

性能验证

分析高 pH 流动相中的化合物

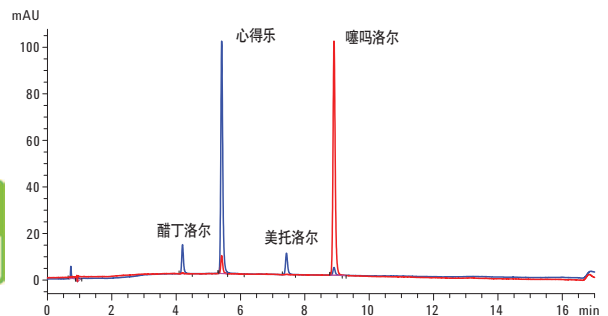
Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
用于普通高 pH 应用的可行性

应用简报

化学和药物分析

作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔德布隆



摘要

在本应用简报中，论证了将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统用于普通高 pH 应用的可行性。相对于不锈钢材质的 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统而言，不含铁和钢的设计使用户可以在更宽的 pH 范围（1-13，短时间分析可以高达 14）内工作。四种 β -阻断剂作为小分子化合物的实例，在 20 h 内其保留时间和分离度均表现出了良好的稳定性。另外，BSA 胰蛋白酶酶解肽段作为生物分子的实例，在 37.5 h 内保留时间也保持稳定。结果表明，对于较长时间的样品分析过程而言，高 pH 流动相 (10-11) 不会对保留时间和分离度的稳定性造成不利影响。



Agilent Technologies

前言

长时间进行高 pH (pH > 10) 液相色谱分析, 由于存在腐蚀作用会使不锈钢系统受到损害。因此, 强烈建议使用不含铁的系统, 其在高 pH 流动相条件下不受腐蚀性试剂的影响。

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱在样品流路中采用无金属组件。自动进样器、柱温箱和检测器流路中所有的毛细管和接头均是完全不含金属的, 因此, 生物分子只与陶瓷或 PEEK 管线接触。相对于 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统而言, 此种不含铁和钢的设计使用户不仅可以采用高盐缓冲液, 而且可以在更宽的 pH 范围 (1-13, 短时间分析可以高达 14) 内工作。另外, 相对于 1260 Infinity 液相色谱系统, 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统已被证实存在高 pH 洗脱液 (如: 100 mM NaOH) 存在的情况下, 释放出金属离子更少¹。

在本应用简报中, 论证了将 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统用于高 pH 流动相应用领域的可行性。其中, 将 β -阻断剂和多肽混合物 (BSA 胰蛋白酶酶解肽段) 分别作为小分子和生物分子的样品实例, 在高 pH 流动相条件下进行了分析^{2, 3}。考察了高 pH 洗脱液对保留时间和分离度稳定性的影响。

实验部分

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统, 包括以下模块:

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高效生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D, 配置生物惰性标准流通池, 10 mm)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

色谱柱

Agilent ZORBAX Extend-C18, 4.6 × 100 mm, 1.8 μ m, 600 bar

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation, 用于 LC 和 LC & MS 系统, 修订版 C.01.02 [14]

洗脱液和样品

1. 50 mM 三乙胺 (TEA, pH 11) 和甲醇, 用于分析以下四种 β -阻断剂:

- 醋丁洛尔
- 心得乐
- 美托洛尔
- 噻吗洛尔

2. 15 mM 氢氧化铵 (NH₄OH, pH 10) 和乙腈, 用于多肽分析

所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。TEA、NH₄OH 和 β -阻断剂均购自西格玛奥德里奇公司 (美国圣路易斯)。

色谱方法

	β -阻断剂	多肽混合物 (BSA 胰蛋白酶酶解肽段)
溶剂:	A: 50 mM TEA, pH 11 B: 甲醇	A: 15 mM NH ₄ OH, pH 10 B: 90% 乙腈, 15 mM NH ₄ OH, pH 10
梯度:	0 min – 45% B 15 min – 80% B 15.01 min – 95% B	0 min 5% B 25 min – 30% B 30 min – 100%
停止时间:	17 min	35 min
后运行时间:	3 min	10 min
温度:	35 °C	35 °C
流速:	1 mL/min	1 mL/min
进样体积:	3 μ L	3 μ L
DAD:	260 nm, 参比波长 360 nm 300 nm, 参比波长 400 nm	214 nm, 参比波长 400 nm
峰宽:	0.025 min (0.5 s 响应时间) (10 Hz)	<0.013 min (0.13 s 响应时间) (20 Hz)

结果与讨论

在高 pH 条件下分析小分子化合物

使用 TEA 和甲醇分别作为碱性水性缓冲液 (pH 11) 和有机流动相, 对四种 β -阻断剂进行分析。图 1 中所示为其在两种不同波长下进行检测后获得的色谱图。前三种 β -阻断剂 (醋丁洛尔、心得乐和美托洛尔) 的检测波长为 260 nm, 噻吗洛尔的检测波长为 300 nm。所有四个色谱峰保留时间的 RSD 均小于 0.2%。

对 20 h 内保留时间稳定性的监测结果表明, 在 0 到 1200 min 内, 保留时间保持稳定, 参见图 2。

对 20 h 内的心得乐、美托洛尔和噻吗洛尔分离度稳定性的监测结果表明, 在 0 到 1200 min 内, 分离度保持稳定, 参见图 3。

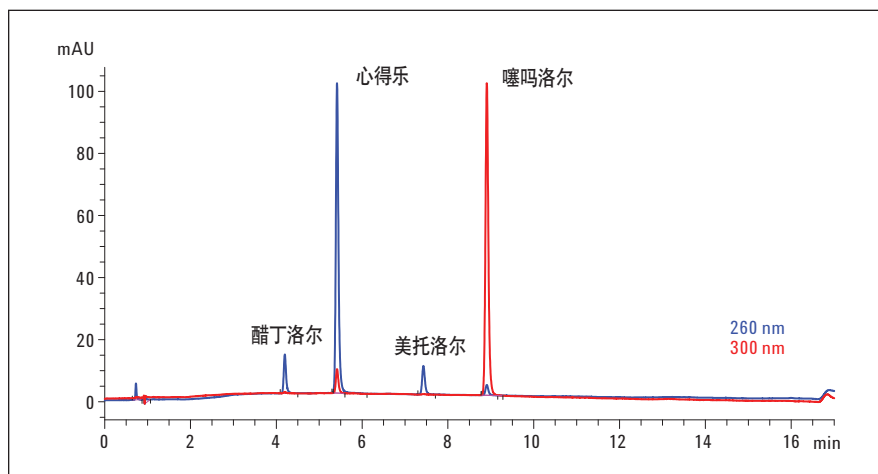


图 1 使用 pH 11 的碱性流动相分析四种 β -阻断剂时所获得的液相色谱图

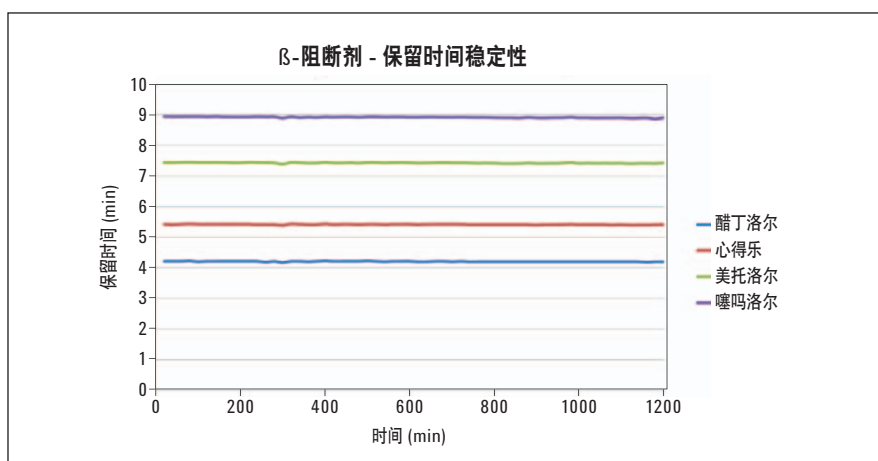


图 2 高 pH 分析条件下四种 β -阻断剂保留时间的稳定性

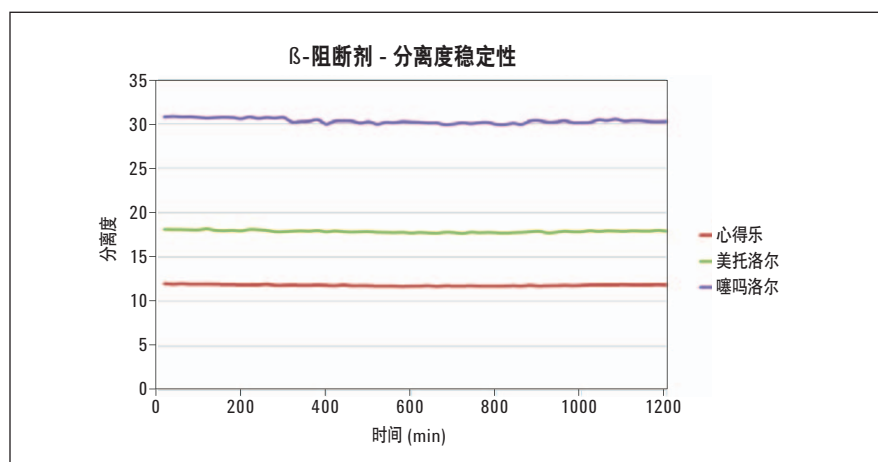


图 3 高 pH 分析条件下四种 β -阻断剂分离度的稳定性

在高 pH 条件下分析多肽

使用 15 mM NH₄OH 水溶液作为碱性流动相 (pH 10), 含有 15 mM NH₄OH 的 90% ACN 溶液作为有机流动相, 分析 BSA 胰蛋白酶酶解肽段。图 4 中所示为在 214 nm 波长下测得的 BSA 酶解肽段的色谱图。随机选取四个多肽用以监测保留时间的稳定性。

对 37 h 内保留时间稳定性的监测结果表明, 在 0 到 2250 min 内, 保留时间保持稳定, 参见图 5。

结论

本应用简报论证了 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统用于普通高 pH 应用的可行性。在分析以 β -阻断剂为代表的小分子化合物时, 确认在 20 h 内保留时间和分离度可保持稳定。另外, 对于以 BSA 胰蛋白酶酶解肽段为代表的生物分子, 在 37.5 h 的较长时间范围内保留时间也保持稳定。

总而言之, 在较长时间内, 高 pH 流动相 (pH 10-11) 对保留时间和分离度无不利影响。

在高 pH 应用中, 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent ZORBAX Extend-C18 色谱柱均表现出了极高的保留时间和分离度稳定性。

参考文献

1. “性能验证: 使用 ICP-MS 测定 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统释放的低含量金属”, 安捷伦科技公司, 版本号 5990-9352CHCN, 2011。
2. I. Peng and T. Farkas (2008). Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography–electrospray

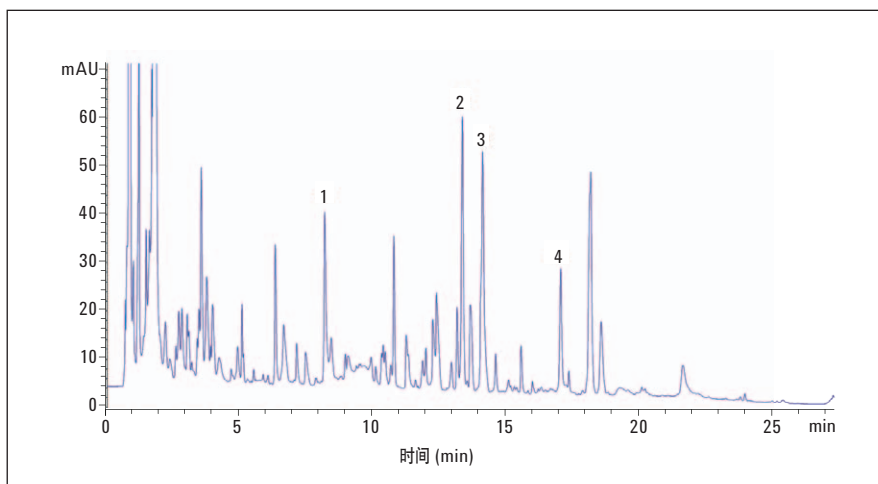


图 4
BSA 胰蛋白酶酶解肽段的液相色谱图

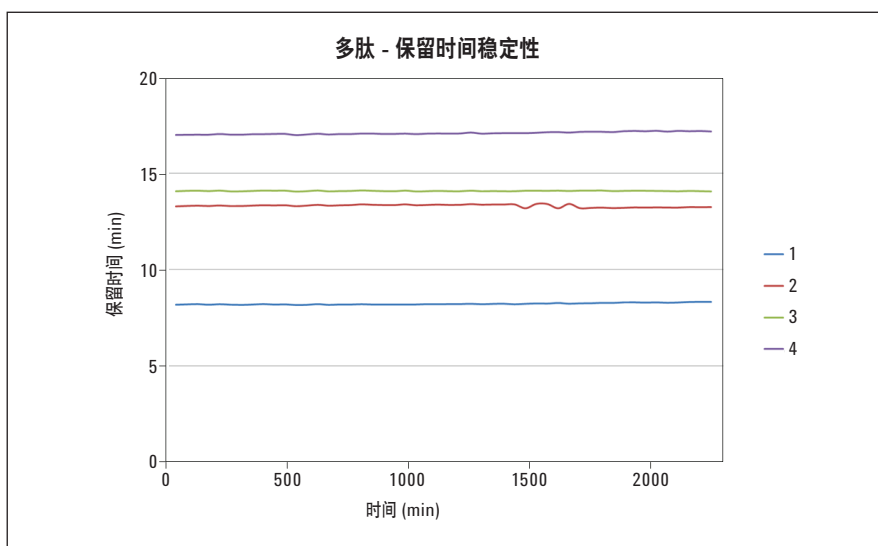


图 5
高 pH 分析条件下四种 BSA 胰蛋白酶酶解多肽的保留时间稳定性

mass spectrometry in high-pH mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 1179, 131–144.

3. “Using the High-pH Stability of ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 to increase Signal-to-Noise in LC/MS” (利用 ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 柱的高 pH 稳定性提高液质联用分析的信噪比), 安捷伦科技公司, 版本号 5989-0683EN, 2004。

www.agilent.com/chem/bio-inert

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2011
2011 年 12 月 1 日中国出版
版本号 5990-9353CHCN



Agilent Technologies