



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108603864 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680078937.8

(22)申请日 2016.10.31

(30)优先权数据

10-2016-0005394 2016.01.15 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2016/012395 2016.10.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/122911 KO 2017.07.20

(71)申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72)发明人 李祥原 李韩糠咪

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413

代理人 王春伟 刘继富

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/34(2006.01)

G01N 30/82(2006.01)

G01N 30/89(2006.01)

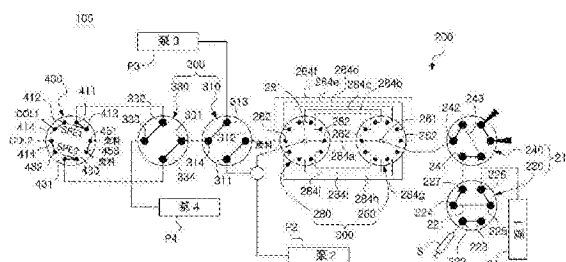
权利要求书4页 说明书13页 附图9页

(54)发明名称

非连续样品分级和级联装置以及具有该装置的双在线多功能液相色谱系统

(57)摘要

公开了一种非连续样品分级和级联装置以及具有该装置的双在线多功能液相色谱系统。根据本公开内容的实施方案的非连续样品分级和级联装置包括:供应待分析样品的样品供应模块;和与样品供应模块连接并被连续供应样品的样品分级模块,该样品分级模块设定通过等分由样品供应模块供应样品的总样品供应时间而获得的多个单位样品供应时间,设定通过等分多个单位样品供应时间的每一个而获得的多个单位分级间隔,并且级联/储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品,从而获取多个级分。



1. 一种非连续样品分级和级联装置,其包括:

样品供应模块,其供应待分析样品;和

样品分级模块,其与所述样品供应模块连接,所述样品分级模块被连续供应样品,设定通过等分由所述样品供应模块供应样品的总样品供应时间而获得的多个单位样品供应时间,设定通过等分所述多个单位样品供应时间中的每一个而获得的多个单位分级间隔,并且级联和储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品以获取多个级分。

2. 根据权利要求1所述的非连续样品分级和级联装置,其中所述样品分级模块包括:

第一分级阀,其与所述样品供应模块连接,所述样品被引入所述第一分级阀中;

第二分级阀,其设置在所述第一分级阀附近;和

多个级分储存回路,其对应于所述单位样品供应时间内的所述多个单位分级间隔的数目而设置,每个级分储存回路的一端与所述第一分级阀连接,另一端与所述第二分级阀连接,以便以相继顺序级联并储存每个所述单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品。

3. 根据权利要求2所述的非连续样品分级和级联装置,其中所述第一分级阀包括:

级分入口,通过所述级分入口由所述样品供应模块引入所述样品;

多个第一级分储存回路连接端口,其设置在所述级分入口附近,每一个第一级分储存回路连接端口与所述多个级分储存回路的一端连接;和

第一连接通道,其将所述级分入口和所述多个第一级分储存回路连接端口中的一个连接成对应于所述单位分级间隔彼此连通;以及

所述第二分级阀包括:

多个第二级分储存回路连接端口,其与所述多个级分储存回路的另一端分别连接;

级分出口,其设置在所述多个第二级分储存回路连接端口附近,并与所述多个级分储存回路之一的另一端连接以排出级分;和

第二连接通道,其将所述级分出口和所述多个第二级分储存回路连接端口中的一个连接成对应于所述单位分级间隔彼此连通。

4. 根据权利要求3所述的非连续样品分级和级联装置,其中所述样品供应模块包括:

第一样品供应阀,其与第一泵和样品注射器连接,其中所述第一泵供应第一溶剂;和

第二样品供应阀,其与所述第一样品供应阀连接,以接收由所述第一样品供应阀供应的样品并将所述样品供应至所述级分入口。

5. 根据权利要求4所述的非连续样品分级和级联装置,其中所述第一样品供应阀包括:

第一样品入口,其与所述样品注射器连接;

第一样品出口,其设置在所述第一样品入口附近;

第一溶剂入口,其与所述第一泵连接;

第一溶剂出口,其设置在所述第一溶剂入口附近并与所述第二样品供应阀连接;和

第一样品储存回路连接端口和第二样品储存回路连接端口,其与样品储存回路的两端各自连接,

在所述第一样品储存回路连接端口和所述第二样品储存回路连接端口各自与所述第一样品入口和所述第一样品出口连接的情况下,所述样品储存在所述样品储存回路中,并

且

在所述第一样品储存回路连接端口和所述第二样品储存回路连接端口各自与所述第一溶剂入口和所述第一溶剂出口连接的情况下,所述第一溶剂被注入所述样品储存回路中以将所述样品供应至所述第二样品供应阀。

6. 根据权利要求5所述的非连续样品分级和级联装置,其中所述第二样品供应阀包括:

第二样品入口,其与所述第一溶剂出口连接;

第二样品出口,其设置在所述第二样品入口附近并与所述级分入口连接;和

样品分离柱,其具有两端,每一端分别与所述第二样品入口和所述第二样品出口连接,使得所述样品在所述第二样品出口处被洗脱,并且

在所述样品分离柱中洗脱的样品被供应至所述级分入口。

7. 一种双在线多功能液相色谱系统,其包括:

非连续样品分级和级联装置,其被连续供应待分析样品,设定通过等分供应样品的总样品供应时间而获得的多个单位样品供应时间,设定通过等分所述多个单位样品供应时间中的每一个而获得的多个单位分级间隔,并且供应通过级联和储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品所获取的多个级分;

双柱阀,其与第一反相液相色谱柱和第二反相液相色谱柱连接,并且具有与所述第一反相液相色谱柱连接的第一固相萃取柱以及与所述第二反相液相色谱柱连接的第二固相萃取柱;和

柱选择模块,其设置在所述非连续样品分级和级联装置与所述双柱阀之间,以便以交替方式将由所述非连续样品分级和级联装置供应的级分以相继顺序供应至所述第一固相萃取柱和所述第一反相液相色谱柱或者所述第二固相萃取柱和所述第二反相液相色谱柱。

8. 根据权利要求7所述的双在线多功能液相色谱系统,其中所述非连续样品分级和级联装置包括:

样品供应模块,其供应所述样品;和

样品分级模块,其与所述样品供应模块连接以连续接收由所述样品供应模块供应的样品,从而获取多个级分并以相继顺序将所述多个级分供应至所述柱选择模块。

9. 根据权利要求8所述的双在线多功能液相色谱系统,其中所述样品分级模块包括:

第一分级阀,其与所述样品供应模块连接,所述样品被引入所述第一分级阀中;

第二分级阀,其设置在所述第一分级阀附近;和

多个级分储存回路,其对应于所述单位样品供应时间内的所述多个单位分级间隔的数目而设置,每个级分储存回路的一端与所述第一分级阀连接,另一端与所述第二分级阀连接,以便以相继顺序级联并储存每个所述单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品。

10. 根据权利要求9所述的双在线多功能液相色谱系统,其中所述第一分级阀包括:

第一级分入口,通过该级分入口从所述样品供应模块引入所述样品;

多个第一级分储存回路连接端口,其设置在所述第一级分入口附近,与所述多个级分储存回路的一端各自连接;和

第一连接通道,其将所述级分入口和所述多个第一级分储存回路连接端口中的一个连接成对应于所述单位分级间隔彼此连通;以及

所述第二分级阀包括：

多个第二级分储存回路连接端口，其与所述多个级分储存回路的另一端各自连接；

第一级分出口，其设置在所述多个第二级分储存回路连接端口附近，所述第一级分出口与所述多个级分储存回路之一的另一端连接以排出级分；和

第二连接通道，其将所述第一级分出口和所述多个第二级分储存回路连接端口中的一个连接成对应于所述单位分级间隔彼此连通。

11. 根据权利要求10所述的双在线多功能液相色谱系统，其中所述样品供应模块包括：

第一样品供应阀，其具有与样品注射器连接的第一样品入口，设置在所述第一样品入口附近的第一样品出口，与第一泵连接的第一溶剂入口，设置在所述第一溶剂入口附近的第一溶剂出口，以及与样品储存回路的两端各自连接的第一样品储存回路连接端口和第二样品储存回路连接端口；以及

第二样品供应阀，其具有与所述第一溶剂出口连接的第二样品入口，设置在所述第二样品入口附近并与所述第一级分入口连接的第二样品出口，以及具有两端的样品分离柱，样品分离柱每一端分别与所述第二样品入口和所述第二样品出口连接，使得所述样品在所述第二样品出口处被洗脱。

12. 根据权利要求10所述的双在线多功能液相色谱系统，其中所述柱选择模块包括：

柱平衡阀，其与第一级分出口连接，以提供以交替方式将所述多个级分供应至所述第一固相萃取柱或所述第二固相萃取柱的通道，并以交替方式平衡所述第一固相萃取柱和所述第一反相液相色谱柱或者所述第二固相萃取柱和所述第二反相液相色谱柱；和

柱选择阀，其与所述柱平衡阀连接，以接收所述多个级分的供应并以交替方式将所述多个级分供应至所述第一固相萃取柱或所述第二固相萃取柱，以便在所述第一固相萃取柱中用所述第一反相液相色谱柱或者在所述第二固相萃取柱中用所述第二反相液相色谱柱洗脱所述级分。

13. 根据权利要求12所述的双在线多功能液相色谱系统，其中所述柱平衡阀包括：

第二级分入口，其与所述第一级分出口以及供应第二溶剂的第二泵连接；

第三溶剂入口，其与供应第三溶剂的第三泵连接，通过所述第三溶剂入口引入所述第三溶剂；

第二级分出口，其设置在所述第二级分入口附近，并选择性地与所述第二级分入口和所述第三溶剂入口连接；和

第三溶剂出口，其设置在所述第三溶剂入口附近，并选择性地与所述第二级分入口和所述第三溶剂入口连接，

在所述第二级分入口与所述第三溶剂出口连接的情况下，注入了所述第二溶剂的级分经由所述柱选择阀被供应至所述第一固相萃取柱或所述第二固相萃取柱，并且

在所述第三溶剂入口与所述第三溶剂出口连接的情况下，所述第三溶剂经由所述柱选择阀以交替方式平衡所述第一固相萃取柱和所述第一反相液相色谱柱或者所述第二固相萃取柱和所述第二反相液相色谱柱。

14. 根据权利要求13所述的双在线多功能液相色谱系统，其中所述柱选择阀包括：

级分和第三溶剂入口，其与所述第三溶剂出口连接，通过所述级分和第三溶剂入口引入所述级分或所述第三溶剂；

第四溶剂入口,其与供应第四溶剂的第四泵连接,通过所述第四溶剂入口引入所述第四溶剂;

级分和第三溶剂出口,其设置在所述级分和第三溶剂入口附近,并选择性地与所述级分和第三溶剂入口以及所述第四溶剂入口连接;和

第四溶剂出口,其设置在所述第四溶剂入口附近,并选择性地与所述级分和第三溶剂入口以及所述第四溶剂入口连接,

当所述级分和第三溶剂入口与所述级分和第三溶剂出口连接时,所述级分被供应至所述第一固相萃取柱,然后在所述第四溶剂入口与所述级分和第三溶剂出口连接的情况下,所述第四溶剂在所述第一固相萃取柱中用所述第一反相液相色谱柱洗脱所述级分,并且在所述级分和第三溶剂入口与所述第四溶剂出口连接的情况下,所述第三溶剂平衡所述第二固相萃取柱和所述第二反相液相色谱柱,并且

当所述级分和第三溶剂入口与所述第四溶剂出口连接时,所述级分被供应至所述第二固相萃取柱,然后在所述第四溶剂入口与所述第四溶剂出口连接的情况下,所述第四溶剂在所述第二固相萃取柱中用所述第二反相液相色谱柱洗脱所述级分,并且在所述级分和第三溶剂入口与所述级分和第三溶剂出口连接的情况下,所述第三溶剂平衡所述第一固相萃取柱和所述第一反相液相色谱柱。

15. 根据权利要求14所述的双在线多功能液相色谱系统,其中所述双柱阀包括:

第一固相萃取柱连接端口和第一固相萃取柱通道端口,其各自与所述第一固相萃取柱的两端连接;

第一固相萃取柱入口,其与所述级分和第三溶剂出口连接,并选择性地与所述第一固相萃取柱连接端口和所述第一固相萃取柱通道端口连接;

第一反相液相色谱柱端口,其与所述第一反相液相色谱柱连接,并与所述第一固相萃取柱连接端口连接或断开;

第二固相萃取柱连接端口和第二固相萃取柱通道端口,其各自与所述第二固相萃取柱的两端连接;

第二固相萃取柱入口,其与所述第四溶剂出口连接,并选择性地与所述第二固相萃取柱连接端口和所述第二固相萃取柱通道端口连接;和

第二反相液相色谱柱端口,其与所述第二反相液相色谱柱连接,并与所述第二固相萃取柱连接端口连接或断开。

16. 根据权利要求15所述的双在线多功能液相色谱系统,其中所述双柱阀还包括:

第一出口,其设置在所述第一固相萃取柱通道端口附近,并与所述第一固相萃取柱通道端口连接或断开;和

第二出口,其设置在所述第一出口附近,并与所述第二固相萃取柱通道端口连接或断开。

非连续样品分级和级联装置以及具有该装置的双在线多功能液相色谱系统

技术领域

[0001] 本公开内容涉及非连续样品分级和级联装置以及具有该装置的双在线多功能液相色谱系统,更具体地,涉及用来实现低的样品复杂性和高的级分均一性的非连续样品分级和级联装置以及具有该装置的双在线多功能液相色谱系统。

背景技术

[0002] 对在特定条件下人体中表达的全套蛋白质的大规模研究的蛋白质组学中,液相色谱系统与质谱联用(LC-MS/MS)已成为非常重要的技术。

[0003] 在这样的技术中,涉及在分析蛋白质之前将其水解成小片段、肽的自底向上或鸟枪法蛋白质组学技术得以广泛使用。

[0004] 自底向上或鸟枪法蛋白质组学方法被证明是有用的,但不可避免地导致样品复杂性。例如,当由约20000个基因组表达的蛋白质被水解成肽时,获得数千万个肽。此外,人体中的蛋白质具有广泛的浓度动态范围(10^{10})。因此,为了进行具有降低的样品复杂性的有效蛋白质组学分析,需要具有高分辨率的分离方法。

[0005] 作为解决这一问题的技术,二维液相色谱技术应运而生。该技术包含两种不同分离方法的级联。

[0006] 二维液相色谱的成功存在两个关键因素:第一个是每种分离方法的分离效率,第二个是分离正交性。

[0007] 分离正交性是指各种分离模式的独立性,这意味着样品混合物通过各种分离模式由不同的生理化学性质而分离。

[0008] 近年来开发并广泛使用的二维分离方法之一是包括以下步骤的方法:根据碱性pH下的疏水性程度对样品进行分级,并且根据酸性pH条件下的疏水性程度再次分离经分级的级分(二维反相液相色谱-反相液相色谱,2DRP-RPLC)。

[0009] 基本上,通过疏水性分离混合物的两种分离模式不具有分离正交性,但是不同pH条件下的肽根据独特的氨基酸组成而具有不同的电荷分布,并且因此甚至相同的肽也可以具有不同程度的疏水性。由此,2D RP-RPLC方法具有分离正交性。

[0010] 然而,2D RP-RPLC方法不具有完全的分离正交性。图1示出了在以pH 10进行RPLC分离、再以pH 2.6进行各级分的RPLC分离、并使用质量分析仪进行分析之后,各种分离方法的洗脱时间处的经鉴别的肽的分布。参见图1,观察到在许多区域没有发现肽,这意味着2D RP-RPLC方法没有利用二维分离的所有分离空间。

[0011] 为解决这一问题而开发的方法是在分级后进行非连续级联。参照图2a,分级后的非连续级联包括:在碱性pH下以第一维RPLC分离的洗脱顺序分级成96个级分(第1级分至第96级分),并且非连续级联成24个级分。在1号至24号成为24个级分后,25号被级联成第一级分,26号被级联成第二级分。结果,1号、25号、49号和73号级分被级联成第一级分,2号、26号、50号和74号被级联成第二级分,24号、48号、72号和96号被级联成最后的第24级分。当以

这种方式进行非连续级联时,二维分离的整个分离空间可以得到充分利用,如图2b所示。

[0012] 通过使用分级和非连续级联技术,2D RP-RPLC实现了高分离正交性。

[0013] 然而,该级联过程由研究人员手动执行,需要大量的人力和时间。此外,为了在酸性pH下对离线方法中获得的级分进行LC-MS/MS实验,需要许多手动步骤来减少级分的体积并再次溶解在适用于LC-MS/MS实验的溶剂中,因而在此过程中造成样品损失并影响实验的再现性。因此,需要开发用来自动执行进样之后的步骤的液相色谱系统。

[0014] 相关文献

[0015] [非专利文献]

[0016] 非专利文献1:M Gilar等人,Anal Chem,2005,77,6426-6434

[0017] 非专利文献2:J.M.Park等人,Sci.Rep.5,18189;doi:10.1038/srep18189 (2015)

[0018] 技术问题

[0019] 因此,本公开内容旨在提供非连续样品分级和级联装置以及具有该装置的双在线多功能液相色谱系统,用于通过自动操作具有低的样品复杂性和高的分级均一性的非连续样品分级和级联过程来提高分级的再现性并防止样品损失。

[0020] 技术方案

[0021] 根据本公开内容的一个方面,提供了一种非连续样品分级和级联装置,其包括供应待分析样品的样品供应模块,和与样品供应模块连接的样品分级模块,该样品分级模块被连续供应样品,设定通过等分由样品供应模块供应样品的总样品供应时间而获得的多个单位样品供应时间,设定通过等分由多个单位样品供应时间中的每一个而获得的多个单位分级间隔,级联并储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间所供应的样品以获取多个级分。

[0022] 样品分级模块可以包括与样品供应模块连接的第一分级阀,样品被引入第一分级阀中;设置在第一分级阀附近的第二分级阀;和对应于单位样品供应时间内的多个单位分级间隔的数目设置的多个级分储存回路,每个级分储存回路的一端与第一分级阀连接,另一端与第二分级阀连接,以级联并储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间按顺序供应的样品。

[0023] 第一分馏阀可以包括:级分入口,通过该级分入口从样品供应模块引入样品;多个第一级分储存回路连接端口,其设置在级分入口附近,各自与多个级分储存回路的一端连接;和第一连接通道,其将级分入口和多个第一级分储存回路连接端口之一连接成对应于单位分级间隔彼此连通;以及第二分馏阀可以包括:多个第二级分储存回路连接端口,其与多个级分储存回路的另一端各自连接;级分出口,其设置在多个第二级分储存回路连接端口附近,并与多个级分储存回路之一的另一端连接以排出级分;和第二连接通道,其将级分出口和多个第二级分储存回路连接端口之一连接成对应于单位分级间隔彼此连通。

[0024] 样品供应模块可以包括:第一样品供应阀,其与第一泵和样品注射器连接,其中第一泵供应第一溶剂;和第二样品供应阀,其与第一样品供应阀连接以接收由第一样品供应阀供应的样品,并将该样品供应至级分入口。

[0025] 第一样品供应阀可以包括:第一样品入口,其与样品注射器连接;第一样品出口,其设置在第一样品入口附近;第一溶剂入口,其与第一泵连接;第一溶剂出口,其设置在第一溶剂入口附近并与第二样品供应阀连接;以及第一样品储存回路连接端口和第二样品储

存回路连接端口,其与样品储存回路的两端各自连接;并且在第一样品储存回路连接端口和第二样品储存回路连接端口各自与第一样品入口和第一样品出口连接的情况下,样品可以储存在样品储存回路中,并且在第一样品储存回路连接端口和第二样品储存回路连接端口各自与第一溶剂入口和第一溶剂出口连接的情况下,第一溶剂可以被注入样品储存回路中以将样品供应至第二样品供应阀。

[0026] 第二样品供应阀可以包括:第二样品入口,其与第一溶剂出口连接;第二样品出口,其设置在第二样品入口附近并与级分入口连接;和具有两端的样品分离柱,其每一端各自与第二样品入口和第二样品出口连接,使得样品在第二样品出口处被洗脱,并且在样品分离柱中洗脱的样品可以被供应至级分入口。

[0027] 根据本公开内容的另一个方面,提供了一种双在线多功能液相色谱系统,其包括:非连续样品分级和级联装置,该装置被连续供应待分析的样品,设定通过等分供应样品的总样品供应时间而获得的多个单位样品供应时间,设定通过等分多个单位样品供应时间之一而获得的多个单位分级间隔,并且供应通过级联并储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品所获取的多个级分;双柱阀,其与第一反相液相色谱柱和第二反相液相色谱柱连接,并且具有与第一反相液相色谱柱连接的第一固相萃取柱以及与第二反相液相色谱柱连接的第二固相萃取柱;和柱选择模块,其设置在非连续样品分级和级联装置与双柱阀之间,以便以交替方式将由非连续样品分级和级联装置供应的级分以相继顺序供应至第一固相萃取柱和第一反相液相色谱柱或者第二固相萃取柱和第二反相液相色谱柱。

[0028] 非连续样品分级和级联装置可以包括:供应样品的样品供应模块;和样品分级模块,其与样品供应模块连接以连续接收由样品供应模块供应的样品,从而获取多个级分并以相继顺序将多个级分供应至柱选择模块。

[0029] 样品分级模块可以包括:第一分级阀,其与样品供应模块连接,样品被引入第一分馏阀中;第二分级阀,其设置在第一分馏阀附近;和多个级分储存回路,其对应于单位样品供应时间内的多个单位分级间隔的数目而设置,每个级分储存回路的一端与第一分馏阀连接,另一端与第二分馏阀连接,以级联并储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间以相继顺序供应的样品。

[0030] 第一分馏阀可以包括:第一级分入口,通过该第一级分入口由样品供应模块引入样品;多个第一级分储存回路连接端口,其设置在第一级分入口附近,与多个级分储存回路的一端各自连接;和第一连接通道,其将级分入口和多个第一级分储存回路连接端口之一连接成对应于单位分级间隔彼此连通;以及第二分馏阀可以包括:多个第二级分储存回路连接端口,其与多个级分储存回路的另一端各自连接;第一级分出口,其设置在多个第二级分储存回路连接端口附近,并与多个级分储存回路中的一个的另一端连接以排出级分;和第二连接通道,其将第一级分出口和多个第二级分储存回路连接端口之一连接成对应于单位分级间隔彼此连通。

[0031] 样品供应模块可以包括:第一样品供应阀,其具有与样品注射器连接的第一样品入口;第一样品出口,其设置在第一样品入口附近;第一溶剂入口,其与第一泵连接;第一溶剂出口,其设置在第一溶剂入口附近;以及第一样品储存回路连接端口和第二样品储存回路连接端口,其与样品储存回路的两端各自连接;以及第二样品供应阀,其具有与第一溶剂

出口连接的第二样品入口;第二样品出口,其设置在第二样品入口附近并与第一级分入口连接;和样品分离柱,其具有两端,每一端各自与第二样品入口和第二样品出口连接,使得样品在第二样品出口处被洗脱。

[0032] 柱选择模块可以包括:柱平衡阀,其与第一级分出口连接,以提供以交替方式将多个级分供应至第一固相萃取柱或第二固相萃取柱的通道,并以交替方式平衡第一固相萃取柱和第一反相液相色谱柱或者第二固相萃取柱和第二反相液相色谱柱;和柱选择阀,其与柱平衡阀连接以接收多个级分的供应并以交替方式将该多个级分供应至第一固相萃取柱或第二固相萃取柱,使得在第一固相萃取柱中用第一反相液相色谱柱或者在第二固相萃取柱中用第二反相液相色谱柱洗脱级分。

[0033] 柱平衡阀可以包括:第二级分入口,其与第一级分出口以及供应第二溶剂的第二泵连接;第三溶剂入口,其与供应第三溶剂的第三泵连接,通过该第三溶剂入口引入第三溶剂;第二级分出口,其设置在第二级分入口附近,并选择性地与第二级分入口和第三溶剂入口连接;和第三溶剂出口,其设置在第三溶剂入口附近,并选择性地与第二级分入口和第三溶剂入口连接;在第二级分入口与第三溶剂出口连接的情况下,注入了第二溶剂的级分可以经由柱选择阀被供应至第一固相萃取柱或第二固相萃取柱,并且在第三溶剂入口与第三溶剂出口连接的情况下,第三溶剂经由柱选择阀以交替方式平衡第一固相萃取柱和第一反相液相色谱柱或者第二固相萃取柱和第二反相液相色谱柱。

[0034] 柱选择阀可以包括:级分和第三溶剂入口,其与第三溶剂出口连接,通过该级分和第三溶剂入口引入级分或第三溶剂;第四溶剂入口,其与供应第四溶剂的第四泵连接,通过该第四溶剂入口引入第四溶剂;级分和第三溶剂出口,其设置在级分和第三溶剂入口附近,并选择性地与级分和第三溶剂入口以及第四溶剂入口连接;和第四溶剂出口,其设置在第四溶剂入口附近,并选择性地与级分和第三溶剂入口以及第四溶剂入口连接;当级分和第三溶剂入口与级分和第三溶剂出口连接时,级分可以被供应至第一固相萃取柱,然后在第四溶剂入口与级分和第三溶剂出口连接的情况下,第四溶剂可以在第一固相萃取柱中用第一反相液相色谱柱洗脱级分,并且在级分和第三溶剂入口与第四溶剂出口连接的情况下,第三溶剂可以平衡第二固相萃取柱和第二反相液相色谱柱;并且当级分和第三溶剂入口与第四溶剂出口连接时,级分可以被供应至第二固相萃取柱,然后在第四溶剂入口与第四溶剂出口连接的情况下,第四溶剂可以在第二固相萃取柱中用第二反相液相色谱柱洗脱级分,并且在级分和第三溶剂入口与级分和第三溶剂出口连接的情况下,第三溶剂可以平衡第一固相萃取柱和第一反相液相色谱柱。

[0035] 双柱阀可以包括第一固相萃取柱连接端口和第一固相萃取柱通道端口,其各自与第一固相萃取柱的两端连接;第一固相萃取柱入口,其与级分和第三溶剂出口连接,并选择性地与第一固相萃取柱连接端口和第一固相萃取柱通道端口连接;第一反相液相色谱柱端口,其与第一反相液相色谱柱连接,并与第一固相萃取柱连接端口连接或断开;第二固相萃取柱连接端口和第二固相萃取柱通道端口,其各自与第二固相萃取柱的两端连接;第二固相萃取柱入口,其与第四溶剂出口连接,并选择性地与第二固相萃取柱连接端口和第二固相萃取柱通道端口连接;和第二反相液相色谱柱端口,其与第二反相液相色谱柱连接,并与第二固相萃取柱连接端口连接或断开。

[0036] 双柱阀还可以包括:第一出口,其设置在第一固相萃取柱通道端口附近,并与第一

固相萃取柱通道端口连接或断开;和第二出口,其设置在第一出口附近,并与第二固相萃取柱通道端口连接或断开。

[0037] 有益效果

[0038] 本公开内容的实施方案提供了一种非连续样品分级和级联装置,该装置级联并储存每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品以自动获取多个级分,从而降低样品复杂性并增加级分均一性,并且进一步改善分级的再现性并防止样品损失。

附图说明

[0039] 图1是显示在pH 10下进行RPLC分离、再次在pH 2.6下进行各级分的RPLC分离、并使用质量分析仪进行分析后所识别的肽分布的图。

[0040] 图2是示出样品分级后的非连续级联的图。

[0041] 图3是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统而获取第一级分的操作图。

[0042] 图4是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统而获取第二级分的操作图。

[0043] 图5是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统而获取第十级分的操作图。

[0044] 图6是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第一级分供应至第一固相萃取柱的操作图。

[0045] 图7是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第一级分供应至第一反相液相色谱柱并平衡第二固相萃取柱和第二反相液相色谱柱的操作图。

[0046] 图8是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第二级分供应至第二固相萃取柱的操作图。

[0047] 图9是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第二级分供应至第二反相液相色谱柱并平衡第一固相萃取柱和第一反相液相色谱柱的操作图。

具体实施方式

[0048] 为了完整理解本公开内容、通过实施本公开内容而获得的其操作优点和目的,参照附图来说明本公开内容的优选实施方案和附图中的陈述。

[0049] 在下文中,将通过参照附图说明本公开内容的优选实施方案来详细描述本公开内容。在每幅图中呈现的类似附图标记表示类似的元件。

[0050] 图3是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统而获取第一级分的操作图;图4是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统而获取第二级分的操作图;图5是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统而获取第十级分的操作图;图6是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第一级分供应至第一固相萃取柱的操作图;图7是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第一级分供应至第一反相液相色谱柱并平衡第二固相萃取柱和第二反相液相色谱柱的操作图;图8是显示通过根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第二级分供应至第二固相萃取柱的

操作图；以及图9是显示通过根据本公开内容实施方案的双在线多功能液相色谱系统将第二级分供应至第二反相液相色谱柱并平衡第一固相萃取柱和第一反相液相色谱柱的操作图。

[0051] 参照图3至图5,根据本公开内容的实施方案的双在线多功能液相色谱系统100包括:非连续样品分级和级联装置200,其被连续供应待分析的样品以获取多个级分,并供应该多个级分;双柱阀400,其与第一反相液相色谱柱(COL1)和第二反相液相色谱柱(COL2)连接,并具有与第一反相液相色谱柱(COL1)连接的第一固相萃取柱(SPE1)和与第二反相液相色谱柱(COL2)连接的第二固相萃取柱(SPE2);以及柱选择模块300,其被设置在非连续样品分级和级联装置200与双柱阀400之间,以便以交替方式将由非连续样品分级和级联装置200供应的多个级分以相继顺序供应至第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0052] 参照图3至图5,根据该实施方案的非连续样品分级和级联装置200的作用在于从由样品注射器S连续供应的样品中获取多个级分。

[0053] 下面将描述根据该实施方案的多个级分。

[0054] 首先,通过等分供应样品的总样品供应时间来设定单位样品供应时间。此外,通过等分每个单位样品供应时间来设定单位分级间隔。另外,通过级联并储存在每个单位样品供应时间内相应的单位分级间隔期间供应的样品来获取多个级分。

[0055] 例如,当总样品供应时间为100分钟时,通过将总样品供应时间等分为五而获得的单位样品供应时间为20分钟的间隔。也就是说,第一单位样品供应时间对应于0至20分钟,第二单位样品供应时间至第五单位样品供应时间分别对应于20分钟至40分钟、40分钟至60分钟、60分钟至80分钟和80分钟至100分钟。

[0056] 此外,第一单位样品供应时间至第五单位样品供应时间可以具有通过等分为十而获得的单位分级间隔。例如,在第一单位样品供应时间期间,第一单位分级间隔对应于0至2分钟,第二单位分级间隔至第十单位分级间隔分别对应于2分钟至4分钟、4分钟至6分钟、6分钟至8分钟、8分钟至10分钟、10分钟至12分钟、12分钟至14分钟、14分钟至16分钟、16分钟至18分钟和18分钟至20分钟。此外,在第二样品供应时间期间,第一单位分级间隔对应于20至22分钟,第二分级间隔至第十分级间隔分别对应于22分钟至24分钟、24分钟至26分钟、26分钟至28分钟、28分钟至30分钟、30分钟至32分钟、32分钟至34分钟、34分钟至36分钟、36分钟至38分钟和38分钟至40分钟。

[0057] 在该实施方案中,通过级联并储存在第一单位样品供应时间至第五单位样品供应时间内相应的第一单位分级间隔至第十单位分级间隔期间供应的样品来获取多个级分。例如,通过级联并储存在第一单位样品供应时间至第五单位样品供应时间内的第一单位分级间隔(即,0至2分钟、20分钟至22分钟、40分钟至42分钟、60分钟至62分钟、80分钟至82分钟)期间供应的样品来获取第一级分。第二级分至第十级分通过与获取第一级分的操作相同的操作获得,并且在此省略其详细描述。

[0058] 此外,尽管该实施方案将总样品供应时间设定为100分钟和第一单位样品供应时间至第五单位样品供应时间,并在每个单位样品供应时间内设定十个单位分级间隔,但本公开内容的保护范围不限于此,并且可以对总样品供应时间、单位样品供应时间和单位分级间隔进行不同地设定。

[0059] 根据该实施方案的非连续样品分级和级联装置200包括供应样品的样品供应模块210;样品分级模块250,其与样品供应模块210连接以连续接收由样品供应模块210供应的样品,从而获取多个级分并以相继顺序将多个级分供应至柱选择模块300。

[0060] 根据该实施方案的样品供应模块210的作用在于将样品连续供应至样品分级模块250。

[0061] 样品供应模块210包括第一样品供应阀220,其与供应第一溶剂的第一泵P1以及样品注射器S连接;和第二样品供应阀240,其与第一样品供应阀220连接以接收由第一样品供应阀220供应的样品,并将该样品供应至样品分级模块250。

[0062] 第一样品供应阀220的作用在于接收由样品注射器S供应的样品,将样品储存在样品储存回路221中,然后接收由第一泵P1供应的第一溶剂并将储存在样品储存回路221中的样品供应至第二样品供应阀240。

[0063] 为此,第一样品供应阀220包括:第一样品入口222,其与样品注射器S连接;第一样品出口223,其设置在第一样品入口222附近;第一溶剂入口226,其与第一泵P1连接;第一溶剂出口227,其设置在第一溶剂入口226附近并与第二样品供应阀240连接;以及第一样品储存回路连接端口224和第二样品储存回路连接端口225,其与样品储存回路221的两端各自连接。

[0064] 尽管未示出,但是在与样品储存回路221的两端各自连接的第一样品储存回路连接端口224和第二样品储存回路连接端口225分别与第一样品入口222和第一样品出口223连接的情况下,样品通过样品注射器S被供应至第一样品入口222并连续地储存在样品储存回路221中。

[0065] 此外,在第一样品储存回路连接端口224和第二样品储存回路连接端口225各自与第一溶剂入口226和第一溶剂出口227连接的情况下,第一溶剂通过第一泵P1被注入第一溶剂入口226中,并且储存在样品储存回路221中的样品被连续供应至第二样品供应阀240。在这种情况下,第一泵P1将第一溶剂供应至第一溶剂入口226,其中第一溶剂为pH 7.5的99%溶液A(10mM三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 水溶液) 和1%溶液B(10mM三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 乙腈溶液) 的混合溶液。

[0066] 此外,第二样品供应阀240的作用在于将由第一样品供应阀220供应的样品连续注入样品分离柱243中,并将注入到样品分离柱243中的样品连续供应至样品分级模块250。

[0067] 第二样品供应阀240包括:第二样品入口241,其与第一溶剂出口227连接;第二样品出口242,其设置在第二样品入口241附近并与第一级分入口261连接;以及样品分离柱243,其具有两端,分别与第二样品入口241和第二样品出口242连接,使得样品在第二样品出口242处被分离和洗脱。

[0068] 储存在样品储存回路221中的样品通过第一溶剂、经由第一溶剂出口227和第二样品入口241被注入样品分离柱243中。此外,注入到样品分离柱243中的样品通过由第一泵P1供应的第一溶剂得以分离和洗脱,并沿着第二样品出口242供应至下述样品分级模块250。在这种情况下,第一泵P1将第一溶剂供应至第一溶剂入口226,其中第一溶剂为由99%降至50%的溶液A(10mM三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 水溶液) 和由1%增至50%的溶液B(10mM三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 乙腈溶液) 的混合溶液。如上所述,通过逐渐增加第一溶剂中溶液B的浓度使样品容易在样品分离柱243中洗脱。

[0069] 根据该实施方案的样品分级模块250的作用在于从由样品供应模块210连续供应的样品中获取十个级分。

[0070] 样品分级模块250包括：第一分级阀260，其与样品供应模块210连接以允许样品经由其被引入；第二分级阀280，其设置在第一分级阀260附近；以及多个级分储存回路284a至284j，其一端与第一分级阀260连接且另一端与第二分级阀280连接。

[0071] 在该实施方案中，由于每个单位样品供应时间具有十个单位分级间隔，因此对应于单位样品供应时间内相应的单位分级间隔数目来设置十个级分储存回路284a至284j。

[0072] 此外，第一分馏阀260包括：第一级分入口261，通过该第一级分入口261从第二样品出口242引入样品；多个第一级分储存回路连接端口262，其设置在第一级分入口261附近并各自与多个级分储存回路284a至284j的一端连接；以及第一连接通道263，其将第一级分入口261与多个第一级分储存回路连接端口262之一连接成对应于单位分级间隔彼此连通。在该实施方案中，对应于十个级分储存回路284a至284j的数目设置十个第一级分储存回路连接端口262。

[0073] 此外，第二分馏阀280包括：多个第二级分储存回路连接端口282，其与多个级分储存回路284a至284j的另一端各自连接；第一级分出口281，其设置在多个第二级分储存回路连接端口282附近并与多个级分储存回路284a至284j之一的另一端连接以排出级分；以及第二连接通道283，其将第一级分出口281与多个第二级分储存回路连接端口282之一连接成对应于单位分级间隔彼此连通。在该实施方案中，对应于十个级分储存回路284a至284j的数目设置十个第二级分储存回路连接端口282。

[0074] 首先，下面将描述在第一单位样品供应时间(0至20分钟)内的第一单位分级间隔至第十单位分级间隔期间获取第一级分至第十级分的操作。

[0075] 如图3所示，在第一单位分级间隔(0至2分钟)期间获取第一级分的操作如下。

[0076] 在多个第一级分储存回路连接端口262中，将第一连接通道263连接至与第一级分储存回路284a的一端连接的第一级分储存回路连接端口262，并且在多个第二级分储存回路连接端口282中，将第二连接通道283连接至与第一级分储存回路284a的另一端连接的第二级分储存回路连接端口282。

[0077] 此外，在第一溶剂出口227和第二样品入口241连接的情况下，第一溶剂由第一泵P1供应至样品分离柱243，使得样品在样品分离柱243中分离和洗脱，并且在样品分离柱243中经分离和洗脱的样品通过第二样品出口242经由第一级分入口261被供应至第一级分储存回路284a并储存在第一级分储存回路284a中。

[0078] 此外，如图4所示，在第二单位分级间隔(2分钟至4分钟)期间获取第二级分的操作如下。

[0079] 在多个第一级分储存回路连接端口262中，将第一连接通道263连接至与第二级分储存回路284b的一端连接的第一级分储存回路连接端口262，并且在多个第二级分储存回路连接端口282中，将第二连接通道283连接至与第二级分储存回路284b的另一端连接的第二级分储存回路连接端口282。

[0080] 此外，在第一溶剂出口227和第二样品入口241连接的情况下，第一溶剂由第一泵P1供应至样品分离柱243，使得样品在样品分离柱243中分离和洗脱，并且在样品分离柱243中经分离和洗脱的样品通过第二样品出口242经由第一级分入口261被供应至第二级分储

存回路284b并储存在第二级分储存回路284b中。

[0081] 此外,如图5所示,在第十单位分级间隔(18至20分钟)期间获取第十级分的操作如下。

[0082] 在多个第一级分储存回路连接端口262中,将第一连接通道263连接至与第十级分储存回路284j的一端连接的第一级分储存回路连接端口262,并且在多个第二级分储存回路连接端口282中,将第二连接通道283连接至与第十级分储存回路284j的另一端连接的第二级分储存回路连接端口282。

[0083] 此外,在第一溶剂出口227和第二样品入口241连接的情况下,第一溶剂由第一泵P1供应至样品分离柱243,使得样品在样品分离柱243中分离和洗脱,并且在样品分离柱243中经分离和洗脱的样品通过第二样品出口242经由第一级分入口261被供应至第十级分储存回路284j,并储存在第十级分储存回路284j中。

[0084] 此外,在第二单位样品供应时间至第五单位样品供应时间(20分钟至40分钟、40分钟至60分钟、60分钟至80分钟、80分钟至100分钟)之中,可以通过在第一单位样品供应时间(0至20分钟)内的第一单位分级间隔至第十单位分级间隔期间反复地进行获取第一级分至第十级分的操作来获取第一级分至第十级分。例如,通过级联并储存在第一单位样品供应时间至第五单位样品供应时间内的第一单位分级间隔(即,0至2分钟、20分钟至22分钟、40分钟至42分钟、60分钟至62分钟、80分钟至82分钟)期间供应的样品来获取第一级分。

[0085] 同时,为了分离并分析通过样品分级模块250获得的第一级分至第十级分,将第一级分至第十级分供应至第一反相液相色谱柱(COL1)或第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0086] 为此,根据该实施方案的柱选择模块300的作用在于以交替方式将由样品分级模块250供应的第一级分至第十级分以相继顺序供应至下述双柱阀400中提供的第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)、或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0087] 此外,柱选择模块300的作用在于将第一级分至第十级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)中的一种,并进行级分分离和分析,同时对第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)中的另一种进行平衡操作。

[0088] 柱选择模块300包括:柱平衡阀310,其与第一级分出口281连接,以提供以交替方式将多个级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2)的通道,并以交替方式平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2);以及柱选择阀330,其与柱平衡阀310连接,以接收多个级分的供应,并以交替方式将该级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2),以便在第一固相萃取柱(SPE1)中用第一反相液相色谱柱(COL1)或者在第二固相萃取柱(SPE2)中用第二反相液相色谱柱(COL2)分离并洗脱级分。

[0089] 根据该实施方案的柱平衡阀310的作用在于提供以交替方式将第一级分至第十级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2)的通道。

[0090] 柱平衡阀310包括:第二级分入口311,其与第一级分出口281和供应第二溶剂的第二泵P2连接;第三溶剂入口313,其与供应第三溶剂的第三泵P3连接以允许第三溶剂被引

入;第二级分出口312,其设置在第二级分入口311附近并选择性地与第二级分入口311和第三溶剂入口313连接;以及第三溶剂出口334,其设置在第三溶剂入口313附近并选择性地与第二级分入口311和第三溶剂入口313连接。

[0091] 参照图6,在第二级分入口311与第一级分出口281连接并且第二级分入口311与第三溶剂出口334连接的情况下,储存在第一级分储存回路284a中的第一级分被供应至下述双重选择阀的第一固相萃取柱(SPE1)。此外,参照图8,在第二级分入口311与第一级分出口281连接并且第二级分入口311与第三溶剂出口334连接的情况下,储存在第二级分储存回路284b中的第二级分被供应至下述双重选择阀的第二固相萃取柱(SPE2)。

[0092] 如上所述,在第一级分出口281、第二级分入口311和第三溶剂出口334连接的情况下,可以以交替方式将储存在第一级分储存回路至第十级分储存回路284a至284j中的第一级分至第十级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2)。

[0093] 在这种情况下,通过置于连接第一级分出口281和第二级分入口311的管线中的第二泵P2将第二溶剂供应至由第一级分储存回路284a至第十级分储存回路284j排出的第一级分至第十级分。此处,第二泵P2供应第二溶剂,即0.2%三氟乙酸(TFA)水溶液。此外,第一泵P1将第一溶剂供应至第一溶剂入口226,其中第一溶剂为99%的溶液A(10mM三乙基碳酸氢铵(TEAB)水溶液)和1%溶液B(10mM三乙基碳酸氢铵(TEAB)乙腈溶液)的混合溶液。此外,由第一泵P1供应的第一溶剂与由第二泵P2供应的第二溶剂的量的比例可以是1:9。

[0094] 这是因为第二溶剂被注入供应至第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2)的第一级分至第十级分中,以稀释并酸化第一级分至第十级分,从而防止第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2)中第一级分至第十级分的损失,并减少有机溶剂的组成。

[0095] 此外,参照图7,在储存于第一反相液相色谱柱(COL1)中的第一级分的分离和分析操作过程中,在第三溶剂入口313和第三溶剂出口334连接的情况下,第三溶剂经由柱选择阀330平衡第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)。此外,参照图9,在储存于第二反相液相色谱柱(COL2)中的第二级分的分离和分析操作过程中,在第三溶剂入口313和第三溶剂出口334连接的情况下,第三溶剂经由柱选择阀330平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)。

[0096] 尽管在该实施方案中将0.1%的甲酸水溶液用作第三溶剂,但第三溶剂不限于此,并且包括任何能够平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)、或第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)的水溶液。

[0097] 根据该实施方案的柱选择阀330的作用在于接收由柱平衡阀310供应的多个级分并以交替方式将该多个级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)或第二固相萃取柱(SPE2)。此外,柱选择阀330的作用在于向第一固相萃取柱(SPE1)供应第四溶剂,以便在第一固相萃取柱(SPE1)中用第一反相液相色谱柱(COL1)洗脱级分,或向第二固相萃取柱(SPE2)供应第四溶剂,以便在第二固相萃取柱(SPE2)中用第二反相液相色谱柱(COL2)洗脱级分。

[0098] 柱选择阀330包括:级分和第三溶剂入口331,其与第三溶剂出口334连接以能够经由其引入级分或第三溶剂;第四溶剂入口333,其与供应第四溶剂的第四泵P4连接以能够经由其引入第四溶剂;级分和第三溶剂出口332,其设置在级分和第三溶剂入口331附近并选择性地与级分和第三溶剂入口331以及第四溶剂入口333连接;以及第四溶剂出口334,其设

置在第四溶剂入口333附近并选择性地与级分和第三溶剂入口331以及第四溶剂入口333连接。

[0099] 如图6所示,描述了平衡第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)的操作,在级分和第三溶剂出口332、级分和第三溶剂入口331、以及第三溶剂出口334和第二级分入口311相连接的情况下,第一级分被供应至第一固相萃取柱(SPE1)。此外,如图7所示,在第四溶剂入口333与级分和第三溶剂出口332相连接的情况下,第四溶剂在第一固相萃取柱(SPE1)中用第一反相液相色谱柱(COL1)洗脱第一级分,并且在级分和第三溶剂入口331、第四溶剂出口334以及第三溶剂出口334相连接的情况下,第三溶剂被引入第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)中,以平衡第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0100] 在该实施方案中,第四泵P4将第四溶剂供应至第四溶剂入口333,其中第四溶剂为从99%降至60%的溶液C(0.1%甲酸的水溶液)和从1%增至40%的溶液D(0.1%甲酸的乙腈溶液)的混合溶液。如上所述,第四溶剂中溶液D浓度的逐渐增加使得第一级分能够容易地在第一固相萃取柱(SPE1)中洗脱,或使得第二级分能够容易地在第二固相萃取柱(SPE2)中洗脱。

[0101] 此外,如图8所示,描述了平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)的操作,在第四溶剂出口334、级分和第三溶剂入口331、第三溶剂出口334和第二级分入口311相连接的情况下,第二级分被供应至第二固相萃取柱(SPE2);然后如图9所示,在第四溶剂入口333与第四溶剂出口334相连接的情况下,第四溶剂在第二固相萃取柱(SPE2)中用第二反相液相色谱柱(COL2)洗脱第二级分,并且在级分和第三溶剂入口331与级分和第三溶剂出口332相连接的情况下,第三溶剂被引入第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)中,以平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)。

[0102] 同时,根据该实施方案的双柱阀400的作用在于对第一反相液相色谱柱(COL1)和第二反相液相色谱柱(COL2)之一中的级分进行分离和分析,同时对另一个柱进行平衡。

[0103] 双柱阀400包括与第一反相液相色谱柱(COL1)连接的第一固相萃取柱(SPE1)和与第二反相液相色谱柱(COL2)连接的第二固相萃取柱(SPE2)。级分通过第一固相萃取柱(SPE1)被供应至第一反相液相色谱柱(COL1)或者通过第二固相萃取柱(SPE2)被供应至第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0104] 此外,双柱阀400以交替方式将第一级分至第十级分供应至第一反相液相色谱柱(COL1)或第二反相液相色谱柱(COL2),并且该双柱阀400与柱选择阀330流体连通,该柱选择阀330对第一反相液相色谱柱(COL1)和第二反相液相色谱柱(COL2)之一中的级分进行分离和分析,同时对另一个柱进行平衡。

[0105] 为此,双柱阀400包括:第一固相萃取柱连接端口412和第一固相萃取柱通道端口413,其各自与第一固相萃取柱(SPE1)的两端连接;第一固相萃取柱入口411,其与级分和第三溶剂出口332连接并选择性地与第一固相萃取柱连接端口412和第一固相萃取柱通道端口413连接;第一反相液相色谱柱端口414,其与第一反相液相色谱柱(COL1)连接并与第一固相萃取柱连接端口412连接或断开;第二固相萃取柱连接端口432和第二固相萃取柱通道端口433,其各自与第二固相萃取柱(SPE2)的两端连接;第二固相萃取柱入口431,其与第四溶剂出口334连接并选择性地与第二固相萃取柱连接端口432和第二固相萃取柱通道端口

433连接;以及第二反相液相色谱柱端口434,其与第二反相液相色谱柱(COL2)连接并与第二固相萃取柱连接端口432连接或断开。

[0106] 参照图6,描述了将第一级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)的操作,在第一固相萃取柱连接端口412、第一固相萃取柱入口411、级分和第三溶剂出口332、级分和第三溶剂入口331以及第三溶剂出口334相连接的情况下,第一级分被供应至第一固相萃取柱(SPE1)。此外,双柱阀400还包括第一出口451,其设置在第一固相萃取柱通道端口413附近并与第一固相萃取柱通道端口413连接或断开,并且在将第一级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)并浓缩时,盐通过第一出口451被排出。

[0107] 此外,参照图7,为了将第一级分注入第一反相液相色谱柱(COL1)中并对第一级分进行分离和分析,在第一反相液相色谱柱端口414、第一固相萃取柱连接端口412、第一固相萃取柱通道端口413和第一固相萃取柱入口411相连接的情况下,第四溶剂沿着第四溶剂入口333以及级分和第三溶剂出口332被引入第一固相萃取柱(SPE1)中,并在第一固相萃取柱(SPE1)中洗脱第一级分,并且将第一级分供应至第一反相液相色谱柱(COL1)。此外,为了同时平衡第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)并对第一级分进行分离和分析,在第二反相液相色谱柱端口434、第二固相萃取柱连接端口432、第二固相萃取柱通道端口433和第二固相萃取柱入口431相连接的情况下,第三溶剂沿着级分和第三溶剂入口331以及第四溶剂出口334被引入第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)中,以平衡第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0108] 此外,参照图8,描述了将第二级分供应至第二固相萃取柱(SPE2)的操作,在第二固相萃取柱连接端口432、第二固相萃取柱入口431、第四溶剂出口334、级分和第三溶剂入口331以及第三溶剂出口334相连接的情况下,第二级分被提供至第二固相萃取柱(SPE2)。此外,双柱阀400还包括设置在第二固相萃取柱通道端口433附近并与第二固相萃取柱通道端口433连接或断开的第二出口453,并且在将第二级分供应至第二固相萃取柱(SPE2)并浓缩时,盐通过第二出口453被排出。

[0109] 此外,参照图9,为了将第二级分注入第二反相液相色谱柱(COL2)中并对第二级分进行分离和分析,在第二反相液相色谱柱端口434、第二固相萃取柱连接端口432、第二固相萃取柱通道端口433和第二固相萃取柱入口431相连接的情况下,第四溶剂沿着第四溶剂入口333和第四溶剂出口334被引入第二固相萃取柱(SPE2)中,并在第二固相萃取柱(SPE2)中洗脱第二级分,并且第二级分被供应至第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0110] 此外,为了同时平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)并对第二级分进行分离和分析,在第一反相液相色谱柱端口414、第一固相萃取柱连接端口412、第一固相萃取柱通道端口413和第一固相萃取柱入口411相连接的情况下,第三溶剂沿着级分和第三溶剂入口331以及级分和第三溶剂出口332被引入第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)中,以平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)。

[0111] 在前述方案中,以交替方式将第一级分至第十级分供应至第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2),然后进行分离和分析,并同时平衡第一固相萃取柱(SPE1)和第一反相液相色谱柱(COL1)或者第二固相萃取柱(SPE2)和第二反相液相色谱柱(COL2)。

[0112] 对于本领域技术人员显而易见的是,本公开内容不限于所公开的实施方案,并且

可以在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下对其进行各种修改和变化。因此,这样的修改或变化落入所附的权利要求内。

[0113] 工业实用性

[0114] 本公开内容可以通过自动操作具有低的样品复杂性和高的级分均一性的非连续样品分级和级联过程来提高分级的再现性并防止样品损失。

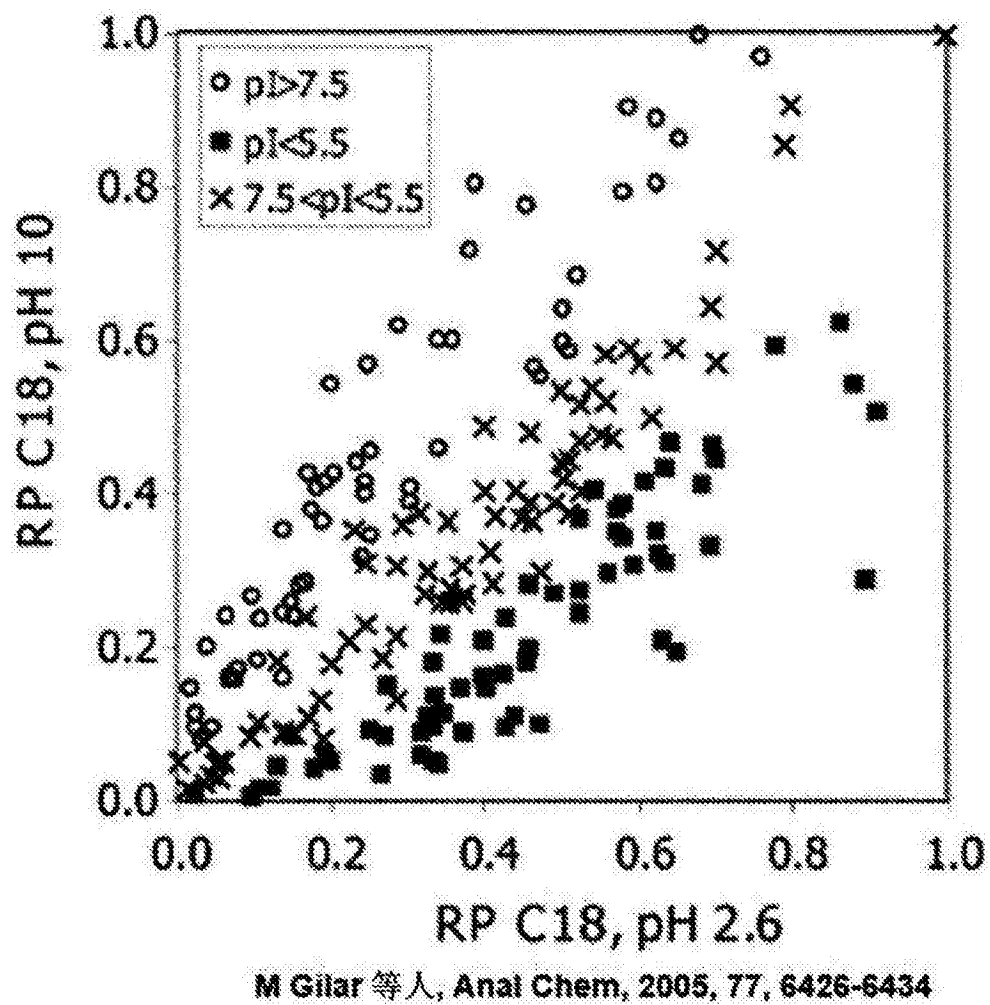
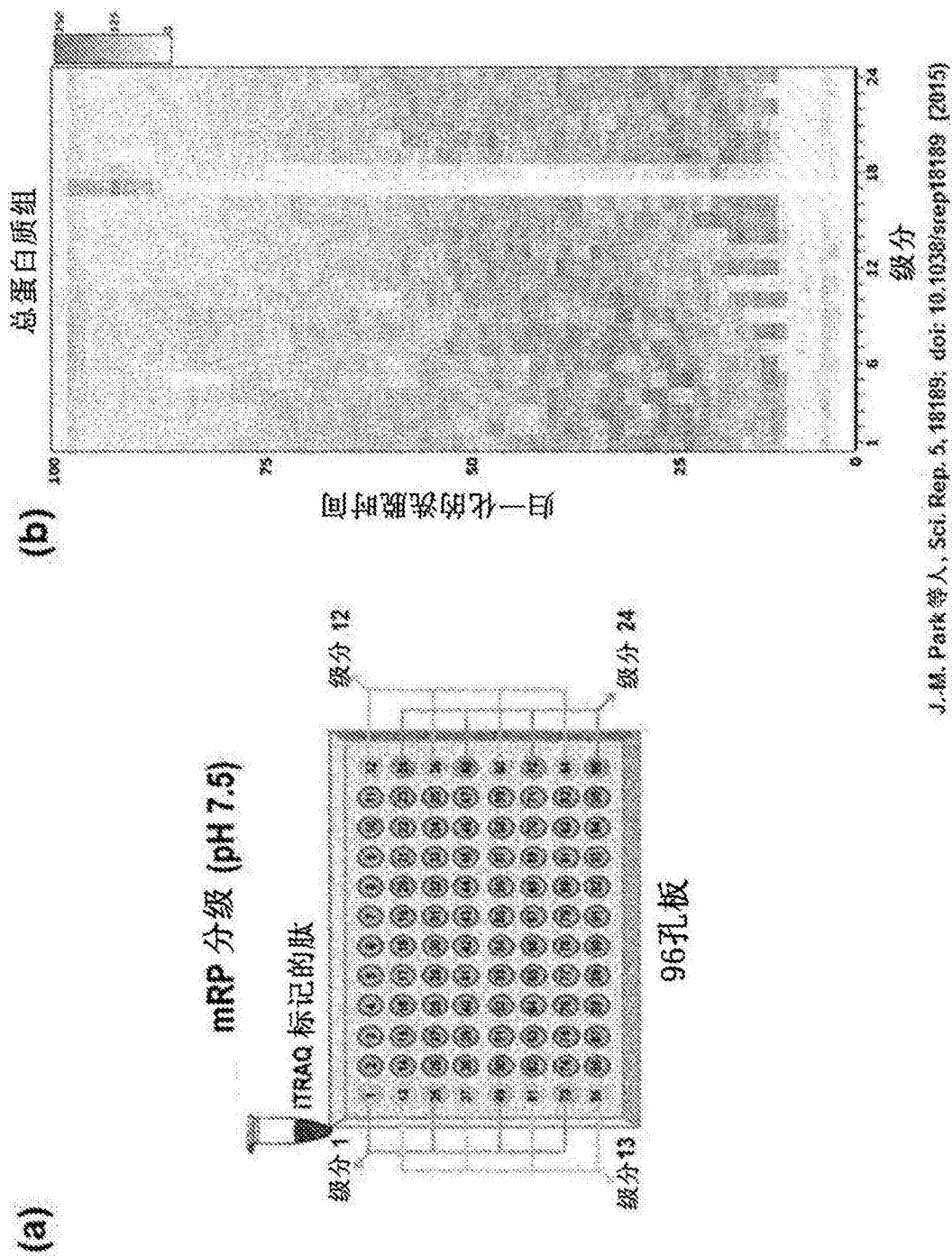


图1



J.M. Park 等人, Sci. Rep. 5, 18189; doi: 10.1038/srep18189 (2015)

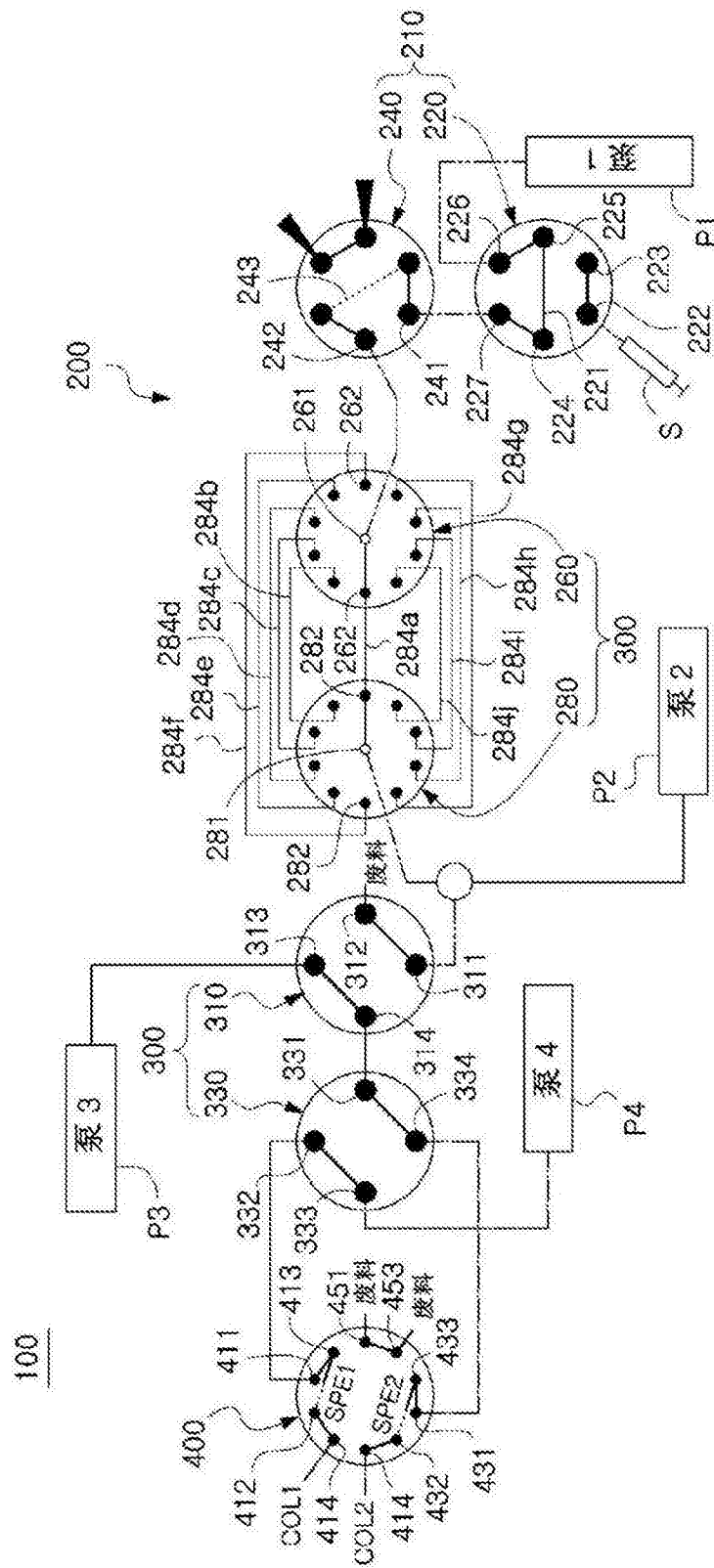


图3

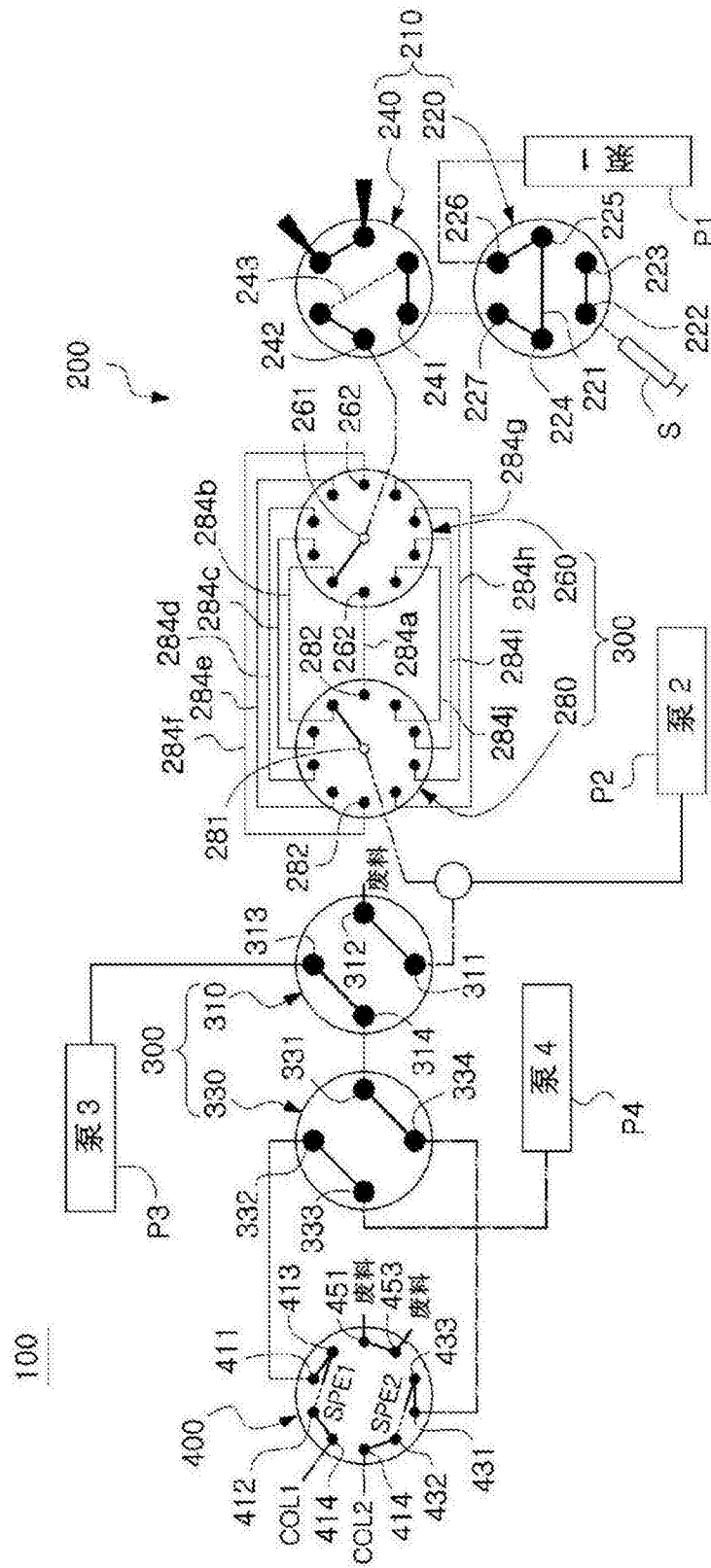


图4

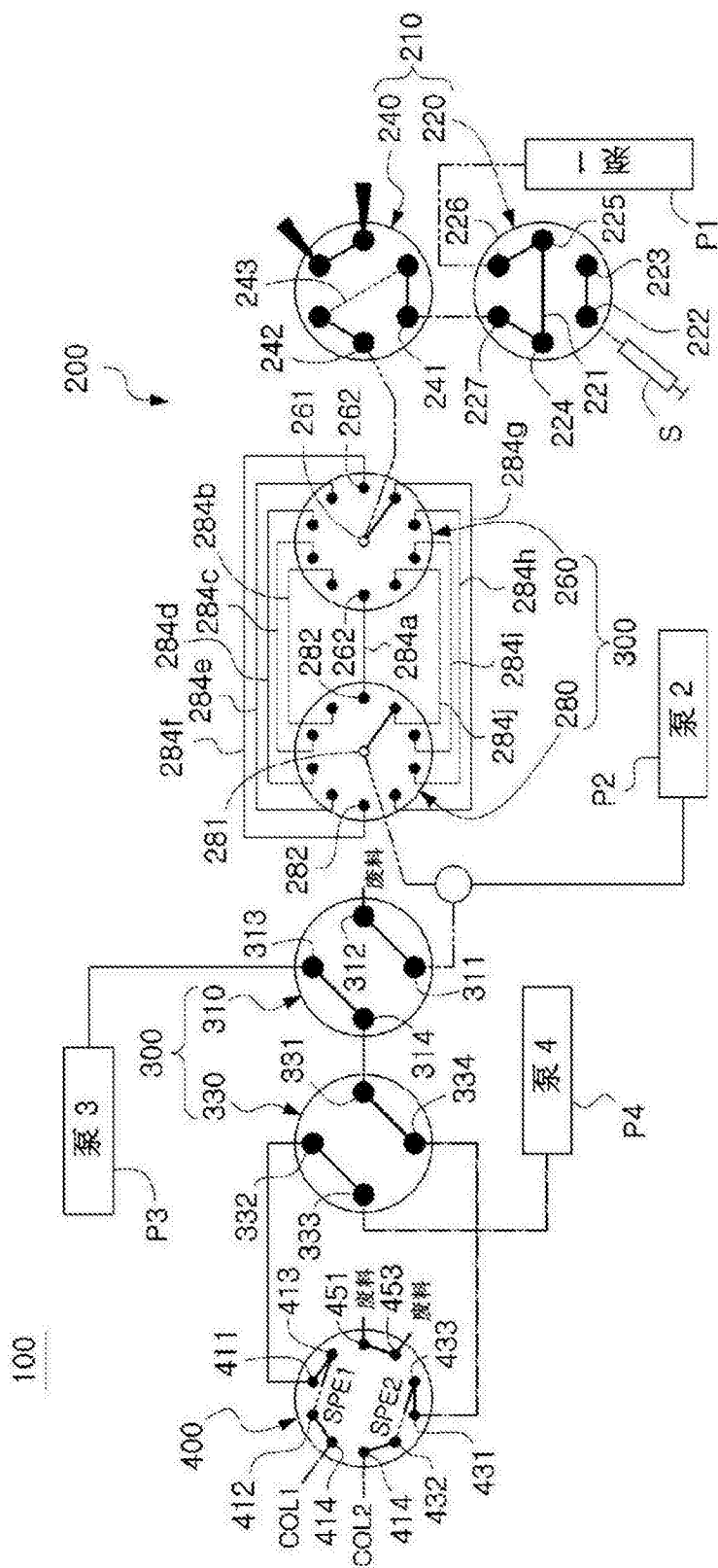


图5

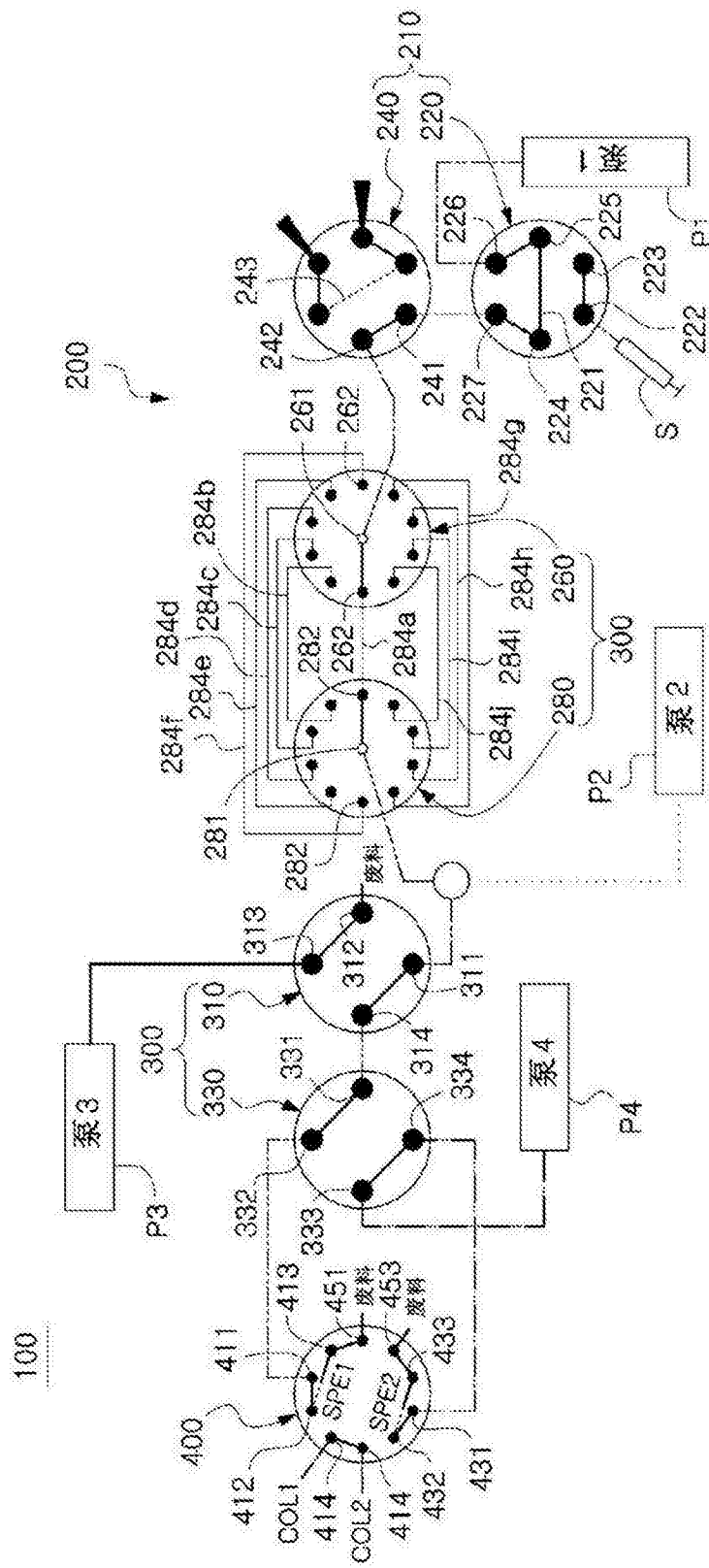


图6

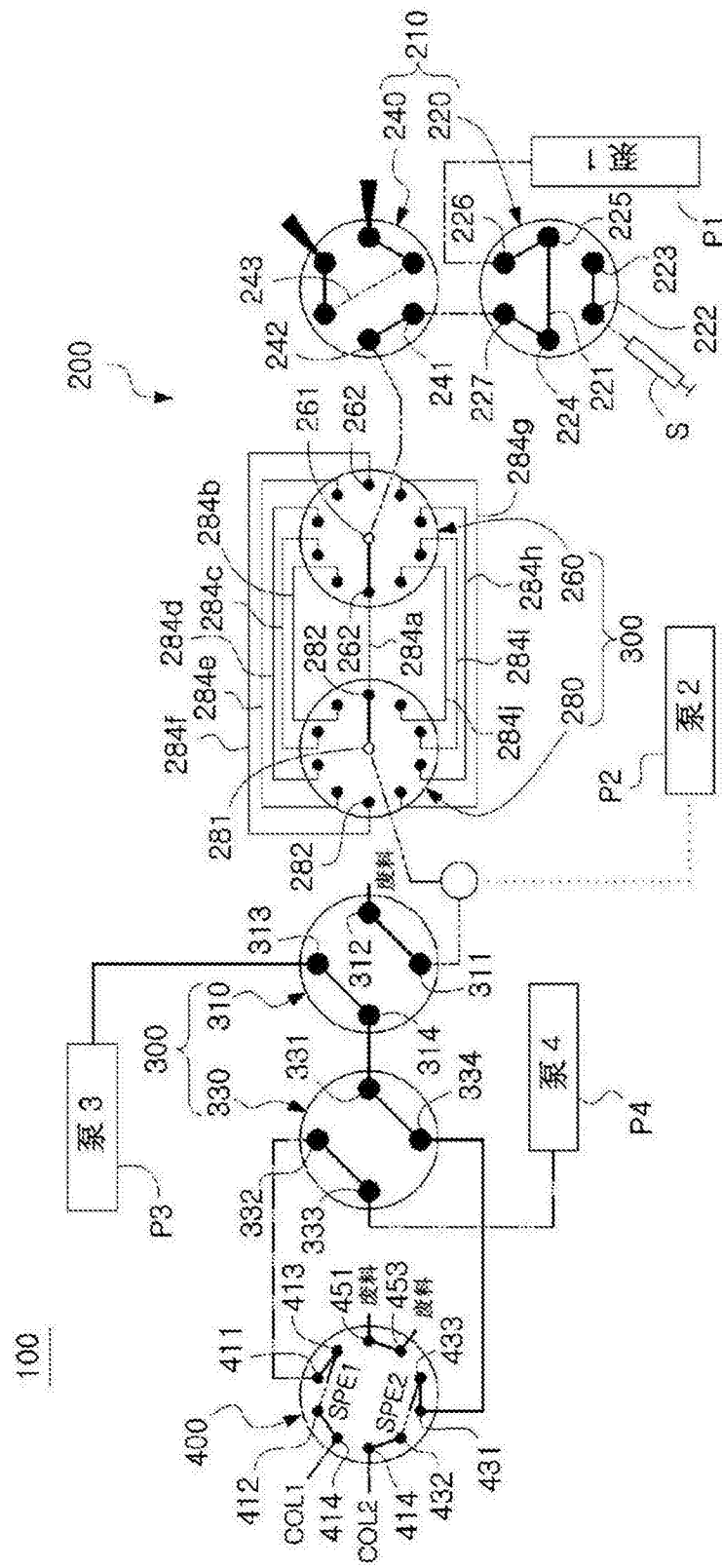


图7

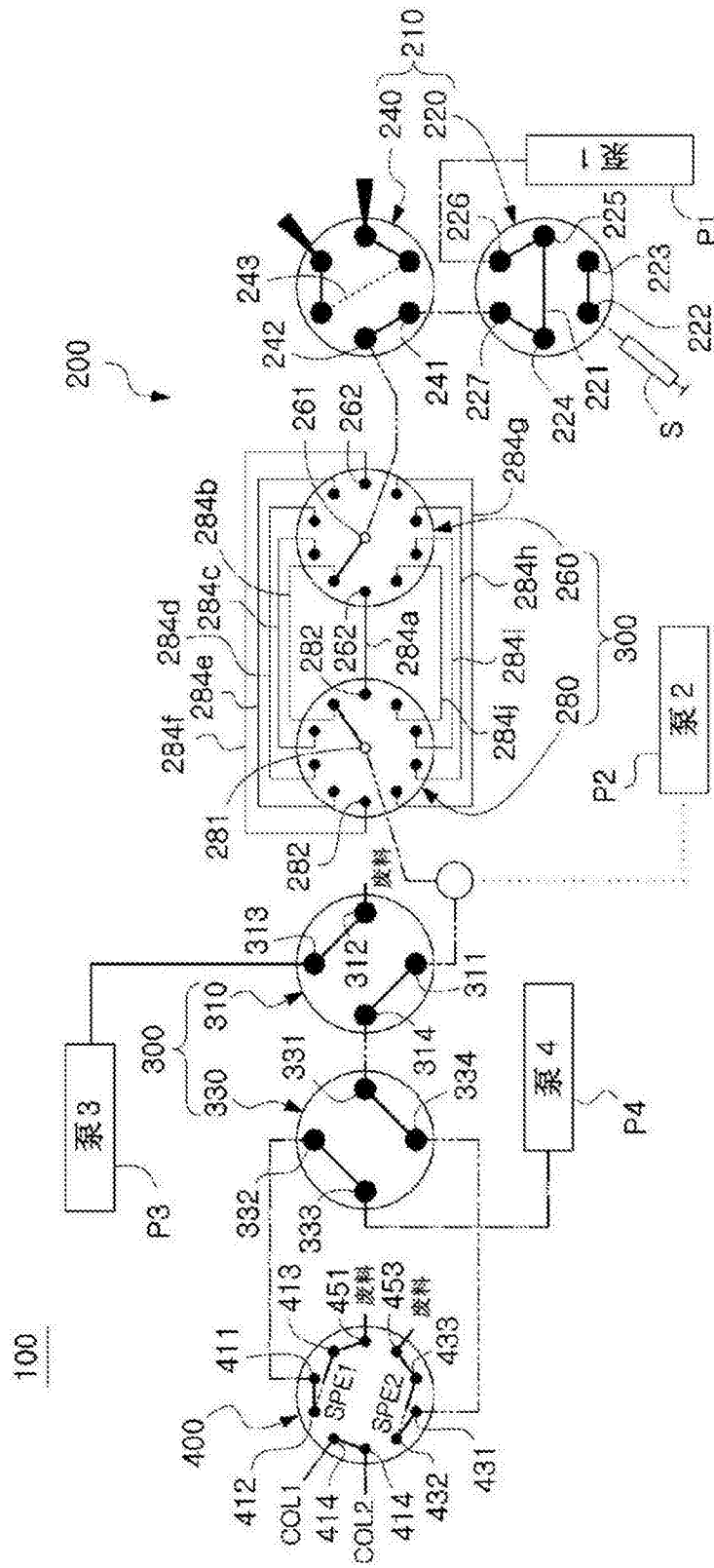


图8

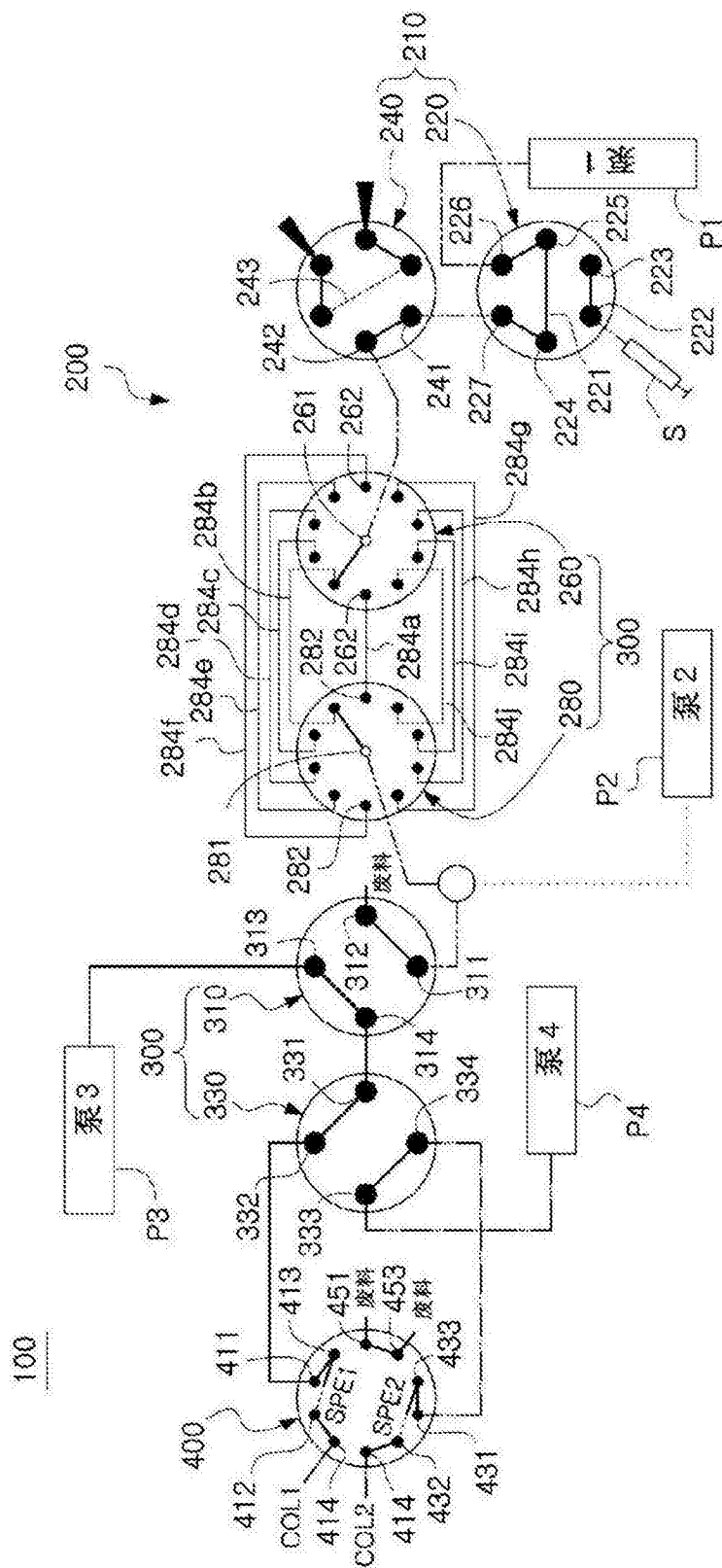


图9