

Labsolutions MD 用于 11 种染料成分的检测方法建立

LC-425

摘要： 本文利用岛津方法开发系统，结合 Labsolutions MD 软件，开发 11 种染料成分的分析方法。使用 Labsolutions MD 软件，基于方法开发系统可实现不同流动相和色谱柱的自动切换、调整，降低液相条件开发的时间。本文使用了三根色谱柱、两种流动相体系和 45 种梯度条件进行方法优化，探索 11 种染料成分分离的最佳液相条件；展示了 Labsolutions MD 软件可基于 UV 光谱、MS 质谱等参数，使用峰追踪（i-PeakTracer）功能对色谱峰进行自动追踪识别的特点，以及“ANOVA”和“model Analysis”功能可评价得分探索最优分析方法的特点。

关键词： 方法开发系统 11 种染料成分 Labsolutions MD

技术特点：

- ❖ 基于 AQBd 理念，使用方法开发系统与联用，开发 11 种染料成分检测方法。
- ❖ 基于 Labsolution MD 软件自动峰识别、构建统计学模型，分析最优液相条件。

随着染料成分的数量不断增加，种类不断增多，相关检测的方法也有多变的特点。即使同色系的染料成分在前处理、检测方法上，往往都会出现较大的差别。高效液相色谱法、高效液相色谱串联质谱法都是检测染料成分的重要手段。使用液相相关手段时，在应对染料检测过程中成分种类多、测试样本差异大的情况，对于检测人员的方法开发、优化能力有较高的要求。因此，在实际检测过程中，检测人员是否具备快速建立、优化方法的能力也成为检测效果的重要影响因素。

岛津方法开发系统与 LCMS-2050 联用，结合 Labsolutions MD 软件，建立一套用于液相分析条件探索的自动化系统，将方法开发过程数据化、直观化，降低了方法开发难度。Method Development Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化，图形操作过程更为清晰和易于理解，让方法开发更轻松。本文选用了 11 种染料成分进行相关的方法开发，利用岛津方法开发系统与 LCMS-2050 快速建立相关检测方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津方法开发系统与液相质谱 LCMS-2050 联用，配置信息如下：

| | | | |
|--------|---|------|-----------|
| 系统控制器： | CBM-20A | 柱温箱： | CTO-20AC |
| 输液泵： | LC-30AD×2（含 LPGE） | 检测器： | SPD-M20A |
| 自动进样器： | SIL-30AC | 质谱仪： | LCMS-2050 |
| 切换阀： | FCV-14AH | | |
| 色谱工作站： | Labsolutions Ver.5.114；Labsolutions MD Ver.2.01 | | |

1.2 质谱分析条件

质谱条件

| | | | |
|---------|-------------|--------|---------------|
| 离子化模式： | ESI± | 雾化气流速： | 3.0 L/min |
| 接口电压： | 3.0/-2.0 kV | 干燥气流速： | 5.0 L/min |
| 加热气流速： | 5.0 L/min | 脱溶剂温度： | 400 °C |
| D L 温度： | 250 °C | 扫描模式： | SIM（具体参数见表 1） |

表 1 SIM 参数

| 序号 | 化合物 | +/- | m/z | 接口电压 (V) | Qarray(V) |
|----|---------|-----|--------|----------|-----------|
| 1 | 分散黄 9 | - | 273.06 | -2 | 3 |
| 2 | 溶剂黄 1 | + | 198.1 | 3 | Auto |
| 3 | 分散红 17 | + | 345.16 | 3 | 10 |
| 4 | 分散蓝 106 | + | 336.11 | 3 | Auto |
| 5 | 分散棕 1 | + | 433.02 | 3 | Auto |
| 6 | 分散橙 37 | + | 392.07 | 3 | Auto |
| 7 | 分散橙 1 | + | 319.12 | 3 | Auto |
| 8 | 分散黄 23 | - | 301.11 | -2 | 3 |
| 9 | 分散橙 149 | + | 459.21 | 3 | Auto |
| 10 | 分散红 151 | + | 532.16 | 3 | Auto |
| 11 | 溶剂红 23 | + | 353.14 | 3 | Auto |



图 1 Labsolutions MD 软件的特点

■ 样品制备

准确移取十一种染料成分标准溶液于容量瓶中，加入适量 50% 甲醇水溶液，配置成浓度为 1 μg/mL 的混合标准溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

■ 结果与讨论

3.1 筛选阶段

3.1.1 筛选阶段实验设计

由于流动相、色谱柱对色谱峰的分离起到关键性作用，因此在筛选阶段采用全因子实验对 2 种流动相和 3 种色谱柱进行了实验设计，如表 2 所示，筛选分类情况如表 3 所示：

表 2 筛选阶段实验设计表

| | |
|--------------|---|
| 流动相: | |
| 流动相 L1 | : A-0.1% 甲酸 +20 mM 甲酸铵水溶液; B-0.1% 甲酸甲醇溶液 |
| 流动相 L2 | : A-0.1% 甲酸 +20 mM 甲酸铵水溶液; B-0.1% 甲酸乙腈溶液 |
| 色谱柱: | |
| 色谱柱 S1 | : Shim-pack Velox C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 2.7 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-32009-03) |
| 色谱柱 S2 | : Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 3.0 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-21014-05) |
| 色谱柱 S3 | : Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3.0 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N:227-30722-05) |
| 分析条件: | |
| 流速 | : 0.55 mL/min |
| 柱温 | : 35°C |
| 进样量 | : 20 μL |
| 检测波长 | : 290 nm |
| 洗脱方式 | : 梯度洗脱, B 相起始浓度为 55%, 时间程序如下, B conc 55% (1 min) ~ 90% (5-10 min) ~ 100% (12-15 min) ~ 55% (15.1-18 min) |

表 3 通用梯度条件分类

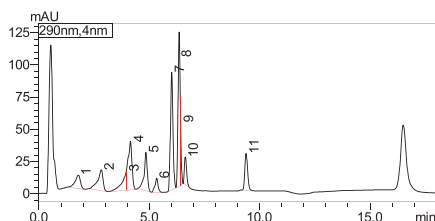
| | 色谱柱 S1 | 色谱柱 S2 | 色谱柱 S3 |
|--------|--------|--------|--------|
| 流动相 L1 | S1L1 | S2L1 | S3L1 |
| 流动相 L2 | S1L2 | S2L2 | S3L2 |

3.1.2 筛选阶段的综合评估

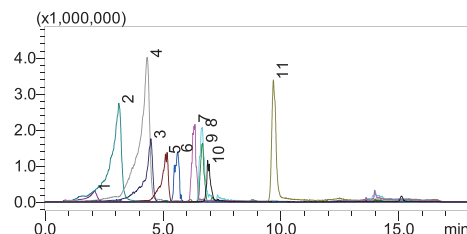
在筛选阶段采用全因子设计总共筛选 2 种流动相和 3 种色谱柱, 因此需对其进行评估, 来确定哪种分离条件的色谱图是最佳的。Labsolutions MD 软件可以自动计算出评估值*, 从而快速轻松地找到最佳色谱分离条件。

分离状态的综合评估值* = 检测到的峰数 P × [分离度 (R_{sn}) 的和]

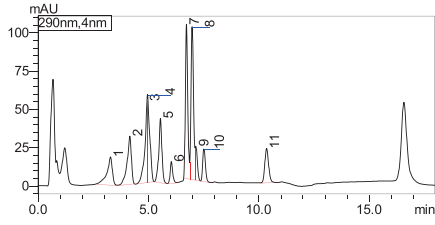
图 2 为分析相关色谱图, 图 3 为各色谱峰按照从最高到最低的顺序排列的综合评估值, 评估值越高, 在一定程度上色谱分离状态越好。分析结果显示, 当使用 Shim-pack GIST C18-AQ 色谱柱, 以 0.1% 甲酸 +20 mM 甲酸铵水溶液和 0.1% 甲酸甲醇溶液为流动相, 评估值最高, 分离效果最好, 具体实验参数如表 4 所示。



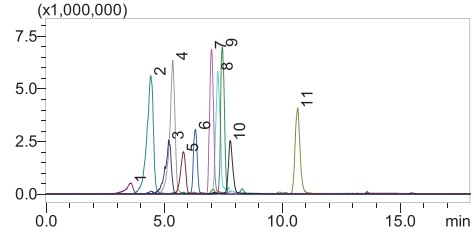
S1L1 分析条件 290 nm 色谱图



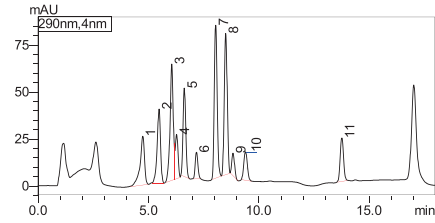
S1L1 分析条件 EIC 色谱图



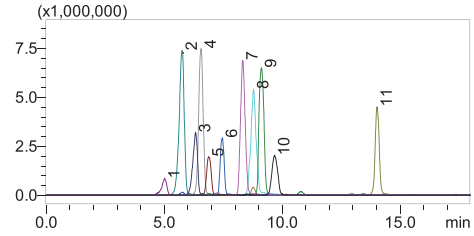
S2L1 分析条件 290 nm 色谱图



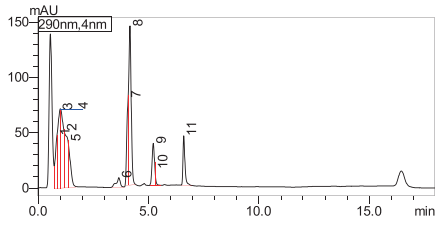
S2L1 分析条件 EIC 色谱图



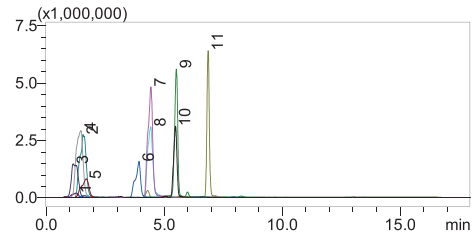
S3L1 分析条件 290 nm 色谱图



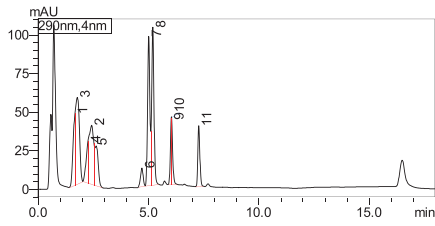
S3L1 分析条件 EIC 色谱图



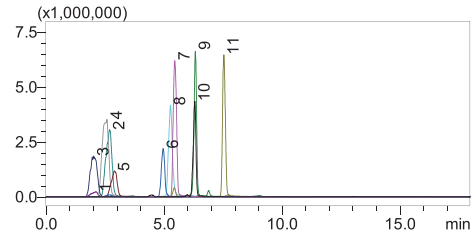
S1L2 分析条件 290 nm 色谱图



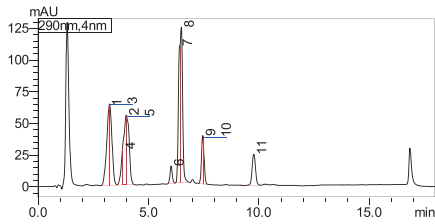
S1L2 分析条件 EIC 色谱图



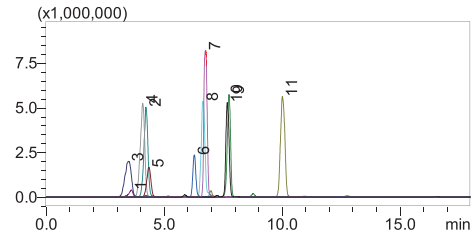
S2L2 分析条件 290 nm 色谱图



S2L2 分析条件 EIC 色谱图



S3L2 分析条件 290 nm 色谱图



S3L2 分析条件 EIC 色谱图

图 2 11 种染料成分在通用梯度条件 1 下的色谱图 (编号见表 2)

| Data File Name | Minimum Resolution | Peak Count | Evaluation Val |
|----------------|--------------------|------------|----------------|
| S3L1.lcd | 1.319 | 11 | 233.688 |
| S1L1.lcd | 2.165 | 11 | 167.489 |
| S2L1.lcd | 1.294 | 11 | 159.424 |
| S2L2.lcd | 0.931 | 11 | 26.511 |
| S3L2.lcd | 1.689 | 11 | 18.579 |
| S1L2.lcd | 0 | 11 | 0 |

图 3 筛选阶段流动相、色谱柱的综合评估值

表 4 筛选阶段最佳分析条件

| | |
|--------------|--|
| 流动相: | |
| A 相 | : 0.1% 甲酸 +20 mM 甲酸铵水溶液 |
| B 相 | : 0.1% 甲酸甲醇溶液 |
| 色 谱 柱 | : Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N:227-30722-05) |
| 分析条件: | |
| 流 速 | : 0.55 mL/min |
| 柱 温 | : 35°C |
| 进 样 量 | : 20 μL |
| 检测 波长 | : 290 nm |
| 洗 脱 方 式 | : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 55 %, 时间程序如下, B conc 55% (1 min) ~ 90% (5-10 min) ~ 100% (12-15 min) ~ 55% (15.1-18 min) |

3.2 峰追踪 (i-PeakTracer)

由于在色谱条件优化过程中, 方法优化的效果与流动相的流速、流动相初始比例和流动相梯度变化情况有关。因此, 基于初步筛选结果, 为进一步提高 Rt 为 5~10 min 色谱峰分离度, 对流动相的流速、流动相初始比例和流动相梯度变化进行优化。参考筛选阶段最佳分析条件对 Flow Rate、Initial Conc. 和 Duration 2 进行优化, 共进行 45 次优化分析, 变量参数具体情况如表 5 所示。

通过“i-PeakTracer”峰追踪功能, 以 Flow Rate=0.5 mL/min, Initial Conc.=50%, Duration 2=5 min 为参考数据, 对所得色谱图进行自动峰识别, 识别参数如图 4 所示, 识别参考数据结果见表 6, 部分色谱图识别结果见图 5 所示:

表 5 变量参数

| No. | 变量参数名称 | 初始参考值 | 变化值 | 变量梯度 | 变量范围 |
|-----|---------------|------------|-------------|------|--------------------------|
| 1 | Flow Rate | 0.5 mL/min | 0.05 mL/min | 1 | 0.45 mL/min ~0.55 mL/min |
| 2 | Initial Conc. | 65% | 7.5% | 2 | 50%~80% |
| 3 | Duration 2 | 5 min | 1 min | 1 | 4 min~6 min |

Identify by:

Use Filter

| Use | Parameter | Tolerance |
|-------------------------------------|-------------------|-----------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Peak# ± | 3 |
| <input type="checkbox"/> | Area (μV · sec) ± | 10000 |
| <input type="checkbox"/> | Height (μV) ± | 10000 |
| <input type="checkbox"/> | Area% ± | 10 |
| <input type="checkbox"/> | Height% ± | 10 |
| <input type="checkbox"/> | Ret. Time (min) ± | 10 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Similarity (UV) | 0.9 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Similarity (MS) | 90 |
| <input type="checkbox"/> | Base Peak m/z ± | 0.5 |

Similarity (UV) Calculation

Wavelength Range: - nm

Mode:

Mass-it

Do Not Identify Co-eluting Peaks

图 4 识别参数

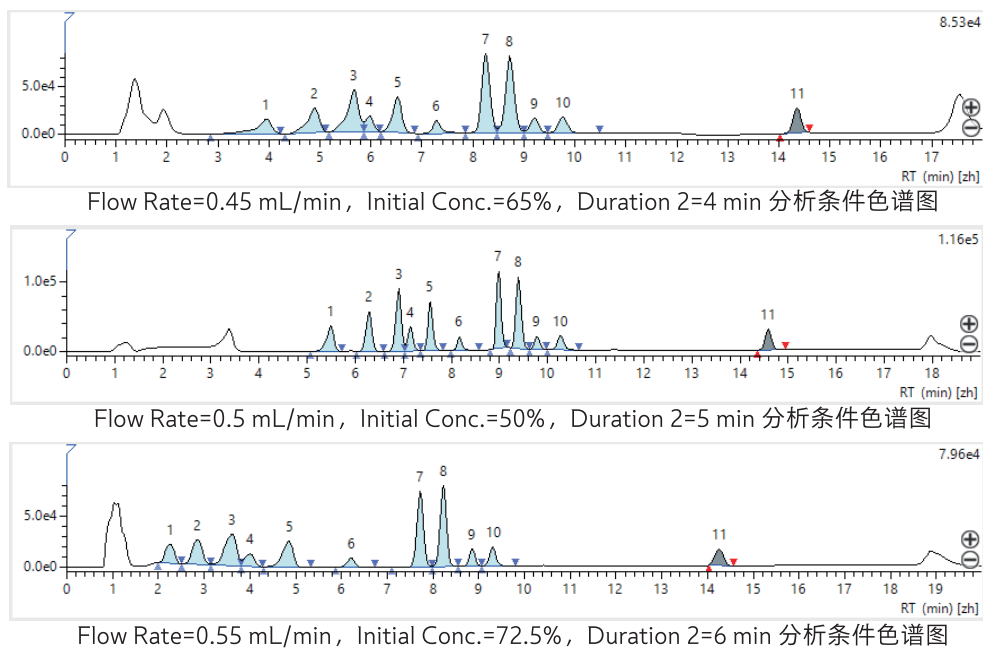


图 5 部分识别色谱图结果

表 6 参考数据识别结果

| No. | 化合物名称 | 保留时间 | m/z | No. | 化合物名称 | 保留时间 | m/z |
|-----|---------|------|--------|-----|---------|-------|--------|
| 1 | 分散黄 9 | 5.93 | 273.06 | 7 | 分散橙 1 | 9.54 | 319.12 |
| 2 | 溶剂黄 1 | 6.77 | 198.1 | 8 | 分散黄 23 | 10.00 | 301.11 |
| 3 | 分散红 17 | 7.36 | 345.16 | 9 | 分散橙 149 | 10.43 | 459.21 |
| 4 | 分散蓝 106 | 7.62 | 336.11 | 10 | 分散红 151 | 10.99 | 532.16 |
| 5 | 分散棕 1 | 8.00 | 433.02 | 11 | 溶剂红 23 | 15.41 | 353.14 |
| 6 | 分散橙 37 | 8.62 | 392.07 | | | | |

峰识别参数：UV 光谱、MS 质谱和洗脱顺序

3.3 ANOVA 方差分析

对基于液相分析条件二的 Flow Rate、Initial Conc. 和 Duration 2 三个变量因子的数据进行单因子和多因子方差分析。结果显示，Flow Rate、Duration 2 和 Initial Conc. 的 p.Value 值均小于 0.01，说明三个变量均对分离造成的较大影响，具体结果如图 6 所示：

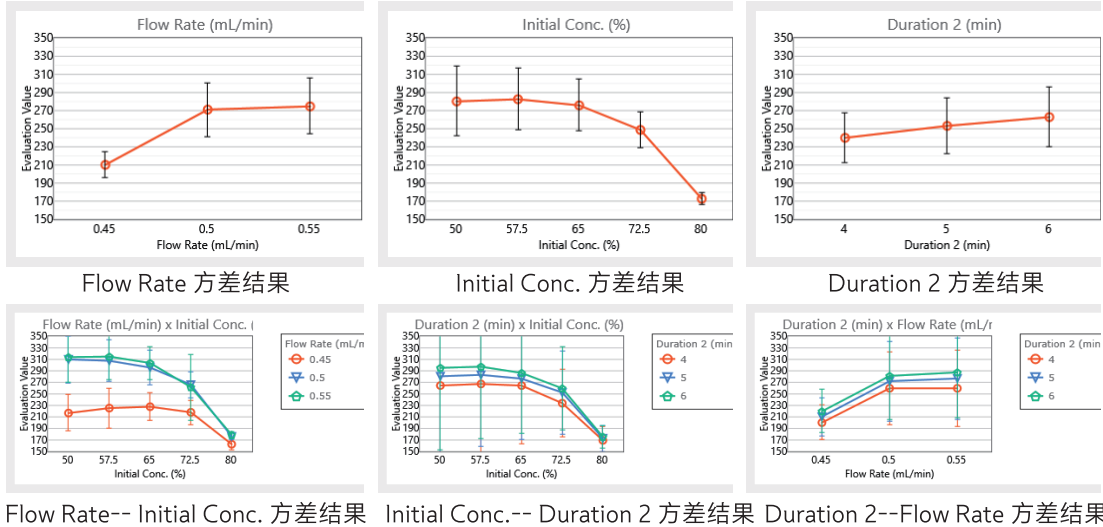


图 6 ANOVA 方差分析结果

3.4 model Analysis 模型解析

将 Flow Rate、Initial Conc. 和 Duration 2 三个变量因子下分析所得数据通过“model Analysis”解析功能进行处理，建立“Heat Map”图和“3D Contour Plot”图。根据分析结果自动选取最优因子，结果显示：Flow Rate =0.55 mL/min，Initial Conc.=55%，Duration 2=6.00 min 为最优因子。“Heat Map”和“3D Contour Plot”结果如图 7 所示：

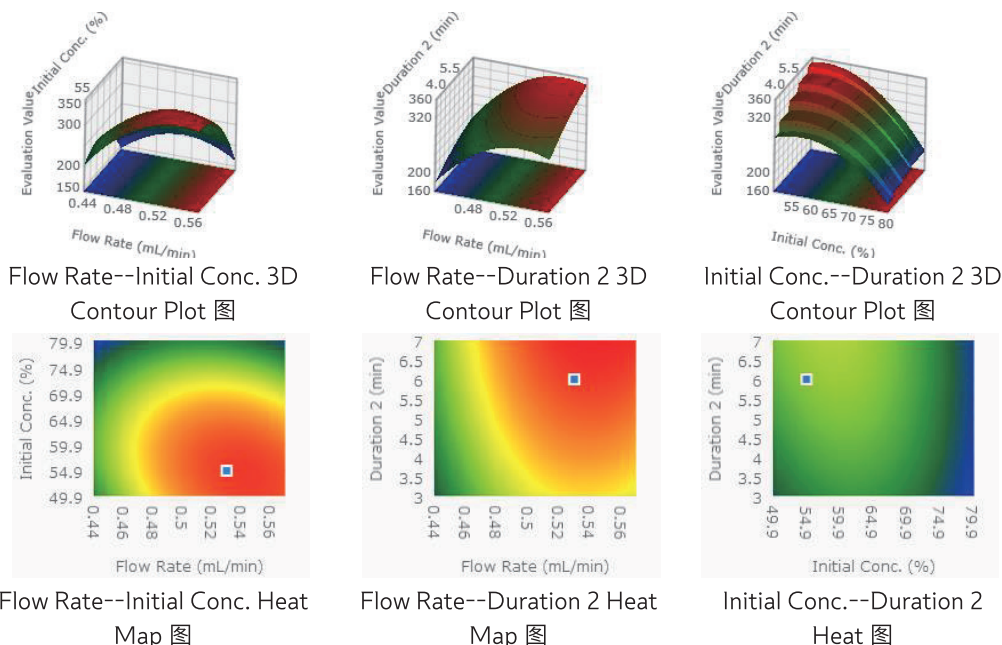


图 7 model Analysis 解析结果

3.5 最优液相分析条件

基于最优液相分析条件：色谱柱 Shim-pack GIST C18-AQ 和流动相 A-0.1% 甲酸水 +20 mM 甲酸铵溶液与 B-0.1% 甲酸甲醇，Flow Rate =0.55 mL/min，Initial Conc.=55%，Duration 2=6.00 min 建立方法分析，其结果显示，目标物检出峰个数、峰型及峰分离情况均良好。相关色谱图结果如图 8 所示，具体分析参数如表 7 所示：

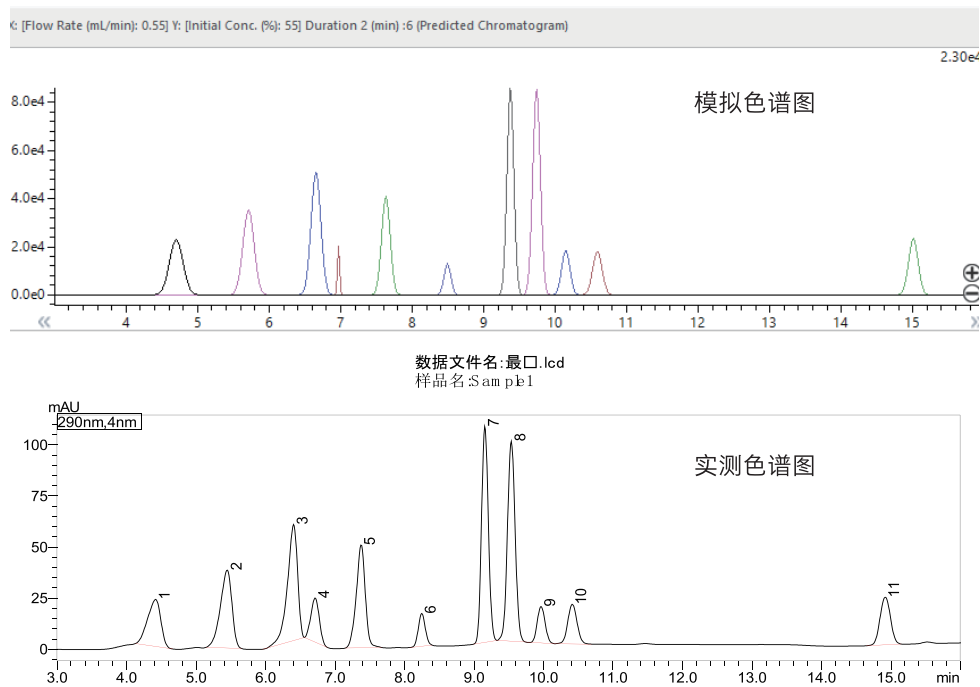


图 8 最优液相分析条件下 290 nm 色谱图（上侧为模拟色谱图，下侧为实测色谱图）

表 7 最优液相分析条件

| 液相条件 | |
|---------|--|
| 色 谱 柱 | Shim-pack GIST C18-AQ (100 mm x 3.0 mm I.D., 3.0 μm) |
| 流 动 相 | A-0.1% 甲酸 +20 mM 甲酸铵水溶液 B-0.1% 甲酸甲醇溶液 |
| 流 速 | 0.55 mL/min |
| 洗 脱 方 式 | 梯度洗脱，B 相起始浓度为 55%，梯度洗脱时间程序如表 8 所示 |

表 8 通用梯度洗脱时间程序二

| 时间 min | 单元 | 处理命令 | 值 |
|--------|-----|--------|-----|
| 1.00 | 泵 | B Conc | 55 |
| 6.00 | 泵 | B Conc | 90 |
| 11.00 | 泵 | B Conc | 90 |
| 13.00 | 泵 | B Conc | 100 |
| 16.00 | 泵 | B Conc | 100 |
| 16.10 | 泵 | B Conc | 55 |
| 19.00 | 控制器 | STOP | |

■ 结论

本方法利用岛津 Nexera LC-30A 方法开发系统与质谱仪 LCMS-2050 联用，结合 Labsolutions MD 软件，开发 11 种染料成分的液相分析方法。通过多色谱体系方法，对多变量因子探索最优分析条件，基于 ANOVA 和 model Analysis 解析功能进行分析，生成最优液相条件。基于分析结果，创建液相分析方法进行测试，其结果重现性良好。说明该系统与 Labsolutions MD 软件结合，可以快速开发 11 种染料成分液相分析方法。

岛津应用云

