

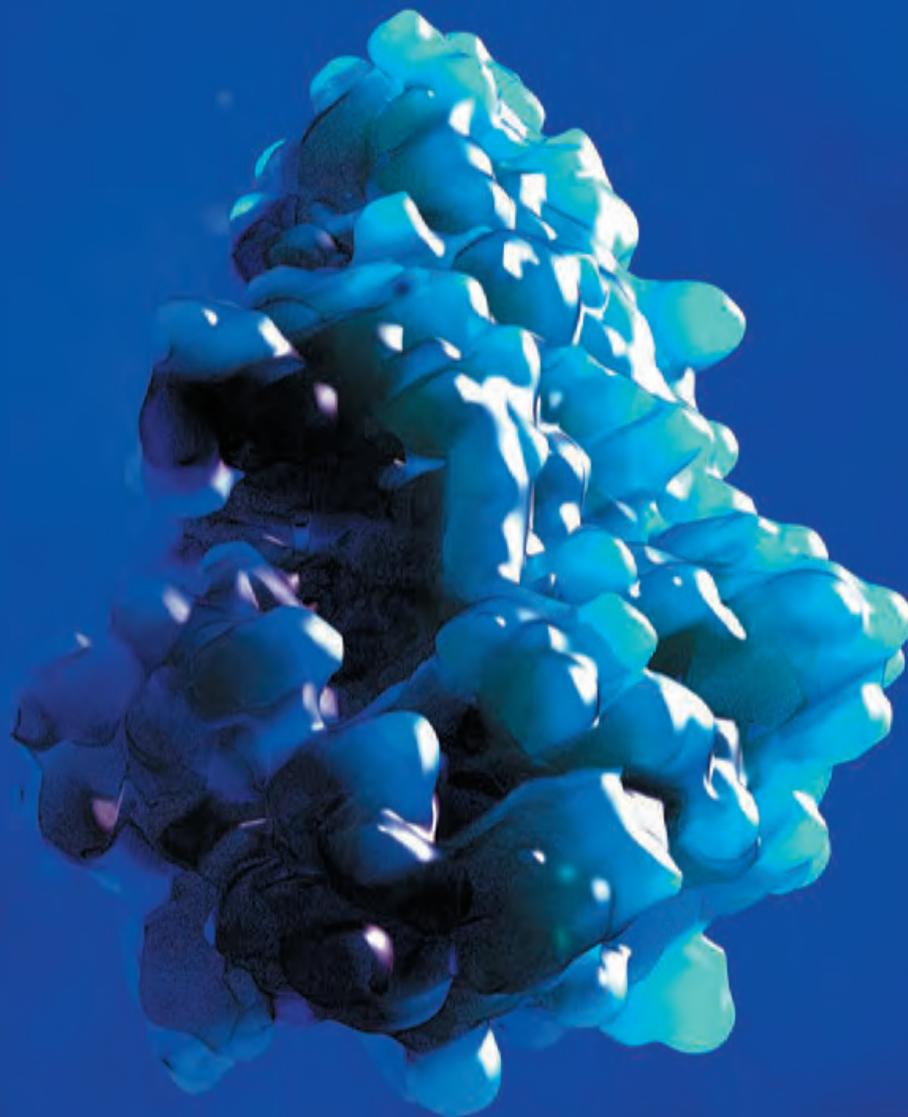
LC | GC

2018年11月/12月

第21卷第4期

www.chromatographyonline.com

亚太地区 分离科学家解决方案



生物制药分析

生物惰性系统和PEEK内衬HILIC色谱柱的有点

LC故障排查

使用体积排阻色谱法分离蛋白质

同行评议文章

提高全二维GC的灵活性

观察专栏

HPLC 2018研讨会的亮点



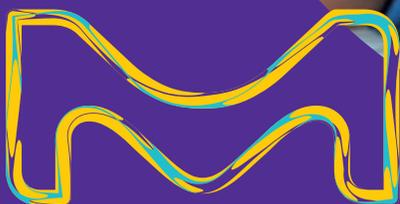
UBM

Feel good in your method development?

FEEL BETTER WITH MERCK

Trust our analytical products in every stage of your drug product development. Whether you're working on bioanalytical LC-MS, formulation, or final quality control and release, we have the expertise you need.

Feel better with full workflow solutions at
SigmaAldrich.com/feel-better



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

© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved. Merck and the vibrant M 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.
2018-14251

MERCK

MACHEREY-NAGEL

Manufacturer of premium
chromatography media

Chromatography



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11月/12月

第21卷 第4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 (欧洲地区) 的文章均应通过杂志编辑顾问委员会的同行评议。

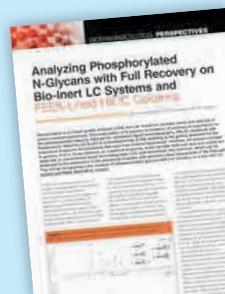
封面:

原始资料来源: Design Cells/stock.adobe.com

封面文章

- 22 关于生物制药的展望
利用基于生物惰性液相色谱系统和PEEK内衬HILIC色谱柱的全回收分析磷酸化N-聚糖

Koen Sandra、Jonathan Vandenbussche 和 Pat Sandra
亲水相互作用液相色谱法 (HILIC) 与荧光检测 (FLD) 和2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 标记相结合是对从生物技术药物中酶解出来的N-聚糖进行分析的黄金标准。但是, 对于磷酸化N-聚糖而言, 不能复制的数据是通过传统LC仪器和色谱柱获取的。对于磷酸化物种的全回收而言, 需要使用生物惰性四元泵液相色谱系统和PEEK内衬HILIC色谱柱。



特色

- 8 压力调制: 提高全二维气相色谱的灵活性 Mohammad Sharif Khan 和 Philip John Marriott
本文介绍了压力调制如何扩大全二维气相色谱的应用范围。

专栏

- 14 LC 故障排查
生物分子分离的秘诀、技巧和故障排查, 第2部分: 当代通过体积排阻色谱法进行的蛋白质分离
近年来, 人们在蛋白质的体积排阻分离中引入了一些新的材料和色谱柱。我如何做出选择? 哪一种分离条件最适合于我的蛋白质分离呢?
- 27 观察专栏
HPLC 2018 研讨会的热点
David S. Bell、Cory E. Muraco 和 Connor Flannery
由Norman Dovichi主持的第47届高效液相分离及相关技术国际研讨会 (HPLC 2018) 于7月29日至8月2日在华盛顿特区举行。本期“色谱观察”涵盖了研讨会上的一些热点。此外, 研讨会还介绍了会议上提出的关于高效液相色谱未来发展的趋势和展望。

部门

- 33 产品

ASPEC® POSITIVE PRESSURE MANIFOLD

MAKING YOUR LAB LIFE EASIER

The new ASPEC positive pressure manifold is a flexible Solid Phase Extraction module for both cartridges and plates.

- Reproducible extractions
- Parallel processing
- Easy to use and set up



www.gilson.com/aspecppm

GILSON®

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

网络直播运行经理
Kristen Moore
kristen.moore@ubm.com

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

在线预订, 网址:
www.chromatographyonline.com

订阅: 亚太地区有资质的读者可免费阅读LCGC (亚太地区) 杂志。
如想申请免费订阅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。如想取消订阅或订过期刊物, 请将要求发送至fulfill@hcl.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。我们已采取适当措施以确保信息的准确性, 但出版社不对所提供信息的准确性或所发表的任何观点负责。

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)。内容许可与重复使用: 有关可使用用途、许可费用及颁奖插图的信息, 请联系我们的官方合作伙伴 Wright's Media, 邮箱: Advanstar@wrightsmedia.com
请注意, Wright's Media 我们与 Advanstar UBM 材料合作的唯一授权公司。
© 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)。
版权所有人允许在 1988 年英国版权法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: jilyn.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。



Daniel W. Armstrong
美国德克萨斯州阿灵顿市, 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
英国布拉德福德, 布拉德福德大学, 药物化学

Attila Feinger
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学和制药学院

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 VVT 技术研究院

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

Kiyokatsu Jino
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
美国纽伯里分析顾问

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
英国肯特布罗姆利区 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
英国切斯特 Advanced Materials Technology

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 Shelle
澳大利亚墨尔本迪肯大学

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

LCGC (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。LCGC (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, 以提高实验室分析科学家的实践性知识, 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。



MERCK

Minimize complexity.
Magnify your focus.

Milli-Q® IQ 7003/7005

Integrated Ultrapure and Pure Water System

- Simple and intuitive Q-POD® and E-POD® dispensers
- Touchscreen display for unparalleled ease of use
- Effortless data management and ensured traceability
- Compact and versatile to optimize lab space

To find out more, visit:

[MerckMillipore.com/labwater](https://www.MerckMillipore.com/labwater)



Merck, the vibrant M, Milli-Q, E-POD and Q-POD 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.

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

Milli-Q®
Lab Water Solutions

压力调谐：提高全二维气相色谱的灵活性

Mohammad Sharif Khan 和 Philip John Marriott, 澳大利亚维多利亚州克莱顿莫纳什大学化学系澳大利亚分离科学研究中心

全二维气相色谱 (GC×GC) 实现了挥发性化学分离的显著改进。选择合适的一维 (¹D) 和二维 (²D) 色谱柱通常需要考虑样品的化学成分。将其中一维替换为双柱集合 (例如, ¹D 色谱柱为 $D_1 + D_2$), 在它们之间提供压力调谐补充气体, 根据结合点压力改变了在调谐步骤之前化合物的相对保留。

这使得改变一维集合的表现极性成为可能, 同时也改变了二维 GC×GC 空间中的峰位。本文介绍了一些研究, 这些研究表明此举为改进 GC×GC 实验室的操作提供了可能。

新引入固定相的总体目标是进行分离, 以实现改进的或替代选择性, 这通常在其他相上是不可能的。离子液体、金属有机骨架和纳米材料是文献中出现的一些新的气相色谱材料 (1-3)。调整选择性的另一种有效方法是使用组合柱。这是改变分离选择性的有吸引力且容易的方案, 在上世纪80年代和90年代研究人员曾对此做过充分的研究 (4)。在不同相位的两个组合柱1和2之间的中间点进行压力调谐 (PT) 能够实现串联组合柱的中间选择性, 因此总体结果既不是1号色谱柱的结果, 也不是2号色谱柱的结果。通过简单地改变压力, 这种方法能够“调谐”或调节每一柱对总体分离的分部贡献率 (5, 6)。该过程能够改变不同化合物的相对洗脱顺序, 这在本质上相当于使组合柱 (1号色谱柱+2号色谱柱) 极性增大或减小, 实际上使组合柱更像1号色谱柱或更像2号色谱柱。这一点通过简单地调节中点压力很容易在线实现。在气相色谱 (GC) 分析期间, Sacks和同事特别积极地推动PT过程 (包括各种停流方法), 以及多个PT阶段 (7)。通过多维和全二维 (2D) 色谱分析平台 (再次) 发现的增强型色谱选择性以及对质谱分析依赖性的提高和创新有可能导致PT失去支持 (8)。

最近, 人们提出了对 GC×GC 中作为第一维度 (¹D) 的组合柱排列进行压力调谐, 称之为 PT-GC×GC (如下)。

这一创新做法使用两个第一维度色谱柱 D_1 和 D_2 , 同时在其结合点处进行压力调谐。随后, 使用调节剂将分析物送入第二维度 (²D) 色谱柱中。近日, Gorecki 的团队也通过对 ²D 色谱柱进行单独可编程的温度操作研究了对 GC×GC 中的 ²D 进行“调谐”的概念, 这一做法的目的也是改变相对分离 (9)。本文将评估 PT-GC×GC 过程的范围和作用, 讨论该过程是否在 2D 分离中实现了有用和可控的混合操作以及对该过程实现实际应用的展望。

通过压力调谐改变选择性

在具有两个不同固定相的典型组合柱一维 (¹D) 系统中, 两个色谱柱通过一个微分流装置 (举例来说) 实

要点

- 在 GC×GC 中两个 ¹D 色谱柱之间的 ¹D 结合处的压力调谐得到有效改变 (调谐) 了 ¹D 中化合物的保留。
- ¹D 保留的变更改变了 ²D 色谱柱的洗脱温度 (T_c), 也改变了 2D 绘图中峰值的相对位置。
- 通过 PT 改变 2D 峰位置, 从而改变了整体的分离正交性, 并且这可能是一个更加容易优化分离的有效策略。

一台气体发生器，
产生的超高纯氢气满足
27台GC 的使用。

NM 1350 Plus 氢气发生器



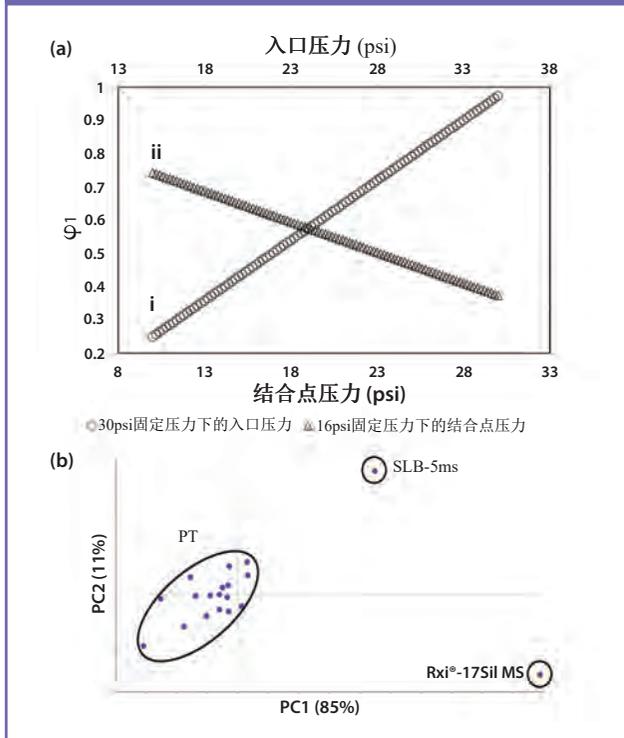
VICI DBS新推出的NM 1350 Plus氢气发生器是原NM系列的升级产品。其体积与原NM系列相同，但流量提高至1350ml/min。
(原NM系列流量范围为100-1000ml/min)

在这种超高流量和11 barg(160psig)出口压力的设计下，仅用一台气体发生器，便可满足最多27台GC的气体供应。

更安全，更高效。
所产生的超高纯气体采用软件方便控制，同时拥有安全警报系统。
NM 1350 Plus为GC用户根据实际需要、安全地供应氢气。

VICI DBS™

图1: (a) 绘图表明了通过 (i) 中点, 或 (ii) 入口压力变化对第一色谱柱贡献率 (ϕ_1) 的改变; 和 (b) 当在PCA图中根据LSER描述符使用PT过程时的选择性差异——PT系统既不像SLB-5ms相, 也不像Rxi-17 MS相。根据参考文献11的许可进行修改。



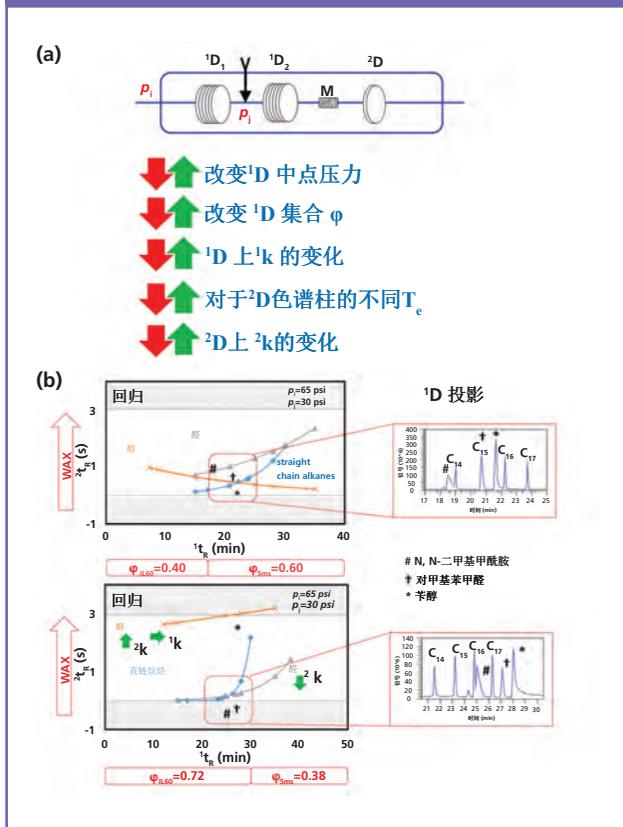
现串联 (10)。一种分析物的相互作用对于每种固定相而言都是不同的, 从而为分析物提供了中间保留特性。例如, 如果使用极性-非极性组合柱进行分析, 保留时间将是第一和第二色谱柱中分析物相互作用时间的总和。通过保留因子可很好地表达了这一点:

$$k_s = \frac{t_{R,1} + t_{R,2}}{t_{M,S}} \quad (1)$$

$$k_s = \phi \cdot (k_1 - k_2) + k_2 \quad (2)$$

其中, $t_{R,1}$ 和 $t_{R,2}$ 是第一和第二色谱柱上的分析物保留时间; k_s 是组合柱保留; $t_{M,S}$ 是组合柱无效时间。术语 ϕ 被称为是相对保持力和每个色谱柱对复合保留做出相对贡献率的方法。其为PT系统提供了一个直观的延迟时间和保留变化的数值表达。对于等温分析, 总体保留将为分析物停留在每一个色谱柱上时间的加权平均值。在不同的中点压力设置下, 峰值可以相对移动, 因此使用本策略仔细调整压力值可以实现对1D分离的优化。

图2: (a) 关于PT-GC×GC特点的插图; 箭头表示根据 P_1 和 P_j 设置值的变化 将改变的参数; (b) 由于选定分析物的中点压力从30psi变为60psi, k_1 和 k_2 的变化。色谱柱组: 30m×0.25mm, 0.20- μ m 1 D SLB-IL60相 (色谱科), 30m×0.25mm, 0.25- μ m SLB-5ms相 (色谱科) 和 2m×0.10mm, 0.10- μ m 2 D Supelcowax10 (色谱科)。等高线图仅显示了直链烷烃、醛和醇的碳骨架 在不断增加的一些实验性和部分外推数据点。M=调节剂。详情见下文。



中点压力 (结合点压力) 的变化对载气流量有直接影响, 这对应于每个色谱柱的滞留时间的变化, 即每个柱的 t_M 值。在给定温度下, 它决定了每一柱上每一溶质的保留系数 (k); 保持时间的变化可以改变由于PT过程导致的分析物的保留特性。我们需要追问的是, 通过PT可以改变多少滞留时间以及这与保持特性有什么关系? 这一问题的答案取决于 (a) 分析物的特性、(b) PT色谱柱集合使用的固定相、(c) 压力设置至以及 (d) 固定相对于各个色谱柱上分离的贡献率。

PT-GC×GC的保留调整机制

在早期的作品中记录了在组合柱系统的每个色谱柱中用于对运载气体降压的不同分析物的相对色谱柱贡献率与保留特性之间的关系 (11)。每个色谱柱的贡献率以可预测的方式随压力设置而变化。图1 (a) 显示了通过改

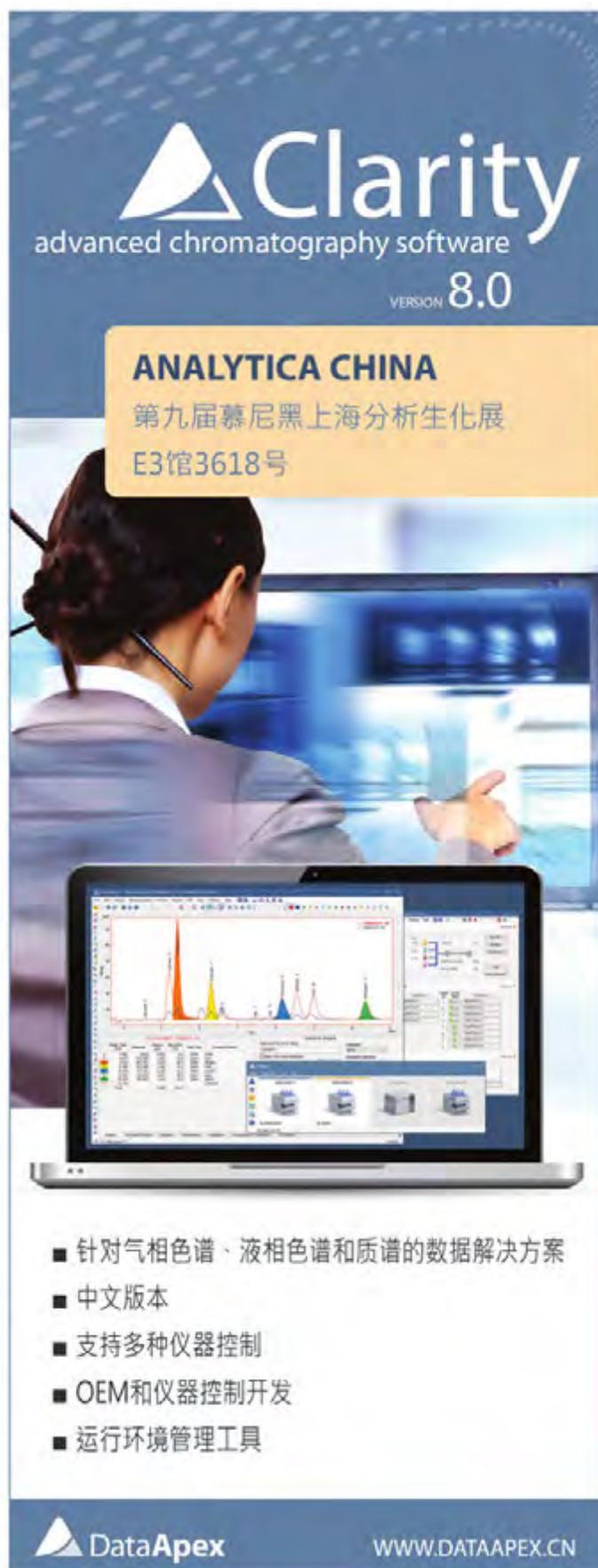
变 (i) 在30 psi固定压力入口处的中点压力；(ii) 在16 psi固定中点压力处的入口压力1号色谱柱贡献率变化的汇总。通过提高 1D_1 上的滞留时间，固定入口压力处中点压力的升高提高了第一色谱柱的贡献率，因此，也降低了第二个色谱柱 (1D_2) 的贡献率。如果中点压力保持不变，入口压力的变化也可以提供调谐机会；中点压力调试似乎更灵活。在出现PT的情况下，我们也描述了使用线性溶解能关系 (LSER) 的总体溶解描述符并将之与单一和组合柱描述符做了对比。我们也明确论证了将PT应用于中间选择性的可能性 (图1【b】)，这表明PT可以产生可变的保留特性，允许相对保留的峰值发生转移。由此可见，PT过程可以改变GC×GC在线组合柱系统第一维度的 1D 选择性，从而转化为 2D 柱的不同洗脱特性。

PT-GC×GC中分析物的净保持量涉及系统性改变参数的一系列步骤，如图2 (a) 所示。GC×GC的第一维度对于完成样本首次分离筛非常重要，随后，第二维度在非常短的时间内以有限的峰值容量提供分离。可行的分离策略将确保 1D 化合物保留适合，然后允许 2D 柱完成所需的分离。 1D GC×GC的PT可以是优化中点压力以实现 1D 最佳分离的一种选择，并随后实现了在2D空间中的最佳分离 (12)。例如在图2 (b) 中，节点压力从30 psi升至60 psi使得第一 1D 色谱柱贡献率从0.40升高至0.72；因此，与直链烷烃 (蓝线) 相比， 1D 集体提高了极性分析物 (例如，酒精 (黄线)) 的相对保留率。

PT对于 1D 分离的影响改变了 2D 色谱柱的化合物洗脱温度 (T_e)，因此，相对 2D 分离将被改变。例如，在图2 (b) 中，在30 psi的压力下，乙醛 (标记为†: 对甲基苯甲醛) 与 C_{15} 链烷 ($t_R = 21$ min) 共洗脱，但是在60 psi的中点设置值下 t_R 约等于27 min。这极大地改变了 T_e (在10 °C/min温度变化速率下40 °C时) 并因此改变了 t_R 。换句话说，在程序升温的试验组中，当该溶解物进入 2D 色谱柱中时，其 T_e 值升高。由此造成的结果是，该分析物的 2D 保留从1.015下降到0.226 s。这应足以从可能在 1D 或 2D 柱上共洗脱的其他化合物中分离出该化合物。正如最近发表的一篇文章中所述，由于通过调谐中点压力分析物的 1D 和 2D 保留出现了这些变化，总体分离正交性也发生了变化 (12)。一些回归确实发生——回归导致 t_R 超出调谐周期，而这在PT-GC×GC分离中必须要考虑到。

通过估算不同PT程序的洗脱温度 (T_e)，可以预测 2D 的变化。这种变化遵循分析物的等挥发性曲线 (当 T 升高时保留率逐渐降低)，表1中显示了两种分析物的数据。

www.chromatographyonline.com



Clarity
advanced chromatography software
VERSION 8.0

ANALYTICA CHINA
第九届慕尼黑上海分析生化展
E3馆3618号

- 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

DataApex WWW.DATAAPEX.CN

表1: PT-GC×GC系统中两种分析物在不同中点压力下 T_e 和 t_R 之间的关系

$p_j = 28 \text{ psi}$	双丙酮醇			α -松油醇		
$p_j \text{ (psi)}$	$^1t_R \text{ (min)}$	$T_e \text{ (}^\circ\text{C)}$	$^2t_R \text{ (s)}$	$^1t_R \text{ (min)}$	$T_e \text{ (}^\circ\text{C)}$	$^2t_R \text{ (s)}$
15	7.33	103	2.87	13.17	161	3.90
16	7.42	104	2.69	13.33	163	3.57
17	7.58	105	2.54	13.50	165	3.36
18	7.83	108	2.24	13.75	167	2.97
20	8.50	115	1.66	14.50	175	2.09
23	10.67	136	0.33	17.08	200	0.66

由于双丙酮醇和 α -松油醇中 p_j 的升高, 2t_R 值随着 T_e 的升高而降低。这一关系可用来决定当PT设定值不同时任何分析物的 2D 位置, 这改变了在 2D 中分析物的保留位置, 并因此改变了总体分离正交性。这两种分析物都是极性分析物, 因此PT的影响并不大。非极性分析物的变动要大得多。

通过使用“脉冲”调谐色谱柱的分离功率从而提高操作的灵活性在色谱界并不新鲜。Mommers和他的同事们研究了在 1D 和 2D 中利用温度调谐GC×GC的选择性(13、14)。在使用多个GC×GC布置扩展分离方面, Savareear和Shellie提出了多路复用色谱柱相提供两个独立的GC×GC系统, 并在更短的操作时间内获得更多的色谱信息(15)。Synovec和他的同事们最近演示了GC×GC×GC-飞行时间(TOF)-MS的实施, 这为其他色谱柱相选择提供了许多实现能力最大化的机会(16)。后者是“静态”方法, 该方法不允许在GC×GC中对选择性进行压力调谐时所接受的容易修改条件。对于 1D 方法, 在近期的文献中也已经报道了关于液相色谱(LC)的温度脉冲和关于超临界流体色谱(SFC)的中点压力调谐(17、18)。这两项研究表明, 在LC和SFC的一维集合体中操作有一定的灵活性。

PT-GC×GC系统的多个好处

可以设想到许多策略来改变PT-GC x GC试验中整体分离。

- (1) 通过因PT过程产生的峰值交换可以对一维分离进行调谐。
- (2) 可以通过 T_e 到 2D 色谱柱的变化来调整第二维分离。
- (3) 可以改变总体分离的正交性。
- (4) 通过改变中点压力可以实现选择性调谐的简单在线过程

- (5) 可以使用一组 1D 集合体和 2D 色谱柱(需选择 1D PT)来实现对不同样本类型的最佳分离。通过使用带有合适 2D 色谱柱的 1D 集合体这一“明智的选择”, 在 1D PT的作用下, 可以使用不同的PT设定值, 例如, 设置值1可能是第1类样品分离的最佳选择, 设置值2可能是第2类样品分离的最佳选择, 而设置值3可能是第3类样品分离的最佳选择。

对各种样品的快速筛选方法:

通过利用PT-GC×GC的调谐特性对样品分析物进行快速筛选从而得到关于各种不同种类样品内容物的初步设想对于任何实验室都是有利的, 比如, 精油、脂肪酸等。与使用以前安装的色谱柱组接受优化程度不佳的结果不同, 分析师可以使用该PT机制轻松地修改 1D 的选择性, 这样可以节省时间和资源, 并提高实验室的通量和产量。

GC×GC分离中的 2D PT:

因为 2D 下的分离时间短且速度非常快, 可以在递增等温条件下研究GC×GC(GC×PTGC)的二维分离。GC×GC工作参数的优化最常涉及寻找方法调整 2D 柱相以及在 1D 色谱柱上洗脱的化合物保留时间(2t_R)。最近报道了 2D (GC×PTGC)实验中的PT组合柱有助于理解 2D PT的机遇和局限性(19)。因为在 1D 中, 由于每个 2D 色谱柱(2D_1 和 2D_2)的压降差所产生的可调停留时间导致了 2D 分离中各柱的可调部分贡献。但是, 在 2D 条件下预期的非常短且快的保留时间使得 2D 的PT变得非常困难。

PT组合柱的未知识别:

保留指数数据将溶质的保留与在特定的固定相和给定温度下的一系列同源化合物参照(如烷烃)联系起来, 尽管程序升温指数也经常使用。大量的来源包含在商业固定相上的I数据。在PT中, 一维指数(1I)是指必须在给定的PT

设置值下从两个不同相中收集关于烷烃和溶质的数据。尽管可以很容易地测得烷烃和溶质的保留率，但是必须通过记录它们从集合体后的洗脱时间却是难以解释的过程。为了将指数系统用在溶质鉴定中，有必要找到一种策略来调整组合柱系统的保留指数数据。通过使用来自各个色谱柱的等温数据并随后对PT数据进行拟合，可以实现对用于识别分析物库数据的PT保留指数数据进行的调整(20)。

选择性转变的在线过程：PT过程实现了在GC×GC中的在线选择性转变。曾有文献报道过通过改变¹D合成柱长度(¹D₁和¹D₂)对第一维选择性进行研究(21)。作者们使用了两个对比色谱柱(非极性和极性)衡量¹D色谱柱选择性对于总体分离和正交性的影响。他们发现，²D分离受¹D *Te*至²D色谱柱的影响并且可以依此做出解释；作者们模拟了数据，与实验相吻合。¹D的变化和相应的²D保留时间变化严格遵循了大多数化合物的“等挥发度曲线”。PT过程仅通过改变上述中点压力设定值来调整¹D集合体而简化了该实验。同样，PT能够在不对色谱柱长度做出实质性改变的前提下对之前研究中所讨论的组合柱选择性进行调谐。

结论

很显然，压力调谐是一个受中点压力调整影响的简单过程，中点压力调整能够交换或改变在色谱图中的峰位置。在GC×GC这方面，由于PT拥有调谐能力并随后改变²D空间中的正交性，通过简单地改变多种不同类型样品的PT设置值，PT提供了有用的概念性和潜在的实用性机会。¹D PT组合体可能因在一定程度上随机改变了保留时间而没有多大的吸引力，特别是对于复杂的样品；但是对于GC×GC而言，¹D色谱柱的PT提供了许多优点，这些优点主要是基于调制和由此产生的²D分离的益处。²D图快捷说明了PT如何通过叠加(举例来说)改变分离，以及如何通过不同PT设置值的比较找到最佳结果。然而，对于特定样品，非PT布置可能是最好的。在理想情况下，PT-GC×GC的优势可以包括：(i) 缩短系统的停机时间，因为如果(¹D₁-¹D₂)×²D色谱柱布置实现了对大量不同样品的可接受调谐分离性能，则可能不必为每个不同样品安装和平衡专用色谱柱组；(ii) 从较少的色谱柱移除和安装中延长色谱柱的寿命；(iii) 由于在线选择性转变和优化实现了操作的灵活性；和(iv)

由于色谱柱布置的简化减少了劳动力。目前，人们对于PT-GC×GC在GC×GC中使用的充分潜力和应用限制仍然比较好奇。我们希望，我们能够实现有效控制仪器性能，选择合适的柱化学反应以及证明通过PT可以轻易调谐并实现对样品分析物进行快速筛选的应用途径。通过使用PT获得合适的²D分离，一个依靠GC×GC分析许多不同样品的中心化实验室可以在无需频繁改变色谱柱组的情况下通过在GC×GC中实现可调谐的分离，充分利用这一过程的优势。

参考文献

- (1) Z.-Y. Gu, C.-X. Yang, N. Chang 和 X.-P. Yan, 化学研究书评 **45**, 734-745 (2012).
- (2) X. Han 和 D.W. Armstrong, 化学研究书评 **40**, 1079-1086 (2007).
- (3) K.B. Mogensen 和 J.P. Kutter, 微型实验室 **12**, 1951-1958 (2012).
- (4) J.H. Purnell, J.R. Jones 和 M.H. Wattan, 色谱法杂志A辑 **399**, 99-109 (1987).
- (5) M. Akard 和 R. Sacks, 分析化学 **66**, 3036-3041 (1994).
- (6) H. Smith 和 R. Sacks, 分析化学 **69**, 5159-5164 (1997).
- (7) R. Sacks, C. Coutant 和 A. Grall, 分析化学 **72**, 524A-533A (2000).
- (8) Z. Liu 和 J.B. Phillips, 色谱科学杂志 **29**, 227-231 (1991).
- (9) H.-Y.J. Chow 和 T. Górecki, 分析化学 **89**, 8207-8211 (2017).
- (10) K.M. Sharif, S.-T. Chin, C. Kulsing 和 P.J. Marriott, 分析化学发展趋势 **82**, 35-54 (2016).
- (11) K.M. Sharif, C. Kulsing, S.-T. Chin 和 P.J. Marriott, 色谱法杂志A辑 **1455**, 156-162 (2016).
- (12) K.M. Sharif, C. Kulsing 和 P.J. Marriott, 分析化学 **88**, 9087-9095 (2016).
- (13) J. Mommers, J. Knooren, T. Dutriez, E. Ritzen 和 S. van der Wal, 色谱法杂志A辑 **1270**, 305-309 (2012).
- (14) J. Mommers, G. Pluimakers, J. Knooren, T. Dutriez 和 S. van der Wal, 色谱法杂志A辑 **1297**, 179-185 (2013).
- (15) B. Savareear 和 R.A. Shellie, 分析化学学报 **803**, 160-165 (2013).
- (16) N.E. Watson, H.D. Bahaghighat, K. Cui 和 R.E. Synovec, 分析化学 **89**, 1793-1800 (2017).
- (17) Y. Hirata, K. Tsuda, 和 E. Imamura, 色谱法杂志A辑 **1062**, 269-273 (2005).
- (18) M. Pursch, P. Eckerle, B. Gu, J. Luong 和 H.J. Cortes, 分离科学杂志 **36**, 1217-1222 (2013).
- (19) K.M. Sharif, C. Kulsing, A.I. da Silva Junior 和 P.J. Marriott, 色谱法杂志A辑 **1536**, 39-49 (2017).
- (20) K.M. Sharif, S.-T. Chin 和 P.J. Marriott, 未发表
- (21) D. Ryan, P. Morrison 和 P. Marriott, 色谱法杂志A辑 **1071**, 47-53 (2005).

Mohammad Sharif Khan是澳大利亚莫纳什大学化学学院的一名博士生，其导师是Philip Marriott教授。他的研究领域包括样品制备，特别是超临界技术、多维色谱的仪器和应用以及化学计量数据分析。他目前的博士研究重点是全二维气相色谱中压力调谐操作的发展。

Philip J. Marriott's的事业包括化学博士(澳大利亚墨尔本拉特罗布大学)、博士后研究(英国布里斯托尔大学)和新加坡国立大学的学术任命(化学)、皇家墨尔本理工大学，现在是墨尔本莫纳什大学的化学教授。他的主要研究领域是气相色谱学和质谱学，特别是在超高分离度全二维气相色谱(GC×GC)和MS的多维GC上，包括基本方法开发和广泛的应用基础，包括石油化学产品、精油、天然产品、污染物和杀虫剂、脂肪酸以及立体选择性分析。

生物分子分离的秘诀、技巧和故障排查，第2部分：当代通过体积排除色谱法进行的蛋白质分离

Szabolcs Fekete¹、Davy Guillarme¹和 Dwight R. Stoll²，¹瑞士日内瓦市日内瓦大学，²LC故障排查编辑

近年来，人们在蛋白质的体积排除分离中引入了一些新的材料和色谱柱。我如何做出选择？哪一种分离条件最适合于我的蛋白质分离呢？

在本期（1）的第1部分，我们关注蛋白质的反相分离。近年来，许多新材料和色谱柱被引入，与一、二十年前相比，它们提供了更好的分离潜力。虽然有些东西保持不变，但随着更好的固定相化学反应的发展和新研究的出现，许多旧的传统观点被推翻了，这些研究为我们观察某些现象提供了更深入的见解（例如，在某些条件下，反相材料中蛋白质的低回收率）。该研究还为操作条件提供了新的指导，从而提高了获得可接受色谱结果的可能性。

在过去的几年中，我们也看到了在基于粒径的蛋白质分离中市售产品的巨大发展。这些分离通常被称为体积排除色谱法（SEC）。在这里，我们会用到这个术语。就蛋白质的反相分离而言，市场上拥有更多色谱柱可供选择的一个优势就是，我们可以根据我们的使用需求更精确地选择色谱柱。但是，拥有更多选择的一个劣势就是

我们必须选择哪一种最合适；在某些情况下，这本身就是一个充满挑战性的任务。另一方面，最近的研究为现有的知识库增加了相当多的见解，以支持这一决策过程。即使我们不能完全理解SEC材料在每种情况中的表现方式（例如，见参考文献2），与五年前相比，我们如今在色谱柱和操作条件上有了更好的选择。

对于本期“LC故障排查”，我曾请求我的两位在生物分子应用领域的蛋白质SEC分离中算得上真正专家的两位同事与我一起分享我们发现对成功SEC分离特别重要的细节。

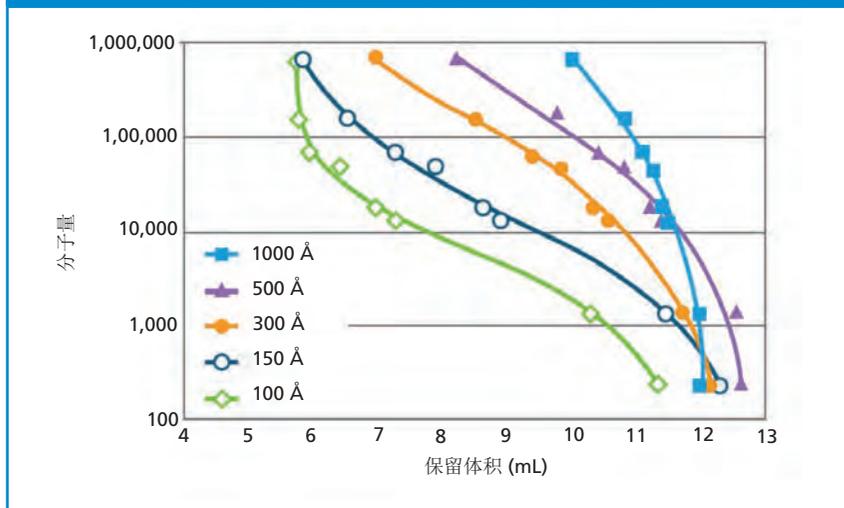
Dwight Stoll

SEC分离的基本知识

从理论的角度来看，SEC可以说是所有色谱分离模式中最简单的一种。在反相模式和其他分离模式中，我们花费了大量时间思考和讨论保留率（即，保

析物、流动相和固定相之间分子间相互作用强度差值的函数。与另一种分析物相比，一种分析物与流动相和固定相相互作用的方式之间的差异导致两种分析物的保留（即，选择性）和最终分离度的差异。通过这种方式，反相和类似分离模式（吸收模式）中的分离度本质上是化学驱动的。另一方面，SEC至少在理想的情况下是完全不同的。在这里，分离度有一个物理基础，而不是化学基础；在理想情况下，固定相的分析物没有保留（也就是说，保留因子为零或者明显为复数）。相反，分离是因为特定粒径的分析物面临着物理限制差异，它们无法通过在SEC色谱柱中使用的多孔颗粒的整个孔隙网络。在样品中非常小的分析物将能够通过大部分孔隙网络。另一方面，因为粒径过大而无法通过所有孔隙的较大分析物将以较高的速度穿过色谱柱，并被观察到其比粒径小的分析物更早从色谱柱中流出。从大粒径分析物的

图1: 颗粒平均孔径不同的SEC色谱柱中分子量与保留体积对比图。在数据集中最小的两个分子是尿嘧啶 (112 Da) 和维生素B12 (1350 Da)，最大的两个分子是伽玛球蛋白 (158 kDa) 和甲状腺球蛋白 (670 kDa)。根据参考文献6的许可进行改编。



角度来看，色谱柱内流动相的体积实际上更小。在理想情况下（也就是说，由于分子间相互作用导致无保留），粒径非常小的分析物在反相分离中将

在我们通常所说的停滞时间 (t_m) 中被洗脱出。与该时间有关的流动相体积（即， $t_m \times F$ ）被称为夹杂物体积（与色谱柱的全孔隙度相对应）。较大的

分析物将早于夹杂物体积被洗脱。

决策1——选择色谱柱

在我们深入讨论细节之前，我们想要弄清楚本期杂志的目的。近年来发表了关于以下主题的大量非常好的资料。我们这里的讨论仅限于对该作品的集锦进行综述。我们强烈鼓励对我们讨论的细节感兴趣的读者阅读本文中引用的文献以便了解更多信息。

粒径和色谱柱长度

在近年来关于SEC色谱柱技术取得进展前，大部分使用的SEC色谱柱相对较大——通常直径为7.8 mm，长度为150 -300 mm。由于使用的粒径较大，因此必须增加色谱柱的长度，大部分色谱柱没有较高的机械强度且必须在较低的压力下使用。最近的SEC色谱柱技术趋势一直集中在开发粒径小 ($<3 \mu\text{m}$)、长度较短（标准值为

RESTEK | ADVANTAGE

See What It Can Do for You and Your Lab



Sign up today to access Restek's years of chromatography knowledge at www.restek.com/advantage

RESTEK Pure Chromatography

Experience the New Proficiency Testing Portal

Ensuring trust and confidence through accurate results every time!

After serving thousands of customers and their 400,000 PT samples over 20 years, we are redefining what PT can do for you.

Discover the next generation of proficiency testing



**User friendly data entry * Graphical Reports * Trend data with "MyStats"
Over 20 new and improved features to enhance your data entry experience!**

We provide you with the essential performance data and premium grade testing components that help you build a valuable quality control asset.

Powerful PT web service provided by QuoData

QuoData contributes its long-term experience in the field of analytical quality assurance, PT and web services to make the new portal stand out.



*QUALITY & STATISTICS!

Get more out of your proficiency testing with our new PT portal.

To connect to the new portal: **[Merck-pt.com](https://www.merck-pt.com)**

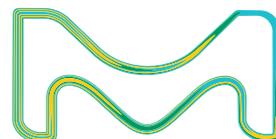
Explore more at **[SigmaAldrich.com/PT](https://www.sigmaaldrich.com/PT)**

Contact: **ptservice@sial.com**

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

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

Lit. No. MK_AD2982EN Ver. 1.0 2018-12840 10/2018



Brighter standards

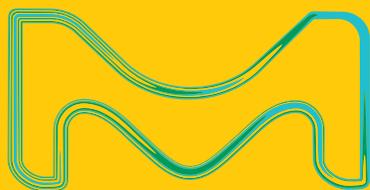
Results are only as accurate as your reference

We manufacture and fully certify our CRMs to the highest industry standards:

- Four production sites doubly accredited to ISO 17034/Guide 34 and ISO/IEC 17025
- Use of validated or qualified testing methods
- Certificate of Analysis, including uncertainties and traceability to meet regulatory requirements
- Real-time assessment of stability and setting of expiry dates and storage conditions based on scientific data

Because results are only as accurate as your reference, trust us with your quality and accuracy.

For more information
SigmaAldrich.com/standards



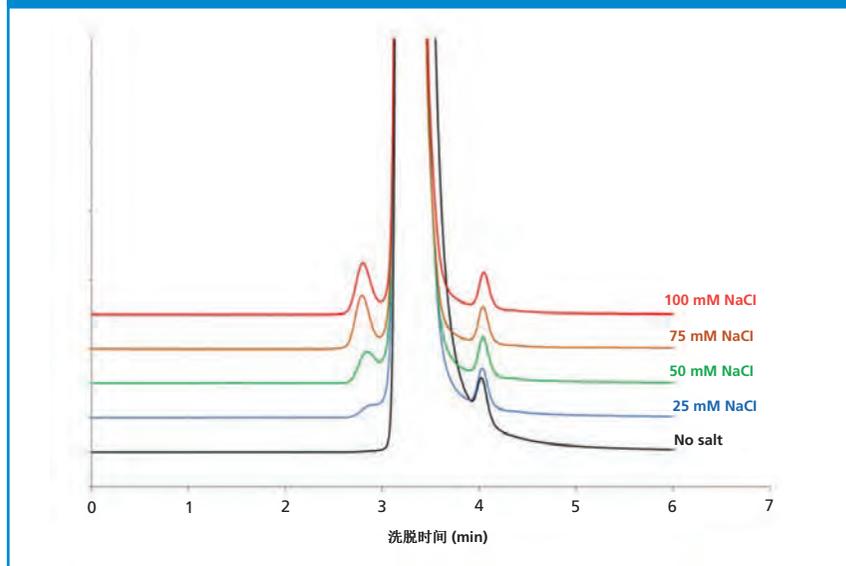
© 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved. Merck and the vibrant M are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

Lit. No. MK_AD2967EN 2018-17066 10/2018

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

Supelco®
 Analytical Products

图2: 治疗性蛋白质阿达木单抗样品中流动相盐浓度对聚集体检测浓度的影响。条件：色谱柱：150mm×4.6mm, 2.7- μm 安捷伦AdvanceBioSEC；流动相：100 mM磷酸盐缓冲剂, pH 6.8；+表示氯化钠的浓度；流速：350 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。按照洗脱顺序的峰值：二聚物、单体和碎片（3）。从D. Guillaume实验室中获得的未发表数据。



15cm) 且直径 (通常为4.6 mm) 较小的色谱柱上。这一趋势得到了颗粒化学反应发展的支持, 这些化学反应在机械上足够稳定而能够与小粒径颗粒一起在较高压力下使用且对生物分子有足够的惰性而产生主要基于分子粒径的分离。向小粒径的转变也通过以更高的流速及这些色谱柱提供提高分离度的机会。对于大粒径颗粒, 使用高流速趋向于导致效率 (即, 塔板数) 和分离度的降低, 而使用较小粒径的颗粒所付出的代价不会造成严重影响。

尽管我们必须对泛化采取谨慎的态度, 在实际意义的层面上, 考虑一下使用小颗粒的趋势对我们有什么影响是很有用的。粗略地说, 塔板高度与颗粒直径成比例。因此, 在将粒径从5- μm 降至2- μm 时, 塔板高度应下降约两倍 (3)。我们可以通过两种主要方式利用塔板高度的这种改进——我们既可以在使用相同长度色谱柱时提高分离度, 也可以在保持分离度的同时缩短分析时间。

在第一种情况中, 如果我们使用两个同一长度的色谱柱, 一个使用粒径为5- μm 的色谱柱, 另一个则使用粒径为2- μm 的色谱柱, 2- μm 颗粒的塔板数应约为5- μm 粒径色谱柱的两倍。由于分离度与塔板数的平方根成比例, 我们应该预期分离度提高约40%。在第二种情况中, 塔板数直接与色谱柱长度成正比, 与塔板高度成反比。如果小粒径的塔板高度下降了两倍, 那么我们可以将色谱柱长度降低两倍, 同时保持相同的塔板数和分离度。如果在两种情况中使用相同的流速, 我们应该预期这一做法会立即造成分析时间下降50%。这是对两种情景简单而有用的观点。当考虑转变为粒径更小的颗粒时, 还有许多其他因素需要考虑, 包括色谱柱和颗粒的压力限制以及仪器的规格。在本文的其他章节中可以看到更多对这些考量相关理论的详细讨论 (4, 5)。

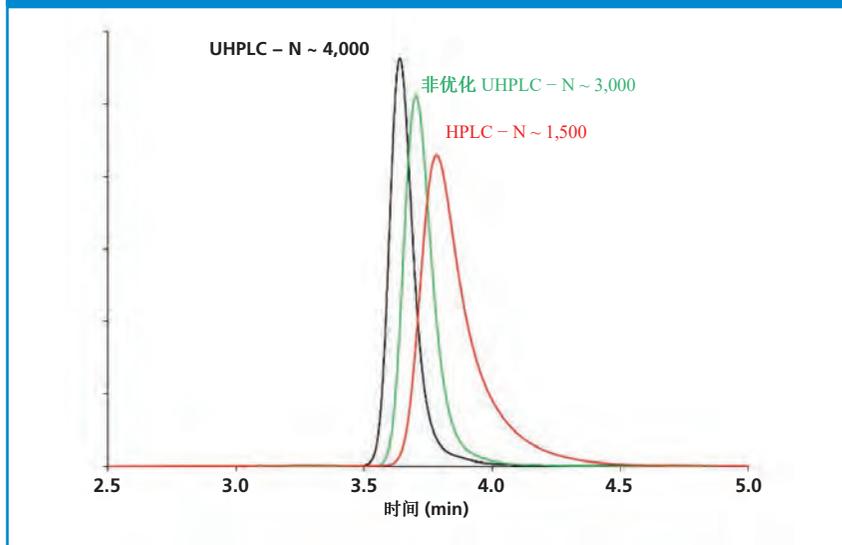
平均粒径和分布

如上所述, 特定分子通过SEC色谱柱

的速度取决于其能够穿过颗粒物孔隙的程度。对于孔径分布良好的颗粒, 存在一系列分子大小使得特定颗粒对基于粒径的分离是有效的。图1所示的校准曲线显示了平均孔径不同的颗粒选择性 (即, 分子量发生特定改变时洗脱体积的差异)。我们可以看到, 当使用小孔隙色谱柱时, 小分子有较好的选择性, 但是最大的分子将被一起洗脱。另一方面, 超大孔隙材料有效地分离最大的分子, 但是最小的分子也被一起洗脱。本曲线图可以用来决定哪一种孔径对于当前的应用最有效。对于蛋白质的特性, 使用介于150Å和500Å之间的典型孔径。对于常见的治疗性蛋白质 (MW \approx 15–80 kDa), 孔径介于150-200 Å时效果很好, 而200-300Å的孔径通常用于单克隆抗体 (mAbs, MW \approx 150 kDa)。对于非常大的蛋白质 (MW > 200 kDa, 例如, 培戈洛酶聚乙二醇蛋白质), 通常情况下, 500-1000Å的材料能够提供最适当的选择性。

孔径分布对于校准曲线的斜率有影响。孔径分布越宽, 曲线的斜率越大。因此, 当孔径分布较宽时, 选择性将降低, 但是可以分离出的分析物范围将会更广。当孔径分布较窄时, 粒径略有差别的种类之间的选择性较高, 但是只能分离出粒径范围有限的分析物。实践中面临的挑战是, 容易从色谱柱制造商处获得的唯一数据就是标准孔径。遗憾的是, 关于如何准确地报告孔隙大小, 目前还没有广泛的共识, 且大部分测量数据依据的是气体吸附/解吸测量值, 这对于蛋白质分析物没有多大意义。因此, 从这些色谱柱使用者的角度来说, 为了能够对给定蛋白质样品的选择性有很好的判断, 通过注射标准蛋白质的混合物来实验确定校准曲线有一定的实际意义。

图3：在三个不同的LC系统中观察到的mAb单体的色谱图。色谱柱：150mm×4.6mm，1.8- μ m；流速：0.3 mL/min；温度：室温。根据参考文献11的许可进行改编。



决策2——选择流动相

在选择色谱柱之后，下一个最重要的决定涉及准确选择将进入流动相的内容。如上所述，SEC分离的基本信

条之一就是应该选择使保留率（从化学意义上来说）最小化的条件。如果实现了，该方法能够确保洗脱体积成为确定分子大小的指标

（如图1所述类型的校准曲线所示），而不是其他指标。乍一看，这似乎应该是简单明了的——我们应该仅选择一个不会通过特定类型的相互作用与被分析物发生强烈相互作用的固定相，并选择一个分析物具有高溶解性并能够使分析物与固定相的相互作用最小化的流动相。但是，如果问我们从50年的液相色谱中学到了什么的话，很显然最重要的就是，固定相或分析物化学反应或结构的微小变化可能导致保留率的重大变化。实际上，在开发新方法时，我们经常在反相分离中充分利用这些相互作用。然而，使用这一方法也意味着在蛋白质的SEC分离中实现“无保留”条件在实践中非常困难。有大量的文献描述了关于使用不同的流动相调相器和条件以便实现固定相与分析物之间相互作用最小化的研究。

Modcol Multipacker and Spring® Columns

Easy self packing for 25, 50, 60, 70, 101 and 150 mm ID HPLC DAC columns

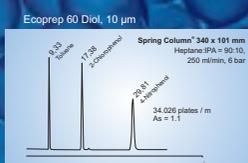
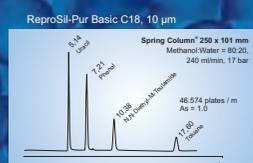
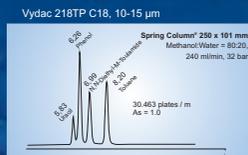
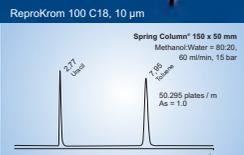
Multipackers

MultiPacker® packing station and Spring® columns can deliver improved performance, productivity, and safety. Unlike competitive systems, the column can be removed from the MultiPacker® packing station and the DAC (Dynamic Axial Compression) mechanism remains contained within the column.



Spring® Columns

The Spring® column system has a unique portable design with patented internal dynamic axial compression (DAC) technology that gives DAC performance independently from the external packing device. The columns are suitable for HPLC and SFC.



Dr. Maisch GmbH

Any Column, Any Size, Any Media

PREP-COLUMNS

ID: 8 - 200 mm

Length: 50 - 500 mm

PACKING SERVICE

REFILL
COLUMN TESTING – QCHPLC – M
PLC – LC
SFC
CHIRAL
COLUMN PACKING DEVICES

BULK MATERIAL IN DIFFERENT

HUGE VARIETY OF MODIFICATIONS:
C30, C18, C8, PHENYL-HEXYL,
C4, C1, SAX, SCX, AMINO, CYANO,
HILIC, PEI, MIXED MODE,
AND MUCH MORE.



Dr. Maisch GmbH

GERMANY

Beim Brücke 14
D-72119 Ammerbuch

Fon +49(0)7073 50 35 7
Fax +49(0)7073 42 16

e-Mail: maisch@reprosil.com
i-Net: www.reprosil.com

EXPERTS FOR PREPARATIVE LC / HPLC & SFC

根据我们的经验，不同流动相条件的许多特殊效应是蛋白质或固定相特异性（或两者），因此，当研究新分子时，对变量进行一定程度的探索是方法开发的必要组成部分。但是，根据我们的经验和迄今为止的文献，我们可以提供一些关于起始条件的建议：

- **pH:** 当蛋白质的等电点 (pI) 已知时，流动相pH应调整为与蛋白质的pI近似。如果pI值未知，pH 6.5是一个好的起点。需要保证的是，无论是基于现有文献还是通过实验，蛋白质在计划的pH值下必须高度可溶且具有化学稳定性。
- **盐:** 我们对多种添加剂进行了测试，作为一种在SEC条件下降低非特异性相互作用和蛋白质保留的手段。例如，在过去我们使用了高浓度 (~0.2 M) 的精氨酸 (7)。精氨酸和其他氨基酸可以与蛋白质相互作用，从而降低可及的放电和可能的静电（离子交换）作用。但是，更常见的情况是使用超高浓度的钠和钾盐抑制固定相与蛋白质之间的静电作用 (8、9)。图2中给出了对于治疗性蛋白质阿达木单抗，在pH值为6.8的磷酸盐缓冲流动相中提高氯化钠添加的浓度所产生影响的示例。这里，我们看到了两个主要的影响，它们很明显都是由于蛋白质与固定相之间的相互作用降低而造成的。首先，mAb二聚体（单体前的峰值洗脱）的检测浓度在未添加盐时几乎检测不到，而后却急剧升高（较高的回收率），当添加了100 mM氯化钠时可以轻易检测出。其次，由于与固定相之间的相互作用降低，二聚体的洗脱体积也再次下降，从而使二聚体和单体的分离度升高。
- **有机溶剂:** 尽管大多数蛋白质都具有足够的亲水性从而使完全含水流动相将产生可接受的SEC结果，但疏

水蛋白质可能需要添加少量溶剂来提高回收率和峰形。特别是，抗体-药物共轭体 (ADC) 是目前最后关注的一类能够因有机溶剂的添加而受益的分子 (10)。在这些情况下，在流动相中添加10-15%的异丙醇是一个好的起点。

关于仪器

在这里，我们至少有两个主要的问题需要讨论：系统色散对于高质量SEC分离的影响以及仪器结构和使用生物惰性及生物兼容性材料的影响。后一个话题比较复杂，我们留待以后讨论。

针对系统色散这一话题，我们必须认识到，SEC分离特别容易受到色谱柱外峰值色散的负面影响（即，柱外色散），这也是因为峰值没有保留或甚至在夹杂物体积之前洗脱。在可预见保留的分离模式中，对于保留较多的峰，柱外色散的影响没有那么严重，且在梯度洗脱的情况下，几乎所有柱前色散都可以被消除。而在SEC中则不是这样，因为没有保留峰，所有的分离都是无梯度的。

如上所述，在不久之前，大部分使用中的SEC色谱柱直径 (~7.8 mm) 和长度 (300 mm) 都较大。这导致峰值体积（即，时间单位的峰宽乘以流速）与它们所连接的LC系统的注射器 - 检测器体积相比有足够大的分离。但是，随着塔板高度的增加和最新色谱柱体积的降低，峰值体积过小，而使得柱外色散再次成为一个非常重要的问题 (11)。图3显示了在柱外峰色散水平不同的三种不同LC系统上获得的单克隆抗体单体检测峰值的比较。考虑到在SEC分离中分离度通常非常重要，其比较清楚地表明，我们应该认真考虑柱外色散对于观察到的色谱的影响，特别是当使用体积和粒径较小的现代SEC色谱柱时。

当使用最先进的150 mm × 4.6 mm SEC色谱柱时，对于在夹杂物体积附近被洗脱出的小分析物，使用传统的高效液相色谱 (HPLC) 系统得到的内在柱效率仅为25%至60%。对于部分筛析的分析物，情况会更糟。必须使用柱外体积（通常为 $V_{ec} < 10 \mu\text{L}$ ）非常小的优化型超高压液相色谱 (UHPLC) 系统，以正确操作这些色谱柱。因此，连接管体积和检测器单元体积必须尽可能小。由于大部分SEC分离在环境温度下进行，流动相预热装置也可以移除，以进一步提高表观效率。另外一个有趣的发现就是，当使用150 mm × 4.6 mm色谱柱时，常规HPLC系统也对蛋白质的表观洗脱时间具有重大影响，并因此影响质量-校正曲线。在这些情况下，所得到的校正数据将不可靠，除非修正了柱外滞留时间。

结论

为蛋白质开发有效和高性能的SEC分离技术需要关注该方法的所有方面，包括围绕固定相、粒径和色谱柱尺寸的选择、流动相条件以及仪器对于色谱层析效率与分离度的影响。一些研究小组在不断地帮助我们理解所有这些决定对分离性能的影响。尽管我们还不能做到完全理解，但是我们比以往任何时候都处于有利地位，可以利用我们已经拥有的信息开发当今可能最佳的方法。

通过本期的“LC故障排查”，我即将完成第一年的每月专栏撰写，这些专栏解决了我们作为液相色谱从业者所遇到的一些难点。我之前已多次提到，随着技术的变化，一些新的问题出现了，我们也适应了仪器和色谱柱的新性能；但是，也有许多问题随着时间的流逝仍然有名无实地存在着。我将继续努力将新旧话题加入到专栏的讨论中，但是作为本专栏的常客我特别希望听到的是您对于我

所谈论话题的想法。是否有一些新出现的挑战是您以前没有见到过的？是否有一些“旧”的话题您希望进一步深入讨论？欢迎您对于我们的话题提出意见！请将您的意见发送至LCGCedit@ubm.com。

参考文献

- (1) S. Fekete, D. Guillaume 和 D.R. Stoll, LCGC 亚太地区21(3), 16-20 (2018).
- (2) A. Goyon, S. Fekete, A. Beck, J.-L. Veuthey 和 D. Guillaume, 色谱杂志B辑 1092, 368-378 (2018). doi:10.1016/j.jchromb.2018.06.029.
- (3) A. Goyon, A. Beck, O. Colas, K. Sandra, D. Guillaume 和 S. Fekete, 色谱杂志A辑 1498, 80-89 (2017). doi:10.1016/j.chroma.2016.11.056.
- (4) K. Broeckhoven 和 G. Desmet, 分析化学发展趋势 63, 65-75 (2014). doi:10.1016/j.trac.2014.06.022.
- (5) P.W. Carr, X. Wang, 和 D.R. Stoll, 分析化学 81, 5342-5353 (2009). doi:10.1021/ac9001244.
- (6) 如何指导生物分子分析的尺寸排除色谱法, (未注明出版日期)
https://www.gbt.com/s/ha/y/p/m/s/p/b/c/5991-3651EN_LR.pdf (2018年6月30日访问)。

- (7) D. Ejima, R. Yumioka, T. Arakawa 和 K. Tsumoto, 色谱杂志A辑 1094, 49-55 (2005). doi:10.1016/j.chroma.2005.07.086.
- (8) A. Goyon, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillaume 和 S. Fekete, 医药和生物医学分析杂志 144, 242-251 (2017). doi:10.1016/j.jpba.2016.09.031.
- (9) F. Bickel, E.M. Herold, A. Signes, S. Romeijn, W. Jiskoot 和 H. Kiefer, 欧洲药剂学和生物药剂学杂志 107, 310-320 (2016). doi:10.1016/j.ejpb.2016.07.020.
- (10) A. Goyon, L. Sciascera, A. Clarke, D. Guillaume 和 R. Pell, 色谱杂志A辑 1539, 19-29 (2018). doi:10.1016/j.chroma.2018.01.039.
- (11) A. Goyon, D. Guillaume 和 S. Fekete, 医药和生物医学分析杂志 135, 50-60 (2017). doi:10.1016/j.jpba.2016.12.004.

Szabolcs Fekete 拥有匈牙利布达佩斯技术大学的分析化学博士学位。他在Gedeon Richter Plc的化工厂分析研发部门工作了10年。自2011年以来，他一直在瑞士日内瓦大学工作。他为100多篇期刊文章撰稿、撰写书籍章节和编辑手册。他的主要研究方向包括液相色谱法（反相、IEX、SEC、HIC、SFC、HILIC）、色谱柱技术、方法开发以及药物和蛋白质分析。

Davy Guillaume 拥有法国里昂大学的分析化学博士学位，现担任瑞士日内瓦大学的高级讲师。他撰写了200多篇与药物分析相关的期刊文章。他的专长包括HPLC、UHPLC、HILIC、LC-MS、SFC以及蛋白质和单克隆抗体的分析。他是《色谱学B》杂志的副编辑，也是包括LCGC（亚太地区）、《色谱学杂志A》、《分离科学杂志》等多家期刊的编辑顾问委员会成员。

Dwight R. 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LCGC编辑顾问委员会成员。

LC | GC's CHROMacademy

powered by crawfordscientific

Become the lab expert with our interactive
HPLC Troubleshooter

Get answers fast. Reduce downtime. Increase efficiency.



Try it now for FREE @

www.chromacademy.com/hplc_troubleshooting.html

For more information contact:

Glen Murry: +1 732.346.3056 | Glen.Murry@ubm.com

Peter Romillo: +1 732.346.3074 | Peter.Romillo@ubm.com

Jacqueline Robertson: +44 (0)1357 522961 | jacqueline@crawfordscientific.com

利用基于生物惰性液相色谱系统和PEEK内衬HILIC色谱柱的全回收分析磷酸化N-聚糖

Koen Sandra、Jonathan Vandenbussche 和 Pat Sandra, 比利时科特赖克色谱研究所

糖基化是可能会对蛋白质生物技术药物的安全性和有效性产生影响的一个关键质量属性 (CQA)。因此, N-聚糖的表征对于制药行业而言是至关重要的。亲水相互作用液相色谱法 (HILIC) 与荧光检测 (FLD) 和2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 标记相结合是对从生物技术药物中酶解出来的N-聚糖进行分析的黄金标准。但是, 对于磷酸化N-聚糖, 也即附着在溶酶体酶上的N-聚糖来说, 要基于经典液相色谱 (LC) 设备和色谱柱对其不可复制的数据及回收问题进行观测, N-聚糖的磷酸化可能是因磷酸根与流动路径中的不锈钢部件相互作用发生的。本文演示如何基于生物惰性液相色谱系统和PEEK内衬HILIC色谱柱利用全回收对磷酸化聚糖进行分析。

蛋白质生物技术药物是正在迅速发展的一类疗法, 广泛用于治疗各种危及生命的疾病 (1、2)。其中有大约40%的蛋白质生物技术药物是糖基化的, 单克隆抗体 (mAb) 的总聚糖量在2%到3%之间, 而促红细胞生成素的总聚糖量 (EPO) 则高

达50%。糖基化可能会对产品的安全性和有效性产生影响, 因此被视为是一个关键质量属性 (CQA)。例如, 复合N-聚糖上的末端唾液酸残基能够调节血液中EPO的半衰期, 核心岩藻糖基化则会影响mAb的效应子功能, 医药用酶上的甘露糖-6-磷酸

根对于运输至酶需要具有催化活性的溶酶体是至关重要的 (1、2)。因此, 对这些聚糖结构进行表征是一项根本要求。蛋白质生物技术药物的糖基化分析可以在不同层面上进行, 即可以在蛋白质层面进行, 也可以在肽和聚糖层面上进行 (3)。

亲水相互作用液相色谱法 (HILIC) 与荧光检测 (FLD) 和2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 标记相结合是对从生物技术药物中酶解出来的N-聚糖进行分析的黄金标准 (1、2、3)。尽管该方法有中性唾液酸N-聚糖的可靠跟踪记录, 但在对来源于医用溶酶体酶的磷酸化N-聚糖进行分析后经常会遇到回收不良的不可复制数据的情况。这是因为磷酸基团与流动路径中的不锈钢部件相互作用而产生的。对于核苷酸和磷酸肽而言, 同样须对这一现象进行观测 (4-9)。而对于 N-聚糖分

图1: 2-AB标记的RNase B N-聚糖基于安装在生物惰性液相色谱系统上的PEEK内衬和不锈钢色谱柱的HILIC-FLD色谱。

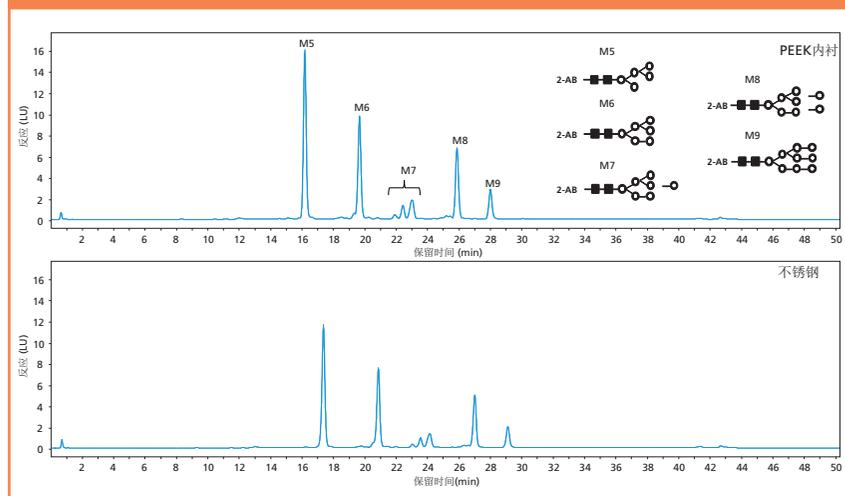


图2: 来源于人类酸性 α -葡萄糖苷酶的2-AB标记中性和磷酸化高甘露糖基与安装在生物惰性液相色谱系统上的PEEK内衬和不锈钢色谱柱的HILIC-FLD色谱。

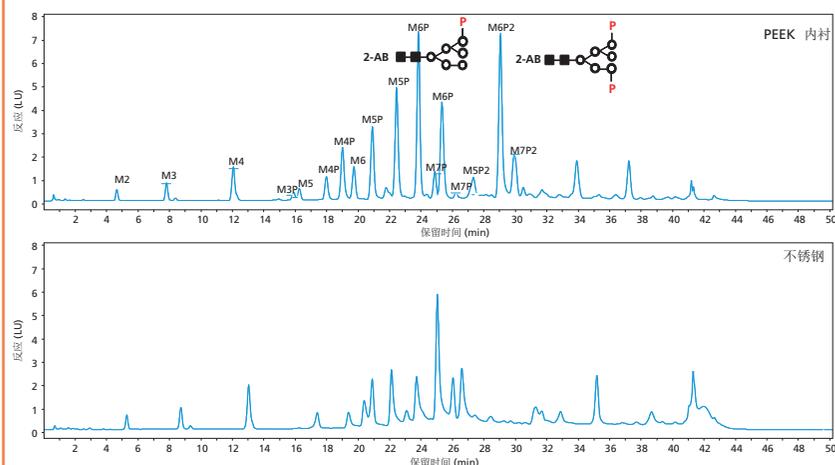
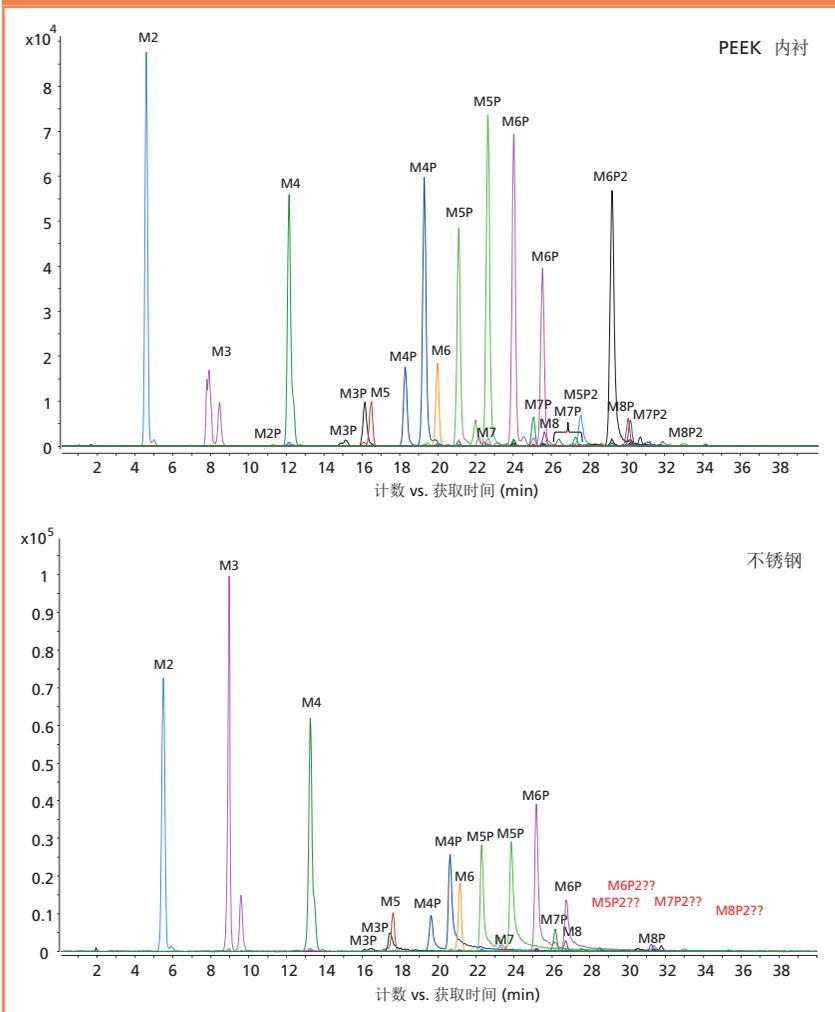


图3: 来源于人类酸性 α -葡萄糖苷酶的2-AB标记中性和磷酸化高甘露糖N-聚糖基与安装在生物惰性液相色谱系统上的PEEK内衬和不锈钢色谱柱的HILIC-ESI-MS色谱。图中显示的是不同聚糖叠加提取的离子色谱图 (EIC)。



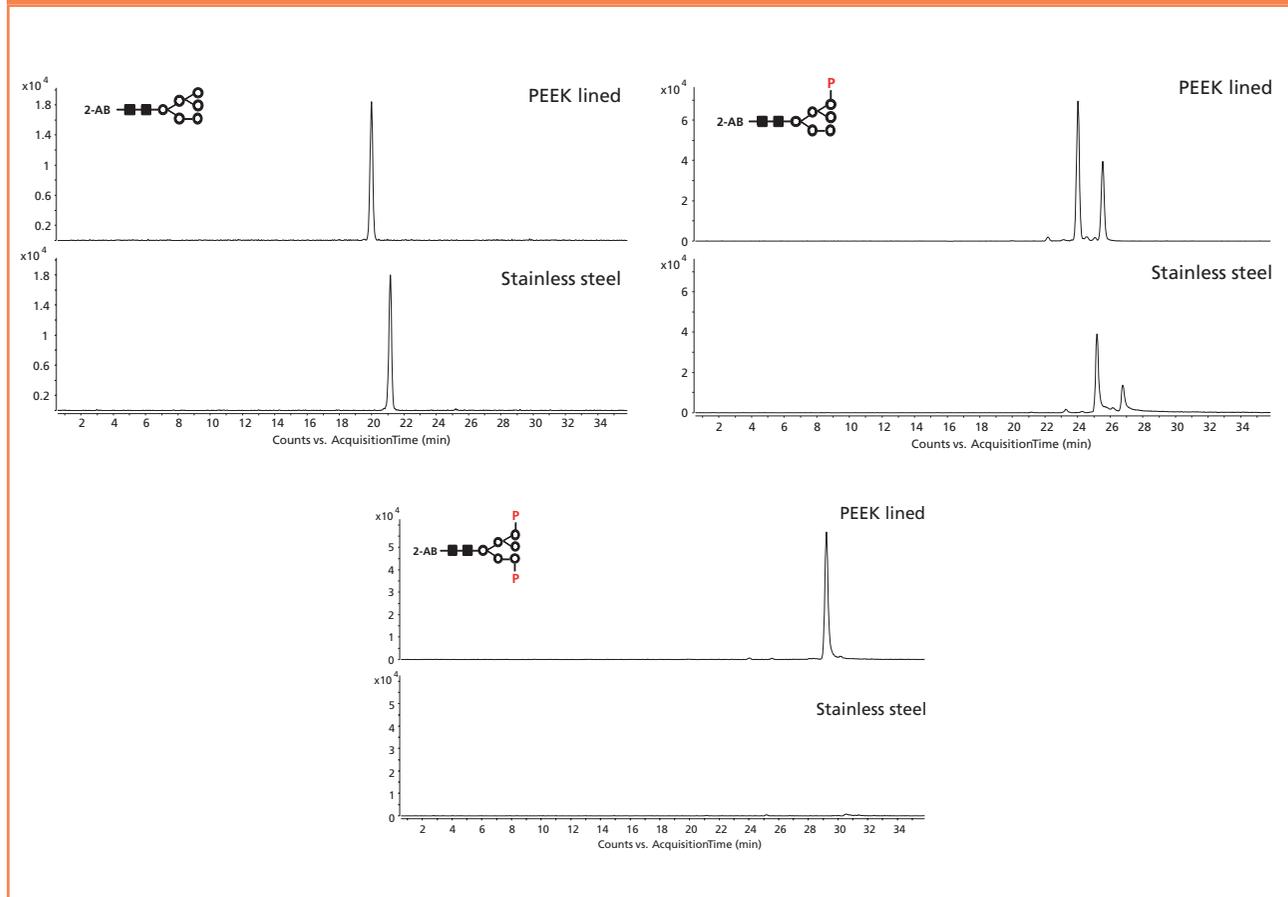
析而言, 则通常通过使用含有离子对试剂 (如三乙胺) 的流动相 (10、11) 或通过使用附带脉冲安培检测的高效阴离子交换色谱法 (HPAEC-PAD) 在高pH值 ($\text{pH} > 12$) 下进行分离予以分离 (12、13)。本文证实了当整个样品流动路径无金属时, 使用常用的流动相组成 (即, pH值为4.5的100-mM NH_4 -甲酸盐和乙腈) 和标准2-AB-标记法, 通过HILIC可以成功分析磷酸化多糖。为实现这个目标, 必须使用生物惰性液相色谱 (LC) 系统以及PEEK内衬HILIC色谱柱。

有大约40%的蛋白质生物技术药物是糖基化的, 单克隆抗体 (mAb) 的总聚糖量在2%到3%之间, 而促红细胞生成素的总聚糖量 (EPO) 则高达50%。

实验材料: 乙腈和水是从Biosolve中提取的。甲酸铵是从Sigma Aldrich公司购买的。2-AB标记的RNase B和重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶N-聚糖 (修饰或未修饰的) 则是由当地的一家生物技术公司提供的。

方法: HILIC-FLD测量基于配备有四元液相泵 (G5654A)、多用采样器 (G5668A)、附带换热器的多列恒温器 (G7116A) 及附带生物惰性流动池的荧光检测器 (G7121B) 的Agilent 1260 Infinity II生物惰性液相色谱系统进行的。对于液相色谱质谱 (LC-MS) 实验, 将上述LC配置联用至配备有JetStream电喷雾电离 (ESI) 源的Agilent QTOF LC-MS系统 (G6545A)。使用OpenLAB CDS (2.1版本) 对LC及LC-MS数据

图4: 来源于人类酸性 α -葡萄糖苷酶的2-AB标记M6 (m/z 1517.539)、M6P (m/z 1597.505)和M6P2 (m/z 1677.472)基于安装在生物惰性液相色谱系统上的PEEK内衬和不锈钢色谱柱的HILIC-ESI-MS离子提取色谱图。



进行采集和分析，分别使用MassHunter进行仪表控制（B06.01）和MassHunter进行数据分析（B07.00）（安捷伦科技公司）。

本研究使用了两个色谱柱：一个 $2.1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ ， $2.7\text{-}\mu\text{m}$ 的AdvanceBio聚糖映射色谱柱（表面多孔型粒子——酰胺）（Agilent），盛装在普通不锈钢外壳中及一个尺寸相同的PEEK内衬色谱柱，以相同的表面多孔型粒子（Agilent）定制填充。以呈线性梯度的（A） $100\text{-mM NH}_4\text{-甲酸盐}$ ， $\text{pH } 4.5$ 和（B）乙腈（ $80\%\text{-}60\%$ ）在38分钟内进行洗脱。流量设定为 0.4 mL/min ，柱温设定为 40°C ，注入体积设定为 $1\mu\text{L}$ 。FLD的激发波长和发射波长分别为 260nm 和

430nm 。QTOF源的操作参数为：干燥气温度： 300°C ；干燥气流速： 8 L/min ；雾化压力： 35 psig ；鞘气流温度： 350°C ；鞘气流速： 8 L/min ；喷嘴电压： 1000 V ；毛细管电压： 3500 V ；碰撞电压： 150 V 。QTOF数据在质心模式下以 1 频谱/秒 的速度进行采集，采集范围为 $500\text{-}3200\text{ m/z}$ 。系统在超宽动态范围模式（ 2 GHz ）下运行。

2-AB标记聚糖的洗脱取决于其聚合程度，即葡萄糖苷键的数量越多，保留也越多。

结果和讨论

HILIC与FLD及2-氨基苯甲酰胺（2-AB）标记结合使用是当前对从生物技术药物中酶解出来的中

性和磷酸化N-聚糖进行分析的最佳方法（1、2、3）。图1显示了基于安装在生物惰性液相色谱系统上的不锈钢和PEEK内衬酰胺HILIC色谱柱对2-AB标记的中性高甘露糖RNase B N-聚糖所进行的分析。对于中性聚糖，在两个色谱柱上得到了非常相似的色谱图。而2-AB标记的聚糖的洗脱则取决于其聚合程度，也即葡萄糖苷键的数量越多，保留也越多。此外，相同聚合反应的化合物存在能够使其彼此分离的足够的选择性差异，也即聚糖树上甘露糖残基位置不同的M7同分异构体。两种谱图都是基于生物惰性液相系统取得的，但在经典不锈钢HPLC系统上也可能会得到相似的结果。

图2和图3分别显示了对来源于在酵母中重组表达的人类酸性 α -葡萄糖苷

酶的2-AB中性和磷酸化高甘露糖N-聚糖所进行的HILIC-FLD和HILIC-ESI-MS分析。人类酸性 α -葡萄糖苷酶在细胞溶酶体室中能够催化糖原水解为葡萄糖。全世界大约有50,000人缺乏这种酶,从而导致糖原在溶酶体中累积,继而造成肌肉损伤。这些患者通常需要接受重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶的酶替代治疗(14)。含有聚糖的甘露-6-磷酸盐的存在也是一个CQA,因为这些功能负责将酶靶向需要分解糖原的溶酶体(15)。

与中性RNase B N-聚糖的观察结果形成对比的是,在基于不锈钢或PEEK内衬色谱柱对2-AB标记的聚糖进行分析时出现了巨大的差异。中性聚糖M2-8在两种色谱柱上的表现都很好。但单磷酸化聚糖M2-8P在不锈钢柱上显示出拖尾峰,而双磷酸化聚糖M5-8P2在后一种色谱柱上则因为金属离子和磷酸根之间的相互作用而完全没能得到回收。已知,核苷酸适用相同的回收原理,也即AMP > ADP > ATP。在PEEK内衬色谱柱上,单磷酸化(例如M6P)和双磷酸化(例如M6P2)结构均观察到了完美的高斯型峰,表明将所有金属部件从流动路径(仪表、色谱柱,包括柱筛)中移除是非常重要的。研究还对同分异构的单磷酸化聚糖(即聚糖树 α 1-3或 α 1-6分支上磷酸基的位置不同)进行了观测。图4中显示的M6、M6P和M6P2的提取离子色谱图也进一步佐证了这一点。图5显示了一些相关的MS/MS谱图。

值得注意的是,与LC系统和色谱柱的金属离子对磷酸化品类的吸附相关的上述现象仅发生在含有N-聚糖($\text{PO}_4\text{-M}$)²⁻的磷酸单酯身上,而不会发生在含有N-聚糖($\text{M-PO}_4\text{-M}$)¹⁻的磷酸二酯上。对于后一种聚糖而言,基于不锈钢和PEEK内衬色谱柱所取得谱图是完全相同的(图6)。有趣的是,这些携带磷酸二酯的聚糖均存在于解脂耶氏酵母所重组生成的人类酸性 α -葡萄糖苷酶上,但在下游处理以生成酶的活性形式(即,携带甘露糖-6-磷酸残基)的过程中,外甘露糖残基会被酶所移除(15)。

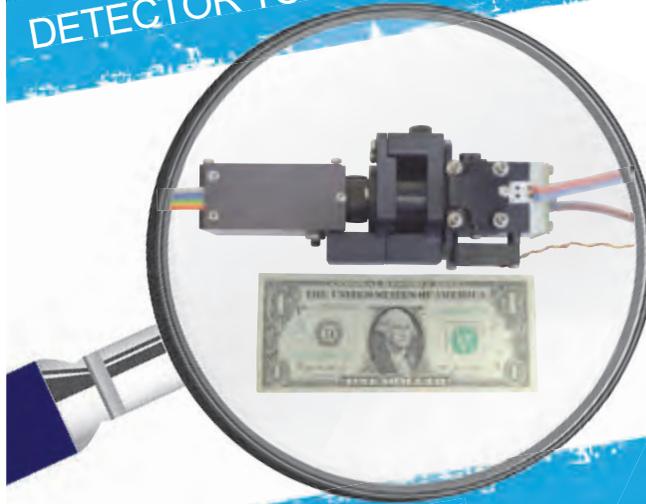
结论

本文描述了使用生物惰性液相色谱柱和PEEK内衬色谱柱对医药用酶中释放的磷酸化N-聚糖所进行的HILIC分析。结果表明,当整个流动路径中没有金属部件(即仪表和柱惰性)时,可以完成对这些具有挑战性结构的分析。

Equipment for Analytical, Preparative and Flash Chromatography:
UV-VIS Detectors • Column Ovens • Software • Pumps • Injectors

益康

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 Analytical Shanghai 2018, booth E3.3710

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



图5: 24.04min时磷酸化N-聚糖洗脱的MS/MS谱图 (对于M6P同分异构体为25.57min, 对于M6P2则为29.30min)。

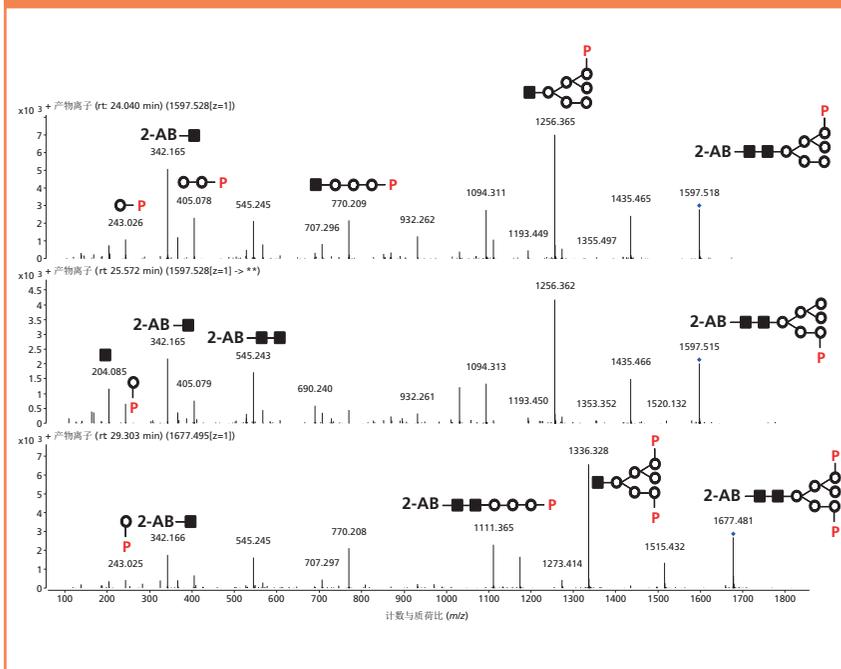
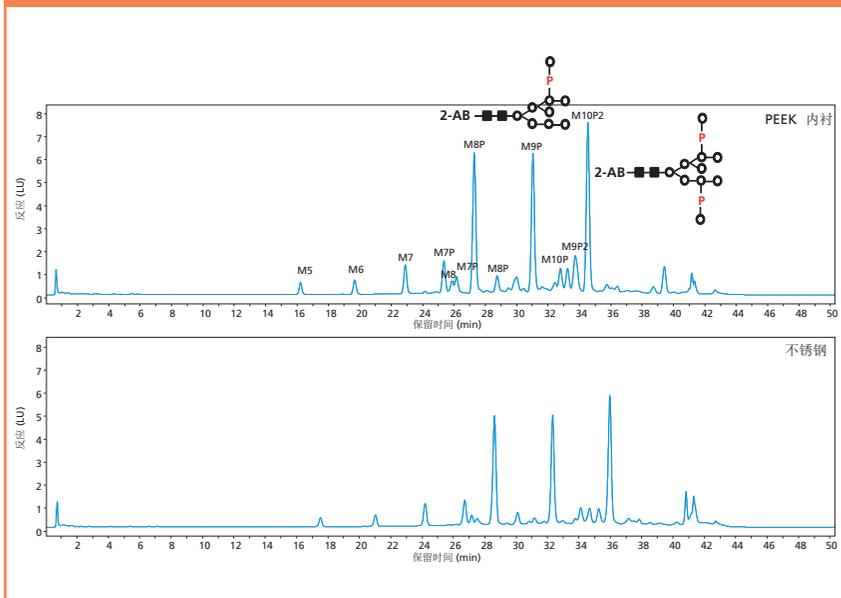


图6: 含有高甘露糖N-聚糖的2-AB标记中性和磷酸化二酯基于安装在生物惰性液相色谱系统上的不锈钢色谱柱和PEEK内衬色谱柱的HILIC-FLD色谱图。



- (5) S. Liu, C. Zhang, J.L. Campbell, H. Zhang, K.K.-C. Yeung, V.K.M. Han and G.A. Lajoie, 质谱学快报 19, 2747-2756 (2005).
- (6) R. Tuytten, F. Lemiere, E. Witters, W. Van Dongen, H. Slegers, R.P. Newton, H. Van Onckelen 和 E.L. Esmans, 色谱法杂志A辑 1104, 209-221 (2006).
- (7) Y. Asakawa, N. Tokida, C. Ozawa, M. Osamu, M. Ishiba, O. Tagaya 和 N.Asakawa, 色谱法杂志A辑 1198- 1199, 80-86 (2008).
- (8) H. Sakamaki, T. Uchida, L.W. Lim 和 T. Takeuchi, 分析科学 31, 91-97 (2015).
- (9) H. Sakamaki, T. Uchida, L.W. Lim 和 T. Takeuchi, 色谱法杂志A辑 1381, 125-131 (2015).
- (10) J.Y. Kang, O. Kwon, J.Y. Gil 和 D.B. Oh, 分析生物化学501, 1-3 (2016).
- (11) J.Y. Kang, O. Kwon, J.Y. Gil 和 D.B. Oh, 数据简报 7, 1531-1537 (2016).
- (12) M.R. Hardy 和 J.S. Rohrer, 综合糖业J.P. Kamerling编辑。(荷兰阿姆斯特丹爱思唯尔, 2007年), pp. 303-327.
- (13) S. Kandzia, N. Grammel, E. Grabenhorst 和 H.S. Conrads, 细胞与文化, ESACT会议, T. Noll编辑 (荷兰多德雷赫特Springer, 2010年), pp. 867-873.
- (14) A.T. van der Ploeg 和 A.J. Reuser, 柳叶刀 372, 1342-1353 (2008).
- (15) P. Tiels, E. Baranova, K. Piens, C.D. Visscher, G. Pynaert, W. Nerinckx, J. Stout, F. Fudalej, P. Hulpiu, S. Tännler, S. Geusens, A. Van Hecke, A. Valevska, W. Vervecken, H. Remaut 和 N. Callewaert, 自然生物技术30, 1225-1231 (2012).

Koen Sandra 是《生物制药的展望》的编辑。他是色谱研究所 (比利时科特赖克, RIC) 的科技总监和 anaRIC biologics (比利时根特) 的研发总监。他还是LCGC亚太区编辑顾问委员会的成员。可直接联系本专栏的总编辑Alasdair Matheson, 邮箱: alasdair.matheson@ubm.com

Jonathan Vandenbussche是RIC 的 LC-MS 技术人员。

Pat Sandra 是RIC的所长及根特大学 (比利时根特) 的名誉教授。

鸣谢

作者向Sonja Schneider、Sonja Krieger、Linda Lloyd 和Udo Huber (安捷伦科技公司) 表示感谢。

参考文献

- (1) K. Sandra, I. Vandenheede 和 P. Sandra, 色谱法杂志A辑 1335, 81-103 (2014).

- (2) S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra 和 K. Sandra, 分析化学 88, 480-507 (2016).
- (3) V. D'Atri, E. Dumont, I. Vandenheede, D. Guillarme, P. Sandra 和 K. Sandra, LCGC 欧洲 30(8), 424-434 (2017).
- (4) A. Wakamatsu, K. Morimoto, M. Shimizu 和 S. Kudoh 分离科学杂志 28, 1823-1830 (2005).

HPLC 2018研讨会 亮点

David S. Bell¹、Cory E. Muraco² 和 Connor Flannery³, ¹观察专栏编辑; ²美国宾夕法尼亚州贝尔丰特市 MilliporeSigma公司; ³美国宾夕法尼亚州贝尔丰特市 Restek公司

由Norman Dovichi主持的第47届高效液相分离及相关技术国际研讨会 (HPLC 2018) 于7月29日至8月2日在美国华盛顿特区举行。本期“观察专栏”涵盖了研讨会上的一些亮点。此外, 研讨会还介绍了会议上提出的关于高效液相色谱未来发展的趋势和展望。

第47届高效液相分离及相关技术国际研讨会 (HPLC 2018) 于7月29日至8月2日在美国华盛顿特区的Marriott Wardman公园酒店和会议中心举行。本次研讨会吸引了来自34个国家的870名代表参加, 其仍然是将液相色谱和相关技术领域的主要科学家聚集在一起的重要活动。美国场馆的出席率继续低于欧洲场馆; 但是, 美国的出席率多年来一直相当稳定 (表1)。本次组织有序的会议由美国圣母大学的Norman Dovichi教授主持。正如教授所述, 该项目着重于制药行业的分离, 包括关于连续制造的有趣会议和前瞻性的药物分析。其他会前亮点包括关于3D打印的介绍、微柱阵列技术发展以及对于快速发展的大麻产业的特别关注。会议包括203场演讲 (其中12场为教程演示)、335个海报展示、9个短期课程以及9个供应商技术研讨会。本期“观察专栏”汇报了会议上的亮点和趋势。

亮点和趋势

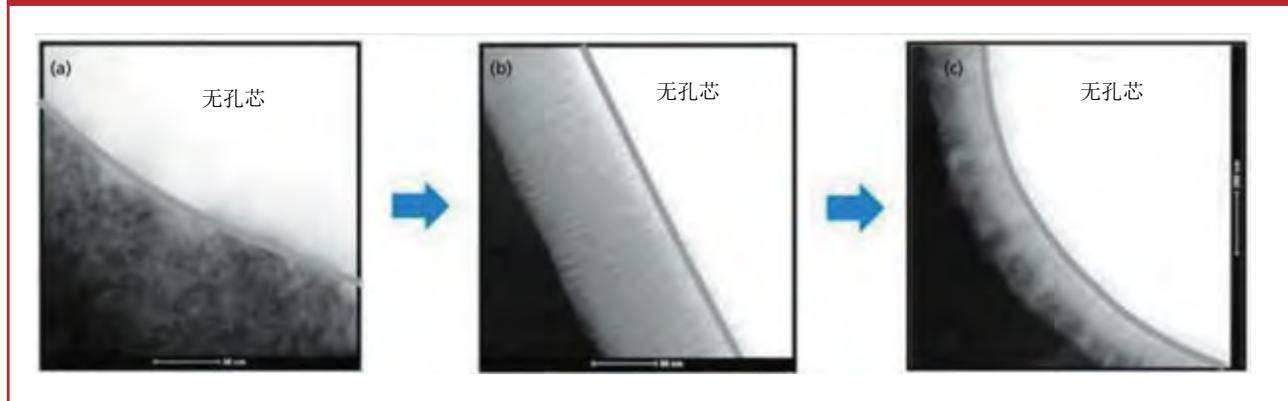
与之前的HPLC评论文章 (1, 2) 类似, 与会的几位同事被要求就他们在研讨会上观察到的最有趣的主题发表自己的见解。接下来的大部分内容是他们的回复和一些个人观点的概要。在回顾过去几次研讨会中的亮点时, 我发现了多个受关注的领域, 即3D打印、大分子分离技术的进展、多维分离以及手性和亲水相互作用色谱 (HILIC)。据报道, 3D打印技术在2017年有所下降; 但是, 在2018年的研讨会上, 关于3D打印的发展问题再次受到了广泛讨论。对于大分子分离的关注度似乎比往年更高, 这也许是因为整个会议都关注药物分析。在今天的研讨会上继续提出了关于HILIC和手性色谱法的进展, 关于有望提高速度、产生更高通量和增加选择性的普遍主题继续推动着研讨会上的讨论。正如会议题目所示——高效液相分离及相关技术国际研讨会——液相色谱法不是研讨会上讨论的唯一分离技术。与许多之前的研讨会类似, 会议

通常会表现出其主持人的个性特点。因此, 毫不意外, 电泳疗法 (CE) 是2018年HPLC会议上的重要话题。有几个研讨话题侧重于CE, 而大部分讨论则集中在生物分子分离上。

大分子分离技术的进展

大分子的特性描述需要用到各种不同的色谱分子方法, 包括反相、离子交换、体积排阻和疏水作用色谱。2018年的HPLC会议包括许多关于技术的演讲, 这些演讲探讨了大分子分离的不同方面。Matthew Lauber提出了一个旨在提高目标大分子 (例如, 单克隆抗体 (mAbs) 和抗体药物复合物 (ADC)) 的效率和分离度的新聚苯色谱柱 (3)。Lauber表示, 新的色谱柱化学能够使用比现有色谱柱浓度更低的离子对试剂并在更低的温度下实现mAb和ADC的分离, 从而最大限度地降低生物治疗药物的柱上降解。对“蛋白质更友好”的反相色谱被认为是刚性苯基部分的高表面覆盖度的结果, 这阻止了分析物进入底层的碱性二氧化硅颗粒。

图1: 表面多孔颗粒技术的进展。(a) 传统SPP; (b) 第一代假形相转换SPP; (c) 第二代假形相转换SPP



表面多孔颗粒 (SPP) 技术继续被用于大分子分离。Barry Boyes将C4、C18和基于1000-Å SPP的新型二苯固定相结合, 开发了mAbs和ADC结构正确分配的方法(4)。

大分子分离的选择性转变会受到流动相以及替代表面化学和颗粒技术的影响。Kevin Schug证实了流动相组分和pH值的变化如何引起不同的蛋白质构象, 从而影响仪器与固定相之间的替代相互作用(5)。该方法可能对完整蛋白质的多维分离领域产生重要影响。

人们通常使用传统的小分子探针和系统用于大分子分离的色谱柱进行表征。Jennifer Field针对大分子反相色谱柱的色谱柱表征协议开发做了一个有趣的演讲(6)。Field及其同事开发了一系列肽探针和创造一系列条件来表征几种市售的宽孔隙反相色谱柱。Field的方案可能会产生对大分子分离科学家来说比以前更有用的色谱柱表征信息。

离子交换色谱(IEX)、体积排除色谱(SEC)和疏水作用色谱(HIC)都提供了与反相分离互补的重要分离能力。但是, 这些技术中通常使用的高盐含量妨碍了使用质谱(MS)

进行检测。Bones提出了使用能够将这些色谱分析方式与MS直接结合的新型低盐流动相通过离子交换-MS和SEC-MS, 分析mAbs的电荷变体和聚集体(7)。该研究证明了使用常规IEX和SEC方法鉴定可能遗漏的独特C-末端赖氨酸变体和mAb片段的能力。

HIC是根据分析物的表面疏水性对其进行分离的常用非变性技术。与IEX色谱分析法类似, 传统上使用非挥发性盐缓冲液进行HIC防止了与MS的直接结合。Bifan Chen报告了一种基于醋酸铵和一些有机溶剂将固定相材料与挥发性流动相结合的新方法(8)。通过对完整蛋白质的分析以及最近对mAbs的分析证明了所得的HIC-MS方法。据作者们所述, 质谱图以天然结构的蛋白质为特点, 主要特点是低电荷状态。对于mAbs, 通过使用HIC-MS方法可以快速测定相对疏水性、完整质量和糖基化谱以及在线配置中互补性决定区的序列和结构表征。对于ADC, 由于分子的脆性, 因此不能直接使用相同的方法和条件。方法开发成为产生药物-抗体比(DAR)零变体的足够保留之间的平衡点, 但不是通过固定相或有机溶剂使高DAR种类(DAR6

和DAR8)变性。通过使用ADC类似物, 总离子色谱图和质谱表明成功分离出了不同的DAR种类, 更重要的是, 这些DAR种类在色谱分析期间保持完整。该小组表示, 他们计划很快将他们关于ADC分析的手稿提交发表。

先进的液相色谱技术

关于颗粒设计的发展继续成为HPLC研讨会的亮点。Ta-Chen Wei做了关于“双孔”结构SPP合成的演讲(9)。在2015年, 该团队通过称之为假形相转换(PMT)的工艺推出了带有有序延长孔的新SPP(10), 并随后证明这一新型颗粒在小分子分离中比传统SPP节省了18-30%的效率(11)。效率的提高是由于从有序孔隙结构的各向异性扩散导致B项大幅减少。在2018年的HPLC会议上, Wei提出了在单一颗粒上带有双孔结构的第二代PMT材料(9)。内部区域具有用于小分子分离的有序细长孔, 外部区域带有用于大分子分离的大型锥形孔。因此, 使用新型双孔SPP填充的单一色谱柱可用于小分子和大分子分离。此外, 这些色谱柱在初步研究中表现出比现有常规SPP更高的效率和分辨率。图1描述了PMT颗粒技术的发展。

图2: 按照会议主题分类的海报数量细目。

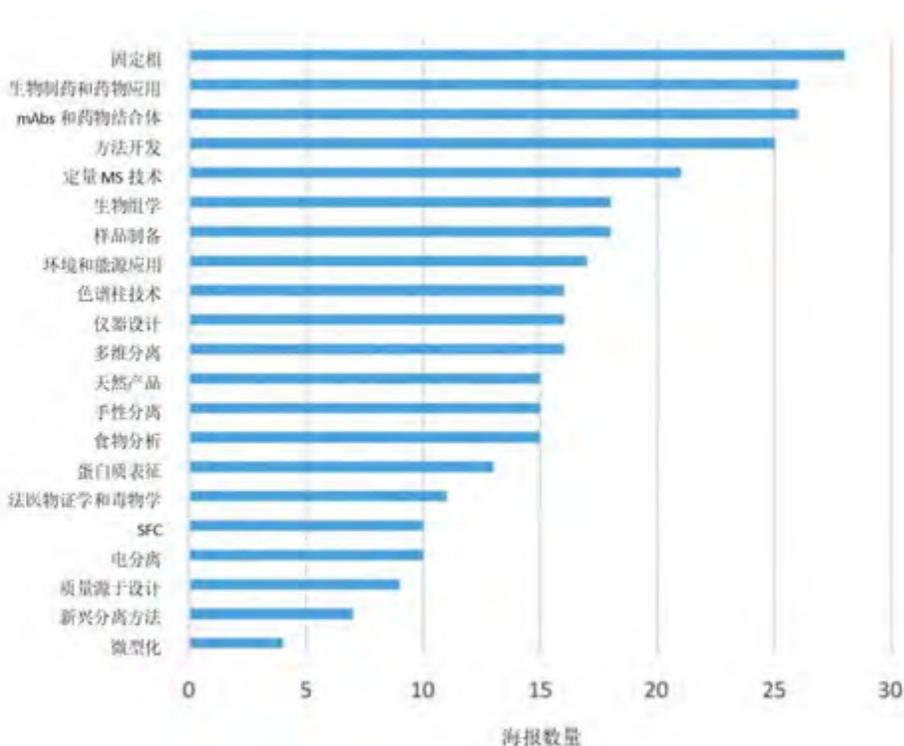


表1: 2012年以来海报和会议主题概览

会议	海报数量	主题数量
HPLC 2018: 华盛顿特区	336	21
HPLC 2017: 布拉格	656	55
HPLC 2016: 旧金山	273	24
HPLC 2015: 日内瓦	560	27
HPLC 2014: 新奥尔良	425	25
HPLC 2013: 阿姆斯特丹	945	36
HPLC 2012: 阿纳海姆	443	19

在HPLC会议上, 对速度的追求一直存在。值得一提的是Dan Armstrong的演讲“超快LC和SFC的实践和分枝”(12)。该演讲的中心思想是, 由于快速色谱(使用适当的色谱柱)和峰处理相结合, 对于分析色谱的现有做法将很快被淘汰。Armstrong认为, 通过在全速超快模式下实施HPLC, 并使用超过其峰值容量的

色谱柱以及适当的峰处理和分离度增强方法, 可以在不到60秒的时间内获得100个基线或近基线峰值。此外, Armstrong预测, 使用该方法进行鉴定(通过保留时间)和定量(通过峰面积测量)将可比拟, 甚至优于今天典型的最佳实践分离。将加强峰处理与快速LC相结合可以发挥强大的作用。Armstrong继续指出, 数十

年来, 光谱学一直在利用先进的处理技术, 而色谱学则落后于形势, 但是当分离学迎头赶上, 结果将会是引人注目且深远的。

James Grinias做了一次关于将标准方法转变为超高效液相色谱(UHPLC)系统的演讲(13)。Grinias研究了循环热梯度对保留时间再现性的影响。由于梯度色谱中的压力循环, 可变粘性加热造成了色谱柱的温度循环。这一影响可描述为其中前几个梯度与最后一个梯度不同的启动效应。通过Grinias团队发表的作品, 我们可以了解到更多细节(14)。Grinias接着讨论了在药典方法的现代化中将HPLC法转换为UHPLC法。Grinias总结说, 利用SPP技术的现代UHPLC仪器和色谱柱可以大大提高基于专著方法的药物分析的通量。

表2: 最佳海报奖

奖项	标题	姓名
一等奖	在基因组植物细胞提取中用于DNA测量的新型基于距离的纸张设备	Boonta Chutvirasakul
二等奖	开发噬菌体细胞内溶素作为多重耐药菌感染的新疗法	Sarah Gao
三等奖	揭露在离子色谱法中为获得单价和多价有机酸而控制共价键阴离子交换剂的选择性的方法	Aleksandra Zatirakha
荣誉奖	液相色谱作为在线样品制备技术与具有双重检测的全二维气相色谱相结合用于分析唇部化妆品中矿物油与合成碳氢化合物	Mariosimone Zoccali
荣誉奖	使用高效亲和色谱法分析药物与 α 1-酸性糖蛋白的相互作用	Kyungah Suh
荣誉奖	药物分析中的HILIC方法开发	Dennis Asberg
荣誉奖	关于在疏水作用色谱中工作温度对蛋白质保留影响的评判性调查	Michael Menz
荣誉奖	本征反相液相色谱法: 一项关于抗体-药物结合体LC-MS的技术	Tse-Hong Chen
荣誉奖	在人类乳腺癌培养细胞中改变L和D氨基酸谱与新陈代谢	Siqi Du
荣誉奖	优化与验证在线超临界流体萃取(超临界流体色谱)关于土壤中多环芳族碳氢化合物的质谱分析的系统性方法	Alison Paige Wicker

微型化始终是液相色谱研究的一个热点。Milton Lee (15) 和 Luke Tolley (16) 关于微型高效LC仪器的介绍被许多与会者视为一大亮点。两次演讲都侧重于介绍一家名为Axcend的公司开发的新微型化LC仪器的巨大前景。在Lee的演讲中, 一个有趣的地方就是, 仪器的移动性在实验室中可能与远程使用一样有用。

在使用微型设备的亮点中, Qun Fang介绍了使用基于水滴的微流体技术进行单细胞分析(17)。Fang与其同事开发了一种可以在微孔板上采样和加载不同溶液的装置。作为该系统应用的一个例子, Fang展示了易于与蛋白质结合的 μ RNA种类的纯化和检测。为了从样品中去除蛋白质, 在进行纳米LC-MS检测之前, Fang进行了“液滴”胰蛋白酶消化, 以便分解和去除 μ RNA中的蛋白质。该团队计划使用毛细管电泳-质谱仪(CE-MS)

进一步开发该系统。

另一个值得注意的亮点是Attila Felinger发表的题为“逆流液相色谱”的演讲(18)。Felingner描述了一种在流动停止后分析物仍留在色谱柱中的技术。然后, 他们通过物理旋转色谱柱或使用阀门系统来逆转流体。该技术使研究人员能够研究熔块的谱带增宽, 理解横柱色散效应并检查柱段是否存在缺陷。有趣的是, 人们发现色谱柱的中心比两端的任何一端都更有效率。

关于3D打印色谱柱的话题在2018年的HPLC大会上再次引起了热烈讨论。人们讨论最热烈的是Simone Dimartino做的两次演讲, 其中一次演讲是教程演示(19, 20)。Dimartino描述了使用具有所需功能的单体构建色谱柱, 而不是使用后期打印化学技术来改变选择性。虽然打印的色谱柱仍然不能产生像现代柱床填

装良好的色谱柱那样高的效率, 但这项技术正在迅速发展。除用于打印色谱柱, 3D打印也被证实可用于设备优化。Theodora Adamopolou在其发表的演讲中展示了使用计算机生成的3D打印设备辅助多维分离(21)。

HILIC和手性分离

HILIC再次成为HPLC会议上的热门话题。再次排在首位的是Andrew Alpert, 他发表了关于在为磷酸化多肽开发HILIC或静电排斥亲水作用色谱(ERLIC)法时选择盐的重要性(22)。Alpert例举了选择阳离子和阴离子引起磷酸肽选择性差异的例子。阳离子的含水率越高, 带负电的磷酸肽的保留率就越高。Alpert还证明了基于盐类型的水-有机物边界上多肽类的分子重取向。该信息可用于涉及糖肽和磷酸化程度不同

的完整蛋白质的应用。Jonathan Shackman发表了第二个引起关注的HILIC演讲。他的题为“HILIC的拯救：药物开发案例”表明，当反相LC等传统方法无法提供确切结果时，HILIC可以成为一种针对小分子药物的有用及可靠的技术（23）。

在HPLC会议上，与会者再次讨论了手性分离技术的发展。Ravindra Hegade提出使用固相优化选择性或固定相耦合作为在LC和超临界色谱（SFC）中开发手性分离的方法（24）。另一个亮点是，Csaba Horváth青年科学家奖得主Martina Catani讨论了传质现象和现代多孔颗粒对于实现高效手性化合物分离的热力学特性（25）。该演讲的一个有趣的地方就是，人们在反相分离中观察到的SPP颗粒较之于多孔颗粒的优势在手性系统研究中并不明显。

海报讨论会的亮点

如往年一样，2018年HPLC的海报讨论会是整个研讨会的一个重要部分。21个讨论会主题共涉及336张海报。与2016年在旧金山举行的HPLC会议相比（这是最后一次在美国举行的会议），会议上展示的海报数量增加了25%。

每个类别的海报数量分布相当均匀。图2给出了在每个讨论会主题下海报数量的细目。就张贴的海报数量而言，四个最受欢迎的海报讨论会主题是固定相、方法开发、生物制药应用和单克隆抗体的表征、药物结合体和其他基于蛋白质的药物；这一排名反

映了今年会议上的口头报告主题以及在LC市场上的整体发展方向。固定相和方法开发主题的受欢迎表明，目前还需继续改进和开发新的分离介质与分析技术。在这两个主题与几个其他讨论会主题中关于HILIC分离的海报越来越多，这些海报的内容涉及理解和为难以在反相色谱柱中保留的大量极性分子开发HILIC方法。其中一个在海报奖项比赛中获得荣誉奖的海报是Dennis Asberg的“药物分析中的HILIC方法开发”。Asberg概述了一个全面的HILIC方法开发策略，以优化亲水药用化合物的分析。

21个海报讨论会主题被分成6个不同的展示环节，在周一、周二和周三分别展示两个。在周四上午，入围海报奖的选手再次展示了他们的作品。由国际科学家组成的评委会根据科学贡献、作品的原创性、作品的完整度、实验或理论执行的质量以及海报的易读性和呈现对入围的海报进行评估。由安捷伦科技公司赞助的最佳海报奖在大会闭幕式上颁发。表2中列出了获得前三名和荣誉奖的海报。

结论

2018的HPLC大会是一个组织良好、生动活泼的研讨会，它吸引了全球对分析科学感兴趣的研究人员。许多最新趋势持续到了2018年。色谱柱和设备的3D打印进展是显而易见的。此外，人们似乎对新型大分子分离技术也产生了浓厚的兴趣。通过会议的活动可以清楚地看出，关于分离科学的研究是充满活力的。

鸣谢

如果没有获得大量帮助，想要报道如此大规模的研讨会是不可能的。作者感谢Andrew Alpert、Robert Kennedy、Xiaoning Lu、Daniel Shollenberger、Ken Broeckhoven、Ta-Chen Wei、Matthew Lauber、Mariosimone Zoccali 和 Daniel Armstrong 的鼎力相助，他们提供了关于各个讨论会内容的笔记、文本、见解、图片以及富有成效的讨论。

参考文献

- (1) D.S. Bell, LCGC 欧洲 30(4), 196–207 (2017).
- (2) D.S. Bell, LCGC 欧洲 29(9), 506–515 (2016).
- (3) M. Lauber, J. Nguyen, S. Rzewuski, D. Walsh, J. Cook, M. DeLoffi, G. Izzo 和 Y. Xu, “一种新型苯基RPLC固定相，用于蛋白质治疗的高通量、高分辨率表征”，发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会，美国华盛顿特区（2018年）。
- (4) B. Boyes, B. Libert, S. Schuster, B. Wagner, C. McHale, W. Miles, M. Schure 和 J. Lawhorn, “使用高性能大孔表面多孔颗粒操纵蛋白质变异分离”，发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会，美国华盛顿特区（2018年）。
- (5) K. Schug 和 Y. Baghdady, “改变质谱中的选择性 - 完整蛋白质的相容性反相分离”，发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会，美国华盛顿特区（2018年）。
- (6) J. Field, P. Petersson 和 M. Euerby, “肽分离系统的表征：基于肽探针的柱表征协议的开发”，发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会，美国华盛顿特区（2018年）。
- (7) F. Fuessler, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler 和 J. Bones, “使用高分辨率原始LC-MS把生物制药作为完整实体进行质量分析”，发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会，美国华盛顿特区（2018年）。

- (8) A. Alpert, Y. Ge, B. Chen 和 Z. Lin, “完整单克隆抗体和抗体 - 药物偶联物的HIC-MS”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (9) T.C. Wei, “多合一HPLC色谱柱: 具有双孔结构的表面多孔颗粒的合成”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (10) D.S. Bell, X. Wang 和 R.E. Majors, LCGC 欧洲 28(9), 500-505 (2015)。
- (11) T.C. Wei等人, 色谱杂志A辑 1440, 55-65 (2016)。
- (12) D.W. Armstrong, “超快速LC和SFC的实践与分析”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (13) J. Grinias, “不断增加药典专著数量”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (14) J.P. Grinias, J.M.T. Wong 和 R.T. Kennedy, 色谱杂志A辑 1461, 42-50 (2016)。
- (15) X. Xie, L. Patil, L. Tolley, P. Farnsworth, D. Tolley 和 M. Lee, “使用串行色谱柱和检测器的纳米液相色谱”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (16) L. Tolley, X. Xie, T. Truong, L. Patil, P. Farnsworth, H.D. Tolley 和 M. Lee, “便携式纳米液相色谱快速分析”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (17) Q. Fang, Z. Li, X. Guo, M. Huang, X. Wang, Y. Zhu, J. Li 和 C.C.L. Wong, “单细胞微流控技术分析”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (18) A. Felinger, “反向流动液相色谱”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (19) S. Dimartino, “分离科学中的3D打印”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (20) S. Dimartino, “3D打印您的专属色谱柱”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (21) T. Adamopoulou, S. Deridder, S. Nawada, G. Desmet 和 P.J. Schoenmakers, “创建基于计算洞察力的多维分离设备”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (22) A. Alpert, “盐选择使磷酸肽和糖肽的选择性显著提高”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (23) J. Shackman, “HILIC急救: 药物开发案例”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (24) R. Hegade, M. De Beer, and F. Lynen, “固定相优化选择性液-超临界流体色谱法(SOS-LC和SOSSFC)提高立体异构体的分辨率”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。
- (25) M. Catani, O.H. Ismail, S. Felletti, C. De Luca, M. Morbidelli, F. Gasparri 和 A. Cavazzini, “新一代多孔粒子超速高效复合物的传质现象及热力学性质研究”, 发表于第47届高性能液相分离及相关技术国际研讨会, 美国华盛顿特区 (2018年)。

已在几家商业杂志上发表了他的研究文章, 并在许多会议上发表了关于他的研究的口头和海报演讲。

Connor Flannery 是宾夕法尼亚州贝尔丰特市Restek公司中HPLC研发团队的产品开发化学家。Connor拥有化学学士学位, 2014年加入Restek。Connor在Restek的工作主要是新固定相和色谱柱填充技术的开发与表征。

David S. Bell 是Restek公司的研发总监。他还是LCGC的编辑顾问委员会成员和“观察专栏”编辑。在过去20年中, 他一直从事色谱行业, 致力于色谱固定相的设计、开发和应用, 以促进气相色谱、液相色谱及相关联用技术的发展。他在纽约州立大学普拉茨堡分校(SUNY Plattsburgh)完成了化学本科学业。他在宾夕法尼亚州立大学获得了分析化学博士学位。在制药行业工作的前十年, 他使用各种形式的色谱法和电泳法进行分析方法开发与验证。其主要目标是创造和推广新的分离技术, 并研究在一系列色谱过程中有助于保留和选择性的分子相互作用。他的研究成果在世界各地的研讨会上发表, 并引致许多同行评议杂志和行业杂志文章的出现。直邮地址: LCGCedit@ubm.com

Cory E. Muraco 是美国宾夕法尼亚州贝尔丰特市MilliporeSigma公司中液体分离研发团队的高级研发科学家。Cory于2013年在扬斯敦州立大学完成了他的研究生学业, 主要研究氧化蛋白的分析和表征。毕业后, Cory进入MilliporeSigma公司, 首先加入了化学标准研发组, 然后转入了液体分离研发组。Cory目前在MilliporeSigma公司的职责是研究、开发和展示新的粒子技术以改进小分子和大分子的色谱分离, 并开发通过多种色谱模式表征生物大分子的新方法; Cory

蒸汽系统

六工位蒸发站mVAP可在用户定义的温度和真空下实现全自动样品浓缩。经SPE或液-液萃取后，mVAP可使溶剂挥发，包括变更为兼容的溶剂，以实现最佳的色谱分析和质谱电离。据公司介绍，该蒸汽系统显著提高了监测极限。向GC-MS或LC-MS系统的进样是全自动的。



www.gerstel.com

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

等度泵

Verity 3011等度泵是在石油应用中用于化学反应监测和凝胶渗透色谱(GPC)的液体输送解决方案。据公司介绍，该等度泵具有高精度，可为各种液体提供几乎无脉冲且稳定的溶剂流量，包括高粘度溶剂，并可使流速从0.010 mL/min升至10 mL/min，并使压力达到最高600巴。



www.gilsonuk.com/verity-3011-isocratic-pump.html

美国威斯康星州米德尔顿Gilson

FID加气站

据公司所述，VICI FID加气站将VICI DBS氢气和零级空气发生器的稳定性与紧凑而方便的包装结合在一起。

适用于所有GC检测器和运载气体应用的高纯度及超高纯度。发生器有两种类型：用在GC下的扁平式；或塔式。H₂流速高达1 L/min，压力可达10.5巴。

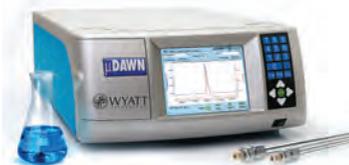


www.vicidsbs.com

瑞士Schenkon, VICI AG International

MALS检测器

据公司介绍，μDAWN是世界上首个可以与任何UHPLC系统连接以便直接测定绝对分子量和聚合物、多肽类和蛋白质或其他生物聚合物而无需采用色谱柱校准或参考标准的多角度光散射(MALS)检测器。据报道，WyattQELS动态光散射(DLS)模块可以“即时”测量流体动力学半径，扩展了μDAWN的多功能性。



www.wyatt.com

美国加利福尼亚州圣巴巴拉Wyatt Technology

置物架

为了安全存放他们的人体工学和电子卷边工具，Macherey-Nagel公司提供了一个耐化学药品的泡沫货架。据公司所述，卷边工具组织良好，并在机架中得到了良好保护。货架完善了药水瓶、瓶盖和气相层析仪配件的范围。



www.mn-net.com

德国杜伦Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

快速GC工具包

据公司介绍，GC加速器工具包在设计时考虑到了GC-MS使用者的需求，提供了一种加速样品分析的简单途径。通过降低炉体积，这些插件可以实现更快的斜坡速率，这降低了炉循环时间并提高了样品处理量和容量，从而能够处理样片。当提高了斜坡速率时，使用Restek的EZGC方法转换器，现有方法可以精确地缩小到更小、更高效及窄孔色谱柱。



www.restek.com/catalog/view/52293/23849

美国宾夕法尼亚贝利方特Restek Corporation

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

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

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，数据采集界面的广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DataApe

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11L/min到432L/min的氮气变流速，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Peak Scientific Instruments Ltd

圆二色性微型板

波富尔科技有限公司推出了一种新型黑水晶紫外石英基底微型板，该微型板能够提供波长范围为185nm至1100 nm的光传输，从而使其成为实验室对圆二色性（CD）进行测量的理想仪器。利用下一代光谱仪，该微型板允许在一个方便的ANSI/SLAS兼容96-或者384-孔的微型板足迹上进行测量。特有的黑色聚苯乙烯混合物确保了较低的串扰，同时，高质量的石英底部降低了进行良好圆二色性（CD）测量所必需的双折射。



www.porvair-sciences.com/krystal-uv-transparent
英国雷克瑟姆Porvair Sciences Ltd.

The FFF - MALS Platform

Next Level Nano, Bio and Polymer Analysis



POSTNOVA

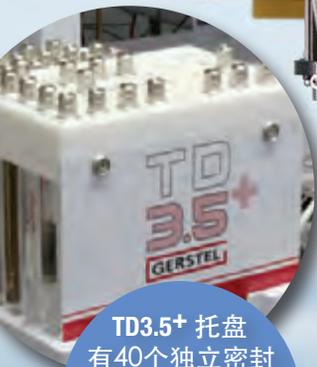
**NEW
With SEC Option!**



NovaFFF Software

MALS	DLS	UV	RI	ICP-MS

Contact us for more information: www.postnova.com

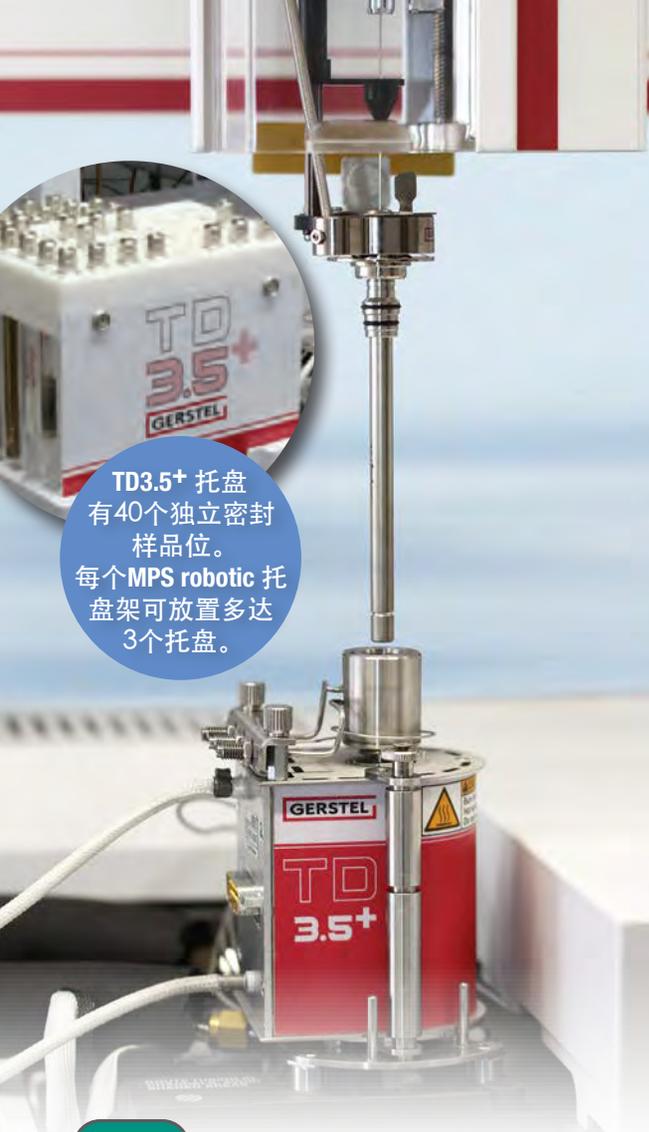


TD3.5+ 托盘
有40个独立密封样品位。
每个MPS robotic 托盘架可放置多达3个托盘。



自动化微仓

DHS large 3.5+，材料释放检测的自动化系统。样品可放置于容积直达1L的微仓中。分析物被3.5英寸的吸附管在用户自定义的时间内收集，然后通过TD3.5+热脱附



新 TD 3.5+

- 使用3.5英寸的热脱附管
- GERSTEL Plus 管，满足最大的回收率
- 无阀，无传输线，使用高度惰性材料
- 无分析物损失，无残留
- 可升级为自动化微仓（DHS L 3.5+）
- 高效，灵活的MPS自动进样器，可实现
- 全自动标样置备（TSS）
- 只需通过鼠标点来实现方法设置，包括GC/MS方法

全世界领先试验室的上千用户信赖并依靠我们的TD热脱附解决方案，我们为其提供更多的可能性。

我们能够为您做些什么？



Agilent Technologies
Premier Solution Partner



www.gerstel.cn