

2014年4月

关键词或短语：

用于HPLC分析的超纯水
无鬼峰 - 旨在获得最佳结果

用于HPLC分析的超纯水 超纯水的作用

Katrin Töppner女士¹, Dirk Hansen博士²和Elmar Herbig博士³

1.赛多利斯泰帝生物技术有限公司, Goettingen, 德国

2. Phenomenex, 德国阿沙芬堡

3. 赛多利斯实验室仪器有限责任两合公司, Goettingen, 德国

引言

HPLC是一种使用液相色谱法分离、鉴定和定量物质的分析方法。HPLC诞生(高压液相色谱法)要追溯到上世纪60年代。由于柱材料和设备得到改进, 其自70年代末起就被称为高效液相色谱法。¹

在HPLC中, 使用进样器或泵将要分离的化合物通过溶剂(洗脱剂)或溶剂混合物(洗脱液|流动相)转移到柱中。柱是一根装满所谓的固定相的试管, 大多数情况下为不锈钢试管(另请参阅图1)。固定相通常由表面粘结有化学配体的多孔硅胶或聚合物颗粒组成。这些配体负责分析物与固定相之间的选择性相互作用, 而这是有效的色谱分离所必需的。涉及的分离机制可能是范德华力吸附、离子交换、离子排斥等, 具体要视样品和固定相而定。

样品中的物质在柱填充材料上的截留时间长短不一, 因此, 其会在不同的截留时间后离开柱。然后由检测器登记样品的单个组分并在计算机上进行评估。产生的结果即为色谱图(图1、5和6)。峰数与样品中所分离组分的数量向对应, 而峰面积则与所分离组分的浓度呈一定的比例(依据Kromidas 20001)。

常见的HPLC应用就是糖类分析。该分析在所进行的各种试验范围内进行的,目的是对膜质量进行特性分析。一方面是检测膜清除糖分子的能力,而另一方面是测定固定化酶膜的活性。为此,需要对糖类进行分析,如棉子糖、葡萄糖和果糖。这些类型的糖可使用酶法进行特异性检测,例如用于葡萄糖²的GOD | POD试验或光谱法,如根据Dische & Borenfreund³测定果糖。

在高级分析中,糖类现在常用薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)和高性能液相色谱法(HPLC)进行分析。如果必须对含有多种糖类的化合物进行分离,就必须要使用这些方法。⁵

在此处所述的HPLC中,洗脱液必须有特别高的物理和化学纯度,而且不能含有悬浮的机械颗粒或任何溶解的物质,因为其在一定的延迟时间后可能会被柱释放,并由此产生信号。一般来说,溶剂的质量对HPLC分析批的可靠性是决定性的。如果在梯度洗脱期间存在痕量污染物,也可能会导致出现“假峰或虚幻峰”。在分析批期间,此类痕量物质会在柱中累积,并在洗脱剂随后发生变化时大量释放。用作洗脱液的水不得含有微生物。为此,可以添加防止微生物和藻类在溶剂混合物中生长的物质,如铜盐或叠氮化钠。⁵与此同时,还要遵照制造商的建议,因为使用不正确的添加剂会对柱造成不可逆转的损害。

去离子水或蒸馏水仍然含有相当量的有机物质,其可能会导致形成假峰。⁵被污染的溶剂可能会导致沉积物在固定相上堆积,从而造成柱堵塞,其会表现为压力增加或样品运行时间出现变化。

使用Arium® Pro VF净化水质, 以用作洗脱液

HPLC所需的特殊质量的水可以从各个制造商处购买,或者直接使用Arium® Pro VF系统等实验室水纯化系统在现场直接按需制备。下面对分离糖混合物的试验作了描述,这些试验均将使用Arium® Pro VF制成的超纯水用作流动相(洗脱液)。

Arium® Pro VF超纯水系统说明

Arium® Pro VF系统(图2)设计主要目的是使用经过预处理的饮用水制备超纯水并去除饮用水中仍然存在的任何污染物。超纯水的生产需要连续的再循环和横档的水流率,这一点是利用压力受控的内置泵系统来实现。在给水入口和下游端口(产物水出口)直接测量水的电导率。本论文所述研究中使用的Arium® Pro VF系统(技术规格与下页所示的当前注册系统一样的前身模型)使用两种不同的滤芯。这些滤芯中填充有某种特殊的活性碳吸附剂和一种特殊的混合床交换树脂,以交付TOC含量低的超纯水。此外,该系统还有一个集成的紫外灯,在185nm和254nm的波长下分别有杀菌和氧化作用。Arium® Pro VF超纯水系统配备的内置超滤柱模块,可用作交叉流过滤器。该过滤器中安装的超滤柱膜可截留胶体、微生物、内毒素、RNA和DNA。在生成的超纯水分配期间,在水出口处安装的0.2μm终端过滤器起到去除颗粒物和细菌的作用。该装置净化水的流程如图3所示(Arium® Pro VF流程图)。

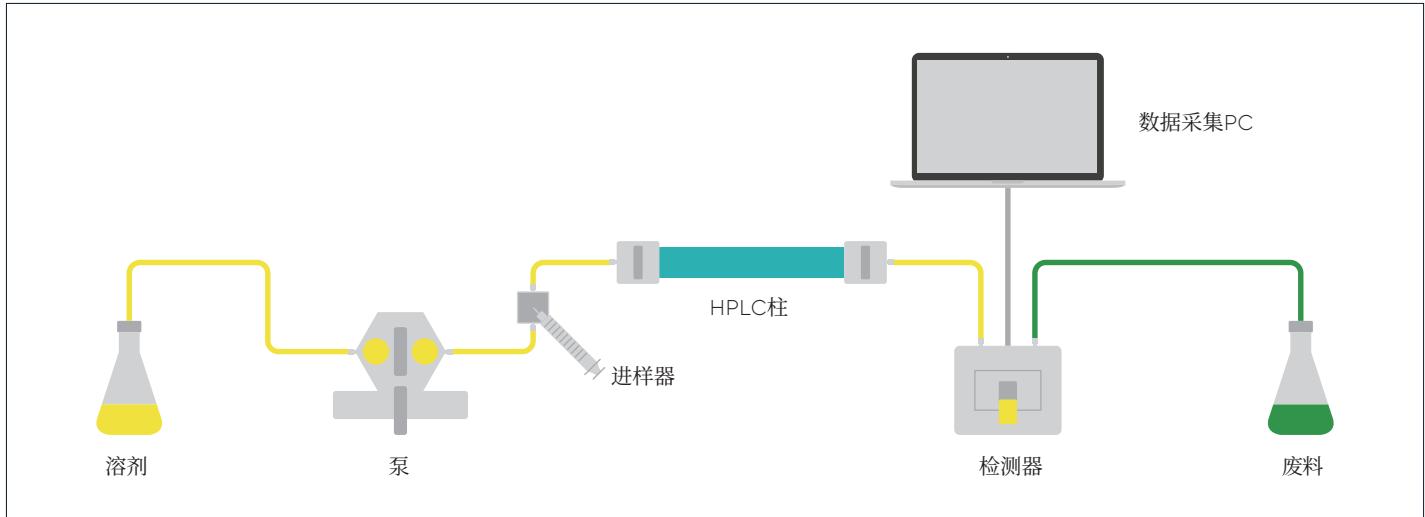


图1: HPLC系统的典型安装

材料与方法

使用HPLC Agilent 1200系列系统及Phenomenex供应的Rezex RNM糖类钠离子(8%)HPLC对样品作了分析。⁶

该柱中填充有经磷酸钠基团改良的交联聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物，并使用离子排斥机制。这意味着分析物要根据不同的离子交互进行分离。由于磷酸基团位于柱填装材料表面，所以孔带有负电荷。因此，带负电荷的分子无法渗透到材料的孔隙内，这会导致其更早地被洗脱出去。离子排斥机制基于吉布斯-唐南平衡，由其控制膜附近离子的行为。能够伸入膜孔内的分析物随后会根据空间差异以及与功能团在固定相表面的疏水性和极性相互作用分离。有关此分离机制的更多详细信息，请参阅⁷。

不同类型的糖的截留时间由折光率(RI)信号的吸光度来决定。RI信号用纳米折射率单位(nRIU)的无因次数表示并指样品细胞中样品折光率与参照细胞流动相之间的差异。

Arium® Pro VF系统生成的超纯水可用作流动相。给HPLC系统中的洗脱液脱气时，则会使用配备0.2 μm膜的Sartolab BT 500 Bottle Top一次性装置(赛多利斯便携式BT180C5)对超纯水进行真空过滤。



图2: Arium® Pro VF超纯水系统
(图片由赛多利斯提供)

设备	公司	货号
二元泵	Agilent	G1312A
脱气装置	Agilent	G1379B
ALS自动进样器	Agilent	G1329A
色谱柱恒温箱 (TCC)	Agilent	G1316A
折光率检测器, RID	Agilent	G1362A
色谱柱	Phenomenex	00H-0136-KO Rezex RNM 糖类钠离子 (8%)

表1: 设备与材料

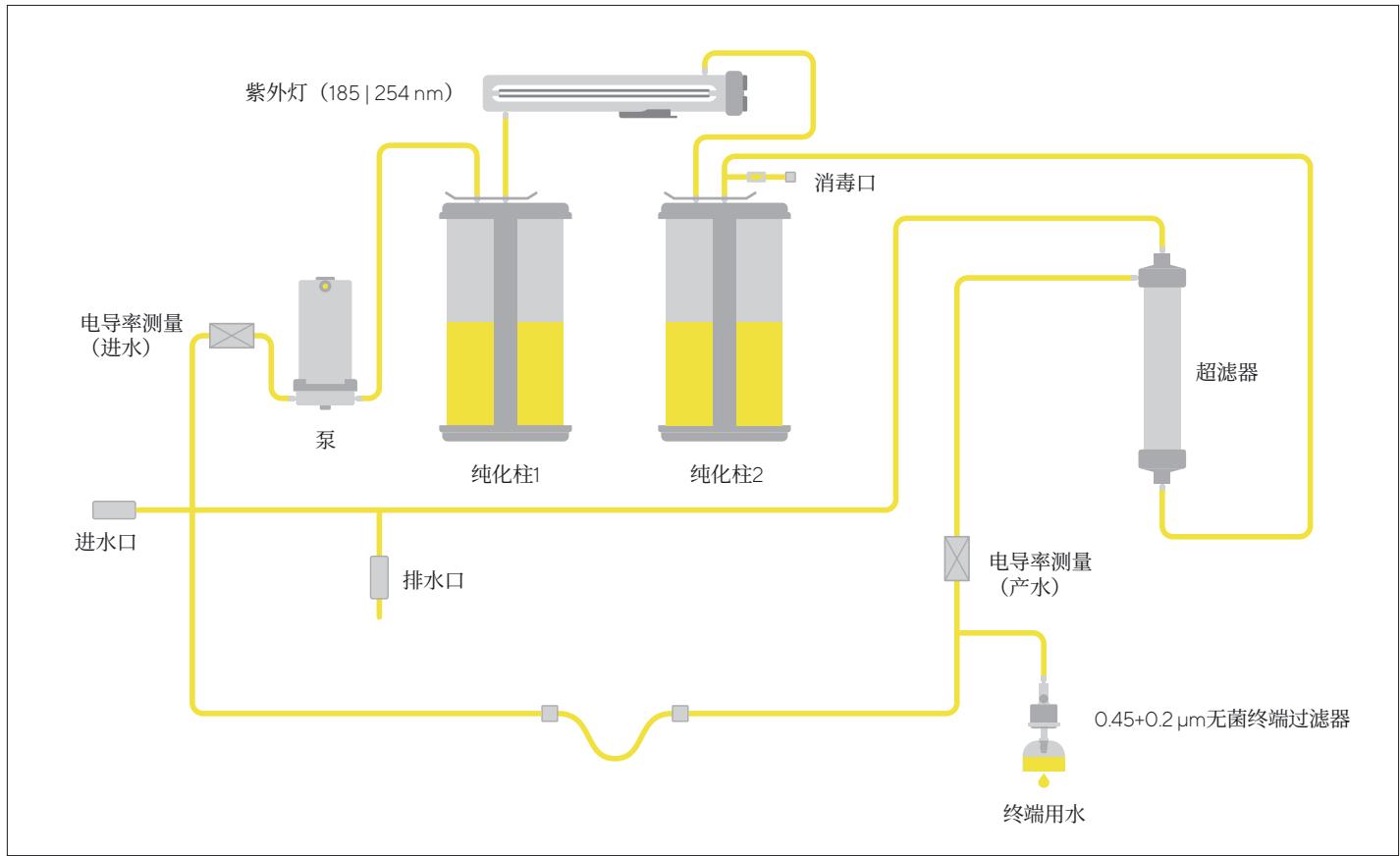


图3: Arium® Pro VF超纯水系统流程示意图（为清楚起见，省略了阀门和控制器）。

HPLC分析程序

为分析批作准备时，在柱温箱(加热器)中将Rezex柱加热到75°C，并使用Arium® Pro VF超纯水在0.6 mL/min的流速下冲洗一夜。将RI检测器的光学装置加热到35°C。使用Arium® Pro VF超纯水制备要分析的样品并使用0.2 μm的针头过滤器装置(赛多利斯Minisart® RC4, 货号:17822)进行预过滤。使用HPLC根据HPLC方法定义的参数对样品作了分析⁶(表2)。

流速	[mL/min]	0.6
时间	[min]	25
最大压力	[bar]	70
柱温箱的温度	[°C]	75
RI检测器的温度	[°C]	35
注射量	[μL]	2

表2: HPLC法

糖	截留时间 [min]
棉子糖	Fluka 83400
麦芽糖	SIGMA M5885
葡萄糖	ROTH 6887.0
果糖	SIGMA F0127

表3: 通过Rezex RNM糖类钠离子 (8%) 柱的糖类样品截留时间

浓度 [mg/mL]	截留时间 [min]	峰面积 [nRIU*s]
0	-	-
0.015	8.96	603
0.03	8.96	1,088
0.06	8.96	2,327
0.125	8.96	4,178
0.25	8.96	7,607
0.5	8.96	15,097
1	8.96	30,495

表3: 通过Rezex RNM糖类钠离子 (8%) 柱的糖类样品截留时间



图4：HPLC Agilent 1200系列系统
(图片由赛多利斯提供)

结果

为了测定单个糖类型的截留时间(表3),制备这些溶液并单次进样(图5)。由于不同的糖类会与固定相发生不同程度的相互作用,所以,具体的截留时间由RI检测器在每种糖通过柱之后记录一次。测定各个类型的糖之后,制备糖混合物并进行分离(图5)。单个糖组分彼此分离。不同截留时间的峰可分配给分析的单个糖样品。污染物或盐类的影响通过进样磷酸钾缓冲液和自来水进行模拟(图6)。

进样电导率为 $265\mu\text{S}/\text{cm}$ 的自来水及电导率为 $1,700\mu\text{S}/\text{cm}$ 的磷酸钾缓冲液后显示出明确的信号,因此可明确地确定为污染物。

多电荷离子很容易与磺酸基团结合。这会改变离解平衡,并可能影响特定糖类的截留时间。因此,流动相必须不含盐和其他污染物,才能在稳定的截留时间下进行可靠的HPLC分析,并避免出现假峰。此分析中使用的Arium®超纯水的电导率为 $0.055\mu\text{S}/\text{cm}$,而且基本上没有干扰性污染物,其用无峰的平坦基线表示(参见图6中的绿色基线)。在分析批过程中,柱压力一直保持在23 bar(~334 psi)。

这表明柱中没有沉积物聚集。开始和结尾的空白批未显示出任何变化,即流动相中无污染物。对浓度不同的标准品系列作了分析,以测定重现性和检出限。以这些系列中的棉子糖为例。截留时间和峰均记录并列示在表4中。重复得出一致的截留时间,这表明具有良好的重现性。棉子糖标准品系统显示出最高浓度为 0.015 mg/mL 的线性曲线(图7)。通过生成基于峰面积的标准品直线,即可对样品定量,在棉子糖这个示例中也可以实现。

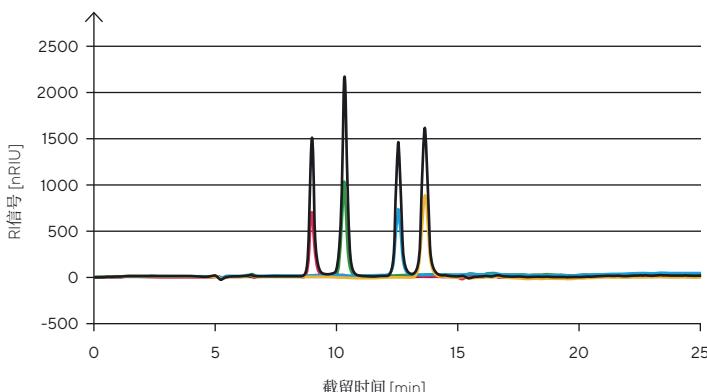


图5：使用Rezex RNM糖类钠离子(8%)柱及超纯水分离单次进样的糖类样品和糖类混合物。黑色曲线：糖类混合物

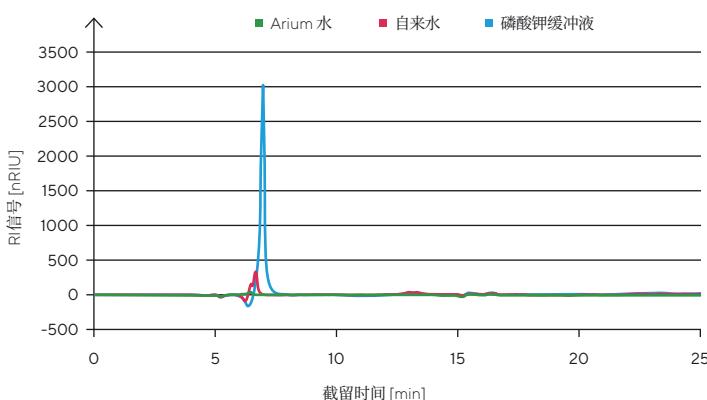


图6：2 μL的10 mM磷酸钾缓冲液、2 μL自来水及2 μL的Arium®超纯水色谱图

结论

结果表明, Arium® Pro VF生产的超纯水可用作本论文中所述的水溶性糖类的HPLC分析流动相。样品与固定相之间的相互作用也不会受流动相的影响, 因为制成的超纯水的电导率为 $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$, 几乎可视为不含污染物。因此, 不含盐类, 否则就可能导致产生假峰或虚幻峰。⁵此外, 试验结果表明, 固定相上没有沉积, 否则会表现为压力增加和样品运行时间变化。

因此, 可随时按需制备的Arium® Pro VF超纯水可作为替代选项, 替代商业出售超纯水, 用以制备HPLC分析的高纯度洗脱水, 以用于食品分析、环境分析以及医疗、化学及生化研究及制药和生物技术行业过程中质量控制测试。

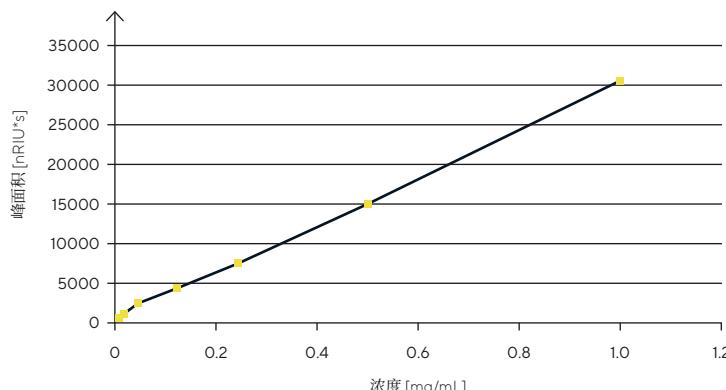


图7: 棉子糖的标准品系列 (表4中的值) 通过使用Arium®超纯水的Rezex RNM 糖类钠离子 (8%) 柱

使用Arium® Pro VF超纯水作为HPLC中的移动相进行的研究及获得的宝贵的经验会在不久的将来拓展到其他分离技术中, 如反相色谱法、排阻色谱法或超高效液相色谱法。

参考文献

1. Joachim Weiß: Ionenchromatographie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 第5章, 第349页 ff. (2001年)。
2. Kromidas, Stavros: HPLC für Neueinsteiger, from the Internet, © by Novia GmbH, (2000).
3. Hans Ulrich Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse Band II, Verlag Chemie, page 1179, 1180 (1970).
4. Dische, Z., and Borenfreund, E.: A New Spectrophotometric Method for the Detection of Keto Sugars and Trioses, J. Biol. Chem. 192, 583-587, (1951).
5. Süßwaren, issue 10, page 7, LCI-Focus, (2006).
6. Gottwald, W.: RP-HPLC für Anwender. Reihe: Die Praxis der instrumentellen Analytik, Editor, Gruber, U., und Klein, W., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pages 7-8 (1993).
7. Chromatography Product Guide 12/13, Phenomenex, pages 232-233, (2012).
8. Weiß, Joachim: Ionenchromatographie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Chapter 5, pp. 349 ff. (2001).

致谢

作者想借此机会感谢德国阿沙芬堡的Phenomenex公司提供Rezex RNM糖类色谱柱供其使用。

英文的第一版本发布于《G.I.T.Laboratory Journal Europe》3-4, 第17卷, 2014年4月

销售与服务 联系方式

更多联系信息, 请访问
www.sartorius.com.cn

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889
邮箱 lab.cn@sartorius.com

赛多利斯 (上海) 贸易有限公司
上海市浦东新区盛荣路 388 弄百佳通
产业园 3 号楼, 7-11 层, 200120
电话 +86 21 6066 6100



关注赛多利斯实验室