

不同接口对高效液相色谱-质谱 分析甾体激素的影响

陈民雄

D. E. Games

(中国药品生物制品检定所 北京 100050)

(University College, Cardiff, UK)

〔摘要〕本文采用传送带接口和热喷雾接口,以 8 种甾体激素的混合标样,就不同接口对 LC/MS 的影响进行了评价。

关键词:液相色谱-质谱 接口 甾体激素

1 引言

高效液相色谱-质谱联机技术(LC/MS)作为一种在线的连续分离检测极性、难挥发、热不稳定的有机混合物的有力工具已日益受到重视^[1-6],并已广泛用于有机混合物分析^[7]、药物分析^[8]及生化分析等^[9]领域。

与 GC/MS 不同,LC/MS 可以直接对样品进行分离检测而不需要对上述样品进行化学衍生化。与此同时由于 LC/MS 技术中使用大量有机溶媒作为流动相,使 LC/MS 联机比 GC/MS 困难得多,尤其是目前 HPLC 的应用中 80% 采用反相色谱,其流动相中除有机溶媒外还含有不同比例的水,从而使 LC/MS 联机运行的条件更为苛刻^[1],对操作技术要求更高。与 GC/MS 不同,目前 LC/MS 的接口还没有统一化,各种接口有各自的特点,适用于不同的分析目的。除传送带和粒子束接口可获得 EI 信号外,其它接口都属于软离子化接口,如热喷雾接口^[5,6](TSP)动态 FAB 接口、电喷雾接口及早期的直接导入式接口(DLI^[4],因灵敏度低已不多用)。

本文应用传送带接口和热喷雾接口(TSP 原型及配辅助灯丝 2 种方式),以 8 种甾体激素的混合标样为标样,就上述 3 种接口对 LC/MS 的影响进行了评价。

2 实验部分

2.1 仪器

2.1.1 色谱

3 个 Waters 6000A 泵,Waters 680 梯度控制器,Cecil 212 可变波长紫外检测器,Rheodyne 7125 进样阀,分析柱:Spherisorb 5 μ m ODS 250 \times 4.6mm(i,d.)

2.1.2 质谱及接口

1995 年 7 月 17 日收

FINNIGAN MAT 4000 四极质谱仪配有 TSP 接口(备有辅助灯丝离子化)。

VG7070H 磁质谱仪,配有传送带接口及雾化除溶剂装置,传送带材质为聚酰亚胺。

自制的雾化除溶剂装置为长 15cm、外径 1/6 英寸、内径 0.006 英寸的电阻不锈钢毛细管(取自 FINNIGAN 热喷雾接口雾化器),端部略挤扁以便限流,毛细管限长度方向施以 6~12V 可调直流电以加热 LC 流出液使成细雾状均匀地喷积于传送带上。

所用数据系统均为 INCOS 系统。

2.3 试剂

8 个激素样口除乙炔雌二醇为 Merck 试剂外,均由中国药品检定所提供,所有溶剂均经重蒸,水为蒸馏水。

3 结果与讨论

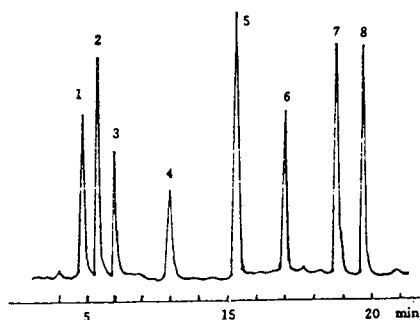


图 1 8 个甾体激素混合标样的 HPLC 色谱图

UV254nm,流量 1.2mL/min,梯度 50%,乙腈/水洗脱 5min,于 6min 内线性梯度淋洗至 100%乙腈,再保持 15 分钟。

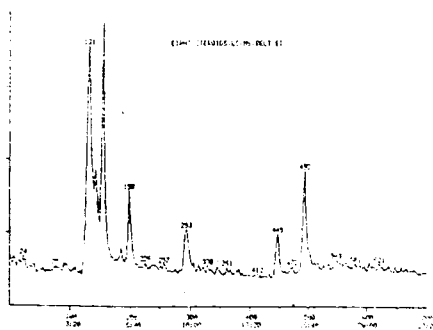


图 2 用传送带接口 LC/MS 分析 8 个样品的 RIC 图

与 GC 分析甾体激素不同,由 HPLC 法样口可以直接上柱而不需事先化学衍生化,因而大大简化了操作,提高了分析速度。图 1 为 8 个甾体激素混合标样的 HPLC 色谱图。

色谱峰序为(1)氢化可的松;(2)地塞美松;(3)醋酸强的松;(4)乙炔雌二醇;(5)十八甲;(6)孕酮;(7)丙酸睾丸素;(8)苯丙酸诺龙(注:联机 RIC 图的峰序与此相同)。由图 1 可见反相 HPLC 可以对 8 个组分达到基线分离,峰形对称且分析时间适中,各组分灵敏度约为 10ng。

图 2 为用传送带接口 LC/MS 分析上述样品的重建总离子流图(RIC)。

由于反相 HPLC 流动相中含水量高而且在梯度洗脱过程中比例不断变化,从而使传送带运行状况急剧恶化,可能的后果一是造成焦带卷带,另一可能是样品雾

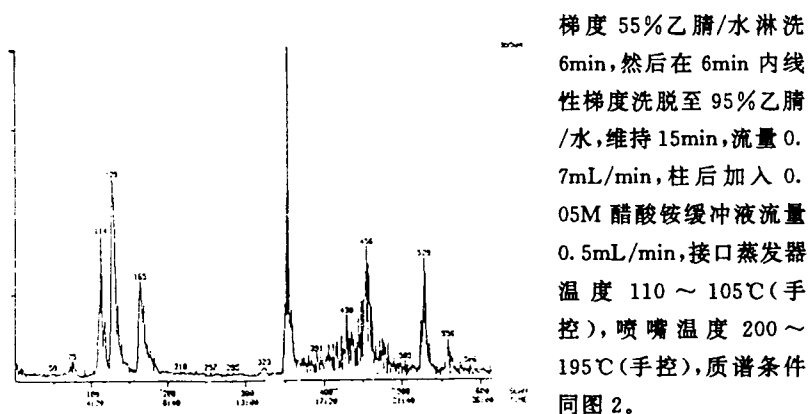
流量 0.7mL/min,梯度 65%乙腈/水洗脱 5min,然后在 6min 内线性梯度洗脱至 100%乙腈,再维持 10min,传送带端部加热及清扫部位无温度显示,传送带上方用红外灯烘烤除去溶剂,EI 源,70eV,源温 150℃,分辨率 500,扫速 3s 全程。

珠在带上凝聚形成滞留或回流导致总柱效降低。即使采用了红外灯烘带及机械泵抽排仍难以除去水份,导致离子源放电,使 RIC 图噪音增大甚至出现毛刺状伪峰。以往的解决办法是降低 LC 流量和使用低于 25% 含水量的流动相采用细径(如 1mm i. d.) 色谱柱及提高雾化除溶剂效率。联机分析的另一关键因素是要尽可能保持色谱总柱效和足够的灵敏度。为此我们用自制的高效雾化除溶装置取代 VG 的商品雾化器(易堵),即使从 65% 乙腈/水(流量 0.7mL/min)开始洗脱,联机运行仍十分平稳。RIC 各基线稳定,噪音不显著。由于洗脱初期流动相中的含水量比图 1 降低了 15%,从而使这阶段的柱效下降,导致 1、2 号峰未分开(但仍能用质量色谱图予以区分)。其余组分均能充分分离,所得各峰的质谱图与标准 EI 谱十分相近,可以用于未知物的定性鉴别,但灵敏度不高。

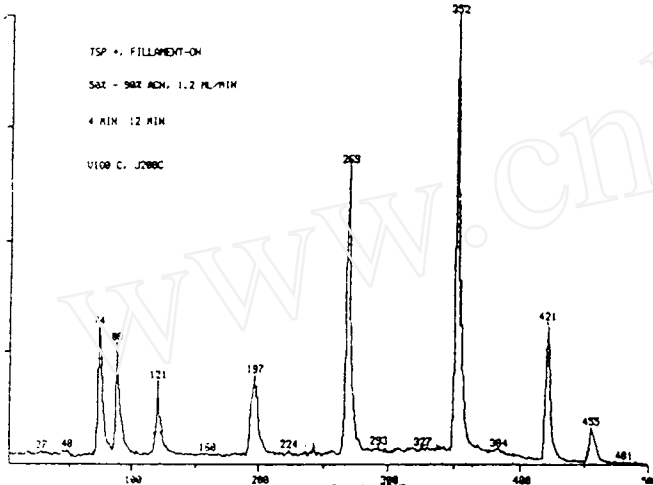
图 3 为用原型(Vesta)热喷雾 LC/MS 分析上述样品的 RIC 图(即流动相中加入质子受体醋酸铵直接离化而不用辅助灯丝)。

由图 3 可见各峰均达到基线分离,除 4 号峰(乙炔雌二醇)未被检测外,其它峰均得到了典型的热喷雾质谱,灵敏度为低 ng 级。由于热喷雾接口本身就是一种软离化源,其离化机制是 LC 流动相中的缓冲剂盐离子(如醋酸铵 NH_4^+ 离子)与样品分子间进行电荷交换,因此不需要借助 EI 源的灯丝来进行离化。由此可知热喷雾接口与传送带接口不同,它只能用于与反相 HPLC 联用,否则缓冲剂的盐离子就会析出而起不到离化作用。值得指出的是这种热喷雾接口有时不能使所有组分进行离化,上述乙炔雌二醇即为一例,因此在对未知样品测定时必须注意防止漏检问题。图 3 中当 LC 梯度洗脱至 75% 乙腈/水时, RIC 图出现较大噪音,但此时各组分仍能被检测,质谱图良好。上述噪音的来源是由于流动相中有机溶剂比例增加使醋酸铵溶解度降低乃至部分析出,从而易在热喷雾接口的喷嘴出口形成析晶所致,严重时甚至会堵塞喷嘴。采用柱后加入醋酸铵缓冲剂可以尽量维持原有的 HPLC 条件并延长分析柱寿命。但这样需要增加一台输液泵以单独泵送缓冲液,在柱后与柱流出液混合后进行入接口。大量溶媒及水则由一个辅助的大容量机械泵(与液氮冷阱串联)从离子室直接抽走。

图 4 为用辅助灯丝离化的热喷雾 LC/MS 的 RIC 图(不用缓冲剂)。图 4 的 RIC 图与 HPLC 图(图 1)十分吻合且无噪音,各峰均被检测且达到基线分离,灵敏度(在全程扫描时)为低 ng 级,略高于原型(即加缓冲剂)的热喷雾法。加辅助灯丝目的是当原



型热喷雾不能离化某些组分时增加其离化可能性,同时亦能增强峰强提高灵敏度^[7]。我们发现对甾体激素类样品只使用灯丝离化而不使用缓冲剂即得到了满意的结果。(如图4),同时亦大大减轻了对离子源和接口喷嘴的污染,当使用SIM技术时,其灵敏度还可以提高2~3个数量级。



梯度50%乙腈/水洗脱4min,然后在9min内线性梯度洗脱至90%乙腈/水,流量1.2mL/min,接口蒸发器温度100℃,喷嘴温度200℃,灯丝条件厂家设定,质谱条件同图3。

图4 辅助灯丝离化热喷雾LC/MS的RIC图

4 结论

在分析甾体激素时,上述3种接口的反相LC/MS联机的特性和用途不同。传送带LC/MS可以用于定性(结构)测定,对含水量高的反相色谱LC/MS必须解决高效雾化除溶装置并适当调整原色谱条件。对于原型热喷雾LC/MS由于存在漏检及梯度洗脱至高溶剂相时噪音严重,因此不推荐此法。用辅助灯丝直接软离化(不用缓冲剂)的热喷雾LC/MS是一种理想的定性定量分析技术,其灵敏度还可以辅以SIM技术对上述样品进行超微量分析。

参 考 文 献

- 1 D E Games. *Biomd Mass Spectrom*,1981;4:454
- 2 J Arpino,G Guiochou. *Anal Chem*,1979;51:682A
- 3 K T McManus *et al.* *J Chromatogr Sci*,1990;28:510
- 4 J D Henion. *Adv Mass Spectrom*,1978;7:865
- 5 C R Blaley. *Anal Chem*,1983;55:750
- 6 M L Vestal. *Anal Chem*,1984;56:2590
- 7 Joyce J R,Ardrey R E. *Biomed Mass Spectrom*,1985;12:588
- 8 D J Liberato *et al.* *Biomed Environ Mass Spectrom*,1986;13:171
- 9 Edmonds C G,Vestal M L,*Nucleic Acids Res*,1985;13:8197
- 10 M Barber. *J Chem Soc,Chem Commun*,1981;325
- 11 J B Fenu *et al.* *Science*,1989;64:246
- 12 T R Covy *et al.* *Rap Commun Mass Spectrom*,1988;2:249

The Effects of LC/MS Interfaces on the Analysis of Steroids

Chen Minxiong

(The National Institute for the Control of
Pharmaceutical Products, Temple of Heaven, Beijing
100050, China)

D. E. Games

(University College, Cardiff, UK.)

Received 1995-07-17

Abstract

A mixture of eight steroids was used as model sample to evaluate the performance of moving-belt and two thermospray (TSP) LC/MS interfaces (with auxiliary filament on and off modes). The results reveals; the moving-belt LC/MS interface provides the advantage in offering the EI spectrum but column efficiency reduced owing to the fluctuation of the water content in the mobile phase. Thermospray source with filament off mode offered high sensitivity, but one of the eight constituents was not detected, also when the operation reached high solvent content, the RIC trace became very noisy owing to the crystallization of the buffer ions at the outlet of the jet. TSP source with filament on mode gave the promising result with high sensitivity, fully sample detectability, high separation efficiency, and less contamination to the interface and ion source, with using SIM technique trace analysis could be achieved on the TSP(filament-on).

Key Words: LC/MS, interface, steroids