

超高效液相色谱(UPLC™)与质谱联用技术： - 改善药残和代谢物分析的结果质量

安 蓉 薄美萍

(沃特斯中国有限公司 北 京 100027)

摘 要 介绍了最新的UPLC™技术及其与质谱联用对药残及代谢物分析。UPLC与质谱联用不仅获得高速、高分离度，而且显著地提高质谱检测的灵敏度。对于需要高灵敏度的药残及其痕量代谢物的分析，UPLC/MS/MS技术是当今最有效的工具之一。

关键词 UPLC™；超高效液相色谱；UPLC/MS/MS；食品及农产品；药残及代谢物

中图分类号 0657.63

Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrum Detector Technology: -- Dramatically Improve the quality of Result on Residues and their Metabolites Analysis in Food and Agro-products

An Rong, Bo Meiping

(Department of Applications Consulting, Beijing Office, Waters China Ltd., Beijing 100005, China)

Abstract A new, powerful chromatography technology -Ultra Performance LC™, is introduced. The advantages of UPLC™ over HPLC are described. Waters ACQUITY Ultra Performance LC system has been holistically designed with innovative new technologies to dramatically improve resolution, sample throughput and sensitivity without compromising any of them. Mass spectrometric detection significantly benefits from the performance characteristics of UPLC. When Waters UPLC coupled with Quattro Premier or QTOF mass detectors, it bring extra sensitivity enhancement. For food safety application with complex matrix and trace amount of target compounds, UPLC and UPLC/MS/MS technologies greatly improve the result quality by dramatically increasing sensitivity and separation power in less time. UPLC and UPLC/MS/MS technologies are becoming one of the most powerful tools for challengeable food and agrochemicals analysis.

Key Words UPLC™; Waters ACQUITY Ultra Performance LC™; residues and metabolites; UPLC/MS/MS

1 引 言

分离科学的能力随着首次成功地使用小颗粒填料得到惊人的分离能力而进入了超高效液相色谱(UPLC™)的新时空。基于1.7μm小颗粒技术的UPLC™，与传统的HPLC技术相比提供了更高的分离效率，因而具有更强的分离能力。

结束了多年来在速度和分离度之间难以取舍的历史。使用UPLC可以在很宽的线速度、流速和高高压下进行高效的分离。满足药残及其代谢物分析时基质复杂、目标化合物浓度很低的特点。当UPLC和质谱联用时，其超强分离能力会使质谱检测的灵敏度获得大幅度地额外提升。能显著提高复杂的食品和农产品基质中痕量药物残留和代谢产物分析的质量，在短时间内获得更高灵敏度、更高置信度的分析结果。

2 小颗粒分离的理论与科学基础

液相色谱的发展史是颗粒技术的发展史。颗粒度的

改变直接影响到柱效，从而对分离结果产生直接影响。由图1可知：随着颗粒度的不断降低，色谱分离能度不断提高。上述规律的理论基础是著名的范第姆特(van Deemter)方程，并由此得到如图2所示的范第姆特(van Deemter)曲线。由曲线得知：随着颗粒度减小，理论塔板高度(HETP)也下降，柱效会更高，且1.7μm颗粒的HETP最小值区域扩大了，表明可在比大颗粒更宽的流量范围内得到最高的柱效，可在不损失高分离度的同时优化流速、提高分析速度。然而，颗粒技术的运用有许多技术难点，不但要求仪器在超出目前限度(6000 psi / 400 bar)的压力下工作，同时要求仪器系统体积要更小，以便不影响梯度性能，而且还要求检测器能高速检测出峰宽只有几秒的色谱峰。

Waters ACQUITY UPLC™超高效液相色谱系统的设计，充分利用了小颗粒填料的所有优点，弥补传统HPLC系统的不足，把全局设计思路用于所有集成的部件，包括从进样到数据采集。

收稿日期：2005-08-17

作者简介：安蓉，硕士研究生，主要从事液相色谱仪器、色谱柱与固相提取产品的技术与应用支持。

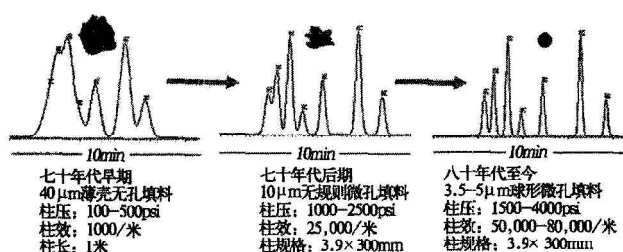


图1 填料技术的沿革

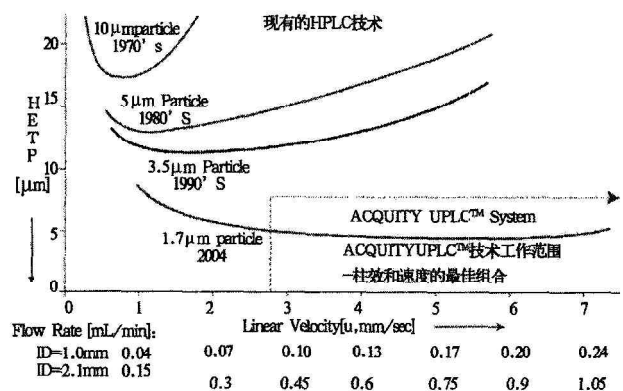


图2 范第姆特 (van Deemter 曲线)

3 超高分离度

色谱工作者正面临分离十分复杂混合物的挑战,如天然产物、有毒有害残留物、肽的消解产物、杂质及体内代谢物样品等,需要一个超高性能的色谱系统。UPLC™用1.7μm颗粒提高了分离能力、能分离出更多的色谱峰,对样品能获得更丰富的信息。极大地缩短开发方法所需的时间。

由图3可见:UPLC™可以大大提高分离度,同时色谱峰强度也得到了提高。

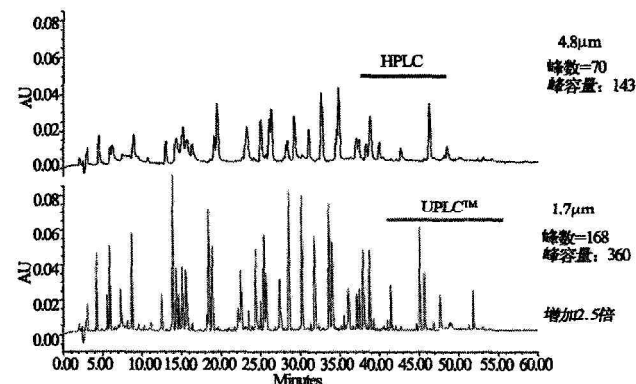


图3 UPLC™与HPLC:分离度比较

4 超高速

分析测试工作始终要求在单位时间内处理更多的样品、提供更丰富的信息并保证数据高质量。由于ACQUITY UPLC™系统用1.7μm颗粒,柱长可比通常缩短3倍而保持柱效不变,且可在高3倍的流速下进行,现代科学仪器 2006 1

结果使分离过程快9倍。图4给出了UPLC系统与HPLC分离速度的比较。

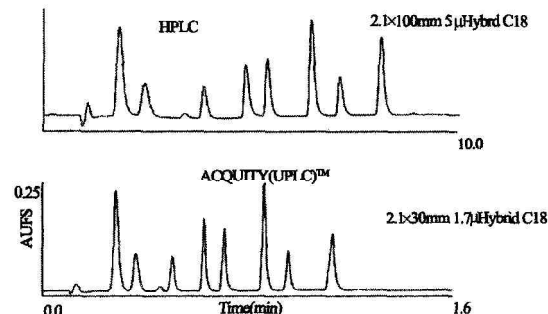


图4 UPLC™与HPLC:速度比较

UPLC™的快速分析亦节省了以往耗时的方法认证的时间,使方法认证变得简单快速。

5 超高灵敏度

以往提高灵敏度的工作集中在检测器上,包括光学检测器和质谱检测器。这主要受被检测化合物的浓度越来越低的需求驱动。采用超高效色谱系统即能显著提高灵敏度。

UPLC™使用小颗粒技术可得到更高的柱效(因而改善了分离度),更窄的色谱峰宽(见式1);因为色谱峰更窄了(W变小),峰高也就更高了(见式2),即灵敏度更高;同样,当UPLC™用于快速分析、用较短色谱柱而使柱效不变时,色谱峰高会相应增加(见式3)。

$$N \propto \frac{1}{W^2} \dots (1) \quad ? \quad \propto \frac{1}{W} \dots (2) \quad ? \quad \propto \frac{1}{L} \dots (3)$$

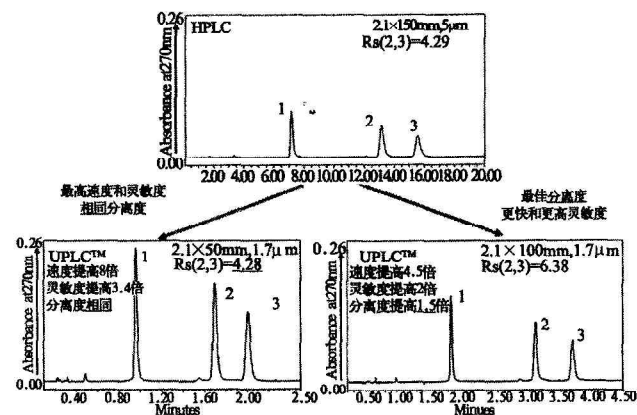


图5 HPLC到UPLC™:灵敏度、分离度和速度全面大幅度地提高

6 UPLC™:最佳的质谱入口,大幅度改善质谱检测的质量

Micromass质谱技术与Waters液相色谱技术的强强结合,使UPLC™的设计能够充分满足质谱检测器的诸多特点和需求,成为质谱检测器的最佳液相色谱入口,这是业界任何其他仪器供应商难以实现的。

由于低流速下色谱峰扩散小,增加了峰浓度,有利于提高离子源的效率,因而使灵敏度至少提高了3倍。除UPLC™技术本身带来的速度、灵敏度和分离度的改善外,UPLC™的超强分离能力有助于目标化合物与之竞争电离的杂质的分离,从而可以使质谱检测器的灵敏度因离子抑制现象的减弱或克服而得到进一步的提高。故使用UPLC™-MS联用,可以获得比HPLC-MS联用系统灵敏度更高、更丰富的高质量信息(见图6)。

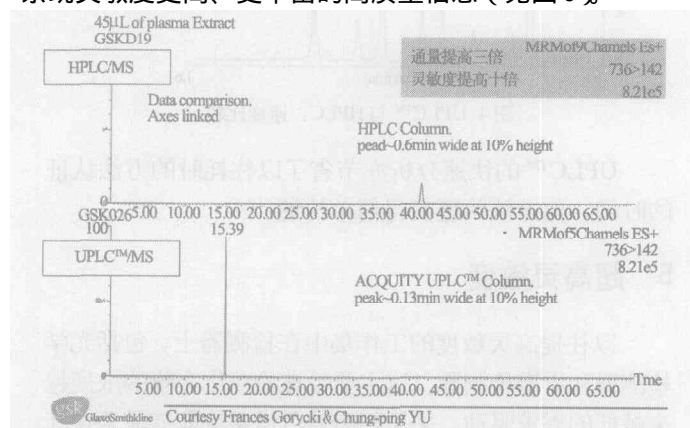


图6 HPLC-MS到UPLC™-MS:灵敏度的额外提高

由于分离效果的提高,对于某一目标化合物浓度的在线浓缩和纯化使得灵敏度和谱图质量均获得极大提高(见图7)。同时极大地改善了离子抑制效应,从而改善了定量的重复性和可靠性。以及定性分析的准确性。

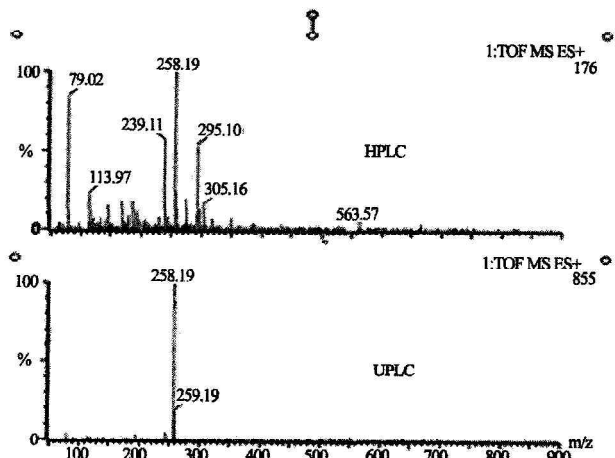


图7 HPLC和UPLC相比,质谱谱图质量的改善

7 UPLC™技术:延伸MS性能

用质谱进行定量时,可用单四极杆MS中的单离子监测(SIR),或串联四极杆MS中的多反应监测(MRM)。在MRM监测中,每个数据点的采集要在MS完成其检测周期之后。其检测周期是指对所有被测物的驻留时间(dwelling time)、通道内滞留时间以及扫描间隔的滞留时间总和。结果是MS数据采集的速率取决于MS周期时间的长短(见图8)。

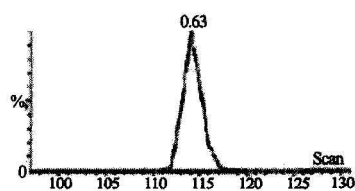


图8左上图和右下图: ACQUITY UPLC™的质谱检出利用了快速MS检测周期的优点。该图通过X轴上的扫描数显示了100 ms(A)和5 ms(B)停留时间的比较结果。Quattro Premier串联四极杆质谱更快的扫描速率获得了最佳的定量结果,提高了分析的置信度。

Sample: Alprazolam in rat Plasma 10ng/mL 5 µL Injection

A. Peak Area=16791
Peak Width=1.8s
Points Across Peak=7
B. Peak Area=16262
Peak Width=1.8s
Points Across Peak=60

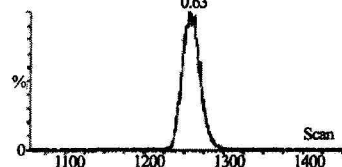


图8

全扫描模式常用于分析药品代谢物、杂质或降解产物等复杂的混合物。由于TOF分析器的快速数据采集速率(每秒超过40个图谱),进行正离子与负离子的快速切换能力,以及异常高的灵敏度,使ACQUITY UPLC™和LCT Premier成为最佳组合。LCT Premier还拥有一种称为动态范围增益(DRE)的专利特征,它能使仪器的动态线性范围为4-5个数量级,这为分析复杂混合物提供极佳的条件。

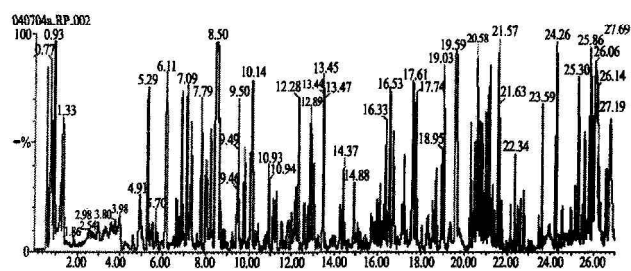
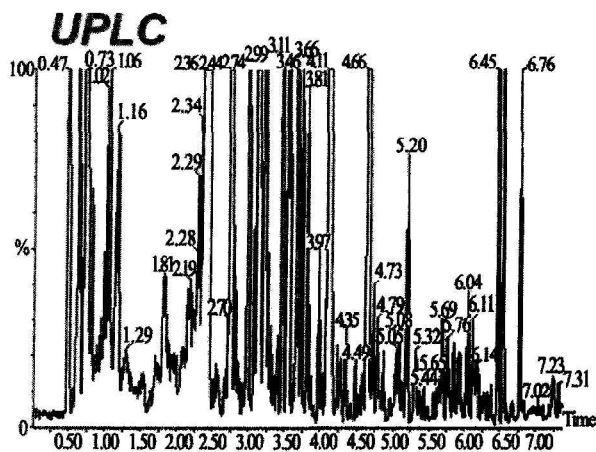


图9 LC/MS用于分析生理液中的代谢物

ACQUITY UPLC™系统提供的高分离度和高灵敏度质谱检测可以分离和鉴别更多的代谢产物(见图9)。色谱图中各个峰的平均峰宽为3.0秒,具有可分离600个峰的容量。这些混合物的差别仅在代谢物的共轭位点不同,用常规HPLC无法分离(见图10)。



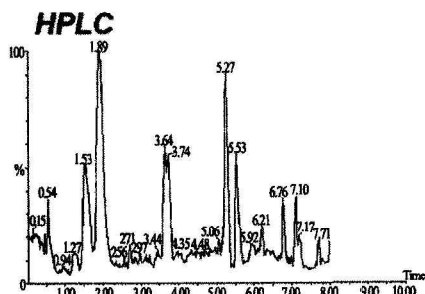


图10 同一鼠尿样品,用HPLC分离,峰容量为60,只能鉴别2000个生物标记物,而用UPLC分离,峰容量为200,可以鉴别10000个生物标记物

8 UPLC™: HPLC 的未来

UPLC™ 可以更快的速度和更高的质量完成以往HPLC的工作,为用户节省宝贵的时间和溶剂,UPLC™的高分离度可帮助用户面对复杂组份(如食品和农产品等)分离的挑战。UPLC™的高灵敏度帮助用户检测更多痕量的目标化合物。UPLC是质谱检测器的最佳入口。

9 UPLC/MS/MS技术在食品和农产品中药残和代谢产物检测分析的应用

食品和农产品中的药物残留及其代谢产物分析,近年来倍受关注且具有挑战性。其关键是解决复杂基质痕量物质的分析。UPLC/MS/MS为这一挑战提供了前所未有的、强有力的工具。UPLC/MS/MS可在更短的时间内、以更高分离度获得更高灵敏度的、更高置信度的检测结果。对于食品和农产品中氯霉素、硝基呋喃及其代谢产物、苏丹红、孔雀石绿、丙烯酰胺、β-内酰胺、氟喹诺酮等药物残留和多种农药残留及其代谢产物等的分析,UPLC/MS/MS皆可体现其快速、灵敏的明显技术优势。以下是几个分析实例(见图11-13)。

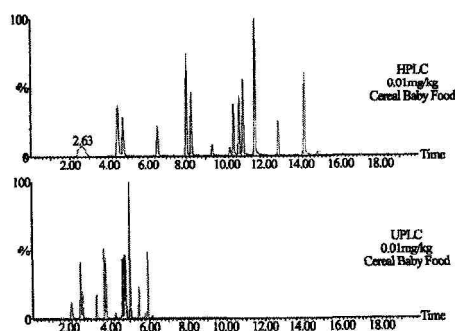


图11 是根据欧盟要求,分析婴儿食品中多种农药残留

UPLC和HPLC技术相比,分析速度大为提高。事实上,样品的检出限也得到了改善。

图12中(1)~(4)HPLC/MS/MS,样品浓度0.1pg/ul,信噪比范围在5:1-36:1;(5)~(8)UPLC/MS/MS,样品浓度0.01pg/ul,信噪比范围88:1-300:1,检出定量限可达0.001pg/ul;UPLC的灵敏度比HPLC提高100倍。

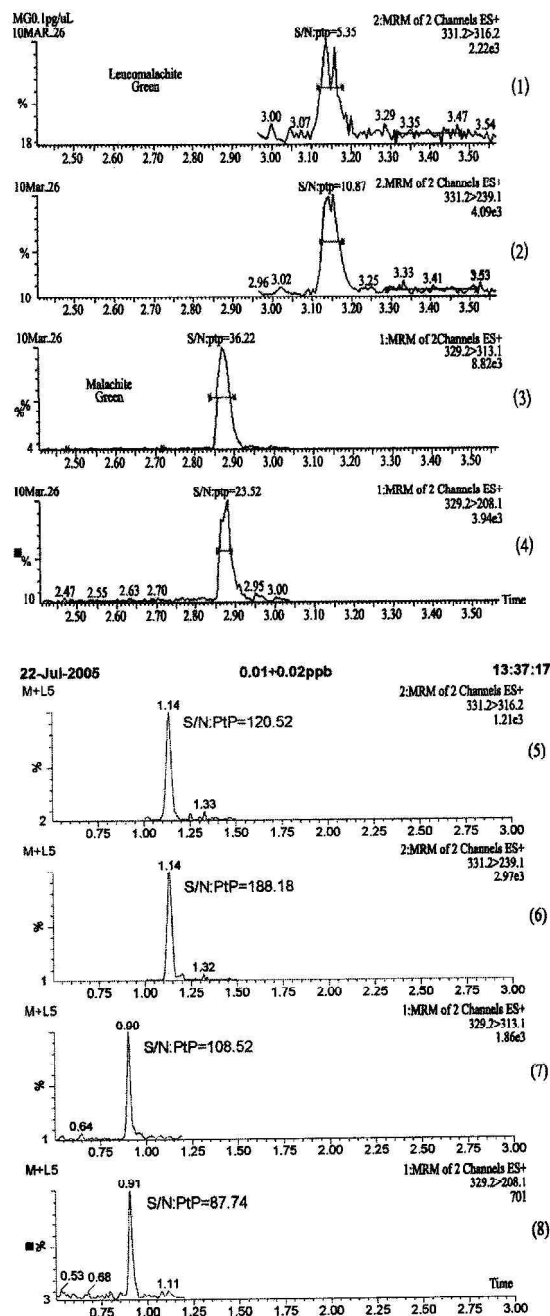


图12 孔雀石绿灵敏度比较

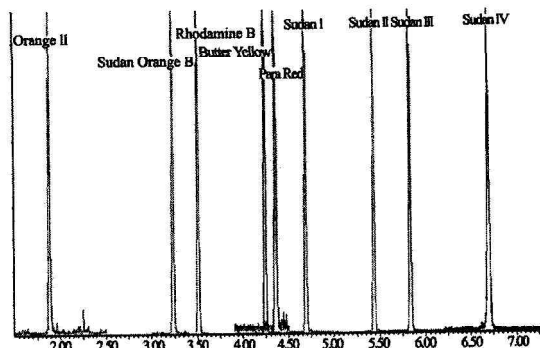


图13 苏丹红等偶氮染料的UPLC/MS/MS分析(MRM)