



# 二维液相色谱

原理、实施与应用

基础导论



Agilent Technologies

# 二维液相色谱

## 原理、实施与应用

基础导论

Peter W. Carr 和 Dwight R. Stoll



**Agilent Technologies**

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 5 月 15 日，中国印刷

5991-2359CHCN

---

# 目录

前言 — Oliver Schmitz 教授.....	VI
前言 — Pat Sandra 和 Koen Sandra.....	VII
序言与致谢.....	X
作者简介.....	XI
引言.....	XV
符号.....	XVI
缩写.....	XVIII
<b>1 二维液相色谱简介.....</b>	<b>1</b>
1.1 什么是二维液相色谱?.....	1
1.2 二维分离的术语.....	5
1.3 二维液相色谱的一些历史回顾.....	6
1.4 二维液相色谱的应用领域.....	6
1.5 二维液相分离的类型.....	7
1.6 二维液相色谱的实施.....	9
1.7 二维液相色谱图的生成.....	12
<b>2 二维液相色谱的原理.....</b>	<b>15</b>
2.1 引言.....	15
2.2 峰容量及相关概念.....	16
2.3 梯度洗脱液相色谱和二维液相色谱基础知识.....	20
2.4 LCxLC 峰容量的基本原理.....	36
2.5 <sup>1</sup> D 梯度洗脱与在线 LCxLC 的比较.....	51
2.6 总结.....	53
<b>3 二维液相色谱的实施.....</b>	<b>54</b>
3.1 设置 LCxLC 系统.....	54
3.2 中心切割二维液相色谱方法.....	85

<b>4 LCxLC 中的方法开发</b> .....	<b>88</b>
4.1 可能的分离模式组合.....	88
4.2 RPxRP 中固定相的选择.....	91
4.3 利用分离区域或转换梯度优化性能.....	98
4.4 在性能、稳定性与操作成本之间进行权衡.....	100
4.5 方法开发案例研究.....	101
<b>5 LCxLC 中的数据分析</b> .....	<b>107</b>
5.1 引言.....	107
5.2 基线检测.....	108
5.3 噪音水平的测定.....	110
5.4 数据平滑和过滤.....	110
5.5 峰检测.....	110
5.6 峰面积测量.....	112
5.7 归并来自相同的 <sup>1</sup> D 母峰的 <sup>2</sup> D 子峰.....	112
5.8 总体峰大小.....	114
5.9 1D-LC 和 LCxLC 定量分析性能的比较.....	114

<b>6 LCxLC 的应用</b> .....	<b>116</b>
6.1 天然产物和中草药提取物 — 紫杉烷的分析.....	116
6.2 天然产物分析 — 柑橘油提取物的分析.....	119
6.3 生物药物 — 单克隆抗体的分析.....	121
6.4 化学品 — 工业洗涤剂同系物的测定.....	124
6.5 药物 — 杂质的测定.....	125
6.6 食品检测 — 饮料中的多酚.....	126
6.7 食品检测 — 初榨橄榄油的质量控制.....	127
6.8 食品检测 — 啤酒的分析.....	129
6.9 应用方法总结.....	131
<b>7 二维液相色谱的未来</b> .....	<b>143</b>
7.1 未来.....	143
7.2 影响 1D 和 2D-LC 比较的理论因素.....	145
7.3 影响 1D 和 2D-LC 比较的实际因素.....	148
7.4 二维液相色谱仪器进展.....	149
7.5 二维液相色谱的其他挑战与机遇.....	149
参考文献.....	153

## 前言 — OLIVER SCHMITZ 教授



**Oliver J. Schmitz**

德国杜伊斯堡-埃森大学化学系  
应用分析化学教授

在当前的有机小分子（最多 2000 Da）仪器分析领域中，存在两个相反的趋势。首先，必须要开发出无需样品前处理或仅需极少样品前处理的超快速分析方法，来应对不断增多的样品分析。而具有广阔前景的进展包括（例如）免疫分析和诸如 DART、DESI 和 ASAP 等环境解吸电离方法。其次，许多样品对检测灵敏度和分离能力的要求日益提高，导致需要采用越来越复杂的分析平台。分析这类样品，除了经典的一维色谱以外，还包括多维色谱法，例如中心切割（或多中心切割）和全二维液相色谱等强大分析方法。采用这些方法分析复杂样品时，最重要的检测器是质量分析器（例如，用于超高灵敏度目标分析的三重四极杆质谱以及用于非目标分析的 qTOF-MS 或 IMS-qTOF-MS 等高分辨率质谱）。

全二维液相色谱 (LCxLC) 的发端可以追溯到两篇相隔 12 年的论文。1978 年，Erni 和 Frei 介绍了使用 GPC 作为第一维、RPLC 作为第二维对番泻苷提取物的二维分离。第一维的分析时间为 10 小时，采用两个 1.8 mL 样品定量环，共采集 7 个 1.5 mL 的馏分，然后转移至第二维。但较长的累积时间以及样品定量环内发生的混合导致第一维分离效果下降。不过，该研究开发出了真正的全二维液相色谱分析技术。

随后，在 1990 年，Bushey 和 Jorgenson 首次采用真正的全二维液相色谱分离蛋白质样品，其中第一维配备微径阳离子交换色谱柱，而第二维则配备体积排阻色谱柱。该论文激起了人们对 LCxLC 的兴趣，近年来，随着商用的全二维液相色谱系统的问世，相关出版物的数量大幅增加。

本基础导论的作者是多维液相色谱领域的两位顶尖科学家，对初学者而言是非常好的入门教材。我确信多维液相色谱尤其适用于分析极性物质以及气相色谱不能分析的物质，在代谢组学、非目标分析和聚合物分析等领域具有极大的潜力。

## 前言 — PAT SANDRA 和 KOEN SANDRA



**Pat Sandra 教授**

比利时根特大学  
名誉教授



**Koen Sandra**

比利时科特赖克  
色谱研究所生命科学部经理

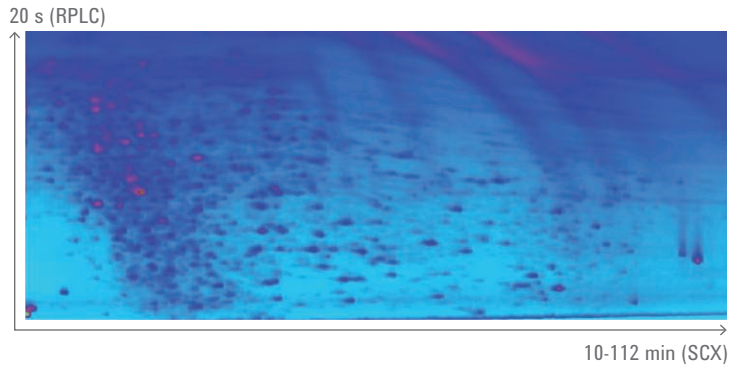
“...但二维色谱非常便捷，因为它能够提供概览信息，否则这些信息只能通过大量实验来获得”。这句话摘自 A.J.P. Martin 及其合作者发表于 70 年前的一篇论文 (*Biochem J.*, **1944**, 38, 224)，它说明二维色谱分离并非新概念，更重要地是，这说明了早期色谱工作者就已经意识到这些分离方法的内在潜力。的确，如今已经无数次地证明，增加另一个分离维度能够显著提高分离度。分离效果提升并不一定意味着快速：文章中提到使用二维色谱在 Whatman 一号纸上分离羊毛水解产物中的氨基酸，第一维分析需要 3 天，第二维分析需要 27 小时。

多年来，在空间维度上实现二维分离的原理已广泛应用于二维薄层色谱和二维凝胶电泳，并且已发展成为多个学科中的主力技术。时间维度上的二维技术开发难度要大得多，大多数研究活动均在 21 世纪伊始才受到关注。其原因在于需要新的仪器及色谱柱等硬件技术的支持才能使二维色谱分离展现出被预期的强大分离性能。如今，全二维 GC 即 GCxGC 已被视作一种成熟的技术，广泛应用于分析极其复杂的混合物，例如石油样品。GCxGC 的开发和商业化进程都比 LCxLC 要快，主要原因在于其流动相，也就是载气更适用于两个维度。

大约十年前，液相色谱柱技术和仪器硬件得到了巨大发展。亚 2  $\mu\text{m}$  颗粒和表面多孔颗粒的问世，以及耐受 1000 bar 甚至更高压力的液相色谱仪的推出，为实现极致分析速度和分离度开启了全新的可能性。这不仅为一维液相色谱提供了较高的峰容量，而且对于二维液相色谱的开发至关重要。一方面，这些进展可应用于二维液相色谱仪；而另一方面，人们很快意识到一维液相色谱现有的峰容量仍然不足以分离高度复杂的样品。目前，对这类混合物的分析是通过高分离度的一维液相色谱联用具有高分辨率、二级质谱和离子淌度功能的现代质谱仪来实现。不过，即便是采用最强大的质谱仪也仍旧需要尽可能好的前端分离效果以得到更精准的数据。此外，QA/QC 实验室日益需要更高的分离度和峰容量，而这类质谱仪却并非成熟的工具。

二维液相色谱包括了本基础导论中所述的不同的二维技术，但其中 LCxLC 无疑是影响最大的一种。将不同模式的液相色谱（RPLC、NPLC、HILIC、IEC、SEC、SFC）进行组合可获得高正交性（此时二维分离空间得到最充分的利用）。由于有更多种类的高分离效能色谱柱可以选择，以及考虑到质谱的兼容性，通常会将 RPLC 作为第二维使用。根据具体应用选择组合，这一点将在本基础导论中明确说明。应当说，对许多应用而言，RPLCxRPLC 组合是一种极其强大的工具。本基础导论将在紫杉烷分析的示例中说明，分离选择性的不完全正交并不会对获得优异分离产生过多不良影响。RPLCxRPLC 中溶剂具有兼容性（当然 GCxGC 也是如此！），因此其非常稳定，可作为开发稳定的通用方法（例如在药物分析中）的基础方法。

由两位作者撰写一篇前言并不常见，更别说这两位作者来自同一家族了。一名作者 (PS) 从事二维液相色谱工作已有十多年，并在多个研讨会中推广该技术。较年轻的一位作者 (KS) 从事生命科学工作，通常面临要求苛刻的分离。他曾对 LCxLC 持怀疑态度，并且不希望非商品化的自制仪器系统上开发和运行方法。然后，商品化仪器的出现彻底改变了这一状况，如今他是二维液相色谱的积极倡导者，甚至将其与紫外检测配合用于 QA/QC 环境中。下图显示了采用 SCXxRPLC-UV 得到的大肠杆菌裂解液胰蛋白酶酶解物的典型结果图。令人激动的是，如今所有液相色谱工作者都能以高度可重现的方式获得相似的结果。



利用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案通过 SCXxRPLC 分离大肠杆菌胰蛋白酶酶解物得到的结果

我们确信二维液相色谱不久便会得到普及。本基础导论是二维液相色谱初学者非常好的入门资料，也将为该领域中经验丰富的科学家带来启发。本指南还为读者提供了若干应用，可在此基础上开发其他复杂混合物的分析方法。我们谨向 Pete 和 Dwight 的出色工作致以最衷心的感谢。

---

# 序言与致谢

## Jens Trafkowski

安捷伦科技公司  
二维液相色谱解决方案  
产品经理，  
德国瓦尔德布隆

安捷伦科技公司非常荣幸能够与 Peter Carr 和 Dwight Stoll 合作出版本基础导论。作为多维分离领域里的两位顶尖的科学家，他们是撰写关于二维液相色谱基础导论的绝佳人选。

两位丰富的经验源自数十年来追求更高的色谱分离度、选择性和灵敏度等性能的研究开发工作。同时，他们有着扎实的理论背景，根据经验推导出了许多基本方程式。这一优势在本基础导论中得到展现，为那些对二维液相色谱及其应用领域感兴趣的人提供了不可或缺的参考资料。

我们非常感激能够与作者开展合作，并确信感兴趣的读者将对这一迅速发展的技术的理论和实际应用获得相当深入的理解。

本基础导论有一章专门介绍了二维液相色谱的应用，展示了生物制药、食品和天然产物分析等领域中获得的数据和结果。如需了解更多应用，请使用安捷伦应用查找工具 (Agilent Application Finder)：

**[www.agilent.com/chem/application-finder](http://www.agilent.com/chem/application-finder)**

---

## 作者简介

**Peter W. Carr** 于 1965 年毕业于布鲁克林理工学院并获化学学士学位，在校期间师从 Louis Meites 教授；于 1969 年毕业于宾夕法尼亚州立大学并获分析化学博士学位，导师是 Joseph Jordan 教授。他于 1965 年夏至 1966 年在布鲁克海文国家实验室担任研究助理和助理研究员，并于 1968 年在斯坦福大学医学院师从 David Glick 从事博士后研究。1969 年他任教于佐治亚大学。1969 年至 1977 年，他在佐治亚大学（位于雅典城）首先担任化学助理教授，后任化学副教授。

1977 年，Carr 教授开始任教于明尼苏达大学，并于 1981 年晋升为化学教授。他是利兹-诺斯拉普公司 (Leeds and Northrup)、惠普公司、3M 公司和安捷伦科技公司的顾问，并且是明尼苏达州阿诺卡的 ZirChrom Separations Inc. 的创始人兼首任总裁。1986 年，他成为明尼苏达大学生物处理技术高级研究院副主任。他曾于 1976 年担任环境领域分析化学研讨会的主席，还是明尼苏达色谱论坛的创始人兼首任会长，并曾任美国化学学会分析化学分会色谱与分离科学分部的主席 (1988-1989 年)。Carr 教授曾任 Analytical Chemistry、Talanta、the Microchemical Journal、LC/GC、Journal of Chromatography、Chromatographia 和 Separation Science and Technology 等杂志的顾问编委。此外，他还加入了美国国家自然科学基金会和美国化学学会的多个顾问委员会，并在美国化学学会会议上组织了许多研讨会。Carr 教授是 1994 年 5 月 8 日至 13 日在美国明尼苏达州明尼阿波利斯举办的第十八届液相色谱及色谱柱国际研讨会 HPLC 94 的程序委员会主席。他曾荣获明尼苏达色谱论坛授予的 Leroy Sheldon Palmer 奖和芝加哥色谱讨论组授予的 Merit 色谱奖。他还获得过美国微量化学学会授予的 1990 年度 Benedetti-Pichler 奖、《分离科学》授予的 1993 年度 Eastern Analytical Symposium, Inc. 奖、Delaware Valley 色谱论坛授予的 1996 年度 Stephen Dal Nogare 奖、由 SUPELCO, Inc. 赞助的 1996 年度 ACS 色谱奖、1997 年

度 ISCO 奖以及东部分析科学论坛授予的 2000 年度分离科学奖。他于 2002 年成为明尼苏达大学杰出教师委员会中的一员。他曾获 2004 年度匹兹堡大会分析化学奖，还荣获 2009 年度美国化学学会分析化学奖。他于 2010 年荣获色谱学会的 Martin 奖章以及美国康涅狄格州分离科学学会和匈牙利分离科学学会的 Horvath 奖章。他荣获了 2013 年度 LCGC 终身成就奖。他还荣获 2013 年度 ACS 分析化学分会授予的杰出教育奖。

Carr 教授和他的 100 名硕士和博士后学生发表了 400 余篇关于分析化学各个领域的论文：电化学、离子选择电极、热化学、固定化酶和色谱。他拥有 21 项关于化学分析和色谱的美国专利。他和他的学生 L. D. Bowers 合作撰写了题为 *Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry and Clinical Chemistry* (分析化学和临床化学中的固定化酶) 的专著。最近，他的研究重心在于开发高速全二维液相色谱。其他研究领域包括亲和色谱、生物分离、非线性色谱理论、开发具有化学稳定性和热稳定性的高效液相色谱 (HPLC) 载体以及近期的超快速和全二维 HPLC。

Carr 教授在其职业生涯中在教授 (主要是) 高年级本科生和研究生方面投入了大量精力。他开设了多年针对优等生和化学专业学生的独特的分析化学本科课程。该课程在普通化学课程的第三季度开设。那段时间 (1982-1985)，他建议系里开发计算机辅助教学设施，并与 John Evans 和 Kent Mann 教授组成委员会，为该计划争取资金并雇佣员工。该设施已成为现今最具活力的本科生教学活动的其中一个组成部分。

随后多年里，Carr 教授主要讲授大四的仪器分析课程。他对该课程的一个重要贡献是建立了课程设计制度，要求每位学生提出一个化学分析问题或是直接给学生分配一个问题，要求他们通过详尽的文献研究给出解决方案。解决方案需形成书面材料并制作成海报，展示给全班同学观看。学生的解决方案将构成期末考试的重要组成部分。该项目作为三次期中

考试的其中一次，独特之处在于由三位专业分析化学家（包括当地环境咨询实验室、3M 分析实验室及其他工业实验室的主任）组成的小组对学生的解决方案进行评估。实际上，每位学生都要参加三次小规模的口试。这些科学家和实验室主任在雇佣学士学位的化学分析人员方面拥有多年经验，能够提供见解深刻的实践反馈。这一做法被 Carr 教授的继任者沿用至今。

在本科生教学中，Carr 教授讲授关于化学平衡、分析化学统计学、热分析、生物分析化学以及固定化酶和酶电极的分析用途的课程。此外，多年来，他还开设了有关分离科学的基础课程，这些课程主要是针对分析化学专业的研究生，也针对化学工程师、制药科学家、环境工程师和许多生物科学家。该课程重点讨论了相平衡的热力学、决定化学分离的分子间相互作用以及传输和扩散过程中涉及的扩散和传质原理。他还讲授关于电子仪器的数学实验/讲座课程，这些课程已成为分析化学专业研究生所熟知的训练营。

**Dwight Stoll** 本科就读于曼凯托的明尼苏达州立大学，分别于 1999 年和 2001 年获得植物生物学和生物化学学士学位。1999 年毕业后，他在 ZirChrom Separations, Inc 担任技术员。在 ZirChrom，他很快熟悉了液相色谱市场，并且迷上了分离科学对其他学科（例如生物学）的新分析方法开发的作用。2000 年，他到明尼苏达大学进修化学相关课程，然后于 2001 年开始攻读化学专业研究生。他在明尼苏达大学师从 Peter Carr 教授，着手开发快速全二维液相色谱，借助高温和超快速梯度洗脱液相色谱的原理改善二维分离的总体速度。在 2007 年拿到分析化学博士学位之前，他曾休学九个月到圣奥拉夫学院担任兼职教员，讲授分析化学和普通化学课程。2007 年毕业后，他在明尼苏达大学肺健康中心跟随 Christine Wendt 博士进行了九个月的博士后研究，开始用液相色谱与质谱联用分析人肺灌洗液中的低分子量成分。

2008年秋季，Dwight 获得古斯塔夫奥德罗普学院化学系的分析化学助理教授一职，主要讲授定量和仪器分析课程，此外还指导一个主要由本科生参与的充满活力的研究项目。他于 2014 年晋升为古斯塔夫学院副教授。其在研项目包括开发用于中等和高复杂性样品的靶向和非靶向分析的快速多维液相色谱。他的实验室的在研项目涉及多维分离方法的多个方面，包括优化等度和梯度洗脱 HPLC、鉴定反相 HPLC 的选择性以及仪器开发。

Dwight 是分离科学领域 40 篇同行评审论文和一部专著章节的作者或共同作者，并且是两项专利的共同发明人。他还是当地、全国和国际会议上 80 次报告的作者或共同作者，并讲授关于二维液相色谱的短期课程：HPLC2013（阿姆斯特丹）；Pittcon 2104（伊利诺伊州芝加哥）。凭借对多维气相色谱的贡献，他荣获了 2009 年度 John B. Phillips 奖，2011 年又获得了 LCGC 的新兴色谱领军人物奖。2012 年，他入选了 LCGC 杂志的编辑顾问委员会，该杂志是分离科学领域的权威期刊。2014 年，他入选了 The Analytical Scientist 杂志评选的 40 位 40 岁以下顶尖分析科学家名单；2015 年，又荣获美国化学学会分析化学分会分离科学杰出青年科学家奖。

---

## 前言

现代二维液相色谱 (2D-LC) 的起源可以追溯到 20 世纪 70 年代末和 80 年代初，那时原理循证实验与许多概念性和理论性研究都清楚地表明：2D-LC 比传统的一维液相色谱 (1D-LC) 的分离能力更强。20 世纪 90 年代，2D-LC 在分离蛋白质组学和分子生物学领域中复杂而难以分离的物质方面发挥了关键作用。然而，获得此类改善的分离效果往往是以分析时间延长为代价（例如，数小时到数天），因此在当时二维液相只是应用范围非常狭窄的小众分离技术。

十年来，液相色谱仪器组件的功能发生了翻天覆地的变化，如今，高分离度 2D-LC 分离可以在一小时以内完成。除此之外，现代 1D-LC 的性能局限逐渐凸显，分析人员需要以更短的时间、更出色的检出限分离更复杂的样品，因此，当前 2D-LC 的研发工作得到了强大的动力。

以前，大多数 2D-LC 用户都必须使用现有的或不甚理想的 1D-LC 系统组件自己组装仪器。如今这一状况也得到改变，现在可以从多家液相色谱制造商购买用于配置 2D-LC 的商品化仪器。尽管这种情况免除了 2D-LC 用户的仪器开发负担，但在 2D-LC 方法开发过程中仍有大量的实验变量需要确定。在本基础导论中，我们将首先阐述 2D-LC 的基本工作原理，然后讨论它比传统 1D-LC 具有更高分离潜力的原因。然后我们将介绍方法开发过程中必须考虑的许多实际因素，并尽可能提供指导原则和开发工具。最后，我们将简要讨论数据分析的主题，数据分析是任何 2D-LC 工作流程的关键组成要素，并提供了多个应用领域的示例，在这些应用中 2D-LC 被证明非常有用甚至有时是不可或缺的。

# 符号

符号	
$a$	饱和系数
$B$	van Deemter 拟合系数
$b$	梯度斜率
$\beta$	平均峰展宽因子
$C$	van Deemter 拟合系数
$D_m$	分析物在洗脱液中的扩散系数
$d_p$	色谱柱填料粒径 (直径)
$\Delta\phi$	梯度组成的范围
$\epsilon_e$	间隙孔隙率
$\epsilon_i$	颗粒内孔隙率
$F$	洗脱液流速
$f_{cov}$	覆盖度分数指标
$G(p)^a$	柱上区域压缩因子
$k$	溶质保留因子
$k_0$	初始洗脱液组成下的溶质保留因子 ( $\phi_0$ )
$k_e$	溶质离开色谱柱时的溶质保留因子
$k_w$	纯水中的溶质保留因子 ( $\phi = 0$ )
$L$	色谱柱柱长
$\lambda$	<sup>1</sup> D 效率因子
$m$	混合物中化学组分的数量
$N$	色谱柱塔板数
$n_c$	峰容量
$n_{c,2D}$	二维分离的峰容量
$n^*_{c,2D}$	二维分离的校正峰容量
$n'_{c,2D}$	二维分离的有效峰容量
$\eta$	洗脱液粘度
$n_{c,max}$	峰容量上限
$\sigma$	峰标准偏差
$P$	系统压力
$P_{max}$	最大系统压力
$p$	观察到的色谱峰的平均数量
$\phi$	色谱柱渗透性

符号	
$\phi_{fin}$	最终流动相组成
$\phi_0$	初始流动相组成
$S$	log 溶质保留因子/洗脱液组分的斜率
$T$	柱温
$t_D$	梯度延迟时间
$t_c$	梯度洗脱循环时间
$t_g$	组分由初始值线性变化为最终值的时间 ( $\phi_{fin}$ )
$t_0$	色谱柱死时间
$t_R$	保留时间
$t_{re-eq}$	再平衡时间
$\tau$	交叉时间
$U_e$	洗脱液填充速度
$V_D$	梯度延迟体积
$V_m$	色谱柱死体积
$V_\sigma$	系统延迟体积
$\overline{W}$	平均 $4\sigma$ 宽度

# 缩写

缩写词	
<sup>1</sup> D	第一维（色谱柱或分离）*
<sup>2</sup> D	第二维（色谱柱或分离）*
1D-LC	一维液相色谱
2D-LC	二维液相色谱
CE	毛细管电泳
GC	气相色谱
GCxGC	全二维气相色谱
HILIC	亲水作用液相色谱
HPLC	高效液相色谱
id	内径
IEX	离子交换色谱
LCxCE	全二维液相色谱/毛细管电泳
LCxGC	全二维液相色谱/气相色谱
LCxLC	全二维液相色谱
LCxSFC	全二维液相色谱/超临界流体色谱
LC-LC	全二维液相色谱
mLC-LC	多中心切割二维液相色谱
sLCxLC	选择性全二维液相色谱
RPLC	反相液相色谱
RPxRP	全二维反相液相色谱
SEC	体积排阻色谱
SFC	超临界流体色谱

\* 与其他符号配合使用的指代数字 1 和 2 表示第一维或第二维。例如，<sup>1</sup>*n*<sub>c</sub> 代表第一维的峰容量；<sup>2</sup>*F* 代表第二维的洗脱液流速。

第一章旨在介绍使用二维液相色谱 (2D-LC) 进行分析的主要原因，并展示 2D-LC 相对于一维方法的优势。此外，我们将回顾 2D-LC 的一些发展历史，并介绍该技术最适合解决哪些化学分析难题。您需要熟悉一些重要的二维分离技术特定的新术语和符号，以便阅读之后的章节。最后，我们将介绍两种形式的二维分离（全二维与中心切割）以及它们不同的实现形式（在线与离线、即停即走）。首先要说明的是，本基础导论仅讨论时间上的二维分离，不涉及空间上的二维分离（例如薄层色谱和平板凝胶电泳中遇到的情况）。

## 1.1 二维液相色谱的含义

二维液相色谱是传统液相色谱技术（包括一维等度和梯度洗脱的液相色谱）的重要补充。恰当地使用多维分离能够大大提高传统一维液相色谱 (1D-LC) 的分离能力。图 1.1 展示了 2D-LC 系统与 1D-LC 系统的关系。传统分离是在第一维 ( $^1D$ ) 色谱柱上进行。可以是等度或梯度洗脱分离。然后， $^1D$  色谱柱中的流出物进入第二维 ( $^2D$ ) 色谱柱，要使第二维色谱柱对样品的总体色谱分离效果产生实际影响，则该色谱柱必须具有与  $^1D$  色谱柱截然不同的分离选择性。实际上， $^2D$  分离色谱柱及其相应的检测器可被当作是  $^1D$  色谱柱中流出物的化学选择性分析系统。由于第二根色谱柱的选择性与第一根不同，因此  $^1D$  色谱柱上完全或部分叠加的相邻色谱峰在  $^2D$  色谱柱上得到分离的可能性将会大大增加。只要在进样过程中  $^1D$  色谱柱分离的化合物不会发生或极少发生再混合，那么第二维的分离能力不是与第一维分离能力的加和，实际上是乘积关系。

我们将在第 2 章“二维液相色谱的原理”中探究此现象的原因和过程。因此，在理想情况下（不发生再混合且选择性不同）， $^2D$  分离的分离能力远高于  $^1D$  分离。

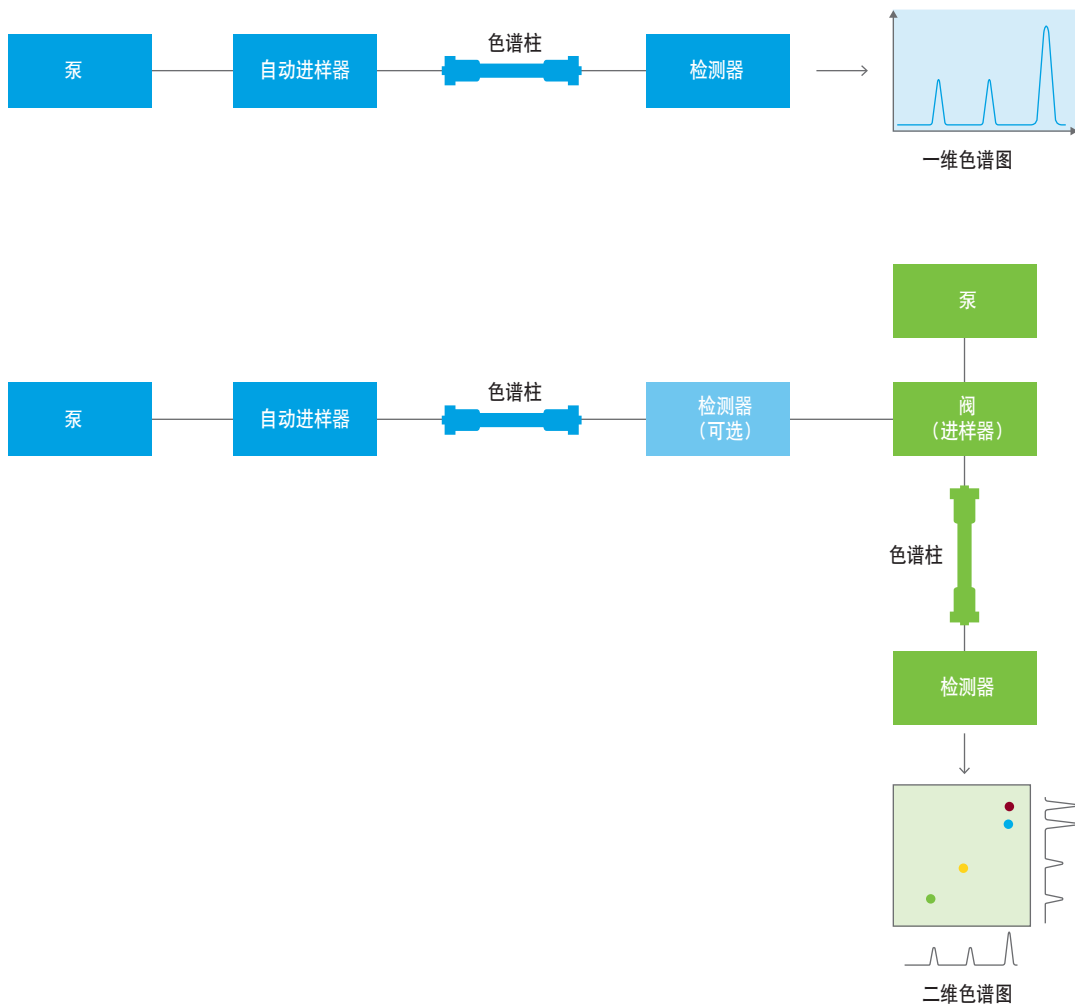


图 1.1 2D-LC 系统与 1D-LC 系统的关系 — 传统的 1D-LC 检测器可以被视作由第二个色谱仪和传统检测器组成的**化学选择性检测器**

二维液相色谱可以划分为差异显著的两种主要类型。全二维液相色谱(以 LCxLC 表示)是将<sup>1</sup>D 色谱柱的流出物连续转移至<sup>2</sup>D 色谱柱。相比之下,中心切割色谱(LC-LC)则是将<sup>1</sup>D 流出物选择性地(部分地)转移至<sup>2</sup>D 色谱柱。我们还将介绍这两大类别下的若干子类,包括选择性二维色谱(sLCxLC)和多中心切割 2D-LC (mLC-LC)。

LCxLC 强大的分离能力在图 1.2 所示的色谱图中得到了充分展现。从中可以看到,仅需 30 分钟就可从复杂的生物样品中分离出数百种组分。在如此短的分析时间内获得如此高的分离能力,远远超出了目前任何一种传统 1D-LC 方法的能力,后者无论使用多大的色谱柱填料粒径,无论仪器采用多高的操作压力,都无法做到这一点。

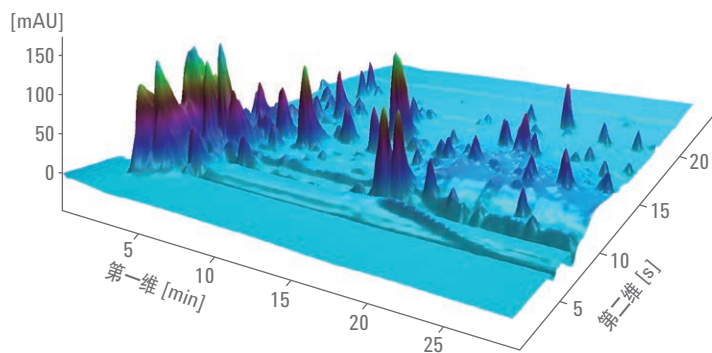
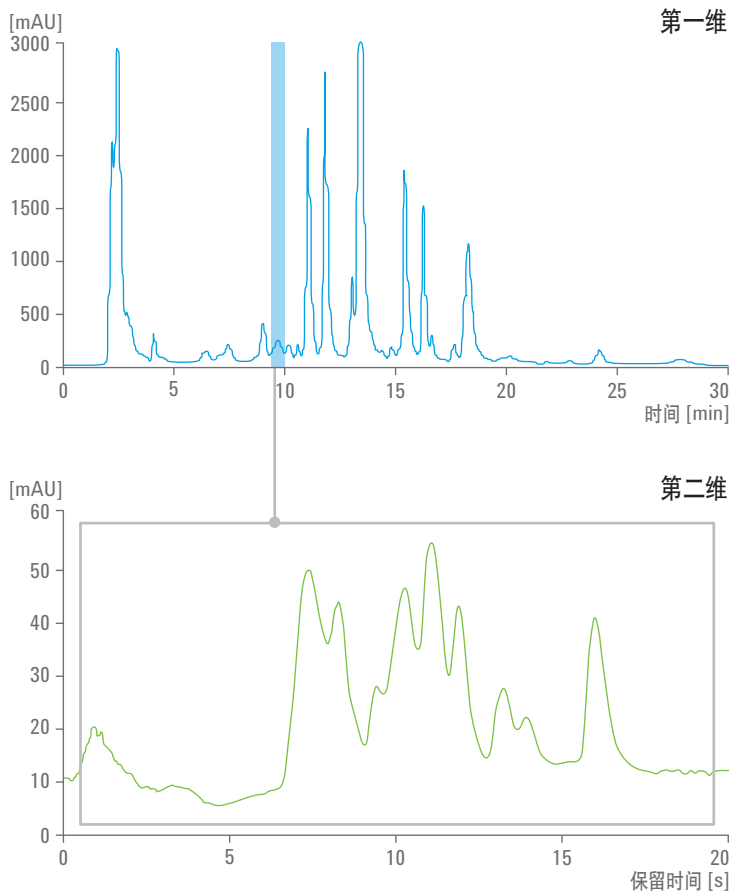
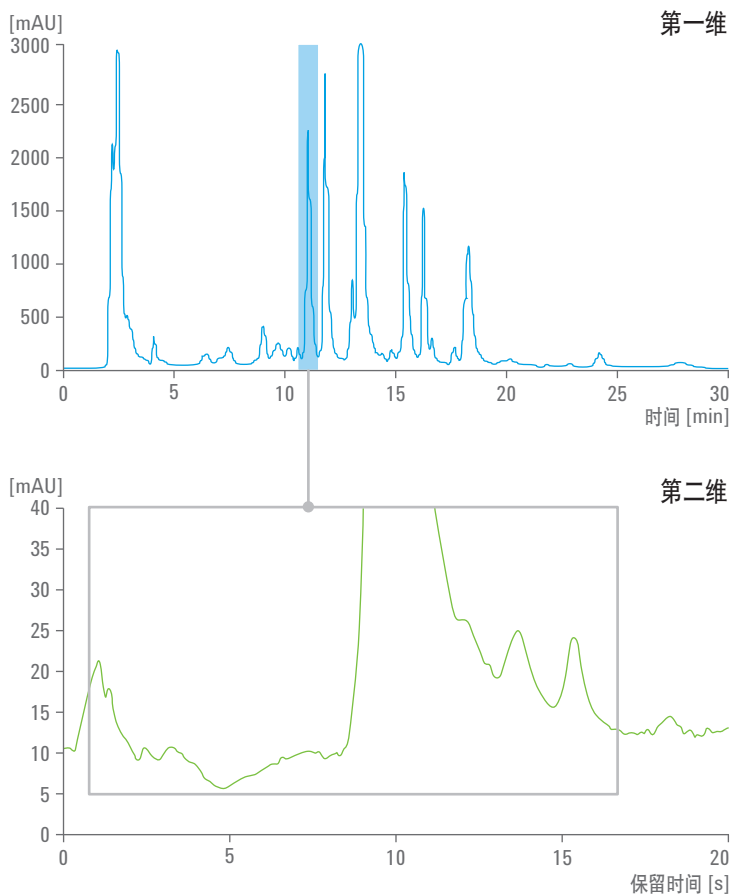


图 1.2 典型的全二维 2D-LC 色谱图展示了对复杂生物样品的分离结果

2D-LC 的真正优势在于它是一种能够大幅提高分离能力同时不会明显延长分析时间的分离模式。说明 2D-LC 的性能显著优于 1D-LC 的两个重要分析示例如图 1.3 和图 1.4 所示。



**图 1.3** 将在线 LCxLC 色谱图 <sup>1</sup>D 蓝色条带中的色谱峰注入 <sup>2</sup>D 色谱柱中。看起来是一个色谱峰，实际上却包含至少九种组分。该样品为玉米种子提取物，在下列 <sup>1</sup>D 条件下进行分离：  
 $2.1 \times 50$  mm Discovery HS-F5 柱， $5 \mu\text{m}$ ；A：20 mM 磷酸盐，20 mM 高氯酸钠，pH 5.7；  
 B：乙腈；梯度程序：23 min 内由 5% B 增至 70% B； $40^\circ\text{C}$ ； $0.1 \text{ mL/min}$ ；进样量  $10 \mu\text{L}$ ；  
 检测波长 220 nm。<sup>2</sup>D 条件： $2.1 \times 50$  mm ZirChrom-CARB 柱， $3 \mu\text{m}$ ；A：20 mM 高氯酸水  
 溶液；B：乙腈；梯度：在 17.4 s 内由 0 增至 74% B； $110^\circ\text{C}$ ，进样量  $34 \mu\text{L}$ ，检测波长  
 220 nm。摘自参考文献 2



**图 1.4** 将在线 LCxLC 色谱图<sup>1</sup>D 蓝色条带中的色谱峰注入<sup>2</sup>D 色谱柱中。这表明 LCxLC 具有更强的分离能力，从中可以看到大峰尾部中的多个小峰，大大缓解了电喷雾电离质谱中经常存在的离子抑制问题。所有条件均与图 1.3 相同；摘自参考文献 2

## 1.2 二维分离的术语

在本基础导论中，我们将使用 Schoenmakers 等人于 2012 年提出的标准化符号<sup>3</sup>。在他们的术语体系中，1D 和 2D 分别指一维和二维；而<sup>1</sup>D 和<sup>2</sup>D 则分别代表第一维和第二维。将在本章及随后章节中广泛采用表 1.1 和缩写词中列出的术语。我们建议您花一些时间熟悉这一新词汇表。

缩写	说明
<sup>1</sup> D	第一维 (色谱柱或分离)
<sup>2</sup> D	第二维 (色谱柱或分离)
1D-LC	一维液相色谱
2D-LC	二维液相色谱
LCxLC	全二维液相色谱
LC-LC	中心切割二维液相色谱
mLC-LC	多中心切割二维液相色谱
sLCxLC	选择性二维液相色谱

表 1.1 二维分离的术语

### 1.3 二维液相色谱的一些历史回顾

事实上, 2D 液相分离已经出现了很长一段时间。与 Archer Martin 共同发明液液分配色谱的 Anthony Syngé 曾给出了一个非常好的例子。在其诺贝尔奖获奖演说<sup>4</sup>中, 他展示了从马铃薯提取的 19 种氨基酸的二维纸色谱分离<sup>5</sup>。然而, 首款真正意义上的 2D-LC 仪器直至 1978 年才开发出来<sup>6</sup>。然而, 直到 Bushey 和 Jorgenson<sup>7</sup> 于 1990 年发表使用体积排阻色谱 (SEC) 和离子交换色谱 (IEX) 实现蛋白质的 14 种组分混合物的全二维液相色谱分离的工作, 该技术才真正开始迅速发展。在该项工作中, 他们使用 SEC 作为第二维; 得到各个 SEC 色谱图需要 6 分钟, 且需要采集 59 幅 <sup>2</sup>D 色谱图才可覆盖整个第一维 IEX 分离。与图 1.3 相比, 各个 <sup>2</sup>D 梯度分离在 21 秒内完成, 并且仅用 30 分钟即可采集到 90 幅色谱图。由于在第二维使用了高效快速的分析手段, 因而极大提高了方法的分离效能。

### 1.4 二维液相色谱的应用领域

文献搜索结果 (截至 2013 年) 表明, 有 3600 余篇论文在其摘要部分提到了二维液相色谱。此外, 2012 年, 有 80 多篇论文直接涉及 2D-LC 技术, 大约 300 篇论文在摘要部分提到了 2D-LC。绝大多数 2D-LC 论文都涉及蛋白质和多肽的分析; 频率第二高的是利用 2D-LC 进行药物分析, 再次是进行聚合物分析和表征。食品分析处于聚合物分析之后的第四位, 最后一个领域是环境分析。

### 1.4.1 各种分析问题

对于手握锤子的人来说，剩下的问题就是找到需要敲的钉子。自然而然产生的问题是，哪些问题最适合用 2D-LC 来解决？迄今为止，二维液相色谱的绝大多数应用都是处理非常复杂的天然存在的混合物（如生物细胞、血液、尿液、环境样品等）以及处理合成聚合物（尤其是共聚物）时不可避免地产生的复杂混合物。第二个相当重要的领域是寻找各种生物条件下的生物标记物。更具体地说，2D-LC 用于蛋白质组学和代谢组学分析，在这些领域中通常使用蛋白质或小分子化合物的浓度变化情况作为早发性疾病状态的指示。与质谱结合使用时，2D-LC 可提供大量可供研究的定性和定量数据。第三个应用领域在我们看来还有待进一步发展，那就是通用型分析仪。该技术的高分离能力将不需要或仅需极少的方法开发即可对相对简单的混合物（例如，少于 20 种组分的混合物）中的一些组分进行定量分析。

然而，应当明确的是，2D-LC 的效用，尤其是其适合解决的分析问题的范围，主要取决于该技术能将分析速度提高到多快。因此，大量最新研究工作都集中于提高 2D-LC 的分析速度，我们将在第 2 章“2D-LC 的原理”中着重讨论这一问题。在第 1.3 节“二维液相色谱的部分历史回顾”中，我们比较了 Bushey 和 Jorgenson 实现 2D 分离花费的时间（大约 6 小时）与 Stoll 所用的时间（大约 30 分钟）。毋庸置疑，分析时间对分析方法适用的问题范围具有重要影响。

## 1.5 二维液相分离的类型

### 1.5.1 二维色谱分离的模式

简而言之，虽然我们在本文中只介绍 2D-LC；但很显然，可以在某一维度采用液相色谱，而第二分离维度采用超临界流体色谱 (LCxSFC)、毛细管电泳 (LCxCE) 或气相色谱 (LCxGC)。全二维气相色谱 (GCxGC) 是一种更加成熟的二维分离技术，后续章节中介绍的许多基础概念都是受益于早期 GCxGC 研究的影响。当然，熟悉 GCxGC 的用户能够更快的熟悉在线 LCxLC 的基本内容。将液相色谱与截然不同的模式相结合很有实际意义，这点将在第 2 章“2D-LC 的原理”中详细讨论。最大的难题来自于液相色谱与其他分离模式的连接；不过，这些替代性模式组合均已取得了一定程度的成功，只是尚未解决某些重要的兼容性問題。如果您感兴趣，可以参阅介绍 LC 与 GC 联用<sup>9</sup>、LC 与 SFC 联用<sup>9</sup> 以及 LC 与 CE 联用的论文<sup>10</sup>。

## 1.5.2

### 各种液相色谱机理的组合

文献中已有介绍的最常见的液相色谱组合模式列于表 1.2 中。

第一维	第二维
反相*	反相
离子交换	反相
体积排阻	反相
正相	反相
HILIC	反相
亲和色谱	反相
临界点色谱	反相
临界点色谱	SEC
离子交换	SEC

表 1.2 液相色谱模式的常见组合 (\*号表示具有不同的分离选择性)

这些组合中的某些组合难以实现，因为两个维度使用的流动相不兼容（溶剂不混溶或其他因素引起）；某些组合则简便易行，例如，离子交换与反相分离的组合。不同分离机理组合（例如，正相色谱与反相色谱组合）的优势在于它们所得到的选择性差异往往会比差异极大的反相色谱柱组合所能得到的选择性差异还要大。我们将在第 4 章“LCxLC 中的方法开发”对 2D-LC 中成对使用的液相色谱类型进行更详细的比较。

## 1.6

### 二维液相色谱的工作模式

2D-LC 的实现途径有很多种，主要可以分为两大类。本文将简要介绍这两种类型。如果您希望了解各种类型的更多详情，请参阅最近发表的全面的综述文章<sup>11</sup>。

## 1.6.1 基于分析的峰数量的分类

### 1.6.1.1 中心切割二维液相色谱

中心切割二维色谱模式的目的是与全二维色谱模式差别很大。在中心切割色谱中，目标是一个或多个色谱峰，采集相应色谱峰的馏分并将其进样至第二根色谱柱中。可以采集单个馏分的整个色谱峰，也可根据需要选择靠近色谱峰前部、中部或尾部的馏分（参见图 1.5）。中心切割 2D-LC 对于分离那些不太复杂并且含有保留特性非常相近的化合物的样品非常适用。相比全二维液相色谱，这种模式的系统构建和方法设置通常比较简单，使用成本也比较低。这种模式可以根据第二维分析时间的长短对第一维中的多个色谱峰进行采样，并在第二维中依序分析。若第一维中需要采样的峰保留时间间隔小于第二维分析时间，则会产生第二维分析不完全的风险，这种情况下建议使用配备多个定量环的多中心切割 (LC-LC) 系统。

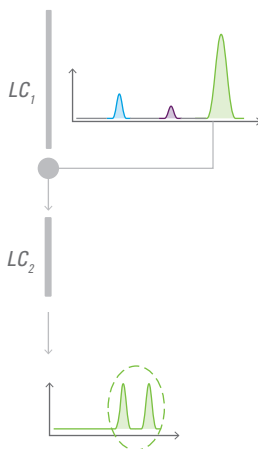


图 1.5 中心切割 2D-LC 实现方式的示意图

### 1.6.1.2 全二维液相色谱

在这种类型的方法中，对 <sup>1</sup>D 色谱柱中流出的每个色谱峰均进样分析。尽管对整个 <sup>1</sup>D 分离的馏分进行采样，但并不需要将第一根色谱柱的所有流出物都转移至第二根色谱柱。例如，您可以对 <sup>1</sup>D 色谱柱流出的部分液流进行连续分流，将部分液流输送至废液瓶中，而将其余液流输送至进样阀中（参见图 1.1 和图 1.2）。这种形式的 2D-LC 称作全二维色谱，通常用 LCxLC 表示<sup>3</sup>。

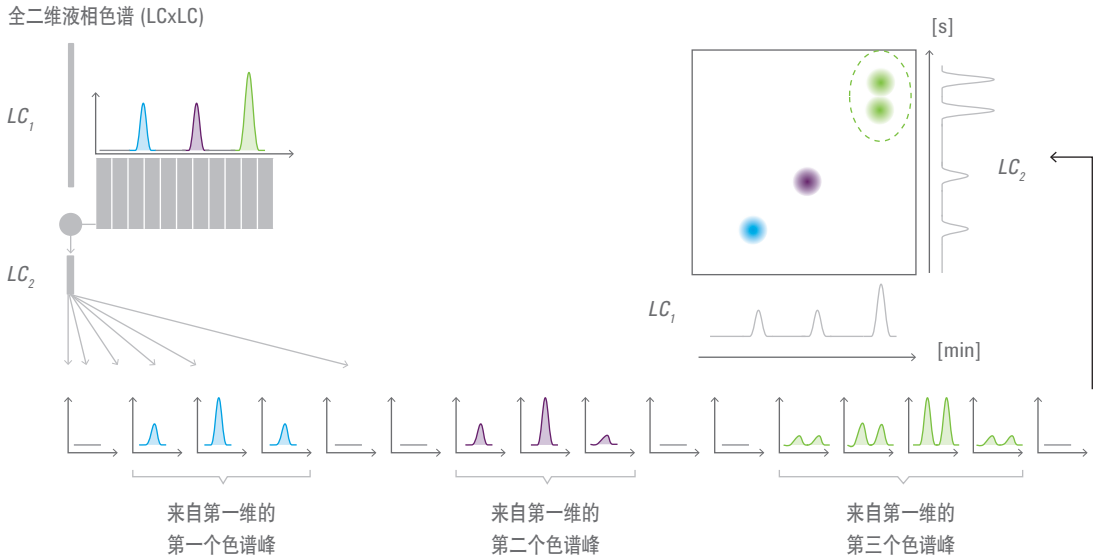


图 1.6 全二维液相色谱实现方式的示意图

## 1.6.2 基于实施时间的分类

### 1.6.2.1 在线二维液相色谱

在线 2D-LC 是指在采集 <sup>1</sup>D 色谱柱流出的目标组分后立刻将其进样到 <sup>2</sup>D 色谱柱进行分析 (参见图 1.1)。这种形式的 2D-LC 可以进行十分快速的自动化分析, 并且在样品测试过程中无需操作人员介入。倘若第一维采用自动进样器, 则可同时分析多个样品。其主要局限性在于这种模式的最高理论分离能力不及整体分析速度慢得多的离线 2D-LC 模式。然而, 其单位运行时间内的总分离能力通常优于离线 LCxLC。正如将在第 2 章“2D-LC 的原理”详细介绍的那样, 由于馏分需要从 <sup>1</sup>D 色谱柱立刻转移至 <sup>2</sup>D 色谱柱, 所以各个馏分的 <sup>2</sup>D 分析时间必须等于 <sup>1</sup>D 流出物的馏分收集时间。为了使 2D-LC 的总分析时间保持在可接受的范围内, 意味着必须频繁采集馏分并且快速完成各个馏分的 <sup>2</sup>D 分离。而这样一来, 又会极大地限制各个 <sup>2</sup>D 分离的分离能力。

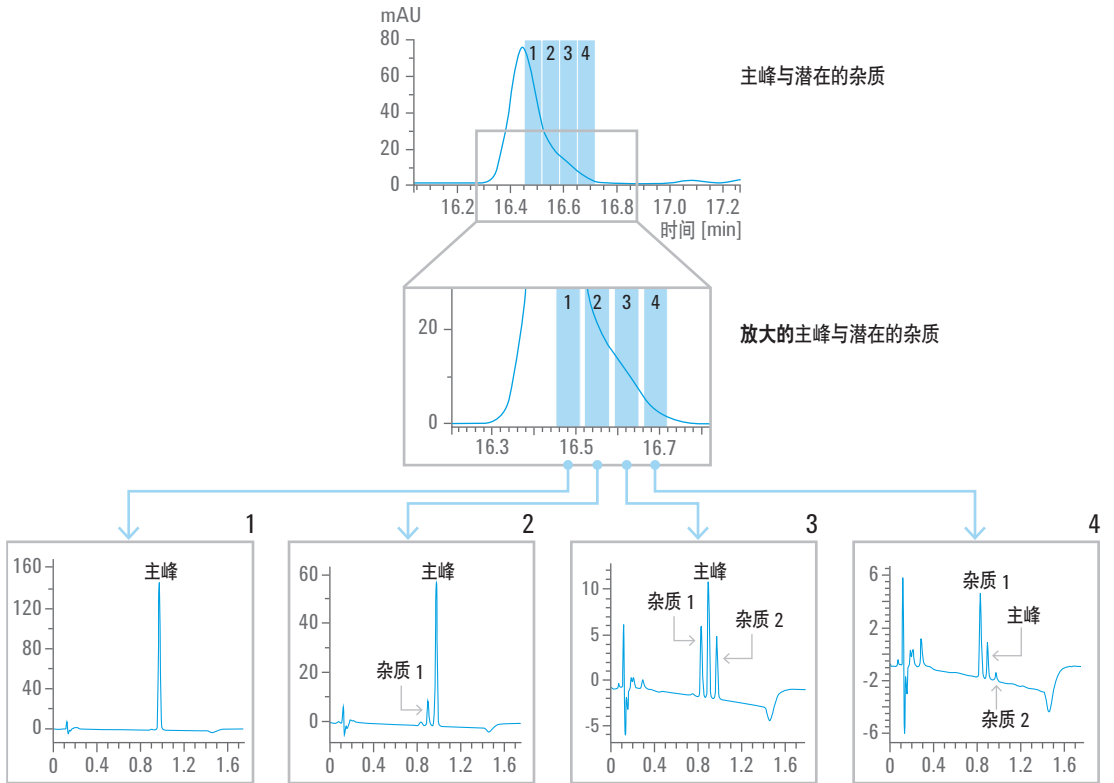


图 1.7 示例：使用多中心切割 2D-LC 分析色谱峰后半段的共流出组分。上图为  $1^{\text{D}}$  分离得到的色谱峰，中图为该色谱峰的放大视图，将峰的后半段分为四个馏分并分别进行  $2^{\text{D}}$  分析。下图为 4 个馏分在第二维分离的色谱图，可以看到掩埋于主峰当中的重要杂质得到了良好分离

### 1.6.2.2 离线二维液相色谱

在离线形式的 2D-LC 中，采集  $1^{\text{D}}$  流出物的馏分，并在  $2^{\text{D}}$  分离之前将其储存起来。当然，这会导致总分析时间比在线二维色谱要长；但是， $2^{\text{D}}$  分析时间不再需要与馏分采集时间相等，而是通常会长得更多。因此，第二维能够获得更高的分离能力，从而使该二维方法的总体分离能力得到提升。离线 2D-LC 方式经常与采用某些特殊形式的质谱检测器搭配使用。另外需要注意的是：相比于传统的停流-再分析 2D-LC，在离线 2D-LC 中， $1^{\text{D}}$  分离是连续运行的。将馏分收集储存起来以备  $2^{\text{D}}$  分离的过程中，可能导致某些痕量物质在收集容器中损失并可能发生污染和分解。在某些情况下，需要部分或完全去除洗脱液。这种方法比在线 LCxLC 繁琐得多，由于需要大量手动操作干预，也提高了方法出错的风险。

### 1.6.2.3

#### 停流-再分析二维液相色谱

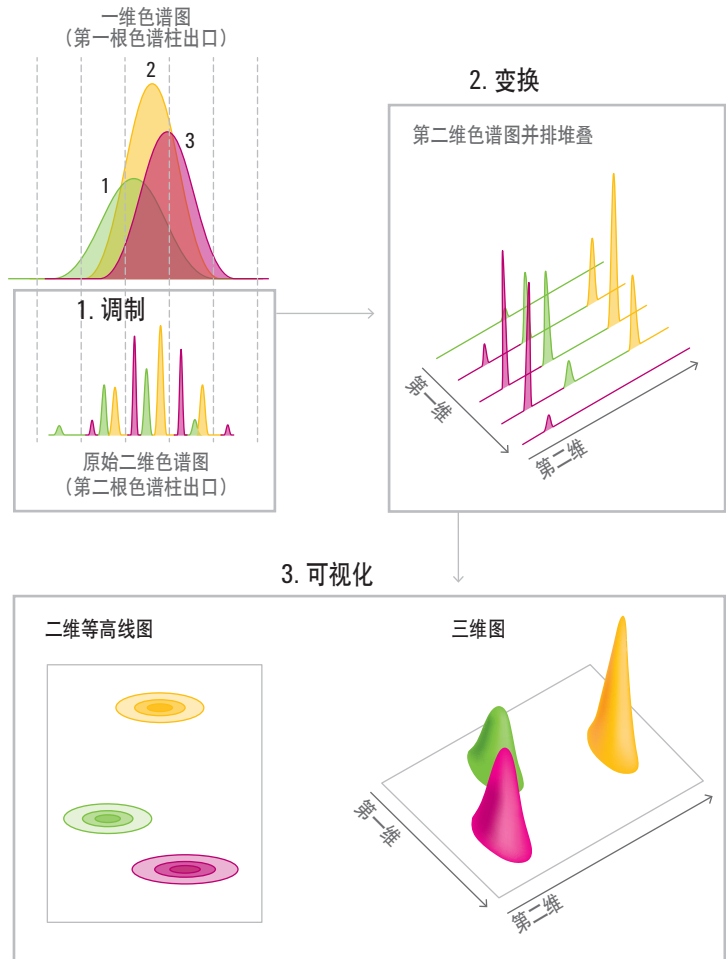
在停流-再分析的工作模式中， $^1\text{D}$  和  $^2\text{D}$  分离交替运行。也就是说，运行一段时间的  $^1\text{D}$  分离，采集流出物，然后停止  $^1\text{D}$  分离并对采集的  $^1\text{D}$  流出物进行  $^2\text{D}$  分离。MudPIT（多维蛋白质鉴定技术）方法<sup>13</sup>就是一种“停流-再分析”的色谱形式。即使在停流的情况下，样品组分也会在  $^1\text{D}$  色谱柱上不断进行轴向扩散，因此  $^1\text{D}$  分离能力会有一定程度的下降<sup>14</sup>。因此，一般而言，停流-再分析模式与在线和离线色谱相比，在分离能力和分析时间方面均有一定劣势。当需要分析的组分为扩散系数较低的大分子时，停流-再分析的模式并不会显著影响第一维分离能力。因为它允许第二维采用更长的运行时间，因此总体分离能力很出色，第二维较长的分析时间也有利于该方法与质谱仪联用。然而，不可避免的是，各个  $^2\text{D}$  分离所花费的时间越长，总体分析时间也会越长。毫无疑问，在线 LCxLC 基本上是最快的一种分析方式。

## 1.7

### 二维液相色谱图的生成

一种比较易于理解的说法是：LCxLC 分析是在  $^1\text{D}$  分析过程中连续采集一系列  $^2\text{D}$  色谱图，这些二维分析结果被分别记录为单独的色谱图，其中一个坐标是从  $^2\text{D}$  分析开始时的保留时间，另外一个对应坐标记录了检测器信号响应强度。最终，所有这些数据被重新组合成一个  $N^2\text{D}$  谱图，其中的  $N$  是由第一维切换至第二维并进行  $^2\text{D}$  分析的馏分总数量。图 1.8 能够很清晰地说明这点，其中表明，所示的 3D 图必须由系列  $^2\text{D}$  色谱图构建得到。将色谱数据重新排列，以第二维分析时间作为一个坐标，另外的坐标对应第一维的馏分收集时间和在该时间段内二维分析记录得到的检测器信号响应强度。然而，对于如何处理数据以生成三维图片，即如图 1.2 所示的色谱图，需要做进一步解释。这一问题由 Adahchour 等人<sup>15</sup>

以图形化方式给出了非常出色的解释（参见图 1.8）。将  $^1D$  中的较大峰作为分析对象，其包含了三个分离度较差的化学组分，分别为 1（绿色）、2（黄色）和 3（粉色）。第 1 步，在共流出的  $^1D$  色谱峰范围内以相等的时间间隔采集馏分。这通常被称作调制或采样过程，目的是对  $^1D$  色谱峰进行分段。第 2 步，所有馏分进行快速的  $^2D$  分析并用得到的色谱图来替代表示  $^1D$  色谱图，每个色谱图中都包含若干色谱峰。从图中可以看出，绿色、黄色和粉色色谱峰峰高在  $^1D$  坐标上先升高，然后降低。第 3 步，将  $^2D$  色谱图重新排列，并按照对应峰的等高线，颜色等信息转换为直观可视的平面图。也可使用其他类型的图形表示，包括顶点图形（仅将每个色谱峰的顶点对应在两个维度的保留时间表示在平面谱图上）以及气泡图，其中圆（以色谱峰顶点为圆心）的面积与绘制的色谱峰大小成正比。



**图 1.8** 将采集到的  $^2D$  色谱图组合为复合 2D-LC 色谱图。在第 1 部分中，显示的绿色、黄色和粉色色谱峰由未分离的复合色谱峰组成，其经过调制或采样形成一系列  $^2D$  色谱图。在第 2 部分中，对这些色谱图进行转换，从而更好地显示该系列，各个黄色、绿色和粉色色谱峰随  $^1D$  复合色谱峰先增高后下降。在第 3 部分中，显示了  $^2D$  色谱图的三种不同的视图，包括彩色等高线图、简单等高线图和 3D 图

## 二维色谱简介

# 二维液相色谱的原理

### 2.1 引言

在本基础导论开篇的“引言”中，我们指出本文主要是面向已经拥有相当丰富的一维液相色谱经验的研究人员。有些概念对于理解多维色谱来说至关重要。其中包括峰容量的概念以及梯度洗脱色谱的基本知识。这些概念在多维色谱中的应用非常普遍，以至于我们感觉甚至是一些在一维色谱方面有丰富经验的人员对这些概念可能也一知半解。因此，在学习二维液相色谱的原理之前，我们先回顾一下这些概念。如果您已经熟悉这些概念，可以跳过第 2.2 节“峰容量及相关概念”和第 2.3 节“梯度洗脱液相色谱和 2D-LC 的基础知识”，这两节内容对于不熟悉这些概念的人相当重要；强烈建议您阅读这些章节。我们将在第 2.2 节里介绍峰容量的概念，将在第 2.3 节里回顾一维梯度洗脱色谱中的保留能力、峰宽和峰容量的基础知识，强调了它们在反相色谱中的作用。将在第 2.3 节的最后介绍在 1D 梯度洗脱中如何选择填料粒径、色谱柱柱长和洗脱液速度以及系统压力和色谱柱柱温来优化峰容量。我们还将介绍梯度洗脱在 LCxLC 起着重要作用的原因。

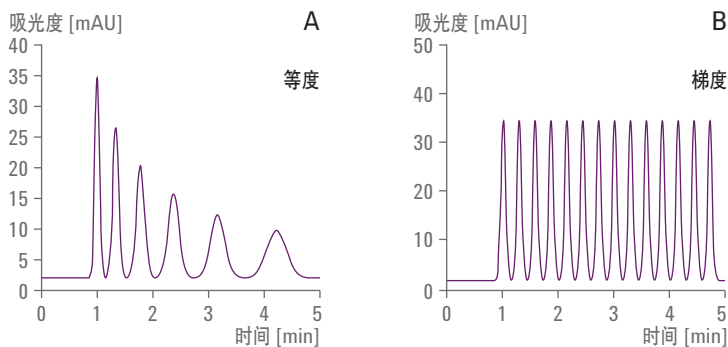
本章的核心内容是第 2.4 节“LCxLC 峰容量的基本原理”。其中介绍了 2D 相对于 1D 方法的主要优势，即乘积法则。乘积法则表明，在理想条件下，2D 分离的峰容量等于 1D 峰容量乘以 2D 峰容量。将介绍 2D-LC 的两个基本问题，即空间覆盖度问题（也称作正交性问题）和采样不足问题（也称作再混合问题），还引入了峰容量校正因子，用于将理论峰容量校正为实际或有效的峰容量。得到了有效峰容量后，我们将考虑如何优化在线 LCxLC 分离的峰容量。这点主要从 1D 采样时间的角度进行考虑，在线 LCxLC 中的采样时间等于各个 2D 分离所需要的时间。我们将从理论和实验两方面说明最佳采样时间，2D 运行时间相当短，通常为 12 至 20 秒。因此，有可能在仅仅 30 分钟的时间内获得 1000 以上的有效峰容量。

## 2.2

### 峰容量及相关概念

我们将为您介绍二维色谱中乘法法则的概念。乘法法则是衡量二维色谱中每一维分离能力的公式。选择峰容量（以  $n_c$  表示）来衡量分离能力是最方便的方法。峰容量的定义是分离窗口内可以容纳的最大色谱峰数量，分离窗口是指最后洗脱的色谱峰与第一个洗脱的色谱峰之间的时间差。显然，当所有色谱峰都能得到完全均等的良好分离时才能纳入最大的数量，如果有些峰没能得到良好分离，则会浪费掉一些分离空间。很明显，峰容量是一个理论数值，是基于假设和推测得到的，因为事实上洗脱出来的色谱峰不可能得到同等程度的分离。在峰容量理论中，通常将界定峰得到分离所需的分离度数值定为 1.0。这相当于相邻色谱峰顶点之间以 4 倍峰标准偏差 ( $4\sigma$ ) 得到精确分离。

在图 2.1 中，我们通过两幅色谱图说明峰容量的概念。色谱图 A 显示了在等度条件下获得的峰容量。我们假设第一个色谱峰在死体积处洗脱出来。在相同色谱柱、相同流速、相同柱温并保持塔板数不变的情况下，色谱图 B 显示了预期的梯度洗脱色谱图。这里，我们假设所有色谱峰具有大致相同的峰宽；这种情况在梯度色谱中很常见（参见第 2.3.2 节“梯度洗脱下的峰宽”）。很明显，与等度色谱图相比，梯度色谱图中可纳入更多的色谱峰。这就是为何要在二维液相色谱中将分离的一个维度或两个维度采用梯度洗脱的其中一个主要原因。实际上，使用梯度洗脱有很多原因，我们将在重点介绍仪器的第 3 章“二维液相色谱的实施”中进行详细讨论。



**图 2.1** 等度 (A) 与梯度洗脱 (B) 峰容量的比较。两根色谱柱具有相同的塔板数，并且所有色谱峰的分度均为 1.5。所有色谱峰具有相同的峰面积，第一个色谱峰在色谱柱死时间时洗脱出来

由于假定所有色谱峰具有相同的峰宽，因此梯度洗脱中的峰容量计算公式十分简洁，参见公式 2.1。

$$n_C = 1 + \frac{t_{R,last} - t_{R,first}}{4R_s\sigma} = 1 + \frac{t_{R,last} - t_{R,first}}{W}$$

**公式 2.1** 梯度洗脱中的峰容量

通常情况下，取  $R_s$  等于 1，当所有色谱峰的峰宽不尽相同时，我们使用平均  $4\sigma$  宽度 ( $W$ ) 给出公式 2.1 的右侧形式。在对峰容量进行理论处理或研究的情况下，峰高的数值是会发生变化的，或者在使用了不同的峰解卷积或多元曲线分辨方式对峰处理的情况下， $R_s$  值被认为是能使任何两个共流出峰峰顶得到分辨所需要的  $R_s$  值的总平均值，在绝大多数实验工作中， $R_s$  都使用同一个均一值。

在许多实际工作中，可以调整分析方法的梯度起始和最终的流动相比例，使得第一个色谱峰在色谱柱死时间 ( $t_0$ ) 时或临近色谱柱死时间时洗脱出来，最后一个色谱峰在最终梯度强度达到色谱柱末端时 ( $t_0 + t_g$ ) 洗脱出来。考虑到公式 2.1 中的第二项通常远大于第一项，因此我们可以按照公式 2.2 对峰容量进行估算。

$$n_C \approx \frac{t_g}{W}$$

**公式 2.2** 梯度洗脱中峰容量的估算公式

该公式非常有用。例如，假设梯度为 30 分钟且典型峰宽 ( $4\sigma$ ) 为 20 秒，我们就能快速估算出最佳情况下的峰容量为 90 左右。

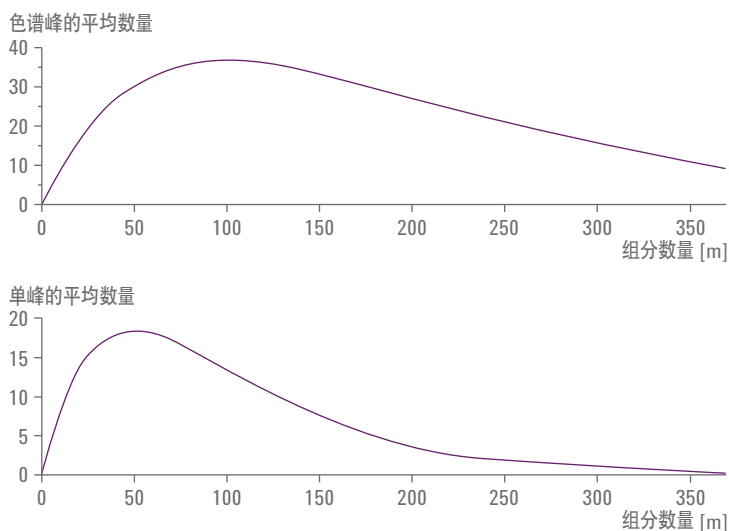
峰容量概念的真正问题在于它是一个假设概念。在实际样品中，色谱峰之间的间隔没有规律，是随机的。另外，色谱峰的峰高也不可能全部相同。众所周知，具有相同峰高和峰宽的两个相邻色谱峰在分离度刚好为 0.5 时可以使两峰顶点之间的峰谷值为一无穷小值（达到基线分离）。但是，峰高不同的色谱峰则需要更大的分离度，两个峰高差异越大，达到“无穷小峰谷值”所需要的分离度的数值也越大。

为了解峰容量假设对实际结果的影响，Davis 和 Giddings<sup>16</sup> 建立了 1D 色谱的色谱峰叠加统计理论，现在该理论的应用已经扩展到了多维色谱。他们使得一系列色谱峰的相对保留时间按泊松分布进行变化。在一维分离中，他们发现观察到的色谱峰的平均数量 ( $\rho$ ) 可能与混合物中化学组分的数量 ( $m$ ) 以及峰容量 ( $n_c$ ) 相关，可表示为公式 2.3。

$$\rho = m \times \exp\left(-\frac{m}{n_c}\right)$$

**公式 2.3** 观察到的色谱峰的平均数量与组分数量和峰容量的关系

$m/n_c$  数值相当重要，在以后的论述中会反复出现，这个值被称为饱和系数，用符号  $a$  表示。 $a$  值低则表示仅有少量色谱峰位于分离空间内。也就是说色谱峰饱和度较低。这种情况下便可实现轻松分离。从另一角度说， $a$  较低时发生色谱峰叠加的可能性小于  $a$  较高时。分离的难度并不是由于组分的绝对数量导致的，而是由于组分数量对于分离区域内的分离能力（以峰容量衡量）的需求导致的。在梯度 1D 色谱中，峰容量与所有色谱峰所需的平均分度之间存在定量关系，而与其相对保留时间无关。而这一概念也适用于多维分离，其中峰容量与所需的平均分度至少存在定性关系。



**图 2.2** 上图显示了峰容量为 100 时，色谱峰的平均数量相对于组分数量的曲线，其中色谱峰平均数量最高仅为峰容量的 37%。下图显示了当峰容量为 100 时，单峰的平均数量相对于组分数量的曲线，其中单峰平均数量最高仅为峰容量的 18%。分析包含大量组分的天然混合物时需要极高的峰容量（例如，在蛋白质组学、代谢组学和环境样品分析中）已成为 2D-LC 引人关注的首要推动力量

Davis-Giddings 理论的一个重要推论就是使用被分析物组分数量对色谱峰数量作图，可以看出该曲线在  $p = 0.37 \cdot n_c$  时有最大值。（参见图 2.2）。所以，假设我们使用一个效能较好的 30 分钟梯度获得了峰容量为 100 的分析方法，使用它来分析一个含有 100 个组分的样品，通常来说，如果没有经过任何的针对选择性的特别优化，我们将只能分离得到 37 个色谱峰。这 37 个色谱峰中的每个峰都可能含有一个组分，两个组分甚至是更多组分，更关键的问题在于，通过这样的分析方法，我们通常平均可以得到多少个纯峰（仅含有单个组分的色谱峰）？根据这个理论预测，纯峰的数量应等于  $0.18 \cdot n_c$ （参见图 2.2）。即，利用峰容量为 100 的方法分析 100 种组分的混合物时，观察到的 37 个色谱峰中将有 18 个是单组分，其他 19 个色谱峰是双组分峰或多组分峰。由于只有单组分

峰才能通过简单的方法（即，利用单变量检测器而非二极管阵列检测器或质谱仪）分析且无需采用任何数学手段辅助解析谱图，显然我们需要极高的峰容量才可最大程度减少所需的方法开发工作量。图 2.2 显示一旦  $m$  大于  $0.5n_c$ ，单组分峰的数量将急剧减少。对该问题的更详细分析表明，当  $\alpha=1$  时，所有组分的相邻色谱峰之间得到良好分离的概率仅为 13.5%，要使 99% 的目标组分与相邻色谱峰都得到良好分离，需要  $n_c \geq 200m$ 。很显然，如果不通过方法开发调整色谱峰分布，就需要极高的峰容量才可实现常见的复杂混合物的分离，如图 2.3 所示。

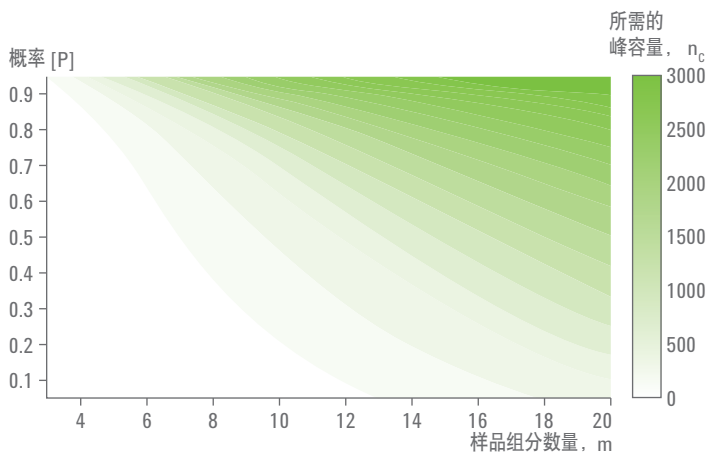


图 2.3 使未知混合物中所有色谱峰得到分离的概率达到特定值  $P$  所需要的峰容量  $n_c$ ，该混合物中包含  $m$  种组分（使用参考文献 17 中的公式 9 计算得到）

## 2.3 梯度洗脱液相色谱和二维液相色谱基础知识

根据上述章节，应当清楚，峰容量这一点在 2D-LC 中非常重要。在尽可能短的合理分析时间内，梯度洗脱分离能够得到的峰容量明显大于等度分离。在 2D 分离的第一维或第二维使用梯度洗脱的优势有很多，当然使用梯度洗脱困难或更合适使用等度洗脱的情况也很多。搞清这些问题需要对仪器有比较详细的了解，我们将在第 3 章“二维液相色谱的实施”中用较长的篇幅进行深入探究，因为理解这些问题对于完成高质量的 LCxLC 工作至关重要。不过，这里需要提出一个非常需要关注的问

题：梯度洗脱与等度洗脱之间的主要操作差异在于，在梯度洗脱中，仪器和色谱柱在每次分析结束后均需要再平衡至初始的流动相组成。这对于我们如何实现<sup>2</sup>D 色谱具有极其重要的影响，尽管在较短的分析时间内采用等度洗脱要容易得多，但是在许多情况下我们发现第二维采用梯度洗脱更可取。对于第一维分析，不使用梯度洗脱的原因就更少了，因此，我们认为在介绍 2D-LC 的原理之前必须对梯度洗脱的一些基本知识有非常清晰的理解。

### 2.3.1

#### 梯度洗脱中的保留时间

在等度色谱中，流动相组成在整个分离过程中保持不变。保留时间 ( $t_R$ ) 只与色谱柱死时间 ( $t_0$ ) 和溶质保留因子 ( $k$ ) 有关，如公式 2.4 所示。

$$t_R = t_0(1 + k)$$

公式 2.4 溶质保留时间与色谱柱死时间和被分析物保留因子的关系

相比之下，在梯度洗脱模式中，人为改变流动相的洗脱强度，使其从初始较弱的洗脱液组成变为较强的洗脱液。通常使用简单的线性梯度，这意味着洗脱液强度或组成与时间呈线性函数进行改变。有关梯度洗脱的多数理论文献都关注的是线性梯度。请查阅 Snyder 和 Dolan 关于梯度洗脱的专著深入了解相关知识，本文不再过多讨论<sup>18</sup>。显然，溶质的瞬时保留因子不再像等度洗脱中那样是个常数，而是在整个分离过程中大约呈指数减小的趋势。根据反相色谱梯度洗脱的线性溶剂强度理论 (LSST)，保留时间、仪器参数与被分析物保留之间的关系如公式 2.5 所示。

$$t_R = t_0 + t_D + \frac{t_0}{b} \cdot \ln \left( b \cdot \left( k_0 \frac{t_D}{t_0} \right) + 1 \right)$$

公式 2.5 保留时间、仪器参数与被分析物保留之间的关系

公式 2.5 中包含多个重要术语；它们与一些附加术语均在表 2.1 中进行了定义。

符号	定义	单位	衍生关系
$t_R$ 有时表示为 $t_{R,g}$	保留时间	时间	
$t_0$	色谱柱死时间	时间	$t_0 = V_m/F$
$V_m$	色谱柱死体积	体积	
$F$	洗脱液流速	体积/时间	
$t_D$	梯度延迟时间	时间	$t_D = V_D/F$
$V_D$	梯度延迟体积	体积	
$S$	被分析物保留因子的对数值对洗脱液组成作图曲线的斜率值	无量纲	
$k_w$	纯水中的被分析物保留因子 ( $\phi = 0$ )	无量纲	
$k_0$	初始洗脱液组成下的被分析物保留因子 ( $\phi_0$ )	无量纲	$k_0 = k_w \exp(-S\phi_0)$
$t_g$	组分由初始值线性改变为最终值的时间 ( $\phi_m$ )	时间	
$\Delta\phi$	梯度组成的范围	无量纲	$\Delta\phi = \phi_m - \phi_0$
$b$	梯度斜率	无量纲	$b = S \Delta\phi t_0 / t_g$

表 2.1 讨论梯度洗脱液相色谱时会用到的符号和术语汇总

从该公式中得出的最重要的信息是，保留时间与初始保留因子 ( $k_0$ ) 的对数有关，而在等度色谱中两者则是线性关系（参见图 2.4）。这一结果是因为溶质保留因子在整个梯度运行过程中不断减小。因此，在由死时间和最强保留溶质被洗脱之间的确定时间内，采用梯度洗脱能够比等度洗脱分析更宽保留特性范围的被分析物。我们还应该特别注意到公式中包含的延迟时间项 ( $t_D$ )。这是指流动相组成的变化需要花费一定时间才能从混合点到达色谱柱头。在梯度洗脱仪器的设备中，样品不会随着流动相经过混合点，而是在混合点后尽可能靠近色谱柱的地方引入样品，这样可以尽量避免峰在色谱柱外的展宽。梯度延迟的影响可以通过某些手段补偿：比如人为在梯度运行开始后的一小段时间再进行进样，这种方式叫做延迟进样。梯度延迟的概念在 2D-LC 系统的第二维中极其重要，这一问题将在第 3 章“二维液相色谱的实施”中予以讨论。

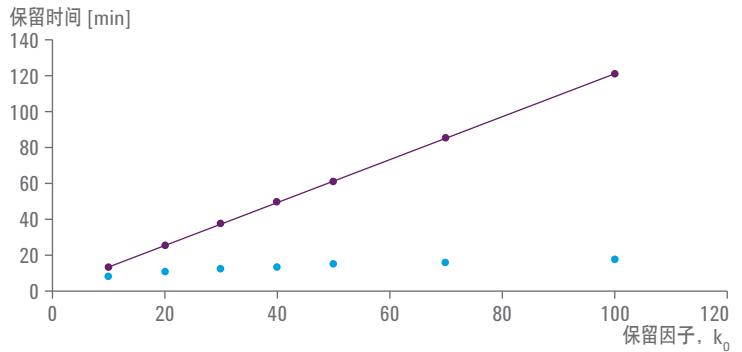


图 2.4 保留时间相对于保留因子的曲线。等度结果以紫色圆点和紫色实线显示。梯度（非线性）结果以蓝色圆点表示。条件： $F = 1 \text{ mL/min}$ ； $V_m = 1.2 \text{ mL}$ ； $V_D = 0.5 \text{ mL}$ ； $t_D = 30 \text{ min}$ ； $S = 12$ ； $k_0$  或  $k = 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100$

根据等度洗脱模式中保留因子的计算方法（参见公式 2.4），我们可以类比得到计算梯度洗脱中“表观（或实际）保留因子”的计算方法（如公式 2.6 所示）。

$$k_g \equiv \frac{t_{R,g} - t_0}{t_0}$$

公式 2.6 表观或实际保留因子

假设延迟时间为零或使用适当的延迟进样方法，将使得梯度保留因子 ( $k_g$ ) 与溶质在初始流动相条件下的保留因子之间呈对数关系 ( $k_0$ )。

### 2.3.2

#### 梯度洗脱中的峰宽

采用梯度洗脱时，峰宽、色谱条件和被分析物性质之间的关系也是重要的考虑因素。事实上，正是峰宽和保留因子之间的关系使梯度洗脱的峰容量远高于等度洗脱。等度色谱中峰标准偏差的公式如公式 2.7 所示。

$$\sigma_{iso} = \frac{t_0}{\sqrt{N}} (1 + k)$$

公式 2.7 等度色谱中峰标准偏差的计算

梯度洗脱采用的公式如公式 2.8 所示。

$$\sigma_{grad} = \frac{t_0}{\sqrt{N}} G(\rho)(1 + k_e)$$

公式 2.8 梯度洗脱中峰标准偏差的计算

这些公式中各项的定义列于表 2.2 中。很明显，两个公式密切相关。梯度压缩因子  $G(\rho)$  用于反映色谱谱带在流经色谱柱时靠近柱头的一端的洗脱强度大于远离柱头一端。在非常慢的梯度（组分缓慢增加）中，洗脱过程接近于等度， $G(\rho)$  趋近于 1；而在快速梯度过程中，可以观察到的最重要影响是峰宽减半；但是，由于扩散影响导致在极快速梯度中  $G(\rho)$  只能减小到一个趋近于 0.58 的极限值。谱带后端的柱上压缩效应确实存在，但它对于第二维分离的影响远不如谱带在色谱柱头产生的色谱聚焦效应带来的影响大，样品聚焦效应通常在第二维中具有重要作用。

符号	定义	单位	衍生关系
$\sigma$	峰标准偏差	时间	
$t_0$	色谱柱死时间	时间	参见表 2.1
$N$	色谱柱塔板数	无量纲	$N = (t_0/\sigma)^2$
$k$	保留因子	无量纲	
$G(\rho)^*$	梯度压缩因子	无量纲	$G = \sqrt{\frac{1 + \rho + \frac{\rho^2}{3}}{(1 + \rho)^2}}$
$\rho$		无量纲	$\rho = k_0 b / (1 + k_0)$
$k_e$	组分离开色谱柱时的保留因子	无量纲	$k_e = \frac{k_0}{b k_0 + 1}$

表 2.2 在梯度洗脱液相色谱中讨论峰宽时所需的符号和术语。此处未定义的术语的定义列于表 2.1 中 (\*  $0.58 < G(\rho) < 1.0$ )

等度与梯度液相色谱之间的真正差别在于  $k$  和  $k_e$  的含义不同。 $k_e$  是谱带流出色谱柱时表观的溶质保留因子。根据表 2.2 所示的公式，该值取决于  $k_0$  和  $b$ 。这两个数值都取决于被分析物本身，但是对于具有大致相同

的分子量的被分析物而言， $k_0$  的变化幅度远大于  $b$ 。实际上，当  $k_0$  很大时（实际情况中经常如此）， $k_e$  的限值为  $1/b$ ，如公式 2.9 所示。

$$k_e \approx \frac{1}{b} = \frac{t_g}{S\Delta\phi t_0}$$

公式 2.9 溶质保留因子的限值

因此，公式 2.8 可以改写为公式 2.10。

$$\sigma_{grad} = \frac{t_0}{\sqrt{N}} G(\rho) \left( \frac{t_g + S\Delta\phi t_0}{S\Delta\phi t_0} \right)$$

公式 2.10 峰标准偏差与溶质保留因子的限值

使用  $k_e$  的演化公式绘制的  $\sigma_{grad}$  相对于  $k_0$  和  $S$  的曲线如图 2.5 所示。该曲线提供的最重要的信息是，当  $k_0$  大于约 20 时，具有大致相同的  $S$  值的所有色谱峰具有大致相同的峰宽。小分子（如苯）的  $S$  值为 6 左右。采用胰蛋白酶对蛋白质进行消化得到的多肽的  $S$  值在 20 至 40 的范围内。

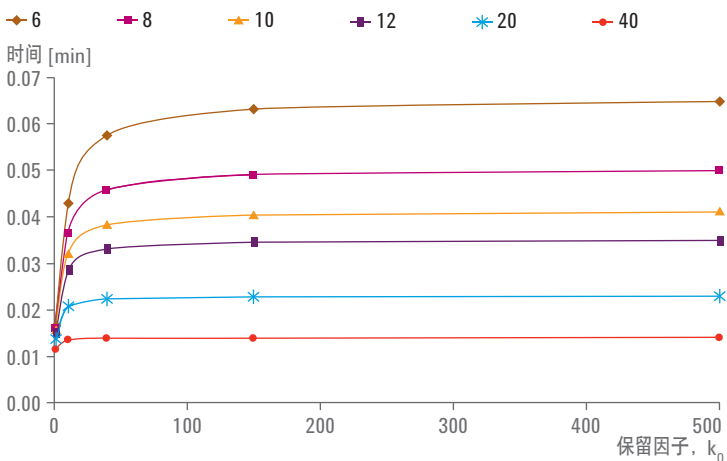


图 2.5 梯度洗脱色谱中色谱峰  $\sigma_{grad}$  值（分钟）相对于初始保留因子 ( $k_0$ ) 的曲线。被分析物的  $S$  因子显示在图例中。其他条件为： $t_0 = 0.5$  min,  $t_b = 0$  min,  $t_g = 15$  min,  $N = 3000$ ,  $\Delta\phi = 0.75$ 。与  $S$  值对应的  $b$  值为 0.20、0.27、0.33、0.40、0.67 和 1.33。该曲线提供的最重要的信息是，当  $k_0$  大于约 20 时，具有大致相同的  $S$  值的所有色谱峰具有大致相同的峰宽

选择小分子量药物的典型  $S$  值 (例如 12), 可以模拟梯度洗脱分离, 得到如图 2.6 所示的色谱图。所有色谱峰具有相同的峰面积。很明显, 随着保留时间的延长, 峰宽略有增加但很快趋于一个定值, 可以从近乎一致的峰高推断。这点与等度色谱中的情况截然不同, 在等度洗脱中其峰宽 (假定所有色谱峰具有相同的塔板数) 随保留时间的延长而不断增加。这是梯度色谱的一个重要特点。它直接导致梯度色谱的峰容量比等度色谱更高。

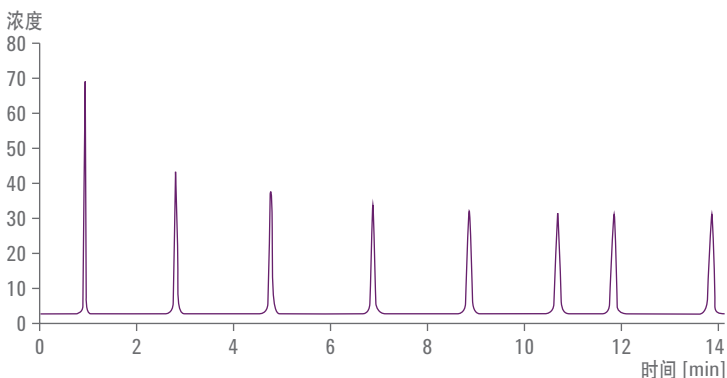


图 2.6 使用公式 2.5 和 2.8 生成的色谱图。 $k_0$  值取为 1、10、40、150、500、1500、3000 和 10000。所有其他条件与图 2.5 所示相同, 且  $S = 12$

### 2.3.3 梯度洗脱的峰容量

为简单起见, 我们假设调整初始洗脱液组成使第一个色谱峰在  $t_0$  后很快洗脱出来, 而调整其最终组成使最后一个色谱峰在  $t_g + t_0$  时洗脱出来。因此, 公式 2.1 中的分子处于最大值。我们假设可使用公式 2.9 所示的近似形式, 在这种情况下  $k_0$  足够大, 使  $k_e$  能够准确表示为  $1/b$ , 如公式 2.11 所示。

$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4G(\rho)} \frac{S\Delta\phi t_g}{t_g + S\Delta\phi t_0} \approx \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{S\Delta\phi t_g}{t_g + S\Delta\phi t_0}$$

公式 2.11 使用公式 2.9 的近似形式计算峰容量

我们使用公式 2.11 计算基于单个峰（通常为最后一个色谱峰）或所有色谱峰的平均值的峰容量。要知道的是，这一估算值有时仅为近似值：在计算中通常将  $G(\rho)$  估算为 1.0，即通常忽略柱上区域压缩的有利影响。很明显，峰容量取决于若干仪器和色谱柱参数 ( $t_0$  和  $t_g$ )。它取决于与溶剂有关的参数 ( $S$ )。当然， $S$  也会由于固定相和流动相的化学性质而变化。有一种倾向是将  $\Delta\phi$  视作一个主要仪器变量。在我们看来，这是错误的：为了使第一个溶质在靠近  $t_0$  时洗脱出来且最后一个溶质在靠近  $t_0 + t_g$  时洗脱出来，必须同时调整  $\phi_0$  和  $\phi_m$ ，它们的值取决于被分析物组的性质，特别是保留特性最低和最高的被分析物的  $k_0$  值。

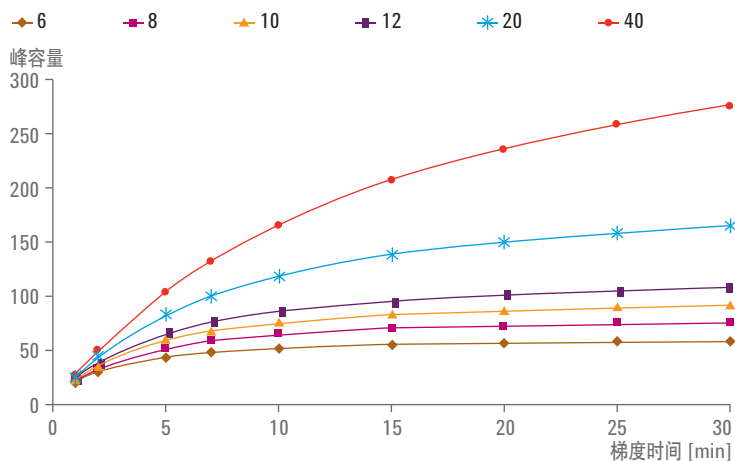


图 2.7 峰容量取决于梯度时间和使用公式 2.11 计算得到的被分析物的  $S$  值，计算时取  $G(\rho) = 1$ 。  $S$  值列于图例中。除  $t_g$  以外的所有其他变量均如图 2.4 和图 2.5 所示。可以看出峰容量刚开始快速增加，然后逐渐接近某个上限，在此限值以上，峰容量几乎不再提高。这些曲线告诉我们，如果想优化峰容量，增加柱长确实为一个有效的方法，因为它会导致梯度时间相应延长

图 2.7 表明对于柱长和流速固定的色谱柱，峰容量随梯度时间而增加，但很快会到达某个限值。达到 90% 峰容量所需的梯度时间由公式 2.12 确定。

$$\frac{t_g}{t_0} \geq 9S\Delta\phi$$

公式 2.12 达到峰容量上限的 90% 所需的梯度时间

峰容量限值由公式 2.13 计算。

$$n_{C,max} \approx \frac{\sqrt{N}}{4} S \Delta \phi$$

公式 2.13 峰容量限值的计算公式

这些公式（包括图 2.7）明确表明，峰容量和得到峰容量的速度与色谱柱柱效 ( $N$ ) 和溶剂组的特性 ( $S$  和  $\ln k_w$ ) 密切相关。因此，为获得较高的峰容量，我们需要性能良好的色谱柱。对于被分析物而言，具有较大  $S$  值和保留范围变化较宽的被分析物会容易获得更高的峰容量。图 2.7 中的曲线所显示的峰容量与梯度时间的函数关系已经得到了很多实验的证实。即峰容量刚开始随梯度时间的延长而快速增加，之后曲线变平缓而峰容量最终将不再增加。这一情况在 LCxLC 系统第一维使用缓慢梯度（15 至 60 分钟）和第二维使用快得多的梯度（数十秒）时均得到了验证。尽管实验数据可能不会与公式 2.11 精确匹配，但曲线中存在相同的极限特征。

很明显，由  $n_c/t_g$  计算可以得出结果：峰容量的生成速率随时间增加而下降（参见第 2.3.4 节“优化 1D 梯度峰容量梯度峰容量”）。这一现象将与“采样不足”问题（将在第 2.4.2 节中讨论）一起产生作用从而使得在 2D 分析中存在一个“使得峰容量达到最大值”（将在第 2.4.3 节“采样不足的结果”中提到的）的最佳 2D 梯度时间。

尽管公式 2.11 很有用，但我们也不得不指出上述将峰容量与梯度时间建立关联的方法存在一个非常严重的缺陷。公式 2.11 假设除了梯度时间之外所有分离条件（色谱柱柱长、流速、初始和最终流动相组成、死时间和塔板数）均固定不变。实际上如果允许其他条件随梯度时间增加而改变，则一定可以显著提高峰容量（参见第 2.3.4 节“优化 1D 梯度峰

容量”)。或许公式 2.11 最严重的局限性在于  $L$  固定不变, 因此  $N$  也不变。我们非常确信在适当的 30 分钟梯度时间的条件下能够获得 20000 以上的塔板数。因此, 我们估计在梯度时间 30 分钟下更合理的  $N$  值为 20000 而非至少 3000。这导致峰容量的上限值变为 149 (6)、194 (8)、237 (10)、278 (12)、425 (20) 和 708 (40), 其中括号内是相关的  $S$  值。这一峰容量与图 2.7 中的结果相比有显著提高。

### 2.3.3.1

#### 生成最大峰容量的最佳速率

与优化在线 2D-LC 紧密相关的另一个重要方面是峰容量的生成速率。该参数由两个独立因素控制, 这两个因素都相当重要。

- 峰容量与梯度时间之间的关系
- 在达到下一梯度之前再平衡 ( $t_{re-eq}$ ) 系统所需的时间

再平衡时间包括冲洗梯度混合系统使其流出物达到梯度中所用的初始组成所需的时间, 以及彻底冲洗色谱柱以使相同溶质实现可重现的分离所需的时间。我们发现许多类型的 RPLC 色谱柱需要用大约二至三倍体积的初始洗脱液进行冲洗才可使其保留时间完全可重现。尚不清楚 HILIC 或离子交换色谱柱再平衡需要多长时间。对于 HILIC 或离子交换色谱 (IEX) 而言, 所需的体积可能会比反相方法大得多。

梯度洗脱循环时间 ( $t_c$ ) 的定义是梯度时间与再平衡时间之和, 因此峰容量的生成速率最好表示为  $n_p/t_c$  而非  $n_p/t_g$ 。如上所述, 梯度时间决定了峰容量。图 2.8 所示的数据来自通过实验测量  $^2n_p$  值与  $^2t_g$  之间的函数, 实验采用小 (2.1 x 33 mm) 色谱柱测定几个小分子量的化合物, 在高温和极高的流速 (3 mL/min) 下进行操作。实验得到的  $t_{re-eq}$  实际上为 3 秒, 但一系列曲线计算得到的一系列  $t_{re-eq}$  值处于 2 至 5 秒的范围内。这证明可以通过优化得到最优的峰容量生成速率。随后我们将看到, 这一现象也会极大地影响 2D 峰容量相对于在线 LCxLC 第一维采样时间的曲线中的最佳值。

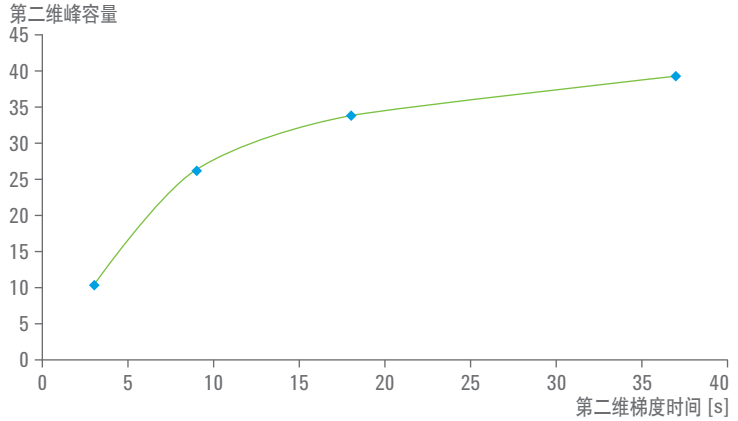


图 2.8  ${}^2n_c$  对  ${}^2t_g$  的实验数据。数据来自 Huang 等人<sup>19</sup>—采用含碳涂层的氧化锆制得的 2.1 x 33 mm (id) 色谱柱，在流速 3 mL/min、柱温 110 °C 的条件下使用乙腈/水进行梯度洗脱。在 LCxLC 分析过程中采集玉米种子样品的数据。圆点为实验数据，最佳拟合曲线方程为  ${}^2n_c = 50.0 {}^2t_g / (9.16 + {}^2t_g)$ ，其中  ${}^2t_g$  以秒计

再平衡时间: — 2 s — 3 s — 4 s

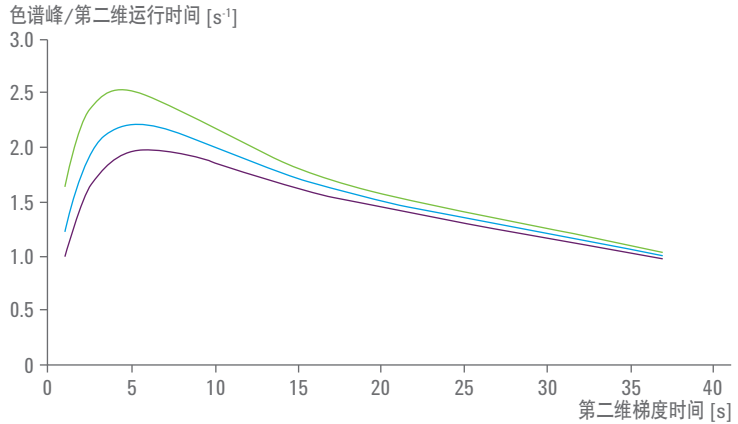


图 2.9 计算得到的峰容量生成速率值相对于梯度时间的曲线。将图 2.8 的数据与公式 2.11 所示的公式进行拟合，计算得到该曲线。将图例中给出的再平衡时间与计算峰容量所用的梯度时间相加，计算得到运行时间。峰容量生成速率定义为  ${}^2n_c / {}^2t_c$

### 2.3.4

#### 优化 1D 梯度峰容量

由于种种原因（在第 3 章“二维液相色谱的实施”中将会详细介绍），很难完全优化在线 LCxLC 1D 梯度所用的色谱条件。具体而言，第一维采用的流速 ( $^1F$ ) 通常远低于使峰容量达到最大时的流速。在传统的 1D 分析中显然不存在 2D 分离对  $^1F$  的限制。可采用许多方法最大程度提高梯度洗脱中的峰容量<sup>18,20</sup>，但是一般而言，最佳方法是采用 Poppe 使用的方法<sup>21</sup>：这一方法最初是为了通过在等度分析中获得最大的塔板数从而提高梯度方法的峰容量而设计<sup>22</sup>。Poppe 的基础概念必须要满足两个条件。

- 色谱柱柱长和流速同时改变，从而使操作压力始终处于某个所需的最大值
- 色谱柱柱长和流速同时改变，从而使分析于某个所需的时间范围内完成。该时间范围由色谱柱死时间 ( $t_0$ ) 和保留时间最长的色谱峰的保留因子确定

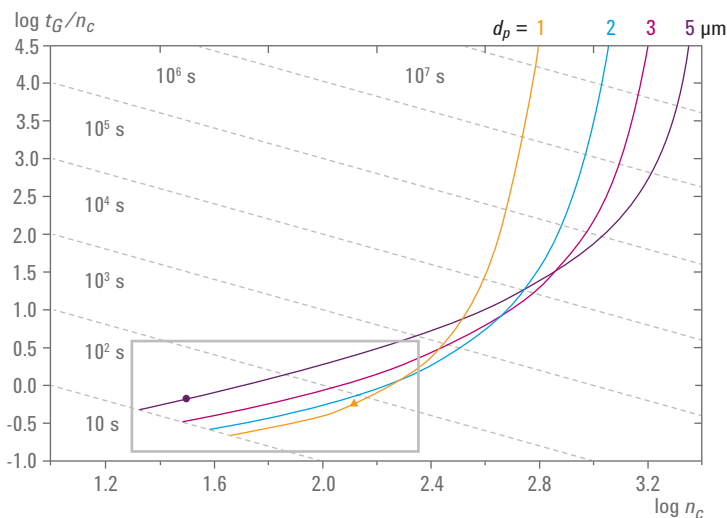
在使用固定填料粒径并且采用恒定的温度、洗脱液组成同时保证流动相粘度恒定的情况下，如果遵守上述规则，得到的将是所用系统选择和填料粒径条件下具有最大的  $N/t_0$  值<sup>23</sup>的方法。

可采用下列方式使用 Poppe 的优化方法对梯度洗脱进行优化<sup>22</sup>。首先，我们使用公式 2.1 对峰容量而非塔板数进行优化。由于该公式取决于保留时间最短和最长的溶质的保留时间，因此我们必须考虑与被分析物有关的数据，特别是  $S$  和  $k_w$  值。其次，时间范围是基于梯度时间而非色谱柱的死时间的。第三，梯度峰容量取决于色谱柱柱长和洗脱流速，以及初始和最终洗脱液组成。如果还想优化温度，则必须输入其他相关参数。有关实现此类优化的计算程序，请访问网站 <http://homepages.gac.edu/~dstoll/calculators/optimize.html>（2014 年 11 月 1 日开放访问）。

进行峰容量梯度优化的最重要的一个经验是在不同的梯度时间长度下选择不同长度的色谱柱。让色谱柱柱长、流速（洗脱线速度）和洗脱液组成随梯度时间而改变是非常重要的。涉及分离胰蛋白酶肽段的此类研究结果如图 2.10 所示。这些曲线提供的关键信息是，有必要随梯度时间的延长而逐渐增加填料粒径，从而最大程度提高峰容量。可以使用尽可能小的填料粒径以在极短的时间内获得最大的峰容量，但是采用较长的梯

度时，必须增加填料粒径。此外，必须明白的是，由于要保持系统一直处于最大工作压力，沿这些 Poppe 曲线中的任何一条（图 2.10 中的曲线上任意一点的压力都保持在 400 bar），从左向右（即向上）移动时，随色谱柱长度增加分析流速逐渐降低，所以随着曲线从左向右移动对应的分析时间（梯度时间）也逐渐延长。

曲线表明，采用最长的梯度时间（远大于 1000 秒）和最长的色谱柱在较低的洗脱液速度下可获得最高的峰容量。此外，梯度时间越长、色谱柱越长且其中所用的填料粒径越大，则得到的峰容量越高。相比之下，在极短的梯度时间（远小于 100 秒）下采用较小的填料粒径和极短（< 5 cm）的色谱柱并以高洗脱液速度进行操作能够获得最有时效的分离。



**图 2.10** 展示梯度时间与优化峰容量之间关系的 Poppe 梯度曲线。斜虚线是由常数  $t_G$  组成的线。所用的条件假设 van Deemter 参数  $A = 1.04$ ,  $B = 16$ ,  $C = 0.033$ , 无量纲的流阻系数 = 500, 柱温 = 40 °C, 且  $P_{max} = 400$  bar。摘自参考文献 22。曲线表明，采用最长的梯度时间（远大于 1000 秒）和最长的色谱柱在较低的洗脱液速度下可获得最高的峰容量。此外，梯度时间越长、色谱柱越长且其中所用的填料粒径越大，则得到的峰容量越高。相比之下，在极短的梯度时间（远小于 100 秒）下采用较小的填料粒径和极短（< 5 cm）的色谱柱并以高洗脱液速度进行操作能够获得最有时效的分离

色谱柱柱温和最大操作压力均对峰容量均有重要影响，在极短的梯度时间下尤其如此。这些结果如图 2.11 所示。在高速区域 ( $t_g < 100$  秒) 中，操作压力对峰容量的影响很小，但提高柱温却能带来正面影响。但是，在获得最高峰容量的长梯度时间下，高温的影响很小，并且在梯度过长的情况下，提高色谱柱柱温最终将产生不利影响。

从这些图表中可以获得大量有关 2D-LC 的重要信息。

- 在较长时间范围 (15 分钟或更长) 内完成的 <sup>1</sup>D 分离中，通常应采用较长的色谱柱 (> 15 cm) 以及较低的流速和中等填料粒径 (几乎肯定不是 1.8- $\mu$ m 颗粒)，才可在最大系统压力下获得最高峰容量
- 随着梯度时间的延长，应增加色谱柱柱长并降低流速，以保证在可允许的系统耐压范围下运行方法
- 应使用 40 至 60 °C 的中等温度 (只要不存在柱上样品分解) 以降低洗脱液粘度
- 色谱柱的内径应当为 2.1 mm 或更小，我们在仪器硬件的讨论中将会说明原因 (参见第 3 章“二维液相色谱的实施”)
- 为实现快速 <sup>2</sup>D 梯度分离 (10 至 60 秒)，应使用小粒径填料 (1.8  $\mu$ m 全多孔硅胶或 2.7  $\mu$ m 核壳型填料)
- 应使用色谱柱可耐受的最高柱温，以使 <sup>2</sup>D 色谱柱在极高的流速下运行。可使用 3 mL/min 的流速，这对于最大程度减少 <sup>2</sup>D 系统冲洗和色谱柱再平衡极其重要

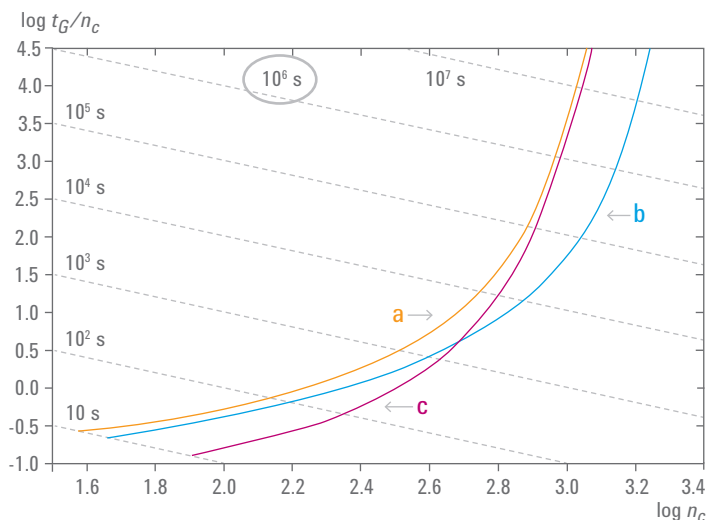


图 2.11 在图 2.10 所示的胰蛋白酶消化肽段研究中，柱温和压力对峰容量和分析时间的影响。在这种情况下，填料粒径固定为  $2\ \mu\text{m}$ 。a)  $P_{\text{max}} = 400\ \text{bar}$ ,  $T = 40\ ^\circ\text{C}$ ；b)  $P_{\text{max}} = 1000\ \text{bar}$ ,  $T = 40\ ^\circ\text{C}$ ；c)  $P_{\text{max}} = 400\ \text{bar}$ ,  $T = 100\ ^\circ\text{C}$ 。摘自参考文献 22。关于图 2.10 的所有备注也适用于此处。结果表明，在以增加速度为目的的情况下，提高色谱柱柱温比提高系统压力能够更有效地加快分析速度。这意味着第二维应当采用较短的色谱柱填充粒径较小的填料，在高温和高洗脱液速度下运行。但是，在以追求峰容量为目的的情况下，提高柱温是不利的，而提高压力则有积极作用

## 2.3.5

### LCxLC 中梯度洗脱的其他优势

与等度液相色谱相比，梯度洗脱除了使 2D-LC 具有更高的峰容量（其对于 2D-LC 非常重要）以外，还具有若干其他优势，这些优势对第二维分析尤其重要。

- 通过使  $^2\text{D}$  梯度运行到极强的洗脱液组成（例如，RPLC 中高比例有机相），可以使所有馏分在下一个  $^2\text{D}$  分析之前从色谱柱上洗脱。这对于避免  $^2\text{D}$  分离中所谓的 *wrap around* 现象至关重要：如果流动相的洗脱强度过小，无法在一个  $^1\text{D}$  馏分分析开始前洗脱掉所有组分，这些未来得及洗脱的组分最终将在之后的分离中的某一个时间被洗脱下来，相应色谱峰将与错误的  $^1\text{D}$  馏分产生关联，从而得到错误的  $^1\text{D}$  保留时间以及错误的  $^2\text{D}$  保留时间。使用梯度洗脱能够减小发生此类情况的可能性

- 采用  $^2\text{D}$  梯度的另一个重要优势在于这种方式有可能将  $^1\text{D}$  馏分中所含的组分聚焦于  $^2\text{D}$  色谱柱的柱头上。这对于减轻等度色谱中存在的谱带稀释展宽至关重要

不得将样品聚焦效应与第 2.3.2 节“梯度洗脱中的峰宽”所讨论的柱上压缩效应混淆，柱上压缩效应由因子  $G(\rho)$  表示。样品聚焦效应则截然不同。它长期以来一直被用于样品预浓缩装置，以允许大体积进样<sup>23</sup>。实现预浓缩的方法之一是在样品定量环中放置捕集柱，如果使用该固定相上对样品洗脱能力极弱的溶液冲洗则会使得样品在捕集柱头聚集成一个非常窄的谱带。设想样品溶解于大量没有洗脱能力的溶液中并流入色谱柱的情况：样品谱带前缘接触到固定相后，前进速度立即大大降低。如果样品与最初存在于色谱柱中的溶剂（优选为极弱的洗脱液）混合程度极小，则这一现象尤其突出。样品后缘以流动相速度移动，从而使样品谱带体积得到压缩，即样品聚焦于色谱柱顶端并得到较大程度的浓缩。大致上，样品浓度随上样溶剂相对于洗脱溶剂的溶质保留因子之比增加而提高（且谱带有效体积减小）。因此，上样溶剂需要为弱溶剂，而洗脱溶剂则需要为强溶剂。为使该效应更好的发挥作用，样品进入色谱柱时的保留因子必须相当大，至少为 10 或更大。如果是这样，则 20  $\mu\text{L}$  样品将被压缩 10 倍，体积变为 2  $\mu\text{L}$ 。这样样品在从进样到经过洗脱流出  $^1\text{D}$  色谱柱并被转移到  $^2\text{D}$  色谱柱上的过程中，几乎所有的区域扩散现象都可避免。从而显著降低 2D-LC 分析中样品在第一维分析时产生的稀释效应程度<sup>25, 26</sup>。

现在来看看 2D-LC 分离过程中发生的情形。当  $^1\text{D}$  色谱柱等度运行时，我们必须确保  $^1\text{D}$  洗脱液是  $^2\text{D}$  色谱柱上的弱洗脱液。然而，如果  $^1\text{D}$  色谱柱在梯度条件下运行时，我们必须确保  $^1\text{D}$  洗脱液在  $^2\text{D}$  色谱柱上（尤其在  $^1\text{D}$  梯度结束时）仍为弱洗脱液。在 RP $\times$ RP 中，选择保留性能远高于  $^1\text{D}$  色谱柱的  $^2\text{D}$  色谱柱将很有用。例如，可使用 RP 氰基或 RP 极性基团封端的低比表面积填料固定相作为  $^1\text{D}$  色谱柱，并用高比表面积填料的高载量 C18 固定相作为  $^2\text{D}$  色谱柱。

我们将在第 3 章“二维液相色谱的实施”中更详细地讨论使用捕集柱和在进样至<sup>2</sup>D 色谱柱之前用极弱的洗脱液专门对样品进行预稀释。

## 2.4 LCxLC 中峰容量的基本原理

考虑二维分离中峰容量的最佳方法之一是将一维分离想象为一系列线性的方块，如图 2.12 所示，每个方块代表一个单位的峰容量，然后对各个<sup>1</sup>D 方块的化学成分进行二次分离，如图 2.13 所示。有点类似于停在路上的汽车和停在停车场的汽车。

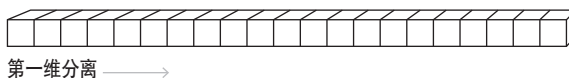


图 2.12 一维分离峰容量的示意图

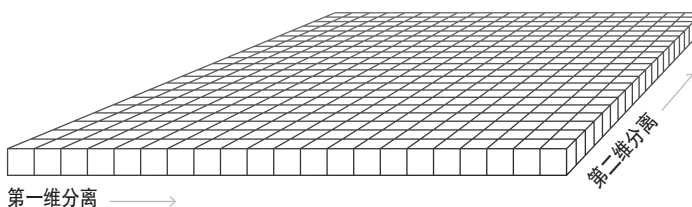


图 2.13 二维分离峰容量的示意图

该方法能够非常快速地导出多维分离的一个最重要概念，即乘积法则，如公式 2.14 所示。这里， $n_{C,2D}$  表示<sup>2</sup>D 分离的峰容量， ${}^1n_C$  和  ${}^2n_C$  分别表示第一维和第二维的峰容量。

$$n_{C,2D} = {}^1n_C \times {}^2n_C$$

公式 2.14 峰容量相乘的乘积法则

乘积法则的重要之处在于它表明 2D 分离的峰容量得到了极大提高，而使用串联色谱柱所得的峰容量最多相当于两根色谱柱之和。

公式 2.14 表明，如果  ${}^1n_c$  为 50 且  ${}^2n_c$  为 20，则  $n_{c,2D}$  等于 1000。从一开始就必须了解，乘积法则仅提供理论最高峰容量的估计值，并且仅适用于特定的理想情况下。根据 Giddings<sup>27</sup> 所述，乘积法则的含义如下：

- “首先，该法则表明混合物组分经过两步或多步分离（机理），在这些分离过程中他们的分离和保留取决于不同因素”
- “第二个标准是，当两种组分在任何一个步骤中得到分离时，它们在整个分析过程完成前始终处于分离状态。”

Giddings 法则的表述相当简练，实际应用时需要予以详细说明。它们可以转换为如下实践指南：

- A. 样品组分的保留特性必须由两种（或多种）不同的（正交）理化性质所决定，并且两套分离体系必须通过互补机理实现物质分离
- B. 组分分离后的时间位置要求由两个时间坐标（ ${}^1t_R$  和  ${}^2t_R$ ）确定而不仅仅是两个保留时间之和。这一限制条件将简单的串联色谱柱形式排除在外
- C. 样品成分必须散布于整个分离区域中
- D. 一旦物质在第一维得到分离，2D 分离过程中必须确保不发生再混合（即，额外的峰展宽）

### 2.4.1 空间覆盖度对乘积法则的限制

假定我们在两个维度使用相同类型的固定相和包括 pH 在内都相同的流动相组成。可以看到在二维分离平面上的两个维度保留时间会对应出一条很完美的对角线（参见图 2.14 的左图）。由于无法满足上述限制条件 (A)，这种情况下不会实现分离的大幅改善。这是在两种分离机制存在着良好相关性（非正交的）时会发生的情形。这一情况将在两个不同的条件下出现。首先，两个维度都利用样品中的同一类决定保留的性质来进行分离，例如，两根色谱柱都仅仅只按被分析的分子大小而不是同时兼

顾利用电荷，氢键或亲和性等特征进行分离。其次，如果分离体系可以根据被分析物的两类或几类不同性质进行分离，但是被分析的组分实际上仅具有一种可用于产生分离的性质，这种情况出现于分离一些比如简单同系物（如烷基苯），或苯系物（苯，联苯，对三联苯）或均聚物（甘氨酸，二聚甘氨酸，三聚甘氨酸）的类似混合物时。显然，需要分离系统的各个维度与决定被分析物保留特性的不同性质相互作用，并且需要被分析物组中包含至少两种此类不同性质。这是被分析物组分分散的必要条件。如果溶质性质的差异足够大，则组分将散布在整个分离区域中，如图 2.14 中的右图所示。这种情况被称为高正交分离。但是通常我们得到的分离仅仅是部分正交的（参见图 2.14 的中图）。

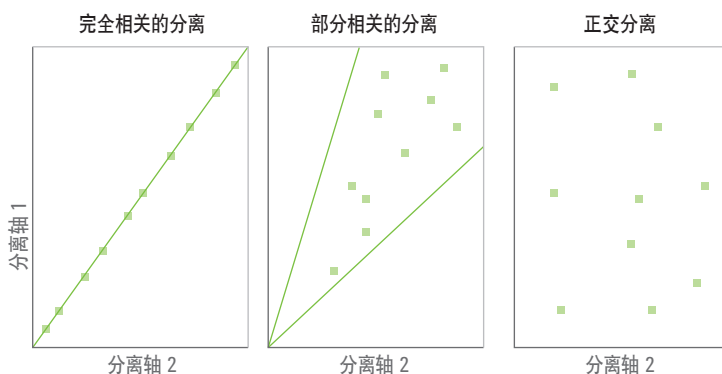
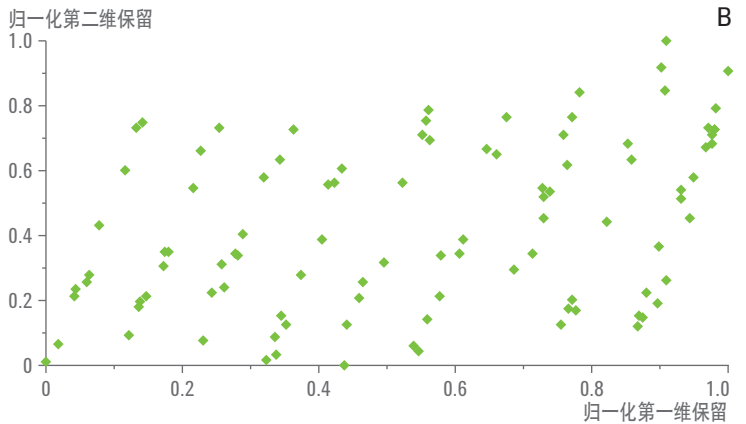
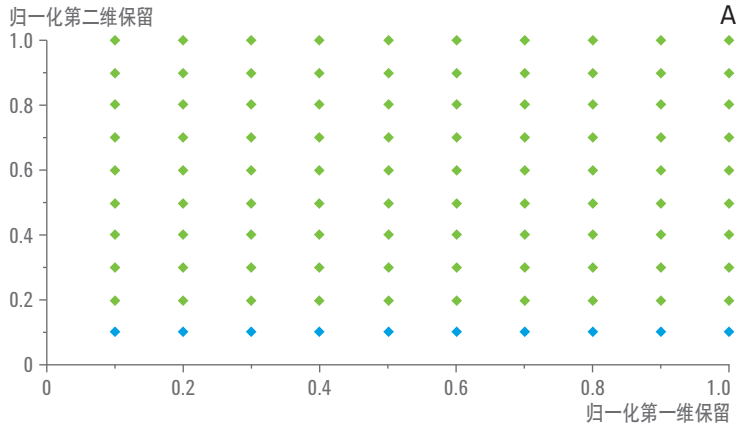
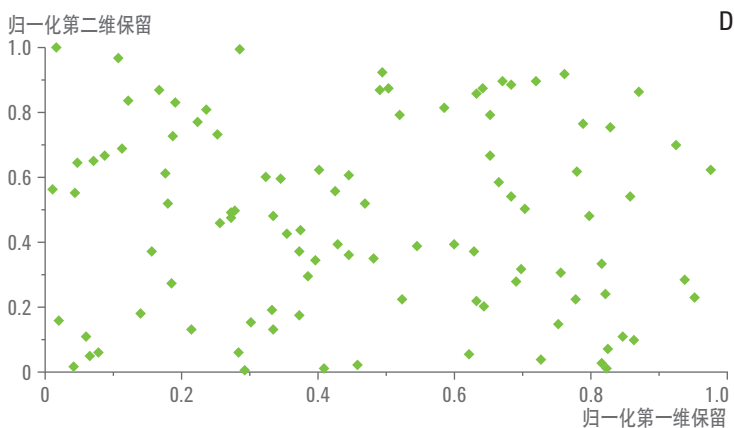
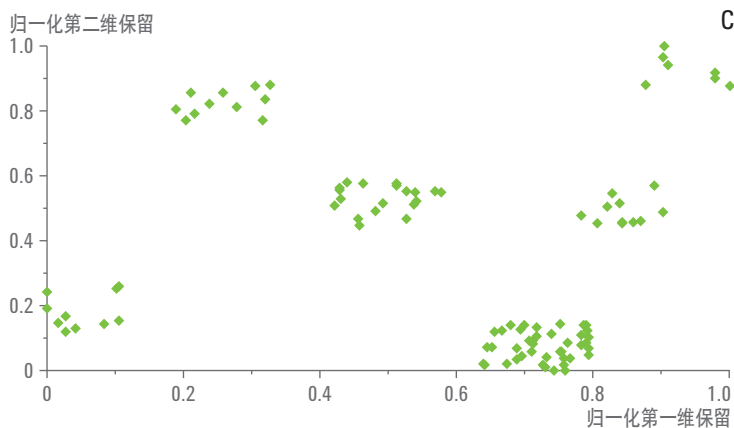


图 2.14 不同相关程度的分离机制对第一维和第二维保留曲线中散点（正交性）的影响

关于上述的正交性可以继续深入从统计学或数学的角度进行解释，最终只有在非常理想的情况下才能得到如 Giddings<sup>28</sup> 所预测的分离效果：  
 a) 两个保留条件之间具有极小的相关性；  
 b) 样品组分尽可能散布于整个分离区域中；  
 以及 c) 数据点群集的数量极少，从而避免出现没有组分占据的稀疏区域和被过于密集组分占据的区域交替出现的现象。在理想的

有序二维色谱图中（参见图 2.15 中的图 A），根据 Giddings<sup>27,28</sup> 设想的二维峰容量概念，所有色谱峰的间距相等，结构中不存在间隙，也就不存在群集。这些条件将使最大数量的单组分色谱峰分布于该分离区域中。可能发生的各种不同的情形如图 2.15 所示。请注意：在所有图中，有 100 种根据不同性质进行保留和分离的组分。





**图 2.15**

**图 A:** 根据 Giddings 所述的理想分布, 表明所有分析物具有相同的分离度, 不存在间隙或群集<sup>28</sup>。

**图 B:** 一种非理想分布的结果, 有时被称作香蕉拼图<sup>29</sup>。该色谱峰布局中存在数据群集和间隙。图 B 与图 A 的比较结果表明, 由于组分在第一维上产生保留的性质的不连续变化而导致聚落的产生, 从而导致平均分离度明显降低。这一现象在聚合物分离中很常见。

**图 C:** 聚类图的数据点沿整个区域的长度和宽度散布, 但存在巨大的间隙。由于浪费了非常大的区域, 因此峰容量大大减小。

**图 D:** 完全正交分离, 所有保留特性点无规则分布于整个区域内。图 B 和 C 中损失的大量峰容量得到恢复, 但我们仍能看到巨大的间隙, 其存在是由于保留特性的无规律性。我们是否应计算此类未使用的区域?

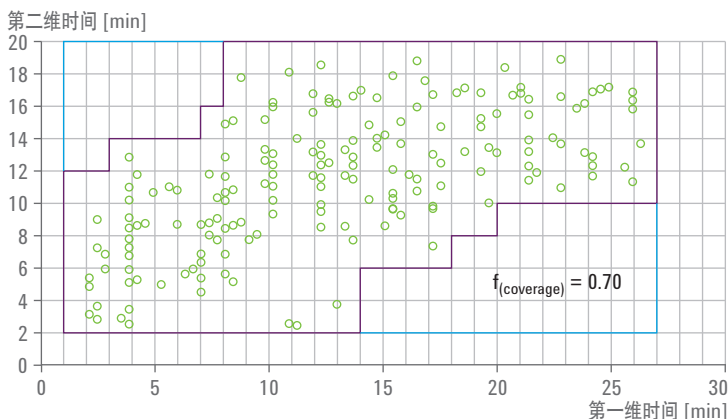


图 2.16 利用 RP×RP 分离玉米种子提取物获得的二维分离区域中的保留坐标（绿色点）。将分离区域的覆盖度分数作为紫色边界中所含的方块数量与蓝色边界中所含的方块数量之比进行计算。摘自参考文献 30

一种可用于计算和定量分析二维分离区域使用情况的方法，也就是所谓的表面覆盖率的方法如图 2.16 所示。该方法由 Stoll<sup>31</sup> 提出，是对 Gilar<sup>32</sup> 之前提出的方法的一种改进。Gilar 概念非常有用也非常重要，其并非简单地依赖正交性概念，并且提出了用色谱峰填充可用区域的观点。与 Gilar 方法不同，Stoll 改进方法不使用方格，而是将整个区域按照各个轴的相对峰容量的比例进行划分。另外，Stoll 改进方法围绕所有已被占据的方格的周围绘制矩形轮廓，因此有许多未被占据的方格点也被纳入其中。这样一来，Stoll 方法就非常类似于如图 2.17 所示的 Davis 的最小  $\alpha$  凸包方法<sup>33</sup>，显然两种方法会给出类似的结果。在 Gilar 方法和 Stoll 改进的 Gilar 方法中，将分离区域划分为一定数量的方块，按照某个既定的半主观但是合理的规则确定方块的数量；然后确定哪些未被占据的方块被已占据的方块围绕，再计算表面覆盖度分数。在如何定义合适的方块大小以及确定是否将某个被占据方块围绕的空方块包含在占据区域中，存在大量的主观性问题。很显然，如何确定方块大小将是确定被占据的方块部分的影响因素之一。是否将被占据方块围绕的未占据方块包含在内的问题也是影响因素之一。无论计算表面覆盖度时遵循什么规则，其目的都是调整固定相和流动相条件，使表面覆盖度分数尽可能地接近于一。在任何情况下，显然图 2.14 中右图的正交分离度更高，与图 2.14 中左图的高度相关的分离相比，获得了更高的覆盖度。

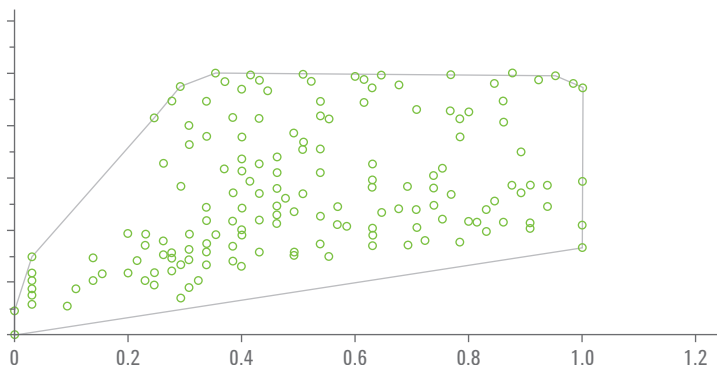


图 2.17 用于测定覆盖度分数指标的 Davis 最小  $\alpha$  凸包方法示意图。摘自参考文献 33

人们采用了大量截然不同的方法用于衡量正交性或表面覆盖分数。对这些方法进行综述和解释不在本文的讨论范围内<sup>31-34</sup>。对于最佳方法，甚至对于最佳方法所应具有的特性，人们尚未达成共识。较好的方式是根据不同样品的特性选择合适的评价方法，例如，包含大量分离聚集区域样品分离结果（例如图 2.15 中图 B 和 C 所示）可能最好采用某种方法进行描述，而那些没有明显聚集区域的样品分离结果（参见图 2.15 中的图 D）可能最好采用另一种方法进行描述。无论如何计算覆盖度指标，我们都希望选择  $^1D$  和  $^2D$  分离条件使得尽可能多的分离区域被样品按照其不同性质的分离占据。

## 2.4.2

### 采样不足或再混合问题

第 2.4 节“LCxLC 中峰容量的基本原理”中所述的限制条件 D 要求在 2D 分离过程中，第一维实现的任何分离均不得损失，否则会违反乘积法则。暂时回到第 1 章“二维液相色谱简介”中的图 1.1 和图 1.2。为实现在线或离线 2D-LC，必须采集 1D 洗脱液并暂时储存，直至采集到所需的样品体积。问题在于，除非采集到的馏分体积仅占色谱峰洗脱液体积的极小一部分，否则将不可避免地发生一定程度的再混合。Murphy、Schure 和 Foley 率先以量化的方式研究了这一问题<sup>35</sup>。他们的基本思路如图 2.18 所示，其中设想采集到的馏分体积相当于大约  $4\sigma$  峰宽。根据馏分采集的时间（称为采样时段）相对于峰顶点的位置来看，这种情况下将很可能发生一定程度的再混合。

Murphy-Schure-Foley 准则认为“在全二维液相色谱中，必须在 1D 色谱峰峰宽  $8\sigma$  的时段内采集至少三到四个馏分进行二维分析，才可最大程度减小定量环中的再混合效应以及总峰容量的损失。”

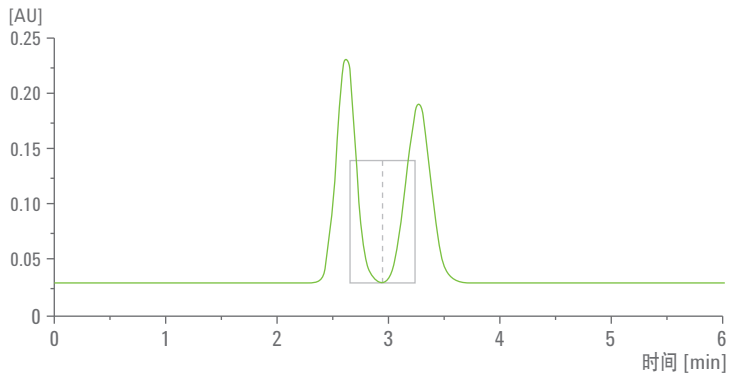


图 2.18 采样不足（再混合）问题的起因<sup>35</sup>。如果第二个样品在 2.9 分钟开始出峰而第一个馏分采集时段在 3 分钟结束，则由 1D 色谱柱实现的这两个色谱峰的所有分离组分都将得到保留。然而，如果放宽采样窗口时间，在 2.6 至 3.2 分钟内采集一个馏分，则 1D 分离实现的分离度将由于色谱峰的再混合而导致损失

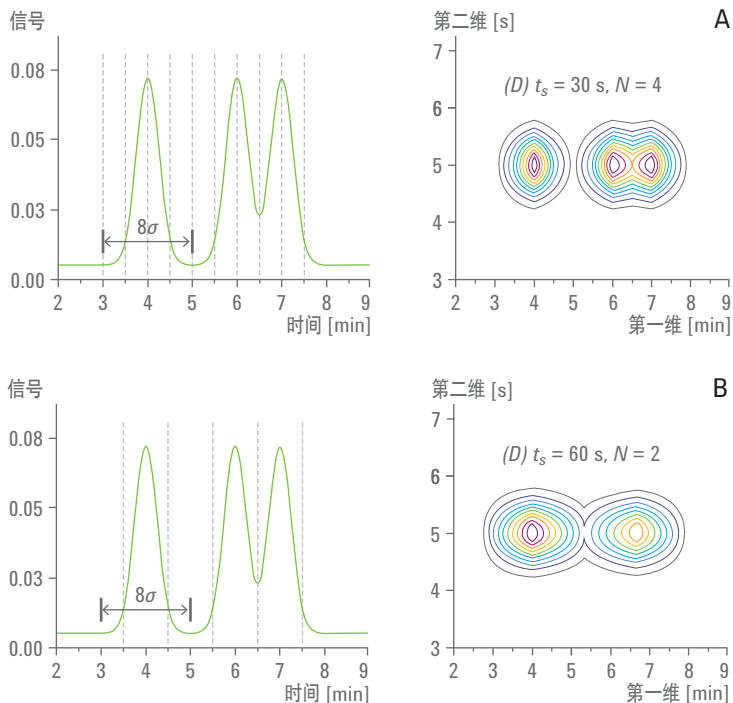
采样不足将导致分离信息和峰容量的损失，图 2.19 的三幅分图很有说服力地显示了这一点。采样速率由每  $8\sigma$  四次降至每  $8\sigma$  一次得到的等高线图表明，最初我们能够看到三个清楚的峰顶点（图 A），然后是两个峰

顶点 (图 B)，最后只能看到一个峰顶点 (图 C)。显然峰容量发生了损失，乘法法则不再适用于估算分离能力。需要知道的是我们损失的是第一维的峰容量，并且该损失程度与采样过程的精度有关。

尽管本文中图 2.19 所示的示例使用 <sup>2</sup>D 等高线图展示峰容量的损失，但是在简单的 <sup>1</sup>D 色谱图中也可以看到由于采样速率不足造成的类似影响 (参见图 2.20)。

请记住，本文一开始将 2D-LC 理解为在普通的 1D-LC 系统中增加基于化学选择性的检测器。

在图 2.20 的图 A 中，以极高的速度 ( $N = 40/8\sigma$ ) 对一组具有随机时间分布和峰高的 100 个色谱峰进行检测，我们能够看到 51 个得到分离的峰顶点，但是随着采样速率的降低，采样时间间隔当中的所有信号将被合并，从而导致很多能在高采样频率下被看到的峰顶点消失不见。甚至在 Murphy 推荐的最小速率  $N = 4$  个样品/ $8\sigma$  (图 2.20 中的图 B) 下，我们也能看到峰顶点数量产生了不容忽视的损失。



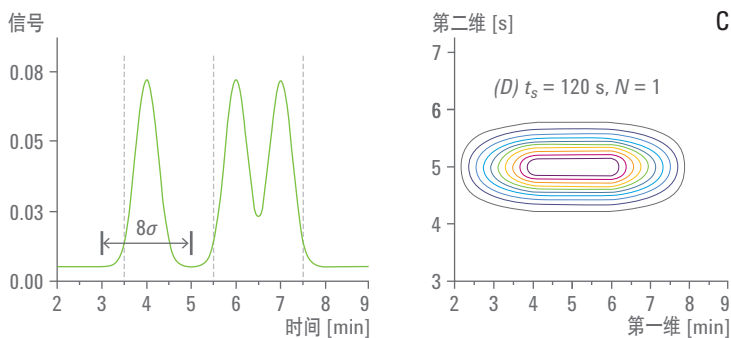


图 2.19 采样速率对 LCxLC 中能观察到的色谱峰数量的影响的图解说明<sup>30</sup>

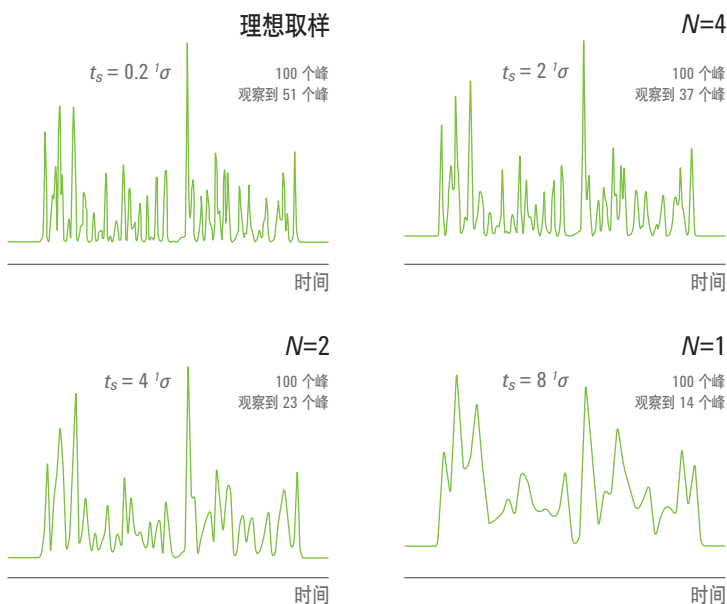


图 2.20 一维色谱中采样速率的影响。图 A 对应于极快（理想）的采样速率， $N = 40$ 。在这种情况下，尽管样品中包含 100 种组分，但只能观察到间距不规则的 51 个峰顶点。图 B 对应于 Murphy-Schure-Foley 推荐的采样速率， $N = 4$ 。我们已经能够看到由于采样不足而导致峰顶点减少。图 C 和 D 分别对应于  $N = 2$  和  $N = 1$  时严重采样不足的情况，峰顶点数量以及分离能力发生了严重损失。感谢 Joe Davis 教授提供该图

尽管 Murphy-Schure-Foley 准则很有用，但它显然只是一种半定量的方式。随后，Davis、Stoll 和 Carr<sup>36</sup> 开发出一个量化的采样不足因子，用于校正  $n_{C,2D}$ 。Davis-Stoll-Carr 方法允许被分离组分的保留时间随机分散

于<sup>2</sup>D 区域内，从而可以合并考虑无规采样时段的影响因素。此外，该方法允许不同组分具有不同的峰高。他们利用*电脑模拟*的随机实验开发出用于计算平均峰展宽因子 ( $\langle\beta\rangle$ ) 的公式 2.15。

$$\langle\beta\rangle = \sqrt{1 + 3.35(t_s / {}^1W)^2}$$

**公式 2.15** 计算平均峰展宽因子

在公式 2.15 中， $t_s$  为采样时间， ${}^1W$  为<sup>1</sup>D 峰宽的  $4\sigma$  平均值。 $\langle\beta\rangle$  将用作乘法法则 (公式 2.14) 的校正因子。因此，将公式 2.2 和公式 2.15 结合，可以得到公式 2.16。

$$n^*_{c,2D} = \frac{{}^1n_c \times {}^2n_c}{\langle\beta\rangle} = \frac{{}^1n_c \times {}^2n_c}{\sqrt{1 + 3.35(t_s \times {}^1n_c / {}^1t_g)^2}}$$

**公式 2.16** 将峰容量的估计值与峰展宽因子相结合

在公式 2.16 中， $n^*_{c,2D}$  为校正后的 2D 峰容量。右边的形式由使用公式 2.2 估算  ${}^1W$  值而得到。以 Murphy-Schure-Foley 速率 (每  $8\sigma$  四个样品) 进行采样，因此  $t_s = 2\sigma$ 。公式 2.15 表明在该采样速率下，校正后的峰容量将比乘法法则得到的理论值小约 36%。显然，分析人员必须多次采集各个峰以最大程度减小采样不足造成的不利的再混合影响。我们来考虑一下 Murphy-Schure-Foley guideline 准则的结果。假设我们进行 30 分钟的<sup>1</sup>D 分离且理论的峰容量为 100。根据公式 2.2，我们对大约 0.3 分钟 (18 秒) 处的平均  ${}^1W (= 4 {}^1\sigma)$  进行估算。这意味着应当每 18/2 或 9 秒钟采集一个样品。尽管在支持理论研究的实验中已获得了每个<sup>2</sup>D 分离仅需 6 秒的速度，但实际的 2D-LC 尚未达到如此之快的速度。因此我们看到 Murphy-Schure-Foley 准则非常严格，即使严格满足这一准则的需求也会损失 36% 的峰容量，而在实际操作中，严格满足这个准则也几乎是不可能的。

作为后文详细讨论的铺垫，我们指出在线 LCxLC (仅配备一根<sup>2</sup>D 色谱柱) 中，<sup>2</sup>D 分析时间必须等于第一维采样时间。这意味着进行梯度洗脱时，梯度时间与系统再平衡时间之和必须等于  $t_s$ 。考虑到这样一个事

实，即梯度洗脱得到的峰容量随梯度时间缩短而迅速减少（参见公式 2.10 和图 2.9），因此 Murphy-Schure-Foley 准则极大限制了在线 LCxLC 的峰容量。Murphy-Schure-Foley 准则未对离线 LCxLC 的第二维设定任何时间限制，因为样品在 <sup>2</sup>D 分析之前处于储存状态。然而，它要求采集许多样品，随后再进行分析。在上述峰容量为 100 的 30 分钟分离中，我们将必须采集和分析 200 个样品。这远远多于任何典型的离线工作中的分析数量。此外，如果我们假定每个 <sup>2</sup>D 分离仅需一分钟即可完成，则整个 2D 分离将需要三小时以上。

### 2.4.3 采样不足问题的后果

基于上述讨论，显然几乎所有的在线和离线 LCxLC 均在第一维严重采样不足的情况下完成。这意味着在实际工作中，公式 2.15 中的第二项才是主要影响因素，在这些条件下，公式 2.16 可近似表示为公式 2.17。

$$n^*_{c,2D} \approx \frac{{}^2n_c \times {}^1t_g}{1.83 \times t_s}$$

公式 2.17 校正后的 <sup>2</sup>D 峰容量的近似计算

在本文中，我们使用公式 2.2 估算 <sup>1</sup>W 的值。这将得到非常重要的结果（参见公式 2.17），即第一维峰容量对校正后的 2D 峰容量 ( $n^*_{c,2D}$ ) 没有影响。该结果清晰地显示于图 2.21 中，其中按照公式 2.16 绘制  $n^*_{c,2D}$  相对于 <sup>1</sup>n<sub>c</sub> 的曲线。在极小的 <sup>1</sup>n<sub>c</sub> 值下，第一维色谱峰很宽，很容易得到充分采集；但是随着 <sup>1</sup>n<sub>c</sub> 的增加，采样不足的问题显著增加，直至达到公式 2.17 适用的限制形式。公式 2.16、公式 2.17 和图 2.21 表明，校正的 2D 峰容量随 <sup>1</sup>n<sub>c</sub> 的增加而快速接近极限，并且校正后的极限峰容量随第一维梯度时间而线性增加。使用实验获得的采样时间、第二维循环时间 (<sup>2</sup>t<sub>c</sub>) 和第二维峰容量 (<sup>2</sup>n<sub>c</sub>) 值，我们可以估算出在 50 分钟的分析时间内可获得 1400 的校正峰容量。该峰容量远远超出经过彻底优化的 1D-LC 所能达到的值。

显然，采样不足问题极其严重地限制了峰容量，其可能发生在 LCxLC 的特定时间下，尤其是在线分离中。在某种程度上，这一限制也意味着没有必要努力实现尽可能高的 <sup>1</sup>D 峰容量，因为 <sup>1</sup>D 峰容量达到某个值以后，将不会提高校正后的 2D 峰容量。

需要重点注意的是，我们在这些计算中尚未考虑覆盖度分数。我们将在第 2.4.4 节“最大程度提高校正后的 2D 峰容量”中予以考虑，但在此之前，我们现在需要考虑另一个非常重要的概念，即存在一个能够使 2D 峰容量最大化的最佳采样时间。

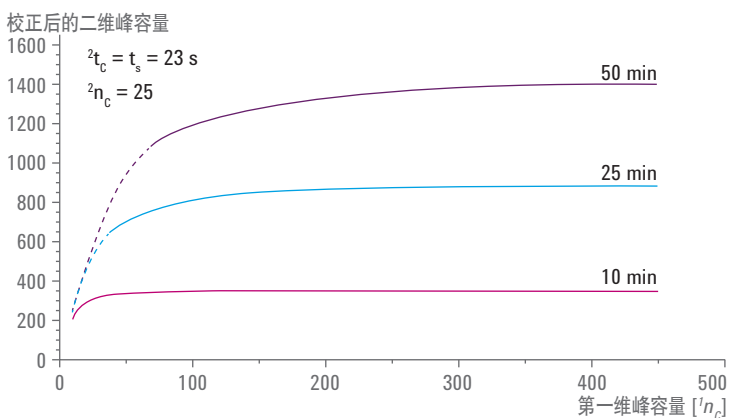


图 2.21 校正后的峰容量相对于第一维峰容量的曲线，使用公式 2.16 并根据图中所示的值和条件进行计算。每条曲线对应于一种 <sup>1</sup>D 梯度时间

该计算的主要现实意义在于，除非 <sup>1</sup>D 梯度时间大于 30 分钟，否则将 <sup>1</sup>D 峰容量提高到大约 100 以上时将不会显著提高校正峰容量。

## 2.4.4 最大程度提高校正后的 <sup>2</sup>D 峰容量

在第 2.3.3 节“梯度洗脱的峰容量”对梯度洗脱峰容量的讨论中，很显然，峰容量作为梯度时间的函数首先几乎呈线性增加，但随后减速并缓慢接近某个常数（参见公式 2.12 和公式 2.13）。<sup>1</sup>D 和 <sup>2</sup>D 峰容量均表现出大致相同的

时间依赖性。我们已经指出在线 LCxLC 中的 <sup>2</sup>D 梯度循环时间 (<sup>2</sup>t<sub>c</sub>) 必须等于 <sup>1</sup>D 采样时间，或者说是 <sup>2</sup>D 梯度时间与 <sup>2</sup>D 仪器及梯度再平衡时间之和，如公式 2.18 所示。

$$t_s = {}^2t_c = {}^2t_g + {}^2t_{re-eq}$$

公式 2.18 采样时间的计算

将这些因素与 LCxLC 校正后的 2D 峰容量随 t<sub>s</sub> 增加而减小的现象综合考虑，我们将看到在线 LCxLC 中作为采样时间的函数的 n\*<sub>c,2D</sub> 存在最佳值，如图 2.22 所示。

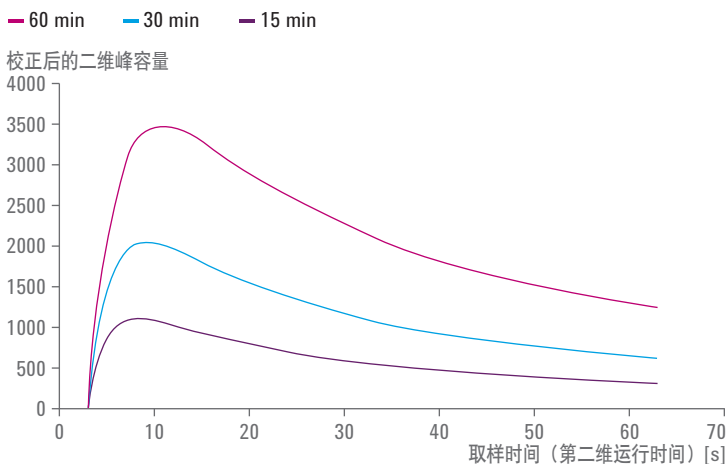


图 2.22 采样时间对在线 LCxLC 校正后的峰容量的影响。<sup>1</sup>D 梯度时间显示于图例中。相应的 <sup>1</sup>D 峰容量分别为 227 (60 分钟)、190 (30 分钟) 和 143 (15 分钟)<sup>1</sup>。<sup>2</sup>D 再平衡时间为 3 秒。<sup>2</sup>D 峰容量的计算方法为：<sup>2</sup>n<sub>c</sub> = 44 · <sup>2</sup>t<sub>g</sub> / (6.3s + <sup>2</sup>t<sub>g</sub>)。

最佳的 <sup>2</sup>D 循环时间在大约 8 至 12 秒的范围内，并随 <sup>1</sup>D 梯度时间的增加而增加

可以看到，最佳采样间隔时间在大约 8 至 12 秒的范围内，并随 <sup>1</sup>D 梯度时间的增加而增加。图 2.22 给出的最重要信息是：在采样不足和 <sup>2</sup>D 梯度时间对 <sup>2</sup>D 峰容量的影响的综合作用下，校正后的 2D 峰容量与采样时

间是密切相关的。在多篇论文中，建议应当刻意降低第一维分离的效果（例如，使用较大颗粒的色谱柱或非最佳流速进行分析），从而故意使<sup>1</sup>D峰展宽，不至于对第二维分离提出苛刻的要求。然而关于这种做法在实际操作中是否能够改善色谱峰的定量分析结果，人们尚未达成一致。

几项理论研究表明，为了获得良好的准确度和精密度，对于第一维中的每一个色谱峰，应当至少保证3次采样。

对于此类高速分离的实际效果，将在关于实施LCxLC所需仪器的第3章“2D-LC的实际操作”中予以讨论。

## 2.4.5 有效峰容量

考虑到2D-LC需要比1D-LC更复杂的仪器且更难以优化，因此2D-LC应当仅用于其分离能力具有明显优势的情况下。您只需要简单地比较1D和2D方法的理想峰容量即可。然而，为公平地比较1D和2D色谱的峰容量，我们提出<sup>31</sup>应考虑采样不足问题和分离区域被样品覆盖的比例，对理想的2D峰容量进行校正。可以通过用校正后的峰容量（ $n^*_{c,2D}$ ，在公式2.16中）乘以覆盖度分数指标（ $f_{cov} \leq 1$ ）得到公式2.19来实现。

$$n'_{c,2D} = \frac{{}^1n_c \times {}^2n_c \times f_{cov}}{\langle \beta \rangle}$$

公式 2.19 有效<sup>2</sup>D峰容量的计算

这一新型峰容量被称作有效2D峰容量，以符号 $n'_{c,2D}$ 表示。许多研究组采用公式2.15估算采样不足因子，但对于覆盖度分数指标似乎没有取得任何新的共识，因为各个研究组都有其自身的指标和局限性<sup>33, 34</sup>。我们将在后文回到这一比较问题上。就当前的目的而言，将使用Stoll<sup>31</sup>对Gilar方法<sup>32</sup>的改进方法，这两种方法基本能够准确表示实际覆盖计算方式和正交度计算方式之间的差异。

## 2.5

### 1D 梯度洗脱与在线 LCxLC 的比较

#### 2.5.1

#### 峰容量和检测到的峰数量

Huang 等人<sup>19</sup>使用公式 2.19 对 1D 和在线 LCxLC 进行了详细对比。他们使用玉米种子的多组分提取物作为样品，测定了以<sup>1</sup>D 和<sup>2</sup>D 梯度时间对 2D 分析中两个维度的峰容量及覆盖度分数之间的函数关系。结果如图 2.23 所示。可以看出，最佳的<sup>2</sup>D 循环时间介于 12 至 21 秒之间。在图 2.24 显示的另外一种结果表现形式：其中我们绘制了四个不同<sup>2</sup>D 循环时间下的有效 2D 峰容量相对于<sup>1</sup>D 或 1D 梯度时间的曲线。该图显示：在 10 分钟的<sup>1</sup>D 分析时间内，2D 的有效峰容量即可达到与 1D 峰容量相当的水平，如果使用进一步优化的采样时间设置，则 2D 在十分钟之内得到的有效峰容量会远远超过 1D 梯度洗脱所得到的峰容量。显然，在线 LCxLC 的分离能力可以在极短的时间内远远超过经过高度优化的 1D 色谱。对于图 2.22 和图 2.23 所示的最佳<sup>2</sup>D 循环时间之间的差异需要做一些解释。首先，色谱条件并不完全一样。其次，也是更重要的，Huang 等人发现  $f_{cov}$  校正因子在较短的<sup>2</sup>D 循环时间下显著减小，从而使有效峰容量曲线中的最佳采样时间向较长的时间一边移动。

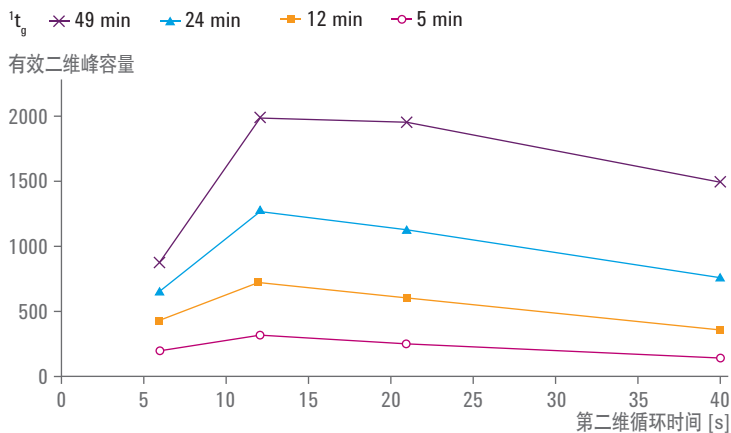


图 2.23 利用玉米种子提取物获得的在线 LCxLC 的有效峰容量是<sup>2</sup>D 循环时间 (= <sup>1</sup>D 采样时间) 和<sup>1</sup>D 梯度时间的函数。摘自参考文献 19

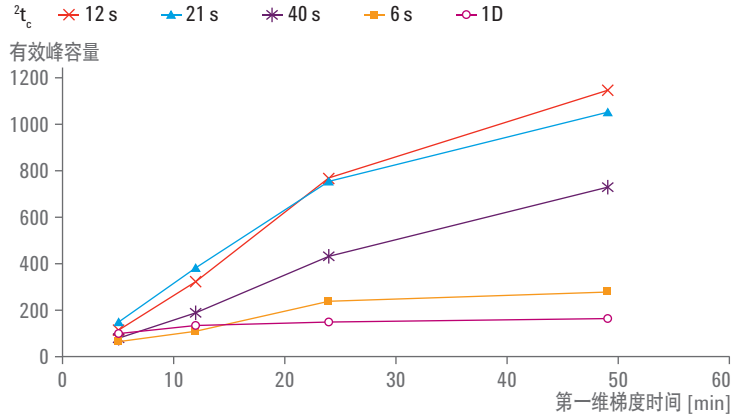


图 2.24 有效 2D 峰容量相对于 LCxLC 中的 <sup>1</sup>D 梯度时间和 1D 方法的梯度洗脱时间的曲线。开圆表示 1D 分离的有效峰容量。封闭符号代表在线 LCxLC。<sup>2</sup>D 循环时间在图例中给出。<sup>2</sup>D 再平衡时间为 3 秒。请注意，除 <sup>2</sup>D 循环时间为 6 秒时采集到的数据以外，在梯度时间大于 5 分钟时，所有 2D 结果均优于 1D 结果。摘自参考文献 19

## 2.5.2 分析物稀释和检测灵敏度

比较 1D 和 2D-LC 分离时应当考虑的另一个因素是 1D 分离中色谱柱出口的检测灵敏度与 2D-LC 分离中 <sup>2</sup>D 色谱柱出口处的检测灵敏度的比较。在大多数色谱分离的典型条件下，由色谱柱洗脱下来的被分析物的浓度小于（即，稀于）进样点处的浓度。这意味着，除非采用某些措施抵消这一稀释过程，否则在 2D-LC 系统中，由 <sup>2</sup>D 色谱柱洗脱下来的被分析物的浓度将小于从 <sup>1</sup>D 色谱柱洗脱下来的浓度，这样显然会影响检测和定量结果，以低含量物质作为目标分析物时尤其如此。有关这一效应的更多量化研究，请参阅 Schure<sup>25</sup> 与 Schoenmakers 及其合作者<sup>26</sup> 的研究。实际上，这一问题可通过精心选择进样至 <sup>2</sup>D 色谱柱的 <sup>1</sup>D 流出物的体积以及 <sup>2</sup>D 流速而得到缓解。通常，较大的进样量有助于最大程度减小检测灵敏度之间的差异，但是必须注意进样量不得过大，否则将影响 <sup>2</sup>D 峰形，我们将在第 3 章“2D-LC 的实际操作”中更详细地讨论这一问题。类似地，较低的 <sup>2</sup>D 流速可最大程度减少被分析物稀释，但这样也会影响 <sup>2</sup>D 分离速度，从而最终导致分离性能的损失。如果需要实现最高的检测灵敏度，则可以考虑使用光程较长的紫外流通池或高灵敏度质谱检测器。

## 2.6 总结

目前为止，应当从本章获得两点最重要的信息：

- 作为 2D-LC 用户，必须根据本文的建议使用公式 2.16 进行校正（即，基于  $\langle\beta\rangle$  的采样不足校正和某种形式的  $f_{cov}$  校正）。否则，您将大大高估 2D-LC 的峰容量，并落入陷阱，在应当采用 1D-LC 梯度分离（其更易于操作和优化）的情况下使用了 2D-LC。细节决定成败
- 即使进行了这些校正，在采用最佳的  $^2D$  循环时间的情况下，2D-LC 的有效峰容量仅需几分钟就可以超过经过全面优化的 1D-LC 所能达到的峰容量

要成功地建立 LCxLC 方法，需要在常规 1D-LC 方法开发时不会遇到的几个因素之间进行权衡、折中考虑。在本章节中，我们将讨论建立 LCxLC 方法的实际环节。其中包括：

- LCxLC 所需组件及其典型特性
- 泵梯度延迟体积对 LCxLC 性能的影响
- 选择第一和第二维色谱条件应考虑的相关因素（色谱柱规格、类型、粒径等）
- 检测方面的考虑因素

### 3.1 设置 LCxLC 系统

随着 2D-LC 分离能力的增加，其复杂性也随之增大，主要体现在仪器设计和方法开发这两方面，建立一个 2D-LC 方法涉及的参数比建立常规 1D-LC 方法所需调整的参数数量的两倍还要多。在本章中，我们将讨论与 2D-LC 系统每个组件相关的重要实际考虑因素，并尝试清晰地阐明 2D-LC 方法设置的最佳方案。

#### 3.1.1 梯度延迟体积对再平衡时间影响的一般性问题

因为 LCxLC 的许多应用都需要在一维或二维分离中使用梯度洗脱条件，所以我们首先来探讨一下这种洗脱模式的一些重要实际问题。由于市场上可以买到的设备或您实验室的现有设备在性能特性方面存在一定的可变因素，所以对您而言，了解这些特性对 LCxLC 方法所用泵系统的影响就非常重要。

色谱泵系统输液的精准能力会影响 LCxLC 方法的性能，主要会影响两个维度中保留时间的重现性。如果要将大量样品的数据进行综合分析，重现性将是个重要指标，因为所有数据中相应的色谱峰必须位于每张色谱图的*相同*位置上。但更有意义的指标是 2D-LC 系统中二维分离所用泵系统的梯度延迟体积。

图 3.1 显示了能够进行梯度洗脱的液相色谱仪的基本组件。要注意的是，在溶剂混合点和色谱柱之间的流路组件会导致在设定的溶剂变化时间和实际作用在色谱柱头的溶剂变化之间存在一段时间（和体积）上的延迟。实际上，该体积比根据混合器到进样器和色谱柱之间的连接管路体积简单计算所得值要大得多，这意味着大部分体积是由混合元件本身造成的。

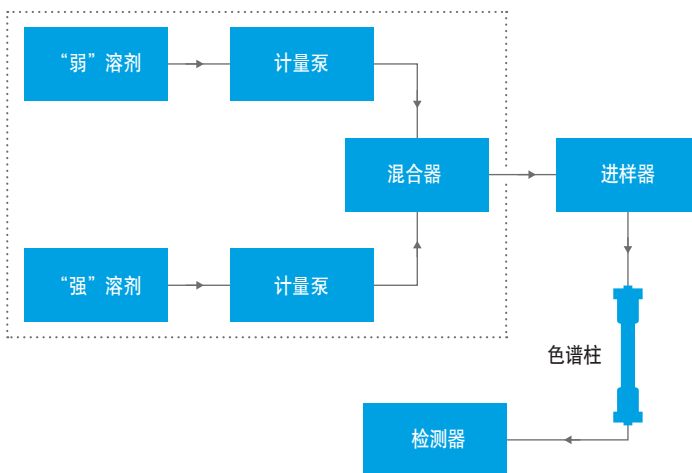


图 3.1 HPLC 系统基本部件的示意图，重点注意洗脱液的流路及混合点前后的组件

在如 RPLC 这种模式中使用两种粘度比较相似的溶剂时（例如，乙腈和水），仅需要较小的体积即可实现溶剂的良好混合。但是，在进行随时间变化流动相比比例的输液模式下，则必须要使用较大的混合体积才能消除由于溶剂输液表现差异导致的瞬时波动。在使用某些老式 HPLC 系统时，甚至可以观察到在往复活塞泵输液冲程末期造成的溶剂输液湍流。图 3.2 比较了两种梯度延迟体积明显不同的两种泵系统在一定时间内能运行的梯度循环数量。红色曲线显示了由仪器控制软件设定的溶剂组

分变化，蓝色虚线为色谱柱入口观察到的真实溶剂组成随时间变化的曲线。梯度起始处蓝色虚线和红线之间的差值即为我们所指的梯度延迟时间 ( $t_D$ )。该延迟时间是梯度延迟体积 ( $V_D$ ，这是特定泵系统的特性参数) 和流速 ( $F$ ) 的函数，见公式 3.1。

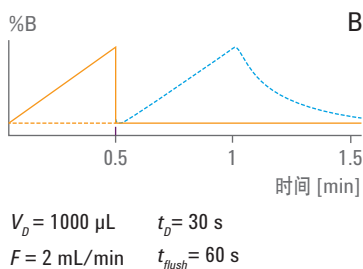
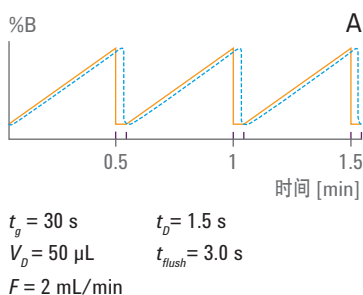
$$t_D = \frac{V_D}{F}$$

**公式 3.1** 延迟时间与梯度延迟体积和流速的关系

实际上，在色谱柱入口出现的溶剂混合延迟不会造成太大的不利影响，因为这种延迟是可以预计的。在短时间内运行多次梯度循环的更大障碍是梯度结束时从泵系统中冲洗强溶剂 (RPLC 中的有机成分) 所需要的时间比  $t_d$  长得多。我们称该时间为冲洗时间 ( $t_{冲洗}$ )，一般将其简单假设为  $2 \times t_D$ 。精确的倍数取决于仪器混合器的结构，这里是导致延迟的主要原因。图 3.2 显示了在 LCxLC 系统第二维常用的条件下，冲洗时间对梯度通量的影响， $V_d$  值代表了低体积 (50  $\mu\text{L}$ ) 和高 (1000  $\mu\text{L}$ ) 体积的梯度混合系统。在高延迟体积系统中，我们发现，使用快速溶剂梯度时的大部分分析时间都用在等待为下一次梯度运行进行准备的系统重新平衡过程。

我们将在第 3.1.4 节“配置第二维的注意事项”中深入讨论这个问题，此处顺便提请注意，此因素基本上限制了在快速在线 LCxLC 系统的第二维中梯度延迟体积大于 100  $\mu\text{L}$  以上的泵的使用。

另一方面，几十微升  $V_D$  的小延迟体积系统，在流速 1 到 3 mL/min 范围内生成的  $t_D$  值为几秒。公式 3.1 清楚地告诉我们，第二维分离中的高流速极为有益，甚至可以强制使用。这意味着，即使采用快速溶剂梯度，大部分分析（周期）时间都花费在梯度洗脱本身，系统的重新平衡只占很少时间，如图 3.2 所示。这一因素在 LCxLC 系统的第一维中也相当重要，但是原因不同。我们还将第 3.1.6 节“配置第一维的注意事项”中更详细地讨论这个问题。



**图 3.2** 两种不同泵系统在 2 分钟内可运行梯度数的性能比较。系统 A 的梯度延迟体积为 50  $\mu\text{L}$ ，系统 B 的延迟体积非常大 — 1000  $\mu\text{L}$ ；流速假设为 2 mL/min

### 3.1.2 通用的 LCxLC 系统示意图

在这里顺便介绍通用的 LCxLC 系统示意图，所有主要组件都将在后面的章节中依次讨论。图 3.3 显示了常规 LCxLC 系统中所包含的各组件。

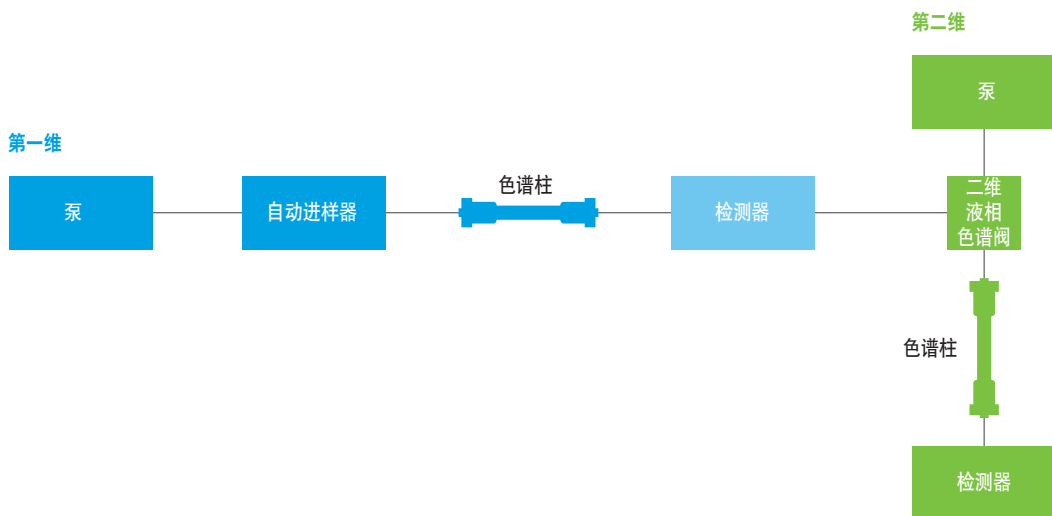


图 3.3 在线 LCxLC 系统主要组件的结构图

### 3.1.3 LCxLC 方法开发过程实例

与所有色谱方法一样，开发 LCxLC 方法的过程主要是考虑在将两个色谱维度联合时必须对哪些因素进行权衡。尽管关于 LCxLC 的方法开发指南远不如 1D-LC 那么详尽，但至少文献<sup>37,38</sup>中可以找到初步指南。表 3.1 给出了建立 LCxLC 方法必须做出的决策顺序——这里以 14 种紫衫烷（核心结构见图 3.4）的分离为例，因为该样品对于分离有明确要求并且其化学性质也被我们所熟知。

步骤	综合考虑	条件
选择 <sup>2</sup> D 分离条件	<sup>2</sup> D 速度与效率	<sup>2</sup> D 色谱柱: 4.6 x 50 mm (1.8 μm) Agilent ZORBAX Plus Phenyl-Hexyl <sup>2</sup> F: 4.0 mL/min ACN 在 0 到 20 s 内从 20% 梯度增加至 33%
选择接口样品环体积和取样时间	检测灵敏度与取样不足的影响	样品环体积: 40 μL 2t 循环: 30 s
选择 <sup>1</sup> D 分离条件	分离速度与 <sup>1</sup> D 峰底宽	<sup>1</sup> D 色谱柱: 2.1 x 150 mm (3.5 μm) Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 <sup>1</sup> F: 0.060 mL/min MeOH 在 0 到 37 min 内从 30% 梯度增加至 100%

表 3.1 LCxLC 方法开发的决策表

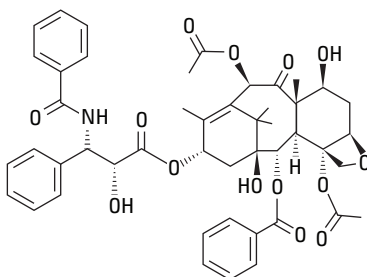


图 3.4 紫衫酚的结构 — 图 3.5 中所示分离的化合物是一类结构类似的物质

在表 3.1 中，我们列出了系统中每个部分的色谱条件，简要讨论了每一步所做的权衡。在随后的章节中，我们将详细解释每个例子中所做的折衷措施以及这些权衡的依据。针对方法开发我们并没有一套所谓正确的条件，也没有建立这些条件的运算方法，将来一定会有某些应用与此处讨论的开发方法完全不同。但是，这里所讨论的应该是方法开发中一般遵循的最优方案了。此混合物的 LCxLC 分离结果见图 3.5。

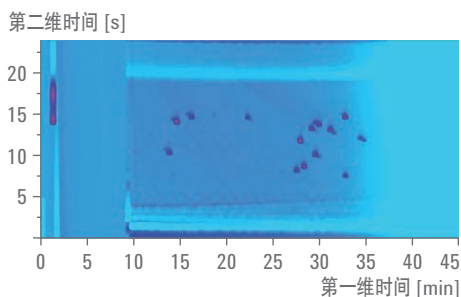


图 3.5 14 种紫衫烷类标准品 (各 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LCxLC 分离, UV 检测 (228 nm), 条件如表 3.1 所述

### 3.1.4 第二维配置的考虑因素

#### 3.1.4.1 色谱柱考虑因素

如我们在第 2.4 节“LCxLC 中峰容量的基本原理”中所讨论, 在 LCxLC 中,  $^2\text{D}$  分离的整体速度和效率对 LCxLC 系统的整体性能有很大影响。基于这一部分的重要性, 我们建议从选择  $^2\text{D}$  色谱柱的尺寸和相应的操作条件开始方法的开发进程。由于  $^2\text{D}$  分离通常必须快速完成 (尤其是对于在线 LCxLC 而言),  $^2\text{D}$  色谱柱一般应该较短 (<5 cm) 和较细 (2.1 mm ID, 由于多方面的技术原因, 我们不建议使用 1 mm 或更细的色谱柱, 请参阅下文)。

表 3.2 和表 3.3 列出了色谱柱所能达到的最大流速 (根据柱长和内径), 色谱柱采用 2.7  $\mu\text{m}$  核-壳填料, 40  $^{\circ}\text{C}$ , 最大操作压力为 500 或 1000 bar。在讨论的本实验中, 我们选择了 500 和 1000 bar 的压力限, 在使用耐压上限为 600 或 1200 bar 的泵进行测试时, 可以有一些允许压力上浮的空间。相应的色谱柱死时间 ( $t_0$ ) 与最大流速一起列在括号中。这两条因素是决定选择使用色谱柱规格的最重要因素 — 在限定了合理的  $t_g/t_0$  的梯度洗脱模式或者给出了预期 k 值范围的等度洗脱中, 色谱柱死时间将最终决定  $^2\text{D}$  分离的整体速度。不同柱长与内径组合的色谱柱在这一条件下的可操作性以不同颜色类别来标示。这里的主要考虑因素有:

- 流速不必很高，以免浪费过量溶剂 — 本文实验中我们选择 3 mL/min 作为合理的上限值
- 流速不可太低，否则梯度冲洗时间 ( $t_{\text{冲洗}}$ ) 相比于梯度本身的时间会过长 (请参阅第 3.1.1 节) — 这里，我们选择 1 mL/min 作为合理的下限值，这相当于对于一台  $V_D$  为 50  $\mu\text{L}$  的系统来说， $t_{\text{冲洗}}$  为 6 秒

在表 3.2 和表 3.3 中，不能实现的条件组合用红色标记，最佳条件组合用绿色标记，临界条件组合用黄色标记。表 3.2 和表 3.3 假定使用的填料粒径为 2.7  $\mu\text{m}$  (对其他类似条件的研究也有一定指导作用)，如果我们将柱内径固定在 2.1 mm，并考察不同柱长与粒径的组合时，柱长分别为 3、5 和 7.5 cm，粒径分别为 1.8、2.7 和 3.5  $\mu\text{m}$ ，结果如表 3.4 和表 3.5 所示。从这些列表中，我们得出了以下的重要结论。

- 即使  $V_D$  值非常低，快速  $^2\text{D}$  分离也不能使用 1.0 mm ID 的色谱柱，因为可操作的流速太低，无法获得满足分析需求的  $t_{\text{冲洗}}$  值。虽然在较高的温度和压力条件下此限制可以得到某种程度的改善，但即便如此，还是不能使用小粒径的 1.0 mm ID 色谱柱
- 很明确，2.1 mm ID 的色谱柱是大多数条件下的最佳选择，大粒径长柱和小粒径短柱都能够实现合理的流速
- 强烈建议使用小粒径 (即，小于 2.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱，但需要用 UHPLC 泵或高于 40  $^{\circ}\text{C}$  的温度，色谱柱短于 3 cm，当然也可以把这些手段进行任意的组合使用

流速 [mL/min]		色谱柱内径 [mm]			
		1.0	2.1	3.0	4.6
L [cm]	3.0	0.63 (1.1)	2.8 (1.1)	5.7 (1.1)	13 (1.1)
	5.0	0.38 (3.2)	1.7 (3.2)	3.4 (3.2)	8.0 (3.2)
	7.5	0.25 (7.1)	1.1 (7.1)	2.3 (7.1)	5.3 (7.1)

**表 3.2** 在最大压力 500 bar，柱温 40 °C，使用 2.7 μm 核-壳填料条件下可实现的最大流速\* (色谱柱死时间以秒计)。

\*其他条件：流动相，20/80 乙腈/水； $\epsilon_o = 0.38$ ， $\epsilon_i = 0.20$ ，请参阅符号列表。无量纲的色谱柱渗透性能是基于色谱柱孔隙率计算的，为 500

流速 [mL/min]		色谱柱内径 [mm]			
		1.0	2.1	3.0	4.6
L [cm]	3.0	1.3 (0.57)	5.5 (0.57)	11 (0.57)	27 (0.57)
	5.0	0.75 (1.6)	3.3 (1.6)	6.8 (1.6)	16 (1.6)
	7.5	0.50 (3.6)	2.2 (3.6)	4.5 (3.6)	11 (3.6)

**表 3.3** 在最大压力 1000 bar，柱温 40 °C，使用 2.7 μm 核-壳填料条件下可实现的最大流速\* (色谱柱死时间以秒计)。

\*其他条件：流动相，20/80 乙腈/水； $\epsilon_o = 0.38$ ， $\epsilon_i = 0.20$ ，请参阅符号列表。无量纲的色谱柱渗透性能是基于色谱柱孔隙率计算的，为 500

流速 [mL/min]		粒径 [μm]		
		1.8	2.7	3.5
L [cm]	3.0	1.2 (2.6)	2.8 (1.1)	4.7 (0.68)
	5.0	0.74 (7.1)	1.7 (3.2)	2.8 (1.9)
	7.5	0.49 (16)	1.1 (7.1)	1.9 (4.2)

**表 3.4** 在最大压力 500 bar，柱温 40 °C，使用 2.1 μm 柱内径条件下可实现的最大流速\* (色谱柱死时间以秒计)。

\*其他条件：流动相，20/80 乙腈/水； $\epsilon_o = 0.38$ ， $\epsilon_i = 0.20$ ，请参阅符号列表。无量纲的色谱柱渗透性能是基于色谱柱孔隙率计算的，为 500

流速 [mL/min]

		粒径 [ $\mu\text{m}$ ]		
		1.8	2.7	3.5
L [cm]	3.0	2.5 (1.3)	5.5 (0.57)	9.3 (0.34)
	5.0	1.5 (3.6)	3.3 (1.6)	5.6 (0.94)
	7.5	1.0 (8.0)	2.2 (3.6)	3.7 (2.1)

表 3.5 在最大压力 1000 bar，柱温 40 °C，使用 2.1  $\mu\text{m}$  柱内径条件下可实现的最大流速\* (色谱柱死时间以秒计)。

\*其他条件：流动相，20/80 乙腈/水； $\epsilon_o = 0.38$ ， $\epsilon_i = 0.20$ ，请参阅符号列表。无量纲的色谱柱渗透性能是基于色谱柱孔隙率计算的，为 500

表 3.2、表 3.3、表 3.4 和表 3.5 中的信息对缩小粒径、柱内径和柱长不同组合的选择范围非常有用。但是这一考虑只是针对分离整体速度的方面，完全忽略了这些色谱柱的柱效（即，塔板数， $N$ ）和/或峰容量 ( $n_c$ )。正如我们在第 2.3.3 节“梯度洗脱的峰容量”中所讨论，估算梯度洗脱条件下的峰容量需要结合样品组分的性质进行考虑，因此一般条件下很难做到。除包括温度 ( $T$ ) 和压力 ( $P$ ) 的操作条件外，我们还可以先从考察塔板数 ( $N$ ) 受上述柱参数的影响程度开始。柱效 ( $N$ ) 与主要操作变量之间的关系包括：粒径 ( $d_p$ )、洗脱液速度 ( $u_o$ ，也就是流速， $F$ )、柱长 ( $L$ )、柱温 ( $T$ )，柱上的压力 ( $P$ )。如果您有兴趣了解下列公式的推导及其意义，请参见参考文献 23。这里我们将列出相关的最后公式供参考，并对在 LCxLC 系统<sup>2</sup>D 分离中这些关系的含义进行讨论。

为了有效地使用这些公式，我们从以下的问题开始：什么样的粒径、柱长和洗脱液流速值能够在柱效 ( $N$ ) 或峰容量 ( $n_c$ ) 方面为我的<sup>2</sup>D 分离提供最佳的性能？为了便于讨论，我们先进行一下合理假设：能够提供最大塔板数 ( $N$ ) 的色谱柱也能提供最大峰容量 ( $n_c$ )；接着再进一步假设，我们会将梯度时间与色谱柱死时间之比 ( $t_g/t_m$ ) 保持在 10。例如，如果我们想要在<sup>2</sup>D 梯度时间 ( $t_g$ ) 为 30 秒的条件下选择最佳的  $d_p$ 、 $L$  和  $u_o$  ( $F$ ) 值，可立刻将色谱柱的死时间 ( $t_m$ ) 确定为 3 秒。确定  $t_m$  之后，在特定操作温度 ( $T$ ) 和压力 ( $P_{max}$ ) 下， $d_p$ 、 $L$  和  $u_o$  ( $F$ ) 的最佳值可以根据公式 3.2、公式 3.3 和公式 3.4 获得，其中  $\phi$  是无单位的色谱柱渗透性（一般约为 500），

$\eta$  为洗脱速度,  $D_m$  是被分析物在洗脱液中的扩散系数,  $B$  和  $C$  是 Van Deemter 拟合系数,  $\lambda$  是间隙 ( $\epsilon_e$ ) 与总柱孔隙 ( $\epsilon_{tot}$ ) 之比。

$$d_p = \left[ \frac{\Phi \eta^{B/C}}{P_{max}} \right]^{1/4} (\lambda t_0)^{1/4} D_m^{1/2}$$

公式 3.2 最佳粒径的计算

$$L = \left[ \frac{P_{max}^{B/C}}{\Phi \eta} \right]^{1/4} (\lambda t_0)^{3/4} D_m^{1/2}$$

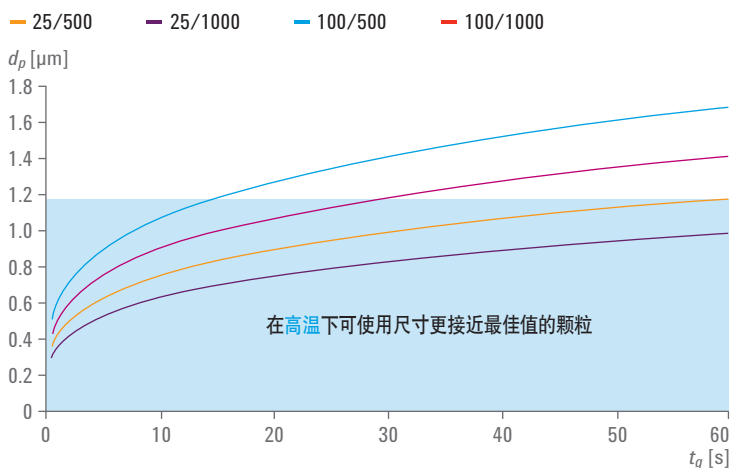
公式 3.3 最佳柱长的计算

$$u_e = \left[ \frac{P_{max}^{B/C}}{\Phi \eta \lambda t_0} \right]^{1/4} D_m^{1/2}$$

公式 3.4 最佳流动相填充速率 (流速) 的计算

本文中的这些关系式在计算  $d_p$ 、 $L$  和  $u_e (F)$  值时非常有用, 可针对相当于目标梯度时间 (以秒计) 的色谱柱死时间提供最大的可能塔板数 ( $N$ ), 我们可以对不同操作温度和压力组合进行上述计算。要知道: 我们不可能用这些公式表征当今所有液相色谱填料技术中的可变参数, 因此, 我们选择了描述填料 (具体细节请见图中的说明) 的常用参数, 并指出填料类型的不同 (例如, 全多孔相比表面多孔填料), 将导致图中这些参数的值发生改变。尽管如此, 我们还是相信, 从这些结果中观察到的趋势是可靠的 (真实的), 可以作为方法开发选择的指南。图 3.6、图 3.7 和图 3.8 显示梯度时间的计算结果范围为 5-60 秒, 温度/压力的各种组合为 25/500、25/1000、100/500 和 100/1000 ( $^{\circ}\text{C}/\text{bar}$ )。图 3.6 表明最佳的

粒径参数选择将随梯度时间的延长以及温度的升高而增大。图下方的透明蓝色方框显示的粒径目前还未商品化，因此这些最佳条件在实验上无法实现。同样，图 3.7 和图 3.8 分别显示了不同柱内径下的最佳柱长和最佳流速的选择 ( $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta P = 500\text{ bar}$ , 虚线, 或  $1000\text{ bar}$ , 实线), 同时仍用蓝色框提示这些条件实验中无法实现 (如  $L$ ), 或不理想 (如  $F$ )。这些图有助于了解最佳参数随梯度时间的变化趋势。



**图 3.6** 在不同的操作条件组合下，最佳粒径的选择受梯度时间的影响程度。蓝色方框显示的条件采用目前商品化的材料还无法在实验中实现。

假设:  $t_g/t_0$  比值固定为 10; 无单位的 Van Deemter 参数为 1.0、5.0 和 0.05;  $D_m$  ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $1.0 \times 10^{-5}\text{ cm}^2/\text{s}$ ;  $\epsilon_e$ , 0.38;  $\epsilon_i$ , 0.30

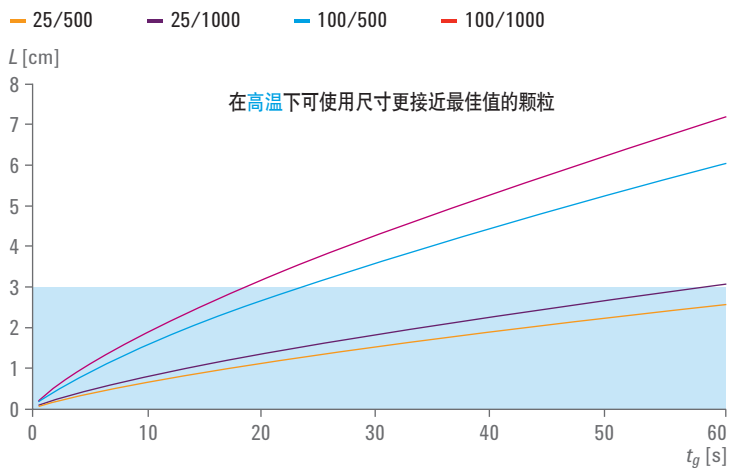


图 3.7 在不同的操作条件组合下，最佳柱长的选择受梯度时间的影响程度。蓝色方框显示的条件采用目前商品化的色谱柱还无法在实验中实现。

假设： $t_g/t_0$  比值固定为 10；无单位的 Van Deemter 参数为 1.0、5.0 和 0.05； $D_m$  (40 °C),  $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ； $\epsilon_e$ , 0.38； $\epsilon_i$ , 0.30

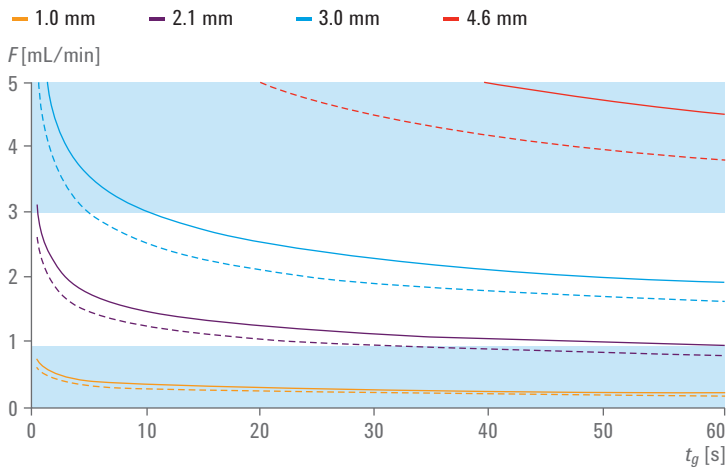


图 3.8 使用不同柱内径时最佳流速的选择受梯度时间的影响程度，假设柱温为 60 °C，最大压力为 500 bar（虚线）或 1000 bar（实线）。蓝色方框显示的条件在实际操作中不适合使用。

假设： $t_g/t_0$  比值固定为 10；无单位的 Van Deemter 参数为 1.0、5.0 和 0.05； $D_m$  (40 °C),  $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ； $\epsilon_e$ , 0.38； $\epsilon_i$ , 0.30

但是，需要从不同的角度来有效地理解温度和压力对这些色谱条件参数最佳组合的影响。表 3.6 和表 3.7 列出了梯度时间为 15 或 30 秒时， $d_p$ 、 $L$  和  $F$  的最佳组合，假设梯度延迟体积为 50  $\mu\text{L}$ ，压力限为 500 或 1000 bar。从这些结果中我们得到了下列一些重要的观察结论：

- 最明显的结论就是：最佳条件超出了目前商品化色谱系统和色谱柱的极限。这意味着无论第二维如何配置，都一定会有某种程度上的性能损失，损失的度主要取决于色谱柱的规格选择
- 将柱温从 25  $^{\circ}\text{C}$  升高到 100  $^{\circ}\text{C}$ ，或将有效工作压力从 500 bar 提高到 1000 bar，可以得到类似的性能提升，在这些条件下实际塔板数可以增加约 50%
- 如果温度和压力都能够增加，与只改变其中一个参数相比，可再使实际塔板数增加 50%
- 在中间压力和温度（例如，选择 60/500）下操作，得到的性能提升相当于温度或压力其中一项进行极端改变时所得的结果

	条件：温度 [ $^{\circ}\text{C}$ ] / 压力 [bar]				
	25/500	25/1000	100/500	100/1000	60/500
$d_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	0.8	0.7	1.2	1.0	1.0
$L$ [cm]	0.9	1.1	2.1	2.5	1.4
色谱柱内径 [mm]	3.0	3.0	2.1	2.1	3.0
$F$ [mL/min]	1.5	1.7	1.7	2.0	2.3
$t_{\text{梯度}}$ [s]	4.0	3.5	3.5	3.0	2.6
$N$	5500	7800	9000	12700	7100

**表 3.6** 梯度时间 15 秒时的最佳参数\*，泵系统梯度延迟体积为 50  $\mu\text{L}$ 。

\* 其他条件：流动相，40/60 乙腈/水； $\epsilon_0 = 0.38$   $\epsilon_i = 0.20$ ；

无单位的色谱柱渗透性（根据所用的填充速度）为 500

	条件: 温度 [°C]/压力 [bar]				
	25/500	25/1000	100/500	100/1000	60/500
$d_p$ [μm]	0.8	0.7	1.2	1.0	1.0
$L$ [cm]	0.9	1.1	2.1	2.5	1.4
色谱柱内径 [mm]	3.0	3.0	2.1	2.1	3.0
$F$ [mL/min]	1.5	1.7	1.7	2.0	2.3
$t_{\text{冲洗}}$ [s]	4.0	3.5	3.5	3.0	2.6
$N$	5500	7800	9000	12700	7100

**表 3.7** 梯度时间 30 秒时的最佳参数\*, 泵系统梯度延迟体积为 50 μL。

\* 其他条件: 流动相, 40/60 乙腈/水;  $\epsilon_o = 0.38$   $\epsilon_i = 0.20$ ;

无单位的色谱柱渗透性 (根据所用的填充速度) 为 500

由于表 3.6 和表 3.7 中所列的任何  $d_p$ 、 $L$  和  $F$  组合在实际操作中都不可能实现, 所以我们在表 3.8 和表 3.9 中提出了针对每种温度和压力组合 ( $^2D$  梯度时间为 15 或 30 秒) 的一套尽可能最佳的各性能指标折衷组合。这些参数组合能够提供以目前已商品化的粒径和柱长条件可获得的最佳性能, 请注意我们在进行这些选择时尽量采用了合理的流速和梯度冲洗时间。这种情况下不同条件 ( $T/P$  组合) 之间的最终性能差异远比表 3.6 和表 3.7 中列出的完全优化条件更具有吸引力。首先, 与 25 °C/500 bar 条件限制下相关的低塔板数主要由 3 cm 的最小柱长所造成, 用 3 cm 色谱柱获得较短色谱柱死时间 (1.5 秒) 的唯一办法是使用大粒径填料。但是, 在需要高洗脱速度实现高速分离的情况下, 由于大粒径填料内外的传质速度慢, 色谱峰严重变宽, 从而使所得塔板数极低。将柱温升高到 100 °C, 可以使塔板数增加 9 倍, 而将操作压力提高到 1000 bar, 柱效可以提升 4 倍。压力升高得到的改善不如完全优化条件下明显, 同样是由于柱长的限制, 色谱柱死时间要达到 1.5 秒, 需要使用 2.7 μm 粒径的填料。以上结果提示, 将提高温度和压力的优点相结合, 可以实现最

显著的性能提升，可以使用 3 cm 柱长的亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱。如果不能实现使用如此高的温度和压力，实际可选择 60  $^{\circ}\text{C}/500$  bar。与 25/1000 的选项相比，提供了具有相对最出色的性能。对表 3.8 和表 3.9 比较显示，梯度时间 30 秒可以获得略高的最佳性能。

	条件: 温度 [ $^{\circ}\text{C}$ ]/压力 [bar]				
	25/500	25/1000	100/500	100/1000	60/500
$d_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	5.0	2.7	2.7	1.8	3.5
$L$ [cm]	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
色谱柱内径 [mm]	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
$F$ [mL/min]	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
压力 [bar]	260	900	340	760	320
$t_{\text{冲流}}$ [s]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
$N$	320	1100	2800	5530	1100
相比最佳条件的性能损失百分比	94	86	69	56	85

表 3.8 梯度时间 15 秒时的最佳折衷参数<sup>\*</sup>，泵系统梯度延迟体积为 50  $\mu\text{L}$ ，最短柱长 3 cm。

<sup>\*</sup> 其他条件: 流动相, 40/60 乙腈/水;  $\epsilon_e = 0.38$   $\epsilon_i = 0.20$ ;

无量纲的色谱柱渗透性能是基于色谱柱孔隙率计算的, 为 500

	条件: 温度 [ $^{\circ}\text{C}$ ]/压力 [bar]				
	25/500	25/1000	100/500	100/1000	60/500
$d_p$ [ $\mu\text{m}$ ]	2.7	1.8	1.8	1.8	3.5
$L$ [cm]	3.0	3.0	3.0	5.0	5.0
色谱柱内径 [mm]	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
$F$ [mL/min]	1.2	1.2	1.2	2.0	2.0
压力 [bar]	450	1000	380	1050	450
$t_{\text{冲流}}$ [s]	5.0	5.0	5.0	3.0	3.0
$N$	1900	3900	7600	10200	2200
相比最佳条件的性能损失百分比	76	65	40	43	78

表 3.9 梯度时间 30 秒时的最佳折衷参数<sup>\*</sup>，泵系统梯度延迟体积为 50  $\mu\text{L}$ ，最短柱长 3 cm。

<sup>\*</sup> 其他条件: 流动相, 40/60 乙腈/水;  $\epsilon_e = 0.38$   $\epsilon_i = 0.20$ ;

无量纲的色谱柱渗透性能是基于色谱柱孔隙率计算的, 为 500

### 3.1.4.2 仪器考虑因素

我们多次强调了 <sup>2</sup>D 溶剂系统中获得小延迟体积的重要性，因为  $V_D$  对 <sup>2</sup>D 分离的效率，以及 LCxLC 系统的整体性能有很大影响。表 3.10 显示了实际分离中，不同类型泵的梯度延迟体积对不同分析时间所得组分的分离程度的影响。对于每种类型的泵（即，传统和现代的），我们都展示了一般条件下第一维和第二维所得的结果。这些值都表明了一点，即，梯度延迟体积超过 500  $\mu\text{L}$  时，要实现极快速梯度分离是绝对不现实的，延迟体积小于 100  $\mu\text{L}$  则非常理想，尤其是在 LCxLC 系统的第二维中。

泵类型	梯度延迟体积 ( $V_D$ , [ $\mu\text{L}$ ])	流速 [mL]	梯度延迟时间 ( $t_d$ )	分析时间	适用于分离的分析组分
老式	1000	0.25	4 min	30 min	74 %
	<b>1000</b>	<b>3.0</b>	<b>20 s</b>	<b>60 s</b>	<b>33 %</b>
现代	100	0.25	24 s	30 min	97 %
	<b>100</b>	<b>3.0</b>	<b>2 s</b>	<b>30 s</b>	<b>88 %</b>

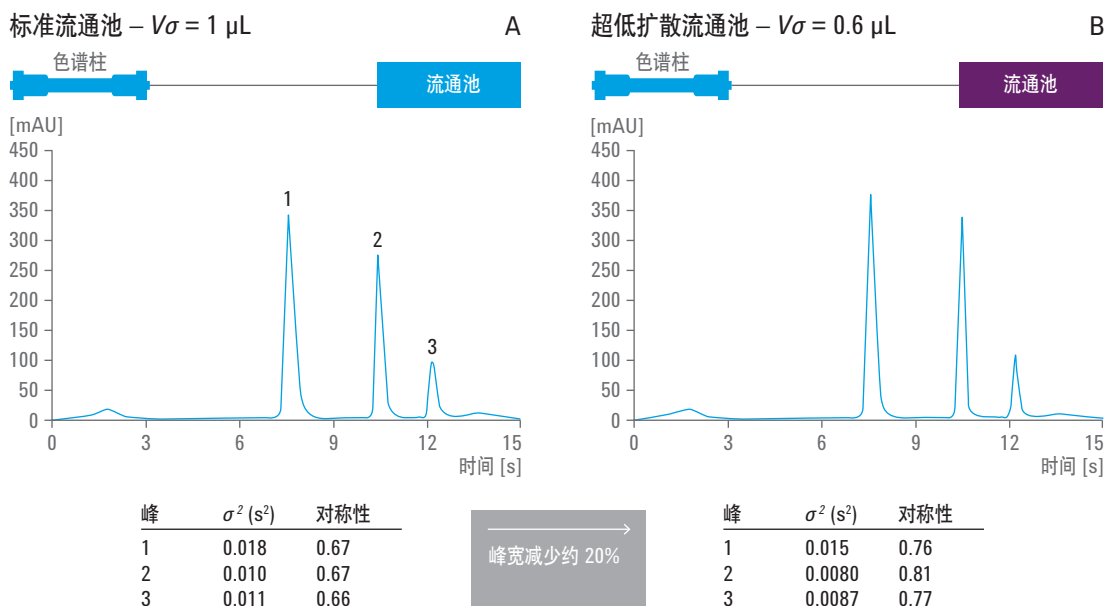
**表 3.10** 在典型的第一维和第二维分离条件下，梯度延迟时间对有效\* 分析时间内所得分离程度的影响。

\* 假设主要影响的是冲洗时间，即  $2t_d$

除了泵混合器系统的性能以外，配置第二维时主要考虑的其他因素包括柱外（即，系统）扩散对 <sup>2</sup>D 峰宽和峰形的影响。假设大多数 <sup>2</sup>D 分离都是以梯度洗脱模式进行，使峰变宽的柱前因素已最小化，柱后使峰变宽的主要来源是连接色谱柱与检测器的管路、检测元件的体积（例如，UV 或 DAD 检测器中的流通池，或 LC-MS 系统中的雾化室），以及检测器响应时间。

快速梯度洗脱条件下获得的 LCxLC 系统第二维典型色谱图（30 mm x 2.1 mm ID 色谱柱，填充 1.8  $\mu\text{m}$  SB C18 颗粒，柱温 60  $^{\circ}\text{C}$ ，流速 2 mL/min）如图 3.9 中图 A 所示。在这些条件下，窄峰谱带的洗脱液体积（由  $4\sigma$  峰宽计算）约为 10  $\mu\text{L}$ ，与峰谱带展宽相关的体积也应当在一个非常小的范围内。这意味着为了避免观察到的峰宽明显增加，与峰展宽相关的柱

后连接管路和检测器流通池的体积也必须很小。表 3.11 显示了在不同的柱长和内径组合中，可将 <sup>2</sup>D 色谱柱连接到检测器的合理连接管路体积。使用 0.003 英寸 (0.075 mm) 内径的管路比较有利，因为体积较小，对峰谱带展宽的贡献也会相应较小。但是，其在第二维中的使用很受限制，因为推动洗脱液经过管路产生的压力与流速的四次方（而不是平方）成正比。至于流通池体积的影响，图 3.9 比较了使用标准 Agilent 1290 Infinity DAD 流通池和  $V_0 = 600$  nL 超低延迟体积流通池所得色谱图中的 <sup>2</sup>D 峰宽和峰形。从这里我们可以看出，减少流通池体积对这些窄峰的峰宽（更窄）和峰形（更对称）都有明显影响，而更大的管路体积对峰宽的影响大于对峰形的影响。



**图 3.9** 在快速梯度洗脱条件下，使用两种不同 DAD 流通池所得 <sup>2</sup>D 色谱图的比较。色谱条件：色谱柱，2.1 x 30 mm，SB C18，1.8 μm；温度 60 °C；梯度洗脱：12 秒内从 2% 增加到 100%；流速 2 mL/min.；柱后连接管路：25 cm x 0.005 英寸内径；进样 40 μL；硝基丙烷 (1)，硝基戊烷 (2) 和邻苯二甲酸二丙酯 (3) 水溶液

长度 [cm]	内径 [英寸] / [mm]		
	0.003/0.075	0.005/0.12	0.007/0.17
5	0.2	0.6	1.2
10	0.5	1.3	2.5
20	0.9	2.5	5.0
30	1.4	3.8	7.4

表 3.11 不同柱长和内径连接管路的体积 [μL]

### 3.1.5 二维分离之间接口配置的考虑因素

在许多方面，我们都把 LCxLC 系统中二维分离之间的接口看做是系统的核心，因为这部分硬件的选择和性能直接影响着第一维和第二维分离的很多方面，以及系统的总体性能。这里所指的接口包括如下部分：

- 具体的阀设计（文献中列出了多种选择）和操作模式；
- 用于收集 <sup>1</sup>D 洗脱液并将其转移到第二维所用的取样环。在下面的子章节中，我们将依次讨论其中的每个环节，回顾这些因素如何影响 LCxLC 系统性能

#### 3.1.5.1 接口阀设计

理论上，接口阀的功能很简单——其目的就是收集 <sup>1</sup>D 洗脱液，并将其转移到 <sup>2</sup>D 柱上并对 <sup>1</sup>D 柱尚未分离的样品组分进行分离。但是在一次 LCxLC 分析中，阀需要在高压条件下进行几十次或几百次快速精准的切换还是很困难的。在 Erin 和 Frei 于 1978 年首次展示在线 LCxLC 分离之后，这种挑战使得接口阀的设计不断改进和发展。图 3.10 中的 A 图显示了早期研究中所用的 2 位/8 通阀的流路图。我们可以看出，其中一个样品环将收集 <sup>1</sup>D 洗脱液（与冲洗入 <sup>2</sup>D 柱的流向相同），而另一个样品环则从与其冲洗相反的流向进行收集。这样，一个样品环采用被称为“正进正出”（FIFO）的方式操作，而另一个样品环则以“正进反出”（FILO）的方式操作。Van der Horst 和 Schoenmakers<sup>39</sup> 曾经证明，这种操作的不对称性可能导致峰形、峰宽和保留时间的差异，具体情况与两个样品环中填充的 <sup>1</sup>D 馏分的特性有关。在他们的论文中，他们认为用 2 位/10 通阀

(如图 3.11 所示)可以消除这些差异。两个样品环都可以从相同的方向进行收集和冲洗。从这个意义上说,这种设计是对称的。但遗憾的是,为使流路完整,他们采用了一个小的桥式连接器使每个样品环的流路增加了小量体积,在其中一个流路中此连接器位于样品环之前,而另一个流路中则位于样品环之后,从这个意义上来说,这种设计又是非对称的。这也会导致<sup>2</sup>D 的保留时间中出现很小但是很致命的可检测到的保留时间偏移,这取决于样品流经了哪个流路。表 3.12 列出了典型<sup>2</sup>D 流速下的保留时间偏移和桥式连接管线的体积。我们可以看出,在 2 mL/min 的实际<sup>2</sup>D 流速下,可以预期的保留时间偏移大约为 40 ms,约为 LCxLC 中典型快速<sup>2</sup>D 色谱图中峰宽的 10%。图 3.12 中的图 A 和 C 显示,在<sup>2</sup>D 分离高度可重现时,此类保留时间的波动很容易观察到。在 LCxLC 阀技术的最新进展中,安捷伦科技公司开发出一种称为双 2 位/4 通的完全对称的阀设计(见图 3.13),可以让两个样品环在同一方向收集/冲洗,无需使用在 2 位/10 通阀设计中会引发问题的桥式连接管线。使用该阀两个样品环的<sup>2</sup>D 分离一致性得到了显著提高,如图 3.13 中图 B 和 D 所示。在复杂 LCxLC 色谱图中进行峰鉴别和归属时,<sup>2</sup>D 保留时间和峰形的一致性非常有用。

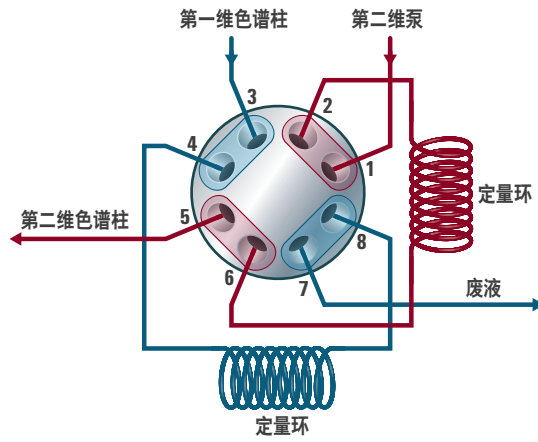
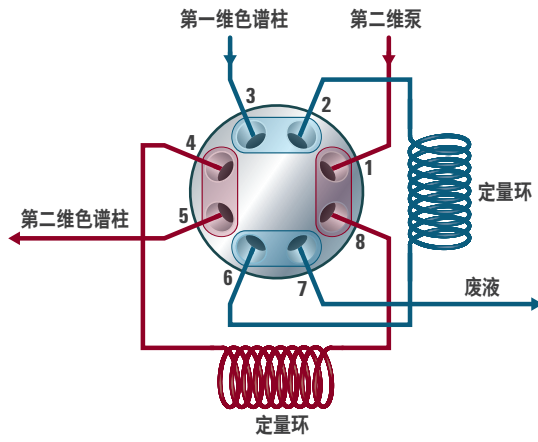


图 3.10 LCxLC 中所用 2 位/8 通阀两个位置的流路

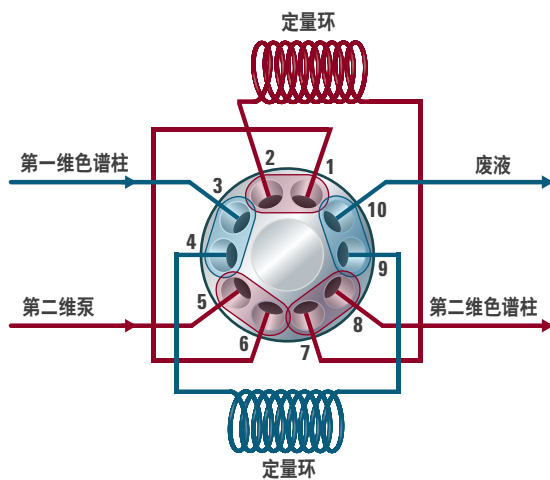


图 3.11 LCxLC 所用 2 位/10 通阀的流路

流速 [mL/min]	桥体积 [ $\mu\text{L}$ ]	保留时间偏移 [ms]
1	1.3	78
2	1.3	39
3	1.3	26

表 3.12 采用图 3.11 所示的阀设计时，不同流路体积引起的预期保留时间偏移

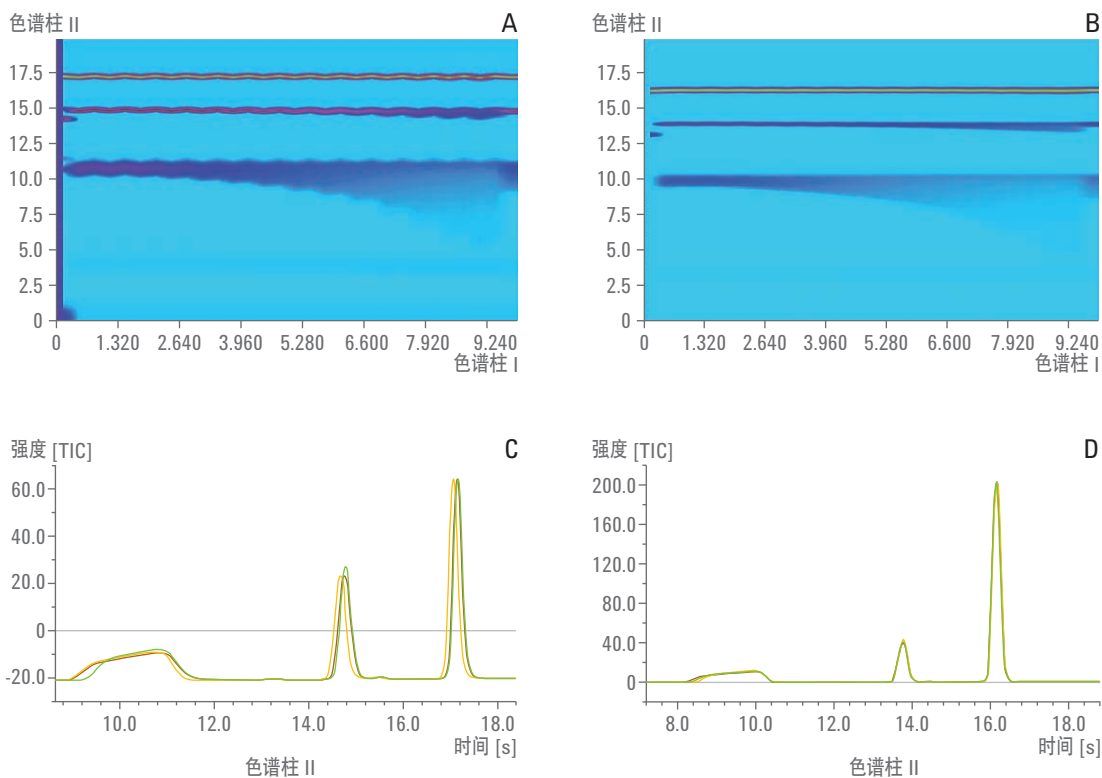


图 3.12 两种不同阀设计的样品环之间<sup>2</sup>D 保留时间一致性对比。采用图 3.11 所示阀设计所得结果见图 A 和 C，采用图 3.13 所示阀设计所得结果见图 B 和 D

图 A 和 C：非对称的 2 位/10 通阀（见图 3.11）

图 B 和 D：对称的双 2 位/4 通阀（见图 3.13）

图 A 和 B 显示了 LCxLC 分离的等高线图，被测试化合物溶解于第一维流动相中持续直接注入阀中，因此化合物在图中呈条状。图 C 和 D 为 3 次连续<sup>2</sup>D 分离所得的叠加色谱图

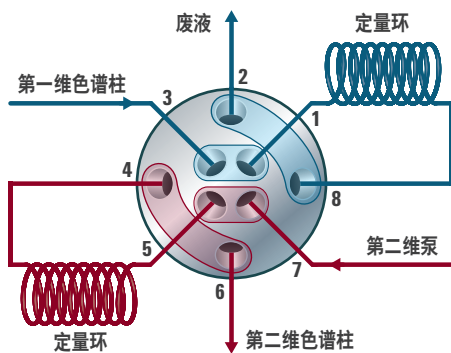


图 3.13 LCxLC 设计的双 2 位/4 通阀对称流路

### 3.1.5.2 样品环体积

用  ${}^1D$  流速 ( ${}^1F$ ) 乘以取样时间  $t_s$  计算所需要的贮存体积，从而可以确定需要连接在图 3.3 所示的接口阀上的定量环的体积。

$${}^2V_{inj} = t_s \times {}^1F$$

公式 3.5 计算需要的贮存体积

但是，与常规的  ${}^1D$  色谱中的情况一样，在管线中流动相液流中心的线速度是四周线速度的两倍，因此  ${}^1D$  洗脱液填充到样品环中时，如果选择使用公式 3.5 计算得到的准确样品环体积进行收集，将导致某种程度的样品损失。为了消除此影响，通常选择的样品环体积要比用公式 3.5 计算的体积高大约 30%，才能得到最精确的结果。当然，这并非绝对规律，实际上在需要纯度性结果时，可以使样品环满溢。最后，应该注意，两个样品环的体积不需要高度准确，但必须精确一致，以保持两个流路尽可能相似。

### 3.1.5.3 ${}^1D$ 流速和 ${}^2D$ 进样体积之间的关系

开发 LCxLC 方法最困难的地方可能在于：在方法的各参数之间存在很多相互影响关系，需要做一些折衷，其中有些非常重要，必须进行折衷考虑。有一个特别重要的相互影响存在于  ${}^1D$  流速 ( ${}^1F$ ) 和  ${}^2D$  进样体积 ( ${}^2V_{inj}$ ) 之间，我们将在第 3.1.5.1 节“接口阀设计”中讨论。这些参数的重要性可以通过表 3.13 更好地了解，表中显示了所需的接口样品环体积与  ${}^1F$  和取样时间 ( $t_s$ ) 的函数关系。不同取样体积用不同颜色标记，由于在第

二维分离中要得到最佳性能必须用非常小体积的色谱柱（参见第 3.1.4 节“第二维配置的考虑因素”），所以选择绿色标示出的采样体积会比较合适。例如，填充全多孔填料的 30 mm x 2.1 mm ID 规格色谱柱，柱体积仅为 60  $\mu\text{L}$  左右。绿色标示的体积 (< 15  $\mu\text{L}$ ) 进样到这样的小体积柱上，如果适当注意  $^2\text{D}$  洗脱液和所注入  $^1\text{D}$  流出液的溶剂强度，将不会造成严重的峰展宽等效应影响。对黄色标示的体积需要非常留意二维条件的组合（例如，在一维分离中选择 IEX，而在另一维选择 RP，以便最大限度地减少溶剂强度的影响，或用弱溶剂对  $^1\text{D}$  流出液进行预稀释），否则  $^2\text{D}$  柱的性能将受到严重影响。标红色的体积几乎完全不可取，一方面是由于溶剂强度问题，另一方面是由于所需的样品环将产生较大的额外延迟体积，降低  $^2\text{D}$  的分离速度。

$^1F$ [mL/min]	取样时间 [s]			
	10	20	30	60
0.025	4.2	8.3	13	25
0.05	8.3	17	25	50
0.1	17	33	50	100
0.2	33	67	100	200
0.5	83	167	250	500
1.0	167	333	500	1000

表 3.13 不同  $^1\text{D}$  流速和取样时间组合条件下相关的进样体积 [ $\mu\text{L}$ ]

从表面上看，表 3.13 中列出的体积似乎没有问题，因为我们可以为接口简单地选择使用小体积的样品环。但如果要对  $^1\text{D}$  分离全面取样，这么小的体积必然伴随着极低的  $^1\text{D}$  流速和/或非常短的取样时间。从表 3.14 中可以看出这一挑战的严重性，表中列出了计算出的  $^1\text{D}$  梯度延迟时间 ( $^1t_D$ )，该时间为  $^1\text{D}$  泵系统梯度延迟体积 ( $^1V_D$ ) 和  $^1\text{D}$  流速 ( $^1F$ ) 的函数。此处可接受的  $^1t_D$  值 (< 1 min) 用绿色标示。很明显，这是一种考虑到  $^2\text{D}$  分析总时间所做的设定，愿意增加  $^1\text{D}$  分离开始时的延迟时间，可能更重要

的牺牲是增加强溶剂从泵系统中冲洗 ( $t_{冲洗}$ ) 结束时的重新平衡时间, 见图 3.2。黄色高亮标示的值代表临界值, 是否采用这个临界值, 很大程度上取决于整个 LCxLC 分析时间。红色的值是不可取的, 除非是在 LCxLC 分析时间大约为几个小时的特殊情况下。

${}^1F$ [mL/min]	第一维梯度延迟时间 [ $\mu$ L]			
	20	100	200	1000
0.025	0.8	4	8	40
0.05	0.4	2	4	20
0.1	0.2	1	2	10
0.2	0.1	0.5	1	5
0.5	0.04	0.2	0.4	2
1.0	0.02	0.1	0.2	1

表 3.14 不同  ${}^1D$  流速和  ${}^1D$  梯度延迟体积组合下的第一维梯度延迟时间 [s]

同样, 表面上我们似乎只需简单地选择  ${}^1V_D$  为 20 到 100  $\mu$ L 的液相色谱系统并使用 0.5 到 1.0 mL/min 的  ${}^1F$  流速进行操作即可, 但通常并非如此简单。首先, 目前 (从 2013 年开始) 所用的大多数 HPLC 泵系统,  ${}^1V_D$  的体积都 > 500  $\mu$ L。只有最新一代的泵系统, 我们才看到  ${}^1V_D$  体积降到了 50 到 200  $\mu$ L 的范围。第二, 使用较大  ${}^1F$  值时存在的主要问题是会导致接口处样品环的取样体积过大, 正如我们在本节上文中所讨论。所以, 在大多数情况下, 选择  ${}^1F$  和  $t_s$  时需要慎重权衡。

### 3.1.5.4

#### 进样到第二维的样品溶剂强度的影响

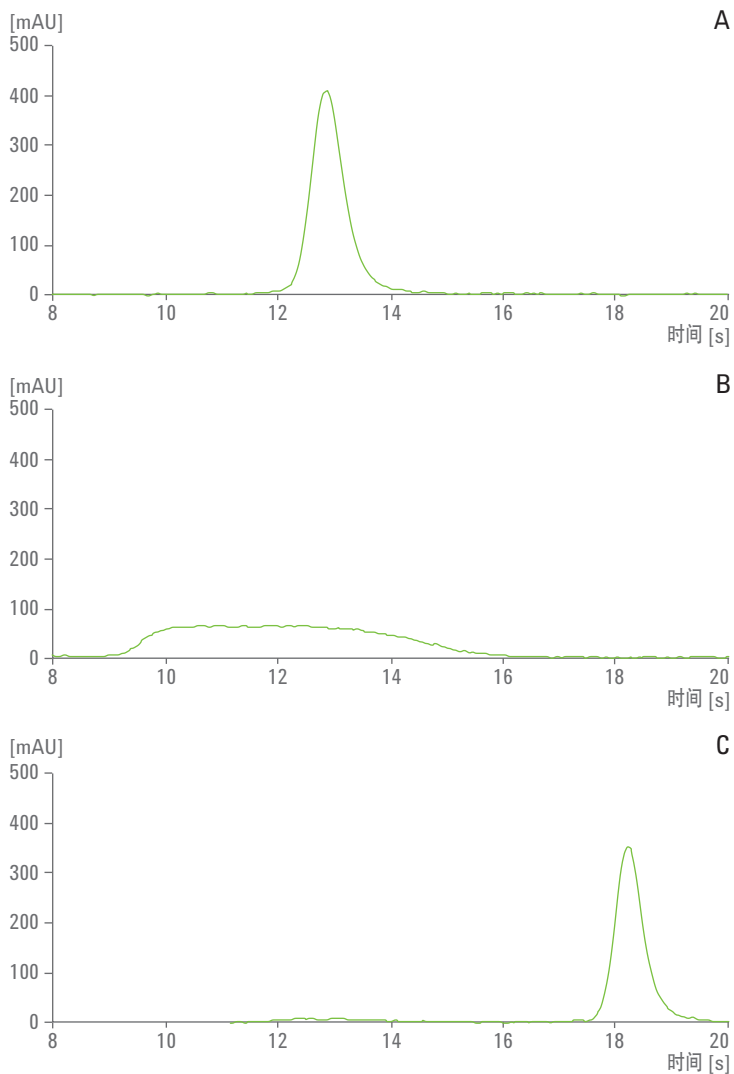
LCxLC 方法开发中最具限制性的难点之一, 是注入到  ${}^2D$  柱中构成样品溶剂的  ${}^1D$  流出液与选择用于  ${}^2D$  柱的洗脱液初始强度或性质之间存在的兼容性问题。举个简单的例子, 假设在 LCxLC 系统的二维分离中使用了两个不同类型的 RP 柱 (如常规 C18 固定相和极性嵌入固定相), 这两根色谱柱都是以梯度洗脱模式操作。那么在 LCxLC 分离中, 为了洗脱  ${}^1D$  柱上强保留的化合物,  ${}^1D$  洗脱液中将含有大量有机溶剂。这通常会使得含有高比例有机相 (例如, 50% 体积) 的相对大体积溶剂 (几十微升) 被注入小  ${}^2D$  柱, 而其梯度洗脱则是采用比注入样品弱得多 (例如, 有机溶剂

体积为 10%) 的溶剂组成开始。从而导致  $^2D$  峰 (至少是较早洗脱的那些峰) 严重变形, 由于被分析物被样品溶剂 (来自于  $^1D$  流出液) 而非  $^2D$  洗脱液进行洗脱, 保留时间会缩短。这种问题引发了多种解决方案的研究, 下面讨论的方案都各有优劣。

- 使用通常比  $^1D$  柱保留性更强 (强得越多, 效果越好) 的  $^2D$  柱 — 此方法可使这个问题最小化, 因为通常  $^1D$  柱所用的洗脱液比较弱, 而  $^2D$  柱所用的洗脱液会较强。总的来说这是个非常好的办法和不错的指导原则<sup>40</sup>
- 使  $^2V_{inj}$  最小化, 从而最大限度减少样品溶剂对  $^2D$  分离的影响 — 该方法通过减少进样的  $^1D$  流出液体积 (而  $^2D$  柱上的体积是不变的) 使问题最小化。在某种情况下 (例如, 进样 1  $\mu\text{L}$  到 30 mm x 2.1 mm ID 色谱柱), 样品溶剂的组成将无关紧要。当检测器灵敏度不成问题时, 该方法非常有效。在 LCxLC 系统中要实现如此小的进样体积需要使用内径非常小的  $^1D$  柱 (例如, 0.5 mm ID, 相对于 2.1 或 4.6 mm ID  $^2D$  柱), 或对  $^1D$  液流进行大比率分流 (如 9:1), 使其小部分进样到  $^2D$  柱上, 或者两种方法都用。无论是在哪种情况下, 检测器的灵敏度都会受影响, 因为当第一维使用非常小的色谱柱时, 可以进样的样品质量会相当小, 如果采用分流, 则样品中的绝大部分还没有到达第二维就已经被损失掉了

- 在接口中使用捕集柱<sup>41,42</sup> — 该方法能够有效地将<sup>1</sup>D柱洗脱出的被分析物从<sup>1</sup>D流出液中富集出来，然后以窄谱带将其进样到<sup>2</sup>D柱。从理论上讲，这种方法完全消除了溶剂强度问题，但其代价是成本的提高，而且可能带来分析效果的损失。捕集效率与捕集柱的体积呈正相关，捕集柱的体积与<sup>2</sup>D色谱柱本身进行比较时是不可忽略的，在<sup>2</sup>D梯度延迟体积中增加一个额外的部分，对于快速的<sup>2</sup>D分离将产生较大影响。捕集柱体积和填料的很小变化都会导致<sup>2</sup>D分离中保留时间和峰形出现变化，这种影响也与所使用的捕集机理有关。虽然有许多研究团队都证明了捕集的概念，但在这里我们尚未确定针对其性能的任何长期而系统的研究用以证明这种方法在几百次的LCxLC实际分析中足够稳定。这是一个在未来应引起更多重视的研究领域

图 3.14 显示了第二维进样溶液的溶剂强度对分析结果的影响。此实例的被分析物是苯妥英（在实验条件下为中性），色谱柱为 2.1 x 30 mm C18 柱。图 A 显示了小体积 (1  $\mu$ L) 样品（含 35% 体积比的 ACN）注入小柱 (2.1 x 30 mm) 时的典型峰形和峰宽，所模拟的 LCxLC 分离条件为 35% ACN: 65 % 稀磷酸水溶液，1.0 mL/min。由于进样体积比柱体积小得多，即使样品溶液和洗脱液的溶剂强度相同，也仍旧可以获得良好的色谱表现。图 B 显示了进样溶液的溶剂强度略高 (45% ACN) 于大体积样品时，柱效受到了严重的影响，这比实际 LCxLC 实验中所常用的实际进样体积 (20  $\mu$ L) 更有代表性。此时，<sup>2</sup>D 分离将被完全破坏。图 C 显示了即使用大进样体积，只要样品中 ACN 的体积百分比至少比<sup>2</sup>D 洗脱液的组成比例低 10%，<sup>2</sup>D 柱还是可以保持卓越的性能。显然，要为其他分离模式（例如，HILIC）开发出类似的指导原则和梯度洗脱条件，还需要做更多的工作。



**图 3.14** 注入  $^2\text{D}$  柱的样品溶剂强度对  $^2\text{D}$  分离质量的影响示例。所有色谱图均使用传统  $^1\text{D}$  仪器和一根  $2.1 \times 30 \text{ mm}$  核-壳 C18 柱获得，流动相为 35/65 ACN/磷酸溶液，流速  $1.0 \text{ mL/min}$

**图 A** 显示，进样  $1 \mu\text{L}$  苯妥英样品（溶于 35/65 ACN/磷酸溶液中）时，得到了出色的峰形

**图 B** 显示了进样  $20 \mu\text{L}$  含 45% ACN 上样溶液对样品分析结果的破坏性影响，这是 LCxLC 实验中很可能遇到的情况

**图 C** 显示了即使进样体积大到  $75 \mu\text{L}$ ，只要样品中所含的有机溶剂比  $^2\text{D}$  洗脱液中的少至少 10%，仍可以得到卓越的峰形

### 3.1.6

#### 第一维配置的考虑因素

第一维仪器组件（如泵、检测器）的某些要求与第二维类似，而其他的则完全不同。主要的区别来源于在线 LCxLC 分离中 <sup>1</sup>D 分离总是比 <sup>2</sup>D 分离有更多的时间。表 3.15 对一般要求以及典型参数组进行了对比，但要知道不同 LCxLC 方法之间存在相当多的区别。

	第一维		第二维	
	一般要求	典型数值	一般要求	典型数值
色谱柱规格	更长，内径与第二维一致或更小	2.1 × 150 mm	更短，内径与第一维一致或更大	2.1 × 30 mm
泵梯度延迟体积	最好小于 200 μL	100 μL	必须小于 200 μL	100 μL
泵流速范围	低流速对于最小化取样体积非常重要	20 至 200 μL/min	提高流速限值可提供更大的操作灵活性	1 至 3 mL/min
泵承压能力	高耐压不是首要考虑因素，因为色谱柱最好能够在其最佳流速下操作	< 600 bar	提高压力限值可提供更大的操作灵活性	< 1200 bar
系统扩散性	最好采用小体积		在体积和时间上均要求尽可能小	
柱温	高温条件下更适合使用有机相含量低的洗脱液，但温度不能太高以免分析物在长时间的分析过程中发生降解	30 至 50 °C	较高的温度可以使用更高的洗脱液速度和流速，从而提高了 <sup>2</sup> D 分离的通量	40 至 100 °C

表 3.15 LCxLC 系统中相关的第一维和第二维典型仪器参数比较

### 3.1.7

#### 检测方面的考虑因素

#### 3.1.7.1

#### 第一维检测器

在系统设置或方法开发过程中，我们强烈建议 <sup>1</sup>D 柱后使用某种类型的检测器，如图 3.3 所示。虽然该检测器的信号最终不用于定性或定量，但我们在实践中发现，这种 <sup>1</sup>D 检测器实时反映了 <sup>1</sup>D 泵系统和色谱柱的性能，这是非常重要的。但一定要注意，确保通过第一个检测器的流路（例如，UV 检测器流通池和连接管路）不会使 <sup>1</sup>D 的峰宽增加太多。正如在第 3.1.6 节“第一维配置的考虑因素”中所讨论，我们建议在第一维中使用窄径柱（例如，1.0 或 2.1 mm 内径柱），以最大限度地减少 <sup>1</sup>D 流出液中注入第二维的样品体积。这种小柱，尤其是如果其分离效果非常好的话，得到的峰体积通常会非常小，甚至小于某些 UV 检测器所用的大体积流通池的体积，这会造成严重的峰展宽，为了避免这种情况的发生，应该使用较小体积的流通池。

### 3.1.7.2

#### 第二维检测器

比起由于极小的峰洗脱体积在检测器中导致的扩散会影响<sup>1</sup>D的峰宽，<sup>2</sup>D的峰展宽可能会更明显，因为它们不仅只有非常小的峰洗脱体积（大约几十微升），它们的峰持续时间也非常小（半峰宽可能低于200 ms），这意味着<sup>2</sup>D检测器必须达到最小40 Hz的采样速率（每秒40个数据点），如果能高于80 Hz最好。这对现代UV吸光度检测器而言并非难题，但对于某些类型的MS检测器可能是个大问题。<sup>2</sup>D色谱峰的小体积意味着也必须慎重考虑检测元件（如，UV检测器中的流通池）的体积，确保其体积与色谱峰洗脱体积相比，也较小。

### 3.1.7.3

#### MS检测的特殊考虑因素

除了要考虑上述检测频率和检测元件体积以外，如果使用MS检测，<sup>2</sup>D流动相的流速也是个重要问题。在第3.1.4节“第二维配置的考虑因素”中，我们探讨了LCxLC系统中<sup>2</sup>D分离的效率与<sup>2</sup>D色谱柱内径、流速，以及泵系统的梯度延迟体积之间的复杂相互关系。为了便于讨论，我们假设，能够完全进入到配置有电喷雾离子源质谱仪(ESI-MS)中的流速上限是0.25 mL/min。从第3.1.4节“第二维配置的考虑因素”中，我们了解到优化LCxLC峰容量的<sup>2</sup>D流速最好超过1 mL/min。如果在第二维中使用2.1 mm内径的色谱柱，需要与MS接口兼容的高流速，液流的一部分必须分流，在MS入口前转入废液，或者选择更窄的<sup>2</sup>D柱，更低的<sup>2</sup>D流速，牺牲某些LCxLC分离性能，或者两种办法都用。

### 3.2 中心切割 2D-LC 方法

虽然本手册的重点是 LCxLC，但中心切割 2D-LC（用 LC-LC 表示）也是本文可提及的非常强大的技术。与 LCxLC 相比，LC-LC 中只有一部分 <sup>1</sup>D 流出液被从特定的 <sup>1</sup>D 峰中捕获，并转移到第二维中进一步分离。因此，LC-LC 是目标性更强的 2D-LC 方法，尤其是需要得到 <sup>1</sup>D 色谱图中少量峰的极高分离度信息时非常有用。图 3.15 显示了可以用于进行 LC-LC 分离的双 2 位/4 通阀配置。

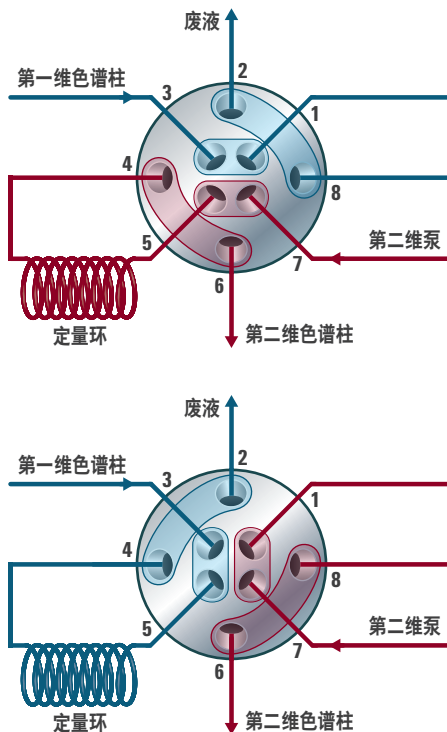


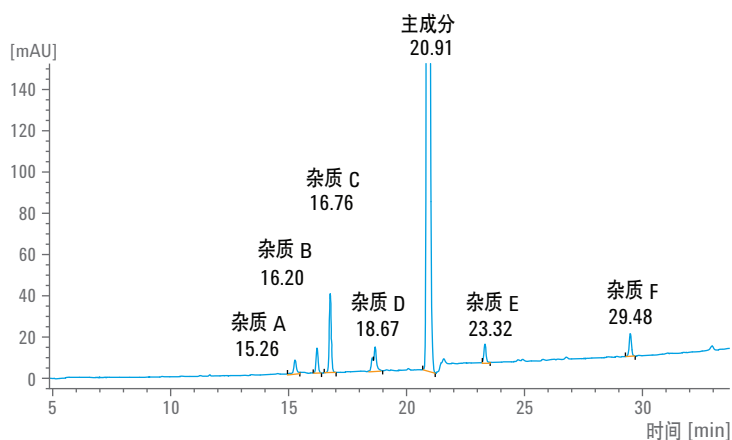
图 3.15 进行 LC-LC 分离所需要的双 2 位/4 通阀配置

在下列 LC-LC 分离的实例中，先采用 <sup>1</sup>D 分离将活性药物成分 (API) 与几个杂质进行分离，见图 3.15。然后，将 20.75 到 21.00 分钟之间共 15 秒 <sup>1</sup>D 馏分捕获到如图 3.15 所示阀上固定的 80  $\mu$ L 定量环中，并立刻进样到第二根色谱柱中进一步分离。

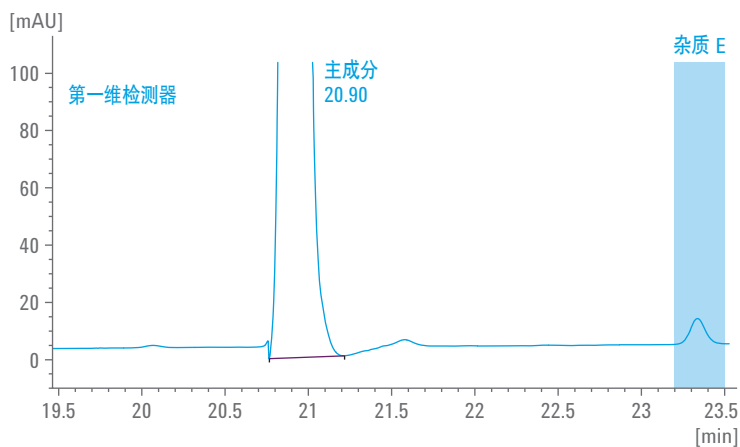
图 3.16 显示，在第一维中与 API 共洗脱的另一个杂质 (G)，很容易地被<sup>2</sup>D 条件分离开了。本实例中所用的色谱条件见表 3.16。

参数	第一维	第二维
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm	Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 3.0 x 50 mm, 1.8 μm
流动相	乙腈, 0.1% 甲酸的水溶液	甲醇, 0.1% 甲酸的水溶液
流速	0.2 mL/min	3.0 mL/min
温度	25 °C	60 °C
转移体积	80 μL	80 μL

**表 3.16** 通过 LC-LC 从药物 API 中分离杂质所用的色谱条件。源自安捷伦应用简报 5991-0834EN



**图 3.16** 在常规 1D 分离中 API 和几个杂质的分离状况。源自安捷伦应用简报 5991-0834EN



开始取样 20.75 ↑  
结束取样 21.00 ↑

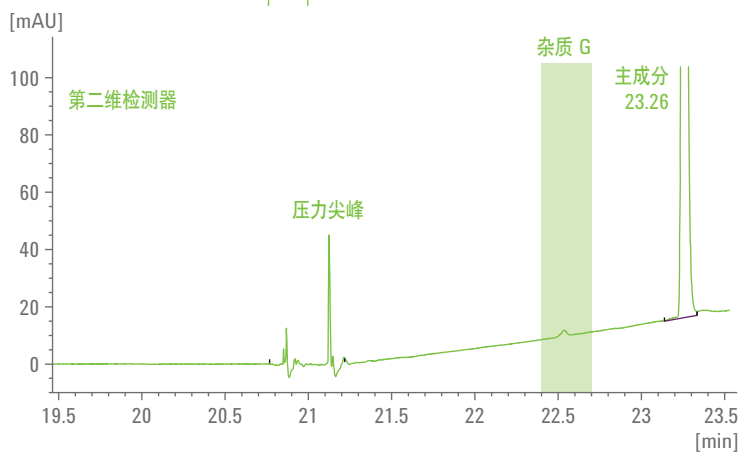


图 3.17 图 A 显示了 <sup>1</sup>D 色谱图中 API 主峰的全视图，取样窗口从 20.75 到 21.00 分钟。图 B 显示了对 <sup>1</sup>D 分离中与 API 共洗脱杂质 (G) 进行的 <sup>2</sup>D 分离。源自安捷伦应用简报 5991-0834EN

除了上面讨论的仪器参数方面的主要考虑外，开发 LCxLC 方法的过程还必须从选择分离模式（即，分离机制）和每个分离维度的特定固定相化学性质开始。在一定程度上，色谱柱规格和其他仪器参数的选择取决于所选择的分离模式和色谱柱，所以要根据下列因素对这些决定进行略微修正。

#### 4.1 分离模式的可能组合

Giddings 很早就 LCxLC 的方法开发中指出<sup>44</sup>：分离模式有大量可能的组合，导致固定相化学性质会有更多的组合可能。但在我们看来，绝大多数可能的模式组合会由于一些原因，在多数情况下远非理想组合，从而很幸运地简化了方法过程中的过多开发。在表 4.1 中，通过将各种重要的操作特性指定分数，我们可以尝试对一些感兴趣的模式组合进行打分。对该比较的深入讨论可以参考综述文章<sup>40</sup>。尽管很难找到具有足够正交性以帮助提升 LCxLC 分离效果的 RPLC 柱组合，除了这一个重要特性之外，特定的 RPXRP 组合在其他方面显然具有非常大的吸引力。基于这个原因，在我们的实验工作和本节及以后的讨论中，我们把这种组合模式作为重点。毫无疑问的是，表 4.1 中一些其他的模式组合在解决特殊分离问题上将非常有效，这可能完全改变评分方案，使得 RPxRP 组合不再具有明显的胜出优势。但我们相信，RPxRP 组合将可能与大量 LCxLC 方法应用的其他组合一样好，或者更好。我们认为，RPxRP 组合有巨大的应用潜力，比如其在二维分离中使用不同 pH 的缓冲液条件，从而能使可离子化分析物的电离状态发生显著的变化。尽管针对这类理论已经有了一些简单的研究<sup>32</sup>，但对此能做的工作还有很多。在今后的十年中，我们预期，随着针对 RPxRP 相对于其他模式组合限制性进行更多的基础研究，我们对其他模式组合的看法将发生改变。

模式	IECxRP [45]	SECxRP [46]	NPxRP [47]	RPxRP [2]	HILICxRP [48]	HILICxHILIC [43]	ACxRP [49]	SECxNP [50]	SECxIEC [7]	LCCCxRP [51]
正交性	++	++	++	+	+	-	++	+	+	++
峰容量	+	+	+	++	+	+	-	-	--	+
峰容量/时间	-	--	+	++	+	+	-	--	--	+
溶剂兼容性	+	+	--	++	+	++	+	+	+	-
适用性	+	+	-	++	+	-	+	-	-	-
分值	4	3	1	9	5	2	2	-2	-3	2

表 4.1 LCxLC 不同模式组合的比较<sup>40</sup>。每种类型实例的参考文献列于该栏标题中。缩写：IEC—离子交换；RP—反相；SEC—尺寸排阻；NP—正相；HILIC—亲水相互作用；AC—亲和色谱；LCCC—临界点色谱

我们在这里说明，RPxPR 组合尤其具有吸引力，很可能是唯一可行的模式组合，我们将讨论图 4.1 所列的溶质组性质。这是一组吡啶的醋酸衍生物，其中某些不带电荷，某些在特定 pH 范围内带正电荷，某些带负电荷，而某些甚至可能是两性化合物。这些化合物称为植物生长激素，参与植物生长和发育的许多环节。一个样品中所含被分析物的化学性质差异巨大排除了离子交换与 RPLC 组合的可能性。同样，所有这些化合物都在相同的分子量范围内，这也排除了尺寸排阻与 RPLC 组合的可能性。这些被分析物中的大多数在 NPLC 常用的低极性溶剂中溶解度很低或几乎不溶解。这些因素让我们认真地考虑了在 LCxLC 分离的两个维度中都使用 RPLC。

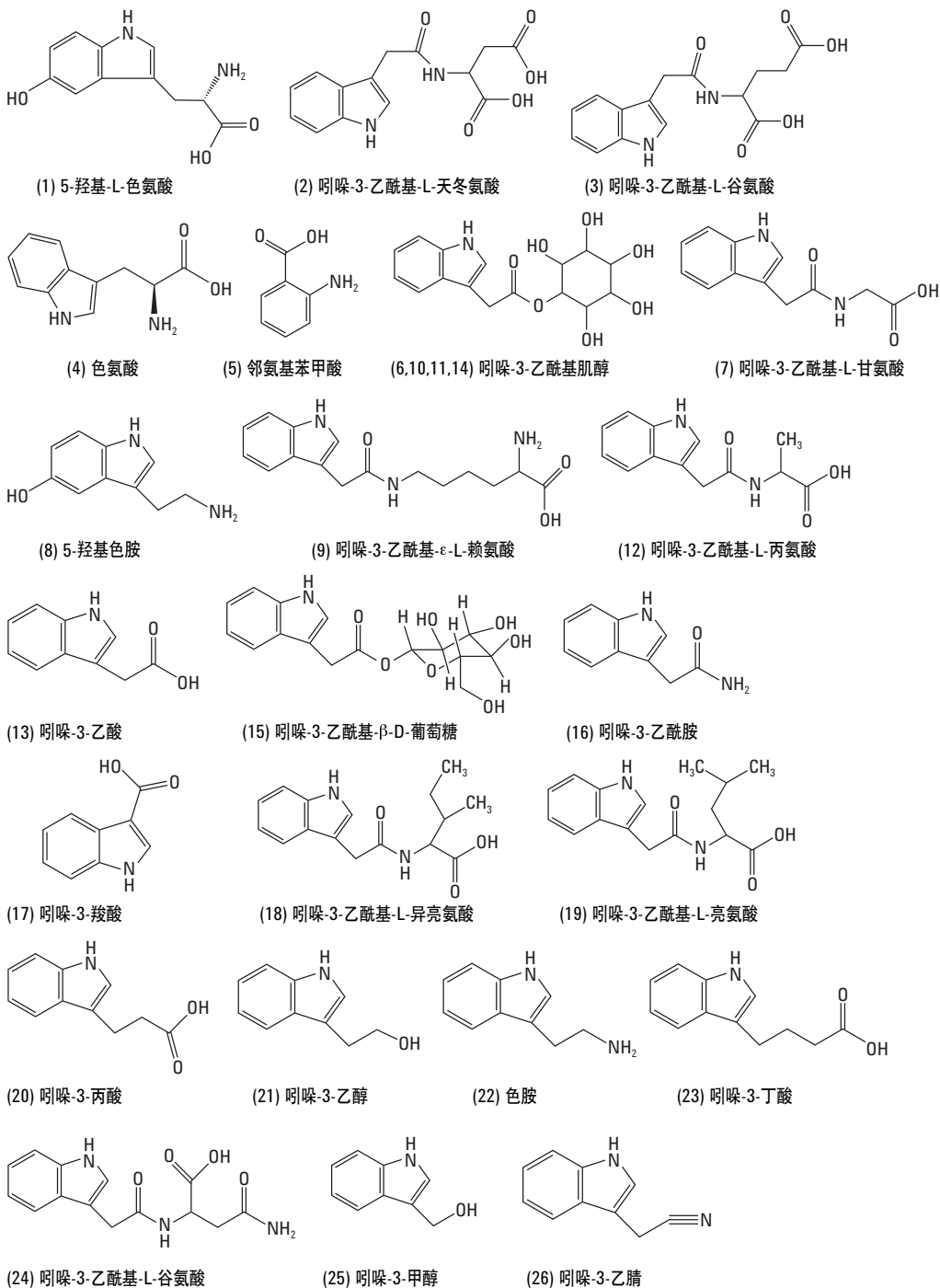


图 4.1 植物中发现的与吲哚-3-醋酸相关的 26 种代谢物结构

## 4.2

### 选择 RPxRP 中的固定相

过去二十多年来，许多团队都曾致力于建立 RPLC 保留机制的数学模型<sup>52,53</sup>。其中最全面的工作是由 Snyder 和 Dolan，及其合作者们完成的研究<sup>54</sup>，他们建立了一个根据色谱选择性把反相柱按不同性质分类的极为有用的系统。此系统基于所谓的选择性的“疏水减法模型” (Hydrophobic Subtraction Model)，后文中将简称为 HSM。在这里，该系统可以帮助我们了解哪些反相柱可以配对成 <sup>1</sup>D 和 <sup>2</sup>D 柱，用于提高获得大比率 2D 分离间距（由  $f_{cov}$  值表示）的可能性。这里，如何开发出色谱柱分类系统的细节并不重要（详见参考文献 55）。重点是不同的 RPLC 固定相和被分析物之间的相互作用可以用如下五个性质进行描述：包括被分析物的疏水性 ( $\eta'$ )、空间位阻 ( $\sigma'$ )、氢键的碱性 ( $\beta'$ )、氢键的酸性 ( $\alpha'$ ) 和离子交换特性 ( $\kappa'$ )。固定相的疏水性 ( $H$ ) 是控制保留性和选择性的主要因素。其他因素的图解如图 4.2 所示。用这 5 个因子足以精确地解释较常见固定相（如，烷基键合硅胶）的选择性，但对于要准确描述苯基、氟代 - 和某些极性嵌入固定相选择性的系统，还需要增加两个额外的因子，即，其与  $\pi$  电子相互作用的能力，及其受偶极相互作用影响的程度。

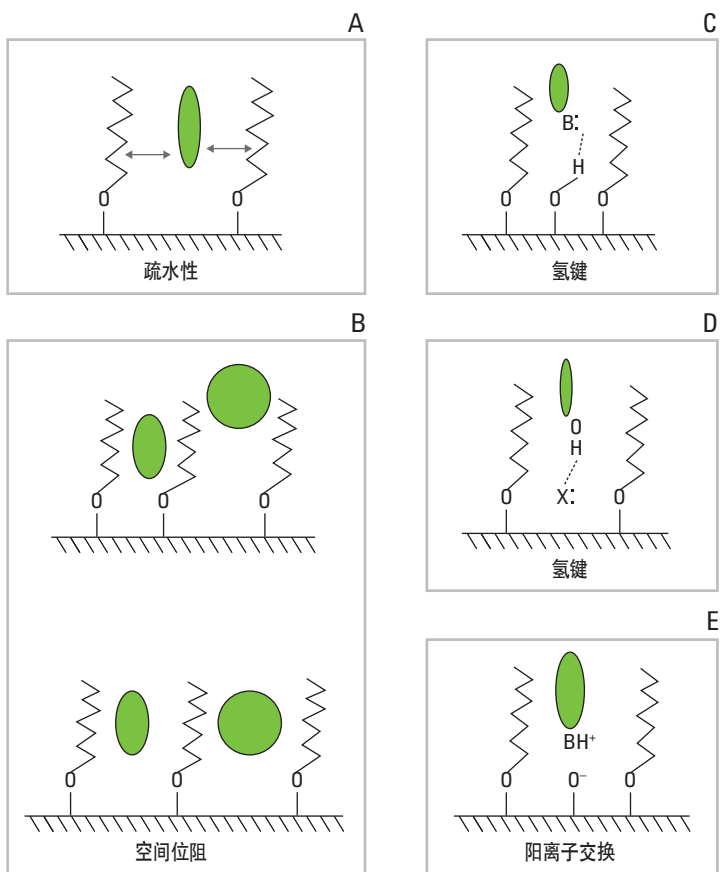


图 4.2 分析物和由 HSM 量化的 RP 固定相之间不同物理化学相互作用的图示。  
摘自参考文献 55

Snyder 等给出了探针溶质相对于乙苯的保留因子 ( $\alpha$ ) 比值，见公式 4.1。

$$\ln(\alpha) = \ln\left(\frac{k_{\text{溶质}}}{k_{\text{乙苯}}}\right) = H\eta' - S^*\sigma' + Aa' + B\beta' + Ck'$$

公式 4.1 保留因子比值

其中  $H$ 、 $S^*$ 、 $A$ 、 $B$  和  $C$  都是与图 4.2 所述被分析物特性相关的固定相特征补偿系数。大写的拉丁字母代表固定相特性，对于极常见的基于 B 型硅胶的普通 C18 色谱柱来讲，除了  $H$  项的值是接近 1 的以外，其他项的值都是接近于 0 的。与典型 C18 填料不同的固定相，其  $H$  因子可能大于或小于 1，取决于其疏水性相比于一般 C18 是更大还是更小。其他因

子可正可负，取决于其相对于原型 C18 固定相是增加还是降低了溶质的保留性（见表 4.2）。举例说明，在特定 pH 条件下，一种固定相获得了大于标准 C18 固定相的负电荷。该固定相将具有正 *C* 因子，因而相对于标准的 C18 固定相，它对阳离子的保留性将增强。Snyder-Dolan 分类系统的最强大之处也许在于其测量了 640 多种不同 RPLC 柱的特性，并可从互联网上免费查阅，请访问 [www.hplccolumns.org](http://www.hplccolumns.org)，从 2014 年 11 月 1 日开放访问<sup>56,57</sup>。

		平均柱参数				
色谱柱性质或类型		H	S*	A	B	C (pH 2.8)
B 型硅胶 C <sub>18</sub> (封端)		1.00	0.01	-0.07	-0.01	0.05
色谱柱性质的改变引起的 B 型硅胶 C18 柱参数变化						
1	C3 至 C18	0.40	0.09	0.27	0.02	0.18
2	不封端到封端	0.02	0.03	-0.38	0.02	-0.22
3	6 至 30 nm 孔隙	-0.20	-0.05	-0.16	0.09	0.14
4	0.9 至 2.9 μmol/m <sup>2</sup>	0.37	0.10	0.19	-0.07	0.16
每种色谱柱类型的柱参数平均值						
5	B 型硅胶 C18	1.00	0.01	-0.07	-0.01	0.05
6	B 型硅胶 C8	0.83	0.00	-0.11	0.02	-0.02
7	A 型硅胶 C18	0.84	-0.06	0.12	0.05	0.78
8	EPG	0.68	0.00	-0.54	-0.17	-0.65
9	极性基团封端	0.94	-0.02	-0.01	0.01	-0.14
10	聚合型烷基硅胶 (A 型)	0.94	0.04	0.42	-0.02	0.69
11	氰丙基	0.41	-0.11	-0.58	-0.01	0.07
12	苯基丙基	0.60	-0.16	-0.23	0.02	0.07
13	键合氧化锆	1.03	-0.01	-0.43	0.05	2.08
14	氟烷基	0.70	-0.03	0.10	0.04	1.03

表 4.2 色谱柱选择性参数随色谱柱性质和柱类型变化的平均值（摘自参考文献 54）

使用 HSM 的另一个重要因素是由于它将固定相性质进行了与流动相中有机相所占比例相独立的初始评估。固定相受流动相性质的影响程度不是那么简单，因为我们知道固定相会吸收一定量的有机改性剂。非常重要的是要注意，*C* 项受流动相 pH 的影响极大。*C* 项的测量可以在 pH 2.8 和 7.0 条件下进行。还应该注意，网站上报告的值都是使用 50:50 乙腈/水混合液（含 60 mM 磷酸盐缓冲液）在这两个 pH 条件下测定的。

#### 4.2.1

使用 HSM 判断 LCxLC 中的固定相适用性

可以对两种反相固定相的总选择性指标、色谱柱选择性因子 ( $F_s$ ) 进行比较，如公式 4.2 所示。

$$F_s = [(H_1 - H_2)^2 + (S^*_{1-} - S_2)^2 + (A_1 - A_2)^2 + (B_1 - B_2)^2 + (C_1 - C_2)^2]^{1/2}$$

公式 4.2 色谱柱选择性因子

为了使用  $F_s$  准确预测一组典型被分析物在选择性上的相似性，我们必须给每项增加一个代表性的权重因子，见公式 4.3。

$$F_s = [(12.5 \cdot (H_1 - H_2))^2 + (100 \cdot (S^*_{1-} - S_2))^2 + (30 \cdot (A_1 - A_2))^2 + (143 \cdot (B_1 - B_2))^2 + (83 \cdot (C_1 - C_2))^2]^{1/2}$$

公式 4.3 包含权重因子的色谱柱选择性因子

但是，这些权重因子必须谨慎使用。例如，如果给定样品中含不带电荷的分析物，那么 *C* 项的权重因子就应设置为零，而  $F_s$  指标都要相应改变。如果两个固定相的  $F_s$  值小于 3，则两个固定相之间的平均选择性差异将小于大约 0.03。反之，如果  $F_s$  大于 50，则可以认为这两种固定相差异非常大，可能对 2D-LC 对有用。必须记住，溶质组的化学性质和固定相的特性都将决定二维分析中组分覆盖率有多高。因此，虽然某固定相可能对某一混合物相当适合，但针对另一种混合物则可能完全不能提供高覆盖率。上述提及的网站<sup>56,57</sup>均提供了根据与特定目标色谱柱的相似或不同，在整个色谱柱数据库中进行筛选的能力。

## 4.2.2

使不同固定相之间的差异图像化的固定相选择性三角形

目前已经有基于大量固定相品种的可视化 HSM 数据表：将  $S^*$ 、 $A$ 、 $B$  和  $C$  参数对  $H$  进行归一化处理，从而在不损失任何信息的情况下将原有的五个属性减少为四个。因此，原则上我们可以将所有信息显示为一组 4 个 3 参数（三角）图形（ $S-C-A$ 、 $S-C-B$ 、 $S-A-B$  和  $C-A-B$ ）。这些图形如图 4.3 所示。原来固定相的  $A$  相通常不是很重要，因为只有相对很少的被分析物（例如，酰胺类）是具有很强形成氢键倾向的碱性结构。所以，在图 4.4 中，我们展示了一个优化过的  $S-C-B$  三角形，其中的数据分布更靠近中心，并且在图中表示出了三种选定的固定相种类。这几种选定的固定相将根据其在三角坐标中的关系，计算出其相对于 Agilent Zorbax SB C18 色谱柱的  $F_s$  值。使用 Snyder-Dolan 探针化合物在这些色谱柱上进行测试，结果色谱图清晰的显示了这些固定相之间的相似性和差异性（见图 4.5）。

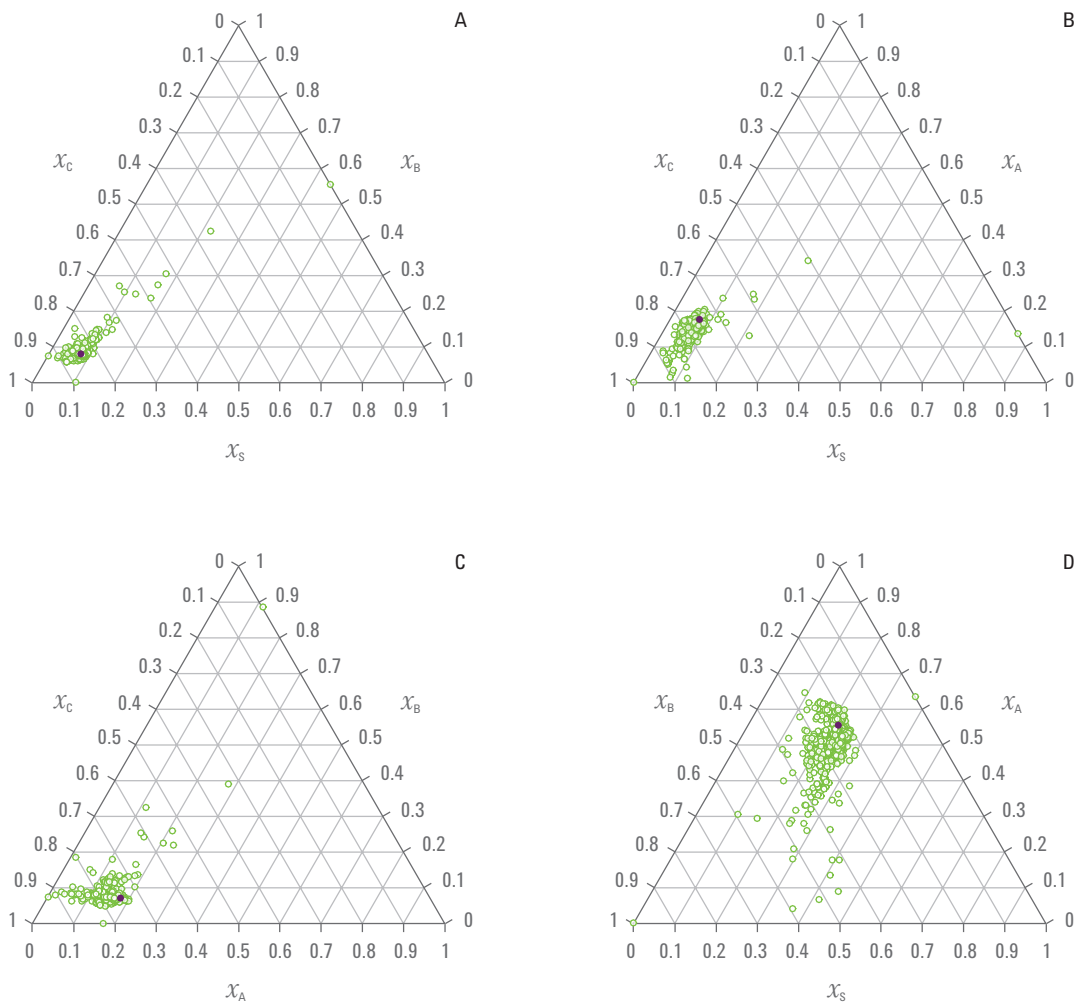


图 4.3 366 种反相柱的选择性分类 — a)  $S-B-C$ ; b)  $S-A-C$ ; c)  $A-B-C$ ; d)  $S-A-B$  三角形。摘自参考文献 58。这些曲线中的每一点都代表着一种固定相，其中，在三角形选择性空间中的特定点位置由三个因子对特定固定相选择性的相对贡献决定（例如， $S$ 、 $B$ 、 $C$  — 见文中对这三个因子的解释）。紫色点表示一般  $C18$  类固定相的位置

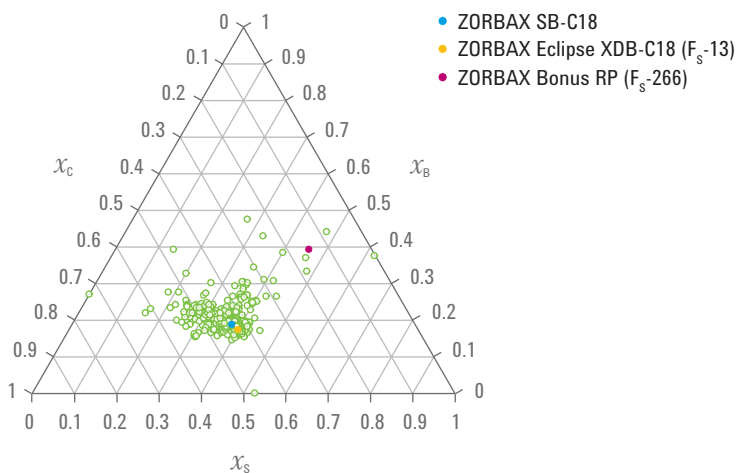


图 4.4 使用 *S-B-C* 三角形，通过参考文献 58 中所述的第二种方法计算所得权重因子获得的 648 种反相柱的选择性分类，可在有效选择性空间内进行一定的扩展调整，实现更好的可视性。重点标出了三个特定的固定相的坐标，以及其他两个固定相与 Agilent ZORBAX SB-C18 相比计算的  $F_s$  值

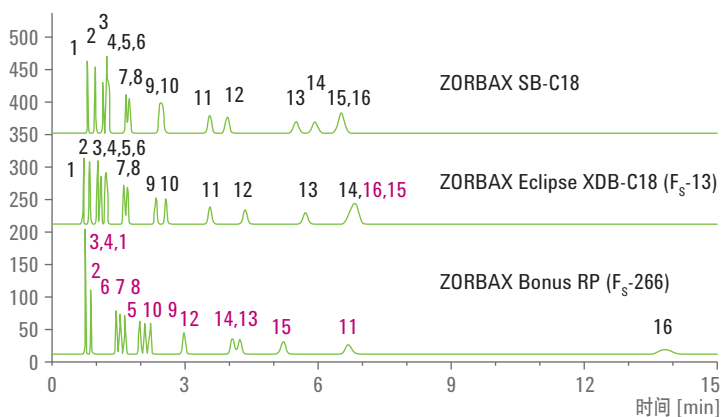


图 4.5 采用三种不同的色谱柱（其中两种非常相似）通过分离用于 Snyder-Dolan HSM 测试 16 种探针化合物并进行比较。

化合物：1) N,N-二甲基乙酰胺，2) N,N-二乙基乙酰胺，3) 去甲替林，4) 阿米替林，5) 对硝基酚，6) 苯妥英，7) 乙酰苯，8) 氰苯，9) 5-苯基戊醇，10) 苯甲醚，11) n-丁基苯甲酸，12) 甲苯，13) 顺式查尔酮，14) 乙苯，15) 反式查尔酮，16) 甲灭酸。

色谱条件：50/50 ACN/60 mM 磷酸盐缓冲液，pH 2.8；35 °C

### 4.2.3

#### 使用不同分离模式的典型性应用

表 4.3 列出了 2D-LC 针对不同类型样品的应用，以及分离模式和所用的固定相。这并不是最全面的信息，但它概括了已成功用于 LCxLC 的各种分离模式和固定相。

应用	模式/固定相		
	第一维	第二维	参考文献
小分子药物	RP/C18 (低 pH)	RP/C18 (pH 8.6)	59
表面活性剂	HILIC/Zic-HILIC	RP/C8-Aqua	48
中药	RP/CN	RP/C18 (低 pH)	60
脂类	银离子	RP/C18	49
类胡萝卜素	NP/未涂渍硅胶	RP/C18	61
多肽	RP/C18 (pH 1.8)	RP/C18 (pH 10)	62
多肽	IEX/磷酸盐改性的氧化锆	RP/C18 (低 pH)	45
聚甲基丙烯酸甲酯	RP/C18	SEC/C18 (临界点色谱)	63

表 4.3 代表性的 LCxLC 最近应用以及所用的分离模式

### 4.3

#### 通过利用分离空间或从动梯度优化性能

在第 2.4 节“LCxLC 中峰容量的基本原理”中，我们指出了尽可能多的利用 2D 分离空间在最大化乘积法则（描述 LCxLC 分离的峰容量增加）效果方面的巨大潜力。从图 4.7<sup>60</sup> 中的色谱图上可以看出，尽管在 LCxLC 系统的二维分析中分别使用了具有高度选择性差异的固定相，2D 分离空间还有相当一部分没有被峰占用（这里用两个标记 A 和 B 的三角形表示）。在此工作中，作者在 LCxLC 系统的第二维采用了称为全梯度的方法，获得了中药样品分离的色谱图。不同 LCxLC 洗脱模式的比较见图 4.6。用于在空间上扩展沿对角线分布的色谱峰以利用更多 2D 分离空间的所谓从动梯度模式（图 4.6 中图 D）最初由 Bedani 等<sup>64</sup> 首次报导，Li 和 Schmitz 对其做了进一步完善。图 4.8 清楚地显示，使用设计得当的从动梯度可以非常有效地将色谱峰扩展到之前无峰的 A 区域。进一步推测，通过控制梯度还可以将峰进一步扩展到 B 区域。

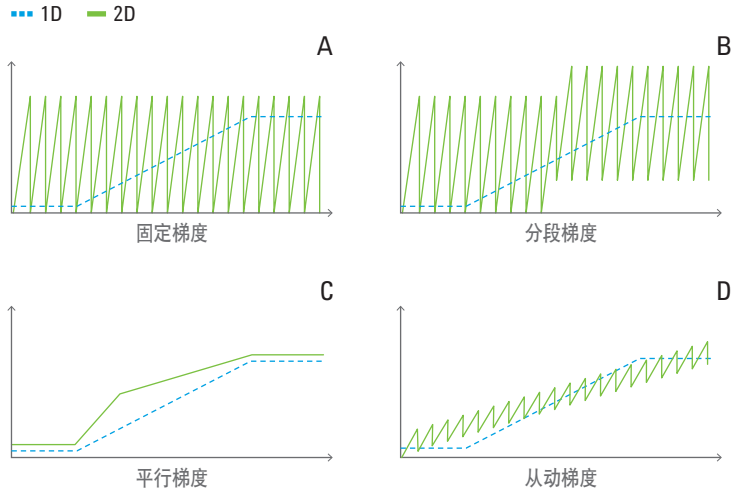


图 4.6 在 LCxLC 分离的第一维和第二维中使用的不同类型梯度曲线。摘自参考文献 60

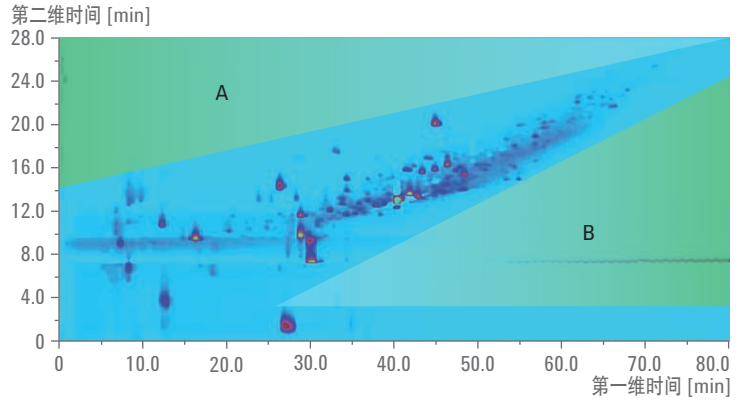


图 4.7 第二维中使用全梯度，对中药 (TCM) 提取物的 LCxLC 分离。  
A 和 B 标记的大部分区域中都没有色谱峰

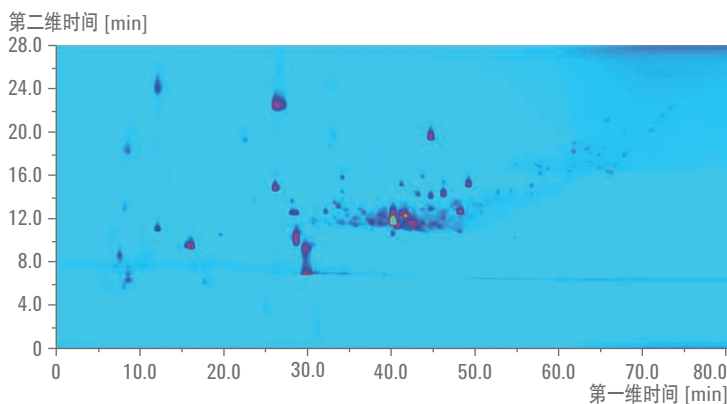


图 4.8 与图 4.7 中相同的 TCM 提取物的 LCxLC 分离，但在第二维中使用的是从动梯度。现在图 4.7 中的 A 区域已有很多谱峰。虽然 B 区域还没有被完全占据，但可以推测，进一步调节从动梯度曲线也可以实现色谱峰向 B 区域扩展

这里需要注意的一点是，使用从动梯度方案时要避免色谱峰的误识别。因为相邻的  $^2D$  分离梯度稍加变化时，相邻  $^2D$  色谱图中同一化合物的洗脱也会沿  $^2D$  坐标轴出现保留时间的轻度偏差。在处理色谱图时，要特别注意这些潜在可能产生的位移，避免将这两个峰归属为不同的化合物。

#### 4.4 对性能、耐用性和操作成本的权衡考虑

在运行 2D-LC 方法时，由于对于传统的 1D 分离而言，2D 分离更加复杂，所以我们会很自然的考虑到运行成本的问题。在这里我们会将这些考虑因素分为两个方面进行讨论。首先，在选择操作参数时，应考虑方法的稳定性和操作成本。在第 2.4 节“LCxLC 中峰容量的基本原理”中关于 2D 方法优化的讨论是高度理论性的，应作为指导性原理，但不是绝对原则。例如，图 2.22 显示，在特定情况下使用 10 秒的取样时间 (sampling time) 可以得到 3500 的 2D 峰容量，但如果取样时间增加至 30 秒，则 2D 峰容量将降至 2500。从峰容量的角度来看，30 秒不是最佳时间，但从方法稳定性的角度来看，取样时间 30 秒可能更好，因为这样  $^2D$  柱的进样频率不会太高（与 10 秒取样时间相比，只有 30% 的进样和阀切换率）。同样，在第 3.1.4 节“第二维配置的考虑因素”中关

于 LCxLC 第二维操作参数的大部分讨论也是集中在以峰容量为量度的方法性能上。在某种情况下，考虑其他性能指标（例如流动相的消耗）也非常重要，在这种情况下，可能首选的是峰容量较低但溶剂消耗较少的方法。

这里要考虑的第二点是，虽然因需要一些额外的部件导致 2D 仪器的前期投入通常比较昂贵，但开发出有效的 2D 方法即可弥补前期成本，它相比于常规的类似方法能够更节省。例如，如果一个 2D 方法可以取代多个 1D 方法用以分离不同的关键化合物对（例如，在一次分析中完成非手性/手性分离，而非一次非手性分离再加一次手性分离），或者如果可以采用性能更好的 2D 分离取代高成本的质谱检测，那么从长远来看，该 2D 方法将更加经济。

## 4.5 方法开发案例研究

LCxLC 系统的配置具有很大的灵活性，这些配置的选择是和样品性质高度相关的，因此很难概括出第 3 章“2D-LC 的实际操作”和第 4 章“LCxLC 中的方法开发”中更多的系统化的方法开发相关的指导原则。所以，我们觉得最有效的方法是以真实的方法开发过程为实例来阐述一些 LCxLC 方法开发过程进行必要参数选择的思路。

### 4.5.1 案例研究 1 — 光敏活性药物成分降解产物的分离

在进行药物活性成分 (API) 的稳定性研究时，通常会在加热、pH、光照等极端条件下使之发生强制降解。有时这些研究产生的样品非常复杂，需要用 LCxLC 进行分离。下文列出了分离 UV 光照后低分子量 API 降解产物时开发的条件。

#### 4.5.1.1 第 1 步 — 选择分离模式和固定相

正如我们在第 4.1 节“分离模式的可能组合”中所讨论，两种 RP 固定相结合非常有吸引力，因为第一维和第二维使用的洗脱液具备固有的兼容性，同时这些固定相还具有多种选择性组合。在第 4.2.2 节“使不同固定相之间的差异图像化的固定相选择性三角形”中，我们讨论了使用选择性三角形指导互补 RP 固定相的选择，结果表明 Agilent ZORBAX SB C18 和 Agilent ZORBAX Bonus-RP 固定相组合，在 RPxRP 分离中具有潜在的强大能力，在本应用中我们使用了这一组合。

#### 4.5.1.2

##### 第 2 步 — 选择色谱柱尺寸和洗脱条件

在第 3.1.6 节“第一维配置的考虑因素”和第 3.1.4 节“第二维配置的考虑因素”中，我们讨论了选择第一维和第二维所用色谱柱尺寸时的考虑因素。利用这些指导原则，并设定目标分析时间约为 15 分钟，我们选择了下列色谱柱尺寸和初始洗脱条件，确保能在给定时间内从色谱柱上洗脱所有样品组分。

##### **第一维**

- Agilent ZORBAX Bonus-RP, 2.1 x 100 mm, 3.5  $\mu$ m
- 35-70-95-95-35-35 %B, 分别对应 0-22-24-26-26.01-30 分钟, A 溶剂为 10 mM 高氯酸水溶液, B 溶剂为乙腈
- 流速: 0.080 mL/min
- 柱温: 40  $^{\circ}$ C

##### **第二维**

- Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 x 30 mm, 2.7  $\mu$ m
- 0-0.20-0.21-0.25 分钟内使用从动梯度模式改变 %B, 溶剂 A 为 10 mM 高氯酸, 溶剂 B 为乙腈
- 流速: 3.0 mL/min
- 柱温: 60  $^{\circ}$ C

#### 4.5.1.3

##### 第 3 步 — 配置接口

在第 3.1.5 节“二维分离之间接口配置的考虑因素”中，我们讨论了在选择取样时间和  $^2$ D 进样体积时要考虑的一些因素。在这个例子中，我们为两维之间的接口配置了 20  $\mu$ L 的样品环，将取样时间设置为 15 秒。此参数组合与进入样品环的 0.080 mL/min 流速相匹配，从而确保每 15 秒即可用 20  $\mu$ L 的  $^1$ D 流出液完全充满样品环。

#### 4.5.1.4

#### 第 4 步 — 调节洗脱条件 最大限度地利用分离空间

用图 4.9 所示的从动梯度法调整  $2^D$  洗脱条件，最大限度地利用分离空间。所得 RP $\times$ RP 色谱图如图 4.10 所示。我们看到，在第一维分离中部分或完全重叠的几个峰，通过 2D 分离很轻松地实现了分离。通过最少的方法开发步骤，我们很快获得了关于此样品的更多信息。

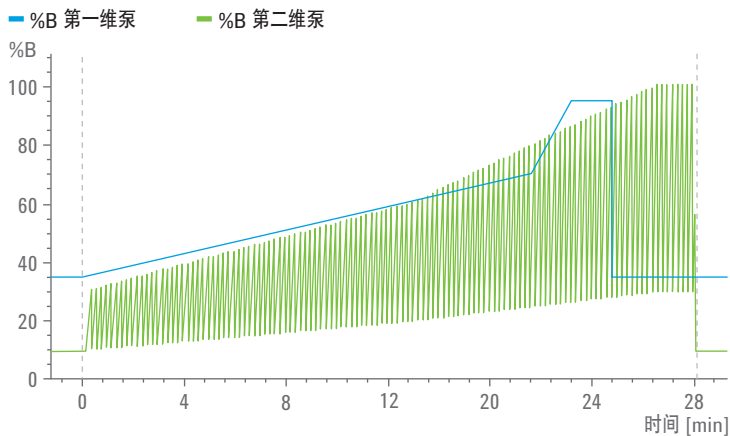


图 4.9 在第二维中采用从动梯度曲线，最大限度地利用 2D 分离空间

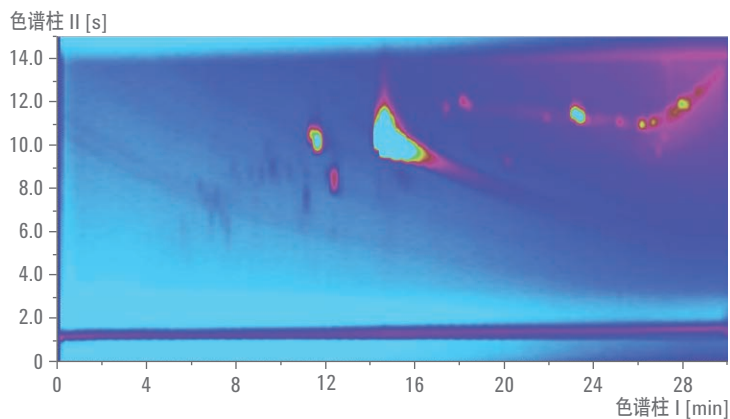


图 4.10 采用图 4.9 所示第二维中的从动梯度，对光降解后的萘普生（浓度为 1 mg/mL）进行的 RP $\times$ RP 分离。彩色强度表示 210 nm 下的吸光度。API 主峰出现在大约 14.5 min/10 s 处。可以看出在第一维中与 API 共洗脱的主要降解峰在第二维中出现在 API 峰后，实现了良好的分离

## 4.5.2

### 案例研究 2 — 离子型和非离子型表面活性剂的分离

虽然我们推荐了 RPXRP 可以作为最常用的组合方式，但在某些特定情况下，亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 和 RP 也是 LCxLC 应用中非常出色的一对组合，因为这两种分离模式的保留机制具有互补性。在下面的研究实例中，我们总结了 Elsner 和 Schmitz 等<sup>48</sup> 开发 HILICxRP 方法分离复杂表面活性剂混合物工作。此工作中分离的表面活性剂类化合物的一般结构见图 4.11。

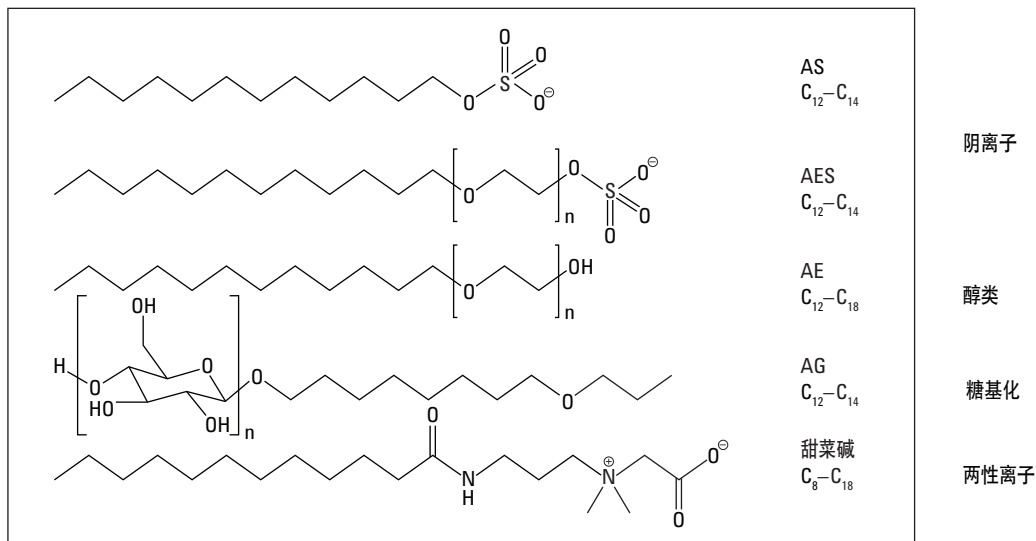


图 4.11 采用 HILICxRP 方法分离的 5 种不同表面活性剂的一般结构

### 4.5.2.1

#### 第 1 步 — 选择分离模式和固定相

分析物化学性质的多样性和类型如图 4.11 所示，在这个例子中使用 HILIC 与 RP 分离模式配对是很好的选择。在这种情况下，HILIC 分离通常能够根据分析物的极性和乙氧基聚合度对混合物进行分离，而 RP 分离则是基于特定分析物类型中烷基链的长度对分析物进行分离。

### 4.5.2.2

#### 第 2 步 — 选择色谱柱尺寸和洗脱条件

在这个例子中，分离的目标是根据功能基和链长度使混合物中的所有主要成分实现基线分离。因此，此工作的重点倒不一定必须是分离速度本身。

#### 第一维

- SeQuant, 瑞典, ZIC-HILIC, 2.1 x 250 mm, 5  $\mu$ m
- 5-5-20-40-40 %B, 0-40-50-90-110 分钟, 以乙腈为 A 溶剂, 50 mM 醋酸铵 (pH 5.3) 水溶液为 B 溶剂
- 流速 0.025 mL/min
- 柱温: 室温

#### 第二维

- Reprospher C8-Aqua, 4.6 x 30 mm, 3  $\mu$ m, (Dr. Maisch GmbH)
- 50-50-70-95-95-50-50 %B, 0-3-6-36-42-48-60 秒, 用 50 mM 醋酸铵 (pH 5.3) 水溶液作为 A 溶剂, 甲醇为 B 溶剂。
- 流速: 3.0 mL/min, 分流, 与 MS 离子源兼容
- 柱温: 室温

### 4.5.2.3

#### 第 3 步 — 配置接口

在这个例子中，我们为两维之间的接口配置了 25  $\mu$ L 的样品环，将取样时间设置为 60 秒。此参数组合可使第一维馏分百分之百充满样品环。请特别注意， $^2$ D 进样体积与  $^2$ D 柱体积的比率 (25  $\mu$ L/600  $\mu$ L, 或 0.042) 比“案例研究 1 - 光敏活性药物成分降解产物的分离”中使用的值 (即, 80  $\mu$ L/60  $\mu$ L, 或 1.3) 要小得多, 但这对于避免  $^2$ D 峰严重变宽非常必要, 如果含高比例有机相 (~80% 乙腈) 的大体积  $^1$ D 流出液进样到使用相对较弱洗脱液 (~75% 甲醇) 的  $^2$ D 柱上, 就容易出现峰变宽的情况。的确, 这也是 HILIC 和 RP 模式组合的局限性之一, 必须采用相对小的  $^2$ D 进样体积 (限制了  $^2$ D 分离相对于第一维的检测灵敏度)。采用此处所述条件得到的分离结果如图 4.12 所示, 这是一个 HILIC 和 RP 分离互补的完美实例, 有效地利用了 2D 分离空间。

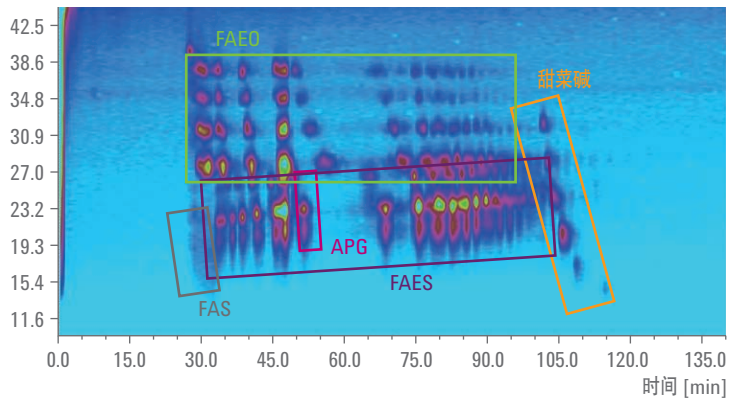


图 4.12 几种不同类型表面活性剂复杂混合物的 HILICxRP 分离，用 MS 检测。  
 标记的峰显示分离并检测出了 110 种不同的表面活性剂。摘自参考文献 88

## 5.1 引言

在多维分离的实践中，数据分析是最具挑战性的工作之一，尤其是非目标 LCxLC 分析。目前，在有效性和易用性两方面，对二维液相色谱数据进行处理的工具仍落后于相应的一维数据处理工具。尤其是 LCxLC 分离模式，存在一些不同于一维液相色谱的独特挑战，因此，下面的讨论将重点关注这种操作模式。

一些原理各不相同的方法已被用于分析 LCxLC 分离产生的数据：

- A. 数据可被当作一系列一维色谱图来处理，每张色谱图都按照传统的数据处理方式进行或多或少的分析<sup>65,66</sup>。随后，这些一维色谱图必须重新整合为一张或能以多种形式显示的二维色谱图（见图 1.8）
- B. 二维分析的连续色谱图数据流直接被输出为 2D 图像，然后采用不同的图像和特征分析技术进行处理<sup>67-69</sup>
- C. 数据的高阶表达（两个色谱维度加上一个表示各个波长或各个  $m/z$  的坐标系），被作为三线性（或更高阶）的数据结构进行处理，并采用平行因子分析 (PARAFAC)、广义秩消法 (GRAM) 或多元曲线分离 - 交替最小二乘法 (MCR-ALS) 等化学计量学方法进行分析。这是一个需要深入研究的领域。主要开展该方法研究的两个课题组包括 Synovec<sup>70-72</sup> 课题组，他们重点研究带有 MS 检测的 GCxGC，以及 Rutan<sup>73,74</sup> 课题组，他们的研究重点则是带有 DAD 检测的 LCxLC。虽然原则上讲，GCxGC 和 LCxLC 均可应用化学计量学方法，但是这两种不同类型的色谱方法还是各自具有不同的挑战。虽然实际上这可能是分析二维色谱数据最强大的方法，但目前尚且没有将这些方法应用于 LCxLC 数据的商品化软件或开源软件。而且，执行这些方法涉及到的许多问题都与 LCxLC 分析所用仪器的特性有关，这些问题还有待解决

此处我们对该方法不作赘述，因为它需要有关化学计量学因子分析方法的详细知识，而且目前它还远未用于常规应用，请参见第 7 章“二维液相色谱的未来”。

方法 A 和 B 都涉及一些常规步骤，包括：

- 基线校正
- 噪音评估
- 数据平滑（过滤）
- 峰检测（包括找到峰起始、结束和到达最高点的时间，以及测定其基线以上的峰高）
- 合并/对齐相同来源的二维色谱峰，以使其可以重新在第一维中表现为一个峰
- 峰面积/体积测定，或者其他形式的定量分析
- 鉴别色谱图中一个或几个峰的化学性质
- 比较不同样品（可选功能）

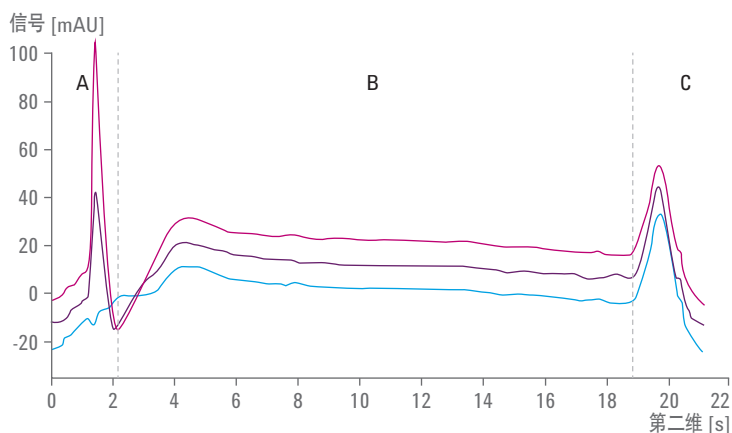
在第一种方法中，某些峰合并的模式必须基于第一维色谱中连续的临近组分进行，以合并属于同一维母色谱峰的所有子二维色谱峰。事实上，这是一个具有挑战性的难题，尤其是当所用的检测器不能为区分不同化学成分提供广泛的定性信息时。为了在后面的章节中使讨论保持简洁，我们假设使用的是单变量检测器（例如，单通道 UV 检测器，或者在 MS 中采用 SIM 模式）。

## 5.2 基线检测

请看图 5.1 所示数据的结构，这些数据是在具有代表性的在线 LCxLC 条件下运行得到的一系列二维色谱图。这些数据通过模拟的分析获得，在该模拟分析中一维色谱柱中未注入样品，这个结果表明，想要更好地对峰进行识别和定量，就必须去除二维检测器的基线干扰。当我们使用吸收型检测器时，会看到单一的二维色谱图基线变化是非常复杂且巨大

的，并且当一维洗脱液的组分随一维梯度分离变化时，二维色谱图的基线也随之变化。因此，数据分析的第一步就是某种形式的基线扣除。遗憾的是，在整个 LCxLC 分析中，基线并不会像我们期望的那样具有良好的重复性，因此，我们开发出了比简单的空白基线扣除校正更高级的方法。这些方法通常是将整个一维色谱图拟合为一个多项式<sup>75</sup>，并最终从色谱图中适当差减这个多项式，或者使用中值滤波器从变化缓慢的基线中辨认出色谱峰<sup>76</sup>。

这些基线校正技术中最强大的一种是 Filgueira 的正交背景校正 (OBGC) 法<sup>77</sup>。许多在使用 DAD 检测器时所观察到的 LCxLC 背景是该检测器对洗脱液折光率变化的敏感性造成的；然而，我们发现，MS 检测器的总离子流响应也会产生与使用 DAD 检测器时所观察到的类似的复杂背景。幸运的是，选定离子的信号会更纯净，但您必须确定您所寻找的目标组分，这种局限性使得该方法只能比较有效地应用于目标化合物的检测。



**图 5.1** LCxLC 背景的结构，由从虚拟分析中获得的三张单一二维色谱图来说明，这些色谱图来自一维分离中梯度的不同时间点。样品溶剂中从一维转移到二维（区域 A）的乙腈的量分别对应于 10%（蓝色曲线）、30%（紫色曲线）和 50%（红色曲线）。区域 B 是大多数色谱峰洗脱的区域，而区域 C 则展示了系统的冲洗峰

### 5.3 测定噪音水平

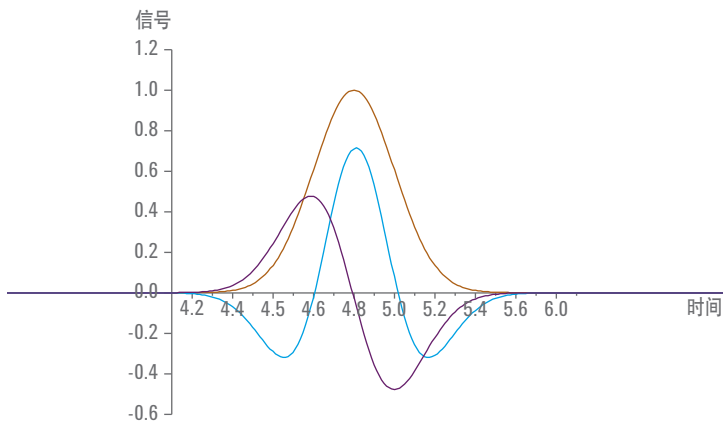
为了确定基线上方的小尖峰是否足够大到能被视为一个色谱峰，我们需要对短期噪音进行评估。仔细观察图 5.1，虽然我们并没有向一维色谱柱中注入任何样品，但我们仍在基线上发现了许多这样的小尖峰（其中一些的高度上超过了数毫吸收单位 (mAU)）。已有多种方法可用来确定噪音，然后用该值设置一个阈值，超过该阈值的信号即被识别为真正的色谱峰<sup>65</sup>。该阈值通常被设为噪音水平的三倍。

### 5.4 数据平滑与过滤

已经有多种技术被成功地应用于一维色谱的分析，包括不同的多项式拟合、傅立叶域，以及调谐滤波器和小波滤波器。与 Savitsky-Golay 多项式滤波器相比，我们更倾向于使用调谐高斯滤波器。当然，我们也推荐非常窄（3 到 5 个点）的中值滤波器，它可以很好地抑制脉冲噪音。

### 5.5 峰检测

在任何一维色谱图中，色谱数据系统确定峰起点、终点和最大值时间点最常见的方法之一，就是检查色谱图的一阶和二阶时间导数<sup>77</sup>。该方法也被多个科研团队用于二维液相色谱分析。峰高一般通过将最大值周围的几个点拟合一个二次多项式，或者将半峰宽以上的多个点拟合为 Gauss 方程的方法来测量。



**图 5.2** 高斯峰曲线（棕色）及其对时间的一阶导数（紫色）和二阶导数（蓝色，乘以 -1）。请注意，一阶导数在峰最大值处为零，而二阶导数在  $t_R + \sigma$  和  $t_R - \sigma$  处为零。我们经常将  $t_R \pm 2\sigma$  作为色谱峰的起点和终点。只测量信噪比大于 3 的色谱峰。而且，有时我们还需要为二阶导数设定阈值，尤其是当我们在处理具有高度弯曲基线的色谱图，或者当我们试图从另一个色谱峰的肩峰上寻找一个色谱峰的起点时

Reichenbach 及其团队开发出了一种与现有方法完全不同的峰检测方法<sup>69,78</sup>。相比于通过分析一系列二维色谱图，并使用与处理简单的一维色谱相同的方法定位色谱峰的上述传统方法，他们的方法是基于三维图像进行的。假设该三维图像是一处被完全淹没的地方，水平面以上看不到任何陆地。现在我们逐渐将水排出。色谱峰会按照其峰高的顺序依次显露出来，即最高的色谱峰最先出现，然后是第二高的，依此类推。

该方法被称为排水算法。该算法首先把信号强度从最大到最小分类排序，然后依次对它们进行处理。该算法从最高峰（即序列中信号强度最大的峰）的峰顶处启动检测，并依次添加所有较小的邻近数据点，直至没有可加宽色谱峰的更小数据点（见图 5.3）。从信号序列中提取的每个数据点都与上一个与其邻近的数据点进行比较。如果上一个邻近数据点的值与它相等或较大，则提取的数据点就被归属为其最大的邻近数据点所在的峰。当然，假如提取的数据点比其邻近的数据点大，就说明它应属于另外一个色谱峰。该程序一直重复，直到所有数据点都处理完成。该方法的优点之一，就是不需要使用任何导数来定位色谱峰的起点和终点，但也正是因为这个原因，与经典的峰检测方法相比，它的灵敏度较低；很显然它不能完全消除噪音的影响，这可能会造成假峰产生。一款用于二维液相色谱数据处理的商品化软件包 (LC Image) 使用了排水算法。

330	207	8
521	827	81
329	1306	328
83	824	519
7	208	331

图 5.3 峰顶点及其周围紧邻的较小数据点的图解

## 5.6 峰面积测定

确定每个色谱峰下的面积通常要使用梯形法则。当我们必须处理两个（或更多个）未完全分离的色谱峰时会遇到不少困难。在面对两个等高 ( $R_s < 1.5$ ) 色谱峰这种最简单的情况下，有两个选择必须考虑（见图 5.4）。峰 1 的面积可以通过从峰谷到从融合峰之前水平延伸至融合峰之后的基线（见图 5.4 中的基线类型 1）画一条垂线来界定。或者，您也可以假设从峰起点到峰谷点画一条线来形成基线，如图 5.4 中的基线类型 2。

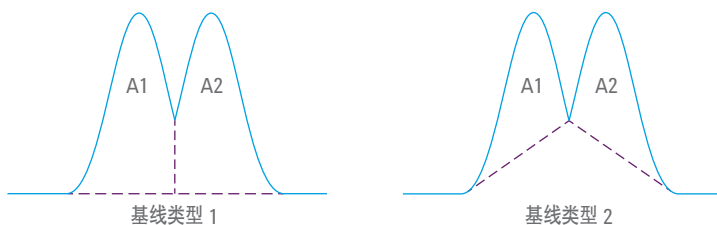


图 5.4 测量峰面积时建立基线的两种方法

## 5.7 归并来自同一第一维母峰 的第二维子峰

当  $^1D$  色谱峰被适当取样，而且，假如该色谱峰的馏分未被过度稀释造成其  $S/N$  降到峰检测阈值以下，则相同的化合物会在一系列  $^2D$  色谱图中的相同  $^2D$  保留时间点处表现为一个色谱峰。由于这些单独的  $^2D$  色谱峰均来自同一个  $^1D$  色谱峰，我们可以将它们归并为一个二维色谱峰。如果  $^2D$  峰的保留时间总是完全相同，这项工作就是极其轻松的，但事实上却很少出现这种情况。而且，分离很差 ( $R_s < 1$ ) 的相邻大峰会显著影响目标峰峰顶点的位置，转移到  $^2D$  色谱柱的溶剂的组分也会在两个  $^2D$  分离间出现轻微变化，并且在 LCxLC 系统第二维的条件下，随着  $^2D$  色谱柱的老化，其保留性能会不可避免地发生变化。针对这些情况，已经有一些算法能够确定何时可以对  $^2D$  色谱峰进行归并，并将它们与原来的保留时间（即  $^1D$ ）相对应。色谱峰归并过程的一个实例见图 5.5。可参考 Peters 等人，及 Stevenson 等人的工作<sup>65,66</sup>，了解归并算法的详细内容。根本问题是，对于一个给定的  $^1D$  母峰，所有一系列子峰的  $^2D$  保留时间并不完全相同。请看图 5.5 的上部，我们可以在椭圆形区域 1 中看

到标记为 a-b-c 和 d-e-f 的两个点群，以及在区域 2 中的第三个点群 g-h-i-j-k。问题是，a-b-c 是否确定属于相同的主峰？以及它应不应该与 d-e-f 合并？有两个独立的标准用于判定这些问题。第一，即使峰 a、b 和 c 的保留时间不相同，但如果在它们的起点和终点间有足够的重叠，就可以说它们实际上属于相同的母峰。根据时间的重叠可以确定 a-b-c 和 d-e-f 的合并。然而，第二个标准是，基于母峰的单态性原则，我们不能合并这两组峰。观察图 5.5 的下部，我们会发现在 a-b-c 群有一个明显的最大值，在 d-e-f 群还有一个最大值，因此，如果将两组峰合并，就会使一个对应的母峰拥有两个顶点，实际上这对于一个色谱峰来说是不合理的。

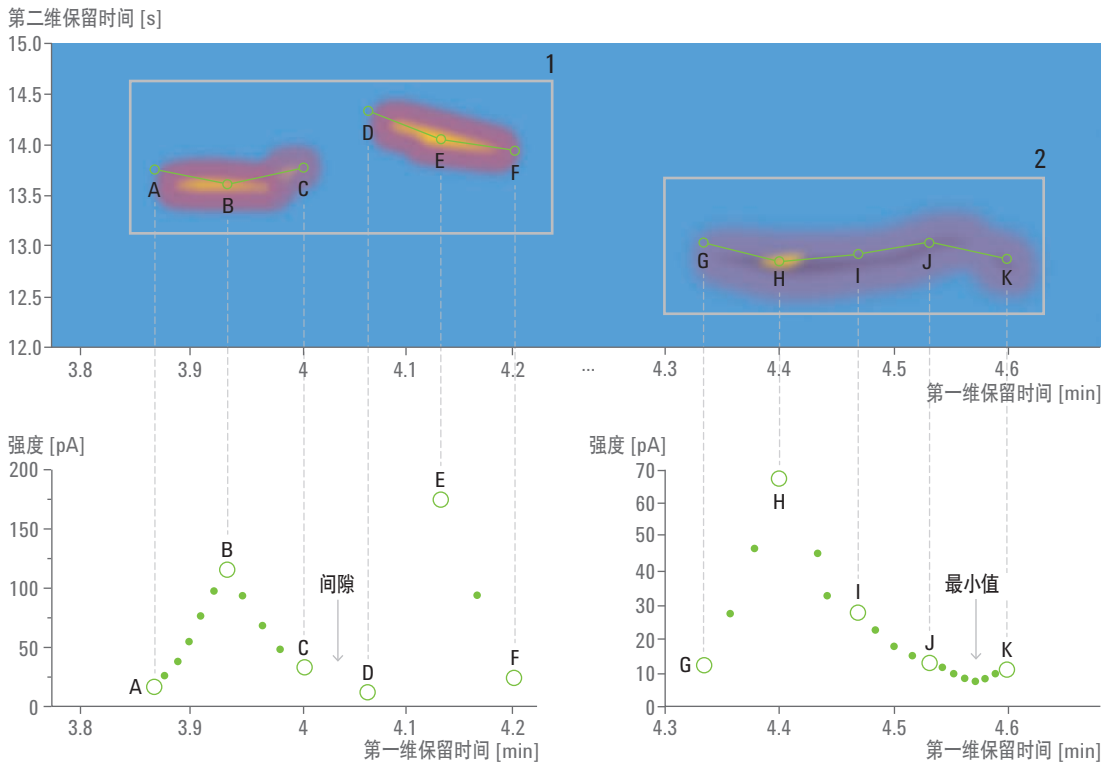


图 5.5 用于说明的理论色谱图。在图的下部，绿色圆圈展示了在第二维的峰值数据点，而绿色圆点为仪器采集到的非峰值数据点

## 5.8 总峰大小

在三维坐标系中，峰的积分实际上应采用体积单位，但我们最常见的是仅简单合计上述归并的每个二维峰的面积或峰高。一些商品化的二维液相色谱数据分析软件可以计算峰体积。

## 5.9 一维液相色谱和 LCxLC 定量 性能的比较

现在极少有比较一维液相色谱和 LCxLC 峰大小测量精密度的实验工作。Stoll 等人<sup>31</sup> 报告了对 6 种化合物的一维液相色谱和 LCxLC 峰进行这种比较的结果。很明显，二维方法的平均精密度比一维方法差。然而，当我们将这些数值与典型的一维 LC/MS 定量分析相比时，结果是基本相当的，而且我们应当注意到，二维液相色谱的使用主要针对复杂的样品分析，这些样品分析无法使用简单的一维 LC/UV 方法完成，而必须使用一维的 LC/MS 方法，所以二维 LC/UV 方法与一维 LC/MS 方法在某种程度上具有一定的可比性。

溶质	一维峰面积的 RSD%	二维峰体积的 RSD%
酪氨酸	0.2	1.6
5-羟基色氨酸	0.4	1.5
色氨酸	0.3	4.5
吲哚-3-乙酸	2.2	3.0
吲哚-3-丙酸	1.2	8.0
吲哚-3-乙腈	0.6	4.7

表 5.1 一维液相色谱与二维液相色谱中色谱峰大小精密度的比较（数据来自参考文献 31）

相比较而言，有关二维液相色谱精密度的理论研究已有很多<sup>73,79,80</sup>。这些研究指出，与一维液相色谱相比，有许多固有的问题会使多维色谱的定量分析复杂化。第一，任何 <sup>1</sup>D 峰通常都会被调制为若干 <sup>2</sup>D 子峰，因此，每个子峰必须小于其完整的母峰。这自然会降低其信噪比。第二，<sup>1</sup>D 系统参数（梯度、柱温等）以及色谱柱在不同运行之间的变化将导致 <sup>1</sup>D 峰的保留时间发生变化，这反过来会导致相对取样位置的波动，进而对 <sup>2</sup>D 峰的大小产生一些影响，并可能会使子峰面积的总和发生变化。第三，快速的 <sup>2</sup>D 分析色谱图中的基线在整个梯度洗脱中会出现很大的变化，并且短期噪音增强。第四，在 Stoll 的研究<sup>31</sup> 中，<sup>2</sup>D 峰与其 <sup>1</sup>D 峰相比拖尾情况更加严重，因此更难将它们准确整合。

请注意，二维色谱图的总峰大小对应于一个体积值。它可以通过两个不同的途径得到。最简单且最直接的方法是仅将所有构成母峰的各子峰的面积相加。这被称为矩量法。然而，有两个科研团队<sup>79,81</sup>已研究出另外一种方法，即将子峰的面积拟合为未知的总峰面积、保留时间和峰标准偏差 ( $\sigma$ ) 的一个高斯函数。为此，我们需要从每个母峰中获得至少三个子峰。如果有至少三个子峰，高斯拟合方法就能给出极其精确的结果，完全摆脱了对调制时间比和取样相对位置的依赖。Stoll 的工作基于更简单的矩量法。我们也可以使用子峰的峰高来定量；但是，一份报告<sup>81</sup>表明，该方法的精确度不如使用子峰面积的方法。很显然，在定量分析方面我们还需要做更多的研究。在第 7 章“二维液相色谱的未来”中，我们将会相当详细地深入探讨该问题，尤其是在多元化学计量学方法的使用方面。

**Jens Trafkowski**

二维液相色谱解决方案产品经理

安捷伦科技

德国瓦尔德布隆

正如我们在第 1.4 节“二维液相色谱的应用领域”部分所描述的，二维液相色谱有许多可能的应用。本章介绍了一些不同应用，举例说明了应用二维液相色谱可以解决许多应用领域的分离难题。各种二维液相色谱研究一般通过不同分析任务、不同固定相组合和适当检测技术的应用来进行阐释。很显然，我们无法覆盖所有可能的应用，但此处展示的应用亦可帮助您很好地了解现在和将来我们可以籍此实现什么。

本章仅选择性地介绍了生物制药、食品和天然产物等领域的一些二维液相色谱应用，您还可以通过 Agilent Application Finder 访问更多应用：

[www.agilent.com/chem/application-finder](http://www.agilent.com/chem/application-finder)

**6.1****天然产物和中草药提取物 —  
紫杉醇的分析**

紫杉醇（见图 6.1）是最好的天然来源化学治疗成分之一。它可以从短叶红豆杉的树皮和细胞培养物中获得。我们希望能够种植出紫杉醇含量尽可能高的短叶红豆杉，因为紫杉醇的天然产量非常低。因此，准确分析紫杉醇含量非常必要，但同时也非常困难，因为它的浓度很低并且样品基质复杂。

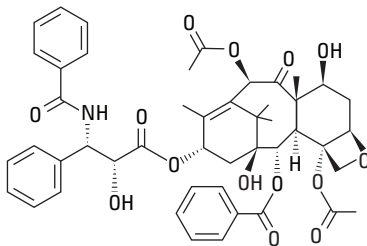


图 6.1 紫杉醇的结构

图 6.2 清楚地说明了基质对一维液相色谱分离产生的极大影响，以及显著增加峰容量的必要性。优化的一维方法是否能实现满意的分离现在还是个疑问。因此全二维液相色谱方法是理想的选择。在本例中，在分离被分析物和基质，以及分离各种目标分析物这两个维度中均使用了反相色谱柱 (RP×RP)。鉴定、定性确证和定量分析使用 DAD，或使用单四极杆质谱在 APCI 正负离子模式下进行。

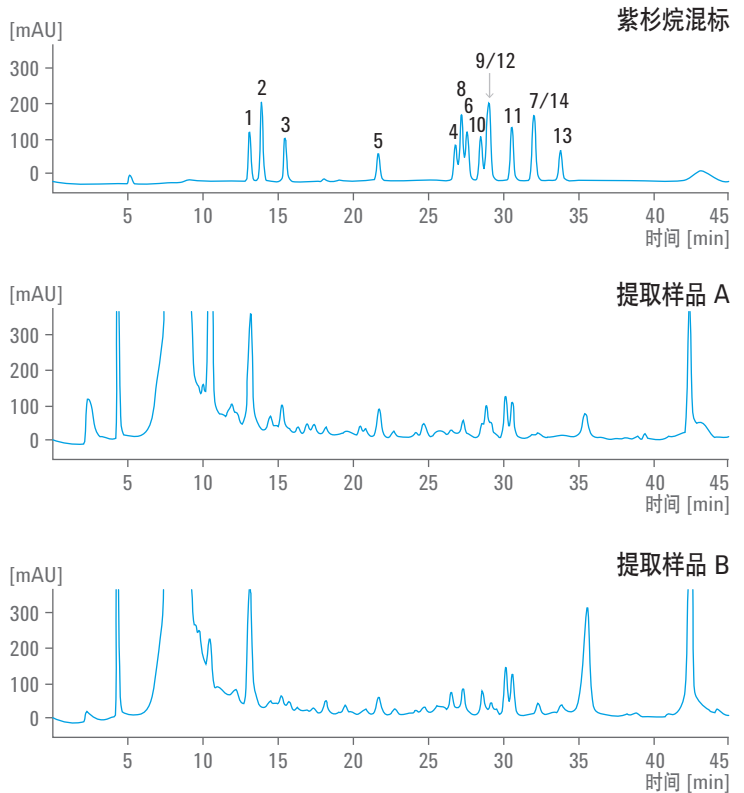


图 6.2 紫杉烷标准品混合物（每种标准品 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）和短叶红豆杉提取物一维分析结果比较

图 6.3 展示了两种不同提取物的二维分离与标准品分离的比较。两种最受关注的紫杉烷类成分——三尖杉宁碱 (10) 和紫杉醇 (12) 在两种提取物中均存在，并可进行定量。有了这些信息，我们就可以确定哪些候选植物中这些重要的紫杉烷类成分含量最高，并进行选种。

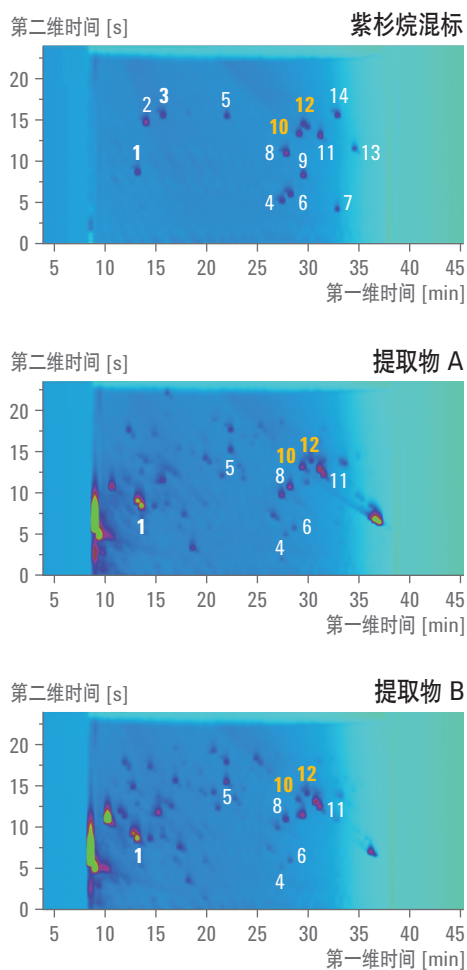


图 6.3 紫杉烷标准品混合物（每种标准品 4  $\mu\text{g/mL}$ ）和提取物的全二维 (LCxLC) 分析结果比较

## 6.2

### 天然产物分析 — 柑橘油提取物的分析

柑橘油在化妆品中应用广泛。然而，广泛应用于个人健康护理产品的精油中含有具有致癌性的呋喃香豆素，因此，测定其在精油中的含量非常重要。精油本身具有高基质干扰效应，并且其分析通常无法达到充分的分离，因此，我们可以使用二维液相色谱来实现最佳分离。对于这类基质，高度正交的正相色谱和反相色谱 (NPxRP) 组合虽然在操作上具有挑战性，但会得到非常好的分离结果。检测使用了 DAD 和单四极杆质谱在 APCI 正离子模式下进行。

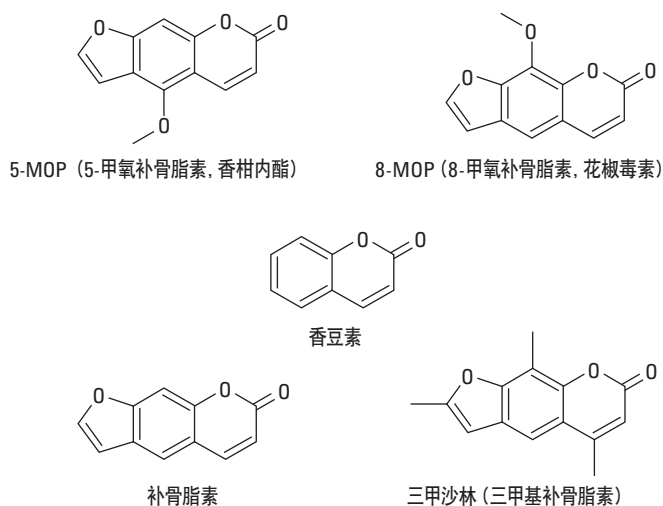


图 6.4 市售呋喃香豆素的结构

选择 5-MOP 作为目标化合物，通过使用 UV 光谱进行确证，四个样品中有三个都可以检出并测定出它的含量。该致癌化合物的存在表明，我们需要更深入地检测一些化妆品中的该类成分，以评估这些产品对消费者的潜在危害。应用全二维液相色谱，不仅可以实现定性分析，还能进行定量分析，这是风险评估中的一条非常重要的标准。

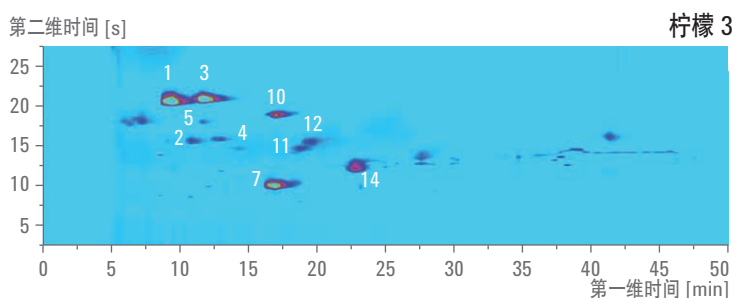
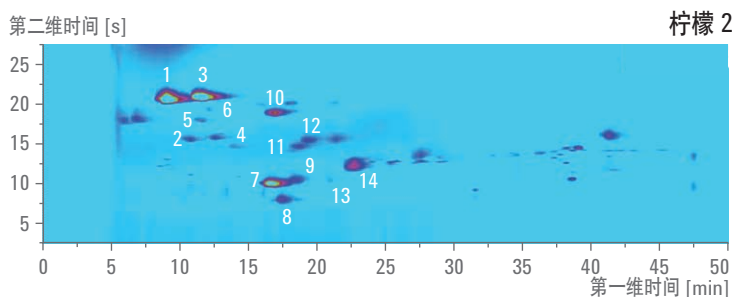
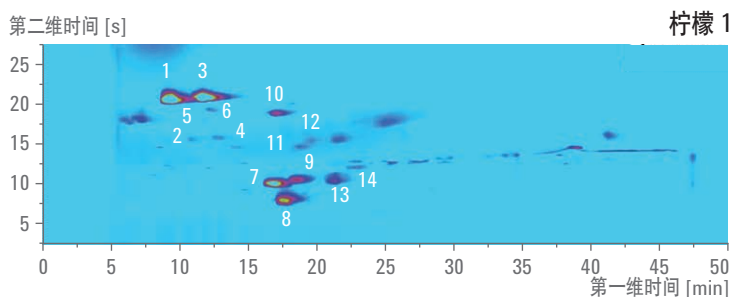
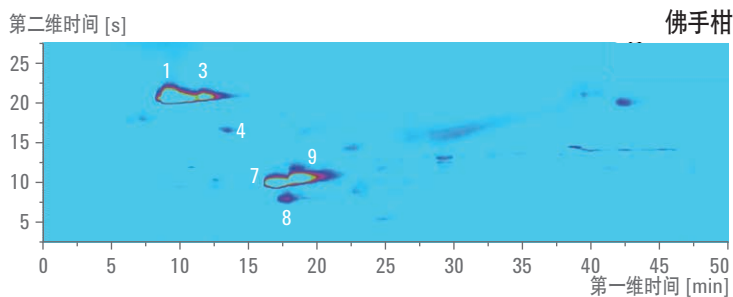


图 6.5 柑橘油的全二维液相色谱分析。

- |                     |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| 1 5-香叶草氧基补骨脂素       | 9 5-MOP                          |
| 2 未知物               | 10 5-香叶草甲基补骨脂素                   |
| 3 5-香叶草氧基-7-甲氧基香豆素  | 11 未知物                           |
| 4 5-异戊烯基氧基-7-甲氧基香豆素 | 12 5-异戊烯基氧基-8-(2,3-环氧基异戊烯氧基)补骨脂素 |
| 5 5-香叶草氧基-8-甲氧基补骨脂素 | 13 5,8-二甲氧基补骨脂素                  |
| 6 未知物               | 14 5-(2,3-环氧基异戊烯氧基)补骨脂素          |
| 7 5,7-二甲氧基香豆素       |                                  |
| 8 未知物               |                                  |

### 6.3 生物制药 — 单克隆抗体的分析

近几年来，药品市场已经开始从经典的小分子药物向生物药物，如单克隆抗体 (mAb)、融合蛋白或治疗性蛋白等转变。因此，蛋白质组学工作流程现在必须能够对这些分子量非常大的蛋白质进行肽谱分析，这是一项高度复杂的分析挑战。

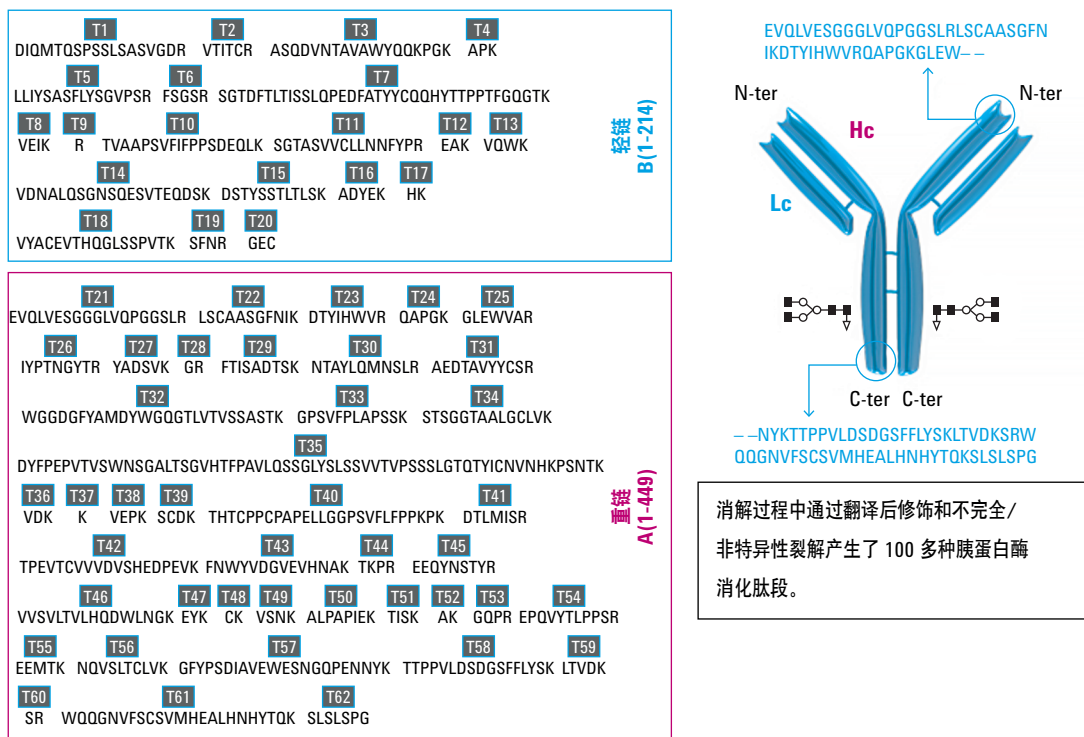


图 6.6 蛋白质赫赛汀的结构和氨基酸序列。特征肽标记为 T1-T62

在本应用中，曲妥单抗（商品名为赫赛汀，一种 150 kDa 的 mAb），使用胰蛋白酶酶解后采用全二维液相色谱进行分析。通过应用强阳离子交换和反相色谱的组合 (SCXxRP)，实现了 100 多种肽的最佳正交分离。将 DAD 检测用于标准品分析，肽的定量分析和鉴定采用 QTOF MS。除了 SCXxRP，还应用 HILIC 和 RP 组合来获取更多数据，尤其是可以用于从其天然形态中分离脱酰胺肽。虽然全二维 HILICxRP 将两种真正正交的技术连接起来，但它通常会导致调制阀中残留高浓度的乙腈。这会造成分离

性能的损失，以及早洗脱的肽在第二维中无法保留，因为乙腈在反相色谱中具有很强的洗脱能力。因此，一维分离的流速被降到 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，而二维分离的流速被升高到 4  $\text{mL}/\text{min}$ ，并且增加了一个额外的三通，使用水来稀释第一维的流出物。

将该方法用于测定多肽的应激相关变化，如图 6.7 所示。即使是低水平的氧化或 pH 应激变化，也可采用该分析设置进行测定。

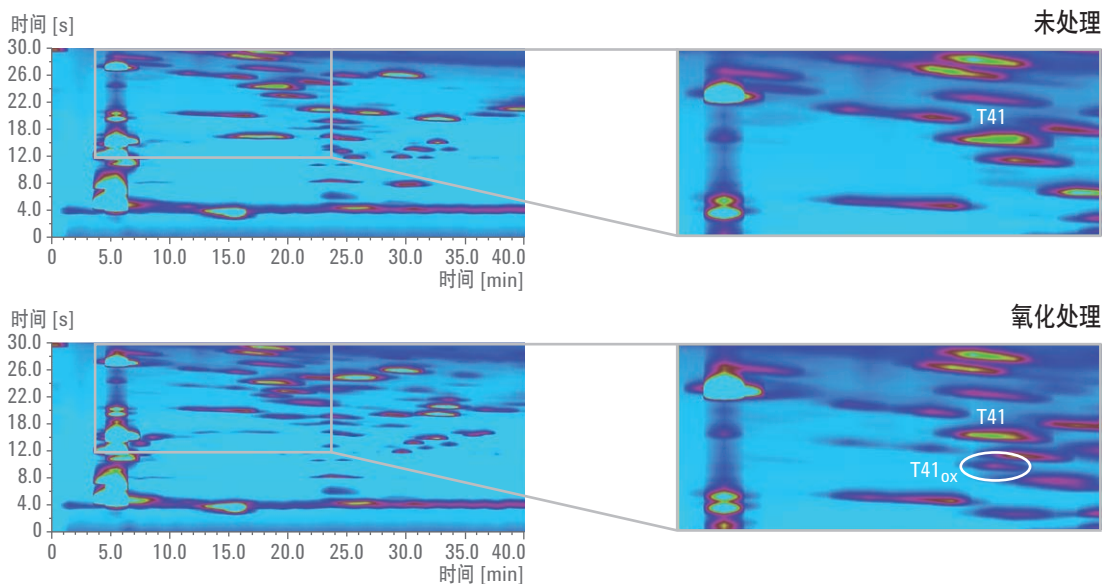


图 6.7 分析未处理和氧化处理的赫赛汀胰蛋白酶酶解物的 LCxLC 等值线图

除了联用 SCX 和 RP 固定相，亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 与 RP 固定相的组合也可实现很好的正交性。HILICxRP 与 SCXxRP 相比的优势在于，HILIC 分离所使用的盐类比 SCX 分离更少，因此这两维的联用更容易实现，并且不再需要脱盐步骤。二维 LC-DAD-QTOF 系统的设置如图 6.8 所示。

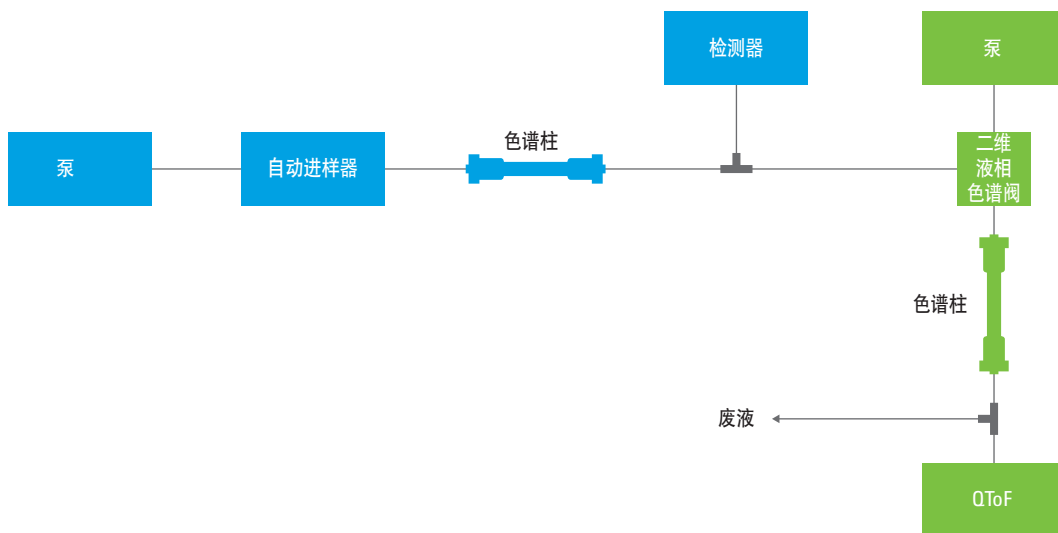


图 6.8 配备二极管阵列检测器和 QTOF MS 的二维液相色谱系统的结构图

HILIC 与 RP 组合面临的主要困难是这二维分离中使用的洗脱液之间不匹配。两者的保留机制差异显著，并且 HILIC 分离需要使用含高比例乙腈的流动相，而 RP 分离使用含高比例水相的流动相。通过将第一维的流速降低至  $50 \mu\text{L}/\text{min}$  并将其分流进入第二维来解决这一不匹配问题。尽管使用分流会使设置更复杂，但其带来的分析优势远比较轻微增加的复杂性带来的不便更加重要。

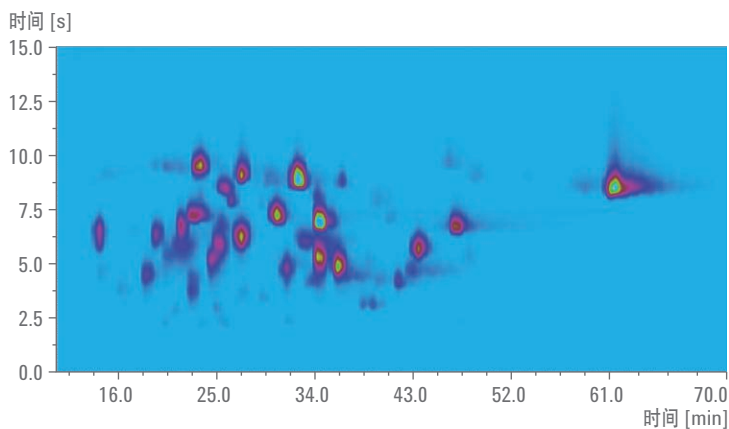


图 6.9 使用 HILICxRP 分离 mAb 胰蛋白酶酶解多肽得到的 LCxLC 色谱图

SCXxRP 和 HILICxRP 分离都得到了令人满意的单克隆抗体分析结果。我们相信，二维液相色谱在生物药物的鉴定、定量分析和纯度控制，以及常规的肽谱分析方面，必将占有越来越重要的地位。

## 6.4 化学品 — 工业级表面活性剂同系物的测定

脂肪醇聚氧乙烯醚这类化学物质是非离子表面活性剂，广泛用于许多个人健康护理产品 (PHCP) 中。除了从 C12 到 C18 的不同链长外，乙氧基化的程度和不同乙氧基化化合物的组合是指示产品质量和产品鉴定的重要因素。

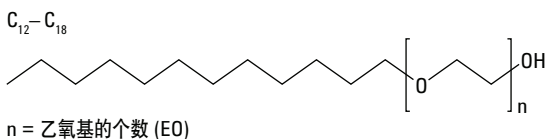


图 6.10 脂肪醇聚氧乙烯醚化合物的结构式

HILIC 和 RP 的组合是实现该高难度分离的理想方法。在第一维 (HILIC) 中，化合物的分离基于其乙氧基化程度实现，而在第二维 (RP) 中，它们的分离则根据其疏水性尾部的长度进行。如图 6.11 所示，二维分离显示出近乎完美的正交性。

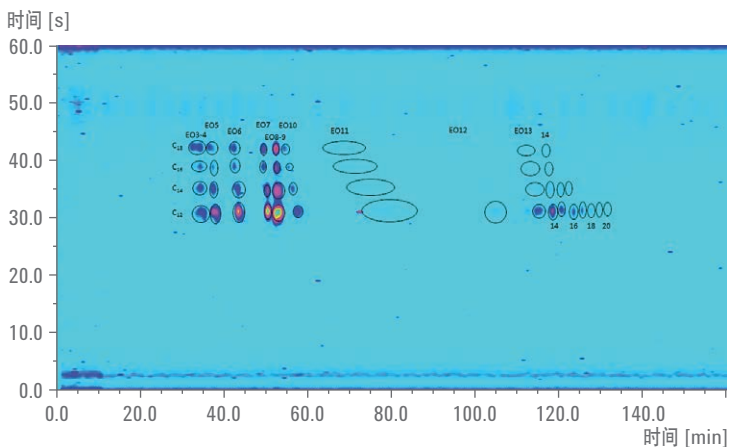


图 6.11 脂肪醇聚氧乙烯醚工业级混合物的二维分离，脂肪醇链长为 C12 到 C18，乙氧基化度为 3 - 20

采用 ELSD 检测这些工业级表面活性剂，因为这些分析物大多数没有紫外吸收。鉴于该检测器具有较高的灵敏度和数据采集速率，它在整个分析中都是一款非常有用的工具。此外，使用质谱进行检测可提高检测灵敏度。

## 6.5 药物 — 杂质测定

药物分析中最重要的任务之一就是杂质的测定。杂质通常与药物的主要化合物或活性药物成分 (API) 相似，但是其在药品中的含量只允许在一定限定值以下。明确区分不同的化合物是非常重要的，尤其是当它们的化学性质非常相似时。因此，要确保最佳的质量控制，我们必须使 API 和杂质得到良好的分离。

在本应用中，我们使用中心切割二维液相色谱来检测额外的杂质。在采用原始方法得到的谱图中，我们确定了 6 种杂质，如图 6.12 所示。

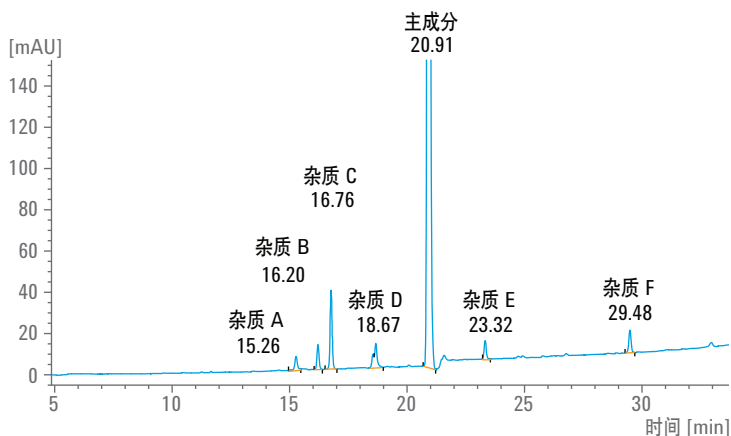


图 6.12 原始一维液相色谱杂质谱图

现在我们关注的问题是是否有额外的杂质与主峰共流出。我们对主峰进行中心切割并在第二维中进行分析，结果发现了两种其他杂质，如图 6.13 所示。杂质 H 可以通过添加该化合物的标准品来确证。

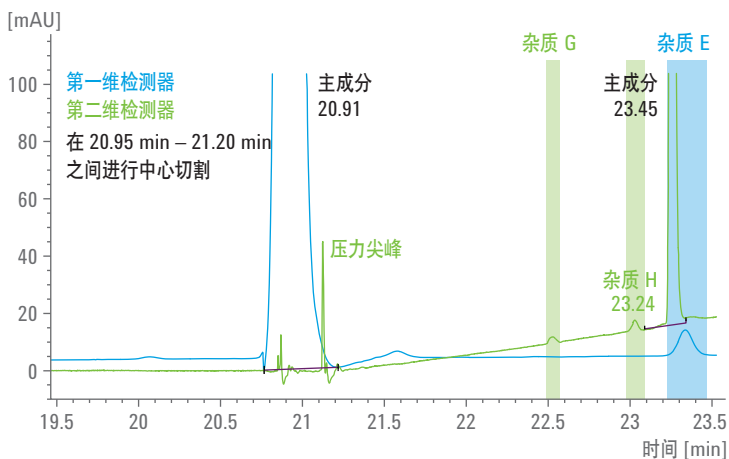


图 6.13 主色谱图（蓝色）和中心切割色谱图（绿色）。对 20.75 - 21.00 min 间的主峰进行中心切割。压力尖峰是由取样开始和结束时的阀切换造成的。延迟由延迟体积和色谱柱体积导致

## 6.6 食品检测 — 饮料中的多酚

多酚是众所周知的天然抗氧化剂，存在于许多常用于制作果汁、葡萄酒，或其他饮料（如啤酒或柠檬汁）的水果中。由于具有抗氧化能力，多酚是自由基清除剂，并具有积极的抗癌作用。这些产品的基质通常高度复杂，因此，二维液相色谱是分析啤酒、果汁或葡萄酒等饮料样品的理想方法。

下述应用测定了果汁和红葡萄酒中的多酚。通过联用两种不同反相分离的全二维液相色谱进行定性和定量分析。样品经微孔滤膜过滤后直接进样分析。图 6.14 展示了标准品混合物的三维谱图，说明了两种固定相的不同分离性能。

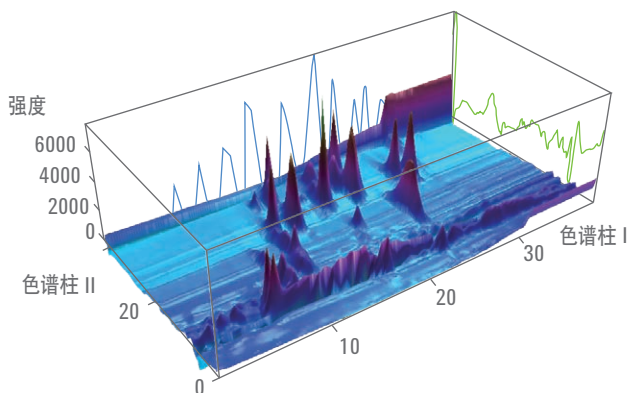


图 6.14 多酚标准品混合物的 LCxLC 分离色谱图

标准品混合物中含有 26 种多酚类成分，二维分离中均获得了良好的保留时间重现性（RSD 在第二维中通常优于 0.5%）。由于二维分离均可获得精密和准确的保留时间，我们可以鉴定实际样品中的多种化合物。而且，鉴定的化合物可采用其 DAD 谱图进行确证，如图 6.15 所示。

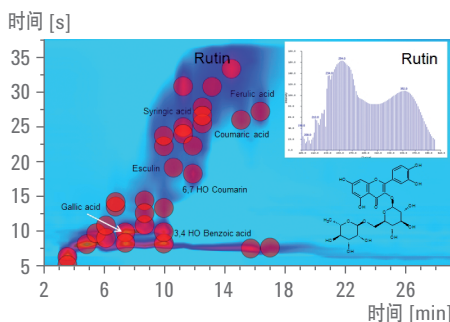


图 6.15 包含红葡萄和绿葡萄、苹果、黑加仑、樱桃、曼越橘、石榴和越桔果汁的混合抗氧化果汁的分离

## 6.7 食品检测 — 初榨橄榄油的质量控制

橄榄油中的酚类化合物具有重要作用，兼具抗氧化和调味功能。因此，在这种亲脂性很强的基质中，要很好地分离和测定这些结构通常非常类似的物质并不容易，而全二维液相色谱是理想的方法。

使用包括 QTOF 检测在内的方法，可以表征和区分不同来源的橄榄油。除了可以通过与确定的标准品比较来鉴定酚类物质外，该方法还可分离出许多其他物质，从而可以在随后的分析中对这些物质进行鉴定。

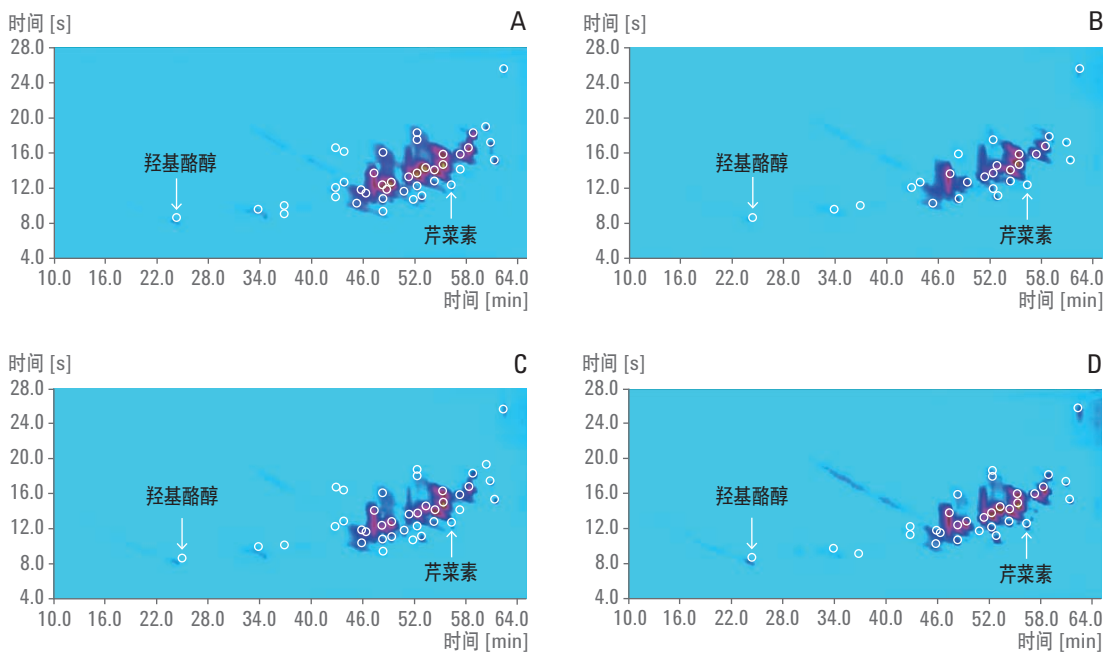


图 6.16 采用质谱检测分离橄榄油 A-D 的 LCxLC 色谱图

针对  $2^D$  梯度洗脱，该方法基于样品基质的亲脂性和被分析物的特殊化学性质，使用了一个特别优化的从动梯度程序。

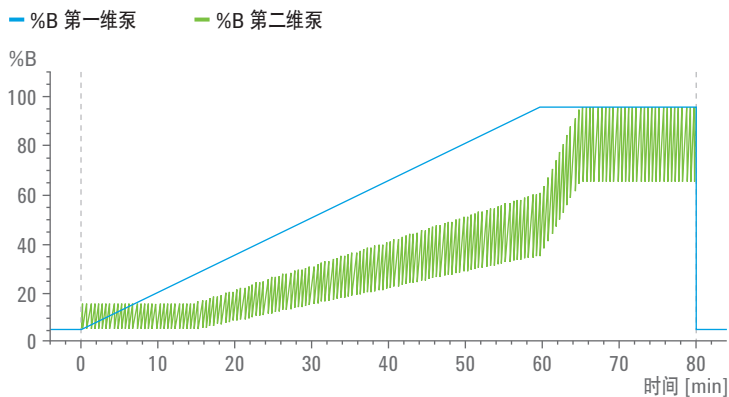


图 6.17 采用特有的从动程序的  $2^D$  梯度

根据酚类成分的不同含量，可以表征和比较这四种橄榄油。

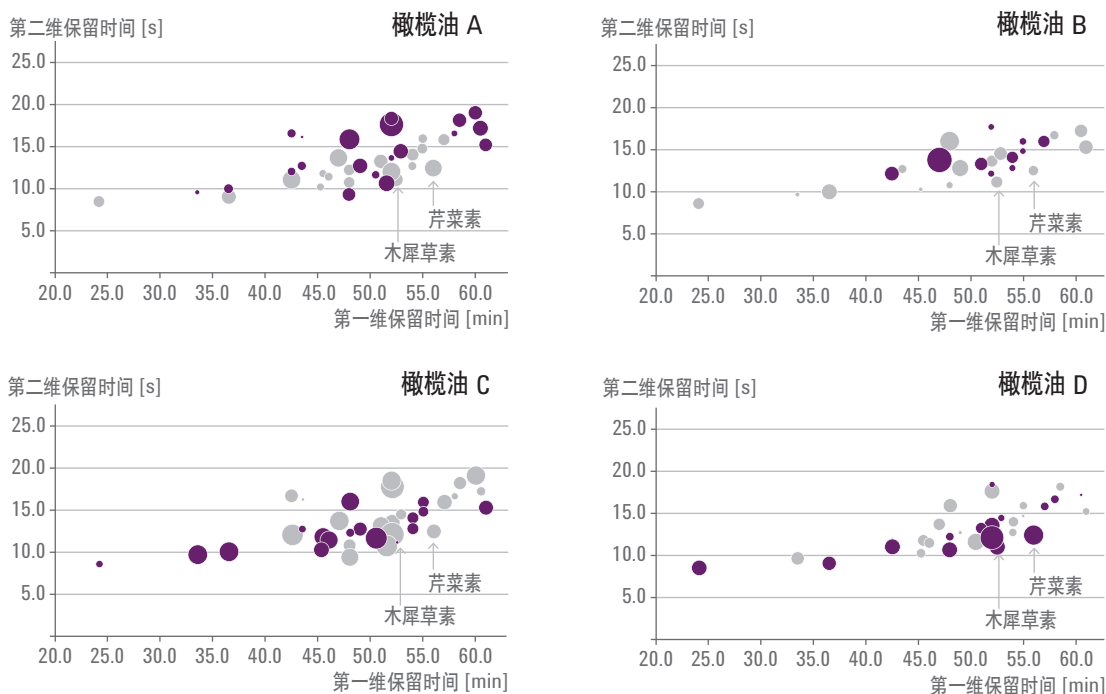


图 6.18 每种橄榄油峰检测间的差异，以及所分析橄榄油的平均值（紫色圆圈表示百分响应比该物质的平均百分响应更高的峰；灰色圆圈表示低于平均百分响应的峰；每个圆圈的面积表示了样品与平均值间的差异度的数量级）

## 6.8 食品检测 — 啤酒的分析

由于生产过程的高度差异性，不同类型的啤酒可以基于不同种类的化合物中的成分差异进行区分。为了实现不同化合物和不同化合物类别的分离，使用反相色谱柱可以很好地分离多酚，而其他强极性大分子化合物（如糖类）可以采用 SEC 或 IEX 更好地分离。

本研究中尝试了三种不同的色谱柱组合，如图 6.19 所示。采用这些组合分析所得到的峰型模式在二维色谱图中看起来截然不同。这些结果有助于我们根据具体的分析和样品的特性选择“最佳”的色谱柱设置。

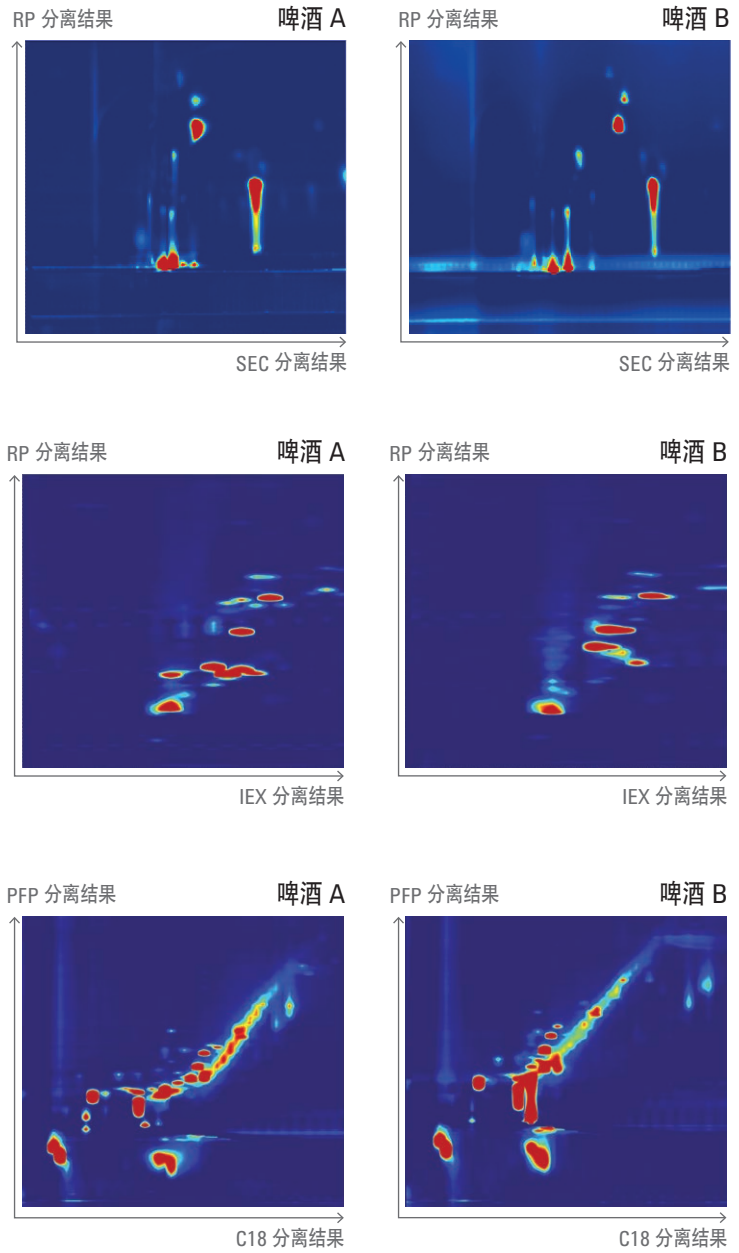


图 6.19 采用三种不同的色谱柱组合，分析比较两个不同的啤酒样品（A 和 B）所得到的 LCxLC 色谱图：A) SECxRP, B) IEXxRP, 和 C) RPxRP

## 6.9

### 应用方法总结

该基础导论中介绍的应用只是众多二维液相色谱潜在应用的冰山一角。无论是分析天然产物、食品、复杂混合物的指纹图谱，还是广泛的药物和生物药物应用，二维液相色谱都将在分析领域占据越来越重要的地位。为了实现这一愿景，尽量降低使用该技术的门槛至关重要。这将使缺乏经验的用户也能够开始使用二维液相色谱。

我们期待着出现更多的应用，包括复杂的聚合物分析，以及啤酒等饮料的鉴定分析等。一个潜力巨大的领域，就是涉及复杂体系的代谢组学和脂质组学等的工作流程领域。

下列表格总结了前文所介绍的应用中使用的色谱条件，并且说明了这些应用中所使用的丰富多样的色谱组合。

## 天然产物和中草药提取物 - 紫杉烷的分析

第一维色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 3.5 μm (部件号 959793-902)
溶剂 A	水
溶剂 B	甲醇
流速	60 μL/min
梯度	0 min 时 30% B 1.5 min 时 55% B 36 min 时 85% B 37 min 时 100% B 45 min 时 100% B 后运行时间 30% B 5 min
柱温	30 °C
第二维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT Plus Phenyl-Hexyl, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 959941-912)
溶剂 A	水 + 0.008% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.004% 甲酸
流速	4 mL/min
空闲流速	0.4 mL/min
初始梯度	0 min 时 20% B 0.3 min 时 33% B 0.31 min 时 20% B
梯度调制/从动	下限: 0 min 时 20% B 37 min 时 55% B 42 min 时 85% B  上限: 0.3 min 时 33% B 37 min 时 85% B
调制范围	9 - 37 min
柱温	40 °C
调制时间	0.4 min (60% 定量环充填)
定量环设置	两个 40 μL 定量环, 正进正冲连接
进样量	5 μL (进样程序, 与 10 μL 水进行三明治式进样)
注射针清洗	冲洗端口 5 s (甲醇)
样品温度	12 °C
二维 DAD 检测	信号 228/8 nm, 参比 370/60 nm 80 Hz
质谱检测	配备 APCI 的单四极杆 干燥气流速 5 L/min 干燥气温度 320 °C 雾化器压力 50 psi 蒸发器温度 380 °C 毛细管电压 3000 V (正离子和负离子模式) 电晕电流 4 μA (正离子模式), 15 μA (负离子模式) 快速扫描 250 - 1000 m/z 碎裂电压 120 V

## 天然产物分析 - 柑橘油提取物的分析

第一维色谱柱	Agilent ZORBAX RX-SIL, 1.0 x 150 mm, 3.5 $\mu$ m (定制填充)
溶剂 A	己烷/乙酸乙酯 95/5 (v/v)
溶剂 B	乙酸乙酯
流速	35 $\mu$ L/min
梯度	0 min 时 0% B 35 min 时 40% B 36 min 时 70% B 60 min 时 90% B 后运行时间 0% B 10 min
柱温	25 $^{\circ}$ C
第二维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 3.0 x 50 mm, 1.8 $\mu$ m (部件号 959757-302)
溶剂 A	水
溶剂 B	乙腈
流速	2.2 mL/min
空闲流速	0.3 mL/min
初始梯度	0 min 时 0% B 0.38 min 时 100% B 0.39 min 时 0% B
梯度调制/从动	无从动梯度
调制范围	2.5 - 52 min
柱温	40 $^{\circ}$ C
调制时间	0.5 min
定量环设置	两个 20 $\mu$ L 定量环, 正进正冲连接
进样量	纯油: 0.4 $\mu$ L 油混标: 0.8 $\mu$ L
注射针清洗	冲洗端口 6 s (乙酸乙酯/异丙醇/丙酮)
样品温度	15 $^{\circ}$ C
二维 DAD 检测	信号 315/4 nm, 参比 500/50 nm 80 Hz
质谱检测	配备 APCI 的单四极杆 干燥气流速 7 L/min 干燥气温度 340 $^{\circ}$ C 雾化器压力 55 psi 蒸发器温度 410 $^{\circ}$ C 毛细管电压 3000 V (正离子和负离子模式) 电晕电流 4 $\mu$ A (正离子模式), 15 $\mu$ A (负离子模式) 快速扫描 150 - 700 m/z 碎裂电压 90 V

## 生物制药 - 单克隆抗体的分析 I

第一维色谱柱	MIC-15-Polysulfoethyl-Asp, 1.0 x 150 mm, 5 µm (PolyLC 有限公司)
溶剂 A	5 mM 磷酸盐, pH 3, 在 5% 乙腈溶液中
溶剂 B	5 mM 磷酸盐, pH 3, 在 5% 乙腈 + 400 mM NaCl 溶液中
流速	60 µL/min
梯度	0 min 时 3% B 30 min 时 25% B 50 min 时 45% B 55 min 时 100% B 58 min 时 100% B 后运行时间 3% B 13 min
柱温	25 °C

第二维色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 3.5 µm (部件号 959943-902)
溶剂 A	水 + 0.1% 磷酸
溶剂 B	乙腈
流速	3.5 mL/min
空闲流速	0.5 mL/min
初始梯度	0 min 时 2% B 0.43 min 时 35% B
梯度调制/从动	梯度调制 0.43 min 时 35% B 到 50 min 时 65% B 再到 51 min 时 100% B
调制范围	1 - 53 min
柱温	55 °C
调制时间	0.5 min
定量环设置	两个 40 µL 定量环, 正进正冲连接
进样量	20 µL
注射针清洗	冲洗端口 6 s (5 mM 磷酸盐, pH 3, 在 5% 乙腈溶液中)
样品温度	4 °C
二维 DAD 检测	信号 214/4 nm, 参比 360/100 nm 80 Hz

## 生物制药 - 单克隆抗体的分析 II

第一维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300-HILIC, 2.1 x 100 mm, 1.8 $\mu$ m (部件号 858750-901)
溶剂 A	水, 50mM 甲酸铵, pH 4.5
溶剂 B	90% 乙腈 + 10% 溶剂 A
流速	50 $\mu$ L/min
梯度	0 min 时 90% B 75 min 时 45% B 80 min 时 0% B 85 min 时 0% B 后运行时间 90% B 20 min
柱温	30 $^{\circ}$ C
第二维色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 3.5 $\mu$ m (部件号 959943-902)
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈
流速	4 mL/min
空闲流速	0.25 mL/min
初始梯度	0 min 时 0% B 0.35 min 时 60% B
梯度调制/从动	
调制范围	12 - 69 min
TCC	30 $^{\circ}$ C
调制时间	0.45 min
定量环设置	两个 40 $\mu$ L 定量环, 正进正冲连接
进样量	3 $\mu$ L
注射针清洗	冲洗端口 5 s (水/乙腈 25/75)
样品温度	4 $^{\circ}$ C
一维 DAD 检测	信号 280/4 nm, 参比 400/100 nm 10 Hz
质谱检测	喷射流, ESI+ 干燥气流速 10 L/min 干燥气温度 340 $^{\circ}$ C 雾化器压力 45 psi 蒸发器温度 400 $^{\circ}$ C 毛细管电压 3500 V 喷嘴电压 1000 V 碎裂电压 175 V 棒状图数据采集速率 8 谱图/s 扩展动态范围 2 GHz 分辨率 10000 (m/z 1000)

## 化学品 - 工业级表面活性剂同系物的测定

第一维色谱柱	ZIC-HILIC, 2.1 x 250 mm, 5 µm, SeQuant, Sweden
溶剂 A	水, 50 mM 乙酸铵
溶剂 B	乙腈
流速	25 µL/min
梯度	0 min 时 97% B 10 min 时 97% B 60 min 时 85% B 100 min 时 85% B 120 min 时 70% B 140 min 时 70% B 160 min 时 97% B 后运行时间 97% B 20 min
柱温	25 °C
第二维色谱柱	Reprospheer C8-Aqua, 4.6 x 30 mm, 5 µm (Dr. Maisch 有限公司)
溶剂 A	水 + 10 mM 乙酸铵
溶剂 B	甲醇
流速	3 mL/min
空闲流速	
初始梯度	0 min 时 50% B 0.1 min 时 70% B 0.65 min 时 95% B 0.75 min 时 95% B 0.80 min 时 50% B 1.00 min 时 50% B
梯度调制/从动	无梯度从动
调制范围	全范围
柱温	50 °C
调制时间	1 min
定量环设置	两个 40 µL 定量环, 正进正冲连接
进样量	5 µL
注射针清洗	使用甲醇清洗 6 s
样品温度	8 °C
ELSD 检测	蒸发器温度 80 °C 雾化器温度 70 °C 采样速率 40 Hz 气体流速 1.3 SLM

## 药物 — 杂质测定

第一维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 959759-902)
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	200 μL/min
梯度	0 min 时 5% B 30 min 时 95% B 35 min 时 95% B 后运行时间 5% B 15 min
柱温	25 °C
第二维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 959757-312)
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	甲醇 + 0.1% 甲酸
流速	3 mL/min
空闲流速	无
初始梯度	固定梯度: 0 min 时 5% B 10 min 时 15% B
梯度调制/从动	不适用于中心切割二维液相色谱
调制范围	不适用
柱温	60 °C
调制时间	不适用
定量环设置	一个 80 μL 定量环和一根短接毛细管
进样量	3 μL
注射针清洗	使用甲醇清洗 6 s
样品温度	8 °C
一维 DAD 检测	信号 254/4 nm, 参比 360/16 nm 20 Hz, 10 mm 最大光强流通池
二维 DAD 检测	信号 254/4 nm, 参比 360/16 nm 20 Hz, 60 mm 最大光强流通池

## 食品检测 — 饮料中的多酚

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	100 µL/min
梯度	0 min 时 5% B 30 min 时 95% B 40 min 时 95% B 后运行时间 5% B 15 min
柱温	25 °C

第二维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 3.0 x 50 mm, 1.8 µm
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	3 mL/min
空闲流速	不适用
初始梯度	0 min 时 0% B 0.5 min 时 60% B 0.51 min 时 0% B 0.65 min 时 0% B
梯度调制/从动	0 min 5% B 到 30 min 50% B 0.5 min 15% B 到 30 min 95% B 0.51 min 5% B 到 30 min 50% B 0.65 min 5% B 到 30 min 50% B
调制范围	全范围
柱温	60 °C
调制时间	0.65 min
定量环设置	两个 80 µL 定量环
进样量	5 µL
注射针清洗	使用甲醇清洗 6 s
样品温度	8 °C
二维 DAD 检测	信号 260 nm/4 nm, 参比关闭 80 Hz, 60 mm 最大光强流通池

**食品检测 — 初榨橄榄油的质量控制**

第一维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 959759-912)
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	甲醇 + 0.1% 甲酸
流速	50 μL/min
梯度	0 min 时 5% B 60 min 时 95% B 80 min 时 95% B 后运行时间 5% B 30 min
柱温	25 °C
第二维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus, C18, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 959757-302)
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	3 mL/min
空闲流速	不适用
初始梯度	0 min 时 5% B 0.35 min 时 15% B 0.36 min 时 5% B 0.5 min 时 5% B 后运行时间 5% B 30 min
梯度调制/从动	不适用
调制范围	全范围
柱温	60 °C
调制时间	0.5 min
定量环设置	两个 60 μL 定量环, 正进正冲连接
进样量	20 μL
注射针清洗	使用甲醇清洗 6 s
样品温度	6 °C
二维 DAD 检测	DAD 与 MS 之间 1:1 分流 信号 260 nm/4 nm, 参比 360 nm/100 nm 信号 280 nm/4 nm, 参比 360 nm/100 nm 80 Hz
质谱检测	ESI- 气体流速 9 L/min 气体温度 300 °C 雾化器压力 60 psi 鞘气流速 12 L/min 鞘气温度 350 °C 毛细管电压 -4500 V 喷嘴电压 -300V 采集速率 10 谱图/s

## 食品检测 - 啤酒的分析 I

第一维色谱柱	TOSOH TSKgel Super Oligo PW, 6.0 x 150 mm
溶剂 A	20% 甲醇水溶液 + 50 mM 乙酸铵
溶剂 B	甲醇
流速	100 µL/min
梯度	0 min 时 0% B 60 min 时 0% B 65 min 时 20% B 70 min 时 20% B
柱温	40 °C

第二维色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT SB-Aq, 3.0 x 50mm, 1.8 µm (部件号 827975-314)
溶剂 A	水
溶剂 B	乙腈
流速	2 mL/min
空闲流速	不适用
初始梯度	0 min 时 0% B 0.5 min 时 20% B 0.51 min 时 0% B 0.65 min 时 0% B
梯度调制/从动	不适用
调制范围	全范围
柱温	50 °C
调制时间	0.65 min
定量环设置	两个 40 µL 定量环
进样量	5 µL
注射针清洗	不适用
样品温度	不适用
二维 DAD 检测	信号 210 nm/4 nm, 参比关闭 信号 254 nm/4 nm, 参比关闭

## 食品检测 - 啤酒的分析 II

第一维色谱柱 Agilent ZORBAX 300-SCX, 2.1 x 150 mm, 5 µm (部件号 883700-714)

溶剂 A 水 + 10 mM 乙酸铵 (等度)

溶剂 B 不适用

流速 80 µL/min

梯度 总运行时间 25 min

柱温 40 °C

第二维色谱柱 Agilent ZORBAX RRHT SB-Aq, 3.0 x 50 mm, 1.8 µm (部件号 827975-314)

溶剂 A 水

溶剂 B 乙腈

流速 2 mL/min

空闲流速 不适用

初始梯度  
0 min 时 0% B  
0.5 min 时 20% B  
0.51 min 时 0% B  
0.65 min 时 0% B

梯度调制/从动 不适用

调制范围 全范围

柱温 50 °C

调制时间 0.65 min

定量环设置 两个 40 µL 定量环

进样量 5 µL

注射针清洗 不适用

样品温度 不适用

二维 DAD 检测  
信号 210 nm/4 nm, 参比关闭  
信号 254 nm/4 nm, 参比关闭

### 食品检测 - 啤酒的分析 III

第一维色谱柱 Agilent ZORBAX Poroshell 120 SB-C18, 2.1 x 150 mm, 2.7  $\mu$ m (部件号 683775-902)

溶剂 A	水
溶剂 B	乙腈
流速	100 $\mu$ L/min
梯度	0 min 时 0% B 20 min 时 50% B 30 min 时 50% B
柱温	40 $^{\circ}$ C

第二维色谱柱 Agilent ZORBAX RRHD SB-Phenyl, 3.0 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m (部件号 857700-312)

溶剂 A	水
溶剂 B	乙腈
流速	2.5 mL/min
空闲流速	无
初始梯度	0 min 时 0% B 0.5 min 时 20% B 0.51 min 时 0% B 0.65 min 时 0% B
梯度调制/从动	不适用
调制范围	全范围
柱温	50 $^{\circ}$ C
调制时间	0.65 min
定量环设置	两个 40 $\mu$ L 定量环

进样量	5 $\mu$ L
注射针清洗	不适用
样品温度	不适用

二维 DAD 检测 信号 210 nm/4 nm, 参比关闭  
信号 254 nm/4 nm, 参比关闭

## 7.1 展望

“很难预测，尤其是对于未来。” Yogi Berra

多年来我们已经很清楚，分析非常复杂的样品时（例如，含有超过 100 至 200 种成分），二维液相色谱的性能大大超出最高性能的一维液相色谱，尽管需要以很长的分析时间为代价（长达数十小时，见图 7.1）。对于某些涉及复杂样品的非目标分析的重要应用（如代谢组学和蛋白质组学分析），二维方法一直以来都超越一维方法占据着主导地位。然而，我们必须承认，绝大多数液相色谱方法仅被用于分离可能只含有 10 至 30 种成分的中等复杂样品。假如二维液相色谱以某种形式与一维液相色谱竞争，用于分析含有 10 至 100 种成分的样品，那么二维液相色谱甚至可能会取代某些一维液相色谱方法。我们对一维和二维液相色谱的历史认识如图 7.1 所示，该图强调了该领域的最新发展趋势。

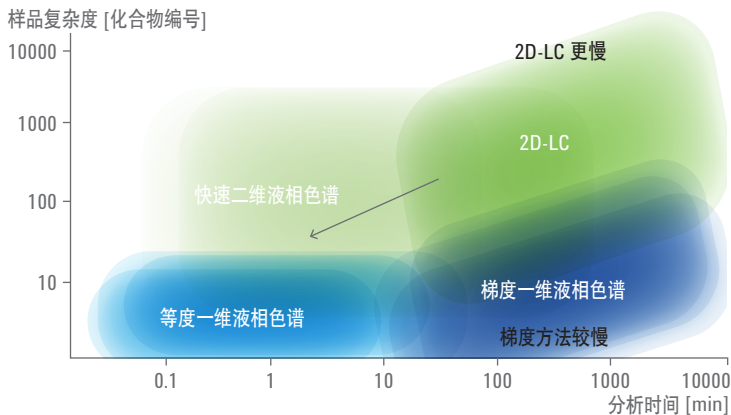


图 7.1 不同液相色谱方法在样品复杂性和所需分析时间方面的分离能力。摘自参考文献 82

当我们从广义上思考分析化学时，可归纳出以下三个二维液相色谱已经发挥着重要作用，或者可能在将来发挥更大作用的领域。

- A. *发现 (或者说非目标分析)* — 蛋白质组学和代谢组学研究项目是这类问题的代表。在这些研究中，我们会挖掘全部数据（由所有的色谱峰和所有的多变量信号组成），以寻找健康/疾病状态的一些指标（生物标记物），以及研究治疗（营养、给药状态）对这些指标的影响等等。这些基本上都是大型的研究项目，涉及许多不同的样品、治疗手段和时间点。此类方法的标志性特征是涉及的样品非常复杂，并且在项目的初始阶段对关键被分析物进行鉴定并不是十分必要。很显然这些研究需要很高的峰容量和更短的分析时间。虽然在线全二维液相色谱可能是最佳选择，但类似于 MudPIT 等的“停流分析”模式在某些情况下可能是更好的折衷方案
- B. *目标分析* — 此类分析中需要鉴定的目标被分析物是已知的。目标被分析物的含量通常较低，且存在于含有多种成分的复杂基质中，因此潜在干扰物较多。解决这类问题的最佳选择是中心切割二维液相色谱或 sLCxLC。生物、环境和法医学来源的样品分析是这类问题的代表
- C. *分析引擎* — 该想法涉及一台非常强大的分离设备，它几乎不需要进行任何方法开发即可分析各种相对简单的、仅包含少量组分（如少于 20 种组分）的样品。它必须具有非常高的峰容量，以克服第 2.2 节“峰容量及相关概念容量与相关概念”中讨论的统计难题，并且它所使用的固定相和分离机理组合应该可以适用于尽可能广泛的样品类型。我们几乎可以肯定，这将需要使用具有不同选择性色谱柱组合的 RPxRP，并配合使用固定梯度和 pH，以减小方法开发的需求。该系统还可能包括一些高度自动化的通用预分离步骤，它也可能包括两个以上的分离维度以提高峰容量。sLCxLC 可能依旧是最佳解决方案。这个方案只需极少的方法开发过程即可成功地应用于多种药物的稳定性分析

很明显，对于上述 A 类别中的问题，我们别无选择，只能使用多维分离。而对于 B 类问题，您必须记住，由于相互作用的变量更多，尤其是需要使两种不同类型的色谱协同工作，二维液相色谱的方法开发将更加复杂。因此我们可以预期，通常方法开发将耗费更多时间。但另一方面，我们也有可能通过二维液相色谱方法开发获得更高的绝对峰容量，因此，该优势将是方法开发的时间投入获得的良好回报。为了获得更强大的方法优势来提高方法开发的时间投入所获得的回报，我们必须要有足够数量的样品分析工作来补偿方法开发的成本。虽然我们对二维液相色谱的优化和应用已或多或少有一些研究，但离解决所有问题还很遥远。要使二维液相色谱开发的效率和有效性达到近年来一维液相色谱开发的水平，我们还有许多工作要做。

在我们看来，对一维和二维液相色谱进行平行比较有两个途径。其中一个主要是理论上的，可回答的问题包括：哪项技术可以在最短的时间内提供给定的峰容量或所观察到的峰数量？第二个角度更实际一些，主要提出一些针对实际问题的见解，包括：哪项技术的单次分析成本最低？哪项技术/方法更稳定？哪项技术的方法开发时间最短？在下面的内容中，我们将略微详细地讨论这些问题。

## 7.2 影响比较一维和二维液相色谱的理论因素

在第 2.5 节“1D 梯度洗脱与在线 LCxLC 的比较”中，我们展示了在 5-10 min 的分析时间内，使用在线 LCxLC 分离玉米种子提取物的有效峰容量超过了高度优化的一维梯度分离的峰容量。最近的一项理论研究<sup>83</sup>表明，当第一维严重采样不足时（这种情况在实际分析中极其常见，尤其是在第一维经过了优化的情况下），通过公式 7.1 能够很好地估计交叉时间 ( $\tau$ ):

$$\tau \approx \frac{1.83 \cdot t_c^2}{2n_c \cdot f_{cov} \cdot \lambda} \cdot n_{c,1D}(t_{g,1D})$$

公式 7.1 交叉时间的计算

交叉时间是二维色谱方法中有效的二维方法峰容量与对应所需要比较的一维方法峰容量相等时的总分析时间。二维色谱的总分析时间通过公式 7.2 中定义的  ${}^1\lambda$  效率因子 ( ${}^1\lambda$ ) 与  ${}^1D$  梯度时间相关联。

$${}^1\lambda \equiv \frac{{}^1t_g}{{}^1t_g + {}^1t_{re-eq}} = \frac{{}^1t_g}{t_{2D, anal}}$$

公式 7.2  ${}^1D$  效率因子的计算

类似地，一维效率因子与一维分析时间相关，如公式 7.3 所示。

$$\lambda_{1D} \equiv \frac{t_{g,1D}}{t_{g,1D} + t_{1D, re-eq}} = \frac{t_{g,1D}}{t_{1D, anal}}$$

公式 7.3 一维效率因子与一维分析时间的关系

公式 7.1 中的所有术语已在其他地方定义（见符号和缩略语）。采用公式 7.4 中公式 2.11 右侧形式的公式，我们现在可以估算一维峰容量。

$$n_{c,1D} \approx \frac{a \cdot t_{g,1D}}{b + t_{g,1D}} = \frac{a \cdot \lambda_{1D} \cdot t_{1D, anal}}{b + \lambda_{1D} \cdot t_{1D, anal}}$$

公式 7.4 估算一维峰容量

在公式 7.4 中替换公式 7.1 中的  $n_{c,1D}$  并求解  $\tau$ ，我们将得到公式 7.5 中所示的简单结果。

$$\tau = 1.83 \frac{{}^2t_c \cdot a}{{}^2n_c \cdot {}^1\lambda \cdot f_{cov}} - \frac{b}{\lambda_{1D}}$$

公式 7.5 通过替换计算交叉时间

这些公式告诉我们，通过最小化 $t_c^2/n_c$ 和 $\lambda_{1D}$ ，以及最大化 $f_{cov}$ 和 $\lambda$ ，能够最大限度地缩短使二维方法达到出色性能的时间。很明显，代表最大一维峰容量的 $a$ （见公式 2.11 和公式 2.13）越大，交叉时间就越长。很显然，对 $f_{cov}$ 的依赖意味着交叉时间将取决于样品。因此，我们必须在获得最高峰容量的同时尽量实现速度最快的二维分离。坦白地说，我们并没有寄希望于主要通过第二维分离来提高分析效率。在可预见的未来，略超过 2 个单位每秒的<sup>2</sup>D 峰容量产生速度将是我们可以预期得到的最佳速度。据此，采用公式 7.5 计算出了表 7.1 中的值。

$f_{cov}$	$\lambda$	$\lambda_{1D}$	a	b	$\tau$ [min]	% $\Delta^{**}$
0.6	0.7	0.9	100	50	2.7	
<b>0.8</b>	0.7	0.9	100	50	1.8	-34
0.6	<b>0.85</b>	0.9	100	50	2.1	-24
0.6	0.7	<b>0.95</b>	100	50	2.8	2
0.6	0.7	0.9	<b>200</b>	50	6.3	134
0.6	0.7	0.9	100	<b>100</b>	1.8	-34

表 7.1 系统参数对交叉时间的影响，假设 $^2n_c/n_c t_c = 2$  峰/s。变化的参数用粗体表示。

\*\* 这是与第一行给出的时间结果相比，交叉时间的百分比变化

第一行代表每个参数的适当值。然后改变参数，每次一个，将其改为一个稍大但在合理范围内的期望值。最后一列是第一行交叉时间的变化百分比，倒数第二列是以分钟为单位的估计交叉时间。很明显，对于时间在数秒到大约 2-3 分钟范围内的分析，一维液相色谱具有绝对的优势。如果能够接受更长的分析时间，则应该认真考虑是否使用二维液相色谱。

从动梯度（见第 4.3 节“通过使用分离空间或从动梯度优化性能”部分）等技术的确能使 $f_{cov}$ 更接近 1.0，大概可将其从当前约为 0.4 - 0.6 的一般值提高到差不多 0.8 - 0.9；但是，这只能使 $\tau$ 降低 30-50%，或反过来说，在 $\tau$ 固定的情况下，将有效二维峰容量提高 30-50%。

在公式 7.1 中值得注意的是，对于一维方法而言，其峰容量是相对独立的数值，但是对于二维方法，在第一维分离中获得的峰容量的变化会显著影响方法的整体表现。这主要是由于在二维方法存在严重采样不足的情况下，其有效峰容量和第一维峰容量有关，而一维方法则不存在类似问题（见第 2.4 节“LCxLC 中峰容量的基本原理”）。这意味着如果我们通过使用更小粒径的填料、更高的压力、更高的柱温或使用最佳流速等途径增加一维方法的峰容量，交叉时间也会增加，从而使得二维方法与一维液相色谱相比的优势不再明显。但不管怎样，在分析时间足够长的前提下，二维液相方法的分离能力始终高于一维液相方法，因此，在非常复杂的发现类问题范畴内，二维液相色谱将始终占有优于一维液相色谱的主导地位。

### 7.3 影响比较一维和二维液相色谱的实际因素

如果我们回顾过去十年左右的时间，会发现大多数液相色谱分离都是在等度条件下进行的。这是以下几个原因造成的结果。

- 以前的梯度洗脱仪器不像现在这样可靠，并且需要使用体积比现在大得多的梯度混合器
- 基于梯度洗脱的理论和实际应用的通用方法开发指导原则还未完整建立<sup>18</sup>
- 还有可能是最重要的一点，即由于色谱柱需要很长时间进行再平衡，梯度洗脱在很多情况下比等度洗脱慢得多。以前，推荐使用 10 - 20 倍柱体积的初始洗脱液冲洗色谱柱来进行平衡，但是现在，至少对于 RP-LC，使用 2 - 3 倍柱体积的洗脱液进行冲洗通常就足以获得可重现的结果<sup>84-86</sup>

最后一个原因可能是梯度洗脱成为常规应用的最大障碍。但是，人们分离更复杂样品的需求，以及对实现这一目标所需的更强大的梯度洗脱能力的需求，极大推动了梯度洗脱的应用，因此现在市场上的绝大多数液相色谱仪器均为梯度仪器。这种历史趋势的示意图如图 7.1 所示，该图还扩展地包含了二维液相色谱可能的应用趋势。

二维液相色谱的应用也需要实现类似的进步，以克服该技术实现普遍应用和常规应用所面临的障碍。分析所需的二维液相色谱仪器现在已经变得更加稳定，并且可从多个主流仪器制造商处购得。但是，更全面、更精确，并且易于使用的方法开发指南的建立仍处于初始阶段。就像对于梯度洗脱一维液相色谱一样，人们针对二维液相色谱当前存在的局限性的一些普遍观念也可以被颠覆。

## 7.4 二维液相色谱仪器的发展

在过去的十年中，我们在硬件和软件的设计和应用方面已经取得了巨大进展，尤其是针对二维液相色谱的应用。硬件发展的首要成就是分析级泵系统的性能改进，现在其压力范围可达 1300 bar (20000 psi)，梯度延迟体积低于 100  $\mu$ L，并且在超快速（例如 < 15 s）洗脱条件下可达到前所未有的精密度。另外，恒流输送泵可以满足二维分析中的流速需求，同时可以保证压力稳定，从而减少了压力波动对于柱寿命的影响。这些性能特点对于提高二维液相色谱与一维液相色谱相比的竞争力非常重要，尤其是对于分析时间在 10 - 60 min 范围内的中等时间分析。但是，对于二维液相色谱来说非常重要的超快 <sup>2</sup>D 分离速度目前仅与质谱实现了半兼容，因为在样品进入 MS 接口之前，它们仍然需要对分析流速进行分流。

## 7.5 二维液相色谱的其他挑战和机遇

### 7.5.1 二维分离方法的数据结构优势

相比一维液相色谱，二维液相色谱的性能还有很大的提升空间，要实现二维液相色谱的常规应用，我们还有很多开发工作有待完成。

使用单变量（如单波长 UV）检测器进行二维色谱分离，我们能够以类似一维色谱与多变量（如 DAD 或 MS）检测器联用的方式通过数学手段对无法色谱分离的峰进行区分。即是说可以利用数据本身的某些数学特性（比如光谱或 m/z 差异）通过数学手段来实现二次分离。

以配备 DAD 检测器的一维液相色谱为例。想象一下，有两个组分产生了完全重叠的峰（相同的保留时间，以及相同的峰形/宽），但是这两个组分具有可以相互区分的吸收光谱。理论上讲，利用一些数学方法，仍然能够将上述色谱峰分离为两个组分峰。当然，光谱的差别越大，定量

的精密度和准确度就会越高；类似地，两个峰的色谱分离度越高，获得可接受结果所需的光谱差异也就越小。现在我们以使用单波长检测器获得的二维色谱图为例。即使两个组分在<sup>1</sup>D 色谱柱上完全重叠，只要它们在第二维分离中未完全重叠，我们就仍然能够分析它们。

此时我们需要指出的是，许多种不同的数学方法都可以利用第二个分离维度（或多变量检测器）提供的额外信息实现数学曲线分离。这些数据结果的双线性结构让我们能够使用两种强大的化学计量学方法，即平行因子分析 (PARAFAC) 和广义秩消法或广义秩消失因子分析 (GRAM)。与不是基于因子分析的方法相比，这些技术有许多非常重要的优点。

- GRAM 和 PARAFAC 均可以为基线建模，因此不需要再通过空白分析来评估基线
- 两者均不受检测器噪音的影响
- 即使存在未知干扰，也可获得精密、准确的定量结果

现在让我们来看看二维液相色谱与多变量检测器联用在未来的应用趋势。这些数据本来就具有三线性而非双线性结构。与联用式一维色谱技术相比，LCxLC-DAD 等二维联用式方法拥有巨大的、公认的优势。这就是所谓的三线性优势。将 PARAFAC 和 GRAM 方法应用于组分数量已知的数据结果，可得到一个绝对唯一的答案。也就是说，在实验数据和建模数据间，不存在具有一组更小残差的其他答案。但是我们必须知道采用这些技术进行分段分析的数据中，在分段过程中对信号有贡献的组分的数目。这是进行实际数据分析所面临的主要困难。我们所说的答案是指将数据结构分解为一组<sup>1</sup>D 和<sup>2</sup>D 色谱峰（保留时间、曲线）的结果，以及其中每个因子都代表一种化学成分或背景信号组分的光谱曲线。

为了使因子分析方法有效，我们必须假设数据是绝对线性的。这样才不会产生色谱超载和非线性检测器响应。此外，在单一的二维色谱图结果中，第二维相同的化合物的色谱峰形或保留时间不可以有变化，并且如果数据集中包括不同样品的一系列分析，那么相同化合物在任一维度中都不可以出现保留或峰形的变化。实际上，使用 PARAFAC 和 GRAM 算法时，即使色谱峰保留仅出现十分之几的变化，也会使  $\sigma$  值产生灾难性的后果。很显然这些都是非常严格的要求。当满足这些要求时，三线优势是非常强大的，并且通过对数据进行数学处理，可能会极大提升分离性能，在样品的实际二维液相色谱物理分离中，分离性能也会随之提升<sup>87</sup>。这些优势突出展示于图 7.2 中。在 <sup>1</sup>D 和 <sup>2</sup>D 分离中所有目标组分完全重叠的情况下，我们看到通过 PARAFAC 可以找出三个组分。

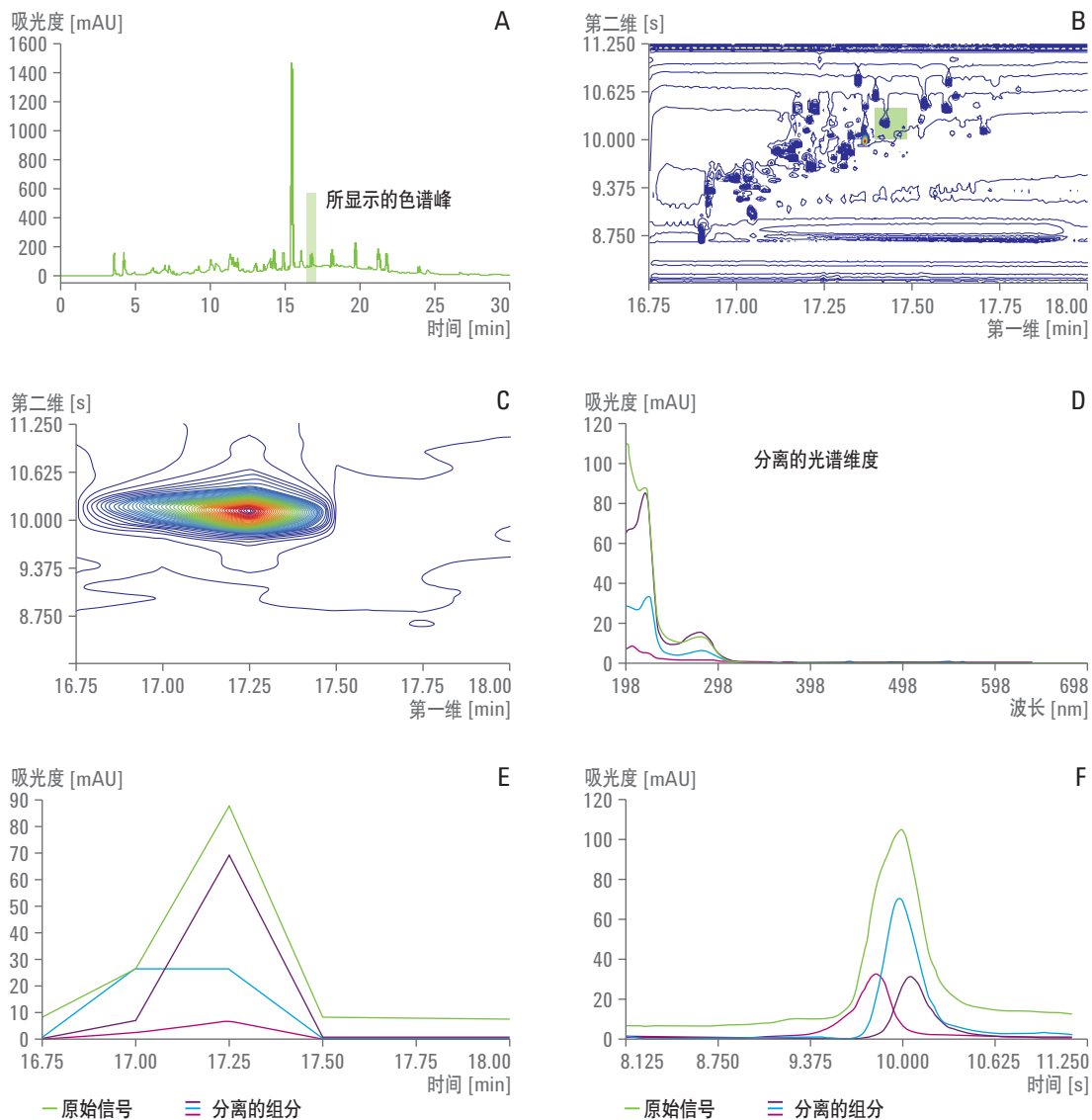


图 7.2 应用 PARAFAC 算法分析 2D-LC-DAD 数据。该图由 Robert Allen 博士提供。

图 A: 第一维色谱图, 其中绿色区域指示了随后要进行数学处理的峰。

图 B: 定义目标空间区域的二维等高线图。

图 C: 图 B 标示区域的放大图, 表明只观察到一个峰最大值。

图 D: 通过 PARAFAC 找到的图 C 所示区域中的组分的吸收光谱。

图 E: 由 PARAFAC 确定的严重重叠的 <sup>1</sup>D 色谱峰曲线。绿色曲线是检测器在 220 nm 处观察到的, 通过 PARAFAC 分离了红色、蓝色和紫色的峰。

图 F: 通过 PARAFAC 分离得到的严重重叠的 <sup>2</sup>D 色谱峰曲线。绿色曲线是检测器在 220 nm 处观察到的峰, 通过 PARAFAC 分离了红色、蓝色和紫色的峰

---

## 参考文献

1. Filgueira, M.R., Huang, Y., Witt, K., Castells, C., Carr, P.W., Improving peak capacity in fast online comprehensive two-dimensional liquid chromatography with post-first-dimension flow splitting, *Anal.Chem.*, **2011**, *83*, 9531–9539, doi:10.1021/ac202317m
2. Stoll, D., Cohen, J., Carr, P., Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, *1122*, doi:10.1016/j.chroma.2006.04.058
3. Marriott, P.J., Schoenmakers, P.J., Wu, Y., Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - an update, *LC-GC Eur.*, **2012**, 266, 268, 270, 272–275
4. Synge, R., Applications of partition chromatography, *Nobel Lecture*, **1952**
5. Dent, C.E., Stepka, W., Steward, F.C., Detection of the free amino-acids of plant cells by partition chromatography, *Nature*, **1947**, *160*, 682–683. doi:10.1038/160682a0
6. Erni, F., Frei, R.W., Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures, *J. Chromatogr. A.*, **1978**, *149*, 561–569, doi:10.1016/S0021-9673(00)81011-0
7. Bushey, M.M., Jorgenson, J.W., Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins, *Anal.Chem.*, **1990**, *62*, 161–167, doi:10.1021/ac00201a015
8. Hyötyläinen, T., Riekkola, M.-L., On-line coupled liquid chromatography – gas chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2003**, *1000*, 357–384, doi:10.1016/S0021-9673(03)00181-X

9. Cortes, H.J., Campbell, R.M., Himes, R.P., Pfeiffer, C.D., On-line coupled liquid chromatography and capillary supercritical fluid chromatography: Large-volume injection system for capillary SFC, *Journal of Microcolumn Separations*, **1992**, *4*, 239–244, doi:10.1002/mcs.1220040310
10. Chambers, A.G., Mellors, J.S., Henley, W.H., Ramsey, J.M., Monolithic integration of two-dimensional liquid chromatography – Capillary electrophoresis and electrospray ionization on a microfluidic device, *Anal.Chem.*, **2011**, *83*, 842–849, doi:10.1021/ac102437z
11. Guiochon, G., Marchetti, N., Mriziq, K., Shalliker, R., Implementations of two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2008**, *1189*, 109–168, doi:10.1016/j.chroma.2008.01.086
12. Zhang, K., Li, Y., Tsang, M., Chetwyn, N.P., Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection: Liquid Chromatography, *Journal of Separation Science*, **2013**, *36*, 2986–2992, doi:10.1002/jssc.201300493
13. Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates, J.R., An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics, *Anal.Chem.*, **2001**, *73*, 5683–5690, doi:10.1021/ac010617e
14. Bedani, F., Kok, W.T., Janssen, H.-G., A theoretical basis for parameter selection and instrument design in comprehensive size-exclusion chromatography x liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, *1133*, 126–134, doi:10.1016/j.chroma.2006.08.048
15. Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R.J.J., Brinkman U.A.T., Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) - Introduction and Instrumental Setup, *Trends Analyt.Chem.*, **2006**, *25*, 438–454, doi:10.1016/j.trac.2006.03.002
16. Davis, J.M., Giddings, J.C., Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms, *Anal.Chem.*, **1983**, *55*, 418–424, doi:10.1021/ac00254a003
17. Martin, M., Herman, D.P., Guiochon, G., Probability distributions of the number of chromatographically resolved peaks and resolvable components in mixtures, *Anal.Chem.*, **1986**, *58*, 2200–2207, doi:10.1021/ac00124a019

18. Snyder, L.R., High-performance gradient elution:the practical application of the linear-solvent-strength model, *John Wiley, Hoboken, NJ*, **2007**
19. Huang, Y., Gu, H., Filgueira, M., Carr, P.W., An experimental study of sampling time effects on the resolving power of on-line two-dimensional high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2011**, *1218*, 2984–2994, doi:10.1016/j.chroma.2011.03.032
20. Snyder, L.R., Introduction to modern liquid chromatography, 3rd ed., *Wiley, Hoboken, NJ*, **2010**
21. Poppe, H., Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *J. Chromatogr. A.*, **1997**, *778*, 3–21, doi:10.1016/S0021-9673(97)00376-2
22. Wang, X., Stoll, D.R., Carr, P.W., Schoenmakers P.J., A graphical method for understanding the kinetics of peak capacity production in gradient elution liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, *1125*, 177–181, doi:10.1016/j.chroma.2006.05.048
23. Carr, P.W., Wang, X., Stoll, D.R., Effect of pressure, particle size, and time on optimizing performance in liquid chromatography, *Anal.Chem.*, **2009**, *81*, 5342-5353, doi:10.1021/ac9001244
24. Hsu, S.-H., Raglione, T., Tomellini, S.A., Floyd, T.R., Sagliano, N. Jr., Hartwick, R.A., Zone compression effects in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **1986**, *367*, 293–300, doi:10.1016/S0021-9673(00)94850-7
25. Schure, M.R., Limit of detection, dilution factors, and technique compatibility in multidimensional separations utilizing chromatography, capillary electrophoresis, and field-low fractionation, *Anal.Chem.*, **1999**, *71*, 1645–1657, doi:10.1021/ac981128q
26. Vivó-Truyols, G., van der Wal, S., Schoenmakers P.J., Comprehensive study on the optimization of online two-dimensional liquid chromatographic systems considering losses in theoretical peak capacity in first- and second-dimensions:A pareto-optimality approach, *Anal.Chem.*, **2010**, *82*, 8525–8536, doi:10.1021/ac101420f

27. Giddings, J. in *Multidimensional Chromatography: Techniques and Applications*; Cortes, H. Ed.; Marcel Dekker: New York, **1990**.
28. Giddings, J.C., Sample dimensionality: A predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation, *J. Chromatogr. A.*, **1995**, *703*, 3–15, doi:10.1016/0021-9673(95)00249-M
29. This is a term used facetiously by Peter Schoenmakers to describe the clusters made by groups of different kinds of polymers having a range in molecular sizes and some other distinctive chemical property
30. Carr, P., Davis, J., Rutan, S., Stoll, D. in *Advances in Chromatography*; Grushka, E., Grinberg, N. Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **2012**; pp 140–222.
31. Stoll, D.R., Wang, X., Carr, P.W., Comparison of the Practical Resolving Power of One- and Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Metabolomic Samples, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 268–278, doi:10.1021/ac701676b
32. Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E., Gebler, J.C., Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 6426–6434, doi:10.1021/ac050923i
33. Rutan, S.C., Davis, J.M., Carr, P.W., Fractional coverage metrics based on ecological home range for calculation of the effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations, *J. Chromatogr. A.*, **2012**, *1255*, 267–276, doi:10.1016/j.chroma.2011.12.061
34. Gilar, M., Fridrich, J., Schure, M.R., Jaworski, A., Comparison of Orthogonality Estimation Methods for the Two-Dimensional Separations of Peptides, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 8722–8732, doi:10.1021/ac3020214
35. Murphy, R.E., Schure, M.R., Foley, J.P., Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 1585–1594, doi:10.1021/ac971184b
36. Davis, J.M., Stoll, D.R., Carr, P.W., Effect of First-Dimension Undersampling on Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 461–473, doi:10.1021/ac071504j

- 37.** Bedani, F., Schoenmakers P.J., Janssen, H.-G., Theories to support method development in comprehensive two-dimensional liquid chromatography - A review: *Liquid Chromatography, Journal of Separation Science*, **2012**, *35*, 1697–1711, doi:10.1002/jssc.201200070
- 38.** Murphy, R., Schure, M. in *Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences; Cohen, S., Schure, M., Eds; Wiley:Hoboken, NJ, 2008*; pp 127–146.
- 39.** van der Horst, A., Schoenmakers P.J., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers, *J. Chromatogr. A.*, **2003**, *1000*, 693–709, doi:10.1016/S0021-9673(03)00495-3
- 40.** Stoll, D.R., Li, X., Wang, X., Carr, P.W., Porter, S.E.G., Rutan, S.C., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2007**, *1168*, 3–43, doi:10.1016/j.chroma.2007.08.054
- 41.** Verstraeten, M., Pursch, M., Eckerle, P., Luong, J., Desmet, G., Thermal Modulation for Multidimensional Liquid Chromatography Separations Using Low-Thermal-Mass Liquid Chromatography (LC), *Anal.Chem.*, **2011**, *83*, 7053–7060, doi:10.1021/ac201207t
- 42.** Wilson, S.R., Jankowski, M., Pepaj, M., Mihailova, A., Boix, F., Vivo Truyols, G., *et al.*, 2D LC Separation and Determination of Bradykinin in Rat Muscle Tissue Dialysate with On-Line SPE-HILIC-SPE-RP-MS, *Chromatographia*, **2007**, *66*, 469–474, doi:10.1365/s10337-007-0341-4
- 43.** Liang, Z., Li, K., Wang, X., Ke, Y., Jin, Y., Liang, X., Combination of off-line two-dimensional hydrophilic interaction liquid chromatography for polar fraction and two-dimensional hydrophilic interaction liquid chromatography x reversed-phase liquid chromatography for medium-polar fraction in a traditional Chinese medicine, *J. Chromatogr. A.*, **2012**, *1224*, 61–69, doi:10.1016/j.chroma.2011.12.046
- 44.** Giddings, J.C., Two-dimensional separations:concept and promise, *Anal. Chem.*, **1984**, *56*, 1258A–1270A, doi:10.1021/ac00276a003
- 45.** Stoll, D.R., Carr, P.W., Fast, Comprehensive Two-Dimensional HPLC Separation of Tryptic Peptides Based on High-Temperature HPLC, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 5034–5035, doi:10.1021/ja050145b

46. Opiteck, G.J., Jorgenson, J.W., Moseley, M.A., Anderegg, R.J., Two-dimensional microcolumn HPLC coupled to a single-quadrupole mass spectrometer for the elucidation of sequence tags and peptide mapping, , *J. Microcol. Sep.*, **1998**, *10*, 365–375, doi:10.1002/(SICI)1520-667X(1998)10:4<365::AID-MCS6>3.0.CO;2-E
47. Dugo, P., Kumm, T., Crupi, M., Cotroneo, A., Mondello, L., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in the analyses of triacylglycerols in natural lipidic matrixes, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, *1112*, 269–275, doi:10.1016/j.chroma.2005.10.070
48. Elsner, V., Laun, S., Melchior, D., Köhler, M., Schmitz, O.J., Analysis of fatty alcohol derivatives with comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **2012**, *1268*, 22–28, doi:10.1016/j.chroma.2012.09.072
49. Mondello, L., Tranchida, P.O., Stanek, V., Jandera, P., Dugo, G., Dugo, P., Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis, *J. Chromatogr. A.*, **2005**, *1086*, 91–98, doi:10.1016/j.chroma.2005.06.017
50. Jiang, X., van der Horst, A., Lima, V., Schoenmakers, P.J., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for the characterization of functional acrylate polymers, *J. Chromatogr. A.*, **2005**, *1076*, 51–61, doi:10.1016/j.chroma.2005.03.135
51. Adrian, J., Two-dimensional chromatography of complex polymers Part 1. Analysis of a graft copolymer by two-dimensional chromatography with on-line FTIR detection, *Polymer*, **2000**, *41*, 2439–2449, doi:10.1016/S0032-3861(99)00402-4
52. USP Column Equivalency Application
53. Németh, T., Haghedooren, E., Noszál, B., Hoogmartens, J., Adams, E., Three methods to characterize reversed phase liquid chromatographic columns applied to pharmaceutical separations, *Journal of Chemometrics*, **2008**, *22*, 178–185, doi:10.1002/cem.1108
54. Snyder, L.R., Dolan, J.W., Carr, P.W., A new look at the selectivity of RPC columns, *Anal.Chem.*, **2007**, *79*, 3254–3262, doi:10.1021/ac071905z

- 55.** Wilson, N.S., Nelson, M.D., Dolan, J.W., Snyder, L.R., Wolcott, R.G., Carr, P.W., Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. I. A general quantitative relationship, *J. Chromatogr. A.*, **2002**, *961*, 171–193, doi:10.1016/S0021-9673(02)00659-3
- 56.** <http://hplccolumns.org/index.php>, accessed November 1, **2014**
- 57.** <http://www.usp.org/usp-nf/compendial-tools/pqri-approach-column-equiv-tool>, accessed November 1, **2014**
- 58.** Zhang, Y., Carr, P.W., A visual approach to stationary phase selectivity classification based on the Snyder – Dolan Hydrophobic-Subtraction Model, *J. Chromatogr. A.*, **2009**, *1216*, 6685–6694, doi:10.1016/j.chroma.2009.06.048
- 59.** Alexander, A.J., Ma, L., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography separations of pharmaceutical samples using dual Fused-Core columns in the 2nd dimension, *J. Chromatogr. A.*, **2009**, *1216*, 1338–1345, doi:10.1016/j.chroma.2008.12.063
- 60.** Li, D., Schmitz, O.J., Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, doi:10.1007/s00216-013-7089-5
- 61.** Dugo, P., Škeříková, V., Kumm, T., Trozzi, A., Jandera, P., Mondello, L., Elucidation of Carotenoid Patterns in Citrus Products by Means of Comprehensive Normal-Phase x Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 7743–7750, doi:10.1021/ac061290q
- 62.** Francois, I., Devilliers, A., Tienpont, B., David, F., Sandra, P., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography applying two parallel columns in the second dimension, *J. Chromatogr. A.*, **2008**, *1178*, 33–42, doi:10.1016/j.chroma.2007.11.032
- 63.** Uliyanchenko, E., Cools, P.J.C.H., van der Wal, S., Schoenmakers P.J., Comprehensive Two-Dimensional Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography for Separations of Polymers, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 7802–7809, doi:10.1021/ac3011582

64. Bedani, F., Kok, W.T., Janssen, H.-G., Optimal gradient operation in comprehensive liquid chromatography x liquid chromatography systems with limited orthogonality, *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, *654*, 77–84, doi:10.1016/j.aca.2009.06.042
65. Stevenson, P.G., Mnatsakanyan, M., Guiochon, G., Shalliker, R.A., Peak picking and the assessment of separation performance in two-dimensional high performance liquid chromatography, *The Analyst*, **2010**, *135*, 1541, doi:10.1039/b922759h
66. Peters, S., Vivó-Truyols, G., Marriott P.J., Schoenmakers P.J., Development of an algorithm for peak detection in comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2007**, *1156*, 14–24, doi:10.1016/j.chroma.2006.10.066
67. Reichenbach, S.E., Tian, X., Cordero, C., Tao, Q., Features for non-targeted cross-sample analysis with comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2012**, *1226*, 140–148, doi:10.1016/j.chroma.2011.07.046
68. Reichenbach, S.E., Ni, M., Zhang, D., Ledford, E.B., Image background removal in comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2003**, *985*, 47–56, doi:10.1016/S0021-9673(02)01498-X
69. Reichenbach, S.E., Ni, M., Kottapalli, V., Visvanathan, A., Information technologies for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Chemometr. Intell. Lab.*, 2004, *71*, 107–120, doi:10.1016/j.chemolab.2003.12.009
70. Skov, T., Hoggard J.C., Bro, R., Synovec R.E., Handling within run retention time shifts in two-dimensional chromatography data using shift correction and modeling, *J. Chromatogr. A.*, **2009**, *1216*, 4020–4029, doi:10.1016/j.chroma.2009.02.049
71. Hoggard, J.C., Synovec, R.E., Parallel Factor Analysis (PARAFAC) of Target Analytes in GC x GC-TOFMS Data:Automated Selection of a Model with an Appropriate Number of Factors, *Anal.Chem.*, **2007**, *79*, 1611–1619, doi:10.1021/ac061710b
72. Hoggard, J.C., Synovec, R.E., Automated Resolution of Nontarget Analyte Signals in GC x GC-TOFMS Data Using Parallel Factor Analysis, *Anal.Chem.*, **2008**, *80*, 6677–6688, doi:10.1021/ac800624e

- 73.** Bailey, H.P., Rutan, S.C., Carr, P.W., Factors that affect quantification of diode array data in comprehensive two-dimensional liquid chromatography using chemometric data analysis, *J. Chromatogr. A.*, **2011**, *1218*, 8411–8422, doi:10.1016/j.chroma.2011.09.057
- 74.** Porter, S.E.G., Stoll, D.R., Rutan, S.C., Carr, P.W., Cohen, J.D., Analysis of Four-Way Two-Dimensional Liquid Chromatography-Diode Array Data: Application to Metabolomics, *Anal.Chem.*, **2006**, *78*, 5559–5569, doi:10.1021/ac0606195
- 75.** Mazet, V., Carteret, C., Brie, D., Idier, J., Humbert, B., Background removal from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function, *Chemometr. Intell. Lab.*, **2005**, *76*, 121–133, doi:10.1016/j.chemolab.2004.10.003
- 76.** Moore, A.W., Jorgenson, J.W., Median filtering for removal of low-frequency background drift, *Anal.Chem.*, **1993**, *65*, 188–191, doi:10.1021/ac00050a018
- 77.** Filgueira M.R., Castells, C.B., Carr, P.W., A Simple, Robust Orthogonal Background Correction Method for Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Anal.Chem.*, **2012**, *84*, 6747–6752, doi:10.1021/ac301248h
- 78.** Latha, I., Reichenbach, S.E., Tao, Q., Comparative analysis of peak-detection techniques for comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2011**, *1218*, 6792–6798, doi:10.1016/j.chroma.2011.07.052
- 79.** Thekkudan, D.F., Rutan, S.C., Carr, P.W., A study of the precision and accuracy of peak quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography in time, *J. Chromatogr. A.*, **2010**, *1217*, 4313–4327, doi:10.1016/j.chroma.2010.04.039
- 80.** Seeley, J., Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2002**, *962*, 21–27, doi:10.1016/S0021-9673(02)00461-2
- 81.** Adcock, J.L., Adams, M., Mitrevski, B.S., Marriott, P.J., Peak Modeling Approach to Accurate Assignment of First-Dimension Retention Times in Comprehensive Two-Dimensional Chromatography, *Anal.Chem.*, **2009**, *81*, 6797–6804, doi:10.1021/ac900960n

- 82.** Stoll, D.R., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *Ph.D. Dissertation, University of Minnesota*, **2007**
- 83.** Potts, L.W., Carr, P.W., Analysis of the temporal performance of one versus on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2013**, *1310*, 37–44, doi:10.1016/j.chroma.2013.07.102
- 84.** Schellinger, A.P., Stoll, D.R., Carr, P.W., High speed gradient elution reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2005**, *1064*, 143–156, doi:10.1016/j.chroma.2004.12.017
- 85.** Schellinger, A.P., Stoll, D.R., Carr, P.W., High speed gradient elution reversed phase liquid chromatography of bases in buffered eluents, *J. Chromatogr. A.*, **2008**, *1192*, 54–61, doi:10.1016/j.chroma.2008.02.049
- 86.** Schellinger, A.P., Stoll, D.R., Carr, P.W., High-speed gradient elution reversed-phase liquid chromatography of bases in buffered eluents, *J. Chromatogr. A.*, **2008**, *1192*, 41–53, doi:10.1016/j.chroma.2008.01.062
- 87.** Davis, J.M., Rutan, S.C., Carr, P.W., Relationship between selectivity and average resolution in comprehensive two-dimensional separations with spectroscopic detection, *J. Chromatogr. A.*, **2011**, *1218*, 5819–5828, doi:10.1016/j.chroma.2011.06.086
- 88.** Elsner, V., Analyse fettchemischer Produkte mittels comprehensiver zweidimensionaler Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (LCxLC-MS), unv.Diss., der Bergischen Universität Wuppertal, September 2013. (urn:nbn:de:hbz:468-20140113-115443-6)

更多信息

**[www.agilent.com.cn](http://www.agilent.com.cn)**

查找当地的安捷伦客户中心:

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)**

安捷伦客户服务中心:

**免费专线: 800-820-3278**

**400-820-3278 (手机用户)**

联系我们:

**[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价:

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

**[www.agilent.com/chem/2d-1c](http://www.agilent.com/chem/2d-1c)**

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2015

2015年5月15日, 中国印刷

5991-2359CHCN



**Agilent Technologies**