

使用 2D-LC 方法去除流动相中质谱不兼容流动相实现蛋白杂质的 QTOF 定性分析

应用简报

作者

李浪, 肖尧, 杜伟

摘要

目的: 利用基于阀切换的 2D-LC 技术实现在不改变原始色谱条件的情况下, 将某些质谱不兼容的流动相替换为质谱兼容的流动相, 从而实现蛋白类样品中杂质的质谱定性分析。

方法: 采用 Agilent Zorbax 300SB C18 柱 (4.6 x 250 mm, 5 μ m) 按照原始分析方法行杂质分析, 并且使用 Agilent ZorbaxSB C18 柱 (4.6 x 30 mm, 3.5 μ m) 作为捕集柱对目标杂质进行捕集, 第二维使用 Agilent Zorbax 300SB C18 (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m) 色谱柱, 流动相为质谱兼容的 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B) 进行梯度分析。**结果:** 使用上述方法可以准确的将蛋白类样品中的杂质峰切换入质谱进行定性分析, 并且完全排除了第一维流动相中质谱不兼容添加剂的干扰。**结论:** 此方法可以在完全不改变原有分析方法选择性的情况下, 实现把质谱不兼容流动相替换为兼容流动相的功能, 方法设置简单, 为此类情况的应用提供了良好的解决方案。



Agilent Technologies

引言

在液相色谱方法的开发中，常会用到一些添加剂以提高色谱行为表现，尤其是蛋白类样品分析中，常加入三氟乙酸，缓冲盐等添加剂，但是这些添加剂经常无法兼容质谱方法，而在某些分析中，如杂质分析，经常需要对某些杂质进行质谱鉴定，但是同时又不希望改变方法选择性以便通过保留时间对未知物进行定性，但是如果将原有方法中不能兼容质谱条件的添加剂改变的话，很可能造成选择性变化，从而无法定位欲分析的未知化合物的位置。另外有一些方法，如果仅仅使用质谱兼容的流动相体系，某些化合物很难取得良好的分离效果或峰，如果希望使用得到良好色谱表现并同时使用质谱检测的情况下，方法开发将异常困难。

为解决此类为题，我们开发了一个基于阀切换的 2D-LC 方法，保证了在各个峰的保留行为不发生变化的情况下（即原始色谱条件不变），通过 2D-LC 方法将原始条件中的质谱不兼容流动相变为兼容流动相，从而实现液质联用方法对未知杂质进行定量分析，并且成功将此方法应用在了蛋白质杂质的定性分析上，取得了良好的结果。

实验部分

仪器和试剂

Agilent 1200 Infinity 2D-LC 液相色谱-质谱联用系统，1290 二元泵，1260 四元泵，自动进样器，柱温箱（内置二位六通阀），二极管阵列检测器，6550Q-TOF 质谱仪。第一维色谱柱为 Agilent Zorbax300SB C18 柱（4.6 x 250 mm，5 μm ），捕集柱为 Agilent ZorbaxSB C18 柱（4.6 x 30 mm，3.5 μm ），第二维色谱柱使用 Agilent Zorbax 300SB C18（2.1 x 100 mm，1.8 μm ）。硫酸钠，甲

酸（色谱纯，Sigma 公司）；甲醇，乙腈（色谱纯，迪马科技）；超纯水由 MiliQ 纯水机制备（Merck-Millipore）。蛋白

色谱条件

仪器配置如图 1 所示，通过阀分别连接两维流路中的分析柱和捕获柱，样品先由泵 A 在第一维分析柱上进行分析，当欲检测的杂质流出时，通过阀切换流路将杂质品从第一维分析柱洗脱到捕获柱上，当杂质完全切割到捕获柱上之后阀切换回原位置，样品在分析柱上继续进行分析，同时泵 B 将捕获柱上捕集的杂质反冲到第二维分析柱上进行流动相替换并进行质谱分析。

色谱条件：第一维：色谱柱 Agilent Zorbax300SB C18 柱（4.6 x 250 mm，5 μm ）流动相：A：200 Mmol/L 硫酸钠水溶液；乙腈=9:1，B：水：乙腈=1:1

梯度时间见表 1，流速 1 mL/min，进样量 10 μL ，柱温 40 度，检测波长 214 nm；

表 1. 蛋白样品分析梯度时间表（第一维）

时间 (min)	0	25	28	33	33.5	40
B%	42	56	80	80	42	42

第二维：捕获柱：Agilent Zorbax SB C18 柱（4.6 x 30 mm，3.5 μm ），分析柱：Agilent Zorbax 300SB C18（2.1 x 100 mm，1.8 μm ），流动相 A：0.1% 甲酸水溶液；B：乙腈溶液，梯度时间见表 2，流速 0.4 mL/min，柱温 40 度，检测波长 214 nm，质谱参数：SCAN 正离子模式。

表 2. 蛋白样品分析梯度时间表（第二维）

时间 (min)	0	29	30
B%	20	20	50

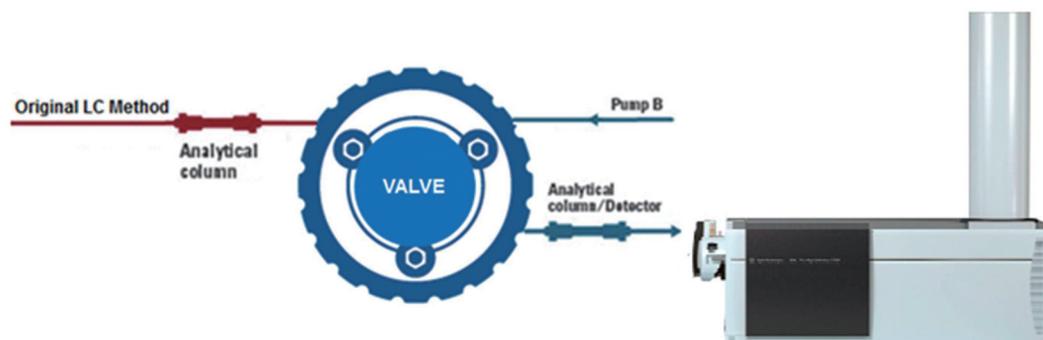


图 1. 流路连接示意图

实验结果

蛋白样品原始分析结果

首先在不切换阀的情况下仅在第一维对样品进行分析，确定杂质的保留时间，以确定阀切换的时间，结果见图 2。

之后，根据杂质的出峰时间确定了阀切换时间，并且编辑第二维分析的梯度条件，对杂质进行了测试，结果见图 3，为避免第一维流动相中的盐进入质谱造成干扰，设置质谱检测器在梯度开始的一段时间内将流动相排废。同时第二维质谱图，可看出 Q-TOF 在 SCAN 模式下有较高灵敏度，非常适合于此类分析。在第二维的紫外色谱图中，大的负峰是由于第一维的硫酸盐流动相造成，因为其紫外吸收本底要远低于第二维的 0.1% 甲酸流动相在 214 nm 下的本底吸收。

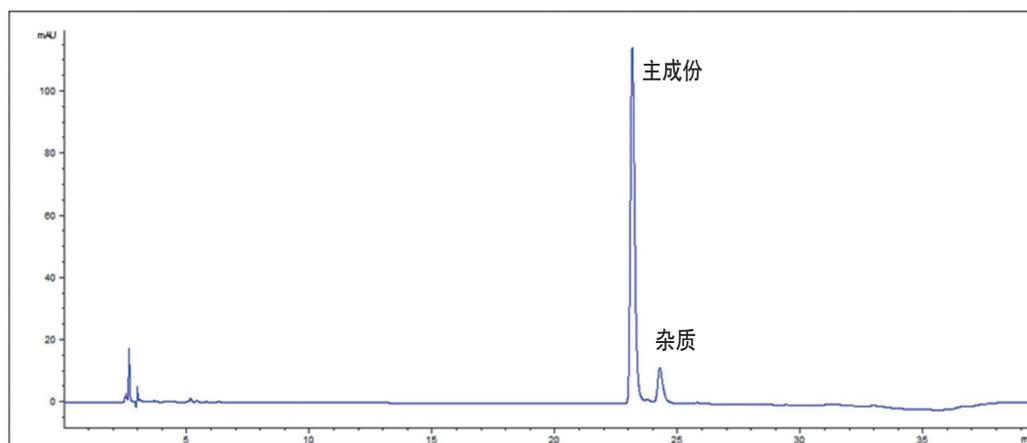


图 2. 蛋白样品的液相分析结果

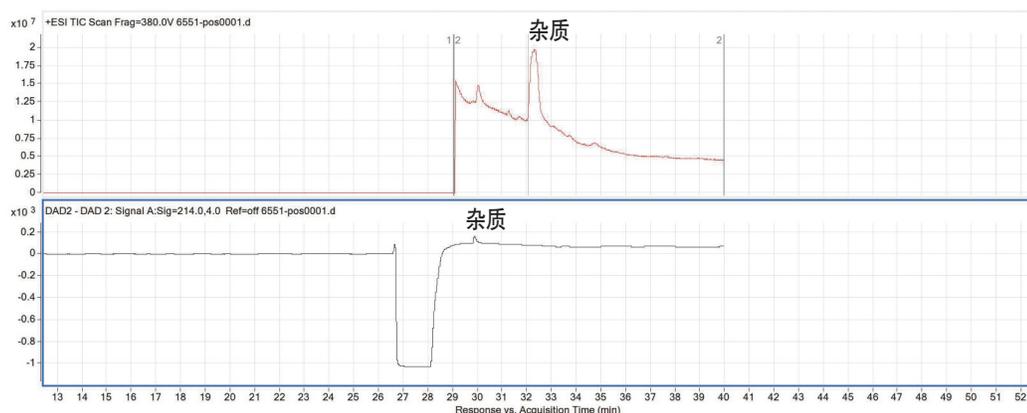


图 3. 杂质 2D-LC 分析结果

A: 杂质 2D 质谱 TIC 谱图; B: 杂质 2D 紫外色谱图

之后使用 MassHunter 软件对质谱数据进行处理，得到杂质的分子量信息，结果见图 4:

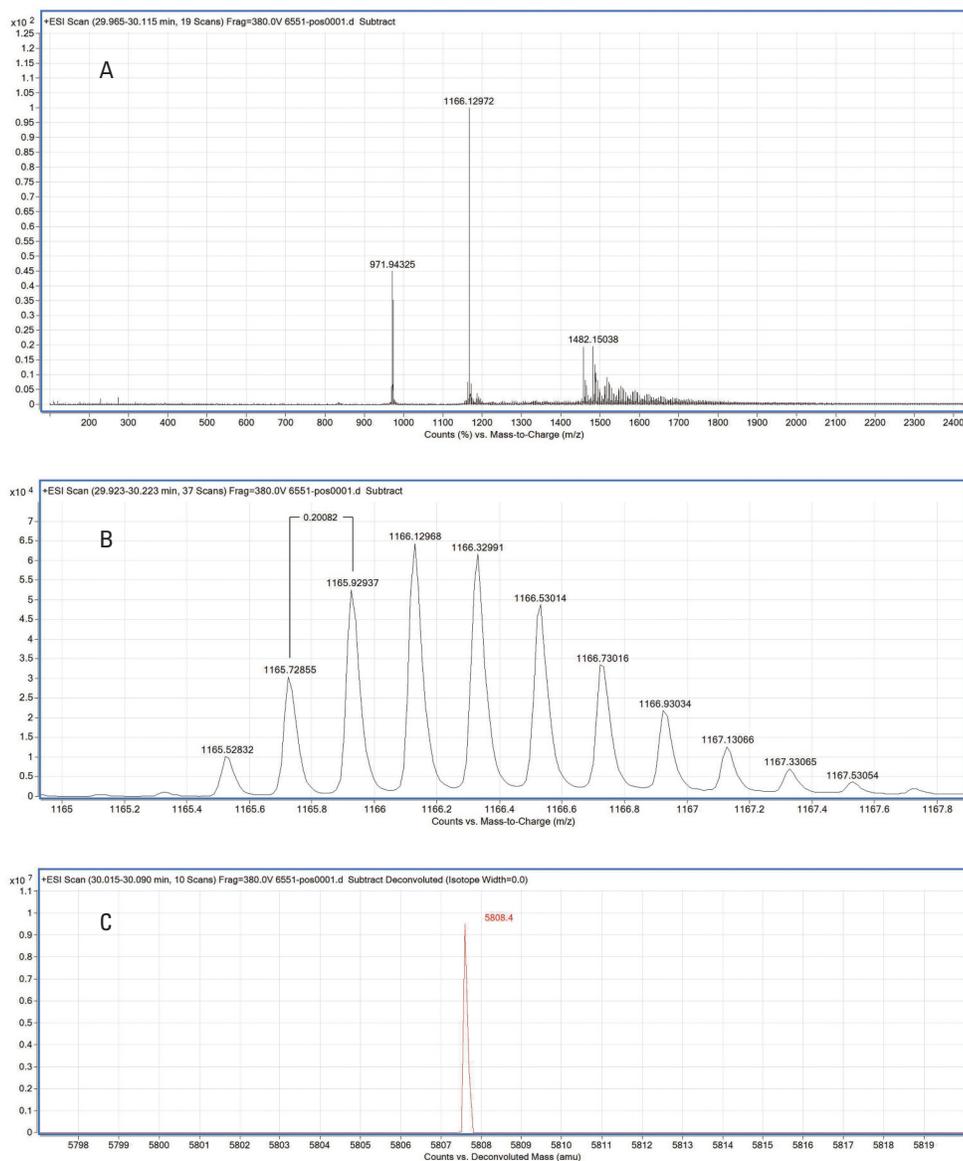


图 4. 杂质 2D-LC 质谱数据分析结果

A: 质谱数据棒状图; B: $m/z=1166$ 峰的轮廓图; C: 软件计算得到的分子量

讨论

本方法当中，只需确定第一维 HPLC 条件，即可以根据杂质出峰位置任意编辑阀切换的时间，便于灵活控制以及应对不同样品的快速调整。

在此实验中，使用 Q-TOF 质谱进行定性分析，但是并没有使用四极杆的选择离子功能，而是让所有离子全部进入 TOF 部分分析，所以这类实验可以在 TOF 上直接进行分析，以减少仪器购买和使用成本。

在以往一些文献中有类似的应用出现，样品在第一维按照原始条件进行分析，杂质出峰时，接在柱后的阀切换流路至质谱检测器流路，将杂质峰进行中心切割至第二维色谱柱，同时另外一台色谱泵通过三通输送质谱兼容流动相，进行流动相替换和质谱分析。

上述方法存在如下几个问题，而本方法可以很好的解决：

两维色谱柱兼容问题：第二维色谱由于要兼容质谱，只能使用小内径色谱柱（2.1 mm），如果第一维使用 HPLC 分析的常规色谱柱（4.6 mm 内径），在进行中心切割时，会有很大流速冲击第二维色谱柱，可能造成损坏，如果使用的是 UHPLC 色谱柱，还可能造成系统超压；如果第一维改用与第二维相同的小内径色谱柱，必然造成方法参数改变，需要进行方法的转换和重新验证，由于流速降低，仪器的延迟也可能对分析结果产生影响。

由于没有捕集柱，以及受到三通等额外配件的影响，杂质色谱峰可能会在中心切割时发生较严重的扩散，从而影响数据质量。另外，由于不使用捕集柱，为防止第二维色谱柱产生的反压对检测器造成损坏，切割杂质的动作需要在第一维检测器以前进行，所以如果进行中心切割，会使得第一维色谱图不完整，增加结果比较和确认的困难

此外，传统方法中第二维的泵通过三通与色谱柱相连，对流速的精确控制可能造成一定负面影响，在本方法中所有流路全部由阀控制，保证了精准度。

结论

在本实验中，我们开发了一个基于阀切换的 2D-LC 方法，保证了在各个峰的保留行为不发生变化的情况下（即原始色谱条件不变），通过 2D-LC 方法将原始条件中的质谱不兼容流动相变为兼容流动相，从而实现液质联用方法对未知杂质进行定量分析，另外，可以根据检测目的，使用不同种类质谱检测器对样品进行分析，有极好的灵活性。使用此类解决方案，完全无需对原始分析方法进行任何调整，包括色谱柱规格，流动相种类及色谱分析条件，避免了重新开发方法的麻烦。同时，此方法简便，稳定，快速，方法设置简单，并且可以灵活的根据不同杂质的保留时间调整阀切换时间，并且可以将此 2D-LC 配置连接于多种质谱设备前端，对于实现未知杂质的快速质谱定性分析提供了良好的解决方案。

更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013年10月9日，中国印刷
5991-3400CHCN



Agilent Technologies