

LC|GC

2018年8月9日

第21卷第3期

www.chromatographyonline.com

亚太地区 分离科学家解决方案

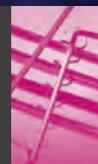
液相色谱中的表面多孔颗粒

我们何时需要使用亚2- μm 颗粒？

同行评审文章
LC在植物分析中的基
础作用

LC故障排查
生物分子分离的疑
难解答

GC连接
如何最大限度地利
用进样口？

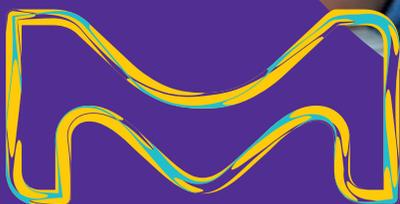


Feel good in your method development?

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8月/9月

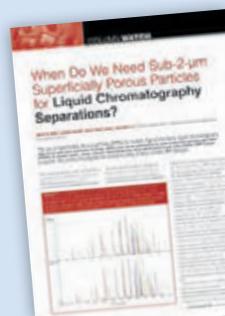
第21卷第3期

封面文章

28 观察专栏

在液相色谱分离中我们何时需要亚2 μm 表面多孔颗粒?

David S. Bell、Landon Wiest、Shun-Hsin Liang和Dan Li 在现代高效液相色谱法 (HPLC) 中使用表面多孔颗粒 (SPP) 如今已经非常常见。表面多孔颗粒最初用作亚2 μm 全多孔颗粒 (FPP) 的替代产品。近年来, 许多色谱柱制造商开发出使用粒径小于等于2 μm 颗粒的产品。本文章探讨了这些小粒径表面多孔颗粒设计的实用性。



特色

8 用于分析植物和植物性食物中酚类化合物的液相色谱及毛细管电迁移技术的基本与实践方面 (第1部分): 液相色谱法

Danilo Corradini、Francesca Orsini、Laura De Gara和Isabella Nicoletti 本文是由两部分组成的评论文章的第一部分, 该文章探讨了植物性食物和食用与药用植物中酚类化合物分析用液相色谱 (LC) 及毛细管电迁移技术的基本与实践方面。第一部分重点讨论液相色谱法。

专栏

16 LC故障排查

生物分子分离的秘诀、技巧和故障排查, 第1部分: 当代反相蛋白凝胶 Szabolcs Fekete、Davy Guillarme和Dwight R. Stoll

近年来出现了几种用于蛋白质反相分离的新材料和色谱柱。我如何知道选择哪一种, 以及哪种分离条件最适合我的蛋白质分离呢?

GC连接

22 分流、不分流与其他——充分利用进样口

Nicholas H. Snow

分流和不分流进样存在一些众所周知的以及一些不为人知的挑战, 这主要是由于进样口的加热使得样品进样与进样口成为气相色谱仪的主要障碍。

部门

31 产品

32 应用说明

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: bonandbon/shutterstock.com

ASPEC® 正压固相萃取仪

使您的实验工作更轻松

全新的ASPEC®正压固相萃取仪是一台多功能固相萃取仪，可以兼容固相萃取柱和固相萃取板。

- 可重现的萃取结果
- 平行化的样品处理
- 轻松地配置和操作



www.gilson.com/aspecppm
www.gilsoncn.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

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

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

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

特殊项目执行编辑 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
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

在线订阅, 网址:
www.chromatographyonline.com

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。如想取消订阅或订阅过期刊物, 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。
联系方式: 电话: +44 (0) 151 353 3500。
再版: 本刊在本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, 不能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。



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境药理学系

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 Felinger
匈牙利佩奇市佩奇大学, 分析和环境化学系, 化学教授

Francesco Gasparini
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达制药
Davy Guillaume
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 VTT 技术研究院

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

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
Debbie 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



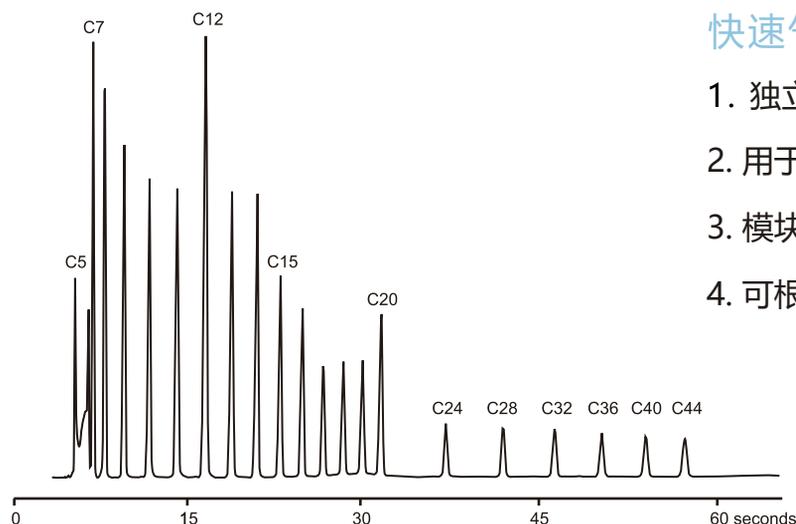
欢迎加入 LCGC 领英团队

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。

快速气相色谱的所有部件都在此

模拟蒸馏分析



快速气相色谱选配件

1. 独立的、可拆卸部件
2. 用于升级或者开发气相色谱的成套配件
3. 模块化设计
4. 可根据需求定制

温度均衡，不在有冷或热点。同时程序控温所有的部件。

快速气相色谱部件

VICI快速温度程序控制模块

四个独立的程序温度控制区
升温速率高达2500摄氏度/分钟
0.1摄氏度准确度，1摄氏度的升温速率

VICI传热线

任何形状的都可以做，长度可以达到1米
使用低质量的40英寸“K”热电偶作为温度传感器

VICI色谱柱

适合于熔融石英色谱柱、金属色谱柱或者是填充柱
1米长/100微米内径的色谱柱到30米长/530微米的色谱柱

VICI排风扇模块

高流速的风扇可供选择 60mm, 92mm和120mm
有12V, 24V和48V电压可供选择
风扇可以带支架或者不带支架、90度的支架可以直接安装风扇模块在气相色谱壁上。



VICI[®]
VICI AG International

请参观我们网站 www.vici.com/fast-gc 获取更多的信息。

植物和植物性食物中酚类化合物分析用液相色谱及毛细管电迁移技术的基本与实践方面（第1部分）：液相色谱法

Danilo Corradini¹、Francesca Orsini^{1,2}、Laura De Gara² 和 Isabella Nicoletti¹，¹意大利罗马蒙特罗通多 della Ricerca di Roma 区域化学方法研究所 CNR；²意大利罗马生技医疗大学食品科学与营养学系

基于色谱柱的液相分离技术，例如在反相分离模式下的液相色谱法（LC）和使用连续电解液系统的毛细管电迁移技术，被广泛用于植物和植物来源食物机制的酚类化合物鉴定与量化中。本文是由两部分组成的评论文章的第一部分，该文章探讨了植物性食物和食用与药用植物中酚类化合物分析用液相色谱（LC）及毛细管电迁移技术的基本与实践方面。同时，文章也讨论了食物王国中主要酚类化合物的化学结构与分布以及用于该等化合物的萃取和样品制备的主要方法。第1部分将重点关注液相色谱法。

植物次生代谢物，也被称为特殊代谢物，是与主要的生物合成和代谢路线一起产生的有机化合物，被认为主要是由于植物与环境的相互作用而产生的。

这些化合物保护植物免受生物和非生物胁迫，包括病原体、捕食者、紫外线和干旱（1）。此外，次生代谢物可赋予食物特定的感官特征，在食用植物和植物源食物的防病保健方面中发挥重要作用（2-5）。植物次生代谢物根据其生物合成来源通常分为三大类：萜类、生物碱和酚类化合物，其中酚类化合物是植物王国中最重要且分布最广的次生代谢物（6）。

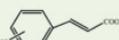
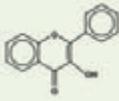
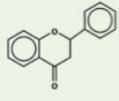
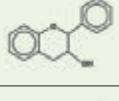
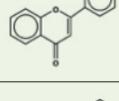
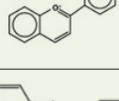
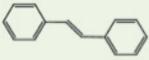
酚类化合物是人类饮食中不可或缺的一部分，促成了食品感官特性和地中海饮食对人类健康的有益影响，这主要归功于它们的抗氧化特性（7）。这些化合物以及许多其他植物次生代谢物在药用植物中作为生物活性

成份也发挥了重要作用，并且对慢性和退化性人类疾病具有多种生物活性和多种健康益处（8）。

要点

- 本文讨论了用于植物和植物源食品基质中酚类化合物鉴定与量化的主要分离模式。
- 文章的第1部分也简要描述了食物王国中主要酚类化合物的化学结构与分布以及用于该等化合物的萃取及样品制备的主要方法。
- 使用HPLC或UHPLC色谱柱的反相色谱法是酚类化合物分析的首选技术。
- HILIC是反相色谱的有效替代方法，也是在酚类化合物的多维色谱中使用的主要分离模式。

表1: 植物酚类化合物的主要分类

酚酸 (C ₆ -C ₁)(C ₆ -C ₃)	羟基苯甲酸衍生物	
	羟基肉桂酸衍生物	
黄酮类 (C ₆ -C ₃ -C ₆)	黄酮醇类	
	黄烷酮类	
	黄烷醇 (或黄烷-3-醇)	
	黄酮类	
	花青素	
芪类 (C ₆ -C ₂ -C ₆)	反式白藜芦醇衍生物	

植物和植物来源食物中酚类化合物含量测定的重要步骤就是样品制备与萃取, 然后使用各种不同的仪器分析方法进行鉴定和量化, 其中大部分方法是使用高效液相分离技术与合适的检测方法相结合。在传统情况下, 人们使用基于福林-乔卡梯奥反应的分光光度法测定总酚类化合物(9), 在该方法中通过磷钨酸盐和磷钼酸盐氧化滴定酚盐阴离子产生了有色产物。在仪器分析技术的基础上, 需要使用更为复杂的方法来鉴定和量化给定样品中存在的每种主要酚类化合物。其中, 液相色谱(LC), 通常采用反相分离模式, 是首选技术, 而毛细管电泳(CE)由于其高分离效率、较短的分析时间以及极低的样品和试剂体积要求而获得了越来越多的认可。

本文是由两部分组成的评论文章的第一部分, 旨在讨论食用和药用植物以及植物来源的食品与膳食补充剂中酚类化合物分析用LC和毛细管电迁移技术的基本与实践方面。第1部分将重点关注这些化合物的液相色谱法和主要酚类化合物的化学结构与分布, 以及在样品制备及萃取中使用的主要方法。

主要酚类化合物

酚类化合物, 也称为酚类, 包含从简单分子到高度聚合化合物不等的大量异质结构, 这些化合物通常与其他分子(经常是糖)结合, 尽管酚类物质也会以游离形态出现。在这些糖基化的酚类化合物中, 可以发现C糖基化和O糖基化。酚类物质的一个常见结构特点就是至少存在一个羟基取代的芳环。根据芳环的数量、将这些芳环连在一起的结构元素以及与芳环相连的取代基, 通常将酚类物质分为不同的亚类(见表1)。

最简单的酚类物质是酚酸, 酚酸可分为苯甲酸和肉桂酸衍生物, 其基本的碳骨架分子分别是C₆-C₁和C₆-C₃。其他主要的酚类化合物包括碳骨架分子为C₆-C₃-C₆的黄酮类, 大量非黄酮酚类化合物的碳骨架分子为C₆-C₂-C₆(芪类, 葱醌类)、(C₆-C₃-C₆)_n(凝缩类丹宁)、(C₆-C₃)₂(木酚素)、(C₆-C₃)_n(木质素)、C₆-C₄(萜醌类)和C₆-C₁-C₆(氧杂葱醌), 在这里我们仅列举了几个主要的亚类。

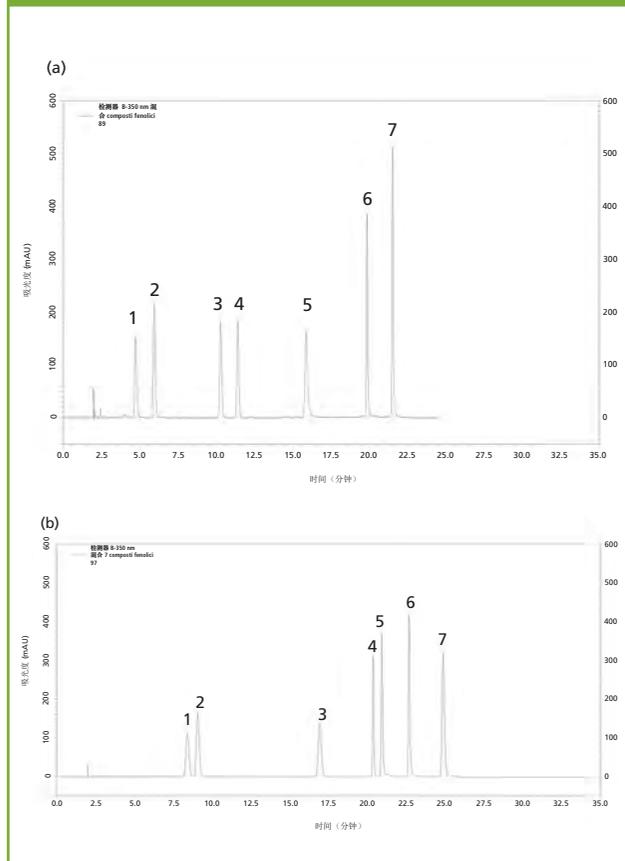
黄酮类是最大的酚类化合物, 分布在结构上成分不同的几个亚类中。这些化合物的分类由C₆-C₃-C₆结构中存在的三碳原子基团决定。一些研究报告称, 类黄酮对人类健康具有多种有益作用, 包括作为化学预防剂干预多种癌症机制的性质(10)。

最丰富且广泛分布的类黄酮亚类之一是黄酮醇, 它由槲皮黄酮、杨梅黄酮、山柰酚和非瑟素组成并存在于葡萄酒、洋葱、苹果和各种叶类蔬菜中。常见于植物和植物性食物与饮料中的黄烷酮类包括柚皮素、柚皮苷、芸香柚皮、橙皮苷和橙皮素。饮食中摄入大量黄烷酮可降低退化性和心血管疾病的风险(11)。

黄烷醇(或黄烷-3-醇)包括儿茶素和表儿茶素, 其可被羟基化形成没食子酰儿茶素, 并且是低聚和多聚原花青素的结构单元, 当它们仅由表儿茶素单元组成时称为原花青素。黄烷醇存在于葡萄酒、西兰花和其他食品中, 如可可、茶、豆类, 以及各种水果(如苹果、石榴、黑莓和红葡萄)中。

黄酮类广泛存在于许多药用植物、香料、水果和叶类蔬菜中。常见的黄酮类包括芹菜素、木犀草素及其糖基化形式、芹菜素-O-葡萄糖苷酸、芹菜素-O-葡萄糖苷和木犀草素-C-葡萄糖苷, 它们已被证明具有潜在的抗氧化和抗炎活性(12)。

图1: 标准酚类化合物的反相HPLC分离。色谱柱: 2.1 mm x 150 mm, 在含有0.1% (v/v) 甲酸的水中使用浓度呈线性递增的 (a) 乙腈或 (b) 甲醇洗脱的5- μ m Polaris C-18 (安捷伦科技公司); 流速: 0.2 mL/min。在280nm下的紫外检测。标准酚类化合物: 1.绿原酸; 2.咖啡酸; 3.阿魏酸; 4.芦丁; 5.杨梅酮; 6.槲皮素; 7.山柰酚 (个人数据)



花青素是在氧杂环化合物上带有正电荷的黄烺盐阳离子的糖基化衍生物, 氧杂环化合物由于共轭双键, 能够吸收可见光, 因此使许多水果和花卉表现出强烈的红橙色到蓝紫色。花青素 (也称为花色素) 的糖苷配基在自然界中更常见且具有饮食重要性, 包括花青素、飞燕草色素、矮牵牛素、芍药花青素、天竺葵色素和锦葵色素 (13)。黄酮类化合物的其他亚类包括查耳酮、橙酮、二氢查耳酮、异黄酮、新黄酮类和双黄酮 (7, 10)。

样品制备和萃取

食用植物和各种植物来源的加工食品与饮料是人类饮食中生物活性次级代谢物的主要来源。很多时候, 这些基质需要在萃取目标次级代谢物之前, 且在某些情况下也需要在萃取后 (样品净化和样品富集), 通过选择的样

品制备方法进行处理。样品的制备和目标化合物的萃取是获得准确分析数据与可靠解释其价值的关键步骤。上述过程的正确选择取决于样品基质的性质和目标次级代谢物的化学性质, 包括其分子结构与极性。其他需要考虑的因素是在样品制备、储存和萃取过程中目标化合物的化学稳定性, 以及它们在样品制备与萃取前经常清洗、研磨、干燥和均质化的基质中的浓度。

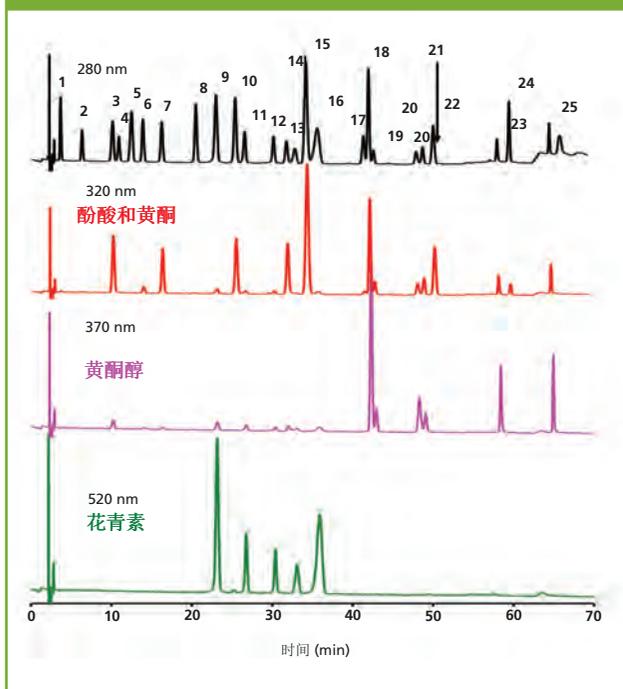
从大量植物物种和食物基质中萃取酚类物质是通过各种技术实现的, 包括使用溶剂、蒸汽或超临界流体 (14)。这些技术包括常规的固液萃取 (SLE) 法, 例如浸渍、浸提、浸透、水蒸馏、煎煮和回流沸腾 (索氏萃取法)。这些技术大多需要用到加热及混合, 非常麻烦、耗时并需要使用较多昂贵且有害的有机溶剂。此外, 它们的萃取率通常非常有限。

另一种特别适用于不耐热化合物的萃取技术是超临界流体萃取 (SFE) (15), 它可以在室温下操作并使用超临界流体, 如二氧化碳, 作为萃取介质。这种化合物以及所有超临界流体, 具有类似液体的密度和萃取能力, 以及类似气体的粘度、扩散和表面张力等特性, 使之能够渗透到样品基质中, 从而提高了萃取效率。然而, 二氧化碳是非极性的, 因此, 由于大多数酚类化合物具有极性, 通常将之与极性助溶剂 (如乙醇、乙酸乙酯或丙酮) 组合使用。在SFE (超声辅助SFE) 期间使用超声可以进一步提高萃取率。

其他最新的高效萃取技术包括超声辅助萃取 (UAE)、微波辅助萃取 (MAE)、酶辅助萃取 (EAE)、脉冲电场萃取 (PEF) 和加压液体萃取 (PLE)。少数现代萃取技术中得到了进一步发展, 例如MAE; 最近开发了高压MAE (HPMAE)、氮保护MAE (NPMMAE)、真空MAE (VMAE)、超声MAE (UMAE)、无溶剂MAE (SFMAE) 和动态MAE (DMAE) (16)。

传统上, 人们通过液-液萃取 (LLE) 和固相萃取 (SPE) 来去除潜在的干扰物 (样品净化) 并实现萃取样品中目标分析物的富集。随着小型化的到来, 这些方法已经逐步发展成各种微尺度萃取技术, 称为液-液微萃取 (LLME) 和固相微萃取 (SPME)。高分子量聚合酚类化合物或与高分子有关的个别低分子量酚类物质, 即所谓的不可萃取酚类物质 (NEP), 通常在进行酸、碱或酶水解以释放基质中的NEP后萃取。其他先进的净化方法使用液膜萃取 (LME)、吸管端SPE (PT-SPE)、分子印迹SPME (MI-SPME) 和微

图2: 从托雅葡萄果实中萃取的酚类化合物的反相HPLC分离与鉴定。色谱柱: 2.1 mm × 150 mm, 在含有0.5% (v/v) 甲酸的水中使用多段浓度呈线性递增的乙腈洗脱的5- μ m Polaris C-18 (安捷伦科技公司); 流速: 0.2 mL/min; 在280 nm、320 nm、370 nm和520 nm下的光电二极管阵列检测。色谱峰鉴定(通过ESI-MS检测确定): 1. 没食子酸; 2. 原儿茶酸; 3. 单咖啡酰酒石酸; 4. 对羟基苯甲酸; 5. 儿茶酸; 6. m-水杨酸; 7. 咖啡酸; 8. 表儿茶酸; 9. 飞燕草色素-3-葡萄糖苷; 10. 对香豆酸; 11. 氰化物3-O-葡萄糖苷; 12. 花葵素3-O-葡萄糖苷; 13. 芥子酸; 14. 芍药素3-O-葡萄糖苷; 15. 反式白藜芦醇苷; 16. 锦葵色素-3-O-葡萄糖苷; 17. 柑桔素-7-葡萄糖苷; 18. 芦丁; 19. 槲皮素3-O-葡萄糖苷; 20. 杨梅酮; 21. 山柰酚3-O-葡萄糖苷; 22. 反式白藜芦醇; 23. 槲皮素; 24. 柚皮素; 25. 山柰酚(个人数据)



流体萃取系统 (17)。

HPLC和UHPLC

反相分离模式中的常规高效液相色谱是用于分析酚类化合物的首选技术, 其通常使用内径 (i.d.) 在4.0 - 4.6mm范围内的分析尺寸色谱柱进行。由于对环境和分析成本的积极影响, 内径为2.0 mm或2.1 mm的窄孔柱最近获得了越来越多的认可, 这是由于其减少了有害和昂贵有机溶剂的消耗。使用窄孔色谱柱的其他优点包括, 由于相比于使用常规的分析尺寸色谱柱该方法在分离过程中仅需轻微稀释样品, 因此它具有与质谱分析 (MS) 检测的流速兼容性, 且紫外可见吸光度检测的预期灵敏度更高。



VERSION 8.0

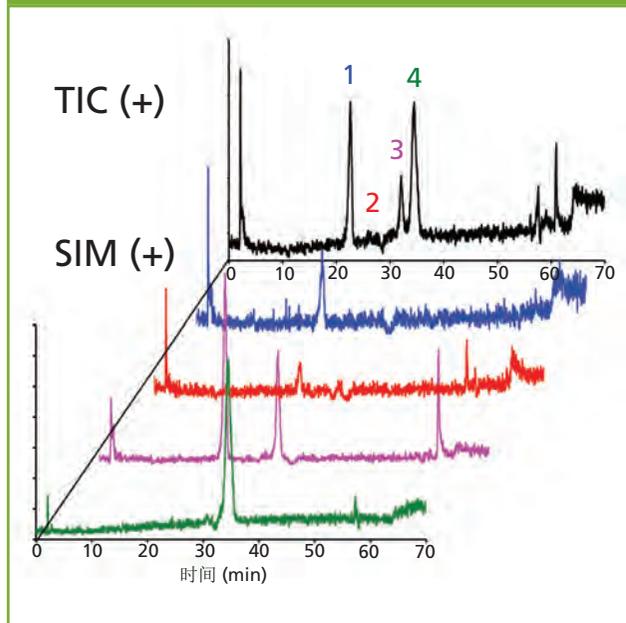
ANALYTICA CHINA
第九届慕尼黑上海分析生化展
E3馆3618号




- 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

图3: 从美乐葡萄果实中提取的花青素的分离与鉴定。色谱柱: 2.1 mm × 150 mm, 在含有0.5% (v/v) 甲酸的水中使用多段浓度呈线性递增的乙腈洗脱的5- μm Polaris C-18 (安捷伦科技公司); 流速: 0.2 mL/min; 在正电离中通过ESI-MS检测确定。色谱峰鉴定: 1. 飞燕草色素-3-葡萄糖苷 (m/z 466.4); 2. 花青色素-3-葡萄糖苷 (m/z 450.4); 3. 芍药花青素-3-葡萄糖苷 (m/z 464.4); 4. 锦葵色素-3-葡萄糖苷 (m/z 494.4) (个人数据)



使用微粒 (2.5-5.0 μm) 球形多孔十八基 (C18) 键合硅填充的色谱柱非常常见, 但是也使用其他键合固定相, 包括辛基 (C8)、苯基-己基、五氟苯基和二苯基键合硅。使用由一个不可渗透的内核和全多孔硅外包层组成的表面多孔微粒, 也称为熔融核或核壳微粒, 也可以实现快速、高效分离, 这种微粒相比于粒径相同的常规全多孔硅石微粒更高效且填充密度更均匀。

与填料硅基色谱柱一样, 在酚类化合物的反相HPLC中也使用了聚合微粒填料和整体柱 (酚基或硅基)。整体柱由具有双峰孔隙度的连续色谱支撑杆组成。它们使用有机或无机前体细胞合成, 并且与常规柱色谱柱相比表现出更强的传质特性 (18)。与常规色谱柱相比, 核壳填充色谱柱和整体柱均可在较高的流动相流速和较低的背压下运行, 同时为各种分析物 (包括天然来源的酚类化合物) 提供高效率 and 分辨能力 (19-20)。

一种更高级的高效液相色谱法, 即超高压液相色谱法 (UHPLC), 使用将粒径低于2- μm 的微粒作为填充物的窄孔色谱柱 (内径为1.0-2.1mm), 实现了在高流速下

的洗脱并需要使用耐压力达600-1000 bar (60-100 MPa) 的色谱系统。根据理论 (van Deemter方程), 使用将粒径低于2- μm 的微粒作为填充物的色谱柱意味着效率的显著提高 (即使在流动相线速度较高的情况下), 其效率与流动相流速成比例。由于效率更高, 色谱峰变窄, 可分辨峰的最大数量 (峰容量) 增加且检出限降低, 这意味着UHPLC的分辨能力和灵敏度预期均高于常规HPLC。

在高流速下进行色谱分离的另一个优点是分析时间显著减少, 而更明显的缺点是较高的色谱柱背压可以轻易达到常规HPLC系统的压力上限。通过在高于环境温度的条件下进行色谱分离, 可以降低色谱柱背压, 使之拥有传统高效液相色谱仪器的优势。然而, 为了充分利用UHPLC, 应使用具有压力扩展能力的专用仪器、进样循环快且进样量低的取样阀、确保最小柱外体积的管道以及具有快速时间常数和获取率的检测器进行分离。

在酚类化合物的HPLC或UHPLC分析中使用的大多数反相色谱柱在梯度洗脱模式下运行, 起始洗脱剂和梯度形成剂分别由富含水和富含有机溶剂的溶液组成。通常情况下, 适当的酸会被掺入起始洗脱剂中, 且在一些罕见的情况下, 也会被掺入到梯度形成剂中, 以控制酸性pH值下的质子平衡。为了提高酚类化合物与固定相的疏水性作用, 在酸性条件下必须确保分析物的羧基和羟基都是质子化形式。乙腈和甲醇是通常用作梯度形成剂的有机溶剂。这两种溶剂具有不同的洗脱强度和分离选择性 (图1)。然而, 在可能的情况下, 乙腈比甲醇更受欢迎, 因为它的UV截断率和粘度较低。

在酚类化合物液相色谱中使用的主要检测方法是基于紫外光的吸光度, 或基于可见光的吸光度对花青素检测。这些检测器包括固定波长、可变波长、扫描和光电二极管阵列 (PDA) 检测器。低压放电灯用作密集型紫外线辐射源, 如汞灯 (254nm) 或镉灯 (229、326 nm), 而辐射范围达190-700nm的氙灯用于可变波长和光电二极管阵列检测器, 其中钨卤灯也可用于改善可见区域的性能。

每种类型的酚类化合物都具有独特的光谱特征。因此, 通过在预期出现在样品中的酚类化合物吸收峰的相应波长处进行紫外-可见光检测, 就可以获得复杂样品混合物中不同种类酚类化合物的一般信息。图2描述了这种方法的一个例子, 它显示了从葡萄果实中提取酚类化合物后分别在黄酮醇 (370 nm)、花青素 (520 nm) 以及酚酸和黄酮

(320nm)吸收峰的相应波长处使用PDA进行检测得到的反相HPLC分离结果。

荧光检测通常使用在线柱后衍生法来检测天然荧光或通过化学改性获得含有荧光标签分子的有限数量酚类化合物。另一方面,通过在流动相中加入荧光探针进行间接检测以及在柱后加入合适试剂进行化学发光检测已得到了有限应用。

通过使用飞行时间(TOF)或轨道阱质谱仪(作为主要方法)实现HPLC或UHPLC与MS或高分辨率质谱仪(HRMS)的联用能够阐明所研究的酚类化合物的化学结构。在LC-MS中使用的不同电离源中,最突出的就是在负电离模式中的电喷雾电离(ESI),尽管也使用正电离模式中的ESI。例如,花青素是在正电离模式下使用ESI-MS检测出的黄烺盐阳离子的糖基化衍生物(21)(图3)。用于酚类物质LC-MS的其他不太常见的大气压电离(API)接口包括大气压化学电离(APCI)(22)和使用范围较小的大气压光化学电离(APPI)(23)。

液相色谱与核磁共振光谱(NMR)的联用技术在分析化学中广泛用于已知和新有机化合物的明确鉴定,也具有很大的发展潜力。直接在线联用可以通过使用双鞍亥姆霍兹线圈或螺线管形微线圈设计的流动NMR探头,并结合旨在提高NMR低探测灵敏度的方法实现,该敏感度受分离步骤中使用的液相背景吸光度的负面影响(24)。这些方法中值得注意的是使用SPE实现LC与NMR的联用。根据该方法,将洗脱色谱柱作为分离峰的每种酚类化合物留在SPE柱上,随后用氮气干燥后用氘代溶剂洗脱到合适的管中用于离线NMR分析。根据Goulas等人的报道,他们使用这种方法鉴定希腊鼠尾草萃取物中的甲氧基黄酮、高丰前素、鼠尾草素和蓟黄素,经鉴定它们都表现出抗真菌性(25)。

亲水作用色谱(HILIC)不论是作为反相色谱的重要替代方案还是作为在多维色谱中使用的分离模式之一都受到越来越多的关注。在HILIC中的色谱保留是由分析物在富含有机流动相与在极性固定相表面形成的水层之间的亲水性分配决定的,氢键、偶极-偶极相互作用和离子交换机制可能也起到了一定的作用。因此,HILIC可被视为正交于反相色谱,其保留机制基于疏水相互作用。另一方面,与反相色谱相似,HILIC使用与MS检测完全兼容的水-有机流动相。HILIC的其他优点包括其适用于分析反相色谱中

未充分保留的极性酚类化合物,以及提供了一个替代分离机制,这意味着不易通过反相色谱分离的化合物可在HILIC中分解。HILIC在酚类物质分析中的适用性实例包括用于分解苹果和苹果提取物中的单个低聚与聚合原花青素(26),以及用于分离和鉴定蓝莓、红葡萄皮、黑豆、红球甘蓝及红心萝卜中的花青素(27)。

综合二维液相色谱

HILIC在食品和饮料中酚类化合物的二维液相色谱分析法的开发上非常有前途(28)。这项技术是使样品通过两个色谱柱,每个色谱柱包含不同的固定相用于根据不同的分离机制或利用不同的选择性分离分析物。该技术根据各种方法进行,这包括“心脏切割”和“综合”二维LC,也分别称为LC-LC和LC×LC。在LC-LC系统中,在第二个色谱柱中仅对第一个色谱柱中含有目标分析物的流出物馏分进行进一步分离;而在综合二维LC中,来自第一个色谱柱的全部流出物都将被转移到第二个色谱柱中。

通过将HILIC与反相色谱相结合而产生的综合二维LC系统结合了在第一个(HILIC)和第二个(反相色谱)色谱柱中操作的两个分别基于亲水性和疏水性的独立分离机制的不同选择性与分辨率。HILIC×反相色谱技术通常通过使用一个或两个取样回路的多端口开关阀在线操作,而离线模式则不太常见。研究人员已对HILIC×反相色谱的在线、离线和停流模式进行了深入研究,并成功将之应用于可可原花青素(29)的分析以及陈酿红葡萄酒(30)中花青素及其衍生物色素的分离和鉴定。最近,人们通过将离线二维HILIC×反相色谱系统与离子阱飞行时间质谱仪(31)联用,从丹参中分离并初步鉴定了265种化合物,包括196种潜在的新酚酸。然而,由于含有大量乙腈的流动相,如在HILIC中使用的流动相,是反相色谱中的强洗脱剂,因此在综合二维HILIC×反相色谱系统中可能会出现系统兼容性问题。综合二维液相色谱分析酚类化合物的一种问题较少的方法是使用两个具有不同选择性的反相色谱柱。根据此方法,通过将第一个维度中的单一或串联的聚乙二醇(PEG)-、苯基-和C18-反相色谱柱与第二个维度中的单一或两个交替C18或Zr-碳色谱柱结合使用,研究人员已经成功从啤酒和红酒中分离出酚酸与类黄酮抗氧化剂(32-33)。在某些报道中也曾提及将第一维度中的微内径苯基色谱柱与第二维度中的整体或表面多孔C18色谱柱相结合用于对酚类

化合物进行综合反向色谱×反相色谱分析的方法(34)。同一小组也描述了一种将微氰基柱和部分多孔C18柱作为第一维和第二维度组成综合二维反相色谱×反相色谱系统,用于分析甘蔗叶提取物中酚类物质的案例(35)。通过使用将C18硅胶色谱柱作为第一维度并将五氟苯酚色谱柱作为第二维度组成的二维反相色谱×反相色谱系统,研究人员已经在悬钩子属植物“Glen Ample”中发现了共34种酚类化合物,包括酚醛酸、鞣花单宁、黄烷-3-醇、黄酮醇和鞣花酸结合物(36)。

除了反相色谱和HILIC,其他色谱分离模式,如体积排阻色谱(SEC)或离子交换色谱(IEC),在酚类化合物的LC-LC和LC×LC中都有一定的应用。另外一种较少使用的方法是双保留机理色谱柱(37)。曾有报道中将SEC与反相色谱相结合用于分析绿茶和黑茶(野茶树)(38)。已开发的综合二维SEC×反相色谱法可以分离和鉴定各种酚类化合物,包括儿茶素、茶黄素及其没食子酸酯衍生物、山奈酚、槲皮素和杨梅酮甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯和甘油四酯、奎尼酸的酯类和没食子酸或羟基肉桂酸。最近,一种在高浓度乙腈中提供双保留机制HILIC且在富水流动相中提供反相的两性离子聚甲基丙烯酸酯整体柱已被用于HILIC×反相色谱或反相色谱×反相色谱综合二维系统的第一维度中,用于分离黄酮和相关的酚类化合物(39)。

结论

综上所述,人们对酚类化合物及其对人体健康的积极影响的关注日益增长,这促进了用于分析食用和药用植物以及植物源食品与膳食补充剂中这些化合物的各种技术的发展。除可靠的分析方法外,这些基质的复杂性和植物界中各种酚类化合物的异质化学结构需要设计良好的样品制备方法和萃取工艺。

目前,人们将专业的LC分离技术与最先进的质谱检测相结合,用于植物和植物来源食品中酚类化合物的分离、鉴定和定量。这些技术包括使用分析体积柱或窄孔柱的HPLC以及使用专用色谱柱和仪器的UHPLC。目前用于分析酚类化合物的大多数HPLC和UHPLC方法均采用反相分离模式;但是也使用了HILIC,作为反相色谱的重要替代方法或作为在二维液相色谱中使用的色谱模式之一,与反相色谱或其他色谱技术相结合。

参考文献

- B. Wielkopolan and A. Obrepalska-Stepłowska, 植物学 244, 313–332 (2016)。
- A. Scalbert, C. Andres-Lacueva, M. Arita, P. Kroon, C. Manach, M. Urpi-Sarda and D. Wishart, 农业和食品化学期刊 59, 4331–4348 (2011)。
- A. Soto-Vaca, A. Gutierrez, J.N. Losso, Z. Xu and J.W. Finley, 农业和食品化学期刊 60, 6658–6677 (2012)。
- U. Lewandowska, K. Szewczyk, E. Hrabec, A. Janecka and S. Goralach, 农业和食品化学期刊 61, 12183–12199 (2013)。
- M. Iriti and S. Vitalini, Pol. 食品营养科学期刊 62, 71–76 (2012)。
- J.N. Kabera, E. Semana, A.R. Mussa and X. He, 药理学和药理学期刊 2, 377–392 (2014)。
- F. Shahidi and P. Ambigaipalan, 功能性食品期刊 18, 820–897 (2015)。
- D. Granato, J.S. Santos, L.G. Maciel and D.S. Nunes, 分析化学之追踪趋势 80, 266–279 (2016)。
- E. de Oliveira and R. Battista, 食品科学与食品安全综合评论 16, 580–616 (2017)。
- V.C. George, G. Dellaire and H.P.V. Rupasinghe, 营养生物化学期刊 45, 1–14 (2017)。
- M.E. Goetz, S.E. Judd, T.J. Hartman, W. McClellan, A. Anderson and V. Vaccarino, 营养学杂志 146, 2233–2243 (2016)。
- A.R. Carvalho, G. Costa, A. Figueirinha, J. Liberal, J.A.V. Prior, M.C. Lopes, M.T. Cruz and M.T. Batista, 国际食品研究 99, 485–494 (2017)。
- E. Skates, J. Overall, K. De Zego, M. Wilson, D. Esposito, M.A. Lila and S. Komarmytsky, 食品与化学毒理学 111, 445–453 (2018)。
- L.C. Klein-Júnior, Y. Vander Heyden and A.T. Henriques, 分析化学发展趋势 80, 66–82 (2016)。
- K.-Y. Khaw, M.-O. Parat, P.N. Shaw and J.R. Falconer, 分子学 22, 1286–1208 (2017)。
- K. Ameer, H.M. Shahbaz and J.-H. Kwon, 食品科学与食品安全综合评论 16, 295–315 (2017)。
- S. Tang, H. Zhang and H.K. Lee, 分析化学 88, 228–249 (2016)。
- L. Trojer, A. Greiderer, C. Bisjak, W. Wieder, C.W. Huck and G.K. Bonn, HPLC手册, D. Corradini, Ed. (美国Boca Raton, CRC出版社, 第二版, 2010年) pp. 3–45。
- A.A. Rahim, S. Nofrizal and B. Saad, 食品化学 147, 262–268 (2014)。
- P. Chocholouš, J. Vačková, I. Šrámková, D. Satínský and P. Solich, 塔兰塔 103, 221–227 (2013)。
- P. Garcia-Herrera, M.L. Pérez-Rodríguez, T. Aguilera-Delgado, M.J. Labari-Reyes, B. Olmedilla-Alonso, M. Camara and S. de Pascual-Teresa, 国际食品科学与技术 51, 2290–2300 (2016)。
- A.P. Singh, T. Wilson, D. Luthria, M.R. Freeman, R.M. Scott, D. Bilenker, S. Shah, S. Somasundaram and N. Vorsa, 食品化学 127, 80–85 (2011)。
- L. Riffault, C. Colas, E. Destandau, L. Pasquier, P. André and C. Elfakir, 植物化学分析 26, 189–201 (2015)。
- R. Brkliača and S. Urban, 液体色度研究技术 34, 1063–1076 (2011)。
- V. Exarchou, L. Kanetis, Z. Charalambous, S. Apers, L. Pieters, V. Gekas and V. Goulas, 农业和食品化学期刊 63, 457–463 (2015)。
- W.J. Hollands, S. Voorspoels, G. Jacobs, K. Aaby, A. Meisland, R. Garcia-Villalba, F. Tomas-Barberan, M.K. Piskula, D. Mawson, I. Vovk, P.W. Needs and P.A. Kroon, 色谱法杂志A辑 1495, 46–56 (2017)。
- C.M. Willemse, M.A. Stander and A. Villiers, 色谱法杂志A辑 1319, 127–140 (2013)。
- F. Cacciola, S. Farnetti, P. Dugo, P.J. Marriott and L. Mondello, 分离科学杂志 40, 7–24 (2017)。
- K.M. Kalili and A. de Villiers, 色谱法杂志A辑 1289, 69–79 (2013)。
- M. Willemse, M. Stander, J. Vestner, A.G.J. Tredoux and A. de Villiers, 分析化学 87, 12006–12015 (2015)。
- W. Sun, L. Tong, J. Miao, J. Huang, D. Li, Y. Li, H. Xiao, H. Sun and K. Bi, 色谱法杂志A辑 1431, 79–88 (2016)。
- F. Cacciola, P. Jandera, E. Blahová and L. Mondello, 分离科学杂志 29, 2500–2513 (2006)。
- E. Blahová, P. Jandera, F. Cacciola and L. Mondello, 分离科学杂志 29, 555–566 (2006)。
- P. Dugo, F. Cacciola, M. Herrero, P. Donato and L. Mondello, 分离科学杂志 31, 3297–3308 (2008)。
- G. Mazzi Leme, F. Cacciola, P. Donato, A.J. Cavalheiro, P. Dugo and L. Mondello, 分析和生物分析化学 406, 4315–4324 (2014)。
- M. Kula D. Glód and M. Krauze-Baranowska, 药物与生物医学分析 121, 99–106 (2016)。
- P. Jandera, M. Staňková and T. Hájek, 分离科学杂志 36, 2430–2440 (2013)。
- C.T. Scoparo, L.M. de Souza, N. Dartora, G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin and M. Lacomini, 色谱法杂志A辑 1222, 29–37 (2012)。
- T. Hájek, P. Jandera, M. Staňková and P. Česla, 色谱法杂志A辑 1446, 91–102 (2016)。

Danilo Corradini 获得了意大利罗马Sapienza大学的化学博士学位，并获得了美国耶鲁大学化学工程系的分离科学博士后学位。他的研究领域包括研究HPLC的基本和实践方面以及用于生物分子（主要是植物来源）分析分离的电迁移技术。为了表彰他的科学贡献，他于2009年获得了Csaba Horváth纪念奖，于2011年获得了中欧分离科学团体奖并于2014年获得了Arnaldo Liberti奖。

Francesca Orsini 是意大利生物科学家登记中心的注册营养师。她于2012年获得了食品科学与人类营养学士学位，并于2014年获得了食品技术与科学营养硕士学位。她于2018年在罗马生物医学大学获得了生物工程与生物科学博士学位。她的研究领域包括植物材料中生物活性化合物的样品制备程序和色谱分析方法的开发。

Laura De Gara 是罗马生物医学大学的植物生理学教授和食品科学与人类营养硕士研究生系主任。她在植物代谢研究方面拥有近30年的经验，特别侧重于环境条件下的氧化还原平衡和信号传递。她还对具有营养和健康作用的植物代谢物感兴趣，特别是多酚、果聚糖和其他纤维，以及抗氧化维生素。

Isabella Nicoletti 在罗马Sapienza大学接受了生物学教育，在1982年至1985年间，她还是该校化学系的博士后研究员。自1985年以来，她一直是罗马蒙泰利布雷蒂意大利研究理事会化学方法研究所的研究科学家。她是分离科学领域的专家，对开发以创新方法分析具有特定健康特性食品的色谱技术感兴趣。

扩展DEGASi产品的新天地

DEGASi PLUS - 小型、智能、静音

我们最新推出又一个全新的 DEGASi 产品 - DEGASi® PLUS。根据不同需求，该产品可广泛用于各种复杂的应用领域。DEGASi® PLUS 是继 DEGASi® Classic、DEGASi® Micro、DEGASi® GPC & DEGASi® Semi-Prep 之后的又一颗明星。



- 产品特性：
- 更小的尺寸和重量
 - 采用智能控制的新型真空泵
 - 静音设计
 - 可选1-6个通道
 - 平行连接的真空室
 - 系统连接简单、直观
 - 故障排除和更换零件简便快捷
 - 交货时间短



全新的
DEGASi PLUS
系列

流体系统的创新产品



公司总部：瑞典Biotech AB, 电话：+46 (0)300-56 91 80, E-mail: info@biotech.com |otech.se
 美国分公司：Biotech USA LLC, 电话：+1 (0)612 7035718, E-mail: sales@biotechusa.us
 日本分公司：BioNik Inc., 电话：+81 (0)545 389125, E-mail: info@bionikinc.com

www.biotech.se

生物分子分离的秘诀、技巧和故障排查，第1部分：当代反相蛋白质分离

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

近年来出现了几种用于蛋白质反相分离的新材料和色谱柱。我如何知道选择哪一种，以及哪种分离条件最适合我的蛋白质分离呢？

在过去十年中，在治疗从癌症到诸如强直性脊柱炎等炎性疾病方面，生物制剂的发展取得了巨大的进步。目前，这些生物制剂大部分是蛋白质，其中许多是单克隆抗体。这一发展活动的增加反过来又致使从事蛋白质分离的研究人员的数量急剧增加，这可能比历史上任何时候都要多。对于那些通过小分子实验来学习色谱原理的人来说，蛋白质分离在色谱领域重要性的日益增加既是巨大的机遇，也是巨大的挑战。尽管设计用于小分子应用的颗粒和色谱柱技术在过去的20年中一直在稳步改进（例如，随着表面多孔颗粒的细化和高性能固定相化学的发展），直到最近，关于大型生物分子分离材料的开发仍未取得重大发展，许多用户仍在使用20多年前开发的色谱柱技术。这种发展上的滞后既是一个机遇——材料技术

上的进步将不可避免地提高大型生物分子的分离性能——也是一个挑战，因为随着颗粒和色谱柱技术的发展，许多与分离相关的最佳实践将不得不被重写。

大约四年前，我们在我的实验室里做了一个重大的转变，从主要关注小分子分离（例如，环境污染物和法医学应用），转向将75%以上的精力放在大生物分子分离上。正如我最近经常说的那样，从小分子到大分子的分离并不像注入不同的样品那么简单。拥有大量生物分子经验的研究人员痛苦地意识到这一困难，但正在从小分子分析向大分子分析过渡的色谱分析人员可能没有意识到看似微小的细节对于实现高质量生物分子分离的重要性。

在这一期的“LC故障排查”中，我邀请了我在生物分子应用领域的两位合作者，与我一起撰写了一些我

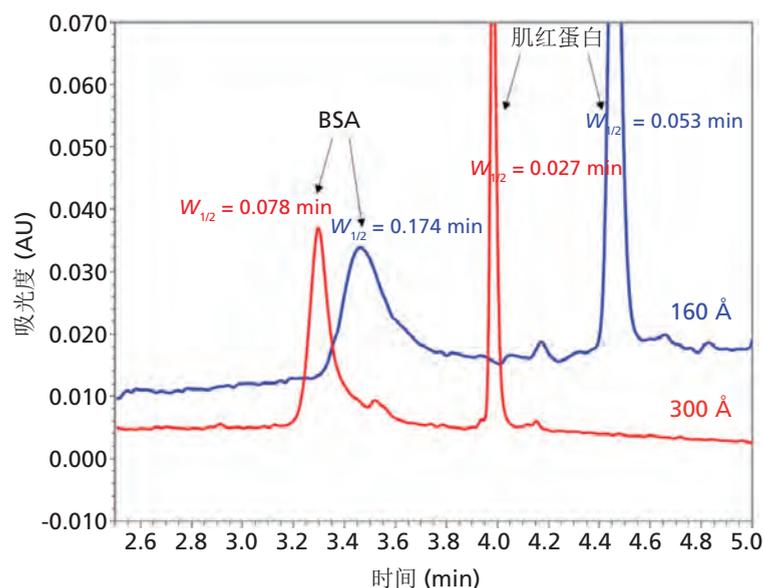
们发现对蛋白质反相分离特别重要的细节。

Dwight Stoll

为什么蛋白质表现得如此不同？

也许，对于为什么蛋白质在色谱系统中表现得与小分子如此不同最简单的观点就是与它们的大尺寸（有时非常大）有关。像布洛芬这样的小分子的质量大约是300 Da，而蛋白质的质量大约是它的20 - 1000倍；单克隆抗体（mAbs）是目前最畅销的生物治疗药物，其质量约为150,000 Da。这些蛋白质由于尺寸较大导致其在溶液中扩散的速度慢得多。它们由成千上万个原子和数十种不同的官能团组成，并且有时具有很强的反应性。不同于通常由简单起始原料合成的小分子，它们全部是由活的有机体（例如，细菌或哺乳动物细胞）产生。随后的净化步骤可能非常好，但却并不完美，

图1: 公称孔径对BSA和肌红蛋白峰宽的影响。色谱柱: 150 mm × 2.1 mm C18; 移动相A: 在水中加入0.1%的三氟乙酸; 移动相B: 在乙腈中加入0.1%的三氟乙酸; 梯度: 10分钟内30–70% B; 流速: 400 μ L/min; 温度: 50 $^{\circ}$ C; 进样量: 1 μ L (未发表结果)



这意味着我们研究的分析物可能是化学异构体。最后, 这些大分子可能采用二级、三级甚至四级结构(即, 形状), 这些结构可能会与色谱介质发生难以理解的相互作用。

在接下来的章节中, 我们总结了我和其他人在反相条件下如何有效利用这些蛋白质的经验。我们讨论的一些问题在基本层面上比其他问题更容易理解, 世界上许多实验室都在积极地尝试更好地理解它们。在大多数情况下, 我们可以从旧文献中学到很多东西(1), 同时随着我们利用制造商引入的新技术进行实验, 还有很多东西有待发现(2)。

RESTEK | ADVANTAGE

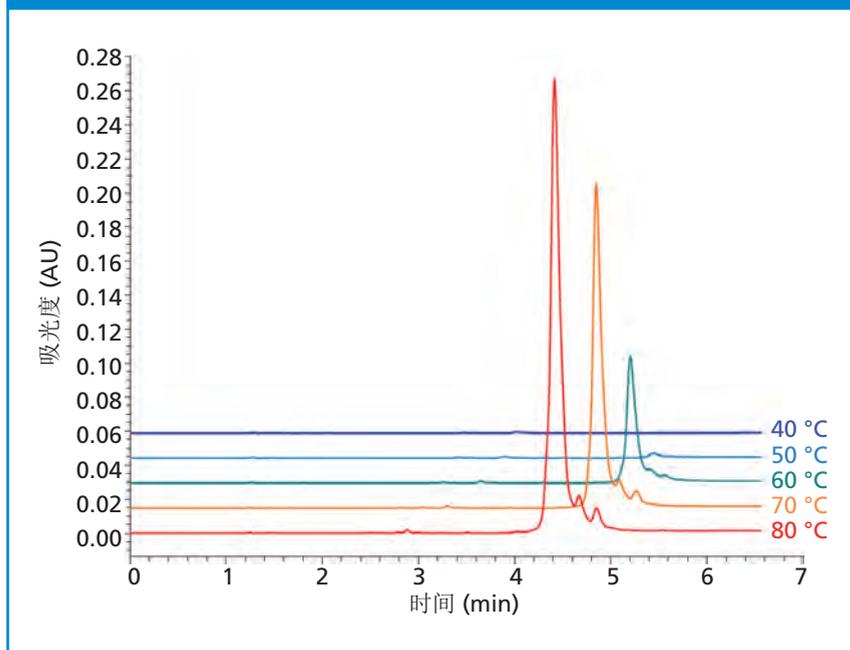
See What It Can Do for You and Your Lab



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

RESTEK Pure Chromatography

图2: 从完整的利妥昔单抗的反相分离中获得的色谱图，温度范围为40至80°C。色谱柱：150 mm × 2.1 mm BEH300 C4；移动相A：在水中加入0.1%的三氟乙酸；移动相B：在乙腈中加入0.1%的三氟乙酸；梯度：6分钟内30–37% B；流速：0.3 mL/min；进样量：0.5 μL；检测：在280 nm长度下的紫外光吸光度。根据参考文献10的许可进行改编。



色谱介质的孔径非常重要

我们很早就了解了液相色谱（LC）的基本概念之一，即分析物出入多孔颗粒孔隙的扩散非常重要；当扩散太慢时，会导致色谱峰变宽。尽管典型的多孔颗粒（公称直径为10nm【100 Å】）的孔隙足够大，可以容纳300 Da的分子，而不会显著阻碍其在孔隙中的扩散，但这些孔隙却不足以容纳蛋白质。在最好的情况下，蛋白质的扩散会受到阻碍，导致峰增宽。在最坏的情况下，蛋白质可以有效地“卡在”粒子内，导致严重的峰拖尾和可被解释为分析物从一次分析转移到下一次分析的现象。

色谱柱制造商当然已经意识到这个问题，但从分析师的角度来看，最重要的一个实际问题是“有多大就足够了？”在非常大的孔隙限制下，多孔

颗粒的机械稳定性将受到损害，并且固定相的表面积将减小到质量过载（即，由于分析物质量进样过多导致峰宽度增加【3，4】）成为严重问题的程度。像这样，如果一个问题未得到妥善解决就会导致产生另一个不同的问题。

图1显示了通过使用两种不同标称孔径的颗粒——一个是160 Å，另一个是300 Å——制备的色谱柱在反相条件下获得的两种蛋白质模型（牛血清白蛋白（BSA，66kDa）和肌红蛋白（17kDa））的峰形进行的比较。

孔径明显对峰宽有很大影响。对于肌红蛋白，当孔径从160 Å增加到300 Å时，峰宽减小约50%。对于比肌红蛋白大两倍以上BSA来说，改进效果更好，峰宽减少了56%。我们注意到，随着材料孔径的增大，保留率也显著降低，这可能是由于颗粒的表面

积减小了。这种峰宽度的改进，对于更大的蛋白质（如单克隆抗体）来说甚至更为显著，促使制造商在400–500 Å范围内，甚至1500 Å范围内，引入孔隙更宽的材料。要想确定哪种颗粒对特定蛋白质表现最佳，最可靠的方法就是通过实验测量峰宽和保留时间。在进行这些测量时，重要的是使测量值超过一系列进样质量（例如，蛋白质进样从0.1至10μg），因为这些数据可用于评估孔径与固定相表面积之间的折中。当然，进行这些测量并不总是可行的；有兴趣了解这个主题的更多细节或者希望获得一些指导而无需自己进行测量的读者可以参考一些关于该主题的最新文章（3-7）。

色谱柱的温度也很重要

在蛋白质的反相分离过程中，色谱柱和流动相的温度也很重要。将温度提高至远高于环境温度的一个令人信服的理由就是，温度的升高会增加溶液中蛋白质的分子扩散率，从而可以减轻由于传质缓慢而导致的峰值变宽。这种方法通常可以提高蛋白质分离的效率和峰容量，也可以通过降低高温下的流动相粘度来提高分离速度（4，8）。另一方面，使用过高的温度，特别是通常用于蛋白质反相分离的酸性流动相，会导致硅氧烷键水解，在硅基相的情况下使固定相配体与二氧化硅表面结合。近年来，在固定相化学上的进展显著地改善了一些硅基相在低pH下的化学稳定性（4，9）。最后，将蛋白质分析物长时间暴露在这些条件中也会导致蛋白质的柱上降解。因此，正如上面讨论的孔径大小一样，这里的问题是“有多热就足够了？”

首先，使用者应遵守色谱柱制造商关于色谱柱规定温度限值的指导。然后，我们考虑以下问题：

- 从色谱柱中回收蛋白质——换句话说，我们注入的所有东西是否都会分析时间内出现？
- 蛋白质在分离过程中的稳定性——色谱柱内是否存在任何可检测的降解？

虽然我们不相信不完全回收的原因很好理解，但从实验中可以得知，使用过低的柱温会导致色谱柱中蛋白质回收不完全，而提高色谱柱温度会提高回收率。图2给出了一个令人信服的例子，说明了在完整mAb蛋白反相分离的情况下，我们自己的研究中产生的这种效果（10）。在40°C时蛋白质峰几乎检测不到，而在50°C时蛋白质峰则变得更加明显并且在温度达到80°C前体积保持增加，这是本研究中探索的最高温度。基于这些数据和我们的研究（11）以及其他组（4）的结果，我们通常使用70-90°C的柱温进行实验室中蛋白质的反相分离。然而，当在这些温度下工作时，我们还尝试将柱上时间（即，保留时间）限制为小于约20分钟，以尽量减少蛋白质在柱内降解的可能性。最近的研究结果表明，通过开发新的固定材料，可以在一定程度上放宽对柱温升高的要求（7）。在某种程度上，这些蛋白质的不完全回收（吸附）和柱上降解的问题是蛋白质和色谱柱特有的。这种情况意味着，虽然我们使用上述指南作为方法开发的起点，但是通过实验确定实现目标蛋白质或样品的回收最大化和降解最小化所需的条件也是一个好主意。实际上，蛋白质结构固有的复杂性和动态性限制了我们的预测蛋白质与其周围环境之间相互作用的能力，从而限制了它们在反相条件下的吸附和保留特性。出于这些原因，筛选方法作为从经验上评估某些特定蛋白质性质（包括色谱性能和作为治疗分子的可开发性）的手段已经变得非常流行。

固定相化学又如何呢？

市面上有许多用于反相蛋白质分离的固定相都是可以购买的。其中一些是基于完全由有机聚合物组成的颗粒。其他的则是基于带有固定相的二氧化硅和其他金属氧化物，这些固定相要么是共价键结合，要么是包裹在颗粒表面。作为一个实际问题，我们有必要问一下固定相化学如何影响蛋白质的反相分离。就硅基相而言，键合到表面的烷基硅烷的类型可以影响蛋白质的保留，因此可

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

以用于控制保留，并且在较小程度上控制选择性。虽然关于固定相配体结构对蛋白质保留率影响的详细分子基础我们尚未完全了解，但我们通过实验得知，影响蛋白质保留率的因素有很多。这些因素包括配体的相对疏水性、表面覆盖度、配体密度、碳负荷、配体的柔韧性以及表面硅烷醇的暴露程度。此外，配体的选择还可以影响蛋白质分析物的回收和构象完整性。

在历史上，人们曾假定较短和疏水性较差的正丁基配体相比于辛基或十八烷基配体（分别为C8和C18相）能够提供更好的回收率。因此，过去大多数丁基（即C4）和丙基（C3）相用于蛋白质分离。然而，在现代商业上可获得的相中，现在看来蛋白质回收率似乎对固定相烷基配体的长度没有明显的依赖性（10）。当比较具有不同键合相的色谱柱时，有时会观察到蛋白质保留的显著差异。例如，在某些情况下，已经观察到蛋白质在C4固定相上比在C8或C18相上保留得更多。这种行为的原因可能是大的溶质（蛋白质）不像小分子那样渗透到键合相层（12），因为与配体之间的可用空间相比，蛋白质太大了。以这种方式，蛋白质可能主要与固定相在键合相层和主体流动相之间的界面处相互作用，换言之，蛋白质仅可以看到固定相的“鸟瞰图”（1）。在大多数情况下，短链的配体密度大于长链的配体密度，因此，与长配体相比，用短烷基配体修饰的相可获得的疏水表面积更大。此外，如果二氧化硅表面存在残留的未键合硅烷醇，则在固定相由短链配体组成的情况下（氢键和离子交换相互作用具有比色散相互作用更长的相互作用距离），它们将更容

易接近。

我们的观点是，大多数烷基结合相（例如C3、C4、C8和C18）是蛋白质分离的可行选择，前提是针对特定材料进行条件优化。该优化至少应考虑孔径、流动相温度和流动相添加剂（例如，三氟乙酸）。从易用性的角度来看（7），最近推出的一些材料看起来很有前途，看看这些产品在不久的将来如何继续发展将会很有趣。

综述

在过去的十年里，许多新的材料和色谱柱被引进用于蛋白质的反相分离。这一趋势带来的好消息是，用户现在有了更多可用于商业用途的材料可供选择。不过，目前的挑战是找出哪种分离方法最适合于特定用途，以及找到最佳的分离条件。在本部分中，我们简要讨论了孔径、柱温和固定相化学对于蛋白质反相分离的重要性。这里讨论的想法应有助于使用者开始方法开发，或者对现有方法的性能进行故障排查。在反相分离的其他考虑因素以及包括离子交换和基于体积的分离等其他分离模式方面，仍有许多问题需要讨论，我们期待在以后的文章中讨论这些问题。

参考文献

- (1) J.W. Dolan, LCGC亚太地区 17(2), 12–15 (2014).
- (2) D. Bell, LCGC 欧洲 31(4), 202–211 (2018).
- (3) S. Fekete, R. Berky, J. Fekete, J.-L. Veuthey 和 D. Guillaume, 色谱法杂志A辑 1252, 90–103 (2012). doi:10.1016/j.chroma.2012.06.066.
- (4) S.A. Schuster, B.M. Wagner, B.E. Boyes 和 J.J. Kirkland, 色谱法杂志A辑 1315, 118–126 (2013). doi:10.1016/j.chroma.2013.09.054.
- (5) B.M. Wagner, S.A. Schuster, B.E. Boyes, T.J. Shields, W.L. Miles, M.J. Haynes, R.E. Moran, J.J. Kirkland 和 M.R. Schure, 色谱法杂志A辑 1489, 75–85 (2017). doi:10.1016/j.chroma.2017.01.082.
- (6) W. Chen, K. Jiang, A. Mack, B. Sachok, X. Zhu, W.E. Barber 和 X. Wang, 色谱法杂志A辑1414, 147–157 (2015). doi:10.1016/j.chroma.2015.08.043.

- (7) B. Bobály, M. Lauber, A. Beck, D. Guillaume 和 S. Fekete, 色谱法杂志A辑 1549, 63–76 (2018). doi:10.1016/j.chroma.2018.03.043.
- (8) H. Chen 和 C. Horvath, 分析方法 1, 213–222 (1994).
- (9) B.C. Trammell, L. Ma, H. Luo, M.A. Hillmyer 和 P.W. Carr, 美国化学会期刊 125, 10504–10505 (2003). doi:10.1021/ja036339d.
- (10) S. Fekete, S. Rudaz, J.-L. Veuthey 和 D. Guillaume, 分离科学杂志 35, 3113–3123 (2012). doi:10.1002/jssc.201200297.
- (11) S. Fekete, A. Beck, E. Wagner, K. Vuignier 和 D. Guillaume, 分离科学杂志 38, 1–8 (2015). doi:10.1002/jssc.201400996.
- (12) M.R. Schure, J.L. Rafferty, J.I. Siepmann 和 L. Zhang, LCGC 欧洲 27(1), 18–27 (2014).

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。

直接通讯地址：LCGCedit@ubm.com

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.

分流、不分流和其他——充分利用进样口

Nicholas H. Snow, 美国新泽西州塞顿霍尔大学化学与生物化学系

虽然毛细管柱气相色谱技术正经历着一场复兴，新的色谱柱、检测器、数据系统和多维分离技术层出不穷，但传统的进样口仍然保持不变：我们仍在用注射器将液体样本注入到分流和不分流的进样口中，正如我们近50年来所做的那样。分流和不分流进样存在一些众所周知的和一些不为人知的挑战，主要是由于进样口的加热使得样品进样和进样口成为气相色谱仪的主要障碍。在本文中我们讨论了这些挑战和一些规避这些挑战的想法，并提出了一个案例，以重新探索冷进样口和进样技术：柱头冷却与序化升温汽化。

在过去的二十年中，气相色谱（GC）已经取得了一些巨大的进展。新仪器已经开始充分利用毛细管柱的功能。新技术包括吸附微萃取技术，例如固相微萃取（SPME）、快速GC、综合多维GC（GC×GC）、具有高度惰性（指定质谱法【MS】）和选择性（专业和离子液体）的毛细管柱，以及新的检测器，包括台式MS-MS和真空紫外（VUV）检测器。这些新技术证明关于GC的新研究仍在进行并有望成为未来的主要分析技术。

随着所有这些新技术的发展，具有讽刺意味的是，最可能让色谱工作者感到困惑的一个领域，即进样口，却很少受到关注。主线路仪表上有四个进样口：分流、不分流、柱头和程序化升温汽化（PTV）。到目前为止，最常用的进样口是分流式和不分流式，它们是在20世纪50年代和60年代开发的；最近开发的进样口PTV是在1979年发明的。尽管对气动和高惰性玻璃套管材料的计算机控制

略微改善了作为进样口的分流和不分流方面，但困扰色谱仪50多年的基本问题仍然存在。

分流和不分流——传统的可靠备用品

现今生产的绝大多数气相色谱仪都包括单一进样口，通常称为分流-不分流进样口，它实现了两种类型的液体样品进样：分流和不分流。在不同程度上，分流和不分流进样解决了将液体样品注入毛细管气相色谱系统的五个基本问题：

- 针头的问题：大部分注射器针头无法插入毛细管柱中。
- 质量问题：使用者只能将少量样品注入毛细管柱（1 μ L液体样品重约1 mg），而永远不知道实际注入的样品量。
- 时间问题：使用者永远不知道进样过程需要多长时间或柱顶的峰宽。
- 污染问题：受污染的样品对于色

谱柱是不利的，并且污染物可能在进样口或柱头处聚集并与分析物相互作用或反应。分析物也可能与进样口的内表面相互作用。

- 歧视问题：加热进样口或注射器针头可能导致一些分析物留在针头或进样口中，而其他分析物则转移到色谱柱中。

分流-不分流进样口的示意图如图1所示。注意，进样口具有较高的热质量，且通常被加热到远高于大多数样品正常沸点的温度，通常为250 $^{\circ}$ C。如图所示，这五个基本问题通过进样口设计及其操作方式得到了部分解决。通过在线访问LCGC亚太地区的ChromAcademy，可以简单地回顾一些基本原则（1）。关于分流和不分流进样口维护基础知识的讨论，请参阅2018年5月的LCGC欧洲期刊（2）。在其关于分流和不分流进样的经典著作中，Grob用了800多页论述与分流和不分流进样有关的基础知识、理论和实践（3）。

图1: 分流-不分流进样口示意图

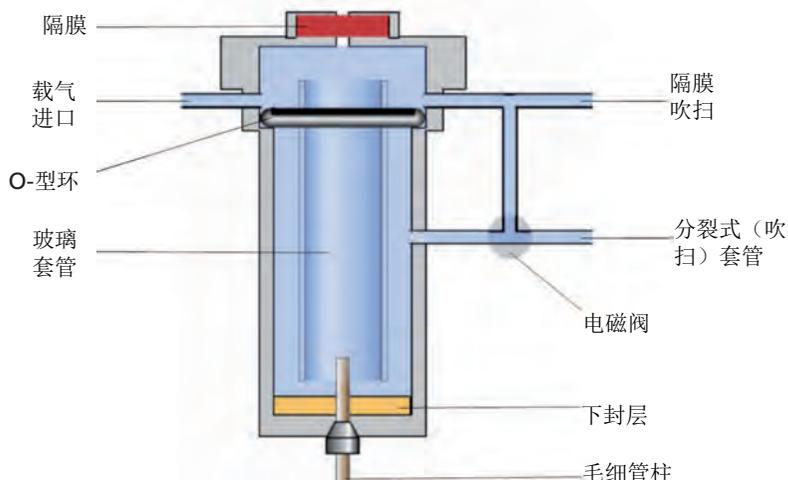
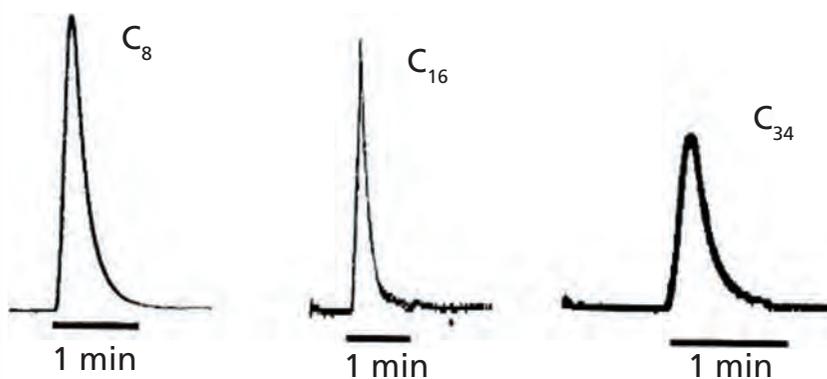


图2: 使用内径为2mm的玻璃套管在不分流条件下通过SPME法对三种烷类的进样剖面图



通过将玻璃套管用作将样品从注射器针头转移到色谱柱的场所解决了针头问题。所有常用的注射器针头都可以很容易地安装在分流和不分流进样口的玻璃套管中。质量问题在分流进样中很明显，可以用一个简单的例子来说明。质量为1-mg (1- μ L)、分流比为100:1的液体样品可以使10 μ g样品进入色谱柱。如果分析物的浓度是1ppm，那么到达检测器的质量（假设在色谱柱或进样口中没有损失）可以估计为10pg，这低于许多检测器的检测极限。虽然一般认为分流进样非常简单，但在痕量分析上使用非常有限。

不分流进样部分缓解了这个问题，因为它实现了将几乎所有进样引入柱中。在上面的例子中，未考虑到分流比，因此进入色谱柱的质量约为1ng，这更适合于大多数检测器。第二个质量问题出现在用于描述在上述两个例子中到达色谱柱的分析物质量的“估计”一词中。虽然对于大多数定量分析来说，校准技术大多可以缓解这一问题，但在分流或不分流进样时，实际到达色谱柱的分析物质量并不准确。最近，Bai及其同事通过无需使用标准品即可进行伪绝对定量的真空紫外检测法检查了分流和不分流进样的效率（4）。他们分析了几个变量，包括

分流比、不分流“吹扫”时间和进样量。在分流比的研究中，在分流比为5:1至200:1的所有情况下，用GC-VUV测量的实际质量显著低于使用样品浓度、进样体积和分流比计算的预期质量。在较低的分流比下，性能会变得更差。

在分流和不分流进样中，重要的是避免在样品蒸发时过多蒸汽使玻璃套管超载。许多典型的玻璃套管的体积为1mL或更小，但是根据溶剂的不同，1- μ L液体体积在完全蒸发时可以有200 μ L-1.2mL或更大体积。为了帮助解决这个问题，在线提供了几种溶剂蒸汽体积计算器（1, 5-6）。这些计算器可用于估算在进样过程中产生的溶剂蒸汽，并将其与典型玻璃套管的体积进行比较。务必保持溶剂蒸汽量低于玻璃套管容积。如果溶剂蒸汽回流到通往进样口的气体管道中，并带走一些蒸发的分析物，这种效应也会导致质量问题。

在不分流进样和少数情况下的分流进样中，特别是在分流比较低时，时间问题是一个重大挑战，被Grob（3）称为“时间谱带增宽”。在不分流进样的“吹扫”期间，通过玻璃套管的气流减少以匹配色谱柱中的流量。对于许多典型的毛细管柱，该流速约为1mL/min。如果玻璃套管的体积约为1 mL，则载气可能需要约1分钟才能将进样扫入色谱柱，因此到达色谱柱的初始峰宽约为1分钟！

图2显示了在不分流条件下进样口实际峰值的一些剖面图。这些剖面图通过在进样口与火焰离子检测器之间放置非常短的空熔融石英传输线，并使用SPME进样（因此不存在溶剂）而获得。需要注意的是峰宽大约为1分钟，并且不是完全对称的。峰增宽的主要原因是样品从SPME纤维穿过玻璃套管

进入色谱柱内需要时间。另请注意，样品的痕迹可能会长时间保留在进样口中，通常比“吹扫”时间长得多。尽量减少样品穿过玻璃套管所需的时间应该是方法开发的目标。

显然，大多数不分流进样产生的峰在检测器和色谱图上的最终宽度不会超过1分钟。在GroB的书中详细描述了几种目前在用的峰值对焦机制（3）。这些机制导致了一些特定于不分流进样的重要优化点：

- 使用冷阱重新聚焦高沸点溶质。如果可能，启动温度程序，使温度至少比分析物的正常沸点低100°C。
- 利用溶剂效应重新聚焦低沸点溶质。启动温度程序，使温度至少比溶剂的正常沸点低30-40 °C。对于大多数溶剂，为了方便起见，我在40°C下启动温度程序。溶剂效应的影响随着分析物正常沸点的增加而减小。
- 使用窄孔直筒玻璃套管，但在溶剂蒸发时要注意可能的衬管超载。玻璃棉之类的障碍物和材料会聚集污垢，并可能引起大量它们能够解决的问题。
- 使溶剂的极性与色谱柱的极性相匹配。在非极性色谱柱中使用非极性溶剂。

为了利用这些优化，所有使用不分流进样的方法都应该进行温度编程。

污染物问题与样品的组成有关，并且进样口和色谱柱内表面的化学反应可能特别具有挑战性。显然，污浊的样品会污染色谱柱或进样口，从而缩短色谱柱寿命。采用玻璃套管的分流-不分流进样口设计确实通过为非挥发性样品组分提供一个着陆点，防止了一些色谱柱污染。然而，在不分流进样后留下的非挥发性样品组分或残

余组分可能留在表面上并造成污染。

当液体样品从注射器注入到分流-不分流进样口时会发生什么？

大多数介绍气相色谱的短期课程和书籍告诉我们，注入的样品在闪蒸后与载气混合，在气相下作为均匀混合物转移到色谱柱中。研究人员已经设计出许多玻璃套管以帮助实现这一概念。然而，两个常识性的实验证明，该过程的描述是不准确的，并且需要小心避免在进样口中的反应和污染。

图3显示了在类似于热进样口表面的热铸铁锅上浇注大约5mL水（与样品类同）的结果。这个实验是在家里完成的，但是也可以在实验室中用热板进行。水不仅不会立即蒸发，而且由于水和表面之间形成了一层蒸汽层，水还会跳动。这就是当液体样品撞击加热进样口内表面时的真实情况。很明显，加热进样口中的蒸发过程不容易控制，当然也不可再现。这种效应也是造成注射器针头歧视的主要原因，这种歧视在人工进样中很常见，是由于注射器针头在进样口受热造成的。

第二个简单的实验是简单地看一下用一个典型的10 μ l注射器（用于GC）射水的距离。想要将液体喷射到比进样口长度更远的地方很容易。本实验表明，液体在离开注射器时不太可能散开和闪蒸。它可能直接被射向它遇到的第一个表面，然后以类似于煎锅的方式蒸发。GroB的书（3）包括一张DVD和演示这个过程的几个视频。其中一些视频可以在网上看到（9）。这些加热效应是第五个挑战，即歧视的主要原因。它们可以使一些分析物优先蒸发并被带到色谱柱中，而其他组分不会有效蒸发并且仅部分转移或

根本不进入柱中。由于加热控制不好，歧视也无法得到控制。进样口的歧视和污染是导致气相色谱中精确度与准确度问题的主要原因。

基于这五个挑战，以下快捷键可以帮助分析师减少歧视与污染，并最大限度的利用传统的分流和不分流进样口：

1. 保持进样口加热和载气流动，以减少污染。批次之间的气体节省模式将减少载气消耗。
2. 使用快速自动进样器进行液体样品进样，速度越快越好。
3. 为您的样品选用最好的玻璃套管。分流和不分流进样口的套管是不同的。没有对于所有样品都适用的万能子弹套管。在进行方法优化时，您应该测试几种不同的套管。
4. 检查清洁度并定期清洁进样口。使用手电筒查找进样口底部的碎屑，如果看到任何碎屑，将其清理干净。
5. 经常更换隔膜。与许多自动取样器一起使用的宽而钝的针头可以迅速去除取样器的核心，并造成泄漏。

为什么我们还在采用热进样？

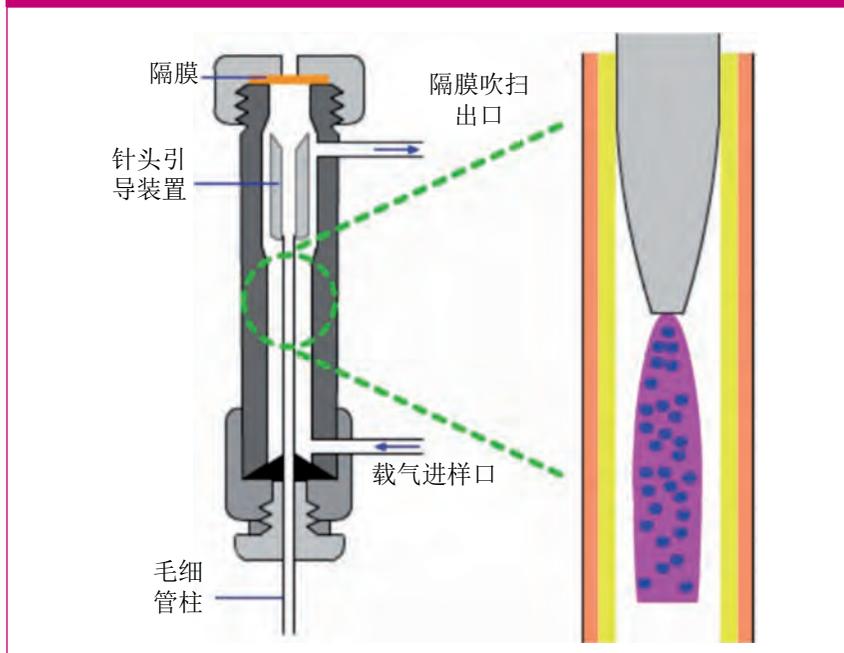
使用分流和不分流进样口所涉及的大多数挑战都是因为进样口被加热。加热这些进样口的原因是在色谱柱气相色谱中，高温加热是使分析物通过该色谱柱的唯一途径。在传统的色谱柱中，气-液相色谱柱中存在的大量固定相，或气固色谱柱中有较大的表面积，通常意味着分析是在高于分析物正常沸点的温度下进行的。因此，在整个分离过程中，包括进样、分离和检测，都需要高温加热。色谱柱进样口通常也非常简单：注射器针头直接插入色谱柱中，因此关于上述毛细管进样口的许多问题都不会发生。

图3: 将约5mL水加入热铸铁煎锅中的结果。水完全蒸发大约需要10秒。注意, 一些水滴是有色的, 这是由于在煎锅表面上受污染的结果。



在毛细管气相色谱中, 色谱柱中存在的低质量固定相会改变GC分离所依据的平衡条件。在大多数隔膜处于较薄和中等厚度的情况下, 分离是在低于正常沸点的温度下进行的。因此, 传统的分流和不分流进样涉及将样品从注射器中排出、在玻璃套管中蒸发、通过玻璃套管将蒸汽传输到色谱柱中、以及冷凝到色谱柱中的固定相

图4: 显示进入柱内的主要部件和注射器针头的冷柱头进样口示意图



中。每一个步骤都可能涉及复杂的化学反应, 且如图3所示, 它们可能以一种不受控制的方式发生。

这个可能的难题导致了一个问题, “我们为什么还在采用热进样?”

PHOTONIS
Scientific

REVEAL THE INVISIBLE

Photonis engineers and manufactures custom ion and electron detectors and inlet tubes for use in mass spectrometers and other analytical instruments. We offer a comprehensive selection of detectors suitable for portable and benchtop instruments which provide superior lifetime and enhanced performance so you will be the first to identify any unknown matter.

Learn how our technology can refine your analysis. Visit us at analytica China stand E4.4706 or at www.photonis.com.

这个问题的错误答案是没有其他选择。几乎每种毛细管气相色谱仪都有两种可供选择的方法：柱头进样口和PTV。通过将样品注入冷却进样口而非热进样口，这两种进样口都消除了与热进样和玻璃套管表面有关的大多数污染和歧视问题。这种方法在进样过程中保持注射器针和进样口冷却。然后，在注射器被移除之后，加热进样口以便将分析物送入柱中。柱头和PTV进样口已经存在数十年，但它们仍然是小众技术，尽管它们可以减少或消除关于分流和不分流进样口的主要问题。柱头进样口就是：将注射器针头直接插入柱的末端，并使液体样品沉积在柱头上。然后将进样口与色谱柱一起进行温度编程以产生分离。使用该进样口完全消除了进样期间的加热和玻璃套管，从而消除了上述这些步骤可能产生的所有问题。低温柱头进样口特别适用于热不稳定分析物的痕量分析，特别是在需要惰性进样口的情况下。柱头进样口的最大优点，即离开注射器的整个样品进入色谱柱，也是其最大的缺点。如果整个样品进入色谱柱，任何非易失性基质组分也会进入色谱柱，只需几次进样即可轻松污染色谱柱。

除了可能发生色谱柱污染外，柱头进样口的另一个主要缺点是注射器。传统的注射器可以与内径为530- μm 的巨孔色谱柱一起使用；但是，内径较小的色谱柱需要带有锥形针头或熔融硅胶针头延伸件的特殊注射器，这些针头延伸件非常脆弱，难以处理。

图4显示了典型的柱头进样口的组件。与其他进样口类似，在进样期间，注射器穿过隔膜。针头引导装置确保了注射器针头与色谱柱正确对齐，以便针头可以进入色谱柱而不会卡住或弯

曲。载气以类似于色谱柱的方式绕过色谱柱的外部，然后通过针头引导装置进入色谱柱。隔膜吹扫用于保持隔膜清洁，这一点尤其重要，因为进样口在大部分时间都是冷却的。在图4的右侧描绘了离开注射器的液体样品。当液体从注射器中流出时，它会覆盖柱内的前几厘米。当柱温升高时，液体将以类似于不分流进样中的溶剂效应的方式被除去。

在带有三通管的排出口后将一个预柱添加到分析柱上并添加一个外部蒸汽出口，从而使其具备溶剂蒸汽出口功能，可以使柱头进样口使用高达数百微升的大体积进样，并随之提高检测极限（10）。

冷柱头进样口的优点是显而易见的，因为样品是在没有加热的情况下注入的。这种方法允许样品从注射器中流出，而不会因针头加热而造成损失，并且将整个注入的样品沉积在柱中，不会因加热的进样口和玻璃套管而造成损失。简易和低载气使用是额外的优势。如果惰性和痕量分析是分析要求，则柱头进样口是首选的进样口。其主要缺点是色谱柱直接暴露在样品中，因此污浊的样品可能会迅速污染色谱柱，导致更需要修整或更换色谱柱。

1979年，Vogt及其同事修改了一个分流-不分流进样口，类似于图1所示，可以快速实现玻璃套管的加热和冷却（11，12）。简而言之，他们移除了包含玻璃套管的高热质块，换上了一个用加热胶带包裹的低热质管。这种改进允许进样口以四种模式操作：传统的热分流和不分流及冷分流和不分流。在两种冷模式下，注入后进样口迅速加热，使样品在比传统热分流和不分流模式更可控的条件下转移到柱

上。这个进样口和过程（PTV）是高度通用的，但需要额外的培训和方法开发才能有效使用。PTV进样口在20世纪90年代广泛使用，当时它在文献中引起了相当大的关注。虽然现在这种方法仍可使用，但却不普遍，这也许是因为它的额外成本和复杂性。

从示意图上看，PTV进样口类似于图1所示的非分流进样口。玻璃套管周围的低热质实现了快速加热和冷却，并实现了多种操作模式：

- 热分流与传统分流一样。
- 热不分流与传统的的分流一样。
- 冷分流和不分流涉及在分流或不分流条件下将样品注入到冷却进样口中，通常注入到填充或带挡板的玻璃套管中。该技术允许样品从注射器中喷出并在冷却的同时落在进样口的内表面上，从而避免类似于图3中所示的蒸发效果。然后快速加热进样口使样品进入柱中。这些技术对于热不稳定性或敏感性分析物特别有用，因为可以控制样品加热速度。冷分流和不分流也减少或消除了由于蒸汽过载和注射器针头歧视造成的样品损失。
- 冷不分流溶剂排放或大容量进样是冷不分流技术的一种变体，可以注入更大的样品体积。该技术将高达数百微升体积的溶剂注入冷却的填充玻璃套管中。填料用于在将溶剂通过运载气流蒸发到排气口的同时将液体保持在适当位置。在蒸发过程中，未发生从进样口到色谱柱的流动。在约95%的溶剂蒸发后，剩余的样品（包括现在浓缩的分析物）在不分流的条件下被转移到色谱柱中。

在液相色谱分离中我们何时需要亚2 μm 表面多孔颗粒?

David S. Bell¹、Landon Wiest²、Shun-Hsin Liang² 和 Dan Li², ¹观察专栏编辑, ²美国宾夕法尼亚州贝尔丰特市Restek公司

如今, 表面多孔颗粒 (SPP) 在现代高效液相色谱 (HPLC) 中的应用非常普遍。最初, SPP 作为亚2 μm 全多孔颗粒 (FPP) 的替代品出现。近年来, 许多色谱柱制造商开发了使用2 μm 及以下SPP的产品。本文研究了这些小型SPP设计的实用性。

2006年, Advanced Materials Development公司推出的现代表面多孔颗粒 (SPP) 使高效液相色谱 (HPLC) 发生了革命性的变化。人们对于这些以固体内核和多孔外层为特征的颗粒的

研究兴趣源于它们在适当背压下产生的高效率 (1)。在SPP出现期间, 为了提高效率, 研究人员将工作重心主要集中在减少填料颗粒的体积上。术语“超高压液相色谱”或UHPLC

由Jorgenson在1997年创造, 并且依据的是对填充有1-1.5 μm 颗粒的纳米孔柱的研究 (2)。2004年, Waters公司推出了第一款能够在高达1000巴的压力下运行的商用液相色谱系统。随着亚2 μm 颗粒填充柱的出现, UHPLC的时代也随之诞生。小的亚2 μm 颗粒导致需要仪器能够在高系统背压下操作。SPP设计经证明是较小的全多孔颗粒 (FPP) 的可行替代品, 因为填充有亚3 μm SPP材料的色谱柱在标准HPLC系统的可达背压下提供了与亚2 μm FPP色谱柱类似的效率 (3)。

自粒径在2.7 μm 左右的SPP柱开始出现以来, 许多制造商开发了使用更小粒径以及具有不同孔结构的颗粒的固定相。2014年, Fekete与合著者们预测, UHPLC的未来趋势将是与亚2- μm SPP柱结合 (4)。作者们指出, 由于涡旋扩散的显著改善、纵向扩散的适度减少以及传质阻力上的一些改善, SPP比相同粒径的FPP能提高30%-50%的效率, 无论颗粒大小如何。因此, 较小

图1: 用于分离34种全氟化合物的1.8 μm 和2.7 μm 表面多孔颗粒柱的比较。色谱柱: (a) Raptor C18, 1.8 μm ; (b) Raptor C18, 2.7 μm ; 色谱柱尺寸: 50 mm x 2.1 mm; 移动相A: 在水中添加5 mM醋酸铵; 移动相B: 甲醇; 梯度: 6分钟内为20-95% B; 流速: 0.4 mL/min; 色谱柱温度: 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测: 质谱分析法

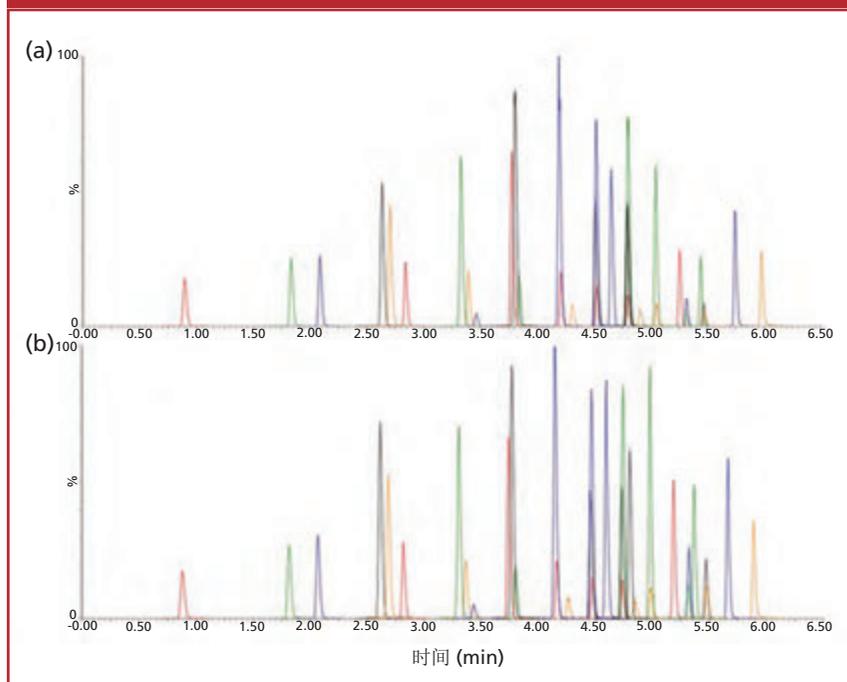
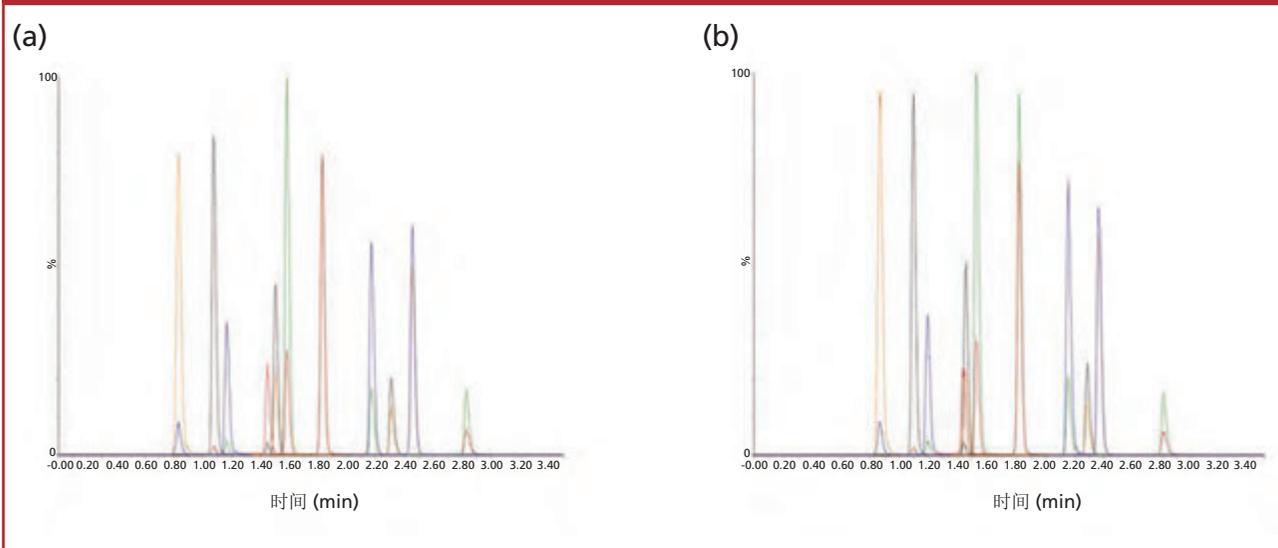


图2: 用于分离11种人造甜味剂的1.8 μm 和2.7 μm 表面多孔颗粒柱的比较。

色谱柱: (a) Raptor Biphenyl, 1.8 μm ; (b) Raptor Biphenyl, 2.7 μm ; 色谱柱尺寸: 50 mm \times 2.1 mm; 移动相A: 在水中添加0.1%甲酸; 移动相B: 在乙腈中添加0.1%甲酸; 梯度: 3分钟内为5%-55% B; 流速: 0.3 mL/min; 色谱柱温度: 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测: 质谱分析法



SPP的效率提高应与在FPP中观察到的趋势类似。他们同时指出, 当时只有两个亚2 μm 的色谱柱可供商业使用。DeStefano及其合著者指出, 较小SPP的优点包括效率提高、检测灵敏度提高、每次分析的移动相位消耗降低、峰容量提高以及对最先进技术的感知。作者们也指出了以下缺点:

- 较小的颗粒需要具有最小柱外体积和小内径连接管(管塞、高压升高)的较高压力仪器;
- 高压操作可使仪器维修更加频繁;
- 较小的柱筛板可能比用于较大粒径色谱柱的较大筛板更容易堵塞;
- 色谱柱可能不会表现出预期的效率, 因为较小的颗粒更难包装。

作者指出, 较小的颗粒确实为某些应用提供了实用性, 但效率优势通常无法克服这些缺点(6)。

在2015年中期, 商用2- μm 和亚2- μm 色谱柱的可用性仍然有限。Advanced Material Technologies公司和Supelco

公司曾推出表面经过多次改进的2- μm 色谱柱系列。Phenomenex曾提供了Kinetex品牌的1.3- μm (C18)和1.7- μm 版本色谱柱。Thermo Fisher Scientific公司曾将1.4- μm C18推向市场, Waters推出过采用裸硅和C18表面化学的1.6- μm 平台(7)。在2016年的一次回顾中, 没有新供应商进入2- μm 和亚2- μm SPP市场; 但是, 市场上出现了两个额外的固定相, 即Kinetex EVO-C18和HALO Peptide ES C18(Mac-Mod)(8)。在2017年, 安捷伦公司在1.9- μm SPP上引入了许多化学物质, 包括用于HILIC的裸硅。ChromaNik公司采用2- μm 格式推出了SunShell, Waters公司推出了采用其他化学成分的1.6- μm Cortecs, Phenomenex公司则推出了用于RNA和DNA表征的1.7- μm SPP柱(9)。从这些例子中可以清楚地看出, 小型SPP的趋势确实在继续。近年来发表的许多出版物中提及了关于在各种学科中应用各种体积SPP相

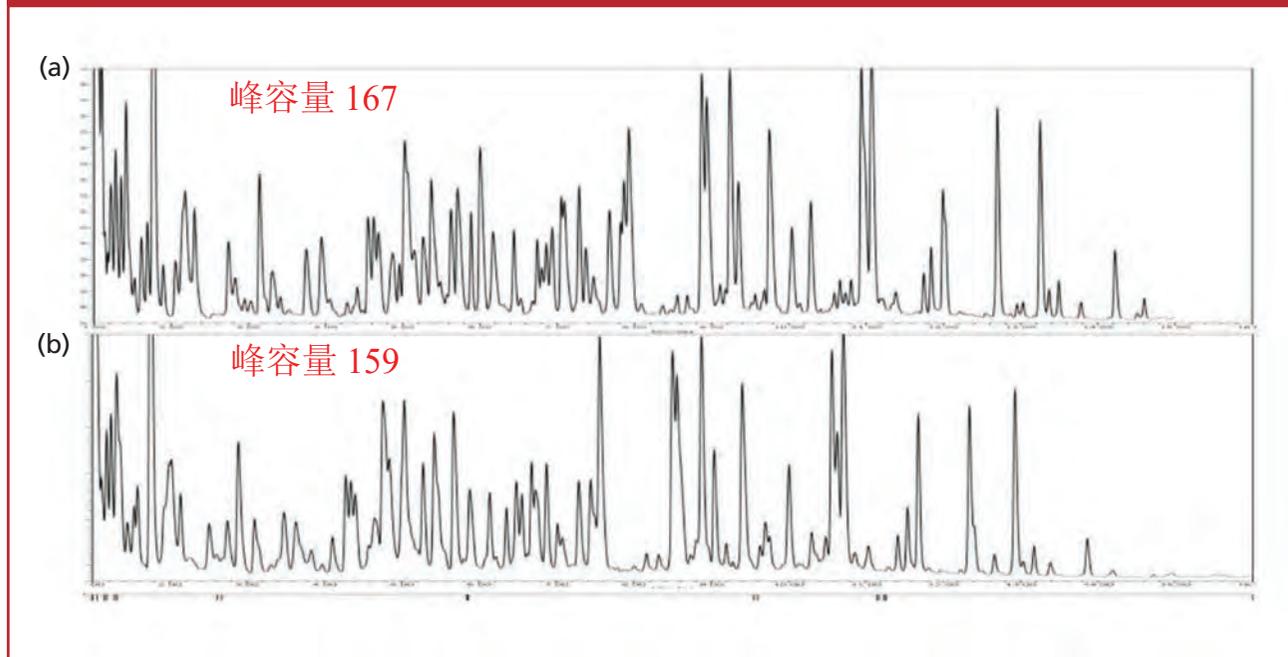
的研究。

在针对色谱观察的这一部分查找的文献中, 没有发现明确地将亚3- μm SPP相与亚2- μm SPP相进行比较的“应用”出版物。在对用于药物代谢物组学的市售UHPLC柱的系统评价中, Dubbelman及其合著者发现1.3- μm 和1.7- μm SPP可以提供高效分离。然而, 当使用1.3- μm 颗粒尝试通过提高流速缩短运行时间时, 他们遇到了系统压力的问题(10)。

因此, 这个问题仍然存在: “是否需要使用2- μm 或亚2- μm SPP相, 或者亚3- μm SPP相是否足够?”这个问题的答案取决于当时进行的分析。例如, 图1显示了在1.8- μm SPP和2.7- μm SPP中全氟化合物(PFC)相当复杂的分离。由于在灵敏度、分辨率或峰形方面观测到的差异非常小, 因此很难证明使用1.8- μm 相在较高的背压下使用该方法合理的。图2给出了对使用1.8- μm 和2.7- μm SPP的联苯色谱柱分离人造甜味剂的比较。在这种情

图3: 用于分离胰蛋白酶消化牛血清白蛋白的1.8- μm 与2.7- μm 表面多孔颗粒的比较。

色谱柱: (a) Raptor ARC18, 1.8 μm ; (b) Raptor ARC18, 2.7 μm ; 色谱柱尺寸: 100 mm \times 2.1 mm; 移动相A: 在水中加入0.1%三氟乙酸; 移动相B: 在乙腈中加入0.1%三氟乙酸; 梯度: 6分钟内为10%–20% B, 在第15分钟为20%–40% B; 流速: 0.3 mL/min; 色谱柱温度: 60 $^{\circ}\text{C}$; 检测: 质谱分析法



况下, 1.8- μm 相位比2.7- μm 相位表现出更高的分辨率。样品越复杂, 可能就越需要提高效率。图3给出了对在1.8- μm 和2.7- μm SPP的C18色谱柱上进行牛血清蛋白(BSA)胰蛋白酶消化的比较。从更高的峰值容量可以看出, 当使用较小的SPP柱时, 对于这样复杂的样品, 提高效率可能会变得更加重要。

正如许多关于色谱的问题一样, 是否需要涉足2 μm 和亚-2 μm SPP领域的答案是“视情况而定”。看起来, 随着分离复杂性的增加, 需要更小SPP提供更高效率的可能性也会增加。然而, 在许多情况下, 即使是在两种或三种分析物分离中, 紧密洗脱的化合物可能需要提高效率 and 更小的SPP相。在实践中, 使用亚3- μm SPP柱通常是方

法开发的合适折衷方案。在方法优化期间调整至较小(或较大)的粒径可以提供更合适的最终方法。

参考文献

- (1) J.J. Kirkland, S.A. Schuster, W.L. Johnson 和 B.E. Boyes, 制药分析 **3**, 303–312 (2013)。
- (2) J.E. MacNair, K.C. Lewis 和 J.W. Jorgenson, 分析化学 **69**, 983–989 (1997)。
- (3) V. González-Ruiz, A.I. Olives 和 M.A. Martín, 分析化学发展趋势 **64**, 17–28 (2015)。
- (4) S. Fekete, J. Schappler, J.L. Veuthey 和 D. Guillarme, 分析化学发展趋势 **63**, 2–13 (2014)。
- (5) S. Fekete 和 D. Guillarme, 色谱法杂志A辑 **1308**, 104–113 (2013)。
- (6) J.J. DeStefano, B.E. Boyes, S.A. Schuster, W.L. Miles 和 J.J. Kirkland, 色谱法杂志A辑 **1368**, 163–172 (2014)。
- (7) D.S. Bell 和 R.E. Majors, LCGC 欧洲 **28**(6), 325–334 (2015)。
- (8) D.S. Bell, LCGC 欧洲 **29**(4), 214–224 (2016)。
- (9) D.S. Bell, LCGC 欧洲 **30**(4), 196–207 (2017)。
- (10) A.C. Dubbelman 等人, 色谱法杂志A辑 **1374**, 122–133 (2014)。

Landon Wiest 是Restek公司的LC应用科学家。在过去的五年中, Landon一直致力于开发LC产品, 现在他将注意力集中到LC在食品安全领域的应用上。

Shun-Hsin Laing 是Restek公司的高级LC应用科学家。他于1988年获得国立台湾大学学士学位, 并于1996年获得密歇根州立大学的博士学位。

Dan Li 是Restek公司的应用科学家。她的工作重点是在制药、食品和环境领域使用LC-MS和GC-MS。

David S. Bell 是Restek公司研究与开发部门的主管。他还是LCGC编辑顾问委员会的成员和观察专栏编辑。欲联系请发送邮件至: LCGCedit@ubm.com

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, 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

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VICIDBS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

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、薄层膜和96孔薄层板。



www.mn-net.com
德国迪伦Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

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喷能力, 具有95%的回收率及99%的纯度。



www.gilson.com
美国威斯康星州米德尔顿Gilson

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

Determination of Pharmaceuticals from Serum

Hans Rainer Wollseifen, Johannes Brand, and Detlef Lambrecht, MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG

This application note describes the determination of pharmaceuticals from serum using solid-phase extraction (SPE) with the hydrophilic-lipophilic balanced SPE phase CHROMABOND® HLB for analyte enrichment and for sample cleanup. The eluates from SPE are finally analyzed by HPLC–MS/MS on a NUCLEOSHELL® PFP core-shell phase.

Nowadays, people suffer from various diseases, and are prescribed many types of pharmaceuticals as part of their treatment, for example, anesthetics, antibiotics, anticholinergics, anticonvulsants. In order for the treatment to be successful, it is necessary to keep controlling the levels of the pharmaceuticals to provide an accurate dosage. This has led to an increasing demand for the development of accurate and sensitive analytical methods to analyze the pharmaceuticals from serum to protect human health.

Table 1: SRM transitions for the investigated pharmaceuticals

Analyte	Retention Time (min)	[M-H]	Q ₁ (Quantifier)	Q ₂ (Qualifier)
Atenolol	1.12	267.2	145.2	74.1
Sulfapyridine	1.72	242.9	130.9	96.9
Atropine	1.81	290.2	124.2	93.0
Sulfamerazine	1.82	265.1	156.0	91.9
Ketamine	1.87	238.2	125.1	179.1
Chlorpheniramine	2.27	275.1	230.0	167.0
Sulfachloropyridazine	2.47	285.1	156.0	91.9
Sulfadoxine	2.63	311.1	156.0	92.1
Sulfamethoxazole	2.70	254.1	155.8	91.8
Propranolol	2.74	260.2	116.2	182.9
Diphenhydramine	2.94	256.1	166.9	152.1
Amitriptyline	3.04	278.2	223.0	91.0
Sulfaquinoxaline	3.14	301.1	156.1	92.1
Nortriptyline	3.32	264.2	232.9	91.1
Verapamil	3.36	455.2	165.0	150.1
Trimipramine	3.41	295.2	100.1	58.0
Carbamazepine	3.50	237.1	194.1	193.0
Clomipramine	3.67	315.1	86.1	58.0
Indapamide	3.77	366.1	132.1	91.1
Ketoprofen	4.28	255.1	77.0	105.0

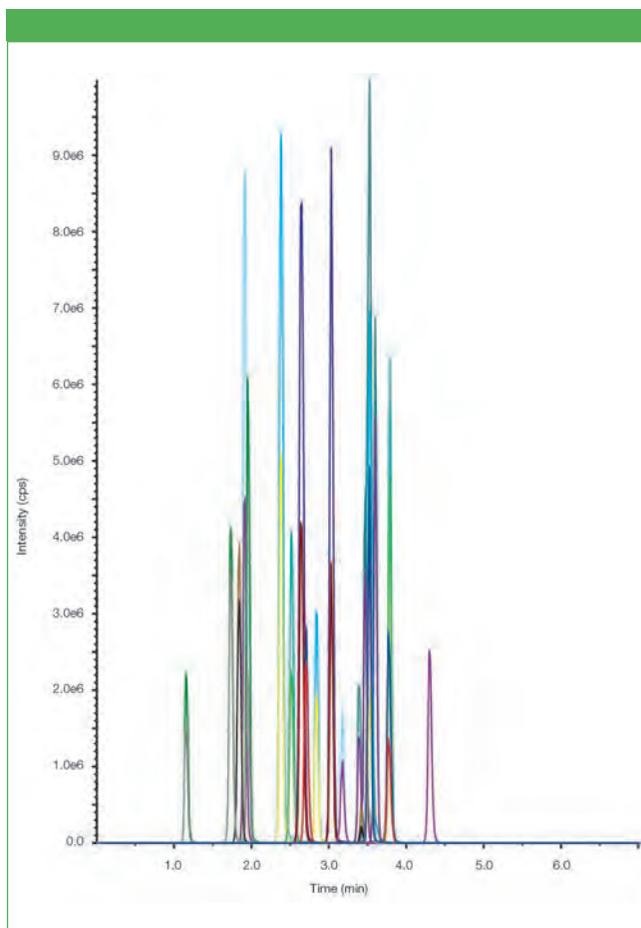


Figure 1: Chromatogram of serum sample spiked with 10 ng/mL for each pharmaceutical.

Solid-Phase Extraction (1)

SPE column: CHROMABOND® HLB, 1 mL, 30 mg, MACHERY-NAGEL REF 730921

Column conditioning: 1 mL methanol, then 1 mL water

Sample application: 1 mL spiked serum sample is passed through the column by vacuum.

Washing: 1 mL water

Drying: 10 min with vacuum

Elution: 2 mL methanol

Eluent exchange: Eluate is evaporated to dryness at 40 °C under a stream of nitrogen and reconstituted in 1 mL 95:5 (v/v) water-acetonitrile.

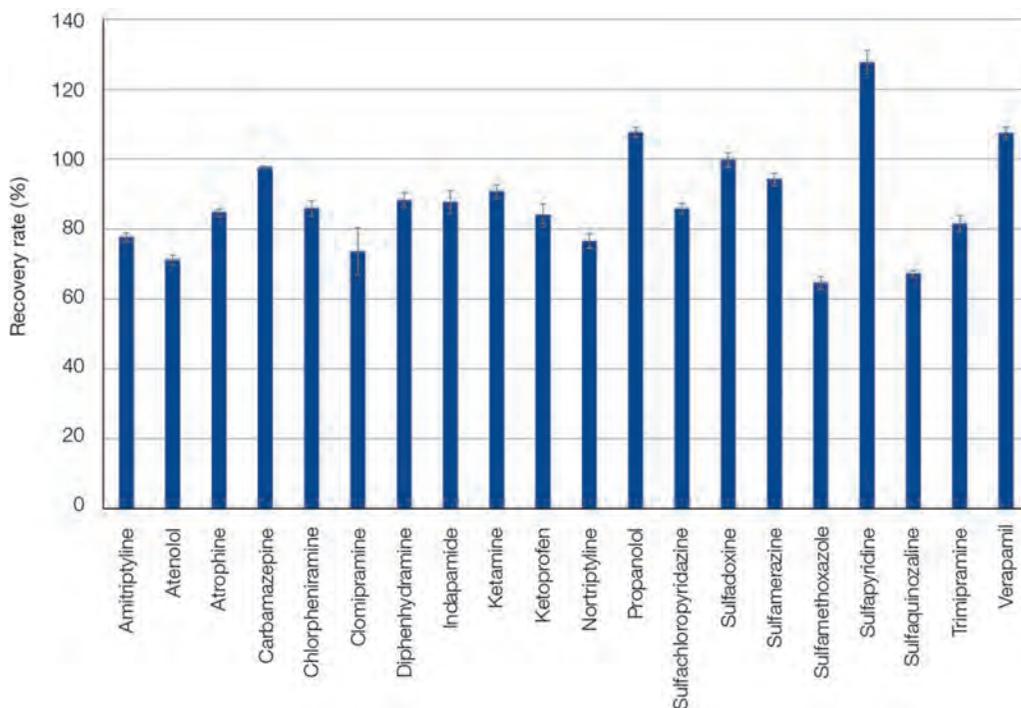


Figure 2: Recovery rates for solid-phase extraction method of pharmaceuticals from serum.

Subsequent Analysis: HPLC–MS/MS (2)

HPLC column: EC 50/2 NUCLEOSHELL® PFP, 2.7 μm , MACHERY-NAGEL REF 763532.20

Eluent A: 0.1% formic acid in water

Eluent B: 0.1% formic acid in acetonitrile

Gradient: 5–95% B in 7.5 min, 95% B for 1 min, 95–5% B in 0.5 min, 5% B for 5 min

Flow rate: 0.3 mL/min

Temperature: 30 °C

Injection volume: 5 μL

MS/MS detection: API 5500 (AB Sciex GmbH); ion source: ESI; positive ionization mode; scan type: selected reaction monitoring (SRM, for transitions see Table 1); detection window: 90 s; curtain gas: 40 psig; ion spray voltage: 5500 V; temperature: 500 °C; nebulizer gas: 45 psig; turbo gas: 45 psig; CAD: medium.

Results

The recovery rates show that the determination of pharmaceuticals from serum could be carried out successfully (Figure 2). By using SPE with CHROMABOND® HLB, it was possible to recover nearly all pharmaceuticals from serum, with good reproducibility on average. Regarding the different types of pharmaceuticals, the average recovery rates were: for anesthetics 90.8%, antibiotics 94.4%, anticholinergics 84.8%, anticonvulsants 97.7%, antidepressants 77.4%, antihistamines 87.1%, anti-inflammatory drugs 84.1%, beta blockers 89.5%, calcium channel blockers 107.5%, and for diuretics 87.7%.

The identification and quantification of pharmaceuticals in the solid-phase extracts were performed using ESI-MS on an EC 50/2 NUCLEOSHELL® PFP column. The chromatogram in Figure 1 shows the results of solid-phase eluate spiked with 10 ng/mL serum for each pharmaceutical.

Conclusion

The presented application describes a quick and convenient method for the determination of pharmaceuticals from serum by SPE with a hydrophilic-lipophilic balanced phase, followed by HPLC–MS/MS analysis.

References

1. Application No. 306510, MACHERY-NAGEL, available from www.mn-net.com/apps
2. Application No. 128200, MACHERY-NAGEL, available from www.mn-net.com/apps



MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG

Neumann-Neander-Str. 6 – 8, 52355 Düren, Germany
Tel.: +49 24 21 969 0 Fax: +49 24 21 969 199
E-mail: info@mn-net.com Website: www.mn-net.com

Investigation of Iron Polysaccharide Complexes by GPC/SEC Using RI- and UV-Detection

PSS Polymer Standards Service GmbH

Gel permeation chromatography (GPC), also known as size-exclusion chromatography (SEC), provides an easy and effective way to measure the molar mass distribution and the amount of free, unbound polysaccharide in iron polysaccharide complexes.

Iron is an essential nutrient in the human body. In case of iron deficiency, complexes of a polysaccharide and iron are applied as drugs to enhance low iron levels. Suitable characterization of these complexes and their formulations are mandatory for regulatory reasons, quality control, and research. In the present investigation, iron polysaccharide complexes from different sources were analyzed on a GPC/SEC system with simultaneous ultraviolet/refractive index (UV/RI) detection.

Experimental Conditions

GPC/SEC was performed using a PSS BioSECcurity SEC system

Columns: PSS SUPREMA, 5 μm , 30 \AA + 2 $\times 1000$ \AA
(8 \times 300 mm, each)
PSS SUPREMA precolumn

Eluent: 0.1 n NaNO_3 in 0.01 m phosphate buffer at pH = 7

Temperature: Ambient

Detection: UV @ 254 nm, refractive index (RI)

Calibration: PSS Pullulan ReadyCal standards

Concentration: 2 g/L for dry material, approx. 50 g/L for formulations

Injection volume: 25 μL

Software: PSS WinGPC UniChrom 8.2

Results and Discussion

Figure 1 shows the overlay of the UV-chromatograms of the four different samples A, B, C, and D, while the inset of the figure shows the overlay of the simultaneously measured RI-traces for two of the samples (A and B), which show nearly identical UV-traces.

An advantage of this application is that the iron polysaccharide complex is selectively detected by the UV-detector operated at 254 nm (20–26 mL). All complexes reveal well shaped nearly Gaussian peak shapes, indicating that the PSS SUPREMA column combination is ideal for this molar mass separation range. By applying a calibration curve, established using PSS pullulan standards, the relative molar mass distributions as well as the molar mass averages and the polydispersities are derived.

While UV-detection is sufficient to differentiate between three of the four samples, samples A and B render identical elution

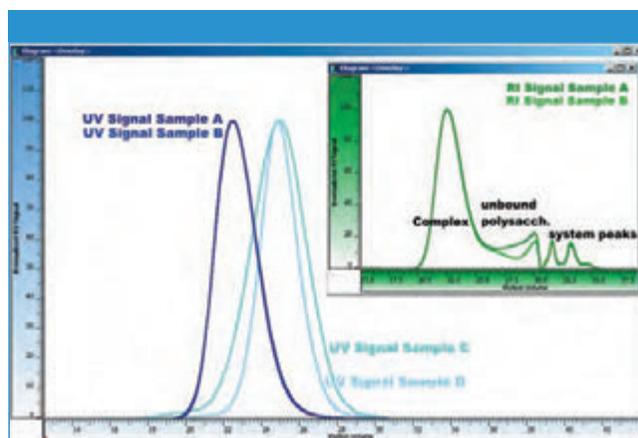


Figure 1: Comparison of the UV-traces of four different iron dextran samples used to determine the molar mass distribution of the iron complexes. While the UV-signals for samples A and B are nearly identical, the inset displaying the RI-traces shows that these samples differ in the amount of unbound polysaccharide.

profiles. However, when comparing the RI-traces of both samples, it becomes clear that sample A contains a significantly higher amount of the unbound polysaccharide.

We can therefore conclude that GPC/SEC with UV- and RI-detection does not only allow the molar mass distribution of iron polysaccharide complexes to be determined, but also provides information on the amount of free, unbound polysaccharide ensuring a more comprehensive characterization of the samples.



PSS Polymer Standards Service GmbH

In der Dalheimer Wiese 5, D-55120 Mainz, Germany

Tel: +49 6131 962390 fax: +49 6131 9623911

E-mail: info@pss-polymer.com

Website: www.pss-polymer.com

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

绿色环保 的分析表现



MPS robotic 表现



无溶剂
顶空/SPME



SPE/蒸发/过滤



无溶剂
热脱附/SBSE (Twister®)



GC 衬管替换/QuEChERS



条形码自动获取序列



QuickMix 震荡萃取/液体处理



无溶剂
动态顶空(DHS/DHS Large)



通过 **GERSTEL**

无溶或低溶剂的萃取，
净化及分析物富集技术