer, F. Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. *Monatshefte für Chemie (Wien)* **1888**, 9 (1), 421–441, doi 10.1007/BF01516710
- Lehmann, O. Über fließende Krystalle, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1889**, 4, 462–472
- Sluckin, T. J.; Dunmur, D. A.; Stegemeyer, H. In *Crystals That Flow – Classic Papers from the History of Liquid Crystals*; Taylor & Francis: London, 2004; ISBN 0-415-25789-1
- Castellano, J. A. In *Liquid Gold: The Story of Liquid Crystal Displays and the Creation of an Industry*; World Scientific Publishing, 2005, ISBN 978-981-238-956-5
- Gray, G. W.; Harrison, K. J.; Nash, J. A. New Family of Nematic Liquid Crystals for Displays. *Electronics Lett.* **1973**, 9(6), 130, doi 10.1049/el:19730096
- Derouiche, Y.; et al. Some Properties on nematic Liquid Crystal E7/Acrylic Polymer Networks. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2011**, 541, 201/[439]–210/[448]
- Bras, A. R. E.; et al. Characterization of a nematic Mixture by Reversed-Phase HPLC and UV Spectroscopy: Application to Phase Behaviors Studies in Liquid Crystal-CO₂ Systems. *Electronic-Liquid Crystal Communication* **2005**, March 28
- Martin, T. I.; Haas, W. E. Analysis of Liquid Crystal Mixtures. *Analytical Chemistry* **1981**, 53(4), 593A–602A

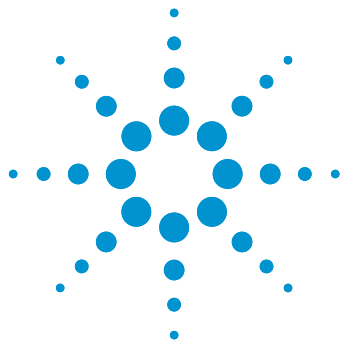
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-6436ZHCN



Agilent Technologies



使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统测定手性合成的异丙甲草胺的对映体过量

应用简报

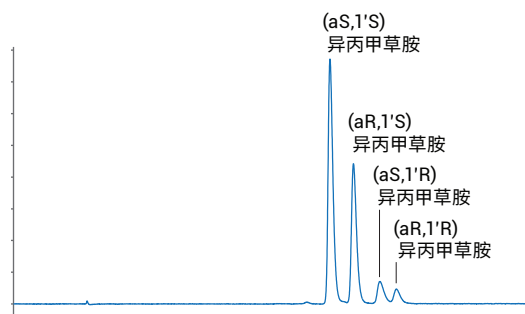
专用化学品

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了分离方法的开发，该方法用于分离来源于具有两个空间中心的化合物的四种立体异构体。使用 Agilent 1260 Infinity 分析型超临界流体色谱 (SFC) 系统与 Agilent ChemStation 方法筛选向导软件开发方法。采用所开发的方法比较由外消旋和立体选择性合成获得的立体异构体的比率。



Agilent Technologies

前言

在全球范围内，异丙甲草胺除草剂大量用于控制玉米及其他作物中的各种阔叶杂草。每年，其全球产量超过 30000 吨^{1,2}。异丙甲草胺具有一个位于不对称取代的碳原子处的立体中心和另一个手性轴。这种结构意味着异丙甲草胺存在四种立体异构体（图 1）。

生物活性主要取决于立体中心碳原子的构型。大约 95% 的生物活性来自两种 S-对映体，即 (aS,1'S) 和 (aR,1'S)，它们的区别在于手性轴上的空间排列不同³。因此，富含 S-对映体的异丙甲草胺制剂不仅可以保持所需的除草效果，还能减少向环境中引入该化合物。研究者们开展了大量工作，试图用 S-对映体的立体选择性合成代替外消旋合成。最终获得了一种解决方案，利用手性二茂铁基催化剂催化加氢反应（图 2）^{4,5}。该合成方法能够生产对映体过量值大约为 80% 的异丙甲草胺，且年产量可达 50000 吨以上。为测定对映体过量并由此确定手性合成成功与否，必须将所有四种立体异构体分离。这一分离已通过正相 HPLC 实现^{6,7}。利用 HPLC 方法，四种立体异构体在 20–30 分钟之间从色谱柱上洗脱下来，并且通常需要使用有害的正相溶剂。

本应用简报介绍了如何使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统开发用于分离异丙甲草胺的所有四种立体异构体的方法。所开发的方法能够分离这四种立体异构体，且分离时间远远短于使用正相 HPLC 条件时通常所需的分离时间。此外，SFC 方法无需使用有害溶剂。

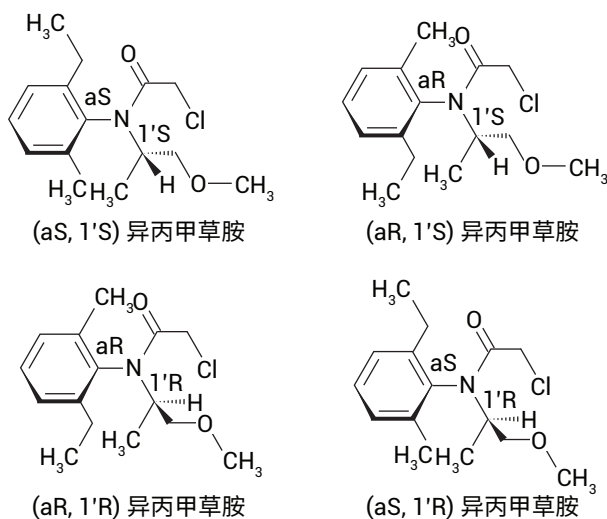


图 1. 农药异丙甲草胺的立体异构体。1'S-对映体具有生物活性，与手性轴上的空间排列无关

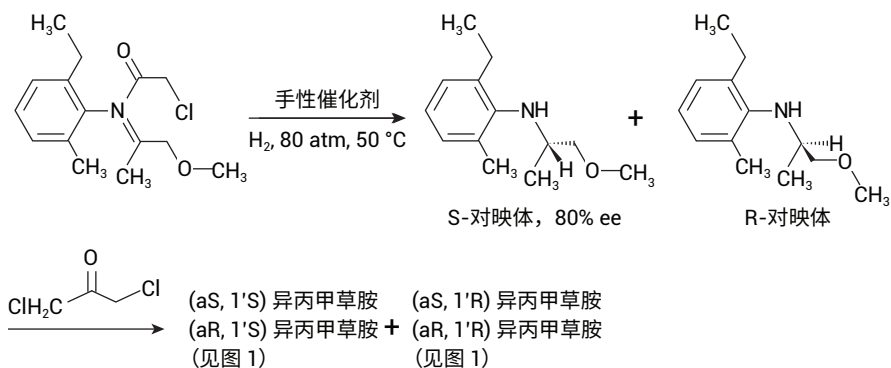


图 2. S-异丙甲草胺的立体选择性合成

实验部分

仪器

所有实验均在 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A) 上完成, 该系统包括:

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 自动进样器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱, 配备阀驱动
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器, 配备高压 SFC 流通池

利用 SFC 系统进行自动化方法开发需要下列额外设备:

- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C), 配备阀驱动
- Agilent 1200 Infinity 系列 8 位/9 通 Quick-Change 快速更换阀, 2 个 (G4230A)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A), 配备 Agilent 1200 Infinity 系列 12 位/13 通 Quick-Change 快速更换阀 (G4235A)
- 方法开发毛细管工具包 (部件号 5067-1595)

仪器设置

为实现溶剂选择, 利用 OpenLAB CDS 中的“仪器配置”菜单将 SFC 二元泵与 12 位/13 通阀结合起来。溶剂在 OpenLAB CDS 的“泵设置”菜单中进行定义。为实现色谱柱选择, 利用 OpenLAB CDS 中的“仪器配置”菜单将两个柱温箱结合起来, 其中每个柱温箱配备一个 8 位/9 通阀。方法开发毛细管工具包支持采用最多八根色谱柱。在 OpenLAB CDS 的色谱柱数据库中输入色谱柱详细信息并在“柱温箱”菜单中进行配置。

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 版本 C.01.06, 附带 Agilent ChemStation 方法筛选向导 A02.04 版 (G2196AA)

SFC 方法

优化后最终方法的条件以粗体显示。

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇、乙醇和异丙醇
SFC 流速	3 mL/min
等度洗脱	2.5%、5%、10% 和 20% 改性剂
改性剂	甲醇
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	120 bar
柱温	35 °C
进样量	1 µL, 固定定量环, 定量环过量填充 10 倍, 用异丙醇在样品瓶中清洗进样针
检测	220 nm/带宽 4 nm, 参比 360 nm/带宽 100 nm, 数据采集速率 10 Hz

色谱柱

- Chiral Technologies, Chiralpak IA3, 4.6 × 250 mm, 3 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IB, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IC, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak ID, 4.6 × 250 mm, 5 µm

化学品

- 异丙甲草胺和 S-异丙甲草胺均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。实验采用溶于 5 mg/mL 异丙醇的溶液
- 所有溶剂均购自德国 Merck 公司
- 新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

结果与讨论

利用包含所有四种立体异构体的异丙甲草胺的外消旋混合物，对四种不同的手性柱和洗脱强度逐渐增加的三种有机改性剂（异丙醇、乙醇和甲醇）进行筛选。采用三种不同的等度条件进行初始筛选，其中有机改性剂分别为 5%、10% 和 20%。用三种不同的溶剂和三种不同的等度溶剂组成对一根色谱柱进行筛选耗时大约 90 分钟，其中包括溶剂更换和平衡时间。通过筛选过程发现，在 Chiralpak IA3 色谱柱上获得了最具前景的洗脱模式（如图 3 所示，未示出其他色谱柱的结果）。

在 Chiralpak IA3 色谱柱上进行筛选时，洗脱强度最高的甲醇未能分离四种立体异构体（图 3A）。使用洗脱强度较低的乙醇时，当乙醇含量为 10% 时，各种化合物开始分离。当乙醇含量为 5% 时，两对化合物得到分离，但是单个化合物未完全分离（图 3B）。采用洗脱强度最弱的洗脱溶剂异丙醇时，在异丙醇含量为 5% 的等度条件下，第一种化合物和最后一种化合物几乎获得了基线分离，并且第二种化合物和第三种化合物之间出现一个峰谷（图 3C）。使用这些起始条件完成了最终优化。最终方法采用异丙醇含量为 2.5% 的等度条件来分离四种立体异构体，四种化合物在 6.16 分钟至 7.44 分钟之间得到分离（图 4）。

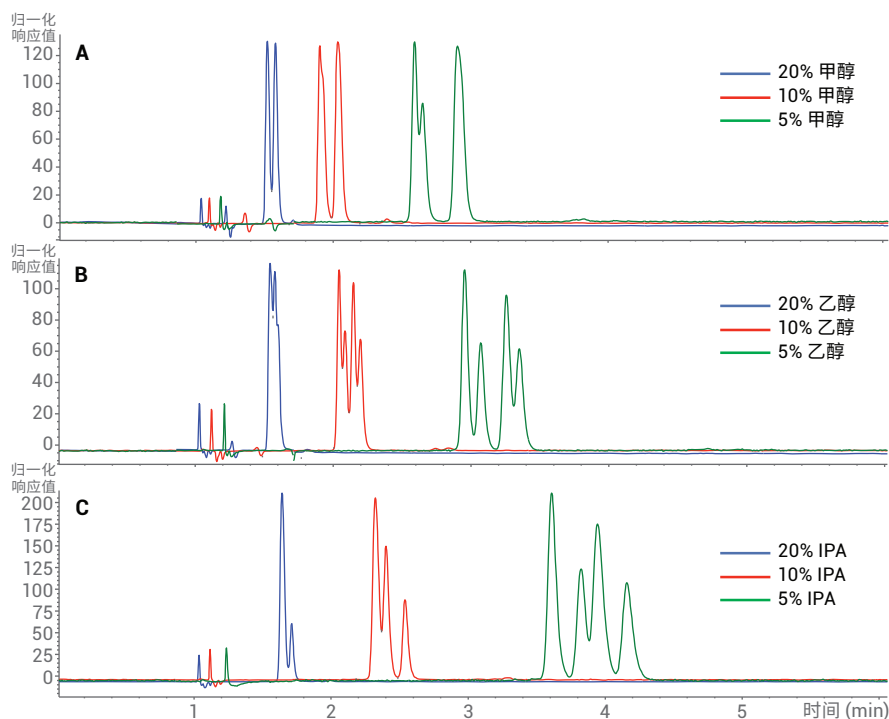


图 3. 采用 5%、10% 和 20% 的 A) 甲醇、B) 乙醇 和 C) 异丙醇 (IPA) 分离四种手性异丙甲草胺异构体。选择 5% IPA 的等度条件作为在 Chiralpak IA3 色谱柱上进行分离方法最终优化的起始点

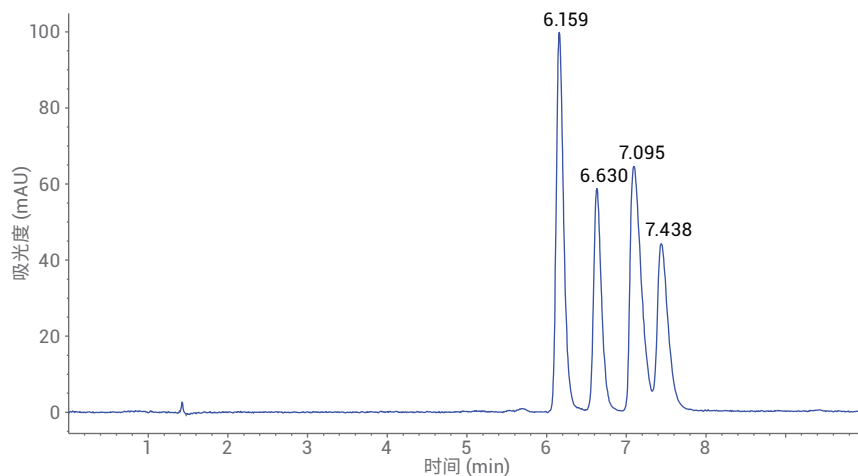


图 4. 在最终优化的方法中，采用 Chiralpak IA3 色谱柱和 2.5% 异丙醇等度条件，异丙甲草胺的四种立体异构体在 6.159 分钟至 7.438 分钟之间得到分离

采用这一优化的方法分析通过立体选择性合成获得的异丙甲草胺，结果表明该异丙甲草胺的 S-对映体过量 (图 5)。作为混合物中的主要化合物，对映体 (aS,1'S) 和 (aR,1'S) 分别在 6.18 分钟和 6.64 分钟处洗脱。作为微量成分，对映体 (aS,1'R) 和 (aR,1'R) 分别在 7.16 分钟和 7.48 分钟处洗脱。通过峰面积计算得出，S-对映体的对映体过量值约为 78% (表 1)。由外消旋异丙甲草胺样品获得的峰面积显示，S-对映体和 R-对映体的比率为 50%:50%，但是其中一种手性轴立体异构体 (aS 或 aR) 的含量更高 (表 1)。

将外消旋和立体选择性混合物进样分析 10 次得到的统计评估结果表明，立体选择性混合物的保留时间 RSD 通常低于 0.2% 并且峰面积 RSD 通常为 1% (表 1)。

结论

本应用简报介绍了农药化合物异丙甲草胺的手性分离方法开发，该化合物具有多个手性中心，因此，其具有两种以上的对映异构体。利用最终方法测定通过立体选择性合成获得的产品对映体过量值。所开发方法的分析时间为 10 分钟。相比之下，典型的正相 HPLC 方法需要至少 30 分钟。该 SFC 方法的分析速度比通常所用的正相方法快大约 3 倍。此外，与正相方法相比，SFC 无需使用正己烷等有害溶剂。获得的保留时间 RSD 值低于 0.2%，峰面积 RSD 值约为 1%。

参考文献

1. O'Connell, P. J; Harms, C.T; Allen, J. R. F. Metolachlor, S-Metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protection* **1998**, 17(3), pp 207-212

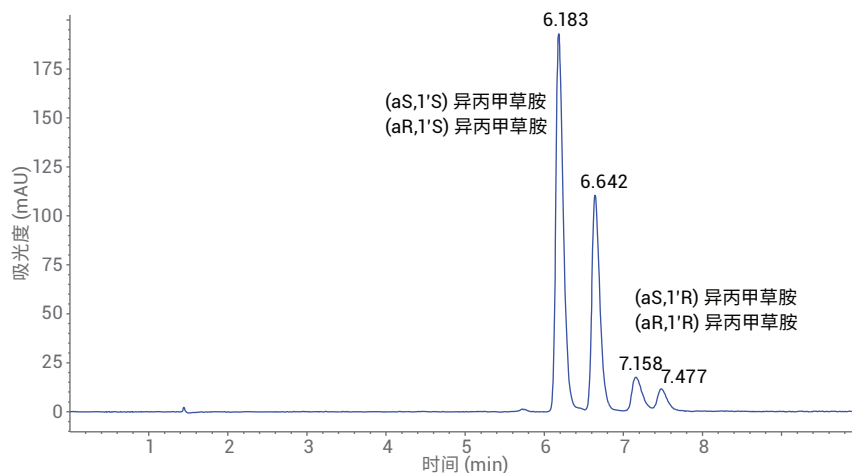


图 5. 通过立体选择性合成获得的异丙甲草胺的四种立体异构体的分离情况。主成分 S-对映体分别在 6.183 分钟和 6.642 分钟处洗脱。S-对映体的对映体过量值约为 78%

表 1. 通过外消旋和立体选择性合成获得的四种异丙甲草胺立体异构体的分离结果的统计评估，以及对映体组成的相对测定结果

峰	保留时间	外消旋合成			立体选择性合成		
		保留时间 RSD	峰面积 RSD	峰面积 %	保留时间 RSD	峰面积 RSD	峰面积 %
峰 1	6.183	0.25	1.06	30.77	0.20	0.90	55.35
峰 2	6.642	0.22	1.05	19.24	0.19	0.97	33.66
峰 3	7.158	0.16	1.06	30.08	0.18	1.93	6.70
峰 4	7.477	0.17	1.04	19.91	0.16	1.34	4.29

2. Poiger, T; Müller, M. D; Buser, H.-R. Verifying the chiral switch of the pesticides Metolachlor on the basis of the enantiomer composition of environmental residues. *Chimia* **2002**, 56, pp 300-303
3. Moser, H; Rihs, G; Sauter, H. Der Einfluss von atropisomerie und chiralem Zentrum auf die biologische Aktivität des Metolachlor. *Z. Naturforsch.* **1982**, 87B, pp 451-462
4. Blaser, H; Spindler, F; *Chimia* **1997**, 51, pp 297-299
5. Blaser, H; et al. *J. Organomet. Chem.* **2001**, 621, pp 34-38
6. Polcaro, C. M; et al. Chiral HPLC Resolution of neutral pesticides. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, 27, pp 49-61
7. Ye, J; Wu, J; Liu, W. Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **2009**, 28(10), pp 1148-1163

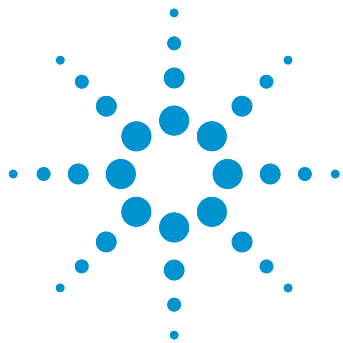
www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-5618ZHCN



Agilent Technologies



根据 ASTM D7347 方法检测变性乙醇中的烯烃含量

应用简报

能源与化工

作者

Martina Noll-Borchers 和
Timo Hölscher
SIM Scientific Instruments
Manufacturer GmbH
Oberhausen, Germany

Edgar Naegele 和 Markus Becker
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统结合 SIM 火焰离子化检测器 (FID) 测定变性乙醇中的烯烃含量。将 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与该 FID 相结合, 可满足 ASTM D7347-07 方法的所有要求, 例如基于时间的色谱柱切换所需的保留时间精密度、良好的峰面积精密度和校准函数。



SIM 
Scientific Instruments Manufacturer GmbH



Agilent Technologies

前言

变性乙醇被用作火花点火发动机燃料中的含氧添加剂。它在终端被添加至燃料中，并且可能包含烯烃物质，进而可能提高燃料的总烯烃含量。事实证明，烯烃类物质可促进大气中的光化学反应。这可能导致易受影响的的城市地区形成雾霾。因此，加州空气资源委员会 (CARB) 规定了火花点火发动机燃料中总烯烃的最高允许限值^{1,2}。

因此，需要一种分析方法来确定用于火花点火发动机燃料的变性乙醇中的烯烃含量，如 ASTM 方法 D7347-07 所述。监管机构和生产商必须遵守该方法²。ASTM D6550 中描述了用于测定汽油中总烯烃含量的相应分析测试方法^{3,4}。

SIM Scientific Instruments Manufacturer GmbH (德国) 针对 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统开发出一款火焰离子化检测器 (FID)，以扩展其应用范围，例如用于满足 ASTM D5186 中所述的柴油燃料中芳香族化合物测定的相关石化应用要求^{5,6}。

本应用简报介绍了使用 1260 Infinity 分析型 SFC 系统结合 SIM 火焰离子化检测器测定变性乙醇中的烯烃含量。结果表明，该 SFC/FID 系统满足 ASTM D7347-07 的所有要求。该测试方法可自动进行，无需任何样品前处理，并且分析时间相对较短，仅 10 分钟左右。适用于分析 0.1%–1.0% (质量 %) 的总烯烃。展示了最终方法的保留时间 (RT) 和峰面积精密密度、烯烃定量测定的准确度以及检测器线性。最后，对变性乙醇样品进行了测量。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统，采用如下配置：

- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- 两个 Agilent 1290 Infinity 柱温箱，配备阀驱动和 2 位/6 通 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换阀
- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- CTC Analytics 液相色谱进样器 HTC PAL (宽 50 cm)，经改进配有 4 通阀 (内部 1 μ L 定量环) 和 DLW，或者 Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器 (替代方案)
- SIM 火焰离子化检测器
- 用于己烷冲洗流路的限流器：PEEKsil，内径 100 μ m，20 cm

完整解决方案可从 SIM Scientific Instruments Manufacturer GmbH (Oberhausen, Germany) 订购。

分析柱

- Agilent ChromSpher 5 Lipids (银负载)，4.6 \times 30 mm (部件号 G7601-85000)
- YMC-PACK-SIL-06, 4.6 \times 250 mm, S-5 μ m, 6 nm (部件号 SL06S05-2546WT)
- YMC-Pack-PVA-Sil, 4.0 \times 50 mm, S-5 μ m, 12 nm (部件号 PV12S05-0504QT)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，修订版 C.01.05

SFC/FID 配置

色谱柱的出口连接至 FID 的上部 T 形管 (图 1)。为冲洗反压调节器 (BPR)，从二元泵的泵头 B 持续泵送己烷。为保持反压恒定和系统连续运行，将限流毛细管集成到泵头 B 和 FID 下部的 T 形管之间。

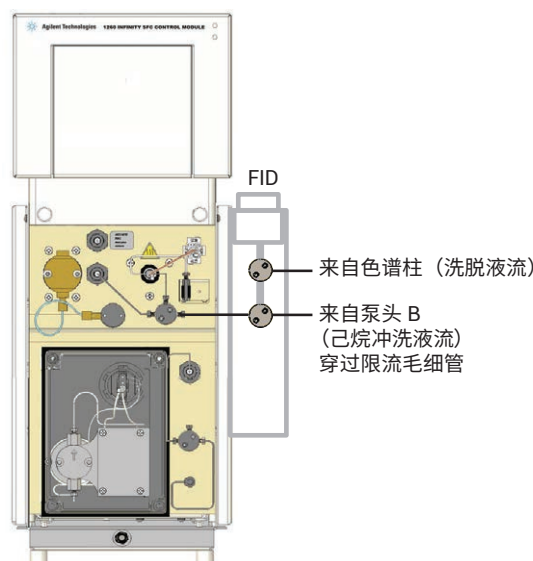


图 1. SFC/FID 模块与液相色谱仪的连接

色谱柱和阀配置

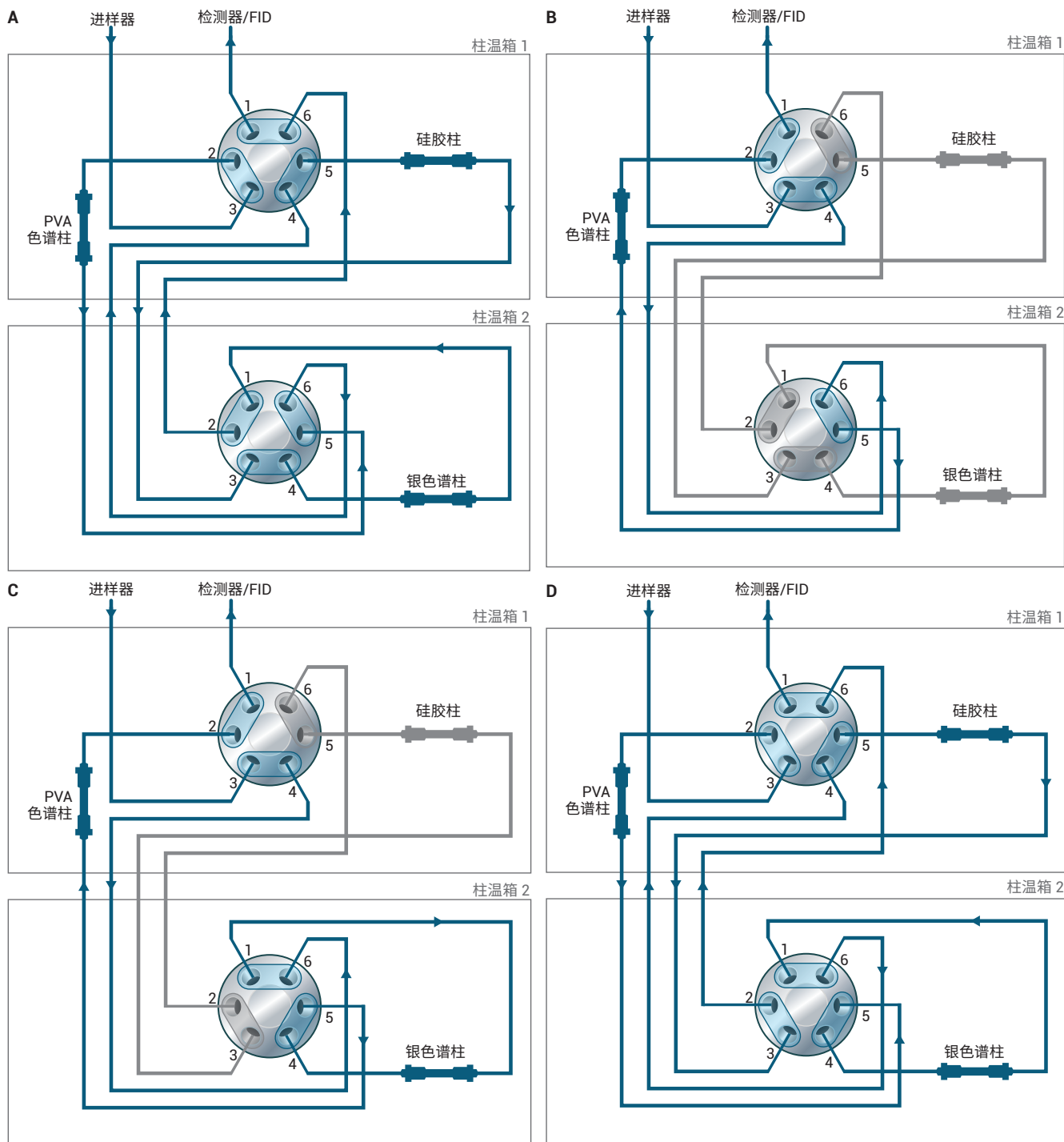


图 2. 色谱柱和阀配置。位置 A) PVA 色谱柱、硅胶柱和银负载色谱柱串联且处于正冲模式下。将样品进样至三色色谱柱上，乙醇保留在 PVA 色谱柱上。在乙醇洗脱（位置 B）后，将利用此位置洗脱饱和烃，使烯烃上样至银负载色谱柱，并保留芳烃。位置 B) 将乙醇从 PVA 色谱柱上反冲下来。硅胶柱和银负载色谱柱不在流路中。位置 C) 反冲银负载色谱柱以洗脱烯烃。硅胶柱不在流路中。位置 D) 液流首先进入 PVA 色谱柱，然后进入银负载色谱柱，最后进入处于正冲模式下的硅胶柱，将硅胶柱上的芳烃洗脱到检测器中

确定阀切换时间

(ASTM D7347, 第 9 节)

通过下文所述的实验，利用载样时间混合物 A 至 C 确定阀切换的时间。必须在初始系统设置或更换部件（如色谱柱、毛细管等）时完成该程序。

- 为确定载样时间 t_L ，将阀切换至图 2B 中所示的位置；使用载样时间混合物 A。该阀位置仅允许使用 PVA 色谱柱，同时保护硅胶柱免受乙醇的影响，并保护银负载色谱柱免受芳烃的影响（图 3A， $t_L = 0.75$ 分钟）
- 利用纯乙醇确定在载样时间 t_L 后从 PVA 色谱柱反冲乙醇的时间 t_E 。当阀处于图 2A 所示的位置时，注入乙醇，然后在 $t_L = 0.75$ 分钟时将阀切换至图 2B 所示的位置。确定乙醇峰返回基线的时间 t_E （图 4， $t_E = 3.0$ 分钟）
- 利用载样时间混合物 B 确定烯烃化合物从硅胶柱转移至银负载色谱柱上的载样时间 t_0 （图 5， $t_0 = 5.15$ 分钟）
- 利用载样时间混合物 C 确定烯烃在反冲模式下从银负载色谱柱上完全洗脱所需的时间段 t_{B0} （图 6， $t_{B0} = 7.5$ 分钟）

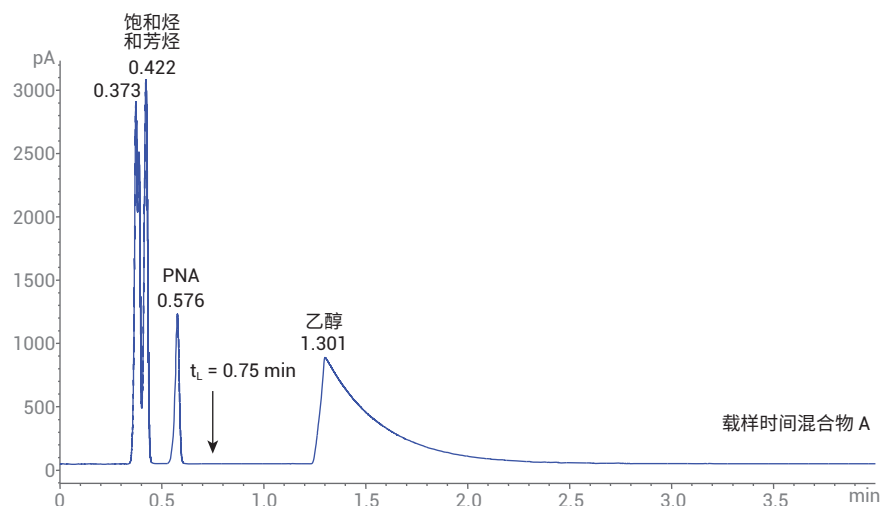


图 3. 载样时间 t_L 的确定。阀切换至如图 2B 所示的位置。使用载样时间混合物 A。芳烃和饱和烃化合物离开 PVA 色谱柱且信号返回基线时的时间确定为载样时间 t_L ($t_L = 0.75$ 分钟)

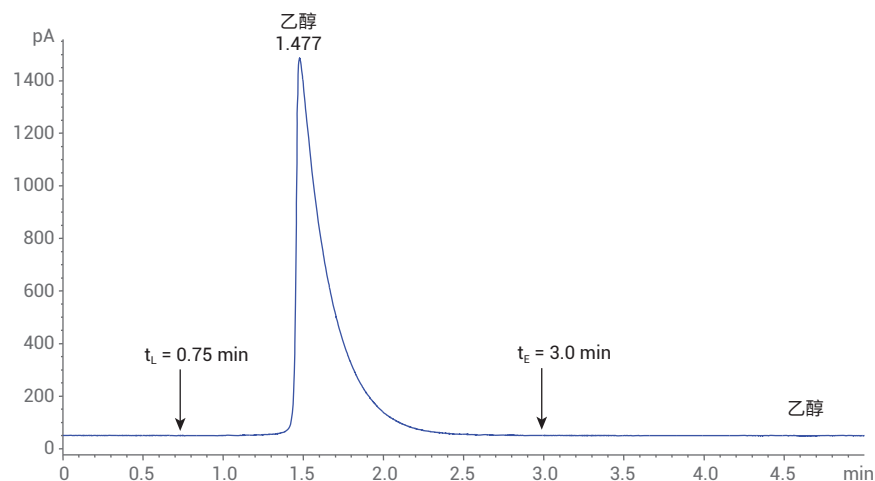


图 4. 确定在载样时间 t_L 后反冲乙醇的时间 t_E 。在阀位置 2A 处注入乙醇，并将阀切换至 2B ($t_L = 0.75$ 分钟)。乙醇峰返回基线时的时间确定为反冲时间 t_E ($t_E = 3.0$ 分钟)

- 利用载样时间混合物 B 确定芳烃的洗脱时间 t_{A0} 。在时间段 t_{B0} 后，将阀切换至图 2D 所示的阀位置，使芳烃从硅胶柱上洗脱下来。在单环芳烃和多环芳烃 (PNA) 洗脱后，可停止运行 ($t_A = 9.5$ 分钟)。图 7 显示了完整的色谱图
- 载样时间混合物 D 和 E 可用于说明是否存在洗脱到银负载色谱柱上的饱和烃或芳烃。可利用它们优化阀切换时间点 t_0 (未示出色谱图)

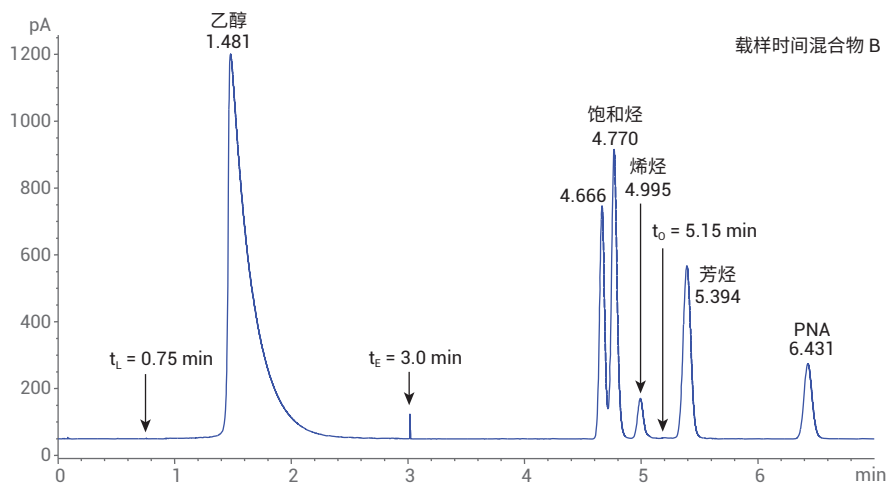


图 5. 确定烯烃化合物上样至银负载色谱柱的载样时间 t_0 。使用载样时间混合物 B。为确定 t_0 ，在图 2A 中所示的阀位置处注入载样时间混合物 B。在 t_L 后，将阀切换至图 2B 中所示的位置以反冲乙醇。在 t_E 时，将阀切换至图 2D 中所示的位置。此配置将饱和烃、烯烃和芳烃直接洗脱到检测器，避免污染银负载色谱柱 ($t_0 = 5.15$ 分钟)

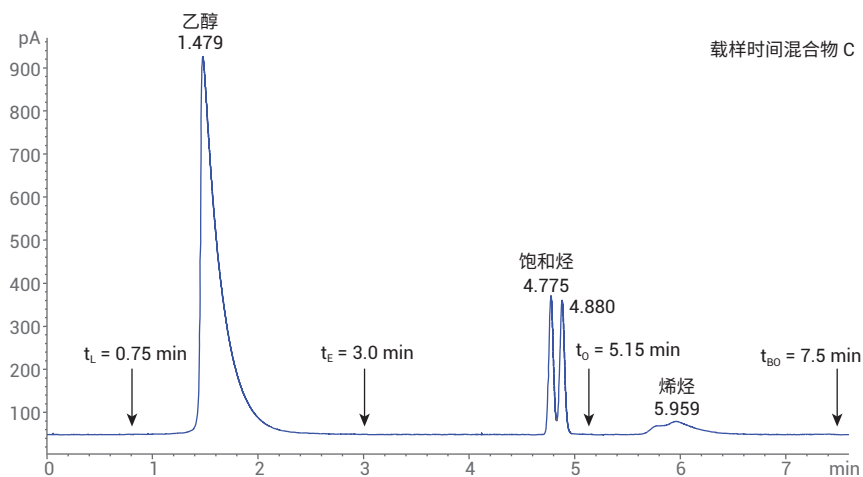


图 6. 在反冲模式下，烯烃从银负载色谱柱上完全洗脱所需的时间段 t_{B0} 的确定。使用载样时间混合物 C。采用图 2A 所示的阀位置注入该样品。在 t_L 时，将阀切换至图 2B 中所示的位置以反冲乙醇。在 t_E 时，将阀切换回初始位置，直至饱和烃从硅胶柱上洗脱下来并通过银负载色谱柱进入检测器 (直至时间 t_0)。现在将阀切换至图 2C 中所示的位置，在反冲模式下，使保留的烯烃从银负载色谱柱上洗脱下来 ($t_{B0} = 7.5$ 分钟)

化学品和溶液

根据 ASTM D7347 中的指南配制样品和标样。所有化学品：苯、甲苯、萘、己烷、环己烷、环己烯、2-戊烯、1-己烯和汽油（特纯，沸点 90–100 °C）均购自 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)。乙醇为 HPLC 级，购自德国 Carl Roth。

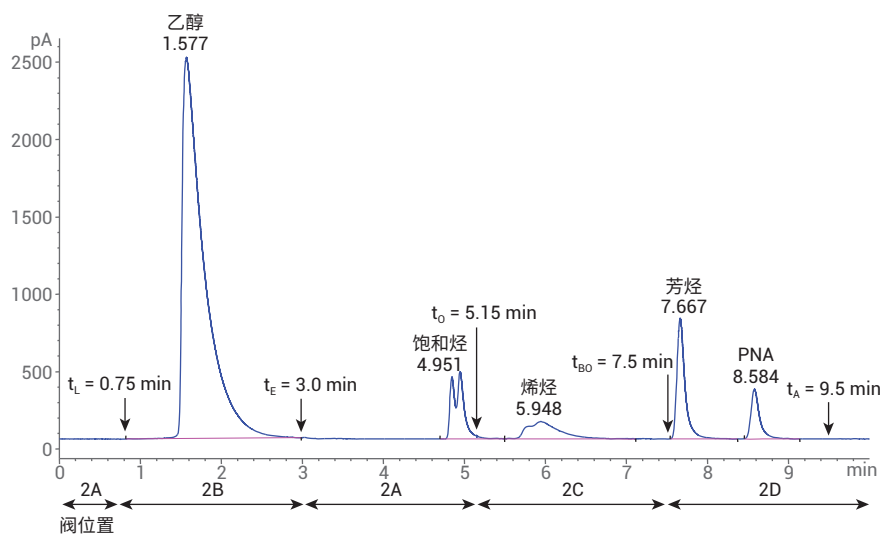


图 7. 变性乙醇中烯烃含量测量的性能测试。阀切换时间点和时间范围如图所示。相应的流路如图 2 所示

组分	组成
FID 气体	氢气、空气和氮气（用作尾吹气）
洗脱液	二氧化碳（纯度 >99.998%，根据 SFC 模块的规格要求，采用不带汲取管的加压钢瓶）
用于反压调节器的冲洗溶液	己烷（不用作改性剂。通过二元泵的通道 B 泵送）
载样时间混合物 A	利用 10% 烷烃（正己烷和环己烷）、10% 芳烃（苯、甲苯和萘）和 80% 乙醇确定饱和烃和芳烃在硅胶柱上的载样时间，同时利用 PVA 色谱柱保护硅胶柱免受乙醇的影响（ASTM D7347，第 7.5.1 节）
载样时间混合物 B	利用 10% 烷烃（正己烷和环己烷）、7% 芳烃（苯、甲苯和萘）、3% 烯烃（2-戊烯、1-己烯和环己烯）和 80% 乙醇确定饱和烃和烯烃在银负载色谱柱上的载样时间，同时无芳烃污染该色谱柱（ASTM D7347，第 7.5.2 节）
载样时间混合物 C	利用 7% 烷烃（正己烷和环己烷）、3% 烯烃（2-戊烯、1-己烯和环己烯）和 90% 乙醇确定烯烃从银负载色谱柱洗脱的时间（ASTM D7347，第 7.5.3 节）
载样时间混合物 D	利用 10% 烷烃（正己烷和环己烷）和 90% 乙醇检验银负载色谱柱上是否存在饱和烃（ASTM D7347，第 7.5.4 节）
载样时间混合物 E	利用 10% 芳烃（苯、甲苯和萘）和 90% 乙醇检验银负载色谱柱上是否存在芳烃（ASTM D7347，第 7.5.5 节）
性能测试混标 (PTM)	包含重量百分比不超过 10% 的烷烃（正己烷和环己烷）、单环芳烃（苯和甲苯）和多环芳烃（萘）以及重量百分比不超过 3% 的单烯烃（2-戊烯、1-己烯和环己烯）的乙醇溶液（ASTM D7347，第 7.7 节）
质量控制混标	包含已知浓度的烯烃的乙醇溶液，用于监测分析型 SFC 系统的精密度（ASTM D7347，第 7.8 节）
校准混标	重量百分比为 10% 的烷烃（己烷和环己烷）、重量百分比为 2% 的烯烃（2-戊烯、1-己烯和环己烯）以及重量百分比为 88% 的乙醇（ASTM D7347，第 8.5 节）。用包含重量百分比为 10% 的烷烃（己烷和环己烷）的乙醇按 1:1 的比例稀释该储备液。将所得的 1% 烯烃溶液稀释得到一系列校准溶液（以 0.1% 递减，烯烃含量最低为 0.1%）
加标样品	单烯烃（2-戊烯、1-己烯和环己烯）含量不超过 1% 的乙醇（用不超过 10% 的汽油进行变性处理）

结果与讨论

用于测定变性乙醇中烯烃总量的 ASTM D7347 测试方法是基于配备三根色谱柱和两个六通切换阀的 SFC LC 色谱系统。逐步将烯烃与乙醇、芳烃和饱和烃分离，并利用 FID 对烯烃进行定量分析。充分确定阀切换时间，对于保护色谱柱免受乙醇的影响、保护银负载硅胶柱免受乙醇和芳烃的影响并保证在烯烃洗脱时银负载色谱柱上不存在芳烃和饱和烃来说非常重要。

首先，按照“实验部分”所述的方法确定阀切换时间，然后对性能测试混标 (PTM) 进行测量。该混标包含饱和烃、烯烃、单环芳烃和 PNA。利用该混标评估阀切换的准确性，并确保所有化合物从其相应的色谱柱上及时洗脱下来以满足所需的保留时间 (RT) 要求 (图 7)。

SFC 方法

Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵

溶剂 A	CO ₂ (预压缩)，99.998%
溶剂 B	己烷，0.5% (仅用于冲洗反压调节器 (BPR)，不用作洗脱液)。根据样品的组成不同，可能需要用较高含量的己烷 (例如，在软件中设置为 50% 洗脱液 B) 不时地冲洗 BPR
流速	1.5 mL/min
BPR 温度	40 °C
BPR 压力	170 bar

Agilent 1290 Infinity 柱温箱

PVA 和硅胶柱柱温	40 °C
银负载色谱柱柱温	70 °C

阀位置 (图 2)

阀位置 A	0 分钟时
阀位置 B	0.75 分钟时
阀位置 A	3.0 分钟时
阀位置 C	5.15 分钟时
阀位置 D	7.5 分钟时

CTC Analytics 液相色谱进样器 HTC PAL

进样量	1.0 µL 定量环，过量填充 30 倍，在端口中用己烷进行清洗
用溶剂 1 预清洗	1
用样品预清洗	1
填充速度	5 µL/s
填充次数	3
进样至	LCVlv1
进样速度	10 µL/s
进样前延迟	500
进样后延迟	500
后清洗溶剂 1	2
阀清洗溶剂 1	2

Agilent 1260 Infinity 进样器 (替代方案)

进样量	1.0 µL 定量环，过量填充 10 倍，在样品瓶用己烷进行清洗
FID	
温度	300 °C
气体	氢气 (H ₂) 50 mL/min 空气 500 mL/min 尾吹气 (N ₂) 50 mL/min

第一步，必须除去烃类中的乙醇。虽然这些化合物在 t_i (0.75 分钟) 时已经全部进入硅胶柱中，但是在 t_e (3.0 分钟) 时进行反冲之前，乙醇仍保留在 PVA 色谱柱上。阀位置的分配如图 7 下方所示。图 2 示出其相应的流路。饱和烃和烯烃从硅胶柱上洗脱下来后，烯烃保留在银负载色谱柱上，饱和烃则进入检测器 (4.95 分钟)。在 $t_0 = 5.15$ 分钟时，将银负载色谱柱切换至反冲位置，使烯烃洗脱下来。芳烃仍保留在处于旁路模式的硅胶柱上。烯烃从反冲的银负载色谱柱上洗脱下来，得到较宽的峰，其峰值对应于 5.95 分钟。在银负载色谱柱上的化合物完全洗脱并对该色谱柱进行冲洗后，在 7.5 分钟时将硅胶柱切换回流路，使芳烃从硅胶柱上洗脱下来。单环芳烃在 7.67 分钟处洗脱，而 PNA 在 8.58 分钟处洗脱。图 8 显示了对 PTM 重复测量 20 次得到的叠加色谱图，表明基于时间的阀切换运行良好。烯烃峰与单环芳烃峰之间的分离度约为 6 (要求 >4)。

为测量实际样品，需要采用溶于变性乙醇且浓度为 0.1%–1.0% 的烯烃校准标样生成校准曲线。校准曲线表现出良好的线性，相关系数优于 0.99 (图 9)。图 9 还显示了校准浓度为 0.1%–1.0% 的烯烃峰的叠加图。

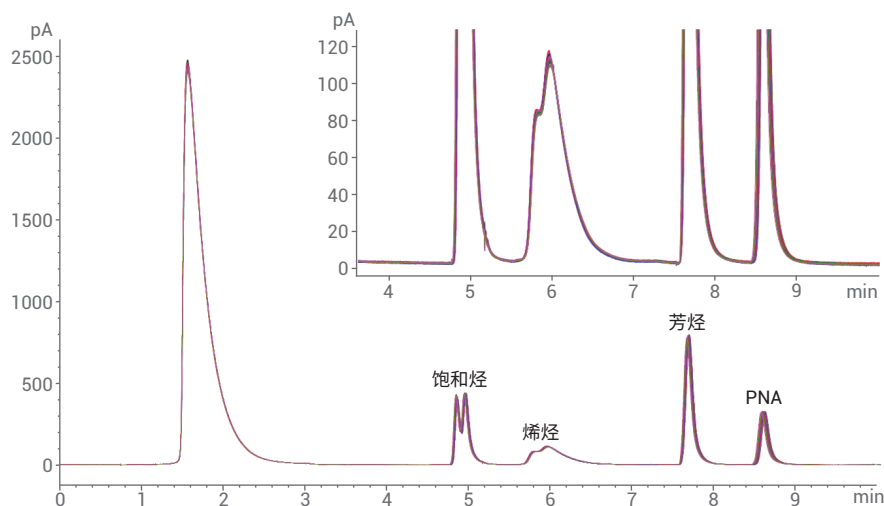


图 8. 利用 PTM 对变性乙醇中的烯烃含量测量进行性能测试，包含放大图 (叠加图, $n = 20$)

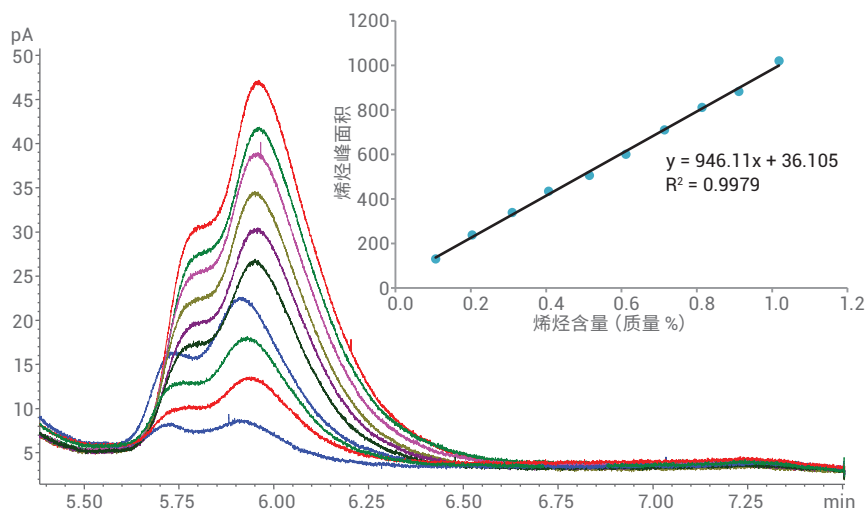


图 9. 烯烃含量为 0.1%–1.0% (质量 %) 的叠加色谱图，以及用于测量变性乙醇中烯烃含量的校准曲线，该校准曲线的线性相关系数为 0.9979

除校准曲线外，还测量了性能样品 (PTM)、质量控制 (QC) 样品和变性乙醇的加标样品 (含 9.5% 的汽油)。图 10 显示了加标 0.5% 烯烃的变性乙醇样品的色谱图。将所有样品进样分析 20 次，对烯烃峰进行统计评估 (表 1)。RT 的相对标准偏差 (RSD) 通常低于 0.2% (要求 < 0.5%)，峰面积 RSD 通常低于 2%。按照 ASTM D7347-07 第 13.1.1 节所述的方法计算重现性限值。连续分析得到的结果之间的差异未超出计算得出的限值，表明所有样品均符合该标准。

结论

本应用简报证明 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 SIM/FID 联用，在按照 ASTM D7347-07 方法测定变性乙醇中烯烃含量时实现了更高的性能。

利用三根不同的色谱柱以及阀切换解决方案 (在正冲模式下分离，在反冲模式下洗脱)，将变性乙醇样品中的烯烃与饱和烃和芳烃以及乙醇本身分离。对 0.1%–1.0% (质量 %) 之间的烯烃进行了定量分析，结果表现出良好的线性。RT 精密度处于给定的限值范围内，此精密度值对基于时间的色谱柱切换非常重要。连续分析得到的结果之间的差异符合 ASTM D7347-07 第 13.1.1 节中规定的重现性限值要求。

表 1. 根据 ASTM 7347-07 第 13.1.1 节所述的方法得到的 PTM、QC 和加标样品的 RT、峰面积、浓度和重现性值 (n = 20)

样品	PTM 3.0% 烯烃			质量控制样品 0.25% 烯烃			加标样品 0.5% 烯烃		
	RT	峰面积	含量	RT	峰面积	含量	RT	峰面积	含量
按重量计的烯烃含量 (质量 %)	3.027			0.257			0.527		
平均值 (质量 %)	5.95	3024.21	3.158	5.93	271.70	0.249	5.95	482.90	0.472
SD	0.01	26.57	0.03	0.01	4.80	0.01	0.01	5.19	0.01
RSD (%)	0.13	0.88	0.89	0.14	1.77	2.04	0.14	1.07	1.16
重现性*(Δ_{max})	0.107			0.022			0.023		
重现性限值*	0.216			0.065			0.077		

* 按照 ASTM D7347-07 第 13.1.1 节所述的方法计算得到

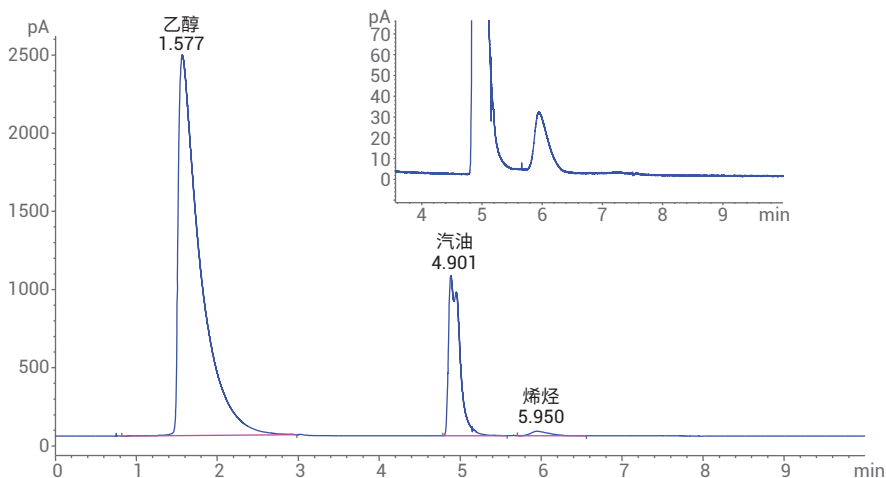


图 10. 加标 0.5% 烯烃的变性乙醇样品 (9.5% 汽油)

参考文献

1. California Air Resources Board, The California Reformulated Gasoline Regulations, Title 13, California Code of Regulations, Sections 2250-2273.5 Reflecting Amendments Effective August 29, **2008**
2. American Society for Testing and Materials (ASTM): ASTM D7347-07 (**2007**), Standard Test Method for Determination of Olefin Content in Denatured Ethanol by Supercritical-Fluid Chromatography, <http://www.astm.org/Standards/D7347.htm> (**2016** 年 2 月 1 日访问)
3. American Society for Testing and Materials (ASTM): ASTM D6550-10 (2009), Standard Test Method for Determination of Olefin Content of Gasolines by Supercritical-Fluid Chromatography, <http://www.astm.org/Standards/D6550.htm> (**2016** 年 2 月 1 日访问)
4. Noll-Borchers, M.; Hölscher, T.; Naegele, N.; Becker, M. Determination of Olefin Content in Gasolines According to ASTM D6550 (根据 ASTM D6550 测定汽油中的烯烃含量), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-6434EN, **2015**
5. American Society for Testing and Materials (ASTM): ASTM D 5186-03 (**2009**), Standard Test Method for Determination of the Aromatic Content and Polynuclear Aromatic Content of Diesel Fuels and Aviation Turbine Fuels by Supercritical Fluid Chromatography, <http://www.astm.org/Standards/D5186.htm> (**2016** 年 2 月 1 日访问)
6. Noll-Borchers, M.; Hölscher, T.; Naegele, N.; Becker, M. 根据 ASTM D5186 测定柴油燃料中的芳烃含量, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5682ZHCN, **2015**

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

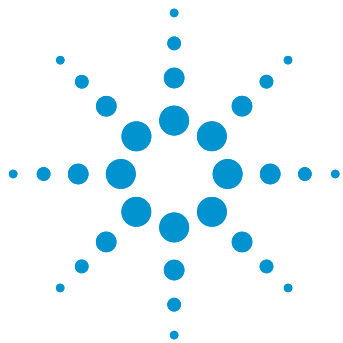
联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-7271ZHCN



根据 ASTM D5186 测定柴油燃料中的芳烃含量

利用火焰离子化检测器增强 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统的分析能力

应用简报

能源与化工

作者

Martina Noll-Borchers,
Timo Hölscher
SIM Scientific Instruments
Manufacturer GmbH
Oberhausen, Germany



Edgar Naegele, Markus Becker
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 SIM 火焰离子化检测器 (FID) 测定柴油燃料中的芳烃含量。将 SFC 系统与开发的 FID 系统相结合，能够满足 ASTM D5186 方法的所有要求（如检测器准确度和线性）。这一组合为现有的正相 HPLC 方法 D1319 和 D2425 提供了一种经济有效且快速的替代方案。



前言

SIM Scientific Instruments Manufacturer GmbH (Oberhausen, Germany) 开发出一款与 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统配合使用的火焰离子化检测器 (FID)。这一组合扩展了应用范围, 例如可满足 ASTM 方法 D5186 所述的石化应用要求。借助适当的电子部件和 FID 软件模块, 可以通过 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件对 FID 进行控制。FID 的开发充分考虑了检测器准确度和线性以及与 1260 Infinity 分析型 SFC 系统的集成。在 FID 开发过程中, 首先按照 ASTM 方法 D5186 所公开的步骤对柴油燃料中的芳香族化合物进行测定。采用该方法有利于按照该测试方法中的要求对系统性能进行验证。该方法使用 FID, 能够分离燃料样品中的单环芳烃和多环芳烃。需要解决的一个重要挑战是高熔点化合物 (如萘) 对反压调节器 (BPR) 的污染。使用二元泵的通道 B 以己烷连续冲洗 BPR, 克服了这一挑战。

柴油和航空涡轮机燃料中包含非芳烃、单环芳烃和多环芳烃化合物。将芳烃含量尽可能降至最低, 有利于发动机获得最佳性能和最长使用寿命。由于芳烃含量会影响燃料的十六烷值, 并且不完全燃烧的芳烃将被排放到大气中。因此, 为保护环境和公共健康, 出台了各种法规。例如, 美国国家环境保护局 (USEPA) 和加州空气资源委员会 (CARB) 出台的相关法规以及炼油厂用于工艺和质量控制而自行制定的规定。

美国材料与试验协会 (ASTM) 发布了测试方法 D5186, 利用超临界流体色谱和火焰离子化检测器测定柴油燃料和航空涡轮机燃料中的芳烃和多环芳烃含量。与测试方法 D1319 和 D2425 相比, 该测试方法表现出明显优势:

- 应用范围更广
- 统计学精密度更高或者至少与其他方法持平
- 不受燃料染色的影响
- 成本低、耗时短

该方法适用于分析总芳烃含量为 1%–75% (质量 %) 和多环芳烃含量为 0.5%–50% (质量 %) 的样品¹⁻³。

实验部分

化学品和溶液

根据 ASTM 方法中的指南配制样品和标样。

FID 气体	氢气、空气和氮气 (用作尾吹气)
洗脱液	二氧化碳 (纯度 >99.995%, 根据 SFC 模块的规格要求, 采用不带汲取管的加压钢瓶)
用于反压调节器的冲洗溶液	己烷 (不用作改性剂! 通过二元泵的通道 B 泵送)
性能混标	根据 ASTM 方法第 7.6 节的规定, 由五种精细化学品 (Sigma Aldrich) 按照以下组成 (近似值) 制得定量混标: 75% (质量百分比) 的十六烷 ($n\text{-C}_{16}$) 20% (质量百分比) 的甲苯 (T) 3% (质量百分比) 的四氢化萘 (1,2,3,4-四氢化萘, THN) 2% (质量百分比) 的萘 (N)
用于线性检验的柴油样品	柴油样品, 芳烃含量 21.8% (根据制造商的分析结果)

仪器

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统, 采用如下配置:

- Agilent 1260 Infinity SFC 控制模块
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱
- CTC Analytics 液相色谱进样器 HTC PAL (宽 50 cm), 经改进配有 4 通阀 (内部 0.5 μL 定量环) 和 DLW
- SIM 火焰离子化检测器

完整解决方案可从 SIM Scientific Instruments Manufacturer GmbH (Oberhausen, Germany) 订购。

分析柱

YMC-PACK-SIL_06, 250 × 4.5 mm, S-6 nm, 5 μm (YMC America, Inc., Allentown, PA, USA) 或 Agilent ZORBAX RX-SIL, 4.6 × 250 mm, 5 μm (部件号 880975-901)

限流器

PEEKsil, 内径 100 μm, 20 cm (用于己烷冲洗流路)

软件

Agilent OpenLab CDS ChemStation 版, 修订版 C.01.05

SFC/FID 配置

色谱柱的出口连接至 FID 的上部 T 形管 (图 1)。为冲洗反压调节器 (BPR), 通过二元泵的通道 B 连续泵送己烷。为保持反压恒定和系统连续运行, 将限流毛细管集成到泵头 B 和 FID 下部的 T 形管之间 (图 1)。

液相色谱方法

Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵

溶剂 A	CO ₂ (预压缩), 99.995%
溶剂 B	己烷, 0.5%, 仅用于冲洗反压调节器 (BPR), 不用作洗脱液。根据样品的组成不同, 可能需用较高含量的己烷 (例如, 在软件中设置为 50% 洗脱液 B) 不时地冲洗 BPR
流速	1.8 mL/min

Agilent 1260 Infinity 柱温箱

柱温	25 °C
----	-------

液相色谱进样器 HTC PAL

进样量	0.5 μL	
进样周期	用溶剂 1 (己烷) 预清洗	1
	用样品预清洗	1
	填充速度 (μL/s)	10
	填充次数	3
	进样至	LC Vlv1
	进样速度 (μL/s)	5
	进样前延迟	500 ms
	进样后延迟	500 ms
	用溶剂 1 (己烷) 后清洗	2
	用溶剂 1 进行阀清洗	1
	(此处未列出的所有其他参数的值均为零)	

FID

温度	300 °C
气体	
氢气 (H ₂)	50 mL/min
空气	500 mL/min
尾吹气 (N ₂)	50 mL/min

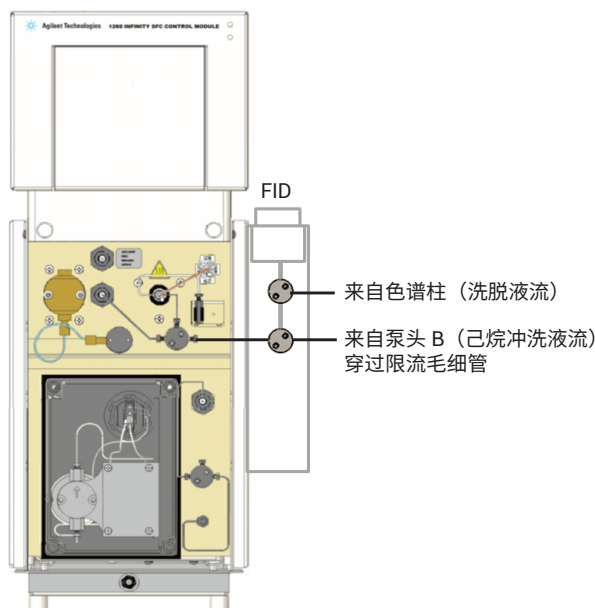


图 1. SFC/FID 模块与液相色谱仪的连接

结果与讨论

下文展示了对 ASTM 测试方法第 8.2 节中列出的系统性能要求的符合性。在色谱图中，通过积分获得性能混标中十六烷、甲苯、四氢化萘 (THN) 和萘 (N) 的峰面积。通过峰面积归一化，计算燃料中各种化合物的质量百分比含量。

FID 灵敏度

根据 ASTM 方法的规定，首先证明 FID 的灵敏度足以检出十六烷中 0.1% (质量 %) 的甲苯 (参见 ASTM 第 6.1 节)。图 2 表明 FID 的性能高于这一要求。

根据 ASTM 第 7.6 节的规定，利用性能混标 (PFM) 确定是否满足大多数方法合格标准，如分离度、保留时间重现性和检测器准确度。此外，利用该混标确定积分标记线，对复杂的燃料样品进行分组和积分。

分离度

图 3 显示了非芳烃 (十六烷) 与单环芳烃 (甲苯) 之间的分离度，用 R_{NM} 表示。ASTM D5186 规定 R_{NM} 值至少达到 4，而实际实验中测得的值为 10。另外，单环芳烃 (四氢化萘) 与多环芳烃 (萘) 之间的分离度 (用 R_{MD} 表示) 是规定值的两倍 (参见 ASTM 方法第 8.2.1 节)。

保留时间重现性

利用 PFM 确定保留时间重现性。十六烷和甲苯峰的保留时间重现性应优于 0.5% RSD。这点很重要，因为柴油样品的积分标记线由 PFM 的分析确定。图 4 显示了五幅色谱图的叠加图以及峰面积对应的柴油样品馏分 (AN = 非芳烃的峰面积，AM = 单环芳烃的峰面积，AP = 多环芳烃的峰面积)。

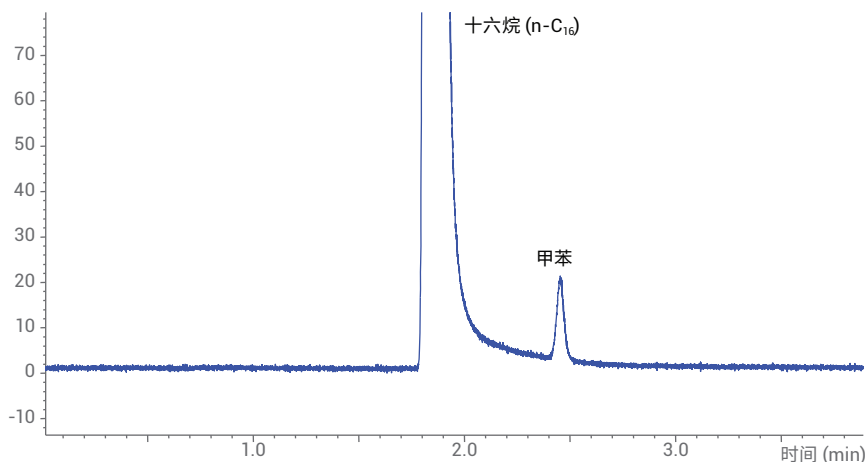


图 2. 包含 0.1% (质量百分比) 甲苯的十六烷 ($n-C_{16}$) 溶液的详细色谱图

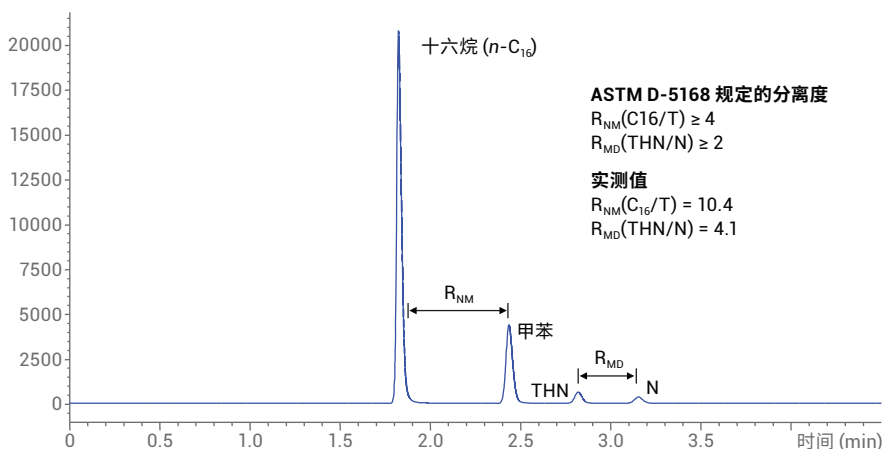


图 3. 使用性能混标测定 R_{NM} (十六烷与甲苯) 和 R_{MD} (THN 与 N) 的分离度值

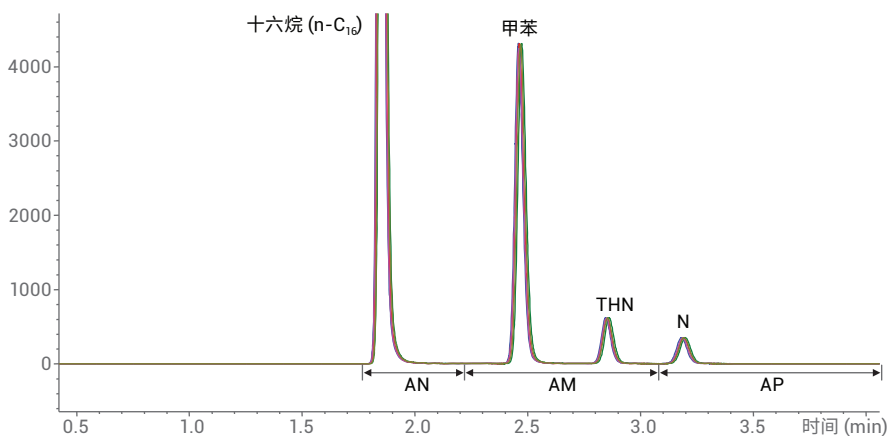


图 4. PFM 的五幅色谱图的叠加图以及峰面积对应的柴油样品馏分 (AN = 非芳烃的峰面积，AM = 单环芳烃的峰面积，AP = 多环芳烃的峰面积)

表 1 列出了计算得出的 PFM 中所有四种物质的相应值。保留时间 (RT) 的相对标准偏差 (RSD) 均低于 0.3%，因此所有的值均满足合格标准。

检测器准确度测试

为检验 FID 响应接近于理论单位碳响应的假设，计算性能混标中各种组分相对于十六烷的响应因子 (RRF)。如果假设 FID 响应接近于理论单位碳响应，则测得的各种组分的 RRF 必须处于理论值的 $\pm 10\%$ 范围内。结果表明，计算得出的 RRF 值均处于这些限值以内，如表 2 所示。

检测器线性检验

利用柴油样品进行此检验。根据 ASTM 第 9 节所述的步骤，对纯燃料和两种稀释样品（包含比例分别为 1:1 和 1:3 的燃料和 $n\text{-C}_{16}$ ）进行分析。测定两种稀释样品中芳烃的质量百分比，并与相应的预期芳烃含量结果进行比较，以验证检测器线性。图 5 显示了这三种柴油样品的叠加色谱图。根据 PFM 的色谱图（图 4）设定积分标记线，测定单环芳烃和多环芳烃的含量。两个峰面积之和为柴油样品中总芳烃的含量（用质量 % 表示）。

表 3 列出了柴油样品及其加权稀释样品中的芳烃含量。实测值与预期值之间的差异处于 ASTM 方法第 13.1.1 节中规定的重现性限值范围内，由此证明了 FID 的线性性能。

表 1. PFM 的保留时间重现性（10 次运行的平均值， $n\text{-C}_{16}$ = 十六烷，T = 甲苯，THN = 1,2,3,4-四氢化萘，N = 萘）

	$n\text{-C}_{16}$	T	THN	N
RT 平均值 (n = 10)	1.83	2.44	2.82	3.16
RT SD	0.004	0.007	0.008	0.009
RT RSD%	0.24	0.28	0.29	0.30

表 2. 测定性能混标的相对响应因子 (RRF)（10 次运行的平均值）

RRF 值	最小值	最大值	计算值*	与测试方法的符合性
RRF (甲苯)	0.9675	1.1825	1.0753	是
RRF (四氢化萘)	0.9630	1.1825	1.0420	是
RRF (萘)	0.9936	1.2144	1.0840	是

* 基于 10 次进样的平均值，所有值均处于给定的限值范围内

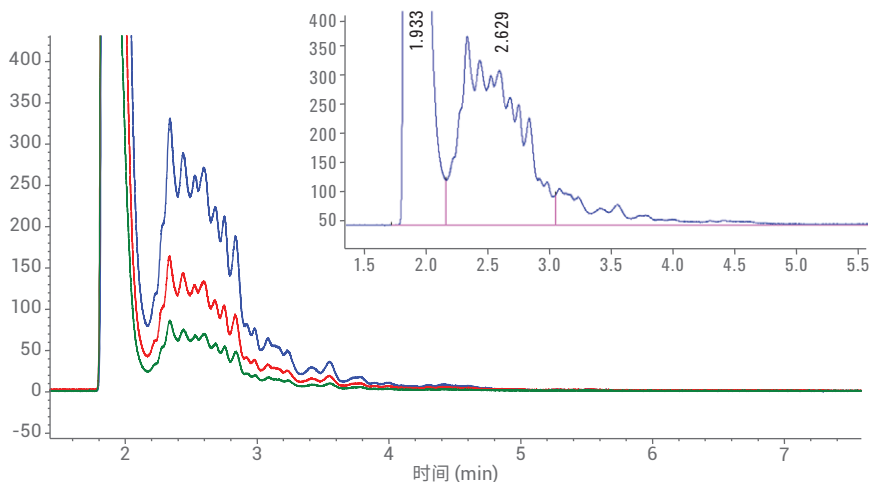


图 5. 柴油样品（蓝色）及其 1:1（红色）和 1:3（绿色）稀释样品的色谱图；右侧插图显示了对应于 PFM 的积分标记线的设置

表 3. 柴油燃料中的总芳烃含量

稀释	实测芳烃含量 (质量 %)*	预期芳烃含量 (质量 %)	芳烃含量偏差 (质量 %)
纯燃料	21.8		
1:1	11.1	10.8	0.3
1:3	5.9	5.7	0.2

* 基于 10 次进样的平均值

柴油样品的分析

为展示柴油样品测量的重现性，图 6 示出 10 幅色谱图的叠加图。如果脂肪酸甲酯 (FAME) 以生物柴油添加剂的形式存在，则需要更长的分析时间，以使 FAME 从色谱柱上洗脱下来。

结论

Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统与 SIM FID 联用符合 ASTM D5186 方法关于柴油燃料中芳烃含量测定的相关性能要求。具体而言，检测器准确度和线性测试表明，SIM FID 适合与 1260 Infinity 分析型 SFC 系统联用以测定芳香族物质。该系统可对反压调节器进行连续冲洗，以确保系统无故障、可靠地运行。

参考文献

1. American Society for Testing and Materials (ASTM): ASTM D5186-03 (2009), Standard Test Method for Determination of the Aromatic Content and Polynuclear Aromatic Content of Diesel Fuels and Aviation Turbine Fuels By Supercritical Fluid Chromatography, <http://www.astm.org/Standards/D5186.htm> (2015 年 4 月 1 日访问)

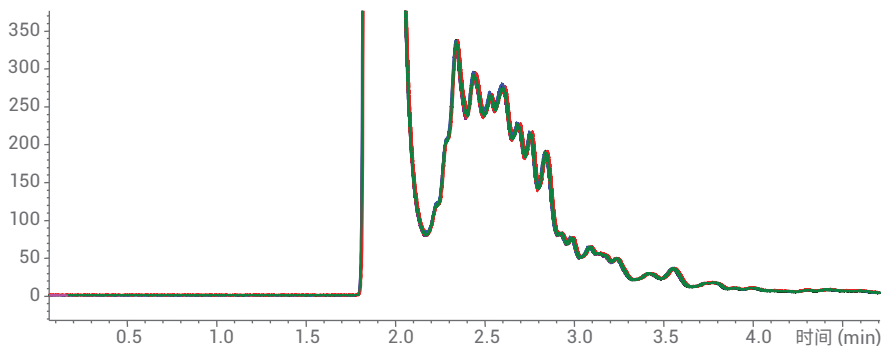


图 6. 10 幅柴油样品色谱图的叠加图

2. American Society for Testing and Materials (ASTM): ASTM D1319-14, Standard Test Method for Hydrocarbon Types in Liquid Petroleum Products by Fluorescent Indicator Adsorption <http://www.astm.org/Standards/D1319.htm> (2015 年 4 月 1 日访问)

3. American Society for Testing and Materials (ASTM): ASTM D2425-04 (2009), Standard Test Method for Hydrocarbon Types in Middle Distillates by Mass Spectrometry <http://www.astm.org/Standards/D2425.htm> (2015 年 4 月 1 日访问)

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2015
2015 年 5 月 1 日, 中国出版
5991-5682ZHCN



Agilent Technologies

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/sfc

www.agilent.com/chem/sfc-applications

查找当地的安捷伦客户服务中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278,

400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017年11月1日，中国出版

5991-8554ZHCN



Agilent Technologies