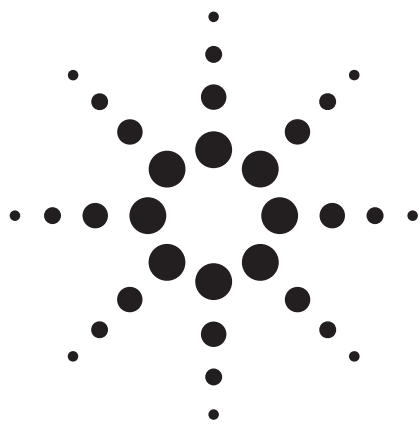




以安捷倫 1100 系列 LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，快速分析磺胺類藥物

應用範圍

食品

作者

William J. Long 與 Anne E. Mack
Agilent Technologies, Inc.,
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

本研究將使用安捷倫 1100 系列液相層析儀搭配 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、 $5\text{-}\mu\text{m}$ 管柱分離 10 種磺胺類藥物之方法，轉換為使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱。文中將提供簡單的方法轉換指南。此種新分離方式，可將原本為 30 分鐘的分析時間，縮短至 8 分鐘，且因為一樣使用 $2\text{-}\mu\text{m}$ 的管柱濾片，所以不需改變樣品的製備方法。雖然壓力高於原本方法，但仍低於 400 bar，很容易將方法轉換至幾乎所有 HPLC 系統。研究中使用添加磺胺二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine)且未過濾的蛋白質碎裂的牛奶樣品，結果證明層析管柱的壽命可注射超過 1000 次。



Agilent Technologies

緒論

磺胺類藥物，為率先用於治療及預防人類全身細菌感染的化學物質。磺胺類藥物屬於細菌抑制劑，不會殺死細菌，但可抑制細菌生長及增殖。一般在人體的最常見用途為治療泌尿道感染。現在已有較新的藥物可治療感染，如 β 內醯胺類抗生素。如今，磺胺類藥物普遍作為獸醫用抗生素，主要用於餵食動物以預防感染。另外，也能用於治療蜜蜂的疾病。蜂蜜樣品極常檢測出此類抗生素的殘留，而這些殘留容易導致中毒或過敏反應，世界各地的消費者對此都很關心。[1,2]

安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 2.7- μm 管柱的效能與 2- μm 以下全多孔性材質相近，但因為使用的 2- μm 管柱濾片類似於 5- μm 管柱，所以不須額外的樣品製備，得以使方法的轉換更加順暢。

在本研究中，梯度沖提方法將由 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、5- μm 管柱轉換至 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱並最佳化。梯度沖提的時間，由 30 分鐘縮短 8 分鐘，若使用 $4.6 \times 50 \text{ mm}$ 管柱，甚至能縮短至少於 4 分鐘，並且只會微微減損解析度。

實驗

本研究中將安捷倫 1100 系列 HPLC 修改為快速分離的 LC 系統此系統的組成由一個 G1312A 二元幫浦推送，最多可施加 400 bar 的壓力，並有一個 G1316A 管柱恆溫器 (TCC)、一部 G1376A 高效能自動注射器，及一部 G1315B 光二極體陣列偵測器並配有光徑為 3 mm 的半微量流動液槽。使用 Poroshell 120 管柱時，應遵循建議，將所有管線更換成內徑 0.12 mm 的最短管線，並將注射針座部分換成內徑 0.12 mm 的針座，而偵測器收集數據的速度則應調高至最快的速度 (40 Hz)，以達到先前文件與報告所呈現的最佳效能。[3, 4]數據收集軟體使用安捷倫 ChemStation A.10.02。研究中所使用的管柱包括 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、5- μm 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱 (p/n 959990-902)，及 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱 (695975-902)。

以下磺胺類藥物，購自 Sigma Aldrich 公司：sulfadiazine、sulfathiazole、sulfapyridine、sulfamerazine、sulfamethazine、sulfamethazole、sulfamethoxypyridazine、sulfachloropyridazine、sulfamethoxazole、sulfadimethoxine。這些化合物均溶於 50/50 v/v 的乙腈 (acetonitrile)：水溶液，製備成 1 mg/mL 的濃度，再各取等量，混合成濃度各為 0.1 mg/mL 的溶液。

奶粉樣品為心美力 (Similac) 奶粉。心美力為市面上的嬰兒配方奶粉，成分與母乳極為相似。此奶粉的製造商已嚴格控管奶粉的成分，因此蛋白質組成非常均一，與牛奶不同（俄亥俄州哥倫布市亞培實驗室）。最常用的嬰兒配方奶粉，其蛋白質來源為純化的牛乳乳清及酪蛋白，脂肪來源為蔬菜調合油，醣類來源為乳糖，並添加維生素與礦物質的混合物，及其他成分。

量取 2 mL 已添加 sulfadimethoxine 的心美力，再加入 18 mL 水：乙腈：甲酸為 200:800:1 的溶液，劇烈搖動 1 分鐘後，靜置 3 分鐘，之後將混合液倒入離心管。離心管以 5000 rpm 的轉速離心 5 分鐘。將離心後的溶液倒入自動注射器的小瓶內，不須過濾。

討論

利用小粒徑填充材料的管柱進行較快速的分析，已行之有年，但需使用較小的濾片，以免濾除填充材料，這點與 5 μm 及 3.5 μm 的管柱不同。2 μm 的濾片能留住 5 μm 及 3.5 μm 的充填顆粒，若充填粒子小於 3 μm ，則需使用 1 μm 或 0.5 μm 的濾片。全多孔性粒子的粒徑大小分布範圍，大於表面多孔性顆粒 25%，而粒徑大小分布範圍較窄的填充材料，如 Poroshell 120 管柱，可以使用 2 μm 的濾片，即可將填充材料留在管柱內。轉換分析方法時，新管柱的濾片孔徑若小於舊管柱，則必須在樣品製備時必須小心，以防不乾淨的樣品堵塞濾片。[5] 將 5 μm 或 3.5 μm 管柱的分析方式轉換為使用 Poroshell 120 管柱，若使用孔徑較大的管柱濾片，便不需再樣品淨化。

圖 1 顯示一開始採用的分析方式，使用 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 的管柱，以 30 分鐘的梯度沖提分離 10 種化合物。此次分離做為大部分化合物的解析度的基準值，而兩波峰間最小的解析度為 1.7。此分離方法的實驗時間冗長，故未再加以改良。分析方法係透過下述的簡單步驟，移轉至 $2.7 \mu\text{m}$ 多孔性表層粒子充填的管柱：

1. 移轉梯度沖提的方式（依管柱長度比例，縮短原本梯度沖提方法的時間，以保持相同的分離結果，即 k' 保持不變）。原本的沖提方法花費 30 分鐘，而原先管柱的長度為 250 mm ，若以相同流速使用 100 mm 的管柱，則梯度沖提的時間縮減比例為 $100/250$ 或 0.4 。注入量也以相同的比例減少。[4,6,7] 此步驟如圖 2 所示

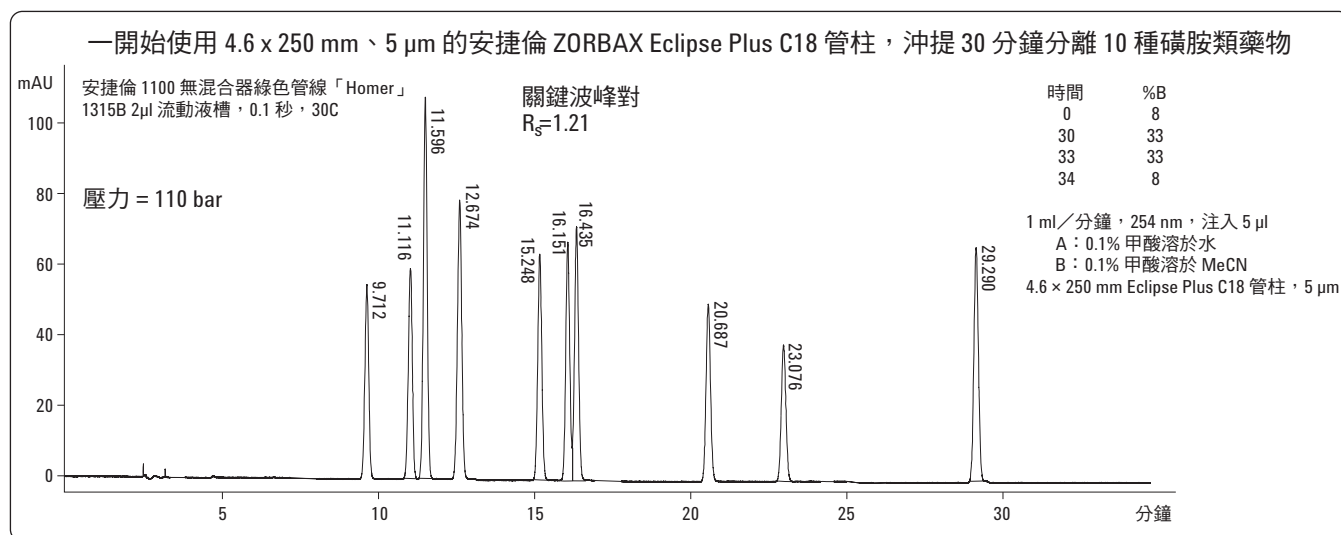


圖 1. 使用 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，以甲酸／乙腈溶液沖提 30 分鐘，分離 10 種磺胺類藥物

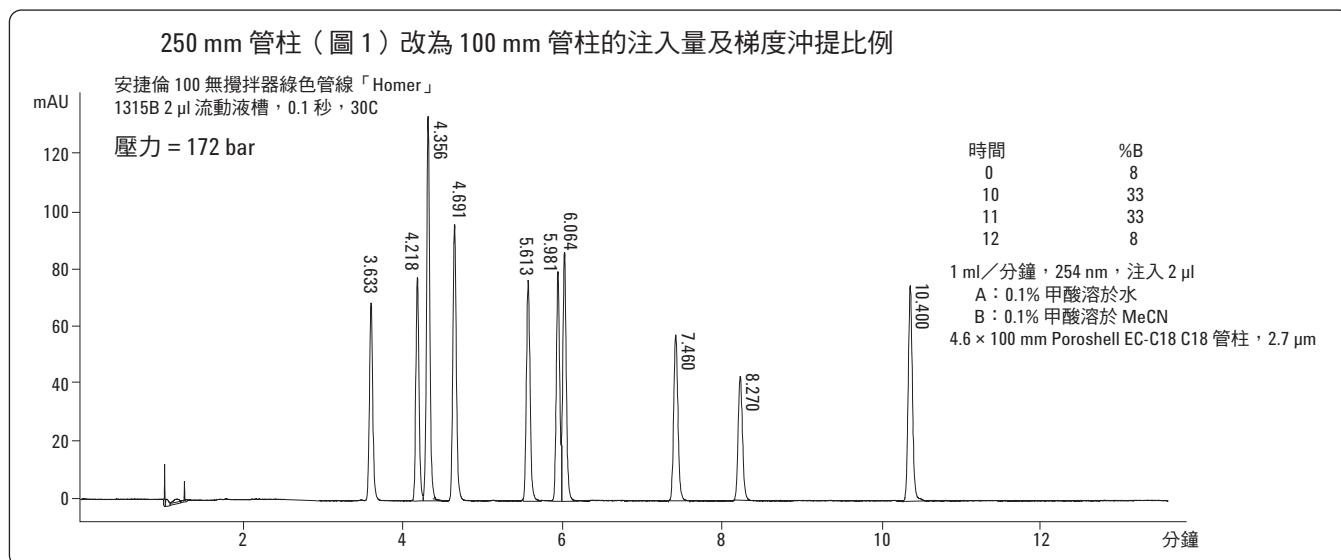


圖 2. 使用 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 、 $2.7 \mu\text{m}$ 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以甲酸／乙腈溶液沖提 12 分鐘，分離 10 種磺胺類藥物

2. 雖然流速升高，但分離過程中動相沖提的管柱體積數維持不變。如圖 3 所示。在相似管柱中的梯度沖提斜率 (G_s) 固定，分離時的 k' 就能保持不變。所利用的公式如方程式 1 所示

方程式 1：
$$G_s = (V_m/F)(\Delta\%B/t_G) [7],$$

重新排列成

方程式 2：
$$(F)(t_G) = ((\Delta\%B) (V_m) / G_s)$$

其中

F 為流速，

t_G 為梯度沖提的時間，

V_m 為管柱體積，

$\Delta\%B$ 為溶劑的濃度變化量。

由此可知，提高流速便能縮短梯度沖提的時間。因此一開始以 8-33% 的 B 和 1 mL/分鐘的流速，需 10 分鐘完成分離；若轉換成 8-33% 的 B 和 1.5 mL/分鐘的流速，則 6.7 分鐘可完成分離；最終採用 8-33% 的 B 和 2 mL/分鐘的流速，則 5 分鐘便完成分離 ($1 \text{ mL/分} \times 10 \text{ 分} = 1.5 \text{ mL/分} \times 6.7 \text{ 分} = 2 \text{ mL/分} \times 5 \text{ 分}$)，採下列方程式計算。

方程式 3：
$$t_2 = t_1 \times \frac{F_1}{F_2}$$

其中

t_2 為新的梯度沖提時間

t_1 為原先的梯度沖提時間

F_2 為新流速

F_1 為原先的流速

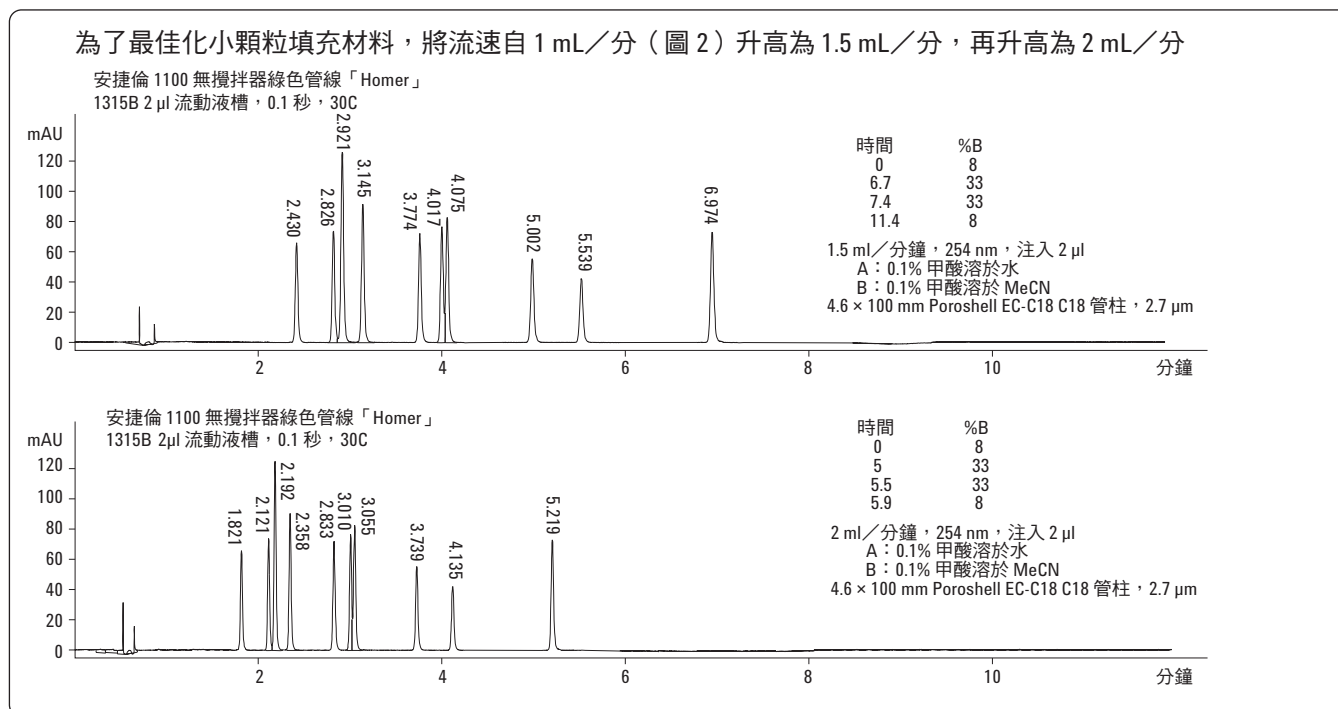


圖 3. 使用 4.6 $\times$ 100 mm、2.7 μ m 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以甲酸/乙腈溶液進行梯度沖提，分離 10 種核苷類藥物。分離結果顯示，流速及梯度沖提自 1 mL/分（圖 2），升高為 1.5 mL/分，最終升高為 2 mL/分，費時 6 分鐘完成分離

3. 最佳化梯度沖提。由於分離時間可依原本分離時間的縮短，且加快了幾個梯度沖提的速度，甚至可能藉此加快分離速度，或提高解析度。此步驟不到 1 小時便能完成。有些最佳化梯度沖提也能在加長型管柱進行，但分析時間會延長，可能需花費 4-8 小時完成此步驟。圖 4 顯示最佳化 Poroshell 120 管柱選擇性的步驟

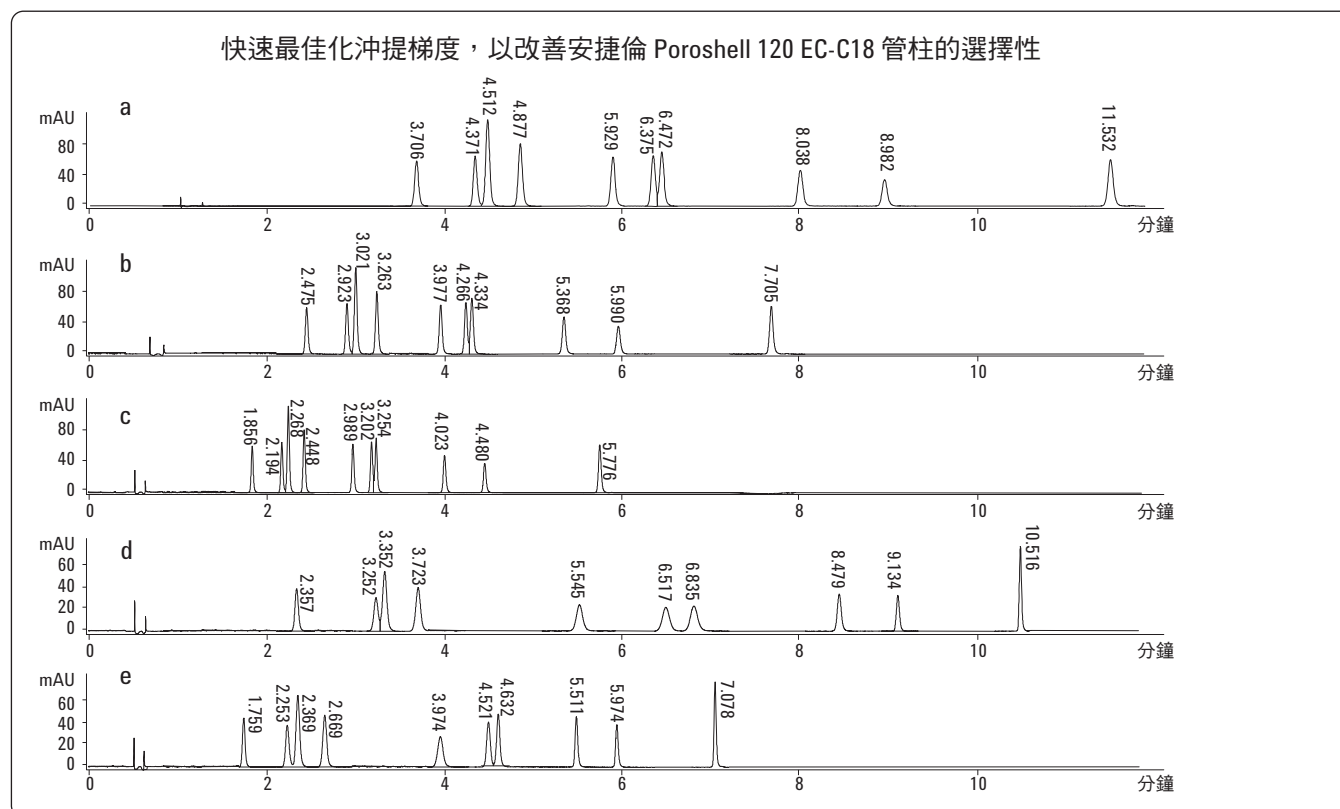


圖 4. 以調整甲酸／乙腈的沖提梯度最佳化以 2.7 μ m 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱分離 10 種磷胺類藥物的效果。(a) 原本的層析圖，以 1 ml／分的流速在 250 mm 的管柱中分離（如圖 2）。(b) 流速調高為 1.5 ml／分的層析圖，分析時間縮短 33%。（如圖 3）。(c) 流速調高為 2 ml／分的層析圖，分析時間縮短 50%。(d) 調整沖提梯度，改善波峰對 6、7 的選擇性。(e) 調整沖提梯度，改善波峰對 2、3 的選擇性

4. 安捷倫 1100 LC 系統最佳化完成。使用小管柱時，若注意儀器設定可再提升效能，其中最重要的參數為偵測器收集數據的速度。在本研究中偵測器設定為最大收集速度 (40 Hz)。其他重要的因素包括：減短管線，改用體積較小的流動液槽以避免波峰加寬，並更換成較小的注射針座。圖 5 將 100 mm 管柱新方式的圖，疊加於原本 250 mm 管柱的圖上。此兩層析圖顯示分析時間省下非常多，新方法的沖提速度較快，且最後一個波峰的出現時間，甚至早於原先使用 5 μm 管柱方法的第一個波峰

最後，加入 sulfadimethazine 的心美力奶粉模擬樣品，萃取時以酸化乙腈沉澱蛋白質。並震盪樣品後靜置 5 分鐘，再將樣品溶液緩緩倒入其他容器。如圖 6 的散佈圖所示，測試其間壓力並未改變，效率也幾乎保持不變。未過濾且蛋白質沉澱的奶粉樣品分析，證實了安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱的確堅固耐用。

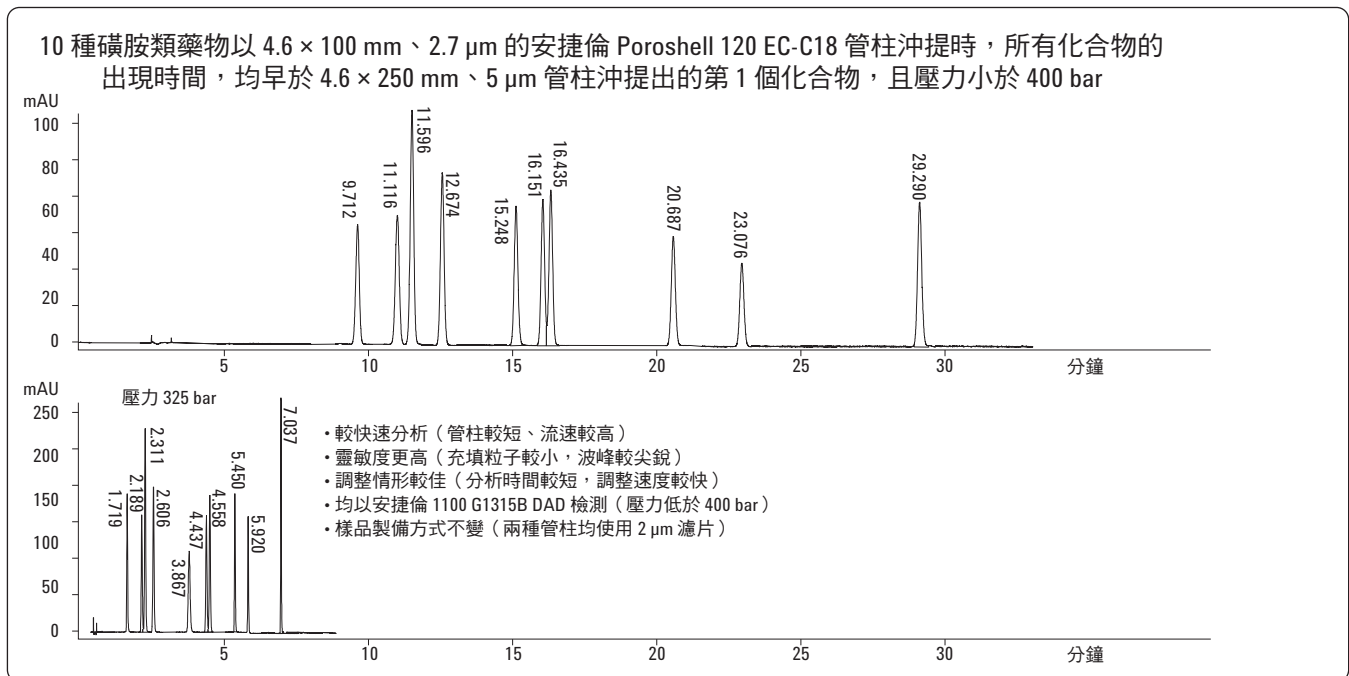


圖 5. 依比例調整以甲酸／乙腈溶液分離 10 種磺胺類藥物的方法，由使用 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，改為使用 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 、 $2.7 \mu\text{m}$ 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，結果顯示，分析時間由 30 分鐘縮短為 8 分鐘

結論

本研究顯示，現有的 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、 $5 \mu\text{m}$ C18 管柱分析方式，可輕易調整成較快的類似方式，套用至安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 管柱。此分析方式的最大壓力不超過 400 bar，傳統的 HPLC 系統仍能使用。此外，兩種管柱均使用 $2 \mu\text{m}$ 濾片，因此樣品製備的方式不變。分析方式的轉換，節省了可觀的時間與溶劑，也就更有餘裕進一步改善分析方式的常數；倘若分析時間非常冗長，就不可能如此。

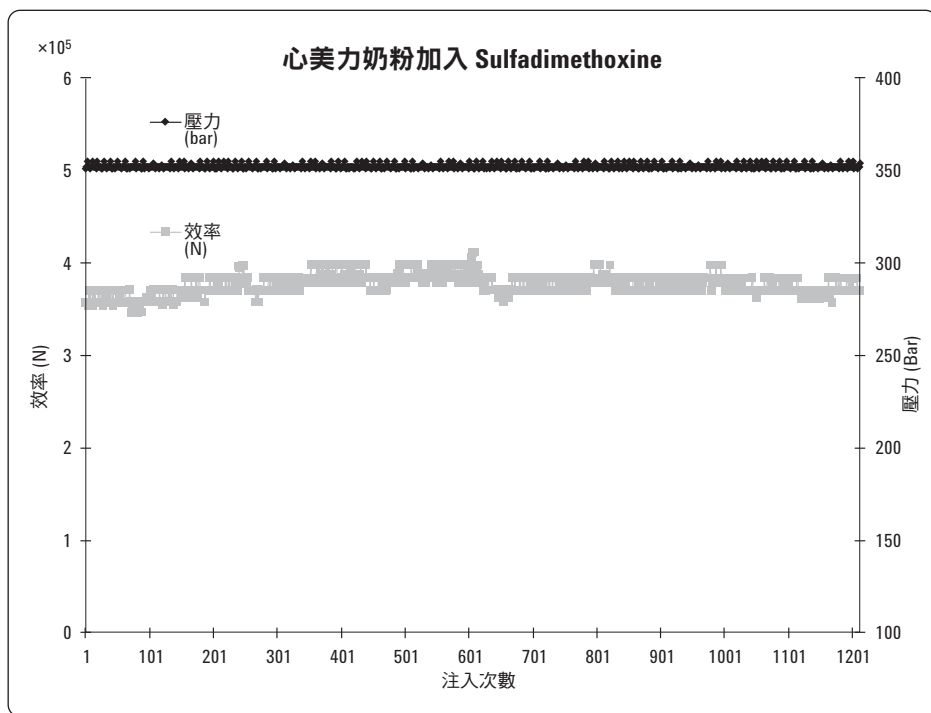


圖 6. 使用安捷倫 Poroshell 120 100 mm 管柱的散佈圖 (sulfadimethoxine 在已經過沉澱的心美力奶粉中注入 超過 1000，散佈點為分離磺胺類藥物的效率，且壓力未升高)

參考資料

1. William J. Long 和 John. W. Henderson Jr.。《以 Eclipse Plus C18 管柱分析磺胺類藥物》 (Analysis of Sulfa Drugs on Eclipse Plus C18)。2006 年 9 月 11 日。5989-5436EN
2. Carol A. Gonzalez 和 Karyn M. Usher、Anne E. Brooks 和 Ronald E. Majors。《以固相萃取及液相層析串聯質譜儀，測定奶粉中的磺胺類成分含量》 (Determination of Sulfonamides in Milk Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)。2009 年 3 月 11 日。5990-3713EN
3. 快、更快、超快：改善液相層析的循環時間，提升沖提速度和解析度。安捷倫科技公司。2005 年 2 月 1 日。5989-2108EN
4. Michael Woodman。《快速篩檢及分析非酒精性飲料的成分》 (Rapid Screening and Analysis of Components in Nonalcoholic Drinks)。2006 年 8 月 3 日。5989-5178EN
5. Dorothy J. Phillips、Mark Capparella、Uwe Neue、Zouibar El Fallah。《充填新型小顆粒，擁有高解析度，加快分析速度》 (A small, new particle packing for faster analysis with high resolution)
6. L.R. Snyder 和 J.W. Dolan。《高效梯度沖提》 (High Performance Gradient Elution)。紐約：Wiley 跨學科期刊 (Wiley-Interscience)。2007 年
7. L.R. Snyder、J.J. Kirkland、J.L. Glajch。《實用高效液相層析法開發》 (Practical HPLC Method Development)，第二版。紐約：Wiley 跨學科期刊 (Wiley-Interscience)。1997 年

www.agilent.com/chem/cn

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2010 年
於美國印製
2010 年 6 月 2 日
5990-5572CHTW



Agilent Technologies