



使用配备 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的 Agilent 1100 系列液相色谱快速分析磺胺类药物

应用

食品

作者

William J. Long, Anne E. Mack
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
美国

摘要

本实验将原来使用 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱分离 10 种磺胺类药物的方法转移到配备 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的 Agilent 1100 系列液相色谱上。并提供了方法转换的简单指导原则。新的分离方法将分析时间从 30 min 缩短到 8 min, 由于两根色谱柱均使用了 $2 \mu\text{m}$ 筛板, 因此样品制备方法无需更改。尽管柱压与原方法相比有所增加, 但仍低于 400 bar, 因此该方法可以很容易地转换到几乎所有的 HPLC 系统上。本实验采用未经过滤的蛋白变性牛奶样品 (磺胺二甲氧嘧啶做内标物), 结果显示色谱柱使用寿命超过 1000 次进样。



Agilent Technologies

前言

磺胺类药物是第一种系统地用于预防和治疗人类细菌感染的化学物质。磺胺类药物属于抑菌药；通过抑制细菌的生长和繁殖而非杀死它们作用。目前，磺胺类药物主要用于治疗人泌尿道感染。其它新型药物用来抗感染，如 β -内酰胺类抗生素。当今，磺胺类药物常作为抗生素被兽医使用，主要用来饲喂动物以预防感染。此外，它也可用于蜜蜂疾病的治疗。蜂蜜样品中往往可以发现这些抗生素的残留，其毒性或过敏反应引起世界各地消费者的关注。[1,2]

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱填料与亚 2 μm 的全多孔填料有相似的性能。由于使用的 2 μm 色谱柱筛板与 5 μm 填料粒径色谱柱的筛板相似，因此无需额外的样品制备就可实现完美的方法转移。

在本实验中，将梯度洗脱方法从 $4.6 \times 250 \text{ mm}$, 5 μm 色谱柱转移到 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上并进行了优化。梯度洗脱时间从 30 min 缩短到 8 min。如果应用 $4.6 \times 50 \text{ mm}$ 色谱柱，虽然分离度有所降低，但洗脱时间可进一步缩短到 4 min 以内。

实验部分

本实验采用快速分离高分离度液相色谱组件对 Agilent 1100 系列 HPLC 仪进行了改进。该系统包括了 G1312A 二元泵，最高输液压力 400 bar；一个 G1316A 柱温箱(TCC)；一台 G1376A 高效自动进样器；一台 G1315B 二极管阵列检测器，配备 3 mm 光程的半微量流通池。使用 Poroshell 120 色谱柱时，所有的管线均改用内径最短的 0.12 mm 管线，改用内径 0.12 mm 的针座；依据先前文献和报告中的优化建议，检测器数据采集速率提至最高(40 Hz)。[3, 4]使用 Agilent ChemStation (A.10.02 版) 采集数据。本实验使用的色谱柱包括 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 $4.6 \times 250 \text{ mm}$, 5 μm 色谱柱（部件号 959990-902）和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 色谱柱(695975-902)。

以下磺胺类药物购自 Sigma Aldrich 公司：磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲噁啶、磺胺二甲噁啶、磺胺二甲噻唑、磺胺甲氧噻、磺胺氯噻唑、磺胺甲基异噻唑、磺胺二甲氧嘧啶。各化合物用乙腈:水(50/50, v/v)分别配制成浓度 1 mg/mL 的溶液，然后等量混合配制成每种化合物浓度均为 0.1 mg/mL 的混合溶液。

所用牛奶为 Similac。Similac 是一种类似母乳的婴幼儿配方奶粉商品。制造商严格控制其原料组成，因此与某些牛奶(Abbott Laboratories Columbus Ohio)不同，其蛋白质成分是均匀的。最常见的婴幼儿配方奶粉包含作为蛋白源的纯化牛奶乳清和酪蛋白，作为脂肪源的混合植物油，作为糖源的乳糖，维生素-矿物质组合及其它成分。

将加入磺胺二甲氧嘧啶的 Similac 牛奶 2 mL 加入 18 mL 水:乙腈:甲酸(200:800:1)混合溶液中，剧烈振摇 1 min，静置 3 min 后，吸取 2 mL 上清液到离心管中，5000 rpm 转速下离心 5 min。上清液无需进一步过滤直接转移到自动进样器小瓶中。

讨论

小颗粒填料色谱柱用于快速分析已经有几年的时间了。然而，与 5 或 3.5 μm 填料色谱柱不同，这种色谱柱需要较小孔径的筛板保持色谱柱中的填料。2 μm 筛板用于保持柱中 5 或 3.5 μm 的填料颗粒。对于粒径 3 μm 或更小的颗粒，则需选用 1 或 0.5 μm 孔径的筛板。全多孔颗粒的粒径分布比表面多孔颗粒的大 25%。使用 2 μm 筛板可使窄粒径分布填料如 Poroshell 120 保持在色谱柱中。若新色谱柱的筛板孔径比旧色谱柱的小，方法转化时须格外注意样品的制备以防脏样品堵塞筛板。[5]方法从 5 或 3.5 μm 色谱柱转移到 Poroshell 120 色谱柱时，如果仍使用较大孔径的色谱柱筛板，就不需要额外进行样品净化了。

如图 1 所示，原方法使用了 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱，在 30 min 内梯度洗脱分离了 10 种化合物。多数化合物达到基线分离，相邻两峰之间最小的分离度为 1.7。由于实验过于漫长，该分离条件很难再进一步优化。原方法可通过以下几个简单的步骤转移到 $2.7 \mu\text{m}$ 表面多孔填料色谱柱上：

1. 梯度程序的转移（根据柱长按比例缩短原方法的梯度程序，以保持原分离度，保持 k' ）。由于原方法分析时间为 30 min，柱长 250 mm，相同流速下使用 100 mm 色谱柱时，梯度洗脱时间缩短为原来的 $100/250$ 即 0.4，进样量按相同比例减少。[4,6,7]如图 2 所示。

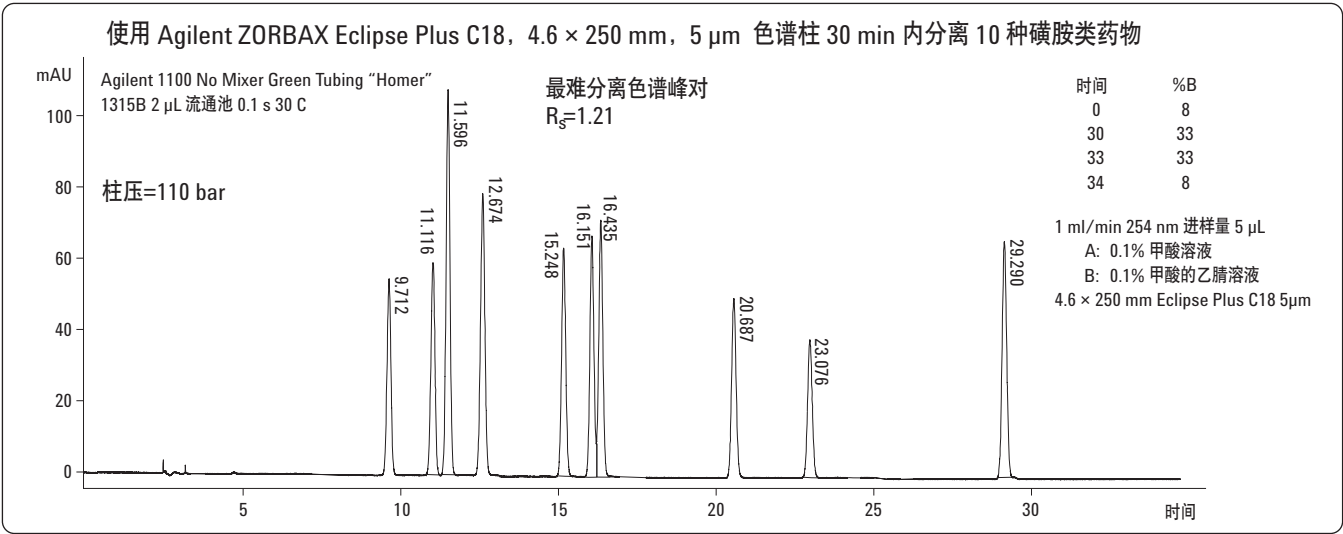


图 1. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱在甲酸/乙腈梯度程序下 30 min 分离 10 种磺胺类药物

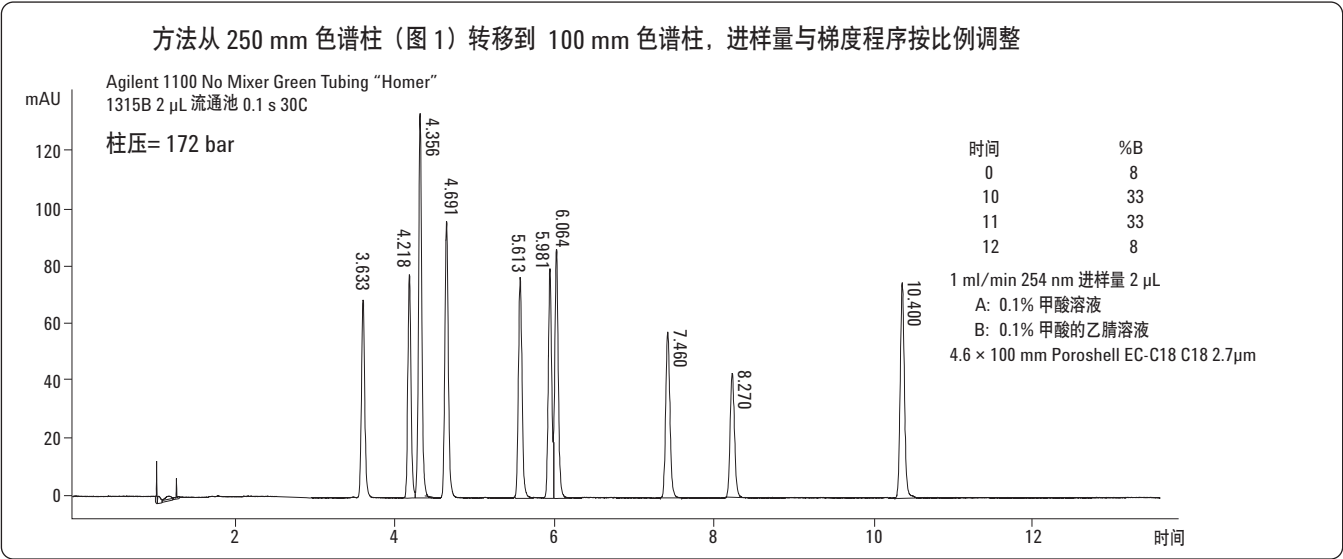


图 2. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱在甲酸/乙腈梯度程序下 12 min 分离 10 种磺胺类药物

2. 如图 3 所示, 保持分离中柱体积不变, 增加流速。在分离中采用相似色谱柱通过保持梯度斜率(G_s)不变从而保持 k' 。利用公式计算, 见公式 1

公式 1. $G_s = (V_m/F)(\Delta\%B/t_G)$ [7],

该公式可变形为:

公式 2. $(F)(t_G) = ((\Delta\%B) (V_m) / G_s)$

其中

F: 流速

t_G : 梯度洗脱时间

V_m : 柱体积

$\Delta\%B$: 溶剂强度的改变

我们发现可以通过增加流速缩短梯度洗脱时间。因此, 按照以下公式, 分离条件由原来的 8% 到 33% B 1 mL/min 运行 10 min, 转变成 8% 到 33% B 1.5 mL/min 运行 6.7 min, 最后转变成 8% 至 33% B 2 mL/min 运行 5 min。(1 mL/min $\times$ 10 min = 1.5 mL/min $\times$ 6.7 min = 2 mL/min $\times$ 5 min):

公式 3. $t_2 = t_1 \times \frac{F_1}{F_2}$

其中

t_2 : 新梯度洗脱时间

t_1 : 原梯度洗脱时间

F_2 : 新流速

F_1 : 原流速

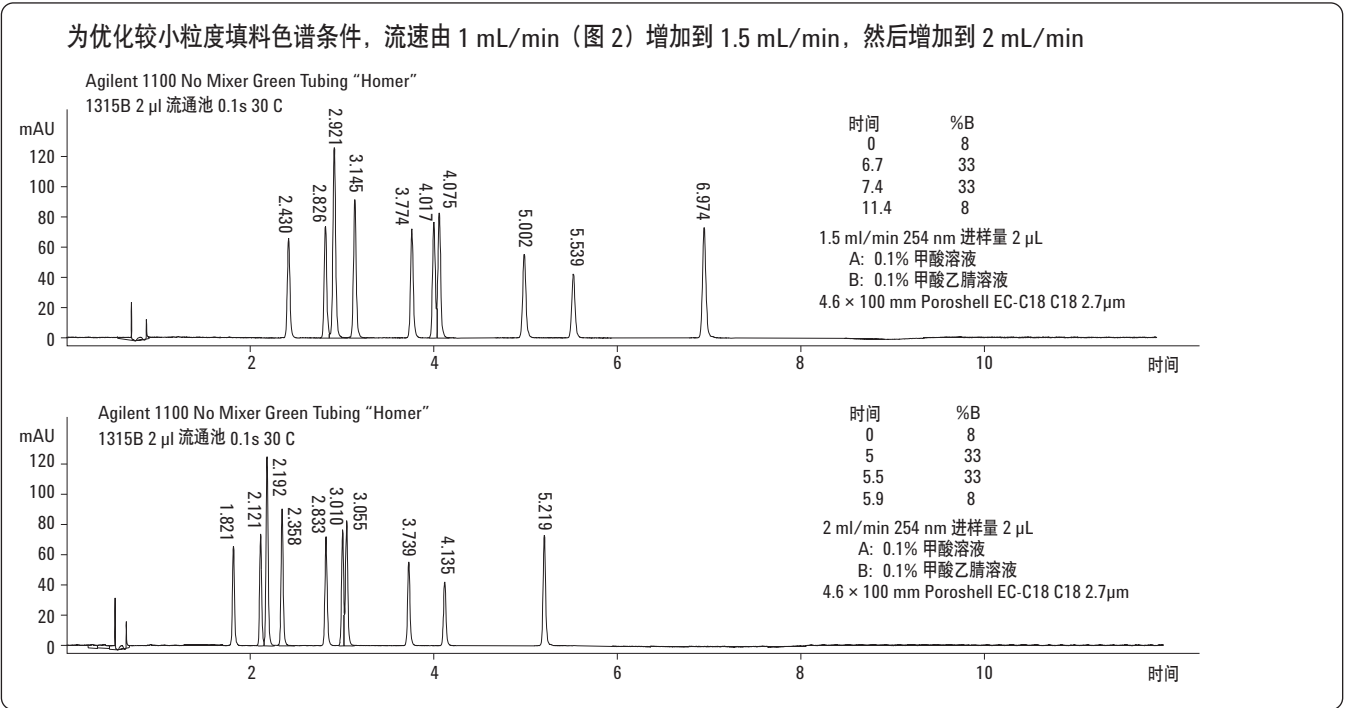


图 3. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 μ m 色谱柱在甲酸/乙腈梯度程序下 6 min 分离 10 种磺胺类药物, 流速和梯度程序从 1 mL/min (图 2) 到 1.5 mL/min, 最后到 2 mL/min 按比例调整

3. 梯度程序优化。由于实验可在原实验所需时间的一小部分里运行，因此几个灵活的梯度变化可实现更快的分离或更好的分离度。该优化可在 1 h 内完成。一些工作可在更长的色谱柱上进行，但由于分析时间过长，实验人员需要花费 4 到 8 h 完成这一步骤。图 4 显示了采用 Poroshell 120 色谱柱优化分离选择性采取的各步骤

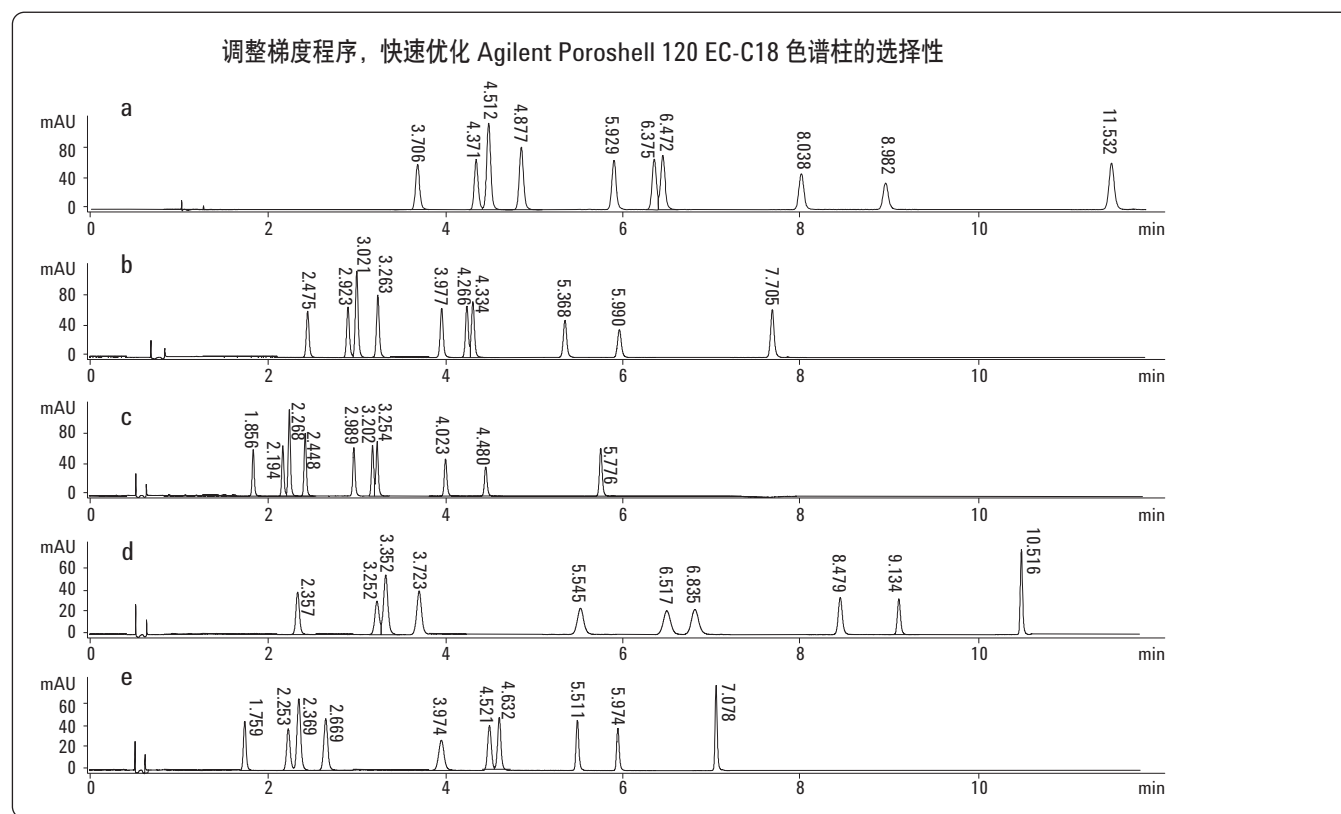


图 4. 调整甲酸/乙腈梯度程序，使用 2.7 μm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱优化分离 10 种磺胺类药物。(a) 采用 250 mm 色谱柱在 1 mL/min 流速下的原梯度洗脱色谱图（同图 2 所示）。(b) 在 1.5 mL/min 较快的流速下，分析时间缩短 33% 的色谱图（同图 3 所示）。(c) 在 2 mL/min 较快的流速下，分析时间缩短 50% 的色谱图。(d) 调整梯度程序，改善相邻色谱峰 6、7 的分离度。(e) 调整梯度程序，改善相邻色谱峰 2、3 的分离度

4. Agilent 1100 LC 系统的完整优化。使用小规格色谱柱, 重视仪器配置可获得额外的性能优势。最重要的参数为检测器采集速率。这种情况下, 检测器设置为最大采集速率(40 Hz)。其它重要的因素包括: 尽量缩短管路、减小流通池体积以减少峰展宽、使用小体积的进样针阀座。图 5 为原 250 mm 方法与新 100 mm 方法的叠加色谱图。这些色谱图显示新的更快的方法中的最后一个峰在原 5 μm 方法的第一个峰之前出峰, 显著节省了分析时间

最后, 添加了磺胺二甲氧嘧啶的 Similac 牛奶样品, 通过酸性乙腈沉淀蛋白后提取, 振荡, 静置 5 min 后倒出。由散点图可看出 (图 6), 整个实验过程中柱压无变化。此外, 柱效几乎保持不变。未经过滤的蛋白变性牛奶样品的直接分析证明了 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的耐用性。

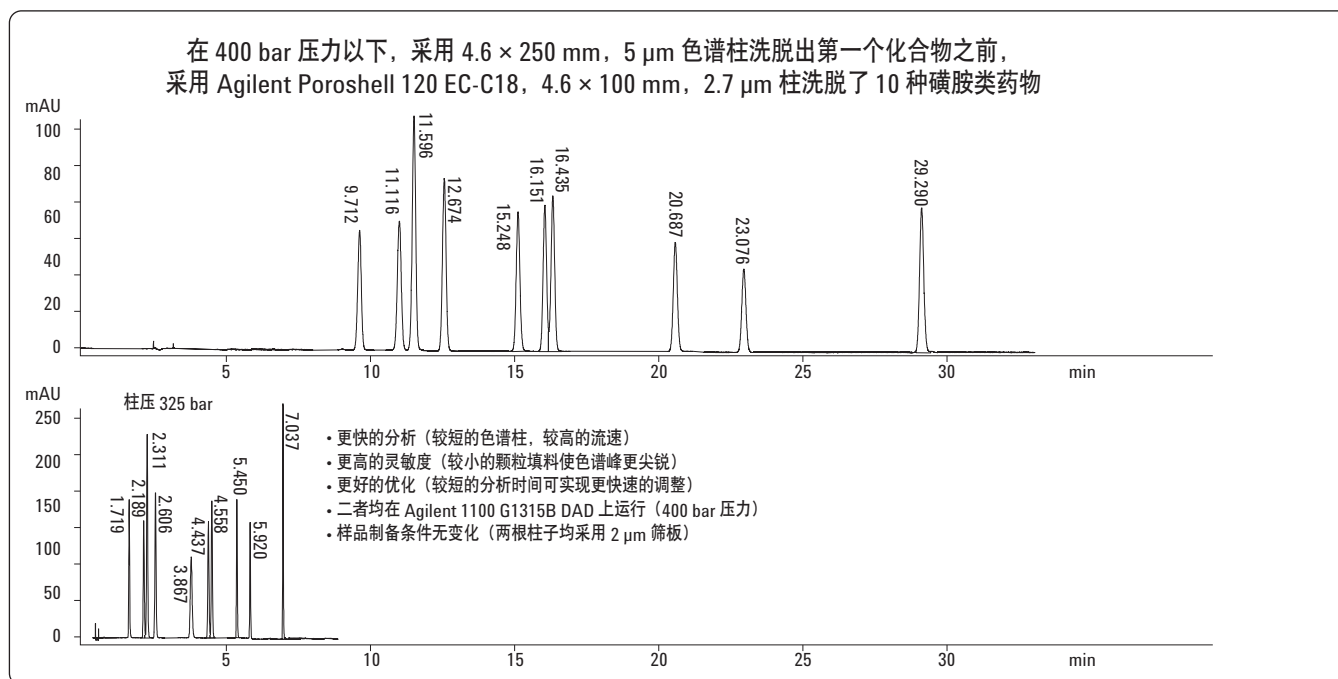


图 5. 从 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, $4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱到 Agilent Poroshell 120 EC-C18, $4.6 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱, 在甲酸/乙腈梯度程序下分离 10 种磺胺类药物, 分析时间从 30 min 减少到 8 min

结论

本实验表明，采用 4.6×250 mm, 5 μm C18 色谱柱的现有方法可以很容易地转换为采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm 色谱柱的更快但类似的方法。由于运行最大压力远低于 400 bar, 故此法还可用于传统 HPLC 系统。此外, 由于两种色谱柱均使用 2 μm 筛板, 样品制备方法可保持不变。这种方法转移节省了分析时间和溶剂用量, 并允许分析人员进一步优化方法参数, 时间较长的分析并不理想。

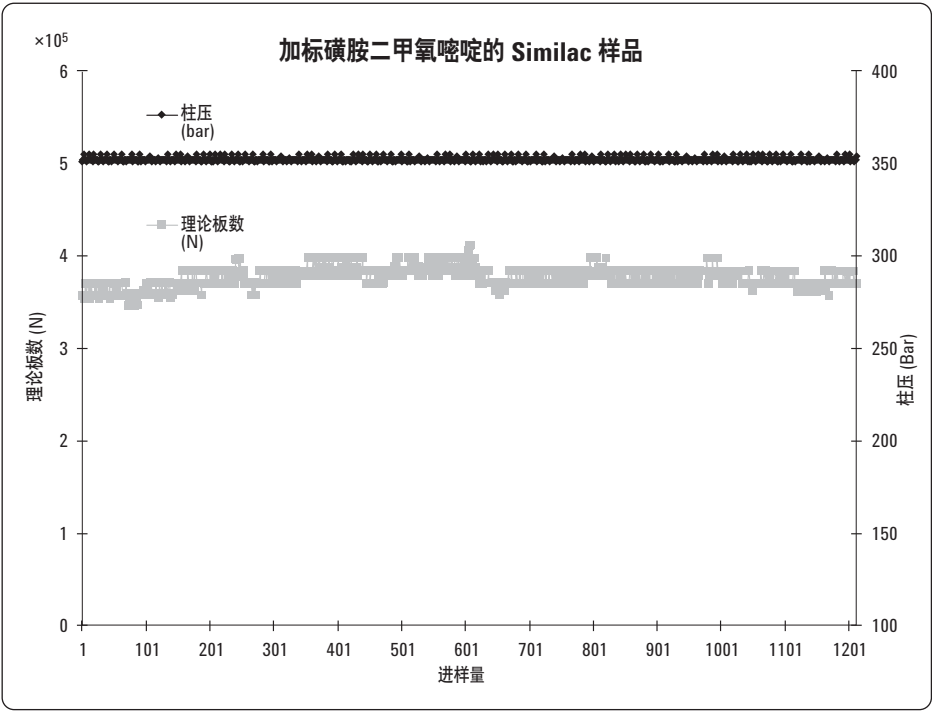


图 6. 使用 Agilent Poroshell 120 100 mm 色谱柱分析的散点图（磺胺二甲氧嘧啶做内标物的带沉淀的 Similac 样品超过 1000 次连续进样，记录磺胺类药物的柱效，并检测柱压力有无增加）

参考文献

1. William J. Long and John. W. Henderson Jr., “使用 Eclipse Plus C18 柱分析磺胺类药物”, September 11, 2006, 5989-5436CHCN
2. Carol A. Gonzalez and Karyn M. Usher, Anne E. Brooks and Ronald E. Majors, “用固相萃取和液相色谱串联质谱法测定牛奶中的磺胺”, March 11, 2009, 5990-3713CHCN
3. Fast, Faster Ultrafast: Optimization of Cycle Times in Liquid Chromatography for Optimal Speed and Resolution. Agilent Technologies February 1, 2005, 5989-2108EN
4. Michael Woodman, “快速筛查和分析非酒精饮料中的成分”, August 3, 2006, 5989-5178CHCN
5. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe Neue, Zouibar El Fallah, “A small, new particle packing for faster analysis with high resolution”
6. L.R. Snyder and J.W. Dolan, “High Performance Gradient Elution”, Wiley-Interscience, New York, 2007
7. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, “Practical HPLC Method Development”, 2nd ED., Wiley-Interscience, New York, 1997.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误, 或由于提供、展示或使用本材料所造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物所含信息、说明和性能指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2010
中国印刷
2010年6月2日
5990-5572CHCN



Agilent Technologies