

气相色谱和高压液相色谱及其与质谱联用技术发展近况

孙守成

(国家标准物质研究中心 北京 100013)

摘要 本文评述了气相色谱和高压液相色谱及其与质谱联用技术发展近况,并结合 2002 年美国匹茨堡会议展示新仪器进行了评介。

关键词 气相色谱 / 质谱联用 高压液相色谱 / 质谱联用 技术发展

1 气相色谱和气相色谱 / 质谱联用技术

气相色谱技术已经成熟,是当前应用最广泛的分析仪器。其现状和发展趋势凸现以下几个方面:

(1) **快速分析** 原则上快速分析可以借助应用较短的细口径毛细管柱(柱内径为 75~100 μm),以氢气作为载气和提高升温速率等办法得以实现。

(2) **发展新的色谱柱** 发展高温下使用的低流失固定相。新的高温、低流失固定液,则多采用在聚硅氧烷链中嵌入苯基或硼碳烷基。

目前用计算机模型可以设计出固定相的最佳化学组成,帮助色谱柱生产厂家“量体裁衣”,研制出许多高选择性专用柱,所以色谱柱供应商产品目录中的专用柱越来越多。

(3) **多维色谱技术** 最新一代的多维色谱技术使用计算机编程的电子压力控制器,可以在同一次分离中多次微调联结串联柱的接口处的气压,从而多次调整系统的选择性。

(4) **统计方法** 用统计方法对色谱中的复杂多组分重叠峰进行解码(decoding),以获取更多的信息。

(5) **质谱将成为气相色谱仪的一个标准检测器** 53 届匹茨堡会议上展出的新仪器充分反映了 GC 仪器在通过高效的方法获得更多信息的同时,实现快速分析和仪器微型化的上述趋势。

本年度 Thermo Finnigan 公司宣称其新发布的 New Ultra-Fast Trace GC 是第一台直接对柱子加热并应用低热容量的材料制作柱箱系统的商品仪器,加热速度高达 1200 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。该仪器结合涡流加热温度程序技术与内径为 0.1mm 的短微柱,从而大大缩短色谱分离时间。仪器的分离机制还允许有较低的分流比,因而改善微柱色谱灵敏较低这一内在的局限性,使 Ultra-Fast Trace GC 适用于痕量分析。为与快速分析匹配,仪器配置一种快响应的高速氢

火焰检测器(或以响应快的 TEMPUSTM 飞行时间质谱作为检测器)。用这种 Ultra-Fast Trace GC 仪器,色谱过程可以缩短为常规毛细管法的 1/5~1/6 左右。

在本届会上展出的其它新 GC 仪器:

Varian 的 CP-4900 Micro GC:该系统有四路独立、即插即用的由进样器、微柱和检测器组成的通道。每个通道相当于一个微型的独立气相色谱仪,各自具有微电子气路控制和存储方法参数的闪存器,可以联结微柱做快速分离。

Shimadzu 的 GC-2010 GC 系统:按照岛津的说法,该系统的自动流量控制为第三代产品,保证了保留值的标准偏差仅为 0.2%。可同时使用四个检测器,其快速升温达 250 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

从上述三台新仪器,我们已清楚地看到未来一代 GC 仪器的发展趋势。

除整机以外,配件方面也有不少产品值得注意:

Thermo Orion 公司的 EZ FLASH GC 附件可以和各种传统牌号的 GC 仪器匹配,将其升级为快速 GC。其核心装置是一个以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 速率升温的小柱盒(允许内置传统的色谱柱)。色谱过程加快 20 倍。

ANTEK 的 3600 系列微波 GC 炉。他们用微波只加热色谱柱,而不加热色谱柱箱。从而实现快速升温及冷却,加热速率为 1~600 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。这种方案还可以在同一柱箱中以不同的温度程序实现多柱分析。

与 Thermo Finnigan 公司的 New Ultra-Fast Trace GC 相似,RVM Scientific,Inc 也利用低热容量的材料代替金属制作柱支架及色谱炉壁,以减少原来柱箱的热容量,从而实现快速升、降温。该公司的 LTM A58 是专门为改装 HP 6890 而制作的部件。

新色谱柱的开发是另一经久不断的探索领域,本届年会共展示 11 种新的色谱柱。

多家公司都聚焦于改进原有 PEG-20M 固定相对氧、水分的敏感性和较低的使用温度。SGE 公司将 PEG WAX 相植入到一种合成玻璃的溶胶凝胶

中,得到比传统 PEG 柱的热稳定性更高的极性柱。而 Restek 公司则研发一种硅橡胶骨架的改性固定相,其极性与 PEG WAX 相似,但对氧气和自由脂肪酸不敏感,有更高的热稳定性,据认为要比传统的 PEG 柱优越得多。

毛细管色谱中的最新产品是溶胶-凝胶柱(sol-gel column)。这种产品将合成的惰性玻璃晶格键合到柱壁上,藉以掩蔽石英壁上的活性点,十分有效地解决样品和相之间的相互作用。该技术有望拓宽柱的选择性和溶质的迁移特性。

有商业兴趣的新闻是 VICI Gig Harbor 公司(Valco 的一家分公司,两年前才生产 GC 柱)宣称:因为革新了工艺,它的产品的价格比老牌厂商的同类产品要低 35%,而质量则高于或与之相当。在本届匹茨堡的 11 种色谱柱新产品中该厂占有三项,均为低流失的 MS 柱。

在色谱软件方面 Scientific Software 的新版 EZChrom Elite Enterprise data system 2.8.3 软件可支持工作站或顾客服务,控制 186 种型号的 GC、HPLC、PDA 和 CE。而 Varian 的 Galaxie chromatography data system 顾客服务数据系统,使用简便,可控制许多不同厂家生产的 GC、HPLC;还可以方便用户在异地通过网络进行实验。

MS 将成为 GC 的一个标准检测器,GC/MS 作为常规分析手段,在发达国家已经非常普及。

在本届展会中,Thermo Finnigan 展出了他们最新的 PolarisQ 离子阱 GC/MS 系统。该系统有一个可调衰减的气体选件(variable-damping gas option),使 MS-MS 模式的灵敏度提高 10 倍,整个系统均由数据系统控制。

岛津公司宣称,他们的 QP-2010 GC/MS 系统中的 MS 部分的技术指标为:在扫描下,1pg 的八氟萘的讯噪比达到 200:1;质量范围 1.5~1024Da;扫描速度 6750Da/S。GC 部分为上述的 GC2010 型。

Leco 公司的 Pegasus 4D TOF GC/MS 系统很受人注意。该系统的色谱部分是一台以 HP6890 为基础的功能强大的全二维 GC;而 MS 则是一台 Pegasus 的 4D 飞行时间(TOF)质谱仪,其采样速率在全程扫描时可达 500 张谱/s。系统的软件 ChromTOF 可从非常复杂样品的共馏出组份中抽出化合物纯真的质谱图,更何况全二维 GC 的本身的分辨能力就可以比通常的单柱色谱高出几十、乃至上百倍,所以特别适用于分析非常复杂的基体。

展会上其它的新质谱检测器为:Thermo Finni-

gan 的 Tempus TOF MS Detector,这种 TOF MS 的动态范围达五个数量级;采样速率全程 100 次扫描/s;电子轰击电离方式与正、负化学电离可自动切换。另一种 Thermo Finnigan 的新产品-Trance MS Plus quadrupole MS Detector,其数据采集和控制均已升级至最新的数字讯号处理器和 USB 系统,使采集速率达 6000amu/s,动态范围超过了五个量级。

2 高效液相色谱和液相色谱/质谱联用技术

已有 30 余年历史的 LC 是相当成熟的技术,估计 LC 的全球市场额达 25 亿美元/年,与 GC 技术联袂,占据了分析仪器工业的主导地位。近年的增长非常迅速,特别是 LC/MS 等联用技术。液相色谱-质谱仪年销售量 4 亿美元,预测到 2005 年,液相色谱-质谱仪的销售额将达到 10 亿美元。

如今,HPLC 在生命科学中的应用已十分普及,最抢眼的课题是解决蛋白质组学中的分离问题。对映异构体的分离也仍非常活跃。

近几年的发展趋势可概括为以下几个方面:

(1) 多维(主要是二维)色谱重新受到青睐 这是因为生物样品中的成分过于复杂,用光谱技术,通常是用 LC/MS 和 LC/MS/MS 进行检定之前,很需要得到彻底的分离和净化。

(2) 仪器的小型、微型化和进行快速、高通量分析的趋势 当前由于已有商品可供应,所以微型化的 LC(micro-LC)和使用短的快速柱已被更多的用户所接受,以适应高通量分离。提高分析速度的其它途径是提高压力,譬如说 75000psi,但这仍处于实验室阶段;另一措施则是提高温度,本届 PITCON 会议上对上世纪 70-80 年代出现过的将温度作为 HPLC 一个参数的研究又获得重视。例如,Jon D.Thompson 提高柱温至 180~200℃,使流动相的粘度下降了 5~10 倍;他们重点研究了柱的选择性和系统设计问题。Minnesota 大学的 Peter W.Carr 也做一种用于常规 HPLC 的加热器,在 150℃和 150mL/min 下,长链烷基苯的分析时间与 25℃下相比,可缩短 60 倍。阻碍 LC 实现高温或温度梯度技术的拦路虎是色谱柱的硅胶填料在水介质中到 70℃就会被破坏。现在有了氧化锆填料(ZirChrom 生产的 Zirconia),其高比表面、窄分布的 C₁₈ 柱可以经受 0~14PH 范围和 150℃高温。Selerity Technologies 展出他们可在高温下使用的 C₈ 和 C₁₈ 硅胶填料、设备和高温液相色谱仪(HTLC),使用温度可达 200℃。在新产品发布会上作

“用温度程序提高 HPLC 的效率和速度”的报告。高温 LC 的最诱人之处或许是可以使用纯水作为洗脱液,过热的水有优良的洗脱特性;而这又将使 HPLC 技术获得一种梦寐以求的通用检测器—火焰离子化检测器(FID)。HPLC 用的 FID 曾有公司开发和生产过,终因问题多、复杂、未能被用户接受而停产。最近,纽约州立大学的 Luis Colon 等综合了微柱(填料粒度 670nm)、以水为流动相、超高压(50000psi)、高温(150~200℃)和用一个 FID 构筑了一台 LC 系统。柱效达到 500000 板数/m,而水的极性可凭藉调节压力和温度得到控制。获得的图谱非常漂亮,分析时间从常规的 25min 降至 3min。

微芯片技术是将 LC 仪器微型化的主导研究方向。这种芯片实验室是在硅片上制作进样门、流体通道、色谱柱(例如有办法在微流体芯片的通道中填装 300~3000PL 的填料);而微流体的输送多依赖电渗流(electroosmotic flow)原理。最近也有人制作微型的电动力学高压泵(electrokinetic high-pressure pump),即可作等度也能作梯度输液。如今大小如同一个 pH 计,可以分离蛋白质碎片和 DNA 的微芯片系统已有商品供应。

(3) 各种联用技术的发展 除与红外(IR)、核磁共振(NMR)、拉曼(Raman)等联用以外,最重要的当然是与质谱计联用。

接口技术是 LC/MS 技术的关键。电喷雾电离(ESI)是迄今最成功的在大气压下电离的质谱接口。与所有其它 LC/MS 接口不同,ESI 在灵敏度上属于浓度型的装置,即其响应与进入离子源的物质浓度成正比,而与流速无关。它最佳的工作流速是 nL/min 量级,十分有利于将其小型或微型化而不殃及灵敏度,也适宜作为低流速的毛细管电泳与质谱联用的接口,因为能形成多电荷离子,所以可以使用有限质量范围的标准质谱仪测量生物大分子。因为它“特别软”的电离特性,只能获得分子量的信息,所以常用串联技术(MSⁿ)以获得分子的结构信息。

大气压化学电离(APCI)的一个优点是它的高灵敏度,对许多生物及药物的灵敏度可达到非克(femtogram)级。与 ESI 不同,在 APCI 中,溶剂汽化和分子离子化的过程是分段发生的,因此它也能有效地作为正相液提色谱/质谱的接口。另一特性是它的最佳工作流量在 1mL/min 以上,所以适宜与标准的 4.6mm LC 柱联用,而不宜于微型化。APCI 适用于分析分子量在 1000Da 以下的中极性到低极性的化合物。

匹茨堡 2002 展会上, Syagen Technologies, Inc

新发展一种大气压光电离技术(APPI),展出的产品称为 PHOTOMATE。APCI 和 ESI 对于非极性分子均有歧视效应。而 APPI 与前两种传统的接口不同,既对非极性分子无歧视效应(即对许多类别的化合物都有响应),同时对于干扰物也有更高的耐容量。例如,它可以避免空气分子及许多溶剂的讯号。因此 APPI 与 APCI 及 ESI 互补,扩大可检测化合物的范围。而它的灵敏度与 APCI 相当,在低流速时则优于 APCI,检测限达 1pg;线性达 5 个数量级。Agilent 和 Finnigan 都抢先一步,与 Syagen 签了合同,最近在美国分析化学杂志上刊登将 APPI 装到各自的 LC/MS 仪器上去的产品广告。

2002 年匹茨堡会议中数量最多的展品要数与生物分子分离有关的产品以及 LC/MS。本届会上展出的新产品如下。

新色谱柱方面:

这两年最引人注意的是 Monolithic Column(整体柱)。所谓“整体柱”是指以高聚物或硅胶为材料的整体结构的色谱柱,内部有供洗脱液流通的多孔网状结构。例如硅胶基的“整体柱”允许有较高的“孔隙大小/骨架大小”比例,其柱效大概与填装 5dμ 硅胶颗粒的传统柱相当。但是“整体柱”有较好的渗透性,而且其 Van Deemter 曲线较扁平,易在高流速下工作(5mL/min),所以减少分析时间。E.Merk 曾因该产品获得了 Pittcon2001 金奖,产品称为 Chromolith。在应用方面的其它亮点如:当流速高至约 10mL/min 时,即在近涡流条件下,可以将血浆不必脱蛋白质而直接注入整体柱,分析其中的药物及代谢产物。

生产高聚物整体柱最负盛名的是 BIA Separations, 该公司利用扁平 Van Deemter 曲线及承载容量与流速无关的特性,致力于发展制备级的整体柱。当柱的流量达 250mL/min 时,柱压力降不高于 2.5MPa。高聚物整体柱也能用于分离生物大分子及像诸如病毒等纳米级(nano)微粒。

另一被看好的是:这种技术为开发新的 LC 填料开辟了“捷径”。过去,研制 LC 填料在一般实验室条件下是很困难的,而整体柱却可以在实验室里用 5min 合成并成型。用这种技术制作毛细管电动色谱(CEC)柱和芯片实验室中的微流体通道色谱柱,要比过去填装微米级的填料容易得多,为商品化开创了新路。

虽然还没有正式产品但仍应该提起的是所谓“分子印刷相”(Molecularly Imprinted Phase)。这种填

料通常用聚甲基丙烯酸酯类高聚物作基体,制作时用另一种物质的分子作为模具。使模具分子周围的高聚物表面被印上该分子的形状印记,将这种作为模具的分子萃取掉以后,制成的填料就会获得高度的分子识别功能。这项技术可以应用于制作高选择性的 LC 柱,如手性分离柱,高通量的药物筛选分析柱等。然而它们最大的应用或许是用于样品制备。目前,有不少用分子印刷相处理生物样品的报导。

下面列举 LC/MS 新仪器方面的动态:

Thermo Finnigan 宣称该公司的新产品 Surveyor MSQ 是单四极杆质谱仪中最小(比其他厂商的同类产品小 40%)、最快、最灵敏的仪器。

Varian Inc 在展览会上推出 1200L 型 LC-MS, 这种仪器的特点是配置灵活—既可作为单级四极质谱仪,也可升级为三级四极质谱仪,或再升级至兼有 GC-MS、LC-MS 两种功能的仪器。

Bruker Daltonics Inc 在本届会上介绍了该公司最新的 Apex-4 型 FTMS。这是一台高性能的 ESI-FTMS, 磁场强度 4.7T(可升级至 7 或 9.4T), 性能要高于已往的 FTMS, 但体积更小, 价格则比 Apex-3 型便宜近 20 万美元。现在认为, 微型 LC-ESI 与 FTMS 联用可以发挥双方所长, 珠联璧合, 是很有前途的产品。

Amersham Biosciences 开发一种专用于蛋白质分析的 LC-MS 系统。该系统的高效色谱系统—AKTA 是专门为纯化蛋白质而设计的, 配置毛细管或微径柱; 质谱仪是一台高质量范围、高分辨率的电喷雾离子化—飞行时间质谱仪(ESI-TOF), 在 Trap Pulse Mode 下具有超高灵敏度。仪器还可以对样品

自动脱盐, 获得蛋白质的纯度及各蛋白质成分的肽谱, 分析一个样品约需 5min。

在蛋白质分析中碰到的最头疼的问题常常是灵敏度: 通常装到 2-D 凝胶上的蛋白质质量约为几百毫微微摩尔(femtomol)或更少, 当经过消化及萃取之后, 可供质谱分析的肽的质量也就是几个 femtomol。离子阱质谱仪的灵敏度可达到亚-femtomol 级, 而其多级开裂功能则可提供更多的讯息, 所以是检定蛋白质的得力质谱技术之一。Bruker Daltonik 为此提供专门用于亚-femtomol 级蛋白质检定的装置—Esquire3000plus。系统的 LC 部分是一台 LC Packings 公司的微柱色谱仪—Ultimate nano LC system, 结合一台微型的 nano ESI。MS 部分的主体是该公司的 Esquire3000, 但在硬、软件上均经过改进, 使灵敏度增高 10 倍。对蛋白质组学的研究而言, MALDI-TOF 更快速, 所以 Esquire3000 Plus 可以作为 MALDI-TOF 筛选分析后再进行较细致研究的一种补充手段。

JEOL 展示该公司的首台 TOF MS—AccuTOF。过去的 ESI-TOF MS 只能在很窄的浓度范围内获得高分辨的质谱, 而 AccuTOF 利用一种连续的数学平均模/数转换器, 加上在离子导入和检测方面的改进, 使仪器的动态范围提高了四个数量级, 而并不损害 TOF 固有的高灵敏度、高分辨、高质量准确度和质量范围宽等优点, 因而认为是首台在高、低样品浓度下均能获得样品准确质量数的质谱仪。AccuTOF 既有 APCI 源, 也可配微量或痕量的 ESI 探头, 或选择与 Agilent 的 1100 系列 LC 联用。AccuTOF 获 2002PITTCO 铜奖。

GC, HPLC and GCMS HPLCMS techniques and their recent development

Sun Shoucheng

(National Research Center for Criterion Materials Beijing 100013)

Abstract The recent developments for GC, HPLC, GC/MS and HPLC/MS are reviewed in this paper, And the assessments are given for the new instruments exhibited an the canference, Pitts burgh in 2002.

Key words GC/MS HPLC/MS Techniques developement

书 讯

由清华大学化学系邓勃教授主编、有来自高等学校、科研院所 20 多位专家参编的分析化学综合性工具书《分析化学辞典》, 收集了分析化学及其相关学科的词条 6000 余条, 内容涉及分析化学的各个领域, 对分析化学中重要的定义、概念、常用的术语、分析方法、分析技术等分别列为辞条, 进行了适当的介绍。对每一辞条的念义都做了准确的诠释, 叙述简明扼要。全书约一百多万字。本书可供化学、化工、冶金、地质、环境、医药卫生、农业、商检与其他领域从事分析测试的人员, 以及大专院校有关专业的师生参考。该书将于 2003 年 1 月份由化学工业出版社出版。