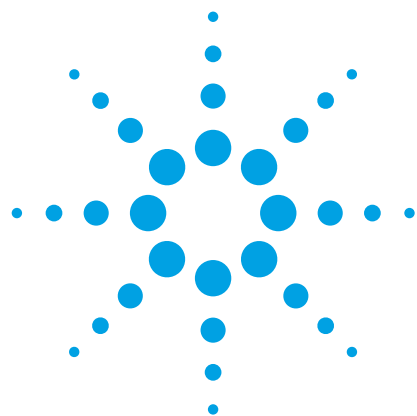




采用 Agilent 1290 Infinity 超低扩散液相色谱系统对吗啡及其代谢物进行 HILIC/MS/MS 分析

应用简报

法医与药物测试

作者

Anne E. Mack
安捷伦科技有限公司

摘要

采用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) HILIC Plus, 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱对吗啡及其三种代谢物 (去甲吗啡、吗啡-3- β -D-葡萄糖苷酸 [M3G]、吗啡-6- β -D-葡萄糖苷酸 [M6G]) 进行 LC/MS/MS 分析。M3G 和 M6G 是同分异构体, 流出时间非常接近。将它们分别用配有 0.12 mm 内径标准毛细管的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱常规系统, 以及配有 0.075 mm 内径毛细管的 1290 Infinity 液相色谱优化系统进行分析, 后者采用的是超低扩散管线工具包中的毛细管, 可以使其柱外死体积最小 (与常规配置相比, 柱外死体积减少了 60% 以上)。两种配置均与 Agilent 6410A 三重四极杆 LC/MS 系统联用。同分异构体 M3G 和 M6G 的基线色谱分离切实得到了改善, 也提高了 LC/MS/MS 的检测灵敏度, 更易于获得重现性更好的定量结果。



Agilent Technologies

前言

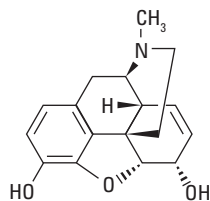
小尺寸液相色谱柱填充颗粒小，可提高工作效率，实现了更快速分离或者更高分离度。但要充分发挥小尺寸 UHPLC 柱的优势，液相色谱系统的柱外死体积必须尽量小，包括连接用的毛细管、针座、热交换器和检测器流通池（假如使用）的死体积。样品一进入液相色谱系统，即通过自动进样器流向色谱柱，然后到达检测器，最后通过检测器流通池，这些过程中都会出现色谱峰展宽。由于它们占有了系统柱外死体积的大部分，所以尽量减小这些部件的死体积对于使用小尺寸色谱柱分析尤其重要。

已有研究证明了在 LC/MS 中使用高效色谱柱的优势 [1]，以及在 1290 Infinity 液相色谱系统中使用超低扩散 0.075 mm 内径毛细管连接的优点 [2]。本报告描述了通过将超低扩散 1290 Infinity 液相色谱系统与质谱联用，在具有挑战性的同分异构体分离中，其对分离度和检测灵敏度的改善作用。目标化合物是吗啡、去甲吗啡、吗啡-3- β -D-葡萄糖苷酸（M3G）和吗啡-6- β -D-葡萄糖苷酸（M6G）（图 1）。吗啡是一种强效的阿片类镇痛剂。去甲吗啡是吗啡的主要代谢物，可用于形成阿片激动剂及拮抗剂的一种去甲基化衍生物。M3G 是吗啡的一种非活性代谢物，而 M6G 是吗啡的主要活性代谢物。M6G 是阿片受体激动剂，是吗啡发挥疼痛缓解和镇痛效应的重要物质 [3、4、5]。M3G 和 M6G 是同分异构体，流出时间接近，实现其基线色谱分离对于获得它们准确的定量分析结果至关重要。

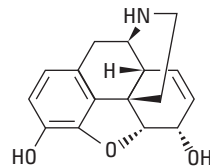
实验部分

本实验采用 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6410A 三重四极杆 LC/MS 联用系统。比较了两种仪器配置：常规配置以及超低扩散的优化配置。常规配置使用标准的 0.12 mm 内径毛细管连接液相色谱模块和质谱仪。优化配置采用安捷伦超低扩散工具包（部件号 5067-5189）中 0.075 mm 内径短毛细管和一个安捷伦液相色谱系统支架（部件号 5001-3726），如图 2 所示。

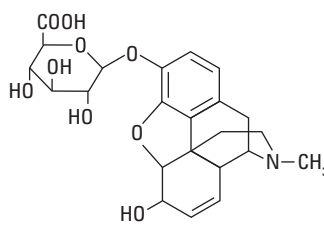
吗啡



去甲吗啡



吗啡-3- β -D-葡萄糖苷酸（M3G）



吗啡-6- β -D-葡萄糖苷酸（M6G）

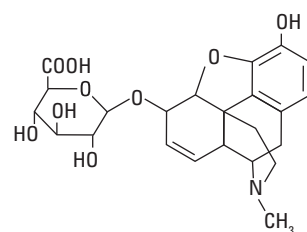
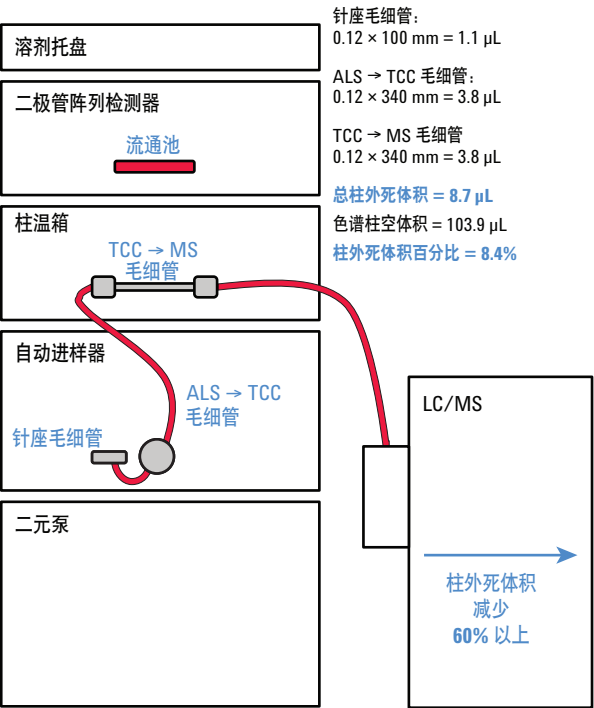


图 1. 目标化合物

分析条件

色谱柱：	Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度（RRHD）HILIC Plus, 2.1 × 50 mm, 1.8 μ m（部件号 959757-901）
流动相：	A: 10 mM NH_4HCO_2 pH 3.2 B: $\text{CH}_3\text{CN}/100$ mM NH_4HCO_2 pH 3.2 (9:1)
流速：	0.4 mL/min
梯度程序：	100% B 保持 0.25 min, 0.75 min 内 B 从 100% 至 55%
温度：	25 °C
样品：	进样 0.1 μ L 浓度均为 1 μ g/mL 的吗啡、去甲吗啡、吗啡-3- β -D-葡萄糖苷酸和吗啡-6- β -D-葡萄糖苷酸乙腈溶液
MS 离子源：	ESI (+)，毛细管电压 4000 V，干燥气温度 250 °C，流速 11 L/min，雾化器压力 30 psi
MS 数据采集：	动态 MRM 模式（dMRM），EMV 增益 200 V，MS 周期时间 40 ms，各化合物 transitions 见表 1
软件：	Agilent MassHunter B.03.01、B.02.00 和 B.03.01 版分别用于数据采集、定性和定量分析

常规 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统



优化的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统

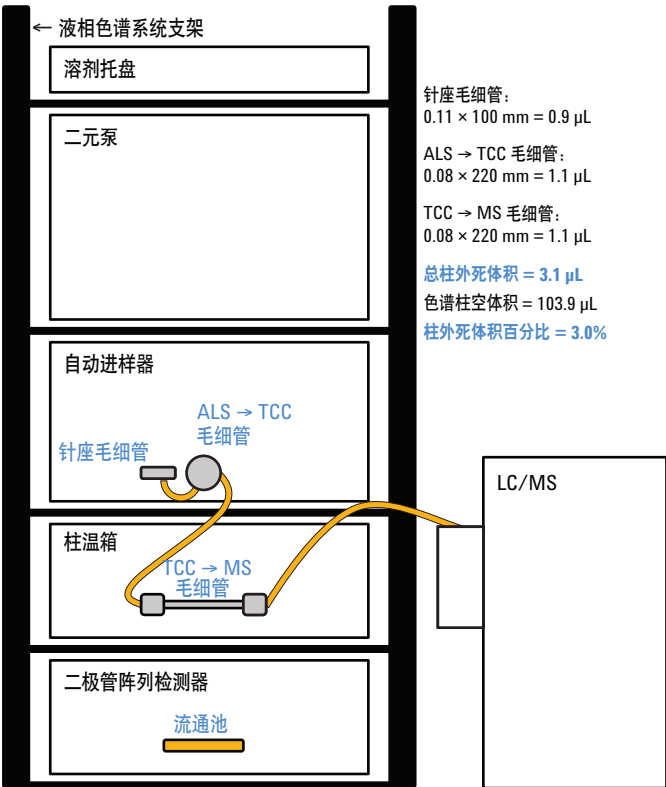


图 2. Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统（左）及其超低扩散优化配置（右）的比较；柱外死体积减少了 60% 以上

表 1. 吗啡及其代谢物分析的质谱 MRM transitions

化合物名称	母离子	子离子	碎裂电压	碰撞能量
去甲吗啡	272	152	170	65
去甲吗啡	272	165	170	35
吗啡	286	152	170	65
吗啡	286	165	170	35
M6G	462	286	170	30
M6G	462	201	170	45
M3G	462	286	170	30
M3G	462	201	170	45

所有 4 种分析物的甲醇溶液均购自 Cerilliant 公司，并用乙腈稀释至适当浓度。乙腈购自 Honeywell 公司。甲酸铵和甲酸购自 Sigma Aldrich 公司。实验用水为 18 MΩ Milli-Q 水。

结果与讨论

安捷伦超低扩散工具包中 0.075 mm 内径窄径毛细管代替标准 0.12 mm 内径毛细管用于 1290 Infinity 液相色谱系统上部件之间的连接（ALS→TCC 毛细管，TCC→MS 毛细管和针座毛细管 [0.11 mm 内径]），通过在安捷伦液相色谱系统支架上重新摆放液相色谱模块进一步优化了液相色谱配置。1290 Infinity 液相色谱系统的二元泵通常因其重量将它放到底部，而采用液相色谱支架就可以将泵安全地放到支架顶端（从顶端到底端依次为：溶剂托盘、二元泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器[假如使用]）。这将实现最短的毛细管连接。更短的 220 mm 长毛细管连接自动进样器阀和色谱柱进口，以及色谱柱出口到质谱（常规配

置为 340 mm 长毛细管）。在本分析中，二极管阵列检测器和柱热交换器都没有必要使用，因此，将它们从样品流路中移除，进一步降低了样品扩散。结果表明，与常规 1290 Infinity 液相色谱系统配置（8.7 μL）相比，优化的配置（3.1 μL）使柱外死体积降低了 60% 以上。常规配置和超低扩散的 1290 Infinity 液相色谱系统柱外死体积对比可由图 2 直观地看到。

图 3 展示了采用 1.8 μm Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱 LC/MS/MS 分析吗啡的两张总离子流色谱图，可用于比较采用常规 1290 Infinity 液相色谱系统及其优化超低扩散系统两种配置的分析结果。较高、较窄的色谱峰很显然属于低扩散 LC/MS 系统。由于样品流路有较低的死体积，组分的保留时间在低扩散系统上略有下降。

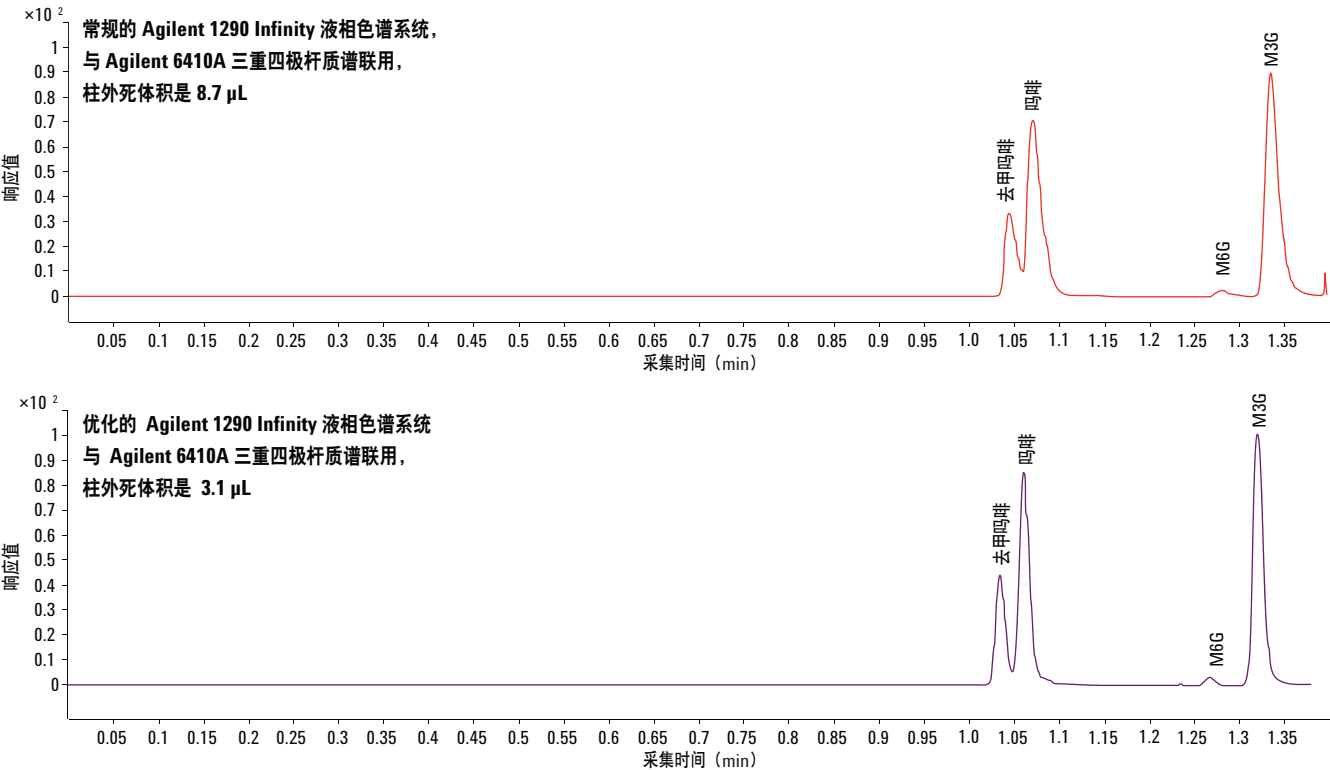


图 3. LC/MS/MS 分析吗啡的总离子流色谱叠加图，表明 LC/MS 系统减少了超过 60% 的柱外死体积，可获得更高、更尖锐的峰形，并且改善了所有峰的分离度和质谱检测灵敏度

图 4 显示的提取 MRM 色谱图强调了通过降低 LC/MS 分析中的系统扩散来优化 UHPLC 色谱柱性能的重要性。一般来讲，质谱仪可以分离共流出的组分峰，但由于 M6G 和 M3G 是同分异构体，有相同的定量和定性离子转换通道，如表 1 所示，这就要求它们必须达到基线色谱分离。由每种化合物的全扫描图谱选择的相应定量离子更好显现了小的 M6G 峰，它比其它三种化合物的检测灵敏度都低很多（见图 3 中的 TICs）。尽管 M3G 和 M6G 在常规 LC/MS 上即可实现很好分离，但柱外死体积的减小还是进一步改善了其分离度，从 1.99 达到 2.73。优化的 LC/MS 系统充分展现出亚 2 μm UHPLC 色谱柱的分离能力和较高的分析效率。减少超过 60% 柱外死体积使这两个峰的分离度提高了 37%。检测灵敏度（信噪比）也提高了 30%。

结论

高效的 Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱，结合超低扩散 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，成功实现了吗啡、去甲吗啡、吗啡-3- β -D-葡萄糖苷酸和吗啡-6- β -D-葡萄糖苷酸的 LC/MS/MS 分离。减小系统扩散能够改善这两种同分异构体的吗啡代谢物的基线分离，并提高其检测灵敏度，从而更容易获得重现性更好的定量分析结果。

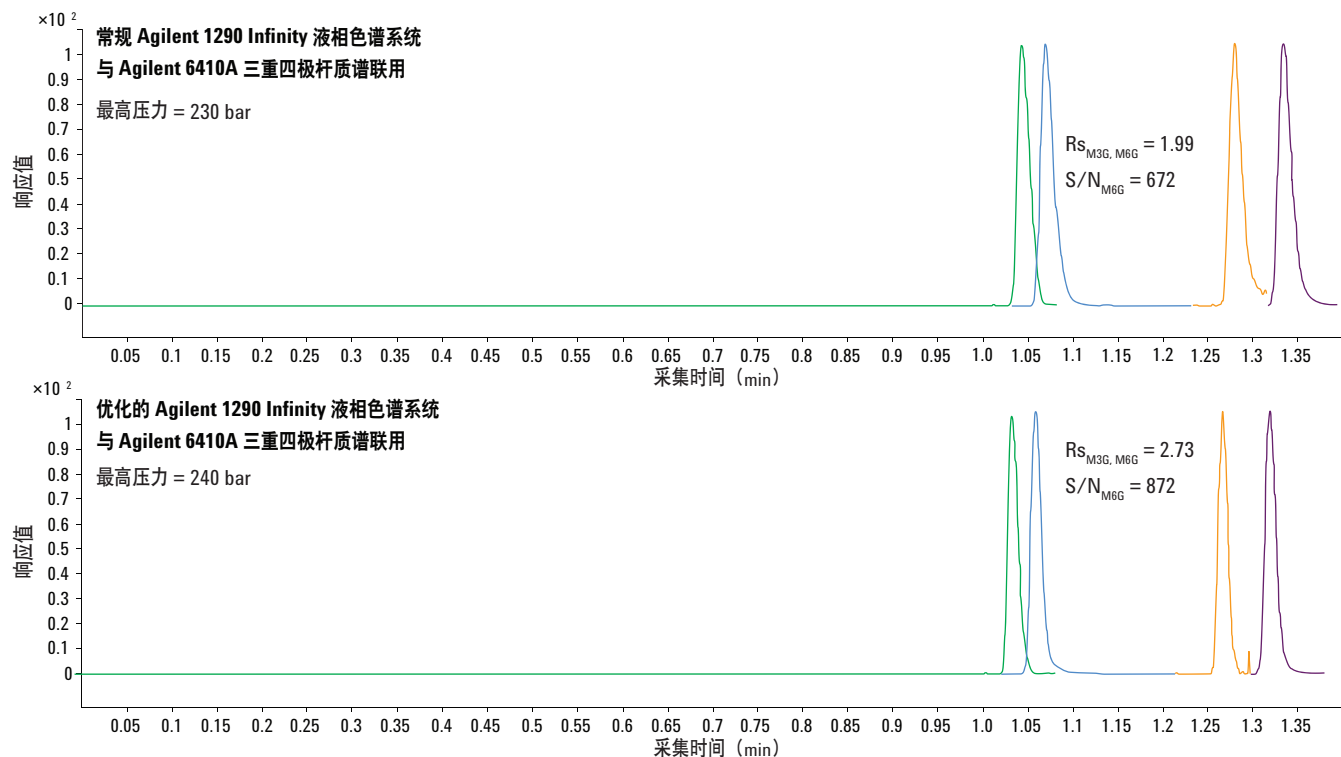


图 4. 吗啡分析的 LC/MS/MS 提取 MRM 色谱图表明，LC/MS 系统柱外死体积减少超过 60%，改善了 M3G 和 M6G 这对同分异构体的分离度，积分更准确，同时提高了 M6G 的 LC/MS 检测灵敏度

参考文献

1. A.Mack.在 LC/MS 分析中充分使用安捷伦高效柱, 应用简报, 安捷伦科技有限公司。出版号 5990-8623CHCN (2012)。
2. 通过增强 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散能力, 优化 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能, 应用简报, 安捷伦科技有限公司。出版号 5990-9502CHCN, (2011)。
3. G. J. Kilpatrick, T. W. Smith. *Med. Res. Rev.* **25**, 521 (2005).
4. E. L. van Dorp, R. Romberg, E. Sarton, J. G. Bovill, A. Dahan. *Anesth. Analg.* **102**, 1789 (2006).
5. A. M. Trescot, S. Datta, M. Lee, H. Hansen. *Pain Physician* **11**, S133 (2008).

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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, 2012

2012 年 4 月 12 日, 中国印刷

5991-0208CHCN



Agilent Technologies