



# 新型亲水作用色谱柱 ***TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m*** 的基本性能评价及应用举例

东曹达（上海）贸易有限公司技术服务中心  
东曹公司生命科学事业部

---



# 亲水作用色谱模式的特点

## ■ 亲水作用色谱 (HILIC) 的分离原理

利用样品在流动相和固定相中的分配平衡，样品中的极性官能团与固定相表面进行亲水相互作用

## ■ 特点

- 1) 固定相一般为极性官能团（如氨基、酰胺基、羟基等）修饰硅胶或聚合物
  - 2) 流动相类似反相的流动相，一般使用比固定相极性低的溶液。如：乙腈/水  $\geq 7/3$  等
  - 3) 极性化合物保留强，适合多肽、糖、核酸等低分子、高极性化合物的分离
  - 4) 疏水性杂质不积累，可以最大程度避免色谱柱损坏。
-



# 东曹HILIC色谱柱

1. **TSKgel Amide-80 (5 $\mu$ m, 3 $\mu$ m)**
  - 硅胶基质（酰胺基型）HILIC色谱柱
  - 极性化合物保留强、分离性能强，但还原糖分离发生峰分裂现象
2. **TSKgel NH<sub>2</sub>-60 (5 $\mu$ m)**
  - 硅胶基质（氨基型）HILIC色谱柱
  - 适合糖类化合物分离，但化学稳定性不高

A large green curved arrow pointing from the second item in the list towards the highlighted text box.

**新型HILIC色谱柱：TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3  $\mu$ m**

- 氨基型色谱柱耐久性大幅度提高
- 与Amide-80具有相同或更高的保留性能和更高的分离性能



# TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m 色谱柱及填料

## 基本性质

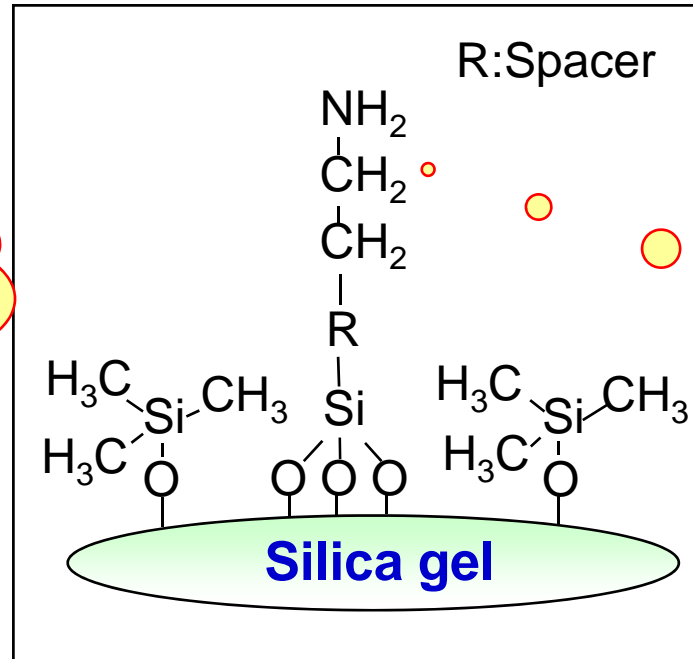
基质	硅胶	
平均粒径	3 $\mu$ m	
孔径	10nm	
比表面积	450m <sup>2</sup> /g	
表面官能团	氨基	
封端处理	TMS 封端	
色谱柱	2.0mm I.D. x 15cm	4.6mm I.D. x 15cm
保护柱	2.0mm I.D. x 1.0cm	3.2mm I.D. x 1.5cm



# TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3μm 的优点

## 表面构造

残余硅羟基封端

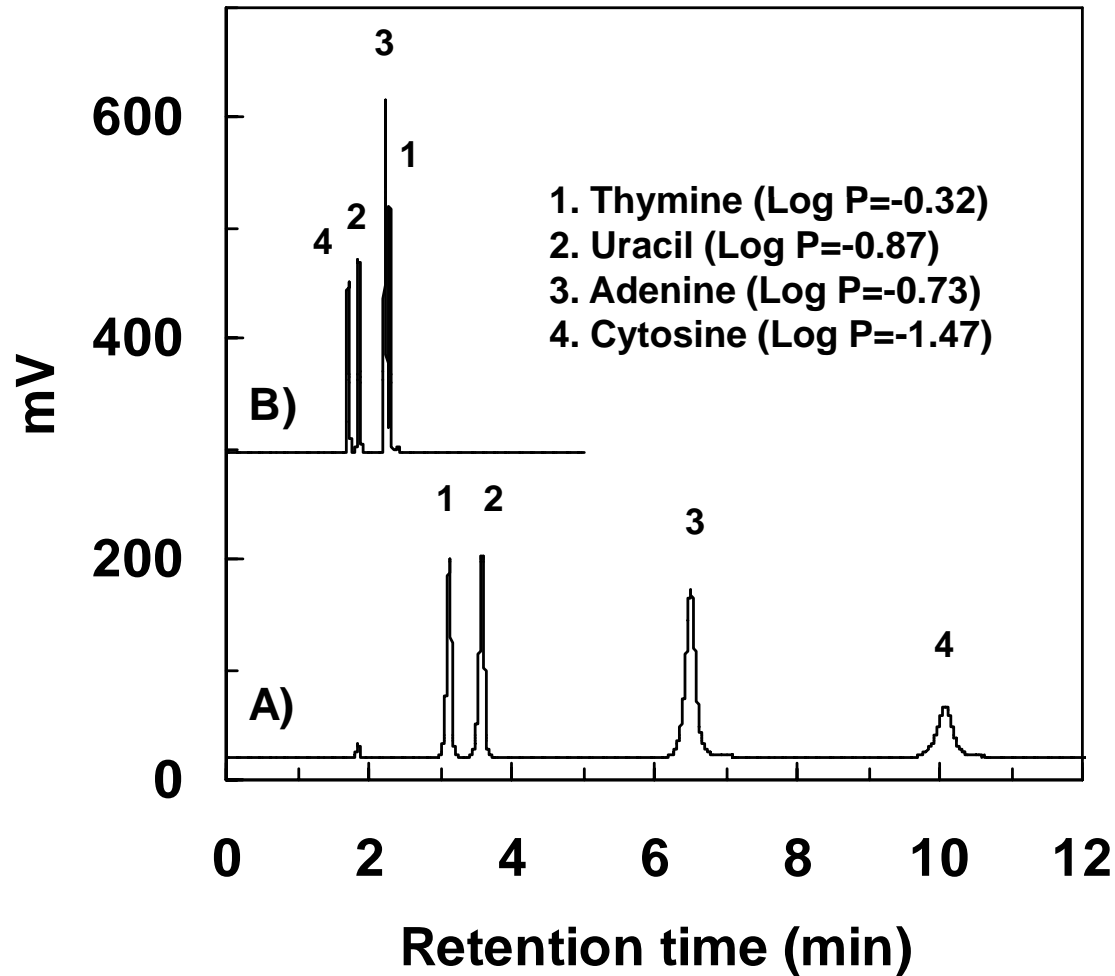


氨基型极性官能团

- 硅胶基质氨基型色谱柱适宜分离亲水性化合物
- 残余硅羟基封端处理，耐久性好
- 立体异构体峰不分裂，适宜测定还原性糖
- 较其他氨基柱对糖类化合物的回收率高
- 采用3μm填料适宜进行高分离、快速、高灵敏度分析
- 与反相色谱柱相比表现出明显的分离选择性差异
- 采用高浓度有机溶剂做流动相，适合进行LC/MS(/MS)分析



# 核酸碱基的分离比较 (NH<sub>2</sub>-100 vs. ODS-100V)



## Conditions

Column : **A) TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**  
(4.6mm I.D. x 15cm)  
**B) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m**  
(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent :

**A) 20mmol/L HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>/AcCN (10/90)**

**B) 20mmol/L HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>/AcCN (90/10)**

Flow rate: 1.0mL/min

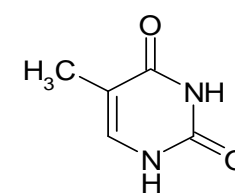
Detect. : UV (254nm)

Temp. : 40°C

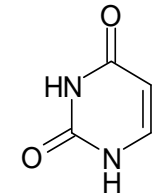
Inj. vol. : 10 $\mu$ L

Samples : 1. Thymine,

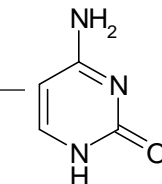
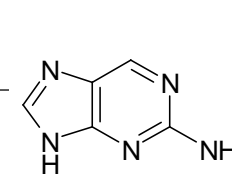
2. Uracil,



3. Adenine,

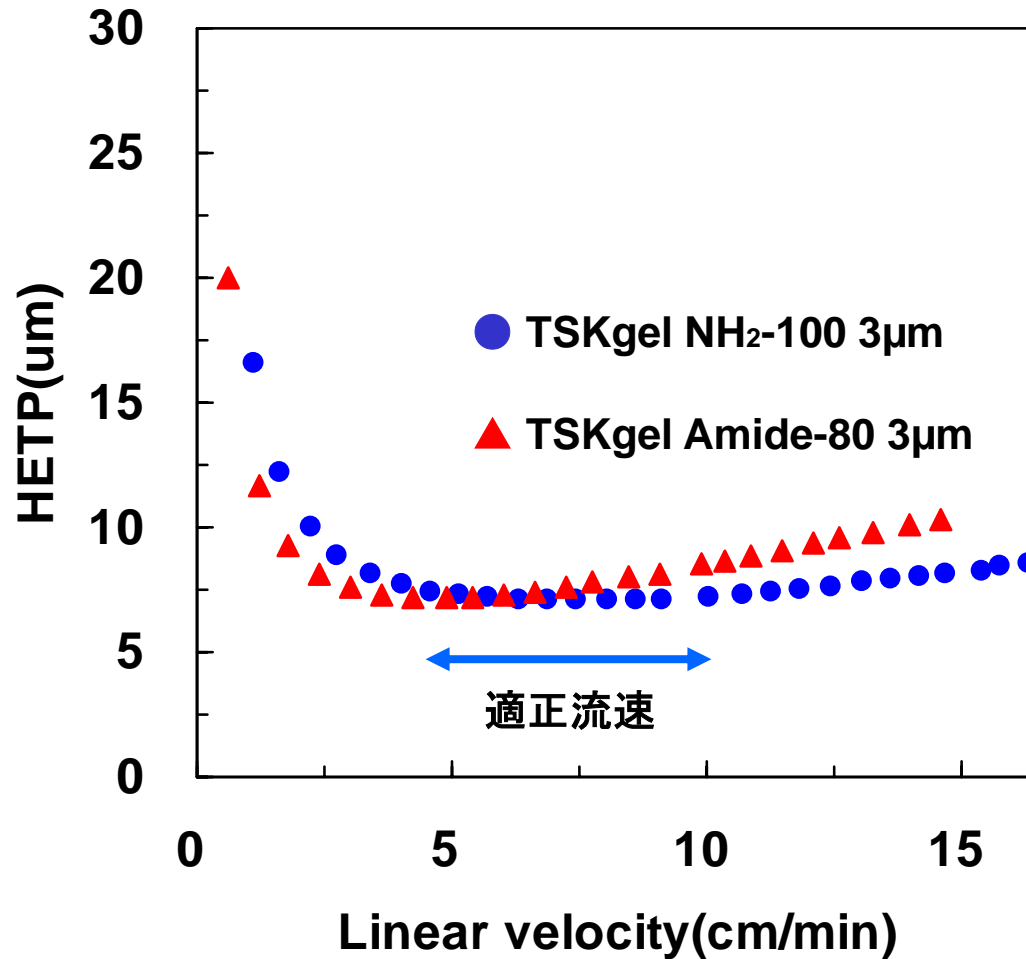


4. Cytosine





# 分离性能与流速的关系 (NH<sub>2</sub>-100 vs. Amide-80)



## Conditions

Column : **TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3μm**  
(4.6mm I.D. x 15cm)  
TSKgel Amide-80 3μm  
(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent : H<sub>2</sub>O/AcCN (10/90)

Flow rate: 0.1~2.4mL/min

Detect. : UV (254nm)

Temp. : 40°C

Inj. vol. : 10μL

Sample : Uracil

## Recommend Flow rate

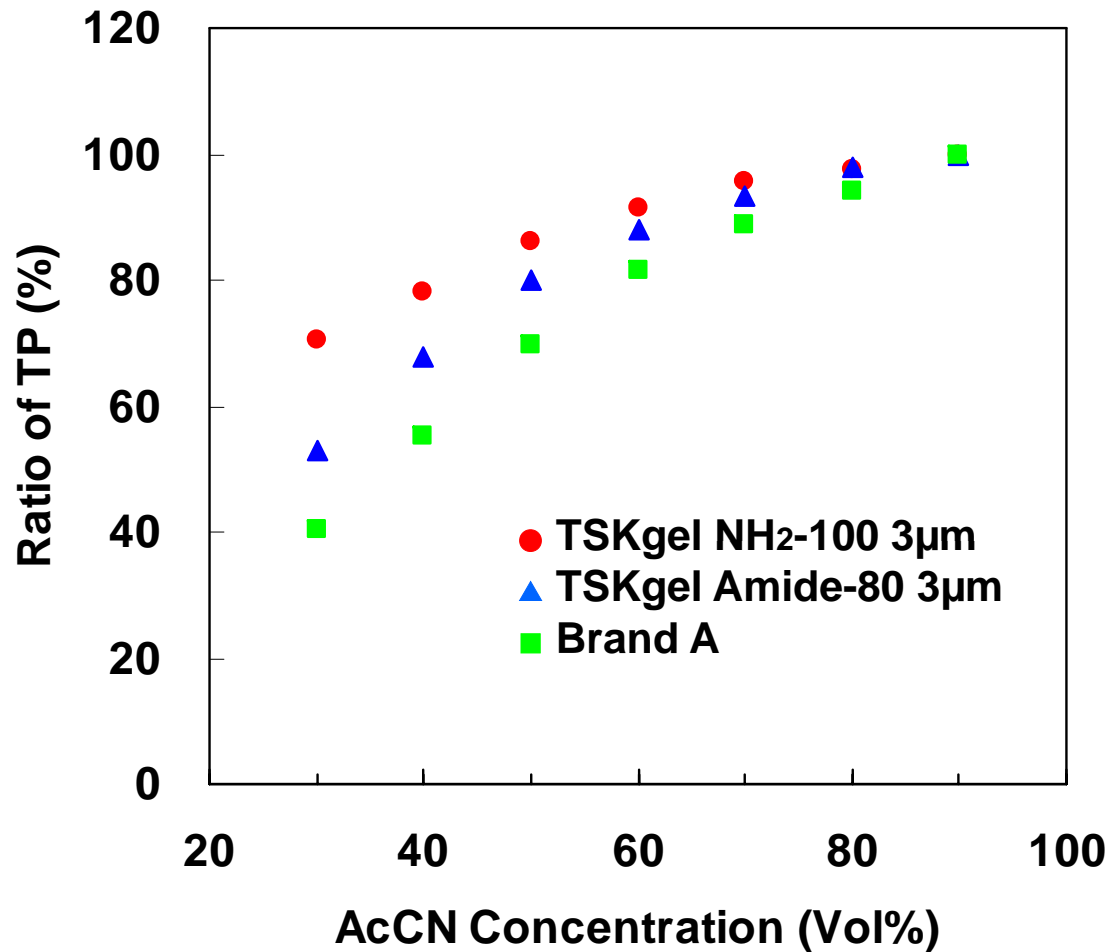
2.0mm I.D. Column:  
0.16 – 0.30 mL/min

4.6mm I.D. Column:  
0.80 - 1.50mL/min

HETP: 理论板高 (柱长 / 理论塔板数)



# 样品中有机溶剂的浓度对 理论塔板数的影响



## Conditions

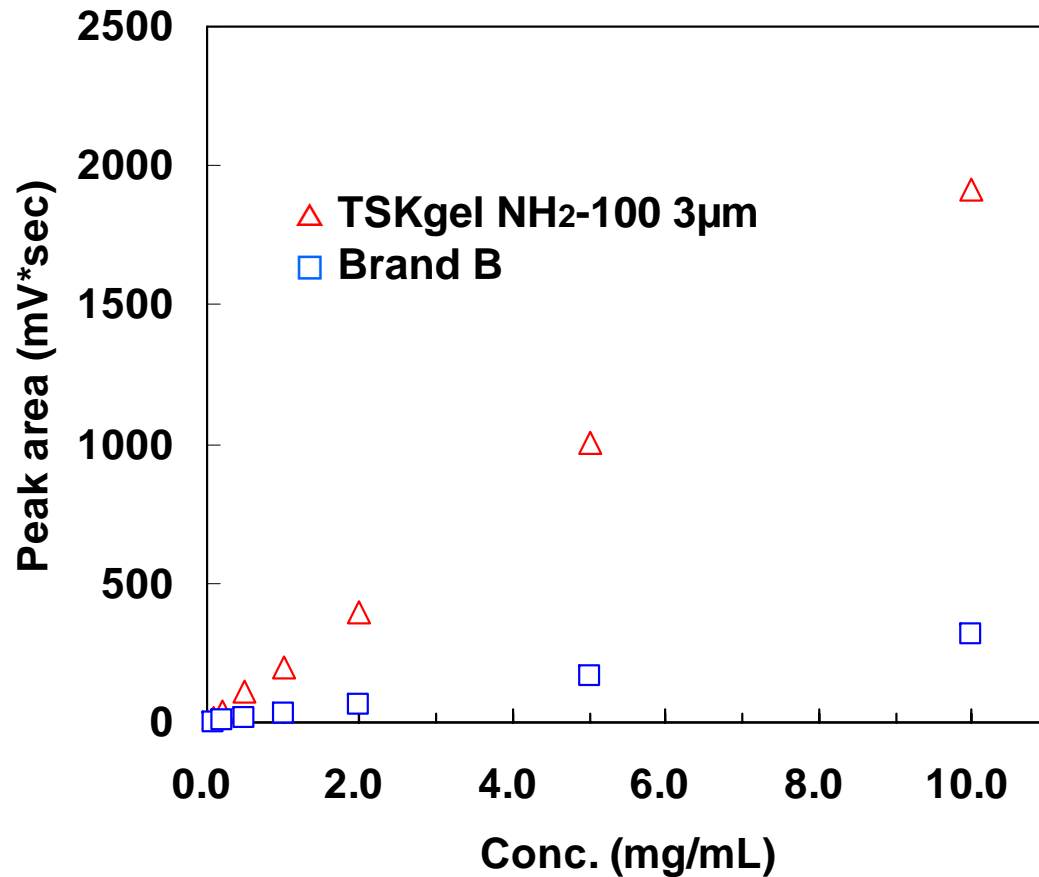
Column : **TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3µm**  
(4.6mmI.D. x 15cm)  
**TSKgel Amide-80 3µm**  
(4.6mmI.D. x 15cm)  
**Brand A**  
(4.6mmI.D. x 15cm)

Eluent : H<sub>2</sub>O/AcCN (25/75)  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Detect. : RI  
Temp. : 40°C  
Inj. vol. : 10µL  
Sample : Mannitol





# 糖类回收率的比较

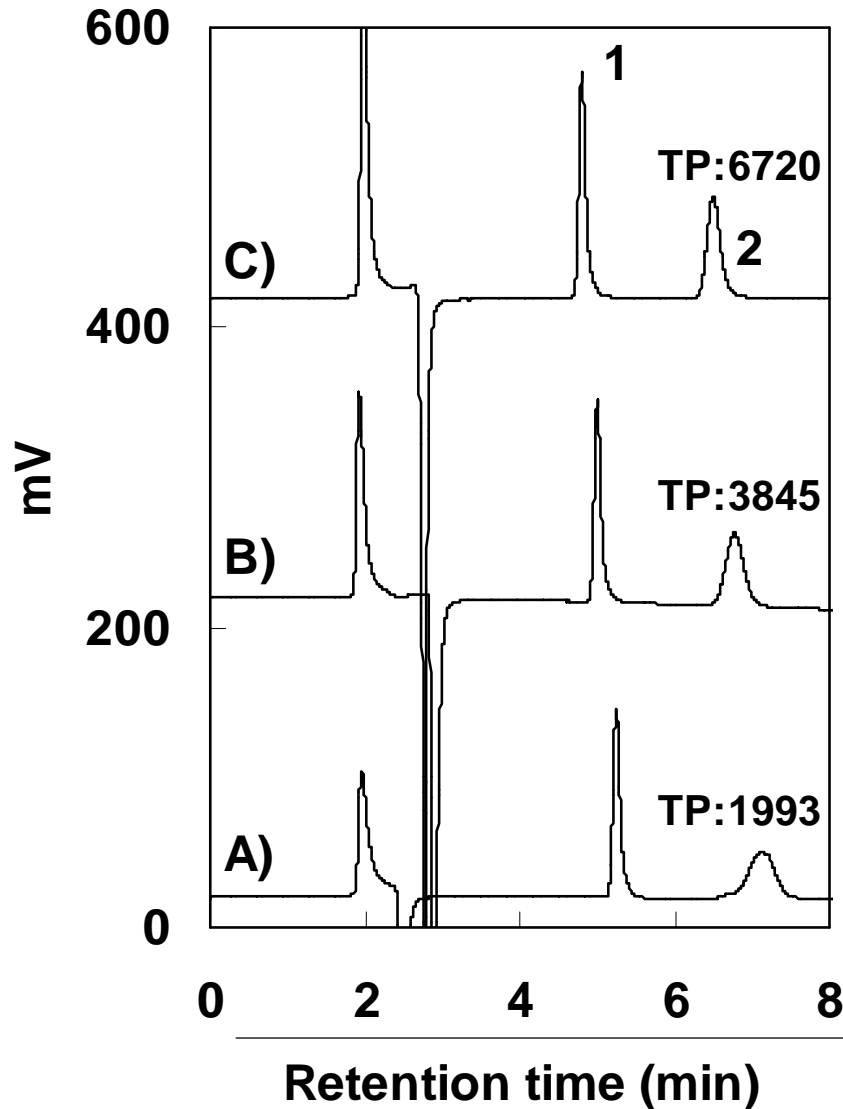


## Conditions

Column : **TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3µm**  
(4.6mm I.D. x 15cm)  
Brand B  
(4.6mm I.D. x 25cm)  
Eluent : H<sub>2</sub>O/Acetone (25/75)  
Flow rate: 1.0 mL/min  
Detect. : RI  
Temp. : 40°C  
Inj. vol. : 10µL  
Sample : Mannose



# 流动相pH的影响



## Conditions

Column : TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m  
(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent : 100mmol/L Triethylamine  
Acetate (pH X)/AcCN (25/75)  
X= A; 4.5, B; 7.5, C; 10.5

Flow rate: 1.0mL/min

Detect. : RI

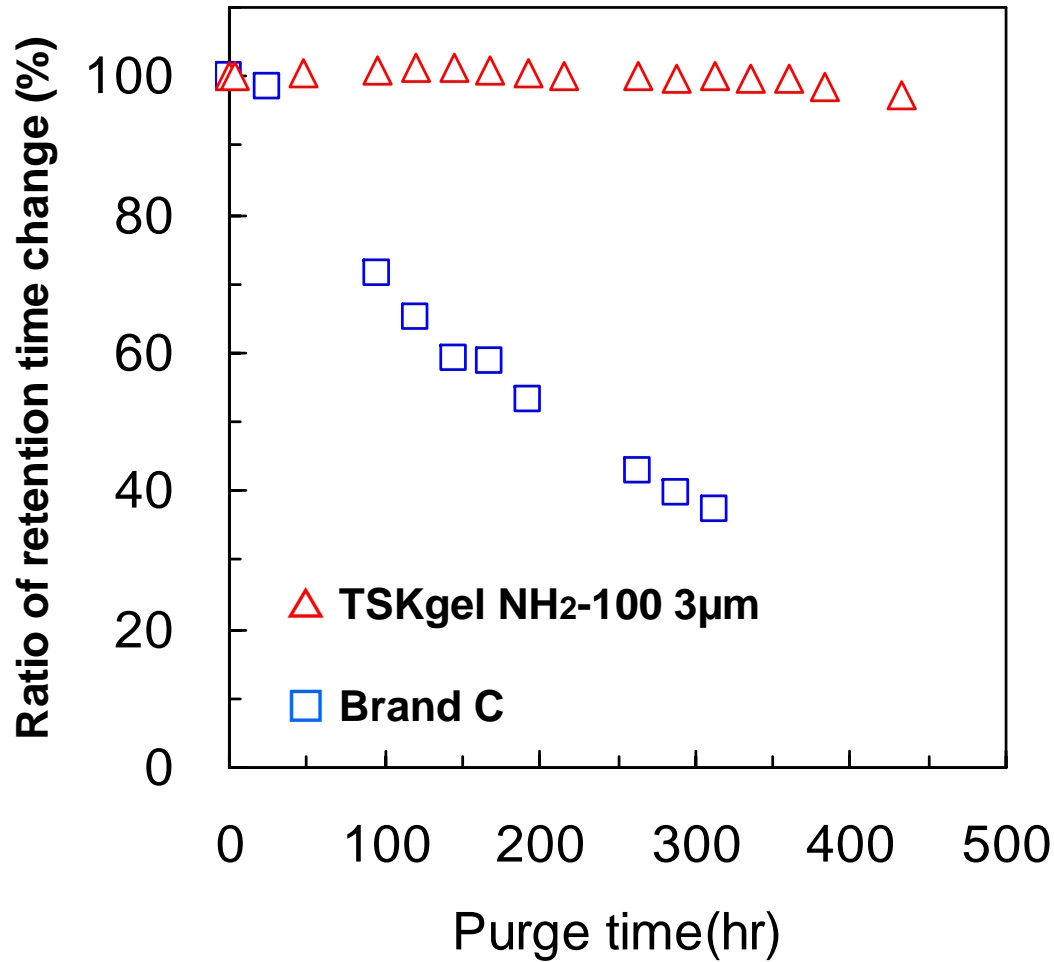
Temp. : 40°C

Inj. vol. : 10 $\mu$ L

Sample : 1.Xylitol, 2.Glucose



# 耐久性的比较

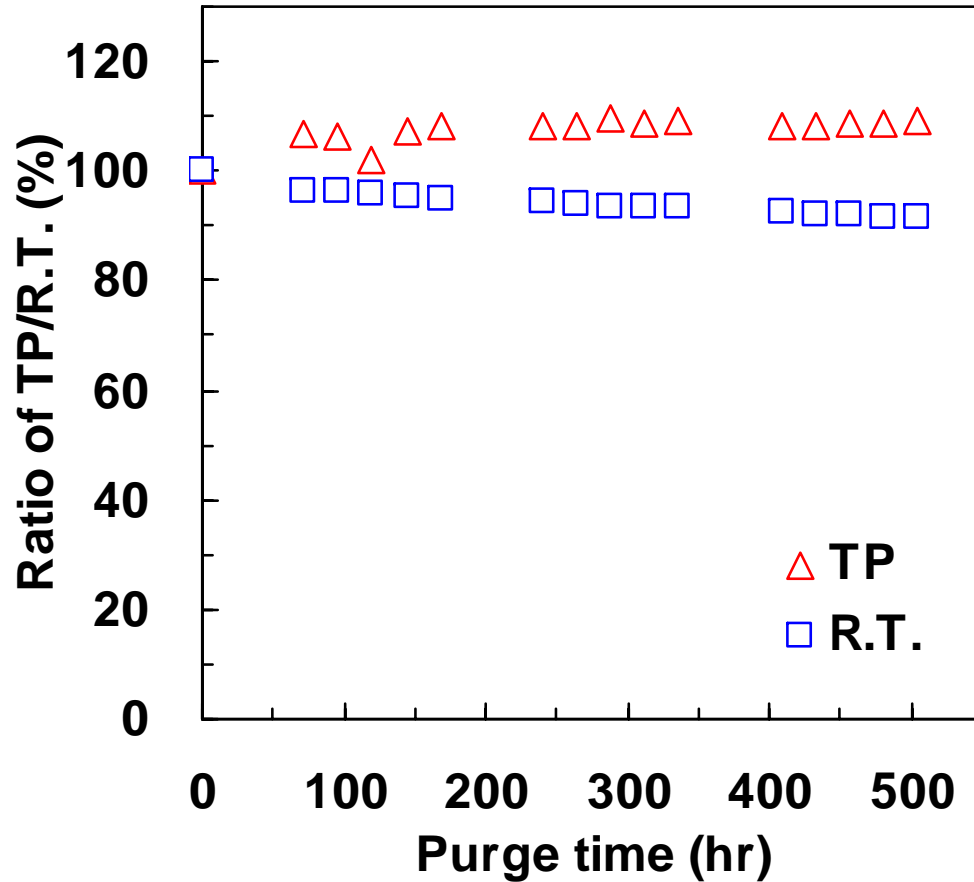


## Conditions

**Column** : TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3µm  
(4.6mm I.D. x 15cm)  
Brand C  
(4.6mm I.D. x 25cm)  
**Eluent** : H<sub>2</sub>O/AcCN (25/75)  
**Flow rate**: 1.0 mL/min  
**Detect.** : RI  
**Temp.** : 40°C  
**Inj. vol.** : 10µL  
**Sample** : Inositol



# 在碱性流动相的耐久性



## Conditions

Column : **TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**  
(4.6mmI.D. x 15cm)

Eluent : 100mmol/L Triethylamine-  
Formic acid (pH 10.0)  
/Acetone (25/75)

Flow rate: 1.0 mL/min

Detect. : RI

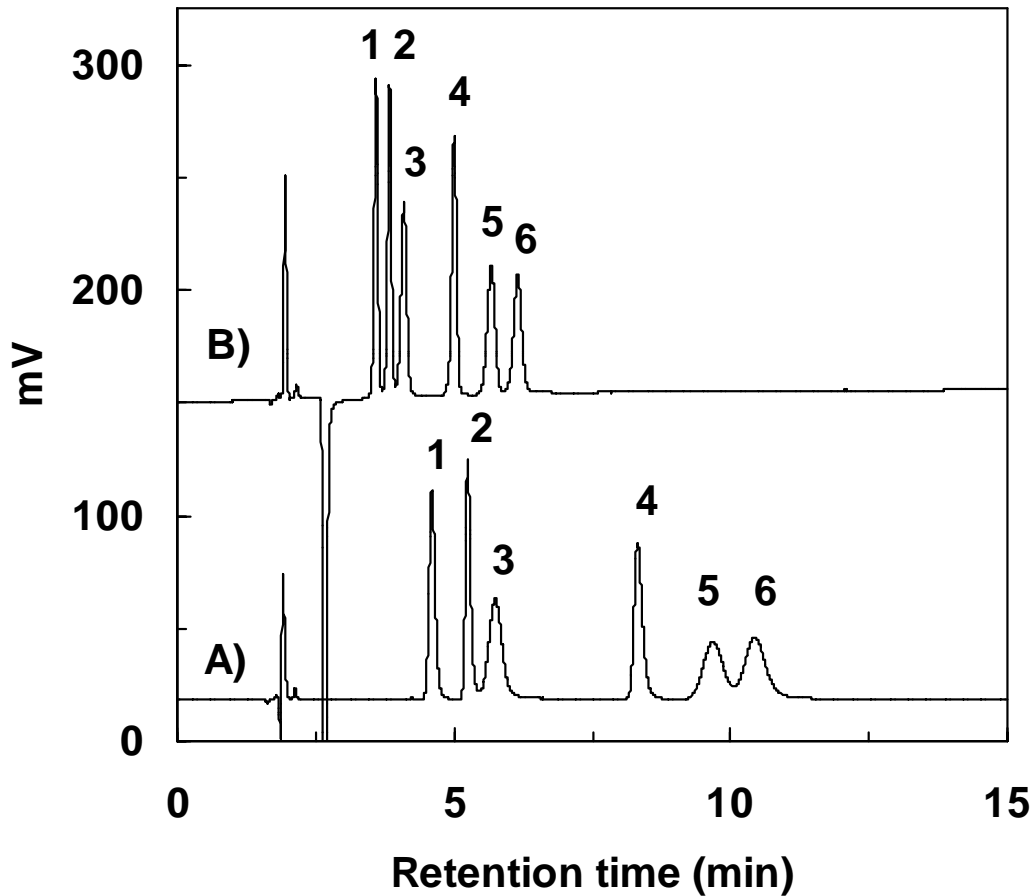
Temp. : 50°C

Inj. vol. : 10 $\mu$ L

Sample : Glucose



# 糖类化合物在丙酮为流动相 下色谱图比较



## Conditions

Column : **TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**  
(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent : A) H<sub>2</sub>O/Acetone (25/75)

B) 100mmol/L Triethylamine-  
Formic acid (pH 10.0)/  
Acetone (25/75)

Flow rate: 1.0 mL/min

Detect. : RI

Temp. : 50°C

Inj. vol. : 10 $\mu$ L

Sample : 1. Fructose, 2. Sorbitol,  
3. Glucose, 4. Sucrose,  
5. Maltose, 6. Lactose

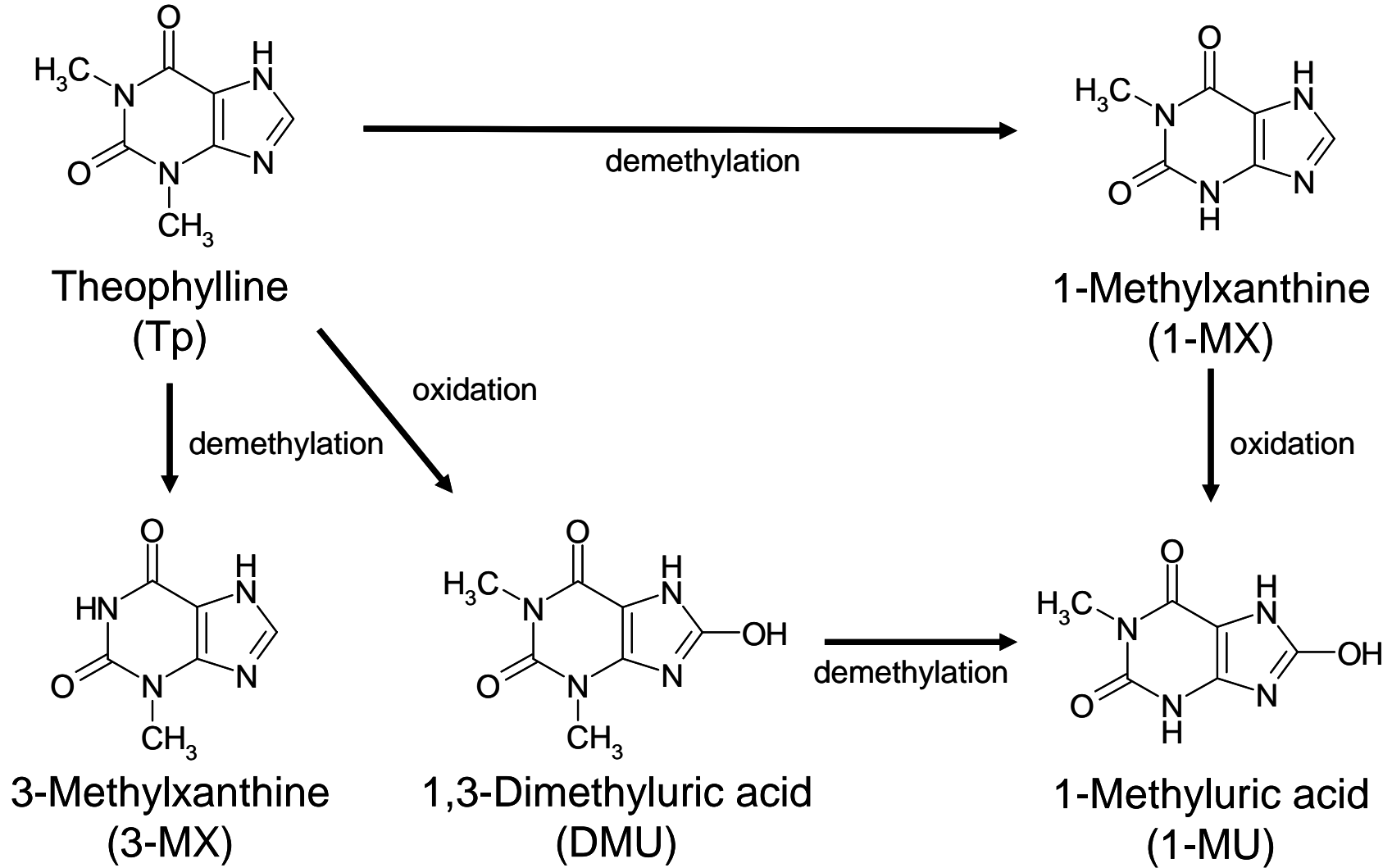


# 应用分析例

---



# 茶碱代谢途径推测





# 茶碱及代谢物分离比较

(NH<sub>2</sub>-100 vs. ODS-100V)

## Conditions

Column: **A) TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**

(2.0mmI.D. x 15cm)

**B) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m**

(2.0mmI.D. x 15cm)

Eluent: **A) A; 100mmol/L Triethylamine-**

Formic acid (pH10.0)/AcCN (5/95),

**B; 100mmol/L Triethylamine-**

Formic acid (pH10.0)/AcCN (50/50)

**B) A; H<sub>2</sub>O/AcCN (98/2)+0.1% Formic acid,**

**B; H<sub>2</sub>O/AcCN (50/50)+0.1% Formic acid**

Gradient: **A) B 0%(0min) - B 0%(2min)**

**- B 80%(30min)**

**B) B 0%(0min) - B 80%(30min)**

Flow rate: 0.25mL/min

Detect.: UV (254nm)

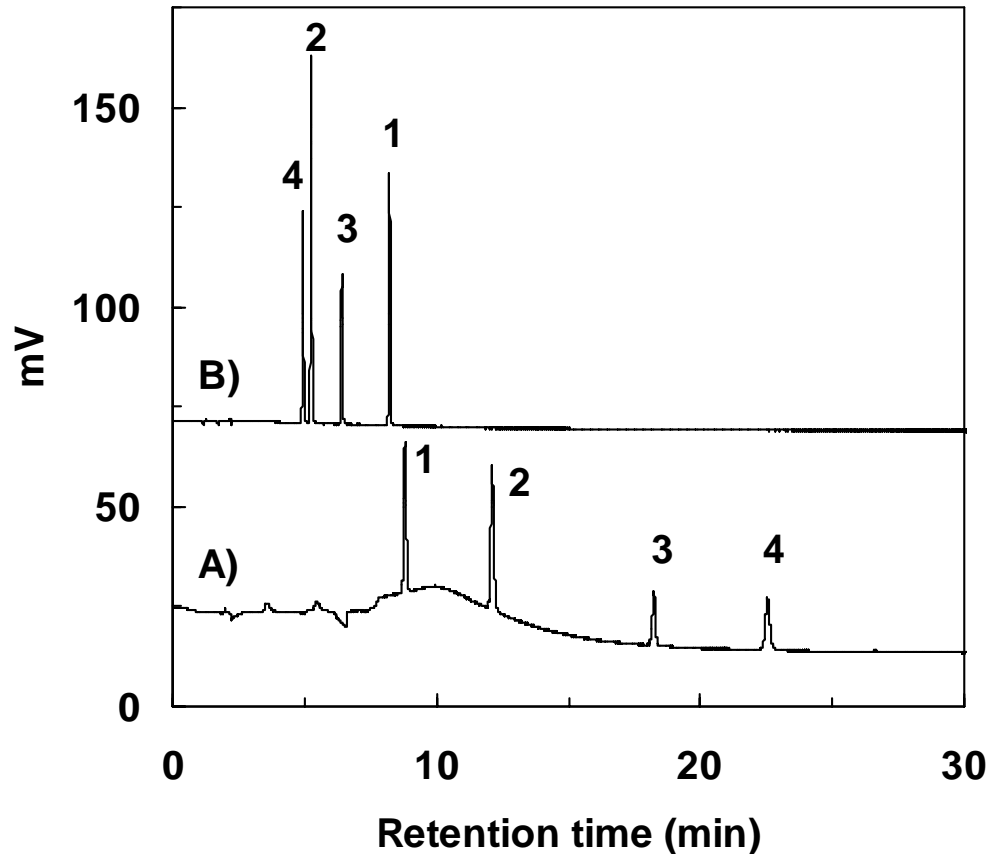
Temp.: 40°C

Inj. vol.: 10 $\mu$ L

Sample: 1. Theophylline, 2. 3-Methylxanthine,

3. 1,3-Dimethyluric acid,

4. 1-Methyluric acid

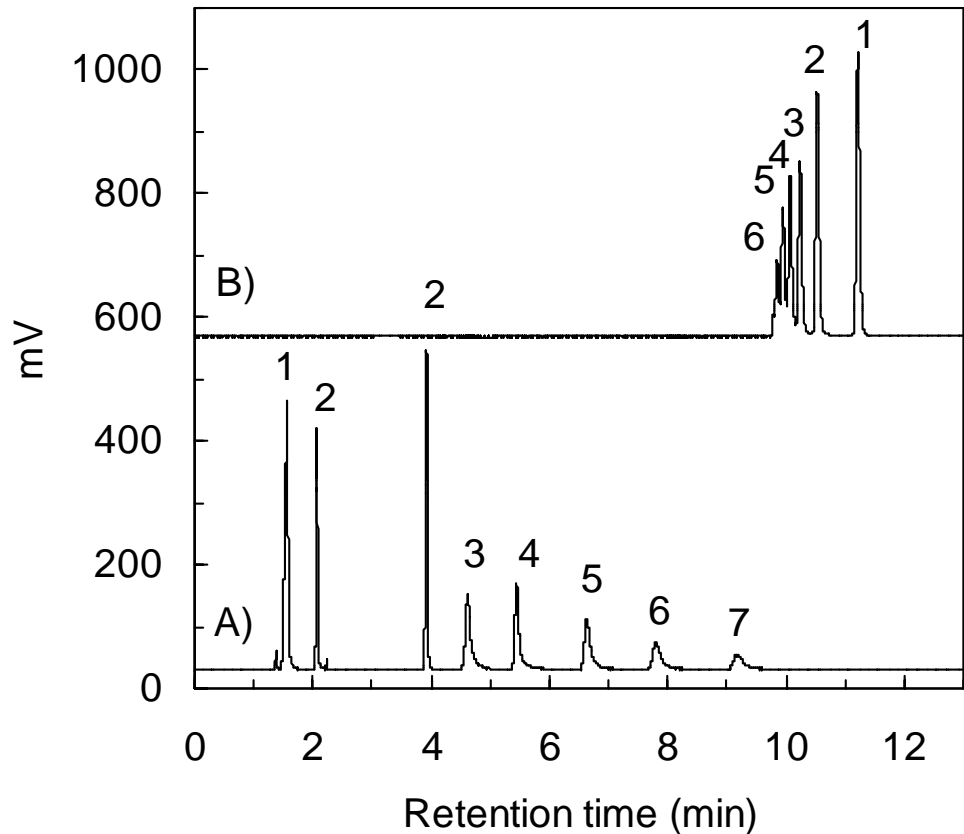






# 抗癌药物 MTX 及衍生物的分离比较

(NH<sub>2</sub>-100 vs. ODS-100V)



## Conditions

Column: **A) TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**  
(2.0ml.D. x 15cm)

**B) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m**  
(2.0ml.D. x 15cm)

Eluent: **A) A; H<sub>2</sub>O/AcCN (10/90)+0.1%TFA,**  
**B; H<sub>2</sub>O+0.1%TFA**

**B) A; H<sub>2</sub>O/AcCN (90/10)+0.1%TFA,**  
**B; AcCN+0.1%TFA**

Gradient: **B 0%(0min) - B 40%(15min)**  
**- B 0%(17min)**

Flow rate: 0.20mL/min

Detect.: UV (313nm)

Temp.: 40°C

Inj. vol.: 10 $\mu$ L

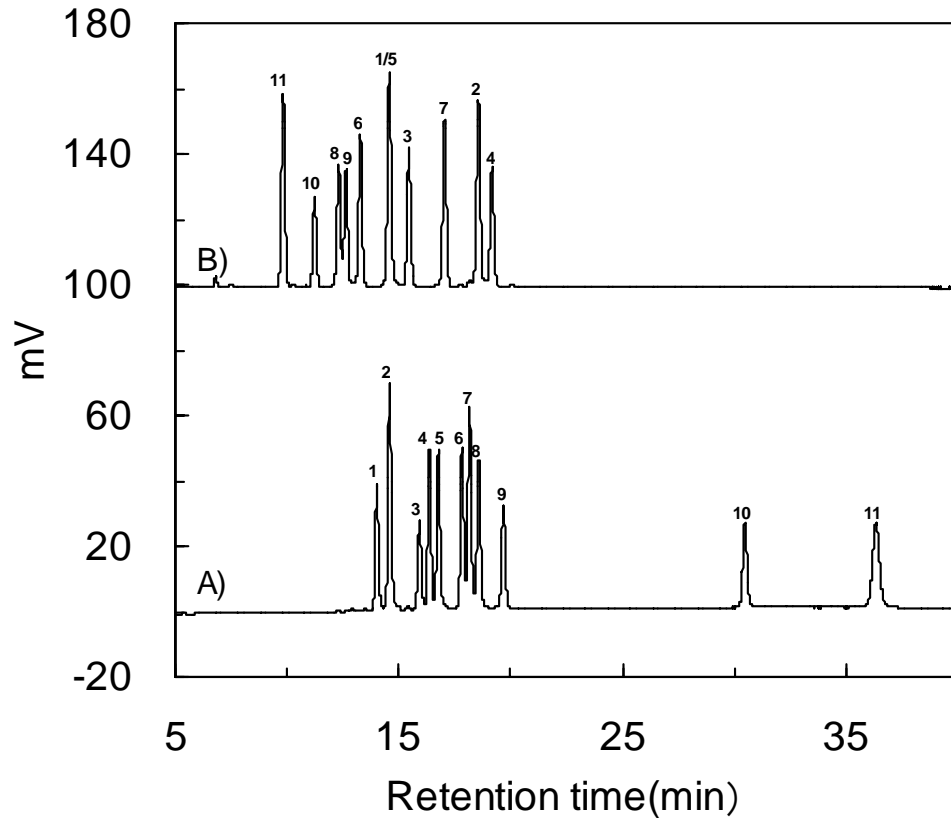
Samples: 1. MTX(MTXPG<sub>1</sub>), 2.MTXPG<sub>2</sub>,  
3.MTXPG<sub>3</sub>, 4.MTXPG<sub>4</sub>, 5.MTXPG<sub>5</sub>,  
6. MTXPG<sub>6</sub>, 7.MTXPG<sub>7</sub>





# PA-Sugar Chain 分离比较①

(NH<sub>2</sub>-100 vs. ODS-100V)



## Conditions

Column: **A) TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3µm**

(4.6mmI.D. x 15cm)

**B) TSKgel ODS-100V 3µm**

(4.6mmI.D. x 15cm)

Eluent: **A) A; 200mmol/L Triethylamine**

Acetate (pH6.5)/AcCN (30/70),

**B; 500mmol/L Triethylamine**

Acetate (pH6.5)/AcCN (60/40)

**B) A; 50mmol/L HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>/AcCN (98/2),**

**B; 50mmol/L HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>/AcCN (90/10)**

Gradient: **B 0%(0min) - B 100%(30min)**

**- B 100%(45min)**

Flow rate: 1.0mL/min

Detect.: Fs (Ex. 315nm, Em. 380nm)

Temp.: 40°C

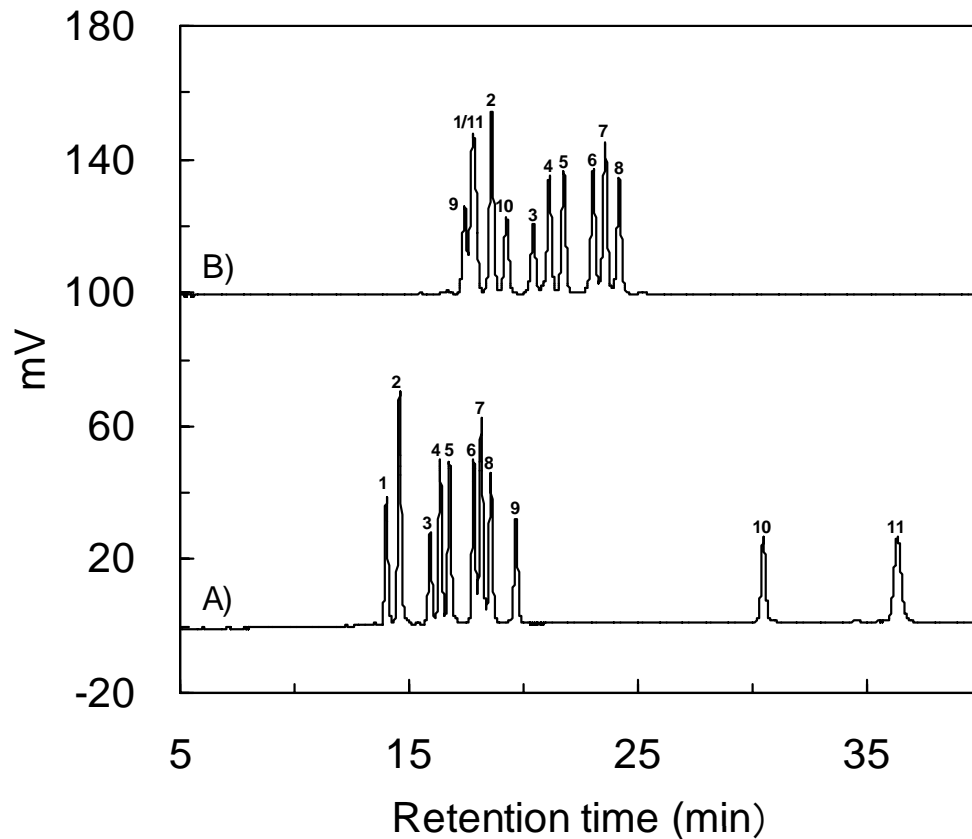
Inj. vol.: 10µL

Sample: PA-Sugar Chain 1-11



# PA-Sugar Chain 分离比较②

(NH<sub>2</sub>-100 vs. Amide-80)



## Conditions

Column: **A) TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**

(4.6mm I.D. x 15cm)

**B) TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m**

(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent: **A) A; 200mmol/L Triethylamine**

Acetate (pH6.5)/AcCN (30/70),

**B; 500mmol/L Triethylamine**

Acetate (pH6.5)/AcCN (60/40)

**B) A; 200mmol/L Triethylamine**

Acetate (pH6.5)/AcCN (26/74),

**B; 200mmol/L Triethylamine**

Acetate (pH6.5)/AcCN (50/50)

Gradient: **B 0%(0min) - B 100%(30min)**

**- B 100%(45min)**

Flow rate: 1.0mL/min

Detect.: Fs (Ex. 315nm, Em. 380nm)

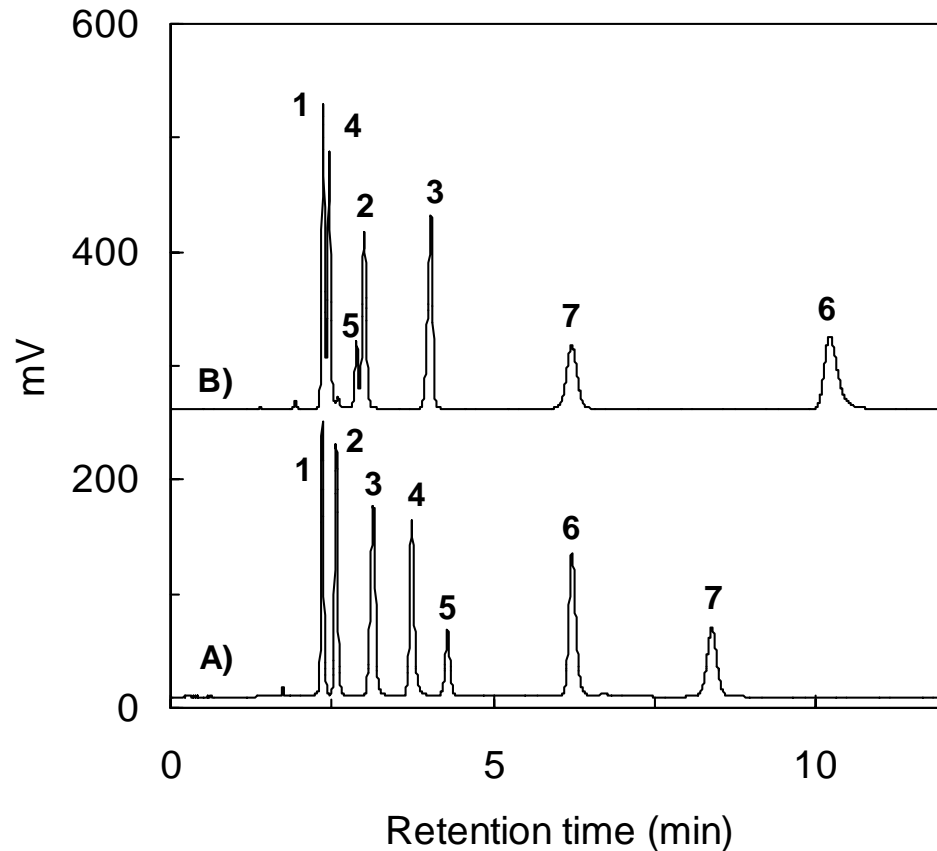
Temp.: 40°C

Inj. vol.: 10 $\mu$ L

Sample: PA-Sugar Chain 1-11



# 水溶性维生素类的分离比较 (NH<sub>2</sub>-100 vs. Amide-80)



## Conditions

Column : **A) TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3 $\mu$ m**  
(4.6mm I.D. x 15cm)

**B) TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m**  
(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent : 25mmol/L Phosphate  
buffer (pH 2.5)/AcCN (30/70)

Flow rate: 1.0mL/min

Detect. : UV (254nm)

Temp. : 40°C

Inj. vol. : 5 $\mu$ L

Sample : 1. Nicotinamide, 2. Vitamin B<sub>2</sub>,  
3. Pyridoxine, 4. Nicotinic acid,  
5. Vitamin C, 6. Vitamin B<sub>1</sub>,  
7. Vitamin B<sub>12</sub>



# 小结

## 新型HILIC色谱柱TSKgel NH<sub>2</sub>-100 3μm

- 采用了特殊封端处理，其耐久性较以前的产品TSKgel NH<sub>2</sub>-60有很大的提高。
  - 在分离还原性糖时不会发生峰分裂现象，保持氨基型色谱柱分析此类化合物的优点。
  - 在对糖类的测定中，回收率相对较高。
  - 在碱性流动相条件下耐久性提高，流动相适宜pH范围扩大。
  - 柱效受样品溶液有机溶剂浓度的影响较小。
  - 与反相色谱柱分离选择性差异显著。
  - 具有亲水性相互作用和离子交换特征的多分离模式的特征。相比其他类型的HILIC色谱柱对高极性的化合物的保留性更强。由于NH<sub>2</sub>-100具有用离子交换的分离性质，对于非离子色谱柱不能分离的成分，也可以获得良好的分离。有望用于高极性药物代谢产物的分析。
-



# 北京金欧亚科技发展有限公司

THE GREAT EUR-ASIA SCI & TECH DEVELOPMENT CO., LTD

北京崇文区左安门内大街8号伟图大厦301室

PC : 100061

Tel : 010-67136152/67100708

Fax : 010-67114016/67113925

<http://www.chromatogr.com>

E-mail : [china.hplc@163.com](mailto:china.hplc@163.com)

---