

HPLC 方法开发系统在 LCMS 分析方法建立中的应用

LCMSMS-136

摘要：使用岛津 HPLC 方法开发系统同三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用，进行 32 种 β -受体激动剂样品液质联用分析方法建立过程中的流动相考察。实验中在 Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. \times 75 mm L., 1.6 μ m 色谱柱上进行 5 种流动相在通用梯度条件下对样品中各化合物的保留行为以及质谱响应情况的影响，通过谱图对比综合考虑，2 mM NH₄Ac-MeOH 为适合该样品分析的流动相体系。

关键词：超高效液相色谱 方法开发系统 β -受体激动剂 三重四极杆质谱

液质联用 (LCMS) 技术问世于 20 世纪 70 年代，该技术体现了色谱和质谱优势的互补，将色谱对复杂样品的高分离能力，与 MS 具有高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来，在药物分析、食品分析和环境分析等许多领域得到了广泛的应用。

以 ESI (电喷雾电离) 方式为主的大气压电离方式是现代液质联用技术中的主要手段，从大极性到中等极性，从挥发性物质到非挥发性物质，从 100 以内的小分子到大分子蛋白质，都可以使用该手段予以检测。然而就 ESI 方式的离子化效果而言，流动相 (溶剂) 的选择对化合物质谱响应具有显著影响，因此选择合适的流动相类型对于 LCMS 分析方法开发至关重要。

岛津 HPL 方法开发系统是一套用于液相分析条件探索的自动化装置，它利用工作站控制自动进行色谱柱切换和流动相选择而实现了原本需要人力干预才能完成的分析方法开发过程。专用 Method Scouting Solution 工作站将繁琐的条件变化设置过程大为简化，图形界面易于操作和理解。

本实验通过岛津 HPLC 方法开发系统同三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用，对 32 种 β -受体激动剂样品的 LCMS 分析方法进行实验，重点考察不同流动相对化合物质谱响应的影响，从而通过该系统确定适用的流动相体系。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系

统。具体配置为 LC-30AD \times 2 (输液泵，配四元低压梯度比例阀)，DGU-20A_{5R} \times 2 (在线脱气机)，SIL-30ACMP (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱，含 FCV-34AH (高压流路切换阀))，LCMS-8040 (三重四极杆液质联用仪)，CBM-20A (系统控制器)，Method Scouting Solution Ver. 1.00 (方法开发系统工作站)，) LabSolutions Ver. 5.53 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2 mm i.d. \times 75 mm L., 1.6 μ m

流动相：A1 相 - 水

A2 相 - 0.1% 甲酸水溶液

A3 相 - 2 mM 醋酸铵水溶液

B1 相 - 乙腈

B2 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

质谱仪：LCMS-8040

离子源：ESI

加热模块温度：400°C

脱溶剂管温度：250°C

雾化气流速：氮气 3 L/min

干燥气流速：氮气 20 L/min

碰撞气：氩气

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

扫描模式：MRM (+)

MRM 参数：见表 1



图1 方法开发系统与LCMS-8040联用

表1 MRM参数

#	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	西马特罗	219.80	202.00*	-23	-9	-20
			160.20	-23	-14	-30
2	特布他林	226.00	152.00*	-23	-15	-29
			125.00	-23	-22	-22
3	沙丁胺醇	240.00	148.00*	-25	-18	-28
			222.00	-25	-9	-22
4	齐帕特罗	262.00	244.00*	-27	-12	-25
			185.00	-27	-23	-18
5	麻黄碱	166.00	148.05*	-30	-15	-29
			91.00	-30	-30	-17
6	异丙喘宁	234.00	160.05*	-26	-13	-17
			143.00	-26	-24	-27
7	西布特罗	234.00	160.20*	-25	-13	-30
			143.10	-25	-24	-26
8	非诺特罗	304.00	107.00*	-22	-32	-20
			135.00	-22	-18	-25
9	利托君	288.00	270.10*	-20	-12	-19
			121.05	-20	-22	-22
10	克仑塞罗	318.70	301.10*	-15	-15	-15
			203.00	-15	-15	-15
11	纳多洛尔	310.00	254.10*	-22	-17	-28
			201.00	-22	-22	-21
12	克伦普罗	262.90	245.10*	-27	-9	-25
			132.20	-27	-24	-24

13	氯丙那林	213.80	154.10 [*]	-22	-15	-28
			196.20	-22	-10	-19
14	克伦特罗	276.90	203.00 [*]	-29	-15	-20
			259.20	-29	-10	-17
15	美托洛尔	268.00	116.10 [*]	-30	-19	-21
			72.05	-30	-21	-28
16	妥布特罗	228.00	154.00 [*]	-24	-16	-28
			119.10	-24	-28	-21
17	溴布特罗	366.90	292.90 [*]	-17	-19	-30
			349.00	-17	-13	-24
18	马布特罗	310.80	237.10 [*]	-30	-16	-24
			217.10	-30	-25	-21
19	班布特罗	368.10	294.20 [*]	-17	-20	-30
			72.15	-17	-35	-27
20	瑞普特罗	390.00	304.00 [*]	-28	-29	-21
			317.05	-28	-25	-23
21	丙卡特罗	291.00	273.05 [*]	-30	-11	-19
			203.00	-30	-15	-21
22	克伦异磅特罗	291.00	273.05 [*]	-30	-11	-30
			203.00	-30	-15	-21
23	马喷特罗	324.80	237.10 [*]	-26	-17	-24
			217.10	-26	-26	-22
24	克伦潘特	327.00	239.00 [*]	-23	-15	-26
			219.00	-23	-26	-23
25	莱克多巴胺	302.00	284.30 [*]	-30	-12	-19
			164.20	-30	-16	-30
26	苯氧丙酚胺	302.00	284.20 [*]	-30	-14	-30
			107.00	-30	-29	-18
27	普萘洛尔	260.00	116.10 [*]	-18	-17	-21
			183.05	-18	-17	-19
28	倍他洛尔	308.00	116.10 [*]	-22	-20	-21
			72.05	-22	-23	-29
29	福莫特罗	345.00	327.10 [*]	-27	-13	-23
			121.05	-27	-32	-22
30	苯乙醇胺 A	344.80	327.20 [*]	-16	-14	-21
			150.20	-16	-23	-27

31	沙美特罗	416.00	398.30*	-19	-14	-27
			380.30	-19	-20	-26
32	喷布特罗	292.00	236.15*	-30	-16	-26
			133.05	-30	-25	-25

*表示为定量离子

表2 9种β-受体激动剂内标化合物MRM参数

#	化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	西马特罗-D7	227.00	209.15	-30	-9	-22
2	西布特罗-D9	243.00	151.05	-30	-18	-28
3	沙丁胺醇-D3	243.00	151.20	-29	-17	-27
4	克伦普罗-D7	270.00	252.05	-30	-10	-28
5	克伦特罗-D9	285.80	204.00	-13	-16	-21
6	马布特罗-D9	320.00	238.00	-30	-18	-25
7	马喷特罗-D11	336.00	238.00	-30	-17	-25
8	莱克多巴胺-D3	305.10	287.00	-21	-12	-20
9	沙美特罗-D3	419.00	401.25	-30	-15	-29

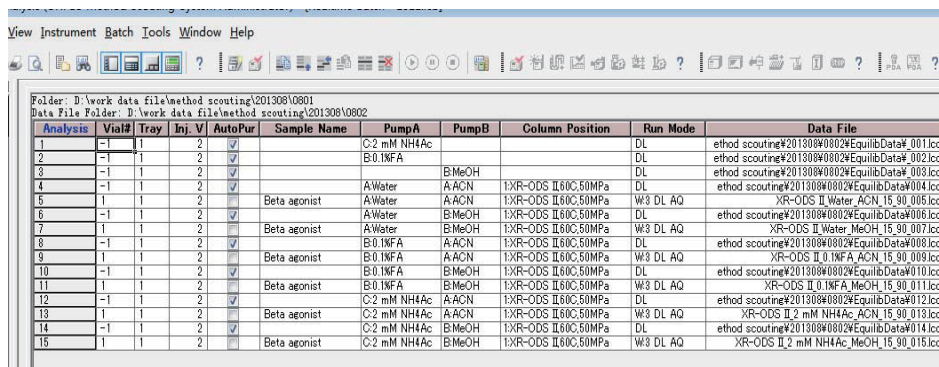
结果与讨论

表1所示的液相梯度时间程序对流动相体系进行测试。

表1 通用梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.51	Pumps	Pump B Conc.	5
4.50	Controller	Stop	

通过方法开发系统 Method Scouting Solution 软件自动生成批处理表(图2)在3种A相和2种B相间进行选择,组合成3×2的方式,各种组合方式下化合物质谱响应离子流图(MRM)如图3所示。



Analysis	Vial#	Tray	Inj. V	AutoPur	Sample Name	PumpA	PumpB	Column Position	Run Mode	Data File
1	-1	1	2	✓		C2 mM NH4Ac			DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData# 0011.ccd
2	-1	1	2	✓		B0.1MFA			DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData# 0021.ccd
3	-1	1	2	✓		B.MeOH			DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData# 0031.ccd
4	-1	1	2	✓		A.Water	A.ACIN	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	ethod scouting#201308#0802#EquibData#0041.ccd
5	1	1	2	✓	Beta agonist	A.Water	A.ACIN	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	XR-ODS II Water ACN 15.90 005.ccd
6	-1	1	2	✓		A.Water	B.MeOH	1XR-ODS II 60C 50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData#0061.ccd
7	1	1	2	✓	Beta agonist	A.Water	B.MeOH	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	XR-ODS II Water MeOH 15.90 007.ccd
8	-1	1	2	✓		B0.1MFA	A.ACIN	1XR-ODS II 60C 50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData#0081.ccd
9	1	1	2	✓	Beta agonist	B0.1MFA	A.ACIN	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	XR-ODS II 0.1MFA ACN 15.90 009.ccd
10	-1	1	2	✓		B0.1MFA	B.MeOH	1XR-ODS II 60C 50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData#0101.ccd
11	1	1	2	✓	Beta agonist	B0.1MFA	B.MeOH	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	XR-ODS II 0.1MFA MeOH 15.90 011.ccd
12	-1	1	2	✓		C2 mM NH4Ac	A.ACIN	1XR-ODS II 60C 50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData#0121.ccd
13	1	1	2	✓	Beta agonist	C2 mM NH4Ac	A.ACIN	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	XR-ODS II 2 mM NH4Ac ACN 15.90 013.ccd
14	-1	1	2	✓		C2 mM NH4Ac	B.MeOH	1XR-ODS II 60C 50MPa	DL	ethod scouting#201308#0802#EquibData#0141.ccd
15	1	1	2	✓	Beta agonist	C2 mM NH4Ac	B.MeOH	1XR-ODS II 60C 50MPa	W3 DL AQ	XR-ODS II 2 mM NH4Ac MeOH 15.90 015.ccd

图2 自动生成批处理表

批处理表中进样位为“-1”的运行后执行系统中流动相的快速置换和色谱柱的平衡。平衡的方式和时间根据所设定的系统策略及数据库中色谱柱长度和内径等信息而定，批表自动生成，避免人工建立时费时费力，甚至考虑不周引发的方法错误等情况发生。

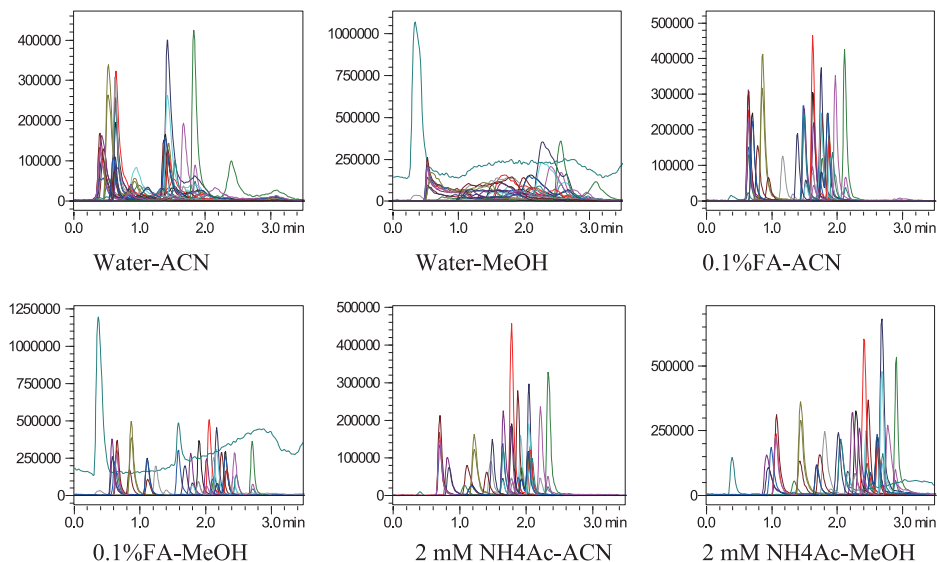


图 4 优化 UHPLC 条件样品分析色谱图

图 4 是通过方法开发系统进行流动相筛选时采集到的化合物 MRM 色谱图，Water-ACN、Water-MeOH、0.1%FA-MeOH 三种条件由于色谱峰拖尾，灵敏度低等原因，不适合该类样品的分析。综合考虑灵敏度和分离度结果，该样品的分析以 2 mM NH₄Ac-MeOH 为优。

在以大气压电离源为主的液质联用分析中，流动相的选择和参数条件不仅仅对色谱峰的分度、峰形、对称性等保留行为产生影响，更重要的是往往直接影响化合物在质谱上的响应信号强度，进而影响分析检测的灵敏度，尤其是电喷雾电离源（ESI）的影响更为明显。

表2 液相色谱条件对质谱响应信号的影响

影响因素		主要影响方面
流动相	流动相类型	ESI 方式中对离子化效率影响大于APCI
	有机相比例	保留时间、基质干扰等
	水相pH值	保留时间、离子化效率
	流动相添加剂	峰形、分离度、离子化效率
色谱柱		保留时间、峰形、分离度
流速		保留时间、峰形、分离度、离子化效率
柱温		保留时间、峰形、分离度

结论

本实验使用岛津 HPLC 方法开发系统同 LCMS-8040 联用，对 32 种 β -受体激动剂样品的 LCMS 方法建立进行优化。通过对 3 种有机相和 2 种水相组成的 6 种流动相组合方式快速筛查，综合考察质谱响应和分离效果，确定了对该类化合物分析适合的流动相组成方式，对进一步优化方法提供帮助。联用方式拓展了方法开发系统的应用领域和效果，使得对 LCMS 尤其是 ESI 源作为分析条件时质谱条件探索中关键的流动相影响因素的考察变得自动和高效化，为样品分析或方法开发前期工作赢得时间，促进整体工作效率的提高。

附表 本实验中所用的 32 种 β -受体激动剂

#	化合物名称		CAS#
	中文名	英文名	
1	西马特罗	Benzonitrile	54239-37-1
2	特布他林	Terbutaline	23031-25-6
3	沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9
4	齐帕特罗	Zilpaterol	117827-79-9
5	麻黄碱	Ephedrine	299-42-3
6	异丙喘宁	Orciprenaline	586-06-1
7	西布特罗	Cimbuterol	54239-39-3
8	非诺特罗	Fenoterol	13392-18-2
9	利托君	Ritodrine	26652-09-5
10	克仑塞罗	Clencyclohexerol	157877-79-7
11	纳多洛尔	Nadolol	42200-33-9
12	克伦普罗	Clenproperol	38339-11-6
13	氯丙那林	Clorprenaline	3811-25-4
14	克伦特罗	Clenbuterol	37148-27-9
15	美托洛尔	Metoprolol	51384-51-1
16	妥布特罗	Tulobuterol	41570-61-0
17	溴布特罗	Brombuterol	41937-02-4
18	马布特罗	Mabuterol	56341-08-3
19	班布特罗	Bambuterol	81732-65-2
20	瑞普特罗	Reproterol	54063-54-6
21	丙卡特罗	Procaterol	72332-33-3
22	克伦异磅特罗	Clenisopenterol	157664-68-1
23	马喷特罗	Mapenterol	54238-51-6
24	克伦潘特	Clenpenterol	37158-47-7
25	莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7
26	苯氧丙酚胺	Isoxsuprin	579-56-6
27	普萘洛尔	Propranolol	318-98-9
28	倍他洛尔	Betaxolol	63659-18-7
29	福莫特罗	Formamide	67346-49-0
30	苯乙醇胺A	Phenylethanolamine A	暂无
31	沙美特罗	Salmeterol	89365-50-4
32	喷布特罗	Penbutolol	38363-32-5