

全谱二维液相系统开发及其性能验证

LCMS-QTOF-032

摘要：本文开发了一套新的二维液相系统，通过将亲水作用色谱（HILIC）与反相色谱（C8）组合，可以实现一次进样分离极性跨度大的目标物质：高极性物质利用 HILIC 柱分离，中低极性物质利用反相柱分离。两种分离模式通过一个高压十通阀及定量环连接，利用系统软件编辑时间梯度程序及十通阀切换；且一种模式分离的同时，另一种模式平衡色谱柱或进行柱头聚焦，节省分析时间。选择 LogP 范围介于 -8.79~13.87 的 60 种目标物（34 种氨基酸、2 种核苷酸、3 种糖、21 种脂质）对系统进行验证，60 种物质均获得了良好的保留与分离。两组保留时间接近的同分异构体在本系统中亦获得了良好的分离，未因阀切换影响分离度。60 种物质标准溶液线性良好，相关系数 $r^2 > 0.9908$ 。连续 6 针重复进样，保留时间 $RSD < 0.39\%$ ，峰面积 $RSD < 5.9\%$ 。高浓度样品分析后系统无残留。大鼠血浆样品分析结果表明，该系统峰容量显著大于普通单柱系统。另外，该系统内含一个 UHPLC 子系统，可用于常规分析，提高系统的适用性。

关键词：全谱二维液相 亲水作用色谱 反相色谱 四极杆 - 飞行时间质谱

液相色谱已广泛应用于各领域中复杂组分的分离与分析，这之中最普遍使用的是反相液相色谱，样品中组分依极性由强至弱依次被洗脱检测。然而强极性的物质在反相色谱柱上保留很弱甚至没有保留，直接在死时间流出，无法有效完成分离。解决这一问题的办法之一是使用亲水作用色谱（HILIC）柱代替反相色谱柱进行分离：HILIC 模式的洗脱顺序与反相色谱相反，强极性物质有更强的保留。然而，与反相柱相反，弱极性物质在 HILIC 柱上保留不佳，同样不能保证所有物质得到有效分离。简而言之，目前没有一种色谱分离模式能同时保证高极性物质与低极性物质的有效分离。

基于以上问题，本文开发了一套新的二维液相系统。第一维为亲水作用色谱，用于高极性物质的分离，第二维为反相色谱，用于低极性物质的分离。两个维度通过高压十通阀及定量环连接，通过阀的切换控制目标物进入相应维度进行分离。选取 39 种高极性物质（34 种氨基酸、2 种核苷酸、3 种糖）与 21 种低极性物质（脂质）对系统进行验证，结果表明，该系统能在 40 min 内完成所有物质的分离，线性与重复性良好，高浓度进样后无残留。大鼠血浆样品分析结果表明，该系统峰容量大于普通单柱系统。该系统可用于代谢组学、天然产物、环境、农兽残等目标物极性跨度较大领域的分析。

■ 实验部分

1.1 仪器

仪器装置由全谱二维液相系统与 Q-TOF 联用，其中全谱二维液相系统核心部件由四个色谱泵、两根色谱柱（第一维为 HILIC 亲水作用色谱柱，第二维为 C8 反相色谱柱）、一个定量环、一个高压十通阀构成，检测器为 LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪，流路图如图 1，具体配置如下述。

全谱二维液相的具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-30AD × 4

柱温箱：CTO-20AC

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

脱气机：DGU-20A_{5R}

自动进样器：SIL-30AC

检测器：SPD-M40

十通阀：FCV-36AH

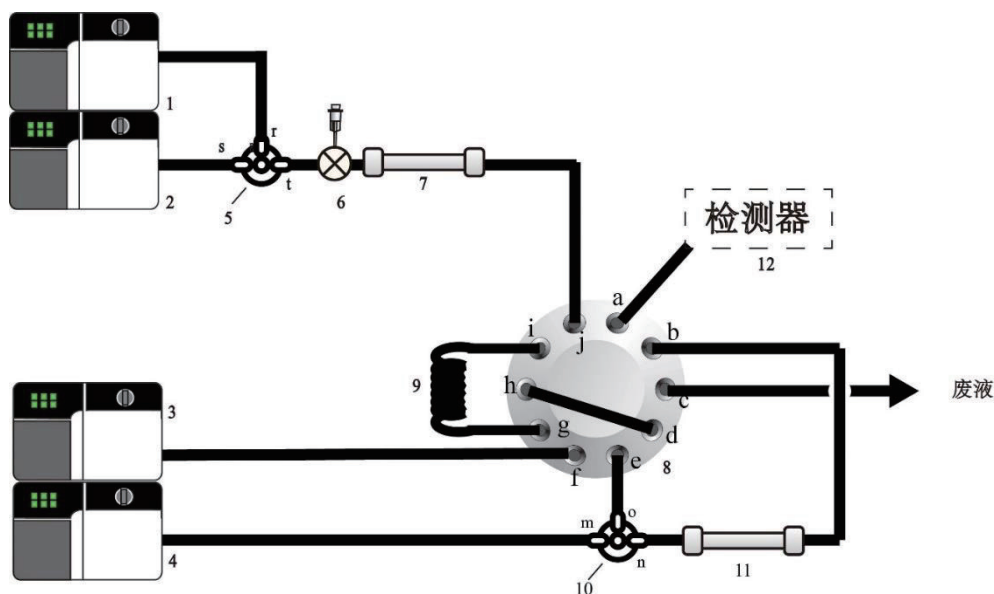


图 1 全谱二维液相系统示意图

(1: 1D 泵 A; 2: 1D 泵 B; 3: 2D 泵 A; 4: 2D 泵 B; 5: 三通混合器; 6: 自动进样器; 7: 亲水作用色谱柱; 8: 高压十通阀; 9: 500 µL 样品环; 10: 三通混合器; 11: 反相色谱柱; 12: 检测器)

1.2 分析条件

一次完整的进样分析分为三个阶段：

1) 极性分流：1D 色谱泵组成的第一维液相系统输送高比例乙腈流动相经自动进样器携带样品进入 HILIC 柱，此时样品中的中低极性物质在 HILIC 柱上不保留，直接洗脱进入样品环，剩余的高极性物质被 HILIC 柱保留，将完成后续的分流；2D 色谱泵输送高比例水相流动相，平衡 C18 柱（图 2）；

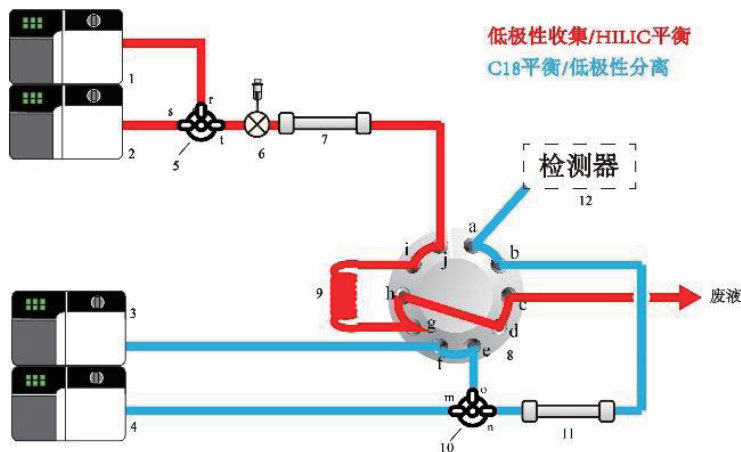


图 2 极性分流状态

2) 高极性物质分离与低极性物质柱头聚焦：待样品环中的中低极性物质收集完成，切换十通阀，1D 水相比例梯度提升，样品中剩余物质按极性从低到高依次从 HILIC 色谱柱中洗脱进入检测器；2D 泵 A 输送有机相流动相将储存于定量环中的中低极性样品推送进入三通混合器，并与 2D 泵 B 输送的大流速水相流动相在线混合稀释，进入并聚焦于 C8 柱头（图 3）。

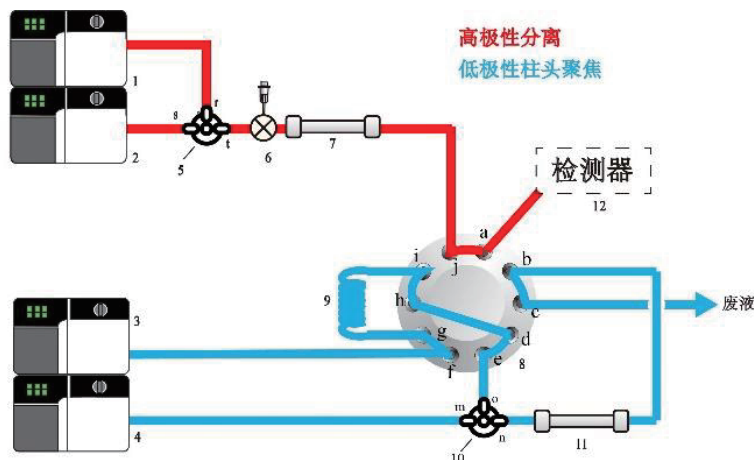


图 3 高级性物质分离与低级性物质柱头聚焦

3) HILIC 平衡及低级性物质分离：待保留于 HILIC 柱上的高级性物质分析完成，切换十通阀，1D 泵回到高比例 ACN，平衡色谱柱；2D 泵梯度提升有机相比例，将聚焦于 C8 柱头的中低级性物质按极性从高到低渐次洗脱进入检测器完成分析（图 4）。

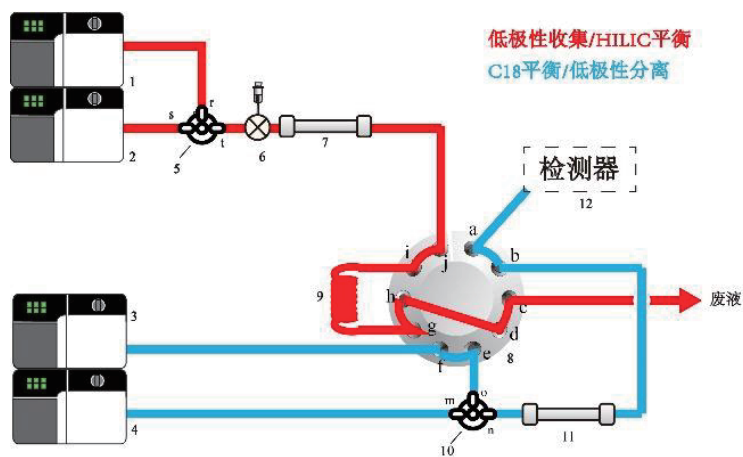


图 4 HILIC 平衡及低级性物质分离

另外，该系统内含一个 UHPLC 子系统（图 3 红色流路部分），可用于常规分析，提高系统的适用性。

液相色谱条件

色谱柱：

第一维

HILIC 色谱柱 150 mm×2.1 mm I.D., 3 μm

流动相：

第一维

A: 水 : 乙腈 (95:5) (0.1% 甲酸 +5 mM 乙酸铵) ;

B: 乙腈 : 水 (95:5) (0.1% 甲酸 +5 mM 乙酸铵)

进样体积: 2 μL

柱温: 45°C

质谱条件

离子源: ESI

接口电压: 4.00 kV (+), -3.00 kV (-)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

第二维

C8 色谱柱, 150 mm×2.1 mm I.D., 2.6 μm

第二维

A: 水;

B: 乙腈 : 异丙醇 (60:40) (5 mM 乙酸铵)

流速: 0.4 mL/min

洗脱方式: 梯度洗脱 (表 1)

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 300°C

干燥气: 氮气 10 L/min

扫描模式: MS Scan (m/z 50 - 1000)

加热气: 空气 10 L/min

ID: OFF

表 1 液相梯度时间程序

时间 (min)	单元	命令	值
0.00	泵	B.Conc	90
0.00	泵	B.Conc3	20
0.00	柱温箱	CTO.RVR	0
1.50	泵	B.Conc	90
2.00	柱温箱	CTO.RVR	1
18.00	泵	B.Conc3	20
20.00	泵	B.Conc	60
22.00	泵	B.Conc	60
22.00	柱温箱	CTO.RVR	0
22.10	泵	B.Conc	90
35.00	泵	B.Conc3	100
39.50	泵	B.Conc3	100
39.60	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc3	20
40.00	泵	B.Conc	90
40.00	控制器	Stop	

1.3 目标物信息

选取 LogP 范围介于 -8.79~13.87 的 39 种高极性物质 (34 种氨基酸、2 种核苷酸、3 种糖) 与 21 种低极性物质 (脂质) 作为目标物质 (表 2), 配制成混标考察系统。

表 2 目标物质基本信息

编号	物质	分子式	CAS#	类别	Log P
1	β -NAD	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$	53-84-9	核苷酸类	-8.79
2	Stachyose hydrate	$C_{24}H_{42}O_{21}$	54261-98-2	糖类	-6.82
3	uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine	$C_{17}H_{27}N_3O_{17}P_2$	528-04-1	核苷酸类	-5.18
4	D-Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	69-65-8	糖类	-4.67
5	D- (+)-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	50-99-7	糖类	-3.17
6	taurine	$C_2H_7NO_3S$	107-35-7	氨基酸	-2.46
7	carnosine	$C_9H_{14}N_4O_3$	305-84-0	氨基酸	-2.17
8	Hydroxyproline	$C_5H_9NO_3$	51-35-4	氨基酸	-1.84
9	Hydroxylysine	$C_6H_{14}N_2O_3$	13204-98-3	氨基酸	-1.79
10	Arginine	$C_6H_{14}N_4O_2$	7200-25-1	氨基酸	-1.79
11	creatinine	$C_4H_7N_3O$	60-27-5	氨基酸	-1.68
12	Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	585-21-7	氨基酸	-1.67

13	serine	C ₃ H ₇ NO ₃	302-84-1	氨基酸	-1.58
14	citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	372-75-8	氨基酸	-1.53
15	Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	2058-58-4	氨基酸	-1.51
16	Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	617-65-2	氨基酸	-1.43
17	Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	4998-57-6	氨基酸	-1.26
18	Anserine	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	584-85-0	氨基酸	-1.24
19	Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	80-68-2	氨基酸	-1.23
20	Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	70-54-2	氨基酸	-1.04
21	Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	616-07-9	氨基酸	-0.96
22	β-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	107-95-9	氨基酸	-0.86
23	sarcosine	C ₃ H ₇ NO ₂	107-97-1	氨基酸	-0.79
24	Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	302-72-7	氨基酸	-0.68
25	aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	617-45-8	氨基酸	-0.67
26	Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	2517/4/6	氨基酸	-0.57
27	α-Aminoadipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	542-32-5	氨基酸	-0.54
28	Cystathionine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	535-34-2	氨基酸	-0.13
29	pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	535-75-1	氨基酸	0
30	Homocysteine	C ₄ H ₉ NO ₂ S	454-29-5	氨基酸	0.22
31	Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	59-51-8	氨基酸	0.37
32	Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	556-03-6	氨基酸	0.38
33	Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	443-79-8	氨基酸	0.73
34	Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	328-39-2	氨基酸	0.73
35	PGF2α-EA	C ₂₂ H ₃₉ NO ₅	353787-70-9	脂肪酸类	0.9
36	Homocystine	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₄ S ₂	462-10-2	氨基酸	1.03
37	Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	1954/12/6	氨基酸	1.04
38	kynurenine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	343-65-7	氨基酸	1.09
39	Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	150-30-1	氨基酸	1.11
40	Cystine	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	923-32-0	氨基酸	1.23
41	8-iso-15-keto-PGF2α	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	191919-01-4	脂肪酸类	1.84
42	PGD2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	41598-07-6	脂肪酸类	2.02
43	PGF2α	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	551-11-1	脂肪酸类	2.14
44	PGD1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	17968-82-0	脂肪酸类	2.38
45	5-iPF2α-VI	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	180469-63-0	脂肪酸类	2.49
46	LPC(16:0)	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	17364-16-8	甘油磷脂类	2.84
47	Lyso-PAF C-16	C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P	52691-62-0	脂肪酰	3.23
48	PGJ2	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	60203-57-8	脂肪酸类	3.34
49	10S,17S-DiHDoHE	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	871826-47-0	脂肪酸类	3.81
50	13-HOTrE	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	87984-82-5	脂肪酸类	4.88
51	LTA4	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	72059-45-1	脂肪酸类	5.05
52	9-HODE	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	98524-19-7	脂肪酸类	5.32

53	AEA	C ₂₂ H ₃₇ NO ₂	94421-68-8	脂肪酸类	5.66
54	OEA	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	111-58-0	脂肪酸类	6.36
55	DHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	6217-54-5	脂肪酸类	6.78
56	AA	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	506-32-1	脂肪酸类	6.91
57	Oleamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	301-02-0	脂肪酸类	7.07
58	PC(16:0/16:0)	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	63-89-8	甘油磷脂类	10.88
59	PC(17:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	70897-27-7	甘油磷脂	11.94
60	ceramide(17:0)	C ₃₅ H ₆₉ NO ₃	67492-16-4	鞘脂类	13.87

■ 样品前处理

取 50 μL 健康大鼠血浆，加入 200 μL 甲醇沉淀蛋白，再加入 50 μL 异丙醇，涡旋 60 s，在 10°C 下以 14,000 rpm 的转速离心 10 min，取 250 μL 上清，真空冷冻干燥，50 μL 异丙醇：水（50:50）复溶，上机分析。

■ 结果与讨论

3.1 与普通液相系统的目标物有效分离数量比较

图 5 所示为目标物混标溶液在二维系统上分析的色谱图，通过组合 HILIC 柱与反相柱（图 6），所有物质均得到了很好的分离。作为对比，仅使用单柱的普通液相系统，无论是 HILIC、C8、C18 还是宽极性的 T3 柱，均有部分物质没有保留（图 7）。综合比较，二维液相系统能在 40 min 内完成对 60 种宽极性跨度物质的良好分离。

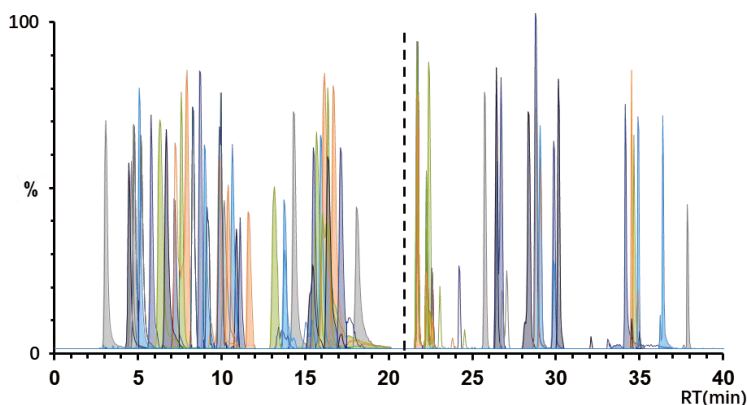


图 5 全谱二维液相系统下的 60 种目标物的 XIC 图

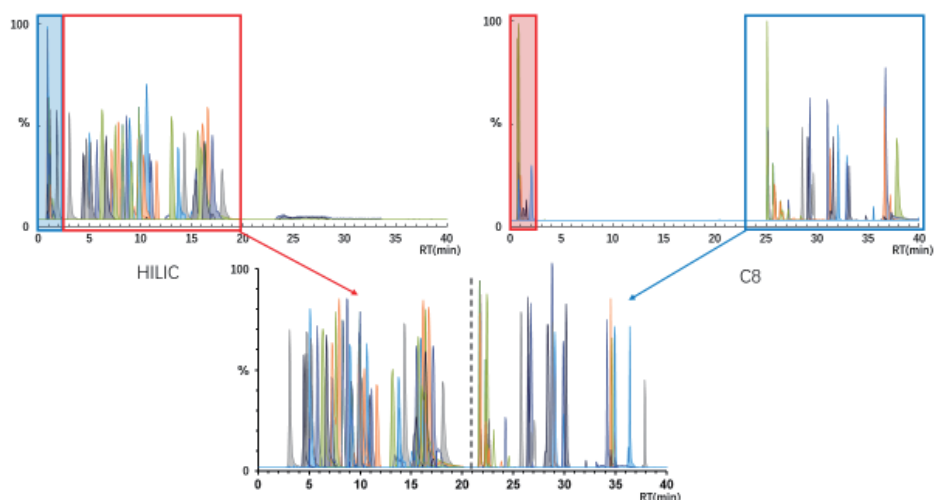


图 6 全谱二维液相系统组合亲水柱与反相柱的优势

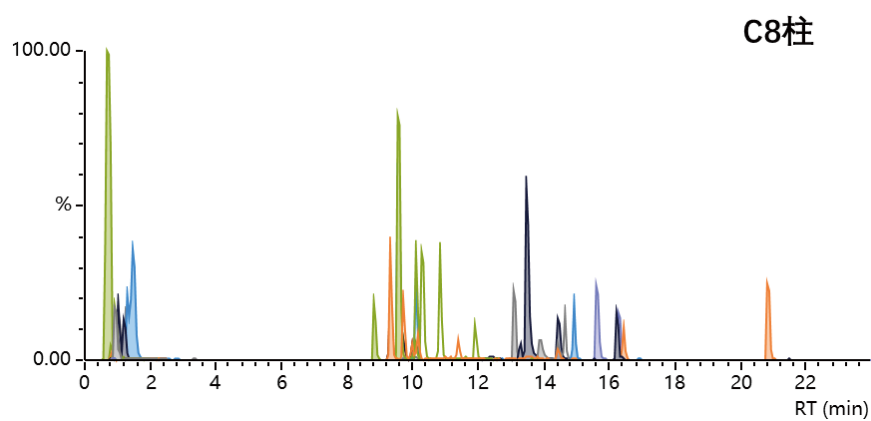
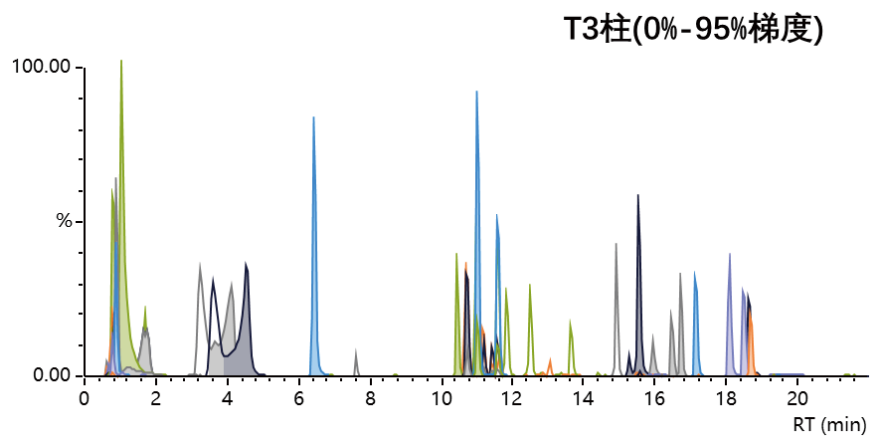
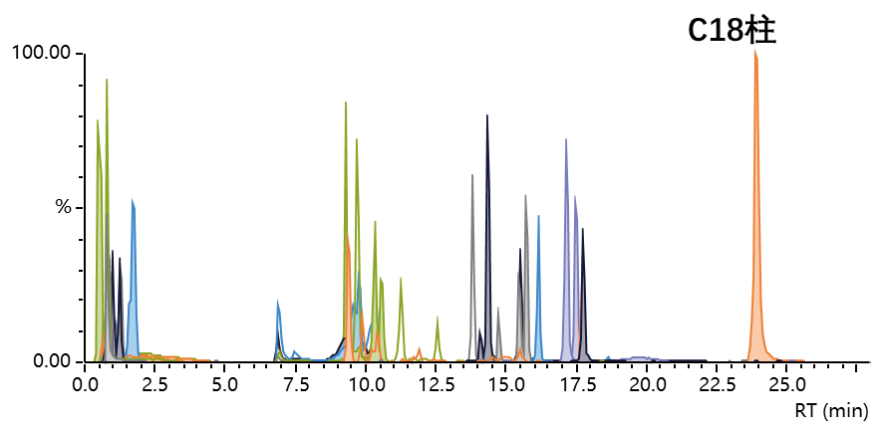
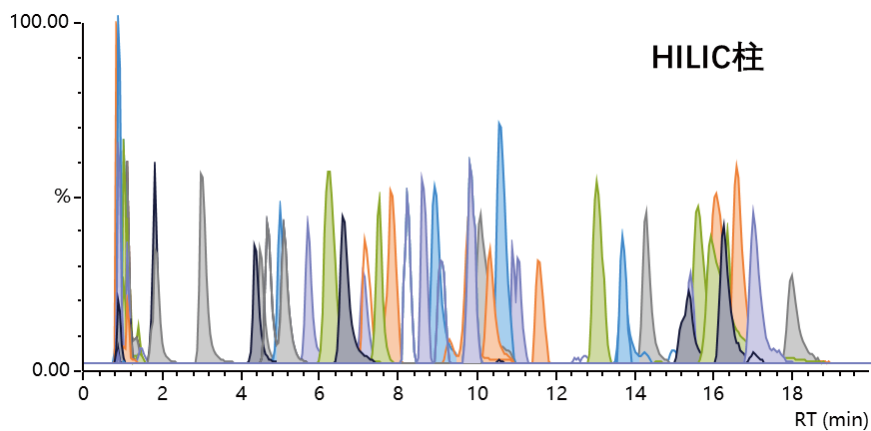


图 7 不同单柱系统对 60 种目标物分离的 XIC 图

3.2 与普通液相系统的分离效果比较

在全谱二维系统的第二维分离中，目标物从第一维经定量环导入到第二维，并经历了较长时间的柱头稀释聚焦，因此有必要对分离效果进行评价。在第二维分离的 21 种脂质中有两组保留时间较近的同分异构体，分别为 1) PGD2 与 8-iso-15-keto-PGF2 α ；2) 5-iPF2 α -VI、PGD1 与 PGF2 α ，在普通系统和全谱二维系统的分离图和分离度评价如图 8 和表 3：总体而言，两组化合物在普通反相系统和全谱二维系统上均满足分离度 >1.5 的要求，且分离效果几乎不变。以上两例表明，低极性物质在二维液相系统中虽然经历了定量环转移、柱头聚焦，但并没有因此而牺牲分离度。

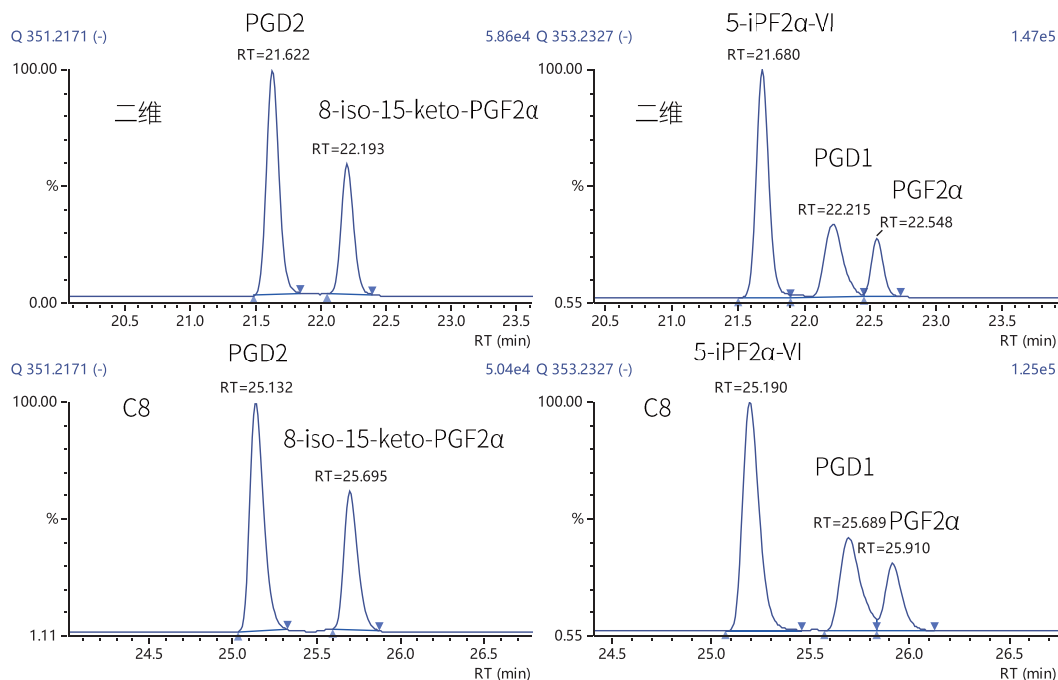


图 8 两组同分异构体在二维液相系统（上）和普通反相液相（C8）的分离效果比较

表 3 两组同分异构体在二维液相系统和普通 C8 反相液相的分离效果比较

物质	保留时间 (min)		分离度 (USP)	
	二维液相系统	反相液相	二维液相系统	反相液相
PGD2	21.622	25.132	—	—
8-iso-15-keto-PGF2 α	22.193	25.695	3.49	4.25
5-iPF2 α -VI	21.680	25.190	—	—
PGD1	22.215	25.689	2.65	3.269
PGF2 α	22.548	25.910	1.74	1.417

3.3 系统验证

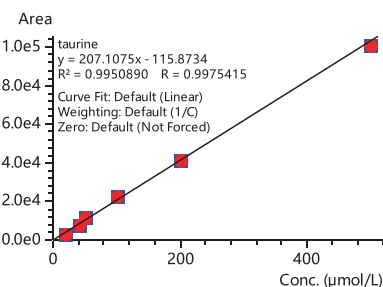
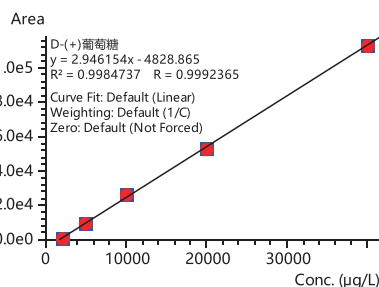
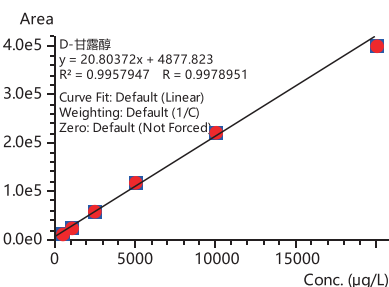
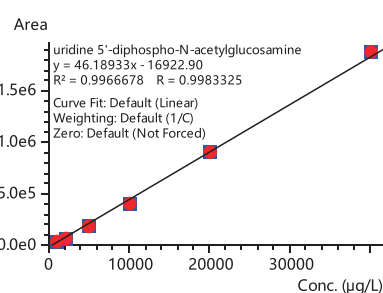
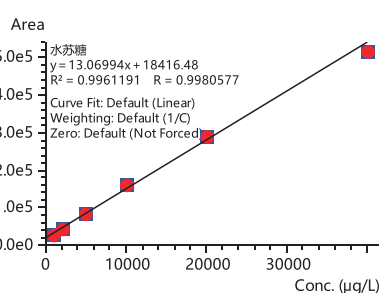
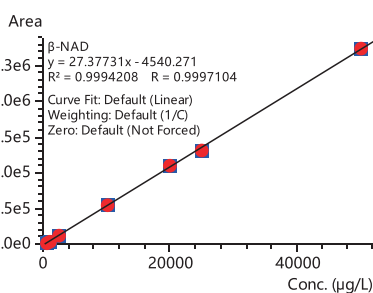
3.3.1 线性

60 种物质标准曲线线性良好 ($r^2 > 0.9908$)，准确度 80~119.3%。各物质详细标准曲线信息如表 4 所示，曲线如图 9 所示。

表 4 目标物质标准曲线信息

编号	物质	线性方程	线性范围	相关系数 r^2	准确度 (%)
1	β -NAD	$Y = 27.3773X - 4540.27$	500-50000 $\mu\text{g/L}$	0.9994	93.5-108.3
2	Stachyose hydrate	$Y = 13.0699X + 18416.5$	1000-40000 $\mu\text{g/L}$	0.9961	88.6-109.4
3	uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine	$Y = 46.1893X - 16922.9$	1000-40000 $\mu\text{g/L}$	0.9967	88.6-109.0
4	D-Mannitol	$Y = 20.8037X + 4877.82$	500-20000 $\mu\text{g/L}$	0.9958	86.1-109.0
5	D- (+)-Glucose	$Y = 2.94615X - 4828.86$	2000-40000 $\mu\text{g/L}$	0.9985	96.3-107.6
6	taurine	$Y = 207.107X - 115.873$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9951	82.5-113.1
7	carnosine	$Y = 8710.80X + 626436$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9974	92.3-108.4
8	Hydroxyproline	$Y = 3938.83X - 3963.04$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9945	91.0-105.4
9	Hydroxylysine	$Y = 2016.78X + 23517.2$	10-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9949	82.0-111.2
10	Arginine	$Y = 5147.10X + 647805$	0.1-10 $\mu\text{mol/L}$	0.9988	92.0-107.3
11	creatinine	$Y = 29746.4X - 1577.74$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9934	80.3-114.4
12	Glutamine	$Y = 19489.2X + 6911.04$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9908	83.7-113.9
13	serine	$Y = 256.858X - 440.187$	2-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9977	96.1-109.6
14	citrulline	$Y = 816.776X - 99.0084$	1-20 $\mu\text{mol/L}$	0.9934	81.5-110.8
15	Asparagine	$Y = 7256.97X - 4481.96$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9967	94.7-104.3
16	Glutamic acid	$Y = 222.404X + 6799.61$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9967	80.4-111.6
17	Histidine	$Y = 17722.8X + 14027.3$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9942	83.4-107.7
18	Anserine	$Y = 63652.8X + 61248.1$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9927	80.1-110.8
19	Threonine	$Y = 10106.2X - 2292.85$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.999	95.5-104.5
20	Lysine	$Y = 973.668X + 25224.2$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9981	92.8-108.2
21	Ornithine	$Y = 633.757X + 38891.2$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9964	82.0-114.2
22	β -Alanine	$Y = 206.761X - 2047.21$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9968	82.8-110.7
23	sarcosine	$Y = 136.861X + 3557.43$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.997	84.4-111.0
24	Alanine	$Y = 328.451X - 1459.50$	5-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9947	88.6-112.4
25	aspartic acid	$Y = 284.087X - 2314.85$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9925	83.2-115.0
26	Proline	$Y = 11690.3X - 4538.63$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9995	94.8-104.6
27	α -Aminoadipic acid	$Y = 3523.68X - 1480.10$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9985	88.4-112.0
28	Cystathionine	$Y = 2641.43X + 3220.09$	5-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9944	80.0-118.5
29	pipecolic acid	$Y = 89671.1X - 13505.9$	0.4-20 $\mu\text{mol/L}$	0.9968	87.2-108.9
30	Homocysteine	$Y = 574.468X - 4944.69$	10-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9914	85.0-117.3
31	Methionine	$Y = 8898.61X - 7423.06$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9951	89.6-114.5
32	Tyrosine	$Y = 4655.75X + 1078.29$	5-100 $\mu\text{mol/L}$	0.9979	91.7-104.8
33	Isoleucine	$Y = 5754.45X - 3406.97$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9997	92.4-104.8
34	Leucine	$Y = 8573.12X - 7335.90$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9967	90.2-111.9
35	PGF2 α -EA	$Y = 95.2196X - 548.681$	27.6-2761 $\mu\text{g/L}$	0.9998	93.5-106.4
36	Homocystine	$Y = 4856.97X - 16445.1$	5-200 $\mu\text{mol/L}$	0.9924	83.4-111.7
37	Tryptophan	$Y = 21175.9X - 14947.4$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9957	89.2-118.7

38	kynurenine	$Y = 24445.8X - 19599.4$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9954	87.7-119.3
39	Phenylalanine	$Y = 23357.4X - 16107.4$	1-40 $\mu\text{mol/L}$	0.9933	88.4-118.4
40	Cystine	$Y = 2617.43X - 38589.2$	20-500 $\mu\text{mol/L}$	0.9951	81.9-112.2
41	8-iso-15-keto-PGF2 α	$Y = 326.376X - 292.982$	13.01-1301 $\mu\text{g/L}$	0.9999	93.1-103.3
42	PGD2	$Y = 325.530X + 856.632$	23.4-2342 $\mu\text{g/L}$	0.9993	93.1-103.3
43	PGF2 α	$Y = 667.922X - 1874.48$	7.3-730 $\mu\text{g/L}$	0.9992	95.6-107.9
44	PGD1	$Y = 1881.10X + 474.898$	4-405 $\mu\text{g/L}$	0.9999	94.8-105.3
45	5-iPF2 α -VI	$Y = 4212.84X + 4195.03$	4-405 $\mu\text{g/L}$	0.9986	86.9-105.5
46	LPC(16:0)	$Y = 507.548X - 2969.19$	15-611 $\mu\text{g/L}$	0.9999	95.9-101.8
47	Lyso-PAF C-16	$Y = 1160.35X - 3546.84$	12-465 $\mu\text{g/L}$	0.9999	97.8-102.1
48	PGJ2	$Y = 394.399X + 1082.77$	8-813 $\mu\text{g/L}$	0.9938	81.0-114.1
49	10S,17S-DiHDoHE	$Y = 62.9644X - 3562.46$	53-1059 $\mu\text{g/L}$	0.9988	94.2-108.8
50	13-HOTrE	$Y = 470.932X - 1063.12$	7-268 $\mu\text{g/L}$	0.9915	87.4-103.7
51	LTA4	$Y = 191.633X + 488.279$	12-605 $\mu\text{g/L}$	0.9938	88.4-112.7
52	9-HODE	$Y = 198.250X - 1070.38$	22.5-900 $\mu\text{g/L}$	0.9993	95.9-105.5
53	AEA	$Y = 495.954X + 2652.58$	9-899 $\mu\text{g/L}$	0.9949	85.6-108.3
54	OEA	$Y = 463.389X - 1668.86$	21-2137 $\mu\text{g/L}$	0.999	85.7-114.8
55	DHA	$Y = 455.245X + 4470.52$	125.6-6281 $\mu\text{g/L}$	0.9977	93.5-106.1
56	AA	$Y = 651.026X - 3998.52$	35-3477 $\mu\text{g/L}$	0.999	92.8-110.2
57	Oleamide	$Y = 340.736X - 223.771$	2.5-100 $\mu\text{g/L}$	0.9985	85.4-108.6
58	PC(16:0/16:0)	$Y = 361.602X + 861.185$	10-418 $\mu\text{g/L}$	0.9998	93.8-104.7
59	PC(17:0)	$Y = 650.588X - 3731.03$	13-520 $\mu\text{g/L}$	0.9996	93.2-102.9
60	ceramide(17:0)	$Y = 127.295X - 1046.25$	66-2663 $\mu\text{g/L}$	0.9993	89.6-105.0



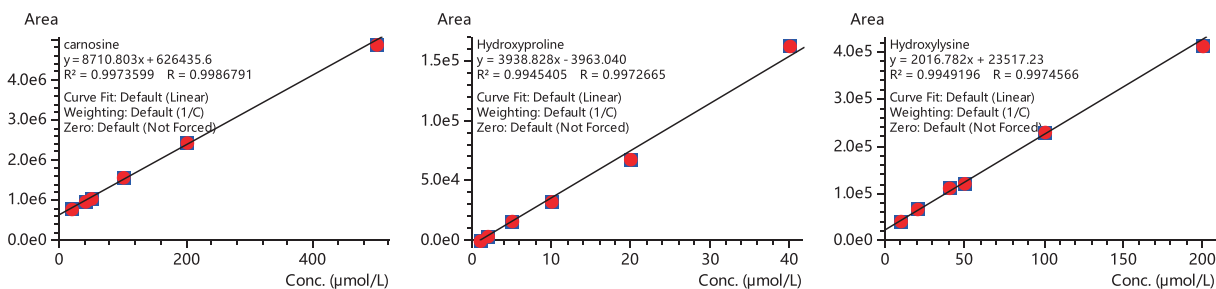


图 9 部分目标物质标准曲线

3.3.2 重复性

取各物质线性范围最低点、中间浓度点及最高浓度点连续进样 6 针，峰面积 RSD < 5.9%，保留时间 RSD < 0.39% (表 5)。

表 5 保留时间与峰面积重复性 (n=6)

编号	物质	保留时间 RSD (%)			峰面积 RSD (%)		
		low	medium	high	low	medium	high
1	β-NAD	0.06	0.04	0.11	1.7	3.4	3.5
2	Stachyose hydrate	0.09	0.09	0.11	1.2	2.5	3.4
3	uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine	0.09	0.08	0.1	2.2	0.8	2.6
4	D-Mannitol	0.22	0.19	0.15	2.0	1.9	5.1
5	D- (+)-Glucose	0.21	0.15	0.15	5.2	3.6	3.2
6	taurine	0.25	0.18	0.21	5.9	5.1	4.0
7	carnosine	0.05	0.04	0.09	1.3	1.6	2.8
8	Hydroxyproline	0.21	0.13	0.14	2.6	2.6	3.7
9	Hydroxylysine	0.09	0.04	0.07	4.3	3.4	5.3
10	Arginine	0.06	0.05	0.06	0.7	2.1	1.5
11	creatinine	0.34	0.19	0.18	3.4	3.0	1.2
12	Glutamine	0.14	0.08	0.15	2.5	5.3	3.0
13	serine	0.15	0.18	0.24	4.9	1.0	3.6
14	citrulline	0.19	0.09	0.3	4.6	3.8	2.7
15	Asparagine	0.17	0.1	0.15	3.9	4.8	3.4
16	Glutamic acid	0.09	0.06	0.16	2.0	2.0	4.0
17	Histidine	0.05	0.03	0.12	3.6	3.8	2.7
18	Anserine	0.08	0.04	0.09	1.7	0.8	1.4
19	Threonine	0.18	0.08	0.16	3.7	5.1	4.6
20	Lysine	0.09	0.08	0.11	1.4	3.7	1.5
21	Ornithine	0.11	0.06	0.11	1.4	2.5	4.8
22	β-Alanine	0.29	0.24	0.3	4.6	4.0	5.2
23	sarcosine	0.37	0.26	0.09	2.1	5.6	2.6
24	Alanine	0.33	0.2	0.3	2.8	5.5	3.9
25	aspartic acid	0.22	0.29	0.14	3.4	3.7	2.4

26	Proline	0.26	0.17	0.17	4.7	2.6	2.3
27	α -Amino adipic acid	0.11	0.07	0.12	5.3	5.7	5.4
28	Cystathionine	0.07	0.04	0.14	1.9	4.1	1.5
29	pipecolic acid	0.25	0.17	0.18	1.7	3.7	2.6
30	Homocysteine	0.1	0.12	0.09	4.9	3.0	3.6
31	Methionine	0.33	0.21	0.2	2.9	2.2	5.1
32	Tyrosine	0.27	0.17	0.19	4.1	4.2	2.5
33	Isoleucine	0.34	0.2	0.26	4.1	4.1	3.5
34	Leucine	0.34	0.22	0.22	3.2	3.9	4.1
35	PGF2 α -EA	0.11	0.1	0.03	2.1	0.9	4.4
36	Homocystine	0.09	0.05	0.12	3.0	2.4	3.2
37	Tryptophan	0.33	0.21	0.28	2.7	5.4	5.6
38	kynurenine	0.39	0.22	0.27	3.1	5.1	4.5
39	Phenylalanine	0.37	0.23	0.27	2.6	4.6	4.3
40	Cystine	0.09	0.07	0.1	5.4	2.3	2.6
41	8-iso-15-keto-PGF2 α	0.13	0.12	0.05	2.6	0.6	2.7
42	PGD2	0.13	0.14	0.05	2.4	0.6	1.6
43	PGF2 α	0.12	0.11	0.05	1.4	1.1	2.2
44	PGD1	0.13	0.12	0.05	2.2	0.6	2.3
45	5-iPF2 α -VI	0.13	0.13	0.05	2.2	0.4	1.6
46	LPC(16:0)	0.1	0.07	0.01	4.0	1.1	0.8
47	Lyso-PAF C-16	0.04	0.06	0.01	3.8	1.3	0.7
48	PGJ2	0.07	0.06	0.04	1.8	2.2	4.0
49	10S,17S-DiHDoHE	0.11	0.05	0.06	5.5	0.8	1.9
50	13-HOTrE	0.11	0.06	0.05	3.8	0.5	1.0
51	LTA4	0.07	0.06	0.04	5.3	3.2	2.4
52	9-HODE	0.1	0.04	0.06	2.5	0.7	1.3
53	AEA	0.04	0.05	0.02	3.2	1.2	0.7
54	OEA	0.02	0.04	0.01	3.5	0.7	1.1
55	DHA	0.06	0.04	0.07	1.3	2.2	0.6
56	AA	0.05	0.03	0.07	1.9	1.2	0.8
57	Oleamide	0.04	0.05	0.02	4.2	1.7	1.9
58	PC(16:0/16:0)	0.01	0.02	0.01	2.3	0.6	1.9
59	PC(17:0)	0.01	0.02	0.01	4.4	1.0	4.4
60	ceramide(17:0)	0.09	0.08	0.1	2.2	0.8	2.6

3.3.3 残留考察

进样线性高点浓度样品后进样空白溶剂（水 / 甲醇 = 50/50, v/v）分析，所有目标物质均未出峰。

3.4 实际样品分析

3.4.1 基质效应

以基质后加标的方式考察基质效应，除4种氨基酸外，其余物质在二维系统上的基质效应均在60-140%之间，且二维系统与普通液相系统基质效应差别不大（图10）。

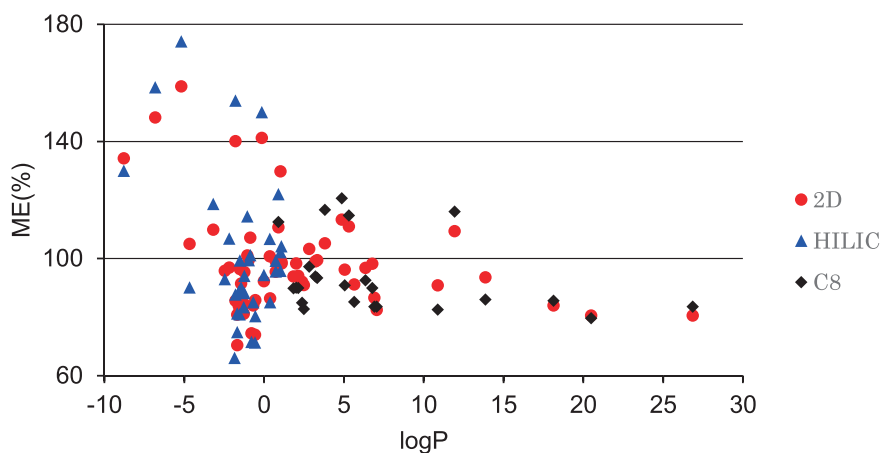


图10 目标物质在二维系统和普通液相上的基质效应

3.4.2 峰容量对比

大鼠血浆经前述方法前处理后上机分析，比较同一样品在全谱二维液相系统、C18柱、HILIC柱和T3柱上能分离得到的总色谱峰数。所得扫描数据经 Insight Explore 自动提取峰表，筛选条件：质谱强度 500，响应 Medium，同时排除死时间（HILIC < 2 min，C18、T3 < 24 min）流出的色谱峰，所得结果如表6及图11、图12所示。无论是正模式还是负模式，全谱二维液相系统的峰容量均大于 HILIC、C8、C18 及 T3 单色谱柱系统。

表6 不同液相系统分析大鼠血浆样品所得色谱峰数

	二维液相	HILIC	C8	C18	T3
正模式	7208	956	5671	4908	4530
负模式	4314	794	3307	3014	3444
总计	11522	1750	8978	7922	7974

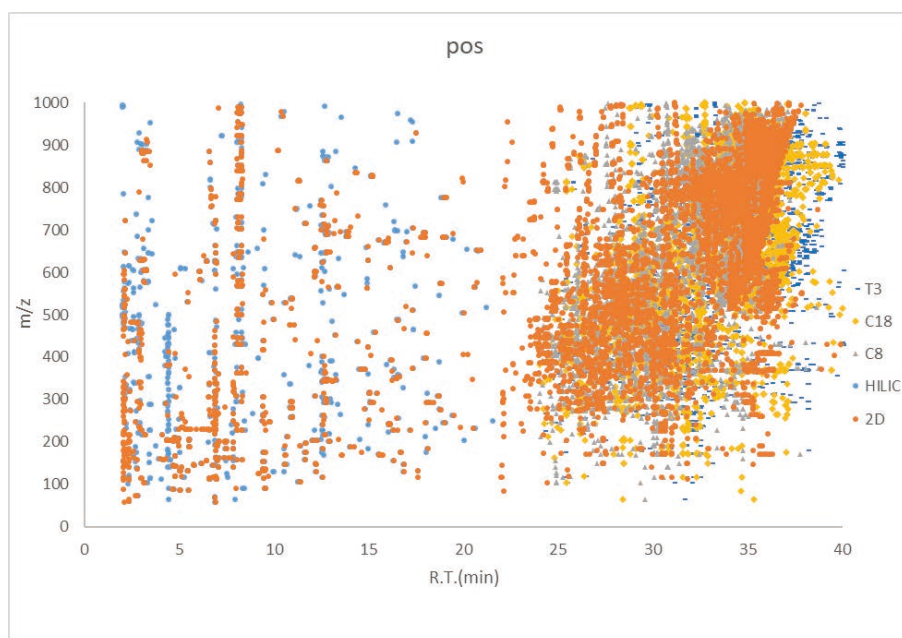


图11 正模式下不同系统分析大鼠血浆样品色谱峰二维图

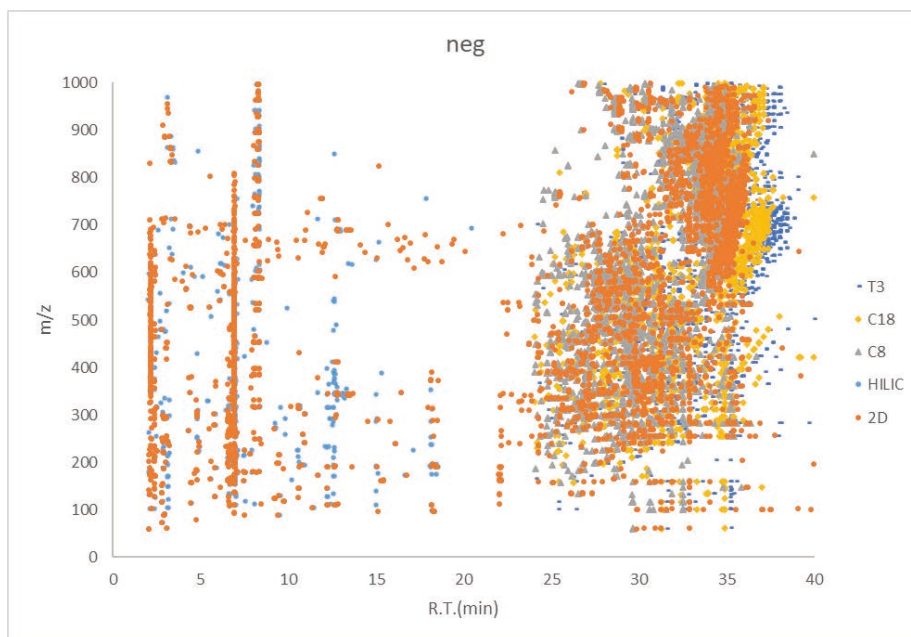


图 12 负模式下不同系统分析大鼠血浆样品色谱峰二维图

■ 结论

本文开发了一个新的二维液相系统，通过将亲水作用色谱（HILIC）与反相色谱（C8）组合，可以实现一次进样同时分析高极性物质和中低极性物质，因此取名为全谱二维液相。通过 LogP 范围介于 -8.79~13.87 的 60 种目标物的系统验证实验以及血浆实际样品分析，证明该系统相较于普通的反相系统或亲水作用色谱系统，能在不明显增加分析时间、不影响分离度、简化样品前处理步骤的前提下，消除无效的死时间分离，显著提高峰容量，可同时分离高中低极性化合物，有望应用于代谢组学、天然产物、农兽残分析、药物代谢等宽极性范围、多目标化合物、复杂基质的各类分析项目。

岛津应用云

