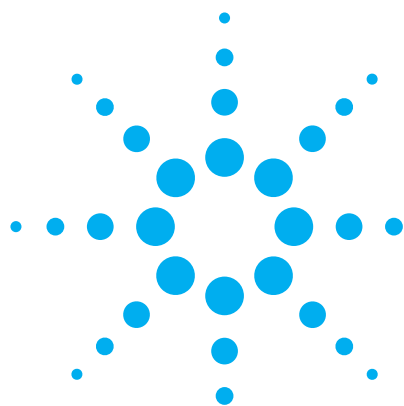




采用带有二极管阵列检测器和质谱检测器的毛细液相色谱分析低 pg 范围的磺胺药物

作者: Rainer Schuster
Christine Miller

摘要

磺胺药物是一类广谱抗菌药物, 广泛应用于治疗各种感染。磺胺药物具有两性特征, 这是因为与磺酰基连邻的酸性的N-H键, 碱性来自于对位NH₂基。采用大气压离子化(API) LC/MS中的正离子模式或负离子模式都很容易检测这些药物。对于电喷雾LC/MS, 用0.1 %的甲酸对流动相进行酸化处理以改善正离子的形成。研究证明, 电喷雾LC/MS为浓度敏感型检测器, 类似于UV-Vis检测器。对于浓度敏感型LC检测器, 柱直径减小将增加灵敏度。例如, 对于相同进样量, 若柱直径由4.6-mm 降至 0.5-mm, 则灵敏度增加近100倍。采用非常低的进样量就可以得到相同的峰高。采用新近开发的自动进样器, Agilent 1100 系列毛细液相色谱系统能够准确而重复地注射100 nl和更小的样品量。磺胺药物作为小分子分析物, 在0.5-mm内径的毛细管柱上注射100 nl样品, 得到了非常好的精密度、线性和重复性数据。采用带有二极管阵列检测器的毛细液相色谱(capLC-DAD), 可检测出小于10 pg的柱上样品。毛细液相色谱系统与单级四极杆质谱仪的高灵敏度选择性离子检测(SIM)相结合, 可检测小于1 pg的柱上样品。如此高的灵敏度正是毛细液相色谱的主要优点。

实验部分

所有实验均采用Agilent 1100 系列毛细液相色谱系统和Agilent 1100 系列LC/MSD SL, 用安捷伦化学工作站进行仪器控制、数据采集和分析。LC/MSD采用电喷雾离子化和毛细液相色谱雾化器, 该雾化器是针对毛细液相色谱的流速而优化设计的。二极管阵列检测器配有500-nl体积, 10-mm光程的流通池。分析柱为Zorbax SB-C18 150 × 0.5 mm, 3.5µm。所有化学试剂均为HPLC级或更高纯度。用10mg/l的磺胺水溶液(储备液)配制磺胺药物混合溶液。

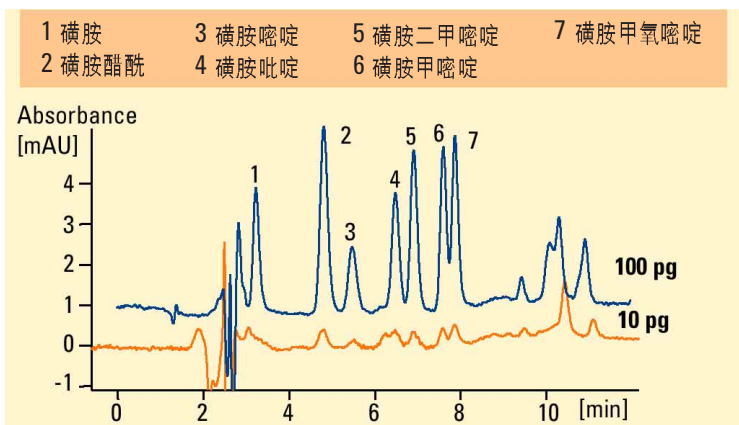


图1. 用二极管阵列检测器分析7种绝对含量为10 pg和100 pg的磺胺混合物, 进样量为100-nL。

条件

样品: 磺胺混合物
柱子: ZORBAX SB C18, 150X0.5 mm, 3.5 µm
流动相: A = 0.1% 甲酸水溶液, B = 含0.1% 甲酸的乙腈
流速: 13 µL/min
梯度: 0 分钟时15% B, 10 分钟时到95% B, 11 分钟时15% B,
进样量: 100 nL
柱箱温度: 25°C
二极管阵列检测: 278/10nm (参450/80nm) MS 条件
离子源: 电喷雾(ESI)
离子化模式: 正
毛细管电压(Vcap): 4000V
雾化器: 10psig
干燥气流速: 7L/min
干燥气温度: 150°C
SIM 选择离子:
0 min: 172.9 (磺胺sulfanilamide) 和 215.1 (磺胺脒sulfaguanidine),
3.6 min: 214.9 (磺胺醋酰sulfacetamide), 和251.1 (磺胺嘧啶sulfadiazine),
5.6 min: 250.1 (磺胺吡啶sulfapyridine), 279.1 (磺胺二甲嘧啶sulfamethazine) 和 281.1



Agilent Technologies

结果

图1所示为用二极管阵列检测器分析7种绝对含量为10 pg 和100 pg的磺胺药物的结果。信噪比为3时，检测极限为10 pg。图2A是同一分析的MS信号(总离子流色谱图)。用于MS检测的绝对进样量为10 pg 和1 pg (比用DAD时小10倍)。几种磺胺药物的保留时间很接近，故只萃取感兴趣的离子，以便实现更好的积分和校准，特别是含量较低时。此外，采用萃取离子色谱图(EICs)有助于发现混合物中微量组分。图2B为使用萃取离子色谱图分析磺胺混合物中三种组分的结果，柱上样品量为1 pg。采用含量为100 pg 的样品，进样量为100 nl，10次分析的统计说明，磺胺药物保留时间的相对标准偏差小于 0.1 %，峰面积的相对标准偏差小于2.8 % (表1)。使用MSD检测，在1 pg/μl到1 pg/μl的浓度范围内线性关系良好($r^2>0.9999$)，DAD检测器在10 pg/μl-100 ng/μl的范围内线性关系良好。即使要处理的样品量极其小的时候，毛细液相色谱系统也能给出重现性较高的定量结果，因此，当样品量有限并要求对单个样品进行多种分析时，该系统为理想选择。组合的毛细液相色谱/质谱系统提高了分析的灵敏度和专属性。

磺胺甲氧嘧啶信号: DAD1 A, Sig=278,20 Ref=450,80

运行号	保留时间[min]	含量[pg]	峰面积[mAU*s]	峰高[mAU]	峰宽	对称性因子 [min]
平均值	8.083	118.6	21.96	3.41	0.099	0.83
标准偏差	4.69e-3	2.01	0.35	0.044	8 e-4	0.01
RSD	0.058	1.70	1.62	1.29	0.857	1.70

磺胺甲氧嘧啶信号: MSD1 TIC, MS File)

Mean	8.346	116.9	2.46e5	2.47e4	0.1495	0.81
标准偏差	4.54e-3	1.87	3943	358	3.40e-3	0.01
RSD	0.054	1.60	1.60	1.44	2.27	1.46

表1: DAD和MSD的相对标准偏差(RSD)值

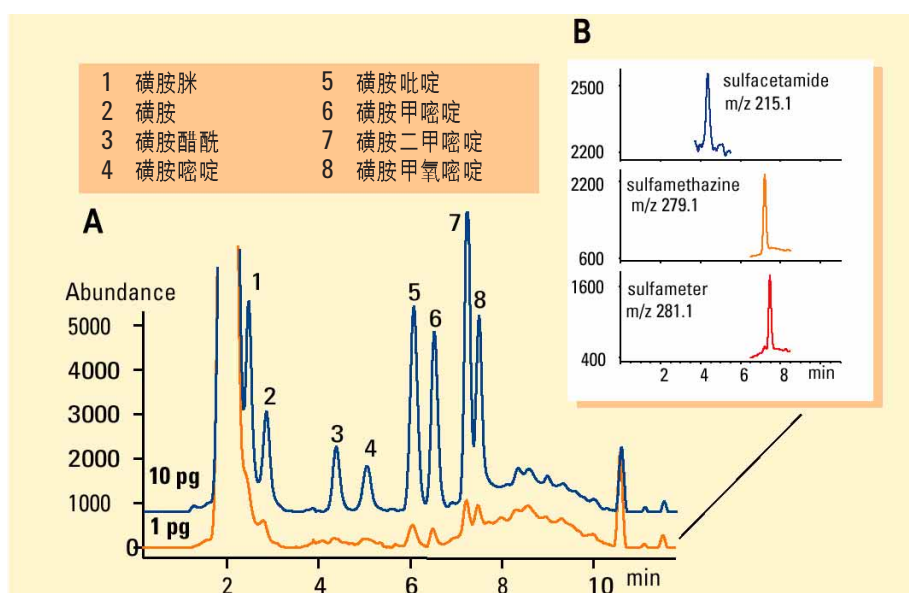


图2.

用MSD和SIM分析10 pg和1 pg的标准混合物——SIM(A)的总离子流色谱图和SIM(B)的萃取离子色谱图

仪器

Agilent 1100毛细液相色谱系统，包括

- 毛细管泵
- 微量真空脱气机
- 柱温箱
- 微量自动进样器
- 二极管阵列检测器500 nL流通池
- 安捷伦化学工作站
- Agilent 1100系列LC/MSD SL
- 电喷雾离子源
- 毛细液相色谱系统雾化器

色谱柱

- ZORBAX SB C-18, 150X0.5 mm, 3.5 μm (安捷伦部件号 5064-8262)

Rainer Schuster是安捷伦科技公司的应用化学家，德国Waldbronn。Christine Miller是安捷伦科技公司的应用化学家，美国加州Palo Alto

安捷伦科技公司生命科学与化学分析部用户服务中心免费热线: 800-820-3278

如需了解我们产品和服务的详细信息请访问我们的网站

<http://www.agilent.com/chem>.

安捷伦将在此材料包含的错误或与本材料的供应、性能或使用相关的损失不承担责任。

本出版物的信息、说明和规格如果变更，恕不另行通知。

安捷伦公司版权所有©, 2000

出版号5980-2499CHCN