

超临界流体色谱-质谱接口技术及应用进展

杨学舫¹ 陈怀义¹ 潘星宇² 杨金磊² 唐飞^{*1} 张四纯^{*2}

(清华大学 精密仪器系¹, 化学系², 北京 100084)

摘要 在过去的几十年里,超临界流体色谱(Supercritical fluid chromatography, SFC)作为液相色谱(Liquid chromatography, LC)分离技术的补充引起了研究者的极大关注,特别是 SFC 与质谱(Mass spectrometry, MS)联用,在代谢组学和脂质组学等方面展示了广阔的应用前景。与 LC-MS 的接口相比, SFC-MS 的接口存在一些特殊的问题,需要采用专门设计方案才能解决。本文对 SFC-MS 接口技术进行了归纳、分类和总结,重点介绍了不同接口设计对检测性能的影响,总结了不同类型接口的适用性,评述了 SFC-MS 在不同领域的应用进展,并对其发展趋势进行了分析和展望。

关键词 超临界流体色谱; 质谱; 接口; 评述

20 世纪 80 年代初, Peaden 等将超临界 CO₂ 作为新的流动相引入到色谱分析中^[1-2], 尽管其存在流动相无毒、粘度低和易挥发等优点, 但基于超临界流体的超临界色谱-质谱联用分析方法(Supercritical fluid chromatography and mass spectrometry, SFC-MS)并未得到足够的关注。自 2012 年以来, 仪器公司相继推出了多款商业化 SFC 分析系统, 提高了 SFC 在实验室和实际应用场景的普及程度, 有关 SFC-MS 的学术论文数量也明显增加。在 Web of Science 中以“Supercritical fluid chromatography and mass spectrometry”与“SFC-MS”为关键词, 共检索到 3085 篇相关文章, 内容主要包括 SFC 与质谱的接口设计与应用(图 1)。其中, 质谱电离方法除了常用的电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI)、大气压化学电离源(Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)、大气压光电离(Atmospheric pressure photoionization, APPI)外, 还有 UniSpray^[3]、电感耦合等离子质谱法(Inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)^[4]以及质子转移反应质谱(Proton transfer reaction-mass spectrometry, PTR-MS)^[5]等具有发展和应用潜力的方法, 应用领域主要包括手性分离^[6]、脂质组学^[7]、代谢组学^[8]、兴奋剂检测^[9-10]和毒品检测^[11-12]等。

本文介绍了 SFC-MS 接口的设计原理以及其在应用方面的发展历程和现状, 归纳了不同类型接口的适用性, 重点分析了接口设计中不同因素对检测性能的影响, 并总结了近年来 SFC-MS 在不同领域中的应用研究进展。

1 SFC-MS 接口的分类

超临界 CO₂ 是 SFC 最常用的流动相, 具有无毒、环境友好和易获取等优点, 其临界点为 31.2 °C、7.38 MPa, 较易在实验室环境中实现。CO₂ 在电离过程中没有直接作用, 进入大气环境时会直接逸散, 相比于液体流动相, 超临界 CO₂ 流动相对质谱检测更有利。SFC 需要在高压条件(15~25 MPa)下进行, 而质谱是在真空条件下工作的检测装置, 因此, 从 SFC 色谱柱洗脱的分析物在进入质谱入口之前必须减压。由于 SFC 流动相的可压缩性较高, 流动相在接口内部压力下降时极易出现相分离, 导致已经溶解的化合物在管壁上析出, 无法转移到质谱装置中, 甚至发生堵塞^[13], 这是 SFC-MS 接口设计需要解决的最主要的问题。因此, SFC-MS 不能像 LC-MS 那样直接将液体从色谱柱出口转移到电离源, 必须采用特殊设计的

2024-05-24 收稿; 2024-09-05 接受

国家重大科研仪器研制项目(No. 20221310054)资助。

* E-mail: tangf@mail.tsinghua.edu.cn; sczhang@mail.tsinghua.edu.cn

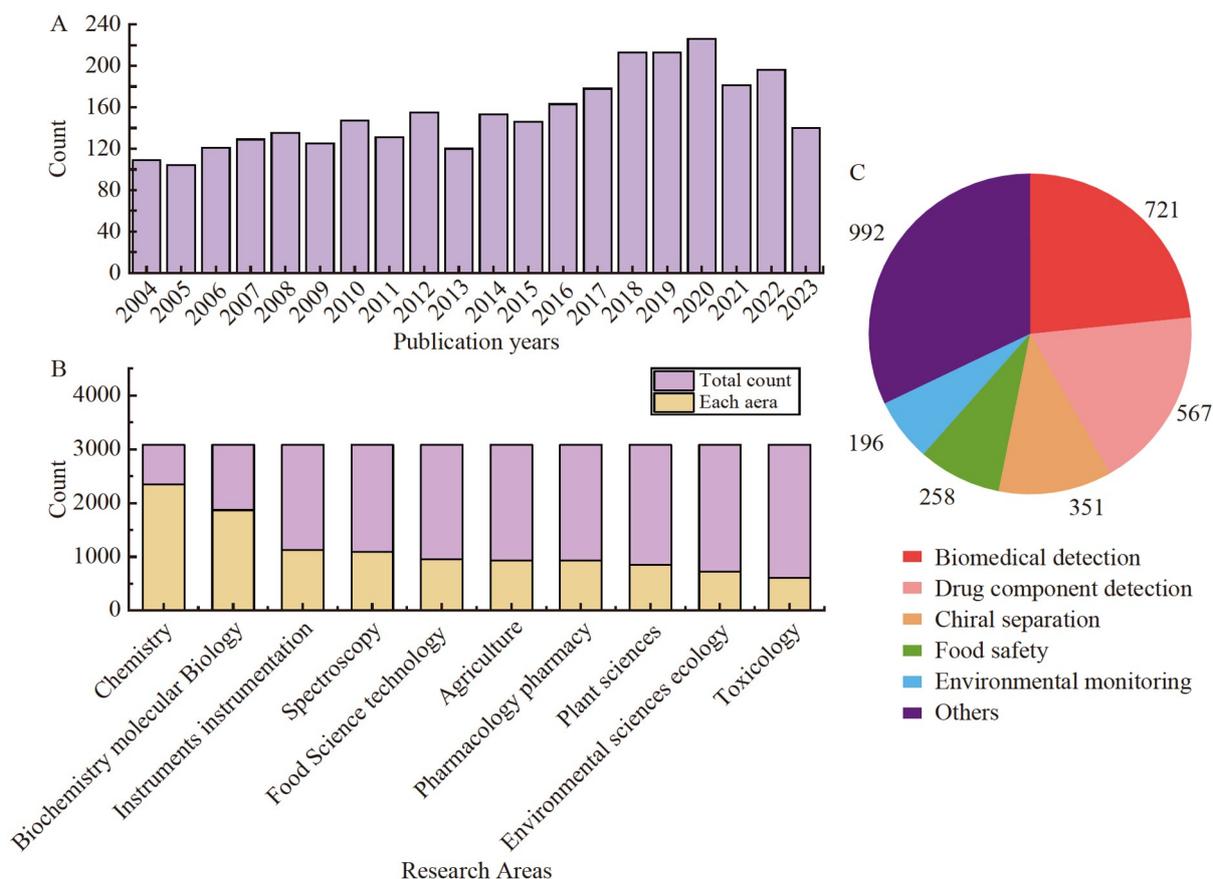


图1 超临界色谱-质谱联用(SFC-MS)分析方法相关文献检索分析:(A)近二十年论文发表数量趋势;(B)前十个主要研究领域的论文数;(C)前五个主要应用领域的论文分布(数据来自Web of Science,关键词为“Supercritical fluid chromatography and mass spectrometry”与“SFC-MS”,检索时间范围为2004~2023年,检索日期2024年5月8日)

Fig.1 Analysis of the publications on supercritical fluid chromatography and mass spectrometry (SFC-MS): (A) Trends in the number of published papers over the past two decades; (B) Number of papers in the top ten main research areas of study; (C) Distribution of papers in the top five main application areas. The data were obtained from the Web of Science, and the keywords were "Supercritical fluid chromatography and mass spectrometry" and "SFC-MS". The retrieval time range was 2004–2023. Retrieved on 8th May, 2024

接口保持色谱的完整性,并保证质谱端有足够的离子化强度。

目前,主流的仪器厂商已经给出了 SFC-MS 接口的完整解决方案,经适当调整,可以满足大多数使用场景。然而,深入理解其内在的运作原理及优缺点非常必要,这可使分析系统在更稳定的状态下运行。目前,SFC-MS 接口所采用的设计方案可以分为全流式接口和分流式接口两大类。

1.1 全流式接口

全流式接口将色谱流出的分析物全部或大部分引入质谱进行检测,因此适合 APCI 等质量敏感型的电离方法。如图 2 所示,全流式接口主要通过以下方式实现:(1)使用节流器直接引入;(2)使用液体泵控制压力;(3)使用小体积自动背压调节器(Automated back-pressure regulator, ABPR)。

1.1.1 直接引入

Smith 等^[14]在 1982 年首次提出了使用节流器进行全流量引入的方法,其中,节流器起到了被动压力调节器的作用。如图 2A 所示,加热节流器的出口或加热整个节流器,可以缓解由于快速减压而导致的 SFC 流动相冷却以及分析物沉淀的问题^[15]。使用节流器的主要优点是结构简单、柱外死体积小,缺点是操作灵活性降低、稳定性差。通过节流器的压降受内部液体的密度、黏度和质量流量的影响,因此,当流动相组分或流量发生变化时,接口两端之间的压降都会发生变化。在这种情况下,电离源电离性能受

到内部液体组成及其流量的影响较大。因此,在流动相流量和组分方式变化的情况下,采用已设计好的节流器难以达到预期效果。然而, Pinkston^[16]指出,如果使用低压缩性的 SFC 流动相,采用节流器同样能够达到令人满意的分析结果,因为此时 SFC 流动相更像“液体”,压力变化不会对流动相产生较大影响。Hoke 等^[17]使用 CO₂-甲醇(35:65, *V/V*)流动相将 SFC 流出的液体在送至节流器前进行预热(图 2A 虚线位置),通过控制温度调节内部液体的密度和黏度,从而保证通过节流器的压降被限制在一定范围内。

1.1.2 压力流控制的全流式接口

压力流控制的全流式接口方案由 Chester 和 Pinkston^[18]提出,整个方案未采用几何结构控制系统的压力。如图 2B 所示,从色谱柱流出的所有成分通过紫外(Ultraviolet, UV)检测器后,液泵送入可与 CO₂ 混溶的调压流体,在零死体积三通中与流动相混合后流向电离源。该调压流可以添加与流动相完全不同的组分,在不影响 SFC 分离过程的前提下,可通过引入不同溶剂和添加剂增强质谱信号。尽管有这些优点,但压力流控制接口仍不够灵活,原因在于传输管路的内径决定了兼容的流量/压力组合范围,在不同条件下需要选择不同的管路。此外,该方法需要一个能够提供无脉冲流的液泵与三通,增加了柱外死体积,并且额外的液流量还会增加电离源中的溶剂负荷。根据目标压力的不同,所需要的溶剂添加量也会发生变化,进而改变分析物的浓度,影响定量分析结果。

1.1.3 带补充液的 ABPR 控制接口

随着小体积 ABPR 的实际应用,在接口中引入 ABPR 成为可能。标准尺寸的 ABPR 通常会显著增加死体积,导致色谱峰展宽,造成色谱分辨率损失,使用小体积 ABPR 可有效解决此问题。然而,该策略却引发了另一个问题:从 ABPR 流出的是完全减压的 CO₂ 流动相,其溶解度可能无法保证将所有分析物传输到质谱。如果管路过长,该问题会更加严重。如图 2C 所示,该方案通过增加补充液泵解决分析物析出的问题。补充液可以在 ABPR 之前或之后添加, Duval 等^[19]以 APCI 为电离源,比较了在 ABPR 前后添加补充液的情况,得到了相近的定量分析结果。

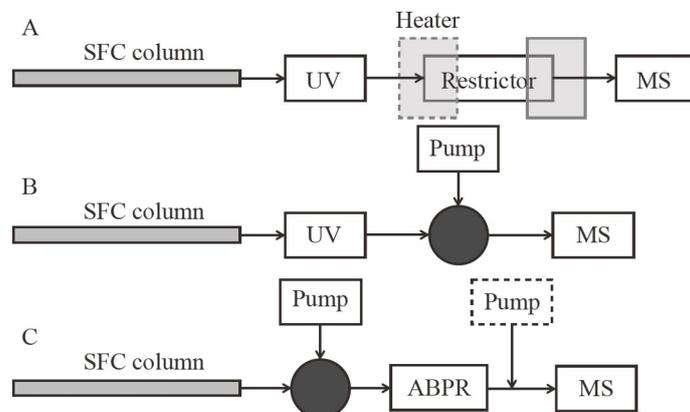


图2 全流式SFC-MS接口示意图:(A)直接引入接口;(B)压力流控制接口;(C)带补充液的小体积自动背压调节器(ABPR)控制接口

Fig.2 Schematic diagram of full flow SFC-MS interface: (A) Direct flow interface; (B) Pressure flow controlled interface; (C) Automated back-pressure regulator (ABPR) controlled interface with make-up pump

1.2 分流式接口

两种分流式接口方案如图 3 所示。在分流式接口中,只有少部分 SFC 流动相转移到电离源,大部分 SFC 流动相通过 ABPR 流出,其主要优点是对 ABPR 的限制较少。但是,流向电离源的流动相减少,可能会影响质谱响应,这对于 APCI 这类质量敏感的电离方法影响很大。对于 ESI 这类浓度敏感的技术^[20],流量损失并不会使质谱响应显著降低,故此类接口通常与 ESI 联用,可得到更佳的分析性能。另外,流动相减少可能会影响定量分析的准确性,这是因为流动相压力或其它环境条件的细小变化都会改变分流比。对此, Perrenoud 等^[21]考察了操作参数对分流比及质谱输出信号的影响。

1.2.1 预分流接口

Zhao 等^[22-23]在 SFC 色谱柱出口采用零死体积三通将少部分(1%~20%)流动相转移到电离源入口,其余的流动相通过 UV 检测器进入 ABPR(图 3A)。为了确保流向质谱的流量较小,流向质谱的流道的流动阻力应高于 ABPR。由于分流装置处于 ABPR 控制下,因此该接口具有较好的灵活性,可通过 ABPR 调节接口内压力以适应不同条件。在限制管路长度与保证接口死体积最小的前提下,使用该接口可将色谱的分离结果完整地从 SFC 转移到质谱。但是,这种设置使得 UV 和 MS 两个检测器都未检测到从色谱柱中流出的全部流动相,这可能导致检测结果不准确和不全面。

1.2.2 后分流接口

图 3B 是目前 SFC-MS 仪器厂商所提供的主流接口方案。该接口由两个串联的零死体积三通组成,在第一个三通添加由液泵输送的补充液,在第二个三通将少部分流动相转移到电离源,剩余的流动相通过 ABPR 流出。该接口充分利用 ABPR 和补充液泵,灵活调节输送到电离源的液体流量和组分,减少样品在接口内的析出,从而获得较高的灵敏度。

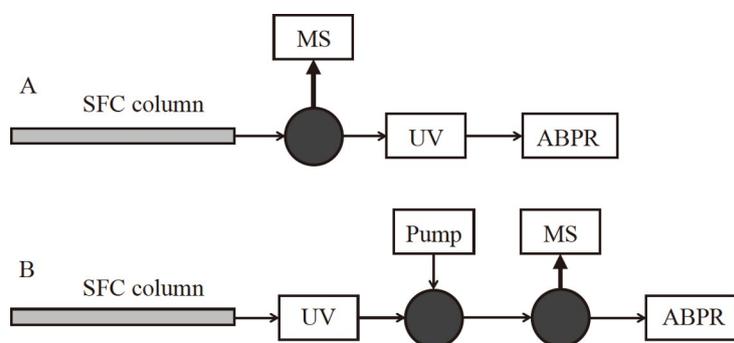


图3 分流式SFC-MS接口示意图:(A)预分流接口;(B)后分流接口

Fig.3 Schematic diagram of split SFC-MS interface: (A) Pre-diverting interface; (B) Post-diverting interface

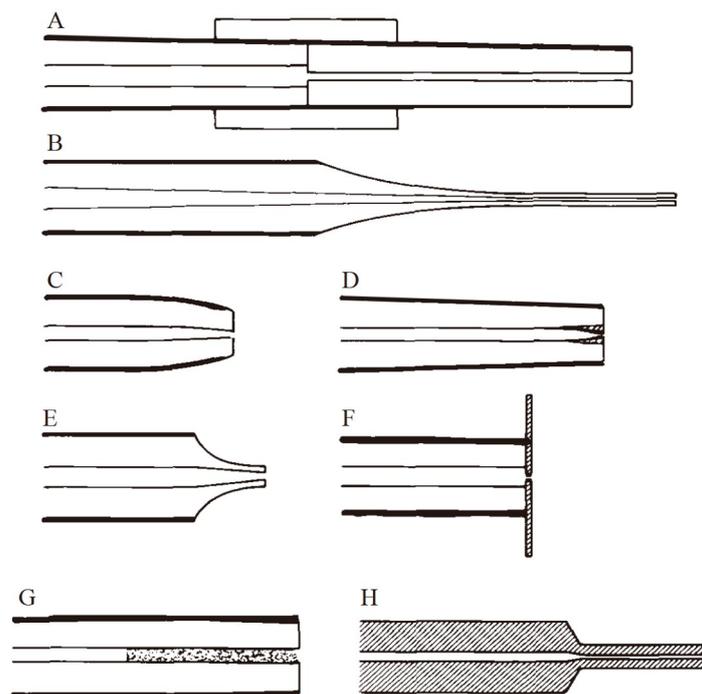
2 影响 SFC-MS 接口性能的因素

2.1 接口几何形状的影响

接口的几何形状在减压过程中起着关键作用。长径比大的接口的效果最差,会导致接口内部的压力连续、渐进、线性地降低。样品通过此类接口减压时在某点可能发生相分离,影响其在随后的管路上继续传递。Pinkston 指出^[16],对于长度 ≥ 1 m 的长接口,相变会导致 CO_2 相和有机溶剂相分段流动,产生“不稳定、脉动的 ESI 喷射和锯齿状色谱峰”。相对地,长度较短且管径较宽,但末端呈锥形或夹紧的管路结构更加适用。

Smith 等^[24]总结了用于 SFC-MS 全流引入的出口几何形状(图 4)。基于实现可控减压的设计初衷,这些几何形状仍然是现代 SFC-MS 接口设计的重要参考依据。图 4A 的设计有两段管路,第一段的直径大于第二段。在确保第二段管路不过长且第一段管路不会引入显著的流体阻力的前提下,这种接口设计优于直径较小且长度较长的接口设计。图 4B 是一个通过熔融和拉伸形成的锥形出口。毛细管未拉伸的部分便于在减压膨胀之前对流体进行有效加热,但是拉伸也会降低接口的耐压性能。此外,还可采用将熔融石英毛细管的封闭端打磨至所需直径(图 4C)、在毛细管末端沉积材料进行塑形(图 4D)、快速拉伸毛细管使其收缩(图 4E)或者在出口固定含小孔的膜片(图 4F)等方式制备接口。图 4G 所示的出口与图 4D 一样采用了额外的填充材料。但是图 4G 的出口填充更类似于构成了一个亚微米尺寸颗粒的柱,形成了多个具有大长径比的流体路径。这种几何结构改善了挥发性化合物的运输,但对难挥发化合物会产生相反效果,因此难挥发的分析物在该结构下极易发生堵塞。通过压接毛细管与铂铱管的末端制造约 1 mm 长的接口(图 4H),可用于更高温度和更多极性流体。

根据 Smith 等^[24]的研究,选择接口几何形状的首要依据应是分析物的挥发性。挥发性化合物能够在

图4 SFC-MS 接口的出口端几何形状^[24]Fig.4 The outlet geometry of the SFC-MS interface^[24]

较高的温度下保证溶解性,因此首要选择坚固耐用且易更换的结构。为了防止沉淀与堵塞,溶解性条件需要保持到接口末端。该研究建议将接口出口变细,这有助于在整个流道中保持较高的压力,并在出口产生更大的压力梯度。最近, Petruzzello 等^[25]在其研究中得出了非常相似的结论,他们在现有的专利接口基础上进行了改进,使新接口缩短了减压过程的发生长度,这项改进显著提高了分析的可重复性,并减少了尖峰和起伏峰的出现。

2.2 补充液的影响

补充液的组成对电离和质谱响应有很大影响。与纯 CO_2 相比,加入有机溶剂通常会使得分析物具有更好的溶解度和更快的传质速度。但是, CO_2 /有机溶剂混合物的温度和压力临界点也随组分比例的不同而改变,因此,在温度和压力控制中需要考虑其影响。优化补充液组分可以实现质谱响应的标准化,特别是在代谢组学中,使同时分析不同浓度水平的代谢物成为可能。对于 ESI, 进入电离源的补充液类型很重要,因为气相质子亲和会影响质谱响应。Amad 等^[26]研究表明,在具有较高气相质子亲和力的补充液存在的条件下,分析物电离会被抑制。添加的有机补充液浓度范围通常为 0.1%~2% 或 1~50 mmol/L,为了更好地洗脱极性化合物,研究者多在含有甲醇的混合补充液中添加低含量(1%~8%)水。

2017 年, West 等^[27]描述并实验证明了甲醇- CO_2 流动相之间的反应生成了单甲基碳酸,从而导致流动相的酸性特征。然而,量子化学计算和红外光谱证实了另一种反应,包括导致碳酸形成的两阶段过程^[28]。单甲基碳酸可以进一步与甲醇反应,生成碳酸二甲酯和水;随后,水与 CO_2 反应生成碳酸。Haglund 等^[29]的研究表明,原本无水的流动相中后来存在水,这说明水是甲醇和 CO_2 反应的产物,证明了上述反应过程的存在。

除了有机溶剂外,还可在流动相中加入盐(如甲酸铵)、酸(如甲酸、三氟乙酸)或碱(如氨水),以提高方法的重复性,改善可电离物质的峰形。Plachka 等^[30]以 91 种化合物、3 种固定相和 2 种有机溶剂为研究对象,通过添加水、甲酸和乙酸、氨和不同摩尔浓度的氨盐,研究了 SFC-ESI-MS 中补充液组成对色谱的影响。他们首先研究了不同有机溶剂以及补充液添加剂的影响趋势,然后利用 Pearson 相关检验和矩阵图计算物质理化性质与质谱响应之间的相关性,并进行回归分析,得到了理化性质与 SFC-MS 响应之间的回归方程。该方程可用于优化补充液添加剂的选择与组成,减少了实验设计时间并简化了程序。

2.3 温度的影响

在与接口相关的所有参数中,温度是避免相分离的关键参数。加热 SFC-MS 接口作为一种有效方法已经应用了很长时间。随着流体温度升高,质谱信号得到改善。对于纯 CO₂ 流动相,为了获得良好的流动特性,以及避免 CO₂ 膨胀过程中两相分离,进入接口前的流动相温度应至少为 80~100 °C。如果可以在整个接口内保持恒温,避免相分离的温度应更低。这是在流体膨胀之前对其以及接口进行加热处理能够显著提升对低挥发性化合物检测效果的原因。对于添加有机补充液的情况,则需根据混合相的组分比例及热力学性质选择加热温度,相关理论可参考文献[31]。简单而言,如果 CO₂/有机溶剂混合流动相中的有机溶剂浓度增加,通常需要更高的温度避免相分离。

另一种避免相分离的方法是冷却流体,使其尽可能像液体[32]。以 CO₂/甲醇(70:30, *n/n*)混合物为流动相,假设初始压力为 150 bar (1 bar=0.1 MPa),如果温度降至 0 °C,流体在接口内须减压到 25 bar 才发生相分离。假设压力在内部线性下降,相分离只会发生在接口长度的最后 1/6 部分;如果使用的接口出口端存在缩口,能够产生大于 25 bar 的压降,则可完全避免在接口内部出现相分离。

2.4 电离源与质谱响应

灵敏度与分析物的种类、样品基质、流动相、补充液组成和分析仪器密切相关,因此,评估并比较不同色谱技术对同一分析物的分析灵敏度水平并不容易。相比于 LC-MS, SFC-MS 在分析葡萄糖苷酸和硫酸盐类固醇[33]、美沙酮[34]、尿液中的兴奋剂[7]以及血清中的维生素 D 代谢物[35]时具有更高的灵敏度。

不同的电离源在 SFC-MS 中的性能也存在差异。Parr 等[36]使用全流式接口比较了 SFC-MS 下离子源分别为 ESI、APPI 和 APCI 时质谱的检出限和灵敏度,认为 ESI 最适于多组分分析,其它电离技术更适于单独分析特定的分析物。例如,单独分析孕二醇时,APCI⁺优于 APPI⁺和 ESI⁺。Matsubara 等[37]也强调了 ESI 在结构解析方面的优势,在类胡萝卜素和环氧类胡萝卜素的 SFC 分析中,采用 ESI 可检测到结构特异性产物离子,而使用 APCI 时未检出。Liu 等[35]在分析血清中维生素 D 代谢物时发现,使用 ESI 的信噪比高出 APCI 约 4~6 倍。Wolrab 等[38]认为 ESI 和 APCI 在分析氨基酸及相关化合物时的敏感性依赖于分析物。但是,也有研究表明 ESI 和 APCI 的灵敏度相似[39]。

Mostafa 等[40]设计了一种新的纳喷雾电离源以及对应的接口,这种电离源能够产生更小的电喷雾液滴。该接口使用了 ABPR,并在 ABPR 之后进行分流,少部分流动相通过电离源电离进入色谱。他们构建了 3 种内径尺寸(25、50 和 75 μm)的电离源,并对有机溶剂比以及流量进行了优化。将最终结果与传统的 SFC-ESI 进行比较,结果表明,不论采用哪种尺寸的电离源,系统的信号强度都增强了 10 倍。

SFC-MS 分析通常在酸性条件下进行,流动相的 pH 值通常在 5 左右,原因是甲醇-CO₂ 以及水-CO₂ 之间的反应。Akbal 等[41]依次检测了添加酸性、中性、碱性以及缓冲溶液后的 CO₂ 喷雾的 pH 值。结果表明,无论哪种条件,喷雾的 pH 值都在 3.8~7.2 范围内,这表明 SFC 分析总是在酸性到中性条件下进行。酸性条件会降低 ESI 负离子模式下的灵敏度,因为去质子化在碱性条件下更易发生。在 SFC-MS 中,ESI 的负离子模式下的质谱信号强度比正离子模式低 10 倍。因此,有必要进一步研究流动相酸性对质谱灵敏度的影响,特别是在负离子模式的 ESI 中。

3 SFC-MS 接口技术的应用

3.1 脂质组学

脂质组学是研究生物体表达的全部脂质或某一体系中所有脂质的科学,不仅需要获得包含个体脂质组成和丰度信息的“脂质谱”,还需要全面了解生物样品中脂质的各种功能[42]。Uchikata 等[43]建立了一套基于 SFC 的磷脂分析系统,可在 5 min 内提取 3 μL 血浆中的磷脂,并在 15 min 内完成分析,共提取到 134 种磷脂,其中,74 种磷脂的分析具有良好的重复性。Lisa 研究组[44]报道了一种高通量的脂质组学分析方法,以甲醇-水-乙酸铵混合物为梯度改性剂,以 1.7 μm 颗粒桥接乙烯杂化硅柱为色谱柱,采用 UHPSFC 法进行脂类分离,可在单次运行中分离 24 个脂类,其中包含 436 种脂质(图 5A)。

Yang 等[45]建立了一种基于真空溶剂蒸发接口的在线二维色谱方法,首先通过一维 SFC 分离脂类,再通过二维 RPLC 分离不同种类的脂类分子。该系统检测 11 个脂质标准品的回收率均大于 88%,脂质标

准品的检出限均在 ng/mL 级,采用该方法可在 38 min 内鉴定出人血浆中 10 个脂类中的 370 种内源性脂质。该研究利用十字双位阀的真空蒸发接口,经过一维 SFC 柱的流动相在流过回路时由真空泵蒸发。通过阀门的自动切换,两个回路交替捕获分析物并将其转移到二维液相色谱,建立了无需中途停止的二维 SFC/RPLC 系统。

De Kock 等^[46]开发了一种高速定量分析类固醇激素的 UPSFC-MS/MS 方法。该方法在 ESI 正离子模式下具有良好的稳定性、选择性和高灵敏度,在 5 min 内可从 50 μ L 人血浆样本中分析 19 种类固醇。该方法线性度良好,相关系数为 0.9983~0.9999,日内和日间精密性(RSD)均小于 15%,对 19 种分析物的准确度在 80%~116%之间。

Jiang 等^[47]利用 UPSFC-MS 开发了一种新型极性脂质分析方法,可分离并定量分析 18 个脂类。利用该系统以 7 份生物乳汁及乳制品为样品,在 10 min 内可检测并定量分析 219 种不同的极性脂质。经过对比发现,与其它哺乳动物相比,人乳中的极性脂质组成明显不同。人乳的极性脂质浓度较低,但胆固醇和鞘磷脂含量较高。在检测的所有动物乳汁样品种类中,驴乳的极性脂质中鞘磷脂的相对含量与人乳最接近,可能是一种潜在的婴儿配方奶粉原料(图 5B)。

Wolrab 等^[48]利用以 UHPSFC-MS 为主的多种质谱方法对胰腺癌患者与健康人的血清样本进行分析,结果表明,胰腺癌患者与健康对照组样本的脂质组成存在统计学上的显著差异(图 5C)。根据样本结果训练出的方法在诊断胰腺癌时敏感性和特异性上均超过 90%,与现有的诊断影像学方法相当。此外,该研究还分析了肾癌、乳腺癌和前列腺癌患者的血浆脂质组学特征与健康对照组的差异^[49],给出了统计学上差异最显著的 7 种脂质,这些脂质有望成为癌症筛查的标志物。

Kozlov 等^[50]开发了一种单平台的 SFC-MS 脂质组学/代谢组学方法,可以在仪器、色谱柱、流动相和改性剂相同的条件下,通过连续两次进样分析血浆中的脂质和极性代谢物(图 5D)。作者围绕系统的压力控制、结果的长期可重复性和色谱性能,对流速梯度程序、补充液以及流动相做了选择与优化,实现在 24 min 内识别 9 类脂质与 39 种代谢物,并且在 50 次重复检测中分析物的保留时间的标准差 <0.011 min。

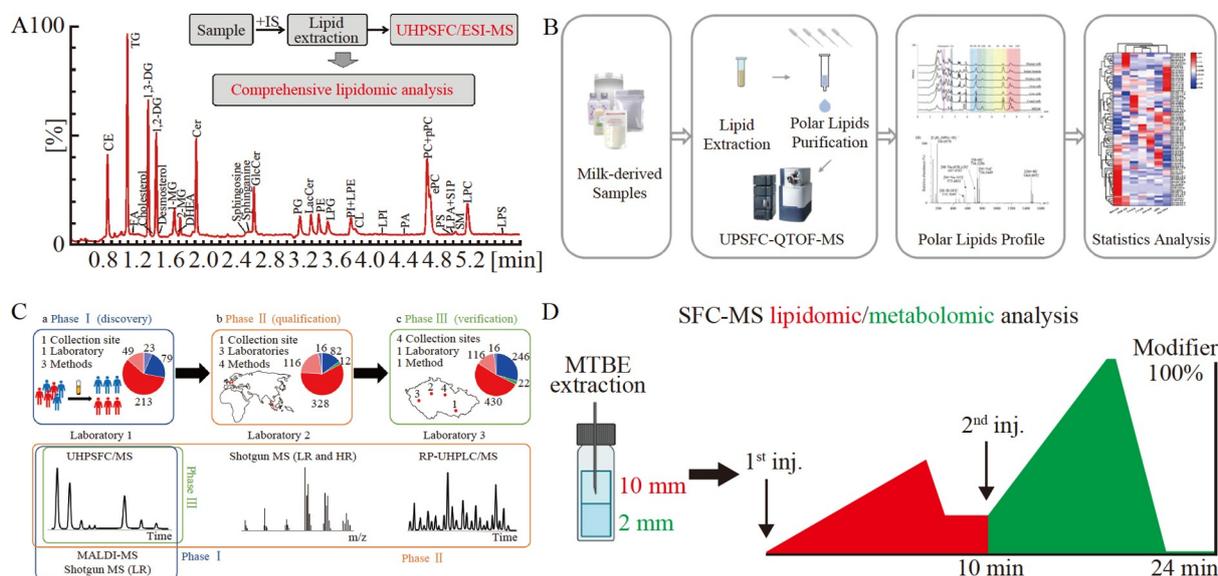


图5 SFC-MS 在脂质组学中的应用: (A)用于脂质分析的高通量SFC-MS系统^[44]; (B)利用 SFC-MS 分析乳制品中的脂质^[47]; (C)利用脂质组学特征进行胰腺癌诊断^[48]; (D)利用单平台进行脂质组学与代谢物组学双重分析^[50]

Fig.5 Application of SFC-MS in lipidomics: (A) High-throughput SFC-MS systems for lipid analysis^[44]; (B) Analysis of lipids in dairy products using SFC-MS^[47]; (C) Diagnosis of pancreatic cancer using lipidomic characteristics^[48]; (D) Both lipidomic and metabolomic analysis using a single platform^[50]

3.2 手性分离

SFC 被认为是对映体分离的首选,与 LC 相比,在分离结果几乎相同的情况下,SFC 的运行时间会大幅降低,极大地提高了分析检测的效率。在市售合法药物的成分中只存在纯 *S* 型安非他明(*S*-Amphetamine),利用 SFC-MS 监测生物样本中是否存在 *R* 型安非他明(*R*-Amphetamine)可以区分非法合成的和作为医疗用药的安非他明^[51],并作为判断是否吸毒的参考依据之一。此外,明确 *R/S*-安非他明的相对含量也可以推断出毒品的合成方法,协助寻找制毒地点。利用 SFC 获取植物药物的对映体组成还可为表征草药产品提供方案,避免与成分相似的化学合成药物或外观相似的植物药物混淆^[52]。

Yang 等^[53]以卡马西平(Carbamazepine)为内标,建立了一种基于 SFC-MS 的快速灵敏测定比格犬血浆中奥卡西平(Oxcarbazepine, OXC)及其手性代谢物尼卡巴嗪(Licarbazine, Lic)的方法。OXC 在口服后会被还原酶迅速代谢为 Lic,其药理活性高于母体化合物,具有较好的抗癫痫作用。Lic 在人血浆中以 *S*-Lic 和 *R*-Lic 的对映体混合物的形式出现,比例约为 5:1。该方法的运行时间仅为 3 min, OXC 浓度在 5~1000 ng/mL 范围内和 Lic 对映体浓度(0.5~100 ng/mL)呈线性关系,定量下限分别为 5.0 和 0.5 ng/mL。

Gou 等^[54]报道了一种基于手性异构体比例分析中成药质量的评价策略。以不同制药企业的 158 批元虎止痛片为样本,通过 HPLC 提取其中的四氢帕马汀(Tetrahydropalmatine, THP)。THP 有两种对映体(*d*-THP 与 *l*-THP(罗通定)),在元虎止痛片的原料延胡索中,这两种对映体将以相对稳定的比例共存。对分离纯化的 THP 进行 SFC 分离,结果表明,正常药品样本的 *d*-THP 与 *l*-THP 的峰面积比与延胡索中的比例相近,峰面积比约为 60:40。然而,在有问题的样本中 *d*-THP 明显减少,峰面积比为 10:90。这表明部分制药企业可能没有严格遵守处方配比和生产规则,使用劣质的延胡索原料,并在生产过程中添加化学原料罗通定,以达到中国药典的定量标准。

在药物的手性化合物纯化过程中,制备型 SFC 比制备型 LC 具有显著优势^[55]。由于超临界流动相的黏度较低,可以使用更高的流动相流速,从而提高 SFC 分离的速度。此外,以 CO₂ 取代大部分流动相,制备型 SFC 的有机溶剂消耗会大大减少,并且 CO₂ 可在柱后通过降低压力很容易地去除并回收,大大降低了去除溶剂所需的人力和时间及能源成本。最后,CO₂ 作为主要流动相成分也使色谱法更加环保。Wilson 等^[56]开发了一种用于分离羟氯喹(Hydroxychloroquine, HCQ)的 SFC 制备方法,在 2 h 内收集了 363 mg *R* 对映体和 338 mg *S* 对映体,对映体纯度超过 99%。

Xin 等^[57]采用手性 SFC 对木脂素的 4 种非对映异构体进行了制备级分离纯化。这 4 种木脂素具有抗神经炎症活性,可用作消炎类药物。由于单一的非手性 HPLC 方法和非手性 SFC 方法都不能分离这 4 种非对映异构体,该研究建立了层叠式自动进样的两步纯化方法。首先,在第一个手性固定相(Chiral stationary phase, CSP)上分离,将 4 种木脂素分成两对;然后,在第二个 CSP 上分别将两对非对映异构体两两分离。以 710 mg 提取物为原料,采用该方法成功分离出 4 种非对映异构体,产量分别为 103.1、10.0、152.3 和 178.6 mg,纯度均大于 98%。

4 总结与展望

本文总结了设计和开发合适的 SFC-MS 接口需要考虑的因素,SFC-MS 接口使 SFC 和 MS 两个系统能够更好地耦合。随着 SFC 仪器和色谱柱技术的发展,其强大的分离能力与非常灵敏的质谱检测相结合,使 SFC-MS 在某些领域可以达到与 LC-MS 互补的水平。SFC-MS 可用于多种样品的分析,从疏水物质(如脂质或脂溶性维生素)的正常相分离,到中极性物质(如药物或天然产物)的反相分离。特别是在一些重要的应用场景,如脂质组学研究中,SFC-MS 表现出更大的优势,能够在一次分离过程中同时测定极性和非极性物质,这是传统的色谱技术很难实现的。目前,SFC-MS 正进入相对成熟的发展阶段,其基础和应用研究越来越丰富,对这一领域的持续关注将有助于 SFC-MS 技术的普及和发展。

References

- [1] PEADEN P A, FJELDSTED J C, LEE M L, SPRINGSTON S R, NOVOTNY M. *Anal. Chem.*, 1982, 54(7): 1090-1093.
- [2] PEADEN P A, LEE M L. *J. Chromatogr. A*, 1983, 259(1): 1-16.

- [3] LUBIN A, BAJIC S, CABOOTER D, AUGUSTIJNS P, CUYCKENS F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2017, 28(2): 286-293.
- [4] GARCIA-MONTOTO V, DENTI P, MALMQUIST L M V, VERDIER S, BOUYSSIÈRE B, CHRISTENSEN J H. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, 35(12): 2852-2858.
- [5] HONDO T, OTA C, MIYAKE Y, FURUTANI H, TOYODA M. *Anal. Chem.*, 2021, 93(17): 6589-6593.
- [6] HARPS L C, JOSEPH J F, PARR M K. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, 162: 47-59.
- [7] WOLRAB D, PETERKA O, CHOCHOLOUSKOVÁ M, HOLCAPEK M. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2022, 149: 116546.
- [8] VAN DE VELDE B, GUILLARME D, KOHLER I. *J. Chromatogr. B*, 2020, 1161: 122444.
- [9] NOVÁKOVÁ L, DESFONTAINE V, PONZETTO F, NICOLI R, SAUGY M, VEUTHEY J L, GUILLARME D. *Anal. Chim. Acta*, 2016, 915: 102-110.
- [10] STORBECK K H, GILLIGAN L, JENKINSON C, BARANOWSKI E S, QUANSON J L, ARLT W, TAYLOR A E. *J. Chromatogr. B*, 2018, 1085: 36-41.
- [11] SEGAWA H, IWATA Y T, YAMAMURO T, KUWAYAMA K, TSUJIKAWA K, KANAMORI T, INOUE H. *Forensic Toxicol.*, 2019, 37(1): 145-153.
- [12] TREMEAU-CAYEL L, CARNES S, SCHANFIELD M S, LURIE I S. *J. Chromatogr. B*, 2018, 1091: 96-100.
- [13] JUMAAH F, LARSSON S, ESSÉN S, CUNICO L P, HOLM C, TURNER C, SANDAHL M. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1440: 191-200.
- [14] SMITH R D, FJELDSTED J C, LEE M L. *J. Chromatogr. A*, 1982, 247(2): 231-243.
- [15] SJÖBERG P J R, MARKIDES K E. *J. Chromatogr. A*, 1999, 855(1): 317-327.
- [16] PINKSTON J D. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 2005, 11(2): 189-197.
- [17] HOKE S H, TOMLINSON J A, BOLDEN R D, MORAND K L, PINKSTON J D, WEHMEYER K R. *Anal. Chem.*, 2001, 73(13): 3083-3088.
- [18] CHESTER T L, PINKSTON J D. *J. Chromatogr. A*, 1998, 807(2): 265-273.
- [19] DUVAL J, COLAS C, PECHER V, POUJOL M, TRANCHANT J F, LESELLIER E. *J. Chromatogr. A*, 2017, 1509: 132-140.
- [20] HOPFGARTNER G, BEAN K, HENION J, HENRY R. *J. Chromatogr. A*, 1993, 647(1): 51-61.
- [21] PERRENOUD A G G, VEUTHEY J L, GUILLARME D. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1339: 174-184.
- [22] BOLAÑOS B J, VENTURA M C, GREIG M J. *J. Comb. Chem.*, 2003, 5(4): 451-455.
- [23] ZHAO Y, WOO G, THOMAS S, SEMIN D, SANDRA P. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1003(1-2): 157-166.
- [24] SMITH R D, KALINOSKI H T, UDSETH H R. *Mass Spectrom. Rev.*, 1987, 6(4): 445-496.
- [25] PETRUZZIELLO F, GRAND-GUILLAUME PERRENOUD A, THORIMBERT A, FOGWILL M, REZZI S. *Anal. Chem.*, 2017, 89(14): 7615-7622.
- [26] AMAD M H, CECH N B, JACKSON G S, ENKE C G. *J. Mass Spectrom.*, 2000, 35(7): 784-789.
- [27] WEST C, MELIN J, ANSOURI H, MENGUE METOGO M. *J. Chromatogr. A*, 2017, 1492: 136-143.
- [28] OPARIN R D, KRESTYANINOV M A, VOROBYEV E A, POKROVSKIY O I, PARENAGO O O, KISELEV M G. *J. Mol. Liq.*, 2017, 239: 83-91.
- [29] HAGLIND A, HEDELAND M, ARVIDSSON T, PETERSSON C E. *J. Chromatogr. B*, 2018, 1084: 96-105.
- [30] PLACHKÁ K, GAZÁRKOVÁ T, ŠKOP J, GUILLARME D, SVEC F, NOVÁKOVÁ L. *Anal. Chem.*, 2022, 94(11): 4841-4849.
- [31] TARAFDER A, IRANETA P, GUIOCHON G, KACZMARSKI K, POE D P. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1366: 126-135.
- [32] TARAFDER A. *J. Chromatogr. B*, 2018, 1091: 1-13.
- [33] DOUÉ M, DERVILLY-PINEL G, POUPONNEAU K, MONTEAU F, LE BIZEC B. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407(15): 4473-4484.
- [34] MUELLER F, LOSACCO G L, NICOLI R, GUILLARME D, THOMAS A, GRATA E. *J. Chromatogr. B*, 2021, 1177: 122755.
- [35] LIU T T, CHEONG L Z, MAN Q Q, ZHENG X, ZHANG J, SONG S. *J. Chromatogr. B*, 2019, 1120: 16-23.
- [36] PARR M K, WÜST B, TEUBEL J, JOSEPH J F. *J. Chromatogr. B*, 2018, 1091: 67-78.
- [37] MATSUBARA A, UCHIKATA T, SHINOHARA M, NISHIUMI S, YOSHIDA M, FUKUSAKI E, BAMBA T. *J. Biosci. Bioeng.*, 2012, 113(6): 782-787.
- [38] WOLRAB D, FRÜHAUF P, GERNER C. *Anal. Chim. Acta*, 2017, 981: 106-115.
- [39] LEMASSON E, BERTIN S, HENNIG P, LESELLIER E, WEST C. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1472: 117-128.
- [40] MOSTAFA M E, GRINIAS J P, EDWARDS J L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2022, 33(10): 1825-1832.
- [41] AKBAL L, HOPFGARTNER G. *J. Chromatogr. A*, 2017, 1517: 176-184.
- [42] CHOLLET C, BOUTET-MERCEY S, LABOUREUR L, RINCON C, MÉJEAN M, JOUHET J, FENAILLE F, COLSCH B, TOUBOUL D. *J. Mass Spectrom.*, 2019, 54(10): 791-801.

- [43] UCHIKATA T, MATSUBARA A, FUKUSAKI E, BAMBA T. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1250: 69-75.
- [44] LÍSA M, HOLČAPEK M. *Anal. Chem.*, 2015, 87(14): 7187-7195.
- [45] YANG L, NIE H, ZHAO F, SONG S, MENG Y, BAI Y, LIU H. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412(10): 2225-2235.
- [46] DE KOCK N, ACHARYA S R, UBHAYASEKERA S J K A, BERGQUIST J. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 16993.
- [47] JIANG C, ZHANG X, YU J, YUAN T, ZHAO P, TAO G, WEI W, WANG X. *Food Chem.*, 2022, 393: 133336.
- [48] WOLRAB D, JIRÁSKO R, CÍFKOVÁ E, HÖRING M, MEI D, CHOCHOLOUŠKOVÁ M, PETERKA O, IDKOWIAK J, HRNČIAROVÁ T, KUČERA L, AHREND S, BRUMAROVÁ R, FRIEDECKÝ D, VIVO-TRUYOLS G, ŠKRHA P, ŠKRHA J, KUČERA R, MELICHAR B, LIEBISCH G, BURKHARDT R, WENK M R, CAZENAVE-GASSIOT A, KARÁSEK P, NOVOTNÝ I, GREPLOVÁ K, HRSTKA R, HOLČAPEK M. *Nat. Commun.*, 2022, 13(1): 124.
- [49] WOLRAB D, JIRÁSKO R, PETERKA O, IDKOWIAK J, CHOCHOLOUŠKOVÁ M, VAŇKOVÁ Z, HOŘEJŠÍ K, BRABCOVÁ I, VRÁNA D, ŠTUDENTOVÁ H, MELICHAR B, HOLČAPEK M. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1): 20322.
- [50] KOZLOV O, HANČOVÁ E, CÍFKOVÁ E, LÍSA M. *Anal. Chem.*, 2024, 96(3): 1320-1327.
- [51] HEGSTAD S, HAVNEN H, HELLAND A, SPIGSET O, FROST J. *J. Chromatogr. B*, 2018, 1077-1078: 7-12.
- [52] WANG R, RUNCO J, YANG L, YU K, LI Y, CHEN R, WANG Z. *RSC Adv.*, 2014, 4(90): 49257-49263.
- [53] YANG Z, XU X, SUN L, ZHAO X, WANG H, FAWCETT J P, YANG Y, GU J. *J. Chromatogr. B*, 2016, 1020: 36-42.
- [54] GOU Y, GENG Z, ZHONG L, WEI J, LIU J, DENG X, LI M, YUAN J, WANG Y, GUO L. *Biomed. Chromatogr.*, 2021, 35(12): e5211.
- [55] MILLER L. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1250: 250-255.
- [56] WILSON L J, MI C, KRAML C M. *J. Chromatogr. A*, 2020, 1634: 461661.
- [57] XIN H, DAI Z, CAI J, KE Y, SHI H, FU Q, JIN Y, LIANG X. *J. Chromatogr. A*, 2017, 1509: 141-146.

Research Progress and Application of Interfacing of Supercritical Fluid Chromatography and Mass Spectrometry

YANG Xue-Ge¹, CHEN Huai-Yi¹, PAN Xing-Yu², YANG Jin-Lei², TANG Fei^{*1}, ZHANG Si-Chun^{*2}

¹(Department of Precision Instrument, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

²(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract In the past few decades, supercritical fluid chromatography (SFC) as a supplement to liquid chromatography (LC) separation technology has attracted people's interest, especially in the combination of SFC and mass spectrometry (MS), which has shown important application prospects in metabolomics, lipidomics, and other fields. Compared to the interface of LC-MS, the interface of SFC-MS presents some unique challenges that require special solutions to be designed. This article categorizes and summarizes the existing interfaces used for SFC-MS, focuses on the impact of different interface designs on detection performance, provides the applicable characteristics of different types of interfaces, and finally briefly introduces the application progress of SFC-MS in different fields.

Keywords Supercritical fluid chromatography; Mass spectrometry; Interface; Review

(Received 2024-05-24; accepted 2024-09-05)

Supported by the National Major Scientific Instruments and Equipments Development Project of China (No. 20221310054).