

## ■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。

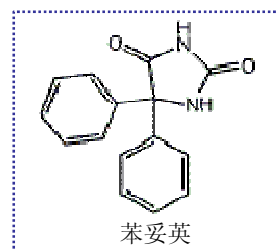
**Chromaster系统采用了选择阀，由此可以通过色谱柱切换方式实现自动化预处理。**

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



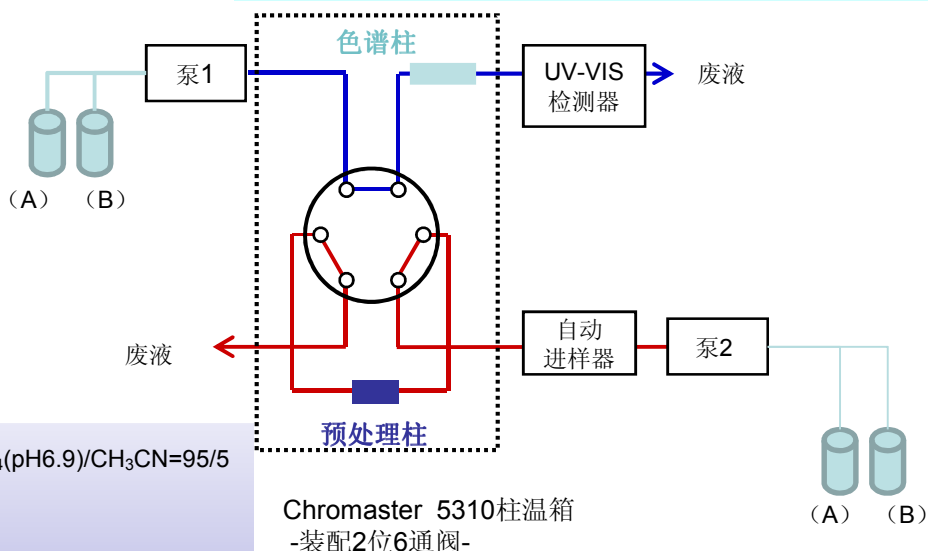
\* 苯妥英为抗癫痫药，其有效血药浓度为10~20 µg/mL，血药浓度超过20 µg/mL以上被认为是中毒范围。

## 【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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH6.9)/CH<sub>3</sub>CN=95/5  
(B) CH<sub>3</sub>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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH6.9)/CH<sub>3</sub>CN=95/5  
(B) CH<sub>3</sub>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

\* 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。

## ■ 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：

使用自动进样器直接注入样品溶液

导入预处理柱

通过阀门切换流路

导入色谱柱

通过阀门切换流路

分析

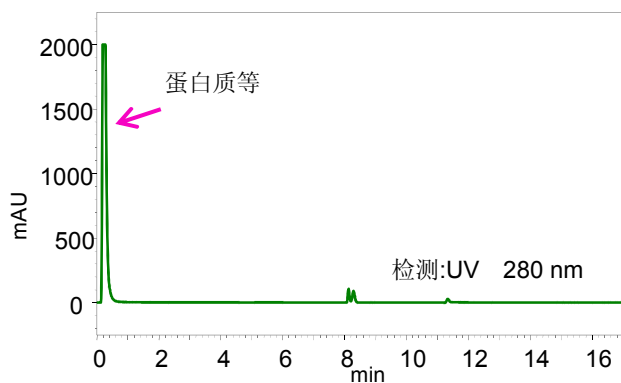
使血清中的蛋白质被洗脱掉，同时保留目标成分

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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH6.9)/CH <sub>3</sub> CN=95/5 (B) CH <sub>3</sub> 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

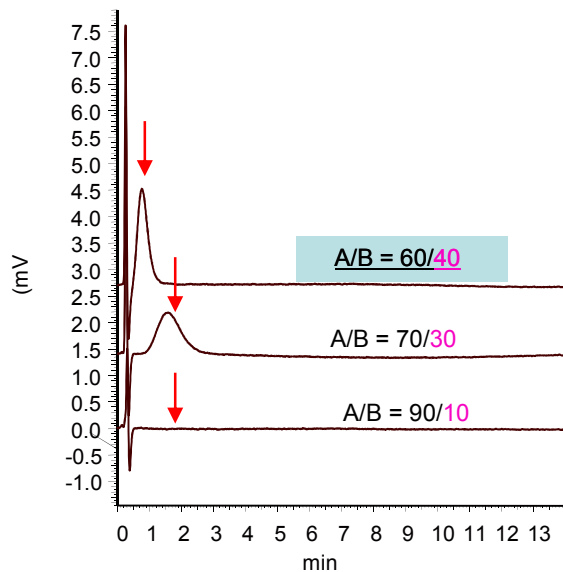
结果：确认了蛋白质等成分未被色谱柱保留并得以洗脱。

## ■通过色谱柱切换实现预处理的自动化

## ■ 预处理柱条件的研讨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  $\mu$ L）、检测波长254 nm



## [预处理条件]

流动相	(A) 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH6.9)
	(B) $\text{CH}_3\text{CN}$
流速	1.0 mL/min
色谱柱	Mspak PK-4A (4.0 $\times$ 10 mm、Shodex)
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$



- 如图，通过增加有机相比比例的方式，可确认苯妥英的洗脱条件

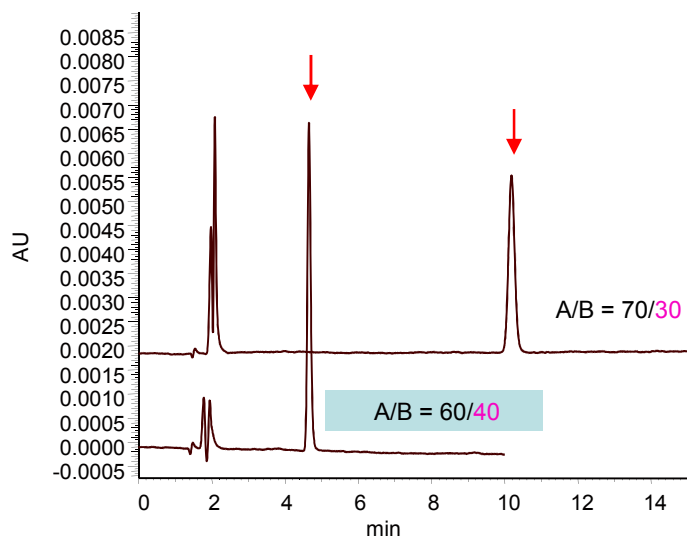


- 在此条件下，可确认苯妥英未被洗脱

## ■ 色谱柱条件的研讨

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  $\mu$ L）、检测波长254 nm



## [色谱条件]

流动相	(A) 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH6.9)
	(B) $\text{CH}_3\text{CN}$
流速	1.0 mL/min
色谱柱	LaChrom C18 (5 $\mu$ m) 4.6 $\times$ 150 mm
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$

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。

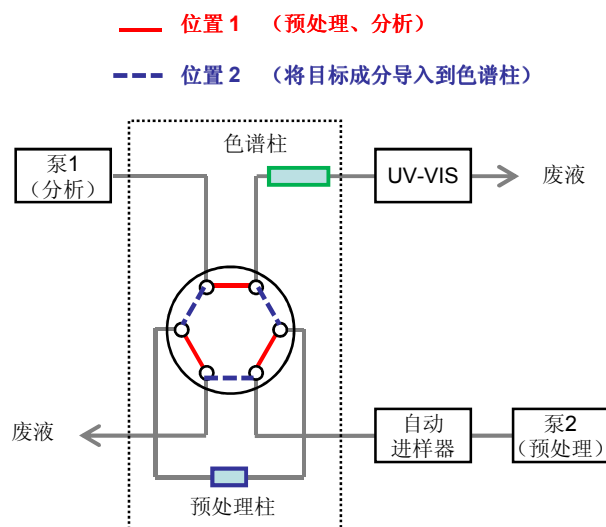
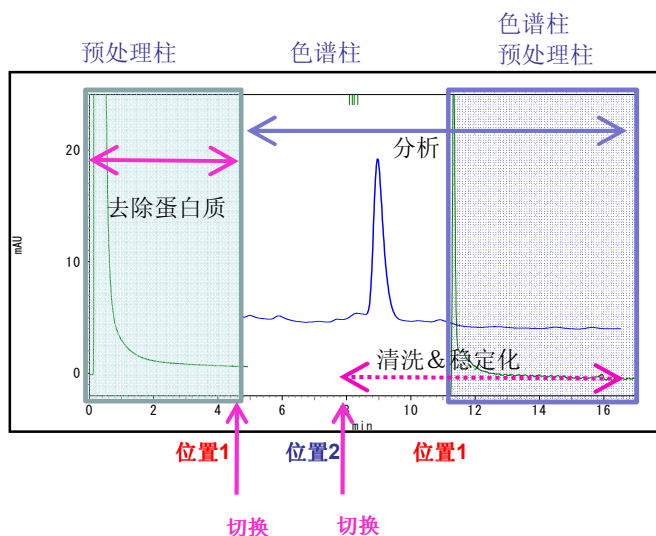
## ■ 通过色谱柱切换实现预处理的自动化

## ■ 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）

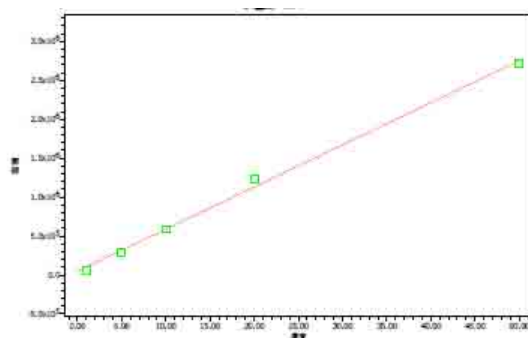
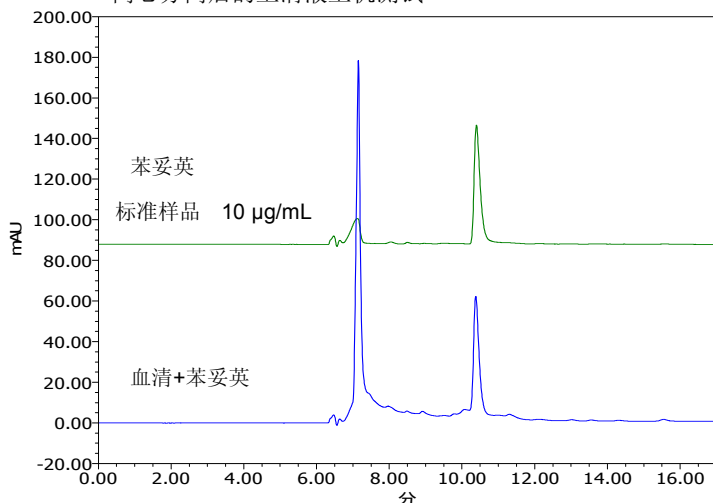
⇒此次将阀切换时间设定为5分钟。

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  $\mu\text{g/mL}$ )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  $\mu\text{g/mL}$ )

此次通过自动化前处理，苯妥英的回收率达到了CV:85.3%，10  $\mu\text{g/mL}$ 上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  $\mu\text{g/mL}$ ，  
血药浓度超过20  $\mu\text{g/mL}$ 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。