

亚 太 地 区
分 离 科 学 家 解 决 方 案

气体发生器, 助您 精简工作流程

Peak气体发生器能为您的LC-MS和GC/GC-MS提供即产即用的可靠气体。这避免了操作钢瓶带来的安全隐患和不便, 提高您的工作效率。Peak毕克气体在气体发生器行业有20年的经验, 我们承诺为客户提供优质的现场服务和技术支持。在实验室里配备一个Peak气体发生器, 您便可以专注于您其他的工作。

若想了解更多, 请立即联系我们。

www.peakscientific.cn



PEAK
SCIENTIFIC
专业呵护, 触手可及

在实验室里配备一台Peak氮气发生器,您便可以专注于您的实验,无需担心气体供应。保障您的气体正常输出是我们的首要任务,这就是我们在每个洲都设有当地驻扎工程师的原因。无论您身在何处,我们都能提供快速的现场响应服务。此外,我们全方位的产品保修涵盖发生器的每一个零部件,您大可安枕无忧。这就是我们Peak对客户的承诺。

Peak气体发生器能为您的实验室带来:



便捷

按需生产气体,无需更换钢瓶及提供
备用库存



连续

持续不断的气体供应,不会产生杂质,
也不会有气体用完的情况



经济

消除了使用钢瓶所不断产生的费用,便
于控制使用寿命内的运营成本



安全

您无需在实验室内储存高压钢瓶



可持续

避免重复的气体运输,绿色环保



现场服务

全面的现场保修和服务计划

若想了解更多 请登录我们的网站

www.peakscientific.cn

LC|GC

2018年2月/3月

第21卷 第1期

www.chromatographyonline.com

亚 太 地 区
分 离 科 学 家 解 决 方 案

超高压液相色谱法的发展

粒子、压力和器械的作用

LC 故障排查
A谱峰纯度评估指南

气相色谱连接
气相色谱检查的过去与现状

基本要点
用于生物制剂分析的分子排阻色谱法



MAXIMISE YOUR CANNABIS PURIFICATION

Advantages of CPC Equipment:

- Isolate any type of cannabinoids or terpenes
- No product loss
- High purity achievable



MACHEREY-NAGEL

Manufacturer of premium
chromatography media



Find what you are looking for!

- CHROMABOND® columns with classical and innovative SPE phases
- Original NUCLEOSIL®, professional NUCLEODUR® and highly efficient NUCLEOSHELL® HPLC columns
- Robust TLC glass plates, economical aluminum and polyester sheets

MACHEREY-NAGEL

www.mn-net.com



2018年2月/3月

第21卷 第1期

LC|GC

亚太地区
分离科学家解决方案

编辑政策:

所有提交给 LC•GC (亚太地区) 的文章均应通过杂志编辑顾问委员会的同行评议。

封面:

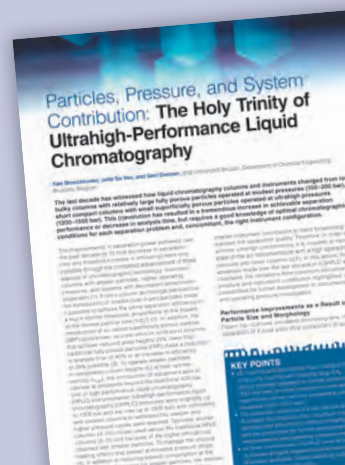
资料来源: De Space Studio/Shutterstock. com

封面文章

8 粒子、压力和系统贡献: 超高压液相色谱法的三位一体

Ken Broeckhoven、Jelle De Vos和Gert Desmet

对过去十年中(超)高压液相色谱法的进展进行了说明, 重点介绍了最大器械压力和器械的贡献, 并且对器械和操作压力取得进一步发展的可能性进行了调查。



专栏

18 LC 故障排查

液相色谱法的谱峰纯度, 第一部分: 基本概念、商业软件和局限性

Sarah C. Rutan、C.J. Venkatramani和Dwight R. Stoll

这是纯净的色谱峰吗? 我怎么样知道其中是否隐藏了一些其他东西?

28 气相色谱连接

气相色谱检测纲要的过去与现状

John V. Hinshaw

本期对过去已经消失的和现在与分离挑战有关的气相色谱检测器进行了回顾。

34 基本要点

优化生物制剂分析的分子排阻色谱法

来自LCGC的在线学习导师辅导, 在CHROMacademy.com对生物制剂分析的分子排阻色谱法(SEC)进行优化。

部门

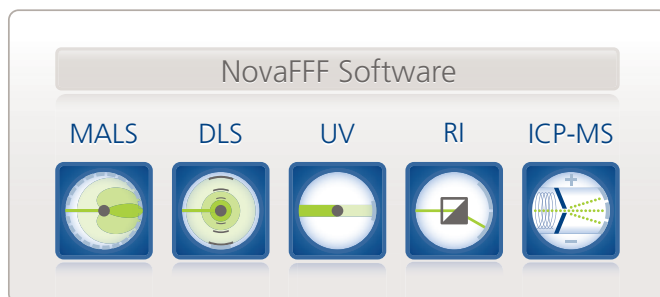
32 产品

The FFF - MALS Platform

Next Level Nano, Bio and Polymer Analysis



**NEW
With SEC Option!**



Contact us for more information: www.postnova.com

副总裁/集团发行人
Mike Tessalone
michael.tessalone@ubm.com

编辑总监
Laura Bush
laura.bush@ubm.com

总编
Alasdair Matheson
alsadair.matheson@ubm.com

执行编辑
Kate Mosford
kate.mosford@ubm.com

助理编辑
Lewis Botcherby
lewis.botcherby@ubm.com

销售经理
Oliver Waters
oliver.waters@ubm.com

销售主管
Liz Mclean
liz.mclean@ubm.com

数字媒体部高级主管
Michael Kushner
michael.kushner@ubm.com

网路直播运行经理
Kristen Moore
kristen.moore@ubm.com

项目经理
Vania Oliveira
vania.oliveira@ubm.com

在线阅读, 网址:
www.chromatographyonline.com

数字生产经理
Sabina Advani
sabina.advani@ubm.com

特殊项目部执行编辑
Kaylynn Chiarello-Ebner
kaylynn.chiarello.ebner@ubm.com

艺术总监
Dan Ward
dward@hcl.com

订户客服
登陆网站
www.chromatographyonline.com
请求或更改订阅内容或拨打客服部
门电话+001 218 740 6877

Hinderton Point,
Lloyd Drive,
Cheshire Oaks, Cheshire,
CH65 9HQ, 英国
电话 +44 (0)151 353 3500
传真 +44 (0)151 353 3601

订阅: 亚太地区有资质的读者可免费阅读LC•GC (亚太地区) 杂志。

如想申请免费阅读或更改您的姓名或地址, 请登录 www.chromatographyonline.com 点击订阅, 按提示进行操作。如想取消订阅或订阅过期刊物, 请将要求发送至 magazines@superfill.com, 在主题栏输入 LCGC (亚太地区)。

请填写您的订阅编号 (如有)。

原稿: 想要了解原稿准备指南, 请登录 www.chromatographyonline.com 或致电编辑 +44 (0) 151 353 3500。请谨慎检查后再提交, 出版社不对作品、照片或原稿的安全性负责。

联系方式: 电话: +44 (0) 151 353 3500。

再版: 本刊在当期以及往期的所有文章均可再版 (最低数量 250)。请联系 Brian Kolb, 地址: 德克萨斯州林地 2407 号 Timberloch Place, Wright's Media, 邮编: 77380。电话: 877-652-5295 分机号: 121。电子邮件: bkolb@wrightsmedia.com

© 2018 UBM (UK) 版权所有。依照 (1988 年 (英国) 版权、设计和专利法案) 规定或版权授权机构 (地址: 英国伦敦市托特纳姆法院路 90 号, 邮编: W1P 0LP) 发布的许可条款, 未经版权所有人书面同意, 不得以任何形式复制本刊物的任何部分 (包括复印或以电子形式保存本刊物, 以及暂时或顺带用于其他用途)。

版权所有者在 1988 年英国版权设计和专利法以外复制本出版物的任何部分, 应以书面形式申请, 并传真至 +1 732-647-1104, 或发送邮件至: Jillyn.Frommer@ubm.com

警告: 任何违反版权的行为可能会引起索赔和刑事诉讼。



10% 用后
废料

Daniel W. Armstrong
美国德克萨斯州阿林顿市, 德克萨斯大学
Günther K. Bonn
奥地利因斯布鲁克大学, 分析化学和放射
化学研究院

Deirdre Cabooter
比利时鲁汶大学, 制药和药理学系

Peter Carr
美国明尼苏达州明尼阿波利斯市, 明尼苏
达大学化学系

Jean-Pierre Chervet
荷兰祖特尔乌德, Antec 科学

Jan H. Christensen
丹麦哥本哈根市哥本哈根大学植物和环保
学系

Danilo Corradini
意大利罗马市, CNR 色谱学院

Hernan J. Cortes
美国密歇根州米德兰, H.J. Cortes 咨询
Gert Desmet
比利时布鲁塞尔市布鲁塞尔自由大学, 运
输模型和分析分离学

John W. Dolan
美国俄勒冈州麦克明维尔, LC 资源

Anthony F. Fell
英国布拉福德, 布拉福德大学, 药物
化学
Attila Felinger
匈牙利佩奇市佩奇大学, 分析和环境化学
系, 化学教授

Francesco Gasparrini
意大利罗马, 罗马一大, 生物活性物质化
学与技术研究所
Joseph L. Glajch
美国马萨诸塞州剑桥市仿真实达制药

Davy Guillarme
瑞士日内瓦, 洛桑大学, 日内瓦大学, 医
学院

Jun Haginaka
日本西宫市武库川女子大学药理学和制药学
学院

Javier Hernández-Borges
西班牙加那利群岛拉古纳大学, 化学学院
(分析化学)

John V. Hinshaw
美国俄勒冈州希尔斯伯勒, Serveron 公司

Tuulia Hyötyläinen
芬兰, 芬兰 VTT 技术研究

Hans-Gerd Janssen
荷兰阿姆斯特丹, 范特霍夫分子科学研究
院

Kiyokatsu Jinno
日本丰桥技术科学大学, 材料科学学院

Huba Kalász
匈牙利布达佩斯市森梅威思医科大学

Hian Kee Lee
新加坡国立大学

Wolfgang Lindner
奥地利维也纳大学分析化学研究院

Henk Lingeman
荷兰阿姆斯特丹自由大学化学系

Tom Lynch
英国纽伯里分析顾问

Ronald E. Majors
美国宾夕法尼亚州西彻斯特, 分析顾问

Debby Mangelings
比利时布鲁塞尔自由大学, 分析化学和制
药技术系

Phillip Marriot
澳大利亚维多利亚莫纳什大学化学学院

David McCalley
英国布里斯托尔西英格兰大学应用科学系

Robert D. McDowall
英国肯特布罗姆利大学 McDowall 咨询

Mary Ellen McNally
美国特拉华州纽瓦克市, 杜邦农作物保护

Imre Molnár
德国柏林 Molnar 研究所

Luigi Mondello
意大利墨西拿市墨西拿大学药物化学系

Peter Myers
英国利物浦市利物浦大学化学系

Janusz Pawliszyn
加拿大安大略湖滑铁卢大学化学系

Colin Poole
美国密歇根州底特律市韦恩州立大学

Fred E. Regnier
美国印第安纳州普渡大学西拉法叶校区生
物化学系

Harald Ritchie
英国米尔顿凯恩斯 Trajan Scientific and
Medical

Koen Sandra
比利时科特赖克市色谱研究院

Pat Sandra
比利时科特赖克市色谱研究院

Peter Schoenmakers
荷兰阿姆斯特丹市阿姆斯特丹大学化学工
程系

Robert Shellie
澳大利亚维多利亚州伍特 Trajan Scientific
and Medical

Yvan Vander Heyden
比利时布鲁塞尔市布鲁塞尔自由大学



关注我们 @ LC_GC



喜欢我们的页面 LCGC



欢迎加入 LCGC 领英团队

LC•GC (亚太地区) 出版社非常感谢编辑顾问委员会委员对我们的继续支持, 以及提出的专业建议。LC•GC (亚太地区) 的高标准和编辑质量得益于他们的不懈努力。

LCGC (亚太地区) 提供与分离科学相关的故障排除信息和应用解决方案, 以提高实验室分析化学家的实践性知识, 帮助其获得竞争优势。本刊具有较高的科学质量和商业客观性, 为读者提供了解决实际问题所需的工具, 使其提高了效率、生产率和员工价值。

THE 6 SHARPEST perspectives

for focused science and technology solutions in life science



Millipore®

Proven Preparation,
Separation, Filtration
& Testing Products

SAFC®

Tailored Pharma
& Biopharma Raw
Material Solutions

BioReliance®

Expert Pharma &
Biopharma Manufacturing
& Testing Services

Sigma-Aldrich®

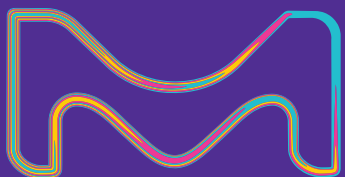
State-of-the-Art Lab &
Production Materials

Milli-Q®

Pioneering Lab
Water Solutions

Supelco®

Trusted Analytical
Products



Merck has brought together the world's leading Life Science brands, so whatever your life science problem, you can benefit from our expert products and services.

To find out how the life science business of Merck can help you work, visit
SigmaAldrich.com/advancinglifescience

#howwesolve

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Merck, the vibrant M, Milli-Q, Millipore, SAFC, BioReliance, Supelco and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

MERCK

粒子、压力和系统贡献： 超高压液相色谱法的三位一体

Ken Broeckhoven、Jelle De Vos 和 Gert Desmet, 布鲁塞尔自由大学化学工程系, 比利时布鲁塞尔

在过去的十年里, 液相色谱柱和仪器从较长并且体积较大的色谱柱转变为较短而紧凑的色谱柱, 前者带有比较大的全多孔颗粒, 在适度的压力下 (100–200巴) 运行, 而后者带有较小的表面多孔颗粒, 并且在超高压 (1200–1500巴) 下运行。这种发展 (革命) 极大地增加了可实现的分​​离性能, 或者说极大地减少了分析时间, 但是对于每一个分离问题以及相伴的正确仪器配置而言, 都需要在良好的色谱条件方面具有丰富的知识。

过去十年中, 在分离能力方面取得的进步 (分离时间减少10倍, 分离效率增加3倍) 可能只是色谱技术三个方面发展的结合: 更小粒子色谱柱的改进、更高的操作压力以及减少附加柱分散的系统 (1)。对于色谱柱技术而言, 由于引入了更小的粒子 (亚2微米), 因此可以在更短的时间范围内取得相同的分离效率, 与反粒子尺寸的平方成比例 ($1/d_p^2$) (2)。此外, 表面多孔颗粒 (SPP) (也成为核-壳或固体内核) 色谱柱的引进使塔板高度降低了25%, 低于传统的全多孔颗粒 (FPP), 分析时间可以降低40%, 而且分析效率可以增加25% (3)。为了在合理的色谱柱长度 (L) 中以最佳的速度 (u_{opt}) 运行更小的粒子, 引进的仪器需要在比传统高压液相色谱法 (HPLC) 仪器 (超高压液相色谱法 [UPHLC] 的压力最初是1000巴, 现在为1500巴) 受到的400巴压力限制更高的压力下运行, 并且需要填装良好的色谱柱以经受急剧上升的更高压力循环。一般而言, 因为可以使用较小的粒子获得更高的效率, 较短的色谱柱 (3–10厘米) 主要用于对抗传统的高压液相色谱柱 (5–25厘米)。为了对压力下降更多时出现的粘性发热效应进行管理 (4), 除了降低较小粒子在更高的最佳流速时的溶剂消耗外, 色谱柱的内直径 (i. d.) 也应该从由高压液相色谱法的4.6毫米减小至超高压液相色谱柱的2.1毫米。色谱柱体积的减小需要更小的仪器在谱带增宽方面的贡献, 从而保持分离质量。因此, 为了获得

超高压, 既需要操作压力较高的先进仪器, 也需要新型的色谱柱 (2, 5)。本文对过去十年中 (超) 高压液相色谱法的发展进行了介绍, 重点介绍了最大仪器压力和仪器的贡献, 并且对仪器和操作压力取得进一步发展的可能性进行了调查。

颗粒大小和形态带来的性能改进

图1 (a–c) 展示了4对谱峰的模拟分离色谱图 (每个的第一部分为 $k=1$ 、3、5和7, 选择度分别为1.080、1.053、1.048和1.046, 分别获得相同的分辨率 R_s)。色谱柱1 (图1[a])

要点

- 液相色谱柱和仪器已经从较长并且体积较大的色谱柱转变为较短并且紧凑的色谱柱, 前者带有比较大的全多孔颗粒, 在适度的压力下 (100–200巴) 运行, 而后者带有较小的表面多孔颗粒, 并且在超高压 (1200–1500巴) 下运行。
- 对过去十年中的发展进行了介绍, 重点介绍了最大仪器压力和仪器的贡献, 并且对仪器和操作压力取得进一步发展的可能性进行了调查。
- 超高压液相色谱法的三个基础部分都需要改进, 以获得更高的分离性能、更小并且更好的颗粒、更高的操作压力并降低系统贡献。

图片来源: De Space Studio/Shutterstock.com

6 powerful propellers

to accelerate expert science
and technology solutions in
life science



Millipore®

Proven Preparation,
Separation, Filtration
& Testing Products

SAFC®

Tailored Pharma
& Biopharma Raw
Material Solutions

BioReliance®

Expert Pharma &
Biopharma Manufacturing
& Testing Services

Sigma-Aldrich®

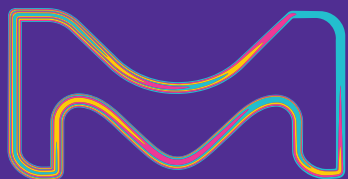
State-of-the-Art Lab &
Production Materials

Milli-Q®

Pioneering Lab
Water Solutions

Supelco®

Trusted Analytical
Products



Merck has brought together the world's leading Life Science brands, so whatever your life science problem, you can benefit from our expert products and services.

To find out how the life science business of Merck can help you work, visit
SigmaAldrich.com/advancinglifescience

#howwesolve

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Merck, the vibrant M, Milli-Q, Millipore, SAFC, BioReliance, Supelco and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

MERCK

图1：不同色谱柱尺寸和颗粒大小的模拟色谱图：（a）4.6×250毫米，5微米的全多孔；（b）2.1×100毫米，2微米的全多孔；（c）3.0×100毫米，2.7微米的表面多孔；（d）2.1×250毫米，2微米的全多孔。塔板高度的计算方法为： $h=H/d_p=a+b/v_0+c\cdot v_0$ ，其中 $v_0=U_0\cdot d_p/D_{mol}$ ， $D_{mol}=10^{-9}m^2/s$ 而且对于全多孔和表面多孔而言， $a=0.75$ 或 0.5 ， $b=4$ ， $c=0.1$ 或 0.075 。（a-c）的所有色谱柱都假定在 U_{opt} 的条件下进行操作，其中全多孔颗粒的 $h_{min}=2$ 而表面多孔颗粒的 $h_{min}=1.6$ 。色谱柱（d）在 $0.76\cdot U_{opt}$ 的条件下进行操作，而色谱柱（e）在 $1.9\cdot U_{opt}$ 的条件下进行操作。色谱柱压力下降的计算公式为 $\Delta P=L\eta U_{opt}/K_v$ ，其中黏度 $\eta=10^{-3}Pa\cdot s$ ， $\phi_{FP}=800$ ， $\phi_{SP}=650$ ， $K_v=d_p^2/\phi$ 。进样体积根据色谱柱的横截面进行确定。

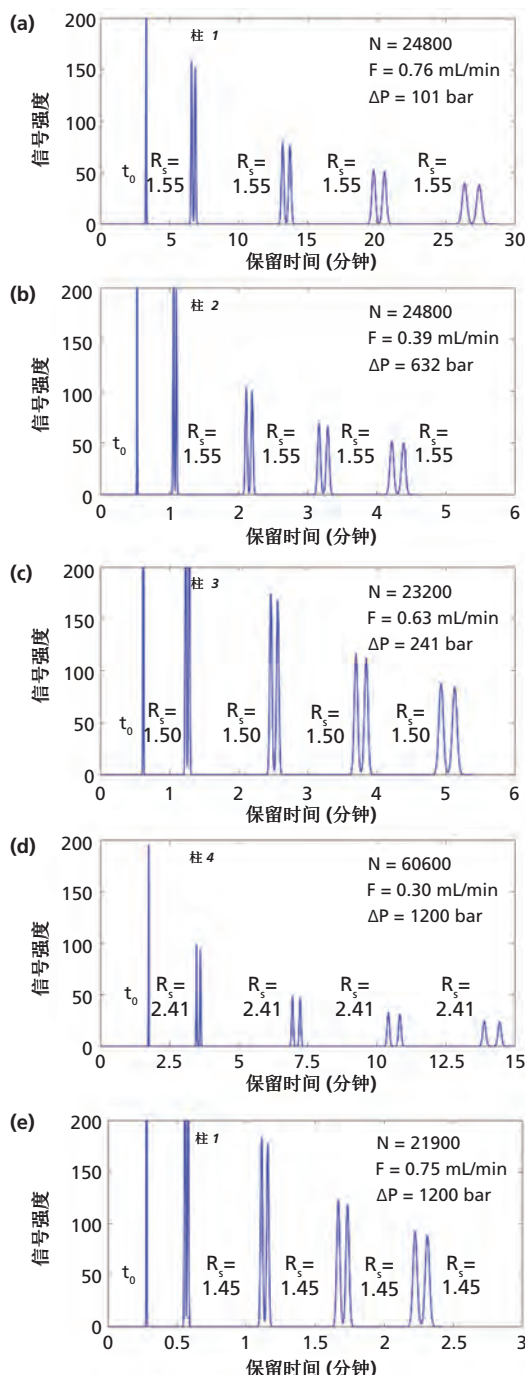
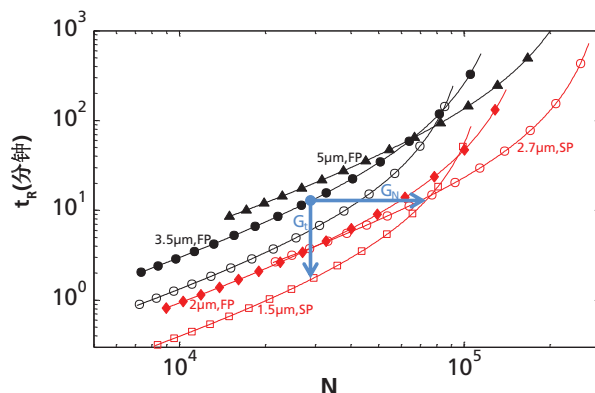


图2：对不同颗粒尺寸和色谱柱形态（FP=全符号，SP=开符号）的高压液相色谱法（黑色）和超高压液相色谱法（红色）仪器与色谱柱的运动性能限制进行比较。压力限制：对于1.5微米（开符号）/2微米（全符号）和2.7微米（开符号）颗粒而言，高压液相色谱法=400巴，超高压液相色谱法=1500或1200巴。保留系数 $k=9$ ，因此 $t_R=10\cdot t_0$ 。其他参数与图1相同。



具有高压液相色谱法常规使用的色谱柱的典型尺寸，即25厘米长，内直径为4.6毫米，使用5微米的全多孔颗粒进行填充（不同色谱柱性能的概述参见表1）。色谱柱2（图1[b]）代表10厘米长的超高压液相色谱法的等价物，但是使用2微米的全多孔颗粒进行填充，而且都在最佳速度下运行，降低之后的塔板高度 $h=H/d_p=2$ 。很明显，两次分离都取得了相同的分离效率和分辨率，但是色谱柱2快了6.25倍。但是，后面的分离也需要增加相同的操作压力，高于标准的高压液相色谱分析仪器（400巴）。按照超高压液相色谱法中经常使用的比较狭窄的内直径（2.1毫米）对色谱柱2中对应的流速进行计算。正如前文所述，处理溶剂消耗减少之外，内直径比较狭窄的色谱柱也需要对压力下降更多时所减小的粘性发热效应进行补偿，以最佳或高于最佳的速度对其进行操作。如果将全多孔颗粒色谱柱转变为填充有2.7微米表面多孔颗粒的色谱柱，则可以在分析时间增加和压力下降增加之间获得良好的平衡（图1[c]，色谱柱3）。这些颗粒不仅有减少之后接近1.5的最小塔板高度，由于更低的孔隙率和更低的流动阻力 ϕ （15%-20%），其为了达到相似的速度而需要的压力下降也更少。因此，只需要小幅增加分析时间（+17%），更大的颗粒（2.7微米vs 2微米）差不多就可以获得相同的效率（-6.5%），将图1（c）（色谱柱3）与图1（b）（色谱柱2）进行比较，就可以看出这一点。主要优势在于2.7微米的颗粒（与2毫米的颗粒比较）在其最佳流速情况下运行该色谱柱所需要的操作压力更低（3）。实际上，所需要的压力只是5微米全多孔颗粒的2.4倍。由于这个原因，考虑将色

谱柱3的内直径定为3毫米，因为在这些更低的压力下，粘性发热情况不是很明显(3)。最近，具有狭窄颗粒尺寸分部的全多孔颗粒已经被证明可以获得降低之后1.7-1.9的最小塔板高度。也就是说，在传统的全多孔颗粒($h=2$)和表面多孔颗粒($h=1.5$)之间(6)。

操作压力下分析时间和效率的增加

图1展示了如何通过改变粒子类型和尺寸在更短的时间内获得相同的分离质量。但是，也可以在分析时间相同的情况下(或者分析时间出现些许增加)，通过使用更长的色谱柱来提高分离质量。图1(d)展示了使用25厘米长的色谱柱分离2微米的全多孔颗粒(色谱柱4)。如果在最佳速度之下运行，操作压力需要大于1500巴。为了代表更加真实的情况，对流速进行了限制，符合1200巴的压力限制(目前所有的超高压液相色谱仪器都可以达到)，以使速度略低于最佳速度(-24%)。然而，2微米颗粒的操作速度是5微米颗粒的2倍(没有压力限制的时候为2.5倍)，使分析时间减少二分之一，效率增加2.4倍，而且分辨率增加1.6倍(因为 $R_S \sim N^{0.5}$)。使用小型粒子的额外好处是可以在大于最佳的速度下对其进行操作，而性能只出现一点损失，因为C末端对H的贡献与对垫片 d_p^2 的贡献成比例。图1(e)对这一点进行了介绍，其中色谱柱2的操作速度几乎是其最佳速度(限制为 $\Delta P=1200$ 巴)的2倍($1.9\times$)。由于效率和分辨率只损失了一点或者没有损失，而实际的分离几乎是其两倍。

为了使最佳的流动相速色谱柱长度以及颗粒尺寸相结合，同时将系统或色

谱柱的压力限制考虑在内，动态图方法(7-11)为(超)高压液相色谱法的分离性能之间的比较提供了一种更加简洁的方法。通过对运动性能限制(KPL)进行绘制，也就是将所获得某一性能的最短时间或者在给定的分析时间内获得的最高性能与色谱支持(颗粒尺寸和种类)的最佳条件进行比较(8,10)。可以在最大压力下

(高压液相色谱法为400巴，超高压液相色谱法为1200-1500巴)进行操作并且对色谱度的长度进行优化来获得这些限制。这些运动性能限制绘制在图2(a)中，这是在参考9的情况下对图1以及参考12的情况下对图3的升级版(简化)。图中通过对分析时间 t_R (计算方法为 $t_R = t_0 \cdot (1 + k)$ ，其中 $k=9$)和效率 N 进行绘制，提供了

气体发生器， 助您精简工作流程

Peak气体发生器能为您的LC-MS和GC/GC-MS提供即产即用的可靠气体。这避免了操作钢瓶带来的安全隐患和不便，提高您的工作效率。Peak毕克气体在气体发生器行业有20年的经验，我们承诺为客户提供优质的现场服务和技术支持。在实验室里配备一个Peak气体发生器，您便可以专注于您其他的工作。

若想了解更多，请立即联系我们。

www.peakscientific.cn



专业呵护，触手可及

PEAK
SCIENTIFIC

图3：（a-b）当从（a）三组成对的色谱柱系统变为（b）两组成对的色谱柱系统时候，其中前者包含在486巴的压力下操作2.6微米的颗粒，而后者包含在1402巴的压力下操作1.5微米的颗粒，对等度模式下烷基苯分离可获的动态时间增益系数进行了实验验证。在保持相同谱峰容量的情况下，通过使用线性梯度（比率梯度时间 t_G 超过色谱柱的无效时间 t_0 ，其中 $t_G/t_0=12$ ，梯度范围 $D_f=0.75$ ）对废水污染物进行了分离，操作对象为（c）两组成对的色谱柱和（d）一个色谱柱，其中前者在495巴的压力下对1.5微米的核壳颗粒进行操作，而后者在1399巴的压力下对1.5微米的核壳颗粒进行操作。改编自参考文献13。

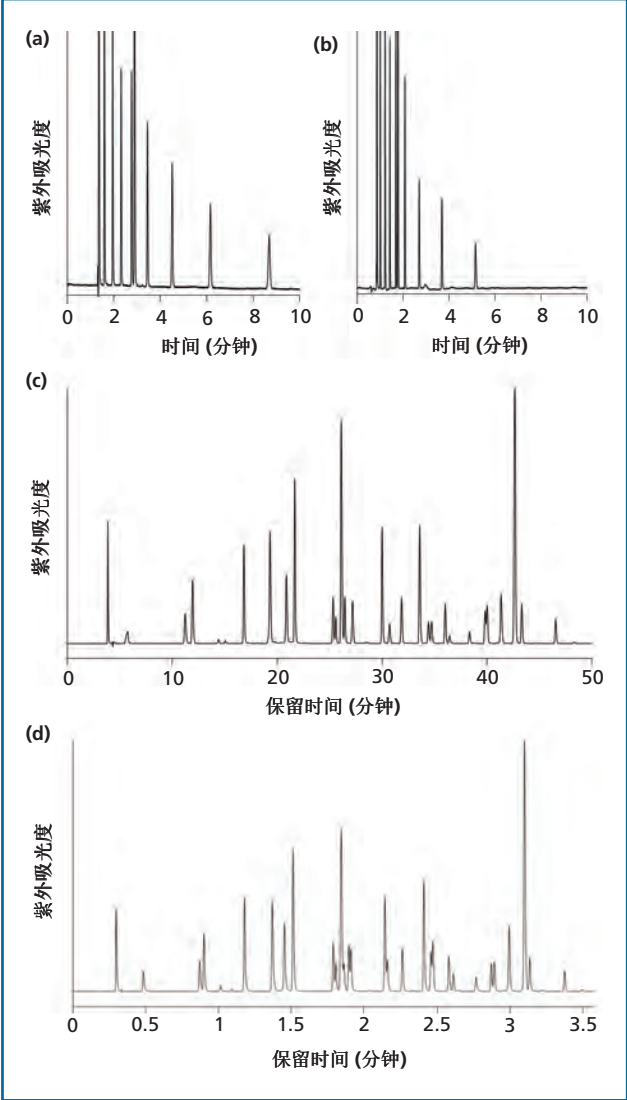


图4：与图1（a-d）的情况相似，但是现在假定附加色谱柱的体积分散贡献为 $50 \mu L^2$ ，特别是高压液相色谱仪器，并且假定压力计算的总管长为50厘米，内直径为170微米。

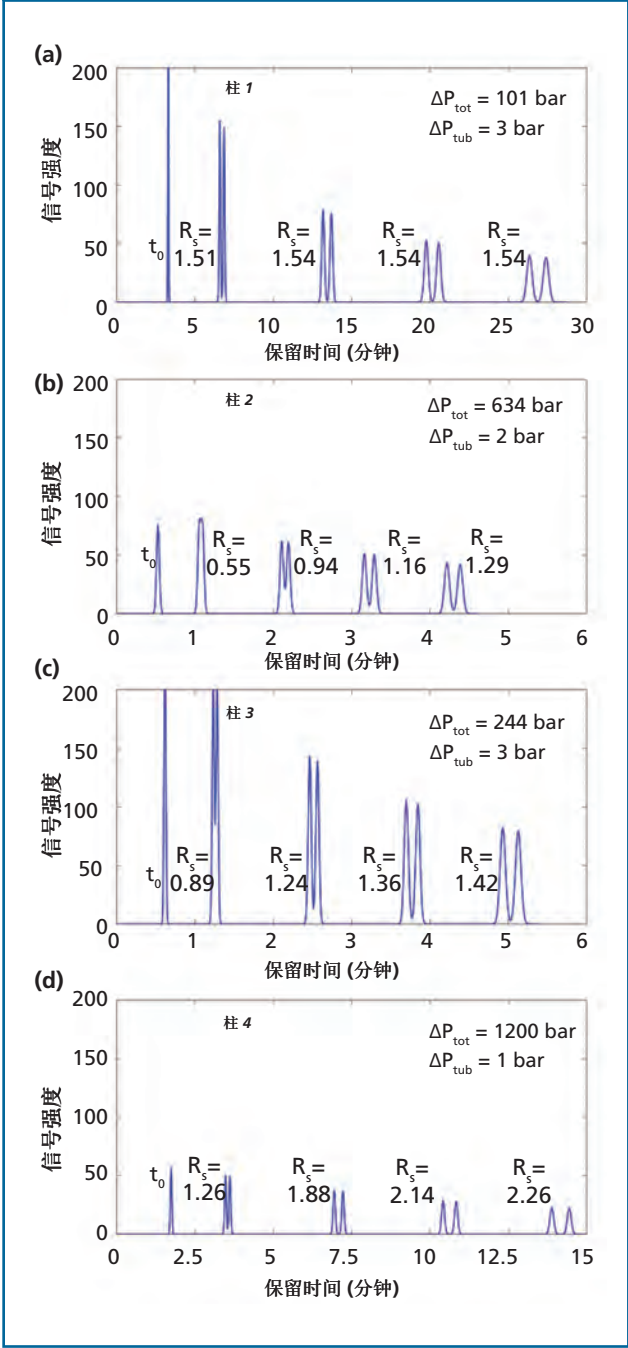


表1：不同模拟色谱柱（图1、4和5）的参数概述

色谱柱	长度 (cm)	直径 (mm)	颗粒尺寸 (μm)	颗粒类型
1	25	4.6	5.0	全多孔
2	10	2.1	2.0	全多孔
3	10	3.0	2.7	表面多孔
4	25	2.1	2.0	全多孔

高压液相色谱法（黑色，3.5-5微米的全多孔颗粒）到超高压液相色谱颗粒和条件（红色，2微米的全多孔颗粒，1.5和2.7微米的表面多孔颗粒）所取得进步的历史概述。由于红色曲线的位置更低（较快的分析）而且更加靠右（较高的效率），因此更高操作压力的优势很明显（8，9）。此外，更高的操作压力也有助于使用较小的颗粒。

对于高压液相色谱法而言, 表面多孔颗粒的优势非常明显, 因为它们在整个相关的效率范围 (3.5微米颗粒的运动效率范围要比5微米颗粒的更好) 内都比3.5微米的颗粒表现更好 (8)。超高压液相色谱分离也可以得出相似的结论, 尽管假定2.7微米的颗粒拥有比2微米全多孔颗粒更低的压力限制 (1200巴), 表面多孔颗粒仍然比对应的全多孔颗粒表现更好 (对于2.5微米的表面多孔颗粒而言, 我们采用了1500巴的压力, 这是目前市场上可以买到的仪器所能产生的最高压力)。其中也表明增加操作压力以及使用效率更高的表面多孔色谱柱所带来的效益都是额外获取的。在该方法中, 可以通过将一种 (旧的) 操作压力、颗粒种类和尺寸切换到另一种 (新的) 进行定义的结合体的方法获得量化分析时间 (G_t) (相同效率情况下) 或效率 (G_N) (相同时间情况下) 增益的运动增益系数 (1, 9)。

$$G_t = \frac{t_{old}}{t_{new}} = \frac{E_{old}}{E_{new}} \cdot \frac{\Delta P_{new}}{\Delta P_{old}}$$

$$G_N = \frac{N_{new}}{N_{old}} = \sqrt{\frac{E_{old}}{E_{new}} \cdot \frac{\Delta P_{new}}{\Delta P_{old}}} \quad [1]$$

with $E = \frac{H^2}{K_{v0}} = h^2 \cdot \varphi$

在这些公式中, E 代表在无保留复合物速度 U_0 的基础上使用塔板高度 H (在所选择的流速下) 的平方除以色谱柱渗透性 K_{v0} 所获得的分离阻抗 ($K_{v0} = d_p^2 / \phi$, ϕ 为流动阻力)。对于图2 ($N_{old} = 30000$, $t_{R,old} = 13.6$ 分钟) 中动态图开始 ($\Delta P_{old} = 400$ 巴) 和结束 ($\Delta P_{new} = 1500$ 巴) 时的箭头而言, 在3.5微米全多孔颗粒的高压液相色谱法到1.5微米表面多孔颗粒的超高压液相色谱法的转换中增益 $G_t = 7.6$ ($t_{R,new} = 1.8$ 分钟), $G_N = 2.48$ ($N_{new} = 74500$)。对于这些分析时间和条件而言, 400巴压力下 $t_R = 30$ 分钟的3.5微米表面多孔颗粒色谱柱在接近最佳状态的速度下进行操作 ($h=2.12$; $E=3596$)。这也是1.5微米颗粒在1500巴的压力下进行操作的情况, 其中 $t_R=2.79$ 分钟 ($h=1.66$; $E=1791$)。在1.5微米颗粒, $t_R=13.6$ 分钟的情况下, 较大的颗粒将会更加适合, 因为色谱柱只在最佳速度即B末端条件下进行运行 ($h=1.84$; $E=2200$)。

图3和图4代表这些增益系数在等度模式下实验研究的结果 (13)。通过将三组成对的10厘米色谱柱 (30厘米) 转换成两组成对的10厘米色谱柱 (20厘米), 前者在将近500巴的压力下 ($H_{old}=5.46$ 微米, $K_{v0}=14.8 \cdot 10^{-15}$ 平方米, 图3[a]) 对2.6微米核壳颗粒进行操作, 而后者在1402巴的压力下 ($H_{new} = 3.96$ 微米, $K_{v0}=3.8 \cdot 10^{-15}$ 平方米, 图3[b]) 对1.5微米核壳颗粒进行操作, 测得了几乎相同的分离效率 ($N_{old} = 54900$ vs $N_{new}=50500$), 但是获得的运动时间增益系数为1.6。1.6倍的分析时间增益略高于 $G_t=1.4$

图5: (a-d) 与图4 (b-c) 的情况现相似, 但是现在假定附加色谱柱的体积分散贡献为 $10 \mu L^2$ (a-b) 和 $2 \mu L^2$ (c-d), 特别是超高压液相色谱法和完全优化的超高压液相色谱仪器, (e) $u_{opt}/3.4$ ($\Delta P_{max} = 1200$ 巴) 的附加色谱柱的体积分散为 $0.5 \mu L^2$ 。管长为50厘米, 内直径为75微米 (a-b)、50微米 (c-d) 和25微米 (e)。

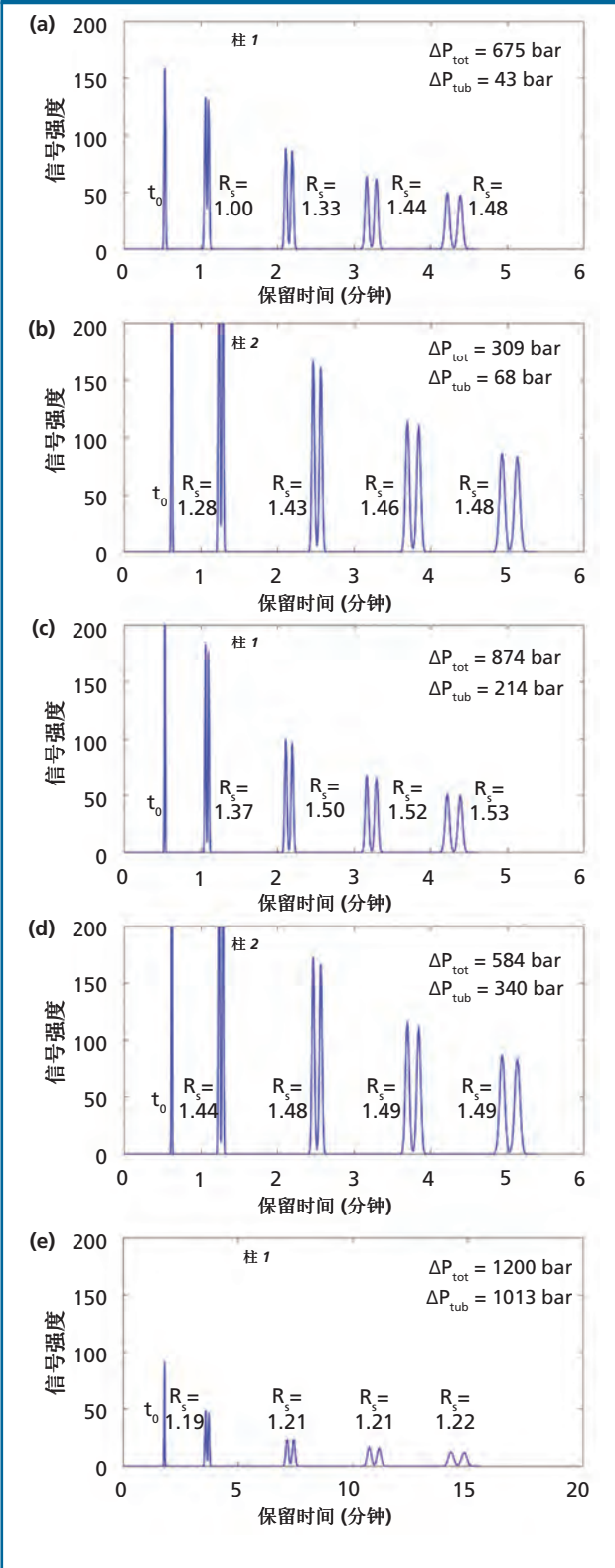
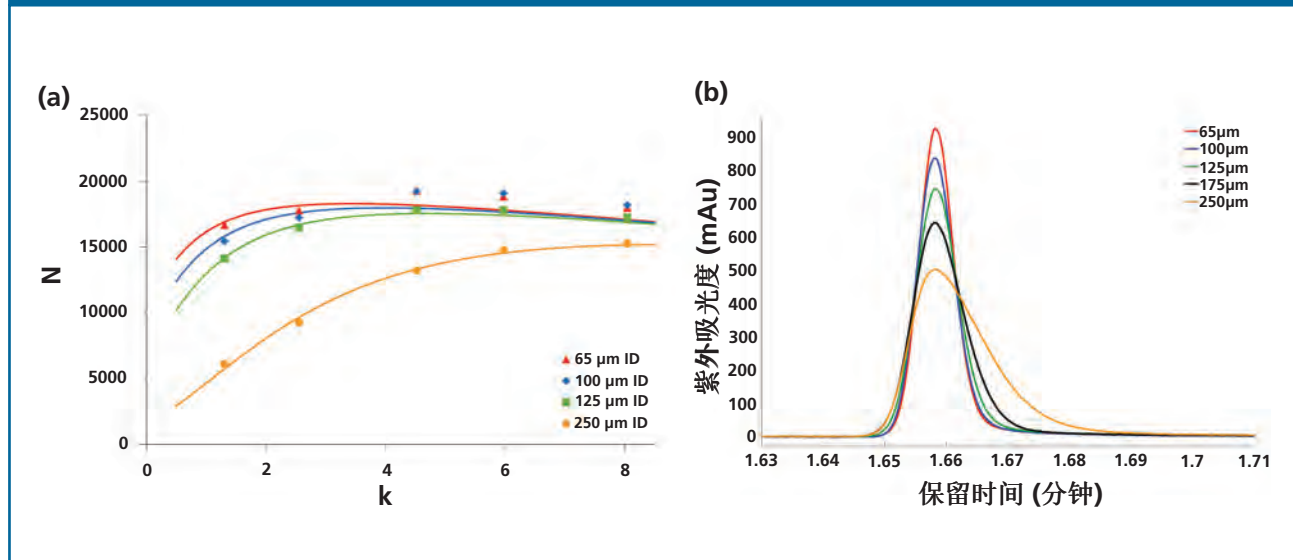


图6: (a) 一系列烷基苯(乙酰-、丙酸-、丁酸-、苯并-和苯戊酮)的板数(N)对保留因子(K)的图表展示了等度模式以及0.8毫升/分钟的流速下色谱柱后连接管内直径的影响, 2.1×50 厘米色谱柱中为1.3微米的表面多孔颗粒。(b) 在 $k_{\text{grad}} = (t_R - t_0) / t_0$ 为4.5, k_{elution} 为1.8, 流速为0.6毫升/分钟的时候, 在梯度洗脱模式下对苯甲酮上的放大层使用相同的色谱柱。改编自参考文献20。



的理论计算值,但是该理论计算值假定两次分离获得了完全相同的效率 N 。但是,因为实际限制(可获得的色谱柱长度),改进的(新的)系统中的分离效率大约为10%,低于“旧的”系统,因此效率略微减小的时分析时间的增益更大。为了获得相同的 N ,在较低的流速(大约减少10%)下,应该使用较长的色谱柱(大约增大10%,对应22厘米的色谱柱),这样时间增益就比1.6的实验值更接近1.4。图3(c)和3(d)展示了通过优化废水污染物的梯度分离可以获得的运动时间增益。对于20:80% (v/v) 乙腈-水到95:5% (v/v) 乙腈-水的线性梯度,所用的 $t_G/t_0=12$ 。通过使用1.5微米的核壳颗粒,并且从两组500巴压力下(图3[c])操作的成对的色谱柱变为1400巴压力下(图3[d])操作的一个色谱柱,所获得的运动时间增益系数几乎达到了13。虽然获得了几乎完全相同的190谱峰容量(13),可以看到两张色谱图的选择度和分辨率存在一些差异。出现这些偏差的原因是导致保留系数发生变化的压力和温度(粘性发热效应)梯度对分离质量产生了影响(4、14、15)。

仪器对分散贡献的要求

为了进行比较,假定图1中的分离仪器没有对整体的谱带增宽做出贡献。但是,注入塞的尺寸(体积)、连接管的直径以及预热器和检测池的体积都会对分离效率产生明显的

影响(16)。因此,图4表示与图1中相同的色谱柱性能($N \approx 25000$),但是鉴定附加系统对分散的贡献为 $50 \mu\text{L}^2$,这是标准高压液相色谱仪器的典型值(5、17),而且假定连接管的内直径为170微米,总长度为50厘米,以计算系统的操作压力。由于几乎没有观察到色谱柱1(包含大型5微米颗粒的较长大口径色谱柱)中附加色谱柱分散的影响,包含2微米颗粒的较短窄口径色谱柱2的分离质量完全无法获得,这表明较早的洗脱对完全重叠,而且较晚的洗脱混合物出现了重大损失。两个色谱柱都是在相同的系统中进行操作,由于较小的色谱柱体积(1/12)造成色谱柱2的体积分散更小,因此色谱柱2所受影响更大(18)。对于色谱柱3而言,其含有表面多孔颗粒,虽然附加色谱柱的分散对性能造成的损失很大,由于使用了较大的内直径(3毫米),其反而更小。连接管的较大内直径可以确保所展示的流速需要很少或不需要附加压力。在色谱柱4(长25厘米,填充2微米的颗粒)观察到了重大损失,但是由于具有更长并且更大的体积,色谱柱受到附加色谱柱分散的影响很小,而且更高的分辨率获得了优越的性能,基线分离($R_S=1.5$)只在第一个洗脱对中出现了折中的情况。图4介绍了为什么只转变成更小的颗粒或更有效率的颗粒形态(表面多孔颗粒)不足以获得更好的分离性能,但是也需要考虑色谱系统的分散(5)。

图5(a)和5(b)介绍了色谱柱2和色谱柱3所获得的性能(色谱柱1受到的系统影响可以忽略不计,因此没有显

示)，但是现在超高压液相色谱仪器的典型分散（17）— $10 \mu\text{L}^2$ —而且假定需要图4中相同的管长（50厘米）和75微米的内直径。可以观察到分离获得了明显改善，尤其是较早的洗脱复合物（18-21）。但是，较早的洗脱复合物并没有获得解决。此外，窄管的操作压力得到了显著增加。由于更大的流速（见图1），这种增加比含有表面多孔颗粒的色谱柱3更大。为了从具有窄内直径的色谱柱获得全部好处，需要在完全优化的超高压液相色谱系统中使用降低的附加色谱柱分散进行操作。一些小组已经将附加色谱柱的分散值减小到了 $2 \mu\text{L}^2$ （20、21、22、23）。这可以使他们获得超过90%的固有色谱柱，同时保留系数 >3 。在图5（c）和5（d）中对这种情况进行了介绍，其中表明除了 $K=1$ 之外，所有谱峰都失去了很少或没有损失分离分辨率。但是，由于连接管的内直径减小，操作压力出现了显著增加。这种情况在3毫米的内直径色谱柱（色谱柱3）更加明显，其中超过60%的压力下降是连接管造成的（含有2.1毫米内直径的色谱柱2为30%）。实际上，在这种情况下，附加色谱柱分散的进一步减少只会为分辨率带来很少的增益，但是压力下降的成本却很大。如果附

加色谱柱的体积减小带来的压力下降导致色谱柱长度或流速减小，则性能方面不再具有任何优势。例如：图5（e）中假定色谱柱2的连接管为25微米内直径，而且系统分散为 $0.5 \mu\text{L}^2$ 。过多的压力下降（固定流速为 $\Delta P_{\text{tub}} \sim d_{\text{tub}}^4$ ）意味着流动相速度减少到3.4，因此在B末端条件下对色谱柱进行操作。可以清楚地看到，这导致分析时间出现明显增加，而分离分辨率出现降低。作为替代方案（结果没有显示），可以选择含有2.7微米表面多孔颗粒的4.6毫米内直径色谱柱，这种情况下在第一个谱峰对可以发现 $50 \mu\text{L}^2$ 高压液相色谱系统的分辨率为1.29，同时只需要247巴的操作压力。但是，需要付出的代价是更高的溶剂消耗，因为流速增加到2.4，而且尽管压力下降是有限的，如果使用具有更大内直径的色谱柱，与粘性发热有关的性能也会变得更加显著。

系统在梯度和等度洗脱贡献方面的举例

图6（a）和6（b）介绍了附加色谱柱体积的优化如何对（a）等度和（b）梯度分离两方面的分离性能产生影响（20）。

SMALL INNOVATION FOR BIG DETECTIONS

Introducing the innovative Runge Mikron liquid chromatography detectors. Analysis directly at the measurement site. Three different detectors - Photometer, Fluorimeter and Conductivity meter. Based on LED technology that ensures long life span. Flexible with its modular system, small size, USB power and ease to use!

WE ARE GLOBAL DISTRIBUTOR FOR RUNGE MIKRON

ACTUAL
SIZE 1:1



MEET US AT PITTCON 2018
ORLANDO FL, USA
FEB 27 - MARCH 1, BOOTH 2107

runge mikron 81 conductivity meter

runge mikron 71 fluorimeter

runge mikron 31 photometer



BIOTECH

INNOVATIVE PRODUCTS FOR FLUIDIC SYSTEMS

www.biotech.se

HEADQUARTER • BIOTECH AB • SWEDEN • TEL +46 (0)300-56 91 80 • info@biotech.se

USA • BIOTECH USA LLC • TEL 612-703-5718 • sales@biotechusa.us

JAPAN • BIONIK INC. • +81 545-38-9125 • info@bionikinc.com

© 2018 BIOTECH AB. ALL RIGHTS RESERVED.

这种情况下,在全优化的色谱系统(POISE [24], 80nL紫外检测器单元以及最小化的色谱柱前管)中运行含有非常小的表面多孔颗粒(1.3微米)的小体积色谱柱,除了连接色谱柱末端与检测器单元的较短(14厘米)连接管。对于这种连接管来说,可以选择65到250微米的内直径。在等度情况下,绘制了所获得分离效率(由板数 N 表示)的变化对保留系数的图表。在这种情况下,即使流程即色谱柱到检测器之间14厘米的较短连接管流程的一部分没有被优化,性能也出现了重大损失, $K<4$ 比预期的 $N=20000$ 效率更低。就像之前的模拟色谱图中介绍的一样,第一个洗脱复合物承受了大部分附加色谱柱的谱带增宽(18、19、21)。效率在较高保留系数处出现些许下降趋势,将会使保留系数对塔板高度和最佳速度产生影响(20)。在图6(b)中,梯度洗脱模式的一个谱峰(苯甲酮)在不同内直径处出现了放大情况。在(明显)梯度保留系数 K_{grad} 大约为4.5的情况下对该复合物进行洗脱。可以看到较宽的管子对谱峰的宽度和高度都产生了显著影响。很显然,与经常假定的情况相反,由于梯度运行开始时存在典型的色谱柱焦点,没有使色谱柱后分散最小化,因此附加色谱柱谱带增宽也会对梯度模式产生显著影响。例如:Spaggiari等人证明了将超高压液相色谱法与质谱法结合之后,必须使接口管最小化,这样就不会对标准体系(25)中大于7的 K 值性能产生影响,而且需要应用最佳的质谱法设置(18、25)。

结论

通过转变成更小的颗粒并且使用表面多孔颗粒,可以获得更快并且更好的分离效果。但是,颗粒越小,需要的操作压力也越大。为了避免粘性发热导致压力下降达到限值,并且减少溶剂消耗,将这些小型颗粒剂填充到具有更窄内直径的较短色谱柱中。因此,这些小体积色谱柱的性能受到色谱系统中附加色谱柱分散的强烈影响。本文说明了超高压液相色谱法的三个基础部分都需要改善,以获得所期望的更高分离效率:更小并且更好的颗粒、更高的操作压力以及较小的系统贡献。

参考文献

- (1) J. De Vos, K. Broeckhoven和S. Eeltink, 分析化学 **88**, 262–278 (2016).
- (2) S. Fekete, E. Oláh和J. Fekete, 色谱法杂志A辑 **1228**, 57–71 (2012).
- (3) J. Ruta, D. Zurlino, C. Grivel, S. Heinisch, J.-L. Veuthey和D. Guilleme, 色谱法杂志A辑 **1228**, 221–231 (2012).
- (4) D. V. McCalley, *TrAC趋势-分析化学* **63**, 31–43 (2014).

- (5) K.J. Fountain, U.D. Neue, E.S. Grumbach和D.M. Diehl, 色谱法杂志A辑 **1216**, 5979–5988 (2009).
- (6) O.H. Ismail, M. Catani, L. Pasti, A. Cavazzini, A. Ciogli, C. Villani, D. Kotoni, F. Gasparrini和D.S. Bell, 色谱法杂志A辑 **1454**, 86–92 (2016).
- (7) K. Broeckhoven, D. Cabooter和G. Desmet, *LCGC 欧洲* **24**, 396–404 (2011).
- (8) K. Broeckhoven, D. Cabooter, S. Eeltink和G. Desmet, 色谱法杂志A辑 **1228**, 20–30 (2012).
- (9) K. Broeckhoven和G. Desmet, *TrAC趋势-分析化学* **63**, 65–75 (2014).
- (10) P.W. Carr, X. Wang和D.R. Stoll, 分析化学 **81**, 5342–5353 (2009).
- (11) G. Desmet, D. Cabooter和K. Broeckhoven, 分析化学 **87**, 8593–8602 (2015).
- (12) R.E. Majors, *LCGC 欧洲* **28**, 658–665 (2015).
- (13) J. De Vos, M. De Pra, G. Desmet, R. Swart, T. Edge, F. Steiner和S. Eeltink, 色谱法杂志A辑 **1409**, 138–145 (2015).
- (14) G. Vanhoenacker, F. David, B. Blatz, E. Naeglele和P. Sandra, “使用Agilent 1290 Infinity液相色谱系统提高盐酸甲氧氯普胺制剂中杂质分析的生产率”, 应用注释, (2009) <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-3981EN.pdf>
- (15) K. Broeckhoven, J. Billen, M. Verstraeten, K. Choikhet, M. Dittmann, G. Rozing和G. Desmet, 色谱法杂志A辑 **1217**, 2022–2031 (2010).
- (16) J.P. Grinias, B. Bunner, M. Gilar和J.W. Jorgenson, 色谱 **2**, 669–690 (2015).
- (17) S. Fekete和J. Fekete, 色谱法杂志A辑 **1218**, 5286–5291 (2011).
- (18) S. Buckenmaier, C.A. Miller, T. van de Goor和M.M. Dittmann, 色谱法杂志A辑 **1377**, 64–74 (2015).
- (19) N. Lambert, S. Miyazaki, M. Ohira, N. Tanaka和A. Felinger, 色谱法杂志A辑 **1473**, 99–108 (2016).
- (20) K. Vanderlinden, K. Broeckhoven, Y. Vanderheyden和G. Desmet, 色谱法杂志A辑 **1442**, 73–82 (2016).
- (21) F. Gritti, T. McDonald和M. Gilar, 色谱法杂志A辑 **1420**, 54–65 (2015).
- (22) K.J. Fountain和P.C. Iraneta, *UHPLC应用于生命科学*, 16号, D. Guilleme与J.-L. Veuthey, Eds., (英国剑桥, RSC色谱学专著, 2012), 29–66页.
- (23) F. Gritti, T. McDonald和M. Gilar, 色谱法杂志A辑 **1420**, 54–65 (2015).
- (24) A.C. Sanchez, J.A. Anspach和T. Farkas, 色谱法杂志A辑 **1228**, 338–348 (2012).
- (25) D. Spaggiari, S. Fekete, P.J. Eugster, J.L. Veuthey, L. Geiser, S. Rudaz和D. Guilleme, 色谱法杂志A辑 **1310**, 45–55 (2013).

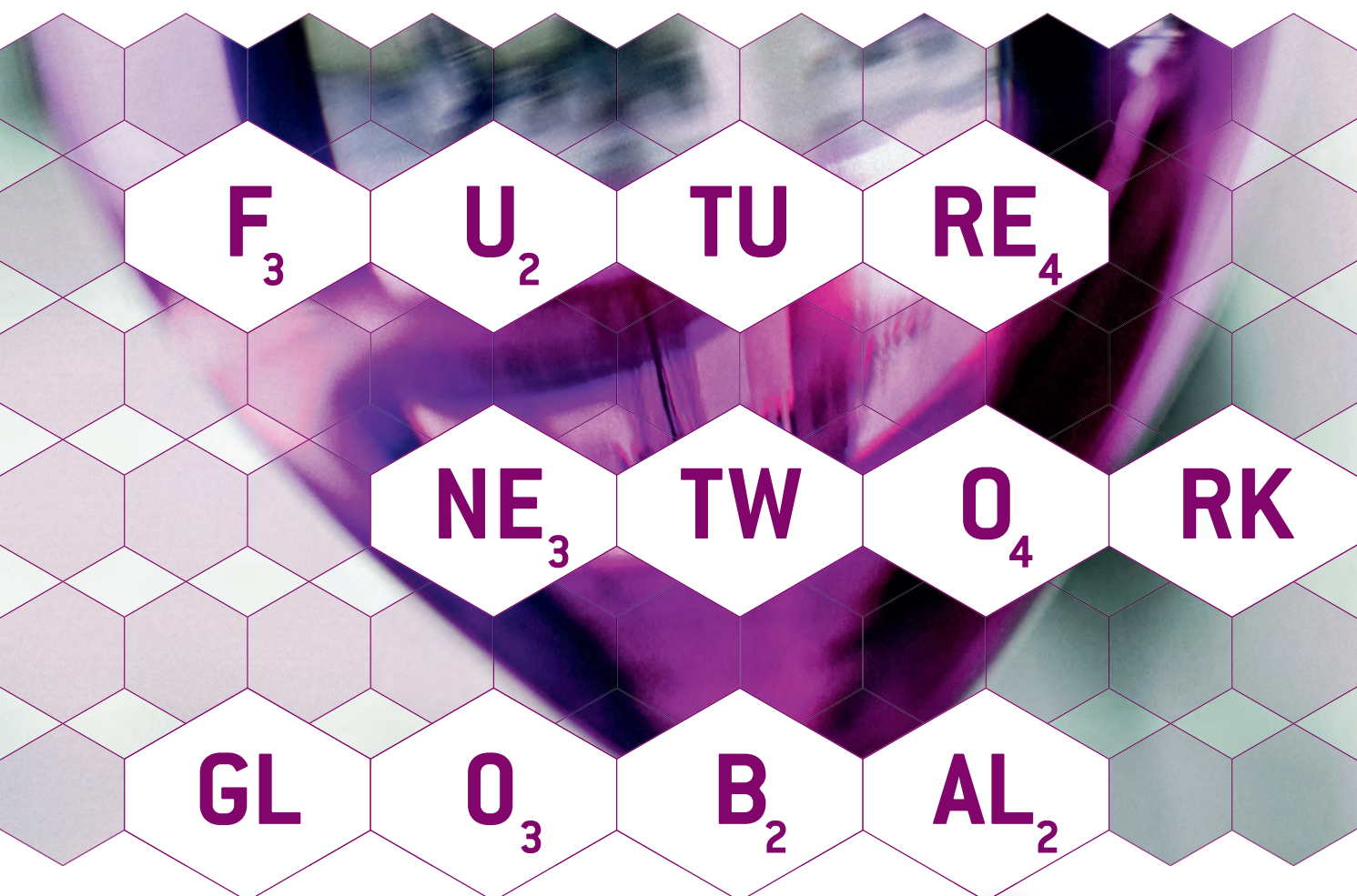
Ken Broeckhoven是位于比利时布鲁塞尔的布鲁塞尔自由大学化学工程系副教授。他的研究主要集中在新型超高压液相色谱仪器的发展、超临界流体色谱法(SFC)的基础、影响色谱柱性能的参数研究以及色谱系统中流动效应建模。

Jelle De Vos是布鲁塞尔自由大学化学工程系博士后。他目前正在研发新型的多层旋翼技术,以促进多维分离,而且正在为三维空间液相色谱法建立微流体芯片技术。

Gert Desmet是布鲁塞尔自由大学生物化学和化学工程专业教授。他的研究主要集中在分离方法的微型化以及色谱系统中流动和质量传递效应的研究。他是250多篇同行评审论文的第一或资深作者,而且拥有10项专利申请。



Messe München
Connecting Global Competence



The World's No.1

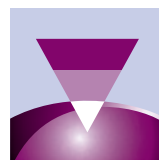
The largest laboratory trade fair in the world features the entire range of products and solutions for industry and research laboratories.

The first-rate scientific analytica conference, world premieres, the latest product developments, unique Live Labs, special shows, forums and Focus Days await you!

**Highlights
in 2018:**
Live Labs and
Digital Trans-
formation

April 10–13, 2018 | analytica exhibition
April 10–12, 2018 | analytica *conference*

26th International Trade Fair for Laboratory Technology,
Analysis, Biotechnology and analytica conference
www.analytica.de



analytica

液相色谱法的谱峰纯度，第一部分：基本概念、商业软件和局限性

Sarah C. Rutan¹、C.J. Venkatramani²和Dwight R. Stoll³，¹美国弗吉尼亚里士满弗吉尼亚联邦大学，²美国加利福尼亚旧金山基因泰克公司，³LC故障排查编辑

这是纯净的色谱峰吗？我怎么样知道其中是否隐藏了一些其他东西？

如果我们带着怀疑的心态来处理我们的数据，作为色谱工作人员，我们知道那些色谱图中被认为是“纯谱峰”（即一次只洗脱了一种化学成分）的色谱图实际上是由多种一起洗脱的成分构成。从定量分析的角度来看，由于假定谱峰是纯的，而实际上并不纯，这会导致复合物的定量测量不准确，因此对“有多少量”这一问题的回答总是一个需要考虑的内容。从定性分析的角度来看，由于我们认为已经确定了10种成分，而实际上有11种成分，我们遗漏了一种，这可能会造成严重的后果（例如：影响健康或效益），因此对“它是什么”这一问题的回答也是需要考虑的内容。由于我们俗称的“纯谱峰”具有重要作用，概念和工具的发展已经付诸了大量的研究，以增加我们清楚从色谱图上所观察到的内容的信心。但是，在引入我们俗称的高效液相色谱法（HPLC）之后的50年里，我们仍然没有处理这一问题的万全之策。在这一期的“LC故障排查”中，我们将会在多部分系列的第一部分处理谱峰纯度的问题，其中我们将会对谱峰纯度评估后面的一些概念进行探索，对这些评估所用的市场销售软件

中的一些工具进行介绍，并且重点突出这些工具在现实范例中的一些限制。为此，我邀请了数据分析和药物分析方面的两位专家和我一起解决这些问题。在随后的内容中，我们将会把谱峰纯度话题的讨论扩展到简单的工具不充分时使用的高级数据分析策略，以及二维液相色谱法（2D-LC）解决谱峰纯度问题的可能性。

Dwight Stoll

谱峰纯度：简介

在所有与谱峰纯度相关的应用领域中，关注度最高的是制药行业，因此在这一期中我们的讨论主要在这种背景下展开。确保医药产品的质量与患者的安全是全世界制药行业和监管机构的主要目标。监管者希望制药行业符合人用药品注册技术要求的国际协调会议（ICH）有关包括残留溶剂和元素杂质在内的新原料药和药物产品中所含杂质的指导方针（ICH Q3A-Q3D）（1-4）。公司和监管者都付出了巨大的努力来确保交付的产品安全、有效用且具有预期的质量和优势。

包含对原料药（APIs）外表、特性（包括形式）、分析（重量或针对某一标准的重量）、杂质（有机和无机，包括残留溶剂）、含水量和颗粒尺寸分析在内的属性进行评估的方法在内的各种分析检验。同样地，对口服药物产品（即活性药物成分和赋形剂）的外表、特性、分析（重量或针对某一标准的重量）和杂质、剂量单位的一致性、溶解、含菌量和含水量进行了检测。在这些检测中，对含量和杂质（如果有的话还包括手性杂质）进行测定的检测是最关键的，因为它们对药物产品的安全性和有效性产生影响的可能性最大。

发展一种特殊的“稳定性指示方法”来测定原料药和药物产品的成分（重量或重量分析）、定量杂质并确定可能的降解产物非常重要，因为其提供了该方法可以在保质期内对材料质量进行监控的证据。发展这种类型的方法通常需要从筛选不同选择度的色谱柱入手，在不同的pH值处使用流动相，并且使用不同的方法（例如：酸、碱、过氧化氢、光和热）对药物产品样品进行分析。在前期使用加压的样品对支持药物产品长期稳定性的方法充分性进行评估，证明其保

免费的演示版软件

质期（或期限）。此外，还有助于确定降解产物和降解途径。方法优化软件工具越来越多地用来确保方法从一开始就具有稳定性，这正是质量源于设计（QbD）方法发展的精神（5）。在这些方法中，二极管阵列探测（DAD）或质谱法（MS）用来对复合物进行探测，因为它们是从色谱柱洗脱而来。如果某种复合物的光谱（紫外[UV]或质量）具有这种复合物的特点，对通过谱峰的光谱发展情况进行检查，为谱峰纯度的评估提供了途径。但是，主要成分附近的杂质和降解产物通常在结构上很相似。这就意味着其二极管阵列探测光谱高度相似，而且在对光谱纯度的评估情况进行解释的时候需要高度关注，还需要考虑为谱峰纯度评估结果提供支持的互补数据（例如：使用互补的色谱柱选择度和质谱数据所观察到的洗脱方式）。

高效能杂质或非活性杂质出现在剂型中，将会影响药物产品的生物活性。在药物发展的历史中有一些著名的例子，说明了探测共同洗脱的重要性。（S）-(+)-甲氧萘丙酸对于关节炎的治疗很有效，但是其对映异构体导致肝中毒。同样，（S,S）-(+)-乙胺丁醇对于结核病的治疗很有效，但是其对映异构体会致盲（6）。大家都知道R-萨力多胺对于孕妇晨吐的治疗很有效，但是其对映异构体却是一种致畸原（7）。因此，对谱峰纯度进行正确地评估对于确保药物产品的安全性和有效性非常重要。

使用二极管阵列探测进行谱峰纯度评估的原则

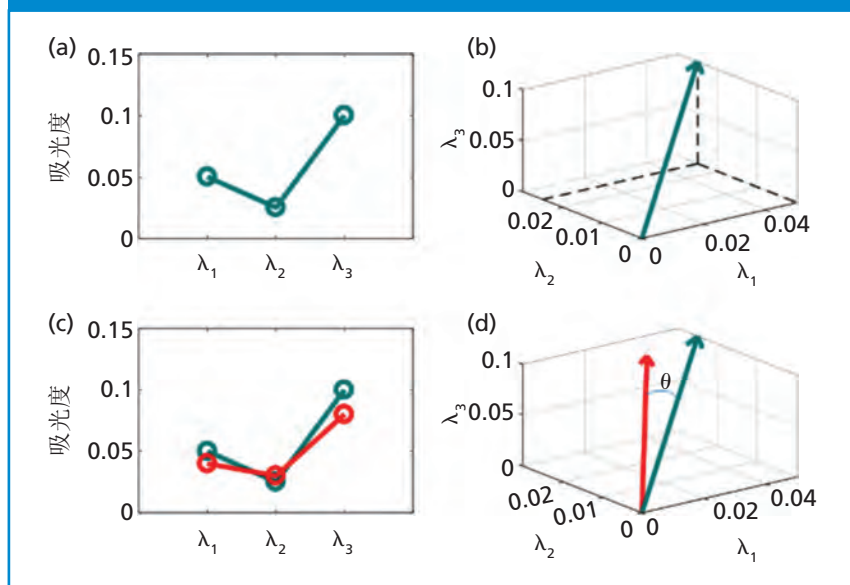
作为一名色谱工作人员，有关谱峰纯度最经常询问的问题是：这种色谱峰是由单一化合物构成的吗？遗憾的是，使用商业软件中提供的传统谱峰纯度分析方法并不能为这一问题提供确切的回答。当然，这些软件工具为这一问题提供了一种回答：此种色谱峰是由具有单一光谱结构的复合物构成的吗？对于这一通常被称为谱峰纯度的概念，可以使用液相色谱法最具有商业使用性的数据系统获得不同程度的解决。

谱峰纯度评估的理论基础

就像大多数色谱数据系统所展示的一样，谱峰纯度概念的基础是将光谱作为矢量在 n 维空间中进行观察，其中 n 是光谱中的数据点的数量（8）。为了更简单地呈现这一概念，我们可以使用图1（a）中所示的用三个波长 λ_1 、 λ_2 和 λ_3 所测得的光谱作为例子。我们可以在图1（b）中所示的三维（3D）空间中将这一光谱作为矢量进行绘制，其中矢量终点的坐标是三种波长的吸光度值。然后，根据图1（c）中用红色提供的第二个光谱，我们对两个光谱之间相似点进行量化的方法很感兴趣。评估光谱相似性的一种简单方法是确定图1（d）中所示的代表

- 针对气相色谱、液相色谱和质谱的数据解决方案
- 中文版本
- 支持多种仪器控制
- OEM和仪器控制开发
- 运行环境管理工具

图1: (a) 三点光谱; (b) 该光谱在三维空间中表示为矢量; (c) 两个相似的三点光谱; (d) 这两个光谱在三维空间中表示为矢量, 两个矢量之间的夹角表示光谱相似性。



维空间中光谱的矢量之间的夹角。如果两个矢量之间的夹角 θ 为0, 则两个光谱的形状完全相同(即使两个光谱的整体强度不同)。如果我们将蓝色光谱(矢量)表示为光谱 $\mathbf{a}$, 将红色光谱(矢量)表示为光谱 $\mathbf{b}$, 可以按照下列方法将光谱相似性作为夹角 θ 的余弦进行计算:

$$\cos \theta = \frac{\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}}{\|\mathbf{a}\| \|\mathbf{b}\|} = \frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum a_i^2} \sqrt{\sum b_i^2}} \quad [1]$$

其中黑体字和小写字母表示矢量, 或者矢量坐标的列表(当前插图中的三个值; n 值表示普通的 n 维空间)。分子代表两个矢量的点积, 符号 $\|\cdot\|$ 代表矢量范数, 在更传统的术语中其表示给定矢量的长度。除以矢量的长度得到光谱相似性的数值, 其与信号的振幅无关, 只与上文中提到的光谱形状有关。

一些光谱数据系统中用来测定光谱相似性的替代方法包括两个光谱的相关系

数, 其计算方式如下:

$$r = \frac{\sum (a_i - \bar{a})(b_i - \bar{b})}{\sqrt{\sum (a_i - \bar{a})^2} \sqrt{\sum (b_i - \bar{b})^2}} \quad [2]$$

其中 $\mathbf{a}_i$ 和 $\mathbf{b}_i$ 代表第 i 个波长的吸光度值。只要在应用方程式1之前矢量是中心平均值, 则表明:

$$r = \cos \theta \quad [3]$$

因此, 两种相似性的测量是等效的。

使用实际光谱测定光谱相似性的说明:

接下来, 我们对两个相似但是不相同的光谱进行比较, 以了解如何在实际中使用光谱相似性这一概念。图2展示了异补骨脂素(蓝色)和补骨脂素(红色)两种同分异构体的光谱。使用中心平均值之后, 它们之间夹角的余弦值(等同于相关系数)为0.980, 夹角(有时候称为光谱对比角)为11.4°。不使用中心平均值, 则夹角的余弦值为0.988, 而且相应的夹角为8.97°。从检查情况可以看到这些光谱虽然相似但不相同。

我们现在探索如何使用这一度量标准来

确定具体的谱峰是否是纯的。图3(a)展示了我们认为谱峰纯度的谱峰, 而图3(b)展示了这一谱峰的轮廓图, 其中彩色的轮廓线表示每次或每个波长点的吸光度。许多色谱数据系统供应商提供的谱峰纯度软件都指出了在谱峰纯度分析之前将基线移除的重要性; 该基线如图3(a)所示, 从9.9至12.7分钟的时候从谱峰开始限值到结束限值(红色影线标记)。

随后, 我们选择谱峰顶点的光谱作为参考光谱(从色谱数据系统供应商提供的几个选项选择一个)。经常推荐选择“最大”色谱图的顶点(由每个光谱中所观察到的最大吸光度构成)。然后对顶点光谱和通过这一谱峰(用指数 j 表示)的所有光谱进行评估, 如方程式4所示:

$$r = \cos \theta = \frac{\sum (a_{\text{apex},i} - \bar{a}_{\text{apex}})(a_{ji} - \bar{a}_j)}{\sqrt{\sum (a_{\text{apex},i} - \bar{a}_{\text{apex}})^2} \sqrt{\sum (a_{ji} - \bar{a}_j)^2}} \quad [4]$$

这种通过谱峰的相似值的变化在图3(c)中用绿色曲线(显示为1000 r^2 ; 这是安捷伦软件所使用的匹配因子; 需要注意的是安捷伦软件所使用的是颠倒的 y 轴)表示(9、10)。虽然通过谱峰顶部的相关性很高, 而谱峰前端的相关值却更低了, 由此产生了这一谱峰是否在“光谱上是纯的”的问题。为了更加充分地解决这一问题, 我们需要建立一个阈值来确定这种相关性是否足够高, 从而得出这是否是一个纯谱峰的结论。正是在这个时候, 不同的光谱数据系统供应商采用了略微不同的方法。

在安捷伦软件中, 阈值曲线的计算方式如方程式5所示:

$$\text{Threshold}_j = 1000 \left(1 - 0.5 \left(\frac{\text{Var}_{\text{noise}}}{\text{Var}_j} + \frac{\text{Var}_{\text{noise}}}{\text{Var}_{\text{apex}}} \right) \right)^2 \quad [5]$$

42nd International Symposium on Capillary Chromatography and 15th GC×GC Symposium

...with particular emphasis on all Comprehensive Separation Technologies and MS Hyphenation



The 42nd International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) and the 15th GC×GC Symposium is a “hyphenated” meeting which will be held again in wonderful Riva del Garda (Italy), from 13 to 18 May, 2018. Apart from the most recent advances in the fields of pressure and electrodriven microcolumn separations, and comprehensive 2D GC. This year particular emphasis will be directed to all Comprehensive Separation Technologies in combinations of Capillary Chromatography and 2D GC with various forms of MS... from unit-mass to high resolution, and from single to hybrid analyzers. Consequently, both the importance and complementary nature of chromatographic and MS processes will be given high consideration. Within the wider context of separation science, great space will be also given to the sample preparation process, in both oral and poster sessions. The ISCC/GC×GC scientific program will be a rich one, it being characterized by:

- invited contributions from leading scientists reporting the latest most exciting developments
- keynote lectures from promising young researchers
- very active poster sessions
- discussion sessions
- workshop seminars presenting the most recent

novelties in scientific instrumentation
- a World-class GC×GC and LC×LC Short Courses
Researchers in all areas relevant to the subjects of the symposia are invited to submit abstracts. As is traditional for the Riva meetings, the majority of presentations will be in a poster format and the Scientific Committee will select contributions for oral presentations. As always, many awards will be assigned in both the ISCC and GC×GC events, recognizing excellence in both established and young scientists, in oral and poster presentations. Exhibitors and sponsors are a fundamental part of the meeting (without them...Riva wouldn't be Riva!) and are encouraged to participate by reserving booth space, becoming a sponsor and to promote the ISCC and GC×GC events.

Last, but not least, the traditional “Riva” social program will be entirely maintained, with one or two events each day: cocktails, the welcome reception, the concert, the wine and cheese evening, and of course, the disco night! Please keep visiting our web site (www.chromaleont.it/iscc) for new information as it becomes available.

Looking forward to meeting you in astonishing Riva del Garda!

13 - 18 May, 2018

*Palazzo dei Congressi
Riva del Garda
Italy*



Organized by
Chromaleont s.r.l.

The Forum of Microcolumn Separations

图2: 异补骨脂素 (蓝绿色) 和补骨脂素 (红色) 的光谱。光谱相似性表示为 $\theta=11.4^\circ$; $r=0.980$ 。

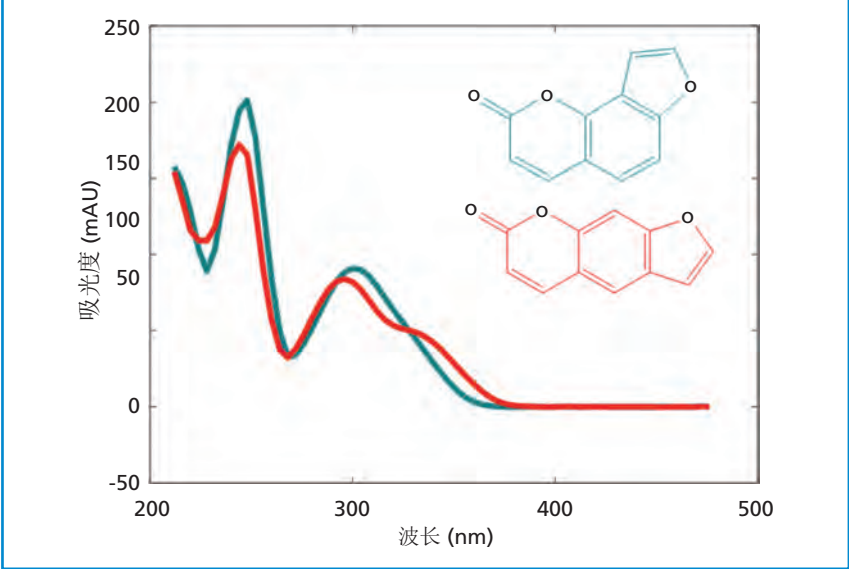
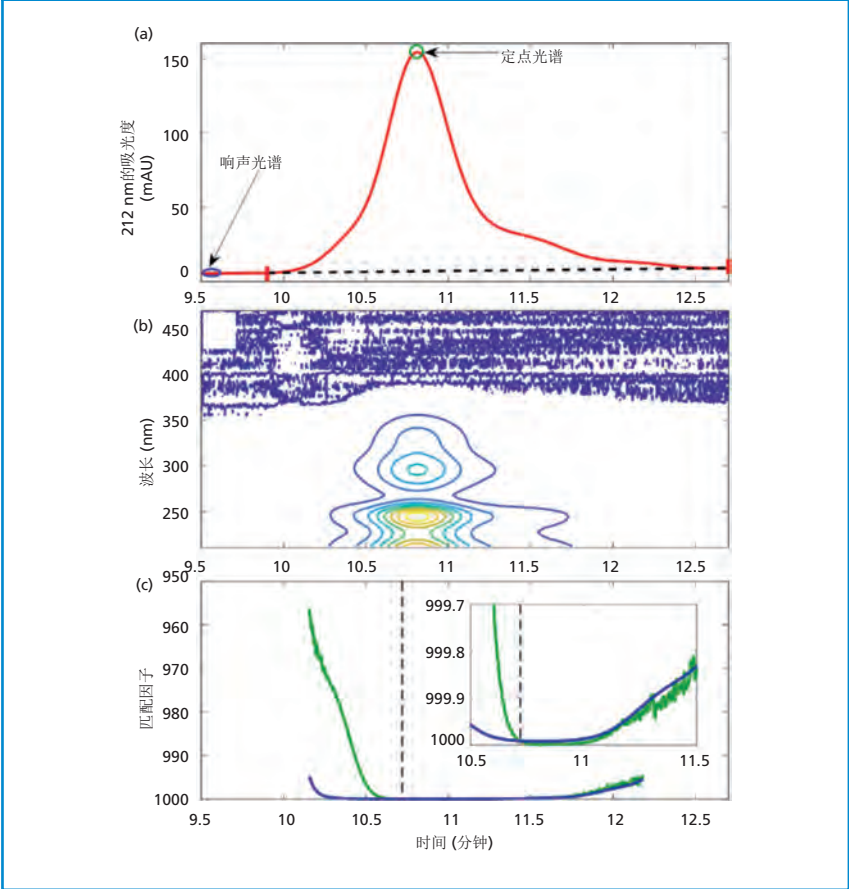


图3: (a) 在谱峰 (绿色圈) 顶点所选择的带有参考光谱的色谱峰以及用来确定响声变化 ($\text{Var}_{\text{noise}}$) (紫色圈) 的响声光谱; (b) 作为等值线图的代表, 其中y轴表示紫外可见光吸收光谱, x轴表示色谱时间轴。(c) 光谱相似性由通过色谱峰轮廓 (绿色) 和相应响声阈值 (蓝色) 的顶点 ($1000r^2$) 构成。根据这张图, 我们可以得出结论: 色谱峰在10.7分钟之前受到了杂质的影响。



其中响声的变异数 ($\text{Var}_{\text{noise}}$) 是通过默认值或用户规定的光谱范围计算而来, 这些光谱中没有分析物吸收, 在图3 (a) 中用紫色曲线表示。 Var_j 是第 j 个光谱的变异数, 而 Var_{apex} 是顶点光谱 (或用户规定的另一个参考光谱) 的变异数。该阈值曲线在图3 (c) 中用紫色表示。插图为展开图, 表明这一谱峰在10.7分钟之前的洗脱时受到了杂质的影响。实际上, 这一谱峰包含百万分之50的补骨脂素 (图2中用红色表示的光谱), 其保留时间为10.8分钟, 并且含有百万分之5的异补骨脂素 (图2中用蓝绿色表示的光谱), 其保留时间为10.4分钟, 这就是软件探测到的“杂质”。除了提供图3 (c) 中所示的谱峰纯度图外, 供应商通常也提供整体的谱峰纯度测量和整个谱峰的阈值。例如: 安捷伦通过对匹配因子和阈值以及这些光谱的匹配因子和阈值的平均数进行比较, 确定了被判定为不纯的谱峰中的光谱总数。从上面所示的例子来看, 通过谱峰的2430个光谱中, 有1446个光谱的匹配因子比相应的阈值小, 这些光谱的平均匹配因子为992.8, 平均阈值为999.0, 再次得出了这个谱峰不纯的结论。

其他色谱数据系统供应商使用这种通用方法的变化形式对谱峰纯度进行量化。例如: 日本岛津公司 (11) 使用相似角的余弦值对纯度进行量化, 并使用下列表达式对阈值进行量化。

$$\text{Threshold}_j = \sqrt{\left(1 - \frac{\text{Var}_{\text{noise}}^2}{\|a_{\text{apex}}\|^2}\right) \left(1 - \frac{\text{Var}_{\text{noise}}^2}{\|a_j\|^2}\right)}$$
$$= \frac{\text{Var}_{\text{noise}}^2}{\|a_{\text{apex}}\| \|a_j\|} \quad [6]$$

同时, 沃特世Empower软件直接使用相似角, 并且在溶剂和响声贡献的基础上对阈值进行计算。无论使用哪一种色谱数据系统方法对谱峰纯度进行评估, 按照有关基线减法和响声估计的指南来获得最有力的光谱纯度结论都非常重要。

使用二极管阵列探测对谱峰纯度进行评估的光谱相似性概念在很多情况下都很实用，而且由于其低成本而具有吸引力。较低的光谱相似值或匹配因子可以为存在杂质的分析物质提供指示；但是，其表明通过谱峰的光谱存在显著差异的较高光谱相似值或匹配因子可能会因为下列原因而出现在不纯的谱峰处：

- 存在的杂质比主要复合物的浓度（吸光度）低很多；
- 主要复合物和杂质的光谱相同或非常相似，而且
- 杂质和主要复合物一起洗脱，并且保留轮廓与主要复合物的形状及该保留时间都相同（9）。

实际医药材料进行分析举例

在下面的案例分析中，我们展示了对连接器药物中间体进行分析的例子，主要突出光谱纯度方法的优势和限制，以便对谱峰纯度进行评估。在这种情况下，所有的谱峰纯度计算值都是由沃特世Empower3软件计算得出。连接器药物中间体的合成与分析极具挑战性，因为它们具有高反应性、化学不稳定性、多级合成路径而且小型分子药物具有相对较高的分子量（13）。它们是肿瘤学中所使用的抗体药物偶联物（ADC）的主要成分。

图4中展示了连接器药物中间体三种合成批次的高压液相色谱分离情况，其中主要连接器药物谱峰附近的范围增大。该图显示了批次之间的变异性，并且在主要成分附近对多种成分进行了洗脱。发展一种高压液相色谱法来溶解这些结构相似的化合物很有挑战性，而且需要使用二极管阵列探测数据和质谱法探测对谱峰纯度进行评估，并且对补充色谱柱的选择度进行筛选，使与主要成分一起洗脱的杂质出现的可能性降到最低。

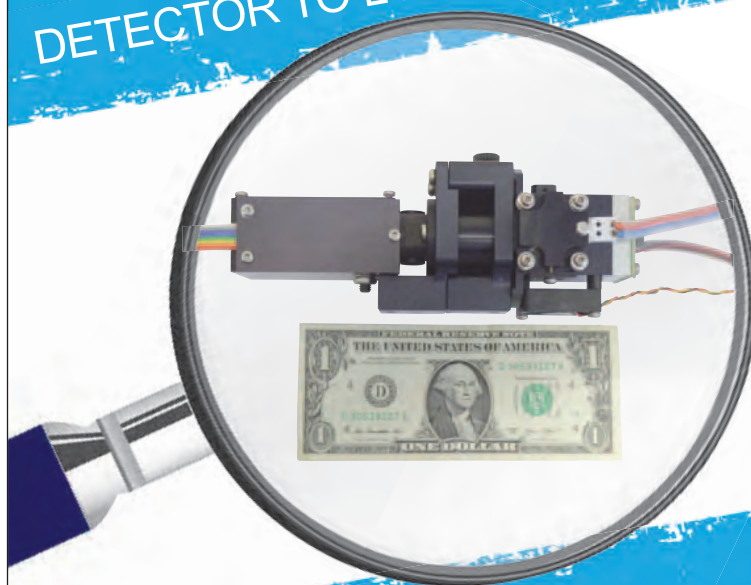
图4（a）展示了样品批次A的色谱轮廓，在主要复合物的后缘没有明显被洗脱的谱峰（保留时间为23.015分钟），但是样品批次B（图4[b]）显示保留时间为23.354时出现的杂质。在这个例子中，只有主要复合物后缘的谱峰是完整的。杂质谱峰的面积百分比为0.13%（图4[b]）。样品批次C展示了主要复合物后缘洗脱的多种成分，其中主要杂质的相对面积为1.4%（图4[c]）。

图5中显示了样品批次A中的谱峰纯度分析结果。主要复合物的纯度角（0.054）比阈值（0.235）更小，而且纯度曲线位于通过整个谱峰的阈值曲线的下方，表明通过谱峰的光谱同质性。

图6（a）显示了样品批次B中的谱峰纯度分析情况。在这种情况下，主要复合物的谱峰（即23.036分钟时的谱峰）通过了谱峰纯度（假阴性），即使图4（b）和6（b）中显示谱峰后缘出现了明显可见的杂质。整体谱峰纯度被确定为0.078，整体阈值为0.235，表明该谱峰在光谱上是纯的。假阴性可能存在的解释包括主要成分杂质谱峰之间的光谱相似性很高，或者与主要成分



PREPARATIVE PDA
DETECTOR TO LOOK OUT FOR



BABY18DAD, detector
so small, you might
lose it!

Dimensions
182 x 59 x 67 mm
(7,17 x 2,32 x 2,64 in)

ECOM
HPLC FROM PRAGUE

Visit us at Analytica Shanghai 2018, booth E3.3710

Americká 3, 120 00 Praha 2, Czech Republic
www.ecomsro.com



图4：色谱柱主要集中在样品批次A、B和C感兴趣的区域。谱峰纯度评估仅限于这个窗口中包含的谱峰。

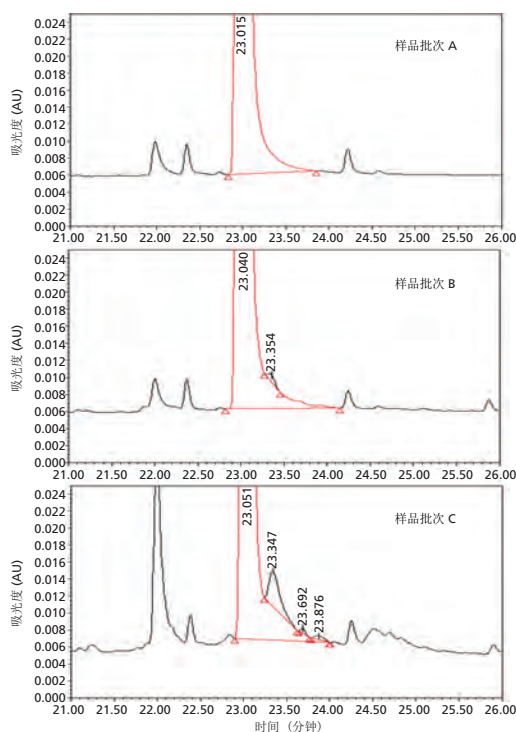
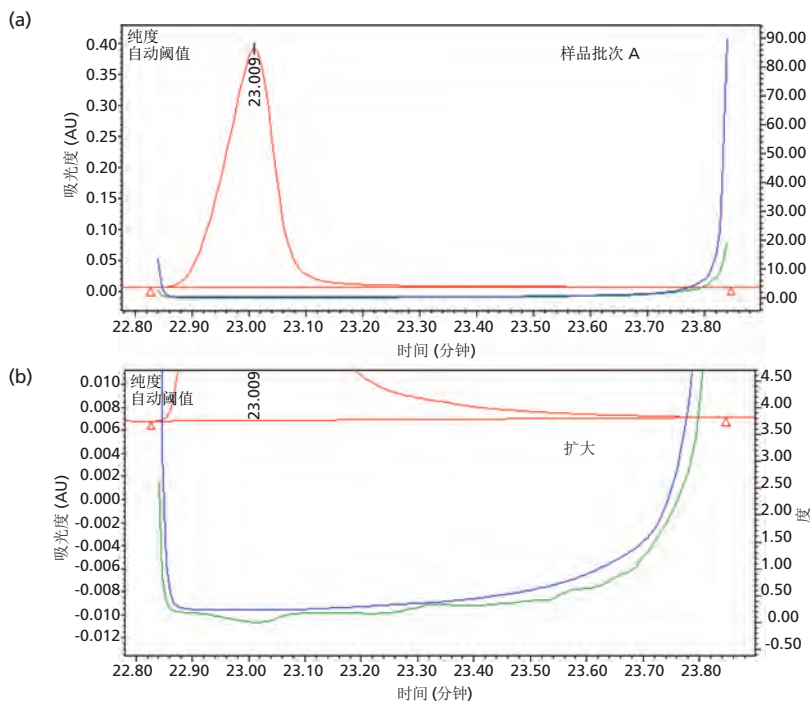


图5：在峰积分限范围内样品批次A的谱峰纯度分析：（a）主要成分在23.009分钟时的谱峰；（b）表明纯度和阈值曲线的扩大规模。纯度曲线（绿色）位于通过谱峰（扩大图）的阈值曲线（蓝色）的下方。



有关的杂质含量很低（大约0.13%）。主要成分和杂质谱峰（图6[a]中的插图）的标准化紫外光谱具有较高的相似性，表明光谱相似性很可能是导致假阴性的原因。但是，图6（b）中纯度和阈值曲线的最近检查情况表明杂质可能出现在谱峰的尾部。通过这一证据和尾部出现的清晰小谱峰，分析人员可以得出结论：尽管整体的纯度检测表明谱峰是纯的，但是谱峰在光谱上是不纯的。

此外，图6（b）中所示的杂质谱峰（即图4[b]中大约23.35分钟时的谱峰）在谱峰的前缘不存在光谱纯度，其纯度角为0.436，阈值为0.272（图6（c））。这可能是因为受到了杂质谱峰前缘主要成分的影响，或者是因为存在其他杂质。在这个例子中，因为色谱证据和谱峰纯度图，尽管有光谱谱峰纯度测试结论，色谱工作人员将会得出存在杂质的结论。通过对图4（c）中的样品批次C的色谱图进行检查，可以获得进一步的见解。在这里，主要谱峰的尾部存在一些明显的杂质谱峰，可能是因为这些杂质的存在

（虽然浓度水平很低）导致图5（b）中样品批次B的阈值的纯度曲线之间观察到存在差异。有趣的是，样品批次A的纯度和阈值曲线在23.35分钟的时候非常接近（图5（b）），这表明这一批次中也可能存在杂质，虽然其浓度较低，色谱和光谱证据都得出了纯谱峰的结论。其重要意义是：如果杂质谱峰没有像当前案例解决，但是在主谱峰下却获得了完全洗脱，则不存在标明存在杂质的色谱或光谱证据，即使是样品批次B和C。

结束寄语

这一使用二极管阵列光谱数据对谱峰纯度评估原则的讨论既强调了该方法的功能，也讨论了其受到的限制。虽然这种方法因为低成本而具有巨大的优势，在对边线结果进行解释的时候也必须格



LABWorld China 2018

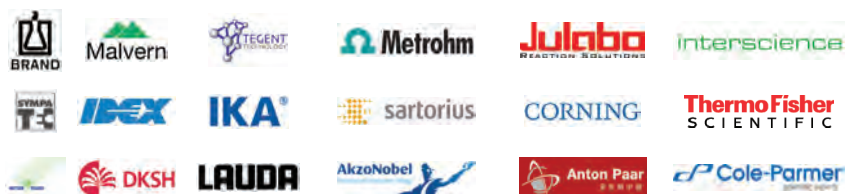
2018 世界生化、分析仪器与实验室装备中国展

2018年6月20-22日 上海新国际博览中心 (SNIEC) **N1/N6** 馆

聚焦领先的医药化工、生物技术与实验室科技

15,000+ 研发人员, **40,000+** 海内外专业买家

知名展商引领全行业展示



同期实验室会议及活动 • 精彩呈现

- 2018药品安全与质量管理论坛
- InnoLAB系列主题沙龙
(色谱、粒度仪、智能实验室建设)
- 制药实验室和供应链质量控制热点论坛
- 第五届中国生物制药峰会

同期举办:



第十八届世界制药原料中国展



第十三届世界制药机械、包装设备与材料中国展

扫码观众预登记



获取同期会议
免费参与资格

+86 10 58036295 / +86 21 33392256

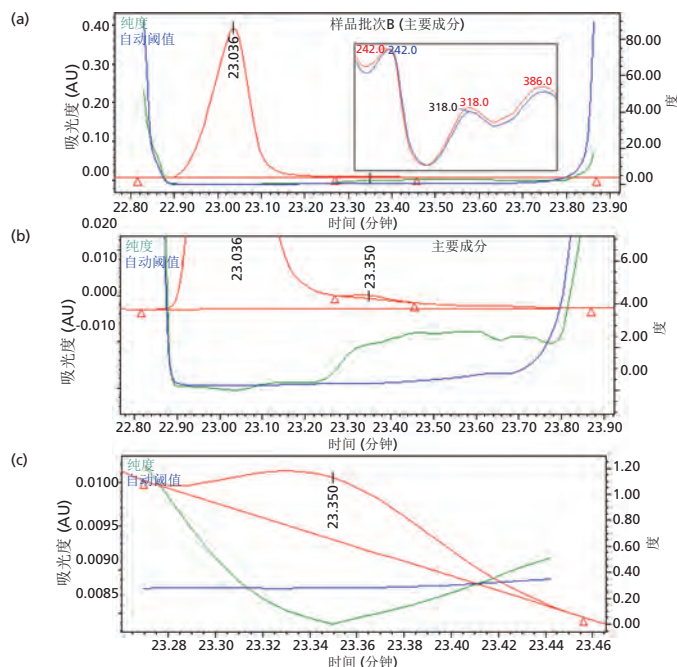
Anthea.Ju@ubmsinoexpo.com

www.labworld-china.com



图6: 样品批次B的谱峰纯度分析表明通过谱峰的光谱纯度与谱峰后缘洗脱的谱峰无关;

(a) 主要成分在23.036分钟时的谱峰; (b) 表明主要成分纯度和阈值曲线详细信息的展开图; (c) 表明杂质在23.350分钟时的纯度和阈值曲线详细信息的展开图。



- (8) H.-J. Sievert and A. Drouen, HPLC中的二极管阵列检测, L. Huber与S.A. George, Eds. (美国纽约, M. Dekker, 1993), 51-126页.
- (9) M. Stahl, “使用二极管阵列技术的HPLC与CE中的峰纯度分析,” (2003).
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5988-8647EN.pdf>
(2017年12月1日通过).
- (10) “OpenLAB CDS - 化学工作站 - 了解您的光谱模块,” (2017).
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/OS_LC_CDS_SpectralModule_A01.xx_EN.pdf
(2017年12月1日通过).
- (11) G. Malikin, “使用岛津光电二极管检测器SPDM10Avp评估HPLC峰纯度,” (n.d.).
<https://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/ko/ssiaplc0213.pdf>
(2017年12月1日通过).
- (12) “Empower PDA 软件 - 入门指南,” (n.d.).
<http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500031503ra.pdf>
(2017年12月1日通过).
- (13) C.J. Venkatramani, S.R. Huang, M. Al-Sayah, I. Patel和L. Wigman, 色谱法杂志A辑 **1521**, 63-72 (2017). doi: 10.1016/j.chroma.2017.09.022.

Dwight Stoll 是“LC故障排查”的编辑。Stoll是美国明尼苏达州圣彼得的古斯塔夫阿道夫学院副教授和化学联合主席。他的研究主要是二维液相色谱在定向和非定向分析中的发展。他是50多篇同行评审论文和三篇分离科学专著章节以及100多份会议简报的作者或共同作者。他也是LCCG编辑顾问委员会成员。直接通讯地址: LCCGedit@ubm.com

Sarah C. Rutan是美国弗吉尼亚州里士满的弗吉尼亚联邦大学 (VCU) 化学教授, 她已经在那里工作了33年。她的研究涉及分析化学和化学计量学的很多领域, 目前, 她主要研究化学计量方法的发展, 以促进色谱分析, 特别是综合二维色谱分析的发展。她发表了100多篇关于该课题的论文, 并进行了多场演讲。

C.J. Venkatramani是美国基因泰克的高级科学家, 他在制药行业有15年的工作经验。他是基因泰克成功发射gRed的首次小分子Erivedge的技术团队的主要成员, 并从发展到商业发射一直处于领导地位。他感兴趣的研究领域包括多维色谱和基因毒性杂质的超痕量分析。

外注意, 这里的杂质水平可能相对较低。

在下一期内容中, 我们将会对高级曲线分辨技术的原理进行审查, 并展示如何利用它们继续使用二极管阵列光谱数据对含有主要成分和次要成分的谱峰进行分析。

致谢

非常感谢安捷伦科技有限公司的Frank Wolf博士在本文的准备过程中提供的众多有益讨论。

参考文献

- (1) 国际协调会议, 新原料药中的杂质Q3A(R2), (瑞士日内瓦ICH, 2006).
<http://www.ich.org/ichim/PubWeb/StatOH/ProductsGuidelines/Quality/Q3A/R2/Guideline.pdf>

- (2) 国际协调会议, 新药制剂中的杂质Q3B(R2), (瑞士日内瓦ICH, 2006).
<http://www.ich.org/ichim/PubWeb/StatOH/ProductsGuidelines/Quality/Q3B/R2/Guideline.pdf>
(2017年12月1日通过).
- (3) 国际协调会议, 杂质: 残留溶剂指南Q3C(R6), (瑞士日内瓦ICH, 2016).
http://www.ich.org/ichim/PubWeb/StatOH/ProductsGuidelines/Quality/Q3C/R6/Step_4.pdf
(2017年12月1日通过).
- (4) 国际协调会议, 元素杂质指南Q3D, (瑞士日内瓦ICH, 2014).
http://www.ich.org/ichim/PubWeb/StatOH/ProductsGuidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step_4.pdf
(2017年12月1日通过).
- (5) 国际协调会议, 药品研发Q8(R2), (瑞士日内瓦ICH, 2009).
<http://www.ich.org/ichim/PubWeb/StatOH/ProductsGuidelines/Quality/Q8/R2/Guideline.pdf>
(2017年12月1日通过).
- (6) N. Chhabra, M. Aseri和D. Padmanabhan, *Int. J. Appl. 基础医学参考* **3**, 16 (2013). doi:10.4103/2229-516X.112233.
- (7) S.K. Teo, W.A. Colburn, W.G. Tracewell, K.A. Kook, D.I. Stirling, M.S. Jaworsky, M.A. Scheffler, S.D. Thomas和O.L. Laskin, *临床药代动力学* **43**, 311-327 (2004). doi:10.2165/00003088-200443050-00004.

The Column

LCGC's global digital magazine provides unique and timely applications, news, and interviews especially relevant to separation scientists across industry sectors.



SIGN UP FOR FREE AT
chromatographyonline.com/column-subscribe

气相色谱检测纲要的过去与现状

John V. Hinshaw, 气相色谱连接编辑

气相色谱检测涵盖多种检测方法。除了最常用的火焰离子化检测（FID）、电子捕获检测（ECD）、热导检测（TCD）和质量选择检测（MSD）外，还包括诸多其他检测方法。如果正确部署使用这些方法，可以实现极佳的检测效果，然而这些方法的特性和应用方法却各不相同且十分复杂。本部分对气相色谱检测方法进行了简要概述，包括过去使用但目前不再使用，以及当前仍使用的检测方法。

在气相色谱诞生之后的六十五年内，科学家已经制定了大量各种各样的检测方法。目前，下述四种检测方法在GC应用领域占据了超过90%的份额：（1）：火焰离子化检测（FID）、热导检测（TCD）、电子捕获检测（ECD）和质量选择检测（MSD）。在现代色谱实验室中还存在其他数量较少的检测器，其中一些长期搁置不用。从火焰离子化检测到使用昆虫触角作为传感元件的电子天线探测（EAD），GC检测方法涵盖了广泛的灵敏度和选择，这是其他方法所无法比拟的。2015年，McNair和Schug在一篇发表于GC Connections（2）的文章中阐述了八种主要的GC检测方法的历史及功能，这些方法涵盖了TCD以及最新的检测方法：真空紫外（VUV）检测。除了这些主流检测方法之外，还有在过去有效或曾经使用的其他许多方法——表1和表2列出了近30种检测方法，但并不包含所有方法。一些色谱法采用其他名称和缩写，且有些并不能通过文献检索查看。

检测器分类

国际理论和应用化学联合会（IUPAC）最近针对离析科学术语发表了更新建

议（3）。IUPAC在更新建议中定义了三种一般类型的色谱检测器。通用检测器：如用于检测洗脱水（而非载气）中任何化合物的热导检测器；特定检测器：仅可用于检测某些特定的化学相关物质，如用于检测卤代化合物的电子捕获检测器或用于检测氮或磷化合物的氮磷检测器（具体根据化合物命名）；选择检测器：可用于检测具有可测量特性（质量或光谱吸光度）的组化合物。MSD与VUV和红外检测（IRD或GC-IR）属于选择检测器。这些分类之间的界限并非总可以明确界定。例如，火焰光度检测（FPD）可检测出洗脱化合物的光谱发射谱线，可能被视为一种选择检测方法，但谱线仅由含特定元素的分子发射，因此FPD还属于一种特定检测方法。从实际层面讲，人们通常基于FPD可检测具体元素的特性选择该方法，而并不考虑其光谱选择，因此最好将该方法视为一种特定检测方法。该分类逻辑可以适用于其他检测方法。

目前，该领域并未制定任何色谱检测方法方面的命名标准。气相色谱检测方法的名称通常能够反应检测的选择

和特异性。火焰离子化检测（FID）和光电离检测（PID）等通常根据检测原理命名。氮磷检测器（NPD）根据检测的具体元素而命名，通常还具有一个反应其物理特性的别名：热离子特异性检测（TSD）。其中热离子特异性检测这一名称的涵义更广，涵盖了对其他杂原子敏感的其他热离子检测。

科学家对这些缩写词既爱又恨。因为它们既简便、简洁，同时又容易误用。幸运的是，气相色谱仪自身拥有一套独特的命名方法，几乎每个缩写词都可对应一个气相色谱装置、检测器、进气口和色谱柱等。对于新的（气相）色谱仪，存在大量令人眼花缭乱的术语。因此该列表或许可以辅助人们对检测器进行区分。

气相色谱技术目前在不断发展。每年都有新的气相色谱装置被开发出来，并上市销售。近年来，市面上已出现了三种新的气相色谱检测器：真空紫外检测器、屏障电离检测器和柱后反应检测器。大部分气相色谱检测器仍继续获得广泛应用，但有少量实际上已几乎不再使用。

**FID塔内保留了工作台空间，
并按需提供氢气，最大可达1000毫升/分钟，
空气流量为每分钟零到5升**

VICI DBS 垂直型**氢气**发生器和空气发生器



**持续不断的GC（色相气谱仪）气体供应
（不含氦气，氢气，零气缸）**

去离子水自动装载自一个容量为3升的智能内部系统水箱，
每次注满后可提供3000升氢气。

**独特的触摸频控制界面及最先进的
钛电池技术**

具有高度完善的软件控制系统及安全报警能力，
它将在克服安全隐患的同时，
为GC用户按需提供氢气。

提高工作场所安全和实验室效率

超高纯度的运营商级气体，
全面完善的软件控制系统及安全警报能力。
它让GC用户在管理安全隐患的同时，
可以按需获得氢气。
流量从每分钟100毫升到1000毫升。

**无需干燥剂，腐蚀性物质或钯，
即可获得超高纯度气体。**

我们的钛技术无需使用干燥剂，腐蚀性物质或钯，
就能生成99.99996%以上纯度的气体。
制氢循环过程中不使用酸性或碱性溶液，
专利的自动干燥系统能确保最大等级的氢气纯度。

提高GC性能及敏感度

氢气的制作是将蒸馏水或去离子水通过聚合物膜，
完成水解。电离作用将水分解成两类主要成分：
用于分析的氢气，和释放到空气中的氧气。

VICI DBS™

www.vicidbs.com

表1：气相色谱检测方法		
检测方法	缩写	描述
原子发射检测	AED	原子发射检测流程为：首先在氦微波诱导等离子体中激发洗脱化合物，然后使用检测范围在160–800nm的光学分光计检测原子发射情况。AED是一种元素特异性检测方法，可用于观察选定的发射谱线，非常类似于FPD，但可同时进行多重发射检测。其灵敏度可与火焰离子化检测（FID）相媲美。
屏障电离检测	BID	BID使用介质屏障放电等离子体发射的近紫外光，使洗脱化合物离子化。其灵敏度可与FID相媲美，而同时表现出接近通用的响应。
电子捕获检测	ECD	电子捕获检测器通过与亚稳态载气分子（由 ⁶³ Ni等放射源放射的β射线产生）碰撞，使溶质离子化。ECD是一种最灵敏的检测方法之一，可以与卤代溶质和其他具有高电子捕获截面的溶质发生强烈响应。
火焰离子化检测	FID	火焰离子化检测器可在氢气–空气火焰中使碳氢化合物溶质离子化。然后收集并使用一个灵敏的静电计测量所产生的电子。FID属于一种近乎通用的检测方法，可以与大多数有机化合物发生强烈反应，而对CO、CO ₂ 、水和其他缺乏C–H键的化合物很少或不发生反应。
火焰光度检测	FPD	火焰光度检测器将洗脱溶质在氢气–空气火焰中灼烧。使用光干涉滤光片选择硫、锡或磷的原子发射谱线，然后使用光电倍增管进行检测。可使用不同的滤光片来观察特定元素的发射谱线。
霍尔电解质电导率检测	HECD, EICD	在还原模式下，电解电导率检测器将含氢溶质与氢进行催化反应，产生强烈的酸性副产物，此类副产物可溶于工作流体中。酸解离后，可测得溶剂的电解电导率增加。其他操作模式则改变与含氮或含硫物质的化学反应。
氮离子化检测、放电电离检测	HeID, HID, DID	氮离子化检测器采用射频脉冲生成氮等离子体来进行检测；等离子体发射高能光子，可以用于使洗脱化合物离子化。其他电子和亚稳态氮原子也会有助于进行该响应。这些检测器的早期版本采用类似于ECD的放射性β粒子源。同时还可见于PDD。
红外检测	IRD or GC–IR	GC–IR检测器可通过在光导管中直接吸收气相透射光谱，或在旋转镀金筒内捕获低温溶质或Zn–Se盘上捕获固态光谱，来获得洗脱溶质的中红外光谱。IRD通过光谱和库检索可区分并识别洗脱物。虽然一些峰存在反卷积，但是仍然可以获得良好的峰分辨率。
质量选择检测、质谱检测	MSD	MSD提供可供搜索的色谱峰质谱。该检测方法采用了多种质量分析仪，包括四级质谱仪、电磁质谱仪、离子阱和飞行时间（TOF）仪。正负（NCI）电子电离（EI）和化学电离（CI）等提供了各种裂解规律。总离子流（TIC）色谱图与其他电离检测器（如火焰离子化检测器）获得的色谱图类似。单离子监测（SIM）和多离子监测（MIM）测量选定的离子，来推断结构信息或去卷积共峰。可以添加第二个质谱分析仪来串联GC–MS/MS，这可以通过选择反应监测（SRM）和多反应监测（MRM）进行进一步分化。
氮磷检测、热离子特异性检测、热离子电离检测	NPD, TSD, TID	NPD在还原环境中催化加热铷或铯表面的含N或P溶质的离子化。NPD具有高度特异性，灵敏度略微优于FID。其他操作模式针对各种其他杂原子进行检测。
光电离检测	PID	光电离检测器可在放电灯的紫外（UV）能量范围内使含光子的溶质分子离子化。PID属于一种特定检测方法，在10.2eV范围内进行检测时，可以与芳香族化合物和烯烃响应，同时还可与具有能量更高的光源的材料响应。
柱后反应器检测	PCR	柱后反应器将洗脱化合物转化为具有不同检测特性的化合物。最常见的柱后装置为镍基还原催化转化器，该装置可通过CO和CO ₂ 生成甲烷，通常被称为甲烷转化器。该装置使得研究人员通过FID对这些化合物进行灵敏检测。最近新开发的装置Polyarc反应器（由Activated Research公司生产）可通过两个步骤将所有含碳物质转化为甲烷，即首先将物质氧化成CO ₂ ，然后还原成CH ₄ 。

表1: 气相色谱检测方法 (续)

检测方法	缩写	描述
脉冲放电检测	PDD	在氦离子化模式下, PDD使用脉冲高压直流电源和氦气生成光子, 用于离子化洗脱峰。最终通过偏置电极收集生成的电子。在该模式下, PDD是一种通用检测方法, 其灵敏度达到十亿分之一 (ppb, 10^{-9})。添加惰性气体 (Ar、Xe、Kr) 可以与芳香族化合物和其他化学物质产生特定的反应。PDD还可以在卤素电子捕获模式下进行检测, 情况类似于ECD。
硫化学发光检测	SCD	这是一种特定检测方法, 通过产生并测量化学发光物质产生的光, 与含硫化合物发生反应。化合物在高温下燃烧, 生成SO, 然后与臭氧反应产生300 - 400nm的化学发光光线。
热导检测 (热导检测器)	TCD	CD可以参照纯载气测量洗脱物质的差异化热导率。TCD是一种灵敏度适中的通用检测方法。热导检测器的名称出现较早, 用于指使用加热热丝测量热导率的变化。其中, 有一些热导检测器使用珠状热敏电阻进行检测。
真空紫外检测	VUV	真空紫外检测器可以在115nm至240 nm波长范围内测量洗脱化合物的近紫外吸收光谱。与FID不同的是, 该检测器可以与CO、O ₂ 和水反应, 产生可以去卷难以分离的化合物 (如间二甲苯和对二甲苯) 的独特光谱。

表2: 不常见或过时的气相色谱检测方法

检测方法	缩写	描述
声学火焰检测	AFD	声学火焰探测器是一种独特的设备, 旨在用于监测不稳定火焰喷射的振荡频率, 此类火焰喷射可以洗脱化合物。AFD还曾在超临界流体色谱法 (SFC) 中使用。
电子天线检测	EAD	也许这是最独特的GC检测方法, EAD曾被用于识别飞蛾、蜜蜂、甲虫和其他昆虫的信息素 (5)。将单个昆虫触角或单个感器连接于电极上, 并暴露于潮湿的流体中。活性化合物的洗脱物可导致神经电反应。然后使用MSD或其他选择检测方法识别化合物。
气体密度计检测	GDB	气体密度计是一种早期的GC检测器, 该检测器使用热敏电阻来测量纯参比载气和GC色谱柱流体密度方面的差异。后来该检测器由热导检测器所取代。
激光光声检测	LOD	LOD使用可调的CO ₂ 激光器的光声效应来生成洗脱化合物在有限范围内的红外光谱。LOD的敏感度可达FID的十几倍 (4), 但在识别共峰方面却缺乏充分的选择性。
核磁共振检测	GC-NMR	许多研究人员已通过停流气相色谱测量或通过NMR管中液相收集, 将GC与NMR结合。 ¹ H和 ¹³ C NMR光谱数据都曾被用于阐明未知化合物的辅助结构信息。
超声波检测	USD	超声波检测器是一种早期应用的GC检测器, 该检测器主要使用一对以超声频率共振的声腔, 在化合物洗脱时借助载气中声速的变化产生差拍信号。该检测器的敏感度相对较低。

参考文献

- (1) 作者估计, 并非公布数据。
 - (2) H.M. McNair和K.A. Schug, *LCGC* 北美 **33**(1), 24-33 (2015).
 - (3) T.A. Maryutina, E.Y. Savorina, P.S. Fedotov, R.M. Smith, H. Siren和D.B. Hibbert, *纯粹和应用化学* **90**(1), 181-231 (2018).
 - (4) L.B. Kreuzer, *分析化学* **50**(6), 597A-606A (1978).
 - (5) J.A. Byers, *J. Neurosci.方法* **135**, 89-93 (2004).
- “气相色谱连接”编辑 **John V. Hinshaw** 是美国俄勒冈州比佛顿Serveron公司的高级科学家, 是LCGC欧洲编辑顾问委员会委员。关于该专栏通过电子邮件直接与作者通信: LCGCedit@ubm.com

纯化色谱柱

离心分配色谱柱在天然产品纯化过程中提供毫克到公斤规模的高容量，具有95%的回收率及99%的纯度。



http://www.gilson.com/en/AllProducts/80.320/Default.aspx#.WqpsD_mOxlZ

美国威斯康星州米德尔顿, Gilson

固相萃取

亲水-亲脂平衡聚合物SPE吸附剂 Chromabond HLB 专门设计用于从诸如水、血清或食品等极性基质中富集亲水分析物(例如农药、药品)。HLB 共聚物的交联亲水基团与分析物的极性官能团相互作用,而亲脂性主链和非极性碳氢化合物残留相互作用,以提供增强的保留。Macherey-Nagel 提供范围广泛、使用Chromabond HLB 吸附剂填充的色谱柱、薄膜和96孔薄层板。



www.mn-net.com

德国迪伦Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

脱气机

Biotech最新的Degasi Plus是Degasi Classic、Degasi GPC、Degasi Micro和Degasi Semi-Prep的进一步开发。该系统可以配置各种应用程序。根据公司介绍,其中的好处包括:

- 更小的占地面积
- 重量1.5kg (6通道)
- 使用智能板的新型真空泵
- 非常安静
- 1-6通道
- 并联真空室
- 易于故障排除和部件更换
- 交货时间短

www.biotech.se

瑞典翁萨拉Biotech AB



FID加气站

VICI的DBS系列FID加气站具有软件控制和报警功能,使GC用户可以获得氢气载气提供的所有好处,同时又能根据公司情况克服安全隐患。据公司报道,该系统将VICI DBS氢气的可靠性和零空气发生器结合在一个紧凑而便利的FID部件之中。



www.VICIDBS.com

瑞士Schenkon, VICI AG International

MALS检测器

按照公司的说法,新型Postnova PN3621 Maximum Angle MALS 检测器为尺寸排阻色谱法(SEC)和场流分离(FFF)最高精度的多角度光散射检测树立了新标杆。检测器最多以21个角度同时测量散射强度,实现蛋白质、聚合物和纳米粒子绝对分子量与尺寸的超高精度测量。



www.postnova.com

德国兰茨贝格Postnova Analytics GmbH

制备系统

Quattro逆流和离心分配色谱仪和萃取器被设计用于配合并补充标准快速与HPLC实验室以及过程仪器。在适当情况下,使用独特的液-液仪器替换固液色谱柱,使制备量从每年的毫克级增加到吨级。根据公司介绍,不会发生柱上吸收或降解。质量平衡是CCC/CPC的标准。通常可以节省50-80%的溶剂。标准两相溶剂、离子液体、液体手征选择剂和离子交换剂均可以使用。根据公司介绍,可以在不造成污染的情况下,将可毒化色谱柱的原材料注入到标准色谱柱中。



www.quattroprep.com

英国伦敦, AECS-QuikPrep Ltd.,

微芯片色谱柱

μ PAC是PharmaFluidics公司生产的基于芯片的色谱柱，用于纳米级液相色谱分析。使用微机械技术将规则的柱形图案刻蚀在硅片上，在分离层上获得良好的排序。该色谱柱可以对微小复杂的生物样品进行高分辨率的分离，具有超强的稳定性。据公司介绍， μ PAC适合脂质组学、代谢组学以及肽的分析。



www.pharmafluidics.com
比利时根特PharmaFluidics

热脱附管

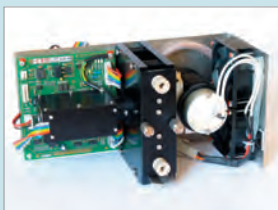
据公司介绍，其设计用于物质排放、调味和空气分析，TD 3.5+可以处理3.5英寸的样品管、Gerstel plus管，并且具有高回收率和灵敏度。无阀无传输管线可以减少分析物损失和记忆效应。可自动处理多达240种样品。与DHS 3.5+相结合，可以处理10毫升至1升的动态顶空。



www.gerstel.com
德国Mülheim an der Ruhr, Gerstel GmbH & Co. KG

PDA检测器

Ecom开发了一款迷你型PDA单色仪；并在一家OEM进行组装，内置检测器的尺寸为220×120×110 mm (8.66"×4.72"×4.33")。该仪器有三个版本，即波长为200-400nm、200-600 nm和200-800nm，分别为双通道、四通道和四通道带扫描。可以获得各种流量管。



www.ecomsro.com
捷克布拉格, Ecom spol. s r.o.

多角度光散射检测器

据公司介绍， μ DAWN是世界上首款多角度光散射(MALS)检测器，可以耦合到超高压液相色谱系统中直接测定绝对分子量和聚合物、肽、蛋白质或其他生物聚合物的尺寸，不需要色谱柱校准或参考标准。据报道，WyattQELS动态光散射(DLS)模块能够“即时”测量流体动力学半径，从而扩大 μ DAWN的用途。



www.wyatt.com
美国加利福尼亚州圣巴巴拉市, 怀雅特技术公司

氮气发生器

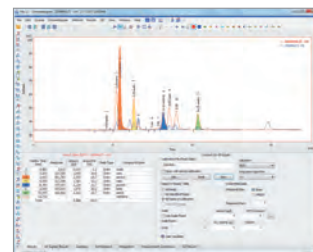
毕克科技的新型Infinity XE 50系列制氮系统设计用于满足典型实验室的多种应用。可以提供1L/min到432L/min的氮气变速流，纯度高达99.5%。该系统非常适合LC-MS、ELSD、试样汽化、NMR、FTMS以及手套箱的各种应用。



www.peakscientific.com/infinityxe50
英国格拉斯哥, 毕克科技仪器有限公司

色谱软件

Clarity可以使用户在一个环境中控制数百种不同的仪器。据公司介绍，数据采集界面的宽阔范围可以与任何色谱仪相连。Clarity可以使用多种语言，用户可以在六种语言之间切换。Clarity操作简单、具有出色的用户支持并且可以扩展到多种应用，包括PDA、MS、GPC或NGA。您可以在公司网站上获取软件的免费演示。



www.dataapex.com
捷克布拉格, DataApex

用于生物制剂分析的优化分子排阻色谱法 (SEC)

这是LCGC电子教程中关于优化分子排阻色谱法 (SEC) 进行生物制剂分析的摘录，详见 www.CHROMacademy.com

在开发可靠的分子排阻色谱法 (SEC) 方法时，需要重点考虑孔径、SEC柱尺寸、温度、流速和流动相等参数，因为这些参数会对检测到的聚集强度造成影响。

首先重要的一点是，您需要针对相关分子选择最佳孔径。您需要确保蛋白质单体和二聚体能够物理渗透到孔隙结构中，以实现分离。其中一个经验法则是SEC柱的孔径应为相关分子直径的3倍。如果孔径太小，蛋白质分子将无法渗透，并将在SEC柱空隙中洗脱，这将会产生不准确的定量数据。反过来，如果孔径太大的话，所有蛋白质将能够完全渗透到粒子中，而很少会被分离。在运用SEC时，由于孔径的选择会影响分辨率，因此有必要对一系列孔径进行测试，以与分析物相匹配。

SEC柱内径会影响流速和注入量。SEC主要包含两种常见的SEC柱内径：4.6mm和7.8mm。由于分离机制单纯地基于固定相孔向内和向外的扩散运行，因此SEC柱尺寸越大，则分离效果越好。流速缓慢可以使分子有足够的时间散入和散出孔结构内流动相的静态池。对于内径7.8mm的SEC柱，正常流速为1.0 mL/min，相当于采用流速为0.35 mL/min的4.6mm的SEC柱。内径的差异也意味着4.6mm柱内注入的样本量可以相应减少（约33%），这对于样本量有限的情况来说具有一定的意义。

您应注意到，在0.35 mL/min的流速下采用内径4.6mm的SEC柱可导致系统内柱外死体积相关的性能差异。如果使用大孔长毛细血管将进样阀与SEC柱或将SEC柱与检测器相连，峰宽会变得更宽。SEC柱越长，可提供越高的分辨率，但需要更长的运行时间。而较短的SEC柱需要较短的运行时间，这会极大地增加样本通过量（为更快地进行分离，使用更高的流速）。由于分离取决于可用的孔体积，因此使用较长或多个SEC柱可以增加可用的孔体积，进而提高分辨率。从30cm的SEC柱切换到15cm的SEC柱意味着运行时间可以减半。只要您可保证要求的分辨率，使用较短的SEC柱可以极大地提高样本的通量。如果您正在筛选多个早期阶段的样本或对发酵情况进行定期测量，样本通量可能显得尤为重要。

在采用一些简单的方法时，如SEC中使用的隔离法，温度有时会被忽视。这些方法通常会将温度陈述为环境温度。但是，如果您想要确保良好的重现性，最好使用柱温箱。在实验室环境中，如果白天或夜晚的环境温度温差超过10°C，您将发现温度会带来明显的影响。这种温差会明显改变流动相的粘度，而这反过来会改变SEC柱的操作压力，同时进出孔结构的扩散过程也将改变。这些影响的诱因是温度升高，温度越高意味着粘度越低、操作压力越低、扩散越快，进而使峰宽更尖且分辨率更高。

然而，如果温度过高，可能会导致聚集情况更严重，甚至可能由于温度过高而导致样本在分析前沉淀。

使用反相分离法的色谱工作人员习惯于高流速以及小分子的最佳平板测数（例如，300 mm × 7.8 mm色谱柱，流速1.1–1.2 mL/min）。然而，当您开始关注较大分子（如蛋白质）的柱效，最佳流速更低（在这种情况下，最佳流速为0.6 mL/min，而前一个示例中的最佳流速为1.2 mL/min）。这一流速差意味着运行时间将大不相同。

流动相的选择可能会对蛋白质产生显著影响，而离子强度、pH值和缓冲液则导致分辨率、选择性和峰形的变化。因此，您必须考虑这些情况会对方法的稳健性和方法优化造成影响，即使是对缓冲液构成的微小变化。您需要特别注意清洗剂和其他变性剂，因为这些化合物可能会导致蛋白质在溶液中展开并扩大，或相互结合而造成溶液中的分子量和尺寸显著增加，这将导致保留时间缩短。不同的SEC柱可能会有不同的表现；大部分为硅基柱，在低离子强度下通常会发生不良的相互作用。然而，随着离子强度的增加，还会发现其他影响；随着操作的继续，还会出现疏水作用，以及出现看起来像疏水作用色谱的情况。

登陆网站了解更多信息：
登陆
www.CHROMacademy.com/Essentials
获取完整教程（4月20日前免费）。



FREE

CHROMACADEMY MEMBERSHIP

Agilent Technologies is offering five years complimentary access to CHROMacademy for all university students and staff.

CHROMacademy is an intuitive, comprehensive e-learning and troubleshooting platform with more than 3,000 pages of content for HPLC, GC, sample preparation, and hyphenated techniques. No other online resource offers separation scientists more live streaming events, a knowledge base, practical solutions, and new technologies in one easy to navigate website.

Get your free five year membership worth US \$1,995* by submitting the form at www.chromacademy.com/agilent.

* Five years free access to CHROMacademy only available to customers affiliated with an academic or research institution, conditions apply. A valid university e-mail address if required.



跑, 跑, 跑!

GC/MS 实验室到处都是样品...

我怎么能把这些事情做完呢?
准备样品! 还有实验数据处理!
我今晚不用回家了...



不要绝望! 使用**MPS** 和 **MAESTRO** 软件, 你可以很容易的自动化处理一切。

几周之后...



现在我可以处理数据和结果了,
MPS可以整晚地运行样品, 我现在可以按时回家了!



多功能样品前处理平台 **MPS** 自动进样器
帮助您处理样品, 并自动的把您的样品进样到
GC/MS 及 **LC/MS** 中进行样品分析。

使用 **MAESTRO** 软件, 只需要把您的样品制备方法输入进去, 用鼠标点击操作, 仪器就可以一步一步的实现样品处理过程。

日常分析的序列可以立即设置并自动检测和验证, 确保您的工作按时完成。

我们可以为您做什么?

