

将二氟乙酸用作小分子LC-MS分析的流动相改性剂

Melvin Blaze, Thomas H. Walter

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报展示了将IonHance二氟乙酸(DFA)用作小分子LC MS分析的流动相改性剂，并与甲酸和三氟乙酸(TFA)改性剂进行比较。

优势

适用于小分子LC-MS分析的酸性流动相改性剂种类有限，而IonHance DFA提供了全新选择。

简介

流动相改性剂是LC-MS分析的关键，会影响色谱保留时间和峰宽以及质谱(MS)信号响应。与配备非MS检测器的LC不同，采用MS检测的LC适用的流动相改性剂非常有限。LC-MS分析所使用的添加剂必须具有足够高的挥发性、能够达到高纯度并且能够提供出色的灵敏度。IonHance DFA既能够达到高纯度（钠和钾的浓度低于100 ppb），又具有足够高的挥发性（沸点133.0 °C，蒸气压1170 Pa），完全满足上述要求。

研究表明，IonHance DFA有利于肽和蛋白质的LC-MS分析，其峰宽较使用甲酸时窄，MS灵敏度较使用TFA时

高^{1,2,3}。本文针对酸性、碱性和中性小分子的LC-MS分析将IonHance DFA与甲酸和TFA进行了比较。比较依据是色谱保留时间和峰宽以及正负电喷雾电离(ESI)模式下的MS信号响应。

实验

向水性流动相和乙腈流动相中加入IonHance DFA (部件号: 186009201)、甲酸 (Optima LC-MS级, Fisher Chemical, 部件号: A117-50) 或TFA (Optima LC-MS级, Fisher Chemical, 部件号: A116-50) 制成浓度为0.1% (v/v)的溶液。表1列出了各分析物及其对应的优化多重反应监测(MRM)通道, 将这些分析物制成浓度为2.5 µg/mL的水溶液, 使用ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm色谱柱以及ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-S MS/MS进行分离分析。色谱保留时间、峰宽和MS信号响应均在乙腈梯度条件下测定(5~100%)。由于流动相中水相/有机相比率会影响MS信号响应, 为了比较使用3种添加剂在水相/有机相组成一定的条件下得到的MS信号响应, 本研究还通过LC后注样的方式, 以不同的水相/有机相比率对两种探针分析物 (2,6-二甲基苯胺和4-氯-N-甲基苯胺) 进行了MS分析。

结果与讨论

图1所示为使用3种流动相改性剂时所有分析物的保留时间对比。对于中性分析物2-氯-4-硝基苯胺, 使用3种改性剂时的保留时间相似, 而对于其它处于离子化状态的化合物, 使用3种改性剂时的保留时间表现出明显差异。水性改性剂溶液的pH值从2.0 (0.1% v/v TFA和0.1% DFA) 到2.7 (0.1% v/v 甲酸) 不等, 对于pKa值在1~4范围内的分析物, 其保留时间会因此而受影响。对于在分离条件下带正电荷的化合物, 由于改性剂的阴离子会与带正电荷的分析物形成离子对, 因此保留时间也会受改性剂的疏水性差异影响。TFA的疏水性最强, 甲酸最弱。关于肽类物质的保留时间差异, 已有结果类似的文献报道²。

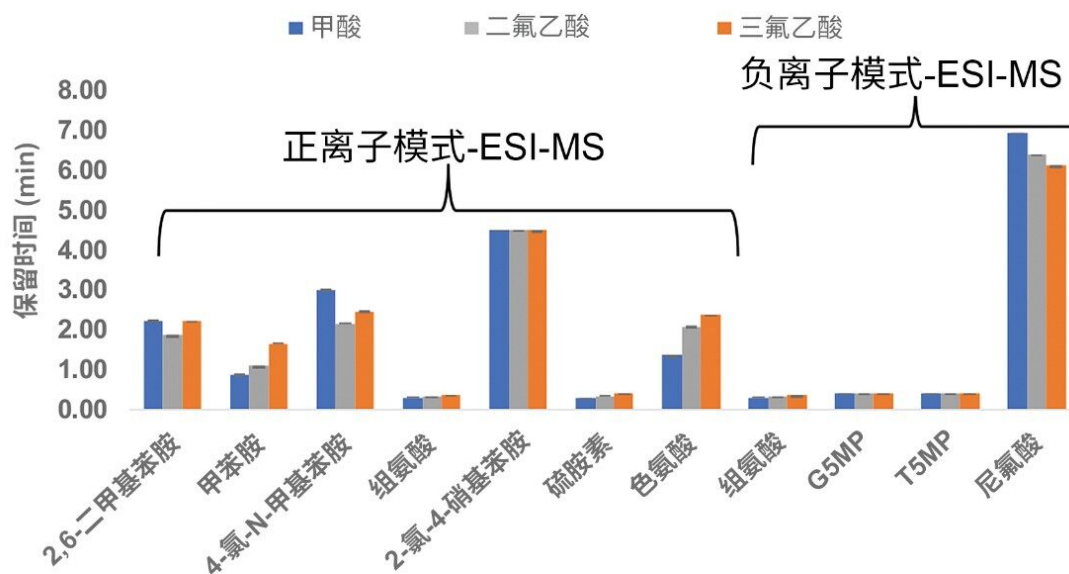


图1.使用含添加剂0.1% 甲酸、0.1% DFA或0.1% TFA的水性流动相/有机流动相溶液和ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm色谱柱分析小分子分析物得到的保留时间比较结果。误差棒表示三次重复测定的一倍标准偏差。

图2所示为使用3种流动相改性剂时所有分析物的色谱峰宽比较结果。对于多数化合物，使用DFA时的峰宽比使用甲酸时窄，与使用TFA时相似。关于肽类物质，已有趋势类似的文献报道^{1,2}。

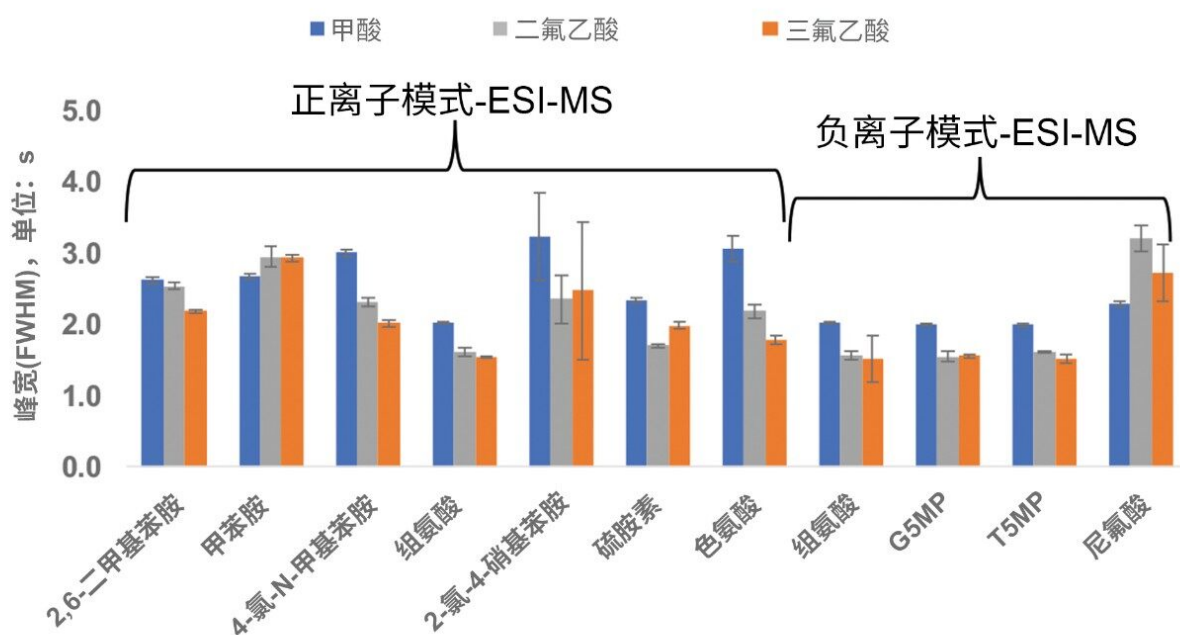


图2.使用含添加剂0.1% 甲酸、0.1% DFA和0.1% TFA的水性流动相/有机流动相溶液和ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm色谱柱分析小分子分析物得到的色谱峰宽（半高全峰宽）比较结果。误差棒表示三次重复测定的一倍标准偏差。

图3所示为使用3种流动相改性剂时所有分析物在相同LC-MS条件下的MS信号响应（峰面积）。所有分析物在使用DFA时的MS信号响应均明显强于TFA（量值上最高可以达到TFA的两倍）。酸性分析物在使用DFA时的MS信号响应与使用甲酸时相当。多数碱性分析物在使用DFA时的MS信号响应高于甲酸。之前针对肽类分析物得出的研究结果也表现出类似的趋势^{1,2}。

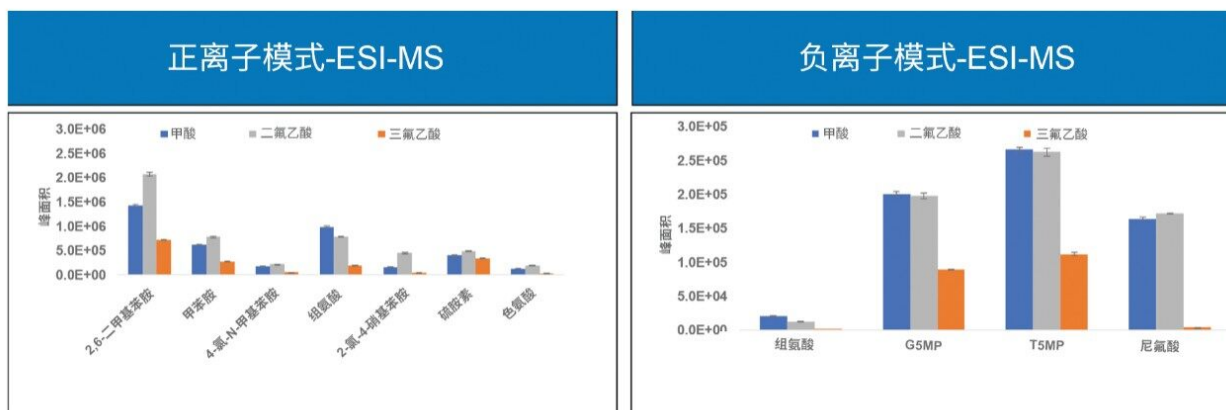


图3.使用含0.1% 甲酸、0.1% DFA和0.1% TFA的水性流动相/有机流动相溶液在ESI+和ESI-电离模式下分析小分子分析物得到的MS信号响应比较结果。误差棒表示三次重复测定的一倍标准偏差。

图4展示了在水性流动相/有机流动相组成一定的条件下，两种碱性分析物（2,6-二甲苯胺和4-氯-N-甲基苯胺）的MS信号响应。结果表明，在不同的水性流动相/有机流动相组成条件下，使用IonHance DFA时上述分析物的MS信号响应略强于甲酸，明显强于TFA。

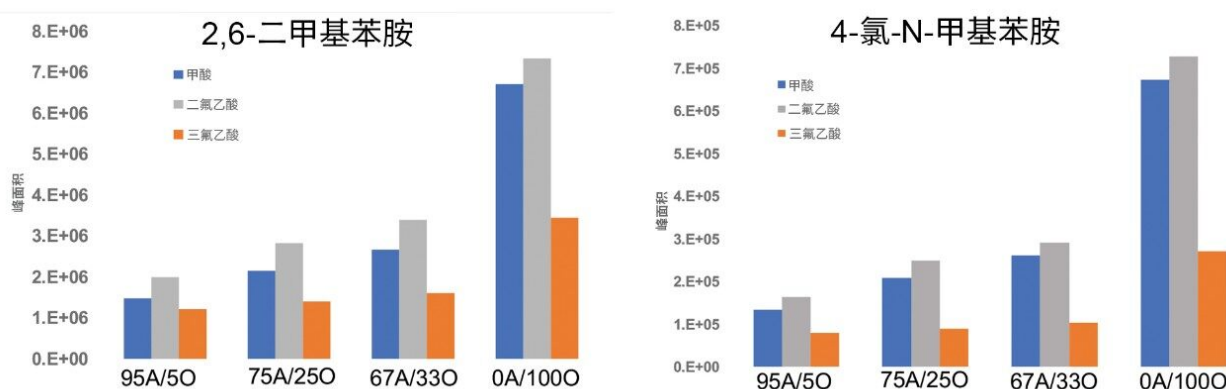


图4.使用含流动相改性剂0.1% 甲酸、0.1% DFA和0.1% TFA的水性流动相/有机流动相溶液，以不同的水相/有机相比率对碱性分析物2,6-二甲苯胺和4-氯-N-甲基苯胺进行分析得到的MS信号响应（LC后MS注射）比较结果。

结论

IonHance DFA用作流动相改性剂在小分子LC-MS分析中表现出巨大潜力，为该用途条件下种类有限的酸性改性剂增加了新的选择。IonHance DFA综合了甲酸与TFA改性剂的优势，所测分析物的峰宽比使用TFA时窄，所得MS信号响应强度与使用甲酸时相当。

参考文献

1. Kellett, J.; Birdsall, R.; Yu, Y. Application of Difluoroacetic Acid to Improve Optical and MS Performance in Peptide LC-UV/MS (《使用二氟乙酸改善肽LC-UV/MS分析的光学和MS性能》). 沃特世技术简报, 720006482EN (2019).
2. Nguyen, J. M等人, High Sensitivity LC-MS Profiling of Antibody-Drug Conjugates with Difluoroacetic Acid Ion Pairing (《利用二氟乙酸离子对试剂对抗体偶联药物进行高灵敏度LC-MS分析》). mAbs, 2019, 11(8),1358-1366.
3. Zhang, X.; Birdsall, R.; Yu, Y. Q. Using Mass Detection as an Orthogonal Technology to Improve Routine Analysis of Biotherapeutics (《使用质谱检测作为正交技术以改善生物治疗药物的常规分析》). 沃特世应用纪要, 720006157EN (2017).

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S <<https://www.waters.com/10160596>>

720006776ZH, 2020年3月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.