

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

B01J 20/286 (2006.01)

B01D 15/18 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680048662.X

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101336133A

[22] 申请日 2006.11.9

[21] 申请号 200680048662.X

[30] 优先权

[32] 2005.11.9 [33] SE [31] 0502485-6

[86] 国际申请 PCT/EP2006/068311 2006.11.9

[87] 国际公布 WO2007/054548 英 2007.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.23

[71] 申请人 纳诺瑟公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

[72] 发明人 P·维贝里 P·斯佩格尔

[74] 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司

代理人 周建秋 王凤桐

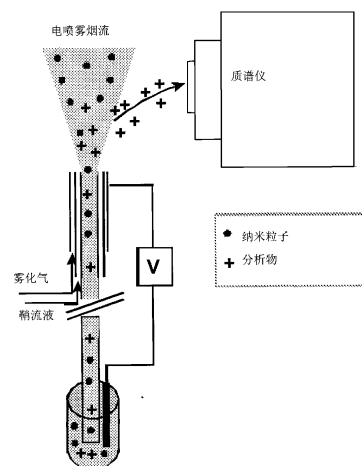
权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 8 页

[54] 发明名称

粒子

[57] 摘要

在此公开了样品成分的色谱分离中的流动固相中所用的粒子。这些粒子含有核和涂层，其中所述核与至少一种分析物相互作用，所述涂层实质上预防絮凝或聚集。



1、样品成分的色谱分离中的流动固相中所用的粒子，其特征在于，所述粒子含有核和涂层，其中所述核与至少一种分析物相互作用，所述涂层本质上预防絮凝或聚集。

2、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述核实质上是疏水的，所述涂层实质上是亲水的。

3、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述涂层实质上是疏水的，所述核实质上是亲水的。

4、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是多孔的。

5、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是无孔的。

6、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是中性的、阳离子的、阴离子的或两性离子的。

7、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是单克隆或多克隆的。

8、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述涂层是多相的或均相的。

9、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是单分散的或多分散的。

10、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是手性的或非手性的。

11、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述核含有石墨、钛氧化物、琼脂糖、氧化铝、聚合物，所述聚合物是由选自由甲基丙烯酸酯、乙烯基吡啶、丙烯酸酯、苯乙烯、二乙烯基苯和硅烷组成的组中的一种或多种单体聚合形成的。

12、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述核的表面含有磷酸根、膦酸、羧酸、醛、环氧化物、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、酯、醚和/或羟基。

13、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述涂层含有线性聚合物、支化聚合物、交替共聚物和/或嵌段共聚物。

14、根据权利要求 13 所述的粒子，其中，所述聚合物和/或共聚物选自由聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇和/或聚乙烯亚胺所组成的组中。

15、根据权利要求 13 所述的粒子，其中，所述聚合物和/或共聚物含有选自由醚、酯、磷酸根、膦酸、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、环氧化物、羧酸、磺酸和羟基所组成的组中的一种或几种官能团。

16、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述涂层含有含选自由酯、醚、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、环氧化物、硫酸酯、磺酸、羧酸、羟基、磷酸根、膦酸和/或酰胺所组成的组中的一种或几种官能团的小分子。

17、根据权利要求 16 所述的粒子，其中，所述小分子的分子量在 10 克/摩尔到 10000 克/摩尔之间的范围内。

18、根据权利要求 17 所述的粒子，其中，所述小分子为烃或氟代烃。

19、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述涂层含有一个或多个选自由蛋白质、脱氧核糖核酸、核糖核酸、纤维素、淀粉、再生纤维素、改性淀粉和/或改性纤维素所组成的组中的物质。

20、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述核是带电的，所述涂层是中性的。

21、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述核是中性的，所述涂层是带电的。

22、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述核或涂层是手性的。

23、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子是交联的。

24、根据权利要求 1 所述的粒子，其中，所述粒子具有比至少一种分析物更大的质荷比 m/z 。

25、制备权利要求 1 所述粒子的方法，其中，所述核是聚合物，该方法包括一个或几个以下的步骤：

将单体聚合形成核；

对聚合物的取代基进行改性；

对核的表面进行改性；

对所述核进行衍生；和

用另一种聚合物涂覆所述核。

26、权利要求 1 到 24 中任意一项所述的粒子在用于从其它样品成分中进行至少一种分析物的色谱分离以及检测至少一种分析物中的用途，其中，所述检测是通过使用具有角度电离源的质量分析器来实现的。

粒子

技术领域

总体上本发明属于粒子领域。更具体地讲，本发明是关于色谱法中作为流动固相的粒子。

背景技术

目前进行分析分离的主要技术是色谱法。传统上色谱法是通过使用泵来进行的，所述泵使样品和流动相传送通过含有固定相的柱子。此技术通常被称为液体色谱法（LC）或高效能液体色谱法(HPLC)。此技术的主要类型之一使用由涂覆有疏水分子的二氧化硅粒子组成的疏水固定相，而流动相是亲水的。此技术的另一类型使用不同程度上结合有手性分子的手性固定相。样品成分在此两相之间的分配是分离的基础。这样，流动相和固定相有不同的特性是很重要的。样品分子从柱中洗脱以后，使用不同的方法收集或探测样品分子。此传统设置的一个主要问题是大多数样品含有牢牢地粘在固定相上的化合物，因此，固定相被污染，发生性能改变。由于此污染最后将不得不交换此柱。

以前，我们已经研发了一项技术来解决这个问题，在该技术中，使用纳米颗粒形式的一次性流动固相（mobile solid phase）来解决由于吸收样品成分或样品基体而污染固定相的问题。通过使用毛细管电色谱(CEC)的部分填充（partial filling, PF），在样品进入薄毛细管柱之前，先将一塞传送液中的纳米颗粒（浆液的形式）注入该薄毛细管柱中。当电压施加到该柱时，样品成分开始穿过纳米粒子浆料塞移动，最终分离。最后，样品成分在纳米粒子塞之前被洗脱，然后使用如 UV-检测光学方法来检测。然而，此技术的一个主要缺点是不能检测到和纳米粒子共洗脱的分析物。而且，此方法使用的两

个注入步骤阻碍了此技术的稳定性和再现性。因而，需要这样一项技术，其中粒子浆液被不断注入毛细管柱，并且其中即使样品成分和粒子共洗脱，样品成分也能被检测出。

Bäckmann 等人(Bäckmann, K., Göttlicher, B., *Chromatographia*, 1997, vol. 45, p. 249-254)已经描述了涂覆有 10-羧基癸基二甲基硅烷的二氧化硅粒子在荧光化合物的电动色谱分离中的应用。惰性核的使用意味着仅有非常有限部分的流动固相，即有限部分的涂层，参与分离，因此分离能力极大减小，因为和分析物相互作用的面积或体积严重减小。涂层的使用，既能促使样品成分分离又能防止粒子沉降，限制了将粒子应用到特定分离类型的可能性。

Huang 等人(Huang, M.-F., Kuo, Y.-C, Huang, C.-C, Chang, H.-T, *Anal. Chem.*, 2004, Vol. 76, p. 192-196)已经描述了金水动力涂覆聚(氧乙烯)纳米粒子作为固定相使用毛细管电泳来分离脱氧核糖核酸(DNA)的用途。此类型粒子不适和作为流动固相，因为涂层没有和核连接。另外，当质谱法用于检测分离的分析物时，聚(氧乙烯)最可能漏进质谱仪而严重降低检测限。

最近，本发明的发明人已经发明了一种方法，该方法为每次新分离使用新相，解决了上面提到的注入和洗脱限度的问题。该相称为流动固相，以传输流体中的纳米粒子浆液的形式被持续注入到分离装置中。因为当通过泵经过柱子时，纳米粒子浆液被连续更换，因此每次新的分析都是在新的未使用的固相上进行的。用这种方法，可能损坏柱子的样品成分的吸收就不再是问题。除了和样品成分的相互作用，流动固相应以和样品成分不一样的速度移动。然后，和流动固相结合样品成分将会以不同于未结合流动固相的样品成分速度的速度通过分离系统，那个速度和未结合的速度不一样。这种迁移速度的差别是分离的基础。和传统方法相比，一个不同之处在于固相是流动的，而不是固定在柱中的。来自毛细管的纳米粒子的持续洗脱使得光学检

测方法如 UV-检测不可行。传统的质谱仪检测也无效，因为洗脱纳米粒子将严重地污染质谱仪。为了促使和流动固相共洗脱的样品成分的检测，需要在检测前将流动固相从样品成分中分离。这可以通过例如角度（如直角）电喷射电离源（angled electrospray ionization source）来实现，其中样品成分被加速送入质谱仪，而流动固相被阻止进入质谱仪。

因此，作为流动固相的改进的粒子将是有益的，特别是提高灵活性、成本有效性、改进分离技术和改进分析物和所述粒子之间的关系的粒子将是有益的。

发明内容

因此，本发明优选试图缓和、缓减或消除上述其中一个或多个现有技术的缺点和不足，并解决至少之一上述问题，并通过提供用于样品成分色谱分离的流动固相中使用的粒子，其中所述粒子含有核和涂层，其中所述核与至少一种分析物相互作用，所述涂层实质上预防絮凝或聚集。通过随附的说明书、附图和从属要求，本发明的进一步的优点和特点将变得清楚。

附图说明

通过参照下面的附图，本发明能够实现的这些或其他方面、特点和优点将变得清楚。其中

图 1 公开了电解液中乙腈浓度在分离邻苯二甲酸二甲酯（▲）、邻苯二甲酸二乙酯（■）和邻苯二甲酸二丙酯（◆）中的影响，其中说明了（A）由每米理论塔板的数量与电解液中乙腈浓度关系表示的分离，（B）保留因子的对数与电解液中乙腈浓度的曲线，（C）在乙腈不同浓度的电解液中邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯之间的分离度；

图 2 说明了显示用 DMSO(1)作为未保留 EOF 标记物的同系列邻苯二甲

酸二烷基酯的 RP-CFF-CEC-ESI-MS 的电色谱, 其中邻苯二甲酸二甲酯(2)首先洗脱, 紧接着的是邻苯二甲酸二乙酯 (3) 和邻苯二甲酸二丙酯 (4), 并用 30% (体积/体积) 乙腈调整电解液;

图 3 说明了用于研究 IE-CFF-CEC 的胺的结构 (苯海拉明 (1), 柳丁氨醇 (2), 和咪唑 (3)), 使用 (A) CE 和 (B) CFF-CEC 来分离胺, 由于非常强的保留而未能检测到苯海拉明;

图 4 说明了再现性和悬浮稳定性研究, 其中研究了相对通过超声波后的时间的保留因子 (悬浮电解液: 碳酸铵 (pH 值 8.2): 乙腈 (70: 30 (体积/体积)));

图 5 说明了在两个不同样品浓度下来自 CFF-CEC 分析的电色谱的急速上升, 其中为易于比较, 峰的高度已重新刻度, x 轴的刻度对于两个电色谱完全一样(悬浮电解液: 碳酸铵 (pH 值 8.2): 乙腈 (70: 30 (体积/体积)));

图 6 说明了分离系统和质谱仪的正交界面;

图 7 说明了使用 PEG 900 酯交换进行的 MAA-TRIM 粒子 0.5 克/毫升的分离, 其中电解液由 65% 10mM 醋酸铵缓冲液 (pH 为 5.4) 和 35% MeCN 组成, 并且流动固相的浓度是变化的;

图 8 说明了 (A) 甲基-、乙基-、丙基-和丁基酯的自由区电色谱 (Free Zone electrochromatography), 其中电解液由 65% 10mM 的 NH_4Ac (pH 为 5.4) 和 35% 的 MeCN 组成; 和 (B) 使用持续满填充法, 用 PEG 900 酯交换粒子浆液和 0.5 毫克/毫升粒子进行的甲基-、乙基-、丙基-和丁基酯的分离, 其中电解液由 65% 10mM 的 NH_4Ac (pH 为 5.4) 和 35% 的 MeCN 组成;

图 9 说明了使用持续满填充法, 用 MeCN 含量不同的硫酸化二乙烯基苯粒子分离甲基-、乙基-、丙基-和丁基酯, 其中电解液由 20-40% 的 MeCN 和 10mM 的 NH_4Ac 缓冲液 (pH 为 5.4) 组成。

具体实施方式

下面的描述将聚焦于根据本发明的能够应用于分离系统如色谱分离系统的粒子、方法、使用和研制方法的实施方式。

本发明描述了能在传输流体中形成稳定悬浮并与传输流体特性不一样的粒子。而且，本发明描述了能通过与粒子的相互作用排除一个或多个样品成分的粒子。本发明也描述了这些粒子在不同分离和分析应用中的用途。

术语“分离和分析综合系统（integrated separation and analysis system）”指的是分离系统和分析系统，其中几个元件有效连接，从而促使产生单一过程的系统。

术语“质量敏感检测器”指能分析、检测或分离涉及质量、电荷或它们的结合的离子或分子的装置。

术语“质量分析器”指分析或分离涉及质量或电荷的离子或分子的装置。因此，质量分析器是质量敏感检测器的一部分。

术语“电离源”指能由分子或离子形成离子的装置。

术语“角度电离源”指处于从传输系统出口到质量分析器入口的可测量角度的电离源。

术语“检测器”指质量敏感检测器中存在的检测器。此检测器记录或探测离子和分子。

术语“固相”指粒子基固体材料。

术语“流动固相”描述了固相是可流动的，即它能在传输流体中移动或被传输流体携带。

关于流动相的术语“静止”和“固定”可互换使用。

术语“传输流体”指一种通过传输系统的流体或超临界流体。含有样品成分样品和流动固相能通过传输系统被传输和/或移入传输流体中。

术语“传输系统”指用来传输传输流体和/或流动固相和/或样品成分到、

通过或进入质量敏感检测器的设备或装置。

术语“选择器”指对一个或多个样品成分具有选择性的单元。

术语“在线”指传输系统中的一系列事件。

术语“离线”指传输系统之外的一系列事件。

术语“定性分离和/或分析”指为了根据它们的特性识别样品中的一个或多个样品成分而进行的分离和/或分析。

术语“样品成分”指样品成分中的一种。术语“分析物”指待分离和/或检测的样品成分。

分离和分析系统

所有的色谱技术依赖于流动相（传输流体）和固定相之间特性的差异，为了促使固定相和样品成分间的相互作用。但是随着使用流动固定相（moving stationary phase）技术的应用，这可能产生问题，因为这种差异将导致固定相在传输流体中不稳定。例如，当粒子用做流动固定相时，这种不稳定性将使流动固定相絮凝或聚集（粒子间的特性相同）和沉降。为了产生固定相的稳定悬浮，粒子需要拥有和传输流体相似的特性。这与传统的用于色谱的流动固定相的理论相悖：为了进行色谱法，固定相和传输流体之间的特点应该有不同，但是与此同时，固定相需要和传输流体拥有类似的特点来形成稳定悬浮。这个悖论被我们的发明解决。我们的粒子有具有与传输流体的特点不一样（例如，核是疏水的而传输流体是含水的）的核，但是此核具有和传输流体相似的特性（例如，亲水涂层和含水传输流体）的涂层。这使得能在传输流体中形成稳定悬浮，但是仍然和能穿透涂层的样品成分相互作用的粒子。

至于用压缩柱的传统色谱法，为了促使与样品成分的相互作用，流动固相应和传输流体（流动相）的特性不一样。这样的结果是在传输流体中产生流动固相的稳定浆液时存在问题。稳定浆液意味着没有或很少发生絮凝、

聚集或沉降。例如，如果系统用于相反相分离，流动固相是疏水的，则传输流体是亲水的。传输流体浆液中粒子的稳定性将会受限，由于疏水效应造成的流动固相絮凝、聚集或沉降。传输流体浆液中稳定性不良的流动固定相的结果是分离和分析能发生的条件非常有限。由于流动固相和传输流体间特性的巨大不同产生的另一个问题是一些样品成分能和流动固相发生极其强烈的相互作用。如此强烈的相互作用的结果可能是导致非常不良色谱的慢的相互作用动力学。这种相互作用的例子是蛋白质和其它生物或合成聚合物通过多点相互作用与疏水性/离子交换基团的相互作用。

根据本发明的一种实施方式，本发明所使用的流动固相由含有至少两种不同材料的粒子组成。粒子的内部称为核，而粒子的外部称为涂层。样品成分可以与核和涂层相互作用。此粒子由不用表面活性剂和乳液稳定剂制得的粒子制成，因此将这些粒子改性以在表面产生化学特性，用于偶联涂层到粒子表面来形成粒子。核粒子的化学功能在核粒子的合成过程中引入。通过对合成方案的优化，可以通过一步法获得涂覆的核粒子。粒子的尺寸应该使在传输流体中，粒子不会因为重力而沉淀。粒子的典型尺寸是大约 1 纳米到大约 10 微米。粒子变得越大，沉淀的问题越大。为了达到最好的分离，优选的尺寸为大约 20 纳米以下，或大于 20 纳米，以在测验之前简化粒子从样品成分中的分离。

在一种实施方式中，并不是所有的功能都可用于偶联涂层。

粒子的涂层应该促进传输流体中粒子浆液的稳定。粒子的特性应该是它们在传输流体中不会絮凝、聚集或沉淀。

因此，在一种实施方式中，涂层具有接近那些传输流体的化学特性。

在另一种实施方式中，涂层具有促进粒子间排斥力的特性。通过静电斥力、空间效应、溶解效应或它们的结合，涂层能够稳定传输流体中的粒子浆液。

通过形成具有电离功能或拥有恒定电荷功能的涂层可产生静电斥力。粒子能避免由类似电荷粒子间排斥力（columbic repulsion）产生的絮凝。

传输流体浆液中粒子的稳定性也可以通过使用链间或连接在核粒子表面聚合物间的空间斥力形成。空间斥力是由于熵损失（loss of entropy）造成的，当两个分子彼此接近时产生熵损失。熵损失是由于彼此接近的分子的阻碍运动和缺少形态自由造成的。空间斥力可以通过使用链状分子、线性聚合物或支化聚合物共价涂覆核来实现。当两个粒子的表面彼此接近时，连接到该两个表面的链彼此接近并损失熵。结果是粒子彼此分开。

传输流体浆液中的粒子能通过溶解效应而稳定，意味着周围传输流体拥有和粒子涂层非常相近的特性。这意味着粒子表面和周围液体的化学特性没有或几乎没有差异。流体不能将自身和粒子区分开。那么将没有动力来将粒子从周围传输流体溶液中排出，这样不会发生絮凝或聚集。这些特性可以基于亲水性、疏水性或其它参数例如静电或它们的结合。

传输流体浆液中的粒子的稳定性也基于混合类型稳定性。具有混合类型稳定性意味着静电、空间或溶解效应的任意结合。

在此系统的另一种实施方式中，粒子是多孔的。多孔粒子具有较大的表面积，因此使用它们的分离系统将具有更大的样品容量。而且，多孔粒子也能用于尺寸排除分离。

在此系统的另一种实施方式中，粒子是高度交联的。高度交联粒子比低交联度的粒子更加机械稳定。这在处理这些粒子时是有益的。

在此系统的另一种实施方式中，粒子具有低交联度。低交联度的粒子对于样品成分具有更高的可及性（accessibility），因为它们能扩散到低交联区。这样相对于更高度交联的粒子，这些粒子的容量和质量传输都能得到改进。

因此，在系统的另一种实施方式中，0-100 摩尔%例如 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100

摩尔%的单体是交联单体。不同的交联度对于系统的不同应用以及不同单体和交联单体以及它们的不同组合是有益的。

在系统的另一种实施方式中，交联单体有 2、3、4 或 5 个能在聚合过程中发生反应的乙烯基。交联单体乙烯基的数量决定了单体生成链的数量。此参数能影响粒子的尺寸、形状和形态。

在此系统的另一种实施方式中，粒子是无孔的。无孔粒子在分析大样品成分时是有益的。从传输流体到多孔粒子内部的大分子质量传输可能非常慢，导致色谱效应不好。这种色谱效应通过使用阻碍此类型扩散的粒子即无孔粒子可以立即得到极大的提高。

在另一种实施方式中，关于一些样品成分粒子是无孔的，对于另一些样品成分粒子是多孔的。这意味着只有选择尺寸的样品成分能扩散到粒子中，而其它较大样品成分被阻碍进入粒子的内部。

在另一种实施方式中，粒子对于一些样品成分是非渗透性的，而对于另一些样品成分是渗透性的。这意味着只有具有选择特性的样品成分能扩散到粒子中，而其它特性的样品成分被阻碍进入粒子的内部。

在此系统的另一种实施方式中，粒子可以是阳离子也可以是阴离子。阳离子粒子能用于阴离子的阴离子交换分离，也可以用于其中吸收和与阳离子样品成分的离子相互作用应该避免的分离。阴离子粒子可以用于分离阳离子样品成分，和用于其中吸收和与阴离子样品成分的相互作用应该避免的分离。

在此系统的另一种实施方式中，粒子是电中性的。中性粒子能用于其中离子相互作用应该避免的分离。

此系统的另一种实施方式中，粒子是两性离子或含有阳离子和阴离子基团。这些粒子能用于使用阳离子和阴离子交换分离的分离，和用于具有配位电荷（complex charge）的样品成分的分离。

此系统的另一种实施方式中，粒子为大约 1 纳米和大约 20 纳米。更小的粒子有益于提高内部粒子质量传输。粒子越小，质量传输越有效。

此系统的另一种实施方式中，正如前面提到的，粒子为大约 20 纳米和大约 10 微米。更大粒子尺寸的选择能通过产量参数和系统要求激发。较大粒子可能具备流动通孔，即贯穿粒子的孔，通过该孔，传输流体能流动，而不仅仅是扩散。此粒子可以用于分离大成分如细胞、细胞器 (organelle) 等的这些应用中。

此系统的另一种实施方式中，粒子的质荷比 (m/z) 是不同的，例如，大于至少一个分析物的质荷比 (m/z)。

此系统的另一种实施方式中，根据分析物或兴趣分析物选择粒子尺寸。即，粒子应当基本大于一个或多个分析物。

此系统的另一种实施方式中，根据兴趣分析物和一个或多个样品成分来选择粒子尺寸，即，粒子应该足够的小，以给出足够的分离样品成分。

此系统的另一种实施方式中，粒子的表面涂料的特性是多克隆的 (polyclonal)。多克隆性可能是产生粒子上具有多克隆表面特性的制备步骤的结果。而且，在一些系统中，例如，为了研究或模仿多克隆系统，多克隆性是有益的。

此系统的另一种实施方式中，粒子的表面涂料的特性是单克隆的。对绝大多数分离系统而言，粒子表面的单克隆性优于多克隆性，由于样品成分连接到粒子的位点能的分布窄得多，产生更窄的样品成分区域 (更高效)，因此更易分离。

在此系统的另一种实施方式中，粒子具有均相表面涂层。均相表面涂层在系统中有益，因为容易描述系统，并因为能降低产生多克隆性的风险，当这不能保证的时候。均相表面涂层可以含有多于一个官能团 (functionalities)，只要该官能团随机分布，并且至少这些官能团之一在与样品成分、传输流体

和/或其它粒子间的相互作用方面领先。

在此系统的另一种实施方式中，粒子具有多相表面涂层。多相表面涂层允许与样品成分的很多不同类型的相互作用，以及许多使粒子在传输流体中悬浮稳定的不同方式。这样，粒子可用于更广泛的分离，例如，不同分离类型和不同的样品和样品成分范围。而且，传输流体组成和类型可能更不一样，使相互作用类型和强度大大变化。多相表面涂层有很多不同的、可能或不可能随机分布的化学官能团。这些官能团的一种以上可能和样品成分、传输流体和其它粒子相互作用。

在此系统的另一种实施方式中，粒子涂层的部分是均相的，但是该涂层的不同部分可以不同。所述部分含有一个或多个官能团，该官能团可能在所述表面部分随机分布。不同部分可能与样品成分、传输流体或其它粒子发生不同的相互作用。在此系统的另一种实施方式中，粒子是单分散的。单分散的粒子有利于产生均相系统。对于样品成分进入粒子的扩散或流道长度将相同，而与样品成分遇到哪个粒子无关。多分散的结果是质量传输限制分布，导致分离效率降低（更宽的样品成分带）。结果，单分散粒子可能产生更高的分离效率。此系统的另一种实施方式中，粒子是多分散的。多分散的粒子可能是生产方法的结果。此粒子的其它特性，例如和分析物的相互作用等仍然可能激发它们在分离系统中的使用。

此系统的另一种实施方式中，混合粒子被使用。这样有不同核、不同涂层、不同尺寸、不同多孔性等的粒子的混合可以用来创建能处理一个分析中的几个不同类型的分离的系统。

对于一些样品成分，粒子的核可能是惰性的，但和其它的样品成分可能相互作用。

核的性质对于在检测前从样品成分中最终分离粒子来说可能是重要的。

在系统的一种实施方式中，使用沉淀聚合合成粒子的核。在表面活性剂

自由过程中沉淀聚合产生核粒子。由于从产品中除去表面活性剂很困难，因此制备中应该避免表面活性剂。而且，由于电喷中电离的减弱，粒子上存有的少量表面活性剂将极大地降低测试系统中样品成分的信号强度。

在系统的另一种实施方式中，使用表面活性剂或乳胶稳定剂无乳化剂聚合（emulsion stabilizer free emulsion polymerisation）合成粒子的核。用这种方法形成稳定的分子，由于自由基引发剂和存在于分散相中的单体之间的相互作用。择一地，稳定分子可被直接加入系统中。这些稳定分子然后被混合例如共价结合到产生的粒子中。因此粒子能被产生，并不含有任何自由稳定表面活性分子（free stable surface active molecule）。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核是由石墨或氧化钛制成的。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核是由氧化铝（铝的氧化物）制成的。在碱性液体中，氧化铝具有比二氧化硅更高的稳定性。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核是由琼脂糖制成的。交联琼脂糖经常在传统的亲和性色谱分析和凝胶色谱分析中使用。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核与至少一个样品成分相互作用。此核的特性可能被设计，旨在赋予其特性，该特性使它和不同分析物最理想或最不理想地相互作用。在此系统的另一种实施方式中，核的尺寸根据待检测的样品成分进行选择，即基本不同，例如，较大，以在检测前提高粒子从样品成分中的分离。

在此系统的另一种实施方式中，选择核的质荷比，即使之与待检测的样品组分基本不同，例如，更大，以在检测前提高粒子从样品成分中的分离。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核并不和样品的全部成分相互作用。在一些分离系统中，核和样品成分的一些但不是和全部发生相互作用。这样，样品成分的一些就不会彼此分离，但是和全部相互作用的样品成分分离。这个安排可能在样品清理程序中有用。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核的表面含有来自单体、自由基引发剂或其它在核的合成期间或者合成后使用的单体的磷酸盐基团、磷酸、环氧化物、乙醛、羧酸、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、酯、醚和/或羟基。单体或自由基引发剂也能为粒子的核的表面提供能与试剂反应产生其它官能团的官能团。此过程也能在多步中在多个不同的官能团上进行。这些不同的表面基团能被用于将涂料偶联到粒子的核上，来稳定在传输流体中的粒子，促进粒子的核或表面涂层的制备，或产生和样品成分的相互作用。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核含有由一个或多个下面的单体聚合得到的疏水性聚合物：甲基丙烯酸酯、乙烯基吡啶、丙烯酸酯、苯乙烯、二乙烯基苯或硅烷。此粒子的疏水核在反相分离中是有用的，在所述反相分离中，分离基于样品成分和粒子的相互作用，取决于样品成分的疏水性。粒子的核中的聚合物类型的不同使得粒子具有不同的特点，例如尺寸、多孔性、形态和样品成分之间的相互作用。

在此系统的一种实施方式中，粒子的核含有由一个或多个由下面单体聚合而成的亲水性聚合物：甲基丙烯酸酯、乙烯基吡啶、丙烯酸酯、苯乙烯、二乙烯基苯或硅烷。取决于例如它们的亲水性，例如具有一些极性官能团的亲水性物质，亲水性核在分离样品成分系统中是有用的。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的核是非手性的或手性的。手性核在其中手性样品成分应该被分离的应用中是有用的。对于其它类型的分离，例如，对于非手性样品成分的分离，并不需要手性核。

在此系统的另一种实施方式中，手性核能和手性样品成分相互作用。这些相互作用是手性分离的基础。

在此系统的另一种实施方式中，手性核能和非手性样品成分相互作用。这些相互作用可能是样品成分特定或基团特定，产生具有广泛选择性的分离。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的手性核是由手性单体产生的。从手性单体产生粒子的核使得一步法产生粒子的手性核，从制备的角度看这是有益的。而且，如此合成的反应产率很可能比多步反应的更高。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的手性核是由非手性单体得到的。通过在粒子核的制备过程中使用手性分子或溶剂，无需手性单体即可制得粒子的手性核。这对在没有发现合适的手性单体的系统的情况中是有益的。

在此系统的另一种实施方式中，通过和手性试剂反应将粒子的核制成手性。手性试剂可以是阴离子、阳离子、中性、两性离子或带电荷的分子或聚合物。可能是蛋白质、大环抗生素、环糊精、冠醚、氨基酸、合成分子、聚冠醚、多肽和/或聚环糊精。

粒子的涂层对使粒子稳定悬浮在传输流体中是重要的。涂层可能是惰性的或者能和样品成分相互作用。涂层也能限制一些类型的分子或样品成分进入粒子的核。

在此系统的一种实施方式中，涂层和至少一个样品成分相互作用。涂层可以和样品成分相互作用来产生分离，或者能和样品成分相互作用来阻碍它们进入粒子的核。当分离非常慢地扩散到粒子的核或从粒子的核非常慢地扩散出的大分子时，和涂层的相互作用是有益的。

在此系统的另一种实施方式中，涂层并没有和样品成分相互作用。可能只是为了使粒子稳定悬浮在传输流体中而合成涂层。因为它只有一个任务即稳定粒子悬浮，因此这种涂层的合成被简化了。

在此系统的另一种实施方式中，使用酸性氯化物调整反应 (acid chloride mediated reaction)、碳二亚胺调整反应、EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺)调整反应、酯交换、醛基调整反应、还原氨基化、共价结合到活化胺、共价结合到活化羧酸基等使涂层聚合物和粒子的核的表面共价结合。基于待固定的涂层类型，可以使用不同的固定模式。

在此系统的另一种实施方式中，涂层聚合物和粒子表面的官能团共价结合，所述官能团来源于用于引发聚合反应的自由基引发剂。

在此系统的另一种实施方式中，涂层聚合物和粒子表面的官能团共价结合，所述官能团来源于单体。

在此系统的另一种实施方式中，涂层含有亲水性聚合物，例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯亚胺。和疏水性粒子的核结合的亲水性聚合物对于反相应用是有用的，因为它们能够使粒子稳定悬浮在极性传输流体中。

在此系统的另一种实施方式中，涂层含有固定到核粒子上的小分子。小分子的分子量在 10 克/摩尔到 10000 克/摩尔范围内。小分子应该有一个或多个以下官能团：酯、醚、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、环氧化物、硫酸、磺酸、羧酸、羟基、磷酸根（phosphate group）、膦酸、酰胺。小分子也可以是烃或氟代烃。小的极性分子可以通过被高回收（recovery）固定来稳定如粒子的疏水性核，产生高表面覆盖度。彼此强烈排斥的小分子，例如，磺酸等，也能够以较低覆盖度使用。在疏水性介质中，小的疏水分子也能用于稳定粒子的亲水核。

在此系统的另一种实施方式中，涂层聚合物为直链、支化、交替共聚物、嵌段共聚物，含有一个或多个以下官能团：酯、醚、磷酸根、膦酸、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、环氧化物、羧酸、磺酸和羟基。

在此系统的另一种实施方式中，涂层可能含有一个或多个下述基团：大分子、蛋白质、脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）、纤维素、淀粉、再生纤维、改性淀粉、改性纤维。这些中的一些自然产生的聚合物和分子与生物样品具有相容性。

在此系统的另一种实施方式中，粒子的表面涂层是手性或非手性的。当传输流体和粒子的特性没有必要差异大时，手性涂层对于手性分子的分离是有用的。对于涉及非手性样品成分的分离，手性涂层能引入选择性相互反应

的基团或物质。在此系统的另一种实施方式中，通过可以是阴离子、阳离子、中性、两性离子或带电的手性分子或手性聚合物与表面涂层之间的反应，将粒子的涂层制成手性。涂层本身也可以是手性的。可以使用的手性分子或聚合物为蛋白质、大环抗生素、环糊精、冠醚、氨基酸、合成分子、多冠醚、多肽和/或聚环糊精。

粒子在电解液中悬浮的稳定性被不同的机制控制。促进其浆料在传输流体中的稳定性的粒子的特性与涂层有关，并选择性地与粒子的核有关。

在此系统的一种实施方式中，传输流体浆液中粒子的稳定性被粒子间的静电斥力控制。由于在涂层上以及可选择性的在粒子的核表面上或者粒子的核中存在阴离子基团或者在涂层上存在阳离子基团，可能产生静电斥力，所述阴离子来源于一个或几个下述基团：磺酸、磷酸、膦酸、羧酸，所述阳离子来源于一个或几个下述基团：伯胺、仲胺、叔胺和/或季铵。

在此系统的另一种实施方式中，传输流体浆液中粒子的稳定性被粒子间空间斥力控制。由于作为涂层的聚合链的存在，可能在核粒子表面形成粒子间空间斥力。这些聚合物链可以是阴离子的、阳离子的、中性的、带电的或中性的。离子涂层可能在排除具有与涂层相同的电荷的带电样品成分进入粒子的核时有用。这个排除机制作为一体化样品清理步骤是有用的。

在此系统的另一种实施方式中，传输流体中粒子浆液的稳定性由传输流体粒子的溶解性控制，这可能是由于粒子表面涂层和传输流体间的极性相似性，也可能是由于粒子的小尺寸。这种涂层在其中核应该进入样品中所有的样品成分的分离中很有用。之后就不能在传输流体相和涂料之间区分样品成分，这样应该限制对粒子核的传质限制。

此发明的一种实施方式是具有带电疏水核和中性亲水表面的粒子基于离子-离子相互作用色谱（离子交换色谱法）和/或疏水效应（相反相或疏水相互作用色谱法）用于分离样品成分的用途。首先，粒子应该带有电荷，为

了使它们有不同于传输流体的迁移率（这对于中性样品成分的分离是很重要的）。充电的样品成分能和粒子核上的电荷相互作用，并依赖于相互作用的强度能被分开。只有电荷与核上电荷相反的样品成分才能和粒子发生积极的相互作用。具有和核相同电荷的样品成分与粒子相互排斥。有正电荷和负电荷的样品成分也能和核相互作用。除了这些，样品成分和粒子间的相互作用也可能被样品成分和核或粒子涂覆间的疏水效应（也指疏水相互作用）控制。因此由于离子-离子间相互作用或疏水性相互作用或它们的组合（混合模式保留），出现了样品成分的分离。基于离子互换和/或疏水效应的分离是所有分离中绝大多数的，因此此种粒子在大多数分离中是有用的。

此发明的另一种实施方式是具有中性疏水核和带电亲水表面的粒子的使用。根据与上面直接描述的实施方式类似的解释，这样的固定流动相也能通过样品成分和粒子间的离子相互作用和/或疏水相互作用分离样品成分。

此发明的一种实施方式是通过使用具有在手性聚合物或具有手性涂层的粒子中制得的核的粒子分离具有不同手性例如对映体的样品成分。例如，人体是由手性筑块（chiral building blocks）（分子）构成，因此人体将和分子的两个对映体形式产生不同的反应。这在制药业和研究中这是极为重要的，因为分子的一个对映体形式将作为人体的药物起作用，而另一种形式对身体有毒。因此手性分离在制药业生产线和研究实验室中是至关重要的。

此发明的另一种实施方式是样品成分从复杂基质样品（例如，但不限于，血、血浆、尿、沉积物（sediment）或组织样品）中的分离和分析。分离柱中新粒子的持续再填充将确保固定相或准固定相的污染物不影响下一次分离。每个样品输入是在未使用的固定流动相上进行的。

本发明的另一种实施方式是通过使用具有与样品基质分子作用多于与其它样品分子的表面或核的粒子从复杂基质样品中分离和分析样品成分。因此，基质分子将通过流动固定相首先在分离中保留，这样在分析中避免和阻

碍与其它样品分子的干扰。这种实施方式和样品纯化技术的应用有关，所述样品纯化是目前分析化学的一个重要部分。

在本发明的另一种实施方式中，通过使用角度电喷射电离界面，粒子被阻碍进入质谱仪。该角度能够在 1 度至 359 度范围内变化。

在本发明的另一种实施方式中，通过使用在分离系统和质谱仪间的直角电喷射界面，粒子被排除进入质谱仪。

根据本发明的另一种实施方式，通过使用渗析粒子被排除进入监测器或质谱仪。

在本发明的一种实施方式中，通过使用分离系统和质谱仪间的高场反对称波形离子移动分光术 (FAIMS) 界面，粒子被排除进入监测器或质谱仪。

通过在色谱分离中使用粒子作为移动流动相，为了从粒子中监测，色谱分离遵循分离兴趣分析物的需要。在质量分光检测中，试图阻止粒子进入质谱仪是非常重要的，因为粒子导致污染和增加噪音。我们的实施方式之一是使用角度电喷质谱仪 (ESI-MS)，例如，直角 ESI-MS。在分离系统和质谱仪之间的这种界面中，粒子经常被鞘流液 (liquid sheath-flow) 和雾化气 (nebulizing gas) 帮助，以与样品成分方向不同的方向 (样品成分朝着质谱仪入口的方向) 电喷出。因此，粒子和分析物间的特性很不相同，通过这种方式，一种或多种分析物和粒子相分离，这对于持续满填充技术是很必要的。作用于离开分析系统的样品的力，是本研究很感兴趣的，也是 (i) 来自雾状气体的力和 (2) 在分离系统出口和质谱仪入口间电压不同产生的作用于带电样品上的电力。大样品比小样品受到更大程度的雾状气体流影响，重样品并不如轻样品被电场这样影响 (和轻样品相比加速重样品需要更大的力)。而且，样品含有的净电荷越多，电场的影响将越大。结果，含有较少净电荷的又大又重的样品并不如具有大量净电荷的又小又轻的样品那么容易被传至质谱仪入口。也就是说，是质荷比 (m/z) 定义样品如何被影响的。这在

从粒子中分离分析物是非常重要的。为了用流动固定相成功分离，要分析的分析物需要有比粒子更小的 m/z 。对于预测或决定粒子的尺寸(例如通过扫描电子显微镜)和然后使用它们的密度算出粒子质量是可能的。分析物的质量应该被决定，例如通过分子式或通过质谱仪研究。电荷依赖于样品上的化学基团和电喷离子步骤。例如鞘流液的 pH 值和传输流体能极大地影响样品上电荷的数量和质谱仪参数的设置。而且，操作者控制之外的任意过程影响了样品上的电荷。而且，雾状气体的参数例如压强和容积流，对于从粒子中分离样品成分有很大的影响。这意味着这种分离系统的使用者很可能协调系统。对于绝大多数分析，粒子将有远远大于样品中的分析物的尺寸和 m/z ，因而在分离中具有大的分离度。但是当非常的小粒子和非常大的样品分子一起使用时，必须注意。使用这些讨论，作为流动固定相使用的粒子能被定义为如下：粒子的 m/z 应该不同于（更大）将要在质谱仪中检测的样品成分的 m/z ，因此通过角度 ESI-MS 界面的分离机制可以分离。

实施例

实施例 1

MilliQ 水(MQ)用 MilliQ 系统 (Millipore, Bedford, MA, USA) 净化。丙酮、醋酸铵、甲酸铵和醋酸来自于 Merck, Darmstadt, Germany。过硫酸钠、苯乙烯和 DVB 由 Polymer Chemistry, Lund University 捐赠。邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯来源于 SigmaALDrich, St. Louise, MO, USA。邻苯二甲酸二丙酯和碳酸铵来自 ALdrich, Gillingham, UK。乙腈来自 Merck, Hohenbrunn, Germany，甲基丙烯酸月桂酯(LMA)来自于 Fluka, Buchs, Germany，氮气来自 AGA, Sundbyberg, Sweden，蚁酸来自 Riedel-de Haen, Seelze, Switzerland。

在圆底烧瓶中将自由基引发剂(过硫酸钠)(15 毫克和 6 毫克)溶解在水中

(A 9.6 毫升和 B 5.9 毫升)。加入单体(DVB (A 16.7 微升和 B 6.7 微升)、LMA(A 250 微升和 B 100 微升)、苯乙烯(A 250 微升和 B 100 微升)和和共溶剂(丙酮(A 0 微升或 B 3.9 毫升)), 并将溶液超声处理一分钟, 通过氮气流脱气五分钟。然后将烧瓶和李比希 (Libig) 冷却器相连, 在氮气氛围中在搅动条件下在 60°C (A) 或 90°C (B) 进行聚合反应四小时。通过渗析使用模缝脊为 8-12.000Da 的再生纤维素薄膜(Spectrum Europe B.V. Breda, Netherlands)将获得的粒子悬浮液从剩余的引发剂、单体和小的低聚物中纯化出来, 使用连续的去离子水流进行 72 小时。纯化的粒子悬浮液被储存在 8°C 的玻璃试管中, 直到使用时。

通过使用传输电子显微镜 (TEM) (JEOL 3000F 场放射传输电子显微镜, JEOL, Tokyo, Japan) 或者使用配有 AxioCam MR.5 计算机控制照相机(Carl Zeiss AG, Gottingen, 德国)的 Car Zeiss Axio Imager M1m 的光学显微镜。

毛细管电色谱法

CFF-CEC 实验是在具有用于数据处理的 Chem Station 软件(V.B01.03)的 HP^{3D} CE 系统上完成的(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)。得自 Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA)的熔凝硅石毛细管(87 厘米, 50 微米 i.d., 375 微米 o.d.)用于所有实验。电解液由 50 毫摩尔/升 pH 为 8.2 的碳酸铵和 0 到 40%(体积/体积)的乙腈制得。在 CFF-CEC 实验中使用的电解液悬浮液中粒子的含量是 3.8 毫克/毫升在 50 毫摩尔/升碳酸铵 pH 为 8.2 和 0 到 40%(体积/体积)的乙腈。分离是在 20KV (230 伏/厘米)在环境温度下进行。在当日的第一个分析之前, 所有的溶液和粒子悬浮液通过超声脱气大约 10 分钟。在每次分析之前, 用 0.1 摩尔/升的氢氧化铵 (1 分钟在 1 巴)、水 (1 分钟在 1 巴) 和电解液 (2 分钟在 1 巴) 冲洗毛细管。最后, 用粒子悬浮液填充和调节毛细管 (2 分钟在 1 巴)。

制备邻苯二甲酸二甲酯(24.2 克/升; 0.125 摩尔/升)、邻苯二甲酸二乙酯(21.89 克/升; 0.098 摩尔/升)、邻苯二甲酸二丙酯(20.6 克/升; 0.0825 摩尔/升)和 DMSO(66 克/升; 0.85 摩尔/升)在甲醇中的原料样品溶液。此原料溶液用水稀释(1:1000 体积/体积), 得到 125 微摩尔/升的邻苯二甲酸二甲酯、98 微摩尔/升的邻苯二甲酸二乙酯、82.5 微摩尔/升的邻苯二甲酸二丙酯和 850 微摩尔/升的 DMSO 的样品溶液。在 5 秒钟内在 50 巴下流体力学地注入样品。制备柳丁氨醇、苯海拉明和咪唑各自以 1 毫克/毫升在甲醇中的原料样品溶液。分析前, 用电解液将此原料溶液稀释至所需的浓度。

质谱分析

在装备有以正电离方式操作的直角 ESI 界面的安捷伦科技 (Agilent Technologies) LC/MSD 离子阱 SL 质谱仪上进行检测。电喷电压为 4 千伏(毛细管的出口维持在地面电位 (ground potential))。将由 0.5% (体积/体积) 在水中的甲酸和甲醇 (1/1 体积/体积) 组成的鞘流液通过 Agilent Technologies 系列 1100 四元泵以 0.120 毫升/分钟抽吸, 并且通过固定分隔板 (fixed splitter) 以 1:20 进行分流。使用 Agilent Technologies 三管同轴雾化器 (triple tube coaxial nebulizer) 将 CE 设备与 EST 界面连接。

结果和讨论

肥皂自由乳液聚合是传统乳液聚合的一个变体。乳液稳定性是由亲水引发剂、离子引发剂、亲水共单体或离子共单体的合并控制。在本研究中, 将离子水溶性引发剂过硫酸钠与疏水性单体苯乙烯和 LMA 一起使用。当这些成分在水中混合时, 产生两相系统, 其中一个为引发剂富水相, 另一个为单体相。在水相中引发剂和单体间的反应产生小的表面活性基团低聚物。使用搅拌来产生有效地俘获表面活性低聚物基团的小单体液滴。因此, 产生的低

聚物基团在水和单体相之间的界面聚集，因此乳化此系统。

获得的粒子悬浮液含有污染物，例如，未反应的或分解的自由基引发剂和单体和无机阳离子（例如，来自自由基引发剂的 Na^+ ），它们潜在地可能对分离和检测产生负面效应。针对去离子水的连续流、使用高截留分子量膜的渗析被用来纯化。

第一个粒子（A）的平均直径为 910 纳米（相对标准偏差（RSD）为 19%， $n=89$ ）。用低总体单体含量、高聚合温度和作为共溶剂的丙酮制备的粒子（B）的平均直径为 157 纳米（SSD 是 22%， $n=60$ ）。粒子（A 和 B）具有由苯乙烯和 LMA 组成的疏水核以及含有强的阳离子交换硫酸根的亲水表面。

电解液中乙腈的含量在 0 到 40% 间变化（体积/体积），并且研究了乙腈浓度对保留因子（ k' ）、溶解度（ R_s ）和效率（ N ）的影响，就像图 1 所显示的。直线的斜率遵循和分析物的对数 P 值相同的顺序，邻苯二甲酸二丙酯最高，紧跟着的是邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯。

从图 1 也可以看出，溶解度随乙腈含量降低以指数方式增长，这有望于 RP 分离。邻苯二甲酸酯的 RP-CFF-CEC 分离在图 2 中显示。

本研究中所使用的粒子有高的负移动，导致宽的迁移时窗（在未保留 EOF 标记物洗脱和粒子洗脱之间的时间）。因为高的分离效度和宽的迁移时窗，此技术的峰-容量很好，潜在能溶解超过 100 个峰。

对粒子对于分析物信号和基线噪音的影响进行了简单研究。基线噪音和分析物信号都没有受太大的影响，当粒子含量提高一倍（从 3.6 到 7.2 毫克/毫升）时。这个效应是由于粒子从直角电喷界面的分析物中的有效分离。

粒子有强的阳离子交换表面，使它们能够用作强离子交换吸附剂。三个模型复合物，短效的 β_2 肾上腺素受体拮抗剂柳丁氨醇、抗阻胺药苯海拉明和芳香咪唑，被用于研究 IE-CFF-CEC 中粒子的用途。分析物的碱性对于柳丁氨醇是最高的（ $\text{pK}_a=9.22 \pm 0.47$ ），其次是苯海拉明（ $\text{pK}_a=8.76 \pm 0.28$ ）和咪唑

($pK_a=7.18 \pm 0.61$)。分析物的亲水性遵循下述顺序：苯海拉明($\log P=3.662 \pm 0.369$)、柳丁氨醇($\log P=0.015 \pm 0.301$)和咪唑($\log P=0.161 \pm 0.241$)。使用 Advanced Chemistry Development Software V8.14 (ACDLabs, Toronto, 加拿大) 计算该值。

最初的研究发现苯海拉明被最强地保留下来，接下来是苯海拉明和咪唑。因此保留遵循分析物的疏水性。

图 3 显示了胺的 CE 分离和 CFF-CEC 分离。显然 CFF-CEC 分离已经改变了和 CE 分离相比的洗脱顺序。苯海拉明被最强地保留下来，因此没有被检测到。从图 3 还可见基线噪音和分析物信号都没有很大地受粒子存在的影响。为了调查疏水性对保留的影响，通过改变粒子悬浮液中乙腈的浓度而进行了一系列的分离。然而，在 40% 乙腈时检测到苯海拉明，虽然苯海拉明被很强地保留。用 CFF-CEC 的胺的分离很可能由于混合方式保留机制，加上离子相互作用和疏水效应的贡献。

也可以发现， k' 不随电解液 pH 发生明显变化。对于邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯和邻苯二甲酸二丙酯， k' 与 pH 函数回归线的斜率各自为 0.0005、0.0002 和 0.0027。对于邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯和邻苯二甲酸二丙酯， k' 在不同 pH 下的相对标准偏差 (RSDs) 各自为 8.5%、2.8% 和 5.3%。这些结果显示获得了在上述研究范围内不取决于 pH 的优秀的 RP 保留和悬浮液稳定性。对于悬浮物是稳定情况下的宽 pH 范围使此技术既适用于具有高 pK_a 值的 RP 分析物的分离，也适用于具有低 pK_a 值的 RP 分析物的分离。

为了进一步测试粒子悬浮液的稳定性，分离进行超过九小时。新近制备的悬浮液在时间 0 进行超声处理。在这个时间段，没有看到 k' 的大的变化 (图 4)。对于 k' 的 RSDs 是 7.4% (邻苯二甲酸二甲酯)、6.0% (邻苯二甲酸二乙酯) 和 7.0% (邻苯二甲酸二丙酯)。选择时间段来提高正常工作日对

于 CFF-CEC 的使用。

制备 3 批相同的粒子 (A)。各批之间没有显著差异 (95% 置信区间)。对于研究的邻苯二甲酸酯, 3 批之间的 k' 的 RSD 在 3% 和 11% 间变化, 仅稍高于在 6.0% 和 7.4% 之间变化的重复性。商业 RP-HPLC 柱的再生能力一般较低, 大约为 2-4%。

为了研究样品的负载容量, 注入 6 种浓度在 10 微摩尔/升到 1 毫摩尔/升间变化的分析物溶液, 计算邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯在 10% 峰高所得的峰值不对称因子。发现邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯的不对称因子是在理想的 1 甚至高达 0.5 毫摩尔/升附近, 当样品含量接近 1 毫摩尔/升 (注入的最高含量) 时, 不对称因子达到约 1.5, 这对于量化目标仍然是可以接受的。图 5 说明了对于 10 微摩尔/升和 1 毫摩尔/升样品含量获得的电色谱 (含量增加 1000%)。这些结果表明 CFF-CEC 技术能被有效地用于非常宽含量范围的量化目标。在最低研究样品含量获得的数据 (10 微摩尔), 对于邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丙酯, LOD 计算值各自为约 0.7、1.1 和 0.9 微摩尔。作为评估, 将 5 纳升样品注入 50 微升 i.d. 毛细管中, 导致注入量的 LOD 为约 3、5 和 4 fmol。在信噪比 (S/Ns) 为 2 时计算 LOD。在最低研究含量下, 获得很好的分离率, 对于邻苯二甲酸二甲酯为超出 1.1 百万理论塔板/米。

总结为基于 CFCEC-ESI-MS 使用粒子可以进行非常有效的反相和混合方式分离 (反相和离子交换)。分离能重复和再生地进行, 样品负载范围很大。直角电喷界面的使用使得与流动固定相共洗脱的分析物能够被检测出。

实施例 2

PEG-900 酯交换粒子

将甲基丙烯酸(MAA)0.109M、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯 (TRIM)

0.109M、AIBN 8 毫克和乙腈 4 毫升加入带磨口盖的硼硅酸盐玻璃试管中，用超声处理脱气 10 分钟，然后放入-26℃冷冻箱中，其中通过在 350 纳米下 UV-辐照引发聚合反应 4 小时。使用的化学物质与前面实施例中所用的具有相同的来源。因此，通过在 3000rpm 下离心 10 分钟萃取粒子，随后使用超声浴用甲醇中:乙酸(9:1, 体积/体积) 再悬浮两次，并用甲醇再悬浮一次，每次 20 分钟。

将 PEG 900 Aldrich (Gillingham, 英国) (1 毫升, 2.5 毫摩尔)加入到甲醇中的 CH_3ONa (0.5M, 1 毫升)溶液中,接着在 45℃下减压浓缩来形成碱性 PEG。粒子(5.6 毫克)被悬浮在 CH_2Cl_2 中(0.6 毫升),并在室温搅拌下加入碱性 PEG 溶液(150 微升, 0.5 M Malsaline PEG 900)。将反应进行一夜,通过在 3000rpm 离心 10 分钟萃取粒子,并在甲醇: HAc(9:1,(体积/体积))中再悬浮两次(超声处理十分钟)和在甲醇中再悬浮一次。粒子在室温下储存直到使用。分析前聚乙二醇化粒子在电解液中洗一次。

毛细管电色谱(CEC)

CEC 实验是在 $\text{HP}^{3\text{D}}$ CE 系统 (Agilent Technologies, Waldbronn, 德国) 中进行的,并使用 Chem Station 软件进行数据加工。获自 Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) 的熔凝硅石毛细管(70 厘米长, 50 微米 i.d.和 375 微米 o.d.)用于所有的实验。通过将邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丙酯和邻苯二甲酸丁酯以 0.10 毫克/毫升的浓度溶解在电解液中以及将 5-羟基多巴胺、肾上腺素、间羟异丙基肾上腺素、特布他林分别以 50 微克/毫升、30 微克/毫升、10 微克/毫升和 4 微克/毫升的浓度溶解在水中来制备样品溶液。以流体动力学法将样品注入毛细管 (5 秒, 50 毫巴) 中,分离电压是 20 千伏(286 伏/厘米)。所有的分离在环境温度下进行。分析前,所有的溶液和粒子悬浮液都通过超声处理脱气,用 0.1 摩尔/升的 NaOH (5 分钟, 1

巴)、水(5 分钟, 1 巴)和电解液(5 分钟, 1 巴)淋洗毛细管。

电解液由 10mM 乙酸铵缓冲液 pH 5.4 和浓度在 20%到 40%之间变化的乙腈组成。粒子(0.5 毫克/毫升)被悬浮在电解液中形成稳定浆液。两种不同方法被用来建立实验, 即部分填充技术和持续满填充技术(full filling technique)。在注入样品之前, 使用部分填充技术, 以流体动力学法将粒子浆液在 50 毫巴压强下注入毛细管中。填充毛细管所需的时间确定为 10 分钟, 因此用于部分填充实验的注入时间更短。持续满填充实验是通过使连续的粒子浆液经过毛细管来进行的。使用这个设置, 样品被注入填有浆液的毛细管中, 将浆液作为电解液进行分析。

质谱检测

使用装备有以正电离方式运行的直角 ESI 界面 Agilent Technologies LC/MSD 离子阱 SL 质谱仪进行检测, 扫描在 m/z 50 和 300 间, 最大离子积累时间在 50 到 75 毫秒之间, 总的离子电流(TIC)目标在 75000 到 100000 之间。由 0.1%在水中的蚁酸和甲醇(1/1 体积/体积)组成的鞘流液流通过 Agilent Technologies 系列 1100 四元泵以 0.180 毫升/分钟进行抽取, 并且通过固定分隔板以 1:30 进行分流。使用 Agilent Technologies 三极管同轴雾化器将 CE 设备连接到 EST 界面。直角界面阻止在持续慢填充分析中粒子进入质谱仪, 如图 8 所示。

结果和讨论

研究了具有低浓度有机改性剂即浓度在 20-40%之间的乙腈的电解液的疏水效应。使用的样品成分为同系列的不同邻苯二甲酸烷基酯。这些分子没有电荷, 因此将不会有任何与负电荷流动固定相的静电相互作用。为了在不同分析中将内渗透流(endosmotic flow, EOF)的差异减至最小, 保留时间

必须向 EOF 标记、DMSO D_6 的保留时间标准化。此后标准化的保留时间将在整个文章中使用。重构的离子色谱图 (RIC) 将被用于识别哪个峰和那个样品分子对应。前面已经显示样品分子的保留时间和注入毛细管中粒子的数量成比例。如图 7 所示, 用未带电样品成分进行该反相研究的情况也是如此。有趣的观察是, 当通过流动固定相时, 样品分子的信号强度并没有被影响, 如图 8 所示。

实施例 3

磺化二乙烯基苯粒子

使用前面描述的沉淀聚合协议在带有磨口盖的硼硅酸盐玻璃试管中制备粒子(参见实施例 2), 但使用二乙烯基苯 (0.109 摩尔/升)作为单体。当粒子达到它们的由于分子量增加导致的溶解度限度时, 粒子开始沉淀。聚合后通过在 3000rpm 下离心 10 分钟来萃取粒子, 随后在甲醇和乙酸溶液(9:1, 体积/体积) 中再悬浮 2 次, 和在甲醇中再悬浮 1 次。

将粒子(16 毫克)悬浮在吐温 80(10 毫克, 0.010M, 2 毫升) 水溶液中。加入 $(NH_4)_2S_2O_8$ 水溶液(0.20 毫升, 8.8 微摩尔), 并将反应混合物在 80°C 下加热 72 小时。通过在 3000rpm 离心 10 分钟来萃取衍生粒子, 接着在甲醇和 H_2O (1:1(体积/体积))溶液和甲醇中分别再悬浮(超声处理十分钟)两次和一次。将粒子在室温储存直到使用。分析前, 将粒子在电解液中洗涤一次。

毛细管电色谱(CEC)

CEC 实验是在 HP3DCE 系统(Agilent Technologies, Waldbronn, 德国)中进行的, 并用 Chem Station 软件进行数据加工。获自 Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) 的熔凝硅石毛细管(70 厘米长, 50 微米 i.d.和 375 微米 o.d.)。通过将邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丙酯和邻苯二

甲酸丁酯以 0.10 毫克/毫升的浓度溶解在电解液中来制备样品溶液。以流体动力学法将样品注入毛细管（5 秒，50mbar）中，分离电压是 20 千伏(286 伏/厘米)。所有的分离在环境温度下进行。分析前，所有的溶液和粒子悬浮液都通过超声处理脱气，用 0.1 摩尔/升的 NaOH(5 分钟，1 巴)、水（5 分钟，1 巴）和电解液（5 分钟，1 巴）淋洗毛细管。电解液由 10mM 乙酸铵缓冲液 pH5.4 和浓度在 20%到 40%之间变化的乙腈组成。

持续满填充实验是通过使连续的粒子浆液流经过毛细管来进行的。使用这个设置，样品被注入填有浆液的毛细管中，将浆液作为电解液进行分析。使用由 20% 10mM 醋酸铵 pH 5.4 和 80% 甲醇组成的电解液以及在电解液中的由 2.5 毫克/毫升磺化二乙烯基苯粒子悬浮液来评价离子交换色谱法（离子色谱法、离子-离子相互作用色谱法）中的空间效应。

质谱检测

使用装备有以正电离方式运行的直角 ESI 界面 Agilent Technologies LC/MSD 离子阱 SL 质谱仪进行检测，扫描在 m/z 50 和 300 间，最大离子积累时间在 50 到 75 毫秒之间，总的离子电流（TIC）目标在 75000 到 100000 之间。由 0.1% 在水中的蚁酸和甲醇(1: 1 体积/体积)组成的鞘流液通过 Agilent Technologies 系列 1100 四元泵以 0.180 毫升/分钟泵出，并且通过固定分隔板以 1:30 进行分流。使用 Agilent Technologies 三极管同轴雾化器将 CE 设备连接到 EST 界面。直角界面阻止在持续慢填充分析中粒子进入质谱仪。

结果和讨论

沉淀聚合草案有利于不使用稳定表面活性剂（stabilising surfactant）合成球形颗粒。由于表面活性剂降低 ESI-MS 中的信号强度，这是很重要的，因此阻止检测可能性。由于表面活性剂可能影响粒子的衍生化并将质疑是否

提高的悬浮液稳定性是由于衍生步骤，因而这种技术也是受欢迎的。通过使用高度稀释高锰酸钾溶液滴定磺化颗粒，定量确定了反应碳碳双键的转化率。使用磺化 DVB 粒子分离的各个邻苯二甲酸酯的标准化保留时间如图 9 所示。为了使不同分析的内渗透流（EOF）的差异最小化，保留时间必须向 EOF 标记、DMSO D_6 的保留时间标准化。重构的离子色谱图（RIC）将被用于识别哪个峰和那个样品分子对应。从图 9 可以看出，乙腈浓度高于 40% 时，疏水性效应消失。乙腈浓度较低的电解液中的相互作用较强。

实施例 4

脏复合样品基质

传统分离系统的一个严重的缺点是固定相的污染，特别是，来自脏样品或复合样品基质中的样品。流动固相的使用解决了这些问题。在本实施例中，通过尿样品对食物产生的致癌化合物进行量化。传统上，分析尿需要实验样品制备来除去样品基质成分，以保证固定相。在本实施例中，尿被直接注入分离柱。

材料和方法

使用悬浮在缓冲液中的具有亲水性涂层的疏水性粒子作为流动固定相。75 厘米长、内径 50 微米的毛细管用于分离。使用部分填充和持续满填充技术引入流动固定相。50 纳升用 PhIP 掺杂（spiked）到浓度为 100 微摩尔/升的尿被用作样品，并注射到负载有流动固定相的毛细管中。

尽管样品基质极端复杂和脏，致癌物 PhIP 仍被成功量化。在柱上进行了超过 100 次的注射，对分离度没有任何影响，尽管是复合基质并缺少样品前处理。如果用传统 CEC 柱或 HPLC 柱进行这些分析，柱将被样品基质分子严重污染。

实施例 5

脏复合样品基质

如实施例 4 所描述的进行实验，但是分析的是血浆（样品基质是血浆）而不是尿。根据污染的分子，血浆是比尿更复杂的基质。传统上，为了除掉污染分子，血浆的分析需要固定相萃取，但是在这个实施例中，血浆被直接注入柱中，结果很好。

实施例 6

通过使用在分离系统和检测器（质谱仪）之间的 FAIMS 界面提高检测灵敏度

迄今，使用电喷质谱仪检测的持续满填充技术已经被应用，其中电喷使用鞘流和雾化气，能促进样品成分从粒子中分离。鞘流的不足是它会稀释从柱中洗脱出的样品成分。由于与质谱仪联用的电喷电离是浓度敏感检测技术（REF），这种对样品成分的稀释使检测灵敏度下降（稀释相当于减小浓度）。为了解决这个问题，质谱仪使用者已经使用缺鞘电喷多年了（REF Finn），经常和低流动毛细管基分离技术结合。迄今，满填充技术已经依赖于鞘流液的使用(如上所述)。然而，随着分离系统和质谱仪间 FAIMS 电喷界面的使用，不需要鞘流液，因此得到更高的检测灵敏度。这将极大地提高持续满填充技术，不仅是灵敏度而且提高应用数量和样品类型。简言之，在 FAIMS 界面中，样品成分通过调整电场中的通道从流动固定相中分离。

实施例 7

使用涂覆有环状糊精惰性粒子的手性分离

传统上，通过溶解环状糊精在毛细管电泳分离系统的电解液中，将环状

糊精用于手性分离。当分析物（例如，对映体对 A 和 B）通过毛细管传输时，A 和 B 将被分离，因为它们与手性环状糊精的相互作用不同。然而，检测将遇到环状糊精分子提高背景噪音的问题。本实施例显示解决了这个问题。在我们发明的这个实施例中，环状糊精分子作为惰性粒子上的涂层被固定化。此流动固相的惰性核确保快速质量迁移，因为 A 和 B 仅仅和环状糊精涂层相互作用，并不是和粒子核。对于此系统，增加的背景噪音将不是问题，因为在检测前，粒子从分析物（A 和 B）中分离。和传统技术相比这是个很大的优点。

实施例 8

通过使用涂覆在粒子上的烷基二醇(alkyldiole)作为限进材料(restricted access material) (RAM) 的粒子

通过使疏水粒子和烷基二醇反应，产生的粒子适合存在于富蛋白质基质中的分子的分析。蛋白质被排除通过这个涂层来到达粒子核以相互作用。

将甲基丙烯酸(MAA) 0.0505M、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM) 0.0505M、AIBN 8 毫克和乙腈 4 毫升加入到带有磨口盖的硼硅酸盐玻璃试管中，超声处理 10 分钟并在氮气流下脱气 8 分钟，放入-26℃的冷冻箱中，其中通过在 350 纳米下 UV-辐照引发聚合反应 4 小时。使用的化学物质与前面实施例中所用的具有相同的来源。此后，通过在 3000rpm 下离心 10 分钟萃取粒子，随后使用超声浴用甲醇:乙酸(9:1，体积/体积)再悬浮两次，并用甲醇再悬浮一次，每次 20 分钟。将所得的粒子在乙腈中再次悬浮，将手性丙烯酸单体和自由基引发剂一起加入。使用热水浴(60℃)引发聚合反应过夜。

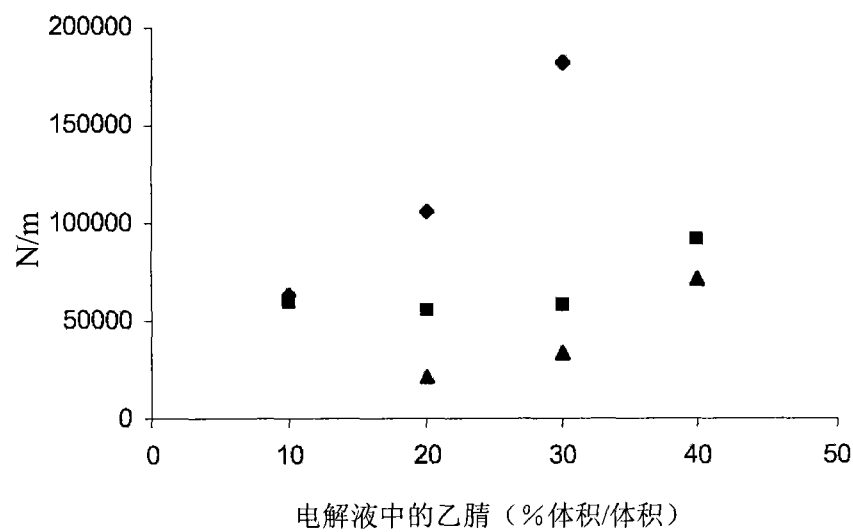
本发明实施方式的要素和成分可以在物理上、功能上和逻辑上以任何适当的方式实现。确实，官能团应该以单个单元、多个单元或作为其它官能团

单元的部分来实现。同样地，本发明可以以单个单元或者可以物理地和功能地分布在不同的单元间来实现。

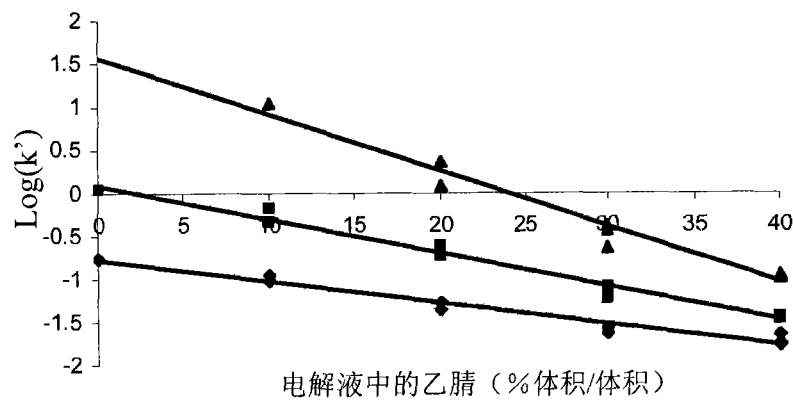
尽管参照具体实施方式已经在上面描述了本发明，但本发明并不是局限于在此阐明的特定的形式。更合适的，本发明仅受随附的权利要求的限制，与上面的具体实施方式不同的其它实施方式也一样可能在这些随附的权利要求的范围内。

在权利要求书中，术语“包含”并不排除其它成分或步骤的存在。而且，虽然单个列出，多个方式、成分和方法步骤也可能实现。另外，虽然在不同的权利要求中可能包括单个特征，但这些特征也可以组合在一起，不同权利要求中的包含物并不暗示这些特征的结合不是可行的和/或有利的。另外，单个参照并不排除多元性。术语“一”、“第一”、“第二”等并不排除多个。在权利要求中提供的参考标记仅仅作为澄清实施例，并不是以任何方式限制权利要求范围的。

(A)



(B)



(C)

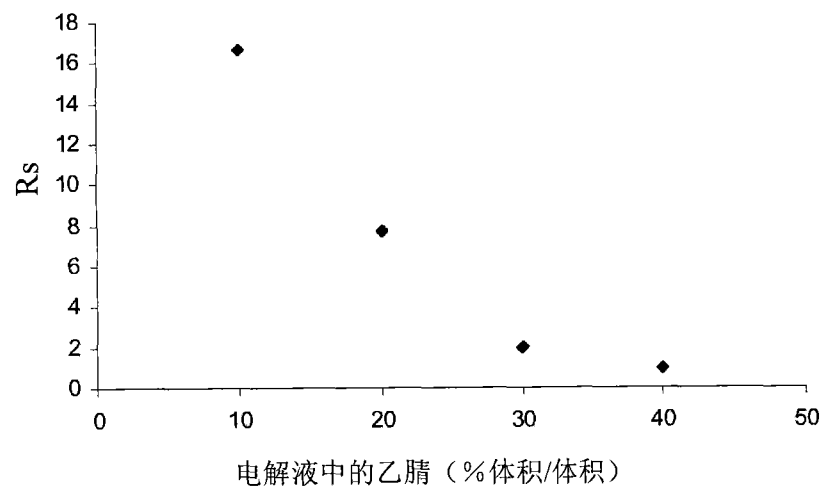


图 1

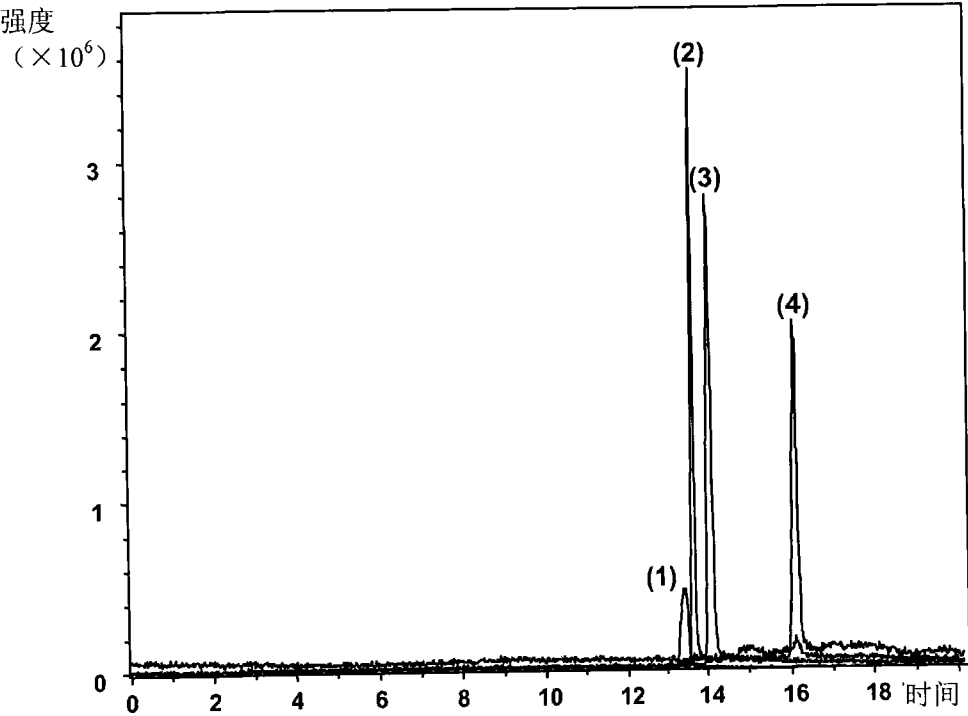


图 2

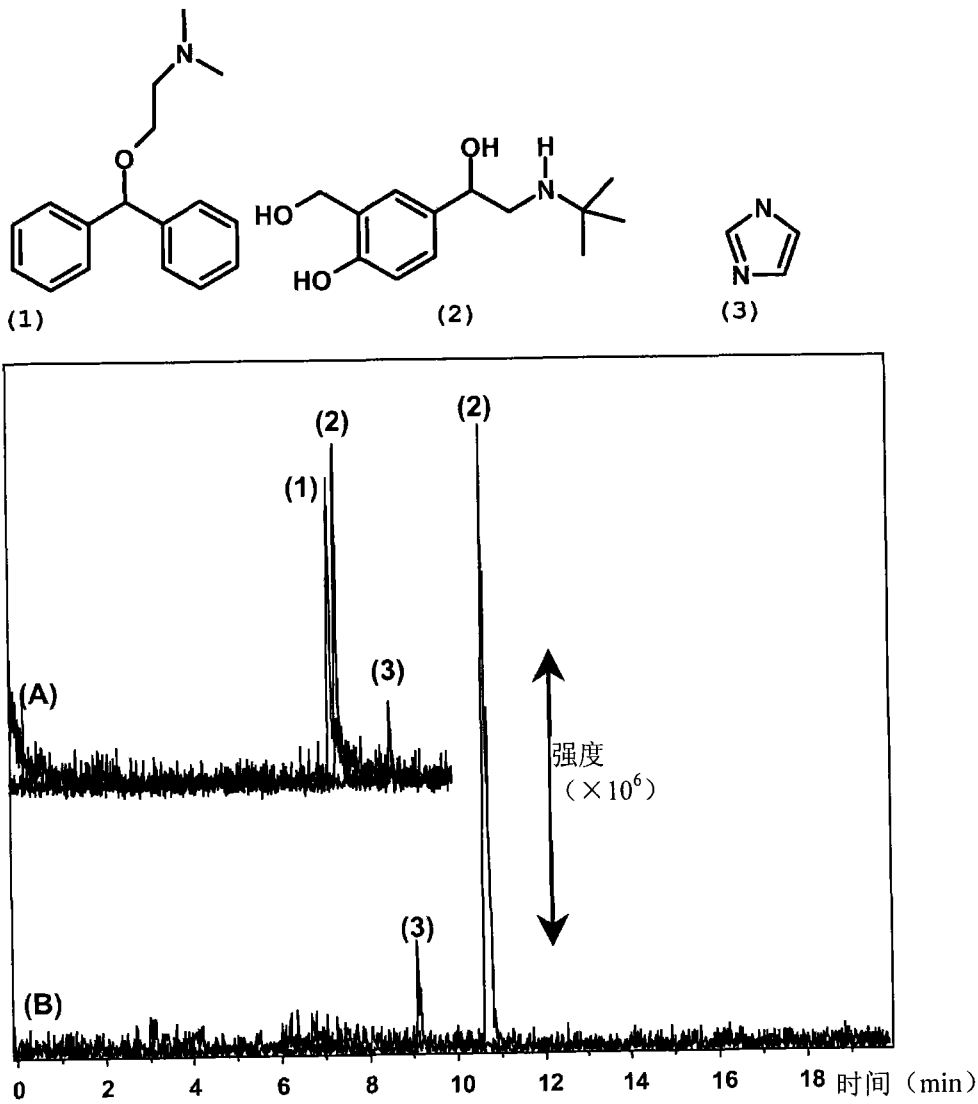


图 3

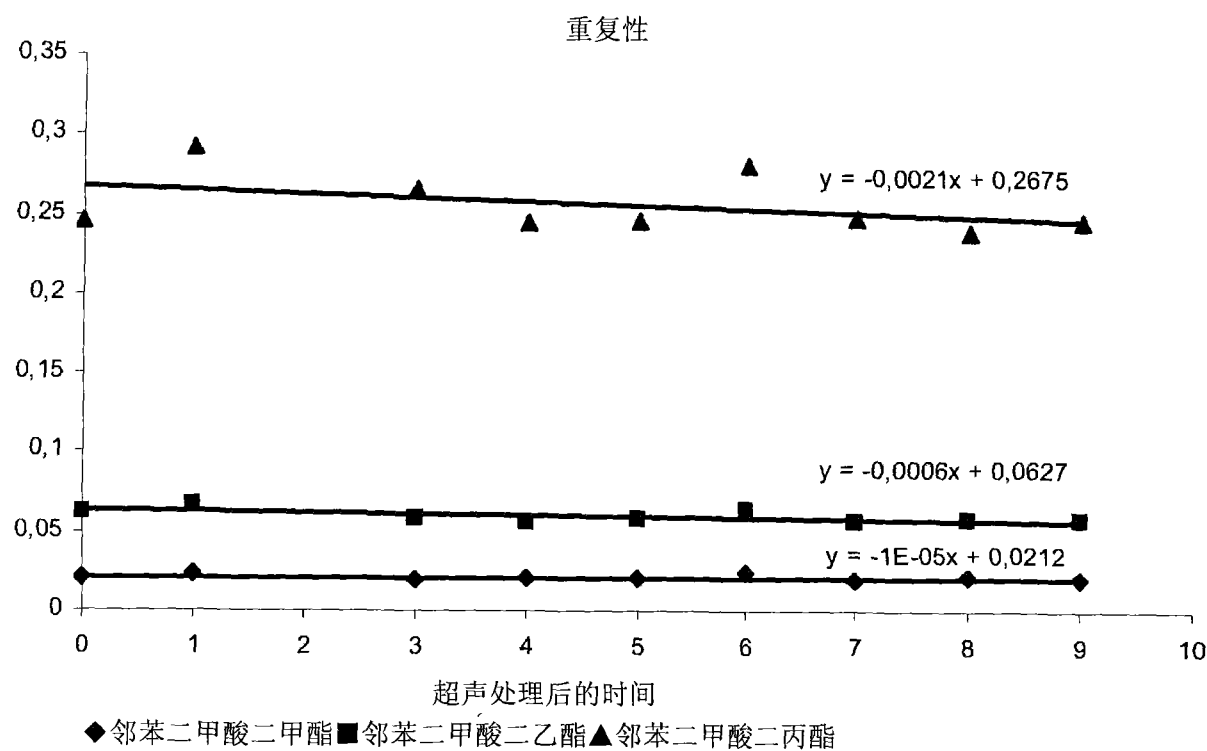


图 4

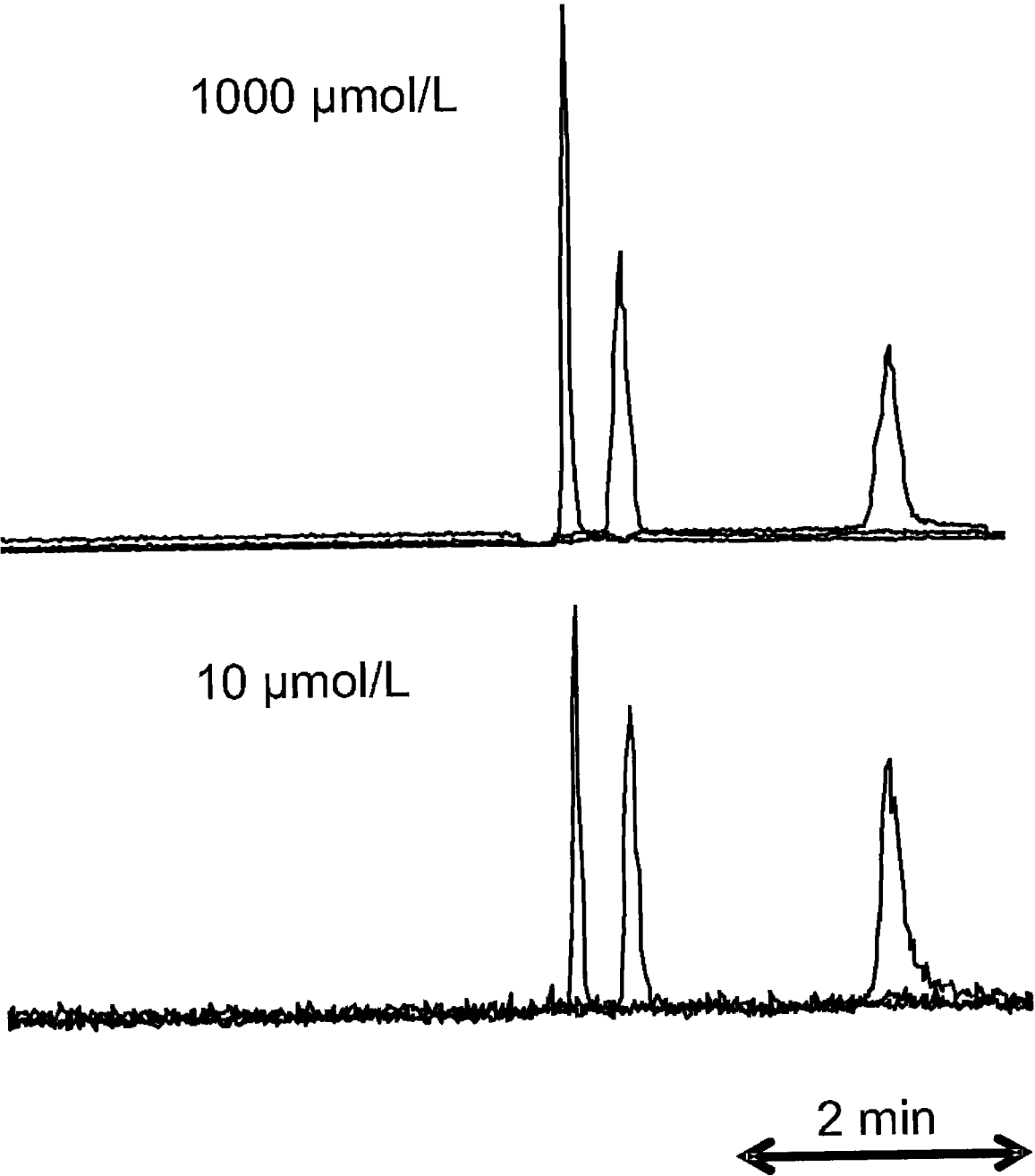


图 5

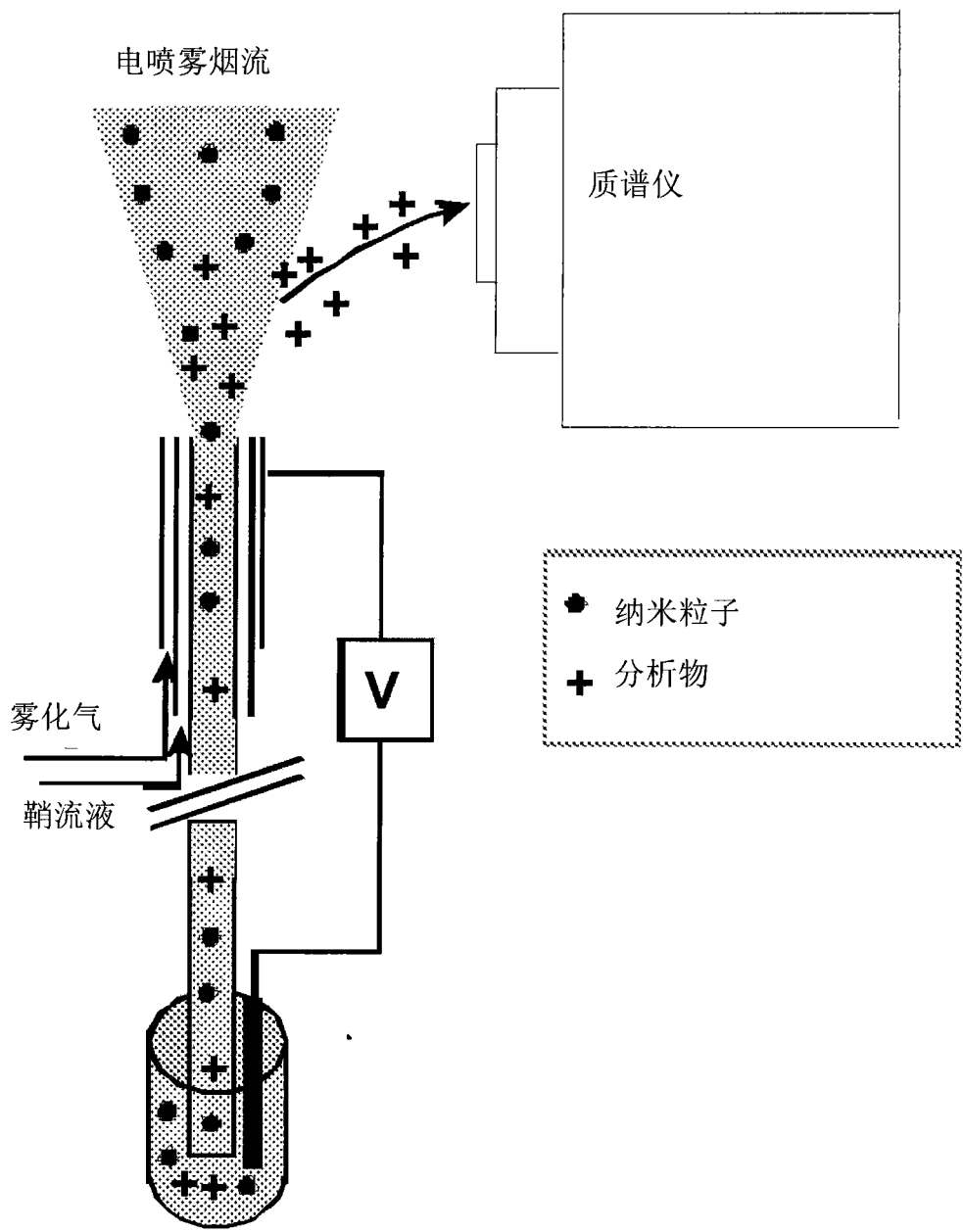


图 6

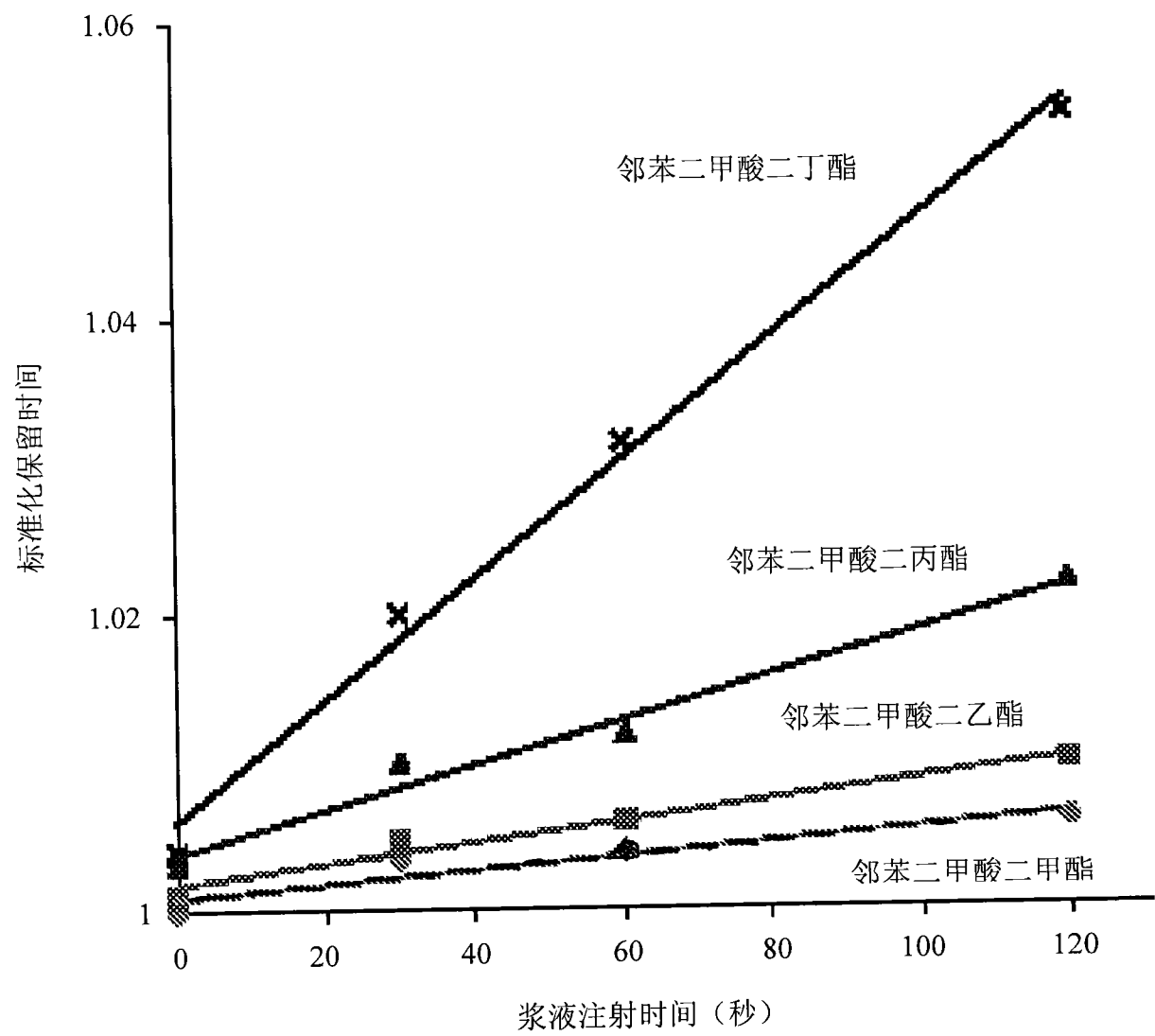


图 7

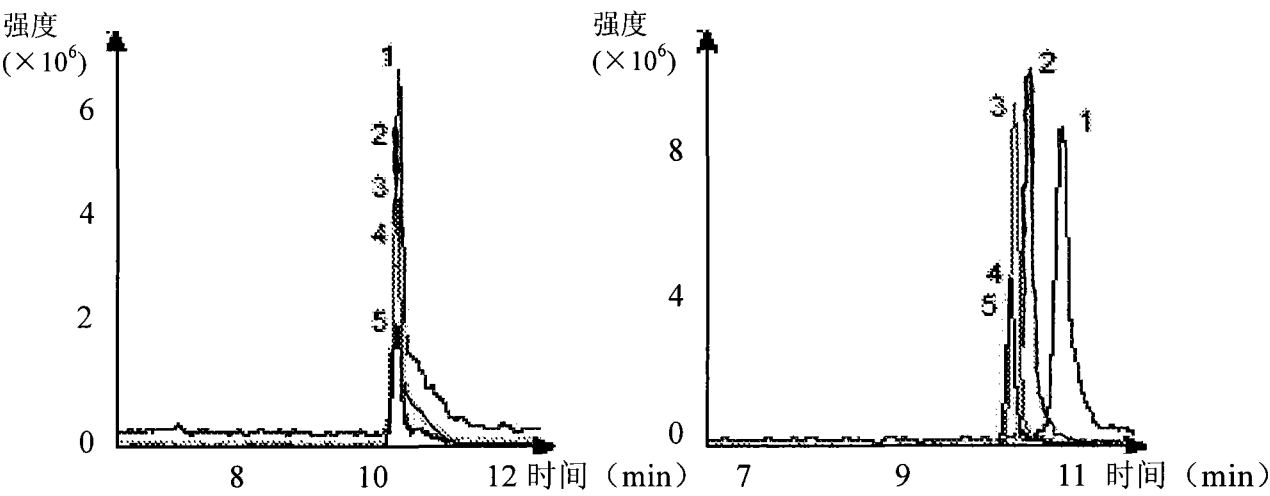


图 8

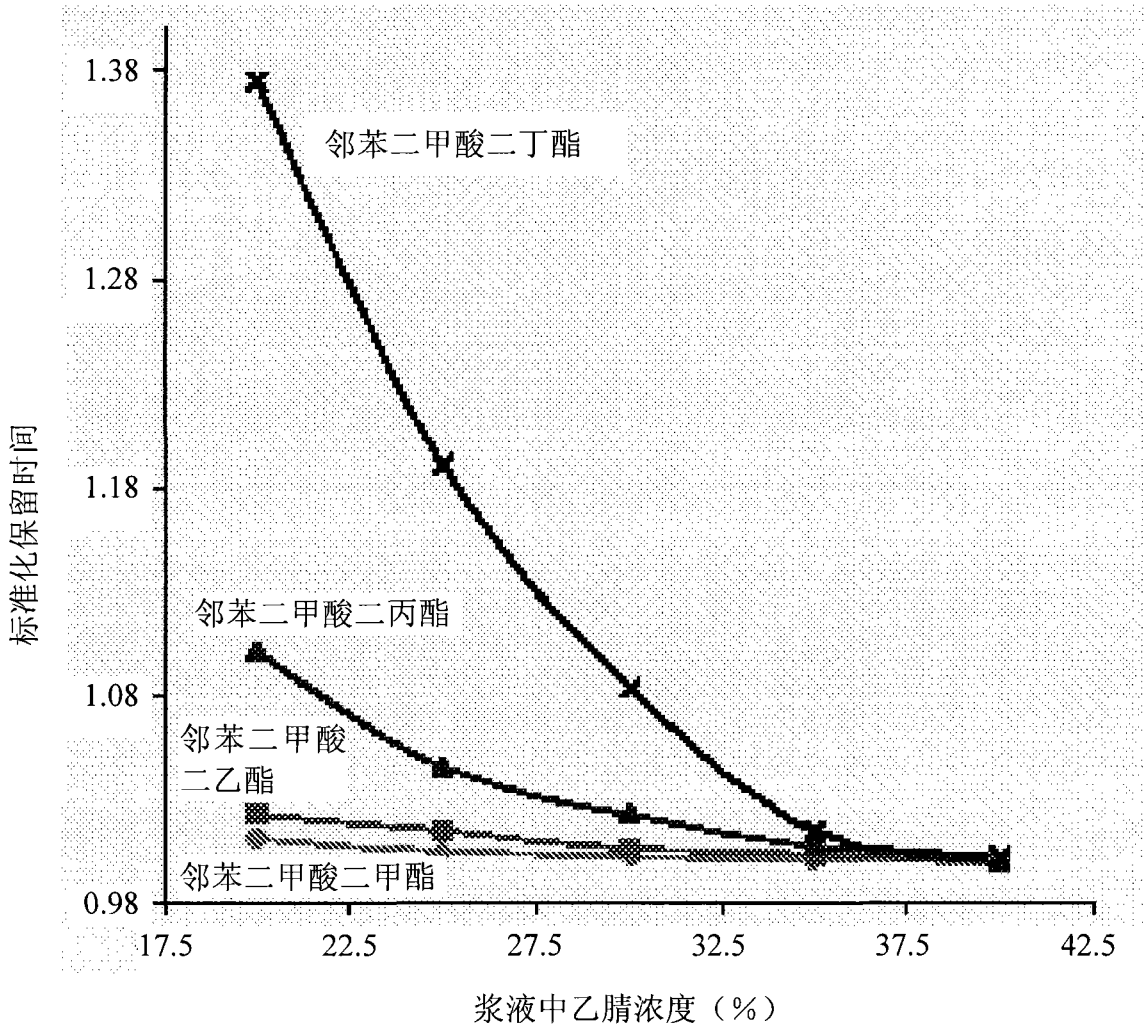


图 9