毛细管电泳 (CE)

—— 非生物药领域应用文集



SCIEX

The power of precision

毛细管电泳（Capillary Electrophoresis, CE）是一类以电场驱动为核心、基于分析物电荷、尺寸及迁移行为差异实现高效分离的分析技术。凭借超高分离效率（理论塔板数可达 10 –10 ）、极低样品与试剂消耗、快速分析速度以及灵活的方法开发空间，CE 已成为色谱技术之外极具价值的补充与替代方案。尤其面对复杂基质、多组分体系、强极性或离子型化合物，以及传统 HPLC/GC 方法分离选择性不足的分析场景，CE 展现出独特优势。

近年来，毛细管电泳在生物制药领域的应用已得到广泛认可；与此同时，在非生物药及工业分析领域，其应用边界正在持续拓展。随着检测需求从单一成分分析逐步转向复杂样品中的快速筛查、质量控制、杂质监测和方法互补，CE 在化学药、食品安全、石油化工、公共卫生、环境及通用离子分析等场景中的实用价值日益凸显。

本白皮书围绕非生物药相关的典型分析挑战与应用场景，系统梳理毛细管电泳在以下五大核心领域中的应用实践，旨在帮助读者快速理解 CE 在不同样品类型、检测目标和方法开发需求中的技术价值，并为后续方法选择、应用拓展和客户沟通提供参考。

1. 化学药（小分子药物分析）

在化学药领域，毛细管电泳（CE/CZE）可作为药典方法和质量控制体系中的重要补充，尤其适用于强极性、离子型、手性或结构相近的小分子药物及相关杂质分析。相关应用覆盖药用辅料表征、原料药杂质谱分析、对映体纯度控制以及药物反离子检测等多个场景。

2. 食品安全与质量控制

在食品安全与质量控制领域，毛细管电泳可用于乳制品蛋白组成、婴配粉功能营养成分、糖类结构、维生素异构体以及饮料中离子 / 有机酸等项目的分离和定量。相较于传统色谱方法，CE 具有样品和试剂消耗低、分离选择性强、方法开发灵活等特点，适合复杂食品基质中的质量评价、配方验证和工艺监控。

3. 石油化工：PTA 杂质检测

精对苯二甲酸（PTA）是生产涤纶的重要原料，其产品质量与下游聚酯材料性能密切相关。PTA 生产过程中可能残留苯甲酸、对羧基苯甲醛（4-CBA）、对甲基苯甲酸（p-TOL）及羟甲基苯

甲酸等杂质，其中 4-CBA 和 p-TOL 是影响 PTA 纯度和后续聚合质量的关键监控指标。毛细管区带电泳（CZE）已被用于 PTA 中 4-CBA 和 p-TOL 的定量分析，具备分离度高、重复性好、灵敏度高和分析速度快等特点。

4. 消毒剂与公共卫生相关分析

在消毒剂与公共卫生相关产品分析中，毛细管电泳可用于含胍类消毒剂的定量检测与成分鉴定。胍类消毒剂包括氯己定（CHA）、聚六亚甲基双胍盐（PHMB）和聚六亚甲基单胍（PHMG）等，常用于皮肤、黏膜及相关卫生产品消毒。由于 PHMB 和 PHMG 具有不同聚合度组成，传统 HPLC 难以获得理想峰型；而 CE/MEKC 可基于电泳迁移行为和胶束分配差异实现更适合的分离与定量。

5. 阴离子 / 阳离子分析

阴离子 / 阳离子分析是毛细管电泳的通用基础能力之一。根据附件中的阴离子和阳离子分析方案，PA800 Plus 可通过间接紫外检测，对本身缺乏紫外吸收的小分子无机离子、有机酸以及脂肪族胺等进行分离和定量。该类方法通过在分离缓冲液中加入具有紫外吸收的背景组分，使透明离子以间接吸收方式被检测，适合药品、食品、饮料、水质和工业样品中的基础离子监测。

目录

1. 毛细管电泳方法测定磺丁基 -β- 环糊精的平均取代度 5
2. 毛细管电泳法对谷胱甘肽中杂质 E 的定量分析 8
3. Estimation of (R)-Isomer and Other Impurities of Zolmitriptan API by Capillary Zone Electrophoresis 11
4. Estimation of Almotriptan-Related Impurities by Capillary Zone Electrophoresis 19
5. 毛细管电泳 - 间接紫外检测法对药物反离子的分析 25
6. CE-SDS 方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析 30
7. BioPhase™ 8800 系统进行婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量的高通量分析 33
8. BioPhase™ 8800 对不同种类乳品中乳清蛋白含量的高通量分析 36

9. CE-SDS 方法表征牛、羊奶粉中乳清蛋白含量的差异 39

10. 毛细管区带电泳方法对乳制品中 A2 β- 酪蛋白含量的测定 42

11. 高通量毛细管电泳方法进行乳品（液态奶、奶粉）中 A2β- 酪蛋白含量测定 46

12. 毛细管区带电泳进行乳品中 α- 乳白蛋白、β- 乳球蛋白的含量测定 50

13. 毛细管区带电泳进行乳品中乳铁蛋白的含量测定 54

14. 毛细管区带电泳法 (CZE) 用于婴儿配方奶粉中骨桥蛋白的分离及含量检测 58

15. Ultrafast Analysis of Human Milk Oligosaccharides (HMOs) by Capillary Gel Electrophoresis 62

16. CGE-LIF 进行支链淀粉分支结构中葡萄糖平均聚合度的分析 67

17. 毛细管电泳法对果蔬汁中维生素 C 异构体的分离及定量分析 70

18. 毛细管区带电泳对葡萄酒中的阴离子、有机酸和阳离子分析 73

19. 毛细管电泳法对精对苯二甲酸中对羧基苯甲醛及对甲基苯甲酸的含量测定—国标方法 79

20. BioPhase 8800 系统对精对苯二甲酸（PTA）杂质的高通量分析 82

21. 利用毛细管胶束电动色谱法（MEKC）对含胍类消毒剂的样品进行定量检测——国标方法 86

22. A lab-scale approach for the Anion Analysis kit 89

23. A lab-scale approach for the Cation Analysis Kit 96

毛细管电泳方法测定磺丁基-β-环糊精的平均取代度

Analyzing the Average Degree of Substitution of Betadex Sulfobutyl Ether Sodium by Capillary electrophoresis

张晓霞[1]，高铁[1]，许凯[2]，陈泓序[1]

Xiaoxia Zhang[1], Tie Gao[1], Kai Xu[2], Hongxu Chen[1]

[1] *SCIEX，中国；2 中国食品药品检定研究院*

[1] *SCIEX, China; 2 National Institute for Food and Drug Control*

Keywords： Average degree of substitution; Betadex Sulfobutyl Ether Sodium(SBE-β-CD); Capillary electrophoresis

1. 前言

磺丁基-β-环糊精（SBE-β-CD）是美国Cydex公司开发成功的阴离子、高水溶性的β-CD衍生物，能很好地与药物分子形成非共价复合物。与β-CD相比，其具有更好的水溶性，且溶血作用小、肾毒性低，是一种应用前景非常广阔的药用辅料。

毛细管电泳技术利用高压电场进行样品分离，非常适合用于带电的物质和极性物质的分离分析。美国药典方法规定用毛细管电泳方法进行磺丁基-β-环糊精平均取代度的分析[1]。药典详细规定了毛细管电泳的仪器条件和冲洗步骤。由于毛细管之间的差异，美国药典（USP）并没有指定背景电解质的pH值，需要根据实际的情况进行优化选择。

本研究基于SCIEX熔融石英毛细管，用三个不同pH值的背景电解质分别进行磺丁基-β-环糊精标准溶液平均取代度分析实验。结果显示pH 7.5-8.5条件下标准品的平均取代度计算结果均满足USP药典的系统适应性要求；pH 8.5条件下出峰更快，峰形更好；pH 8.0条件下标准品各峰（I-X）的相对迁移时间与USP药典参考值最接近，可以用于峰指认。

2. 实验部分

2.1 试剂和样品

背景电解质：30 mM的苯甲酸，加入100 mM的Tris缓冲液调整到合适的pH值；

标准溶液：取适量USP标准品，用去离子水配制成10 mg/mL磺丁基-β-环糊精标准溶液。

2.2 仪器及方法

仪器：SCIEX PA 800 Plus药物分析系统，匹配PDA检测器或UV检测器。熔融石英毛细管（PN. 338451）：40/50 cm(有效/总长度)，50 μm 内径；毛细管温度：25 ℃；样品室温度：25 ℃；检测波长：间接紫外检测法200 nm；窗口狭缝：100×200 μm。分离条件：0-30 kV线性梯度10 min，然后30 kV维持20 min；进样条件：0.5 psi, 10 s；

毛细管冲洗步骤：新的毛细管在首次使用前需要先用1 M的NaOH在20 psi压力下冲洗1 h，再用水在20 psi压力下冲洗2 h。每天分析样品前需先用0.1 M的NaOH在20 psi压力下冲洗30 min，水在20 psi压力下冲洗2 h，背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗1 h。

样品分离的时间程序见表1。

表1. 样品分离的时间程序。

时间 Time	事件	值	持续时间	进口盘	出口盘	概要	备注
	Rinse-Pressure	20 psi	2.00 min	BI: D1	BO: D1	Forward	0.1 N NaOH rinse
	Rinse-Pressure	20 psi	3.00 min	·BI: E1	BO: D1	Forward	Water rinse
	Rinse-Pressure	20 psi	3.00 min	BI: B1	BO: D1	Forward	Buffer rinse
	Inject-Pressure	0.5 psi	10 sec	SI:A1	BO: C1	Override, Forward	Sample injection
0.00	Separate-Voltage	30 kV	30.00 min	BI: C1	BI: C1	10.00 min ramp, normal polarity,both	
30.01	End						

3. 结果与讨论

美国药典方法未规定背景电解质的pH，本研究考察了pH 7.5，pH 8.0及pH 8.5三个不同pH下各峰（I-X）的分离结果是否满足系统适应性要求。

3.1 系统适应性要求结果分析

本研究用磺丁基-β-环糊精标准溶液考察了pH 7.5，pH 8.0及pH 8.5三个不同pH下各峰(I-X)的分离结果是否满足系统适应性要求。

不同pH值下标准品的电泳图谱如图1。从图谱上看，pH增加时出峰更快，峰形更好。

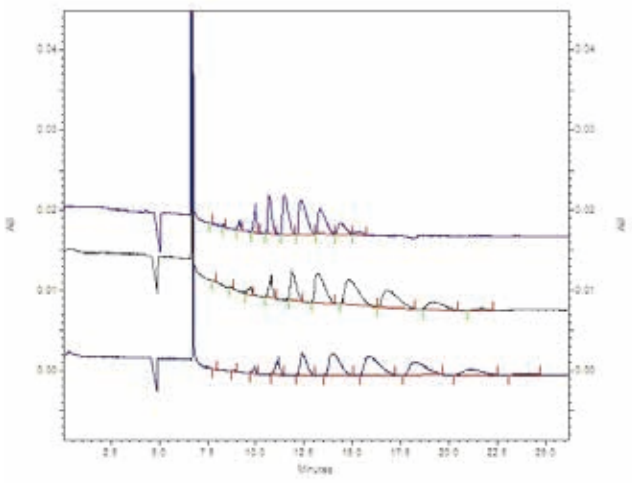


图1. 不同pH下标准品的电泳图谱。

对不同pH值下标准品各峰进行积分并计算平均取代度，计算方法如式1-3。

$$\text{校正峰面积}A_i = \frac{\text{峰面积} \times \text{毛细管有效长度(cm)}}{\text{迁移时间}} \quad \cdots\cdots(1)$$

$$\text{校正峰面积百分比}A_i\% = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^{n} A_i} \times 100 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

$$\text{平均取代度} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(\text{各峰的取代度} \times A_i\%)}{100} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots(3)$$

注：各峰的取代度为：峰I为1，峰II为2，……峰X为10。

结果表明，pH 7.5-8.0条件下标准品结果均满足USP药典系统适应性要求。各峰（I-X）的峰面积百分比（Ai%）均在USP药典范围；峰IX和峰X的分离度均大于0.9满足USP药典要求；平均取代度结果也均能达到USP药典要求，结果见表2。

表2. 不同pH下标准品结果比较峰面积百分比，峰IX和峰X的分离度及平均取代度)。

		USP限制范围	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5
各峰的峰面积百分比(Ai%)	I	0-0.3	0.02	0.12	0.08
	II	0-0.9	0.35	0.42	0.43
	III	0.5-5.0	1.79	2.06	2.31
	IV	2.0-10.0	5.64	6.12	6.58
	V	10.0-20.0	12.86	13.44	14.67
	VI	15.0-25.0	21.41	21.27	22.43
	VII	20.0-30.0	24.59	25.54	25.19
	VIII	10.0-25.0	20.60	19.15	18.56
	IX	2.0-12.0	9.54	8.97	8.02
	X	0-4.0	3.20	2.89	1.71
平均取代度		6.2-6.9	6.45	6.44	6.39
分离度(峰IX和峰X)		≥0.9	1.349	1.510	1.351

对比不同pH值下标准品各峰(I-X)的相对迁移时间，pH 8.0时各峰(I-X) 的相对迁移时间更接近USP药典的参考值，可以用于磺丁基-β-环糊精各峰(I-X)的指认。结果见表3。

表3. 不同pH下各峰(I-X)相对迁移时间结果比较。

峰号	相对迁移时间			
	USP参考值	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5
I	0.58	0.50	0.57	0.62
II	0.63	0.56	0.63	0.67
III	0.69	0.63	0.69	0.75
IV	0.77	0.71	0.76	0.81
V	0.83	0.79	0.83	0.87
VI	0.91	0.88	0.91	0.93
VII	1.00	1.00	1.00	1.00
VIII	1.10	1.15	1.11	1.08
IX	1.20	1.33	1.23	1.17
X	1.30	1.52	1.34	1.24

重复性结果

本研究选择pH 8.0作为磺丁基-β-环糊精标准品的pH值进行重复性的考察。连续进样6针，计算各峰(I-X)迁移时间的重复性，结果如图2和表4。从表4中可以看出，各峰的迁移时间具有良好的重复性，迁移时间的RSD值为0.2%-3.14%。

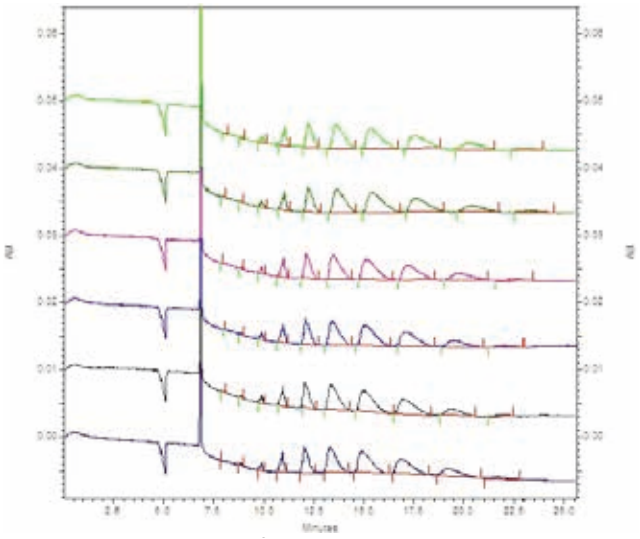


图2. pH 8.0下磺丁基-β-环糊精标准品各峰迁移时间的重复性(n=6)。

结论

本研究考察了不同背景电解质pH值对磺丁基-β-环糊精各峰(I-X)分离的影响，结果发现，pH从7.5到8.5变化时计算的平均取代度均能满足USP药典要求。pH 8.5时各峰出峰更快，峰形更好；pH 8.0时各峰的相对迁移时间更接近USP药典给出的参考值。

在分析实际样品时，可以先用pH 8.0进行试分离，再根据USP药典系统适应性要求及各峰的出峰时间及峰形情况来调整至合适pH值，保证各峰相对迁移时间更接近USP药典参考值。

表4. pH 8.0下磺丁基-β-环糊精标准品各峰迁移时间的重复性(n=6)。

峰号	迁移时间(min, n=6)						RSD(%)
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	
I	7.85	7.917	8.008	7.846	7.921	7.933	0.76
II	8.808	8.821	8.829	8.829	8.846	8.858	0.20
III	9.875	9.887	9.9	9.904	9.917	9.946	0.25
IV	10.963	10.983	11.004	11.021	11.063	11.079	0.41
V	12.008	12.042	12.075	12.1	12.192	12.192	0.63
VI	13.342	13.375	13.433	13.496	13.65	13.629	0.96
VII	14.863	14.967	15.025	15.108	15.458	15.413	1.61
VIII	16.854	17.021	17.125	17.208	17.642	17.546	1.77
IX	19.212	19.375	19.454	19.667	20.425	20.433	2.72
X	21.7	21.9	21.967	22.775	23.429	23.029	3.14

参考文献

1. Betadex / Official Monographs, The United States Pharmacopeial Convention, 2012, 5425-5426.

毛细管电泳法对谷胱甘肽中杂质E的定量分析

Identification and quantitative analysis of impurity E in glutathione by capillary electrophoresis

唐红梅，王文涛，陈泓序，罗继，郭立海

Hongmei Tang, Wentao Wang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

SCIEX，中国；

SCIEX, China;

Keywords: Capillary electrophoresis, Quantitative analysis, glutathione, Impurity E

引言

谷胱甘肽是一种含γ-酰胺键和巯基的三肽，由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成，广泛存在于动、植物组织和微生物中，在生物体内能帮助免疫系统保持正常的功能，并具有抗氧化和整合解毒的作用。谷胱甘肽固体较为稳定，但是在水溶液中容易氧化降解；在中性和碱性溶液中氧化速度更快，而在低 pH 溶液中，由于硫醇化合物的质子化作用阻止了其氧化过程。还原型谷胱甘肽中可能存在的杂质为L-半胱氨酰甘氨酸 (杂质A) 、L-半胱氨酸 (杂质B) 、氧化型谷胱甘肽 (杂质C) 、γ-谷氨酰半胱氨酸 (杂质D) ，还可能存在未知杂质E。还原型与氧化型谷胱甘肽含量的比值可作为细胞氧化还原状态的主要动态指标。谷胱甘肽中杂质的产生会影响到后续产品的质量及其生产的进行，因此需要建立一种能准确确认及定量的分析方法。毛细管电泳方法 (CE) 可以实现杂质E与主成分谷胱甘肽及其他杂质 (B、C、D) 的有效分离，并且欧洲药典中规定每个峰相对于内标 (约14分钟) 的相对迁移时间：杂质E约等于1.2；毛细管电泳是欧洲药典收录方法，并且毛细管电泳法可以同时对谷胱甘肽中的杂质E进行确认及定量分析，具有灵敏度高、稳定性好、对环境友好、分析速度快等特点。

本文参照欧洲药典的方法选用毛细管电泳法对谷胱甘肽中的杂质E进行定量分析。本方法简捷、杂质分离度高，适于分析测定谷胱甘肽中的有关杂质E。

2. 试剂及方法

2.1 仪器和试剂

L-苯丙氨酸标准品 (Sigma-Aldrich) ; L-半胱氨酸标准品 (Sigma-Aldrich) ; 氧化型谷胱甘肽标准品 (Sigma-Aldrich) ; 无水磷酸二氢钠 (Sigma-Aldrich) ; 去离子水 (Millipore) ; 磷酸 (Sigma-Aldrich) ; 盐酸 (Sigma-Aldrich) ; 氢氧化钠 (Sigma-Aldrich) ; 样品：谷胱甘肽粉末样品 (0.6 g左右) 。

2.2 样品及前处理

2.2.1 背景电解质溶液制备

背景电解质溶液：将1500 mg无水磷酸二氢钠溶解在230 mL去离子水中，并用磷酸调节至pH值1.80用去离子水稀释至250 mL。

2.2.2 内标溶液制备

内标溶液: 取L-苯丙氨酸约10 mg，置于50 mL容量瓶中，加背景电解质溶液溶解并稀释至刻度，内标溶液浓度为0.2 mg/mL。

2.2.3系统适用性溶液制备

系统适用性溶液: 取杂质B标准品约5 mg、杂质C标准品约5 mg，置于50 mL容量瓶中，加内标溶液溶解，杂质B终浓度为0.1 mg/mL，杂质C中浓度为0.1 mg/mL，作为系统适用性溶液。

2.2.4 供试品溶液制备

供试品溶液: 精确称取20 mg谷胱甘肽粉末样品置于1.5 mL离心管中，加1mL内标溶液溶解，浓度为20 mg/mL，作为供试品溶液。

2.2.5 对照品溶液制备

精密量取供试品溶液10 µL，放置于1.5 mL离心管中，用内标溶液稀释100倍，浓度为0.2 mg/mL，作为对照品溶液。

2.3 仪器及方法设置

毛细管：SCIEX PA 800 Plus药物分析系统，匹配UV检测器，采集频率：2 Hz，检测波长：200 nm；熔融石英毛细管，75 μm内径，50/60.2 cm (有效/总长度)；进样：0.5 psi，5 s；分离电压：20 kV，45 min；毛细管温度：25 ℃；样品室温度：10 ℃。

新毛细管的预处理：先用0.1 N HCl在20 psi压力下冲洗毛细管20 min；再用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管10 min；为了实现毛细管完全平衡，先用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗毛细管40 min，然后在20 kV下加电平衡毛细管60 min。

每次运行前毛细管预处理：用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗毛细管40 min；

毛细管运行间冲洗：用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管1 min；然后用 0.1 N NaOH在20 psi压力下冲洗毛细管 2 min；再用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管1 min；再用 0.1 N HCl在20 psi压力下冲洗毛细管 3 min；最后再用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗毛细管10 min。

3. 结果与分析

3.1 系统适用性验证

为了保证分离结果，需要先进行系统适用性验证，利用前文2.2.5制备的系统适用性溶液进行实验验证，得到的毛细管电泳分离谱图如下所示；

欧洲药典中规定每个峰相对于内标 (约14分钟) 的相对迁移时间：杂质A= 约0.77；杂质B= 约1.04，杂质E= 约1.2；杂质C= 约1.26，杂质D= 约1.3。由系统适应性溶液分离结果可知，系统适应性测试正常，满足欧洲药典的要求。

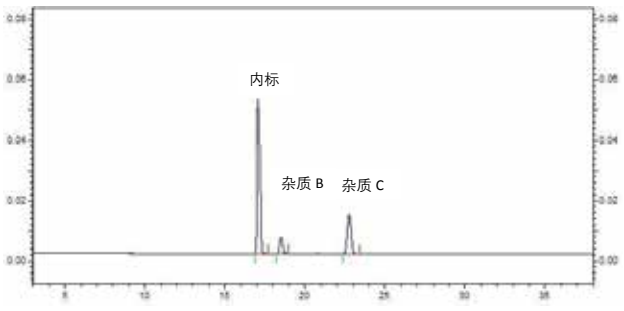


图1. 系统适应性毛细管电泳分离谱图

表1. 系统适应性溶液分离结果表

	相对迁移时间(min)		分辨率	
名称	欧洲药典标准	实验数据	欧洲药典标准	实验数据
内标	0.00	0.00	0.00	0.00
杂质B	1.04	1.08	>1.5	4.20
杂质C	1.26	1.33	--	10.61

3.2 毛细管电泳法对样品中杂质E的分析

利用毛细管电泳法对供试品中的杂质进行分析；供试品的毛细管电泳分离谱图如下图2所示；分离度以及相对迁移时间结果如表2所示；

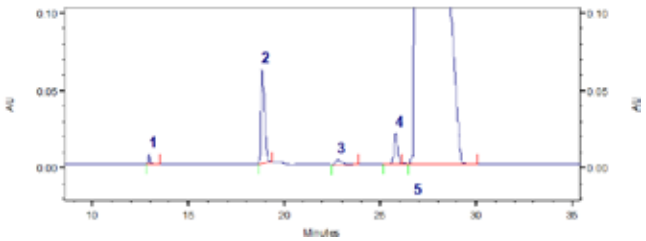


图2. 供试品毛细管电泳分离谱图

通过供试品溶液的毛细管电泳分离谱图结果可知：2号峰为内标，5号峰为谷胱甘肽主成分峰；欧洲药典规定：杂质E可以通过相对迁移时间进行确认，杂质E与内标的相对迁移时间为1.2；结合供试品毛细管电泳分离谱图可知：3号峰与内标的相对迁移时间是1.2，因此3号峰为杂质E，说明毛细管电泳法可以对谷胱甘肽中的杂质E进行很好的分离。

3.3 毛细管电泳法对样品中杂质E的定量分析

通过毛细管电泳法得到对照品溶液以及供试品溶液的电泳分离谱图，根据两者电泳分离谱图中内标峰的峰面积、供试品杂质的峰面积以及对照品中谷胱甘肽的峰面积即可根据公式计算即可得到杂质E的百分比含量。计算公式如下：

$$\text{杂质E} = \frac{(\text{A供试品杂质E} * \text{A对照品内标})}{(\text{A供试品内标} * \text{A对照品谷胱甘肽})}$$

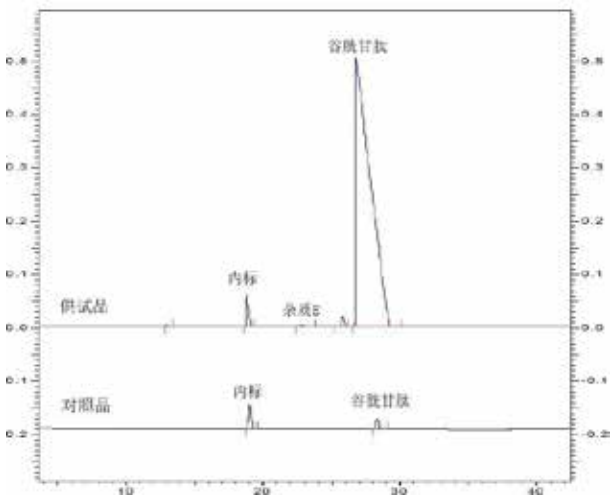


图3. 比较供试品以及对照品的毛细管电泳分离谱图

根据上述公式计算，该供试品中杂质E的百分含量为0.17%；因此利用毛细管电泳法可以对谷胱甘肽中的杂质E进行快速的定量分析。

4. 结论

本文借助于毛细管电泳法谷胱甘肽样品中杂质E进行定量分析。通过系统适应性试验实验结果得到杂质B、杂质C的峰相对于内标峰的迁移时间，以及内标峰与杂质B的分离度大于1.5，均满足欧洲药典对于分离度的要求；根据欧洲药典中对杂质E的相对迁移时间规定，利用毛细管电泳方法对谷胱甘肽供试品溶液进行测定，可以对杂质E进行很好的分离；另外通过对供试品溶液以及对照品溶液的毛细管电泳分离谱图进行对比得到计算公式中的相应峰面积，从而可以对杂质E进行简单快速的定量。

*产品或方法仅限于科研用途，不用于临床诊断

Estimation of *(R)*-Isomer and Other Impurities of Zolmitriptan API by Capillary Zone Electrophoresis

Prashant Dour, Abel Shalom, Dilip Reddy, Manoj Pillai
SCIEX, 121, Udyog Vihar, Phase IV, Gurgaon, Haryana, India

Overview

Who Should Read This: Senior Scientists, Lab Directors

Focus: Measurement of the *(R)*-isomer and impurities of zolmitriptan by capillary zone electrophoresis (CZE).

Goals: Successfully apply the United States Pharmacopoeia (USP) capillary electrophoresis method for determination of zolmitriptan enantiomers using the SCIEX P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis System. Meet established USP standards.

Problem: Zolmitriptan, (4S)-4-[3-[2-dimethyl aminoethyl]-1*H*-5-indolyl-methyl]-1,3-oxazolan-2-one, is a serotonin receptor agonist that is highly effective in the acute treatment of migraines.[1] Zolmitriptan is synthesized as the *(S)*-isomer because *(S)*-zolmitriptan is pharmacologically more potent than *(R)*-zolmitriptan and because *(R)*-zolmitriptan is toxic. Due to this toxicity, the allowed limit of the *(R)*-isomer has been established by the USP as 0.15% w/w.[2] As such, an accurate and robust method is needed to evaluate the enantiomeric purity of zolmitriptan.

Results: The system met the suitability standards established by the United States Pharmacopoeia. Obtained relative migration times (RMTs) were comparable to USP RMTs and consistent over multiple runs.

Key Challenges:

- The developed analytical method must be able to resolve the enantiomers of zolmitriptan as well as related impurities
- The developed analytical method must be accurate and reproducible



Figure 1: The SCIEX P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis (CE) System

Key Features:

- Capillary zone electrophoresis is highly effective at separating enantiomers
- In many cases, capillary zone electrophoresis provides greater resolution than liquid chromatography
- The P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis (CE) System features, as standard, temperature control of both the sample and capillary. This greatly enhances the analytical reproducibility that is crucial for quality control applications.

Experimental Design

Materials

Table 1. Chemical supplies

Reagent/material	Catalog Number	Vendor
Zolmitriptan	1727009	United States Pharmacopoeia (USP)
Zolmitriptan *(R)*-isomer	1727018	United States Pharmacopoeia (USP)
Zolmitriptan Related Compound F	1727075	United States Pharmacopoeia (USP)
Zolmitriptan Related Compound GS	1727086	United States Pharmacopoeia (USP)
Sodium borate	B3545	Sigma
Tryptamine HCl-A030	F1101-RMBB	www.tcichemicals.com
Hydroxypropyl β-cyclodextrin	XFR3G-MS	www.tcichemicals.com
Orthophosphoric acid, 88%	ECOA600144	Merck
Hydrochloric acid	HK3H530649	Merck
Water, Purified – Type 1	Milli-Q	Millipore

Table 2: Vials, parts, and other supplies

Material	Catalog Number	Vendor
Universal vials (pkg of 100)	A62251	SCIEX
Universal vial caps (pkg of 100)	A62250	SCIEX
nanoVial (qty 100)	5043467	SCIEX
Capillary – 75 µm ID, 111 cm total length (qty 3)	360800	SCIEX
Cartridge assembly kit, blank	144738	SCIEX
15 & 50 mL conical bottom tubes	NA	Appropriate third party
Assorted pipettes and corresponding tips	NA	Appropriate third party
Microcentrifuge vials	NA	Appropriate third party
3 mL syringe with needle	NA	Appropriate third party
0.5 mL centrifuge vials	NA	Appropriate third party
0.45 µm syringe filters	4497	Pall Corporation

Reagent and Sample Preparation[3, 4]

Stock Solutions

Internal standard stock solution

Tryptamine was used as the internal standard (IS). The tryptamine internal standard stock solution was prepared by dissolving 2.0 mg of tryptamine in 0.02 M HCl made to a total volume of 10 mL.

Zolmitriptan stock solutions

The zolmitriptan stock solution was prepared by dissolving 2 mg of zolmitriptan in 0.02 M HCl made to a total volume of 1 mL. Similarly, zolmitriptan F, G, and *(R)*-isomer stock solutions were each prepared (separately) by dissolving 1 mg of the compound in 1 mL of 0.02 M HCl.

p2

Working Solutions

System suitability solution (0.01 mg/mL tryptamine, zolmitriptan F, zolmitriptan G, and zolmitriptan *(R)*-isomer + 1 mg/mL zolmitriptan)

The system suitability solution was prepared by adding 10 µL of each stock solution (zolmitriptan F, G, and *(R)*-isomer), 50 µL of tryptamine (IS) stock solution, and 500 µL of zolmitriptan RS stock solution to a 2 mL microcentrifuge tube. The volume was made up to 1000 µL using 0.02 M HCl solution. The final mixture contained 1.0 mg/mL of zolmitriptan, 0.01 mg/mL of zolmitriptan F, G and *(R)*-isomer impurities and 0.01 mg/mL of tryptamine (IS).

Standard solution (0.01 mg/mL of tryptamine, 0.001 mg/mL zolmitriptan)

The standard solution was prepared by first diluting 50 µL of zolmitriptan stock solution (2 mg/mL) with 950 µL of 0.02 M HCl to produce a 0.1 mg/mL zolmitriptan solution. 10 µL of the 0.1 mg/mL zolmitriptan solution and 50 µL of the tryptamine (IS) stock (0.2 mg/mL) were then aliquoted into a microcentrifuge tube, to which was added 940 µL of 0.02 M HCl. The solution was gently vortexed for uniform mixing.

Sample solution (0.01 mg/mL of tryptamine, 1.0 mg/mL zolmitriptan sample)

1 mg of sample was weighed into a 1.5 mL Eppendorf tube. 950 µL of 0.02 M HCl and 50 µL of tryptamine (IS) stock solution were added and briefly vortexed to dissolve.

CZE running buffer

286.5 mg sodium borate decahydrate and 7 mL of water were combined in a 15 mL polypropylene tube and briefly vortexed to dissolve the mixture. The pH was adjusted to 2.2 with 1 N orthophosphoric acid. 750 mg of β-cyclodextrin was added to the mixture and vortexed to dissolve. Water was added to bring the total solution volume to 15 mL. The solution was filtered through a 0.45 µm syringe filter.

System Set Up and Configuration

All experiments were performed on a P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis (CE) System (SCIEX, Framingham, USA), equipped with a UV detector and 200 nm filter. The capillary was a 75 µm ID bare fused silica capillary with 50 cm effective length. The cartridge detection window aperture was 100 x 200 µm. The instrument was controlled by 32 Karat™ software version 10.1.33.

Initial Conditions

The initial conditions were the same for all methods:

Capillary/Sample Storage/Peak Detection Initial Conditions (see also Figure 2)

- Voltage maximum: 30.0 kV
- Current maximum: 300 µA
- Cartridge temperature: 20.0° C
- Sample storage: 15.0° C.
- Peak detection threshold: 2
- Peak width: 9
- Analog output scaling: 1

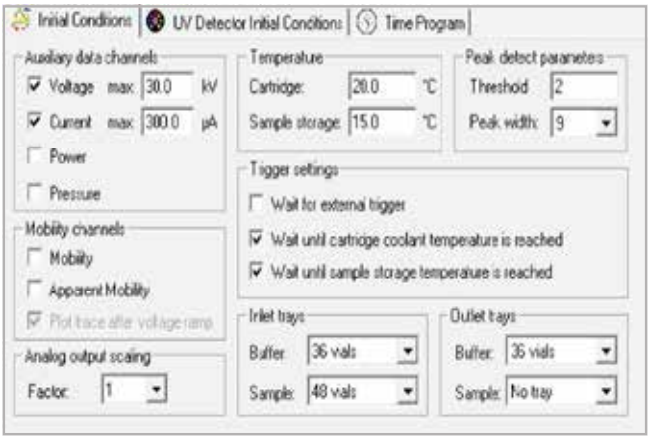


Figure 2: Initial conditions for capillary, sample storage, and peak detection

UV Detector Initial Conditions (see also Figure 3)

- Acquisition: Enabled
- Wavelength of 200 nm
- Data rate: 4 Hz
- Filter: Normal
- Peak width (points): 16–25
- Absorbance signal: Direct

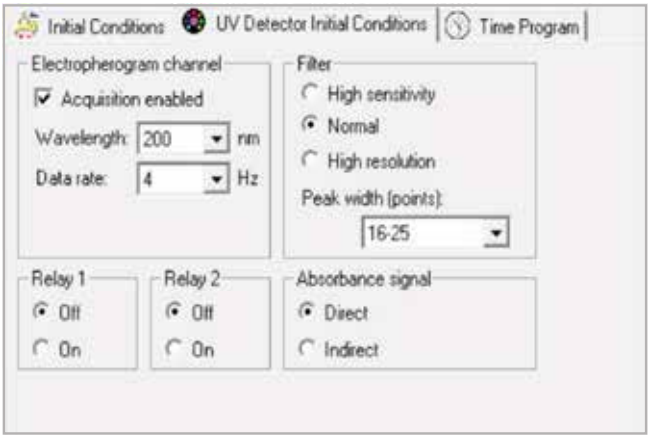


Figure 3: Initial conditions for the UV detector

Current

The current generated throughout the separation was between 70 µA and 90 µA.

Separation Methods

Three methods were created in 32 Karat™ software. They were: capillary equilibration, zolmitriptan separation, and shutdown (programs depicted in Figures 4, 5, and 6, respectively).

Capillary equilibration was performed as follows:

1. 30 min rinse at 20 psi of 0.1 N NaOH
2. 60 min rinse at 20 psi of 0.1 N HCl
3. 60 min rinse at 20 psi of 0.1 N orthophosphoric acid
4. 60 min rinse at 20 psi of running buffer
5. Voltage equilibrium of 15 kV for 6 hours

Zolmitriptan separation was achieved as follows:

1. 3 min rinse at 20 psi of water
2. 5 min rinse at 20 psi of 0.1 N orthophosphoric acid
3. 5 min rinse at 20 psi with 0.1 N HCl
4. 7 min rinse and fill at 20 psi using running buffer
5. Hydrodynamic sample introduction at 1.0 psi for 5 secs
6. Buffer plug at 0.5 psi for 5 sec
7. Separation at 15.0 kV for 40 min (250 V/cm)

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	30.00 min	BI:B6	BO:B6	forward	0.1N NaOH rinse
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	60.00 min	BI:E6	BO:E6	forward	0.1NHcl Rinse
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	60.00 min	BI:F6	BO:F6	forward	0.1N ortho phosphoric acid rinse
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	60.00 min	BI:D6	BO:D6	forward	BGE Rinse and fill
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	360.00 min	BI:C6	BO:C6	5.00 Min ramp, normal polarity	Conditioning by voltage
6	5.00	Autozero						
7	360.00	End						
8								

Figure 4: Capillary equilibrium time program

Zolmitriptan separation was achieved as follows:

1. 3 min rinse at 20 psi of water
2. 5 min rinse at 20 psi of 0.1 N orthophosphoric acid
3. 5 min rinse at 20 psi with 0.1 N HCl
4. 7 min rinse and fill at 20 psi using running buffer
5. Hydrodynamic sample introduction at 1.0 psi for 5 secs
6. Buffer plug at 0.5 psi for 5 sec
7. Separation at 15.0 kV for 40 min (250 V/cm)

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	3.00 min	BI:A1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 7	Water Rinse
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:F1	BO:F1	forward, In / Out vial inc 7	0.1N O Phosphoric Acid
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 7	0.1N Hcl Rinse
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	7.00 min	BI:D1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 7	BGE Rinse and Fill
5		Inject - Pressure	1.0 psi	5.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	Sample Inject
6		Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	BI:B1	BO:C1	No override, forward, In / Out vial inc 7	Water Plug
7		Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 7	Capillary ends Wash
8	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	40.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 7	Separation
9	5.00	Autozero						
10	40.10	End						
11								

Figure 5: Zolmitriptan separation time program

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	0.00	Separate - Pressure	30.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	Water Rinse
2	5.01	Wait		0.00 min	BI:B1	BO:A1		
3	5.05	Lamp - Off						
4	5.06	End						

Figure 6: Shutdown time program

p4

Peak Integration

To take full advantage of the software's ability to analyze data as it is acquired, a few parameters need to be set in the 32 Karat™ software. The integration parameters optimized for the analysis of Zolmitriptan are shown in Figure 7.

#		Event	Start Time	Stop Time	Value
1	☑	Width	0.000	0.000	0.5
2	☑	Threshold	0.000	0.000	2500
3	☑	Integration Off	0.000	15	0
4	☑				

Figure 7: Peak integration parameters for analysis of zolmitriptan

Results and Discussion

System Suitability

Per United States Pharmacopoeia, the system suitability solution must be run with a minimum of 3 replicates and standard solution with a minimum of 6 replicates in each sequence or batch.

Resolution should be not less than 1.5 between zolmitriptan and zolmitriptan *(R)*-isomer peaks in all of the system suitability solution injections.

Relative standard deviation should be not more than 5% for the peak response ratio of zolmitriptan and tryptamine peaks in the replicate standard solution injections.

Figure 8 shows an electropherogram generated by analysis of the system suitability solution – 0.01 mg/mL, zolmitriptan *(R)*-isomer, zolmitriptan related compound F, zolmitriptan related compound G, tryptamine; 1 mg/mL zolmitriptan.

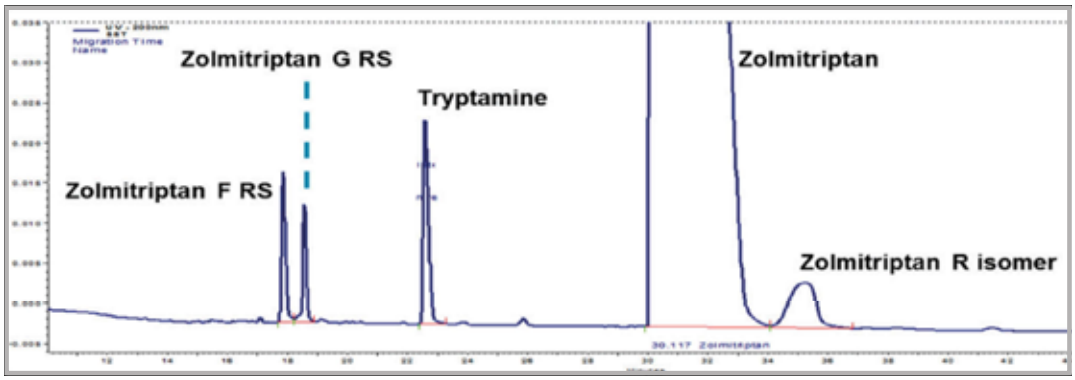


Figure 8: Electropherogram of system suitability solution

The Peak ID table was set as shown in Figure 9 so the software could annotate the peaks.

Named Peaks | Groups

#		Name	ID	Mig. Time	MT Window	Ref. ID #	ISTD. ID #
1	☑	Zolmitriptan related Comp F	1	18.05	0.9025	0	0
2	☑	Zolmitriptan related Comp G	2	18.7542	0.937708	0	0
3	☑	Tryptamine	3	22.8083	1.14042	0	0
4	☑	Zolmitriptan	4	30.5	1.525	0	0
5	☑	Zolmitriptan R isomer	5	35.5542	1.77771	0	0
6	☑						

Figure 9: Peak ID table.

Table 3 lists the resolution between zolmitriptan, zolmitriptan *(R)*-isomer, zolmitriptan related compounds, and the internal standard. The system passed the USP system suitability requirements.

Name	Migration Time (MT)	Relative MT	Resolution (USP)	Area	Corrected Area
Zolmitriptan Related Compound F	17.183	0.611	0.000	140359	5473
Zolmitriptan Related Compound G	17.738	0.631	2.824	86931	3284
Tryptamine	21.262	0.756	15.095	281104	8858
Zolmitriptan	28.108	1.000	4.306	22747153	542209
Zolmitriptan (R)-Isomer	32.779	1.166	**2.12**	275765	5637

Table 3: Result table of system suitability injections. Highlighted (bold) is the resolution of zolmitriptan *(R)*-isomer with respect to zolmitriptan. USP minimum is 1.5.

Figure 10 shows an overlay of 6 replicates of standard solution injections. Table 4 presents the numerical results. The system passed the USP requirements.

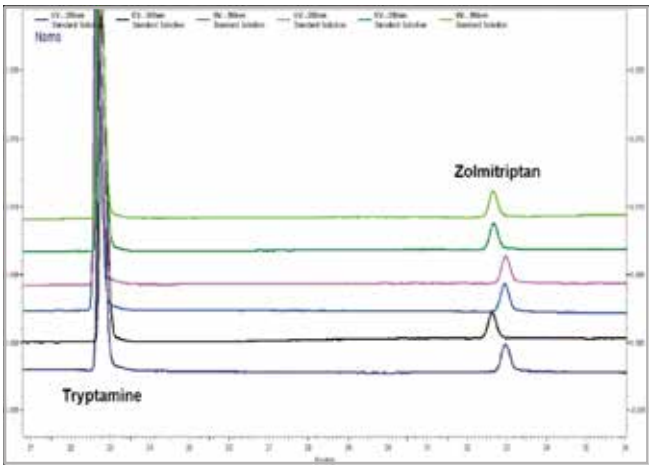


Figure 10: Overlay of 6 replicate injections of standard solution.

Sample Number	Name	Area	Corrected Area	Peak Response Ratio Area	Peak Response Ratio Corrected Area	Area SD	Area % RSD	Corrected Area SD	Corrected Area % RSD
1	Tryptamine	313601	9229	10.243	14.838	0.2	**2.4**	0.3	**1.9**
	Zolmitriptan	30616	622						
2	Tryptamine	306957	9009	9.735	14.143				
	Zolmitriptan	31530	637						
3	Tryptamine	305398	8968	9.831	14.280				
	Zolmitriptan	31065	628						
4	Tryptamine	297059	8757	10.192	14.644				
	Zolmitriptan	29145	598						
5	Tryptamine	294063	8665	10.214	14.686				
	Zolmitriptan	28789	590						
6	Tryptamine	291943	8625	10.287	14.744				
	Zolmitriptan	28380	585						

Table 4: Results from 6 replicate injections of standard solution. Area and corrected area %RSDs are highlighted (bold). USP maximum is 5%.

Sample Analysis

Data from the standard solution and sample solution were processed using the following formula to calculate the corrected peak responses:

Corrected Peak Response = (r/m)

Where:

r = peak response

m = migration time of the peak (min)

The percentage of each impurity was calculated by:

% Impurity = (R_u/R_S) X (C_s/C_u) X (1/F) X 100

Where:

R_u = corrected peak response ratio of the impurity to the internal standard from the *sample solution*

R_S = corrected peak response ratio of zolmitriptan to the internal standard from the *standard solution*

C_S = concentration of USP zolmitriptan in the *standard solution* (mg/mL)

C_U = concentration of zolmitriptan in the *sample solution* (mg/mL)

F = relative response factor for the corresponding impurity peak

Name	Relative Migration Time	Relative Response Factor	Acceptance Criteria NMT (%)
Zolmitriptan Related Compound F	0.68*	0.39	1.2
Zolmitriptan Related Compound G	0.71*	0.63	0.1
Tryptamine	0.78*	1.0	-
Zolmitriptan	1.0	-	-
Zolmitriptan (R)-Isomer	1.07*	1.0	0.2
Any individual unspecified impurity	-	1.0	0.1

* RMTs will vary depending on the pH, concentration of separation buffer, conditioning and length of capillary.
Disregard peak due to Zolmitriptan related compound E.
Disregard peaks less than 0.10% of the area of the principal peak from the sample solution.

Table 5: Acceptance criteria as per USP 39–NF 34 (8184)

Conclusion

Separation and measurement of zolmitriptan enantiomers are necessary for quality control and for related pharmaceutical and biological study of this drug. Capillary electrophoresis technology can be readily applied to determine enantiomeric purity of zolmitriptan, even in the presence of its potential process-related impurities. Using the United States Pharmacopoeia CZE method, the P/ACE™ MDQ Plus System provided the resolution and reproducibility needed to separate the zolmitriptan enantiomers and meet USP requirements.

References

1. Muzaffar Khan, K.V.S.R.Krishna Redd, P.K.Dubey and B.Mallikarjuna Rao. Analytical Chemistry an *Indian Journal* vol 10, issue 10 (2005) pages 676-682
2. M.K. Srinivasu, B. Mallikarjuna Rao, G. Sridhar, K.B. Chandrasekhar, P. Rajender Kumar. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 796–800
3. 2016 U.S. Pharmacopoeia-National Formulary Pending Monograph Draft 1—For Public Comment SM4: H. Ramanathan, R. Ravichandran. Correspondence Number—C86196
4. 2016 U.S. Pharmacopoeia-National Formulary [USP 39 NF 34]. Volume 1, Pages 8184-8185

Who is SCIEX? SCIEX company's global leadership and world-class service and support in the capillary electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry industry have made it a trusted partner to thousands of the scientists and lab analysts worldwide who are focused on basic research, drug discovery and development, food and environmental testing, forensics and clinical research.

Contact Us: sciex.com/contact-us

Estimation of Almotriptan-Related Impurities by Capillary Zone Electrophoresis

SCIEX PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System

Abel Shalom, Prashant Dour, Dilip Reddy, Manoj Pillai
SCIEX, Gurgaon, Haryana, India

Overview

Almotriptan malate is a selective serotonin 5-HT1B/1D agonist belonging to the class of second-generation triptans. It is used for acute treatment of the headache phase of migraine attacks[1]. Impurities commonly associated with almotriptan malate include: almotriptan N-dimer and almotriptan-related impurities B, C, and D [2]. For quality control, pharmaceutical research, and biological studies, it is essential that researchers have an accurate and robust method for detecting and measuring these impurities to ensure the almotriptan meets established standards. Capillary electrophoresis features outstanding resolving power and demonstrated robustness, repeatability, and reproducibility. It can readily be applied to detect almotriptan impurities.

This note demonstrates measurement of almotriptan and almotriptan impurities by capillary zone electrophoresis (CZE). It shows successful execution of the United States Pharmacopoeia (USP) capillary electrophoresis method for estimation of almotriptan impurities on a SCIEX PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System. The system met the suitability standards established by the USP. Obtained relative migration times (RMTs) were comparable to USP RMTs and consistent over multiple runs.

Key Features

- Capillary zone electrophoresis offers excellent compound resolution and is highly effective at separating impurities
- In many cases, capillary electrophoresis can provide greater resolution than liquid chromatography
- With a well-designed method, capillary electrophoresis also has very good repeatability and reproducibility
- The PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System features, as standard, temperature control of both the sample and capillary, greatly enhancing analytical reproducibility



Figure 1. The SCIEX PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System

Table 1. Results from 6 replicate injections of standard solution. % RSD is highlighted (bold). USP maximum is 5%.

4-Hydroxy-4-phenylpiperidine (IS)			Almotriptan			IC/Ref STD
#	RT	Area	#	RT	Area	
1	25.521	8095	1	32.742	11916	0.68
2	25.546	9852	2	32.742	14087	0.7
3	25.508	9928	3	32.675	15010	0.66
4	25.433	9942	4	32.567	14075	0.71
5	25.229	13539	5	32.179	19782	0.68
6	25.225	11712	6	32.217	16440	0.71
		% RSD				**2.8**

Experimental

Materials

Table 2. Chemical supplies

Reagent/Material	Catalog Number	Vendor
Almotriptan malate RS	*1013512*	*USP*
Almotriptan-related compound B	*1013545*	*USP*
Almotriptan-related compound C	*1013556*	*USP*
Almotriptan-related compound D	*1013567*	*USP*
4-Hydroxy-4-phenylpiperidine	*H 52201*	*Merck*
Phosphoric acid	*W 290017*	*Merck*
Triethanolamine	*90279*	*Merck*
Sodium hydroxide	*S 8045*	*Merck*
Methanol	*34860*	*Merck*
HPLC Grade water	*34877*	*Merck*

Table 3. Vials, parts and other supplies

Material	Catalog Number	Vendor
Universal vials (pkg of 100)	A62251	SCIEX
Universal vial caps (pkg of 100)	A62250	SCIEX
Nanovial (qty 100)	5043467	SCIEX
Capillary – 75 µm ID, 111 cm	360800	SCIEX
Cartridge assembly	144738	SCIEX
15 & 50 mL conical-bottom tubes	NA	NA
Assorted pipettes and tips	NA	NA
Microcentrifuge vials	NA	NA
3 mL syringe with needle	NA	NA
0.5 mL centrifuge vials	NA	NA
0.45 µm syringe filters	4497	Pall Corp

Reagent and Sample Preparation

Internal standard stock solution: The 4-hydroxy-4-phenylpiperidine internal standard stock solution was prepared by dissolving 0.1 mg of 4-hydroxy-4-phenylpiperidine in 1:1 methanol:water (diluent) made to a total volume of 10 mL.

Standard stock solutions: Almotriptan stock solution was prepared by dissolving 0.5 mg of USP almotriptan malate RS in 1:1 methanol:water, made to a total volume of 1 mL.

Standard solution: Standard stock solution was prepared by diluting almotriptan standard stock solution in internal standard solution to a final concentration 0.005 mg/mL. This was filtered by passing through a suitable filter of 0.45 µm pore size.

System suitability solution: System suitability solution was prepared by diluting almotriptan-related compounds B, D, and RS, and almotriptan standard stock solution in internal standard solution to a final concentration 0.005 mg/mL. This was filtered by passing through a suitable filter of 0.45 µm pore size. Almotriptan N-dimer was not available for this experiment.

Sample solution: Sample solution was prepared by dissolving 2.5 mg of almotriptan malate in 1 mL of internal standard solution. The solution was sonicated to promote dissolution and passed through a suitable filter of 0.45 µm pore size.

CZE running buffer: Phosphoric acid was dissolved in water to a concentration of 23.5 g/L. The pH of the solution was adjusted to 3.0 using triethanolamine (TEA). This was filtered by passing through a suitable filter of 0.45 µm pore size.

System Set Up and Configuration

All experiments were performed on a PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System (SCIEX, Framingham, MA, USA), equipped with a UV detector and 214 nm filter. The capillary was a 75 µm ID uncoated fused silica capillary with 60 cm total length. The cartridge detection window aperture was 100 x 200 µm. The instrument was controlled by 32 Karat™ software.

Capillary/Sample Storage/Peak Detection Initial Conditions (Figure 2)

Initial conditions for the capillary, sample storage, and peak detection are listed below and in Figure 2.

Voltage maximum: 30.0 kV;
Current maximum: 300 µA;
Cartridge temperature: 25.0° C;
Sample storage: 15.0° C;
Peak detection threshold: 2
Peak width: 9
Analog output scaling: 1

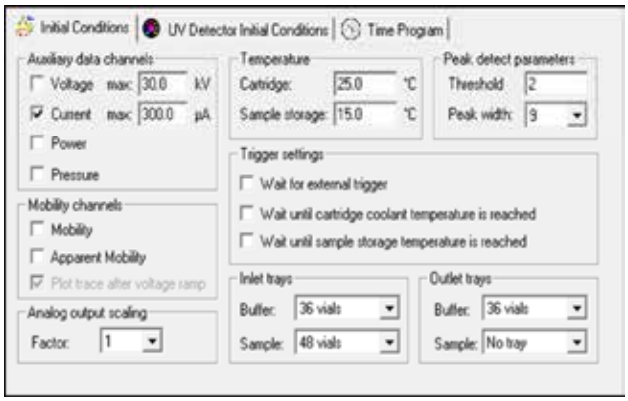


Figure 2. Initial conditions for capillary, sample storage, and peak detection.

UV Detector Initial Conditions (Figure 3)

Initial conditions for the UV detector are listed below and in Figure 3.

Acquisition: Enabled
Wavelength of 214 nm
Data rate: 4 Hz
Filter: Normal
Peak width (points): 16–25
Absorbance signal: Direct

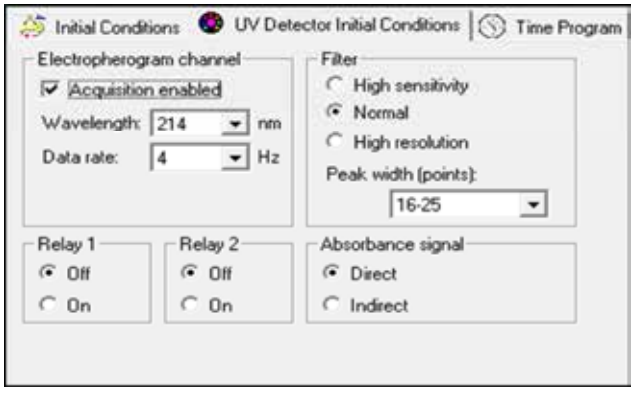


Figure 3. Initial conditions for the UV detector.

Separation Methods

Three methods were created in 32 Karat™ software: capillary equilibration, almotriptan separation, and shutdown (programs depicted in Figures 4, 5, and 6, respectively).

Capillary equilibration (Figure 4)

1. Rinse with water at 20 psi for 5 min
2. Rinse with 0.1 N NaOH at 20 psi for 10 min
3. Rinse with run buffer (background electrolyte, BGE) at 20 psi for 10 min rinse
4. Voltage equilibrium at 15 kV for 30 min

Almotriptan separation (Figure 5)

1. Rinse with water at 20 psi for 3 min
2. Rinse with 0.1 N NaOH at 20 psi for 5 min
3. Rinse with run buffer (background electrolyte, BGE) at 20 psi for 7 min
4. Hydrodynamic sample introduction at 0.5 psi for 8 secs
5. Buffer plug at 0.5 psi for 3 secs
6. Separation at 15.0 kV for 45 min (250 V/cm)

Peak Integration (Figure 7)

To take full advantage of the software's ability to analyze data as it is acquired, a few parameters need to be set in the 32 Karat™ software. The integration parameters optimized for the analysis of almotriptan are shown in Figure 7.

Data Analysis

Data from the standard solution and sample solution were processed using the following formula to calculate the corrected peak responses2. Acceptance criteria are listed in Table 4.

Corrected peak response = (r/m)
Where:
r = peak response
m = migration time of the peak (min)

The percentage of each impurity was calculated by:
% Impurity = $(R_u/R_S) \times (C_s/C_u) \times 100$
Where:
R_u = corrected peak response ratio of the impurity to the internal standard from the sample solution
R_S = corrected peak response ratio of almotriptan to the internal standard from the standard solution
C_S = concentration of USP almotriptan malate RS in the standard solution (mg/mL)
C_U = concentration of USP almotriptan malate RS in the sample

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:A1	BO:B1	forward	Water Rinse
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1N NaOH Rinse
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	BGE Rinse
4	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, normal polarity	Voltage Equilibrium
5	5.00	Autozero						
6	30.00	End						
7								

Figure 4. Capillary equilibrium method

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	3.00 min	BI:A1	BO:B1	forward	Water Rinse
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1N NaOH Rinse
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	7.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	BGE Rinse
4		Inject - Pressure	0.5 psi	8.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	Sample Injection
5		Inject - Pressure	0.5 psi	3.0 sec	BI:B2	BO:C1	No override, forward	Buffer Injection/Plug
6	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	45.00 min	BI:C1	BO:C1	0.17 Min ramp, normal polarity	Voltage Equilibrium
7	1.00	Autozero						
8	45.00	End						
9								

Figure 5. Almotriptan separation method

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	0.00	Separate - Pressure	30.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	Water Rinse
2	5.01	Wait		0.00 min	BI:B1	BO:A1		
3	5.05	Lamp - Off						
4	5.06	End						

Figure 6. Shut down method

#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Width	0.000	0.000	0.5
2	Threshold	0.000	0.000	2500
3	Integration Off	0.000	15	0
4				

Figure 7. Peak integration parameters for analysis of almotriptan

Table 4. Acceptance criteria, as per USP IRA-1-May-2017

Name	Relative MT	Acceptance Criteria NMT (%)
Almotriptan N-dimer	0.71	0.3
Internal standard	0.78	-
Almotriptan related compound B	0.92	-
Almotriptan	1.00	-
Almotriptan related compound C	1.02	-
Almotriptan related compound D	1.22	0.1
Any individual unspecified impurities	-	0.1

Results and Discussion

As per United States Pharmacopoeia, the resolution should be not less than 2.0 between almotriptan-related compound B and almotriptan peaks and should not be less than 2.0 between almotriptan-related compound D and almotriptan peaks in all the system suitability solution injections. Relative standard deviation should not be more than 5.0% for the peak response ratio of almotriptan and 4-hydroxy-4-phenylpiperidine (internal standard) peaks in the replicate standard solution injections. Figure 8 shows an electropherogram generated by analysis of the 0.005 mg/mL system suitability solution containing almotriptan related-compound B, almotriptan-related compound D, 4-hydroxy-4-phenylpiperidine (internal standard), and almotriptan RS.

Table 1 lists the resolution between almotriptan standard, almotriptan-related compound B, almotriptan-related compound D, and the internal standard. The system passed the USP system suitability requirements. Figure 9 shows an overlay of 6 replicates of standard solution injections. Table 1 presents the numerical results. The system passed the USP requirements.

Figure 8: Electropherogram of system suitability solution.

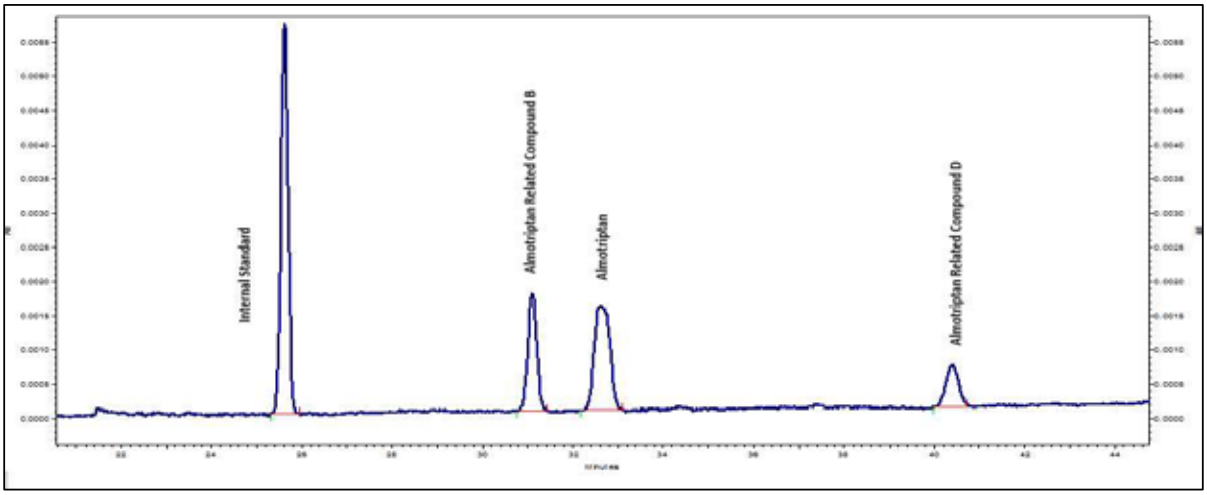


Table 5. Results of system suitability injections

Injection Number	Sample Name	Migration Time (MT)	Relative MT	Corrected Area	Resolution (USP)	Area ratio of IS/Standard
1	Internal standard	25.354	0.78	15198	0.00	0.33
	Almotriptan- related compound B	30.942	0.95	24474	16.6	
	Almotriptan standard	32.575	1.00	46054	3.4	
	Almotriptan-related compound D	40.167	1.23	27268	13.7	
2	Internal standard	25.321	0.78	13708	0.00	0.325
	Almotriptan-related compound B	30.875	0.95	21866	16.6	
	Almotriptan standard	32.508	1.00	42214	3.4	
	Almotriptan-related compound D	40.296	1.24	25402	13.9	
3	Internal standard	25.467	0.78	8166	0.00	0.326
	Almotriptan-related compound B	31.133	0.95	12874	16.3	
	Almotriptan standard	32.817	1	25033	3.4	
	Almotriptan- related compound D	40.808	1.24	14723	13.7	
		% RSD				**0.83**

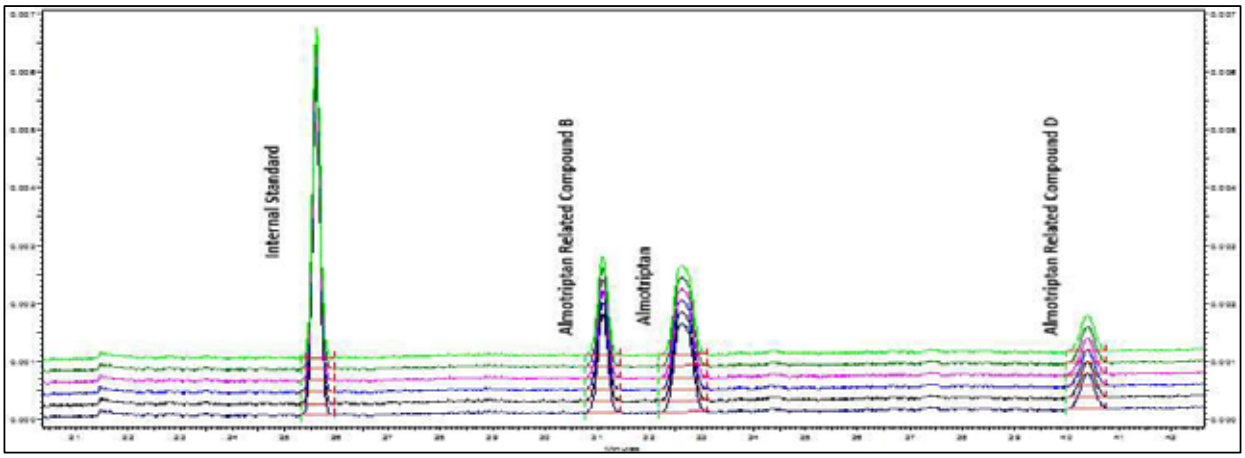


Figure 9. Overlay of 6 replicate injections of system suitability solution.

Conclusion

Separation and measurement of almotriptan impurities is necessary for quality control and for pharmaceutical and biological study of this drug. Capillary electrophoresis technology can readily be applied to determine almotriptan impurities. This study, demonstrated the measurement of almotriptan-related impurities B and D. Using the United States Pharmacopoeia capillary electrophoresis method, the PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System provided the resolution and reproducibility needed to separate the impurities and met the USP suitability standards. Obtained relative migration times (RMTs) were comparable to USP RMTs and consistent over multiple runs.

References

1. Orlandini S, *Journal of Chromatography*. **2014**. 1339 (200-209)
2. Almotriptan / *USP Official Monograph, Interim Revision Announcement*. Official May 1, 2017

毛细管电泳-间接紫外检测法对药物反离子的分析

C Boardman[1], J Dewald[1], JB Falmagne[2], F de l'Escaille[2]
1 Sciex, Brea, CA
2 Analis R&D Diag. Namur, Belgium

1. 摘要

毛细管电泳（Capillary Electrophoresis, CE）- 间接紫外检测法是一种对反离子分析的有效手段。CE的特点是分析速度快，样品和试剂消耗量小，产生的废液少，且能够针对复杂样品基质进行分析。这些特点使其成为离子色谱理想的替代或补充分析技术。在该项研究中，我们展示了基于CE-间接紫外检测法，对常见的有机和无机反离子分析的方法。同时我们考察了其线性范围和检出限。此外，我们将样品离子溶于常用于提高药物稳定性的有机溶剂中，来考察该方法定量的准确性。

2. 材料与方法

采用配备有紫外检测器的 PA800 系列毛细管电泳分析系统，数据分析和采集均使用 32 Karat 软件。阳离子和阴离子分析方法均参照 SICEX 相关试剂盒操作手册。阳离子分析试剂盒和阴离子分析试剂盒的货号分别为 PN A53537 和 PN53540。相关运行法法可参见图 1 和图 2。

所有购买的药物均采用二次去离子水（DDI）进行溶解和稀释，并用 0.2 µm 的滤头进行过滤。除了酒石酸麦角胺（ergotamine tartrate）和硫酸阿托品（atropine sulfate）溶于二甲亚砜（DMSO）并用水稀释。钠盐和氯化物的标准曲线计算，是通过将 0.5 g NaCl 溶于 100 mL 过滤后的二次去离子水中，进行一系列浓度的稀释得到的。三氟乙酸（TFA）的储备液浓度为 9700 ppm。每种物质的标准曲线均采用 10 个浓度进行线性拟合，每个浓度下重复运行 5 针。积分是根据均软件内置的积分参数来进行自动积分。

为了验证有机溶剂对阴离子分析的影响，该样品时通过下列步骤配制的：将 4.6 g 85%磷酸、15.7 g 25%硫酸、120 g 二次去离子水、54 g 二环己基胺、1.5 g 酒石酸、1.18 g 琥珀酸和 1.07 g 丙二酸混合，并加入二次去离子水使其至 200 g。将上述溶液过滤后，取 200 µL 溶液稀释到 20 mL（用水稀释）。有机溶剂作为溶液的测试采用 SCIEX P/ACE™ MDQ 系列毛细管电泳分析。

初始条件	阴离子	阳离子
毛细管内径	75 µm	75 µm
毛细管有效长度	50 cm	50 cm
毛细管柱温	25 ℃	25 ℃
样品存储室温度	25 ℃	25 ℃
间接紫外检测波长	230 nm	200 nm
电极方向	反向	正向

图1 反离子分析的初始条件

3. 结果

阴离子分析时间程序方法		
冲洗 Anion Dynamic Capillary Coating Solution	20 psi	30 s
冲洗 Anion Separation Buffer	20 psi	30 s
进样	0.5 psi	8 s
进水塞	0.1 psi	1 s
分离（反向电压）	20 kv	8 min
自动归零	1.25 min 后	
停止采集数据	8 min 后	
冲洗 Conditioner Na	20 psi	30 s
冲洗 Rinse Solution	20 psi	30 s
结束		

图 2（A）阴离子分析时间程序方法

阳离子分析时间程序方法		
冲洗 **Cation Dynamic Capillary Coating Solution**	**20 psi**	**30 s**
冲洗 **Cation Separation Buffer**	**20 psi**	**90 s**
沾水	**12 s**	
进样	**0.5 psi**	**5 s**
进水塞	**0.1 psi**	**10 s**
分离（正向电压）	**30 kv**	**5 min**
自动归零	**2 min** 后	
停止采集数据	**5 min** 后	
冲洗 **Conditioner Na**	**20 psi**	**30 s**
冲洗 **Rinse Solution**	**20 psi**	**30 s**
结束		

图**2**（**B**）阳离子分析时间程序方法

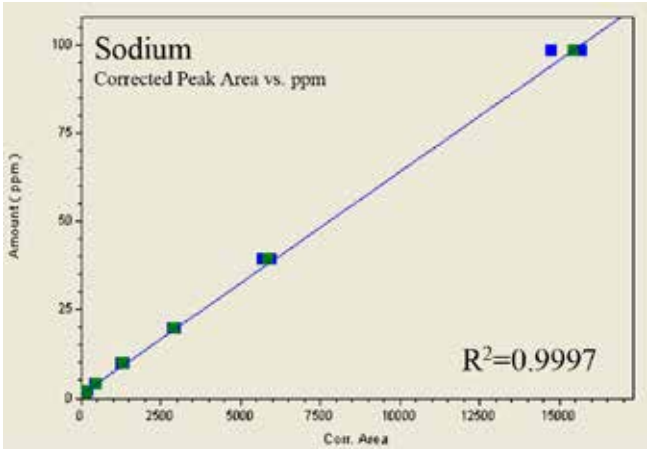


图**3** 钠离子线性回归曲线（采用阳离子分析试剂盒）。线性范围为**1-100 ppm**。峰面积计算采用软件中内置积分参数进行自动积分。

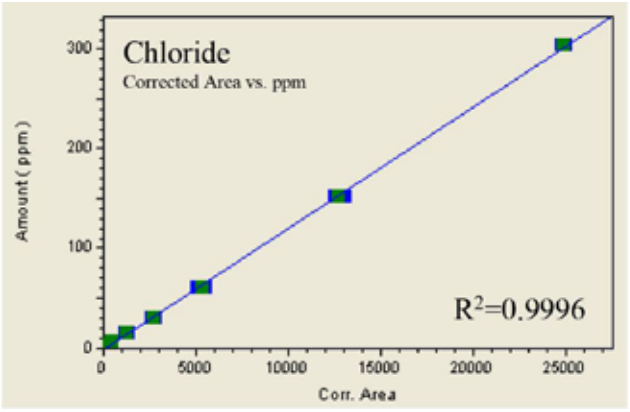


图**4**（**A**）氯离子线性回归方程（采用阴离子分析试剂盒）。线性范围为**1.5-300 ppm**。峰面积计算采用软件中内置积分参数进行自动积分。

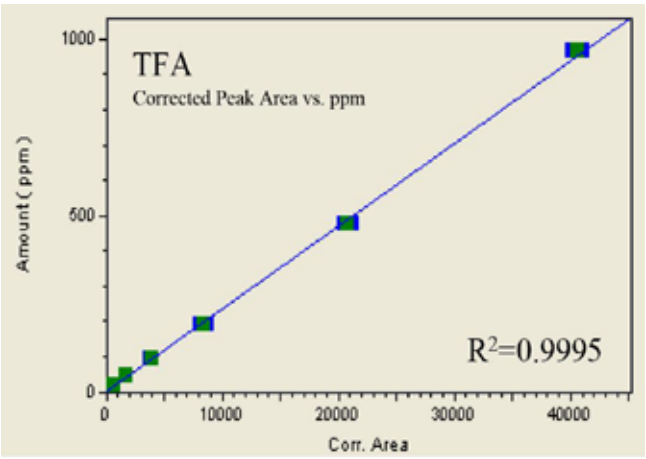


图**4**（**B**）**TFA**线性回归方程（采用阴离子分析试剂盒）。线性范围为**4.85-970 ppm**。峰面积计算采用软件中内置积分参数进行自动积分。

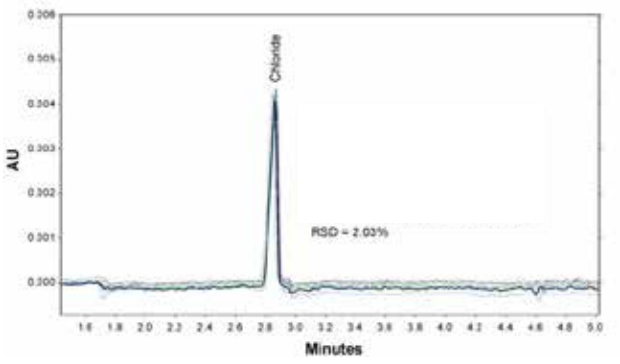


图5（A）采用阴离子分析试剂盒对样品进行化学计量学分析。分别对两个进样小瓶中的3-多巴胺-HCl重复五针进行实验。将得到的10个数据进行叠图。其中，理论浓度为50 ppm，检测到浓度为48.87 ppm。其RSD为2.03%。

初始条件	阴离子	阳离子
3-多巴胺- HCl	48.8717	2.03
甲氧胺-HCl	47.492	3.48
肾上腺素- HCl	48.707	3.04

N=10 每个样品配置于两个进样品，每个进样品连续进样 5 针

图5（B）3-多巴胺- HCl、甲氧胺-HCl、肾上腺素- HCl相关数据结果。

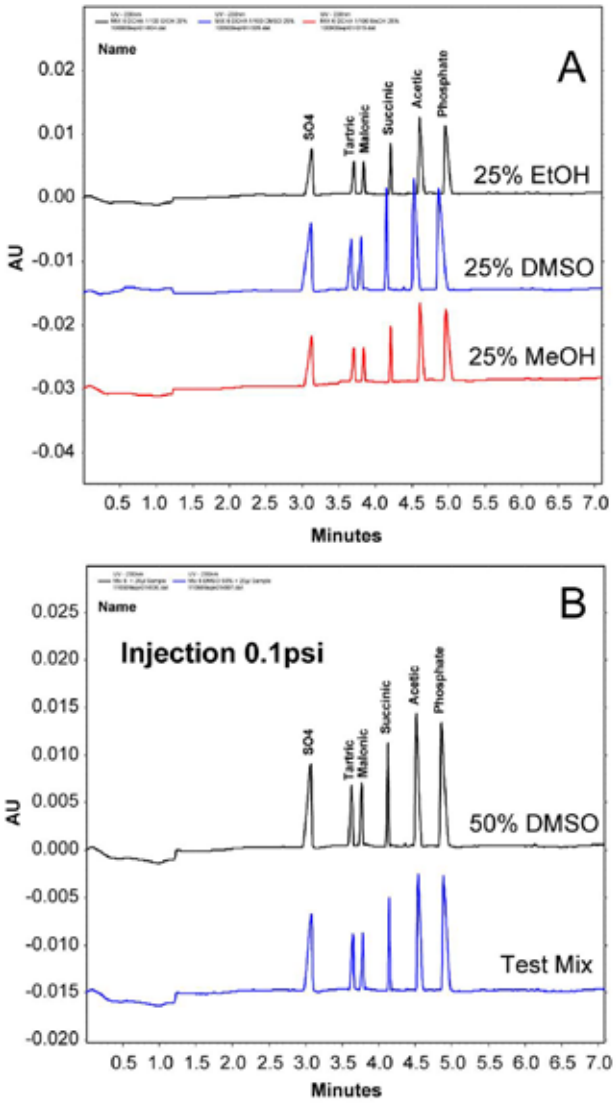


图6（A）有机阴离子分析。测试混合物分别溶于含有25%的有机溶剂（EtOH、MeOH和DMSO）。进样样品的制备文章第2部分已经介绍。（B）样品混合物分别用水和50%的DMSO稀释并进行分析。进样方式为0.1 psi压力进样8 s。进样样品的制备文章第2部分已经介绍。同时向其中加入20 µL的阴离子储备液。

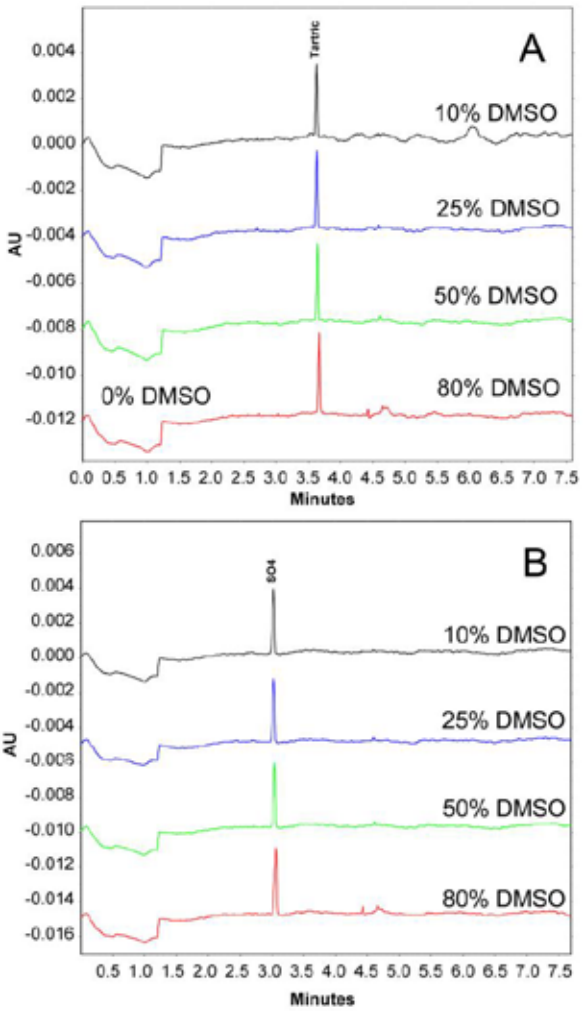


图7 两种在水中溶解度较低的药物反离子分析。酒石酸麦角胺（ergotamine tartrate）和硫酸阿托品（atropine sulfate）。浓度为2 mM，溶于80% DMSO。

4. 分析与讨论

根据阴离子分析试剂盒指导，氯离子和TFA分别在浓度1.5-300 ppm和4.85-970 ppm的范围内呈良好的线性关系，其线性回归系数均大于0.999。检出限LOD和定量限LOQ分别采用S/N=3和S/N=10来计算，得到最终氯离子的检出限和定量限分别为0.6 ppm和5 ppm，TFA的检出限和定量限分别为1 ppm和5 ppm（图3）。钠离子的线性回归范围为1-100 ppm，其检出限和定量限分别为1 ppm和4 ppm（图4）。采用阴阳离子试剂盒对相关药物样品的分析结果如图5所示。采用阴离子试剂盒中的标准方法，对溶解于25%有机溶剂（EtOH、MeOH和DMSO）的测试混合物进行的分析结果如图6所示。然而，通过简单降低进样压力来减少样品区带的长度，该方法能够分析DMSO含量在50%的样品混合物（图6B）。酒石酸麦角胺（ergotamine tartrate）和硫酸阿托品（atropine sulfate）是两种在水中溶解度较低的两种药物，采用该方法分析时，有机溶剂DMF（未列出）或DMSO在样品混合物中能够达到80%。

5. 结论

毛细管电泳-间接紫外检测法是一种适用于药物反离子分析的有效手段。氯离子、TFA和钠离子的线性范围分别为1.5-300 ppm、4.85-970 ppm和1-100 ppm。相关计算结果与理论预测相一致。更进一步的，相关研究内容表明，通过对标准方法的进样方式稍加改进，能够分析的样品溶液中的有机溶液的浓度能够达到80%。

参考文献

1. Altria K, Goodall D, Rogan M. Quantitative determination of drug counterion stoichiometry by capillary electrophoresis. (1994) *Chromatographia* 38 (9-10) 637-42

2. Little M. Quantifying Counterions in Drug Discovery (2002) *Beckman Coulter PACE Setter* 6 (2) 1.

3. Jidimar M, DeSmet M, Sneyers R, Van Ael W, Janssens W, Redlich D, Cockaerts, P. Capillary

4. Electrophoresis as an orthogonal technique in HPLC method variation. (2003) *Journal of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology* 8(3-4) 45-52

5. Sazelova P, Kasicka V, Solinova V, Dusan K. Determination of purity degree and counterion content in lecirelin by capillary zone electrophoresis and capillary isotachophoresis. (2006) *Journal of Chromatography* B 841(1-2)145-151

6. Little M. Quantifying trifluoroacetic acid as a counterion in drug discovery by 19FNMR and capillary electrophoresis. (2007) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43(4) 1324-30.

7. Zhou, L Dovletoglou, A. Practical capillary electrophoresis method for the quantitation of the acetate counter-ion in a novel antifungal lipopeptide. *Journal of Chromatography* A (1997) 279-284.

Denis, CM Baryla, NE Determination of piperazine in pharmaceutical drug substances using capillary electrophoresis with indirect UV detection. (2006) *Journal of Chromatography* A 1110(1-2) 268-271.

8. Altria K, Marsh A, Sanger-van de Griend C. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. (2006) *Electrophoresis* 27 2263-2282

9. Rocheleau MJ, Analytical Methods for the Determination of Counterions in Pharmaceutical Salts (2008) *Current Pharmaceutical Analysis* 4, 25-32.

10. Foret F. Capillary electrophoresis of small ions using complex formation and indirect detection (2009). *Electrophoresis* 30, S34-S39

11. Johns C, Breadmore M, Mirek M, Marketa R, Haddad P. Recent significant developments in detection and method development for the determination of inorganic ions by CE. (2009) *Electrophoresis* 30 S53-S67

CE-SDS方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析

Quantification of Whey Protein Content in Infant Formula by CE-SDS

高铁1，陈泓序[1]，吴建华[1]，冯憑[2]
Gao Tie[1], Chen Hongxu[1], Wu Joshua[1], Feng Ping[2]

[1] *SCIEX，中国；*[2] *惠氏营养，中国*
[1] *SCIEX, China;*[2] *Wyeth, China*

Key words: capillary electrophoresis, infant formula, content of whey protein, SDS

1. 前言

乳清蛋白作为一组从乳清中分离出来的球状结构的蛋白，是人体生长、发育、增强机体抵抗力首选的蛋白来源，也是婴儿配方奶粉中重要配方成份。

本技术说明采用CE-SDS的方法定量分析乳清蛋白在婴儿配方奶粉的蛋白中百分含量。通过在配方奶粉样品中加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）和β-巯基乙醇，在加热的条件下，蛋白质间的分子间力和二硫键断开，SDS结合到蛋白质分子上，形成带负电的蛋白质与SDS的复合物。该复合物进入填装了分离凝胶的电场后，在电压的驱动下迁移至检测窗口而被检测。奶粉中的乳清蛋白和乳酪蛋白被分离成两组不互相干扰的蛋白质峰组，根据这两组蛋白质组的峰面积，以及乳清蛋白对乳酪蛋白的质量对面积校正系数1.4，利用峰面积归一化法，计算出乳清蛋白在奶粉总蛋白质中的百分含量。

2. 材料和方法

2.1 试剂

SDS-MW分子量分析试剂盒（SCIEX，PN 390953），所含试剂见表1；β-巯基乙醇（Sigma，PN M7154或M6250）；乳品蛋白标准品（Sigma：α-乳白蛋白，L6010；β-乳球蛋白，L3908; 免疫球蛋白，I5506; 牛血清白蛋白，A1933；β-酪蛋白，C6905；αS-酪蛋白，C6780；κ-酪蛋白, C0406；ALAR Ingredient：酪蛋白糖巨肽）和婴儿配方奶粉由国内某厂家提供；去离子水（Millipore）。

2.2 样品前处理

乳品蛋白标准品混合物

根据配方奶粉中的含量比例，取相应质量的蛋白标准品，溶于水中，配置成乳品蛋白标准品混合物。

表1. SDS-MW分子量分析试剂盒。

货 号	项 目
338451	50 µm 内径毛细管
A30341	SDS凝胶缓冲液
A26487	10 kDa 标准品
A22196	不同分子量标准品
	SDS样品缓冲液
	0.1N 碱洗液
	0.1N 酸洗液

婴儿配方奶粉

称取100 ± 4 mg婴儿配方奶粉，置于1.5 mL离心管中，加入水到1 mL刻度，涡旋振荡，至充分溶解并混合均匀。

变性过程

以SDS样品缓冲液与10 kDa Marker为84:1 µL体积比例配置分析预备液，用移液器将10 µL的婴儿配方奶粉和蛋白标准品混合溶液，分别移入至1.5 mL离心管中，然后相继加入85 µL分析预备液、5 µL β-巯基乙醇，混合并涡旋振荡，盖紧瓶盖。在水浴或金属浴中加热样品100 ± 5 ℃ 10 min，冷却样品至室温，列入样品盘。

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	ddH2O rinse to remove the acid residue
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	SDS Gel rinse to fill the capillary
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, reverse polarity, both	SDS Gel for voltage equilibration
6								

图1. 毛细管预平衡程序。

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic increment every 8 runs
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group - Automatic increment every 8 runs
3		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	forward, In / Out vial inc 8	Water rinse to remove the acid residue - Automatic increment every 8 runs
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 8	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel - Automatic increment every 8 runs
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every 8 runs
6		Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every 8 runs
7		Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, reverse polarity	Sample injection
8		Wait		0.00 min	BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over - Automatic increment every 8 runs
9	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 8	SDS Gel for separation - Automatic increment every 8 runs
10	5.00	Autozero						
11								

图 2. 分离程序。

2.3 运行条件及方法

SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统；检测器：PDA，220 nm，采集频率：2 Hz；样品室温度：25 ℃；毛细管温度：25 ℃；窗口狭缝：2号（100 × 200 μm）；毛细管：熔融石英毛细管，50 μm内径，20/30 cm有效/总长。毛细管预平衡和分离时间程序如图1和图2。

3. 数据处理

3.1 积分方法

完成采集后，需要使用32 Karat™软件进行积分处理。首先要进行凯撒积分的关闭，从32 Karat™软件工具栏中以仪器管理员身份登录，然后选择使用的仪器模块，在仪器配置中关闭凯撒积分。

积分乳品蛋白混合物标准品电泳图：对照试剂空白，确定乳清蛋白和乳酪蛋白标准品的位置，进行数据的积分处理。

积分婴儿配方奶粉电泳图：对奶蛋白的第一个乳清蛋白峰组和乳酪蛋白峰组进行自动积分，积分起始时间是10 kDa内标前小峰开始（大约内标前0.4 min），结束时间是酪蛋白结束的位置；根据乳品蛋白混合物标准品所得的酪蛋白组起始和终止的出峰迁移时间，确定酪蛋白峰组。用手动积分从酪蛋白后到第二个乳清蛋白峰组后的基线，得到乳酪蛋白后的相对分子质量高的乳清蛋白。

3.2 含量测定

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在婴幼儿配方奶粉中的含量：

$$Aw.c. = 1.4 \times Aw \quad (1)$$

式中：Aw.c. – 乳清蛋白校正峰面积；

Aw – 总乳清蛋白实测峰面积；

1.4 – 校正因子

$$乳清蛋白含量（\%）= Aw.c./(Aw.c.+Acn) \times 100 \quad (2)$$

式中：Acn – 总乳酪蛋白实测峰面积

4. 结果分析

乳品蛋白标准品混合物

乳清蛋白（α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、酪蛋白糖巨肽、免疫球蛋白和血清白蛋白）和乳酪蛋白（β-酪蛋白，αS-酪蛋白，κ-酪蛋白）标准品的CE-SDS分离结果如图3所示。乳酪蛋白刚好移动到免疫球蛋白的轻链和重链之间，而没有主要乳清蛋白在此间出峰，乳清蛋白组和乳酪蛋白组完全分离，互不干扰。

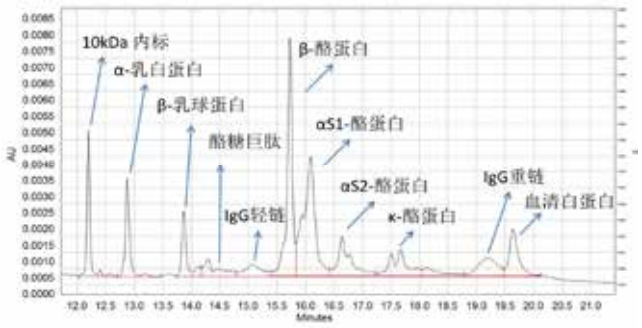


图3. 乳品蛋白标准品混合物CE-SDS分离的电泳图。

婴儿配方奶粉

按照中国国标GB 10765 的定义：婴儿奶粉是“指以乳类及乳蛋白制品为主要原料，加入适量的维生素、矿物质和/或其他成分，仅用物理方法生产加工制成的液态或粉状产品。”婴儿配方奶粉中蛋白的CE-SDS分析电泳图见图4。经计算，此婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量为61.97%。

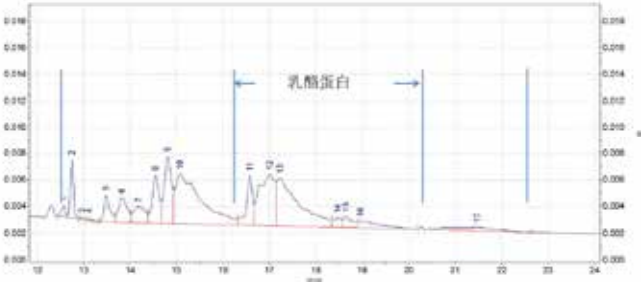


图4. 婴儿配方奶CE-SDS分离的电泳图（图中2号峰为10 kDa内标）。

5. 结论

利用毛细管凝胶电泳（CGE）对乳清蛋白在婴儿配方奶粉的总蛋白中含量的测定，可将乳清蛋白和乳酪蛋白按照峰组进行区分，达到定量乳清蛋白的测定。经过多方验证，方法稳定重现。通过每个厂家的样品测定，结果反馈符合厂家预期，方法可提供准确的婴儿配方奶粉的总蛋白中乳清蛋白含量信息[1]。

参考文献

1. Ping.Feng, Christophe Fuerer, Adrienne McMahon. Quantification of Whey Protein Content in Infant Formulas by Sodium Dodecyl Sulfate-Capillary Gel Electrophoresis (SDS-CGE): Single-Laboratory Validation, First Action 2016.15; Journal of AOAC International Vol. 100, No.2, 2017.

BioPhase™ 8800系统进行婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量的高通量分析

High-throughput purity analysis of whey protein in infant formula on BioPhase™ 8800 system

刘冬科，高铁，陈泓序，郭立海
Liu Dongke, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX，中国
SCIEX, China

关键词： BioPhase™ 8800 系统；CE-SDS；婴儿配方奶粉；乳清蛋白

1. 前言

GB 10765-2021规定一段乳基婴儿配方粉中乳清蛋白含量在总蛋白的比例必须≥60%，SDS-毛细管凝胶电泳法（CE-SDS）乳清蛋白含量分析方面受到广泛关注和应用，AOAC和ISO均已接收CE-SDS作为婴配粉中乳清蛋白含量测定的方法[1-2]。随着婴儿配方奶粉的来源、种类、功能不断增多，乳品行业需要高通量仪器以提高研发、检测分析效率。作为高通量的毛细管电泳分析系统，BioPhase™8800系统能够同时进行8个样品的检测分析，对于CE-SDS乳清蛋白含量分析实验，可在保证分析效果和准确性的前提下，提高大量样本的分析检测效率。

- 同一样品的乳清蛋白含量在BioPhase™8800与PA 800 Plus上结果一致；
- 通量高，速度快，平均每个样品仅用时7 min；
- 同一样品8通道间一致性高，乳清蛋白含量RSD值＜2%；
- 单通道连续6针进样重复性好，乳清蛋白含量RSD值＜2%。

2. 仪器及方法

BioPhase™ 8800系统，配备紫外检测器（UV，波长220 nm），BioPhase软件1.2.20（SCIEX）。用于BioPhase™ 8800系统的熔融石英毛细管卡盒8×30 cm（SCIEX PN 5080121，50 μm 内径，20/30 cm有效/总长）；BioPhase™ 8800系统启动盘套装（SCIEX PN 5080311），包含4块96孔样品盘、4 块缓冲液盘、8块出口盘。

PA 800 Plus药物分析系统，配备紫外检测器（UV，波长220 nm），32Karat软件，窗口狭缝： 2号（100×200 μm），毛细管：熔融石英毛细管，50 μm内径，20/30 cm有效/总长。离心机；分析天平；金属浴/水浴。

BioPhase™ 8800 系统及PA 800 Plus进行乳清蛋白含量分析的CE-SDS分离方法如下，进样：-5kV，20s；分离：15kV，30分钟。针间冲洗方法：碱性冲洗液，70 psi，2min；酸性冲洗液，50psi，2min；DDI Water，50psi，1min；Gel 冲洗：70 psi，4min。数据采集频率：4 Hz；样品室温度：25 ℃；毛细管温度：25 ℃。

3. 试剂及样品

用于BioPhase™ 8800系统的CE-SDS蛋白分析试剂盒（SCIEX PN C30085），包含凝胶缓冲液，样品缓冲液，10 kDa内标，碱性冲洗液，酸性冲洗液，CE级水。2-巯基乙醇（Sigma-Aldrich PN M7154）。一段婴儿配方奶粉为某品牌市售产品。

称取100 ± 4 mg一段婴儿配方奶粉，置于1.5 mL离心管中，加水到1 mL刻度，涡旋振荡至充分溶解，配成浓度为1mg/mL的奶粉溶液。

于1.5 mL离心管中加入840 μL样品缓冲液、10 μL 10 kDa 内标、100 μL奶粉溶液、50 μL β-巯基乙醇，涡旋并混合均匀，盖紧瓶盖。金属浴/水浴中加热样品100 ± 5 ℃ 10 min，冷却至室温，即得。

各取200 µL加入96孔样品盘一列的8个样品孔中，样品摆放见图1。此时8个样品孔中的样品相同， 使用 BioPhase™ 8800仪器及BioPhase软件采集分析，考察单次进样8通道一致性，单通道连续进样6次的重复性。

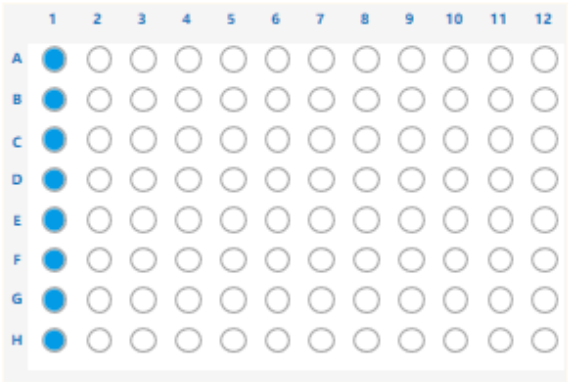


图1. BioPhase™ 8800样品盘摆放

另取100 µL样品，使用PA 800 Plus仪器及32Karat软件采集分析，比较同一样品在BioPhase™ 8800及PA 800 Plus两个仪器上的电泳结果。

4. 结果与讨论

4.1 同一样品使用 BioPhase™ 8800与PA 800 Plus采集的结果分析

对于同一婴儿配方奶粉，使用BioPhase™ 8800进行CE-SDS分析的电泳图见图2a，使用PA 800 Plus进行CE-SDS分析电泳图见图2b，根据之前的研究[3]，划分乳清蛋白和乳酪蛋白区域，进行数据的积分处理。

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在配方奶粉中的百分含量：（1）Aw.c.=1.4 × Aw；（2）乳清蛋白含量（%）=Aw.c./(Aw.c.+Acn) × 100。式中：Aw.c.–乳清蛋白校正峰面积；Aw–总乳清蛋白实测峰面积；1.4–校正因子；Acn–总乳酪蛋白实测峰面积。

对于同一婴儿配方奶粉，使用 BioPhase™ 8800仪器、BioPhase软件积分后计算得乳清蛋白含量为64.49%。使用PA 800 Plus仪器，32Karat软件积分后计算得乳清蛋白含量为64.38%，二者结果一致。

4.2 BioPhase™ 8800多通道重复性结果分析

对8通道的样品同时连续进样6次，考察单次进样8通道间的一致性，单通道连续进样6针的重复性，以10kd作内标对各峰迁移时间进行校正，目标峰校正迁移时间（Cal MT）=目标峰迁移时间/10kd内标峰迁移时间。

单次进样8通道间表现出良好的一致性，电泳图见图2a，乳清蛋白百分含量RSD值均 < 2%。单通道6针重复性好，电泳图见图2b，乳清蛋白百分含量RSD值均 < 2%。对8通道的样品同时连续进样6次共计48针样品中，乳清蛋白含量平均值为64.21%，RSD值2.53%，见表1。

5. 结论

本文提供了在BioPhase™ 8800系统上使用CE-SDS方法进行婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量分析的方法验证：1）同一样品的乳清蛋白含量在BioPhase™ 8800与PA800 Plus上分析结果一致；2）通量高，速度快，平均每个样品仅用时7 min；3）同一样品8通道一致

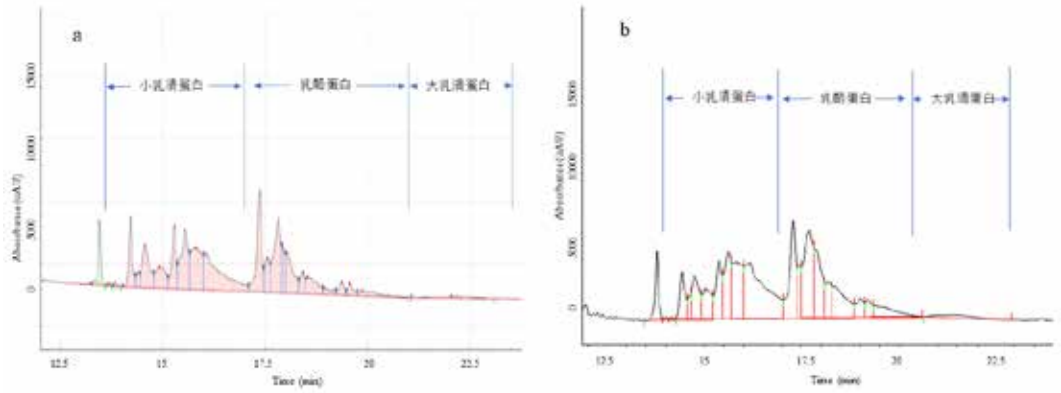


图2. 同一婴儿配方奶粉在不同仪器及软件中进行乳清蛋白含量分析的CE-SDS电泳图（a： BioPhase™ 8800仪器，BioPhase软件，b：PA 800 Plus仪器，32Karat软件）

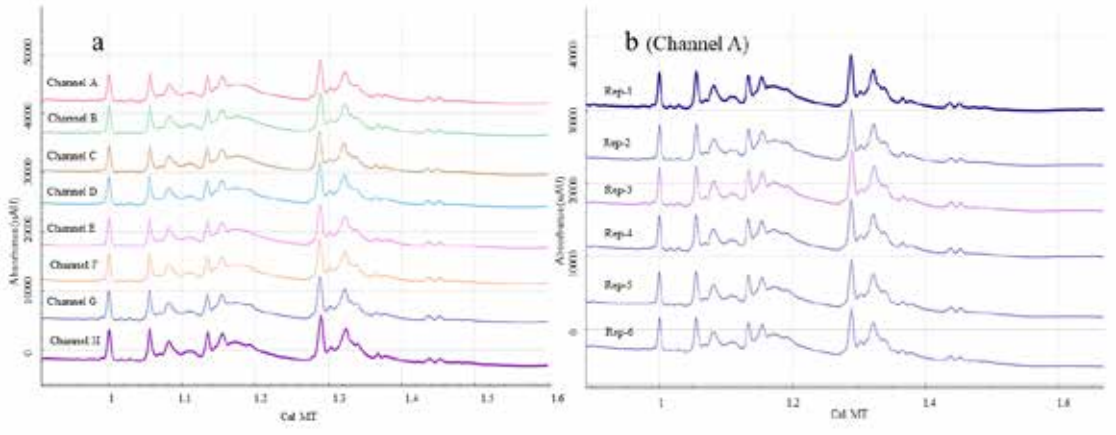


图3. Biophase™ 8800系统使用CE-SDS方法进行婴儿配方奶粉乳清蛋白含量分析的电泳图（a）8通道A-H；（b）A通道重复6针

表1. BioPhase™ 8800 乳清蛋白含量分析的8通道一致性、单通道6针重复性结果

Channel	乳清蛋白含量（%）							
	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-4	Rep-5	Rep-6	Mean	RSD
A	64.49%	66.11%	64.73%	64.32%	64.62%	64.72%	64.83%	0.91%
B	62.93%	63.07%	63.10%	63.93%	64.53%	64.80%	63.73%	1.17%
C	63.71%	63.98%	62.44%	62.78%	63.59%	62.95%	63.24%	0.87%
D	64.17%	65.46%	63 .13%	62.98%	63.68%	63.62%	63.84%	1.28%
E	62.94%	65.50%	62.06%	62.61%	63.07%	63.25%	63.24%	1.71%
F	64.26%	64.90%	62.57%	64.21%	64.37%	64.02%	64.05%	1.12%
G	64.64%	66.98%	64.21%	63.21%	64.26%	64.35%	64.61%	1.78%
H	62.84%	65.62%	63.16%	63.40%	63.37%	64.61%	63.83%	1.52%
Mean	63.75%	65.20%	63.18%	63.43%	63.94%	64.04%	64.21%（48针平均值）	
RSD	1.10%	1.76%	1.33%	0.97%	0.85%	1.03%	2.53%（48针RSD值）	

性高，乳清蛋白含量RSD值＜2%；4 ）单 通道连续6针进样重复性好，乳清蛋白含量RSD值＜2%。当面对不同批次、来源、种类、功能等大量婴儿配方奶粉样品检测时，BioPhase™ 8800系统可在保证分析效果和准确性的前提下，实现大量样品的快速分析，提高检测分析效率。

6. 参考文献

[1] Quantification of Whey Protein Content in Infant Formulas by Sodium Dodecyl Sulfate-Capillary Gel Electrophoresis (SDS-CGE): Single-Laboratory Validation, First Action 2016.15 Journal of AOAC International, DOI: 10.5740/jaoacint.16-0344;

[2] Milk-based infant formula powders- Quantification of whey protein content by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE), ISO 23293:2020(en)

[3] SCIEX Tech Note： CE-SDS方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析（RUO-MKT-02-7649-ZH-B）

BioPhase™ 8800对不同种类乳品中乳清蛋白含量的高通量分析

High throughput analysis of whey protein content in different dairy products

刘冬科，高铁，陈泓序，郭立海
Liu Dongke, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX，中国
SCIEX, China

关键词： BioPhase™ 8800；CE-SDS；婴儿配方奶粉；乳清蛋白

1. 前言

GB 10765-2021规定一段乳基婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量应≥60%，GB 10766-2021规定二段乳基婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量应≥40%。SDS-毛细管凝胶电泳法（CE-SDS）在乳清蛋白含量分析方面受到广泛关注和应用，AOAC和ISO均已接收CE-SDS作为婴配粉中乳清蛋白含量测定的方法[1-2]。BioPhase™ 8800系统进行乳清蛋白含量分析已经过验证[3]，本文在高通量的BioPhase™ 8800毛细管电泳分析系统上，使用CE-SDS方法对0-6月龄、6-12月龄、12-36月龄不同段位牛乳基的婴儿配方奶粉及中老年配方调制乳粉中的乳清蛋白含量进行了分析。另外，还对牦牛奶粉、骆驼奶粉、羊奶粉、鲜羊奶（液）等不同动物来源乳品中的乳清蛋白含量进行了比较研究，方法具有以下特点：

1）方法可同时进行8个不同样品的检测分析，平均每个样品仅用时7 min，显著提高了大量样本的分析检测效率。

2）方法可测定不同段位牛乳基配方奶粉中乳清蛋白的含量，其中，一段婴配粉奶乳清蛋白的含量为64.07%，二段婴配粉为50.10%，均符合国家标准；

3）方法可测定不同动物来源乳品中乳清蛋白的含量，不同动物来源乳品中乳清蛋白含量有明显差异，可在BioPhase™ 8800系统上，使用CE-SDS方法开发根据乳清蛋白含量差异鉴别不同动物来源乳品的应用。

2. 仪器及方法

BioPhase™ 8800系统，配备紫外检测器（UV，波长220 nm），BioPhase软件1.2.20（SCIEX）。用于BioPhase™ 8800系统的熔融石英毛细管卡盒8 × 30 cm（SCIEX PN 5080121），内径50 μm，20/30.2 cm（有效/总长度）；BioPhase™ 8800系统启动盘套装（SCIEX PN 5080311），包含4块96孔样品盘、4块缓冲液盘、8块出口盘；离心机；分析天平；金属浴/水浴。

进样条件：-5kV，20 sec；分离电压：-15 kV，30 min；毛细管温度25℃，样品室温度25℃，毛细管的预处理、针与针间冲洗程序：使用碱性冲洗液在70 psi压力下冲洗2 min，20 psi冲洗8 min，酸性冲洗液20 psi冲洗5 min，去离子水20 psi冲洗2 min，背景电解质80 psi冲洗10 min。

3. 试剂及样品

用于BioPhase 8800系统的CE-SDS蛋白分析试剂盒（SCIEX PN C30085），包含凝胶缓冲液，样品缓冲液，10 kDa内标，碱性冲洗液，酸性冲洗液，CE级水。2-巯基乙醇（Sigma-Aldrich PN M7154）。0-6月龄，6-12月龄，12-36月龄的婴儿配方奶粉，羊奶粉，鲜羊奶，牦牛奶粉，中老年配方调制乳粉等由市场购买。

奶粉的处理：分别称取100 ± 4 mg奶粉，置于1.5 mL离心管中，加水到1 mL刻度，涡旋振荡至充分溶解，配成浓度为1 mg/mL的奶粉溶液。液奶的处理：充分混匀，直接进行下述处理。

于1.5 mL离心管中分别加入84 μL样品缓冲液、1 μL 10 kDa 内标、10 μL奶粉溶液/液奶、5 μL β-巯基乙醇，涡旋并混合均匀，盖紧瓶盖。金属浴/水浴中加热样品100 ± 5 ℃ 10 min，冷却至室温，8个样品分别各取100 μL加入96孔样品盘一列的8个样品孔中，样品摆放见图1，在BioPhase™ 8800上使用CE-SDS方法对各乳品的乳清蛋白含量进行分析。

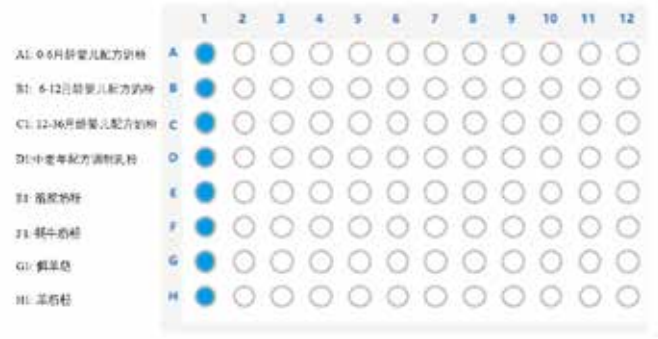


图1. BioPhase™ 8800样品盘位置摆放

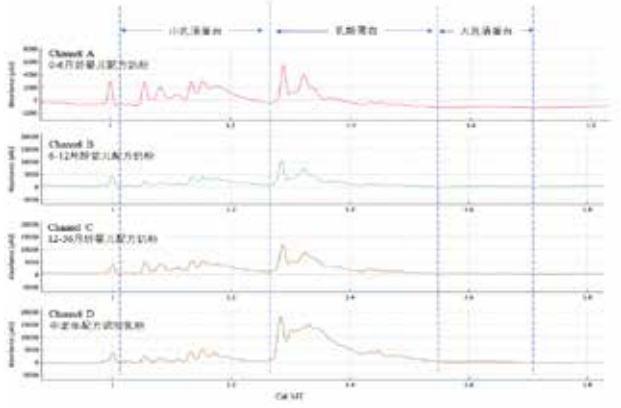


图1.不同段位牛乳基配方奶粉CE-SDS电泳图（Cal MT：校正迁移时间）

4. 结果与讨论

4.1 数据积分及乳清蛋白含量计算

各通道对应的乳品CE-SDS分析电泳图见图1、图2，根据之前的研究[4]，划分乳清蛋白和乳酪蛋白区域，进行数据的积分处理。以10kd作内标对各峰的迁移时间进行校正，目标峰校正迁移时间（Cal MT）=目标峰迁移时间/10kd内标峰迁移时间。

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在配方奶粉中的百分含量：（1）Aw.c.=1.4×Aw；（2）乳清蛋白含量（%）=Aw.c./(Aw.c.+Acn)×100。式中：Aw.c.–乳清蛋白校正峰面积；Aw–总乳清蛋白实测峰面积；1.4–校正因子；Acn–总乳酪蛋白实测峰面积。

4.2 不同段位牛乳基配方奶粉的乳清蛋白含量分析

不同段位牛乳基配方奶粉的CE-SDS电泳图见图1，乳清蛋白含量及重复性结果见表1，其中，一段婴儿配方奶粉乳清蛋白含量平均为64.07%，二段婴儿配方奶粉平均为50.10%，均达到国标要求。三段婴儿配方奶粉乳清蛋白含量平均为52.54%，中老年配方调制乳粉平均仅为24.58%。各样品的3针重复性中，乳清蛋白含量RSD值均＜2%。

4.3 不同动物来源乳品的乳清蛋白含量分析

不同动物来源乳品的CE-SDS电泳图见图2，乳清蛋白含量及重复性结果见表2，不同动物来源乳品中乳清蛋白含量有明显差异，羊奶粉含量最高，平均为48.41%，鲜羊奶（液）平均为22.67%，牦牛奶粉平均为20.48%，骆驼奶粉平均仅为14.22%。该组样品的3针重复性中，乳清蛋白含量RSD值均＜2%。可在 BioPhase™ 8800系统上，利用CE-SDS毛细管凝胶电泳法开发根据乳清蛋白含量差异鉴别不同动物来源乳品的应用。

表1. 不同段位牛乳基配方奶粉中乳清蛋白含量及重复性结果（n=3）

Channel	配方奶粉	乳清蛋白含量（%）				
		Rep-1	Rep-2	Rep-3	Mean	RSD%
A	0-6月龄婴儿配方奶粉	64.42%	64.05%	63.74%	64.07%	0.44%
B	6-12月龄婴儿配方奶粉	49.15%	50.50%	50.65%	50.10%	1.35%
C	12-36月龄婴儿配方奶粉	52.79%	52.64%	52.19%	52.54%	0.48%
D	中老年配方调制乳粉	24.59%	24.31%	24.85%	24.58%	0.90%

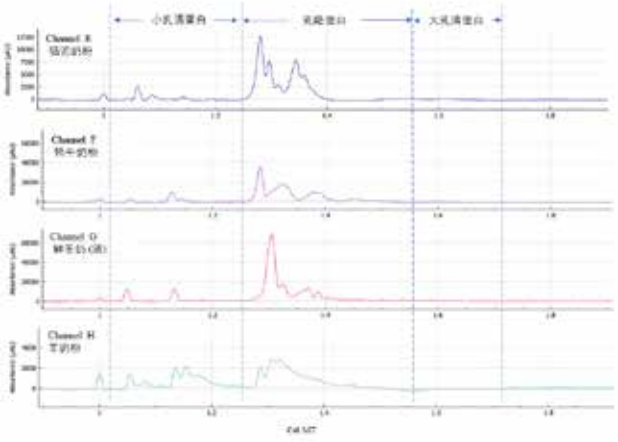


图2.不同动物来源乳品的CE-SDS电泳图（Cal MT：校正迁移时间）

表2. 不同动物来源乳品中乳清蛋白含量及重复性结果（n=3）

Channel	乳品类型	乳清蛋白含量（%）				
		Rep-1	Rep-2	Rep-3	Mean	RSD%
E	骆驼奶粉	14.37%	13.85%	14.45%	14.22%	1.85%
F	牦牛奶粉	20.38%	20.39%	20.67%	20.48%	0.65%
G	鲜羊奶（液）	22.28%	23.00%	22.73%	22.67%	1.31%
H	羊奶粉	48.43%	48.43%	48.37%	48.41%	0.06%

5 .结论

本文在高通量的 BioPhase™ 8800系统上使用CE-SDS方法进行乳品中乳清蛋白的含量分析，具有以下特点：1）该方案可同时进行8个不同样品的检测分析，平均每个样品仅用时7 min；2）方法可测定不同段位牛乳基婴儿配方奶粉中乳清蛋白的含量，判断是否符合国家标准；3）方法可测定不同动物来源乳品中乳清蛋白的含量，可开发根据乳清蛋白含量差异鉴别不同动物来源的乳品的应用。因此，当面对不同适用阶段、不同动物来源等大量乳品的CE-SDS检测需求时，BioPhase™ 8800 系统可快速评估样品性质，显著提高大量样本的分析检测效率。

6. 参考文献

[1] Quantification of Whey Protein Content in Infant Formulas by Sodium Dodecyl Sulfate-Capillary Gel Electrophoresis (SDS-CGE): Single-Laboratory Validation, First Action 2016.15 Journal of AOAC International, DOI: 10.5740/jaoacint.16-0344;

[2] Milk-based infant formula powders - Quantification of whey protein content by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE), ISO 23293:2020(en)

[3] SCIEX Tech Note： BioPhase™ 8800 系统进行婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量的高通量分析（MKT-02-15557-ZH-A）

[4] SCIEX Tech Note： CE-SDS方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析（RUO-MKT-02-7649-ZH-B）

CE-SDS 方法表征牛、羊奶粉中乳清蛋白含量的差异

高铁、陈泓序、姜帆
CE & Biopharma，SCIEX

1. 引言

乳蛋白作为牛、羊乳中重要的营养物质，可提供人类日常蛋白需求。乳蛋白主要包括乳清蛋白和乳酪蛋白两大类，其中乳清蛋白中含有 α -乳白蛋白、β -乳球蛋白、血清白蛋白和免疫球蛋白等，乳酪蛋白中含有 α -酪蛋白、β -酪蛋白、κ -酪蛋白等；相较于牛乳，羊乳中具有含量更高的乳清蛋白。本技术说明采用以蛋白变性为手段，根据蛋白分子量大小分配的毛细管凝胶电泳（CE-SDS）的方法，进行表征牛、羊奶粉中乳清蛋白含量的差异。

CE-SDS 方法中，在奶粉样品中加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）和 β-巯基乙醇。在加热的条件下，蛋白质间的分子间力和二硫键断开，SDS 结合到蛋白质分子上，形成带负电的蛋白质-SDS 复合物。该复合物进入填装了分离凝胶的电场后，在电压的驱动下迁移至检测窗口，在 220 nm 被检测。奶粉中的酪蛋白和乳清蛋白被分离成两组不互相干扰的蛋白质峰组，根据这两组蛋白质组的峰面积，以及乳清蛋白对酪蛋白的质量对面积校正系数（本方法中对配方奶粉确定为 1.4），利用峰面积归一化法，计算出乳清蛋白在奶粉总蛋白质中的百分含量 [1]。

2. 材料和方法

2.1. 需要的试剂耗材

SDS-MW 分子量分析试剂盒（SCIEX 公司，PN.390953），所含试剂见表 1；β -巯基乙醇（Sigma 公司，PN.M7154 或 M6250）；羊奶粉、牛奶粉均由国内不同厂家提供；去离子水（Millipore）。

2.2. 样品前处理

样品溶解

称取 100 ± 4 mg 牛、羊奶粉，置于 1.5 mL 离心管中，加入水到 1 mL 刻度，涡旋振荡，至充分溶解并混合均匀。

变性过程

以 SDS-MW Sample Buffer 与 10 kDa Marker 为 84:1 μL 体积比例配置分析预备液，用移液器将 10 μL 的各奶粉样品溶液，移入至 1.5 mL 离心管中，相继加入 85 μL 分析预备液、5 μL β-巯基乙醇，混合并涡旋振荡，盖紧瓶盖。在水浴或金属浴中加热样品 100℃ ± 5℃，10 min，冷却样品至室温，列入样品盘。

表1. SDS-MW分子量分析试剂盒

货 号	项 目
338451	50 μm ID Capillary
A30341	SDS Gel Buffer
A26487	10 kDa Marker
A22196	MW Marker
	SDS Sample Buffer
	0.1N NaOH
	0.1N HCl

2.3. 运行方法

PA800 Plus 毛细管电泳仪；检测器：PDA，220 nm，采集频率：2 Hz；样品室温度：25 ℃；毛细管温度：25 ℃；窗口狭缝：2 号（100 × 200 μm）；毛细管：熔融石英毛细管，50 μm 内径，20/30 cm 有效/总长。毛细管预平衡和分离时间程序如图 1 和图 2。

3. 数据处理

3.1. 积分方法

完成采集后，需要使用 32 Karat 软件进行积分处理。首先要进行凯撒积分的关闭，从 32 Karat 软件工具栏中以仪器管理员身份登录，然后选择使用的仪器模块，在仪器配置中关闭凯撒积分。

积分牛、羊乳粉电泳图：对照空白图谱对乳蛋白的第一个乳清蛋白峰组和乳酪蛋白峰组进行自动积分，积分起始时间是 10 kDa 内标前小峰开始（大约内标前 0.4 min），结束时间是酪蛋白结束的位置。用手动积分从酪蛋白后到第二个乳清蛋白峰组后的基线，得到乳酪蛋白后的相对分子质量高的乳清蛋白。

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	ddH2O rinse to remove the acid residue
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	SDS Gel rise to fill the capillary
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, reverse polarity, both	SDS Gel for voltage equilibration
6								

图 1. 毛细管预平衡程序

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic increment every 8 runs
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group - Automatic increment every 8 runs
3		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	forward, In / Out vial inc 8	Water rinse to remove the acid residue - Automatic increment every 8 runs
4		Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 8	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel - Automatic increment every 8 runs
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every 8 runs
6		Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every 8 runs
7		Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, reverse polarity	Sample injection
8		Wait		0.00 min	BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over - Automatic increment every 8 runs
9	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 8	SDS Gel for separation - Automatic increment every 8 runs
10	5.00	Autozero						
11								

图 2. 分离程序

3.2. 含量测定方法

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在婴幼儿配方奶粉中的含量：

$$Ac.w. = 1.4 \times Aw \quad (1)$$

式中：Ac.w. – 乳清蛋白校正峰面积；

Aw – 总乳清蛋白实测峰面积；

1.4 – 校正因子

$$乳清蛋白含量（\%）= Ac.w./(Ac.w.+ Acn) \times 100 \quad (2)$$

式中：Acn – 总乳酪蛋白实测峰面积

4. 结果分析

4.1. 牛奶粉数据结果

牛奶粉积分处理结果如图 3，经计算牛奶粉的乳清蛋白含量为 23.18%。

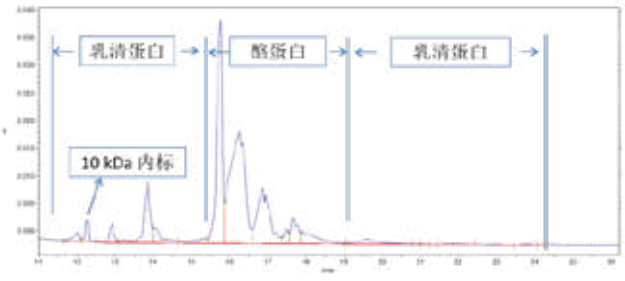


图 3. 牛奶粉 CE-SDS 分离的电泳图

4.2. 羊奶粉数据结果

羊奶粉积分处理结果如图 4，经计算羊奶粉的乳清蛋白含量为 23.18%。根据已知酪蛋白分子量大小（α -酪蛋白＜β -酪蛋白＜κ -酪蛋白）从图谱中可以发现 [1]，羊乳中的β -酪蛋白和 κ -酪蛋白含量明显小于牛乳中的含量。

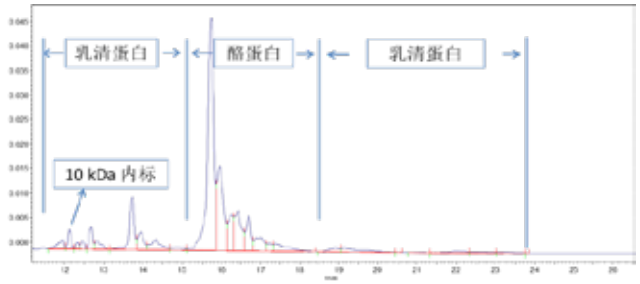


图 4. 羊奶粉 CE-SDS 分离的电泳图

4.3. 不同厂家牛、羊奶粉中乳清蛋白含量对比

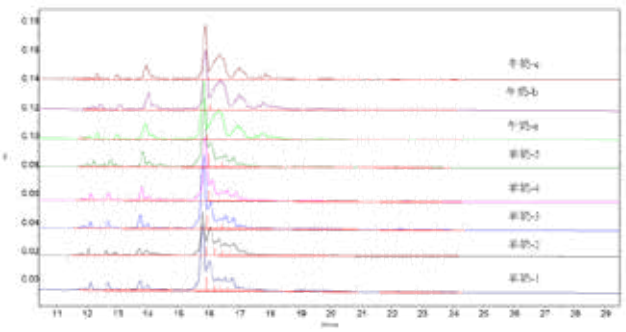
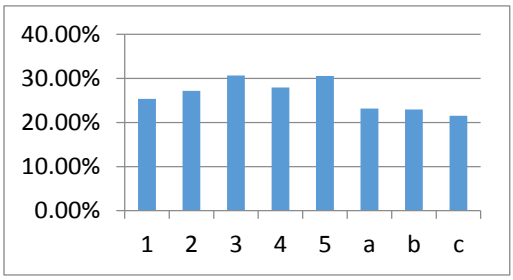


图 5. 不同厂家的牛、羊奶粉的电泳叠加图

经过对这些不同厂家羊奶粉和牛奶粉的积分处理，根据含量测定方法进行乳清蛋白含量测定，结果如表 2。可从结果中发现，羊奶粉中的乳清蛋白含量明显高于牛奶粉。

表2. 不同厂家羊奶粉和牛奶粉的乳清蛋白含量结果及对比

种类	厂家	乳清蛋白含量（%）
羊奶粉	1	25.35
	2	27.18
	3	30.67
	4	27.95
	5	30.55
牛奶粉	a	23.18
	b	22.95
	c	21.53



5. 结论

毛细管凝胶电泳（CE-SDS）可将奶粉中乳清蛋白与乳酪蛋白分配成互补干扰的峰组，从而可以利用此方法定量乳清蛋白含量。利用毛细管凝胶电泳（CE-SDS）对乳清蛋白在牛、羊奶粉中含量的测定中发现，牛、羊奶粉中乳酪蛋白中的β-酪蛋白、κ-酪蛋白含量存在明显差异，并且羊乳中乳清蛋白含量占比高于牛乳中乳清蛋白含量占比。

参考文献

1. Ping.Feng, Christophe Fuerer, Adrienne McMahon. Quantification of Whey Protein Content in Infant Formulas by Sodium Dodecyl Sulfate-Capillary Gel Electrophoresis (SDS-CGE): Single-Laboratory Validation, First Action 2016.15; Journal of AOAC International Vol. 100, No.2, 2017.

毛细管区带电泳方法对乳制品中A2 β-酪蛋白含量的测定

Determination of A2 β-Casein in Dairy Product by Capillary Zone Electrophoresis

高铁[1], 陈泓序[1],冯憑[2]
Gao Tie[1], Chen Hongxu[1], Feng Ping[2]

[1] CE & Biopharma, Sciex, China; [2] 惠氏营养, 中国
[1] CE & Biopharma, Sciex, China; [2] Wyeth, China

Key Words: milk powder, liquid milk, A2 β-casein, CZE

There are 13 variants of β-casein (CN) in milk, of which A1, A2 β-CN and B β-CN are the main variants, C and I are common but the content is very low, and other variants are very rare. Among them, A2 β-CN is more similar to β-CN in breast milk in terms of structure and digestive characteristics. According to published data, the use of milk powder or liquid milk without A1 β-CN may help reduce the risk of multiple adverse effects or reactions. A2 β-CN is a naturally compatible milk protein that is closer to breast milk and contributes to the long-term health of infants and young children. At present, there are commercial A2 milk powder or liquid milk on sale (the product does not contain A1 β-CN). In this technical note, a capillary zone electrophoresis method (CZE) was developed for the separation of A2 β-CN and the determination of the ratio of A2 β-CN to total β-CN.

1. 引言

牛乳中的β-酪蛋白（β-CN）有13种基因型，其中A1、A2 β-CN和B β-CN是主要的基因型，C和I比较常见但含量很低，其它基因型极为少见。其中A2 β-CN与母乳中的β-CN在结构和消化特点方面更为接近。目前发表的数据显示，采用不含A1 β-CN的奶粉或液态奶有可能有助于降低多种不良作用或反应的风险。A2 β-CN是自然亲和并且更接近母乳的牛奶蛋白质，有助于婴幼儿的长远健康。目前市场上已有商品化的A2奶粉或液态奶（产品中不含A1 β-CN）。本文开发了一种可分离A2 β-CN、并测定A2 β-CN与总β-CN含量比例的毛细管区带电泳方法（CZE，Capillary Zone Electrophoresis）。

2. 材料和方法

2.1 试剂及配置

2.1.1 试剂

尿素（分析纯，Amresco，PN 0568）；柠檬酸（分析纯，Amresco，PN 0529）；羟丙基甲基纤维素（HPMC，Sigma-Aldrich，PN 09963）；七水合磷酸二氢钠（分析纯，MP Biomedicals，PN 191441）。

2.1.2 背景电解质及样品缓冲液的配置

分别配制10 mol/L尿素，0.2 mol/L磷酸氢二钠，1.0 mol/L柠檬酸和1%羟丙基甲基纤维素作为储备液。

分别移取10 mL尿素、6.25 mL磷酸氢二钠、3.5 mL柠檬酸和5 mL HPMC储备液，均置于同一25 mL容量瓶中，用超纯水稀释、定容至刻度，混匀则配制成含50 mmo/L Na_2HPO_4+140 mmol/L 柠檬酸+0.2% HPMC+4 mol/L尿素的分离背景电解质。

分别移取5 mL 磷酸氢二钠、2 mL 柠檬酸和12.5 mL尿素储备液，均置于同一25 mL容量瓶中，用超纯水稀释、定容至刻度，混匀则配制成40 mmol/L 磷酸氢二钠+80 mmol/L柠檬酸+5 mol/L尿素为样品稀释液。

2.2 样品及前处理

2.2.1 样品

β-酪蛋白（β-CN，≥98% (PAGE), Sigma-Aldrich）；奶粉（A2全脂奶粉、普通全脂奶粉、普通高钙奶粉、普通婴儿配方奶粉）、液态奶（A2巴氏鲜牛奶、普通巴氏全脂鲜牛奶、普通巴氏脱脂鲜牛奶、普通UHT鲜牛奶）均为市场购买。

注：“普通”为商品未标明A2奶粉或液态奶。

2.2.2 样品前处理

去离子水配置β-CN标准品至2 mg/mL，去离子水配置奶粉为10 mg/mL；β-CN标准品、奶粉溶液、液态奶样品均与样品缓冲液等比例添加，充分涡旋混合。

2.3 运行条件及方法

PA800 Plus毛细管电泳仪；检测器：PDA，214 nm，采集频率：2 Hz；样品室温度：25 ℃；毛细管温度：38 ℃；窗口狭缝：2号（100×200 μm）；毛细管：熔融石英毛细管，50 μm内径，40/50 cm（有效/总长度）；分离电压：20 kV（500 V/cm）；进样压力及进样时间：0.5 psi，10 s。毛细管分离时间程序如图1。

3. 结果分析

3.1 β-CN标准品的分离与定量

β-CN的13种基因型中，A1和A2 β-CN含量最高，B β-CN含量较少，C和I β-CN虽然常见但含量很低，其它基因型极少见。按照氨基酸序列中第67位氨基酸为原始的脯氨酸还是突变为组氨酸进行分类，A1、B、C基因型均属于A1型，A2和I基因型属于A2型。组氨酸为带正电荷R基的氨基酸，而脯氨酸为非极性R基的氨基酸，在酸性背景电解质的电泳分离中，A1 β-CN的迁移时间短于A2 β-CN；而B β-酪蛋白的133位氨基酸为精氨酸，A1 β-CN为丝氨酸，因此B β-CN的迁移时间短于A1 β-CN。如图2，在β-CN标准品的电泳图谱中，可以明显分离B、A1和A2 β-CN。

在A2 β-CN的定量中，基因型I与A2难以分离，但是基因型I一般含量极低，将其定量在A2 β-CN中是可以接受的；同样基因型C的含量也较低，可定量在B β-CN中，因此总β-CN可用A1和A2型β-酪蛋白的总量表示。在计算A2 β-CN在总β-CN中的含量比例中，可利用A2型β-CN的校正峰面积（CA，Corrected Area）除以A1型（包含基因型A1、B）和A2型β-CN的校正峰面积之和进行计算。

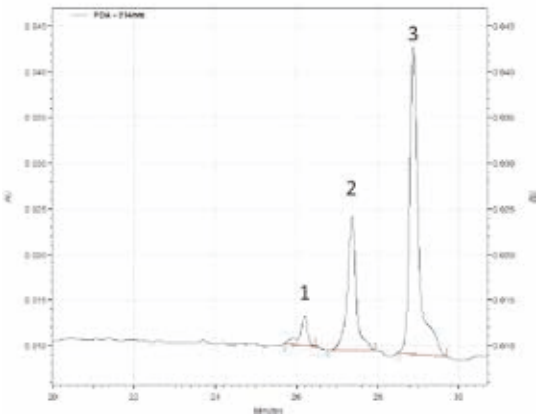


图2. β-CN的CZE分离结果，峰1为B β-CN、峰2为A1 β-CN、峰3为A2 β-CN，电泳条件如2.3所示。

3.2 奶粉中A2 β-CN的分离与含量测定

在此方法下，我们尝试了A2全脂奶粉、普通全脂奶粉、普通高钙奶粉、普通婴儿配方奶粉中A2 β-CN的分离和含量测定。奶粉均为高温喷粉制成，在此过程中，乳蛋白与乳糖共同经受高温脱水，属于还原糖的乳糖与蛋白链中的赖氨酸发生美拉德反应，生成美拉德初期产物（蛋白与乳糖的糖化产物）。部分蛋白分子会与乳糖结合。这些美拉德反应产物会改变该蛋白的质量与所带电荷的比值，从而改变其在本方法中的迁移速率，表现形式就是迁移时间相对于未发生美拉德反应的蛋白略晚出峰，造成蛋白峰分裂的现象，这在其他毛细管电泳方法分析发生美拉德反应的奶蛋白中也有出现[1]。图3为奶粉中A1型（包含基因型A1、B和C）和A2型（包含基因型A2和I）β-CN的分离结果，可以明显发现A1和A2型β-CN均有美拉德产物的生成。图3中A1组峰为A1型β-CN，包含A1型β-CN及其美拉德产物；A2组峰为A2型β-CN，包含A2型β-CN及其美拉德产物。A2型β-CN的含量即为基因型为A2的β-CN的含量。利用校正峰面积百分比（CAP，Corrected Area Percent）计算A2 β-CN在总β-CN中的含量比例，如表1。

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:B1	forward	water rinse
2		Rinse - Pressure	70.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	buffer rinse
3		Inject - Pressure	0.5 psi	10.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	inject
4	0.00	Separate - Voltage	20.0 KV	40.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, normal polarity, both	separate
5								

图1. 毛细管电泳分离的时间程序。

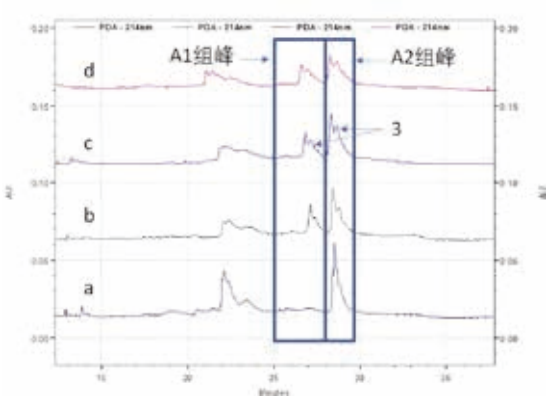


图3. 不同奶粉中A1和A2型β-CN的CZE分离结果。
a. A2全脂奶粉、b. 普通全脂奶粉、c. 普通高钙奶粉、d. 普通婴儿配方奶粉，A1组峰为A1型β-CN、A2组峰为A2型β-CN、峰3为美拉德反应产物，电泳条件如2.3所示。

表1. 不同奶粉中A2 β-CN的含量比例。

奶粉	A2 β-CN（CAP%）
A2全脂奶粉	93.57
普通全脂奶粉	64.05
普通高钙奶粉	66.42
普通婴儿配方奶粉	60.32

3.3 液态奶中A2 β-CN的分离与含量测定

我们也尝试了不同杀菌工艺的液态奶中A2 β-CN的分离与含量测定，液态奶样品分别为巴氏奶（A2巴氏鲜牛奶、普通巴氏全脂鲜牛奶、普通巴氏脱脂鲜牛奶）和普通UHT奶鲜牛奶。CZE方法可以分离液态奶中的A1和A2型β-CN，如图4。通过与β-CN标准品中峰的迁移时间对液态奶中的A1和A2峰进行了鉴定。通常巴氏奶的杀菌温度为75 ℃，15-20 s，而 UHT奶在加工过程中杀菌温度为135 ℃，2-5 s。在温度较高的UHT杀菌方式下，乳蛋白与乳糖会同样会发生高温脱水的美拉德反应，产生少量的蛋白与乳糖结合的美拉德产物，因此在UHT奶中，可以发现A1和A2型β-CN中的美拉德产物（图4 d，峰3指示位置），同样将美拉德产物与其相应的乳蛋白含量进行结合，依照A2型β-CN的含量即为基因型为A2 β-CN的含量的原则，计算A2 β-CN在总β-CN中的含量比例。在A2全脂鲜牛奶中（图4 a），我们可以测得A2 β-CN占总β-CN的83.45%，而未标明A2商品液态奶的普通液态奶中（图4 b-d），A1 β-CN含量均较高，如表2显示。

表2. 不同液态奶中A2 β-CN的含量比例 。

液态奶	A2 β-CN（CAP%）
A2巴氏全脂鲜牛奶	83.45
普通巴氏全脂鲜牛奶	62.05
普通巴氏脱脂鲜牛奶	60.05
普通UHT鲜牛奶	61.22

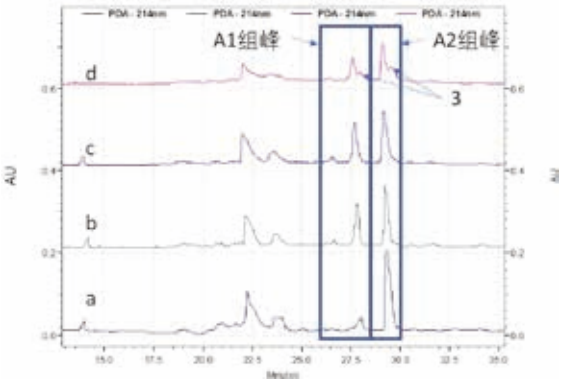


图4. 不同液态奶中A1和A2型β-CN的CZE分离结果。
a. A2巴氏全脂鲜牛奶、b. 普通巴氏全脂鲜牛奶、c. 普通巴氏脱脂鲜牛奶、d. 普通UHT鲜牛奶，A1组峰为A1型β-CN、A2组峰为A2型β-CN，电泳条件如2.3所示。

4. 结论

以上结果说明CZE方法可以有效地分离奶粉（A2全脂奶粉、普通全脂奶粉、普通高钙奶粉、普通婴儿配方奶粉）和液态奶（A2巴氏鲜牛奶、普通巴氏全脂鲜牛奶、普通巴氏脱脂鲜牛奶、普通UHT鲜牛奶）中的A2 β-CN，并利用A2 β-CN与总β-CN的校正峰面积比值测定A2 β-CN的含量。对于奶粉和UHT液态奶，虽然有美拉德反应发生，该方法仍可有效地将A2 β-CN以及美拉德产物从其它基因型的β-CN中分离出来并相对定量。因此，CZE方法是对乳制品（奶粉和液态奶）中测定A2 β-CN相对含量比例的有效方法。

5. 参考文献：

1. Feng P , Fuerer C , Mcmahon A . Quantification of Whey Protein Content in Infant Formulas by Sodium Dodecyl Sulfate-Capillary Gel Electrophoresis (SDS-CGE): Single-Laboratory Validation, First Action 2016.15[J]. Journal of AOAC International, 2017, 100(2):510-521.

高通量毛细管电泳方法进行乳品（液态奶、奶粉）中A2 β-酪蛋白含量测定

PA800 Plus与BioPhase 8800方法的平行转移

Determination of A2- β -casein in dairy products (liquid milk and powder) by high throughput capillary electrophoresis

Parallel method transfer from PA800 Plus to BioPhase 8800

高铁[1]，王象欣[2]，刘冬科[1]，陈凌声[1]，陈泓序[1]，郭立海[1]
Gao Tie[1], Wang Xiangxin[2], Liu Dongke[1], Chen Lingsheng[1], Chen Hongxu[1], Guo Lihai[1]

[1] *SCIEX，中国；[2] 黑龙江飞鹤乳业有限公司*
[1] *SCIEX, China[2]; Heilongjiang Feihe Dairy Co.,Ltd.*

关键词： BioPhase 8800 系统；毛细管区带电泳；液态奶；奶粉；配方奶粉；A2 β-酪蛋白

1. 前言

乳制品中蛋白约80%为酪蛋白（CN），其中β-酪蛋白（β-CN）占CN的33%-40%， β-CN最常见的变异体为A1、A2、B型。所谓A2 乳制品是由以产A2 β-CN为主的奶牛（A2牛）产出的奶加工而成的乳制品，但A2牛有一定概率发生基因突变导致产奶以A1 β-CN为主。因此，为保证A2乳制品质量，不仅需要对A2牛的基因进行检测，也需要对产奶及终产品的A2 β-CN的含量进行确证。

A2 β-酪蛋白相关的产品，比如液态奶、普通奶粉或配方奶粉目前已有多款产品上市，由于工艺问题，巴氏杀菌或UHT杀菌乳中的蛋白美拉德产物并不多，而在奶粉制作过程中由于高温喷粉的工艺，会有较多美拉德产物的生成，尤其是像蛋白与乳糖发生反应，这会导致乳蛋白的复杂程度增高，检测难度增加；并且随着乳品的来源、种类、功能不断增多，乳品行业需要高通量仪器以提高研发、检测效率。基于之前的研究[1-2]，本文在BioPhase 8800上建立了基于毛细管区带电泳（CZE）的方法检测乳品中（如液态奶及奶粉）的A2 β-CN，可在保证分析效果和准确性的前提下，提高大量样本的分析检测效率，方案具有以下优点：

1. BioPhase 8800系统与PA800 Plus药物分析系统的数据一致性较高，可相互转移；
2. 方法通量高，速度快，平均每个样品仅用时5 min；
3. 同一样品8通道一致性高，A2 β-CN含量RSD值 < 1.5%；
4. 单通道连续6针进样重复性好，A2 β-CN含量RSD值 < 1.5%。
5. 使用50 cm总长的毛细管，可对液态奶及奶粉中（常规或A2产品）的A1和A2 β-酪蛋白进行有效分离。

2. 仪器及方法

BioPhase 8800系统，配备紫外检测器（UV，波长220 nm），BioPhase软件1.2.20（SCIEX）。用于BioPhase 8800系统的熔融石英毛细管卡盒8 × 50 cm（SCIEX PN 5080123，50 µm内径，40/50 cm有效/总长）；BioPhase 8800系统启动盘套装（SCIEX PN 5080311），包含4块96孔样品盘、4块缓冲液盘、8块出口盘。

BioPhase 8800 系统进行A2 β-CN含量分析的CZE分离方法如下，检测器：UV，220 nm，样品室温度：25℃；毛细管温度：38℃；分离电压：14.5 kV；进样压力及进样时间：0.5 psi，10 s。针间冲洗方法：碱性冲洗液，70 psi，2min；酸性冲洗液，50 psi，2min；DDI Water，50 psi，1 min；背景电解质冲洗：50 psi，5 min。

3. 试剂及配置

尿素（分析纯，Amresco, PN 0568）；柠檬酸（分析纯，Amresco, PN 0529）；羟丙基甲基纤维素（HPMC, Sigma-Aldrich, PN 09963）；七水合磷酸二氢钠（分析纯，MP Biomedicals, PN191441）。

分别配制10 mol/L尿素，0.2 mol/L磷酸二氢钠，1.0 mol/L柠檬酸和1%羟丙基甲基纤维素作为储备液。

分别移取10 mL尿素、6.25 mL磷酸二氢钠、3.5 mL柠檬酸和5 mL HPMC储备液，均置于同一25 mL容量瓶中，用超纯水稀释、定容至刻度，混匀则配制成含50 mmo/L NaH_2PO_4+140 mmol/L 柠檬酸+0.2% HPMC+4 mol/L尿素的分离背景电解质。

分别移取5 mL 磷酸二氢钠、2 mL 柠檬酸和12.5 mL尿素储备液，均置于同一25 mL容量瓶中，用超纯水稀释、定容至刻度，混匀则配制成40 mmol/L 磷酸二氢钠+80 mmol/L柠檬酸+5 mol/L尿素为样品稀释液。

4. 样品及前处理

β-酪蛋白标准品（β-CN，≥98% (PAGE), Sigma-Aldrich）；液奶、奶粉等均为市场购买。

去离子水配置β-CN标准品至2 mg/mL，去离子水配置奶粉为10 mg/mL；β-CN标准品、奶粉溶液、液奶样品均与样品缓冲液等比例添加，充分涡旋混合。

以一个普通奶粉样品为例，各取100 μL加入96孔样品盘第一列的8个样品孔中（此时8个样品孔中的样品相同），考察单次进样8通道的一致性，单通道连续进样6次的重复性。将收集到的样品分别各取100 μL加入样品盘第二列的8个样品孔中，考察方法对不同乳品的分析适用性。最终样品摆放见图1，使用 BioPhase 8800仪器及BioPhase软件采集分析。



图1. BioPhase 8800样品盘摆放

另取100 μL β-CN标准品，使用PA 800 Plus仪器及32Karat软件采集分析，比较同一样品在BioPhase 8800及PA 800 Plus两个仪器上的电泳结果。

5. 结果与讨论

5.1 同一样品使用 BioPhase 8800与PA 800 Plus采集的结果分析

对于同一β-CN标准品，分别使用BioPhase 8800及PA 800 Plus进行CZE分析的电泳结果见图2a、2b。β-CN各峰的校正峰面积百分比（CAP%）及分离度（R）结果见表1，同一样品在BioPhase 8800与PA 800 Plus上表现出较好的一致性。

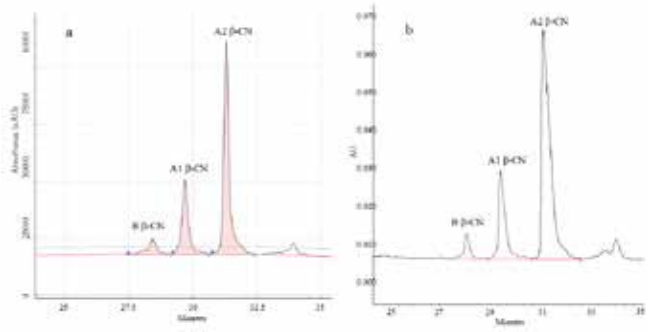


图2. 相同β-CN标准品在不同仪器及软件中的CZE电泳图（a. BioPhase 8800仪器，BioPhase软件，b.PA 800 Plus仪器，32Karat软件）

表1. 相同β-CN标准品在不同仪器分析中的结果

Instrument	B-β CN		A1-β CN		A2-β CN	
	CAP%	R	CAP%	R	CAP%	R
BioPhase 8800	8.23	/	27.63	3.13	64.14	4.28
PA 800 Plus	7.96	/	26.97	3.25	65.07	3.97

5.2 BioPhase 8800多通道重复性结果分析

对样品盘第一列的普通奶粉样品连续进样6次，考察单次进样8通道间的一致性，单通道连续进样6针的重复性。样品中A1、A2 β-CN峰较宽，为高温喷粉过程中形成的美拉德产物。单次进样8通道间表现出良好的一致性（图3a），A2 β-CN百分含量RSD值均＜1.5 %。单通道6针重复性好（图3b），A2 β-CN百分含量RSD值均＜1.5 %。对8通道的样品同时连续进样6次共计48针样品中，A2 β-CN含量平均值为60.16 %，RSD值1.15 %，见表2。

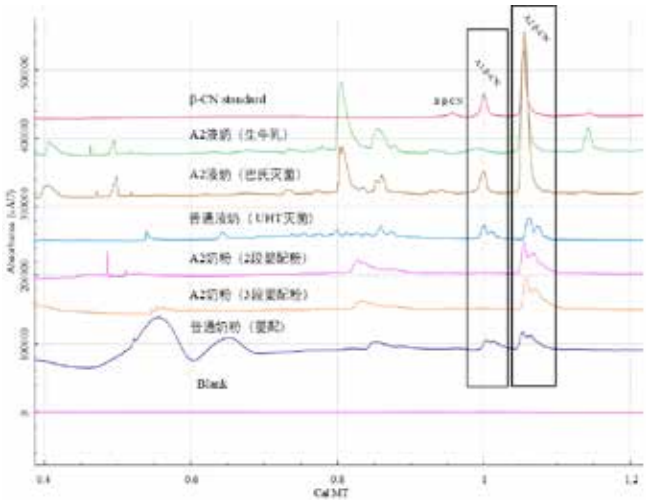


图3. Biophase 8800系统使用CZE方法分析乳品中A2 β-CN含量的电泳图（a）8通道A-H；（b）A通道重复6针（Cal MT：校正迁移时间）

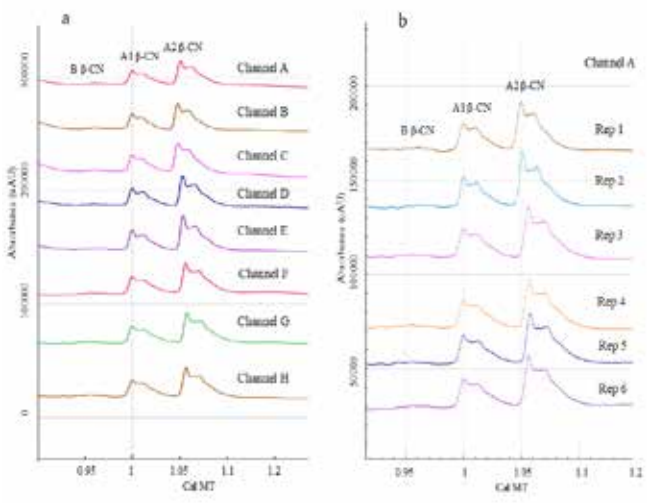


图4. 不同乳品的β-CN分析电泳图（Cal MT：校正迁移时间）

5.3 不同乳品A2 β-CN含量分析

BioPhase 8800系统可准确测定乳品中A2 β-CN 的含量。不同乳品的CZE电泳结果见图4，B、A1、A2 β-CN可实现基线分离并准确定量。收集的液奶样品中，A2液奶（生牛乳）的A2 β-CN含量最高，为86.72 %，A2液奶（巴氏灭菌）为81.81 %，普通液奶（UHT灭菌）为57.65 %，且UHT液奶因高温灭菌的方式产生了美拉德产物峰。奶粉样品因高温喷粉工艺均表现出美拉德产物峰，其中A2奶粉（2段婴配粉）A2 β-CN含量为92.28 %，A2奶粉（3段婴配粉）为91.87 %，普通奶粉59.95 %。

表2. BioPhase 8800 A2 β-CN含量分析的8通道一致性、单通道6针重复性结果

Channel	A2 β-CN含量（%）							
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Mean	RSD
A	60.75%	59.11%	60.73%	60.32%	60.62%	60.72%	60.31%	0.97%
B	60.93%	59.07%	59.10%	60.93%	60.53%	60.80%	60.11%	1.36%
C	60.71%	60.98%	59.44%	60.78%	59.59%	60.95%	60.30%	1.06%
D	59.17%	59.46%	59 .13%	60.98%	60.68%	59.62%	60.07%	1.19%
E	60.94%	59.50%	59.06%	60.61%	59.07%	59.25%	59.84%	1.26%
F	59.26%	60.90%	60.57%	60.21%	59.37%	60.02%	60.06%	0.99%
G	60.60%	60.98%	60.21%	60.21%	60.26%	60.35%	60.45%	0.46%
H	60.84%	60.62%	59.16%	59.40%	59.37%	60.61%	59.88%	1.17%
Mean	60.40%	60.08%	59.75%	60.43%	59.94%	60.29%	60.16%（48针平均值）	
RSD	1.15%	1.35%	1.13%	0.80%	1.02%	0.94%	1.15%（48针RSD值）	

5. 结论

本文提供了在BioPhase 8800系统上使用CZE方法进行乳品（液态奶、奶粉）中A2 β-CN含量分析的方法验证：1）BioPhase 8800系统与PA800 Plus药物分析系统的数据一致性较高，可相互转移；2）方法通量高，速度快，平均每个样品仅用时5 min；3）同一样品8通道一致性高，A2 β- CN含量RSD值＜1.5%；4）单通道连续6针进样重复性好，A2 β-CN含量RSD值＜1.5%。5）BioPhase 8800系统可对液态奶和奶粉中（常规或A2产品）的A1和A2 β酪蛋白进行有效分离。当面对不同批次、工艺、种类、功能等大量乳品样品检测时，BioPhase 8800系统可在保证分析效果和准确性的前提下，实现大量样品的快速分析，提高检测分析效率。

6. 参考文献

[1] SCIEX Tech Note：毛细管区带电泳方法对乳制品中A2 β-酪蛋白含量的测定，RUO-MKT02-10644-ZH-B.

[2] SCIEX Tech Note: High-throughput milk A2 β-Casein analysis by capillary zone electrophoresis (CZE), RUO-MKT-02-26643-A.

毛细管区带电泳进行乳品中 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白的含量测定

The Determination of α-lactalbumin and β-lactoglobulin in Dairy by Capillary Zone Electrophoresis

高铁[1]，陈泓序[1]，杨爱君[2]，何瑛[2]，纪坤发[2]
Gao Tie[1], Chen Hongxu[1], Yang Aijun[2], He Ying[2], Ji Kunfa[2]

[1] *SCIEX，中国；*[2] *燕塘乳业*
[1] *SCIEX, China;* [2] *Yantang Milk*

Keywords： α-lactalbumin; β-lactoglobulin; P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis System; Capillary Zone Electrophoresis; Milk

1. 前言

α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白是乳清蛋白的主要成分，其中 β-乳球蛋白含有 A 和 B 两 种变异体；在生乳及其乳制品中，两个蛋白的含量可反应产品的质量。在现行的标准中， β-乳球蛋白有相应的检测方法（T/TDSTIA 007-2019），而 α-乳白蛋白并没有相应的检测 方法。

本文利用毛细管区带电泳分离了乳品中 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白 A 和 β-乳球蛋白 B，并制作外标曲线进行 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的含量测定；该方法可在同一次运行中 同时检测到 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白，并且适用于液态奶、奶粉和配方奶粉等多种类型 的乳品。

2. 试剂和方法

2.1. 试剂和样品

CEofixTM NTMP 试剂盒（Analis，PN 10004780/A71142）包含 pH 7.0 缓冲液、pH 4.2 缓冲液、启动冲洗液和样品稀释液；α-乳白蛋白标准品（Sigma-Aldrich，PN L5385）；β-乳 球蛋白标准品（Sigma-Aldrich，PN L3908）；醋酸（Sigma-Aldrich，PN 695092）；氢氧化 钠（Sigma-Aldrich，PN S5881）；二次去离子水（Millipore）；巴氏杀菌奶由燕塘乳业提供。



图1. P/ACE™ MDQ Plus毛细管电泳系统

2.2. 标准品前处理

分别精确称取 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白标准品 2 mg，添加 4 mL 二次去离子水，分别 配置成 500 μg/mL 标准品溶液；逐级稀释至如表 1 浓度。

表 1. α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白标准品逐级稀释后的浓度

稀释倍数	0	2	4	8	16	32
α-乳白蛋白浓度（μg/mL）	500	250	125	62	31	16
β-乳球蛋白浓度（μg/mL）	500	250	125	62	31	16

2.3. 样品前处理方法

巴氏杀菌奶样品精确移取 20 mL，添加醋酸调节 pH 至 4.5（±0.1），10000 rpm 离心 15 min，用移液枪穿过表面的脂质层吸

取中间的清液（避免触碰底部沉淀）；取 20 µL 清液， 添加 NTMP 试剂盒中的样品稀释液 180 µL，为最终进样样品。

2.4. 仪器及方法

P/ACE™ MDQ Plus 毛细管电泳系统，匹配紫外检测器（UV）。熔融石英毛细管：

50/60.2 cm（有效/总长度）， 50 µm 内径；分离条件：15 kV, 30 min；进样条件：0.5 psi，12 s；毛细管温度：25 ℃；样品室温度：15 ℃；UV 检测器波长：200 nm；分离缓冲液选择 pH 7.0 缓冲液（NTMP 试剂盒）。图 2 为毛细管活化和分离的初始条件，图 3 为毛细管活化 和分离的检测器条件。



图 2. 初始条件

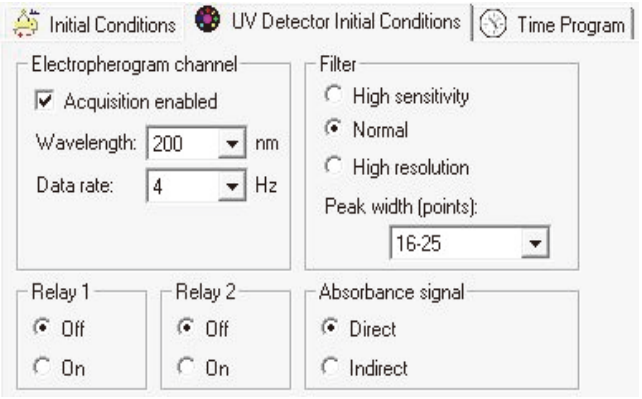


图 3. 检测器条件

新毛细管活化：分别使用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、启动冲洗液和 pH 7.0 缓冲液进 行毛细管的冲洗活化。图 4 为毛细管活化的时间程序。

每针运行间毛细管的冲洗：启动冲洗液 50 psi 压力下冲洗 0.5 min，pH 7.0 缓冲液50 psi 压力下冲洗 1 min。图 5 为毛细管电泳分离的时间程序。

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	0.00	Separate - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
2	5.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
3	10.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
4	20.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
5	20.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
6	25.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
7	35.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
8	35.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
9	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
10	50.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
11	50.00	Stop data						
12	50.00	End						

图 4. 毛细管活化的时间程序

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	0.50 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
3		Inject - Pressure	0.5 psi	12.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	Sample Inject
4		Inject - Pressure	0.5 psi	8.0 sec	BI:D1	BO:B1	No override, forward	Sample buffer Inject
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	40.00 min	BI:E1	BO:B1	1.00 Min ramp, normal polarity	Separation
6	2.00	Autozero						
7	40.00	Stop data						
8	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
9	41.00	End						

图 5. 毛细管电泳分离的时间程序

3. 结果

3.1.外标曲线的制作

利用毛细管电泳分别检测不同级别浓度的 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白，以浓度为横坐 标，以校正峰面积为纵坐标进行外标曲线的制作。其中 β-乳球蛋白由于含有 A 和 B 两种变 异体，以 A 和 B 总校正峰面积之和作为相应浓度对应的校正峰面积。图 6 为 α-乳白蛋白不 同浓度下的电泳图谱，线性方程为 $y=1.53\times10^{3}x+7.25$，线性相关性 $r^2=0.999$；图 7 为 β-乳球 蛋白不同浓度下的电泳图谱，线性方程为 $y=1.46\times10^{3}x+6.51$，线性相关性 $r^2=0.998$。β-乳球 蛋白含有 A 和 B 变异体，毛细管区带电泳的分离原理是根据待测物质的荷质比差异，根据 文献报道[1]可判断 β 乳球蛋白 B 的迁移时间小于 β-乳球蛋白 A 的迁移时间。

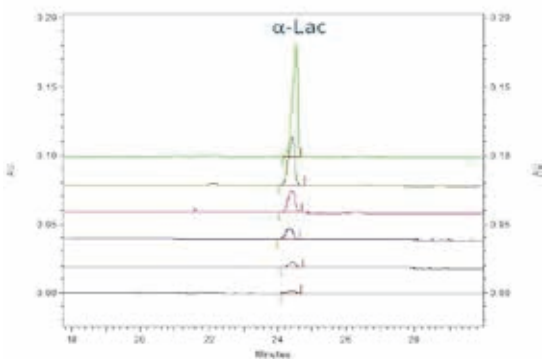


图 6. 不同浓度的 α-乳白蛋白标准品（16-500 μg/mL）的电泳图谱

3.2.乳品中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的含量测定

巴氏杀菌奶经过酸沉淀后，吸取 20 μL 清液，添加 180 μL 样品稀释液充分混合后利 用毛细管电泳进行检测，在同一针运行中可同时检测到 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白，如图 8。 分别利用外标曲线方程测定 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的含量，测定结果乘以 10（稀释倍数） 为巴氏杀菌乳中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的实际浓度，巴氏杀菌奶中的实际浓度分别为 1.33 mg/mL（α-乳白蛋白）和 2.69 mg/mL（β-乳球蛋白）。

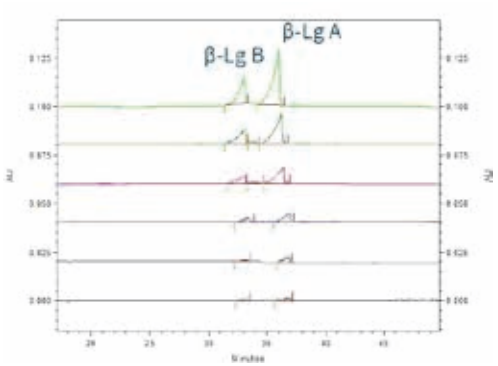


图 7. 不同浓度的 β-乳球蛋白标准品（16-500 μg/mL）的电泳图谱

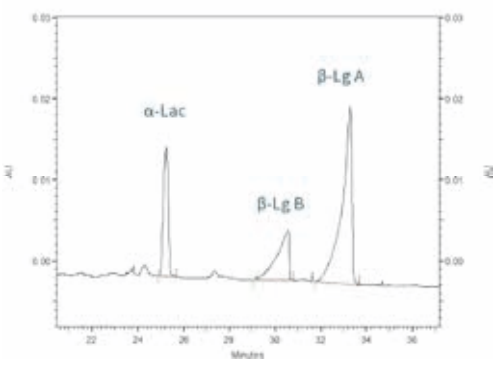


图 8. 巴氏杀菌奶中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的电泳图

4. 结论

毛细管电泳可成功分离巴氏杀菌奶中的 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白 B 和 β-乳球蛋白A；并利用 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白标准品制作的外标曲线，可准确测定巴氏杀菌奶中 α- 乳白蛋白和 β-乳球蛋白的含量，本文测定的巴氏杀菌奶中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的实 际含量分别为 1.33 mg/mL 和 2.69 mg/mL。

毛细管电泳在一次运行中即可同时检测到 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白，并可进行含 量测定。该方法不仅适用于巴氏杀菌奶，也适用于生乳、超高温灭菌奶、奶粉或配方奶粉 等乳制品。

5. 参考文献

1. Irene Maierb, Vadim M. Okuna, Fritz Pittnerb, Wolfgang Lindner Changes in peptic digestibility of bovine-lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. Journal of Chromatography B, 2006, 841: 160– 167.

毛细管区带电泳进行乳品中乳铁蛋白的含量测定

The Determination of Lactoferrin in Dairy by Capillary Zone Electrophoresis

高铁[1]，陈泓序[1]，杨爱君[2]，何瑛[2]，纪坤发[2]

Gao Tie[1], Chen Hongxu[1], Yang Aijun[2], He Ying[2], Ji Kunfa[2]

[1] *SCIEX，中国；*[2] *燕塘乳业*

[1] *SCIEX, China;*[2] *Yantang Milk*

Keywords： Lactoferrin; P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis System; Capillary Zone Electrophoresis; Milk

1. 前言

乳铁蛋白（Lactoferrin, Lf）又称乳转铁蛋白，是一种多功能生物活性铁结合糖蛋白，属于转铁蛋白家族的一员，具有多种生理功能，如抗菌、抗病毒、免疫调节和抗氧化等。乳制品中其活性乳铁蛋白含量的多少可间接反映产品的价值。

对乳铁蛋白进行准确定量有助于评价乳制品的质量，也可以反映乳制品加工过程中的生产工艺。由于乳铁蛋白在液态奶或奶粉等乳制品中含量较少，可利用肝素亲和柱进行乳铁蛋白的富集并去除乳制品中其它蛋白和基质，再利用蛋白超滤膜进行超滤浓缩；富集后的样品可经毛细管电泳进行检测和定量。相比于其它分离分析工具，毛细管电泳法具有操作简便、分离效率高、分离模式多、无毒无害等优势。

本文利用毛细管区带电泳检测乳品中的乳铁蛋白，通过肝素柱纯化、富集和超滤管超滤浓缩富集，可准确测定乳制品中的乳铁蛋白并进行定量。该方法适用于乳铁含量较低的生乳、液态奶、奶粉或配方奶粉等多种类型的乳品中乳铁蛋白的高灵敏度检测。

2.试剂和方法

2.1.试剂和样品

CEofix™ NTMP试剂盒（Analis, PN 10004780/A71142）包含 pH 7.0 缓冲液、pH 4.2 缓冲液、启动冲洗液和样品稀释液；乳铁蛋白标准品（Sigma-Aldrich, PN L4765）；氢氧化钠（Sigma-Aldrich, PN S5881）；磷酸二氢钠（MP Biomedicals, PN A0571）；磷酸氢二钠（MP Biomedicals, PN A0404）；氯化钠（MP Biomedicals, PN A0241）；肝素亲和柱（美正，QC0140，保质期18个月）；二次去离子水（Millipore）；巴氏杀菌奶由燕塘乳业提供。



图1. P/ACE™ MDQ Plus毛细管电泳系统

2.2.仪器及方法

P/ACE™ MDQ Plus毛细管电泳系统，匹配紫外检测器（UV）。熔融石英毛细管：50/60.2 cm（有效/总长度），50μm内径；分离条件：15 kV，30 min；进样条件：0.5 psi，12 s；毛细管温度：25℃；样品室温度：15 ℃；UV检测器波长：200 nm；分离缓冲液选择pH 7.0缓冲液（NTMP试剂盒）。图2为毛细管活化和分离的初始条件，图3为毛细管活化和分离的检测器条件。

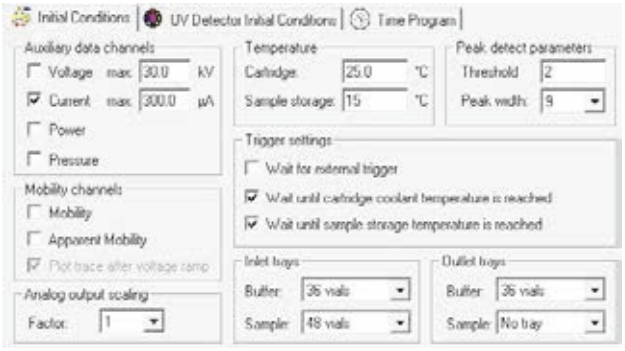


图2. 初始条件

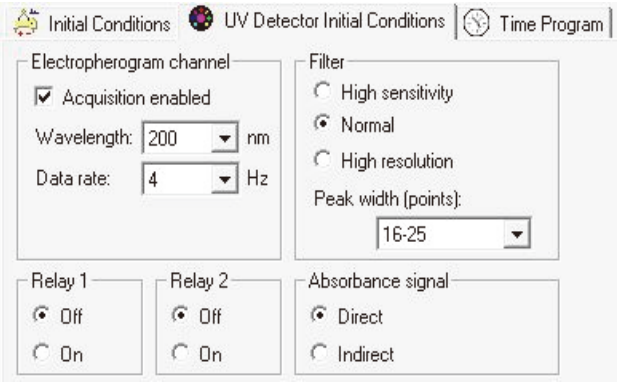


图3. 检测器条件

新毛细管活化：分别使用0.1 mol/L氢氧化钠溶液、启动冲洗液和pH 7.0缓冲液进行毛细管的冲洗活化。图4为毛细管活化的时间程序。

每针运行间毛细管的冲洗：启动冲洗液50 psi压力下冲洗0.5 min，pH 7.0缓冲液50 psi压力下冲洗1 min。图5为毛细管电泳分离的时间程序。

2.3.标准品前处理

分别精确称取乳铁蛋白标准品3000 µg，添加2 mL二次去离子水，分别配置成1500 µg/mL标准品溶液；逐级稀释至如表1浓度。

表1. 乳铁蛋白标准品逐级稀释后的浓度

稀释倍数	0	2	4	8	16	32
乳铁蛋白（µg/mL）	1500	750	375	187	93	46

2.4.样品前处理方法

使用肝素亲和柱需要配置的试剂：

1) 结合缓冲液（100 mM, pH 7.5, NaH_2PO_4-Na_2HPO_4）：称取5.96 g磷酸氢二钠和0.96 g磷酸二氢钠，加入400 mL二次去离子水，充分溶解后定容至500 mL；

2) 淋洗液（含0.1 M NaCl的50 mM, pH 7.5, NaH_2PO_4-Na_2HPO_4）：称取2.98 g磷酸氢二钠、0.48 g磷酸二氢钠和2.92 g氯化钠，加入400 mL二次去离子水，充分溶解后定容至500mL；

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	0.00	Separate - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
2	5.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
3	10.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
4	20.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
5	20.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
6	25.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
7	35.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
8	35.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
9	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
10	50.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
11	50.00	Stop data						
12	50.00	End						

图4. 毛细管活化的时间程序

Initial Conditions | UV Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	0.50 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
3		Inject - Pressure	0.5 psi	12.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	Sample Inject
4		Inject - Pressure	0.5 psi	8.0 sec	BI:D1	BO:B1	No override, forward	Sample buffer Inject
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	40.00 min	BI:E1	BO:B1	1.00 Min ramp, normal polarity	Separation
6	2.00	Autozero						
7	40.00	Stop data						
8	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
9	41.00	End						

图5. 毛细管电泳分离的时间程序

3) 洗脱液（含 1 M NaCl的50 mM, pH 7.5, NaH_2PO_4-Na_2HPO_4）：称取 2.98 g磷酸氢二钠、0.48 g磷酸二氢钠和29.2 g氯化钠，加入400mL二次去离子水，充分溶解后定容至500 mL。

乳铁蛋白的纯化：

1) 肝素亲和柱去掉下方堵头，利用注射器加压排出柱内保存液，待保存液与筛板平齐 后，添加 5 mL 结合缓冲液进行冲洗；

2) 待结合缓冲液与筛板平齐后，吸取 10 mL 巴氏杀菌奶，添加 40 mL 结合缓冲液，充分混合后逐次添加至肝素亲和柱中（依靠重力进行乳铁蛋白与肝素亲和柱的结合）；

3) 待样品液与筛板平齐后，添加 15 mL 淋洗液，将其余乳品中的杂质进行洗脱，洗杂后利用注射器排干肝素亲和柱内液体；

4) 向肝素亲和柱添加 3.5 mL 洗脱液，并进行富集（依靠重力洗脱乳铁蛋白），洗脱完后将富集液定容至 3.5 mL；

5) 将富集液利用 10 kDa 超滤管浓缩 10 倍，作为最终进样的样品。

3. 结果

3.1.外标曲线的制作

利用毛细管电泳分别检测不同级别浓度乳铁蛋白标准品，以浓度为横坐标，以校正峰面积为纵坐标进行外标曲线的制作。图6为乳铁蛋白不同浓度下的电泳图谱，线性方程为 $y=7.55\times10^4x+635.56$，线性相关性 $r^2=0.999$。

3.2. 乳品中乳铁蛋白的含量测定

巴氏杀菌奶经肝素亲和柱进行乳铁蛋白的纯化与富集，并使用 10 kDa 超滤管超滤浓缩 10 倍进行检测，如图7。利用外标曲线方程测定乳铁蛋白的含量，检测浓度为1181 μg/mL，根据公式1计算可得实际浓度为41 μg/mL。

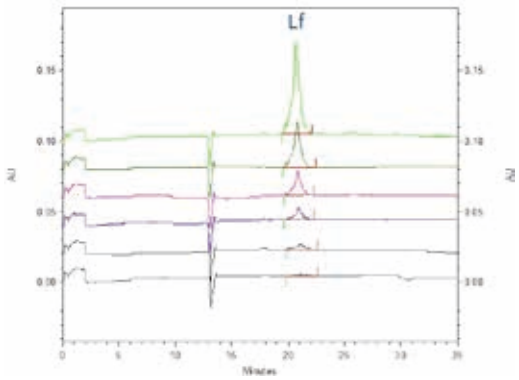


图 6. 不同浓度下（46-1500 μg/mL）乳铁蛋白标准品的电泳图谱

$$\text{公式1：} y=\frac{\text{富集液体积}\times x}{\text{浓缩倍数}\times\text{初始体积}}$$

其中 y 为样品实际乳铁蛋白浓度，x 为检测浓度，富集液体积为 3.5 mL，10 kDa 超滤管超滤浓缩倍数为 10，初始体积为 10 mL。

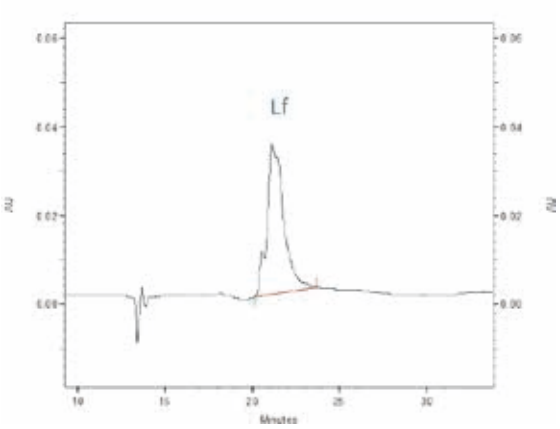


图7. 巴氏杀菌乳中乳铁蛋白的电泳图

4. 结论

本文使用毛细管区带电泳法对巴氏杀菌奶中的乳铁蛋白进行了定量分析。由于乳制品中乳铁蛋白含量较低，在样品前处理过程中可使用肝素亲和柱进行纯化和富集，再利用10 kDa超滤管进行超滤浓缩，处理后的样品可经毛细管区带电泳进行定量分析。根据外标曲线，本文测定了巴氏杀菌奶中的乳铁蛋白，其含量为41 µg/mL。该样品前处理及毛细管区带电泳测定乳铁蛋白含量的方法不仅适用于巴氏杀菌奶，同样适用于生乳、超高温灭菌奶、奶粉或配方奶粉等乳制品。

毛细管区带电泳法(CZE)用于婴儿配方奶粉中骨桥蛋白的分离及含量检测

Capillary zone electrophoresis (CZE) for the separation and detection of osteopontin in infant formula milk powder

张晓霞[1]，唐红梅[1]，王象欣[2]，陈泓序[1]，罗继[1]，郭立海[1]
Xiaoxia Zhang[1], Hongmei Tang[1], Xiangxin Wang[2], Hongxu Chen[1], Ji Luo[1], Lihai Guo[1]

[1] *SCIEX，中国；[2] 黑龙江飞鹤乳业有限公司，中国*
[1] *SCIEX, China; [2] Heilongjiang Feihe Dairy Co., Ltd, China*

Key words： CZE, Infant formula milk powder, Osteopontin

1. 引言

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种高度磷酸化的酸性糖蛋白，分子量从45至75 kDa范围内不等，牛乳OPN主要有两种亚型，一个是全长编码翻译，分子量为60 kDa；另一个是C端缺失的OPN蛋白，分子量为40 kDa。OPN具有多种生物、生理和病理活性，同时OPN还可通过静电或亲和相互作用与乳铁蛋白、乳过氧化物酶和IgM形成复合物为这些免疫调节和抗微生物蛋白转运至其作用位点并保护它们免于蛋白水解。OPN在母乳中含量高达138mg/L，占乳蛋白总量的2.1%，被认为是母乳中重要的免疫活性蛋白，因此，许多高端婴配粉中都标称添加了OPN，旨在使配方奶粉“无限接近母乳”，以满足婴幼儿早期发育的需求。欧盟委员会发布的新条例(EU) 2023/463规定了在婴儿配方奶粉中骨桥蛋白的最大使用量应控制在151 mg/mL以下。因此，建立一种有效、准确和快速的方法来定量婴配粉中OPN的含量是乳制品质量的保证。

目前报道的关于OPN含量检测的方法包括酶联免疫法(ELISA)[1]和液相色谱质谱联用法(LCMS)[2]等，其中ELISA因操作简便，广泛用于母乳中OPN的检测，可能与其他蛋白发生交叉反应，导致结果被高估。LC-MS是一种灵敏的、通用的分析物测定方法。然而，不易直接定量完整OPN，需要将OPN的两部分酶解成特定肽段后，通过分析肽段进行定性和定量。王象欣等[3]开发了HPLC方法检测乳制品中OPN含量，通过离子交换柱实现乳制品中OPN与其他蛋白的分离与检测。与HPLC相比，毛细管电泳技术(CE)是一种以高压电场为驱动力的分离技术，更适合用于带电的、大极性的蛋白分离和检测。且相较于HPLC，CE具有分离速度快，操作简便，分离度高，试剂消耗量低等多种优势，已在多种蛋白产品中广泛应用，如蛋白药物质量研究。乳制品行业也已有多种蛋白的检测方法采用CE技术[4,5]，其中CE用于乳清蛋白总量测定、A2 -酪蛋白含量测定等方法已在国内外多个标准中收录。

本文利用毛细管区带电泳(CZE)开发了一种乳品中OPN蛋白分离及含量检测方法，从乳品样品前处理、CZE方法毛细管选择、背景电解质选择等方向进行了方法优化，并考察了方法的线性和重复性等结果。优化后的方法OPN的峰与乳品中其他蛋白分离度好，分析速度快，重复性好、线性良好，适用于婴儿配方奶粉及其他乳制品中OPN的分离和含量检测。

2. 试剂及方法

2.1 试剂和样品

试剂： 去离子水 (Millipore)，醋酸 (Sigma-Aldrich) ，氢氧化钠 (Sigma-Aldrich)，磷酸氢二钠(Sigma-Aldrich) ，磷酸二氢钠 (Sigma-Aldrich)，硼酸 (Sigma-Aldrich) ，柠檬酸 (Sigma-Aldrich)。

标准品： OPN标准品 (OPN纯度为95%) (Sigma-Aldrich) ，BSA (Sigma-Aldrich)，-乳白蛋白 (Sigma-Aldrich)，-lac (Sigma-Aldrich)，IgG (Sigma-Aldrich) 。

样品： 从超市购买3种不同品牌的1段婴配粉，分别命名为婴配粉-1，婴配粉-2，婴配粉-3。

2.2 试剂及样品溶液制备

2.2.1 背景电解质制备

背景电解质为40 mM pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液，配置方法：6.1 mL 40 mM 磷酸氢二钠 + 3.9 mL 40 mM 磷酸二氢钠，混合均匀。

2.2.2 标准品溶液制备

OPN标准储备液：精确称取OPN标准品10 mg，添加1 mL水，配制成10 mg/mL的OPN标准储备液。

乳清蛋白混标溶液：分别配制BSA 6.5 mg/mL, α-lac 7.72 mg/mL, β-lac 6.13 mg/mL，乳铁蛋白 6.76 mg/mL，IgG 5.28 mg/mL及OPN 6.2 mg/mL的单标准品溶液；各个单标分别取50 µL混合均匀，制成乳清蛋白混标溶液。

2.2.3 样品溶液制备

婴配粉样品溶液：取5 g婴配粉，加30 mL去离子水溶解后，加入4mL 500 mM氯化钙溶液混匀。于70℃下水浴20 min，冷却室温。用10%醋酸溶液调整pH至4.4，用水定容至25 mL。10000 g条件下离心10 min。取500 µL清液于10000 Da超滤管中，4000 g条件下离心20 min，向超滤管中加水定容至500 µL。取清液作为待测样品溶液。

OPN样品加标溶液：将OPN储备溶液加水分别稀释成6份不同浓度的OPN标准品溶液(稀释8倍，16倍，32倍，64倍，128倍和256倍)，取900 µL待测样品溶液加100 µL稀释后的OPN标准溶液，涡旋混匀，制备成加标OPN终浓度分别为125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.62 µg/mL, 7.81 µg/mL, 3.90 µg/mL的样品加标溶液。

2.3 仪器及方法

SCIEX PA 800 Plus毛细管电泳系统，匹配UV检测器，采集频率：2 Hz，检测波长：214 nm；中性涂层毛细管，50 µm内径，20/30.2 cm (有效/总长度)；2号狭缝；进样：2 psi，10 s；分离电压：-10 kV，20 min；毛细管温度：20 ℃；样品室温度：10 ℃。

毛细管冲洗条件：每天分析样品前需要对毛细管进行预冲洗，先用去离子水在20 psi压力下冲洗5 min，再用背景电解质在20 psi压力下冲洗5 min。每针运行前也需要对毛细管进行冲洗，先用去离子水在20 psi压力下冲洗2 min，再用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗2 min。

3. 结果与分析

3.1 CZE方法优化

3.1.1 背景电解质的选择

比较了40 mM pH7.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，40 mM pH7.0的硼酸缓冲液和40 mM pH7.0的磷酸缓冲液作为背景电解质对乳清蛋白标准品混合溶液中各蛋白的分离情况，结果如下图1所示：背景电解质为磷酸盐缓冲液时OPN与其他乳清蛋白的分离效果最好，故最终选择磷酸缓冲液作为背景电解质。

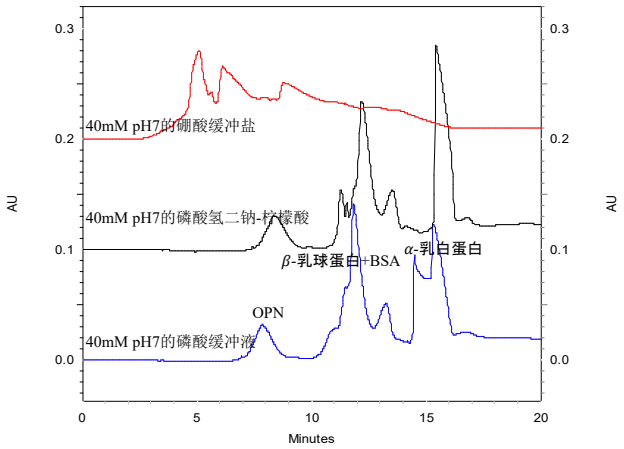


图1. 不同类型背景电解质下乳清蛋白标分离的电泳图

3.1.2 背景电解质pH的优化

确认背景电解质的类型后，进一步优化背景电解质的最佳pH，样品选择OPN标准品和乳清蛋白混标溶液，结果见图2(A)和(B)。图2(A)显示，在pH 6.0或者7.0时OPN标准品峰型更好；图2(B)结果显示pH 7.0时OPN与其他乳清蛋白分离度好，且蛋白分离时间短，所有蛋白在 20 min内出峰；当pH 6.0时OPN与其他乳清蛋白分离度最大，但分离时间长；pH 5.0时OPN峰展宽明显。最终确认pH 7.0作为背景电解质的最佳pH值。

3.1.3 样品前处理的优化

奶粉直接用水溶解时发现OPN与其它蛋白分不开，查阅文献发现OPN与奶粉中含量较高的酪蛋白的分离度差，而钙离子的引入，可使钙敏感酪蛋白发生沉淀，同时加热还能使酪蛋白与含有二硫键的乳清蛋白发生交联，减少干扰样液澄清。冷却后调pH值至4.4避免OPN发生沉淀，同时也可使未崩解的酪蛋白胶束进一步沉淀，降低干扰。后经优化最终确认样品前处理条件为：向样品溶液中加入氯化钙溶液，70℃下水浴20 min后冷却至室温，用10%醋酸调至pH 4.4，定容后离心取上清液，然后用10000 Da超滤管超滤，最后用水定容样品即得婴配粉样品溶液，对其进行检测。

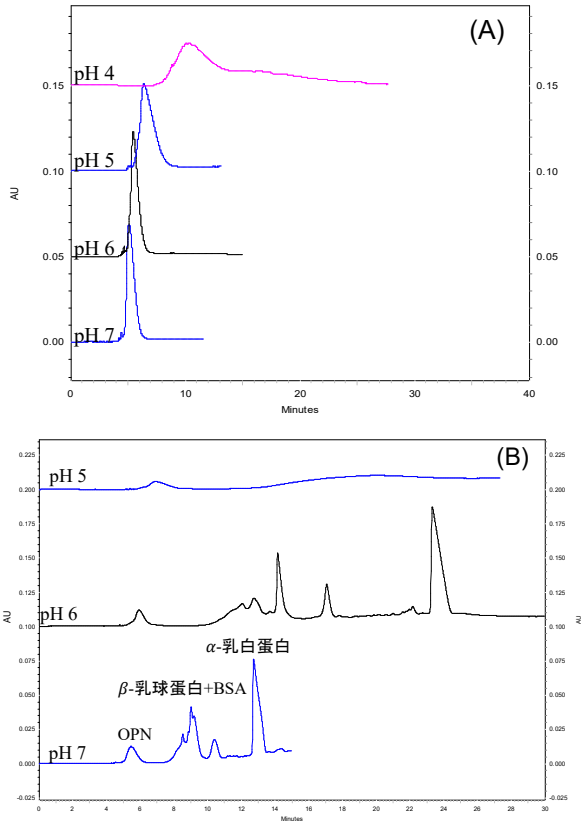


图2. 不同pH条件下OPN标准品和乳清蛋白混标的电泳图。(A)不同pH条件下OPN标准品溶液的电泳图 (B) 不同pH条件下乳清蛋白混标的电泳图

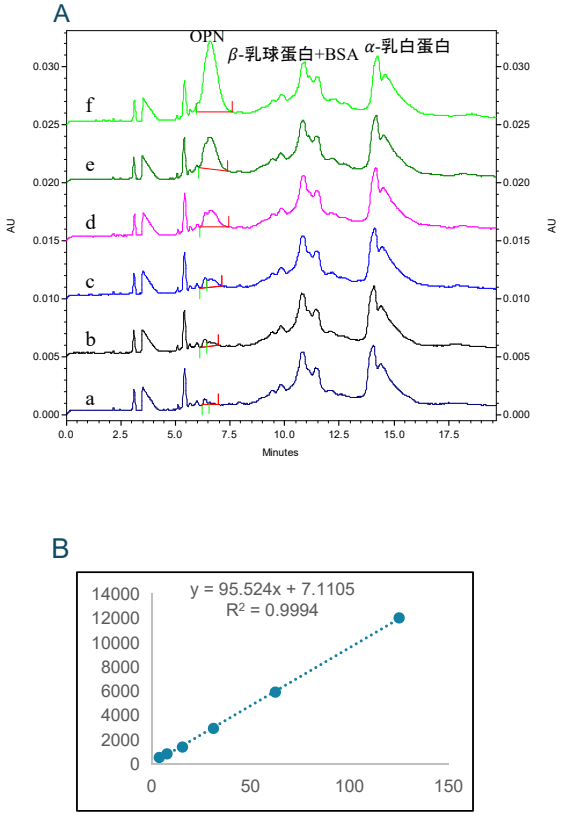


图3. 婴配粉-3加标不同浓度OPN的加标溶液电泳图谱(A)和标准曲线(B)。图A中a-f分别指OPN浓度为3.90 μg/mL, 7.81 μg/mL, 15.62 μg/mL, 31.25 μg/mL, 62.5 μg/mL和125 μg/mL的加标样品溶液电泳图

3.2 方法验证

3.2.1 线性范围

以婴配粉-3为基质，按照2.2.3中样品加标溶液的制备方式制备一系列OPN样品加标溶液。OPN终浓度分别为3.90 μg/mL, 7.81 μg/mL, 15.62 μg/mL, 31.25 μg/mL, 62.5 μg/mL, 125.0 μg/mL，不同浓度对应的电泳图见图3(A)。以OPN浓度为横坐标，校准峰面积为纵坐标绘制标准曲线。标准曲线见图3(B)，标准曲线的R^2为0.9994，说明OPN在3.90 μg/mL~125 μg/mL浓度范围内线性良好。

3.2.2 重复性

以婴配粉-3为基质，按照2.2.3中样品加标溶液的制备方式制备OPN浓度为62.52 μg/mL的样品加标溶液，重复进样6次，计算迁移时间和校正峰面积的重复性。实验结果迁移时间的RSD值为0.09%，校正峰面积的RSD值为1.72%，说明该方法重复性良好。

3.2.3 回收率

以婴配粉-3为背景基质，按照加标样品处理方法制备OPN终浓度为20 μg/mL，60 μg/mL和100 μg/mL的加标样品，每个浓度平行制备3份，代入线性方程计算OPN的回收率。低、中、高浓度的OPN回收率为82.98%-96%。

3.3 婴配粉中OPN含量检测

购买的3种婴配粉按照2.2.3样品溶液制备方法制备成待测样品溶液。另外，取待测样品溶液加标制备成含OPN浓度为125.0 μg/mL的加标样品溶液。加标样品溶液与样品溶液平行检测，通过加标样品溶液中OPN的出峰位置作为对照确认婴配粉中OPN的出峰位置。三个样品中OPN含量计算结果见下表。

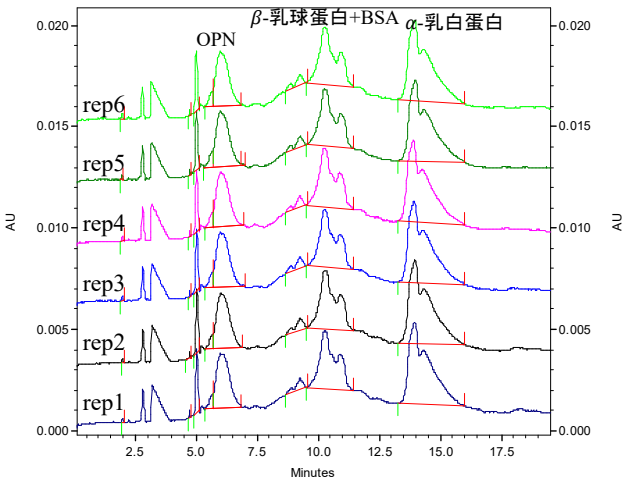


图4. OPN样品加标溶液的电泳图(n=6)

表1. 不同浓度OPN加标样品溶液中OPN的回收率(n=3)

理论浓度(μg/mL)	计算浓度(μg/mL)	回收率(%)
20	16.60	82.98
60	57.59	95.98
100	96.00	96.00

4. 结论

本文开发了一种毛细管区带电泳用于分离和定量检测乳品中骨桥蛋白的方法，通过优化样品前处理条件，毛细管类型，背景电解质的类型和pH等条件，确认了CZE分离骨桥蛋白的最佳条件。用OPN加标样品进行方法学考察，考察了该方法的线性范围，重复性和回收率，结果线性范良好，加标样品中OPN的校准

表2. 不同婴配粉中OPN含量检测结果

样品名称	溶液中OPN浓度 (μg/mL)	奶粉中OPN含量 (mg/100g)
婴配粉-1	2.28	27.37
婴配粉-2	2.12	25.45
婴配粉-3	1.84	22.09

峰面积的重复性好，低、中、高浓度样品回收率符合要求，说明该方法非常适合用于婴配粉中骨桥蛋白的分离检测。用该方法对三个婴配粉中骨桥蛋白的含量进行了检测，确认婴配粉中骨桥蛋白的含量。

5. 参考文献

1. Wang, K. X.; Denhardt, D. T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. Cytokine Growth Factor Rev. 2008, 19 (5-6), 333-345.
2. Hu, B.; Zhang, J.; Jiang, Y.; Tong, W.; Lai, S.; Ren, Y. Quantitative determination of osteopontin in bovine, buffalo, yak, sheep and goat milk by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and stable isotope dimethyl labeling. Food Chem. 2021, 343, 128489.
3. Wang, X. X; Cui, D.Y; Qu, X.Y; You, H. Analytical Ultracentrifugation-Calibrated Anion-Exchange Chromatography for Sensitive and Intact Determination of Osteopontin in Infant Formula and Dairy Products. J. Agric. Food Chem. 2023, 71, 13880-13888.
4. SCIEX Technote, 毛细管区带电泳方法对乳制品中A2 -酪蛋白含量的测定, RUO-MKT02-10644-ZH-B
5. SCIEX Technote, CE-SDS方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析, RUO-MKT-02-7649-ZH-B

Ultrafast Analysis of Human Milk Oligosaccharides (HMOs) by Capillary Gel Electrophoresis

Andras Guttman[1] Marton Szigeti[2] and Daniel Sarkozi[2]
[1]*SCIEX, Brea, CA 92130, USA;*
[2]*Horváth Csaba Memorial Laboratory of Bioseparation Sciences, University of Debrecen, Hungary*

Introduction

Human milk oligosaccharides (HMOs) are the third most abundant ingredients in human milk [1], and arecritical to child development [2]. Their quantities and structures differ in the various lactation periods of the mother and are population specific [3, 4]. Consequently, there is an increasing demand to produce suitable baby formulas [5], being addressed by both pharma and food manufacturing companies with the goal to develop natural analogue HMO based functional food additives. Academic institutions are also heavily investigating milk samples from various sources to understand the biological role of HMOs in child development [6-8].

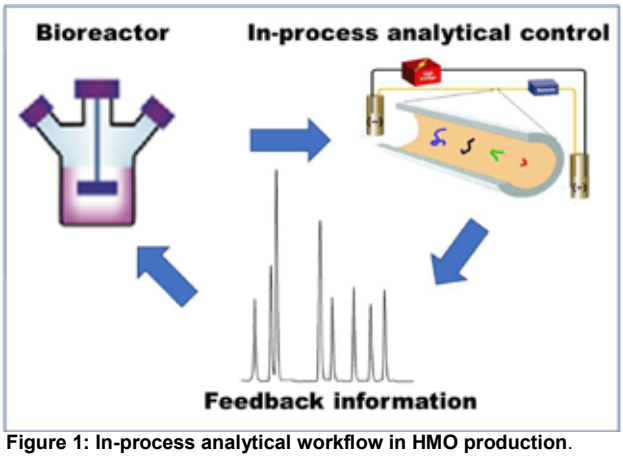


Figure 1: In-process analytical workflow in HMO production.

The building blocks of HMOs are based on lactose that is modified by β-N-acetyllactosamine (LacNAc) or lacto-N-biose (LNB) with the possible addition of fucose (Fuc) or sialic acid (Neu5Ac). Currently, more than 200 HMO structures are known [9]. Their theoretical varied linkage types significantly increase their complexity level, resulting in numerous isomeric structures [10, 11]. Therefore, there is a great demand for high performance analytical methods to address the challenging task of HMO characterization [12]. Capillary electrophoresis (CE) is one of the most effective glycoanalytical methods broadly used in the pharmaceutical, biomedical and food industries [13, 14]. After tagging the sugars with a fluorescent label (e.g., aminopyrenetrisulfonate, APTS), the sensitivity of capillary electrophoresis (CE) based analysis with laser-induced fluorescent detection (LIF) can be as low as 10^{-10} M. APTS also provides charge to the otherwise mostly neutral sugars to produce their electromigration. It is important to note that all reducing sugars are labeled at their reductive end only, making quantification easy due to the one APTS/sugar structure stoichiometry [15]. With the use of borate containing buffers systems, the secondary equilibrium of the borate-diol complexation may further improve resolving power [16]. Utilizing sugar and linkage specific exoglycosidase based digestions, the sequence of the oligosaccharide structures can aslo be determined [17].

During fermentation and enzymatic bioprocessing of HMOs, rapid analytical in-process control is crucial to provide the necessary information for the decision maker to make the appropriate feedback and fine tune the bioreaction parameters. In this Technical Note the analysis of the ten most important HMOs are demonstrated utilizing the SCIEX's Fast Glycan Sample Preparation and Analysis and the SDS-MW kits, this latter with a borate containing background electrolyte. **Food manufacturers currently facing challenges in adopting fast and high-resolution separation methods to the analysis of human milk oligosaccharides will obtain the desired resolution and speed with the use of the methods described in the Technical Note.** Figure 1 shows the suggested workflow of sampling from the bioreactor, rapid analysis by the PA 800 Plus system, and immediate feedback to the bioreactor if any fine tuning is necessary in the fermentation parameters to obtain faster and more precise production of the required HMOs.

Key Features

- An ultrafast glycoanalytical technique to decipher the high complexity of HMOs during the entire bioprocessing workflow, including lot release
- Provides help in faster decision making needed to make the appropriate feedback and fine tune the bioreaction parameters during fermentation and enzymatic bioprocessing of HMOs
- SCIEX's HR-NCHO and SDS-MW separations provided complementary resolving power for all synthetic HMOs analyzed

- Utilization of a secondary equilibrium via borate-diol complexation provided a significant step forward, towards comprehensive in-process control for HMO production
- Fine tuning of the resolving power was possible by mixing the two gel formulations

Experimental

Chemicals

The Fast Glycan Labeling and Analysis Kit (part # B94499PTO) including the separation gel-buffer system and the 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid tagging dye and the separation gel from the SDS-MW kit (part # 390953) were from Sciex (Brea, CA, USA). Acetic acid (glacial), tetrahydrofuran (THF), sodium-cyanoborohydride (1 M in THF) and water (HPLC grade) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The HMO standards (Table 1) were from Glycom (Hørsholm, Denmark).

Sample Preparation

Two milligrams of each sugar standards were labeled by the addition of 18 µL of 20 mM APTS (in 20% acetic acid) and 2 µL of $NaBH_3CN$ (1 M in THF), followed by overnight incubation at 37°C with the vial lid open [18]. The labeled samples were reconstituted in 100 µL HPLC grade water (labeled stock) and further diluted by 1,000x to 10,000x prior to capillary gel electrophoresis analysis.

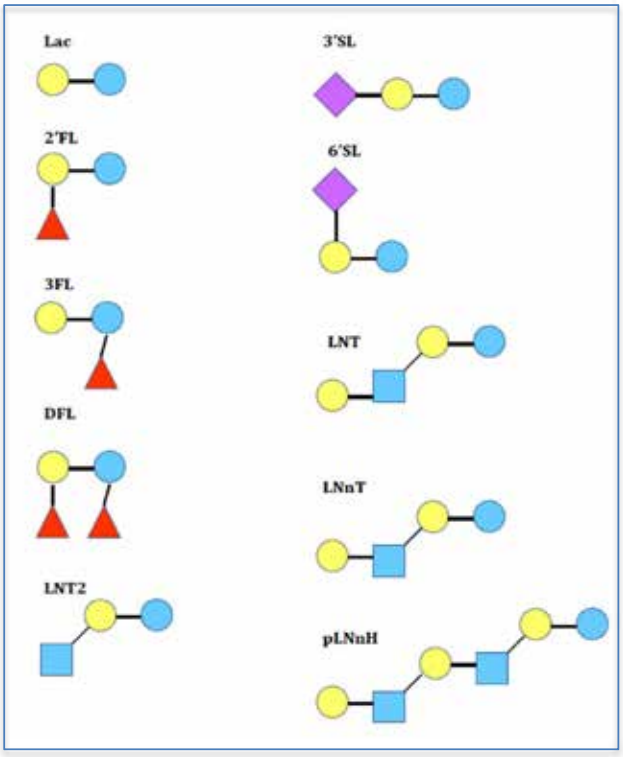
Capillary SDS-Gel Electrophoresis

A PA800 Plus Pharmaceutical Analysis system (Sciex) equipped with a solid state laser-induced fluorescence detector (488 nm excitation wavelength with 520 nm emission filter) was used for all capillary electrophoresis separations with the HR-NCHO and SDS-MW separation gel buffer systems. CGE-LIF analysis of the APTS labeled HMOs were performed in a pre-built EZ-CE cartridge (part # A55625) with 20 cm effective length (30 cm total length), 50 µm ID bare fused silica capillary columns by applying 1,000 V/cm electric field strengths in reversed polarity mode (cathode at the injection side). The electrokinetic sample injection protocol was as follows: 5.0 psi for 5.0 sec water pre-injection, followed by 2.0 kV for 2.0 sec sample injection. Data acquisition and analysis were accomplished using the 32Karat (version 10.1) software package (Sciex).

Results and Discussion

Analysis of the ten most important HMO containing test mixture (Table 1) was accomplished by using the HR-NCHO and SDS-MW gels (Figures 1 and 2, respectively). Closer look at the electropherograms in Figures 1 and 2 exhibited remarkable differences.

Table 1. The components of the HMO test mixture. Lac: lactose, 2'FL: 2'-fucosyllactose, 3FL: 3-fucosyllactose, DFL: difucosyllactose, LNT2: lacto-N-triose, 3'SL: 3'-sialyllactose, 6'SL: 6'-sialyllactose, LNT: lacto-N-tetraose, LNnT: lacto-N-neotetraose, pLNnH: para-lacto-N-neohexaose



With the use of the HR-NCHO gel, the extra charge carrying sialylated structures migrated first (6'-sialyllactose and 3'-sialyllactose) followed by the neutral oligosaccharides according to their hydrodynamic volumes since all of them carried the same APTS associated charges. The disaccharide lactose migrated after the sialylated glycans, followed by the trisaccharides. Foremost, the compact fucosylated ones (2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose) and later the more stretched lacto-N-triose. In this case, due to their very similar mass to hydrodynamic volume ratios, the 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose structures co-migrated. All tetrasaccharides (difucosyllactose, lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose) were well separated. Please note that the lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose structures differed only by their β1-3 and β1-4 galactose linkage at the non-reducing terminal. The large para-lacto-N-neohexaose hexasaccharide migrated last. With the use of this background electrolyte, the entire analysis took less than 3.4 minutes at the optimal separation temperature of 25°C.

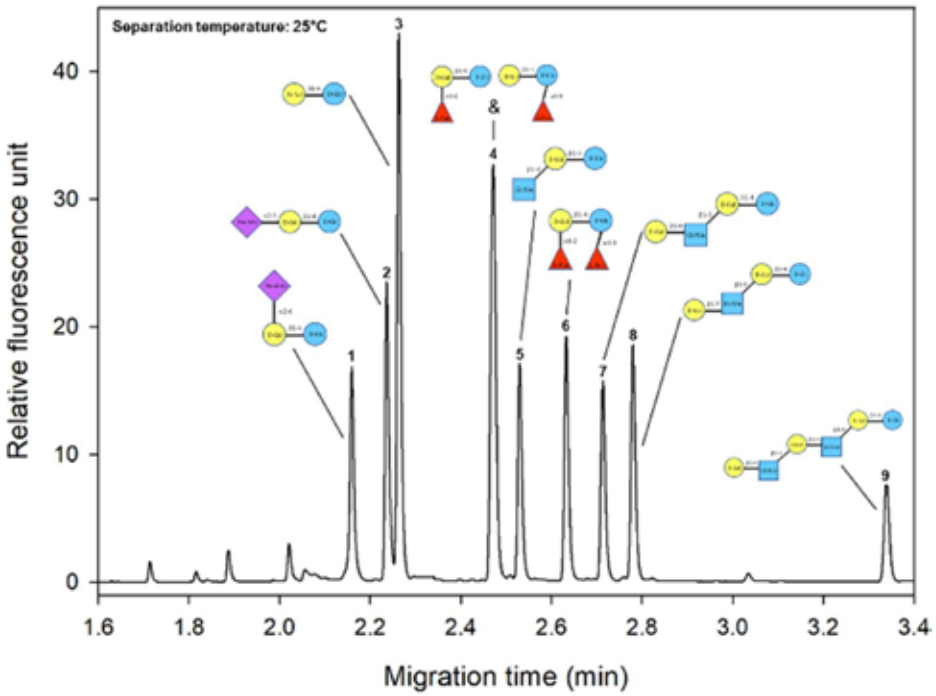


Figure 1. Capillary gel electrophoresis separation of the HMO test mixture using the HR-NCHO gel. The corresponding structures are shown above each peak. Conditions: Bare fused silica capillary with 20 cm effective length (30 cm total length), 50 µm ID; HR-NCHO gel buffer system; Separation temperature: 25°C; Applied electric field strength: 1000 V/cm; Injection sequence: 1) 5.0 psi for 5.0 sec water pre-injection, 2) 2.0 kV for 2.0 sec sample injection.

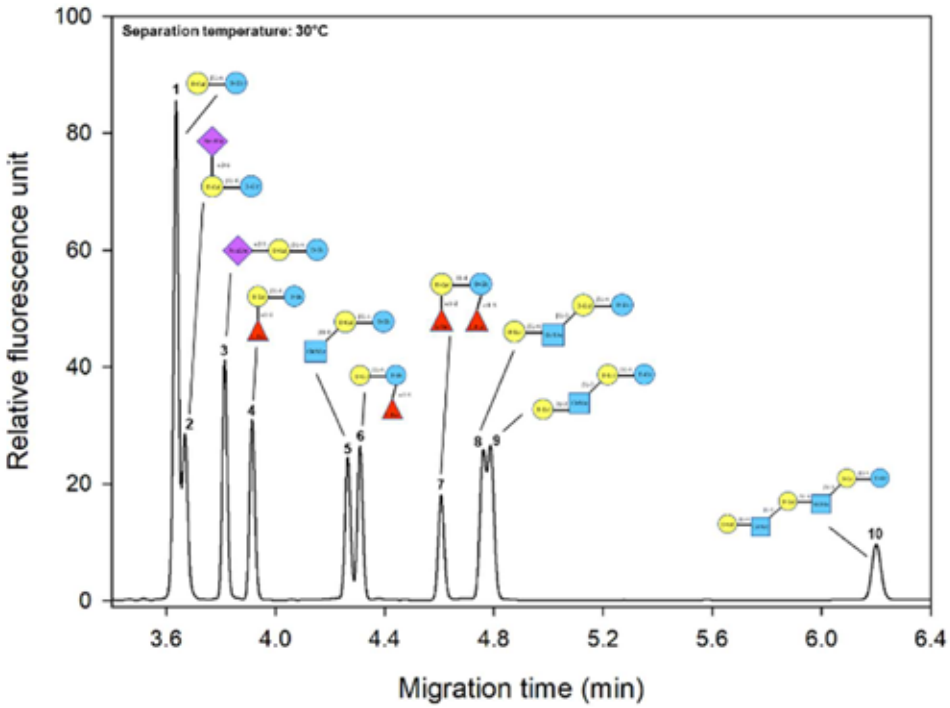


Figure 2. Capillary electrophoresis separation of the HMO test mixture using the SDS-MW gel. The corresponding structures are shown above each peak. Conditions: Bare fused silica capillary with 20 cm effective length (30 cm total length), 50 µm ID; SDS-MW gel buffer system; Separation temperature: 30°C; Applied electric field strength: 1000 V/cm; Injection sequence: 1) 5.0 psi for 5.0 sec water pre-injection, 2) 2.0 kV for 2.0 sec sample injection.

Figure 2 depicts the separation of the HMO test mixture using the SDS-MW gel matrix. As one can observe, the migration order is different in comparison to Figure 1. The total analysis time was slightly longer (6.3 min) at the optimal separation temperature of 30°C. Please note that in this instance the large amount of borate in the gel-buffer system had a strong tendency to complex with the vicinal OH groups of the human milk oligosaccharides. This secondary equilibrium affected the electrophoretic mobilities of the sample components also causing resolution alterations. Lactose, the smallest HMO in the mixture migrated first, faster than the extra charge carrying 6'-sialyllactose and 3'-sialyllactose, probably due to the different borate complexation with these structures. Most notably, excellent separation of the positional isomer trisaccharides of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose were obtained with this separation matrix in contrast to their co-migration with the use of the HR-NCHO gel-buffer system. Actually, the separation window was so great that the lacto-N-triose trisaccharide migrated in between them. The tetrasaccharides represent the next separation block. The difucosyllactose structure well separated from the closely migrating lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose oligosaccharides, which latter two migrated in a split peak. Apparently, the borate complexation very much diminished the hydrodynamic volume differences between the β1-3 and β1-4 linked structures. The hexasaccharide para-lacto-N-neohexaose was well separated from all and migrating last.

Since neither the HR-NCHO nor the SDS-MW gels offered full separation of all 10 important HMOs, mixing of the two gels was attempted. Figure 3 shows the separation of all sample components at 40°C by mixing the two gel formulations in a 1:1 ratio. This example clearly demonstrated that fine tuning by adjusting the proportion of the two gel formulations as well as the separation temperature represented further options to increase the separation power for the sample compontents of interest in hand.

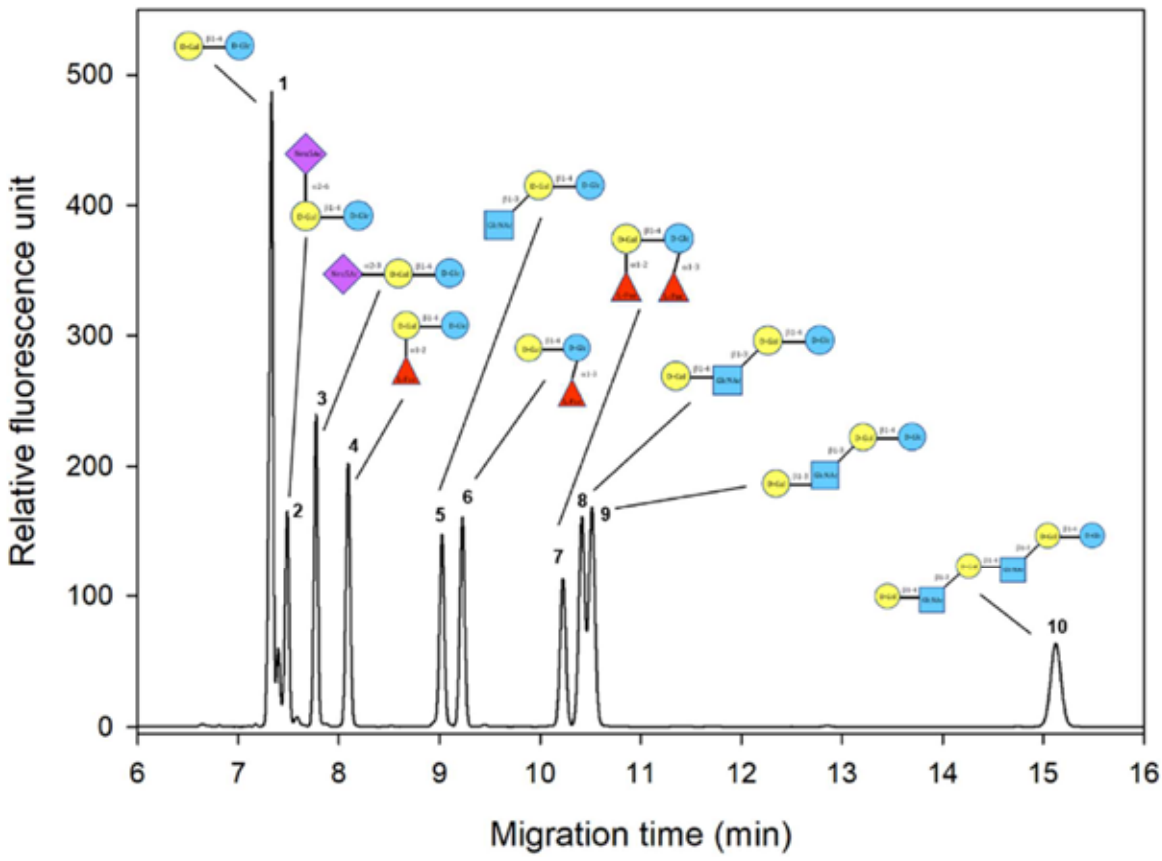


Figure 3. Fine tuning of the resolving power by mixing the HR-NCHO and SDS-MW gels (1:1)

Conclusions

In this Technical Note, two complementary separation matrices the HR-NCHO and SDS-MW gels were compared for ultrafast and high resolution analysis of human milk oligosaccharides (HMOs) by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection as shown in the workflow of Figure 1. The 2'- and 3-fucosyllactoses were co-migrating with the use of the HR-NCHO gel-buffer system, while well separated in the SDS-MW gel. Conversely, the lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose, which were well separated by the HR-NCHO gel, resulted only in a split peak with the SDS-MW gel composition. Therefore, the appropriate separation matrix should be chosen to address adequate HMO analysis during production. In a rare case requiring the use of both gels for a sample mixture possibly containing the fucosyllactose and lactotetraose isomers, the total analysis time of the two runs would still be less than 10 minutes. Alternatively, the two gel matrices can be mixed, and the separation temperature can be fine-tuned to accommodate the actual separation problem in hand. **Researchers can now rapidly and efficiently analyze human milk oligosaccharides from production batches, baby formulas or food additives by simply choosing any of these gel-buffer systems or a mixture od both to obtain the desired resolution.**

Acknowledgment

The authors greatly acknowledge the generous provision of the HMO standards by Glycom (Hørsholmm, Denmark). The stimulating discussions with Drs Sahana Mollah and Elliott Jones are also highly appreciated.

References

1. Ballard, O. and A.L. Morrow, *Human milk composition: nutrients and bioactive factors.* Pediatr Clin North Am, 2013. **60**(1): p. 49-74.
2. Quigley, M., N.D. Embleton, and W. McGuire, *Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants.* Cochrane Database Syst Rev, 2019. **7**: p. CD002971.
3. Bode, L., *Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama.* Glycobiology, 2012. **22**(9): p. 1147-62.
4. Coppa, G.V., et al., *Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation.* Acta Paediatr Suppl, 1999. **88**(430): p. 89-94.
5. Liu, Z., et al., *Human milk and infant formula differentially alters the microbiota composition and functional gene relative abundance in the small and large intestines in weanling rats.* Eur J Nutr, 2019.
6. Zhu, J. and K.A. Dingess, *The Functional Power of the Human Milk Proteome.* Nutrients, 2019. **11**(8).
7. Goonatilleke, E., et al., *Human Milk Proteins and Their Glycosylation Exhibit Quantitative Dynamic Variations during Lactation.* J Nutr, 2019. **149**(8): p. 1317-1325.
8. Breakey, A.A., et al., *Illness in breastfeeding infants relates to concentration of lactoferrin and secretory Immunoglobulin A in mother's milk.* Evol Med Public Health, 2015. **2015**(1): p. 21-31.
9. Ninonuevo, M.R., et al., *A strategy for annotating the human milk glycome.* J Agric Food Chem, 2006. **54**(20): p. 7471-80.
10. Kobata, A., *Structures and application of oligosaccharides in human milk.* Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010. **86**(7): p. 731-47.
11. Grabarics, M., et al., *Analytical characterization of human milk oligosaccharides - potential applications in pharmaceutical analysis.* J Pharm Biomed Anal, 2017. **146**: p. 168-178.
12. Rassi, Z.E., *Carbohydrate Analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*. 2012: Elsevier Science.
13. Guttman, A., *Capillary electrophoresis in the N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals.* Trends in Analytical Chemistry 2013. **48**: p. 132-143.
14. Szilagyi, T.G., et al., *Analysis of the oligosaccharide composition in wort samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection.* Food Chem, 2018. **256**: p. 129-132.
15. Guttman, A., *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis.* Nature, 1996. **380**(6573): p. 461-2.
16. Hoffstetter-Kuhn, S., G. Alt, and R. Kuhn, *Profiling of oligosaccharide-mediated microheterogeneity of a monoclonal antibody by capillary electrophoresis.* Electrophoresis, 1996. **17**(2): p. 418-22.
17. Szigeti, M. and A. Guttman, *Automated N-Glycosylation Sequencing Of Biopharmaceuticals By Capillary Electrophoresis.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11663.
18. Reider, B., M. Szigeti, and A. Guttman, *Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination.* Talanta, 2018. **185**: p. 365-369.

CGE-LIF进行支链淀粉分支结构中葡萄糖平均聚合度的分析

The degree of glucose polymerization in branch structure of amylopectin was analyzed by CGE-LIF

高铁，兰朝辉，陈泓序，郭立海
Gao Tie, Lan Zhaohui, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX，中国
SCIEX, China

Key word: CGE-LIF，支链淀粉，葡聚糖，平均聚合度

1. 前言

淀粉是由葡萄糖分子聚合而成的多糖链，基本构成单位为α-D-吡喃葡萄糖，由支链淀粉和直链淀粉组成，其中直链淀粉是长直链，通过α-1,4-糖苷键连接，分子量在3-16万范围内，相当于200-980个葡萄糖单元连结而成，如图1；支链淀粉结构复杂，分量也更大，在10-100万范围内，相当于600-6000个葡萄糖单元连结而成，支链淀粉具有多个分支，分支通过α-1,6-糖苷链连接，分支的数量在50以上，整个支链淀粉形如树枝状，如图2（其中红色标注位置为异淀粉酶的切割位点）。支链淀粉分支结构中葡萄糖的平均聚合度一直是淀粉结构研究的热点，其中聚合度（Degree of Polymerization, DP）代表了糖链中糖的数量（及糖链长度），而平均聚合度代表的是在不同长度的糖链混合样品中聚合度的平均值（计算公式可参考结果部分）。分支结构链长分布的传统方法通常依靠分子排阻方式进行分离[1]，依靠折射率和光散射进行检测。然而这些方法对于不同长度分支结构的分辨率略差，并且以分子量为基础的检测手段灵敏度较差。同样有报道利用阴离子交换高效液相色谱系统匹配安培检测器和成像电泳匹配荧光检测器进行分支结构链长分析[2]，但这两种方法都不能很好地解决淀粉中糖链长度范围分析中遇到的分辨率和定量问题。

使用异淀粉酶将淀粉中的分支结构切割下来。分支结构的还原末端通过还原胺化反应标记上荧光染料（8-amino-1,3,6-pyrenesulfonic acid，APTS），通过PA800 Plus药物分析系统（图3）结合激光诱导荧光检测器（LIF）进行支链淀粉分支结构链长的检测，并计算平均聚合度。该方法在1-100多葡萄糖链的长度范围内均可提供良好的分离度，可实现一个单元葡萄糖的分离，考察分支结构的平均聚合度，并且超高灵敏度的LIF检测器为后续的定量工作提供了更优质的支持。



图1. 直链淀粉的结构示意图

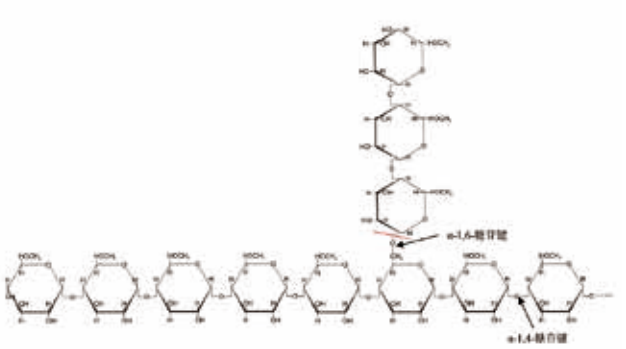


图2. 支链淀粉的结构示意图（红色为异淀粉酶切割位点，可将支链淀粉的分支切割下来）



图3. PA800 Plus药物分析系统和糖标记及分析试剂盒

2.1. 试剂、方法和样品

试剂耗材：糖标记及分析试剂盒（SCIEX，PN477600），包含APTS（SCIEX，PN 501309，5 mg）、分离凝胶（SCIEX，PN 477623，56 mL）、N-CHO涂层毛细管（SCIEX，PN 477601，50 µm I.D.）和葡聚糖梯度标准品（G20，50 mg），醋酸（Sigma-Aldrich，PN 695092），1 M溶于THF的氰基硼氢化钠（Sigma-Aldrich，PN296813），二次去离子水（Millipore）。

样品：葡萄糖梯度标准品（G20），异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉粉末（异淀粉酶的作用是：水解支链淀粉分支的a-1,6-糖苷键，切下整个分支）。

2.2. 样品前处理方法

取100 µL 15%（v/v）的醋酸溶解5 mg APTS，涡旋充分溶解后标记为APTS工作溶液。

G20标准品制备：取5 mgG20标准品溶于80 µL二次去离子水中，取溶解好的G20标准品2 µL，添加2 µL 1M溶于THF的氰基硼氢化钠，再添加2 µL APTS工作溶液，进行充分混合，60 ℃孵育4 h，添加96 µL二次去离子水终止标记反应，样品可于-80 ℃冻存3个月。

样品制备：取100 µg异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉粉末，加5 µL APTS工作溶液与10 µL 15% 冰醋酸和5 µL 1M溶于THF的氰基硼氢化钠，充分涡旋混合，60℃孵育4 h，添加500 µL二次去离子水终止标记反应，样品可于-80℃冻存3个月。

标记反应流程如图4。

2.3. 仪器及方法

PA800 Plus药物分析系统匹配LIF检测器（SCIEX）。N-CHO涂层毛细管：40/50 cm(有效/总长度)，50 µm 内径；分离条件：-30 kV，20 min；进样条件：0.5 psi，5 s；毛细管温度：20℃；样品室温度：10℃；LIF检测器：488 nm（激发波长），520 nm（发射波长）。毛细管电泳分离步骤及详细参数设置如图5。

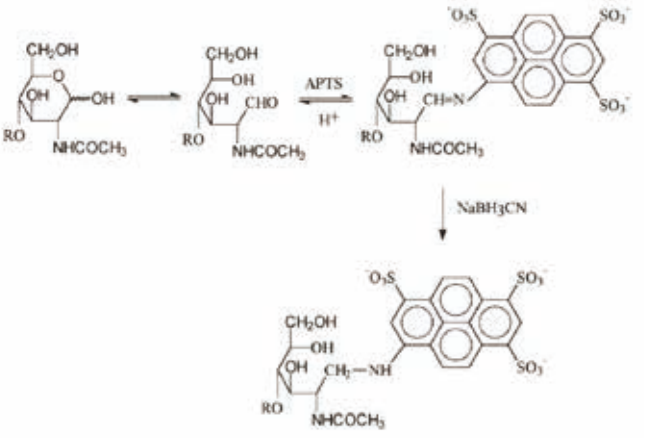


图4. APTS的标记反应

2. 结果

G20标准品与异淀粉酶处理后的脱支淀粉样品分别进行CGE-LIF分析，结果如图4。G20标准品为不同葡萄糖聚合物，最小的聚合度为一个葡萄糖，葡萄糖的数量以聚合度表示（DP）；通过与G20标准品的对比，发现异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉样品的第一个峰聚合度为6，后面的聚合度逐步增加，每个峰之间的差异即为一个葡萄糖单元。

根据样品中每个峰的迁移时间、峰面积、聚合度等参数，可以计算平均聚合度，公式为

$$\text{校正峰面积 } A_i = \frac{\text{峰面积} \times \text{毛细管有效长度(cm)}}{\text{迁移时间}} \quad \cdots\cdots(1)$$

$$\text{校正峰面积百分比 } A_i\% = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^{n} A_i} \times 100 \quad \cdots\cdots(2)$$

$$\text{平均聚合度} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \text{各峰的聚合度} \times A_i\%}{100} \quad \cdots\cdots(3)$$

Initial Conditions | LIF Detector Initial Conditions | Time Program

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	30.0 psi	3.00 min	B:B1	B0:B1	forward, In / Out vial inc 20	Gel Buffer-N rinse to clean capillary surface - Automatic increment every 20 cycles
2		Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	S:A1	B0:C1	Override, forward	Sample introduction
3		Wait		0.20 min	B:A4	B0:A4	In / Out vial inc 20	ddH2O dip to clean capillary tips - Automatic increment every 20 cycles
4	0.00	Separate - Voltage	30.0 KV	20.00 min	B:C1	B0:C1	0.17 Min ramp, reverse polarity, In / Out vial inc 20	Separation - Automatic increment every 20 cycles
5	1.00	Autozero						
6	20.00	Stop data						

图5. 毛细管电泳分离的时间程序

经过计算，可以确认该样品的聚合度分布在6-32，且峰之间的分离度均大于3，计算得到该样品的平均聚合度为15.24。

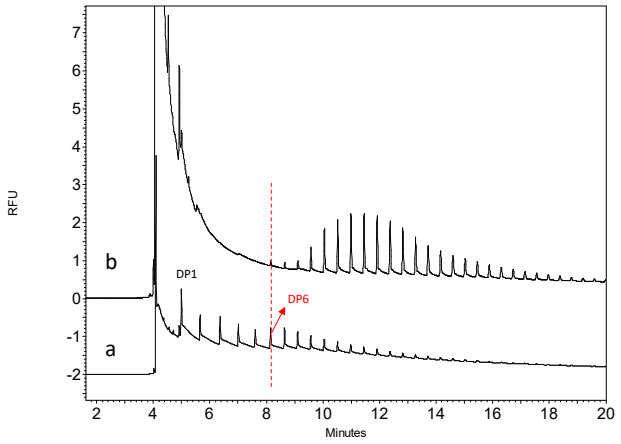


图4. G20标准品与脱支淀粉样品的CGE-LIF结果（DP1表示一个葡萄糖，DP6表示6个葡萄糖聚合）；a. G20标准品，b. 异淀粉酶处理后的蜡质玉米淀粉样品。

表1. 样品中各峰的迁移时间、峰面积、分离度等信息及平均聚合度结果

名称	时间	峰面积	分离度	聚合度	校正峰面积	校正峰面积百分比	含量
DP6	8.15	37222.00	0.00	6.00	228355.83	0.89	5.33
DP7	8.65	37857.00	9.42	7.00	218826.59	0.85	5.96
DP8	9.11	105901.00	5.88	8.00	581234.91	2.26	18.08
DP9	9.57	192931.00	5.73	9.00	1007998.96	3.92	35.28
DP10	10.05	363036.00	8.12	10.00	1806149.25	7.02	70.24
DP11	10.52	465512.00	7.81	11.00	2212509.51	8.60	94.64
DP12	10.99	529761.00	7.58	12.00	2410195.63	9.37	112.47
DP13	11.45	549123.00	7.19	13.00	2397917.03	9.32	121.22
DP14	11.92	547579.00	6.95	14.00	2296891.78	8.93	125.05
DP15	12.38	520788.00	6.63	15.00	2103344.10	8.18	122.69
DP16	12.82	476931.00	6.22	16.00	1860105.30	7.23	115.74
DP17	13.28	405840.00	5.87	17.00	1528012.05	5.94	101.02
DP18	13.72	341079.00	5.35	18.00	1242999.27	4.83	87.01
DP19	14.16	301107.00	5.07	19.00	1063230.93	4.13	78.56
DP20	14.60	272586.00	4.86	20.00	933513.70	3.63	72.60
DP21	15.03	244594.00	4.54	21.00	813685.96	3.16	66.45
DP22	15.45	208114.00	4.46	22.00	673508.09	2.62	57.62
DP23	15.88	168655.00	4.48	23.00	531029.60	2.07	47.50
DP24	16.30	137551.00	4.43	24.00	421935.58	1.64	39.38
DP25	16.73	111213.00	4.39	25.00	332375.97	1.29	32.31
DP26	17.14	89860.00	4.40	26.00	262135.36	1.02	26.50
DP27	17.55	74367.00	4.35	27.00	211871.79	0.82	22.25
DP28	17.97	60693.00	4.28	28.00	168873.12	0.66	18.39
DP29	18.38	50318.00	4.23	29.00	136882.48	0.53	15.44
DP30	18.79	41824.00	4.10	30.00	111293.24	0.43	12.98
DP31	19.19	35065.00	3.97	31.00	91362.69	0.36	11.01
DP32	19.60	26971.00	3.91	32.00	68803.57	0.27	8.56
平均聚合度							15.24

3. 结论

该毛细管凝胶电泳（CGE-LIF）方法具有如下特点：

- **高效分离**：可实现单个葡萄糖差异的分离。
- **操作方便**：具有商品化的毛细管、染料和分离凝胶。
- **实用性强**：可有效评估支链淀粉分支结构的葡聚糖链分子大小和分布情况，考察平均聚合度。

参考文献

[1] Hizukuri, S., Carbohydr. Res. 1985, 141, 295-306.

[2] Koizumi, K., Kubota. Y.. Tanimoto. T.. Okada. Y.. J. Chromatorr. 1989, 464, 305-373.

毛细管电泳法对果蔬汁中维生素C异构体的分离及定量分析

Separation and quantitative analysis of vitamin C isomers in fruit and vegetable juice by capillary electrophoresis

王文涛，唐红梅，高铁，罗继，陈泓序，郭立海

Wang Wentao, Tang Hongmei, Gao Tie, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX，中国；

SCIEX, China;

Keywords: Capillary electrophoresis, Vitamin C, Isomer, Quantitative analysis

1. 引言

维生素C又名抗坏血酸，是比较常见的水溶性维生素，大量存在于蔬菜、水果中，可作为营养补充剂预防和治疗坏血病。在生物体内，维生素C是一种抗氧化剂，因为它能够保护身体免于氧化剂的威胁。维生素C结构上含有两个手性碳原子，所以它有两对光学异构体，其中包括右旋（D型）及左旋（L型）异构体，D型维生素C一般不具有抗坏血酸的生理效应，自然界存在的具有生理活性的维生素C是L型维生素C。L型维生素C异构体的含量也是评价果蔬汁营养价值高低的重要指标，因此维生素C的L型异构体（简称VC-L）和D型异构体（简称VC-D）的分离和定量是非常有价值的。目前分离VC-L和VC-D型异构体的方法中，高效液相色谱法（HPLC）使用较为普遍，但该方法通常会使用高比例有机溶剂作为流动相，容易污染环境。毛细管电泳（CE）无需使用高比例有机溶剂，更加环保，目前已经广泛应用于食品与饮料中营养成分的分析。遵循食品企业的环保理念，环境友好、操作简便的CE方法是VC-L和VC-D型异构体的分离及定量分析的很好选择。

本文利用毛细管区带电泳（CZE）方法对果蔬汁中的VC-L和VC-D型异构体进行了分离及定量分析。

2. 试剂及方法

2.1仪器及方法

仪器：PA 800 Plus毛细管电泳，匹配PDA检测器，检测波长：264 nm；熔融石英毛细管，75 μm内径，50/60.2 cm（有效/总长度）；毛细管温度：25 ℃；样品室温度：10 ℃；进样方式：气压进样：0.5 psi，10 s；分离条件：20 kV，20 min。

毛细管的预处理和毛细管针与针之间的冲洗均进行如下操作：依次用0.1 N NaOH（20 psi，3 min）、去离子水（20 psi，2 min）和运行缓冲液（20 psi，5 min）冲洗毛细管。

2.2 试剂和样品

VC-L和VC-D标准品、氢氧化钠、盐酸 、硼砂、硼酸均购置于Sigma-Aldrich；去离子水产自Millipore。

样品为国内某品牌果蔬汁。

2.3溶液配制及样品前处理

标准品溶液配制：准确称取VC-L和VC-D标准品 10.0 mg，用0.01 M盐酸定容至 10.0 mL，得到浓度为1000.0 mg/L 的标准溶液，然后分别配制 500.0、250.0、125.0、20.0 、10.0 、5.0 mg/L的溶液，制作标准曲线。

样品溶液制备：

1) 果蔬汁-空白：即果蔬汁中没有添加VC-L和VC-D标准品；准确量取果蔬汁样品1.0 mL，用 0.01 M盐酸进行 5 倍稀释， 然后经0.45 μm滤膜过滤，得到果蔬汁-空白测定液。

2) 果蔬汁-加标：果蔬汁中分别加入VC-L和VC-D标准品，其中VC-L加标浓度约为500.0 mg/L；VC-D约为 300.0 mg/L；准确量取该果蔬汁样品1.0 mL，用 0.01 M盐酸进行 5 倍稀释， 然后经0.45 μm滤膜过滤，得到果蔬汁-加标测定液。

背景缓冲液制备：分别配置50.0 mM的硼砂溶液和200.0 mM 硼酸溶液，取8.0 mL硼砂溶液和2.00 mL硼酸溶液涡旋混合，得到运行缓冲液：40.0 mM 硼砂缓冲液，pH 约为9.2。

3. 结果与分析

3.1 VC-L和VC-D的分离及定性分析

本文以40.0 mM硼砂缓冲液（pH 9.2）作为背景缓冲液，无需使用有机试剂，采用CZE方法即可实现对VC-L和VC-D型异构体的高效分离，如图1 C所示，分离度为10.8。通过分析VC-L和VC-D标准品，即可准确判定不同异构体的出峰顺序，从而有效实现不同异构体的定性分析。

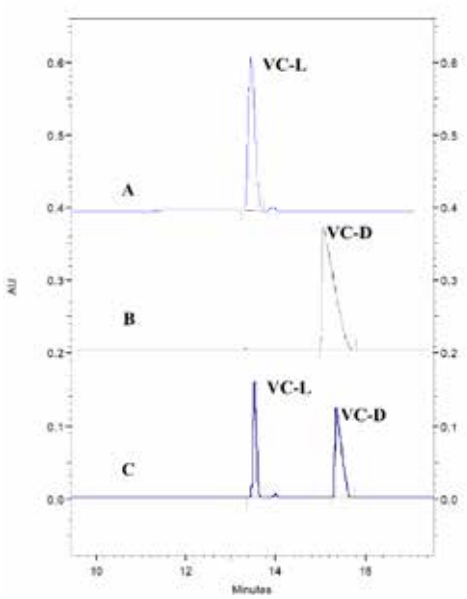


图1. VC-L和VC-D型异构体的分离及定性，A）1.0 mg/mL VC-L；B) 1.0 mg/mL VC-D；C）0.5 mg/mL VC-L和VC-D混合物；

3.2 VC-L和VC-D的定量分析

3.2.1 标准曲线的制作

选取浓度分别为5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、125.0 mg/L、250.0 mg/L、500.0 mg/L的VC-L和VC-D溶液，利用CZE方法进行分析（如图2所示），分别以不同浓度VC-L或VC-D型异构体的峰面积作为横坐标，维生素C标准品溶液的浓度作为纵坐标，制作标准曲线；VC-L和VC-D型线性方程分别为：$Y=5.816\times10^{-4}$ X-0.966，R^2=0.995；$Y=3.934\times10^{-4}$ X+1.218，R^2=0.996。当浓度为5.0 mg/L时，VC-L和VC-D的S/N分别为23.3和22.9。以S/N等于3时为检出限，S/N等于10时为定量限，VC-L和VC-D的检出限分别为0.6 mg/L和0.6 mg/L；定量限分别为2.1 mg/L和2.2 mg/L。

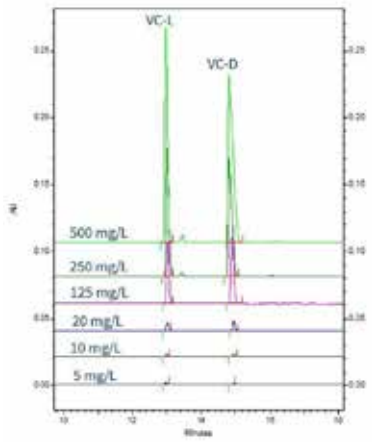


图2. 不同浓度的维生素C异构体的CE分离谱图；

3.3 果蔬汁中VC-L和VC-D含量的测定

对果蔬汁-空白以及果蔬汁-加标两个样品溶液进行CZE分析，得到两者的CE分离谱图，如图3所示。通过在果蔬汁中加入VC-L和VC-D型标准品，可以准确判断VC-L和VC-D的出峰位置。通过VC-L和VC-D的标准曲线，可计算出两者的浓度。由于果蔬汁-空白以及果蔬汁-加标在前处理中都已进行了5倍稀释，所以果蔬汁中VC-L和VC-D的实际浓度是理论浓度的5倍，计算结果如下表1所示；

表1. 果蔬汁-空白中VC-L和VC-D的校正峰面积及浓度

名称	校正峰面积	样品浓度(mg/L)
果蔬汁-空白VC-L	5355.0	239.0
果蔬汁-空白VC-D	171.0	13.0

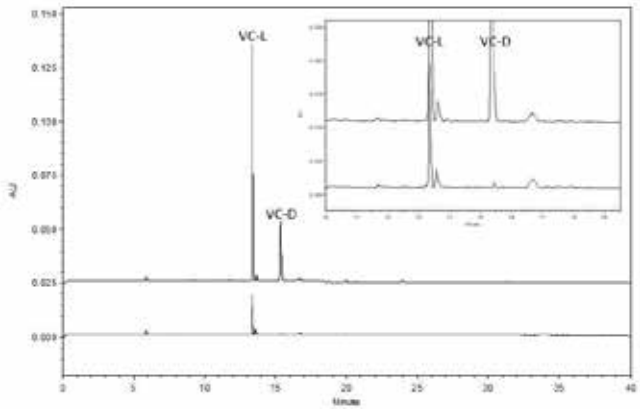


图3. 果蔬汁-空白和果蔬汁-加标溶液的CE分离谱图；

3.4 CZE方法重复性考察

以125.0 mg/L的VC-L和VC-D混合溶液连续5次进样，考察VC-L和VC-D迁移时间和校正峰面积的重复性，电泳分离谱图如图4所示。迁移时间RSD小于0.5%，校准峰面积RSD小于1%。

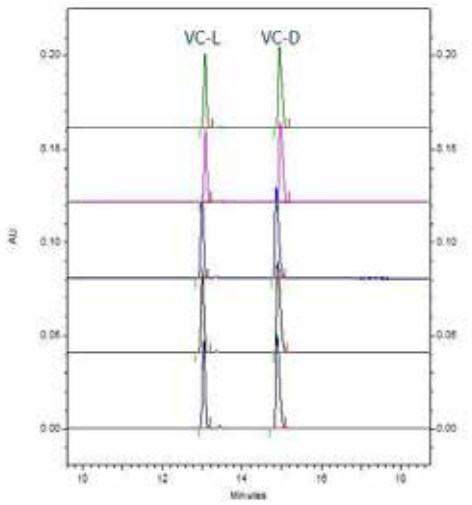


图4. 浓度为125.0 mg/L的VC-L和VC-D混合溶液连续5针进样的CE分离谱图；

4. 结论

本文借助于CZE方法对果蔬汁中维生素C 的L型及D型异构体进行了分离及定量分析。该方法主要表现出如下优点：

- 无需使用有机试剂，更加环保；
- 分辨率高，VC-L和D型异构体的分离度为10.8；
- 灵敏度高，L型和D型维生素C异构体的检出限分别为0.6 mg/L和0.6 mg/L；定量限分别为2.1 mg/L和2.2 mg/L；
- 方法重复性好，迁移时间RSD小于0.5%，峰面积RSD小于1%；

毛细管区带电泳对葡萄酒中的阴离子、有机酸和阳离子分析

John C. Hudson, Mark Lies
Beckman Coulter Life Sciences Brea, CA, USA

1. 简介

毛细管电泳（**Capillary Electrophoresis, CE**）技术成为商业化的分离技术已经经历了**20**多年的发展。该技术的主要优点是提供了自动化的分析平台实现了带电分析物的准确定量以及高效分离。**CE**所擅长的应用的领域包括生物治疗中抗体纯度和异质性的表征，糖分析和生物过程控制中的离子分析。**CE**的基本原理是其能够对带电的和极性分析物实现高效的分离，因此在**Beckman Coulter**的应用和服务支持下，很容易将**CE**拓展到其他领域。

CE技术可以拓展应用的一个领域即是食品和饮料行业。例如，在葡萄酒制造过程中，需要对酒的品质进行一致性和安全性的监测。意大利、法国和西班牙是世界上葡萄酒产量大国。在美国，葡萄酒的消费市场预估能够带来**320**亿美元的收益，为了保证如此庞大数量酒类品质的一致性，需要多个方面的监测，包括质量控制，分析资质认证以及打假。随着酒类行业的收入和需求进一步增长，新的葡萄种植者和葡萄酒生产商正在进入这个市场。 在某些时候，投机主义者会利用品牌进行虚假宣传甚至是造假。基于上述原因，建立酒类高品质的检测方法是十分必要的。

大多数葡萄酒的品质特征可以追溯到其葡萄品种，地理环境，甚至是葡萄酒制造过程。酒中成分的种类和浓度，是表征葡萄酒质量的关键指标中较为重要的一项，包括阴离子，阳离子，有机酸，谷胱甘肽，亚硫酸盐，溶菌酶和酚类化合物，由于这类物质均是带电的和极性的，因此均可以使用**CE**技术进行分析。从功能上看，离子和有机酸，与酒类的颜色、均衡度、味道相关，也会影响酒类的微生物和理化稳定性。谷胱甘肽是一种抗氧化剂，它可以为葡萄酒提供稳定的香味。而酚酸的存在会影响葡萄酒的味道、颜色和口感。亚硫酸盐可以自然存在，也可以人工添加，其有助于抑制微生物生长。因此，准确的对这些离子进行定量和定性，对全面了解葡萄酒的品质和特性非常重要。

在本研究中，我们用**CE**技术对多种商品化的葡萄酒样品进行离子分析。主要对阴离子，有机酸和阳离子进行表征，结果表明了该技术在葡萄酒粒子分析中是一项简单快速、高效且重现性良好的实用技术。

2、试剂与方法

2.1 标准品

需准备以下标准品：葡糖酸，如**D-**葡萄糖酸钙，**1-**乳酸和**1-**苹果酸（**Alfa Aesar**）；柠檬酸，草酸钠，硫酸钠，亚硫酸钠和酒石酸为分析纯（**Fisher Scientific**）。 用作标准的其他有机酸和阴离子是**Beckman Coulter**试剂盒中提供的。

2.2 试剂

二次去离子水（**DDI**）甲醇、**1 N**氢氧化钠和**0.1 N**盐酸的冲洗溶液都是分析纯（**VWR Scientific, Bridgeport, NJ, USA**）。

阴离子分析试剂盒（货号**A53537**）和阳离子分析试剂盒（货号**A53540**）（均来自**Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA**）用于阴离子和阳离子分离。

2.3 仪器

使用配备有**UV**检测器的**PA800 plus**毛细管电泳分析系统进行分离，阴离子分析试剂盒采用**230 nm**波长检测，阳离子分析试剂盒采用**200 nm**波长检测。该检测方式为间接紫外检测，需要在于缓冲溶液中添加有恒定紫外吸收的物质。

PA 800 plus使用**32 Karat v9.1**版本的软件进行控制。毛细管和样品储存温度分别设定在**25 ℃**和**10 ℃**。检测器数据采集速率设置为**4 Hz**。 检测器过滤器设置为**"Normal"**模式，过滤峰宽点设置为**16-25**。 这些设置用于本工作中描述的所有方法，包括平衡，分离和关机程序。这些设置在用户指南中有详细介绍。

2.4 毛细管

阴离子分析和阳离子分析试剂盒中提供的未涂层的熔融石英毛细管的内径为**75 µm**，外径为**375 µm**，总长度为**60.2 cm**，有效长度为**50 cm**。 对于阴离子分析，在每次运行之前，需将未涂

层的毛细管动态涂覆，形成带正电的表面。 对于阳离子分析，需将未涂层的毛细管进行双动态涂覆使其表面带负电荷。在两种试剂盒中，毛细管柱内表面在每次运行之前都会再生，从而保证产生一致的电渗流和迁移时间的准确性。

新毛细管在第一次使用前需要用试剂盒中**"Conditioner - Na"**溶液进行**1 min**的冲洗活化。等待**4 min**后，重复冲洗**40 s**。所有的冲洗程序的时间为**1 min**，冲洗压力为**20 psi**。如果在实验中出现样品峰的迁移时间和峰型与试剂盒说明书中的不符，需对毛细管柱再次进行活化。

在进行系统适应性实验或分析样品时时，毛细管必须进行活化。应当重复进样两次系统适应性的标准品，以确保迁移时间和校正峰面积百分比在整个序列中的一致性。

2.5 分析方法

阴离子分析和阳离子分析的分离方法和关机程序应当参照各自试剂盒说明书中的内容进行编辑和应用。

2.6 毛细管的储存

在从仪器上取下毛细管卡盒准备储存前，用试剂盒内的冲洗液在**20 psi**的压力下冲洗毛细管**5 min**，将毛细管卡盒放置在相应的存储盒内，并且将毛细管末端浸入装有冲洗液的小瓶内。切勿让毛细管末端风干，这样溶液造成毛细管柱的堵塞。将毛细管存储在**2 – 8℃**，且每周更换一次溶液。

2.7 样品制备

CE的适用于微量样品的分析，并且可以通过对葡萄酒的直接稀释来进行样品制备。除非可见颗粒，否则不需要过滤或离心样品。 最佳的稀释比例为酒和水按照**1:25**的比例进行稀释。可以取**0.2 mL**的样品加入到**50 mL**的容量瓶内，用阴离子分析试剂盒内的**"Condition - Na"**和水按照**1:1**的比例混合，并用该溶液将样品定容至**50 mL**。如果样品量较少或需要对其微量成分进行分析，可以按照**1:10**或**1:5**的比例对样品进行稀释。在样品量有限的情况下，可以使用微量样品瓶来进行进样，需至少 制备**100 µL**的样品量。

2.8 进样方式

该方法采用压力进样。电动（电压）进样可以用做预浓缩技术来增加分析物的进样量和分辨率。电动进样只会将带电的物质进样至毛细管内。电动进样的检出限（**Limit of Detection，LOD**）能够达到十亿分之一（**ppb**）。当采用该方法进行定量时，需采用内标法来进行定量，以此来补偿不同样品离子在电动进样时的"进样歧视"。在阴离子试剂盒中，电动进样可以提供低至十亿分之一（**ppb**）级别的检测限（**LOD**）。在阴离子试剂盒中，锌离子被用作内标，在阳离子试剂盒中，锂离子作为内标。

2.9 样品通量

阴离子和阳离子试剂盒用中提供的分析方法无需进一步的优化，可以使用**96**孔样品盘在**24**小时内进行**130**次阴离子或**160**次阳离子分析。 如果使用**48**位置托盘，则完成第一组样品时将需要对样品进行更换。如果需要，还可以在入口缓冲液托盘中添加样品（储存在入口缓冲液托盘中的样品无法进行温度控制）。

3、结果与讨论

我们着眼于商品化的葡萄酒中总阴离子，有机酸和阳离子含量的差异的分析。各类红葡萄酒和白葡萄酒的购买、稀释和分离均参照**Beckman Coulter**阴离子和阳离子试剂盒中定义的方案进行。 为了实现葡萄酒样品中各个离子的基线分离和准确定量。我们采用系统适应性样品来进行实验以此来表明该方法可以用于每种离子和有机酸的定性定量（图**1A**，**1B**和**1C**）。通常情况下，阴离子标准物迁移时间的**RSD%**≤**0.2%**和校正峰面积百分比的**RSD%**≤**3.7%**。阳离子标准物迁移时间的**RSD%**≤**0.06%**和校正峰面积百分比的**RSD%**≤**2.9%**。

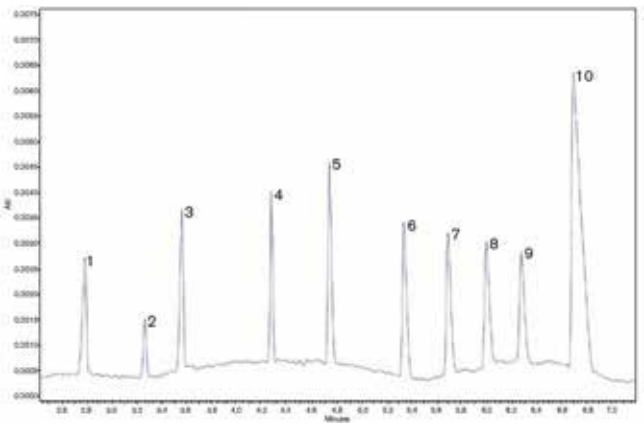


图 **1A**：有机酸根离子测试混合物。离子：**20 ppm**，叠氮根：**20 ppm**（**1**、氯离子；**2**、叠氮根；**3**、甲酸根；**4**、琥珀酸根；**5**、醋酸根；**6**、丙酸根；**7**、丁酸根；**8**、戊酸根）。

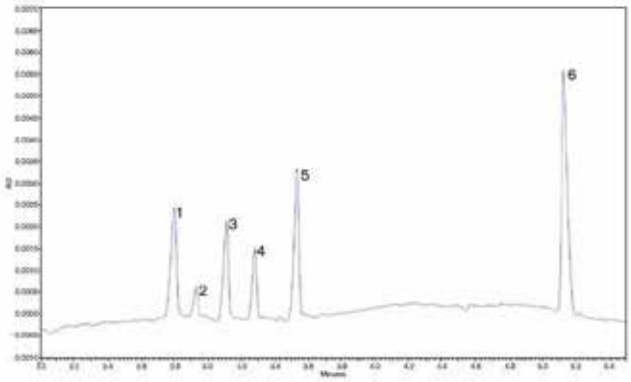


图 **1B**：无机阴离子测试混合物。离子：**20 ppm**，叠氮根：**20 ppm**（**1**、氯离子；**2**、硝酸根；**3**、硫酸根；**4**、叠氮根；**5**、氟离子；**6**、磷酸根）。

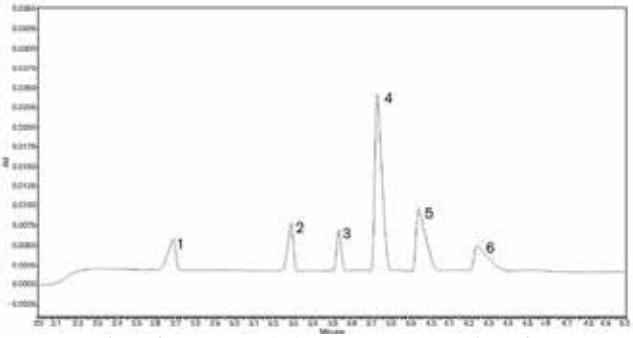


图 **1C**：无机阳离子测试混合物。**20 ppm**（**1**、氨根离子；**2**、钠离子；**3**、钾离子；**4**、锂离子；**5**、镁离子；**6**、钙离子）。

使用阴离子分析法，通过对白葡萄酒（**Chardonnay**）进行稀释进样和分离，我们能够在 **8 min** 内对样品中的 **14** 种有机和无机离子进行分离和鉴定（如图 **2** 所示）。

对于红葡萄酒采用同样的分析方法（如图 **3** 所示），两次分析的结果表明，白葡萄酒和红葡萄酒主要的区别在于苹果酸和琥珀酸的浓度，前者在白葡萄酒中更为丰富，后者在红葡萄酒中更丰富。

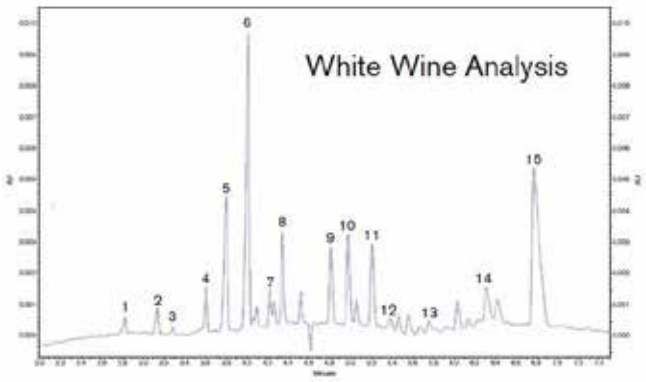


图 **2**：阴离子分析谱图——白葡萄酒（**Chardonnay, Lindeman's Bin 65, SE Australia 2011**）。（**1**、氯离子；**2**、硫酸根；**3**、草酸根；**4**、甲酸根；**5**、酒石酸根；**6**、苹果酸根；**7**、柠檬酸根；**8**、琥珀酸根；**9**、醋酸根；**10**、乳酸根；**11**、磷酸根；**12**、丙酸根；**13**、丁酸根；**14**、葡萄糖酸根；**15**、辛酸根（**Internal Standard, IS**））。

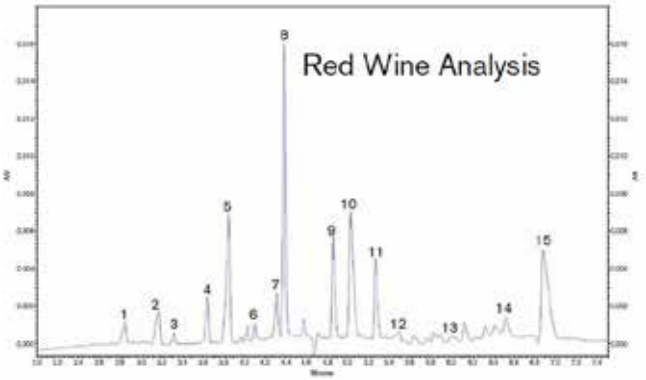


图 **3**：阴离子分析谱图——红葡萄酒（**Cabernet Sauvignon, Lindeman's Bin 65, SE Australia 2011**）。（**1**、氯离子；**2**、硫酸根；**3**、草酸根；**4**、甲酸根；**5**、酒石酸根；**6**、苹果酸根；**7**、柠檬酸根；**8**、琥珀酸根；**9**、醋酸根；**10**、乳酸根；**11**、磷酸根；**12**、丙酸根；**13**、丁酸根；**14**、葡萄糖酸根；**15**、辛酸根（**IS**）。

为了验证实验的重复性，进行了多针阴离子分析并叠加，显示迁移时间和校正面积的重复性良好（图 **4** 和 **5**）。

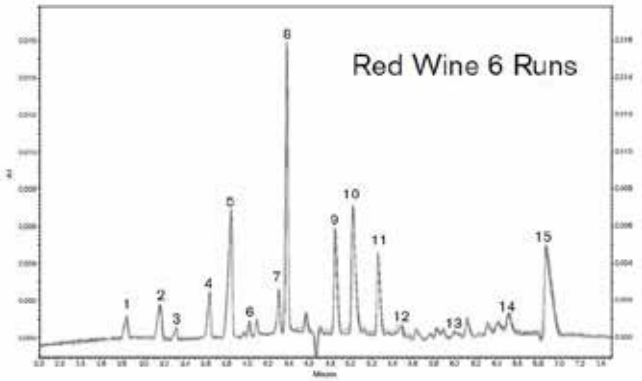


图 **4A**：红葡萄酒阴离子、有机酸分析重复进样 **6** 针并叠图。（**1**、氯离子；**2**、硫酸根；**3**、草酸根；**4**、甲酸根；**5**、酒石酸根；**6**、苹果酸根；**7**、柠檬酸根；**8**、琥珀酸根；**9**、醋酸根；**10**、乳酸根；**11**、磷酸根；**12**、丙酸根；**13**、丁酸根；**14**、葡萄糖酸根；**15**、辛酸根（**IS**））。

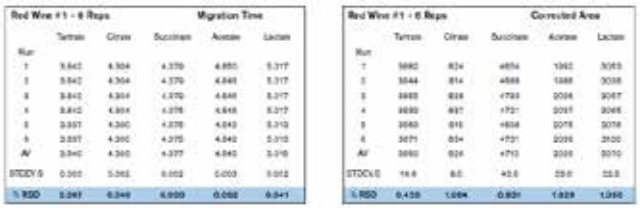


图 **4B**：红葡萄酒中有机酸分析的重现性。其 **6** 针重现性谱图见图 **4A**。

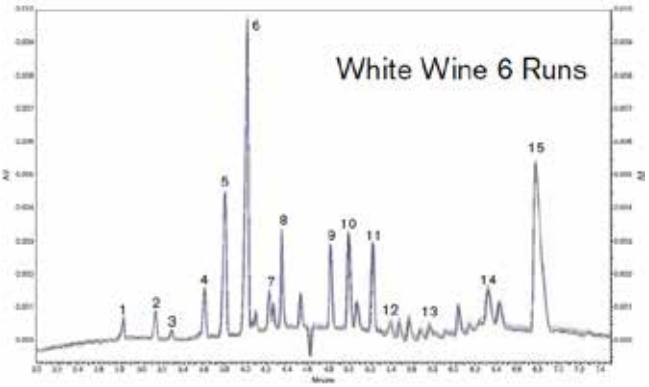


图 **5A**：白葡萄酒阴离子、有机酸分析重复进样 **6** 针并叠图。（**1**、氯离子；**2**、硫酸根；**3**、草酸根；**4**、甲酸根；**5**、酒石酸根；**6**、苹果酸根；**7**、柠檬酸根；**8**、琥珀酸根；**9**、醋酸根；**10**、乳酸根；**11**、磷酸根；**12**、丙酸根；**13**、丁酸根；**14**、葡萄糖酸根；**15**、辛酸根（**IS**））。

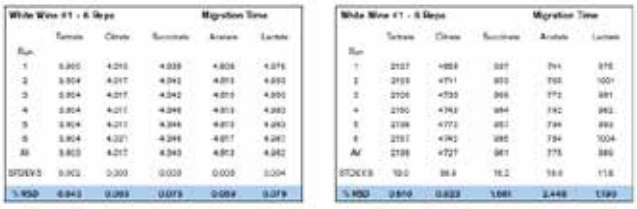


图 **5B**：红葡萄酒中有机酸分析的重现性。其 **6** 针重现性谱图见图 **5A**。

在本项研究中，我们同样考察了商品化的葡萄酒中阳离子的含量。实验结果通过表明红葡萄酒和白葡萄酒的阳离子含量和种类没有显著差异（图 **6A**）。我们同样也获得了良好的重现性（图 **6B** 和 **6C**）。

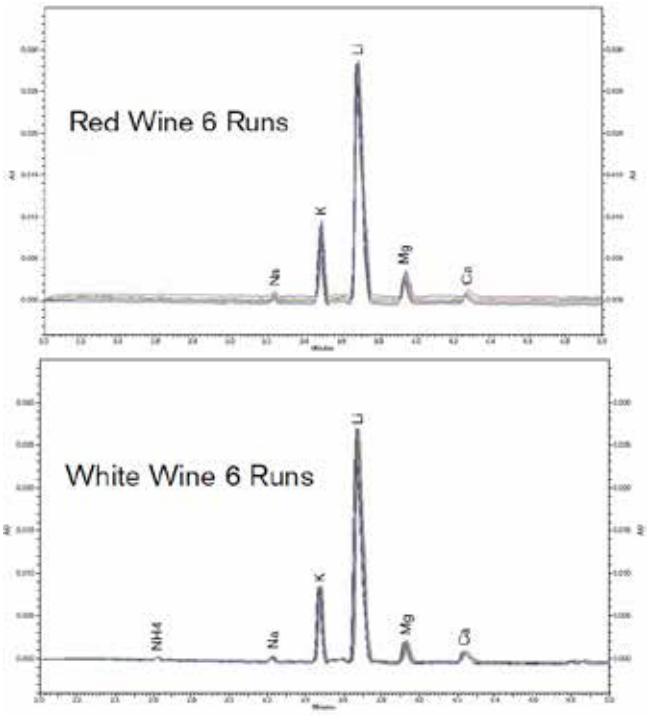


图 **6A** 红葡萄酒和白葡萄酒样品中阳离子分析重现性。重复进样 **6** 针的叠加谱图（NH_4^+ 未检出）。

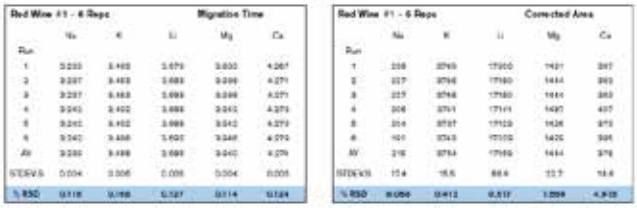


图 **6B**：红葡萄酒中阳离子分析的重现性。其 **6** 针重现性谱图见图 **6A** 。

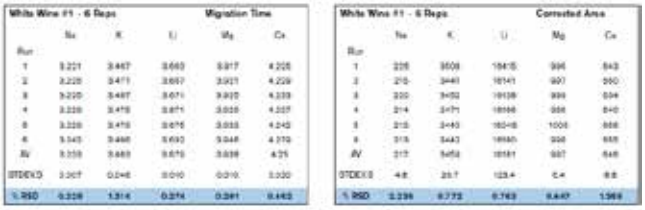


图 **6C**：白葡萄酒中阳离子分析的重现性。其 **6** 针重现性谱图见图 **6A** 。

在本项研究中，我们拓展了样品分析的范围，选择了来自世界不同地区的商业化白葡萄酒和红葡萄酒样品，以确定不同类型的酒类之间的差异。尽管在某些离子的数量上有一些差异，但各个白葡萄酒和红葡萄酒中的总阴离子和有机酸含量相似（图 **7**）。

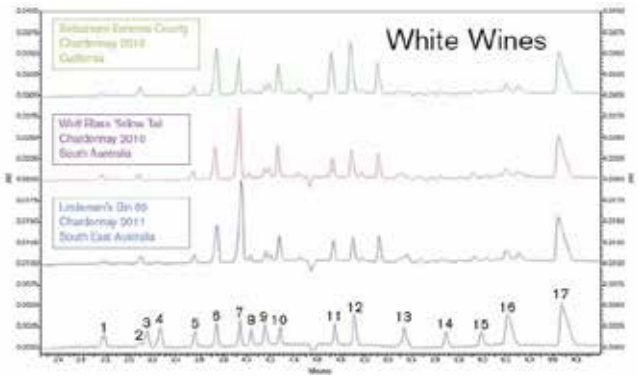


图 **7A**：三种白葡萄酒的无机阴离子和有机酸分离谱图。三种样品分别为 **California Chardonnay**（**2010**）、**South Australia Chardonnay**（**2010**）、**Southeast Australia Chardonnay**（**2011**）。最下方的谱图为测试混标。（**1**、氯离子；**2**、硫酸根；**3**、氯酸根；**4**、草酸根；**5**、甲酸根；**6**、酒石酸根；**7**、苹果酸根；**8**、亚硫酸根；**9**、柠檬酸根；**10**、琥珀酸根；**11**、醋酸根；**12**、乳酸根；**13**、丙酸根；**14**、丁酸根；**15**、戊酸根；**16**、葡萄糖酸根；**17**、辛酸根（**IS**））。

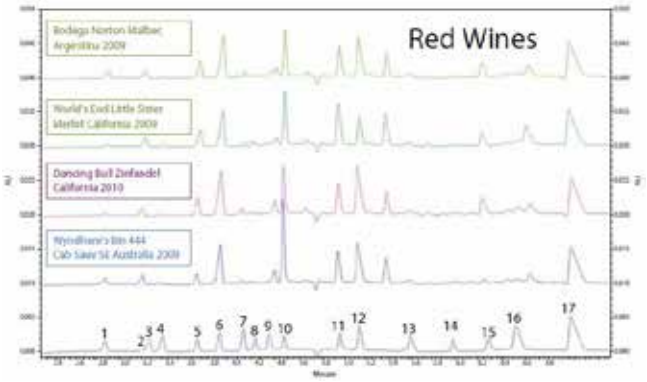


图 **7B**：四种白葡萄酒的无机阴离子和有机酸分离谱图。四种样品分别为 **Argentina Malbec**（**2009**）、**California Merlot**（**2009**）、**California Zinfandel**（**2010**）和 **Australia Cabernet Sauvignon**（**2009**） 。最下方的谱图为测试混标。（**1**、氯离子；**2**、硫酸根；**3**、氯酸根；**4**、草酸根；**5**、甲酸根；**6**、酒石酸根；**7**、苹果酸根；**8**、亚硫酸根；**9**、柠檬酸根；**10**、琥珀酸根；**11**、醋酸根；**12**、乳酸根；**13**、丙酸根；**14**、丁酸根；**15**、戊酸根；**16**、葡萄糖酸根；**17**、辛酸根（**IS**））。

4、结论

毛细管电泳广泛用于许多行业，可以帮助确保生产过程中产品的一致性，并在某些的情况下可以用来监控生产过程。比如，葡萄酒的生产需要质量控制来评估生产和最终产品。 在全球一些地区，商业葡萄酒中酸度的规定已经出台。 这种酸度可以部分地通过对关键分析物的定性和定量来进行测试，比如酒石酸，苹果酸，柠檬酸，琥珀酸，醋酸和乳酸。 **CE**技术可应用于与葡萄酒品质相关的阴离子，阳离子和有机酸的分析。 本文介绍的工作说明了**CE**在商业葡萄酒方面的应用，特别是离子分析。 **CE**可以用最少的样品制备轻松实现快速，高分辨率，重现性良好的离子分析。**CE**技术提供了一种自动化的策略，可以更好地表征葡萄酒中的离子和有机酸，并具有应用到其他的离子和极性物质分析的潜力。

5、参考文献

1. XXXIV World Congress of Vine and Wine and the 9th General Assembly of OIV – 2011 Proceedings

www.oiv2011.pt/en/en_organisation.html

2. Wine Institute online information

www.wineinstitute.org/resources/pressroom/03222012

3. Ribereau-Gayon, P., Gloris, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. 2000. Handbook of

Enology, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments. Vol. 2. Wiley. New York.

毛细管电泳法对精对苯二甲酸中对羧基苯甲醛及对甲基苯甲酸的含量测定—国标方法

Determination of p-carboxybenzaldehyde and p-methyl benzoic acid in p-terephthalic acid by capillary electrophoresis

王文涛，唐红梅，罗继，陈泓序，郭立海

Wang Wentao, Tang Hongmei, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX，中国；
SCIEX, China;

Key words: Capillary electrophoresis, PTA, 4-CBA, p-TOL

1. 引言

精对苯二甲酸（PTA）为白色晶体或粉末状态，低毒可燃。PTA是生产涤纶的主要原料。其生产方法以对二甲苯为原料，经氧化生成粗对苯二甲酸，再经加氢精制，结晶、分离、干燥得到最终的PTA产品。PTA产品中会含有多种杂质，如苯甲酸、对羧基苯甲醛（4-CBA）、对甲基苯甲酸（p-TOL）、羟甲基苯甲酸，其中4-CBA和p-TOL是影响 PTA产品纯度的重要指标，是主要监控的杂质。4-CBA及p-TOL均是聚合物链终止剂，会引起侧链反应，并会影响到后续产品的质量，因此需要建立一种能准确定量其含量的分析方法。毛细管区带电泳（CZE）方法是中华人民共和国国家标准[1]和行业标准收录的方法，可以同时对PTA中 4-CBA、 p-TOL进行定量分析，该方法具有灵敏度高、稳定性好、分析速度快等优点。

本文选用CZE方法对 PTA中4-CBA和p-TOL含量进行测定并考察了该方法的稳定性。

2. 试剂及方法

2.1 仪器和试剂

MDQ Plus毛细管电泳仪，匹配紫外检测器，检测波长为200 nm，均购自于SCIEX。正己烷磺酸钠、正庚烷磺酸钠、3-环己胺丙磺酸、氯化十四烷基三甲基铵（TTAC）、十二水磷酸氢二钠、十二水磷酸三钠、p-TOL、4-CBA 、氢氧化钠、浓氨水溶液（浓度为25%）均购置于Sigma；去离子水（Millipore）。

2.2 溶液和样品配制

电渗流（EOF）改性剂，即TTAC溶液配制：精确称取 0.750 g TTAC， 加入适量去离子水溶解后，转移到 50 mL 容量瓶中，用去离子水定容后摇匀。

2.5%氨水溶液：取10 mL浓氨水转移至100 mL容量瓶中用去离子水定容，该氨水溶液浓度为2.5%。

电解液配制：精确称取正己烷磺酸钠0.50 g以及十二水磷酸氢二钠0.18 g，倒入100 mL烧杯中，加去离子水49 mL，然后移取1.0 mL TTAC溶液至烧杯中，搅拌均匀，滴加0.5 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值为 10.5 ~ 11.0之间，在使用前用0.45 μm的滤膜过滤再脱气15 min。

PTA试样的配制：精确称取 PTA 标准品和试样各0.50 g，分别倒入 25 mL 烧杯中，然后各加入 7 mL 2.5%的氨水溶液，充分搅拌使其完全溶解，转移至 25 mL 容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，使用前经 0.45 μm 的滤膜过滤。

2.3 CZE方法设置

毛细管：熔融石英毛细管，75 μm内径，50/60.2 cm（有效/总长度）；进样条件：0.5 psi，5s；分离：-25 kV，10 min。毛细管温度：20 ℃；样品室温度：20 ℃；检测器波长：200 nm；数据采集频率：4 Hz。

毛细管预处理和毛细管针与针之间的冲洗均进行如下操作：使用0.5 mol/L NaOH溶液在20 psi压力下冲洗毛细管1 min；再用去离子水在20 psi压力下冲洗毛细管2 min；最后用电解液在20 psi压力下冲洗毛细管3 min。

3. 结果与分析

3.1 CZE方法对PTA及其杂质的分离

CZE方法主要基于待测分析物的电荷/体积之比的差异进行分离，如图1所示，PTA及其杂质可以实现很好的基线分离，分离度均大于1.0，其出峰顺序依次为：PTA、苯甲酸、4-CBA、p-TOL、羟甲基苯甲酸。结果证明：CZE方法对PTA及其杂质的分离度高，有助于PTA纯度的准确计算。

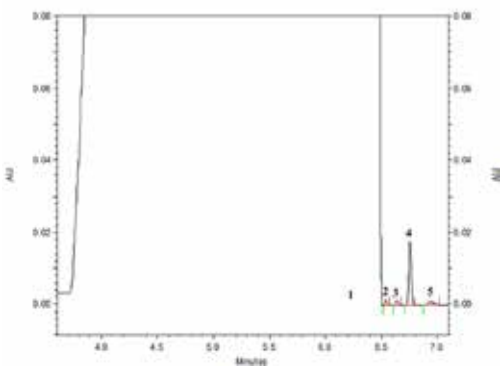


图1. PTA纯度分析（1. PTA；2. 苯甲酸；3. 4-CBA；4. p-TOL；5. 羟甲基苯甲酸）

3.2重复性考察

为了验证CZE方法用于PTA纯度分析的重复性，对同一样品进行连续5次进样，5针重复性谱图如下图2所示。4-CBA和p-TOL的迁移时间以及峰面积的RSD值如下表1所示，迁移时间的RSD均小于0.1%；4-CBA和p-TOL连续5针进样的峰面积RSD 分别小于4%和1%。结果表明：CZE方法用于PTA样品中杂质4-CBA和p-TOL的分析具有良好的重复性。

3.3 检出限和定量限

在检出限和定量限的分析中，使用的4-CBA和p-TOL目标浓度分别定为1 mg/kg，4-CBA和p-TOL的信噪比分别为：12.8、10.3。按照信噪比为3时对应的样品浓度定为检出限，信噪比为10时对应的样品浓度定为定量限。CZE方法对于4-CBA和p-TOL的检出限分别为0.23 mg/kg和0.29 mg/kg；定量限分别为：0.78 mg/kg和 0.97mg/kg。实验结果证明：CZE方法灵敏度高，可准确应用于PTA中杂质4-CBA和p-TOL的定量分析。

表1. 4-CBA及p-TOL连续5针进样迁移时间和峰面积的重复性结果

编号	4-CBA		p-TOL	
	MT	Area	MT	Area
STD-1	6.64	2255	6.75	29804
STD-2	6.63	2298	6.75	29730
STD-3	6.63	2496	6.75	29986
STD-4	6.63	2316	6.75	29637
STD-5	6.63	2371	6.75	29971
RSD%	0.06	3.96	0.00	0.50

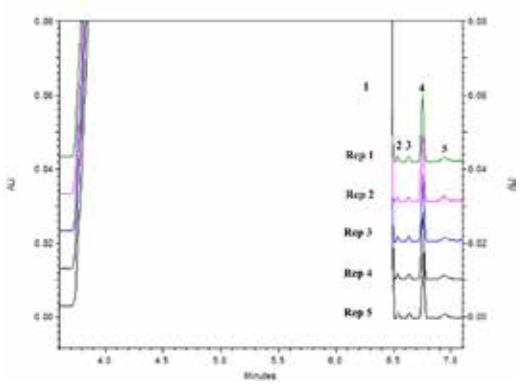


图2. 4-CBA及p-TOL连续5针进样的重复性谱图

4. 结论

本文按照中华人民共和国国家标准要求，利用CZE方法快速准确的判定PTA样品中4-CBA及p-TOL的含量，该方法主要的优势如下：

- 方法操作简便、分离速度快；
- 分离度高；
- 重复性好：对于4-CBA以及p-TOL的迁移时间的RSD均小于1%、峰面积的RSD均小于5%。
- 灵敏度较高，4-CBA和p-TOL的检出限分别为0.23 mg/kg和0.29 mg/kg；定量限分别为：0.78 mg/kg和 0.97mg/kg。

参考文献：

1. 中华人民共和国国家标准：GB/T30921.1 2014—工业用精对苯二甲酸(PTA)试验方法第1部分：对羧基苯甲醛(4-CBA)和对甲基苯甲酸(p-TOL)含量的测定

BioPhase 8800系统对精对苯二甲酸（PTA）杂质的高通量分析

High-throughput analysis of p-terephthalic acid impurities on BioPhase 8800 system

刘冬科，兰朝辉，高铁，陈泓序，刘冰洁

Liu Dongke, LanZhaohui, Gao Tie, Chen Hongxu, Liu Bingjie

SCIEX，中国

SCIEX, China

关键词： BioPhase 8800 系统；精对苯二甲酸（PTA）；对羧基苯甲醛（4-CBA）；对甲基苯甲酸（p-TOL）

1. 前言

精对苯二甲酸（PTA）是生产涤纶的主要原料，其生产方法以对二甲苯为原料，经氧化生成粗对苯二甲酸，再经加氢精制，结晶、分离、干燥得到最终的PTA产品。PTA产品中含有多种杂质，如苯甲酸、对羧基苯甲醛（4-CBA）、对甲基苯甲酸（p-TOL）、羟甲基苯甲酸，其中4-CBA及p-TOL是聚合物链终止剂，会引起侧链反应，并影响到后续产品的质量，因此4-CBA和p-TOL为PTA产品主要监控的杂质，需要建立一种准确定量其含量的分析方法。毛细管区带电泳（CZE）方法是中华人民共和国国家标准[1]收录的方法，可以同时对PTA中 4-CBA、 p-TOL进行定量分析，该方法具有灵敏度高、稳定性好、分析速度快等优点。

SCIEX 的MDQ Plus毛细管电泳仪在PTA杂质分析中应用广泛[2]，但MDQ Plus为单通道的毛细管电泳仪，巨大的样品量需要多通道毛细管电泳设备提高检测通量。本文在BioPhase 8800高通量毛细管电泳系统上建立了CZE方法检测PTA中的中4-CBA和p-TOL，在保证分析效果和准确性的前提下，提高大量样本的分析检测效率，方案具有以下优点：

1. BioPhase 8800系统与PA800 Plus系统的数据一致性高，可相互转移；
2. 方法通量高，速度快，平均每个样品仅用时2 min；
3. 同一样品8通道一致性高，4-CBA和p-TOL峰面积RSD值均＜4％；
4. 单通道连续6针进样重复性好，4-CBA和p-TOL峰面积RSD值均＜4％。

2. 仪器及方法

BioPhase 8800系统，配备紫外检测器（UV，波长220 nm），BioPhase软件1.2.20（SCIEX）。用于BioPhase 8800系统的熔融石英毛细管卡盒8×50 cm（SCIEX PN 5080123，50 μm内径，40/50 cm有效/总长）；BioPhase 8800系统启动盘套装（SCIEX PN 5080311），包含4块96孔样品盘、4块缓冲液盘、8块出口盘。

BioPhase 8800 系统CZE方法如下，样品室温度：20 ℃；毛细管温度：20 ℃；分离电压：-15 kV；进样压力及时间：0.5 psi，10 s。针间冲洗方法：0.5 mol/L NaOH溶液，20 psi，1 min；DDI Water，20 psi，2 min；背景电解质冲洗：20 psi，3 min。

3. 试剂及配置

氯化十四烷基三甲基铵（TTAC），浓氨水溶液（浓度为25%），正己烷磺酸钠，十二水磷酸氢二钠，氢氧化钠均购置于Sigma；去离子水（Millipore）。

电渗流（EOF）改性剂，即TTAC溶液配制：精确称取 0.750 g TTAC， 加入适量去离子水溶解后，转移到 50 mL 容量瓶中，用去离子水定容后摇匀。

2.5％氨水溶液：取10 mL浓氨水转移至100 mL容量瓶中用去离子水定容，该氨水溶液浓度为2.5％。

电解液配制：精确称取正己烷磺酸钠0.50 g以及十二水磷酸氢二钠0.18 g，倒入100 mL烧杯中，加去离子水49 mL，然后移取1.0 mL TTAC溶液至烧杯中，搅拌均匀，滴加0.5 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值为 10.5～11.0之间，在使用前用0.45 μm的滤膜过滤再脱气15 min。

4. 样品及前处理

PTA样品由某企业提供，配制方法为：精确称取 PTA试样0.50 g，倒入 25 mL 烧杯中，然后加入 7 mL 2.5 %的氨水溶液，充分搅拌使其完全溶解，转移至 25 mL 容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，使用前经 0.45 µm 的滤膜过滤。

分别取100 µL样品溶液加入96孔样品盘第一列的8个样品孔中（此时8个样品孔中的样品相同），考察单次进样8通道的一致性，单通道连续进样6次的重复性。使用 BioPhase 8800仪器及BioPhase软件采集分析。

另取100 µL 样品溶液，使用MDQ Plus仪器及32Karat软件采集分析，比较同一样品在BioPhase 8800及MDQ Plus两个仪器上的电泳结果。

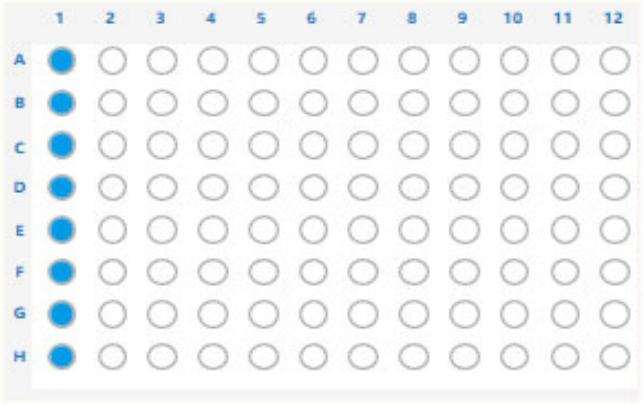


图1. BioPhase 8800样品盘摆放

5. 结果与讨论

5.1 同一样品使用 BioPhase 8800与MDQ Plus采集的结果分析

对于同一样品，分别使用BioPhase 8800及MDQ Plus进行CZE分析的电泳结果见图2a、2b，纯度对比结果见表1。结果显示同一样品在BioPhase 8800与MDQ Plus上表现出较好的一致性。

表1. 同一PTA样品在不同仪器上的纯度（CAP%）结果

杂质	CAP%	
	MDQ Plus	Biophase 8800
苯甲酸	14.57	14.50
4-CBA	33.53	34.03
p-TOL	5.16	5.29
羟甲基苯甲酸	46.74	46.18

5.2 BioPhase 8800多通道重复性结果分析

对样品盘第一列的PTA样品连续进样6次，考察单次进样8通道间的一致性，单通道连续进样的6针重复性。

单次进样8通道间表现出良好的一致性（图3a），4-CBA、p-TOL峰面积 RSD值均＜4 %。单通道6针重复性好（图3b），以A通道为例，4-CBA、p-TOL峰面积 RSD值均＜4 %。对8通道的样品同时连续进样6次共计48针样品中，4-CBA峰面积RSD值为3.54 %，p-TOL峰面积 RSD值为3.61 %，分别见表1、表2。

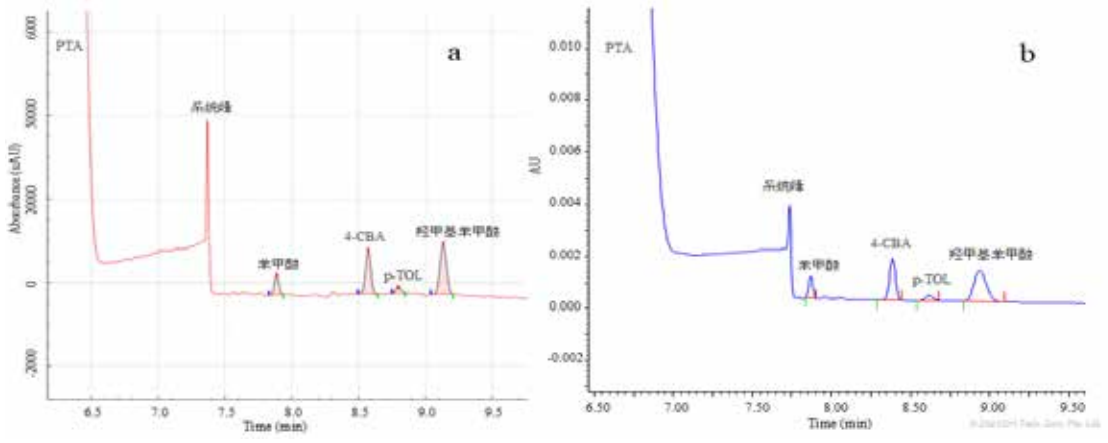


图2. 同一PTA样品在不同仪器及软件中的CZE电泳图（a：BioPhase 8800仪器，BioPhase软件；b：MDQ Plus仪器，32Karat软件）

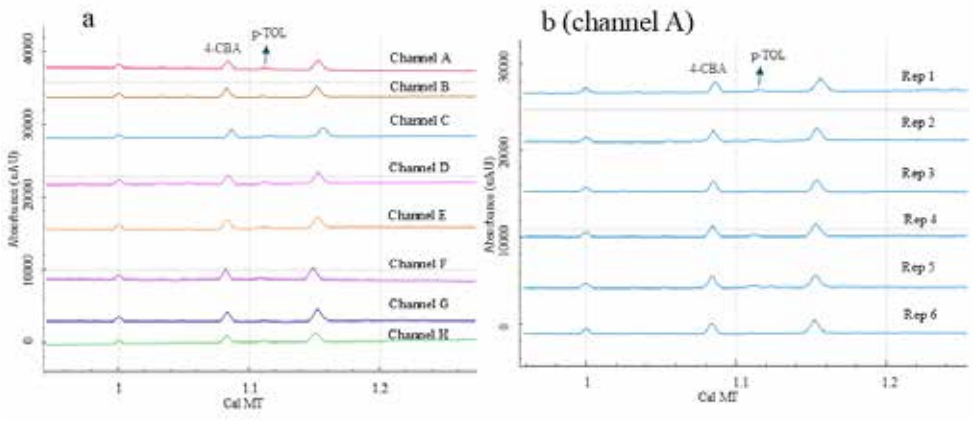


图3. Biophase 8800 系统上使用CZE方法分析PTA中 4-CBA、 p-TOL的电泳图（a）8通道A-H；（b）A通道重复6针（Cal MT：校正迁移时间）

表1. BioPhase 8800 8通道一致性、单通道6针重复性统计结果（4-CBA峰面积）

Channel	4-CBA峰面积							
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Mean	RSD
A	2691	2670	2784	2730	2640	2792	2718	2.08%
B	2797	2634	2640	2717	2741	2702	2705	2.09%
C	2742	2797	2846	2782	2820	2752	2790	1.30%
D	2615	2563	2654	2658	2623	2672	2614	1.62%
E	2879	2752	2893	2860	2939	2849	2862	1.99%
F	2811	2864	2851	2973	2848	2897	2874	1.77%
G	2857	2822	2927	2833	2866	2825	2855	1.26%
H	2942	2750	2847	2875	2889	2806	2852	2.15%
Mean	2792	2732	2805	2803.5	2796	2787	2786 (48针平均值)	
RSD	3.55%	3.48%	3.53%	3.39%	3.89%	2.52%	3.54% (48针RSD值)	

表2. BioPhase 8800 8通道一致性、单通道6针重复性统计结果（p-TOL峰面积）

Channel	p-TOL峰面积							
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Mean	RSD
A	461	474	445	436	472	433	454	3.62%
B	432	453	438	467	426	452	445	3.15%
C	479	458	462	475	459	454	465	1.98%
D	454	451	424	454	443	425	442	2.90%
E	444	484	445	437	466	446	454	3.57%
F	476	441	444	439	425	455	447	3.54%
G	436	429	452	429	436	446	438	1.93%
H	430	462	458	450	438	414	442	3.77%
Mean	452	457	446	448	446	441	448 (48针平均值)	
RSD	3.99%	3.58%	2.49%	3.38%	3.77%	3.19%	3.61% (48针RSD值)	

6. 结论

本文在BioPhase 8800系统上建立了CZE方法分析PTA中4-CBA、 p-TOL杂质，具有以下优势：1）BioPhase 8800系统与PA 800 Plus系统的数据一致性高，可相互转移； 2）方法通量高，速度快，平均每个样品仅用时2 min；3）同一样品8通道一致性高，4-CBA、 p-TOL 峰面积RSD值＜4 %；4）单通道连续6针进样重复性好，4-CBA、 p-TOL 峰面积RSD值＜4 %。当面对大量PTA样品检测时，BioPhase 8800 系统可在保证分析效果和准确性的前提下，实现大量样品的快速分析，提高检测分析效率。

7. 参考文献

[1] 中华人民共和国国家标准：GB/T30921.1 2014—工业用精对苯二甲酸(PTA)试验方法第1部分：对羧基苯甲醛(4-CBA)和对甲基苯甲酸(p-TOL)含量的测定.

[2] SCIEX Tech Note：毛细管电泳法对精对苯二甲酸中对羧基苯甲醛及对甲基苯甲酸的含量测定—国标方法，RUO-MKT-02-15055-ZH-A.

利用毛细管胶束电动色谱法（MEKC）对含胍类消毒剂的样品进行定量检测——国标方法

Determination of guanidine disinfectants by capillary micellar electrokinetic chromatography (MEKC) - GB method

张晓霞，陈泓序，罗继，郭立海
Xiaoxia Zhang, Hongxu Chen, Ji Luo, Lihai Guo

1. SCIEX，中国；
1. SCIEX, China;

Key Words: Guanidine disinfectants, MEKC, PHMB, CHA, PHMG

前言

胍类消毒剂是一类细胞膜活性抗菌剂，它杀菌谱广，消毒速度快，同时生物安全性更 高，对皮肤黏膜无刺激性，因此，常用于皮肤、黏膜消毒等。胍类消毒剂是一类环保型高 分子聚合物，因其化学结构式中具有生物活性的烷基胍而得名，主要分为双胍类和单胍类 两大类，双胍类消毒剂有氯己定（CHA）、聚六亚甲基双胍盐（PHMB）等;单胍类消毒剂有聚 六亚甲基单胍（PHMG）等。常用的几种胍类消毒剂的结构如图 1。

2020 年发布并实施的国标《胍类消毒剂卫生要求》（下文称国标）介绍了三种检测胍类 成分的方法 [1]。其中，HPLC 只能检测没有聚合度的氯己定，而 PHMB 和 PHMG 由于由不 同的聚合度组成，在 HPLC 上无法分离得到一个理想的峰型，因此不能检测。紫外分光光 度法利用胍类消毒剂特定波长下的吸收度进行定量检测，因此，只能用于检测含有一类成 分的单方消毒剂，复方消毒剂中多种胍类成分的吸收相互干扰会影响结果准确性因此不能 用于复方检测。毛细管电泳技术（CE）利用带电物质的荷质比差异在电场作用下进行分离， 通过优化分离条件，不同聚合度的胍类因为荷质比一致很容易得到一个较好的峰型，因此 非常适合具有复杂聚合度的胍类消毒剂的含量测定。国标中介绍 CE 方法适用于含 CHA、 PHMG 及 PHMB 的单方或复方消毒剂中胍类成分的定量检测，也可用于鉴定。

本文利用国标 CE 方法考察了 CHA、PHMG 以及 PHMB 三种标准品的线性范围，并 成功用于 6 种含胍类成分的消毒剂及化妆水中胍类成分的定量检测。

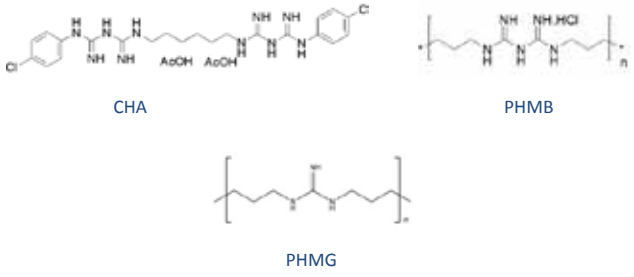


图 1. 几种常见胍类消毒剂的结构图

2. 实验部分

2.1.试剂及样品

试剂：四硼酸钠（$Na_2B_4O7 \cdot 10H_2O$, >99.5%），氢氧化钠（NaOH）：优级纯，十二烷基 硫酸钠（SDS, 99%），脱氧胆酸钠（SD, 98%），聚乙二醇 20000（PEG20000）。标准品：聚六亚甲基双胍盐酸盐(PHMB)标准品、聚六亚甲基单胍盐酸盐标准品（PHMG）、醋酸氯己定（CHA）标准品均由客户提供。样品：含不同类型胍类消毒剂的样品从市面购买或客户提供。具体信息如表 2。

2.2.样品及缓冲液制备

标准品储备液制备：准确称取 PHMB、CHA 及 PHMG 标准品各 50 mg，分别置于 15 mL 塑料离心管中，用移液器加入水 10 mL，涡旋混匀，制得质量浓度均为 5 g/L 的标准储 备液。液体标准品直接用水先稀释至 5 g/L 的标准储备液。

标准品工作液制备：将标准品储备液分别用样品缓冲液逐级稀释，分别配制成 1.875 mg/L、3.75 mg/L、7.5 mg/L、15 mg/L、30 mg/L、60 mg/L、120 mg/L 的标准品工作液。

样品溶液制备：s1，s2 用样品缓冲液稀释 20 倍；s3 稀释 30 倍；s4 稀释 5 倍；s5(湿巾 挤出液)和 s6 先用水稀释至 5g/L，再在用样品缓冲液稀释至 30 mg/L；

分离缓冲液制备：分别配置浓度为 100 mM 的 Na2B4O7 水溶液，200 mM 的 SDS 水溶 液，50 mM 的 SD 水溶液，10 g/L PEG20000 水溶液。取 100 mL 容量瓶，分别加入 100 mM 的 Na2B4O7 水溶液 20 mL，200 mM 的 SDS 水溶液 15 mL，50 mM 的 SD 水溶液 10 mL， 10 g/L PEG20000 水溶液 8mL，加水定容至刻度，混匀作为分离缓冲液。

样品缓冲液制备：分离缓冲液用水稀释 10 倍作为样品缓冲液。

2.3. 仪器及方法

仪器：SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统，匹配 PDA 检测器。熔融石英毛细管（PN. 338451）：40/50.2 cm（有效/总长度），50 μm 内径；毛细管温度：25 ℃；样品室温度：25 ℃； 检测波长：214 nm（检测 CHA及PHMG），235 nm（检测 PHMB 及 PAPB）；窗口狭缝：100 × 800 μm。分离电压：24 kV；进样条件：0.5 psi，20 s； 毛细管冲洗步骤：新毛细管在使用前分别用 1M NaOH 冲洗 20 min，水冲洗 5 min，分离缓冲液冲洗 5 min。每次进样前依次用 1M NaOH 冲洗 2 min ，水冲洗 2 min ，分离缓冲液冲洗 2 min ，以保证迁移时间和校正峰面积的重现性。

3. 结果与讨论

3.1. 三种胍类标准品的电泳结果

CHA、PHMB 和 PHMG 三种胍类消毒剂标准品的电泳图谱和特征紫外吸收光谱，如 图 2（A-C）。三种胍类消毒剂在 CE 条件下均能得到一个较为对称的峰型，因此，可对单方 中的胍类成分进行定量检测。从图 2D 不同胍类标准品在 CE 上的迁移时间可以看出， CHA 迁移时间最快，与其他两种胍类标准品可以区分。PHMG 及 PHMB 两种胍类消毒剂 在 CE 上的迁移时间重叠，无法直接分离检测。但是从两种胍类的紫外吸收光谱中可以看 出 PHMB 的特征吸收波长为 235nm，而 PHMG 在 235nm 处几乎无紫外吸收，因此对于复 方消毒剂，可以选择不同检测波长分别对 PHMG 和 PHMB 进行定量检测。

三种胍类成分的紫外特征吸收光谱差异明显，因此除定量检测外，CE 方法还可以用 于胍类成分的鉴定。CHA 和 PHMG 的最大吸收波长在 200nm 左右，为了避免低波长端背 景缓冲液的干扰，国标选择 214nm 作为 CHA 和 PHMG 的检测波长，PHMB 在 235nm 左 右具有特征吸收波长，因此，选择 235nm 作为检测波长。

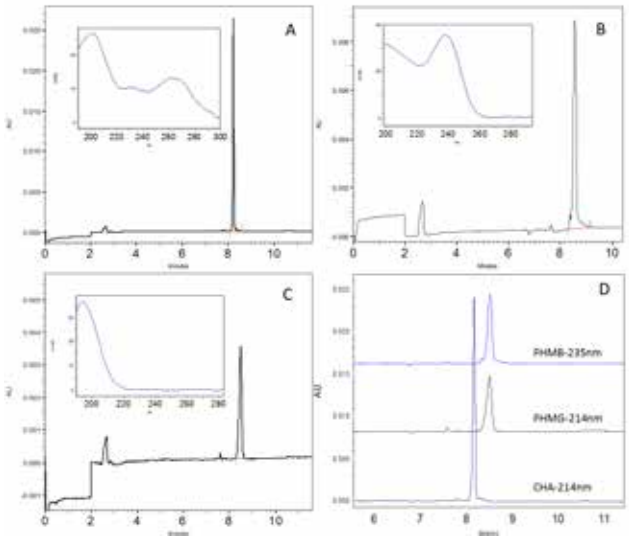


图2. 三种胍类标准品的电泳图及紫外吸收光谱图。A CHA，浓度为30mg/ml，电泳图通道为 214nm；B PHMB，浓度浓度为 30mg/ml，电泳图通道为 235nm；C PHMG，浓度为 60mg/ml，电泳图通道为 214nm； D 三种胍类标准品的迁移时间比较。

3.2. 标准品线性范围及重复性考察

对 CHA、PHMB 和 PHMG 三种胍类消毒剂标准品的线性范围及进样重复性结果进行 考察，四种标准品均用样品缓冲液稀释至 1.875mg/L、3.75mg/L、7.5mg/L、15mg/L、 30mg/L、60mg/L、120mg/L，结果如表 1 所示，三种标准品的校准峰面积和标准品的浓度 呈现良好的线性关系，R^2 分别为 0.9993,0.9976 及 0.9999。分别对三种胍类消毒剂标准品 的进样重复性进行考察，均选用 30mg/L 浓度，重复进样 6 次，各标准品迁移时间及校准 峰面积的重复性结果见表 1，结果显示三种胍类消毒剂的迁移时间 RSD 值分

别为 0.34%， 0.12%，0.49%及 0.88%；校准峰面积 RSD 值分别为 1.41%，3.02%，4.48%，重复性结果 均满足国标要求 RSD 值不大于 10%的规定。说明方法的重复性良好。

表 1. 三种胍类消毒剂标准品的线性范围及重复性结果

名称	线性(1.875-120mg/L)		重复性(n=6)	
	标准曲线方程	R^2	RSD(%,MT*)	RSD(%,CA*)
CHA	y=206.32x+58.902	0.9993	0.34	1.41
PHMB	y=161.63x+174.88	0.9976	0.12	3.02
PHMG	y=35.982x+6.8161	0.9999	0.88	4.48

*MT 指迁移时间，CA 指校准峰面积

3.3. 样品中胍类消毒剂成分含量检测结果

对收集到的 6 种样品中胍类消毒剂成分含量进行检测。其中 s1，s2 和 s3 三种样品是 含 CHA 成分的洗剂，s4，s5 和 s6 三种样品是含 PHMB 成分的化妆品。从图 3 可以看出， 国标 CE 方法在检测复杂样品中胍类成分时样品峰型好，基线平滑，且消毒剂中的其他物 质不干扰胍类成分检测，因此，非常适合用于胍类消毒剂的定量检测。几种样品的含量检 测结果见表 2。

表2. 样品中胍类消毒剂成分含量检测结果

样品	名称	成分	含量计算结果	理论含量
s1	甲硝唑氯己定洗剂	CHA	0.9 g/L	1.2 g/L
s2	妇炎洁	CHA	1.3 g/L	0.8-1.2 g/L
s3	无醇免洗手消毒液	CHA	0.9 g/L	10-12 g/L
s4	完美日记卸妆水	PHMB	0.9 g/L	未标识
s5	卸妆湿巾成品	PHMB	1.3 g/L	2 g/L
s6	精华液	PHMB	2.0 g/L	2 g/L

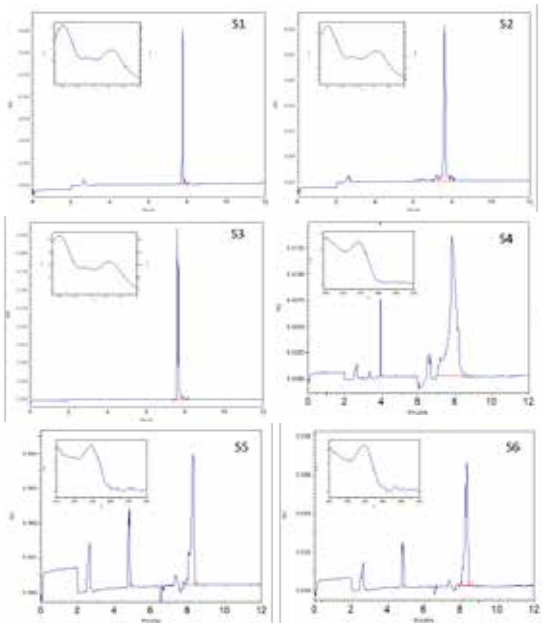


图 3. 六种含胍类成分的样品的电泳图。

4. 结论

本实验重现了国标《胍类消毒剂卫生要求》中介绍的毛细管电泳方法，对 CHA、 PHMB 及 PHMG 三种标准品进行了线性范围考察以及进样重复性考察。结果三种标准品 在 1.875 mg/L-120 mg/L 范围内线性良好，迁移时间及校准峰面积的重复性均良好。利用 国标 CE 方法对 6 种含胍类成分的样品进行胍类成分定量检测，所有样品峰型好，基线平滑，且主峰检测不受样品中其他成分干扰。国标 CE 方法非常适合胍类消毒剂的定量检测。

5. 参考文献

1. 胍类消毒剂卫生要求，GB/T 26367-2020.

A lab-scale approach for the Anion Analysis kit

Fang Wang, Philip Hoang and Quincy Mehta
SCIEX, US

In this technical note, we demonstrate the preparation of all reagents needed to run anion analysis and show that they can be used to replicate what was found in the previously available Anion Analysis Kit from SCIEX (Figures 1 and 2).[1]

Due to sales and supply chain impacts, we no longer provide the Anion Analysis Kit (SCIEX, PN A53537). To continue to support scientists performing anion analysis, we instead provide this instruction to prepare all necessary reagents in the lab and demonstrate comparability of results.

The Anion Analysis Kit permits the analysis of small inorganic anions and organic acids, which are often UV-transparent. For this reason, the separation buffer contains a chromophore and detection is achieved with an indirect mode.

The separation method is performed under reverse polarity so that the negatively charged ions migrate toward the anode (the positively charged electrode). In addition, the capillary is dynamically coated with a polycation, which reverses the electro-osmotic flow (EOF) toward the anode, thus reducing the separation time while maximizing migration time reproducibility.

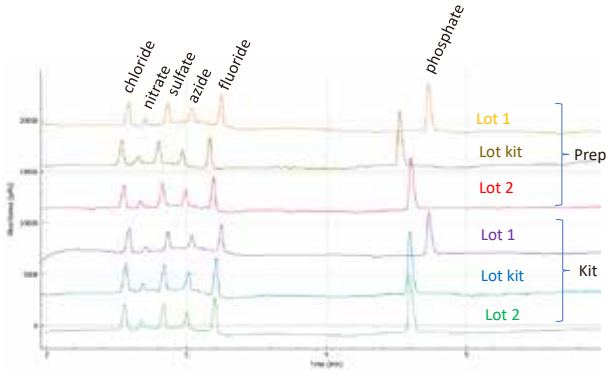


Figure 1. Electropherograms of inorganic test mix. The top 3 traces display the example electropherograms of the inorganic test mix that was prepared with the procedure described in this technical note. The bottom 3 traces display the results of the inorganic test mix acquired from the commercial kit. All samples were analyzed using 3 lots of separation buffer.

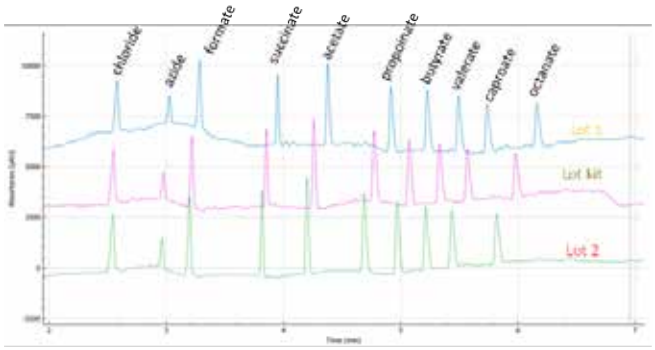


Figure 2. Electropherograms from the kit organic test mix. The traces display the example electropherograms of the organic test mix acquired from the commercial kit. Samples were analyzed using 3 lots of separation buffer.

Key features

- Detailed and complete instructions to prepare anion analysis reagents and test mix standards
- Comparable results with the previously available, commercial Anion Analysis Kit
- Robust and repeatable anion analysis
- Suitable for both inorganic and organic anions
- Indirect absorbance analysis allows for a wide range of sample compatibility

Methods

Materials: The 0.1N NaOH solution (PN 338424) and water (PN C48034) used in this assay were from SCIEX. The 0.1N hydrochloric acid solution was purchased from LabChem (PN LC152204). All other chemicals needed were ordered from Sigma the detailed part number are listed in Table 1.

Confidential - Company Proprietary

Table 1. Reagents needed to make anion analysis solutions.

Chemical Name	PN
Sodium nitrate	*S5506-250G*
Sodium sulfate	*238597-25G*
Sodium fluoride	*201154-100G*
Sodium azide	*71289-5g*
Potassium chloride	*P5405-250g*
Potassium dihydrogen phosphate	*1048730250*
Sodium phosphate dibasic	*S0876-500g*
Sodium hydroxide	*S5881-500G*
Sodium formate	*71539-500G*
Succinic acid	*S3674-100G*
Sodium acetate trihydrate	*S8625-250G*
Propionic acid	*402907-100ML*
Butyric acid	*B103500-5ML*
Valeric acid	*240370-5ML*
Hexanoic acid	*153745-2.5G*
Octanoic acid	*C2875-10ML*
Sodium carpylate	*C5038-100G*
Bis-tris	*B7535-25G*
2,3 Pyridinedicarboxylic acid	*P63204-25g*
Polyethylenimin (50% wt)	*181978-5G*
Ethylene glycol	*324558-100ML*

.

Instrumentation: The PA 800 Plus system was from SCIEX (Framingham, MA). The system was configured with a UV detector with a 230 nm filter (SCIEX, PN 144433) and a 254 nm filter (SCIEX, PN 144438). Analysis was performed using a 50 cm effective length (60 cm total) bare-fused silica capillary (BFS capillary) with 75 µm ID (SCIEX, PN 338454) with an 800 µm aperture (SCIEX, PN 144711). Instrument control was achieved using the 32 Karat software package. After the experiment was completed, data were exported into ASCII format and imported into BioPhase 8800 software for processing.

Reagent preparation: All reagent solutions listed below were prepared using a graduated cylinder with the proper volume unless stated otherwise.

Polyethylenimin (1% wt) stock solution preparation: Dilute 200 mg of the polyethylenimin (50% wt) into a final volume of 10 mL with filtered deionized water. Mix well.

Anion coating: In a graduated cylinder with 70 mL of filtered deionized water, while stirring, add 1165 mg of bis-tris, 460 mg of 2,3 pyridinedicarboxylic acid and 100 µL of the prepared polyethylenimin (1%wt) stock solution. Stir until all solids are fully dissolved. Add water until the total volume reaches 100 mL.

Conditioner-Na: 0.1N NaOH solution.

Anion acid rinse: 0.1N HCl solution.

Anion internal standard: Dissolve 50 mg of sodium caprylate into 10 mL filtered deionized water.

Anion separation buffer: In a graduated cylinder with 70 mL of filtered deionized water, while stirring, add 3450 mg of ethylene glycol with a pipette, 1048.5 mg of bis-tris, 414 mg of 2,3 pyridinedicarboxylic acid and 100 µL of the prepared polyethylenimin (1% wt) stock solution. Stir until all solids are fully dissolved. Add water until the total volume reaches 100 mL.

Test mix stock solution: In a 15 mL centrifuge tube with volume markers, add 7 mL of filtered deionized water and 100 mg of sodium azide and sonicate to dissolve all solid into solution. Add water until the total volume reaches 10 mL. Cap the tube and invert multiple times to mix the solution well. Repeat this process for the following chemicals: 1) potassium chloride, 2) sodium formate, 3) sodium acetate trihydrate, 4) succinic acid, 5) propionic acid, 6) butyric acid, 7) valeric acid, 8) hexanoic acid, 9) sodium nitrate, 10) sodium sulfate, 11) sodium fluoride, 12) potassium dihydrogen phosphate and 13) sodium phosphate dibasic. This process yields a total of 14 stock solutions.

Anion organic test mix: In a graduated cylinder with 70 mL of filtered deionized water, while stirring, add 2 mL of 0.1N sodium hydroxide and the test mix stock solutions. The following amounts of test mix stock solutions must be added: 154 µL of sodium azide, 414 µL of potassium chloride, 295 µL of sodium formate, 454 µL of sodium acetate, 200 µL of succinic acid, 200 µL of propionic acid, 200 µL of butyric acid, 200 µL of valeric acid, and 200 µL of hexanoic acid. Then, add 2 µL of octanoic acid directly from the reagent bottle. Mix everything well. Remove the stir bar and add water until the total volume reaches 100 mL. ***Note*: The water solubility of octanoic acid is 6.8 mg/100 mL. Therefore, the compound must be added directly to the final test mix. After the 100 mL final volume is adjusted, transfer the liquid into a plastic bottle and mix with sonication to avoid erroneous analysis (wide peaks). The solubility is not enough for a 2-step dilution procedure.**

Anion inorganic test mix: In a graduated cylinder with 70 mL of filtered deionized water, while stirring, add in 200 µL of sodium azide, 419 µL of potassium chloride, 275 µL of sodium nitrate,

Confidential - Company Proprietary

288 µL of sodium sulfate, 200 µL of sodium fluoride, 136 µL of potassium dihydrogen phosphate and 568 µL of sodium phosphate dibasic. Stir until all solids are fully dissolved. Add water until the total volume reaches 100 mL.

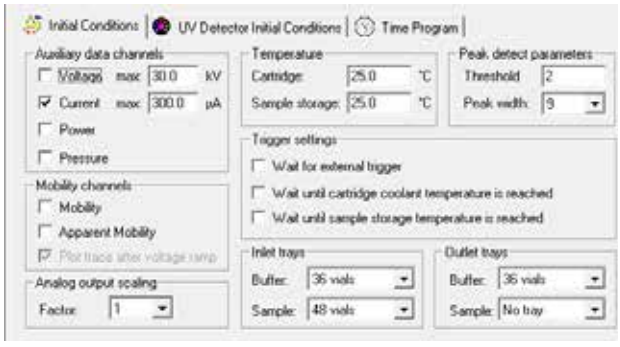
Rinse solution: CE grade water (PN C48034).

Sample preparation:

Depending on the concentration of the analytes, the sample should be injected as-is or diluted. Dilution should be done so that the final concentration of the sample anions is between 5 ppm and 200 ppm. Special care should be taken to verify the pH of the sample, which should be above pH 5. A 50mM NaOH solution can be used to dilute the sample and adjust its pH value.

The anion internal standard (I.S.) consists of 30mM sodium octanoate (sodium caprylate), which is the equivalent of 4296 ppm of octanoate ion. The I.S. can be used in the quantification of the sample anions. To use it, dilute the I.S. by a factor of 50

A) Initial conditions for all anion separation methods



B) Detector conditions for all anion separation methods

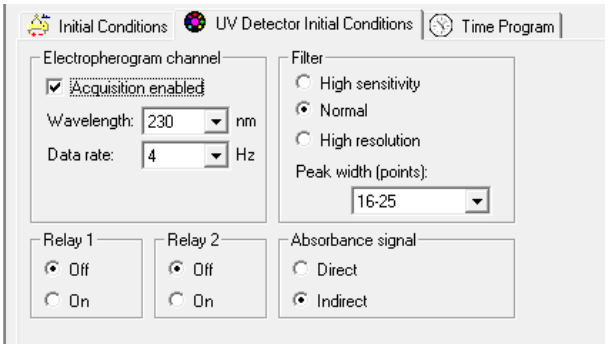


Figure 3. Initial conditions and detector conditions for all anion analysis methods. Some ions, such as nitrate, absorb at short wavelengths. In these situations, the wavelength (nm) shown in panel B should be set to 254 nm.

A) Time program for capillary conditioning method



B) Time program for conditioning method



C) Time program for separation method



D) Time program for shutdown method

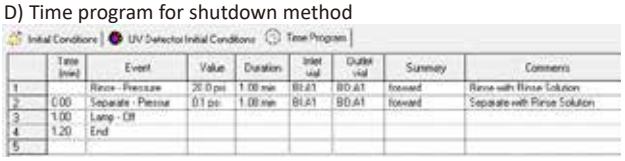


Figure 4. Time program conditioning and separation methods in 32 Karat software. A) Conditioning of a brand-new capillary. B) Conditioning at the beginning of a sequence. C) Separation of the standards in the kit. D) Shutdown and capillary storage.

with the sample. For example, mix 4 µL of I.S. with 200 µL of sample to yield 86 ppm of octanoate ion.

PA 800 Plus system method: Figure 3 shows the initial conditions (3A) and UV detector initial conditions (3B). Figure 4 shows the time program to condition a brand-new capillary (4A), the method to condition at the beginning of a sequence (4B), the method to separate the standard in the kit (4C) and assay/instrument shutdown (4D).

Instrument preparation:

Set up and configure the instrument with the UV detector and 230 nm filter. Refer to the PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System Maintenance Guide for additional information.[2]

If installing a new capillary, run the new capillary rinse condition (Figure 4A), before running a sequence. Otherwise create a sequence that starts with the conditioning method (Figure 4B),

Confidential - Company Proprietary

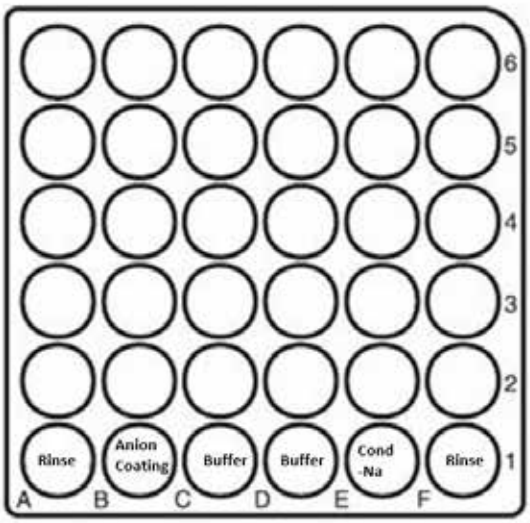


Figure 5. Buffer tray configuration for anion analysis. Fill each vial listed, except waste, with 1.5 mL of the specified solution. Fill the waste vial in the outlet buffer tray with 0.7 mL of CE-grade water. Note: When analyzing fluoride and/or phosphate ions, fill a vial with the anion acid rinse and place it in position F1 of the inlet buffer tray. The use of the anion acid rinse is required when running the anion inorganic test mix to avoid peak tailing.

followed by the separation method for sample and standards (Figure 4C) and the shutdown method (Figure 4D).

Prepare buffer trays according to the buffer tray map shown in Figure 5 and adjust the buffer vial numbers based on the sequence created. Each buffer vial is good for 12 injections or as demonstrated to be appropriate for the samples to be analyzed. After use, store the capillary on the instrument or in the original capillary storage box, with both ends submerged in rinse solution. Do not allow the capillary ends to dry because the capillary may become plugged or damaged if stored incorrectly.

Data processing: Data files were exported in ASCII format and imported into the data analysis software modules of the BioPhase software.

Results and Discussion

Experimental design: Two different scientists followed the above protocol and prepared 2 lots of separation buffer. The test mix was only prepared by 1 scientist and tested using all 3 lots of separation buffer and buffer solutions. We evaluated the previously available commercial kit and the prepared lots 1 and 2 of the separation buffer in a single sequence. Therefore, all samples were run on the same cartridge and on the same system to demonstrate the consistency and the reliability of the preparation protocol. Triplicate injections were performed with the test mix prepared in the lab and the test mix acquired from the kit.

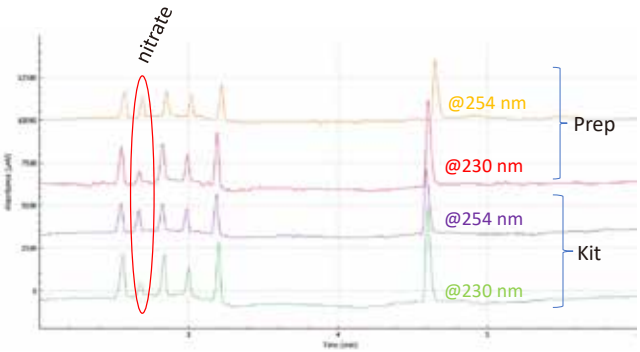


Figure 6. Electropherograms from the inorganic test mix with the 2 detection wavelengths using a single prepared buffer lot. The top 2 electropherograms display the results of the inorganic test mix prepared according to the procedure described in this technical note. The bottom 2 traces display the results of the inorganic test mix acquired from the commercial kit.

Table 2. Signal comparison for nitrate ions at 230 and 254 nm. Average values were calculated from 6 injections of both the prepared and commercially available inorganic test mixes.

Wavelength	Average height	Average S/N P-P	Average S/N RMS
230 nm	*593.85*	*6.30*	*25.04*
254 nm	*1145.61*	*10.48*	*41.43*

Confidential - Company Proprietary

Inorganic test mix detection wavelength: As noted in the original kit application guide,[1] a detection wavelength of 254 nm provides an optimal detection signal for ions that absorb in the short UV range, such as nitrate. The inorganic test mix was analyzed with both the 230 and 254 nm filters. The results are shown in (Figure 6). When detecting at 254 nm, the nitrate ions show improved peak height and a 4x improvement in the signal-to-noise ratio (Table 2).

Comparability of the separation buffers: The separation performance and repeatability of the separation buffer from the commercial kit and the 2 lots prepared in the lab were compared. The test mix from the commercial kit was analyzed using 3 lots of buffers in a single sequence. Electropherograms of the inorganic test mix are shown in Figure 1. Similar profiles were observed for the prepared inorganic test mix and that from the kit. Additionally, the sample was analyzed using the different separation buffers, which showed comparable quantification results (Tables 3 and 4). The % difference between the kit buffer and the 2 lots of prepared buffers in average peak MT was less than 4% and the average corr. area% were less than 7% for all ions included.

Table 3. Inorganic test mix from kit separation using the kit buffer.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
Chloride	2.61	1.16	23.14	12.08	NA
Nitrate	2.73	1.37	4.38	22.96	2.37-3.14
Sulfate	2.89	1.46	14.32	3.54	3.37-4.25
Azide	3.08	1.76	9.83	27.00	3.49-4.95
Fluoride	3.29	1.98	20.39	4.45	4.13-5.53
Phosphate	4.82	4.04	27.95	9.36	25.87-34.14

Table 4. Inorganic test mix from kit separation using the prepared buffer. Average values were calculated from 6 injections and with 2 prepared buffer lots.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
Chloride	2.58	0.60	21.50	7.80	0-0
Nitrate	2.70	0.67	4.16	15.27	2.35-2.83
Sulfate	2.85	0.72	15.54	6.53	3.37-3.98
Azide	3.02	0.81	10.54	6.87	3.42-3.94
Fluoride	3.22	0.96	19.68	3.35	4.34-4.89
Phosphate	4.64	1.79	28.58	4.05	25.84-29.48

Table 5. Analysis results of organic test mix using the kit buffer.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
Chloride	2.53	0.00	14.40	6.42	0-0
Azide	2.94	0.08	5.17	1.18	8.47-8.75
Formate	3.17	0.08	13.83	0.22	5.27-5.33
Succinate	3.77	0.05	9.81	5.31	14.61-14.67
Acetate	4.15	0.10	12.59	1.86	9.15-9.21
Propoinate	4.62	0.05	11.30	4.08	9.20-9.33
Butyrate	4.90	0.10	9.70	0.45	4.75-4.87
Valerate	5.13	0.05	8.71	1.87	3.88-4.06
Caproate	5.35	0.09	7.78	4.08	3.55-3.64
Octanate	5.72	0.07	6.71	1.04	5.88-5.99

Table 6. Analysis results of organic test mix using the prepared buffer. Average values were calculated from 6 injections and with 2 prepared buffer lots.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
	Average of MT	%RSD for MT	Average of Corr. Area%	%RSD for Corr. Area%	Resolution
Chloride	2.56	0.75	14.94	3.33	0-0
Azide	3.00	1.03	5.85	8.91	8.59-9.24
Formate	3.24	1.20	13.69	2.40	5.23-5.68
Succinate	3.88	2.05	9.54	1.69	15.03-15.82
Acetate	4.29	1.82	12.73	1.47	9.27-10.17
Propoinate	4.80	2.05	10.98	2.32	9.42-10.40
Butyrate	5.10	2.16	9.68	1.86	4.92-5.40
Valerate	5.43	2.05	8.66	2.03	4.31-4.49
Caproate	5.59	2.36	7.44	2.71	3.60-4.02
Octanate	6.00	2.55	6.40	6.77	5.90-6.83

Electropherograms of the organic test mix from the commercial kit are shown in Figure 2. The sample analyzed using the different separation buffers showed comparable quantification results (Tables 5 and 6). The % difference between the kit buffer and the 2 lots of prepared buffers in average peak MT was less than 5% and the average corr. area% was less than 5.0% for all ions except azide. Due to the high absorbance of azide at short

Confidential - Company Proprietary

UV wavelengths, the reported corr. area% was the smallest compared to all other peaks, resulting in a relatively high % difference of 10%.

Comparability of prepared inorganic test mix: The inorganic test mixes prepared in the lab and from the commercial kit were analyzed using the same lot of prepared separation buffer. Comparable results were achieved in both test mix standards.

The % difference between the kit test mix and the prepared test mix in average peak MT was less than 0.5% and the average corr. area% was less than 5% for all ions included. (Figure 1 and Tables 4 and 7)

Table 7. Analysis results of inorganic test mix prepared following the technical note instructions.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
chloride	2.55	0.41	20.01	4.33	0-0
Nitrate	2.67	0.47	4.89	4.72	2.39-2.53
Sulfate	2.83	0.44	16.44	7.78	3.48-3.54
Azide	2.99	0.43	10.29	2.16	3.54-3.59
Fluoride	3.19	0.39	19.95	1.60	4.36-4.45
Phosphate	4.59	0.50	28.41	3.66	26.62-27.63

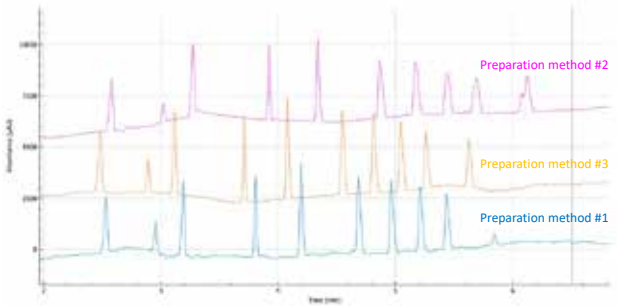


Figure 7. Electropherograms of organic test mix analyzed with kit buffer and using 3 different preparation methods. The top trace (preparation method #2) was prepared by adding the octanoic acid directly into solution and shaking to mix. The middle trace (preparation #3; final preparation) was prepared by adding the octanoic acid directly and sonicating to mix. The bottom trace (preparation trace #1) was prepared using an octanoic acid stock solution.

Comparability of the prepared organic test mix: The preparation of the organic test mix was not as straightforward as that of the inorganic mix. Three different ways of mixing were evaluated, and variation was observed in the signal intensity and peak shape of the octanate ions (Figure 7). In the first preparation method, a stock solution of 100 mg in 10 mL was prepared the same way as other components and further diluted to make the organic test mix. Using this method, the peak intensity was significantly lower than expected (Figure 7). As noted in the section for organic test mix preparation, the low peak intensity was attributed to the low solubility of octanoic acid in water. In the second preparation method, the octanoic acid was directly added into the final solution and mixed by inverting the volumetric flask several times. The relative corrected peak area matched the expected peak area, however, the peak shape for the octanate ion was asymmetric with a split peak top. In the third preparation method, the solution was sonicated for 10-15 mins after the octanoic acid was added and the volume was adjusted. The third preparation yielded results that matched the expected peak intensity and had good peak shape.

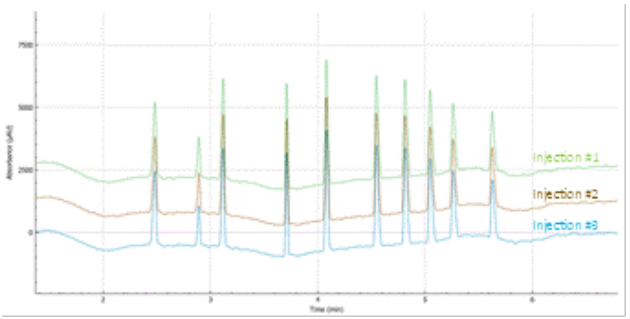


Figure 8. Electropherograms of final preparation organic text mix from three replicate injections.

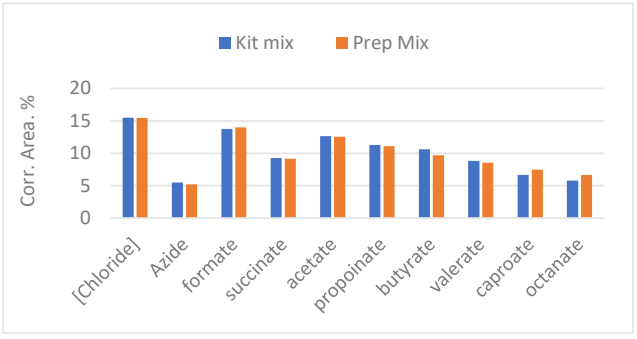


Figure 9. Corrected area % for each ion in the organic test mix from the kit (blue) and the final preparation (orange).

The organic test mixes from the final preparation and those from the commercial kit were analyzed using the separation buffer from the kit. The final preparation showed great assay repeatability between injections (Figure 8) and comparable quantification to the test mix from the commercial kit (Figure 9).

Confidential - Company Proprietary

The % differences between the kit test mix and prepared test mix in average peak MT was less than 0.5% and the average corr. area% was less than 10% for all ions included (Figures 2 and 9).

Conclusions

- With the instructions provided, a lab-scale Anion Analysis Kit was created successfully
- No method modifications were needed to use the lab-scale anion analysis reagents to replace the use of the previously available commercial Anion Analysis Kit
- The lab-scale preparation of the reagents provided comparable results compared to the commercial kit

References

1. SCIEX Anion Analysis Kit Instruction Guide, SCIEX, A49108AESCIEX Anion Analysis Kit Instruction Guide, SCIEX, A49108AE
2. PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System, system maintenance Guide, SCIEX, RUO-IDV-05-5519-B

A lab-scale approach for the Cation Analysis Kit

Fang Wang, Philip Hoang, and Quincy Mehta
SCIEX, USA

In this technical note, we demonstrate the preparation of all reagents necessary to run cation analysis and show that they can be used to generate results equivalent to those acquired with the previously available Cation Analysis Kit from SCIEX (Figures 1 and 2).[1]

Due to discontinuance, SCIEX no longer provides the Cation Analysis Kit (PN: A53540).[1] To continue to support our customers performing cation analysis, we instead provide the instructions here to prepare all necessary reagents and demonstrate the comparability of the results between the commercial and lab-produced test kits.

The Cation Analysis Kit supports the analysis of small, inorganic cations and aliphatic amines, which are often UV-transparent. For this reason, the separation buffer contains a chromophore, and detection is achieved with an indirect mode.

The separation method is performed under normal polarity so that the positively charged ions migrate toward the cathode (the negatively charged electrode). The capillary is dynamically coated with a polycation and later with a polyanion, which directs the electroosmotic flow (EOF) toward the cathode, thus reducing the separation time while maximizing migration time reproducibility.

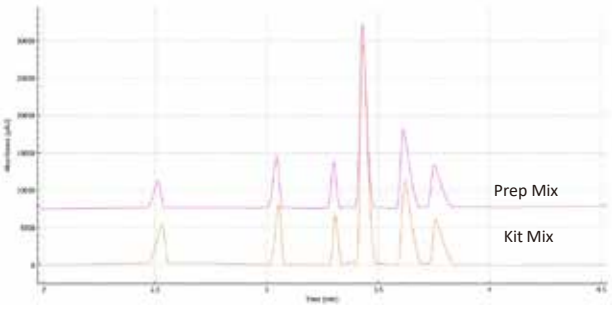


Figure 1. Electropherograms comparison between the prepared and the kit cation test mix. The top trace displays the example electropherogram of the cation text mix prepared using the procedure described in this technical note. The bottom trace displays the results of the cation test mix from the commercial kit. Both were analyzed using reagents from the kit.

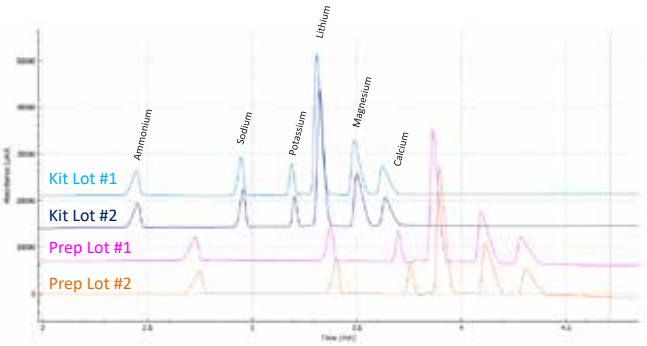


Figure 2. Electropherogram comparison of the cation test mix generated using prepared separation buffers and separation buffers from the kit. The top 2 traces display the example electropherograms of the cation test mix analyzed using 2 lots of commercial kits. The bottom 2 traces display the example electropherograms of the cation test mix separated with 2 lots of prepared reagents.

Key features

- Detailed and complete instructions to prepare the cation analysis reagents and test mix standards
- Comparable results with the previously available, commercial Cation Analysis Kit
- Robust and repeatable cation analysis
- Indirect absorbance analysis allows for a wide range of sample compatibility

Methods

Materials: The 0.1N NaOH solution (PN: 338424) and water (PN: C48034) used in this assay were from SCIEX. The 0.1N hydrochloric acid solution was purchased from LabChem (PN: LC152204). Polyacrylic acid (~ MW. 450,000) was purchased from both Sigma-Aldrich and Polysciences to evaluate the impact of raw material on separation performance. All other chemicals needed were ordered from Sigma-Aldrich with the detailed part numbers listed in Table 1.

Confidential - Company Proprietary

Table 1. Reagents are needed to make the cation analysis solutions.

Chemical Name	PN
Polyacrylic acid (~ MW. 450,000)	*181285-5G*
Lithium chloride	*793620-100G*
Lithium hydroxide	*909025-100G*
Propyl-4-hydroxybenzoate (NaCl)	*91359-100MG*
Potassium chloride	*P5405-250g*
4-Aminopyridine	*275875-5G*
Malic acid	*240176-50G*
18-Crown-6	*186651*
Sodium chloride	*S9625*
Calcium chloride	*C4901-100G*
Magnesium nitrate	*237175-100G*
Ammonium chloride	*213330-25G*
Polyethyleneimine (50% wt)	*181978-5G*

Instrumentation: The PA 800 Plus system was from SCIEX (Framingham, MA). The system was configured with a UV detector with a 200 nm filter (SCIEX, PN: 144430). Analysis was performed using a 50 cm effective length (60 cm total) bare-fused silica capillary (BFS capillary) with a 75 µm ID (SCIEX, PN: 338454) and an 800 µm aperture (SCIEX, PN: 144711). Instrument control was achieved using the 32 Karat software package. After the experiment was completed, data were exported into ASCII format and imported into the BioPhase 8800 software for processing.

Reagent preparation: All the reagent solutions listed below were prepared using a graduated cylinder with the proper volume unless otherwise stated.

Polyethyleneimine (1% wt) stock solution preparation: Dilute 200 mg of the polyethyleneimine (50% wt) to a final volume of 10 mL with filtered deionized water. Use a stir bar to mix well.

Polyacrylic acid (~ MW. 450,000) stock solution preparation (0.5% wt): Weigh 50 mg of polyacrylic acid (*~ MW. 450,000*) into a glass vial and add 10 mL of filtered deionized water. Cap the glass vial and seal it well. Put the glass vial onto a rotator and allow the polymer to slowly dissolve minimum overnight.

Propyl-4-hydroxybenzoate (NaCl) stock solution preparation: Weigh out 25 mg of propyl-4-hydroxybenzoate (NaCl) and dissolve the solid in 10 mL of filtered deionized water in a 15 mL conical tube. Cover the conical tube and mix well by inverting it multiple times.

Rinse solution: CE-grade water (PN: C48034) from SCIEX.

Cation coating A: In a graduated cylinder, add 105 µL of the prepared polyethyleneimine (1% wt) stock solution. Add water until the total volume reaches 100 mL.

Cation coating B: Mix 1 mL of the prepared polyacrylic acid (*~ MW. 450,000*) stock solution (0.5% wt) with 99 mL of filtered deionized water.

Cation separation buffer: In a graduated cylinder with 70 mL of filtered deionized water, while stirring, add 1 mL of propyl-4-hydroxy-benzoate (NaCl) stock solution, 188 mg of 4-aminopyridine, 254 mg of malic acid, 450 mg of 18-crown-6 and 260 µL of prepared cation coating B. Cover with parafilm and invert to mix until all solids are fully dissolved. After inverting, add water until the total volume reaches 100 mL. Note: 18-crown-6 is a hygroscopic crystalline solid. Ensure that the solid is weighed quickly to minimize its absorption of moisture.

Conditioner-Li: In a graduated cylinder, add 420 mg of lithium hydroxide to 70 mL of filtered deionized water. Cover with parafilm and invert to mix until all solids are fully dissolved. Add water until the total volume reaches 100 mL.

Conditioner-Na: 0.1N NaOH solution (SCIEX, PN: 338424)

Cation internal standard: In a graduated cylinder, add 85 mg of lithium chloride to 7 mL of filtered deionized water. Cover with parafilm and invert to mix until all solids are fully dissolved. Add water until the total volume reaches 10 mL.

Test mix stock solution: Add 100 mg of sodium chloride to 7 mL of filtered deionized water in a 15 mL centrifuge tube and sonicate to dissolve all solids into the solution. Add water until the total volume reaches 10 mL. Cap the tube and invert it multiple times to mix the solution well. Repeat this process for the following 5 chemicals: 1) potassium chloride, 2) calcium chloride, 3) lithium chloride, 4) magnesium nitrate, and 5) ammonium chloride. This process yields a total of 6 stock solutions.

Cation test mix: In a graduated cylinder with 70 mL of filtered deionized water, while stirring, add 508 µL of sodium chloride, 382 µL of potassium chloride, 555 µL of calcium chloride, 1220 µL of lithium chloride, 2100 µL of magnesium nitrate and 630 µL of ammonium chloride. Cover and invert to mix until all solids are fully dissolved. Add water until the total volume reaches 500 mL.

Sample preparation: Depending on the concentration of the analytes, the sample should be injected as-is or diluted. Dilution should be done so that the final concentration of the sample cations is between 1 and 50 ppm. Special care should be taken

Confidential - Company Proprietary

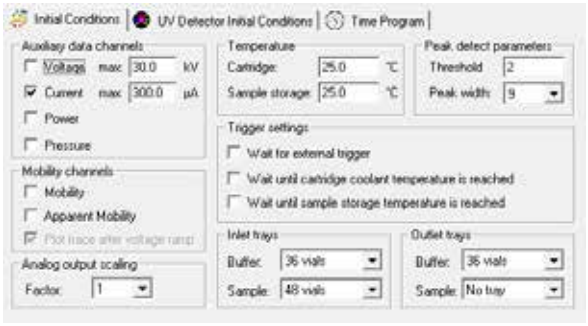
to verify the pH of the sample, which should be slightly acidic. Optional, If the sample pH is not acidic, adjust the pH of the sample by adding 3mM HCl or nitric acid.

The cation internal standard (I.S.) consists of 0.20M lithium chloride (LiCl), which is equivalent to 1388 ppm of lithium-ion. The I.S. can be used in the quantification of the sample cations. To use it, dilute the I.S. by a factor of 50 with the sample. For example, mix 4 µL of I.S. with 200 µL of sample to yield 28 ppm of lithium-ion.

PA 800 Plus system method: Figure 3 shows the initial conditions (Figure 3A) and UV detector initial conditions (Figure 3B). Figure 4 shows the time program to condition a brand-new capillary (Figure 4A), the method to condition at the beginning of a sequence (Figure 4C), and the assay/instrument shutdown (Figure 4D).

Instrument preparation: Set up and configure the instrument

A) Initial conditions for all cation separation method



B) Detector conditions for all cation separation method

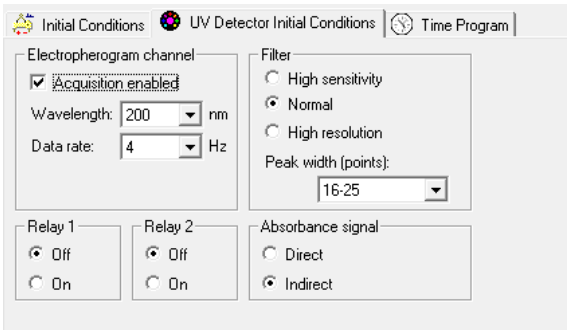


Figure 3. Initial conditions and detector conditions for all cation analysis methods. Some ions, such as nitrate, absorb at short wavelengths. In these situations, the wavelength (nm) shown in panel B should be set to 254 nm.

with the UV detector and 200 nm filter. Refer to the PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System Maintenance Guide for additional information.[2]

If installing a new capillary, run the new capillary rinse condition (Figure 4A) before running a sequence. Otherwise, create a sequence that starts with the conditioning method (Figure 4B) and is followed by the separation method for the sample and standards (Figure 4C) and the shutdown method (Figure 4D).

A) Time program for new capillary conditioning method



B) Time program for condition method



C) Time program for separation method



D) Time program for shutdown method



Figure 4. Time programs for conditioning and separation methods for cation analysis in 32 Karat software. A) Conditioning of a brand-new capillary. B) Conditioning at the beginning of a sequence. C) Separation of the standards in the kit. D) Shutdown and capillary storage.

Prepare buffer trays according to the buffer tray map shown in Figure 5 and adjust the buffer vial numbers based on the sequence created. Each buffer vial is good for 12 injections or as appropriate for the samples to be analyzed. After use, store the capillary on the instrument or in the original capillary storage box with both ends submerged in rinse solution. Do not allow the capillary ends to dry because the capillary might become plugged or damaged if stored incorrectly.

Data processing: Data files were exported in ASCII format and imported into the data analysis software modules of the BioPhase 8800 software.

Confidential - Company Proprietary

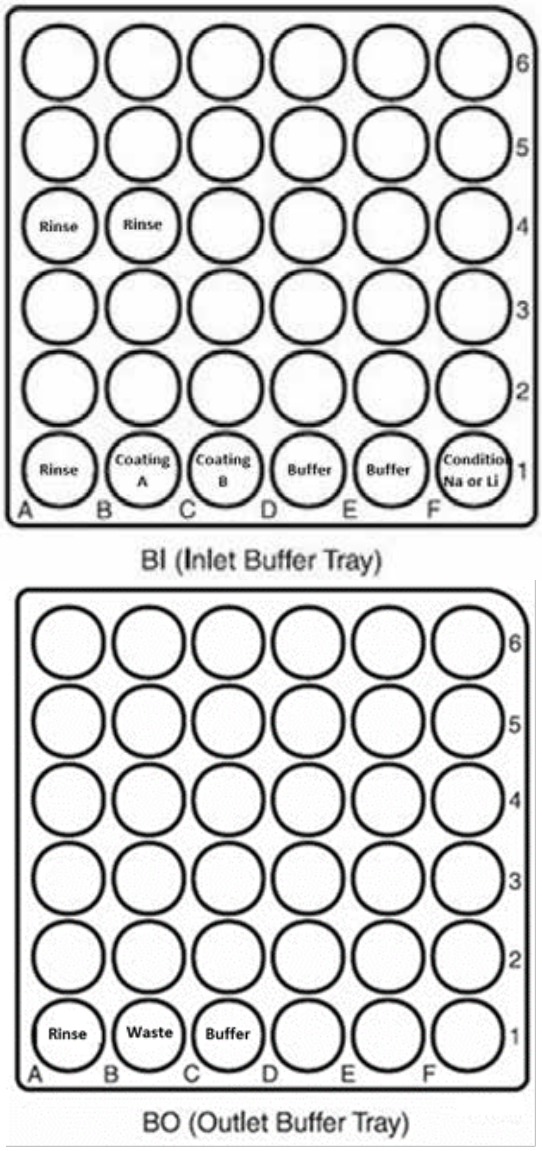


Figure 5. Buffer tray configuration for cation analysis. Fill each vial listed, except waste, with 1.5 mL of the specified solution. Fill the waste vial in the outlet buffer tray with 0.7 mL of CE-grade water. Note: Small amounts of sodium or lithium can be detected when using Conditioner-Na (0.1N NaOH) or Conditioner-Li (0.1N LiOH), respectively, as the conditioner solution. Select the conditioner solution loaded into the buffer inlet vial at position F1 to minimize carryover of the analyte of interest. If the sodium ion is an analyte of interest, use Conditioner-Li; if the lithium-ion is an analyte of interest, use Conditioner-Na.

Results and discussion

Experimental design: Two different scientists followed the above protocol and prepared 2 lots of separation buffers. The test mix was only prepared by 1 scientist and tested using all 3 lots of separation buffer and buffer solutions. We evaluated the previously available commercial kit and the prepared lots 1 and 2 of the separation buffer in a single sequence. Therefore, all samples were run on the same cartridge and on the same system to demonstrate the consistency and reliability of the preparation protocol. Triplicate injections were performed for each combination of sample and separation buffer.

Comparability of prepared cation test mix: The cation test mixes prepared in the lab and from the commercial kit were analyzed using all buffers from the kit in 1 sequence. Comparable results were observed. Figure 1 shows an example of the electropherograms and Tables 2 and 3 show the quantification of ions for the 2 samples. The results from the kit test mix are shown in Table 2 and the results from the prepared test mix are shown in Table 3. The % difference in the average peak migration time between the kit test mix and the prepared test mix was less than 0.2%. The average corr. area% was less than 3% for all ions included (Figure 1 and Tables 2 and 3)

Table 2. Analysis results for the cation test mix from the kit with reagents from the kit.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
Ammonium	2.45	0.09	11.45	0.50	0.00
Sodium	2.96	0.10	10.54	1.20	8.69
Potassium	3.20	0.20	6.59	1.65	5.51
Lithium	3.32	0.23	41.85	0.68	2.41
Magnesium	3.50	0.20	19.21	0.39	2.67
Calcium	3.63	0.19	10.37	0.70	1.75

Table 3. Analysis results for the cation test mix prepared in the lab with reagents from the kit.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
Ammonium	2.45	0.09	11.43	0.37	0.00
Sodium	2.96	0.07	10.46	0.32	8.74
Potassium	3.20	0.10	6.56	0.67	5.56
Lithium	3.32	0.09	41.27	0.35	2.45
Magnesium	3.50	0.09	19.64	0.26	2.68
Calcium	3.64	0.12	10.64	0.53	1.76

Confidential - Company Proprietary

Impact of coating solution B: As shown in Figure 1, when the cation test mix was analyzed using buffers prepared in the lab, the migration times for all ions were delayed compared to using the kit buffers. First, lot-to-lot variation was evaluated, and the results indicate that the shift is larger than the lot-to-lot variations for both the prepared buffers and the kit buffers.

Based on the separation mechanism of the kit, a matrix condition involving coating solution A, coating solution B, and separation buffer was analyzed in the same sequence mix and the migration times of the ammonium ion (first peak) and the calcium ion (last peak) were used as key indicators for the separation. As shown in Table 4, the source of cation coating B directly controls the migration time of all the peaks. When the cation coating B that was prepared in the lab was used, all ions migrated later.

Table 4. Experimental design and results to understand migration time shift in the prepared buffers.

Coating A source	Coating B source	Separation buffer source	MT for ammonium	MT for calcium
Kit	Kit	Kit	2.45	*3.64*
Kit	Prep	Prep	2.81	4.52
Prep	Prep	Kit	2.73	4.29
Prep	Prep	Prep	2.74	4.33
Prep	Kit	Prep	2.56	3.81

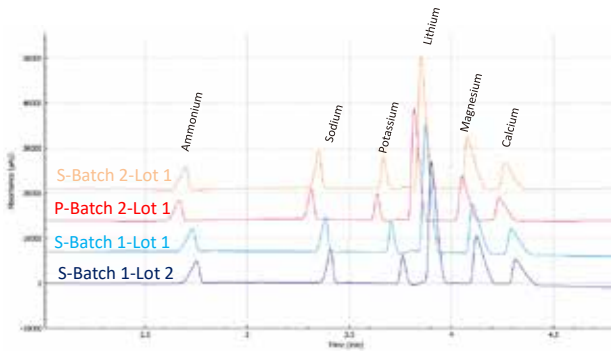


Figure 6. Electropherograms of the cation test mix were analyzed with 4 sets of buffer solutions (coating A, coating B, and separation buffer). The top 2 traces are from buffers made as batch 2 using polyacrylic acid (~ MW. 450,000) from Sigma-Aldrich (S) and Polysciences (P). The bottom 2 traces are from buffers prepared by 2 different analysts using polyacrylic acid (~ MW. 450,000) from Sigma-Aldrich (S).

Since polyacrylic acid (~ MW. 450,000) is the sole component of cation coating B, the same compound from a different vendor was purchased and evaluated. Polyacrylic acids (~ MW. 450,000) from Sigma-Aldrich and Polysciences were used to prepare new batches of cation coating B in parallel. All separation buffers were prepared again and used for the cation test mix separation. Results were comparable to previously prepared buffers and show a similar delay in absolute ion migration time compared to the results acquired using all buffers and solutions from the previously available commercial kits (Figure 6). A previous study (data not shown) for a similar application showed that molecular weight distribution plays an important role in the migration time and peak resolution of an analyte. Despite both vendors reporting the same molecular weight [3-4], we hypothesize that this phenomenon can explain the delayed migration times observed here. Additional characterization is needed to test this hypothesis.

Table 5. Analysis results for the cation test mix from the kit with reagents prepared in the lab.

	Average MT	%RSD MT	Average corr. area%	%RSD corr. area%	Resolution
Ammonium	2.70	1.45	11.28	1.76	0.00
Sodium	3.35	1.41	10.34	1.27	10.03
Potassium	3.67	1.74	6.63	1.96	6.51
Lithium	3.84	1.38	41.61	0.55	2.96
Magnesium	4.06	1.34	19.47	0.93	2.88
Calcium	4.25	1.42	10.67	2.02	2.02

Comparability of the quantification results on cation test mix: Despite migration time differences using the prepared separation buffers, the quantification of the ions in the test mix was consistent between the kit and the prepared buffers (Tables 2 and 5). Consistent with earlier observations, the solutions prepared in the lab showed improved resolution for all ions in the cation test mix.

Additionally, great repeatability and robustness were demonstrated in the preparation procedure. Four different batches of solutions (coating A, coating B, and separation buffer) prepared using polyacrylic acid (~ MW. 450,000) from 2 different vendors and prepared by 2 different analysts on 2 different days using were used to analyze the cation test mix. Results were comparable across 14 injections. %RSD was less than 2% for peak migration time and corrected area % for all ions (Table 5).

Conclusions

- With the instructions provided, a lab-scale Cation Analysis Kit was successfully created

Confidential - Company Proprietary

- No method modifications were needed to use the lab-scale cation analysis reagents to replace the use of the previously available commercial Cation Analysis Kit (PN: A53540)
- The lab-scale preparation of the reagents provided comparable results to the commercial kit

References

1. SCIEX Cation Analysis Kit Instruction Guide, SCIEX, A49108AESCIEX Cation Analysis Kit Instruction Guide, SCIEX, A49108AE
2. PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System, system maintenance Guide, SCIEX, RUO-IDV-05-5519-B

SCIEX Now™支持网络

一站式满足您各种支持需求

产品和数据安全

合规性服务提升您的信心，帮助您保护数据安全，确保数据完整性，以及数据管理系统的溯源性。

新手上路

我们将帮助您在SCIEX Now 学习中心在线注册，邀请您在SCIEX Now 学习中心注册学习，并向您发送欢迎电子邮件。



实验室增强服务

SCIEX实验室增强服务计划，为您的实验室提供整体服务解决方案，以提高工作效率并减少系统停机时间。

SCIEX Now 学习中心

优质的内容，个性化的学习方式 - 使用全新的科学记忆方式设计的课程。

自我学习资源

我们的知识库和社区，将帮助您提升科学知识水平，并从SCIEX专家或者同行那里找到您所需要的答案。

全工作流程技术支持

只要您在实验过程中，遇到困难挑战，SCIEX 支持团队都会帮助您高效地解决问题，实现科学目标。

立即开始成功之路：sciex.com.cn/support

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅https://sciex.com.cn/diagnostics 。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-39495-A

SCIEX
The power of precision

SCIEX 中国

北京分公司
北京市昌平区生命科学园科学园路18号院
A座一层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488，400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502层
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China

danaher