

NanoLC-TOF性能测试

朱辉, 黄保

(广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 510530)

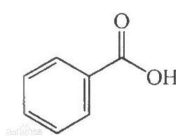
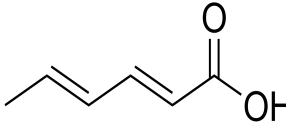
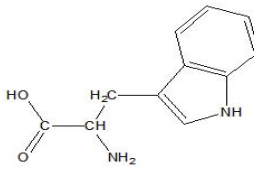
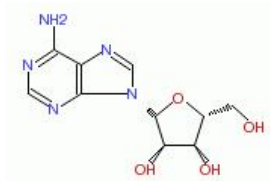
摘要: 利用 NanoLC 目的在于获得最高效色谱分辨率、灵敏度及重现性, 其分析柱极小的直径, 可用来分析极少的样品量和稀释的样品。同时 NanoLC 可高效分离各种多肽和蛋白质, 与质谱联用后是蛋白组学研究的一个重要应用方向。合作单位暨大药学院利用 NanoLC-TOF 分析开发两性离子亲水材料的毛细管整体柱, 通过不同样品评估其柱子的柱效、稳定性和柱容量等, 但在应用过程中重现性、色谱分辨率等都未能达到客户的要求故目前需要利用 NanoLC-UV 和 NanoLC-TOF 进行比对, 评估总结 NanoLC-TOF 联用问题。

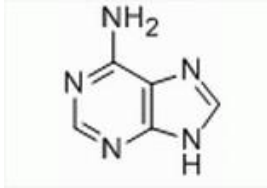
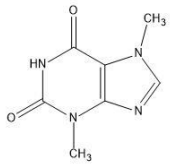
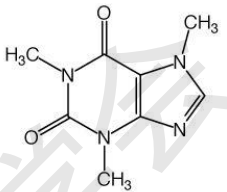
关键词: 性能测试; 质谱

用 1-己烷磺酸钠、苯甲酸、山梨酸等对 NanoLC-TOF 情况进行测试, 同时在 NanoLC-UV 上进行测试, 比对两者目标峰的峰型和半峰宽。另外在 ESI-TOF-05-L 进行色氨酸、腺苷、腺嘌呤、可可碱、咖啡因、山梨酸的测试, 确定下一步的实验方案。

1 测试条件

1.1 样品信息

名称	化学式	分子量	结构式
苯甲酸	C_6H_5COOH	122.12	
山梨酸	C_5H_7COOH	112.13	
色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.23	
腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.24	

腺嘌呤（维生素 B4）	C ₅ H ₅ N ₅	135.13	
可可碱	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.16	
咖啡因	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	

1.2 样品制备方法

1-己烷磺酸钠: 称取 12mg 的 1-己烷磺酸钠粉末, 用水溶解定容至 10mL, 得到 1200mg/L, 然后移取 1mL 用甲醇稀释 10 倍, 得到 120mg/L。

苯甲酸和山梨酸: 分别称取约 5mg 的样品, 用甲醇稀释到 5mL, 分别得到 1000mg/L 的苯甲酸和山梨酸溶液, 然后各移取 100ul 用甲醇稀释 100 倍, 各自得到 10mg/L。

腺苷、腺嘌呤和咖啡因: 分别称取约 5mg 的样品, 用甲醇（含少些水）稀释到 5mL, 分别得到 1000mg/L 的腺苷、腺嘌呤和咖啡因溶液, 然后各移取 100ul 用甲醇稀释 100 倍, 各自得到 10mg/L。

色氨酸和可可碱: 分别称取约 5mg 的样品, 用甲醇（加入少量氢氧化钠）稀释到 5mL, 分别得到 1000mg/L 的色氨酸和可可碱溶液, 然后各移取 100ul 用甲醇稀释 100 倍, 各自得到 10mg/L。

1.3 NanoLC-TOF 实验条件

仪器: 禾信 Nano-TOF-23; KYA 公司 NanoLC

流动相: 甲醇; 流速 1ul/min; 进样量为 4nl

Nano 源喷针: Metal TaperTip Emitters(外径: 320um, 内径 50um); 质谱条件: ESI(-3500), 质谱口温度: 150°C

测试样品浓度: 1-己烷磺酸钠: 120mg/L; 苯甲酸: 1000mg/L; 山梨酸: 1000mg/L

1.4 NanoLC-UV 实验条件

仪器：KYA 公司 NanoLC-UV

流动相：甲醇；流速 1ul/min；进样量为 4nl；紫外波长：214nm；色谱柱：空柱（外径 360um，内径 100um）

测试样品浓度：苯甲酸：1000mg/L；山梨酸：1000mg/L

1.5 ESI-TOF-05-L 测试条件

仪器：注射泵 HARVARD Pump 11 Elite；ESI-TOF-05-L

样品流速 5ul/min；质谱条件：ESI（4000，-4000），质谱口温度：250°C，ESI+（Acce：-4600，Mcp：-2800），ESI-（Acce：4300，Mcp：6100）

测试样品浓度：色氨酸、腺苷、腺嘌呤、可可碱、咖啡因、山梨酸甲醇溶液：各 10mg/L

2 测试方法

1-己烷磺酸钠在 NanoLC-TOF 的测试情况

苯甲酸在 NanoLC-TOF 和 NanoLC-UV 的测试情况

山梨酸在 NanoLC-TOF 和 NanoLC-UV 的测试情况

色氨酸、腺苷、腺嘌呤、可可碱、咖啡因和山梨酸在 ESI-TOF-05-L 的测试情况

3 测试结果

3.1 1-己烷磺酸钠在 NanoLC-TOF 的测试

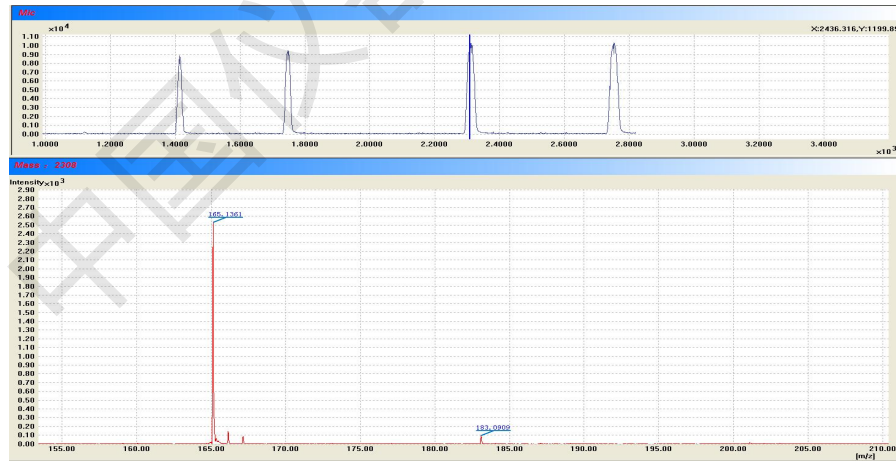


图 1 1-己烷磺酸钠在 NanoLC-TOF 上的 MIC 图

总结：120ppm 的 1-己烷磺酸钠目标峰的保留时间约 138s，半峰宽约 28s，峰型较为对称，未见拖尾情况。

3.2 苯甲酸在 NanoLC-TOF 和 NanoLC-UV 的测试

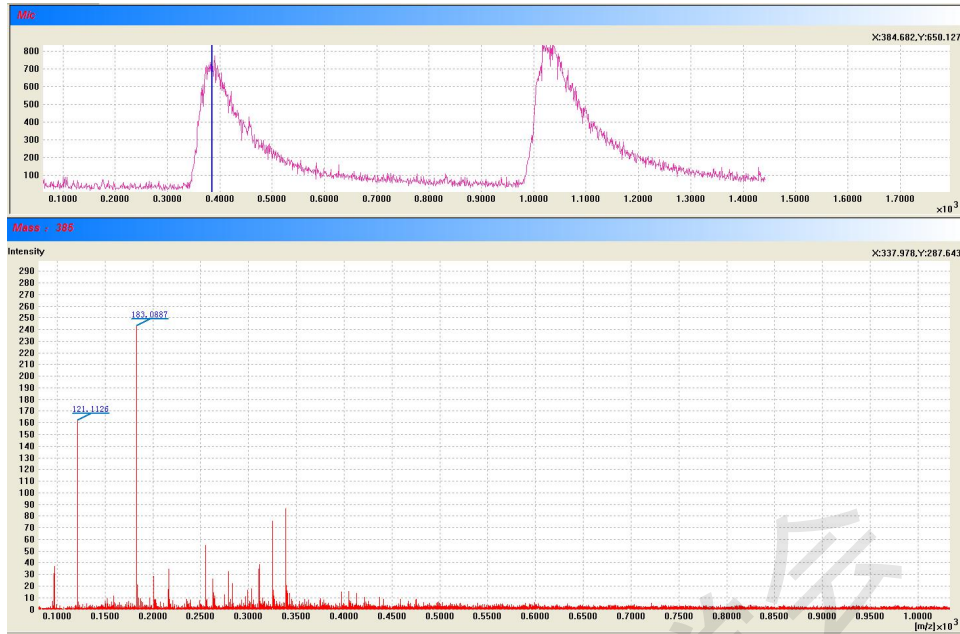


图 2 苯甲酸在 NanoLC-TOF 上的 MIC 图

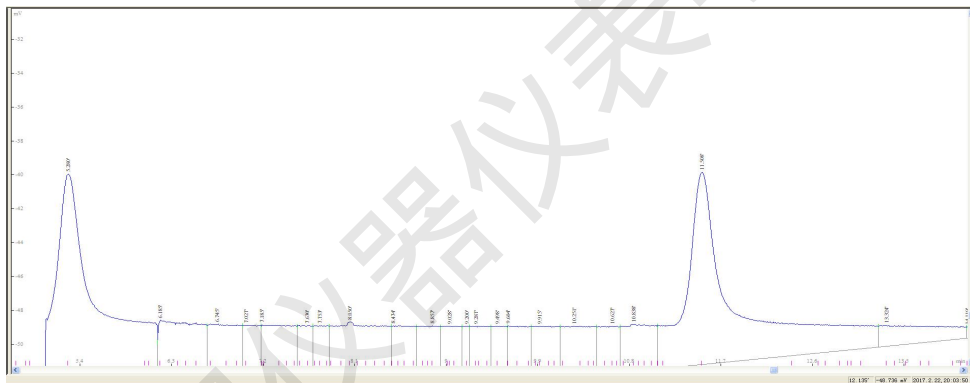


图 3 苯甲酸在 NanoLC-UV 上的色谱图

总结：1000mg/L 的苯甲酸在流动相、流速和进样量相同，柱体积大体一致的情况下，其目标峰在 TOF 上保留时间约 185s，半峰宽约 125s，且峰严重拖尾；其在 UV 上保留时间约 5.3min，半峰宽约 13s，峰有少些拖尾。

3.3 山梨酸在 NanoLC-TOF 和 NanoLC-UV 的测试

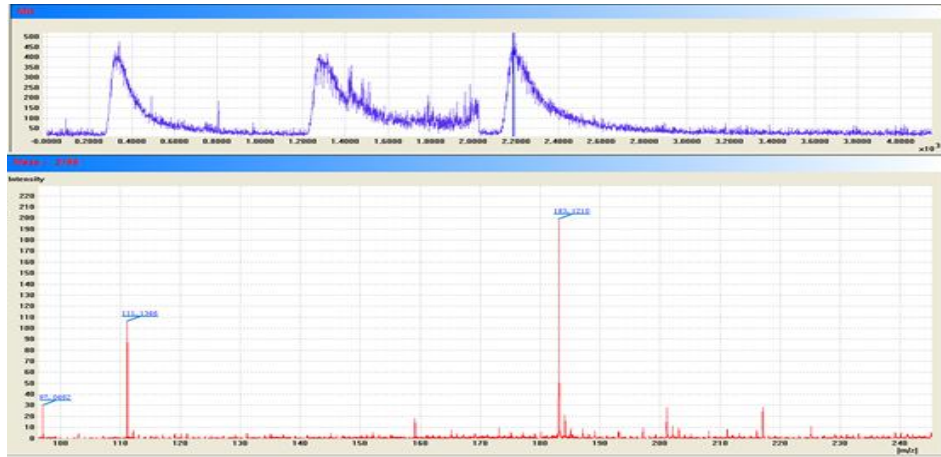


图 4 山梨酸在 NanoLC-TOF 上的 MIC 图

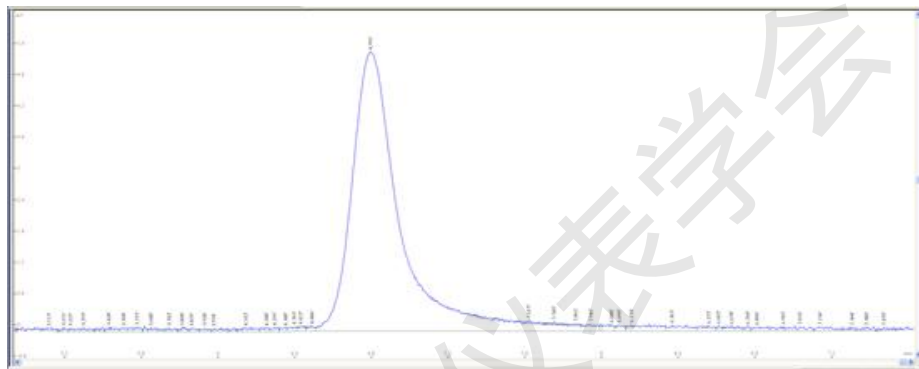
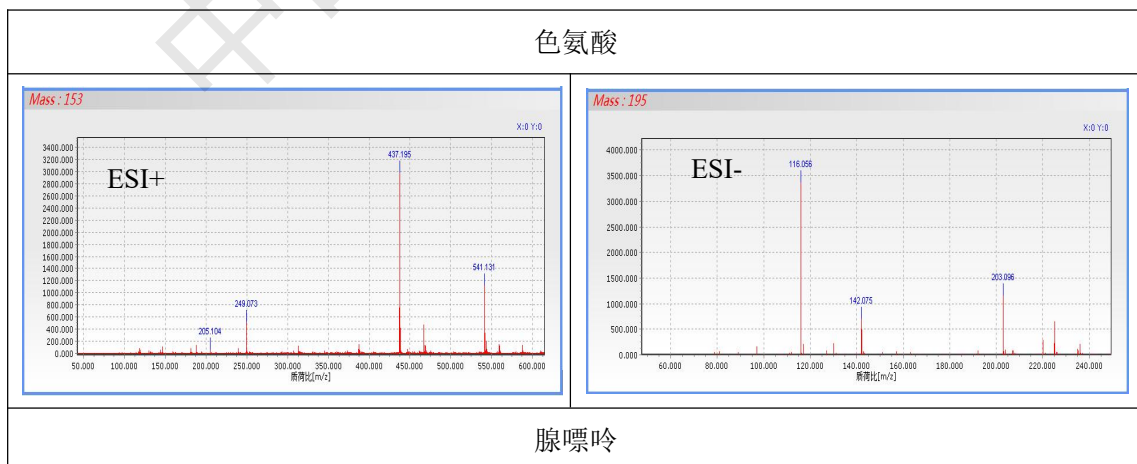


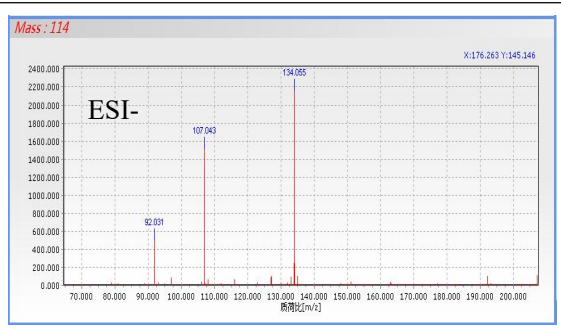
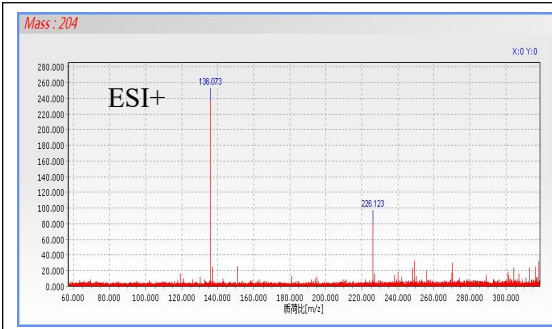
图 5 山梨酸在 NanoLC-UV 上的色谱图

总结：1000mg/L 的山梨酸在流动相、流速和进样量相同，柱体积大体一致的情况下，其目标峰在 TOF 上保留时间约 175s，半峰宽约 123s，且峰严重拖尾；其在 UV 上保留时间约 4.8min，半峰宽约 13s，峰有少些拖尾。

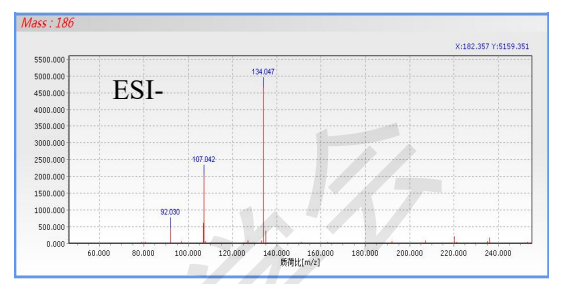
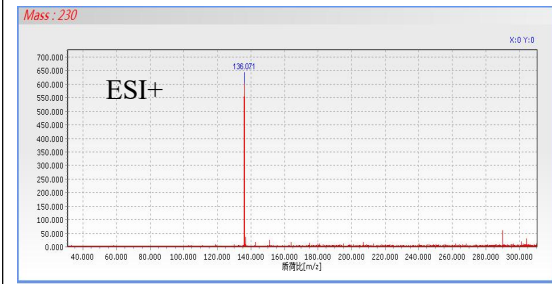
3.4 色氨酸、腺嘌呤、腺苷、可可碱、咖啡因和山梨酸在 ESI-TOF-05-L 的测试

表一 色氨酸、腺嘌呤、腺苷、可可碱、咖啡因和山梨酸的质谱图



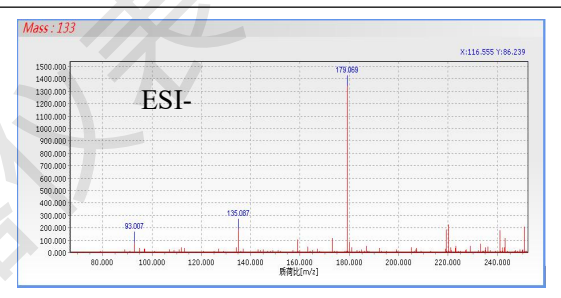


腺苷

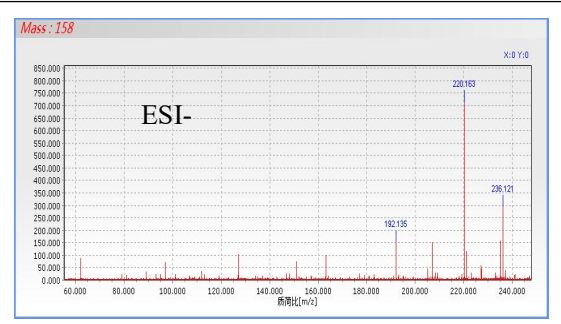
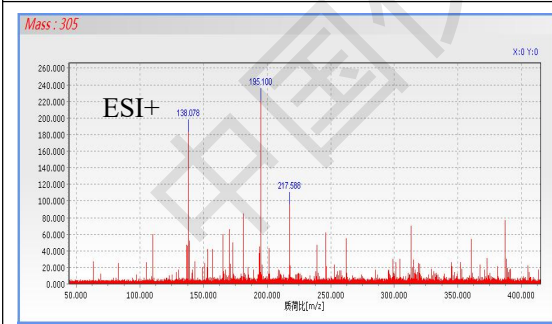


可可碱

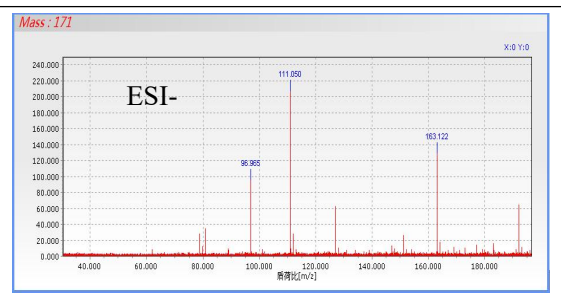
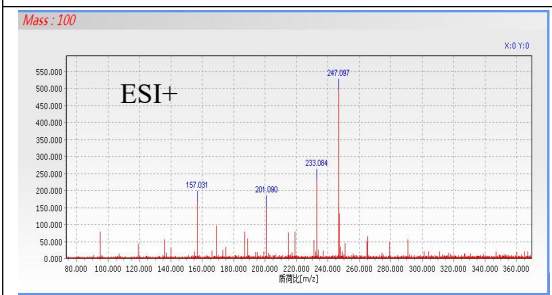
ESI+未检出



咖啡因



山梨酸



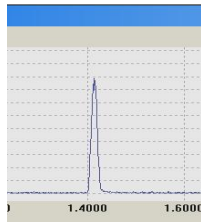
总结: 10ppm 色氨酸甲醇溶液在正负离子模式下的定性离子峰 **【M+H】⁺**和 **【M-H】⁻**分别为 m/z205.1 和 203.1, S/N (信噪比) 分别为 15 和 260; 10ppm 腺嘌呤甲醇溶液在正负离子模式下的定性离子峰 **【M+H】⁺**和 **【M-H】⁻**分别为 m/z136.1 和 134.1, S/N 分别为 48 和 440; 10ppm 腺苷甲醇溶液在正负离子模式下产生的碎片离子腺嘌呤目标峰分别为 m/z136.1 和 134.1, S/N 分别为 120 和 900; 10ppm 可可碱甲醇溶液在正离子模式下为未检出, 在负离子模式下的定性离子峰 **【M-H】⁻**为 m/z179.1, S/N 为 270; 10ppm 咖啡因甲醇溶液在正离子模式下的定性离子峰 **【M+H】⁺**和 **【M+Na】⁺**分别为 m/z195.1 和 217.6, S/N 分别为 44 和 20, 在负离子模式下未检出; 10ppm 山梨酸甲醇溶液在正负离子模式下的定性离子峰 **【2M+Na】⁺**和 **【M-H】⁻**分别为 m/z247.1 和 111.1, S/N 分别为 100 和 40。

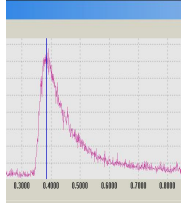
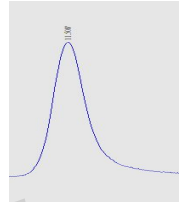
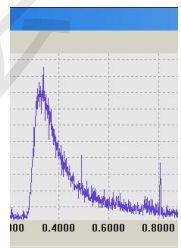
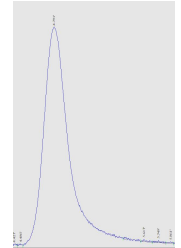
4 测试结论

通过 1-己烷磺酸钠、苯甲酸、山梨酸三个样品在同等条件下 NanoLc-TOF 上 MIC 图的比较, 1-己烷磺酸钠峰型较为对称, 苯甲酸和山梨酸则拖尾严重。针对 NanoLC-TOF 峰型个别样品拖尾严重问题, 下一步通过用在负离子模式下灵敏度较高的色氨酸、腺嘌呤、腺苷、可可碱进行实验测试, 观察它们 MIC 的灵敏度和峰型状况, 同时也用咖啡因和山梨酸在正离子模式下进行测试观察 MIC 的峰型情况

山梨酸和苯甲酸在 NanoLC-UV 上峰型正常, 但保留时间和 NanoLC-TOF 上则不一致, 有可能是因为柱前压力不同而导致出峰位置也不同 (TOF:0.2Mpa; UV:0.1Mpa)。下一步考虑用喷针 Uncoated SilicaTip Emitters-N (FS360-100-30-N-5) 进行 NanoLC-TOF 的测试, 分析金属喷针 (外径: 330um) 和连接石英毛细管 (外径: 360um) 因外径不同是否会引起个别物质 MIC 图出现拖尾。

对前面的测试结果进行总结, 附加图表再次总结, 如 (可以根据实际情况自行更改, 但必须总结成表格形式方便领导直接看结果)

测试样品	浓度 (mg/L)	来源	测试方法	结果	备注
1-己烷磺酸钠	120	负离子模式校准液	NanoLC-TOF	测出有明显的 1-己烷磺酸钠目标峰, 峰型较均匀, 峰保留时间约 138s, 半峰宽约 28s。	

苯甲酸	1000	暨大 药学 院药 品	NanoLC-UV	因波长未知，未测试	
			NanoLC-TOF	测出有明显的苯甲酸目标峰，峰型严重拖尾，峰保留时间约185s，半峰宽约125s	
山梨酸	1000	暨大 药学 院药 品	NanoLC-UV	有明显的苯甲酸目标峰，峰型有少些拖尾，峰保留时间约318s，半峰宽约13s	
			NanoLC-TOF	有明显的山梨酸目标峰，峰型严重拖尾，峰保留时间约175s，半峰宽约123s	
			NanoLC-UV	有明显的山梨酸目标峰，峰型有少些拖尾，峰保留时间约288s，半峰宽约13s	
总结				<p>1.通过 NanoLC-TOF 进样，不同样品测试出来的峰型相差较大，1-己烷磺酸钠峰型较均匀，半峰宽为28s，但苯甲酸和山梨酸则拖尾严重，导致半峰宽有120s。</p> <p>2.通过 NanoLC-UV 进样，只测试苯甲酸和山梨酸，两者峰型有少些拖尾，半峰宽只有13s。</p> <p>3.目前 NanoLC-TOF 中目标峰保留时间比 NanoLC-UV 提前，可能是由于其柱压高些引起（前者：0.2Mpa；后者：0.1Mpa）；个别样品峰型拖尾严重下一步还需进行多个样品测试去验证；半峰宽比 NanoLC 宽，可能与 Nano 源的结构有关，需购买 Uncoated SilicaTip Emitters-N 喷针再进行比对。</p>	

测试样品	浓度 (mg/L)	来源	测试方法	结果
色氨酸	10	暨大药学院 提供样品	直接进样 ESI+	测有目标峰 【M+H】⁺ , m/z205.1 其 S/N 为 15
			直接进样 ESI-	测有目标峰 【M-H】⁻ , m/z203.1 其 S/N 为 260
腺嘌呤	10		直接进样 ESI+	测有目标峰 【M+H】⁺ , m/z136.1 其 S/N 为 48
			直接进样 ESI-	测有目标峰 【M-H】⁻ , m/z134.1 其 S/N 为 440
腺苷	10		直接进样 ESI+	测有碎片目标峰 【M+H】⁺ , m/z136.1 其 S/N 为 120
			直接进样 ESI-	测有碎片目标峰 【M-H】⁻ , m/z134.1 其 S/N 为 900
可可碱	10	直接进样 ESI+	未测出	
		直接进样 ESI-	测有目标峰 【M-H】⁻ , m/z179.1 其 S/N 为 270	
咖啡因	10	直接进样 ESI+	测有目标峰 【M+H】⁺ , m/z195.1 其 S/N 为 44	
		直接进样 ESI-	未测出	
山梨酸	10	直接进样 ESI+	测有目标峰 【2M+Na】⁺ , m/z247.1 其 S/N 为 100	
		直接进样 ESI-	测有目标峰 【M-H】⁻ , m/z111.1 其 S/N 为 40	

1. 暨大药学院提供用于两性离子亲水材料的毛细管整体柱的药品通过

ESI-TOF-05-L 的直接进样分析, 在负离子模式下色氨酸、腺嘌呤、腺苷和可可碱的灵敏度较高, 咖啡因和山梨酸在正离子模式下灵敏度较高。

总结

2. 下一步用负离子模式下色氨酸、腺嘌呤、腺苷和可可碱以及正离子模式下咖啡因和山梨酸进行 NanoLC-TOF 和 NanoLC-UV 进样分析, 观察目标峰的峰型状况。