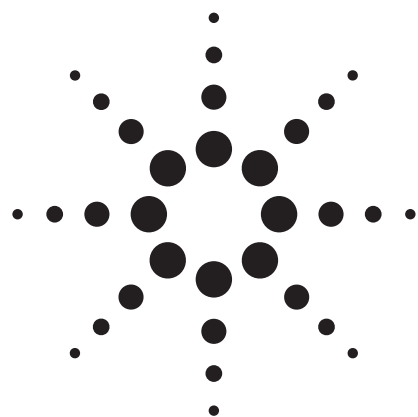
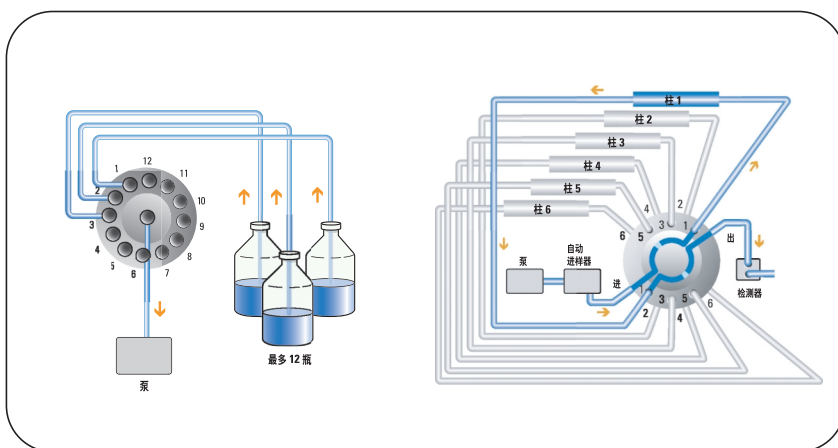




方法开发 — 用 Agilent 1100 系列阀系统进行溶剂和色谱柱选择

Udo Huber

应用报告



摘要

在一个 HPLC 分析方法用于制药 QA/QC 中的化合物定性、定量之前，必须经过三个阶段。第一个阶段是方法开发，然后必须经过方法认证，最后一步是将方法写成标准操作规程 (SOP)，使其能够用于 QA/QC 实验室。虽然方法认证有许多指南和法规要求，但方法开发却仍然是和分析化学家的经验密切相关的实验过程。更成熟的方法开发办法是用溶剂和色谱柱自动选择功能进行系统实验，本文就此将做详细报告。



Agilent Technologies

引言

在这篇应用报告中，报导了使用 Agilent 1100 系列阀¹的三个例子。

1. 用 Agilent 1100 系列 12 位/13 通阀进行溶剂选择，可以选择多达 12 种不同的溶剂，分析流速在 10 ml/min 以下。
2. 使用 Agilent 1100 系列 6 位选择阀可选择多达 6 种色谱柱。
3. 推荐将溶剂和色谱柱选择两种阀相结合进行自动方法开发，具有最大的灵活性。

仪器

所用的 Agilent 1100 系列系统包含下列组件：

- Agilent 1100 系列四元泵，可带多达 4 个脱气机
- Agilent 1100 系列多孔板自动进样器
- Agilent 1100 系列 12 位/13 通阀
- Agilent 1100 系列 6 位选择阀
- Agilent 1100 系列柱组合架
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器

系统用安捷伦化学工作站 (A.09.03 版) 控制。

溶剂选择的配置

溶剂选择可以有两种配置，如图 1A 和 B 所示。

在图 1A 显示的配置中，脱气机设置在溶剂选择阀之后。这种配置的优点是所有溶剂只需要一个脱气机。缺点是每换一种溶剂都要冲洗脱气机的通道，溶剂的消耗较大。标准脱气机的内腔体积是 12 mL，微量脱气机为 1 mL，因此推荐的冲洗体积分别为 25 mL 和 5 mL。在每个溶剂瓶和选择阀之间都设置一个脱气机可以不用冲洗脱气机通道，避免溶剂消耗和废液丢弃造成

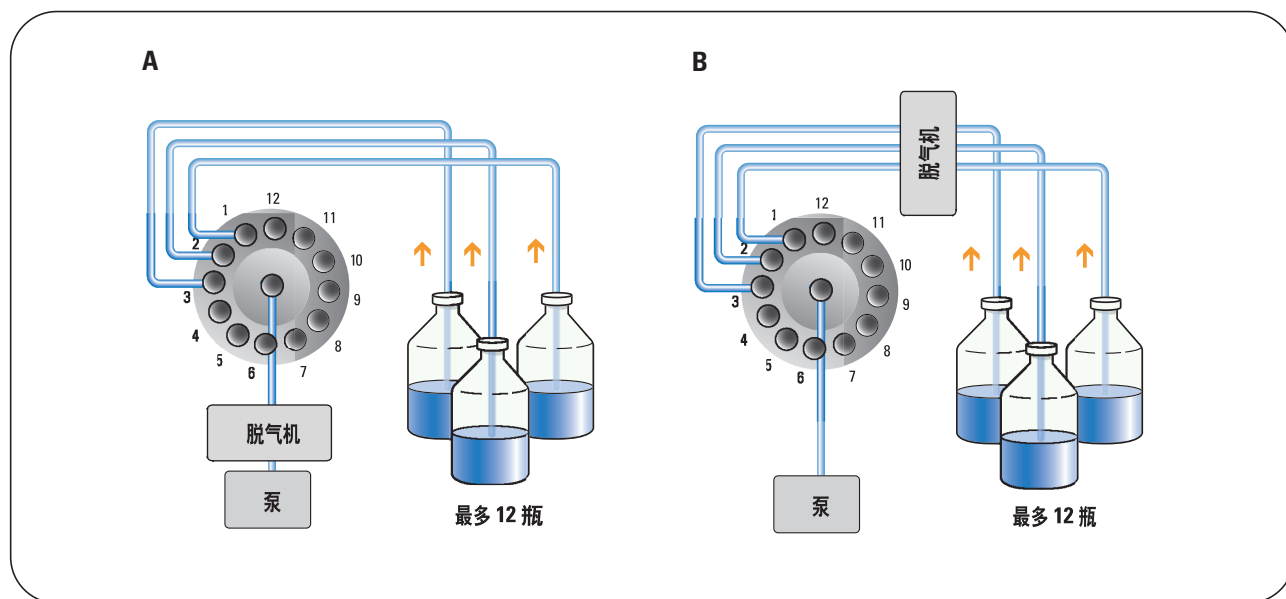


图 1

A. 所有溶剂用一个脱气机通道

B. 每种溶剂一个脱气机通道

浪费。而且，这种配置的方法和序列设置也更加容易。这种设置的缺点是可能最多需要 4 个脱气机。然而，长期提供和处理溶剂所需要的费用比增加脱气机的花费要高得多，因此，我们建议每种溶剂用一个脱气机进行溶剂选择。本文报道的正是这种配置。

结果和讨论

1. 溶剂选择

Agilent 1100 系列 12 位/13 通阀可用于最多切换 12 种溶剂，进行溶剂选择。在这篇应用报告显示的实例中，pH 值在 3 到 11 之间的五种缓冲溶液作为流动相 A 在 Zorbax Extend-C18 柱上使用。每种溶剂都建立了不同的方法，将溶剂选择阀切换到相应的位置。图 2 显示了溶剂 1（磷酸缓冲液，pH=3）的阀设置窗口。

要用所有 5 种流动相进行全自动溶剂选择，应按图 3 显示的序列表进行方法设置

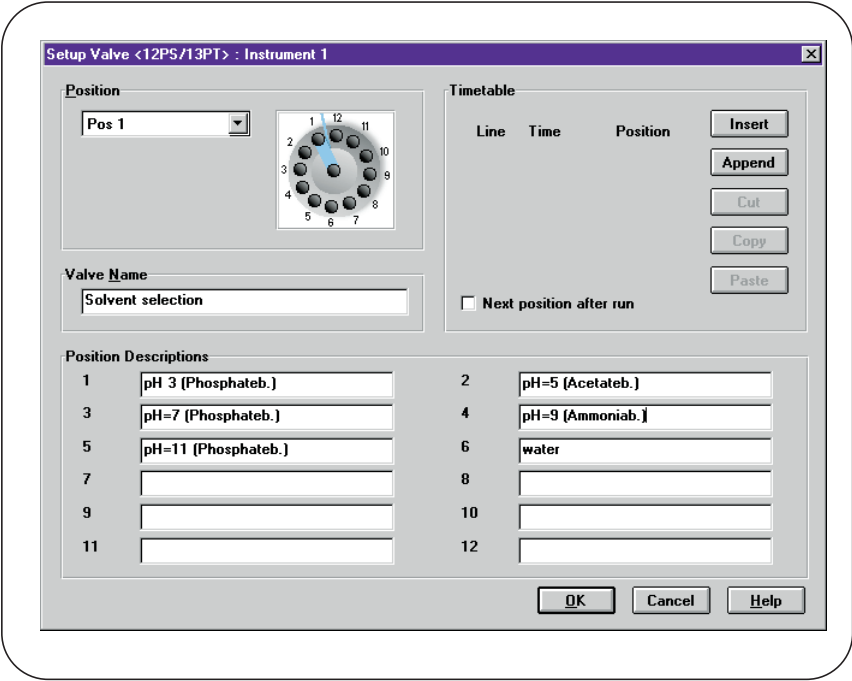


图 2
 溶剂 1 的阀设置窗口

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Cal Le
1	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH3_01	1	Sample	
2	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH5_01	1	Sample	
3	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH7_01	1	Sample	
4	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH9_01	1	Sample	
5	Vial 11	Tricyclic Antid.	PH11_01	1	Sample	
6		Wash	WASH01	1	Sample	

图 3
 自动溶剂选择的序列表

色谱柱:	Zorbax Extend-C18 4.6 × 75 mm, 3.5 μm
流动相:	A = 水溶液 B = 乙腈
梯度:	0 分钟时 10% B 9 分钟时 70% B 9.01 分钟时 90% B 12 分钟时 90% B
停止时间:	12 分钟
滞后时间:	关闭
流速:	1 mL/min
进样:	10 μL
柱温:	室温
UV 检测器:	254 nm/16 (参考波长: 360 nm/60) 光程 10 mm

图 4 显示了溶剂选择实验的结果。使用 pH5 的流动相能够在 Zorbax Extend-C18 柱上使三种化合物实现最佳分离。

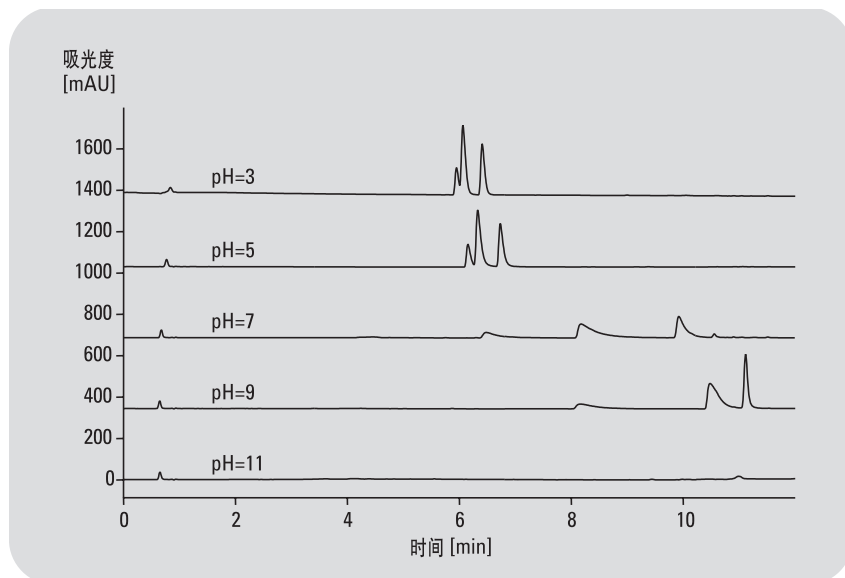


图 4
溶解选择实验结果

色谱柱的预处理和后处理

当切换到下一种溶剂时，需要花时间去用新的流动相平衡色谱柱。这一过程叫做色谱柱的预处理。色谱柱需要平衡多久，取决于柱长、内径、流速，以及两种流动相的互混性。由于为每种溶剂都设置了一种方法，各种方法又设定在一个序列中，所以可以使用序列参数 (Sequence Parameter) 窗口的等待时间 (Wait Time) 功能。按照图 5 所示的设置，方法按序列表调用后，溶剂选择阀就立刻切换到方法指定的位置。方法调用后，软件要在进样前等待一定的等待时间 (本例中为 10 分钟)。

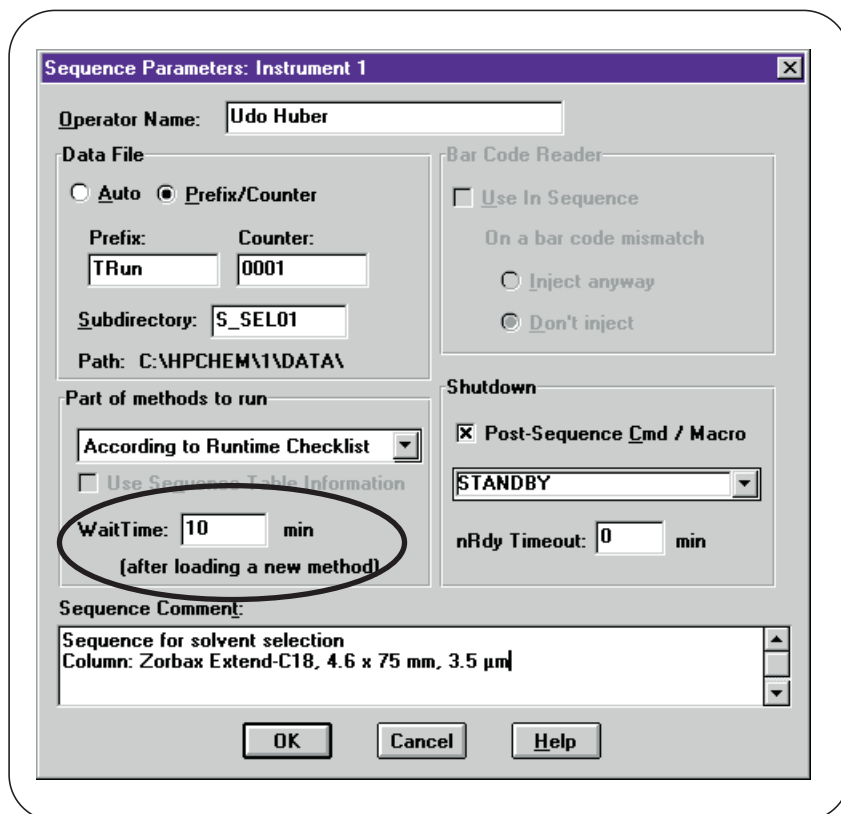


图 5
序列参数窗口，指定等待时间为 10 分钟

最后的实验完成后，色谱柱必须用不含缓冲液的溶剂平衡，色谱柱就保存在这种溶剂中。这一过程称为色谱柱的后处理。因此，要在序列表（图 3，第 6 行）中设置不进样的空白运行。在这次运行中，先用水冲洗掉残留的缓冲液，最后用保存色谱柱的溶剂洗柱子（例如，使用乙腈）。色谱柱的数据表上通常都有保存溶剂。

2. 色谱柱选择

Agilent 1100 系列 6 位选择阀可最多切换 6 根色谱柱，用于色谱柱选择。在本应用报告所显示的实例中，使用了 4 种不同的反相色谱柱，用磷酸缓冲液 (pH=3) 作为流动相A。5 位上连接了一个毛细管。阀的这个位置可以用来冲洗系统。每根色谱柱都设置了一个不同的方法，将色谱柱选择阀切换到相应的位置。图 6 显示了为在柱 1 (Zorbax Extend-C18) 上运行的方法而进行阀设置的窗口。

要在所有 4 根色谱柱上进行全自动柱选择实验，应将方法设置在一个序列表中，如图 7 所示。

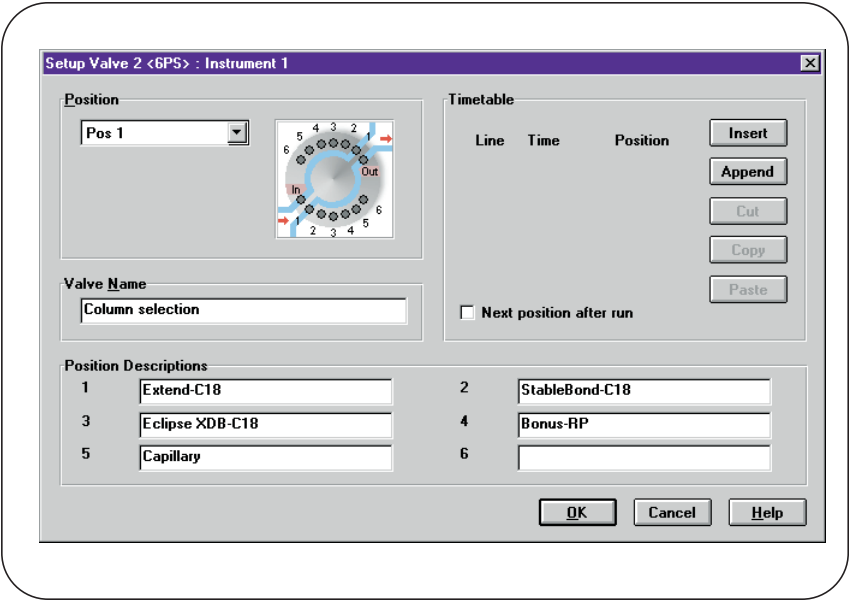


图 6
柱 1 的阀设置窗口

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Cal L
1	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN1	1	Sample	
2	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN2	1	Sample	
3	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN3	1	Sample	
4	Vial 21	Tricyclic Antid.	COLUMN4	1	Sample	
5		Column wash	WASH_ALL	1	Sample	

图 7
自动柱选择的序列表

色谱柱选择实验的结果见图 8。
pH=3 条件下在 Zorbax Stable-Bond-C18 柱上能够实现最佳分离。

色谱柱：	Zorbax 反相
流动相：	4.6 × 75 mm, 3.5 μm
	A = 50 mM 磷酸缓冲液
	(pH = 3)
	B = 乙腈
梯度：	0 分钟时 10% B
	9 分钟时 70% B
	9.01 分钟时 90% B
	12 分钟时 90% B
停止时间：	12 分钟
滞后时间：	关闭
流速：	1 mL/min
进样：	10 μL
柱温：	室温
UV 检测器：	254 nm/16
	(参考波长：360 nm/60)

色谱柱的预处理和后处理

色谱柱的预处理和后处理与溶剂选择中所描述的一样。用序列参数 (Sequence Parameters) 窗口的等待时间 (Wait Time) 进行色谱柱预处理，不进样冲洗运行进行色谱柱后处理。在图 7 的序列表中（第五行），设置了一个冲洗所有色谱柱的方法。在这个方法中，用适当溶剂冲洗一段时间后，时间表将使色谱柱选择阀切换到下一个位置。可能有必要在分析结束后立刻冲洗色谱柱，这取决于柱填料、所用的溶剂和整个序列的时间。本实验的序列表中，在每根色谱柱的每次运行后都设置了冲洗方法。

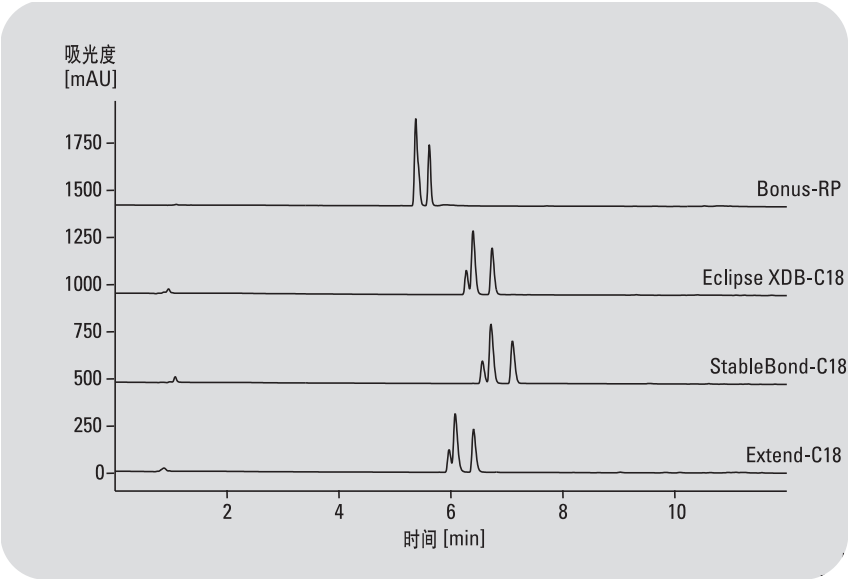


图 8
溶剂和色谱柱自动选择序列表

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj/Location	Sample Type	Cal L
1	Vial 31	Tricyclic Antid.	C1_S1	1	Sample	
2	Vial 31	Tricyclic Antid.	C1_S2	1	Sample	
3	Vial 31	Tricyclic Antid.	C1_S3	1	Sample	
4	Vial 31	Tricyclic Antid.	C2_S1	1	Sample	
5	Vial 31	Tricyclic Antid.	C2_S2	1	Sample	
6	Vial 31	Tricyclic Antid.	C2_S3	1	Sample	
7	Vial 31	Tricyclic Antid.	C3_S1	1	Sample	
8	Vial 31	Tricyclic Antid.	C3_S2	1	Sample	
9	Vial 31	Tricyclic Antid.	C3_S3	1	Sample	
10	Vial 31	Tricyclic Antid.	C4_S1	1	Sample	
11	Vial 31	Tricyclic Antid.	C4_S2	1	Sample	
12	Vial 31	Tricyclic Antid.	C4_S3	1	Sample	
13		Column wash	WASH_ALL	1	Sample	

图 9
溶剂和色谱柱自动选择序列表

溶剂选择和柱选择相结合

将 12 位/13 通阀和 6 位选择阀组合在一个系统上,就可以使溶剂选择和柱选择结合在一起了。在本应用报告的实例中,使用了三种 pH 值从 3 到 7 的水溶液,在四根反相柱上进行了实验。为每个样品设置方法,使溶剂选择阀和柱选择阀切换到适当位置。溶剂和柱选择的阀设置窗口与图 2 和图 6 相同。图 9 所示的序列表设置了使用所有三种溶剂和四根柱子的 12 种方法进行全自动测试。

图 10 显示了溶剂和色谱柱自动选择实验的结果。化合物在 Zorbax StableBond-C18 柱上已经实现了基线分离,但最佳分离是 pH 7 条件下,在 Zorbax Bonus-RP 柱上得到的。

色谱柱预处理和后处理

色谱柱的预处理和后处理如前所述。用序列参数 (Sequence Parameters) 窗口的等待时间 (Wait Time) 进行色谱柱预处理,不进样冲洗运行进行色谱柱后处理。图 9 的序列表中 (第 13 行) 还有一个包含冲洗所有色谱柱时间表的方法。如果需要,也可以为每根柱子每次运行结束后设置一个冲洗方法。

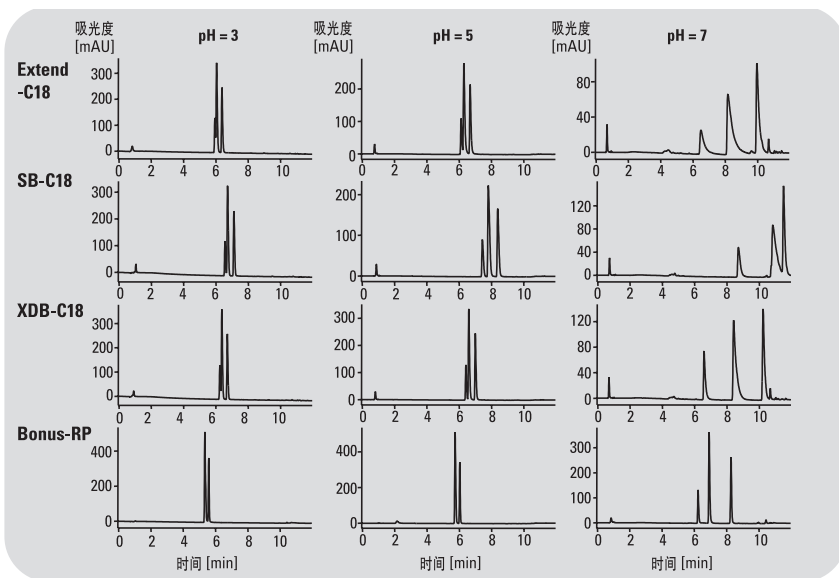


图 10
溶剂和柱选择实验结果

结论

本文报道了三个应用-溶剂选择、色谱柱选择,以及溶剂选择和柱选择相结合。表明使用 Agilent 1100 系列 12 位/13 通阀和 6 位选择阀,可以组成来自同一厂家的全自动集成系统。给出了所有三种应用的阀设置以及全自动分析的序列设置。报道了用不同反相柱在不同 pH 值条件下分离三种化合物混合物的一个应用实例。清楚地显示了溶剂与柱选择相结合的效力。如图 10 所

示,达到最佳分离效果的溶剂/色谱柱组合可以很方便地得到。如果仅使用溶剂或色谱柱选择,要做更多的实验才能得到同样的结果。

参考文献

1. “New dimensions for HPLC applications”, 安捷伦科技产品样本, 2002, 出版号 5988-6707EN。

Udo Huber 是安捷伦科技公司的
应用化学家。
德国 *Waldbronn*

www.agilent.com/chem/1100

安捷伦科技公司 ©, 2002

版权所有。未经书面许可，不得复制、改编或翻译，
符合版权法者除外。

2002 年 11 月 1 日出版

出版号 5988-8347CHCN



Agilent Technologies