技术概述

带主动溶剂调制功能的 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案

提高挑战性分离条件组合的分离度与灵敏度

作者

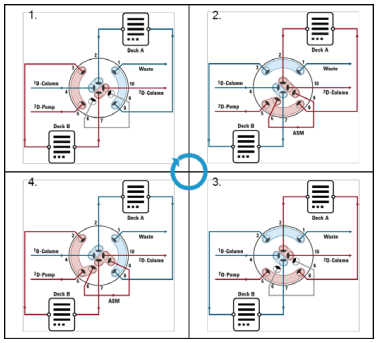
Sonja Krieger

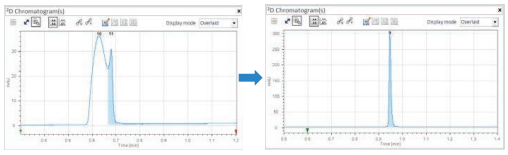
安捷伦科技公司

摘要

二维液相色谱 (2D-LC) 方法开发中的一项重大挑战是第一维 (^{1}D) 与第二维 (^{2}D) 溶剂系统不兼容。在充满挑战的分离系统组合中，^{2}D 中可观察到流穿峰、峰展宽或变形峰等体积过载效应。主动溶剂调制 (ASM) 提供了一种基于阀的方法来解决该问题，可提高 ^{2}D 中的分离度和灵敏度。本篇技术概述阐述了 ASM 的原理，并展示其在两种反相 (RP) 液相色谱分离组合及亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 和 RPLC 组合中发挥的作用。







前言

在分析复杂样品或样品中含有难分离的目标化合物时，仅依靠一维液相色谱 (1D-LC) 无法实现充分分离。二维液相色谱 (2D-LC) 因此成为了一种更好的选择[1]。Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案可进行全二维液相色谱 (LCxLC)、多中心切割二维液相色谱 (MHC) 以及高分辨采样 (HiRes) 二维液相色谱，从而改善整个样品的分离 (LCxLC)，或实现一维液相色谱无法实现的目标化合物分离 (MHC 和 HiRes 二维液相色谱)。

二维液相色谱方法开发中的一项挑战是第一维 (^{1}D) 与第二维 (^{2}D) 溶剂系统不兼容[2]。在基于定量环的 2D-LC 中，^{1}D 洗脱液中的分析物从 ^{1}D 转移到 ^{2}D 中。转移到 ^{2}D 的 ^{1}D 洗脱液体积远大于 ^{2}D 色谱柱体积时，^{1}D 洗脱液在一定时间内会成为 ^{2}D 色谱柱的流动相[1]。对于 ^{1}D 洗脱液中的分析物在 ^{2}D 色谱柱中保留性较低的分离系统组合，^{2}D 中可能会出现流穿峰、峰展宽或变形峰等体积过载效应[1,2]。主动溶剂调制 (ASM) 解决以上问题的方法是，在 ^{2}D 色谱柱前用 ^{2}D 流动相稀释 ^{1}D 洗脱液，使分析物在 ^{2}D 色谱柱头处集中[2]。

本篇技术概述阐述了主动溶剂调制的原理，并展示其在两种反相 (RP) 液相色谱分离组合及亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 和 RPLC 组合中发挥的作用。

实验部分

设备

Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统包括以下模块：

- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备冷却装置（选件 #100）
- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- 两台 Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)，配备 10 mm 最大光强卡套式流通池 (G4212-60008)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，带二维液相色谱阀、主动溶剂调制 (G4243A)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40 µL 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000)

质谱检测器 (MSD) 采用配备安捷伦喷射流电喷雾离子源 (G1958-65538) 的 Agilent 6150 单四极杆液质联用仪 (G6150BA) 进行。

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，版本 C.01.07 SR3 [465] 以及二维液相色谱软件，版本 A.01.04。

色谱柱

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus PAH, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm（部件号 959764-918）
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 RRHD, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm（部件号 959757-906）
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus, 2.1 × 100 mm, 3.5 µm（部件号 959793-901）
- Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 655750-902）

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈和甲醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸铵及甲酸分别购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) 和 VWR (Darmstadt, Germany)。

样品和方法

多环芳烃 (PAH) 的 RPLC-RPLC 分析

用乙腈稀释 16 种多环芳烃 (PAH) 的混合物（PAH mix 25，来自 Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany (YA20950025AB)），每种化合物的浓度为 10 µg/mL。表 1 显示了仪器参数。

多肽的 HILIC-RPLC 分析

多肽标准品（安捷伦十肽标准品，冻干品 71 µg，部件号 5190-0583）溶于 100 µL 水/乙腈 (50:50, v/v) 中，含 0.1% 甲酸。表 2 显示了仪器参数。

多肽标准品中含有以下多肽：

- 缓激肽片段 1–7（多肽 1）
- 缓激肽（多肽 2）
- 血管紧张素 II（多肽 3）
- 神经降压素（多肽 4）
- 血管紧张素 I（多肽 5）
- 猪肾素底物（多肽 6）
- [Ace-F-3,-2 H-1] 血管紧张素 (1–14)（多肽 7）
- 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15–31)（多肽 8）
- [F14] 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (15–31)（多肽 9）
- 蜂毒肽素（多肽 10）

表 1. RPLC-RPLC 参数

第一维	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus PAH, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm
流动相	A) 水 B) 甲醇
梯度	0 min 时 B 为 50% 15 min 时 B 为 100% 停止时间：22 min 后运行时间：5 min 在 ^{2}D 泵中设置停止时间和后运行时间，软件会自动将停止时间延长至所有切割均完成 ^{2}D 分析。
流速	0.200 mL/min
温度	40 °C
检测	DAD；230 nm/4 nm，参比 390 nm/20 nm；20 Hz 为保护流通池不受阀切换产生的压力脉冲的影响，在 ^{1}D DAD 和 2D-LC 阀之间安装压力释放工具包 (G4236-60010)。
进样	进样量：2 µL 样品温度：8 °C 进样针清洗：用水/乙腈 (70/30) 清洗 3 s
第二维	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm
溶剂	A) 水 B) 乙腈
温度	40 °C
检测	DAD；230 nm/4 nm，参比 390 nm/20 nm；80 Hz
2D-LC	
二维液相色谱模式	中心切割
流速	1.000 mL/min
采样表	采用 PAH 混合物的 ^{1}D 色谱图作为参比色谱图，设置采样时间为 0.20 min 的基于时间的中心切割二维液相色谱。
ASM 和 ^{2}D 梯度 — 未使用 ASM 的方法	
ASM	未启用 ASM
^{2}D 梯度	0.00 min 时 B 为 50% 1.00 min 时 B 为 100% ^{2}D 梯度停止时间：1.20 min ^{2}D 周期：1.70 min
ASM 和 ^{2}D 梯度 — 使用 ASM 的方法，ASM 稀释因子为 1.5	
ASM	ASM 毛细管：5500-1303 (0.12 × 680 mm) 启用 ASM（ASM 稀释因子：1.5） 冲洗样品定量环 3 次（0.18 min）
^{2}D 梯度	0.00 min 时 B 为 5% 0.18 min 时 B 为 5% 0.19 min 时 B 为 50% 1.19 min 时 B 为 100% ^{2}D 梯度停止时间：1.39 min ^{2}D 周期：1.89 min
ASM 和 ^{2}D 梯度 — 使用 ASM 的方法，ASM 稀释因子为 2.0	
ASM	ASM 毛细管：5500-1302 (0.12 × 340 mm) 启用 ASM（ASM 稀释因子：2.0） 冲洗样品定量环 3 次（0.24 min）
^{2}D 梯度	0.00 min 时 B 为 5% 0.24 min 时 B 为 5% 0.25 min 时 B 为 50% 1.25 min 时 B 为 100% ^{2}D 梯度停止时间：1.45 min ^{2}D 周期：1.95 min

表 2. HILIC-RPLC 参数

第一维	
色谱柱	Agilent ZORBAX HILIC Plus, 2.1 × 100 mm, 3.5 µm
流动相	A) 50 mM 甲酸铵水溶液，pH 调至 4.0 B) 乙腈
梯度	0 min 时 B 为 85% 10 min 时 B 为 60% 11 min 时 B 为 60% 12 min 时 B 为 85% 停止时间：12 min 后运行时间：15 min 在 ^{2}D 泵中设置停止时间和后运行时间，将运行时间延长至所有切割均完成 ^{2}D 分析。
流速	0.500 mL/min
温度	40 °C
检测	DAD；220 nm/4 nm，参比 360 nm/100 nm；20 Hz 为保护流通池不受阀切换产生的压力脉冲的影响，在 ^{1}D DAD 和 2D-LC 阀之间安装压力释放工具包 (G4236-60010)。
进样	进样量：5 µL 样品温度：8 °C 进样针清洗：用水/乙腈 (10/90) 清洗 3 s
第二维	
色谱柱	AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm
流动相	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
温度	40 °C
检测	DAD 和质量选择型检测器 (MSD)
DAD	220 nm/4 nm，参比 360 nm/100 nm；40 Hz
质量选择检测 (MSD)	
MSD 信号	极性：正离子 模式：扫描 质量范围：100–1350 *m/z* 碎裂电压：100 V 增益：1.00 阈值：150 步长：0.10 峰宽：0.10 min 数据存储：完全 停止时间：无限制 将停止时间为设置“无限制”，将运行时间延长至所有切割均完成 ^{2}D 分析。
雾化室	干燥气流速：10.0 L/min 雾化器：35 psig 干燥气温度：200 °C 鞘气温度：300 °C 鞘气流速：10.0 L/min 毛细管电压：2500 V 喷嘴电压：300 V

2D-LC	
二维液相色谱模式	中心切割
流速	0.500 mL/min
采样表	1.00 min 基于时间，采样时间 0.08 min 4.00 min 基于峰，采样时间 0.15 min 6.50 min 基于峰，采样时间 0.25 min 8.00 min 基于峰，采样时间 0.15 min 8.50 min 基于峰，采样时间 0.45 min 10.00 min 关闭
峰检测	模式：斜率 正斜率：3 mAU/s 负斜率：1 mAU/s
ASM 和 ^{2}D 梯度 — 未使用 ASM 的方法	
ASM	未启用 ASM
^{2}D 梯度	0.00 min 时 B 为 15% 3.00 min 时 B 为 60% ^{2}D 梯度停止时间：3.00 min ^{2}D 周期：5 min
ASM 和 ^{2}D 梯度 — 使用 ASM 的方法，ASM 稀释因子为 3.0	
ASM	ASM 毛细管：5500-1301 (0.12 × 170 mm) 启用 ASM（ASM 稀释因子：3.0） 冲洗样品定量环 3 次（0.74 min）
^{2}D 梯度	0.00 min 时 B 为 3% 0.74 min 时 B 为 3% 0.75 min 时 B 为 15% 3.75 min 时 B 为 60% ^{2}D 梯度停止时间：3.75 min ^{2}D 周期：5.75 min
ASM 和 ^{2}D 梯度 — 使用 ASM 的方法，ASM 稀释因子为 5.1	
ASM	ASM 毛细管：5500-1300 (0.12 × 85 mm) 启用 ASM（ASM 稀释因子：5.1） 冲洗样品定量环 3 次（1.23 min）
^{2}D 梯度	0.00 min 时 B 为 3% 1.23 min 时 B 为 3% 1.24 min 时 B 为 15% 4.24 min 时 B 为 60% ^{2}D 梯度停止时间：4.24 min ^{2}D 周期：6.24 min

结果与讨论

[1]D 和 [2]D 溶剂系统间的不兼容性常被视为 2D-LC 方法开发中的重大挑战之一[2]。ASM 提供了一种基于阀的方法，在 [2]D 色谱柱前用 [2]D 流动相稀释 [1]D 洗脱液，解决了这一问题[2]。

为实现 ASM，采用了一种由 2D-LC 阀主动溶剂调制 (G4243A) 和两个 MHC 阀 (G4242-64000) 组成的阀布局。图 1 展示了阀配置。

图 2 通过展示阀切换流程阐述了主动溶剂调制的原理。

在位置 1，[1]D 的一个馏分在峰驻留组件 A（MHC 阀 A）中进行采样。同时，来自 [2]D 泵的液流流经峰驻留组件 B（MHC 阀 B）。对峰驻留组件 A 中采集的样品开始分析时，ASM 阀切换至位置 2。[2]D 泵的液流从端口 5 进入 ASM 阀，并在位于峰驻留组件 A（端口 8）和 ASM 毛细管（端口 6）之间的阀中分流。流经峰驻留组件 A 和 ASM 毛细管的 [2]D 液流在端口 10 处汇合，然后流向 [2]D 色谱柱。在这一阀位置中，在峰驻留组件 A 中采样的 [1]D 洗脱液馏分由 [2]D 溶剂稀释，之后到达 [2]D 色谱柱。采用弱极性 [2]D 溶剂使分析物在 [2]D 色谱柱头集中。ASM 阀将一直保持在位置 2，直到 [1]D 洗脱液的馏分完全转移到 [2]D（ASM 阶段）。馏分转移完成后，ASM 阀将切换至位置 3。现在，来自 [2]D 泵的所有液流均流经峰驻留组件 A，ASM 毛细管与液流断开连接。ASM 阀将一直保持在位置 3，直到转移馏分的 [2]D 分析结束。同时，来自 [1]D 洗脱液的馏分将在峰驻留组件 B 中进行采样。

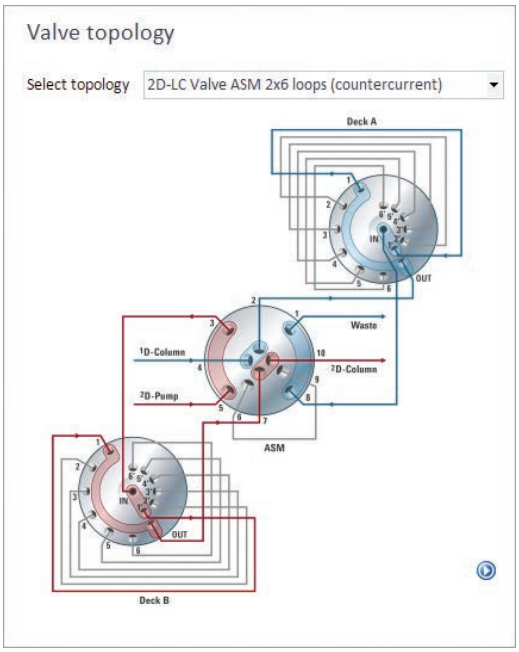


图 1. ASM 的阀布局，逆流配置

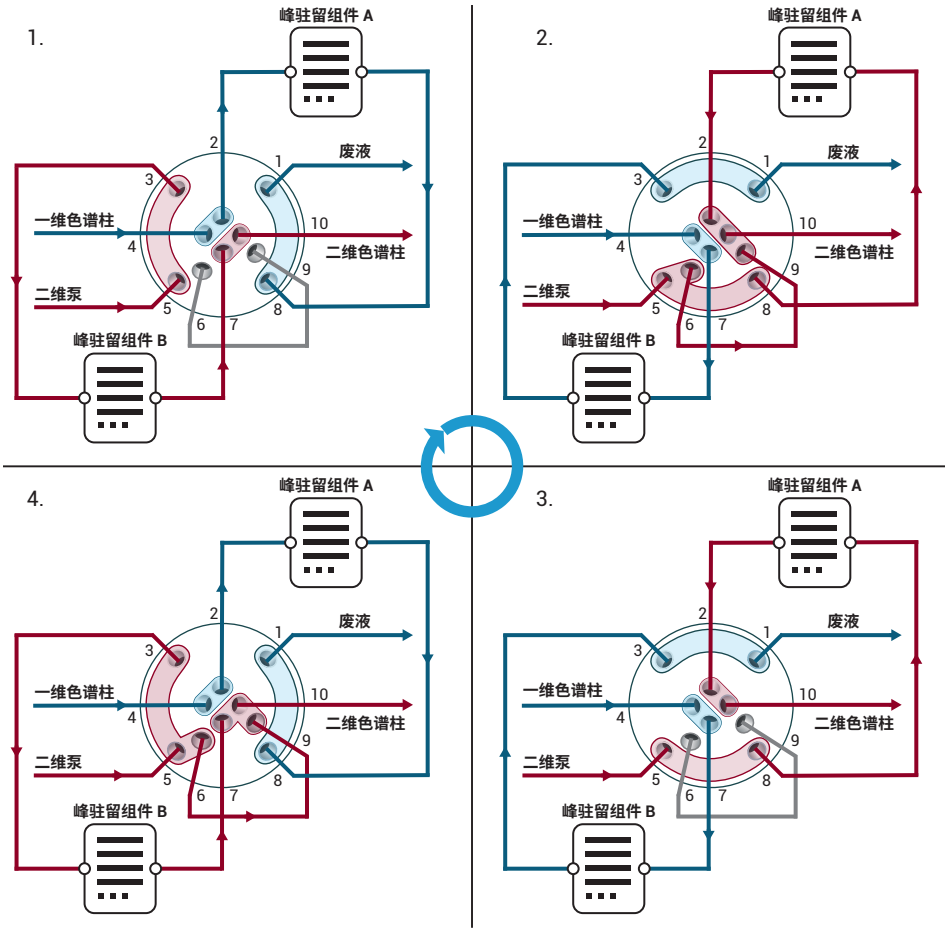


图 2. ASM 的阀切换流程，反冲配置

开始分析在峰驻留组件 B 中采样的 ^{1}D 洗脱液馏分时，ASM 阀在 ASM 阶段中切换至位置 4，使 ^{1}D 洗脱液得到 ^{2}D 溶剂的稀释。ASM 阶段结束后，ASM 阀切换回位置 1，ASM 毛细管再次与液流断开连接。

ASM 稀释因子描述了 ^{1}D 洗脱液馏分的稀释情况，由峰驻留组件和 ASM 毛细管之间的分流比决定。该分流比取决于 ASM 毛细管以及经过峰驻留组件的流路所产生的反压。在经过峰驻留组件的流路中，反压主要由 ASM 阀和 MHC 阀之间的传输毛细管产生。我们提供不同类型的 ASM 毛细管，以调节分流比和 ASM 稀释因子（表 3）。例如，如果安装了 ASM 毛细管 5500-1302 (0.12 × 340 mm)，它产生的反压等同于 ASM 阀和 MHC 阀之间的传输毛细管（两根 0.12 × 170 mm 的毛细管）产生的反压。因此，来自 ^{2}D 泵的液流在峰驻留组件和 ASM 毛细管之间以 1:1 的比例分流。^{1}D 洗脱液中的采样馏分因此得到稀释，稀释倍数约为 2（ASM 稀释因子为 2）。

为使用 ASM，需要在 2D-LC 配置中对 ASM 阀进行安装和配置，如图 1 所示。安装后的 ASM 毛细管和传输毛细管需要在 2D-LC 配置中设置，如图 3 所示。

在 2D-LC 方法中，可启用 ASM，并通过指定在稀释阀位置流经定量环到达^{2}D 的样品定量环体积倍数，设置 ASM 阶段的持续时间（图 4）。系统将显示 ASM 阶段的持续时间结果。通常情况下，冲洗样品定量环三倍体积（推荐的默认值）足以实现定量转移。

表 3. 可用的 ASM 毛细管

ASM 毛细管	长度 (mm)	内径 (mm)	体积 (µL)	ASM 稀释因子*	分流比*（定量环：ASM）
5500-1300	85	0.12	0.96	5	1:4
5500-1301	170	0.12	1.9	3	1:2
5500-1302	340	0.12	3.8	2	1:1
5500-1303	680	0.12	7.7	1.5	1:0.5

* ASM 稀释因子和分流比由传输毛细管 5500-1270 (0.12 × 170 mm) 决定，并取决于经过 ASM 和转移毛细管的溶剂粘度

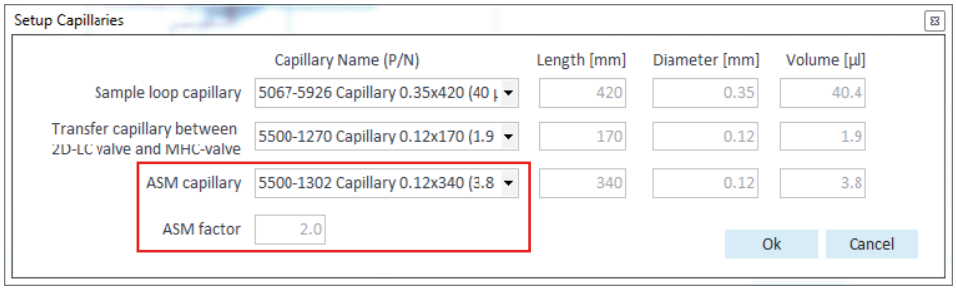


图 3. 2D-LC 配置中的 ASM 毛细管配置

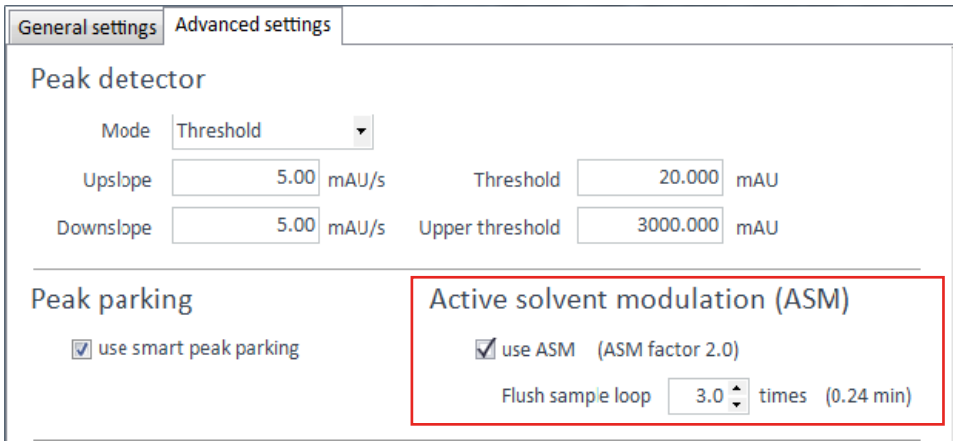
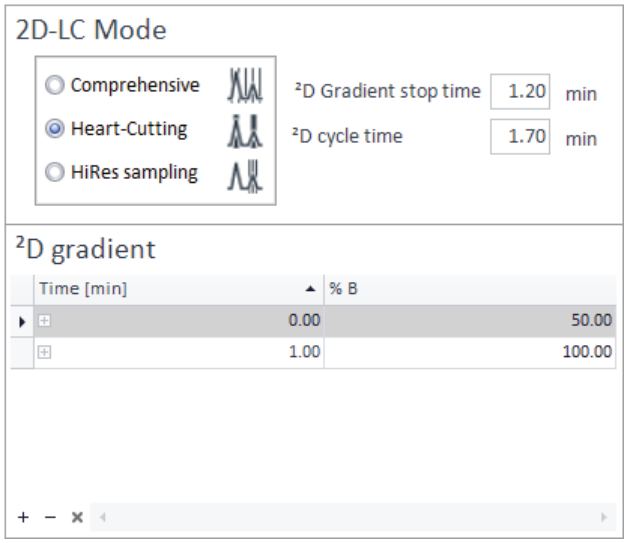
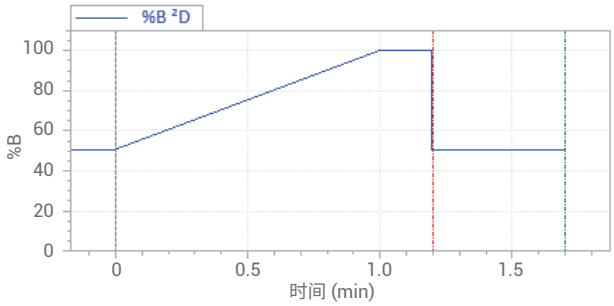


图 4. 2D-LC 方法中的 ASM 启用和方法设置

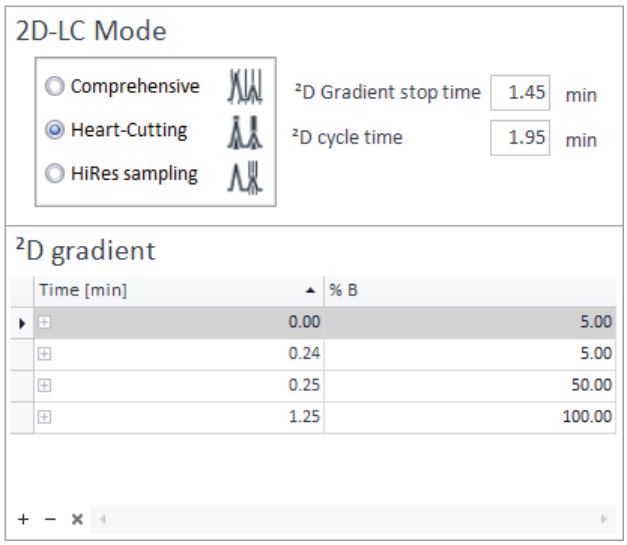
在 2D-LC 方法中，最初设置的未使用 ASM 的 ^{2}D 梯度需要根据 ASM 阶段持续时间进行延迟。^{2}D 梯度停止时间和 ^{2}D 循环时间需要相应延长。为有效使用 ASM，ASM 阶段中需选择低强度溶剂组成。图 5 展示了最初设置的未使用 ASM 的 ^{2}D 梯度（图 5A）与使用 ASM、ASM 阶段持续 0.24 分钟的 ^{2}D 梯度的差别（图 5B）。

A





B



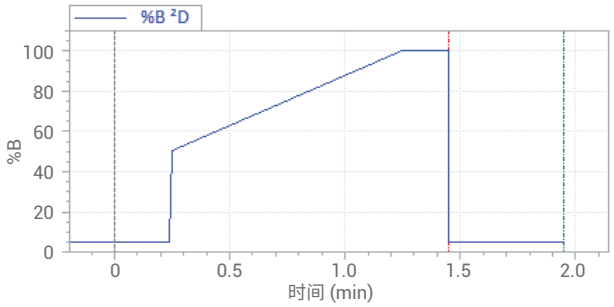


图 5. ^{2}D 梯度设置。A) 最初设置为不使用 ASM 的 ^{2}D 梯度。B) 使用 ASM、ASM 阶段持续 0.24 分钟的 ^{2}D 梯度

多环芳烃 (PAH) 的 RPLC-RPLC 分析

图 6 展示了在两个维度下均利用 RPLC 对 PAH 进行的 MHC 2D-LC 分析。该分析选择 Agilent ZORBAX Eclipse Plus PAH 色谱柱作为 ^{1}D 色谱柱，采用 ZORBAX Eclipse Plus C8 色谱柱作为 ^{2}D 色谱柱。ZORBAX Eclipse Plus PAH 色谱柱的 PAH 保留性能高于 ZORBAX Eclipse Plus C8 色谱柱。通常在 RPLC-RPLC 分析中，将保留性更佳的色谱柱置于 ^{2}D 中，将更有利于 ^{2}D 色谱柱头对分析物的富集[2,3]。本文特意将保留性更佳的色谱柱置于 ^{1}D 中，以展示这一色谱柱顺序带来的挑战，并证实 ASM 能够实现分析物在 ^{2}D 色谱柱头的富集。因而，ASM 能够提高这一挑战性组合中 ^{2}D 的分离度和灵敏度。

图 6B 显示，未使用 ASM 时组分未在 ^{2}D 色谱柱头集中，因此 ^{2}D 中的 PAH 峰发生变形。转移到 ^{2}D 的 ^{1}D 洗脱液馏分中含有高比例有机溶剂，因而造成分析物谱带无法集中。图 6C 和图 6D 证明了 ASM 可使分析物在 ^{2}D 色谱柱头处集中，因而获得对称的 ^{2}D 窄峰。

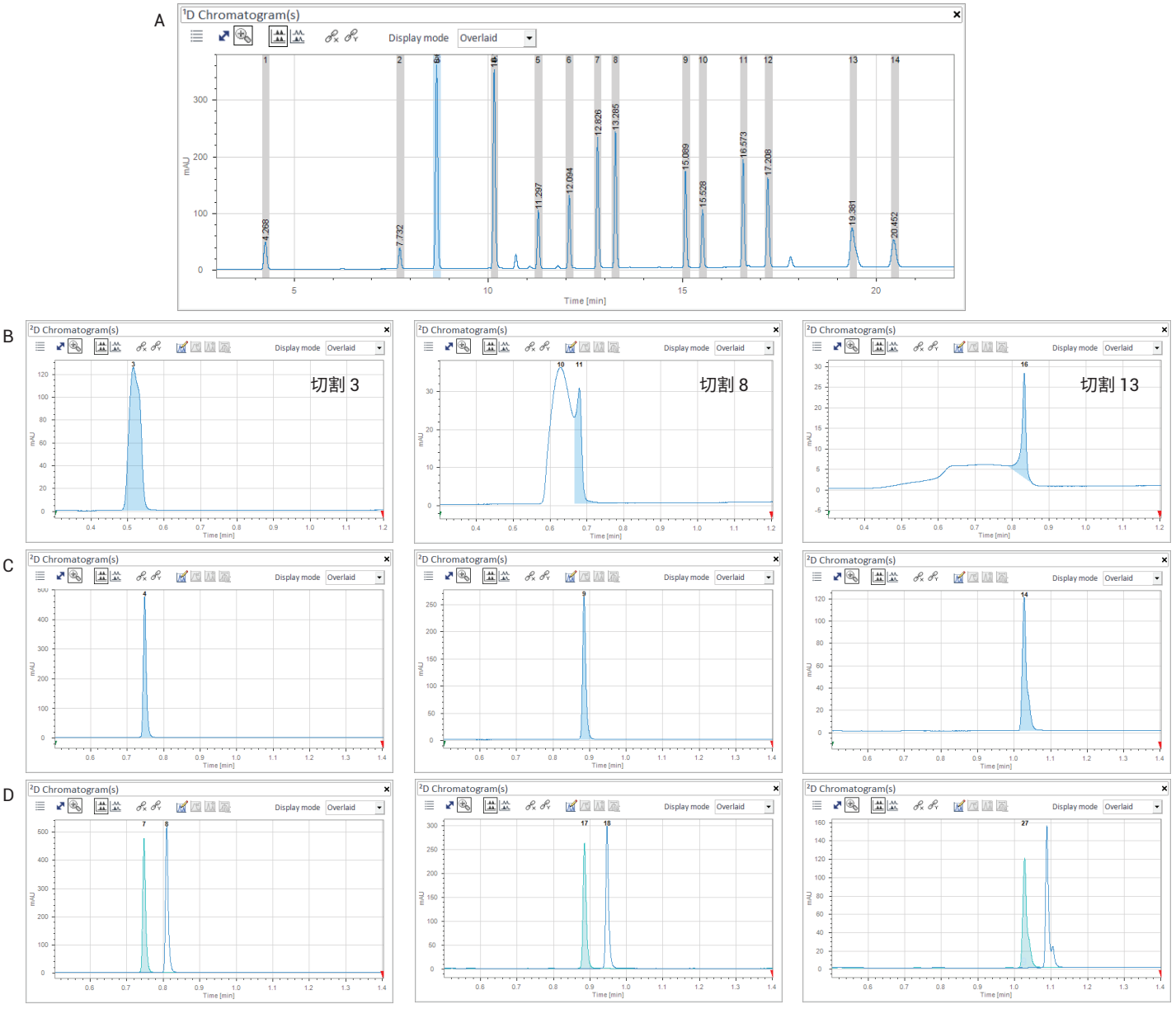


图 6. PAH 的多中心切割二维液相色谱分析。A) ^{1}D 色谱图。B) 未使用 ASM 分析的 ^{2}D 色谱图。C) 使用 ASM、ASM 稀释因子为 1.5 分析的 ^{2}D 色谱图。D) 使用 ASM：ASM 稀释因子为 1.5 的 ^{2}D 色谱图（绿色迹线）和 ASM 稀释因子为 2 的色谱图（蓝色迹线）

在图 6C 中，在 ASM 稀释因子为 1.5 的情况下使用 ASM，得到了对称的 ^{2}D 窄峰。图 6D 对比了采用 ASM 在不同 ASM 稀释因子下得到的 ^{2}D 分离结果，绿色迹线 ASM 稀释因子为 1.5，蓝色迹线 ASM 稀释因子为 2。ASM 稀释因子为 2 时，^{1}D 洗脱液的稀释比例更高，^{2}D 峰宽进一步减小，峰高增大，获得了良好的灵敏度。在切割 13 中，可看到采用 1.5 的 ASM 稀释因子时以肩峰形式出现的共洗脱，而采用 2 的 ASM 稀释因子时这个峰得到了部分分离。

为证实 ^{2}D 色谱柱头处的分析物富集不仅取决于所用的 ^{2}D 梯度，还取决于 ^{2}D 色谱柱前的 ^{1}D 洗脱液稀释，在两种条件下进行了分析，两种条件下 ^{2}D 梯度均用 5% B（ASM 稀释因子为 2 的分析中使用的 ^{2}D 梯度）的初始保持比例，一种使用 ASM（图 7，绿色迹线），另一种未使用 ASM（图 7，蓝色迹线）。只有在使用 ASM 时才获得了对称的 ^{2}D 窄峰，这一结果清晰表明 ASM 对实现 ^{2}D 色谱柱头处富集的必要性。

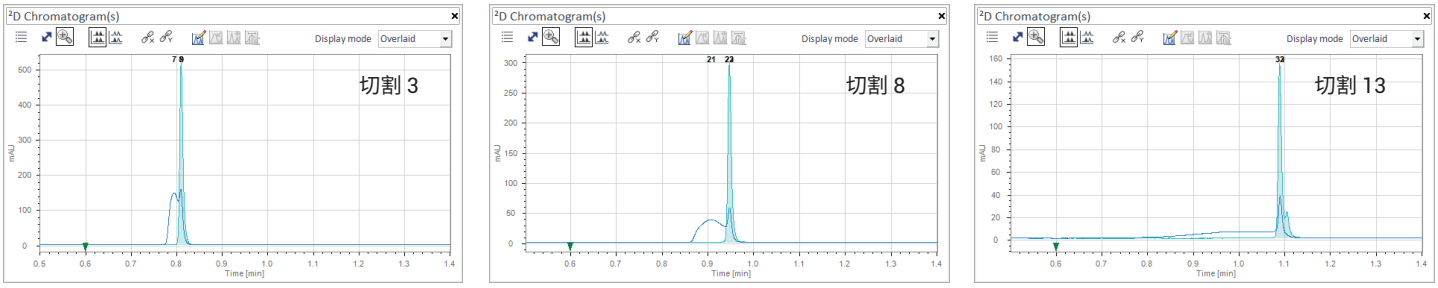


图 7. 采用相同 ^{2}D 梯度对 PAH 进行多中心切割二维液相色谱分析得到的 ^{2}D 色谱图，第一种情况使用了 ASM（绿色迹线），第二种情况未使用 ASM（蓝色迹线）

多肽的 HILIC-RPLC 分析

图 8 展示了在 ^{1}D 和 ^{2}D 中分别用 HILIC 和 RPLC 实现的 MHC 2D-LC 多肽分析。在 ^{1}D 色谱图（图 8A）中，后洗脱峰中已看到多肽的共洗脱现象。图 8B–D 展示了检测多肽的 ^{2}D 提取离子色谱图 (EIC)。本文中，提取了每种多肽检出的丰度最高的离子（例如，多肽 9 提取的是 EIC 1050，对应于摩尔质量为 2099 的 $[M+2H]^{2+}$ 离子）。

图 8B 显示了未采用 ASM 的分析结果。转移到 ^{2}D 的 ^{1}D 洗脱液馏分中含有大量有机溶剂，多肽对这类溶剂的反应与 PAH 不同。在 ^{1}D 洗脱液转移到 ^{2}D 色谱柱后，多肽表现出部分流穿。^{2}D 色谱柱上保留的多肽比例与表现出流穿的比例之间的关系，因所分析多肽类型的不同而有所不同。为证明在 EIC 中观察到的未保留峰来源于多肽的部分流穿，对保留峰和未保留峰的质谱图进行了对比。这些质谱图之间的相似性证实了部分流穿的发生。图 9 中的切割 3 展示了一个示例。

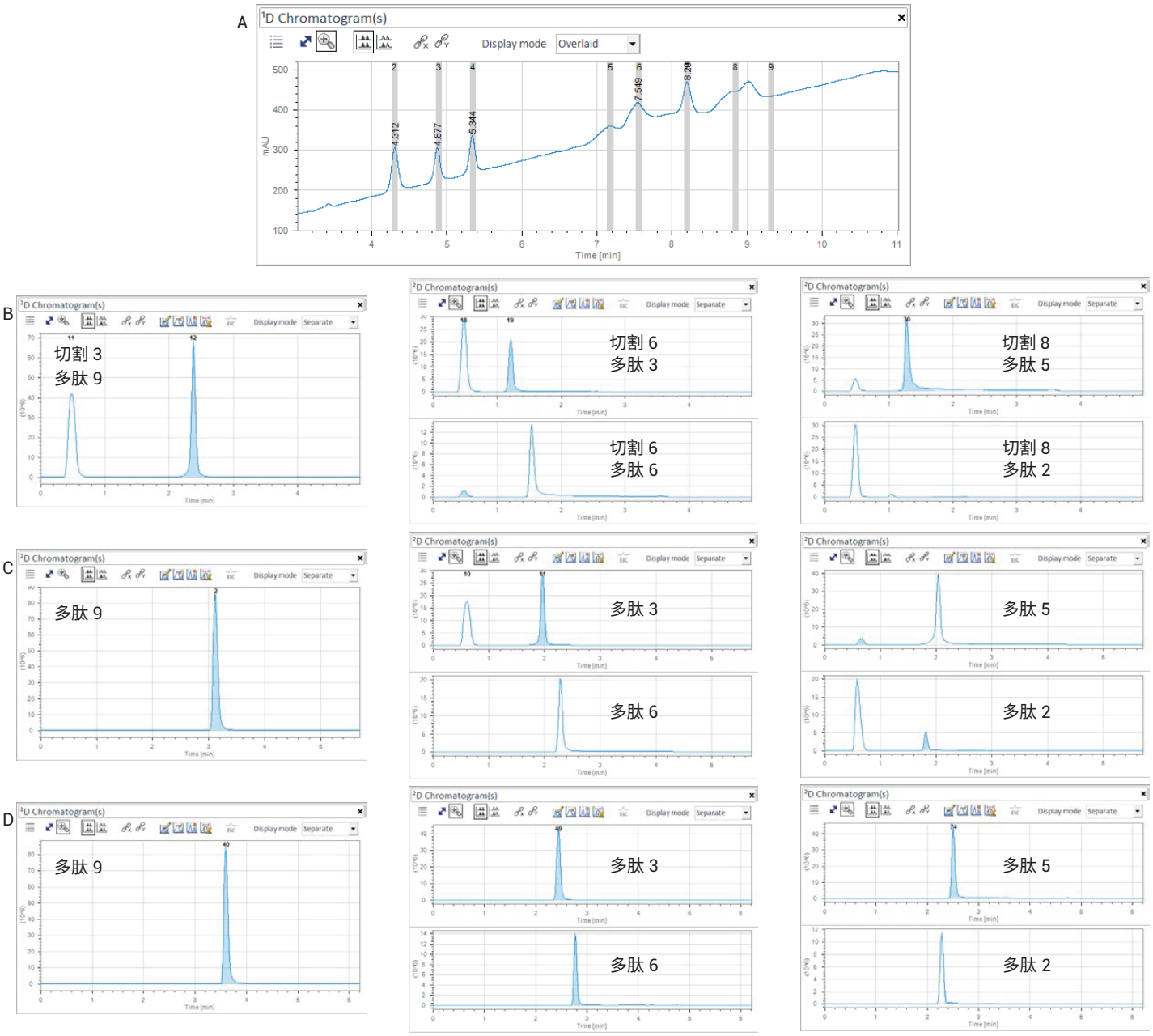


图 8. 多肽的多中心切割二维液相色谱分析：A) ^{1}D 色谱图。B) 未使用 ASM 分析的 ^{2}D EIC。C) 使用 ASM、ASM 稀释因子为 3 分析的 ^{2}D EIC。D) 使用 ASM、ASM 稀释因子为 5 分析的 ^{2}D EIC

图 8C 和图 8D 证明了 ASM 可使转移到 ^{2}D 的多肽完全保留，避免了未使用 ASM 时观察到的部分流穿。由于分析物在 ^{2}D 色谱柱头处富集，^{2}D 峰获得了对称峰型。在图 8C 中，在 ASM 稀释因子为 3 时使用 ASM，可避免出现特定多肽（如切割 3 中的多肽 9）的流穿。对于其他多肽（例如切割 6 中的多肽 3），ASM 稀释因子为 3 时弱极性 ^{2}D 溶剂未能充分稀释 ^{1}D 洗脱液，多肽未实现完全保留。在这些多肽中，需要用 5 的 ASM 稀释因子以完全避免流穿，如图 8D 所示。

为证实避免多肽流穿不仅取决于所用的 ^{2}D 梯度，还取决于 ^{2}D 色谱柱前的 ^{1}D 洗脱液稀释，在两种条件下进行了分析，两种条件下 ^{2}D 梯度均用 3% B（ASM 稀释因子为 2 的分析中使用的 ^{2}D 梯度）的初始保持比例，一种使用 ASM（图 10，绿色迹线），另一种未使用 ASM（图 10，蓝色迹线）。未使用 ASM 时，多肽发生流穿，证实了 ASM 在实现多肽完全保留中的必要性。

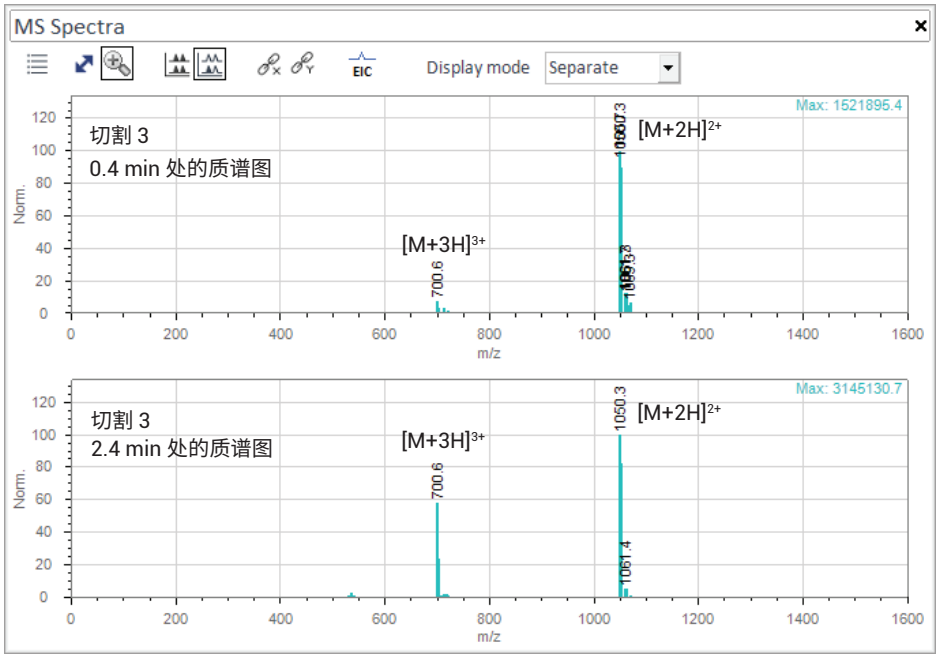


图 9. 未使用 ASM 时，多肽多中心切割二维液相色谱分析的切割 3 中观察到的未保留峰（上图）和保留峰（下图）的质谱图

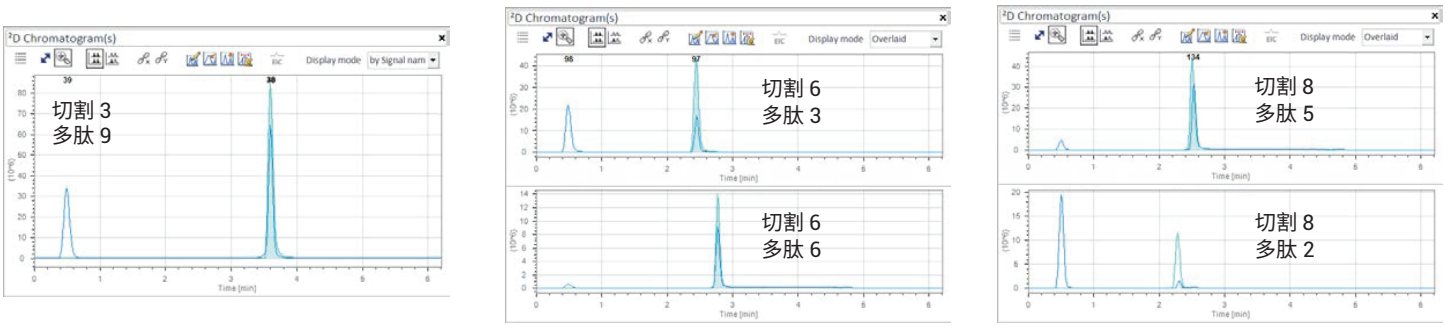


图 10. 采用相同 ^{2}D 梯度对多肽进行多中心切割二维液相色谱分析得到的 ^{2}D EIC，第一种情况使用了 ASM（绿色迹线），第二种情况未使用 ASM（蓝色迹线）

结论

2D-LC 方法开发中的一项重要挑战是 ^{1}D 与 ^{2}D 溶剂系统不兼容。对于 ^{1}D 洗脱液中的分析物在 ^{2}D 色谱柱中保留性较低的分离系统组合，^{2}D 中可能会观察到流穿峰、峰展宽或变形峰等体积过载效应。主动溶剂调制提供了一种基于阀的方法，在 ^{2}D 色谱柱前用 ^{2}D 流动相稀释 ^{1}D 洗脱液，解决了这一问题，从而实现了 ^{2}D 色谱柱头处的分析物集中。

在 PAH 的 RPLC-RPLC 分析中，未使用 ASM 时将出现 ^{2}D 峰展宽和变形峰。在 ASM 稀释因子为 2 的条件下使用 ASM 时，^{2}D 色谱柱头实现分析物集中，从而获得了对称的 ^{2}D 窄峰。在多肽的 HILIC-RPLC 分析过程中，未使用 ASM 的 ^{2}D 中出现了多肽的部分流穿。在 ASM 稀释因子为 5 的条件下使用 ASM 时，多肽实现了完全保留。

参考文献

1. Stoll, D. R.; Carr, P. W. Two-Dimensional Liquid Chromatography: A State of the Art Tutorial. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 519-531
2. Stoll, D. R.; et al. Active Solvent Modulation: A Valve-Based Approach To Improve Separation Compatibility in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 9260-9267
3. Li, D.; Jakob, C.; Schmitz, O. Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions. Analytical and *Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 153-167

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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，2017

2017 年 12 月 1 日，中国出版
5991-8785ZHCN

Agilent
Trusted Answers