



目 录

	Page
1. 序言-----	1
1-1. 规格-----	1
1-2. ODP2 HP 的流动相条件-----	1
2. ODP2 HP 的特长 -----	1
2-1. 高理论塔板数-----	2
2-2. 高极性物质的保留-----	2
2-3. 碱性物质的分析-----	3
2-4. 盐浓度依存性-----	4
2-5. 除去蛋白质的能力-----	4
2-6. 生物体液中的药物分析-----	5
2-7. 强耐碱性-----	7
3. ODP2 HP 的基本特性-----	8
3-1. 流量的影响 -----	8
3-2. 样品负荷量的影响-----	9
3-3. 样品注入量的影响 -----	10
3-4. 测定温度的影响 -----	11
3-5. 流动相组成的影响 -----	12

1. 前言

Shodex ODP2 HP 是拥有高理论塔板数的反相聚合物基质色谱柱。ODP2 HP 与一般的 ODS 色谱柱比较, 对高极性物质有着很强的保留能力。ODS 会因蛋白质吸附造成色谱柱劣化, 但是在 ODP2 HP 中, 几乎不存在蛋白质吸附, 在蛋白质可以完全洗脱的情况下适用于生物体液中药物的分析。因为 ODP2 HP 受流动相的盐浓度影响很小, 所以也适应于 LC/MS 分析。

1-1. 色谱柱的规格

订货号	产品名称	粒径 (μm)	塔板数 (TPN/column)	规格(mm) ID x L
F7622001	<u>ODP2 HP-4B</u>	5	> 3,500	4.6 x 50
F7622002	<u>ODP2 HP-4D</u>	5	> 13,000	4.6 x 150
F7622003	<u>ODP2 HP-4E</u>	5	> 17,000	4.6 x 250
F6714010	ODP2 HPG-4A	5	保护柱	4.6 x 10
F7622004	<u>ODP2 HP-2B</u>	5	> 3,000	2.0 x 50
F7622005	<u>ODP2 HP-2D</u>	5	> 7,000	2.0 x 150
F6714011	ODP2 HPG-2A	5	保护柱	2.0 x 10

填料: 聚羟基甲基丙烯酸酯

全部色谱柱

可使用温度范围: 20-60°C

可使用 PH 值范围: 3-12

溶剂耐受性: 乙腈、甲醇都能以 100% 的浓度使用。

1-2. ODP2 HP 的流动相条件

1) 可以使用水、酸、碱性物质、盐的水溶液(包含缓冲液)、乙腈、甲醇及以下的任意混合溶液。

<代表性酸> 磷酸、蚁酸、醋酸、氟化醋酸

<代表性碱性物质> 氨

<代表性盐> 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸铵、酸铵、醋酸铵、碳酸铵、碳酸钠、碳酸氢钠

(注意) 流动相的 PH 值请控制在 3-12 内。

2) 酸、碱性物质以及盐的总浓度请调制在 100mM 以下。一般在 1-50mM 的范围内比较适宜。

3) 在含盐的水溶液中加入乙腈或者甲醇的情况下, 请在确认混合后盐不会析出后再使用。

4) 正乙烷、甲苯等非极性有机溶剂不能使用。

2. ODP2 HP 的特长

2-1. 高理论塔板数

ODP2 HP 是聚合物基质的反相模式色谱柱。其理论塔板数和早期的产品 ODP-50 相比较, 几乎提高了 2 倍。

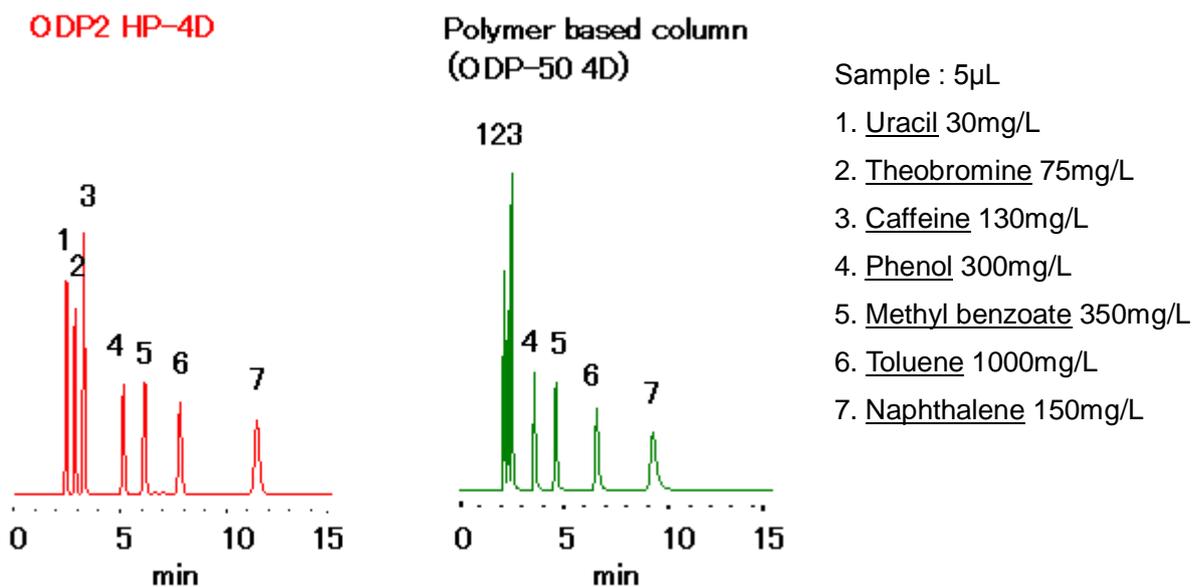
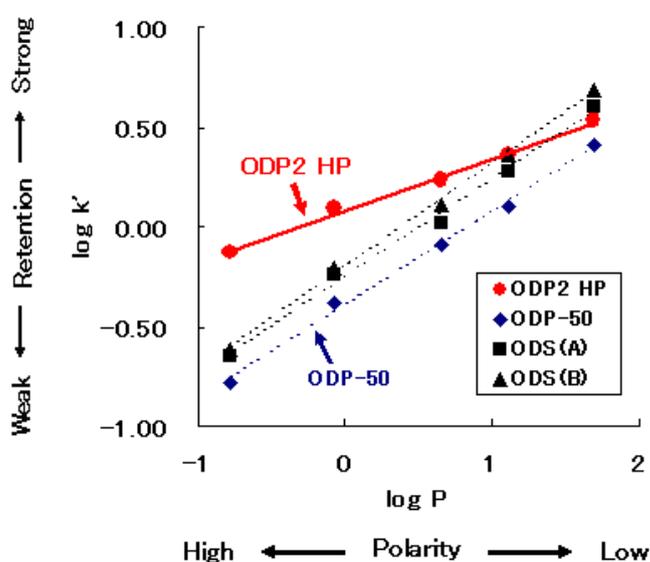


图 1: ODP2 HP 与常规产品的分离比较

Columns	: Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)	: Shodex Asahipak ODP-50 4D (4.6mmID*150mm)
Eluent	: H ₂ O/CH ₃ CN=55/45	: H ₂ O/CH ₃ CN=35/65
Flow rate	: 0.6mL/min	: 0.6mL/min
Detector	: UV(254nm)	: UV(254nm)
Column temp.	: 40°C	: 40°C

2-2. 高极性物质的保留

图 2 表所示物质极性及其保留能力的关系。ODP2 HP 对高极性的物质的保留能力相比其他色谱柱更高。



logP 值越小极性越高，logk'值越大保留能力越强。

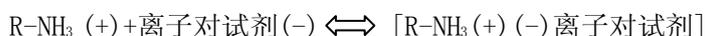
Columns	: Shodex ODP2 HP-4D, Asahipak ODP-50 4D ODS(A), ODS(B) from (4.6mmID*150mm)
Eluent	: H ₂ O/CH ₃ CN=75/25
Flow rate	: 1.0mL/min
Column temp.	: 40°C

图 2: 各种色谱柱物质极性及其保留能力的关系

2-3. 碱性物质的分析

一般来说，离子型物质的反相分析需要在抑制样品解离的 PH 条件下分析并使用离子对试剂。离子对试剂中有与样品相反的离子性，甚至可能具有疏水性。使用离子对试剂进行的分析因为与下列两种分离模式有关，所以分离机制比较复杂。

① 样品与离子对试剂形成离子对、样品的疏水性提高、保留性加强。



碱性物质

离子对

② 离子对试剂的疏水性部分被反相色谱柱吸附，反相色谱柱将作为离子交换色谱柱运用。

用反相分析低级胺类碱性物质的情况下，ODS 柱这样的硅胶反相色谱柱在抑制碱性物质解离的 PH 条件也就是碱性环境下有耐久性的问题，一般会使用离子对试剂的分析手法。与这相对应，作为聚合物系反相色谱柱的 ODP2 HP 有着很好的耐碱性，流动相的 PH 值可以配成碱性环境，可以抑制碱性物质的解离，因为样品的疏水性会得到提高所以可以很方便的进行反相分析。图 3 中是 ODP2 HP 与其他公司的 ODS 色谱柱 ODS (A) 分析碱性药物实例。

*关于 ODP2 HP 色谱柱的耐碱性请参考 2-6

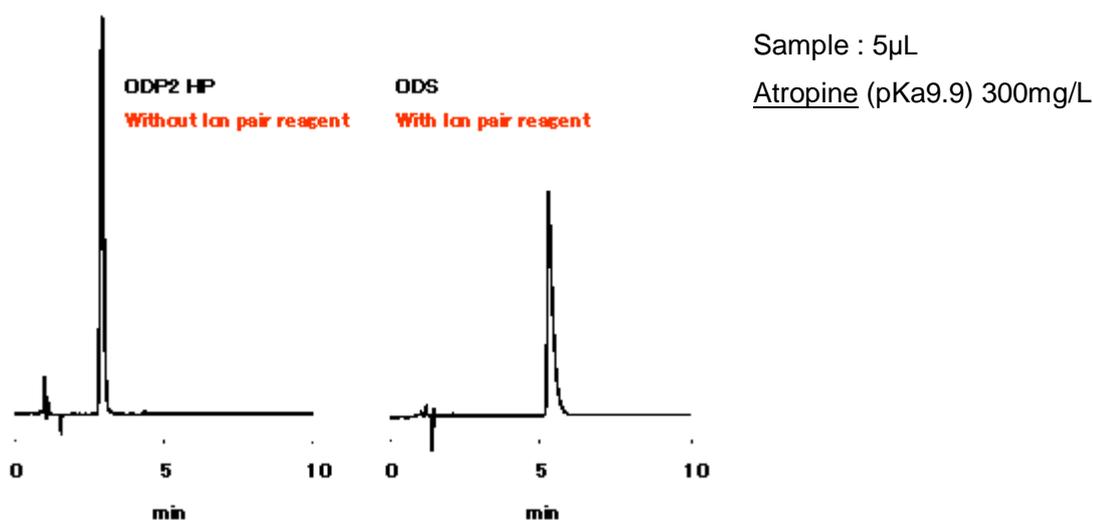


图 3. ODP2 HP 与其他公司的 ODS 色谱柱 ODS (A) 分析碱性药物实例

Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)

Eluent : 10mM Sodium phosphate buffer (pH11)/CH3CN=55/45

Flow rate : 1.0mL/min

Detector : UV(220nm)

Column temp. : 40°C

Column : ODS from other manufacturer (4.6mmID*150mm)

Eluent : 0.1% Sodium 1-pentanesulfonate aq./CH3CN=55/45

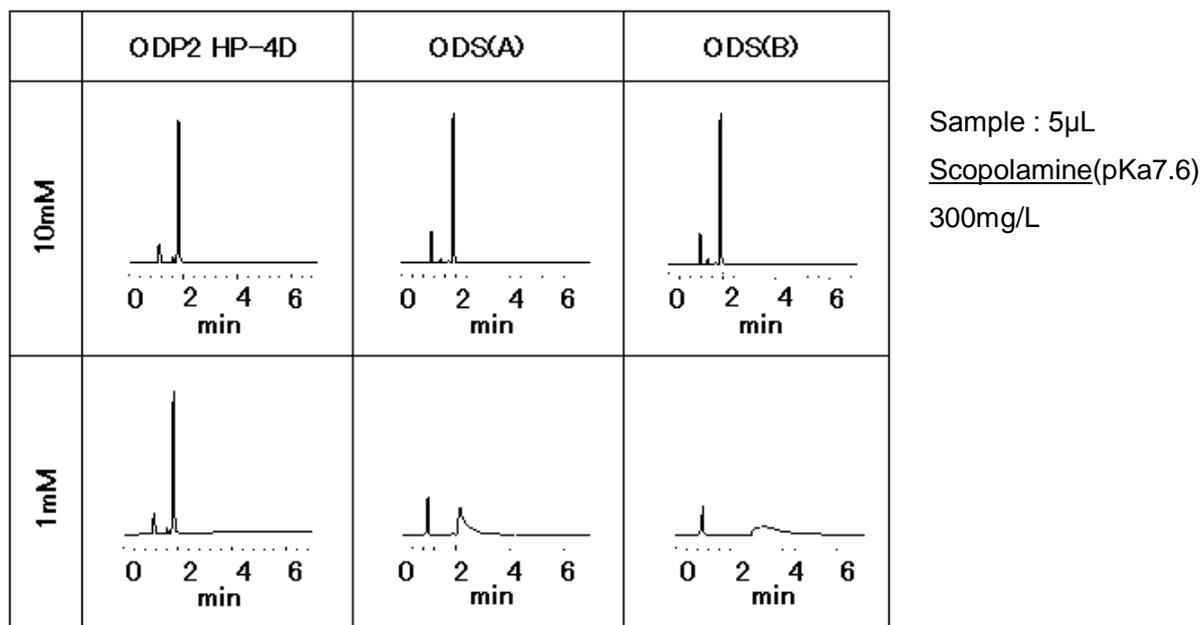
Flow rate : 1.0mL/min

Detector : UV(220nm)

Column temp. : 40°C

2-4. 低盐浓度依存性

使用 ODP2 HP-4D 与其他公司 2 种 ODS 色谱柱，根据流动相中的醋酸铵浓度洗脱的情况比较如图 4 示。使用 10mM 醋酸铵缓冲液，每种色谱柱都能得到比较好的谱图。当醋酸铵浓度低于 1mM，东莨菪碱与 ODS 柱上残存的硅醇基的相互作用，引起峰形拖尾。相反，聚合物基质 ODP2 HP-4D 色谱柱，即使醋酸铵浓度低，由于东莨菪碱与填料不存在非特异吸附的相互作用，东莨菪碱的洗脱峰形尖锐。由于 ODP2 HP 色谱柱，即使盐浓度低也不会影响分离如洗脱时间和峰形，因此特别适合 ESI 法 (LC/MS) 分析。该方法中盐浓度会导致样品的离子化抑制。



图四： 使用 ODP2 HP-4D 与其他公司 2 种 ODS 色谱柱，根据流动相中的醋酸铵浓度洗脱情况的比较

Columns : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm each)

ODS(A), ODS(B) from other manufacturer (4.6mmID*150mm each)

Eluent : Ammonium acetate buffer(pH7.0)/CH₃CN=35/65

Flow rate : 1.0mL/min

Detector : UV(254nm)

Column temp. : 40°C

2-5. 除去蛋白质的能力

ODP2 HP-2B 以及其他公司 ODS 色谱柱 ODS (A) 注入牛血清白蛋白(BSA)时 BSA 的注入次数与相对压力(蛋白质注入前的压力以 100%表示)如图 5 所示。图 6 表示在 ODP2 HP-2B 中注入 BSA 时的谱图。ODS (A) 色谱柱会随着注入样品次数增多而造成压力上升。另一方面，ODP2 HP-2B 在注入 140 次后压力没有明显变化，BSA 在色谱柱中没有保留全部洗脱。一般的 ODS 色谱柱会吸附蛋白质导致色谱柱劣化，ODP2 HP 基质的表面是高级性物质且孔径很小，所以不吸附蛋白质，也基本不会出现劣化的情况。

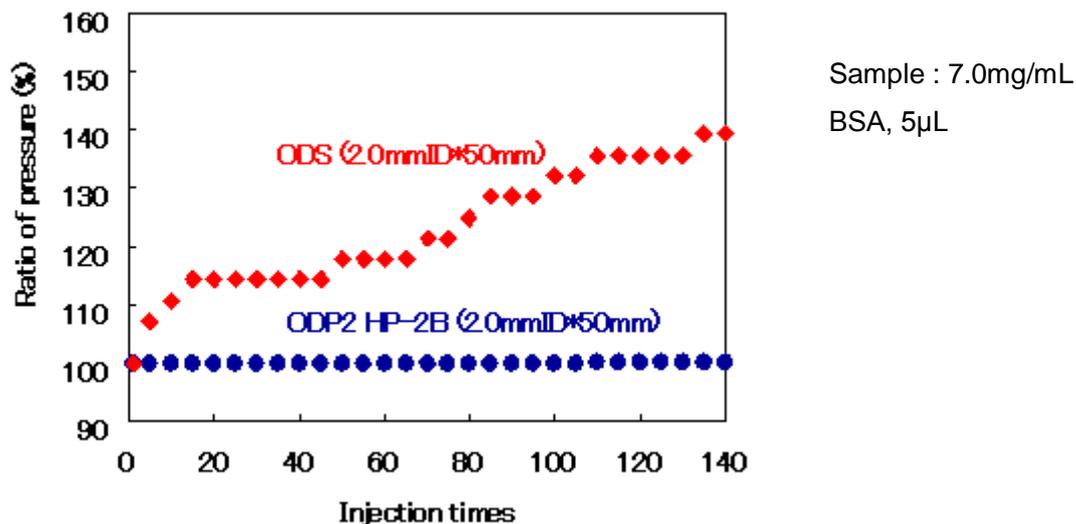


图 5: 牛血清蛋白(BSA)注入回数与相对压力。

Column : Shodex ODP2 HP-2B (2.0mmID*50mm)
 Eluent : 1mM CH₃COONH₄ aq./CH₃CN=90/10
 Flow rate : 0.2mL/min
 Detector : UV(220nm)
 Column temp. : 30°C

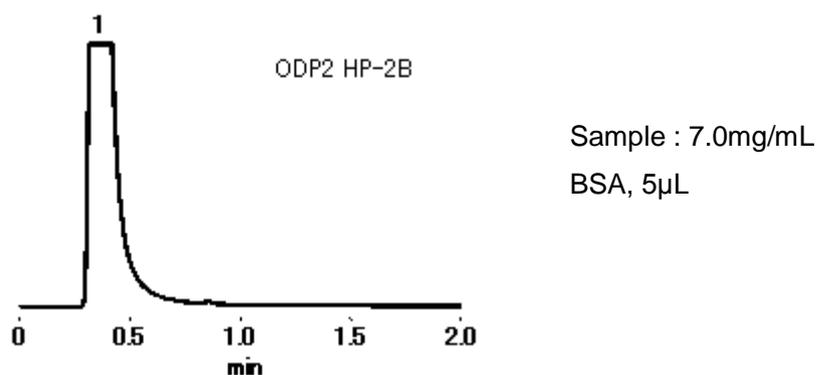


图 6: BSA 洗脱模式

Column : Shodex ODP2 HP-2B (2.0mmID*50mm)
 Eluent : 1mM CH₃COONH₄ aq./CH₃CN=90/10
 Flow rate : 0.2mL/min
 Detector : UV(220nm)
 Column temp. : 30°C

2-6. 生物体液中的药物分析

LC/MS 虽然适合高灵敏度的分析，但是蛋白质会污染 MS(质量检测器)，影响样品的离子化。分析含有蛋白质的样品时，虽然一般都需要进行前处理，但是要完全去除蛋白质非常困难。因此，蛋白质和样品同时被洗脱，引起了离子抑制，可能使样品峰变小。使用聚合物基质反相色谱柱 ODP2 HP 可以完全不保留蛋白质，在蛋白质被洗脱后，只把样品中的巴比妥导入 MS 系统，不受离子抑制的影

响，进行分析。

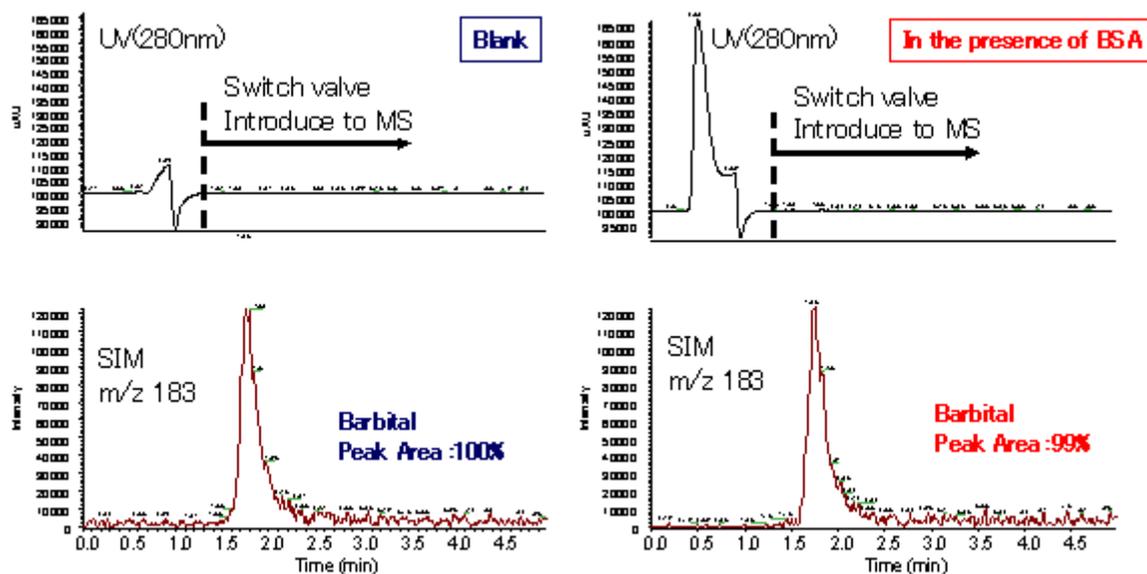


图 7：BSA 中巴比妥的 LC/MS 分析

Sample : Barbital (500ng/mL) in BSA (7.0mg/L), 10 μ L

Column : Shodex ODP2 HP-2B (2.0mmID*50mm esch)

Eluent : 10mM Ammonium acetate aq./CH₃CN=70/30

Flow rate : 0.2mL/min

Detector : UV(280nm), ESI-MS(SIM negative)

Column temp. : 30 $^{\circ}$ C

图 8 为使用 ODP2 HP-2B 以及其他公司 ODS 色谱柱在存在牛血清蛋白的情况下使用 LC/MS 的谱图比较。图 9 为测定次数与巴比妥回收率的关系(回收率的检测方法与图 7 相同)。ODS(A) 由于蛋白质的存在，会受到离子抑制的影响，与没有蛋白质的时候相比，巴比妥的峰变小。与之相反，ODP2 HP-2B 不受离子抑制的影响，蛋白质和药物的分离较好，多次重复测试后巴比妥的回收率依然较高。

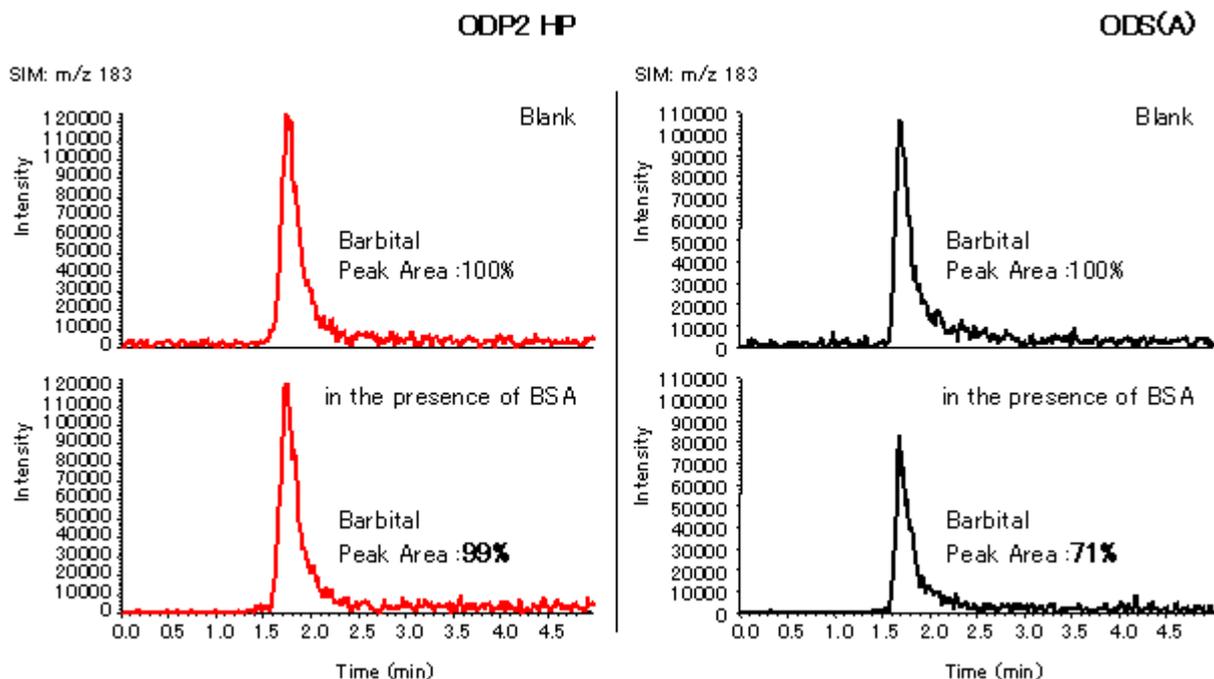


图 8: ODP2 HP-2B 与 ODS (A) BSA 中巴比妥的回收率比较

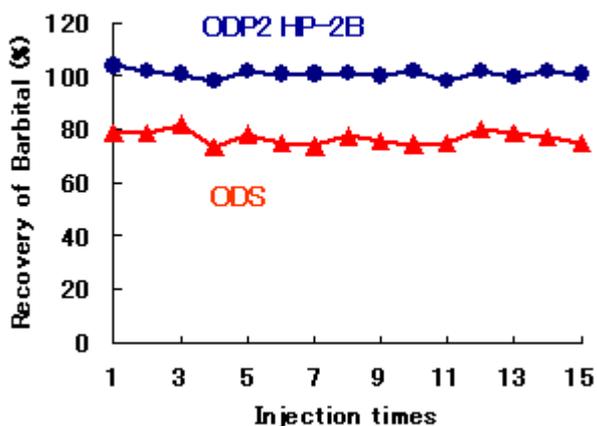


图 9: 测定次数与 BSA 中巴比妥的回收率的关系

Sample : Barbitol (500ng/L) in BSA (7.0mg/L), 10 μ L

Column : Shodex ODP2 HP-2B, ODS from other manufacturer(2.0mmID*50mm esch)

Eluent : 10mM Ammonium acetate/CH₃CN=70/30

Flow rate : 0.2mL/min

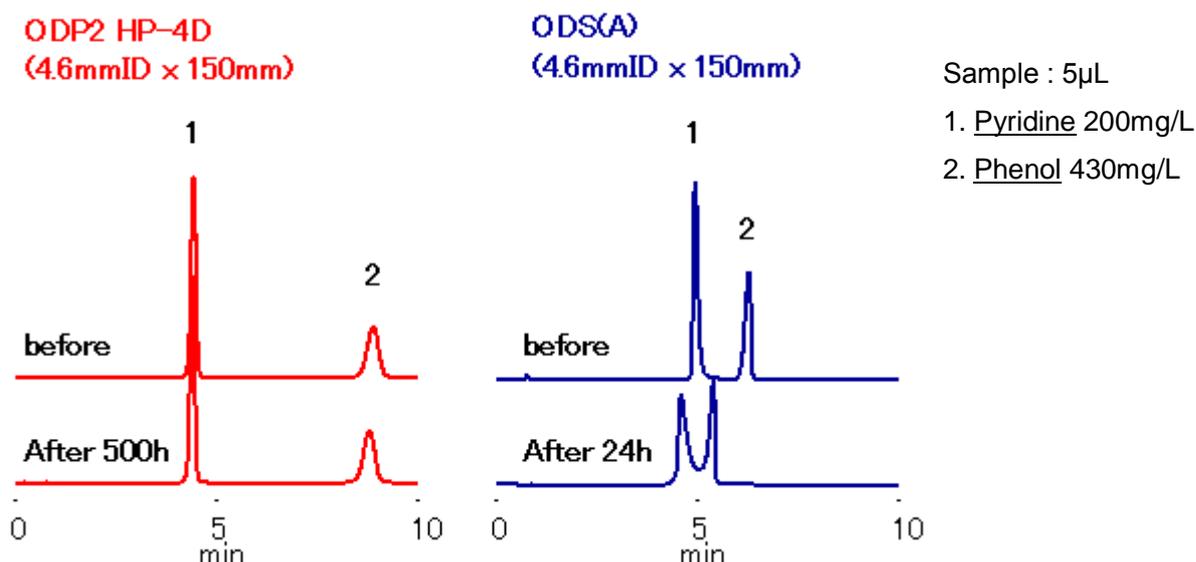
Detector : ESI-MS (SIM negative)

Column temp. : 30 $^{\circ}$ C

2-7. 强碱耐久性

一般 ODS 色谱柱如果使用碱性流动相, 因为硅胶基质会发生分解可能引起色谱柱的劣化。图 10 为 ODP2 HP-4D 与其他公司 ODS (A) 通过碱性流动相前后的质谱分析图比较, 图 11 为通液时间与吡啶的相对理论塔板数(碱性流动相通液前的理论塔板数为 100%)。ODS (A)通碱液 24 小时后, 各样品的保留时间逐渐变快, 柱效降低, 表明色谱柱劣化。聚合物反相柱 ODP2 HP-4D 通碱液超过 500 小时后, 各样品的保留时间和理论塔板数基本不改变, 显示了优异的耐碱性。

图 10: 碱性流动相通液前后的质谱分析图比较



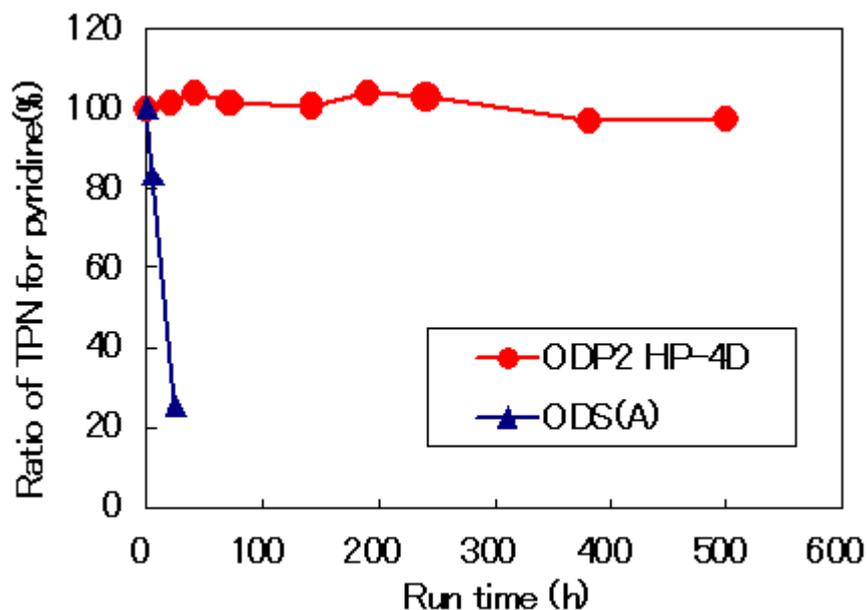
Test condition of alkali durability:

Eluent : 10mM Phosphate buffer(pH12)/CH₃CN=45/55

Flow rate : 0.6mL/min

Column temp. : 30°C

图 11: 碱性流动相通液时间与相对理论塔板数的关系



Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)

ODS(A) from other manufacturer (4.6mmID*150mm)

Eluent : H₂O/CH₃OH=70/30

Flow rate : 1.0mL/min

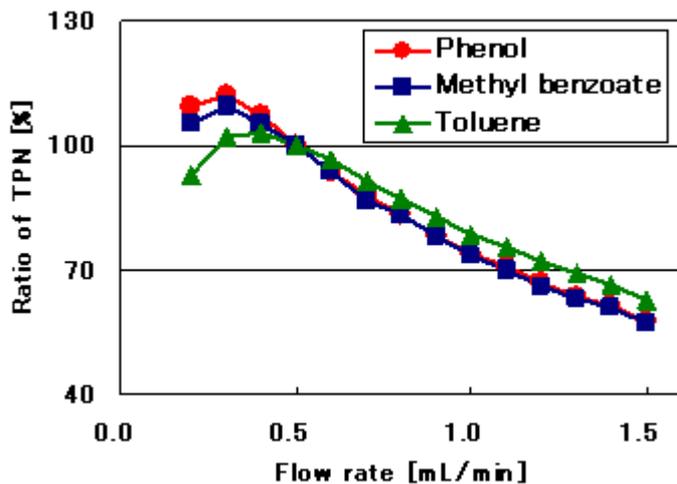
Detector : UV(254nm)

Column temp. : 40°C

3. ODP2 HP 的基本特性

3-1. 流量的影响

使用聚合物反相柱 ODP2 HP 4D (4.6mm ID x 150mm L)时流速与理论塔板数的关系以及流速与保留时间的关系如图 12 所示。每种样品均显示为流速 0.3mL/min 时理论塔板数最高, 当流速低于 0.3mL/min 时由于样品扩散柱效降低。另外, 流速低于 0.5mL/min 时各样品的保留时间长。因此使用 ODP2 HP-4D 时推荐标准使用流速为 0.5 – 1.0mL/min。 ODP2 HP-2D (2mm ID x 150mm L) 的标准使用流速为 0.1 – 0.2mL/min。



Sample : 5 μ L
 Phenol 300ppm
 Methyl benzoate 350ppm
 Toluene 1000ppm

图 12: 流量与理论塔板数的关系

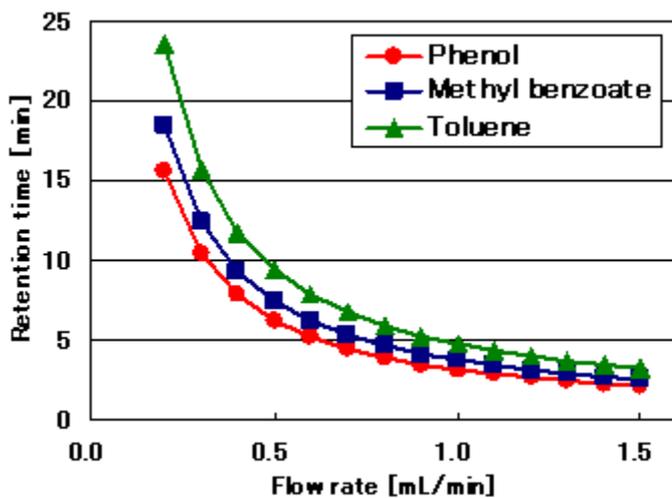


图 13: 流量与保留时间的关系

Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)

Eluent : H₂O/CH₃CN=55/45

Detector : UV(254nm)

Column temp. : 40°C

3-2. 样品负荷量的影响

ODP2 HP 4D (4.6mm ID x 150mm L) 样品负荷量与理论塔板数的关系如图 13。为充分发挥 ODP2 HP-4D 的柱性能, 建议样品负荷量低于 10 μ g。建议 ODP2 HP-2D (2mm ID x 150mm L) 的样品负荷量低于 2 μ g。

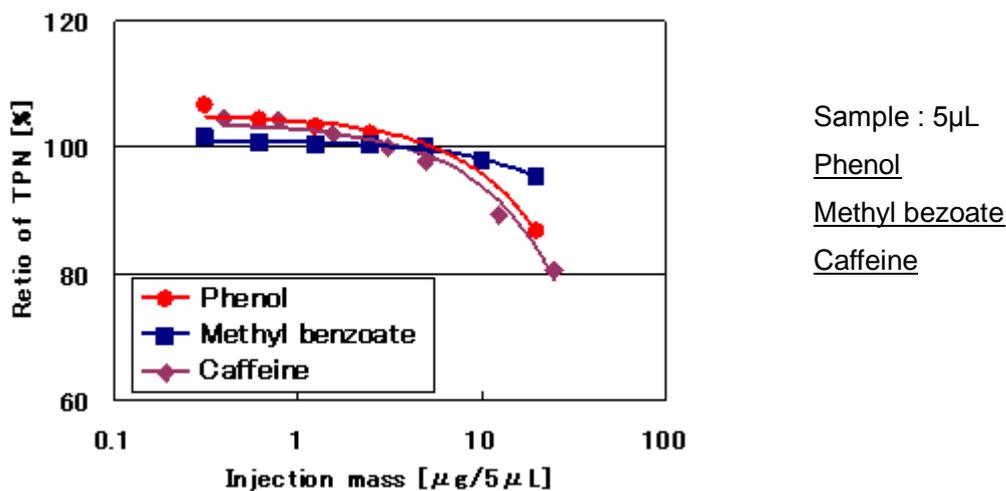


图 14: 样品负荷量与相对理论塔板数的关系

Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)

Eluent : H₂O/CH₃CN=55/45

Flow rate : 1.0mL/min

Detector : UV(254nm) Phenol, Methyl benzoate

UV(300nm) Caffeine

Column temp. : 40°C

3-3. 样品注入量的影响

ODP2 HP 4D (4.6mm ID x 150mm L)样品进样量与理论塔板数的关系如图 15 所示。为充分发挥柱性能, 建议 ODP2 HP-4D 的样品进样量为 40μL 以下。ODP2 HP-2D (2mm ID x 150mm L)的样品进样量为 8μL 以下。

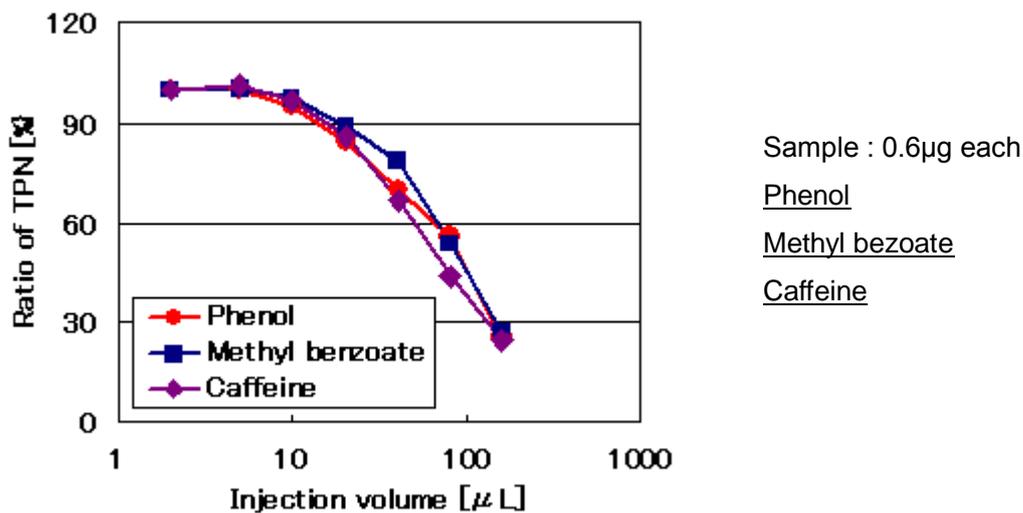


图 15: 样品注入容量与相对理论塔板数的关系

Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)
 Eluent : H₂O/CH₃CN=55/45
 Flow rate : 1.0mL/min
 Detector : UV(254nm) Phenol, Methyl benzoate
 UV(300nm) Caffeine
 Column temp. : 40°C

3-4. 测定温度的影响

测定温度和保持时间的关系如图 16 所示，测定温度与相对理论塔板数(测定温度在 40°C时的理论段数作为 100%)的关系图如图 17 所示。温度与保留时间的关系以及温度与理论塔板数的关系如下。测试温度不同，保留时间和理论塔板数也会不同。因此建议使用柱温箱，使色谱柱在恒定的温度下进行测试。

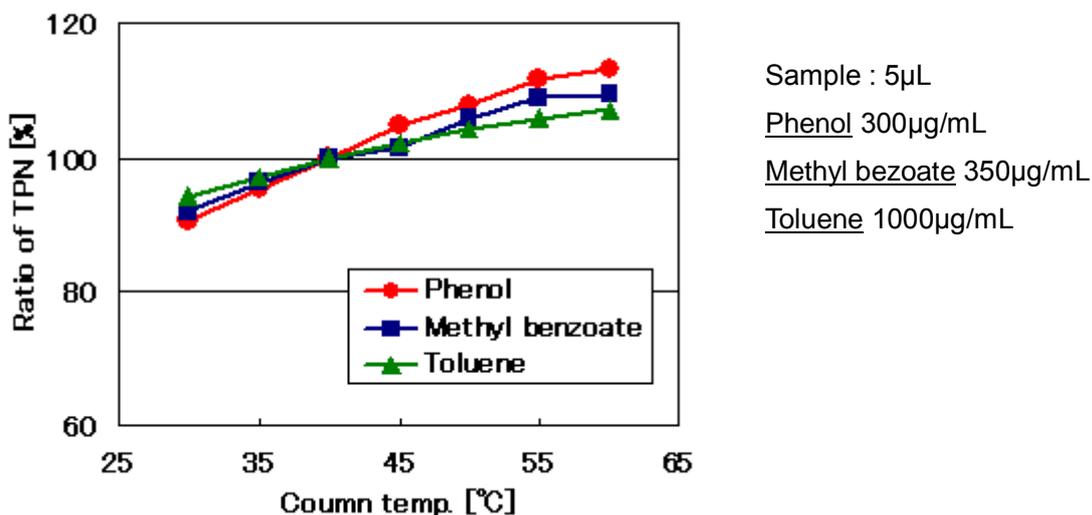


图 16: 测定温度与保留时间的关系

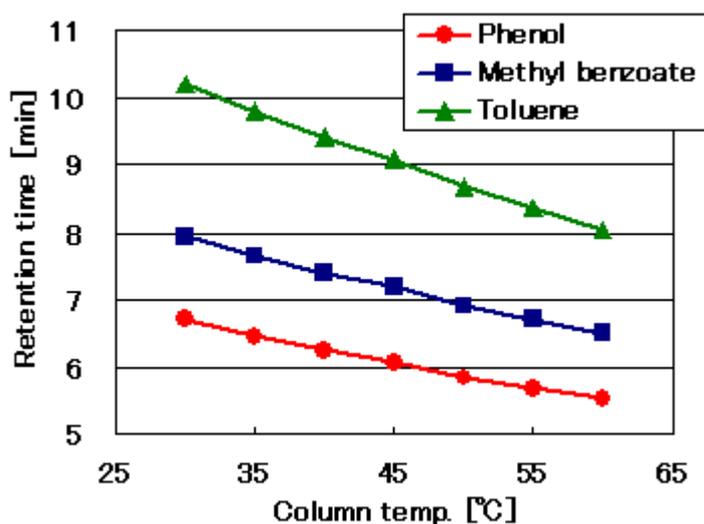


图 19: 测定温度和相对理论塔板数的关系

Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)
 Eluent : H₂O/CH₃CN=55/45
 Detector : UV(254nm)

3-5. 流动相组成的影响

流动相中的有机溶剂乙腈的含量与理论塔板数的关系以及有机溶剂乙腈的量与保留时间的关系如图 18 所示。各样品的有机溶剂含量为 40~45%之间时柱效最高。有机溶剂乙腈的含量与各样品保留时间的关系如图 19 所示。乙腈含量低于 40%时，各样品的保留时间延长。推荐乙腈含量 45% 为标准分析条件。

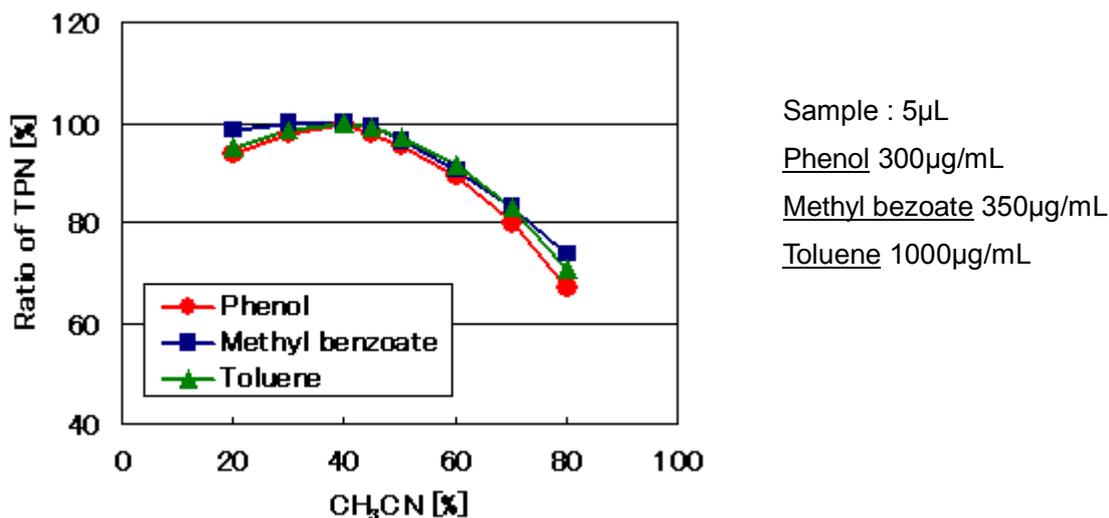


图 18: 乙腈含量与相对理论塔板数的关系

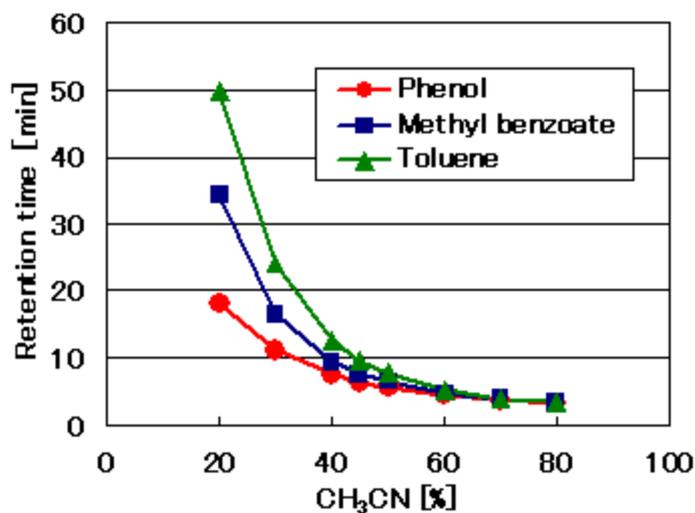


图 19: 乙腈含量与保留时间的关系

Column : Shodex ODP2 HP-4D (4.6mmID*150mm)
 Eluent : H₂O/CH₃CN
 Flow rate : 0.5mL/min
 Detector : UV(254nm)
 Column temp. : 40°C

Shodex 主页

<http://www.shodexchina.com/>

Shodex 主页上介绍了各产品的规格、应用数据以及 HPLC 发生故障时的处理方法等，详情请参考我们的主页。

[注意]

1. 请在使用前仔细阅读产品附带的操作手册。
2. 由于产品的升级换代，某些规格会有变化，恕不另行通知。
3. 本产品目录中的数字仅作参考之用，并不是保证值。
4. 如果操作手册中没有安全方面的内容，处理试剂和其他化学品时请务必按相关规定小心谨慎。

昭和电工科学仪器（上海）有限公司

上海市静安区石门一路 211 号旺旺大厦 18F

邮 编：200241

电 话：021-6217-6111 传真：021-6217-9879

销售邮箱：sales@shodexchina.com

技术支持：support@shodexchina.com

公司网站：www.shodexchina.com

