

■通过色谱柱切换实现预处理的自动化

对生物样品或含有大量杂质成分的样品进行分析时，有必要实施蛋白质或杂质成分的去除及浓缩等预处理。预处理操作对分析结果造成重大影响，是非常重要的因素。而且操作过程中的很多细节依靠分析人员的操作经验和熟练程度，因此进行“稳定的预处理操作”是极为重要的一步。

预处理方法，使用较为广泛的是固相萃取法或色谱柱切换法。

Chromaster系统采用了选择阀，由此可以通过色谱柱切换方式实现自动化预处理。

以血清中药物的分析研究为例进行介绍。

◆色谱柱切换方式来分析血中的苯妥英◆

样品制备：人体血清中添加苯妥英后，离心后取上清液，即可。

目的：研讨苯妥英分析的自动化预处理



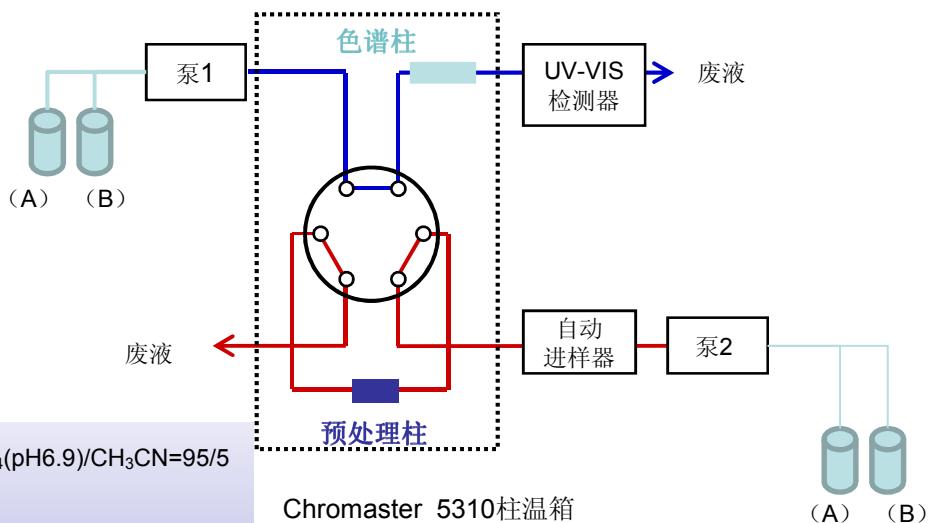
* 苯妥英为抗癫痫药，其有效血药浓度为10~20 µg/mL，血药浓度超过20 µg/mL以上被认为是中毒范围。

【仪器配置】

Chromaster 5110泵
 Chromaster 5210自动进样器
 Chromaster 5310柱温箱
 (装配2位6通阀)
 Chromaster 5420紫外-可见 检测器

【色谱条件】

流动相	(A) 50 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH6.9)/CH ₃ CN=95/5 (B) CH ₃ CN *(A)/(B)= 65/35
流速	1.0 mL/min
色谱柱	LaChrom C18 (5 µm) 4.6 × 150 mm
柱温	40°C
检测波长	210 nm



【预处理条件】

流动相	(A) 50 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH6.9)/CH ₃ CN=95/5 (B) CH ₃ CN *(A)/(B) = 95/5
流速	1.0 mL/min
进样量	20 µL
预处理柱	Mspak PK-4A (4.0 × 10 mm、Shodex) *注释1
柱温	40°C

Chromaster 5310柱温箱
 -装配2位6通阀-

*注释1

其特点为：色谱柱切换分析用预处理柱中，不保留蛋白质而只保留小分子物质。

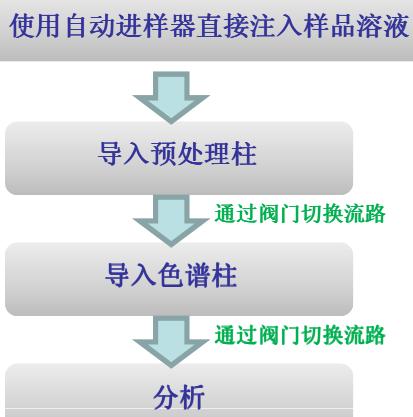
Page .1

■通过色谱柱切换实现预处理的自动化

■ 色谱柱切换预处理法的研讨

对血清中的苯妥英（抗癫痫药）进行分析时，需要去除蛋白质等成分。
因此，研究讨论了用前处理柱去除蛋白质后只将苯妥英(目标成分)导入色谱柱的方法。

从自动化预处理至分析的流程：



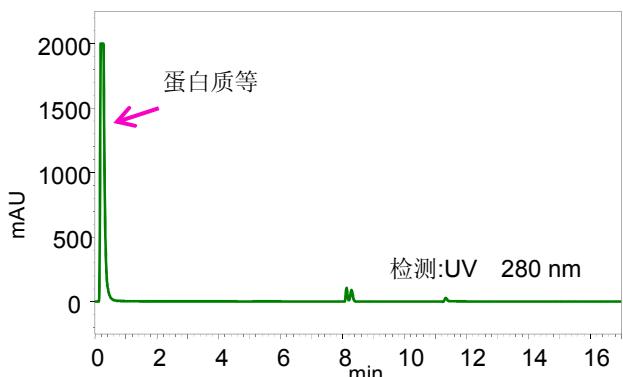
使血清中的蛋白质被洗脱掉，同时保留目标成分

将预处理柱上保留成分导入色谱柱进行分析

在分析过程中，通过切换流路的方式，可以同时进行预处理柱的清洗及平衡，以备下次分析。

■ 关于前处理柱条件的研讨①

目的：确认蛋白质的洗脱条件



【预处理条件】

流动相	(A) 50 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH6.9)/CH ₃ CN=95/5
	(B) CH ₃ CN
	* (A)/(B)=95/5
流速	1.0 mL/min
进样量	20 μL
色谱柱	Mspak PK-4A (4.0 × 10 mm、Shodex)
柱温	40°C

结果：确认了蛋白质等成分未被色谱柱保留并得以洗脱。

■通过色谱柱切换实现预处理的自动化

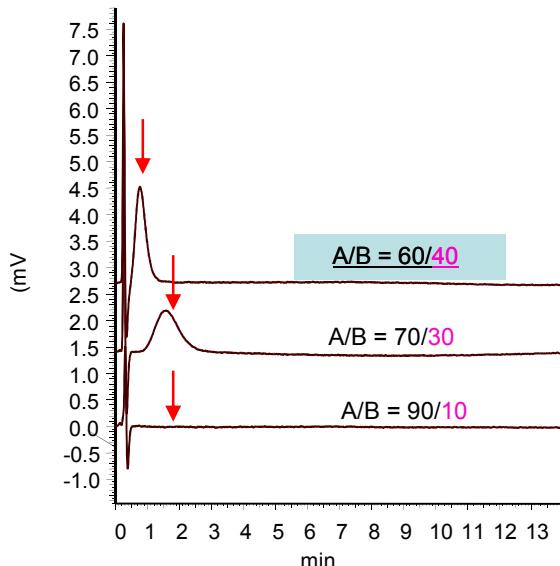
■ 预处理柱条件的研究②

确认将目标成分（苯妥英）导入到色谱柱的条件

苯妥英STD 10 mg/L (进样量20 μ L)、检测波长254 nm

[预处理条件]

流动相 (A) 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH6.9)
(B) CH₃CN
流速 1.0 mL/min
色谱柱 Mspak PK-4A (4.0 × 10 mm、Shodex)
柱温 40°C



- 如图，通过增加有机相比例的方式，可确认苯妥英的洗脱条件
- 在此条件下，可确认苯妥英未被洗脱

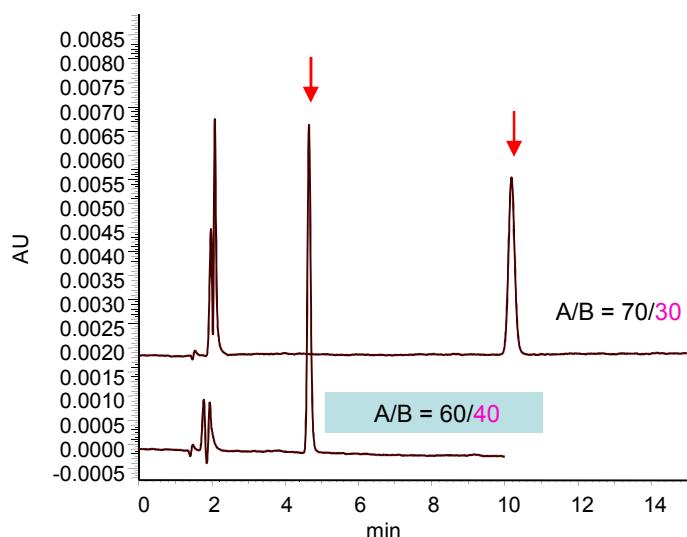
■ 色谱柱条件的研究

确认目标成分（苯妥英）被保留在色谱柱并得以分离的条件

在苯妥英STD 10 mg/L (进样量20 μ L)、检测波长254 nm

[色谱条件]

流动相 (A) 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH6.9)
(B) CH₃CN
流速 1.0 mL/min
色谱柱 LaChrom C18 (5 μ m) 4.6 × 150 mm
柱温 40°C



结果：将苯妥英从预处理柱导入至色谱柱后，色谱条件设定为A/B = 60/40。

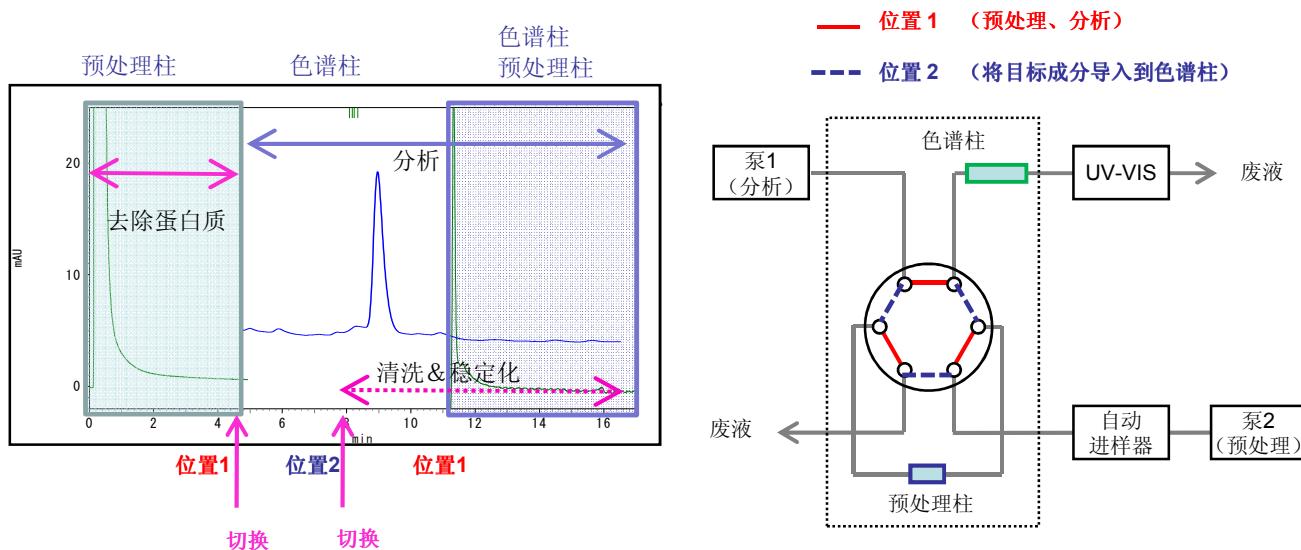
■通过色谱柱切换实现预处理的自动化

■ 关于阀切换时间的研讨

①将血清导入到预处理柱，确认去除蛋白质所需时间。（280 nm波长下检测蛋白质）

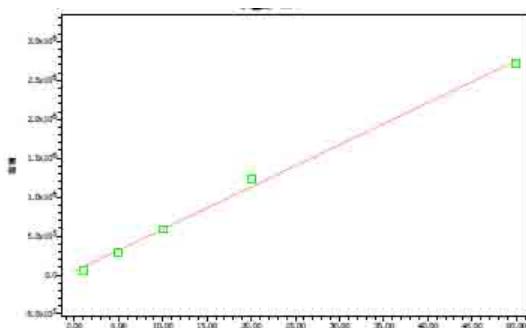
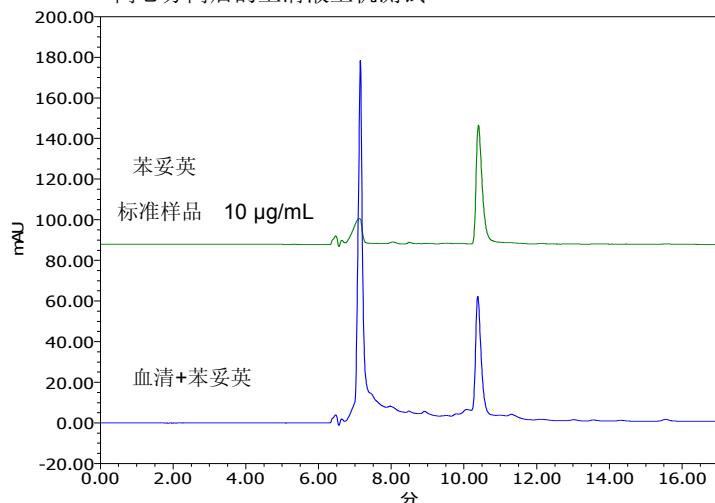
⇒此次将阀切换时间为5分钟。

②根据前述前处理柱条件的探讨结果，决定了流动相的比例。



■通过色谱柱切换的分析结果

样品制备：人的血清中添加苯妥英标准样品(10 µg/mL)而成
 *离心分离后的上清液上机测试



血清中的苯妥英的标准曲线
 (1~50 µg/mL)

此次通过自动化前处理，苯妥英的回收率达到了
 CV:85.3%，10 µg/mL上时的保留时间的重现性达到
 CV:0.04%，峰面积值的重现性达到CV:1.91%。
 苯妥英的有效血药浓度为10~20 µg/mL，
 血药浓度超过20 µg/mL时，将被认为中毒范围，
 而此次已确认采用本方法，可以进行高精度分析。

注意：本资料所示数据仅为测定例用数据而非可保证仪器性能的数据。

本仪器只是研究用仪器，而不是诊断、治疗或预防人或动物疾病的医疗仪器。

Page .4