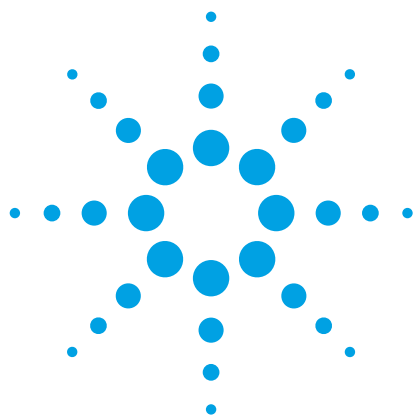




采用配备安捷伦 ZORBAX RRHD 色谱柱的 UHPLC/MS 对比吗啡的 HILIC 和 RPLC 分析

应用报告

法医学与药物测试

作者

Anne E. Mack
安捷伦科技有限公司

摘要

采用 UHPLC/MS 对吗啡及其 3 种代谢产物（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]）进行反相液相色谱（RPLC）和亲水作用色谱（HILIC）分析，并对比它们的质谱检测灵敏度。比较中使用了两支安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度（RRHD）色谱柱，其中一支安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱用于 RPLC 分析方法，另一支安捷伦 ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱用于 HILIC 分析方法。两种方法均采用配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行分析。两种方法都采用等度洗脱，以乙腈/醋酸铵缓冲液做流动相。由于采用更易挥发的富含乙腈的溶液做流动相，因此 ESI-MS 离子源可实现更高效的喷雾化和去溶剂化，从 M6G 色谱峰最低检测灵敏度时的信噪比计算可见，HILIC 可实现更高的质谱检测灵敏度。

前言

亲水作用色谱（HILIC）在液相色谱中日益普及，尤其受关注的是其保留和分离极性分析物的能力——这些化合物采用常规反相液相色谱（RPLC）方法分析时常会失败。该新颖的色谱方法由于使用水作为强洗脱溶剂，因此有独特的保留机理。由于 HILIC 使用高比例有机溶剂作为流动相，因此在 LC/MS 检测灵敏度方面与传统的 RPLC 相比具有明显优势。高比例有机溶剂流动相与传统的 RPLC 流动相比挥发性更强，使 HILIC 更适合与质谱联用。



Agilent Technologies

HILIC 被广泛应用于极性分子的分析。本文采用 LC/MS 对吗啡及其 3 种代谢产物进行分析, 结果表明 HILIC 比 RPLC 有更高的质谱检测灵敏度。目标化合物为吗啡、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)。吗啡为一种强效的阿片类镇痛剂。去甲吗啡为吗啡的主要代谢物, 它是一种吗啡的去甲基化衍生物, 可用作阿片受体激动剂和拮抗剂。M3G 为吗啡的非活性代谢物, 而 M6G 为主要的活性代谢物。M6G 作为激动剂作用于阿片受体, 大大增强了吗啡缓解多种疼痛和镇痛的作用。

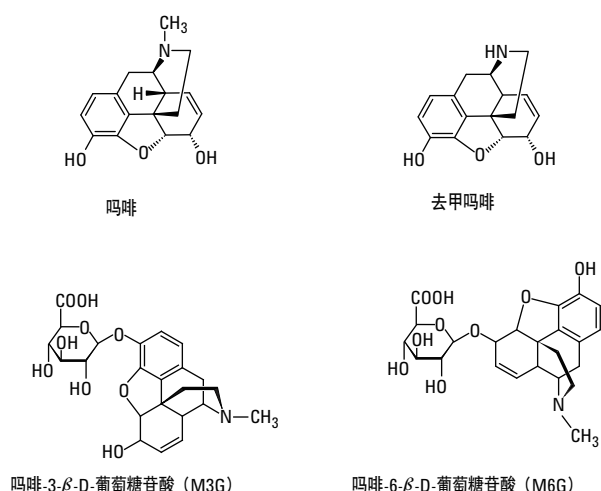


图 1. 目标化合物

实验部分

本实验采用配有 Agilent 6410A 三重四极杆质谱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统。使用安捷伦超低扩散套装 (部件号 5067-5189) 中 0.075 mm 内径的短毛细管和安捷伦液相色谱系统支架 (部件号 5001-3726) [4] 来优化系统安装, 实现最小的柱外死体积。

所有 4 种分析物的甲醇溶液均购自 Cerilliant 公司, 并用乙腈或水稀释至所需浓度。乙腈购自 Honeywell 公司。甲酸铵和甲酸购自 Sigma Aldrich 公司。所用水为 18 M Ω Milli-Q 水。

分析条件

色谱柱:	安捷伦 ZORBAX RRHD HILIC Plus, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μ m (部件号 959758-901); 安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μ m (部件号 959758-902); 安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 3.5 μ m (部件号 959793-902); 安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 5 μ m (部件号 定制)
流动相:	A: 10 mM NH ₄ HCO ₂ pH 3.2 B: CH ₃ CN/100 mM NH ₄ HCO ₂ pH 3.2 (9:1) HILIC 70% B 等度洗脱; RPLC 10% B 等度洗脱
流速:	0.4 或 1.0 mL/min
温度:	25 $^{\circ}$ C
样品:	进样 2 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-葡萄糖苷酸溶液; HILIC 样品用 CH ₃ CN 制备; RPLC 样品用水制备
质谱离子源:	ESI(+), 毛细管电压 4000 V、干燥气温度、流速和喷雾器压力随流动相流速变化, 详细说明见表 1
质谱数据采集:	选择离子模式 (SIM)、EMV 增益 200 V、MS 驻留时间随流动相流速变化, 详细说明见表 1, 化合物特征参数的详细信息见表 2
软件:	分别采用安捷伦 MassHunter B.03.01、B.02.00 和 B.03.01 版进行数据采集、定性和定量分析

表 1. 不同流速下吗啡分析的质谱参数

	0.4 mL/min	1.0 mL/min
离子源	ESI+	ESI+
EMV 增益	200 V	200 V
MS 驻留时间	20 ms	10 ms
干燥气温度	250 $^{\circ}$ C	325 $^{\circ}$ C
干燥气流速	11 L/min	12 L/min
雾化器压力	30 psi	55 psi
毛细管电压	4000 V	4000 V

表 2. 吗啡质谱分析的 SIM 参数

	M+H	碎裂电压
吗啡	286	170
去甲吗啡	272	170
吗啡-3- β -D-葡萄糖苷酸	462	170
吗啡-6- β -D-葡萄糖苷酸	462	170

结果与讨论

采用 UHPLC 色谱柱改善 RPLC/MS 的检测灵敏度

如图 2 所示，与传统的 5 μm 色谱柱对比，新型 1.8 μm UHPLC 色谱柱在色谱性能上展现出一种实质上的改善，尤其是在峰宽上的改善。吗啡及其代谢物的 RPLC 分析中，与采用传统的 5 μm 色谱柱相比，由于采用的亚 2 μm UHPLC 色谱柱的高柱效，我们得到了极窄的色谱峰。每种分析物分析的方法参数均相同，包括固定相的化学性质；唯一不同的参数是填料粒径。本例显示了在满屏量程时，每种化合物单独的提取离子流色谱图（EIC）的叠加图。所有粒径的 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱均保持了相同的选择性，因此可在必要时轻松进行方法扩展和转换。

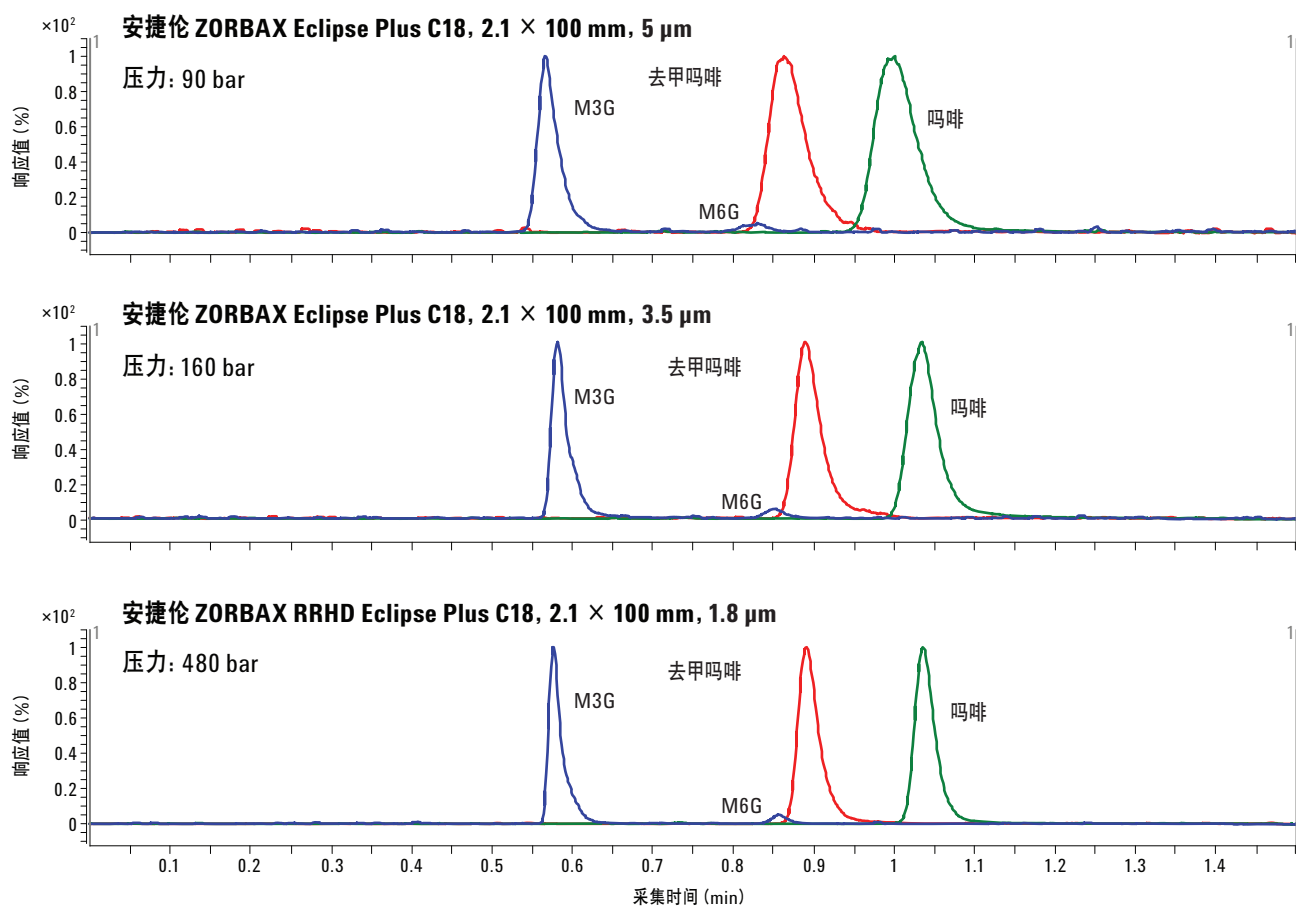


图 2. 与传统的 5 μm 色谱柱相比，采用高效的 1.8 μm UHPLC 色谱柱可改善峰宽，并保持相同的选择性；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

M3G 和 M6G 是同质异位素，因此质量数相同并均在 m/z 462 时被检测到。当将这些 EIC 谱图调整到相同的坐标轴刻度时（图 3），可看出更小粒径色谱柱不仅可以明显改善峰宽，而且峰高也有差异。比较 M6G 色谱峰最低检测灵敏度时的信噪比，显示与传统的 $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱相比，高效的亚 $2\ \mu\text{m}$ UHPLC 色谱柱可以提高至 5 倍的质谱检测灵敏度。

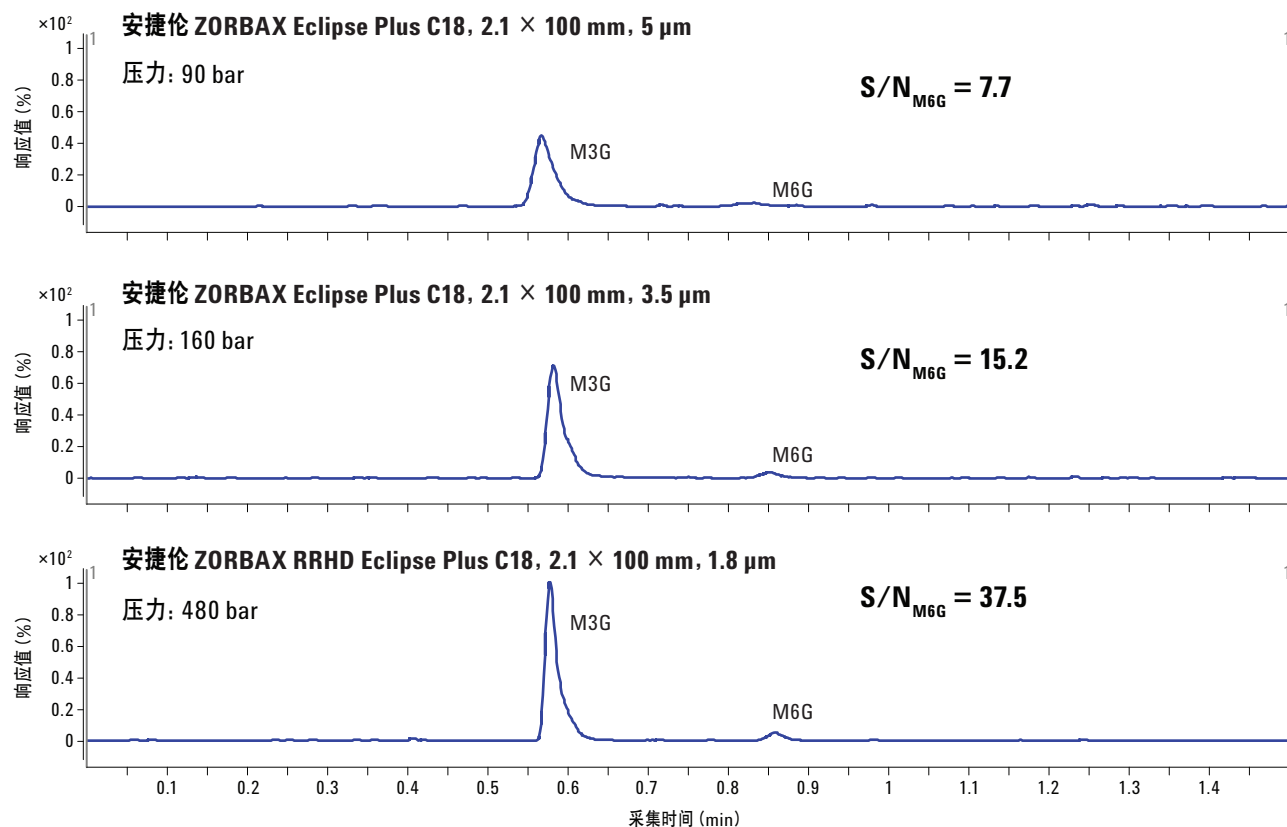


图 3. 与传统的 $5\ \mu\text{m}$ 色谱柱相比，采用高效的 $1.8\ \mu\text{m}$ UHPLC 色谱柱可提高至 5 倍的质谱检测灵敏度（信噪比），且保持相同的选择性；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

采用 HILIC 模式提高 LC/MS 的检测灵敏度

鉴于采用 UHPLC 色谱柱与传统的 LC 色谱柱相比在某些方面可能的改进，我们探究了 HILIC 模式对质谱检测灵敏度的影响。图 4 展示了采用 RPLC 和 HILIC 平行进行相似分析后的色谱图。方法参数尽可能地保持一致，以避免不恰当地对比 2 种分析。RPLC 分析使用 10% 乙腈，而 HILIC 分析使用 70% 乙腈。样品溶剂根据情况选择相应的弱洗脱溶剂；HILIC 样品溶剂使用乙腈，RPLC 样品溶剂使用水，以消除由于强洗脱溶剂进入二者中任何一个分析体系都可能引起的色谱峰扭曲。为消除质谱检测时

由于盐浓度不同产生的差异，流动相水和有机部分的甲酸铵浓度均为 10 mM。每种分析均采用等度洗脱，组分保留因子相似，以避免由于梯度聚焦或柱效不同产生的差异。这些满屏量程的 EIC 叠加色谱图展示了 C18 和 HILIC 色谱柱选择性的不同。HILIC 的选择性与 C18 的互补，并且几乎是相反的。一个有趣的现象是与 C18 相比，HILIC Plus 色谱柱保留了所有的化合物，即便此时 C18 是在建议的最低有机/水相比比例流动相下运行的。C18 在较少的有机相下会引起固定相塌陷或柱脱水，从而导致结果重现性或者色谱图变差。

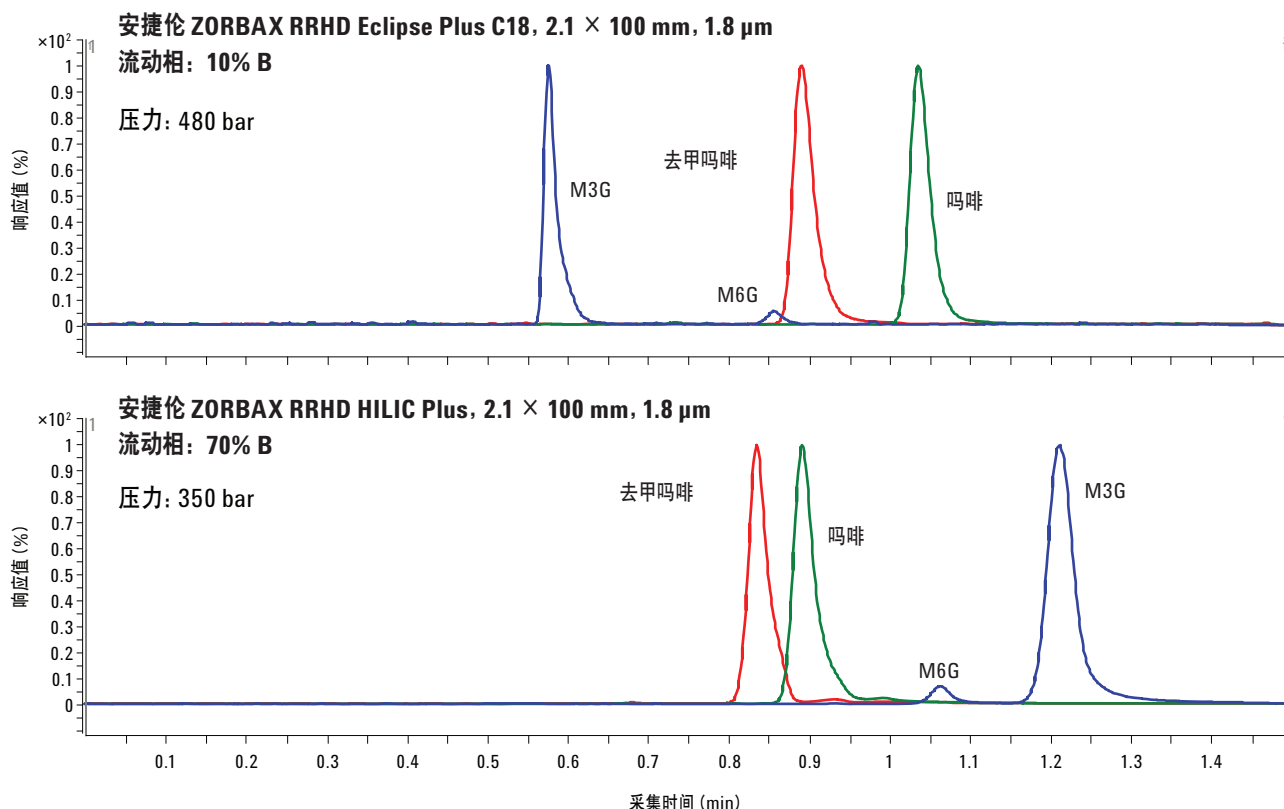


图 4. 安捷伦 ZORBAX RRHD HILIC Plus 色谱柱呈现出与安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱互补的选择性，二者的洗脱顺序几乎是相反的；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

如图 5 所示，当将吗啡葡萄糖苷酸代谢物谱图放大到相同刻度时，可看到 C18 色谱柱和 HILIC 色谱柱不仅是选择性不同，而且 HILIC 模式下质谱的信号更强。与 C18 色谱柱 10% 乙腈流动相比，HILIC Plus 色谱柱使用了 70% 乙腈流动相，其溶剂更易挥发，在 ESI-MS 离子源内可更高效地喷雾和去溶剂化，从而可产生更强的质谱信号。

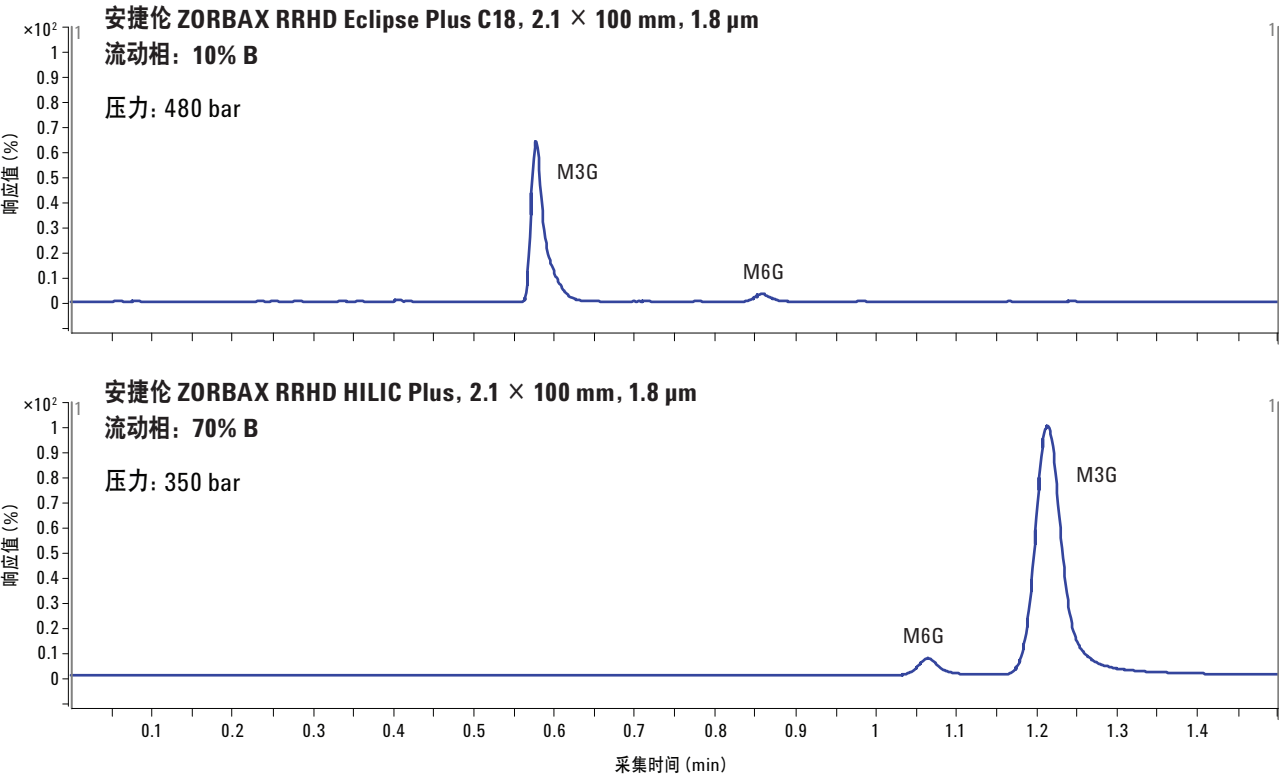


图 5. 与 RPLC 模式相比，HILIC 模式在 ESI-MS 离子源内可更高效地喷雾和去溶剂化，从而可产生更强烈的质谱信号；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

仔细观察 M6G 色谱峰可发现 HILIC 模式不仅增强了信号强度，同时也减小了基线噪音。图 6 显示与类似的 UHPLC C18 方法相比，HILIC 模式下 M6G 的信噪比提高了四倍。

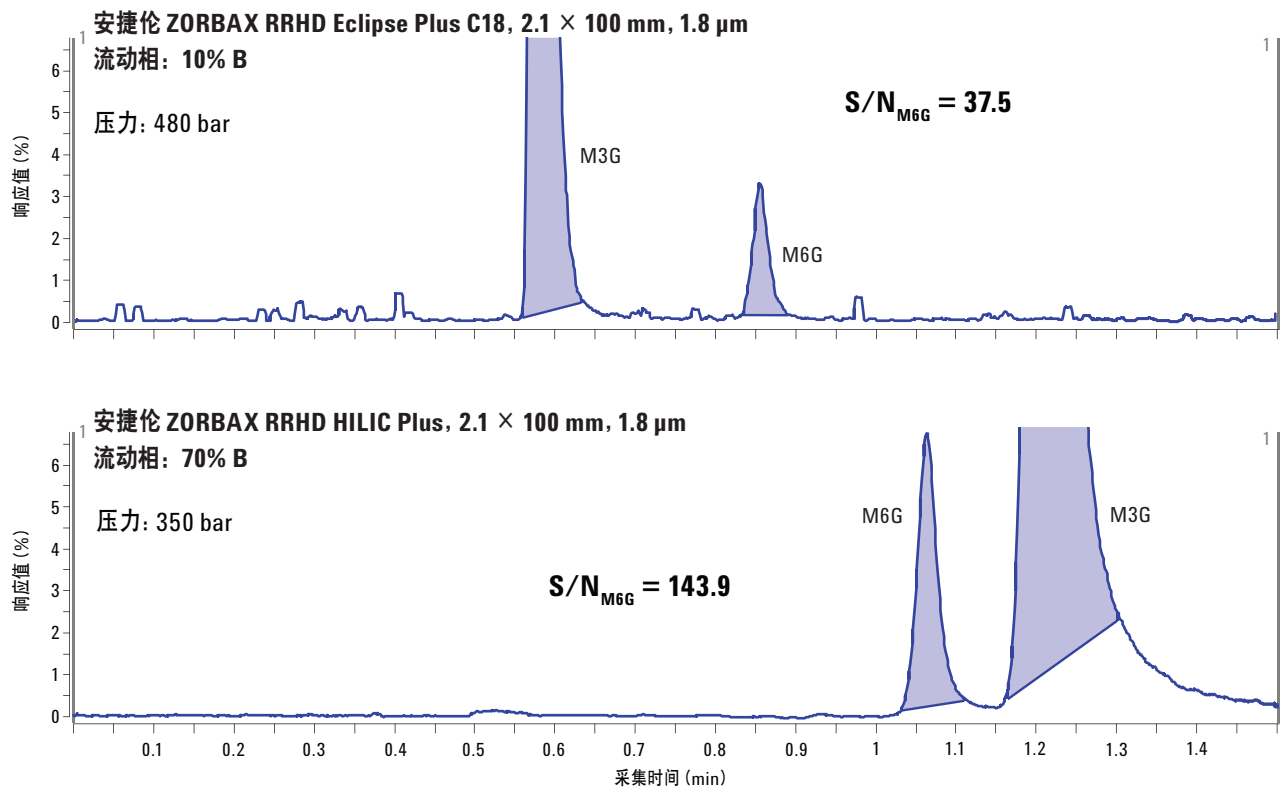


图 6. 与 RPLC 模式相比，HILIC 模式在 ESI-MS 离子源内可更高效地喷雾和去溶剂化，从而可产生较小的基线噪音和较强的质谱信号，使检测灵敏度提高了四倍；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

为展现 UHPLC/MS 与 HILIC 模式结合的效果，可以将 1.8 μm HILIC Plus 色谱柱与早期 RPLC 模式下使用的 5 μm 色谱柱进行比较。可以再次看到，当使用低效的 5 μm 色谱柱时，RPLC 色谱图显示出较大的基线噪音，而采用 1.8 μm HILIC 色谱柱时，活性吗啡代谢物 M6G 的信噪比提高至 20 倍，如图 7 所示。

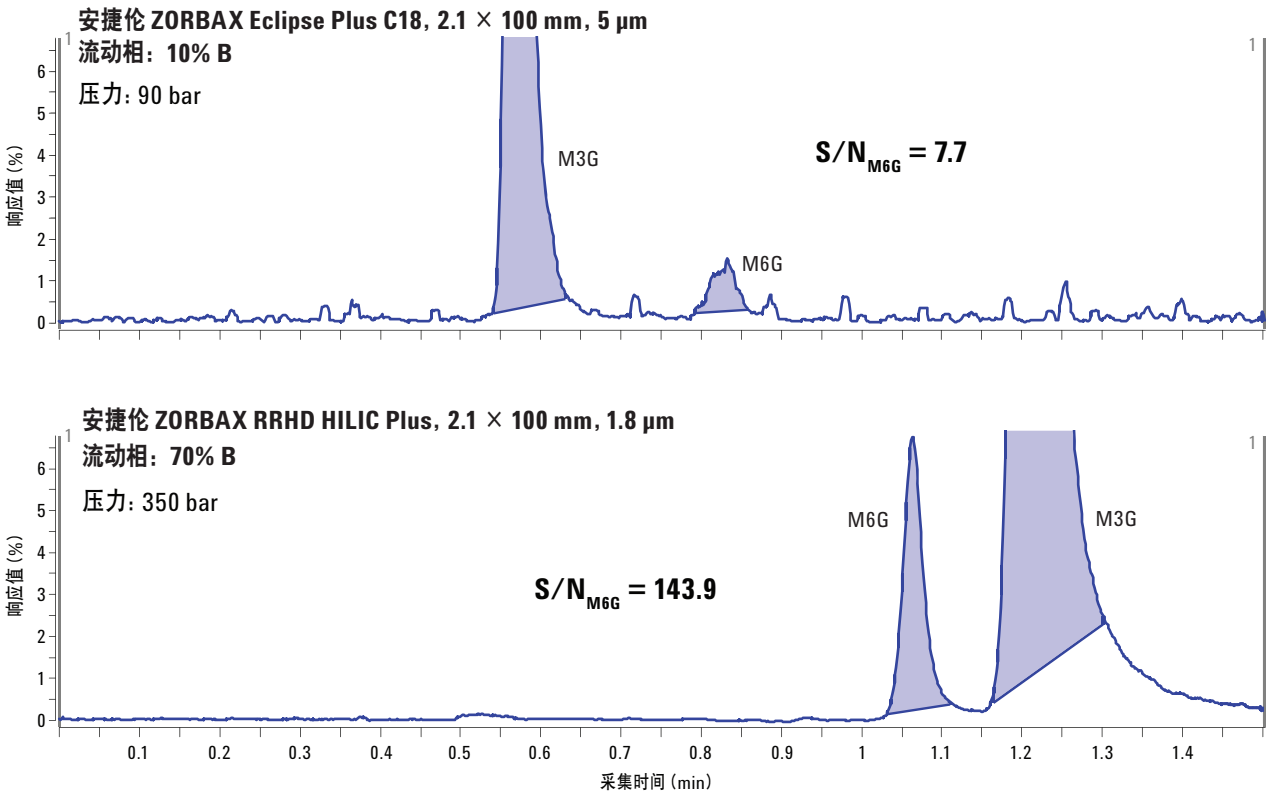


图 7. 使用 UHPLC 色谱柱的 HILIC 模式与采用传统 LC 色谱柱的 RPLC 模式相比，质谱检测的灵敏度提高至 20 倍；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

通过提高流动相流速可充分利用 UHPLC 色谱柱和 LC 系统耐受 1200 bar 压力的优势。这点显示出 HILIC 模式不仅比采用传统色谱柱的 RPLC 模式检测灵敏度更高，而且保证检测灵敏度提高 10 倍以上时分析时间将缩短一半以上（图 8）。HILIC 模式下该 UHPLC 分析的检测灵敏度低于先前的 HILIC 分析，因为流速从先前最佳的 0.4 mL/min 提升到了 1 mL/min，这将会造成其柱效部分下降。

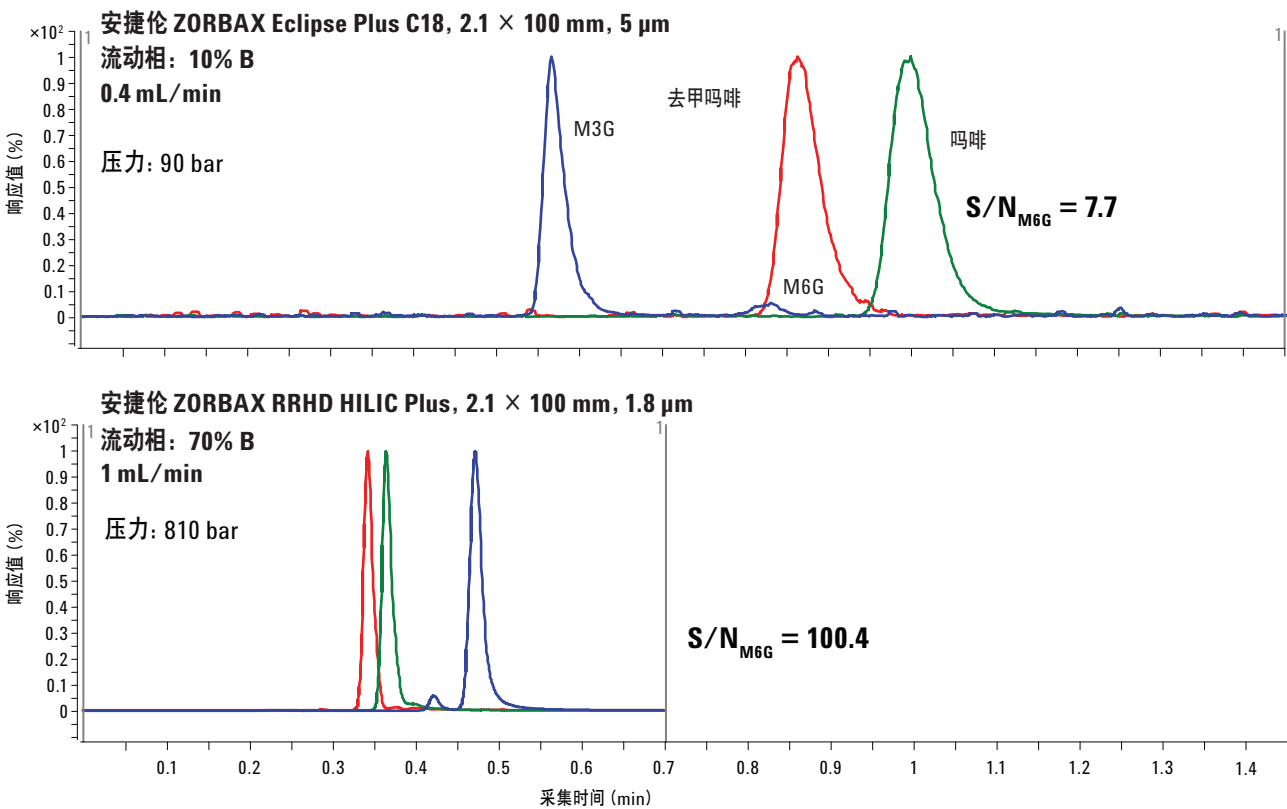


图 8. 使用 UHPLC 色谱柱的 HILIC 模式与使用传统 LC 色谱柱的 RPLC 模式相比，分析时间减半，质谱检测的灵敏度提高了 10 倍以上；详细的 LC/MS 方法参数见实验部分

结论

吗啡及其代谢物的这些分析表明，使用高效亚 2 μm UHPLC 色谱柱比使用传统的 5 μm 色谱柱检测灵敏度提高了 5 倍。此外，HILIC 模式由于使用了较大有机溶剂比例的挥发性流动相，因此它与 RPLC 模式下相似的 UHPLC 分析相比，ESI-MS 效率提高了 4 倍。与使用传统 5 μm 色谱柱的 RPLC 模式相比，结合使用 UHPLC 色谱柱和 HILIC 模式的优势，质谱检测灵敏度提高了 20 倍。此外，UHPLC 色谱柱和 LC 系统可通过提高流速缩短分析时间，同时可使检测灵敏度提高 10 倍以上。

参考文献

1. G. J. Kilpatrick, T. W. Smith. *Med. Res. Rev.* **25**, 521 (2005).
2. E. L. van Dorp, R. Romberg, E. Sarton, J. G. Bovill, A. Dahan. *Anesth. Analg.* **102**, 1789 (2006).
3. A. M. Trescot, S. Datta, M. Lee, H. Hansen. *Pain Physician* **11**, S133 (2008).
4. A. Mack. *Optimizing Performance of an Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Column by Enhancing an Agilent 1290 Infinity LC System for Ultra-Low Dispersion*. (通过增强 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散能力优化安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能)，应用报告，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-9502EN (2011)。

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解我们产品和服务的更多信息，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

5991-0245CHCN



Agilent Technologies