



迎接第二维，
作者：Pat Sandra 和
Gerd Vanhoenacker

4

中草药全二维
液相色谱分析

11

大型制药公司采用二维液相
色谱，作者：Cadapakam
J. Venkatramani

16

使二维液相色谱成为主流，
作者：Michael Frank 和
Jens Trafkowski

25

揭秘二维液相色谱

二维液相色谱 (2D-LC) 不再是一项难以捉摸的小众技术，经过先进仪器的简化，它已适合于主流分析人员使用。几位多维色谱领域的著名专家和两位新人在本文中介绍了一些窍门与技巧，并分享了展现二维液相色谱分离性能的生动报告。

快速高效 自由随心

全新 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪

非凡杰作，超乎想象。树立分析效率、仪器效率及实验室效率的新标杆。更多空闲时间，尽在您的掌握。

体验新一代 UHPLC

EfficientUHPLC.agilent.com

额外时间中您想做什么？
参与 #EfficientUHPLC 讨论。



© Agilent Technologies, Inc. 2014

二维液相色谱技术介绍以及揭秘的全过程



2014年初，安捷伦科技找到我们，明确表示想借助我们的平台，向公众展示二维液相色谱技术如今已变得多么简单和稳定。

于是专栏“揭秘二维液相色谱”应运而生。同时，“分析科学家杂志 × 安捷伦科技公司”的合作也就此展开，并已经取得了丰硕的成果。

我们非常荣幸能够与该技术多个关键应用领域内的一些超级大腕合作。英国皇家化学学会的 Pat Sandra 和 Gerd Vanhoenacker 以“迎接第二维”作为开端，提供了基本的背景理论，并介绍了二维液相色谱如何满足复杂样品中更高峰容量的要求。同时，“二维液相色谱领域的新进研究者”着重介绍了两位最近刚开始从事第二维色谱研究的科学家，我们就研究经验对他们进行了公开问答。其他作者还包括基因泰克公司的 Cadapakam J. Venkatramani 和来自德国杜伊斯堡-埃森大学的 Oliver Schmitz。

为进一步答疑解惑，其他两位作者 Koen Sandra 和 Dwight Stoll 最近提供了一次网络研讨会，以更深入地探讨实际二维液相色谱应用的某些方面，并且在线回答问题。您可以通过此链接访问录制版本：tas.txp.to/1114/2DLCwebinar

安捷伦和分析科学家杂志都将本文集看作是二维液相色谱讨论的开始，而非结束。我们期待收到您的问题和反馈。

Rich Whitworth

主编

目录

- 4 迎接第二维
作者: Pat Sandra 和 Gerd Vanhoenacker
- 4 我与二维液相色谱
Dwight Stoll 访谈
- 8 采用二维液相色谱探索中药奥秘
作者: Oliver Schmitz 和 Duxin Li
- 11 解决方案: 中草药的全二维液相色谱分析
- 12 二维生物分析
作者: Koen Sandra, Gerd Vanhoenacker 和 Pat Sandra
- 15 采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案分析单克隆抗体酶解物
- 16 大型制药公司采用二维液相色谱
作者: Cadapakam J. Venkatramani
- 19 解决方案: 手性药物的非手性-手性中心切割二维液相色谱分析
- 20 二维液相色谱领域的新进研究者
Bernd Kammerer 和 Ole Gron 访谈
- 23 解决方案: 生物药物中复杂 N-糖链的在线二维液相色谱分析
- 25 使二维液相色谱成为主流 Michael Frank 和 Jens Trafkowski 访谈

迎接第二维

从一维液相色谱到二维液相色谱，是追求复杂样品分析所需的高峰容量的道路上迈出的一大步。

作者: Pat Sandra 和 Gerd Vanhoenacker

过去，我们采用柱效 (N) 来描述色谱系统的分离性能。在液相色谱 (LC) 中，该值取决于填料粒径 (d_p) 和色谱柱长 (L)。对于多孔填料， $N = L/2d_p$ 。2006 年，随着表面多孔填料技术的革新，最先进仪器的实验塔板数已接近 $L/1.5d_p$ ，这是因为在多孔薄壳内可以实现快速传质。并且在大约十年前，亚 $2\ \mu\text{m}$ 多孔填料的采用带来了色谱柱技术的巨大进步。以上所有，连同耐压高达 1200 bar 的新型液相色谱仪器的推出，为液相色谱工作者实现更快分析速度和更高分离度提供了新的可能。

对于当今的复杂分析，塔板数并非性能的有效量度，现在使用广泛的一个更好的概念是峰容量 n_c 。Giddings 于 1967 年提出 n_c 的概念 (1)，它是指在一定的分离度下 (通常为 1)，第一个与最后一个目标峰之间可以并存的最大峰数。这个概念的首次提出是用于等度分离，而 Horvath 和 Lipsky (2) 首先认识到，液相色谱中的梯度洗脱或气相色谱中的程序升温能够获得比等度分离高得多的峰容量。通常用于在梯度洗脱中计算峰容量的方程式是 $n_c = 1 + t_g/W$ (3)，其中 t_g 是梯度运行时间， W 是平均峰宽 (4 s)。

在高压仪器和小粒径填料问世之前，传统一维液相色谱 (1D-LC) 可获得高达 200 的峰容量。而目前已有报道称，采用亚 $2\ \mu\text{m}$ 多孔填料 (或表面多孔填料) 可在 50 分钟内获得 570，以及在 180 分钟内获得高达 850 的峰容量 (4)。对于复杂样品，可通过对梯度时间和/或流速进行微调来优化色谱柱的峰容量效率 (峰/分钟)。

然而，这样的峰容量还远不足以分离非常复杂的混合物，如生物样品、食品、环境样品或天然产物中的成分。峰容量需要大大超出样品中的组分数；峰重叠的统计理论 (5) 告诉我们，当样品中的组分数超过峰容量的 37% 时，峰分离度会严重下降。的确，为分离 98% 的随机分布样品组分，峰容量应超出组分的 100 倍 (6)。这就意味着我们需要 10000 的 n_c 值 (对应大约 1×10^8 的理论塔板数) 对含有 100 种组分的样品进行“色谱”分离！但幸运的是，色谱不是揭示样品复杂性的唯一贡献者；现代质谱 (MS) 的选择性能大大降低了对色谱分离度的要求。当然，即使是采用最强大的 MS 仪器，最大限度地提高前端分离度仍十分重要；在尚未配备质谱仪并常常需要高峰容量的 QA/QC 实验室中，这也至关重要。一个增加 n_c 的简单途径就是使用多维液相色谱，尤其是二维液相色谱。



我与二维液相色谱

Dwight Stoll 自 2000 年起就一直从事二维液相色谱方面的工作。本文中，他讲述了作为研究核心技术的二维液相色谱的优势。

您是怎样开始使用二维液相色谱的？为什么要使用它？

2000 年，我与 Peter Carr 正在一起工作，他针对加快 HPLC 的分离速度做了许多工作。我们决定将快速分离的专业知识应用

到第二维中，目标是在 30 分钟内实现分离并且不损失柱效，从而取代传统 5–10 小时的运行时间。

当时的二维液相色谱是怎样的？

几乎每个人都在制作各自的系统，并编写各自的软件。长期以来，实现稳定二维液相色谱系统的可用性都是一个巨大的障碍，但随着“现成”解决方案数量的不断增长，这道障碍正在被打破，而这无疑会颠覆我们对这一强大技术的看法和用法。

二维液相色谱释义

在线二维液相色谱可分为“中心切割”法和全二维法（见下页“二维液相色谱101”）。中心切割二维液相色谱将进一步分离所选保留时间窗口中的组分，而在全二维液相色谱（此处讨论的重点）中，整个样品都要经过两次分离。实际上，首个全二维色谱分析示例出现在70年前，系采用纸色谱(PC)分离氨基酸(7)：在采用溶剂A从一个方向上展开后，纸条被调转90度并采用溶剂B进行二次展开。鉴于纸色谱过程的静态性，这一现象十分直观。

在全二维液相色谱中，两根色谱柱通过切换阀（调制器）串联起来，在多个重复交替的周期内，从第一根色谱柱洗脱的小体积馏分被收集并进样到第二根色谱柱中。标准的全二维液相色谱调制器是一个带有两个收集环的十通切换阀。只有当环1中的前期馏分完全从第二根色谱柱洗脱时，环2中的后续馏分才可被引入此色谱柱。第一根色谱柱中的分析时间没有任何限制，但第二根色谱柱中的分析时间（包括梯度洗脱后的再生时间）应等于或小于调制周期。在理想的全二维液相色谱组合中，总

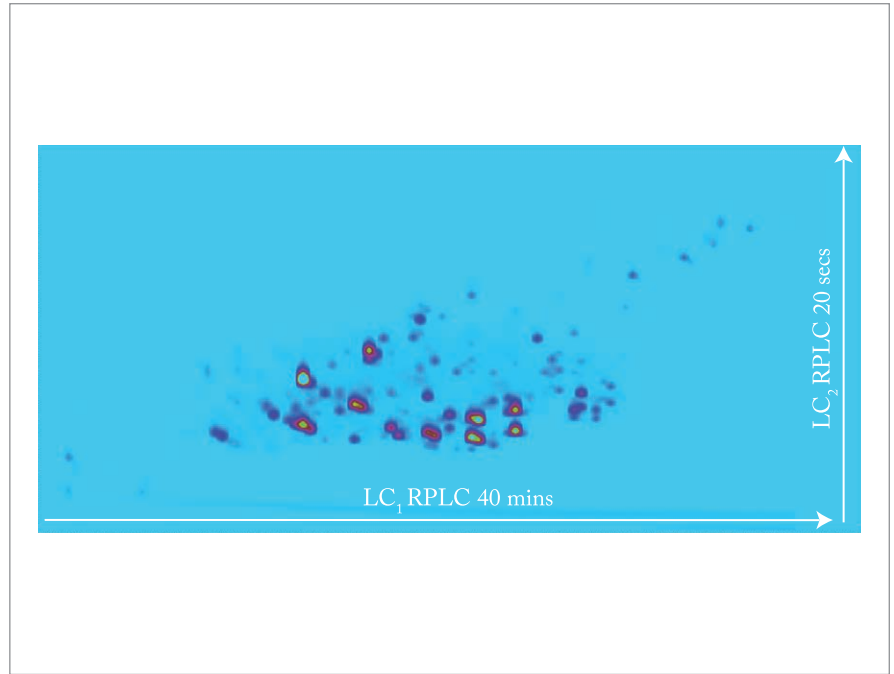


图1. 柑橘绿茶中多酚的RPLC x RPLC二维图谱，紫外检测器，波长320 nm。第一维色谱柱是C18柱，流动相梯度从0.1%甲酸水溶液到甲醇。第二维色谱柱是Phenyl-Hexyl柱，流动相梯度从0.1%甲酸水溶液到乙腈。

峰容量为第一根色谱柱的峰容量乘以第二根色谱柱的峰容量： $n_{c,t} = n_{c,1} \times n_{c,2}$ 。理论上讲，这意味着如果将 $n_{c,1}$ 为500（高分离度）的色谱柱与 $n_{c,2}$ 为20（高分析速度）的色谱柱串联， $n_{c,t}$ 将为10000。然而，由

于我们永远不能充分利用所有的二维空间，实验 $n_{c,t}$ 将低于理论值。请注意，在全二维液相色谱中，总分析时间只是略高于第一根色谱柱上的分析时间（通常为1分钟）。

主要的优势有哪些？

三个最大的效益是：

- 二维液相色谱技术在分离能力和可获取的信息方面的强大性能
- 提高隐藏峰方面的数据可靠性。这也是中心切割二维液相色谱迅速得到更多青睐的原因
- 获得高通量的潜力，例如，将30分钟的一维分离压缩到10分钟，并通过连接第二维色谱重新获得损失的分离度

最后一点是我非常感兴趣的。虽然转换现有方法看起来十分繁琐（毕竟每种分离方式各不相同），但未来方法开发的潜力已经非常明确。我们不再满足于30分钟的一维运行，而是以心中的目标为起点并大大增强分离能力，从而完成方法开发，最终获得最佳柱效。

二维液相色谱是否难以使用？

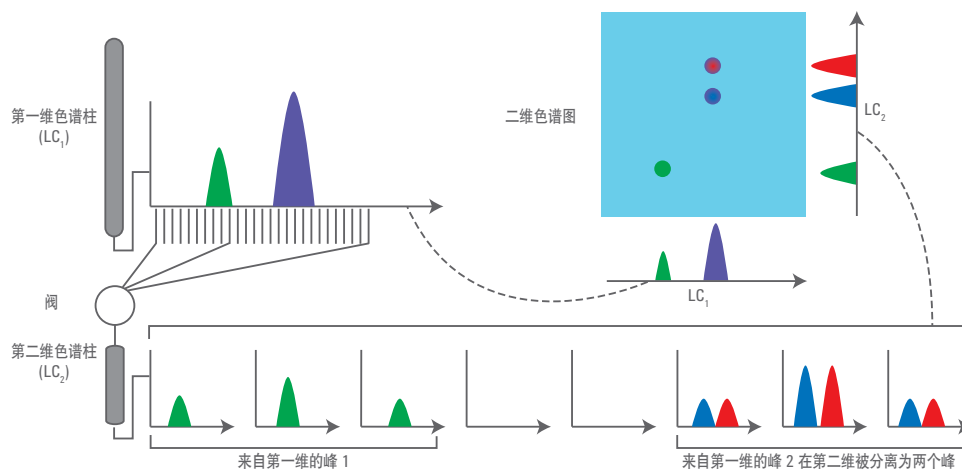
实际上，即使在商业化仪器推出之前，二维液相色谱也并不难用，只是它比较耗时，并且需要一些专业知识和经验使其发挥最

佳功能。而制药公司和其他相关行业中的分离科学家并没有时间去“虚度”。

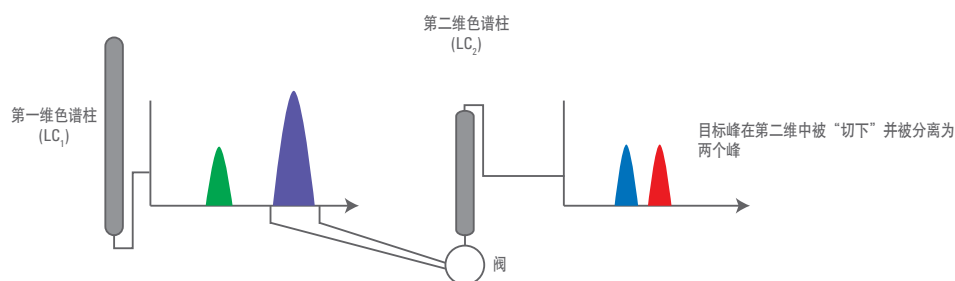
我们多数的关注焦点都在全二维液相色谱中，您可以利用它设法全面了解样品的组成。中心切割分离的工作曾经更易于进行，但当前全二维分离似乎又卷土重来——制药行业十分迅速地将其重新捡起并加以利用。随着大供应商们均不约而同地推出相应技术，这一模式将整个业界带入了一个崭新的纪元。

二维液相色谱 101

A. 全二维液相色谱



B. 中心切割二维液相色谱



在全二维液相色谱中，第一维色谱柱中的所有洗脱物均通过切换阀转移到第二维色谱柱中。阀转移出的小部分洗脱物可在 20 – 30 秒内被快速梯度洗脱分析。数据采集完成后，两个维度中的部分色谱图被相对应齐。在中心切割二维液相色谱中，只有第一维色谱柱洗脱物的选定部分才会被转移到第二维色谱柱中。从分离中心切出的色谱峰可以在第二维色谱柱中以更高的分离效率进行分析。第二维分析的运行时间通常长于从第一维进行收集的时间。

有哪些改进促进了“简易二维液相色谱”的发展？

虽然过去面临着无法在第二维实现真正的快速梯度洗脱的极大挑战，但泵技术的改进已使我们将梯度延迟体积从 1 mL 降低到了 100 μ L。这是一个重要的里程碑。软件中已经投入的开发时间也显著改善了用户体验。

二维液相色谱在何种情况下可作为首选技术？

十年前我和其他所有人都很清楚，二维液相色谱相当复杂，假如其性能无法明显优于一维色谱，一切努力就失去了意义。如今，我们通过模拟和实验了解到“交叉时间”（即二维性能开始优于一维的分离运行时间点）大约是 10 – 15 分钟 (1)。这为我们的坚持研究提供了极大的动力；您完全可以在众多的潜在应用中以相同运行时间获得更加优异的分​​离性能。

我们是否处在二维液相色谱应用的临界点？

不断加强的认知、供应商解决方案的推出，以及一维色谱局限性的日益凸显都使得二维色谱更具有吸引力。我最近收到一封来自一个大型制药公司的电子邮件，其中说道，“我们认识到我们需要的不仅仅是一维色谱，所以请帮助我们！”换言之，例如当基因泰克公司联系安捷伦并索要二维液相色谱系统部件号时，您就该明白情形已经发生了戏剧性的改变！

当两个维度的分离机制分别具有明显不同的保留曲线时，二维空间可以得到最充分的利用。正交性越高，我们就越接近理论峰容量。高正交性的示例包括正相液相色谱 (NPLC) 与反相液相色谱 (RPLC) 的组合、亲水作用色谱 (HILIC) 与 RPLC 的组合、体积排阻色谱 (SEC) 与 RPLC 的组合、离子交换色谱 (IEC) 与 RPLC 的组合，以及超临界流体色谱 (SFC) 与 RPLC 的组合。出人意料的是，虽然 RPLC × RPLC 的组合根据定义具有低正交性，但它为某些应用提供了可观的选择性，如在二维色谱中进行的不同 pH 下的多肽分析 (8)。此外，在 RPLC × RPLC 中，溶剂兼容性不成问题，并且还能开发适用于 QA/QC 环境的极其耐用的分析方法，如图 1 所示。

全二维液相色谱已经足够成熟到即使在常规环境下也能普遍适用；使用具有全二维和中心切割模式的可靠仪器时尤其如此。

Pat Sandra 和 Gerd Vanhoenacker 来自比利时科特赖克的色谱研究所。

更多参考资料

“Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry”, Editor L. Mondello, (John Wiley & Sons Hoboken, NJ, USA, 2011).

安捷伦科技公司 2D-LC

安捷伦科技公司应用简报: tas.txp.to/0314/2DLC

参考文献

1. J. C. Giddings, “Maximum Number of Components Resolvable by Gel Filtration and Other Elution Chromatographic Methods”, *Anal. Chem.* 39, 1027-1028 (1967)
2. C. G. Horvath and S.R. Lipsky, “Peak Capacity in Chromatography”, *Anal. Chem.* 39, 1893 (1967)
3. U. D. Neue, “Theory of peak capacity in gradient elution”, *J. Chromatogr. A* 1079, 153-161 (2005)
4. G. Vanhoenacker 等, 安捷伦科技公司, 应用简报 5990-4031CHCN, 2009
5. J. M. Davis and J. C. Giddings, “Statistical Theory of Component Overlap in Multicomponent Chromatograms”, *Anal. Chem.* 55, 418-424 (1983)

6. J. C. Giddings, “Sample Dimensionality: A Predictor of Order-Disorder in Component Peak Distribution in Multidimensional Separation”, *J. Chromatogr. A* 703, 3-15 (1995)
7. R. Consden, A. H. Gordon, and A. J. P. Martin, “Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatographic Method Using Paper”, *Biochem. J.* 38, 224-232 (1944)
8. I. François et al., “Tryptic Digest Analysis by Comprehensive Reversed Phase × Two Reversed Phase Liquid Chromatography (RP-LC×2RP-LC) at Different pHs”, *J. Sep. Sci.* 32 1137-1144 (2009)

您预测该技术将在哪个应用领域获得最大成功？

当然，聚合物分析界的许多团队使用二维液相色谱已经有了比较长的一段时间，并且已经完成了许多出色的工作。他们在该领域内付出的努力当然值得称赞，想必他们也会坚持不懈地继续努力。

我认为从现在开始，生物制药行业很可能将会受到最大的关注，因为该技术能够为其带来最大的收益。而且该行业是一个相对容易的起点，因为它们可以受益于从蛋白质组学中获得的经验。在蛋白质组学中，第一维分离系采用离子交换色谱，而第二维分离则采用反相色谱。这真是一个美妙的组合。我仿佛已经听到了火箭升空时发出的隆隆声。

Dwight Stoll 是美国明尼苏达州古斯塔夫奥德罗普学院的分析化学助理教授。

参考文献

1. D. R. Stoll, X. Wang, and P. W. Carr, “Comparison of the Practical Resolving Power of One- and Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Metabolomic Samples”, *Anal. Chem.* 80, 268-278 (2008).

采用二维液相色谱探索 中药奥秘

二维液相色谱确实令人印象深刻，能够生成直观生动的图谱，但是它在复杂样品的分析中是否必需呢？我们在本文中展示了二维液相色谱既可以提供新颖的分析形式，又可以提供卓越的分析性能。

作者：Oliver Schmitz 和 Duxin Li

中药是一门古代艺术。现存最早的中国医药典籍可追溯到公元前一世纪或二世纪的《黄帝内经》。通常，早期的中药就是由一些植物（其每一味都含有数百种，甚至数千种化合物）构成的一个单独的药物配方。现今的情况大抵依旧，中草药 (CHM) 的普通配方仍旧极其复杂。像西药一样进行中药产品的质量控制是一个巨大的挑战。不出所料，随着我们对更有效药物研究的更加深入，CHM 吸引了全世界的众多关注。于是，研究人员对中草药的化学成分及其药理学和治疗学活性的来源产生了浓厚兴趣。

必要的分离

我们可能都听说过，因为配备高分辨质谱 (HRMS) 的实验室越来越多，检测前对良好色谱分离的需求就会越来越少。对于一些非色谱工作者来说，这听起来甚至还颇具吸引力。然而实际上，这却是一个不怎么有道理的说法：假如样品中的所有组分都被同时进样到离子源中，再假如那些化合物中的绝大部分都实现了离子化，那么，像中草药这样的复杂样品就会生成数千种自由基阳离子。在 ESI 或 APCI 等大气压离子源中，所有这些生成的自由基阳离子会发生反应或相互作用，每一个离子从离子化到进入质谱都会经历大约 20000 次碰撞。结果就是潜在离子抑制的出现和/或伪峰的形成。这是一个问题。解决方案呢？就是在质谱前加入高效色谱平台！这样的组合即使对于 HRMS 也堪称（并且可能永远都是）金标准。

全二维液相色谱（或 LCxLC）提供了复杂样品所需的高分离性能。的确如此，我们团队利用全二维分析技术专门从事 CHM 中不同草药的分析工作。我们采用 GCxGC-MS 分析多数非极性成分，而采用 LCxLC-MS 分析多数极性化合物（见图 1）。

当然，与其他任何一种分析技术一样，LCxLC 也有优点和缺点，这取决于具体应

用。对于我们来说，与一维液相色谱比较时 LCxLC 的缺点可以归纳为利用质谱检测器时潜在的低灵敏度以及更复杂的方法开发过程 (1)。但优点也是一目了然的：它能够提供更得多的峰容量（如第 4 页的首篇文章所述）；生成的等高线图能够在第一维和第二维中将峰强度显示为保留时间的函数，具备了出色的指纹分析能力。

梯度程序优化

那么，我们如何进一步优化 LCxLC 的分离性能呢？答案就在所使用的梯度程序中（见图 2）。我们的系统可以在第二维使用不断变化的梯度（从动梯度，Shift Gradient），这一梯度的流动相组成范围虽然比固定梯度 (Full Gradient) 程序窄，但却可以根据保留情况不断改变浓度范围。从动梯度实际上是平行梯度 (Parallel Gradient) 和固定梯度的组合；低浓度范围可以使弱保留馏分被保留，而高浓度范围正如平行梯度一样，足以使强保留馏分被洗脱。从动梯度不仅可以抑制谱带展宽，还可以减少类似于使用固定梯度时出现的“扎堆”行为的可能性。

在相关的 RPLCxRPLC 系统中，第一维中早洗脱的分析物会在第二维中具有弱保留；在第一维分离中段洗脱的分析物会

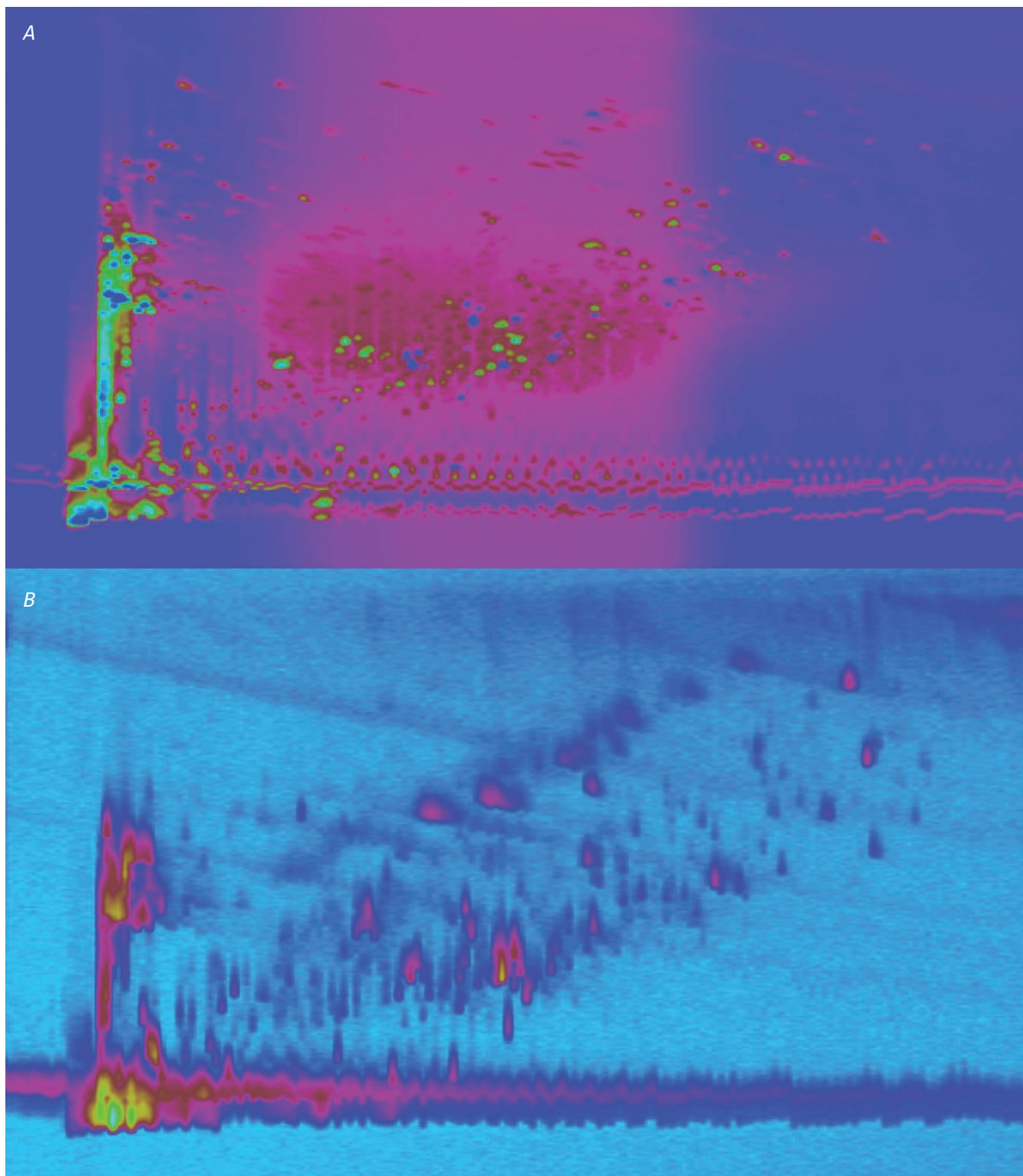


图 1. 半枝莲和白花蛇舌草两种草药水提取物的 LCxLC 分析 (A: 二极管阵列检测器, B: ESI-qTOF-MS)

在第二维中段洗脱；第一维中晚洗脱的分析物会在第二维中具有强保留。且由于从动梯度以连续方式运行，因此实际样品的集群信息得到了保留。

毋庸置疑，从动梯度显著增强了第二维的分离性能，如图 3 和 4 所示 (2)。

是否要使用二维液相色谱，是个值得考虑的问题

您是否正在利用二维液相色谱的强大性能？如果希望提高复杂样品的分离性能，那么您的选择绝对明智！利用 LCxLC-MS 会使疾病生物标志物鉴定等非靶向分析变得更强大，而这仅仅是开始。下一步即是利用 LCxLC-IMS-qTOF-MS。我们的实验室即将首次进行这一方面的某些研究……

Oliver Schmitz 是德国杜伊斯堡-埃森大学的应用分析化学教授，Duxin Li 是该校的博士后。

参考文献

1. A. P. de la Mata and J. J. Harynuk, "Limits of Detection and Quantification in Comprehensive Multidimensional Separations", *Anal. Chem.* 84, 6646-6653 (2012)
2. D. Li and O. J. Schmitz, "Use of Shift Gradient in the Second Dimension to Improve the Separation Space in Comprehensive Two-dimensional Liquid Chromatography", *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6511-6517 (2013)

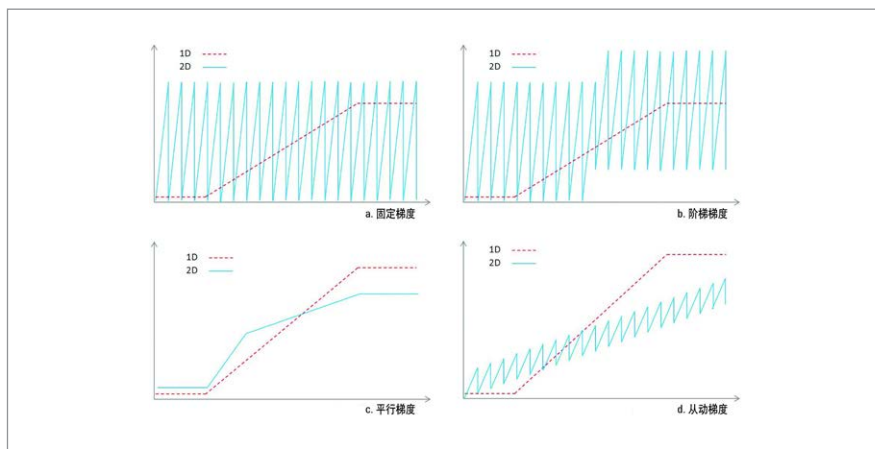


图 2. 用于二维液相色谱的不同梯度程序的示意图

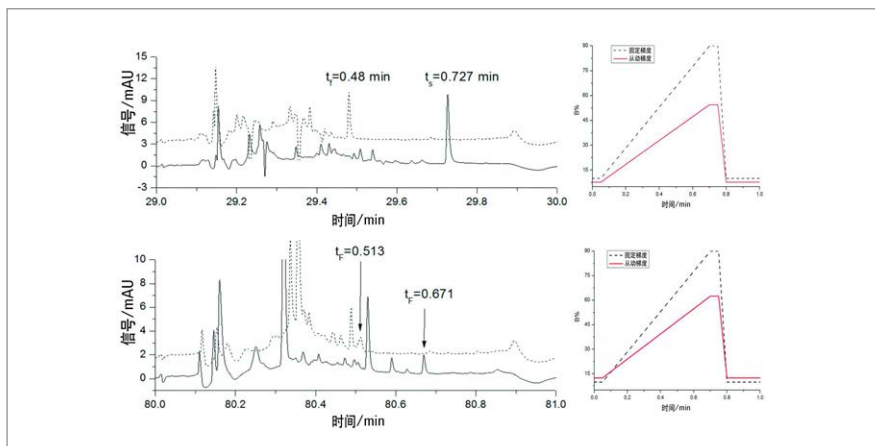


图 3. 两种白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* 和 *Oldenlandia diffusa*) 的 LCxLC 分析中，水提取物馏分 29 (上色谱图) 和 80 (下色谱图) 的固定梯度 (虚线) 和从动梯度 (实线) 的比较，相应的梯度程序列于右侧

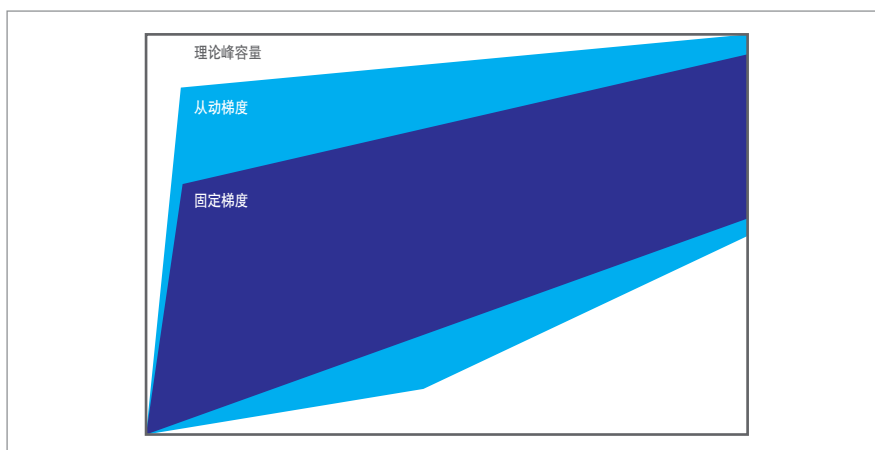


图 4. 固定梯度和从动梯度色谱峰分布区域比较 (摘自参考文献 3)

中草药的全二维液相色谱分析

采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案获得最高的色谱分离度。

作者: Sonja Krieger 和 Jens Trafkowski

前言

中草药 (CHM) 是中医 (TCM) 的一部分, 是由一种植物或若干种植物形成的组方制剂。CHM 的疗效取决于植物中多成分的协同效应。CHM 中涉及的植物均为极其复杂的样品。因此, 全二维液相色谱 (全 2D-LC) 是其理想的分析方法选择。

结果与讨论

在全二维液相色谱分析中, 制备植物样品和煎煮汤剂类似。可以预期的是, CHM 的植物汤剂中除含有许多弱极性化合物外, 还含有一系列强极性化合物。为此, 应选择安捷伦 ZORBAX SB-Aq 色谱柱用于第一维分离, 因为它不仅可以保留亲水性化合物, 而且还可以在 100% 水相条件下运行。另外, 甲醇对桑枝中的成分具有更好的分离能力, 也可以在两种洗脱液中都加入 0.1% 的甲酸。在 80 分钟内梯度从 0 运行到 95% 甲醇。

为第二维色谱选择合适的色谱柱时, 通过对一些色谱柱进行测试后发现安捷伦 ZORBAX Bonus-RP 色谱柱具有最佳分离性能, 可运行快速梯度。通过使用乙腈作为洗脱液, 并在两种洗脱液中加入 0.1% 的甲酸, 实现了第一维和第二维分离间的选

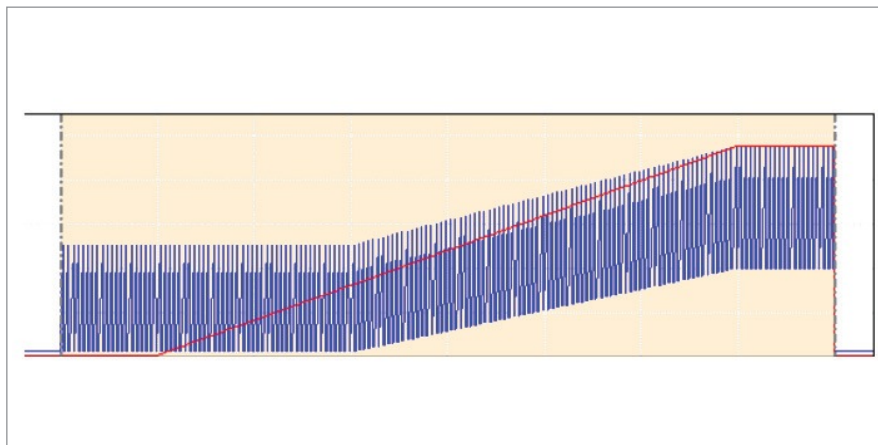


图 1. 专为桑枝汤剂成分第二维分离设计的复杂梯度

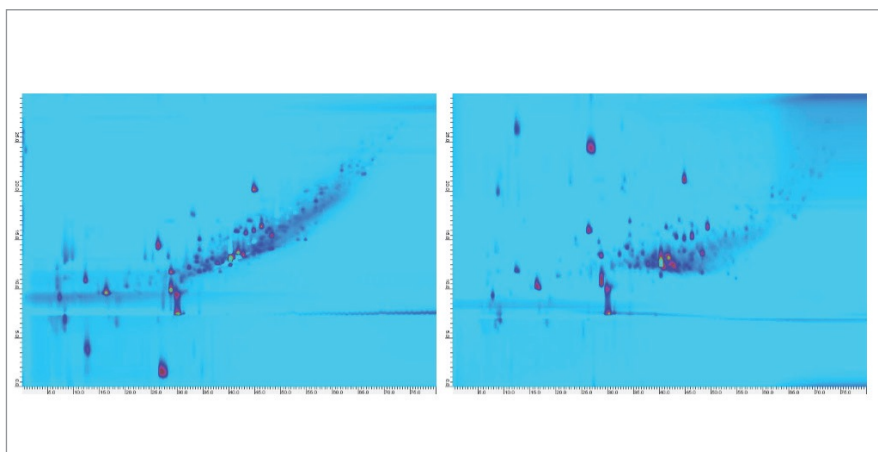


图 2. 桑枝汤剂的全二维液相色谱分析: (A) 采用从 5 到 95 % 乙腈的固定重复二维梯度; (B) 对汤剂采用复杂从动二维梯度洗脱, 在 254 nm 下检测

择性差异。除了实现两个维度间更高的正交性, 使用乙腈还有另一个优势, 即可产生比使用甲醇更低的背压。因此, 第二维中即可采用更高的流速。

为扩大可用的二维分离空间, 我们在第二维中使用了从动梯度, 如图 1 所示。高正交性分离如图 2 所示。

结论

全二维液相色谱非常适用于草药配方的分析, 尤其是在两个分离维度中结合利用了两个反相固定相时。

如需了解完整解决方案, 请访问:
tas.txp.to/2DLC/herb

二维生物分析

利用二维液相色谱将生物药物和生物仿制药推向市场。

作者: Koen Sandra, Gerd Vanhoenacker 和 Pat Sandra

近年来, 药品销售榜单的前十名已大范围被蛋白质治疗药物占据, 如用于治疗癌症和自身免疫性疾病等多种危及生命疾病的单克隆抗体和重组蛋白质。其中许多重量级生物药物的专利权不久即将到期, 这一事实将使生物仿制药或“生物类似药物”市场面临爆发的局面。

不论一个企业是要开发创新的生物药物还是要模仿生产生物仿制药, 都必须进行详尽的表征。的确, 产品特征在投放临床或市场前需要受到严密监控。蛋白质类生物药物的复杂性远远超出小分子药物, 因此其表征已成为了严峻的分析挑战, 其中通常会涉及到多种分析技术和方法学(1)。

由于肽谱分析可以提供所研究分子的详细信息, 因此它是一种常用的表征方法。以一个 150 kDa 的单克隆抗体为例, 对其进行胰蛋白酶酶解后会生成 100 多种肽, 这些肽具有各不相同的理化性质与宽动态浓度范围。这些酶解物的复杂性要求

系统具有最佳的分离性能。与一维分离(1D-LC)相比, 二维液相色谱(尤其是全二维液相色谱(LC × LC))可大大提高峰容量(只要两个维度的分离有良好的正交性), 并且在组分转移到第二维时也会保持其在第一维中获得的分离度。

基于二维液相色谱的肽谱分析的正交组合包括强阳离子交换色谱和反相色谱(SCX × RPLC)、亲水相互作用色谱与反相色谱(HILIC × RPLC), 以及两个维度流动相具有不同 pH 的反相色谱和反相色谱(RPLC × RPLC)(2-4)。采用 SCX × RPLC 和 HILIC × RPLC 可获得最高正交性, 因为两个维度的分离机制完全不同。当然, RPLC × RPLC 也是特别令人关注的。它不仅因两个维度间的出色溶剂兼容性而可靠耐用, 而且还具有非常高的峰容量(得益于每一维中的高塔板数)和高正交性。这是由于肽具有两性离子性质, 因此在采用极端 pH 条件进行 RPLC 分离时将会获得极大的选择性差异。

图 1 显示了采用 RPLC × RPLC 得到的两个批次单克隆抗体曲妥单抗的二维液相色谱酶解肽图。曲妥单抗于 1998 年上市, 商品名为赫赛汀, 如今仍用于 HER 2 阳性乳腺癌的治疗。肽图提供的丰富信息可用于鉴定及纯度评估。曲妥单抗的鉴定涉及到 62 个胰蛋白酶酶解肽段(20 个轻链片

段和 42 个重链片段), 其中多数可达到基线分离。其中一些酶解肽段含有易于修饰的氨基酸, 可进行脱酰胺基化、异构化和氧化等反应。这些与产品相关的杂质会影响产品的安全性和有效性, 需要进行严密监控。

图 2 中突出显示了与此类修饰分析相关的二维液相色谱技术的优势, 还显示了未处理和经高 pH 处理原研药的二维液相色谱放大肽图。pH 为 9 时, 处理后的曲妥单抗的脱酰胺基作用在三天时间内大大增强。这一修饰发生在轻链第三个酶解肽段的天冬酰胺上, 已经观察到未处理样品中约 10% 的上述位点发生了此种修饰。采用质谱进行峰归属鉴定, 并通过 MS/MS 确定修饰位点。

RPLC × RPLC 方法学与紫外检测联用获得的良好精密度(保留时间 RSD < 0.2%, 峰面积 RSD < 5%, n=5)使其成为了一种强大的分析手段, 可用于证明不同批次产品间(如图 1 所示)以及生物原研药与生物仿制药间的可比性。

因此最大的问题就是, 我们可以在生物药物研发流程中的哪个环节中看到二维液相色谱的实际优势? 公平地讲, 在研发的早期阶段, 一维 LC-MS 肯定是更好的选择; 峰容量远远超出 500 的 RPLC 色谱柱如今已得到广泛应用, 在与高分辨质谱联

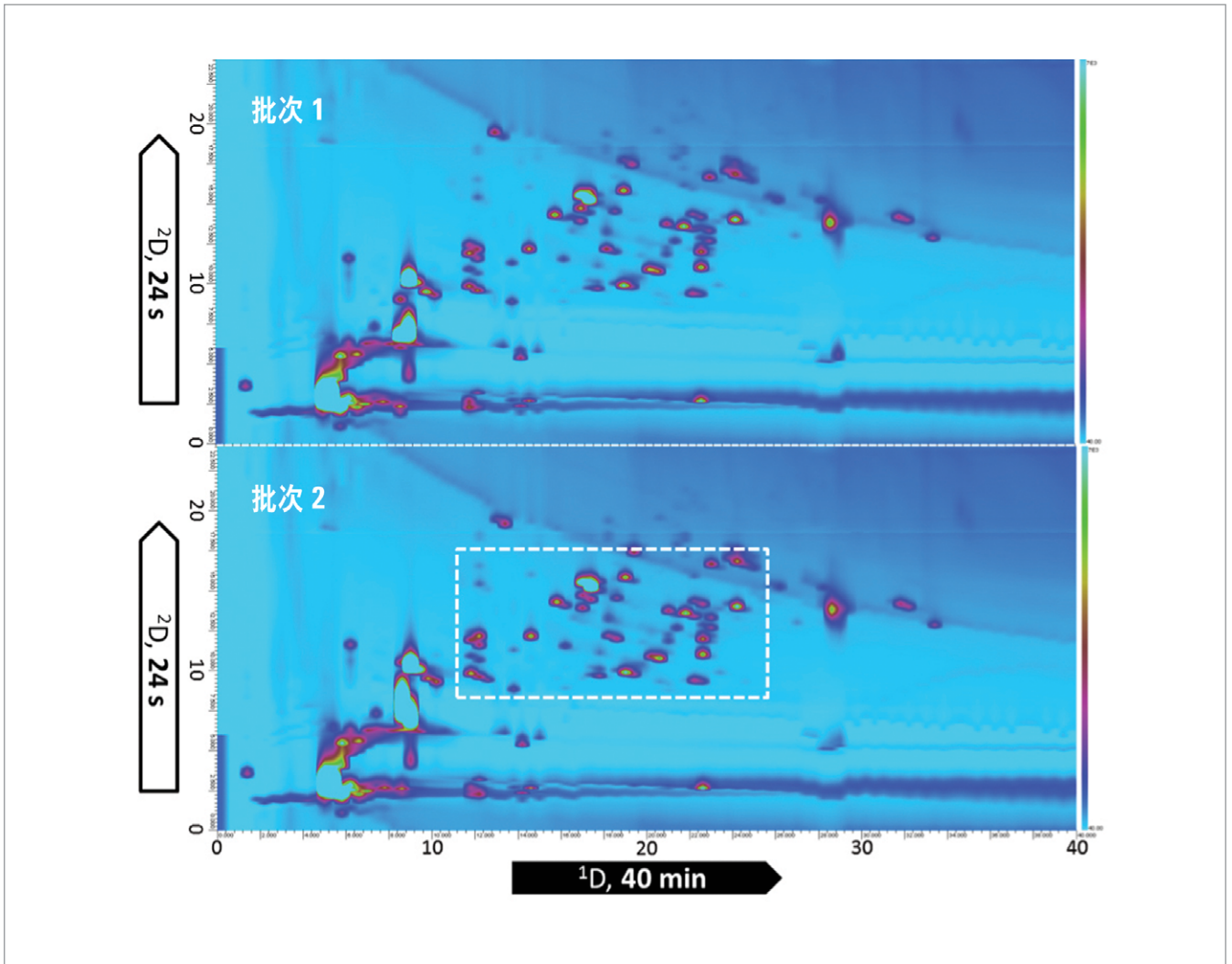


图 1. 赫赛汀两个批次产品的二维液相色谱肽图。第一维和第二维分离采用反相色谱，分别在高 pH 和低 pH 下运行。采用一个双定量环接口将馏分从一维转移到另一维中。紫外检测波长为 214 nm。

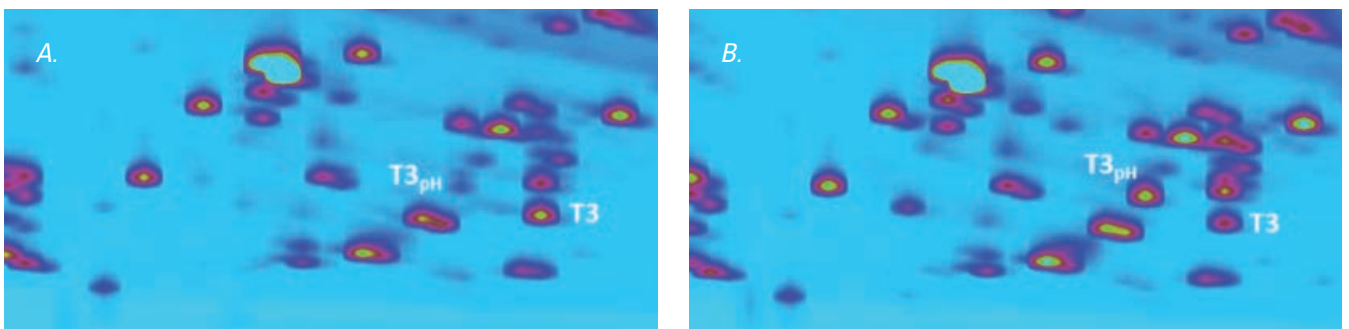
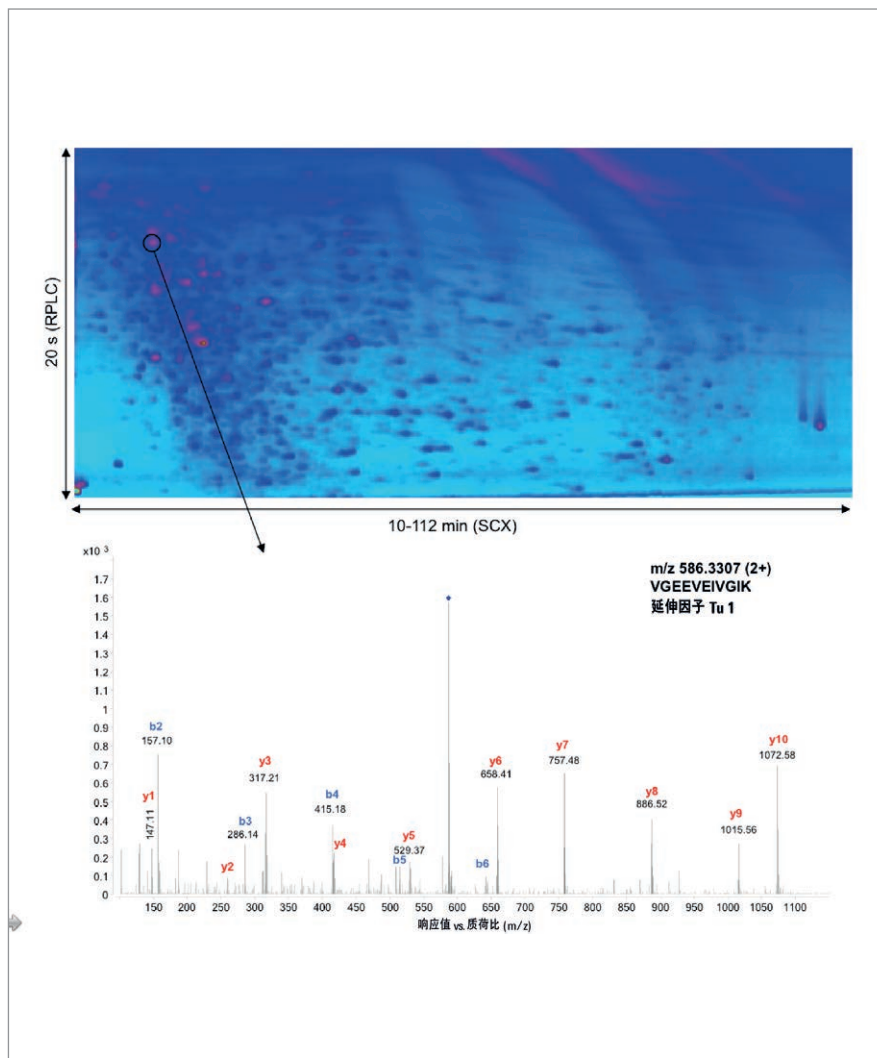


图 2. 未处理 (A) 和经 pH 处理 (B) 的赫赛汀同一批次产品的二维液相色谱放大肽图，显示出此单克隆抗体轻链中天冬酰胺的脱酰胺作用增强。T3 指从轻链 N 端起起的第三个酶解肽段。T3_{pH} 为脱酰胺的变体。

超越生物药物分析范畴：基于二维液相色谱的肽谱分析

作者: Koen Sandra, Gerd Vanhoenacker 和 Pat Sandra

基于二维液相色谱 (2D-LC) 的肽谱分析可用于生物药物分析以外的领域，如大肠杆菌裂解液胰蛋白酶酶解物的 SCX × RPLC 分离结果所示。与一维液相色谱相比，峰容量得到了大幅提高。两个维度间的高正交性可实现优异的分选性能，与快速 Q-TOF MS 系统联用后还可以解析所观察斑点中肽和蛋白质的鉴定结果。



用时，即可成为一款强大的表征工具。然而当我们继续进行研发流程直到进入临床或上市阶段时，质谱应最好被紫外检测取代，此时二维液相色谱具备的更高分离度将会派上用场。当然，商业化仪器的出现使生物药物分析中二维液相色谱的普及推广迈进了一大步。

Koen Sandra 为研发主任，Gerd Vanhoenacker 为液相色谱产品专员/经理，Pat Sandra 为创始人兼总裁，他们均来自比利时科特赖克色谱研究所。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, J. Chromatogr. A, 1335, 81-103 (2014)
2. G. Vanhoenacker, K. Sandra, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, U. Huber, E. Naegel, Agilent Technologies, Application Note 5991-2880EN (2013)
3. G. Vanhoenacker, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, K. Sandra, Anal. Bioanal. Chem, Special Issue "Multidimensional Techniques", in preparation
4. K. Sandra, M. Moshir, F. D'hondt, R. Tuytten, K. Verleysen, K. Kas, I. Francois, P. Sandra, J. Chromatogr. B, 877, 1019-1039 (2009)

使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案分析单克隆抗体酶解物

二维液相色谱: HILIC x RPLC-MS。

作者: Gerd Vanhoenacker, Koen Sandra, Isabel Vandenheede, Frank David, Pat Sandra 和 Udo Huber。

前言

诸如治疗性单克隆抗体 (mAb) 等生物药物在多种疾病的治疗中变得越来越重要。肽谱分析是对其进行全面表征和纯度测定的一项常用技术。mAb 酶解物的复杂性要求系统具有最高的分离性能。与一维分离相比, 全二维液相色谱 (LC×LC) 将会大大提高峰容量。

结果与讨论

本文介绍了采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案与 Agilent 6530 精确质量数四极杆-飞行时间液质联用系统结合的 HILIC×RPLC 在曲妥单抗酶解物分析中的应用。在 LC×LC 配置中, 第一维 HILIC 与第二维 RPLC 的结合可为化合物 (如多肽) 提供良好的正交性。这种正交性和互补性已在多份报告中得到证明, 但大多采用了停流模式或离线 LC×LC 方法。曲妥单抗的 LC×LC 肽谱如图 1 所示。等高线图采用 MS 总离子流数据生成。通过采用安捷伦 MassHunter Bioconfirm 软件将实验采集的数据与曲妥单抗理论序列以高质量精确度 (< 5 ppm) 进行匹配, 从而对斑点进行鉴定。最终的分离结果表明两个维度间具有良好的正交性。

所开发方法的适用性通过经处理和未处理样品进行评价。在酶解前, 曲妥单抗采用强降解条件进行处理。对比经处理和未处理样品的数据即可找出降解产物。图 2 显示了肽 T41 及其氧化物的提取离子等高线图。对比未处理和氧化样品的图谱可以明显看出, 未处理的曲妥单抗中已经含有少量氧化物。图 2 中的插图是相应质谱图。

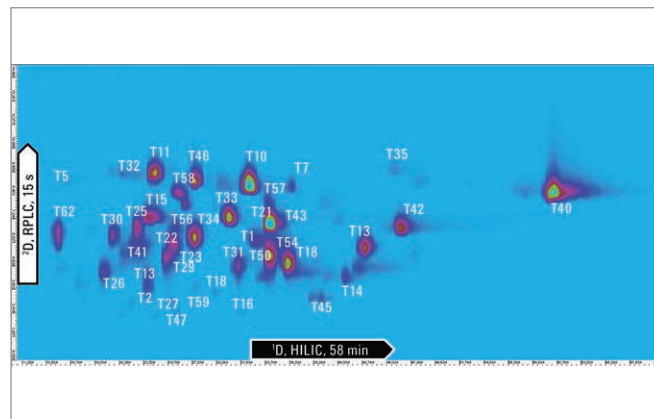


图 1. 曲妥单抗胰蛋白酶酶解物分析的 LCxLC 等高线图

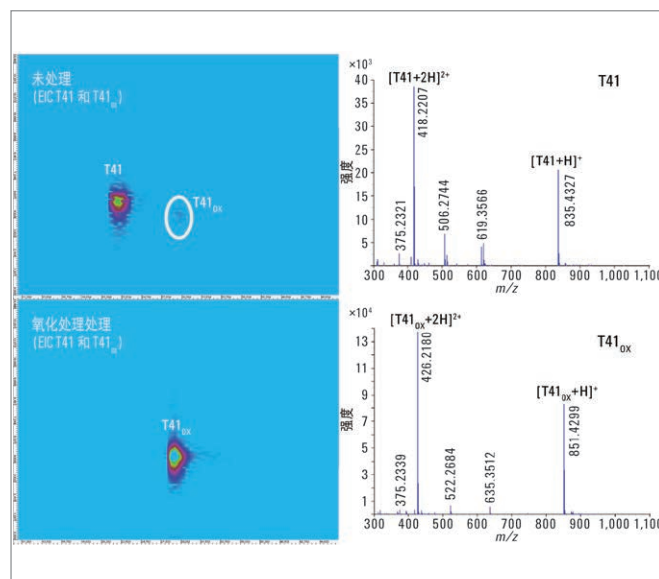


图 2. 分析未处理和氧化处理的曲妥单抗胰蛋白酶酶解物所得的 LCxLC 提取离子等高线图

结论

Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案与 Agilent 6530 精确质量数四极杆-飞行时间液质联用系统的结合是单克隆抗体酶解物全面分析的理想选择。LC×LC 与高端质谱仪的结合在详细肽谱分析方面具有很大潜力, 这可以通过经处理和未处理曲妥单抗酶解物的一些代表性分析结果得到证明。

如需了解完整解决方案, 请访问: tas.txp.to/2DLC/antibody

大型制药公司采用二维液相色谱

十几年前，我非常看好二维液相色谱具备的潜力。因此，我建立了一套系统并义无反顾地坚持了下去。如今，更成熟的二维液相色谱系统随时都可以在药物分析中发挥更大的作用。

作者: Cadapakam J. Venkatramani

在研究生院中我痴迷于已故教授 John B. Phillips 的研究，他于 1990 年初发明了全二维气相色谱 (GC) 系统。我的二维色谱之旅是从加入他的团队开始的；对于采用互补固定相将第一维色谱柱的所有洗脱物进样至第二维色谱柱进行进一步分离这一技术的前景，我充满信心。作为研究生，我将大量精力投入到二维气相色谱研究，尤其是石油样品的分离中。研究的重点是采用全二维气相色谱分离石油样品中的 4000 多种成分，这充分证明了此项技术具有很大潜力 (1)。90 年代后期我加入了一个制药公司，并认为它会成为我将二维气相色谱理念拓展到液相色谱 (LC) 领域的理想之地。然而直到本世纪初，我才在天时地利人和的条件下得到了一个机会，从此真正开始追求我的二维液相色谱目标。

自制二维液相色谱

二维气相色谱可以真正发挥作用，因此我相信二维液相色谱也一定能够获得成功。最重要的问题是，“我如何去建立一个系统？”市面上并没有现成的仪器，但幸运的是我们有许多台并排放置的 HPLC 系统，所以问题在于如何对它们进行配置以及如

何设计一个二维液相色谱接口将第一维色谱柱的洗脱物转移到第二维色谱柱上。简单地说，我利用一个 12 通双位阀组合出了一个系统，并于 2003 年发表了这项成果 (2)。论文中着重介绍了一些不同的二维液相色谱设置，包括第二维中的单色谱柱和并联的双色谱柱、多种检测器，以及其他一些内容。事实上，那时我们开展的工作与当前多维液相色谱的研究非常类似。我想我们跑在了时代前面！

当然，建立自己的系统将面临诸多挑战。其中一个问题就是，阀反复切换产生的噪音会使共洗脱的杂质难以从噪音尖峰中被识别。我需要使阀切换时间完全同步，而考虑到系统的限制，这可是一项不小的工程。我必须集成一个高速电子定时器，以便在触发后每 30、60 或 90 秒根据项目需要自动并重复启动切换序列。总而言之，我必须考虑到三个主要问题：(i) 如何配置两个 HPLC 系统，使它们实现通讯，(ii) 如何成功提取第一维色谱柱中的馏分，并将其聚集在第二维色谱柱的柱头上以便进一步分离，以及 (iii) 如何降低阀切换产生的基线噪音。只有解决了这些问题，我们才能得到数据。

从二维液相色谱系统中获得二维数据同样具有极大挑战性。HPLC 系统给出一系列检测器响应值作为第一维色谱柱保留时间的函数。第二维的保留时间成为了真正的缺失环节。这使我们不得不在考虑数据采集频率和阀切换频率的基础上，在 Excel 中手动重新创建这些数据 (3, 4)。由酸性、碱性和中性化合物组成的样品混合物在二维混合模式固定相（第一维为酸性，第二维为碱性）中分离得出的二维等高线图如图 1 所示 (4)。样品组分被分离为酸性区和碱性区，以及沿对角线分布的中性组

分。样品组分在二维平面上的位置反映了它的化学性质。

因此，尽管存在诸多挑战，我们仍可以获得出色的数据证明了这一理念的可行性，这让我们感到所付出的巨大努力是值得的。说来有趣，那时我们在一些未发表的专有研究中采用了亚 2 μm 色谱柱，未料想有一天它竟然发展成为了现在俗称的亚 2 μm 色谱法。那时我们只知道需要使用小粒径 (1.8 μm) 色谱柱来实现快速高效的分离。

总之，虽然早些年我们对二维液相色谱付出了大量的创造力与艰苦的努力，但的确也获得了丰厚的回报。

将二维液相色谱提升到新的水平

安捷伦于两年前推出二维 LC-MS 系统前，我一直在使用自制系统。

现在，像我一样的研究人员不需要再担心我们曾经面对的许多问题。二维液相色谱已经成为了一种完美而直观的方法；它不再只是极少研究人员手中的研究工具，而是能够提供重复梯度分析能力的一款商业化工具。每个梯度的起始有机相浓度与之前梯度相比都可以不断提高，从而提高了效率。以前，我不得不在两个维度中都利用平缓梯度，但在当今的系统中，重复梯度编程几乎不受任何条件的限制，这开辟了全新的应用领域。

在药物分析中，我们尤其关注主要活性药物成分中痕量共洗脱杂质的分离和鉴定。但由于在主峰附近洗脱的化学成分往往具有类似结构（或为同分异构体），因此开发出灵敏的专属性 HPLC 方法绝非易事，并且二极管阵列检测器 (DAD) 和质谱等常规检测技术也具有一定局限性。此外，这些杂质的浓度往往也要低好几个数

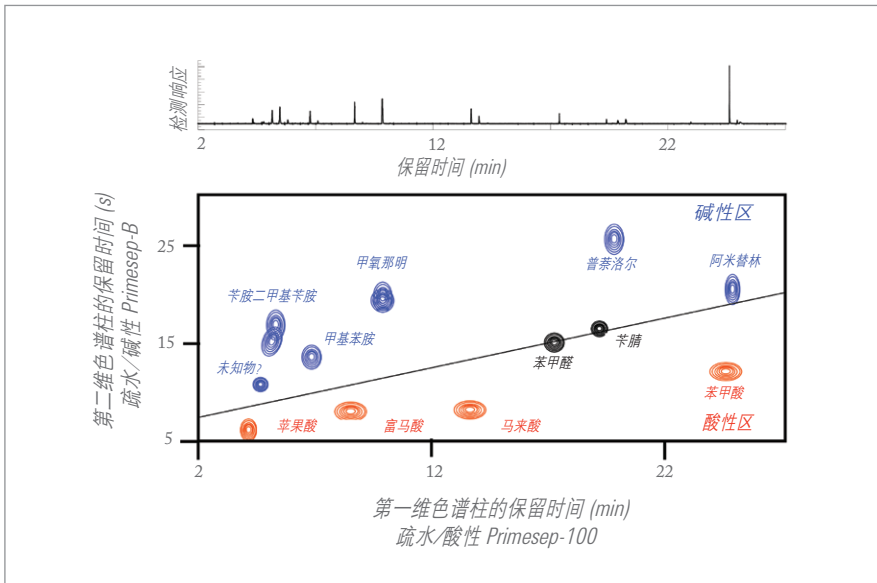


图 1. 测试混合物在 Primesep-100 色谱柱 (第一维) 和 Primesep-B 色谱柱 (第二维) 上的互补性二维液相色谱分离结果。一维色谱图 (上图) 用于生成二维等高线图。第一维色谱柱的流速为 0.5 mL/min, 第二维色谱柱的流速为 3.25 mL/min。紫外检测波长为 215 nm。

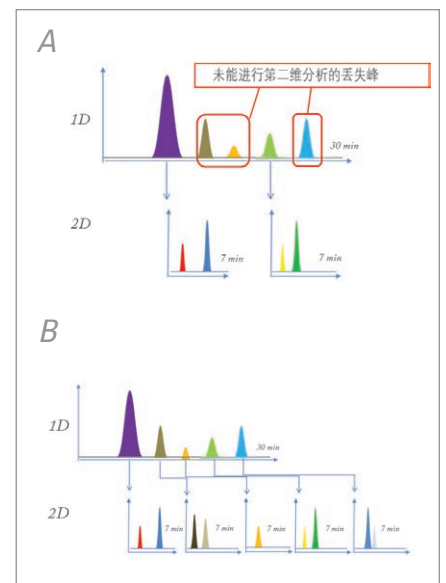


图 2. A. 标准中心切割二维液相色谱。B. 采用多重中心切割峰保留解决方案的二维液相色谱, 它可以在 12 个样品定量环中收集并储存多个馏分。

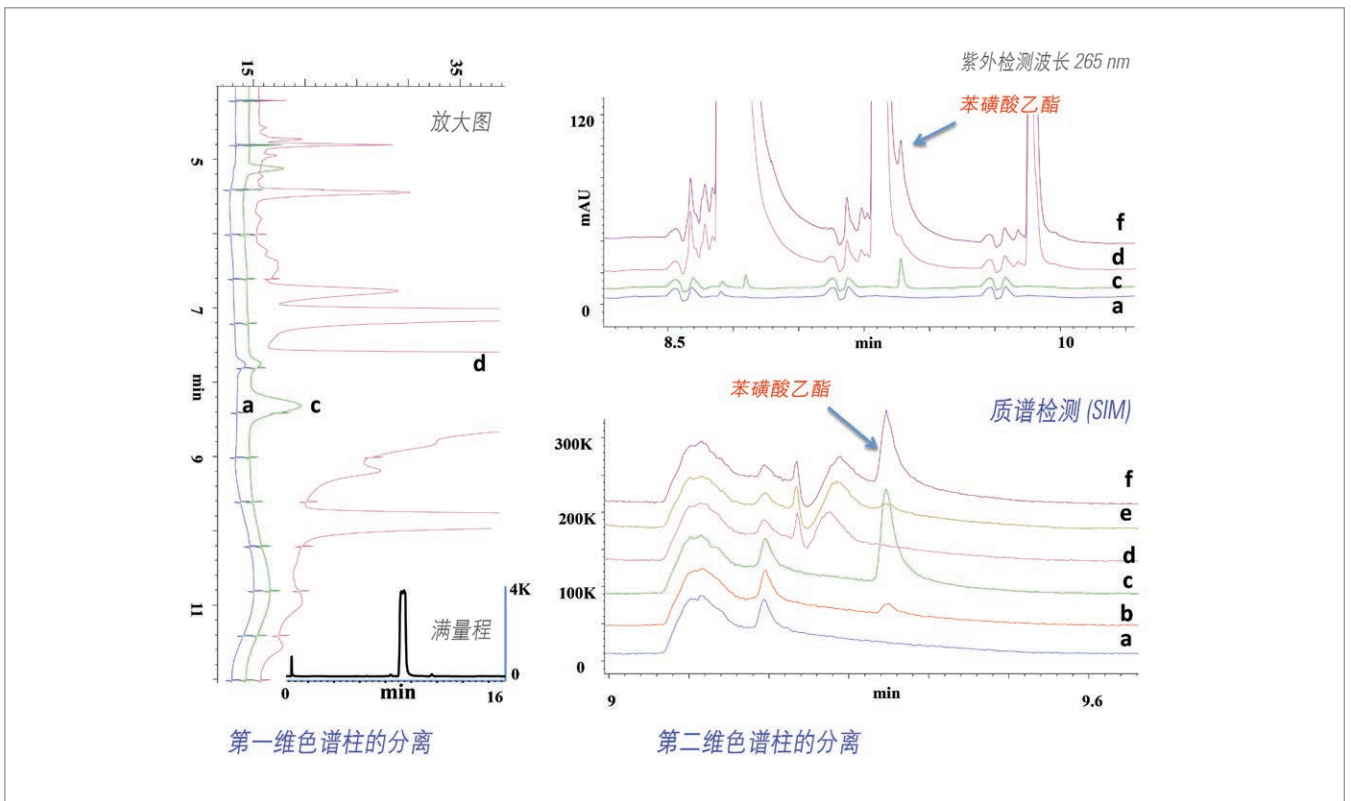


图 3. 被加标至活性药物成分 (API) 中的遗传毒性杂质苯磺酸乙酯的二维 LC-MS 分结果。左图为第一维色谱柱的分离, 采用 C18 色谱柱 (5 cm x 2.1 mm x 1.8 μm)。插图为第一维色谱柱分离的满量程图。右图为所转移馏分的第二维色谱柱分离, 采用 265 nm 的紫外检测 (上图) 以及苯磺酸乙酯特征离子的 MS-SIM (M+1 离子, 下图) 进行监测。第二维采用 PhenylHexyl 色谱柱 (5 cm x 2.1 mm x 1.8 μm)。

采用紫外检测时, 苯磺酸乙酯在第二维色谱柱中仅可部分分离。下图所示的未加标与加标样品的质谱曲线证明了采用质谱检测的二维液相色谱的分离能力。a: 稀释后的空白, b: 0.5 ppm 苯磺酸乙酯标样, c: 5 ppm 苯磺酸乙酯标样, d: 未加标 API, e: 0.5 ppm 苯磺酸乙酯加标的 API (10 mg/mL), f: 5 ppm 苯磺酸乙酯加标的 API (10 mg/mL)。

使用二维液相色谱的窍门

1. 了解您的样品
2. 向自己提问：“我想要实现什么？”以及“二维液相色谱有助于解决我的问题吗？”
3. 回顾文献。明确已经完成的工作；不要做无谓的重复劳动
4. 明确哪些是市售仪器；让事情变得容易
5. 进行实验并享受游戏一般的乐趣

量级。这就像我们想要看到大小如同世界上最高建筑（迪拜的哈利法塔）的主成分峰，同时又不希望错过它下方大小如街道上行人的杂质。通过在第二维中使用另一种分离机制，我们将有第二次机会找到所有共洗脱组分。这是用于制药行业的一个主要优势。

在小分子药物科学领域中，由于只需要分析主要组分峰附近的杂质，完整的全二维液相色谱并没有太大优势。我们更倾向于采用一种选择性或伪全二维分析方法（有些像扩展的中心切割法）。由于目前只能每 30 或 60 秒生成一次第二维的色谱图，因此我们需要在主峰洗脱期间降低第一维色谱柱的流速（例如从 1 mL/min 到 0.05 mL/min），以将更多馏分传送到第二维色谱柱上。安捷伦在 HPLC 2014 上推出的最近一项创新即为多重中心切割的峰驻留解决方案，它可以在 12 个样品定量环中

收集并储存多个馏分，然后对这些馏分依次进行分析（见图 2）。采用此解决方案后，我们就不再需要降低第一维色谱的流速了。我相信它对于制药行业一定具有极高的价值。我们正在等待试用版本的推出。

有关二维液相色谱在制药行业独具潜力的另一个示例，是对质谱不兼容方法中潜在共洗脱物的评估。您可以在不影响质谱的前提下，从第一维色谱柱中取出一小部分不兼容质谱的流动相，并将其注入第二维色谱柱进行进一步分离。我还发现二维液相色谱在遗传毒性杂质分析方面具有很大应用潜力；这些杂质会显著影响患者的健康，而且必须在极低浓度下进行定量分析。共洗脱遗传毒性杂质的二维 LC-MS 分析应用如图 3 所示。苯磺酸乙酯是一种在第一维色谱柱中可与 API 峰共洗脱的遗传毒性杂质，采用 UV 检测在第二维中可以实现部分分离。使用质谱等灵敏的专属性检测器可检测出浓度差超过 4 个数量级的共洗脱杂质，这证明了二维液相色谱具有出色的分离能力。

非手性/手性分析是另一个二维液相色谱可以发挥重要作用的领域，尤其在手性中心的数量增加时。在早期的工作中我们采用二维液相色谱同时进行了非手性/手性分析，印证了这一理念的正确性 (5)。

将来，我确信二维液相色谱将会用于评估共洗脱物的稳定性指示方法，并成为优化或改进常规分析方法的一种反馈机制。通过在开发初期将二维液相色谱用作研究工具，我坚信我们会开发出更耐用的稳定性指示方法。

在未来 5–7 年内，特别是在监管机构

采取更强硬立场，并对潜在共洗脱物的稳定性指示分析方法执行更严格审查的条件下，二维液相色谱凭借这些优势成为万众瞩目的焦点也不足为奇。

Cadapakam J. Venkatramani 是美国加州旧金山基因泰克有限公司小分子药物科学所的资深科学家。

参考文献

1. C. J. Venkatramani and J. B. Phillips, "Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography Applied to the Analysis of Complex Mixtures", *J. Microcolumn Sep.* 5, 511-519 (1993)
2. C. J. Venkatramani and Y. Zelechok, "An Automated Orthogonal Two-dimensional Liquid Chromatograph", *Anal. Chem.* 75, 3484-3494 (2003)
3. C. J. Venkatramani and A. Patel, "Towards a Comprehensive 2-D-LC-MS Separation", *J. Sep. Sci.* 29, 510-518 (2006)
4. C. J. Venkatramani and Y. Zelechok, "Two-dimensional Liquid Chromatography with Mixed Mode Stationary Phases", *J. Chromatogr. A* 1066, 47-53 (2005)
5. C. J. Venkatramani et al., "Simultaneous, Sequential Quantitative Achiral-Chiral Analysis by Two-dimensional Liquid Chromatography", *J. Sep. Sci.* 35, 1748-1754 (2012)

手性药物的非手性-手性中心切割二维液相色谱分析

采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案进行杂质分析并同时测定对映异构体组成。

作者: Sonja Krieger 和 Udo Huber

前言

根据 ICH 指导原则 Q3A (R2), 必须对新药中含量在 0.05% 或以上的杂质进行报告, 并对含量在 0.1% 或以上的杂质进行鉴定。手性药物的对映异构体通常具有不同的药代动力学特征和药理学活性。一种对映异构体可能具有药理活性, 而另一种可能没有活性或甚至有毒性。因此, FDA 已针对立体异构体新药的开发发布了指导, 要求需要了解具有一个手性中心的药物立体异构体的组成, 并要求最终产品的技术指标应包括从立体化学角度出发对纯度的保证。

结果与讨论

可以将药物的浓缩溶液进样到液相色谱中, 进行药物中所含杂质的分析。从药物中分离出的杂质通常会被检测为一个紧邻主成分大峰的小峰。

选择外消旋布洛芬来证明手性药物中的杂质分析原理, 同时对 API 中的对映体组成进行测定。图 1A 显示了由布洛芬第一维反相色谱分析得出的色谱图。此时, 一些杂质由主成分中被分离出来。

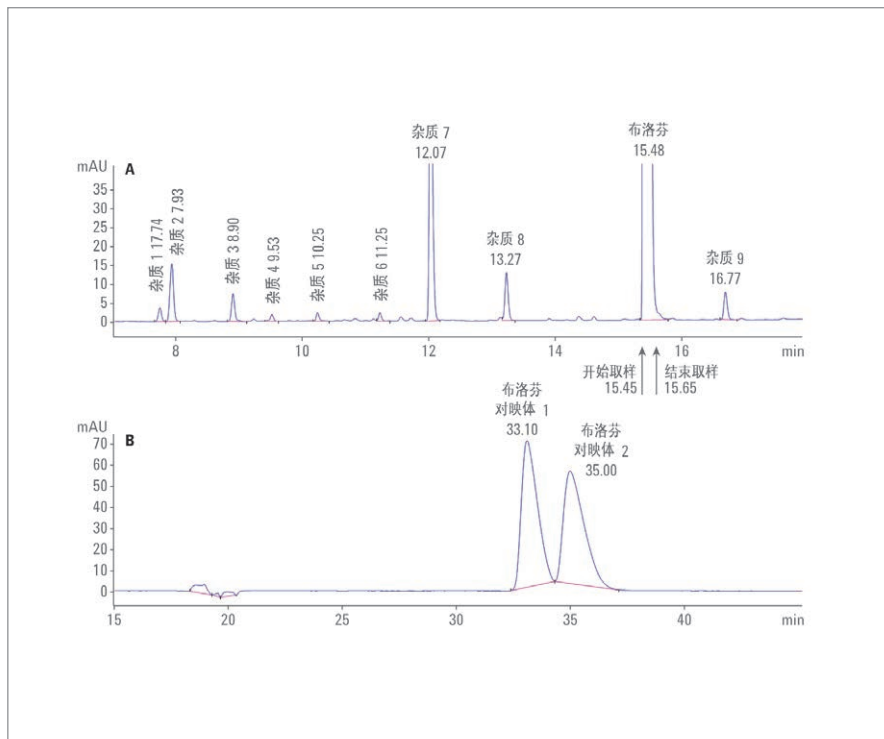


图 1. A. 布洛芬及其杂质 1-9 在第一维反相色谱柱上的分离, 以及 B. 布洛芬峰的中心切割, 以及将其转移到第二维手性柱进行对映体拆分。

截取 15.45 分钟时第一维色谱柱的洗脱物, 定量环充填时间为 0.20 分钟, 从而将布洛芬峰转移到第二维手性柱中进行对映体分离。图 1 显示了第一维色谱柱的洗脱物被切割并被转移到第二维色谱柱中 (A), 并在第二维手性色谱柱中进行布洛芬的对映体拆分 (B)。在第二维手性柱上拆分布洛芬对映体的分离度为 $R_s = 1.25$ 。

结论

本文说明了 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案非常适用于手性药物中杂质的分析以及 API 对映体组成的同时测定。

在第一维中, 反相色谱分离用于从 API 中分离非手性杂质。中心切割实验用于将 API 转移到第二维手性柱进行对映体组成的测定。

如需了解完整解决方案, 请访问:
tas.txp.to/2DLC/chiral

二维液相色谱领域的新进研究者

两位二维液相色谱领域的新人讲述了他们到目前为止总结出的经验，并讨论将来他们计划如何对此项技术进行充分利用。

代谢组学大师

Bernd Kammerer 领导着德国弗莱堡大学生物系统分析中心 (ZBSA) 的代谢组学实验室，该实验室的目标是对生物系统中的所有代谢物进行鉴定和定量。Bernd 在代谢物和代谢组分析，尤其是利用质谱和核磁共振方法方面有着丰富的科研经验，他对于聚类分析和代谢组学数据挖掘的生物信息学方法也非常熟悉。

代谢组学有什么特定的分析需求？

代谢物浓度的复杂性与宽动态范围为定性和定量分析带来了严峻的挑战。通常，目标化合物是质量介于 100 – 1000 Da 范围内的小分子。这是在细胞培养样品、尿液和血液等各种不同生物基质中进行的研究。一方面，您需要精确的质谱分析；另一方面，高效的色谱分离也必不可少。

您如何看待二维液相色谱在过去十年中发生的改变？

十年前，主要通过以离线方式连接第一维和第二维来实现二维液相色谱。这样虽然可

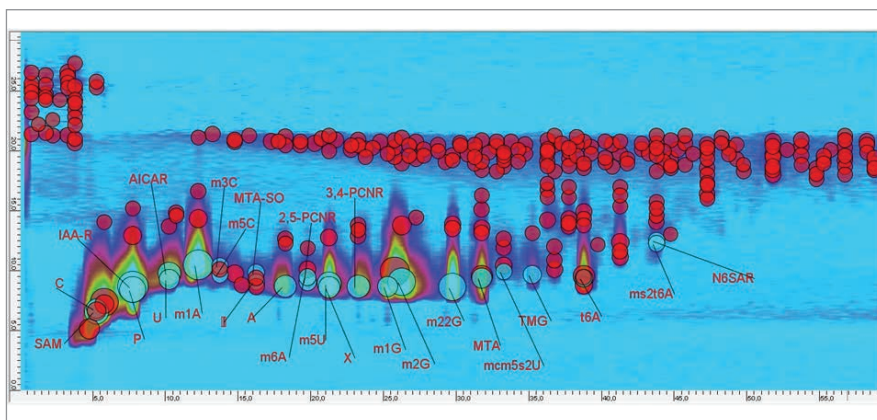


图 1. 采用二维 LC-QToF MS 对 SPE 纯化尿样中的修饰核苷的检测结果

以得到极高的分离性能，但却非常耗时，不过现代二维液相色谱系统已经成功解决了这个问题。如今，我们可以在无需担心耗时与潜在误差的前提下运行全二维液相色谱。

在初次考虑到二维液相色谱时，您需要解决什么问题？

我们的主要研究项目是鉴定代谢信号用于人乳腺癌的早期诊断。为了实现这个目标，我们分析了极其复杂的不同生物样品。我们的目标物——修饰的核苷和核糖基化衍生物在化学结构上只有微小差异，因此，它们在液相色谱上的保留可能也是如此。因此，我们决定将色谱分析提升到一个全新水平，即二维分离。

代谢组学通常涉及含有数百种化合物的复杂基质，因此强大的分离能力是必不可少的。不完全的分离可能会导致高活性自由基阳离子的形成，在进入质谱之前，它们会在离子源 (ESI 或 APCI) 中相互作用，

造成离子抑制并生成伪峰。鉴于我们时常需要区分目标分子两种不同的生物状态，因此，改进目标化合物的（半）定量分析就非常重要，尤其需要解决与离子抑制相关的问题。更高分离性能的另一个优势就是可以测定之前被隐藏的代谢物。

您对二维液相色谱有什么期望？

实际上有两条。我们涉及的结构种类是差异修饰的核苷，并且我们希望对于采用单色谱柱几乎无法完全分离的异构体和核苷实现更好的差异性分离。我们还希望色谱峰能够在第二维分离中进行纯化，从而有助于限制背景噪音。

到目前为止您获得了哪些经验？

我们刚开始利用这项新技术，目前正在方法进行方法优化。选择正确的分离机制是方法开发的第一步。色谱柱维数、溶剂和洗脱梯度都会为提高分析性能提供多种可能，



不同色谱填料的组合会使正交性、保留和峰容量产生显著差异。我们的二维液相色谱可用作带有二极管阵列检测器的独立解决方案，它也可以与不同质谱仪联用。这种丰富的功能性和高度的灵活性对于复杂生化通路的研究至关重要。

当前，我们正在着手对一大批实际样品首次进行全面测定。第一批结果看起来非常令人鼓舞（见图1）。

您是否认为二维液相色谱会在代谢组学研究中得到更广泛的应用？

是的。由于全二维液相色谱具有很高的通用性，因此它将会得到更多的重视。我认为与不同离子源以及质谱解决方案联用的二维液相色谱将成为分析化学应用中，尤其是在必须应对复杂基质和/或复杂分析物谱图的研究中不可或缺的工具。

在不久的将来您会如何使用二维液相色谱？

我们正在计划将我们的二维液相色谱解决方案与不同的质谱仪联用，以解决样品和色谱分析的一系列挑战。此时，针对正在面临的特殊挑战对色谱方法进行优化显得至关重要。特别是对于修饰核苷中普遍存在的结构异构体的分离，二维液相色谱技术为我们开辟了新的应用前景。



杂质分析家

Ole Gron 在制药行业利用光谱从事分离科学工作已有 10 多年了。Ole 现在就职于 Vertex 圣迭戈研发中心的分析开发部，这里可提供从早期药物开发到临床试验等重要阶段的技术支持。

您使用二维液相色谱有多长时间了？

两年来我们一直在对此项技术进行评估，以了解其是否如 Vertex 希望的那样可以更大规模地加以利用。

是什么具体的难题促使您开始关注二维液相色谱？

老实说，当我第一次听说二维液相色谱时，虽然它听起来很新鲜有趣，但我并没有在工作中发现对它的需求。毕竟那时我们还没有像其他领域一样，因面对超负荷的色谱图而被搞得焦头烂额。然而，这一技术的商业化促使我们开始认真地考虑这一需求，因为这意味着我们可以直接采用商业化系统对这项技术进行测试，而无需再浪费时间建立足够稳定的系统。我们的主要需求在杂质分析领域；虽然我们的色谱图还没有超出负荷，但我们会碰到共洗脱出的结构相关杂质。我们时常需要运行两个独立却正交的 LC 方法来提高可靠性；从根

本上说，我们希望尽可能快地获得尽可能多的分离结果。我们想知道能不能将这两次一维运行结合为一个单独的二维液相色谱方法。

您认为二维液相色谱是容易还是困难？

当然，这有一个学习过程，还有许多参数需要仔细考虑。然而对设置渐渐习惯之后，运行系统就相对容易了。更重要的是，我能够相信商业化系统可以始终如一的结果。稳定性非常重要。

如今您如何使用二维液相色谱系统？

我正在使用多中心切割对第一维分离中的每个杂质峰进行评估。现在我使用“峰驻留”配置系统对每个杂质峰进行储存，这能够使我在第二维分离中拥有更长的分析时间。

您认为制药行业采用二维液相色谱的速度将有多快？

我想我们将不会看到使用量的激增；制药行业对于新技术的应用相当保守，因此这需要一些时间。然而，如果已经尝到了更出色技术的甜头，就很难再回头了。我已经在许多不同的应用中评估了二维液相色谱，可以想象在随后的一两年里，它在 Vertex 一定会得到更广泛的应用。

假如您也是二维液相色谱的新手，请访问以下链接观看由 Koen Sandra 和 Dwight Stoll 主讲的自选网络研讨会并向大师们学习：tas.txp.to/1114/2DLCwebinar

生物药物的多中心切割和全二维液相色谱分析

采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案对复杂 N-糖链进行在线二维液相色谱分析, 实现最高分离度。

作者: Sonja Schneider, Edgar Naegele, Jens Trafkowski 和 Sonja Krieger

前言

促红细胞生成素 (EPO) 是一种分子量为 30400 道尔顿 (Da) 的糖蛋白类激素, 它可以调节红细胞的生成 (erythropoiesis, 红细胞生成)。由于 EPO 包含多个糖基化位点, 而每一个位点都具有多种可能的糖链结构, 因此其糖基化形式高度可变。如此导致的糖链结构的极端复杂性被称为微观不均一性。重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 在与癌症有关的贫血、慢性肾衰竭和 HIV 感染等一些不同疾病的治疗中非常有效。对生物药物的糖链谱图进行详细表征是一项法规要求, 因为糖基化差异会影响药物在人体内的药效学和药代动力学特征。因此, 开发先进的分析技术以实现高效和详细的糖基化分析显得很有必要。

结果与讨论

为所释放糖链的标准 HPLC 分析选择的方法通常是亲水相互作用色谱 (HILIC), 在分析前采用 2-氨基苯甲酰胺 (2AB) 对糖链进行标记, 以实现高灵敏度的荧光检测。虽然 HILIC 可以根据流体动力学半径实现糖链

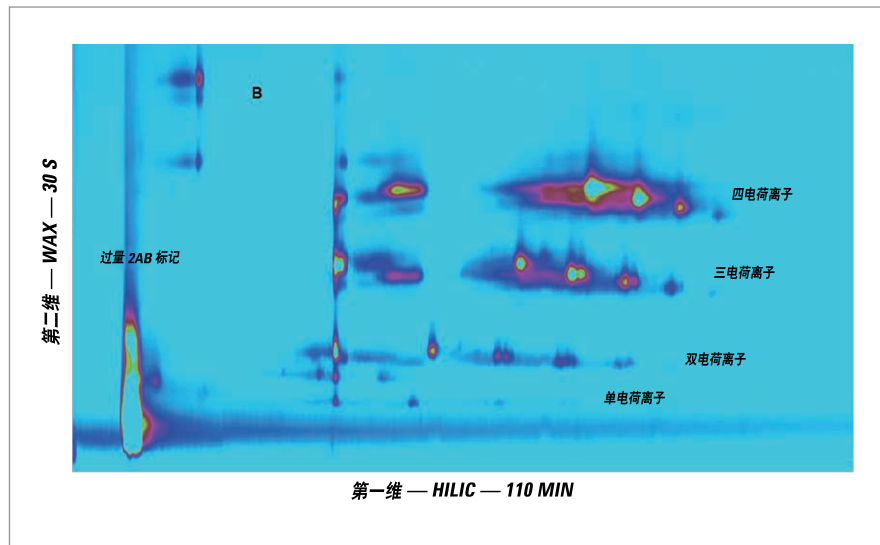


图 1. 胎球蛋白 (A) 和 EPO (B) 的 HILIC/WAX 全二维液相色谱分离结果, 展现了高度正交的分离性能。第二维的离子交换色谱揭示了糖链的电荷分布情况。

的高效分离, 但它仍不足以对样品中具有分支结构糖链的复杂混合物 (如 EPO) 实现完全分离。幸运的是, 弱/强阴离子交换色谱 (WAX/SAX) 提供了高度正交的分离性能, 它依靠糖链中酸性单糖的数量和排列实现分离。WAX/SAX 与 HILIC 的结合将极大提高二维液相色谱 (2D-LC) 的峰容量, 因为这两种分离技术间有高度正交性。

Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案拥有全二维或 (多) 中心切割分析的在线二维液相色谱工作流程。全二维液相色谱分析采用通过一个 2 位/4 通阀连接的两个样品定量环, 可采集第一维中的所有色谱峰。如果期望在第二维获得更高的分辨率, 1290 Infinity 多中心切割二维液相色谱解决方案可提供更高的灵活性, 例如, 采用更长的循环周期或使用更长的色谱柱。

二维分离提供了较高的峰容量和分离度, 许多来自 HILIC 维度的共洗脱峰均可通过 WAX 实现完全分离。第二维分离根据糖链的电荷将它们进行归类。中性糖链随进样峰立即被洗脱, 单电荷糖链紧随其后。双电荷、三电荷、四电荷及少量五电荷 (胎球蛋白) 糖链随着盐梯度的升高逐渐从第二维中洗脱, 实现了更完全的分离。根据净电荷对 EPO 异构体进行分类 (EPO alpha、EPO beta 等)。这种设置可同时实现电荷分析和糖链峰型模式的良好解析。两种分离机制的完美正交性如全二维液相色谱图所示 (图 1)。利用此方法能够实现筛查并了解整个样品的概况, 可用于指纹分析。

为实现最高的分离度, 我们开发出了全新的多中心切割二维液相色谱方法。在该设置中, 全二维液相色谱中的两个进样

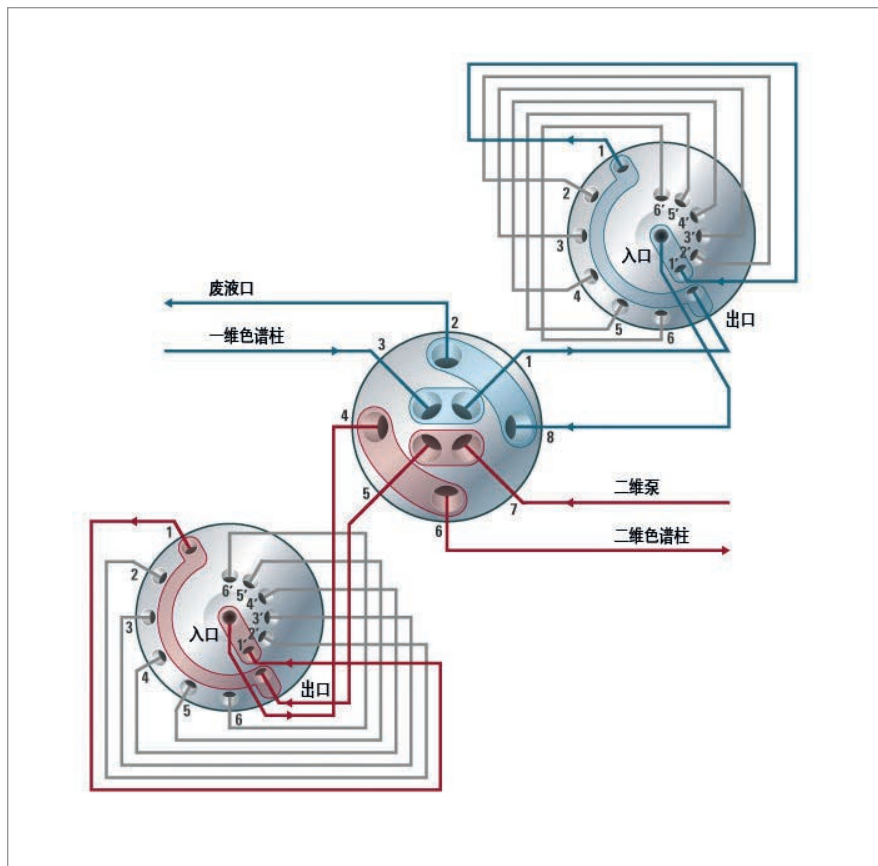


图 2. 2 位/4 通阀与两个带 12 个预装 40 μ L 定量环的 6 位/14 通阀组合的管线连接图

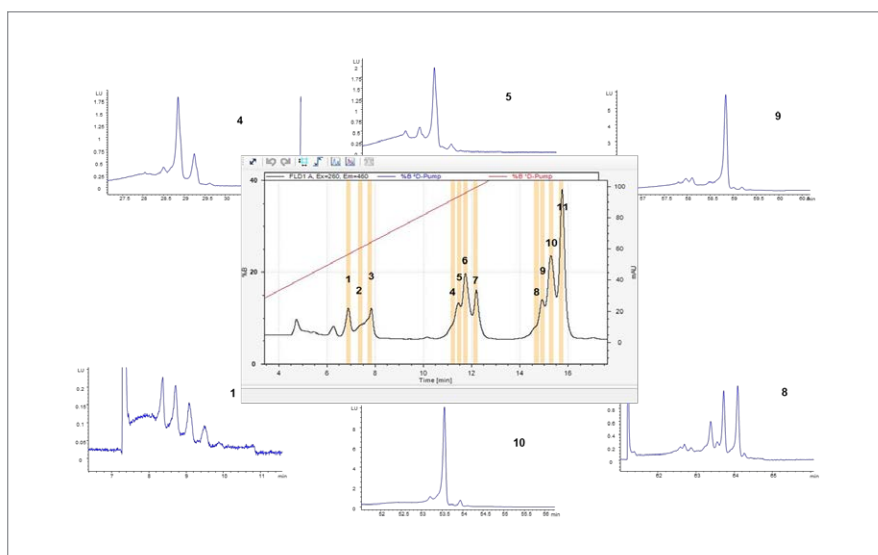


图 3. 展现多中心切割设置高分离能力的 6 个示例，标有 8 的区域分离出多达 8 个峰

定量环被两个 6 位/14 通色谱柱选择阀取代，后者配备了 6 个样品定量环（图 2）。

通过采用更长的分析周期或更长的色谱柱，多中心切割二维液相色谱还可以在第二维中实现最高的分离度。在当前的应用中，这种高灵活性使我们可以第二维中使用 HILIC，而这在全二维液相色谱中却很难实现，因为在运行时间极短的情况下还需满足 HILIC 色谱柱较长的再平衡时间。我们采用 3.5 分钟的梯度时间以及 1.4 分钟的再平衡时间。糖链被保留在短 HILIC 色谱柱上，从而获得了出色的二维分离度（图 3）。我们利用 6 个示例来证明 HILIC 在多中心切割设置下的分离能力（峰 1、4、5、8、9 和 10）。在第一维共同显示为一个主峰的多数隐藏峰可通过第二维进行检测与分离，例如峰 8 在第二维中至少显示出 8 个峰。

结论

全二维液相色谱和多中心切割二维液相色谱在单台仪器上的结合成为了糖蛋白全面分析的理想工具。

如需了解完整解决方案，请访问：

tas.txp.to/2DLC/glycan

使二维液相色谱成为主流

二维液相色谱并不是一项新技术，但最近推出的商业化系统才得以在它强大分离能力的基础上新增了易用性、可靠性和重现性。这样做的结果是，二维液相色谱如今更易于被更广泛的受众所接受。Michael Frank 和 Jens Trafkowski 在本文中分享了迄今为止安捷伦对此项技术付出的努力，并对其前景做出了简单的展望。

Michael，您能给我们简要介绍一下安捷伦的液相色谱策略吗？

Michael Frank: 从常规系统到该领域前沿研究人员所用的超高性能系统，安捷伦科技公司提供了各种分析型液相色谱系统以满足不同用户的需求。

就我们产品系列中的最高端产品而言，我们的意图非常明确——就是尽可能提供最高性能。实现这一目标的主要方式即提高效率，我们将它分为三部分：

分析效率 — 必须为客户提供最好的数据，以解决复杂的分析问题。

仪器效率 — 操作人员能够与系统轻松互动，例如快速创建新方法。

实验室效率 — 系统应具有向下兼容性，可以轻松集成到现有实验室环境中、有助于降低运行总成本等等。

如上所述，从一开始我们策略的一个重要内容就是向下兼容性，这意味着所有的新系统首先必须能够与之前的系统匹配。我们已经在研发中投入巨资来兑现这项承诺。



Michael Frank 是液相分离事业部全球市场高级总监，该部门兼管分析系统和毛细管电泳。在 10 年前加入安捷伦之前，Michael 是 Graffinity 制药公司（后更名为 Santhera）的分析主管。他最初是海德堡大学的一名无机化学家，拥有化学博士学位。

二维液相色谱将如何融入这一产品系列？

MF: 在我们看来，二维液相色谱可以提供最高的峰容量和分离度，因此它有助于进行复杂样品的快速分析。我们有多种途径可以提高分离度和峰容量。首先是减小填料粒径。这种理念下诞生了 UHPLC，可以肯定它已经我们将我们带入了一个新的时代。但过小的填料会增大系统背压，而峰容量的实际增加却很少。对于二维液相色谱，我们不再用百分数衡量峰容量的增加，而应采用 2 倍或 3 倍等因子。

我们已经付出了大量投资，专注于开发只具备基本液相色谱经验的分析人员也可以操作的稳定的商业化系统，从而推动二维液相色谱由一项实验性的“自制”技术不断向前发展。我们于 2012 年正式推出了二维液相色谱技术，因此有幸看到我们的系统被用于大型制药公司的方法开发实验室等生产环境中，这与它开始时有待开发的小众技术的定位已相去甚远。



Jens Trafkowski 是液相分离事业部全球产品经理，2012 年开始接管安捷伦的 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案。在 2011 年加入安捷伦之前，Jens 作为一名拥有超过 6 年经验的应用专家，为 LC-MS 系统提供培训和技术支持。Jens 凭借从事法医和临床毒理学方面的 LC-MS/MS 工作，在波恩法医学研究所中获得了博士学位。

许多公司已经发表了利用二维液相色谱完成的科学论文（其中几篇在本增刊中被引用），这是一个很好的迹象，表明二维液相色谱作为主流市场的有效技术已得到广泛认可，而这正是我们希望达到的目标。**Jens Trafkowski:** 二维液相色谱加入现有的产品系列后可以帮助客户提高解决复杂问题的能力，它完全符合我们的策略。通过将此项技术完全商业化，我们可以为用户提供前所未有的易用性，并降低出错的风险。我们已进行了大量前期工作来创建方法和方案，因此用户可以轻松快速地获得结果，同时他们还可以阅读我们编写的二维液相色谱基础导论，了解技术背后的理论。我们认为这种方式是推出一项技术的最佳选择，一旦成功后即可将出色、灵活与强大的新技术加入我们的分析工具包中。

合作开发具有什么样的重要性?

MF: 自开发初级阶段开始,我们就与一些二维液相色谱的思想领袖在学术和产业上展开了密切的合作。他们对我们的系统进行了审查并给予了宝贵建议,这使系统的可用性与性能得到了大大改善。

现在我们与当初的思想领袖和专家的合作暂告一段落,而是把精力投入了几乎没有多维分析经验的实验室,这对于我们制造商来说是另一种非常好的现象。自2012年以来我们已经完成了一些改进,例如,我们最近刚完成商业化的多中心切割二维液相色谱(见17页的图2)成为了一个完整的用户工具包,尤其在制药行业中可以发挥重要作用。

您想对那些对二维液相色谱只有有限需求的人们说些什么?

MF: 这是个很好的问题。如果用户主要利用的是一维液相色谱,但有时又需要二维液相色谱的性能,那么一维—二维可切换配置即可充分优化仪器的使用体验,这样您的二维液相色谱系统即可免于遭受遗弃角落落满灰尘的命运。这种灵活性设计与我们关于实验室效率的理念非常契合。

除了《二维液相色谱基础导论》(见封底内页)之外,从培训角度出发您还有哪些可以吸引客户的手段?

MF: 我们非常积极地举办技术研讨会,致力于提供二维液相色谱的再培训机会。但我认为,通过我们自己和客户不断进行扩充的应用简报文库不仅可以帮助客户了解二维液相色谱的工作原理和适用领域,而且还提供如何根据分析对象的不同灵活应用此项技术(中心切割、多中心切割、全二维液相色谱)的信息。通过以不同方式

提供额外的峰容量,每一种方法都具有独特优势。在许多情况下,我们已经开发出了未来的二维液相色谱用户将会需要的解决方案。

JT: 我们真心希望用户能通过我们的系统获得最佳性能,为实现这一目的,专业知识和操作培训至关重要。作为一名应用专家我真正明白,如果人们能对技术了解得更深入并获得更多信心,得出的结果也将得到极大改善。我们始终肩负着完成这一目标的使命。

我们期望看到二维液相色谱未来有什么发展?

MF: 尽管无法公开太多关于未来计划的细节(我敢肯定我们的竞争对手会喜欢这个!),但我可以明确地声明我们有一些坚定的目标,其中最主要的一个目标就是使二维液相色谱方法的设置变得更加简单。我们的目标是简化所有的复杂之处,使人们在接触二维液相色谱时像接触其他普通液相色谱方法一样,而不再感到头疼。在这方面,先进的数据分析功能也是非常重要的。

JT: 我们显然还没有走到技术开发的尽头。我们有许多等待详细讨论的创意和机遇,其中有一些是由我们的客户提供的。开发一直是、并且将永远是一个持续不断的过程。我们是技术领导者,并且希望保持这一地位。

您认为将在哪些应用领域获得最大成功?

MF: 二维液相色谱在复杂样品方面真正体现出了自己的价值,在这方面我认为它拥有无限广阔的市场空间。例如,我们拥有在加工食品中寻找过敏原的公司客户。其他一些人正在石化行业中寻找应用空间。

生物药物是复杂样品的代名词,还有一些针对杂质分析和方法开发的小分子分析应用。您很快就可以看到应用范围非常广阔,随着客户信心的不断增强以及目睹其他领域获得的成功,更多的应用领域将陆续涌现。

现在,二维液相色谱已经跨过了“早期尝试者”的门槛,迈入了最需要提高分离性能的应用领域中。我们期望二维液相色谱的成长就如同UHPLC的发展历程一样;10年前,UHPLC主要在公司和学术机构的研发部门使用,但它现在已经发展成为最常用的工具。

证明二维液相色谱前景光明的一个好的迹象是其他分析系统制造商也开始介入这一领域。这证明了我们很早就开始投资这项技术是一个正确的决定。作为市场首入者我们拥有巨大优势,我们也会努力将这种优势一直保持下去。

JT: 当然,随着二维液相色谱在多个领域一次次证明了自己,人们便会认识到它的优势,新的应用也会接踵而来。虽然我们无法预测所有情况,但我认为它的应用不会仅限于某些特定领域。从生物分析到食品,以及这一范围内的一切应用领域,都可能成为二维液相色谱扎根的土壤。

最后可不可以说一些鼓励话?

JT: 色谱工作者不仅希望抓住任何一个峰,而且还希望得到可靠和重现的系统,而这正是我们所提供的。

MF: 对于那些已经听说过二维液相色谱并产生了兴趣的人们,我想说:不要害怕!它是一款强大的工具,可以帮助您以前所未有的速度解决分析问题。从一维液相色谱到二维液相色谱,其实很简单,迈出一小步,成就大精彩。

获取免费二维液相色谱基础导论

二维液相色谱

Peter W. Carr 博士, 明尼苏达大学教授, 美国明尼苏达州明尼阿波利斯
Dwight Stoll 博士, 古斯塔夫奥德罗普学院教授, 美国明尼苏达州圣彼得



立即预定,
获取副本!

2015 年春季推出
在线预定副本
[AGILENT.COM/
CHEM/2DLC-PRIMER](http://AGILENT.COM/CHEM/2DLC-PRIMER)

 **Agilent Technologies**

揭秘二维分析



agilent.com/chem/infinity-2DLC

安捷伦出版号 5991-5363CHCN, 2014 年 11 月 19 日印制