

腺嘌呤项目总结

腺嘌呤异构体分离，最初送样时间是 2014-10-10，到南京的时间是 10-16，到现在已经一个多月了，前后客户提供了三种方法。

| | |
|--|----------------|
| 色谱柱：C18 4.6×250mm 5um，120A； | |
| 检测器：紫外274nm | |
| 流动相1：称取0.63g的L-苯丙氨酸，0.47g硫酸铜，2.21g磷酸二氢铵，溶于38ml乙腈和962ml水的混合液中 | |
| 柱温：25℃ | 运行时间：25min |
| 流速：0.6ml/min | S-异构体相对tR：约0.9 |
| 进样量：20μl | 空白：流动相 |
| 备注：过夜0.2ml/min流速平衡流动相 | |

图 1-客户提供方法 1

8.2

流动相制备：溶解 0.75g 硫酸铜，0.17g L-苯基丙氨酸和 2.3g 磷酸二氢铵于 1000ml 水中，用三乙胺调节 PH 至 4.0 ± 0.05 。

稀释液：水

8.3 色谱分析条件：

柱子：色谱柱 ODS 3V，5 μm(150×4.6mm)或相等的

抽运模式：无梯度

流速：0.5ml/min

进样量：10 μL

柱温：25℃ ± 2

波长：260nm

运行时间：30min

图 2-客户提供方法 2

4.4 Preparation of reagent solutions

4.4.1 Buffer preparation

Dissolve about 0.17 g of L-Phenyl alanine in a 1000mL of Milli Q- water, add 2.3 g of ammonium dihydrogen phosphate and dissolve then add 0.75 g of copper sulphate pentahydrate and dissolve. Adjust pH to 4.0 ± 0.05 with ammonia solution and filter through 0.22 μm filter.

4.4.2 Mobile phase

Mix 950ml of buffer solution and 50ml of Acetonitrile. Filter through 0.22 μm filter and sonicate.

5 Diluent

Mobile phase

6 System suitability solution

Weigh accurately about 2.5 mg of each of PMPA standard and PMPA S-Isomer standard into a 50 mL volumetric flask, add 30 mL of diluent, sonicate for 2 minutes to dissolve and dilute to the mark with diluent and mix.

Note: This solution is stable for 3 months at 2-8°C.

7 Sample solution

Weigh accurately about 25 mg of sample and transfer into a 50 mL volumetric flask, add 30 mL of diluent, sonicate for 2 minutes to dissolve and dilute to the mark with diluent and mix.

图 3-客户提供方法 3

② 分离度测定溶液的 HPLC-UV 图 1

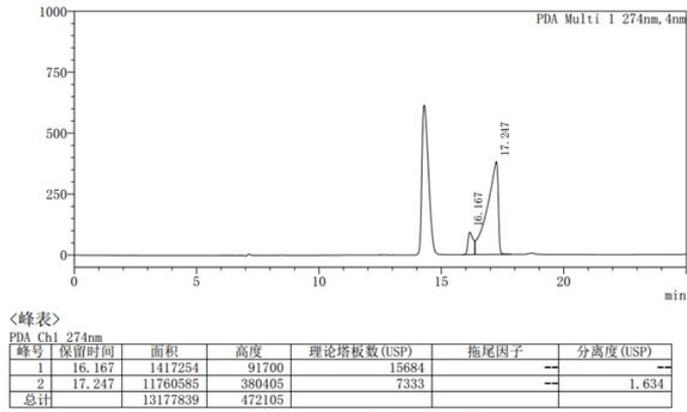
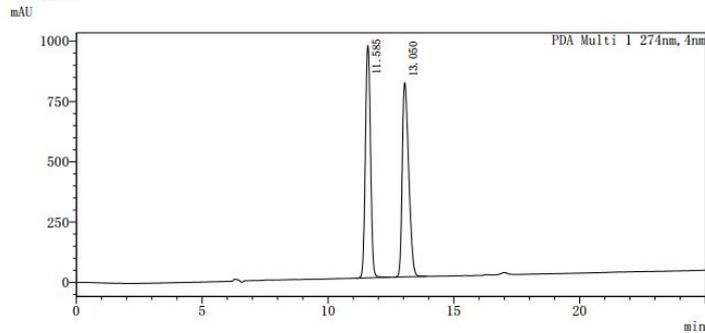


图 4-AQ-C18 腺嘌呤（方法 1）

这是最开始的结果，AQ-C18 做的，结果不好，后来换其他柱子做了。

<色谱图>



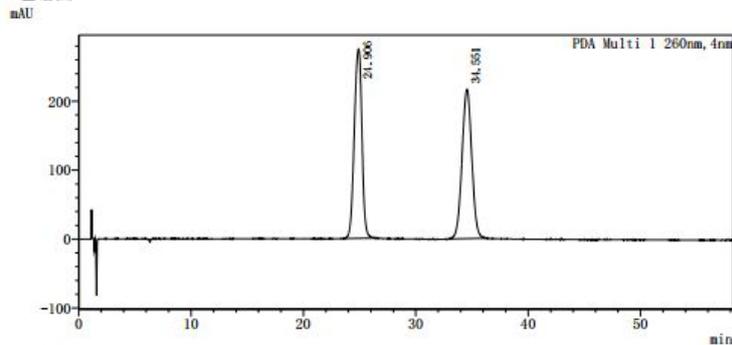
<峰表>

| 峰号 | 保留时间 | 面积 | 高度 | 理论塔板数 (USP) | 拖尾因子 | 分离度 (USP) |
|----|--------|----------|---------|-------------|-------|-----------|
| 1 | 11.585 | 13750953 | 961125 | 15009 | 1.050 | -- |
| 2 | 13.050 | 14445901 | 805202 | 11571 | 1.374 | 3.393 |
| 总计 | | 28196855 | 1766327 | | | |

图 5-XB-C18 腺嘌呤（方法 1）

这还是按照方法 1 做的，试了几种不同的 C18 柱之后，最后 XB-C18 还不错，客户也觉得分离挺好的，但是这个时候客户又提供了方法 2，说要按照新的方法来。

<色谱图>



<峰表>

| 峰号 | 保留时间 | 面积 | 高度 | 理论塔板数 (USP) | 拖尾因子 | 分离度 (USP) |
|----|--------|----------|--------|-------------|-------|-----------|
| 1 | 24.906 | 12999876 | 274839 | 6790 | 0.942 | -- |
| 2 | 34.551 | 13087813 | 216677 | 7673 | 1.015 | 6.921 |
| 总计 | | 26087689 | 491516 | | | |

图 6-LP-C18 (150mm) 腺嘌呤（方法 2）

图6是根据客户方法2做的结果，其实按照该方法做60min都未出峰，将流速从客户提供的0.5ml/min提高到1.5ml/min后，样品分别在约25min和35min出峰，分离结果很好，跟客户沟通了客户也说分离效果可以。但是过了几天客户说流速1.5ml/min太消耗试剂了，而且出峰时间还是有点晚；然后提供了第三个方法。下面是客户提供的标准图谱，也有两个，应该是客户的不同客户提供的。

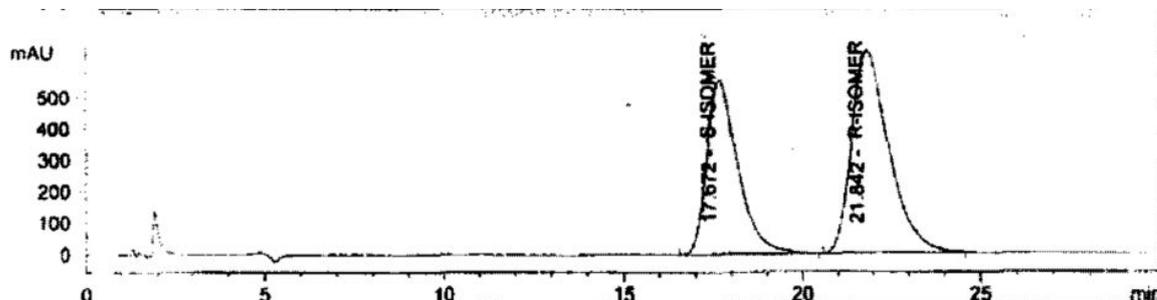


图7-客户提供参考图谱1

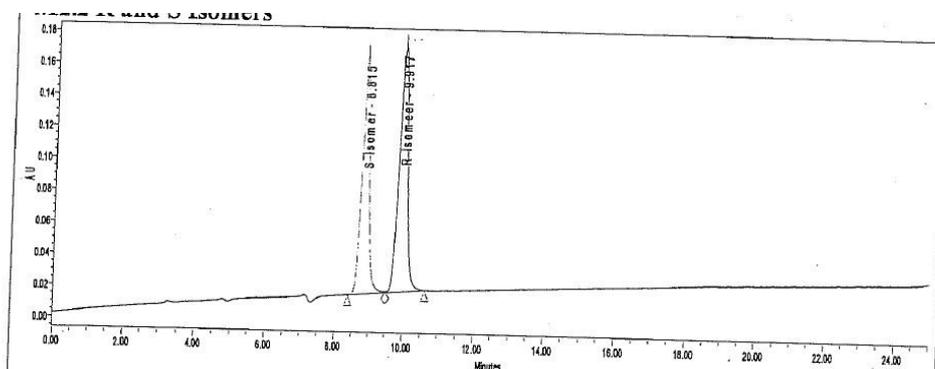


图8-客户提供参考图谱2

概括一下，客户提供的三种方法，无论哪一种，平衡时间都很长（过夜小流速平衡也不够，第二天至少还要再平衡3-4小时，太浪费时间），对仪器和柱子伤害严重（平时需要冲洗很长时间才能冲干净，检测器还堵过）；而且客户提供的图谱和我们做样的结果出峰时间同等条件下差别很大，我觉得不应该仅仅是柱子不同导致的，可能方法还是存在一定的因素。

汪少峰
2014-12-2