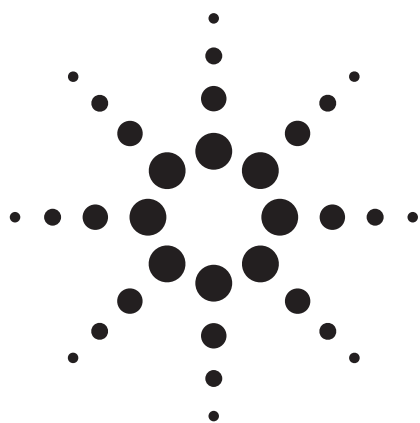




Eclipse Plus C8 柱改进药物 HPLC 分析的峰形和效率

应用

药物

作者

John W. Henderson Jr., Nona Martone, and Cliff Woodward
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

本文报道了7个用ZORBAX Eclipse Plus C8柱进行药物分析的实例。Eclipse Plus C8柱分离碱性、酸性和中性化合物都有良好的峰形，因而是方法开发的良好起点。有了好的峰形，才能有好的分离度。Eclipse Plus C8柱与Eclipse XDB C8柱和Eclipse Plus C18柱相比，具有不同的选择性。C8的脂肪链较短，比C18链的保留更弱，与C18相比可以明显缩短分析时间。另外，还有适用于分析、高分离度快速(RR)、高通量分析的各种色谱柱。这几个分析实例是用RR柱替代长柱将分析方法变为RR方法。卓越的峰形加上可以升级成高通量方法的能力，使Eclipse Plus C8柱成为可提高所有HPLC分离效率的有效工具。

引言

由于没有一种柱子可以适用于所有分析，所以人们一直在研究新的HPLC柱技术。科学家们一直都在寻找有助于创新、提高效率，并更快获得良好结果的更好、更快的方法。例如，在制药行业，药物的研究和开发需要更高效的色谱柱，以增加在一定时间内进行准确分析的数量。更快地筛选出潜在的药物非常有意义。另外，政府和行业规范对仪器和技术的要求也越来越严格。用于食品的来自空气和水（水，空气和食品中）的每一种物质都要严格检查其质量和安全性。高质量HPLC柱是耐用的仪器和方法的必要组成部分，有了所有这些，才能获得可靠的结果。

ZORBAX Eclipse Plus C8柱有几种填料粒径和柱尺寸，是提高效率的良好工具。它们分离酸性、中性和碱性化合物都有良好的峰形。是方法开发的首选色谱柱。



Agilent Technologies

Eclipse Plus C8的选择性

色谱柱的选择要考虑到一些因素。选择性是进行色谱柱选择最重要的因素之一。选择性系数(α)是两个峰的相对保留值:

$$\alpha = k_2 / k_1$$

在这里 k_2 和 k_1 分别是第二个洗脱出来的峰和第一峰的保留因子, 也称容量因子。如果这两个峰一起被洗脱, α 为 1; 对这两个紧密相邻的峰来说, 选择性接近 1。选择性, 或峰间距, 可以通过改变温度、流动

相或固定相(色谱柱)进行调节。因为选择性体现了分析物与固定相/流动相之间的相互作用, 所以难以理解、也很难预测, 常常需要通过实验进行优化。有各种柱子可供选择, 这是改变 α 的有力而容易的办法, 尤其是因稳定性、溶解度、pH 或其它局限无法改变流动相时。图 1 显示了在同样的色谱条件下, Eclipse Plus C8 柱、Eclipse Plus C18 柱, 和 Eclipse XDB C8 柱的不同选择性。Eclipse Plus C8 柱与 Eclipse XDB-C8 柱相比, 虽然对三种非常难分离的化合物来说, α 仅改变了 6%, 但分离度增加了 1 倍, 从 1.23 增至 2.42。

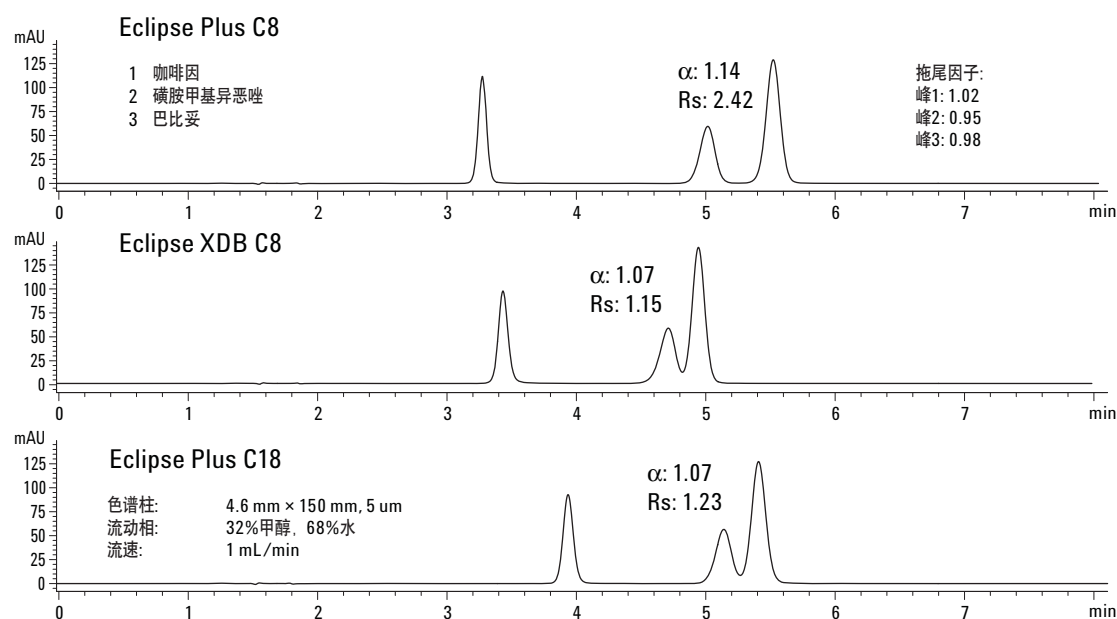


图 1. Eclipse Plus C8 和其它固定相之间选择性的差别

这些柱子都有相似之处，如，同样以ZORBAX硅胶为基质，都采用的是安捷伦控制的生产技术，因此，可以预计其洗脱顺序也比较相似，如图所示。但它们之间也有明显的不同，例如，Eclipse Plus柱和Eclipse XDB柱采用的专利的硅胶处理和键合技术不同，C18和C8的官能团也不同。这些差异反映为选择性的不同，进而将改善分离度。对于 α 接近1的紧密相邻峰， α 的微小变化将对分离度产生极大的影响，例如在这个例子中， α 从1.07变为1.14，分离度就从1.15增加到2.42。

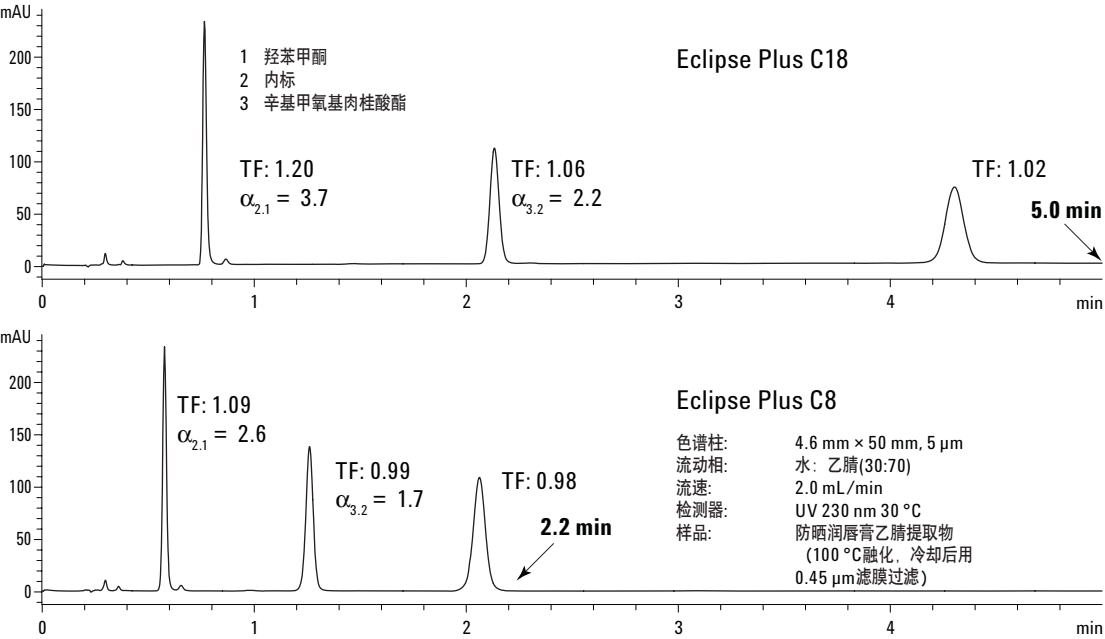


图2. C18和C8的不同选择性将唇膏的分析时间缩短了一半

C8柱的保留比更长烷基链的C18柱弱，可以用来缩短分析时间，还可以提供良好的选择性。图2显示，与Eclipse Plus C18柱相比，采用Eclipse Plus C8柱可以将分析时间缩短一半。Eclipse C8柱的脂肪链较短，与分析物之间的疏水相互作用较弱，因此洗脱更快。许多用C18设计的方法，改用Eclipse Plus C8后都可以在更短的时间轻松地使色谱峰完全分离。

快速分离(RR)

小粒径的填料与大粒径填料相比，优势就是有更高的柱效。用这一特点可以明显提高效率。填充了小粒径填料的较短色谱柱，在保持了用长柱能得到的足够分离度的同时，显著加快了分析速度。图3、4、5是应用实例，用更短的高分离度快速(RR) (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m)柱代替Eclipse Plus C8分析柱(4.6 x 150 mm, 5 μ m)。直接或“plug & play”替代都在保持足够分离

表1. 用“Plug & Play” RR柱提高灵敏度

	最后洗脱峰的峰高(mAU)		
	分析柱	RR柱	% RR增高
巴比妥	18.9	41.1	54
漱口水	47.4	90.8	48
苯甲酸酯类	43.5	97	55
	最后洗脱峰的面积		
	分析柱	RR柱	% 峰面积变化
巴比妥	155.4	155.6	0
漱口水	1083.8	1089.8	1
苯甲酸酯类	322.7	327	1

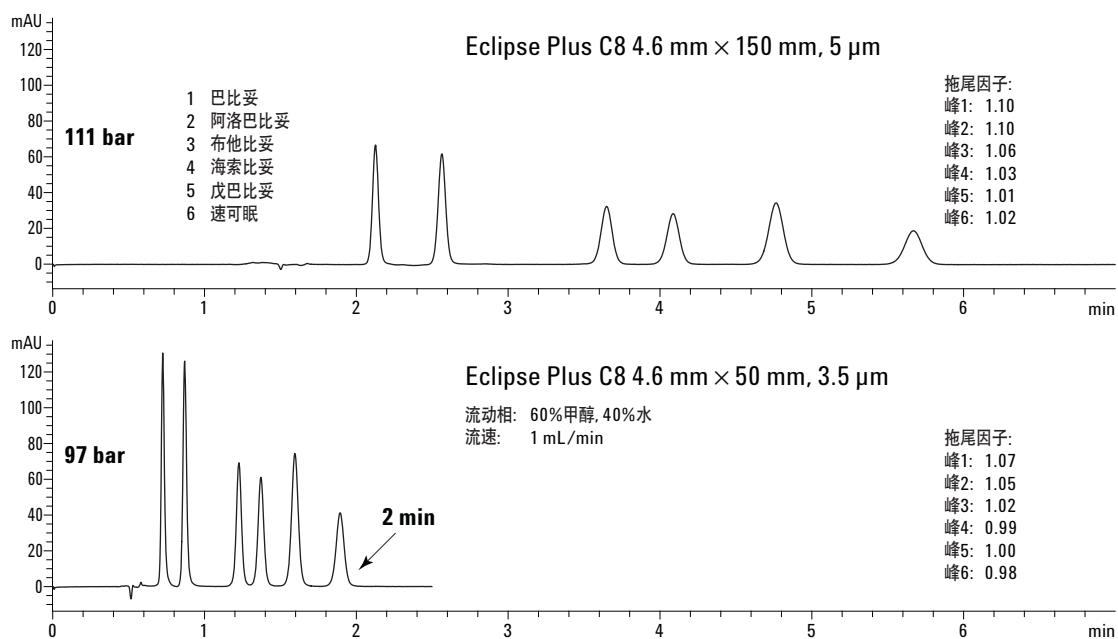


图3. 巴比妥类药物的 Plug & play RR 分析

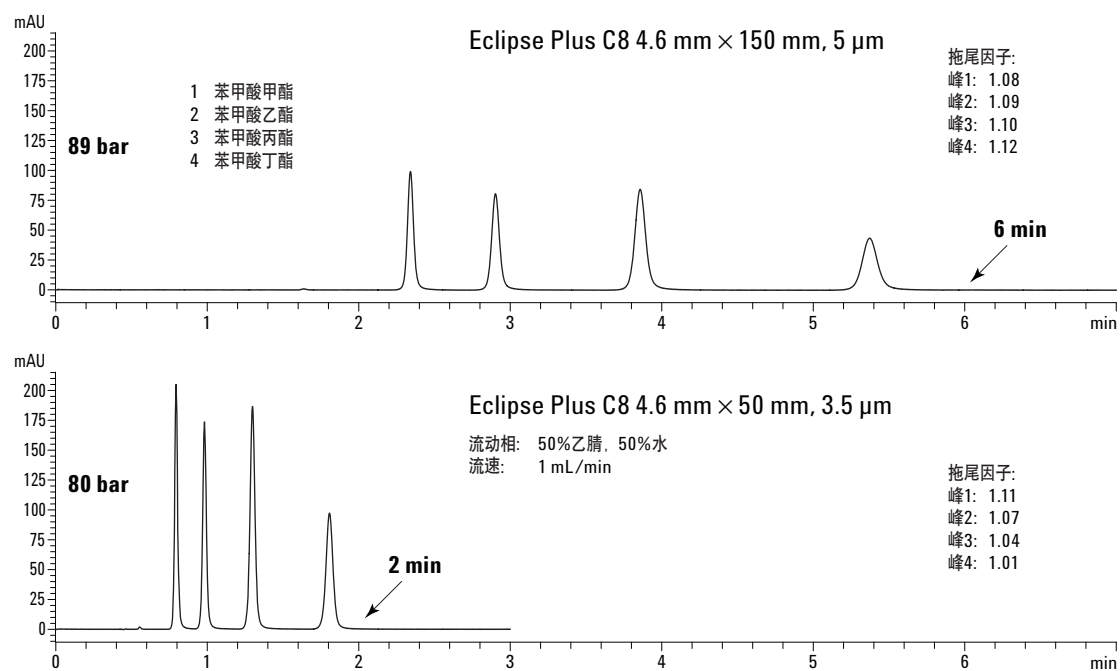


图4. 苯甲酸酯类的 Plug & play RR 分析

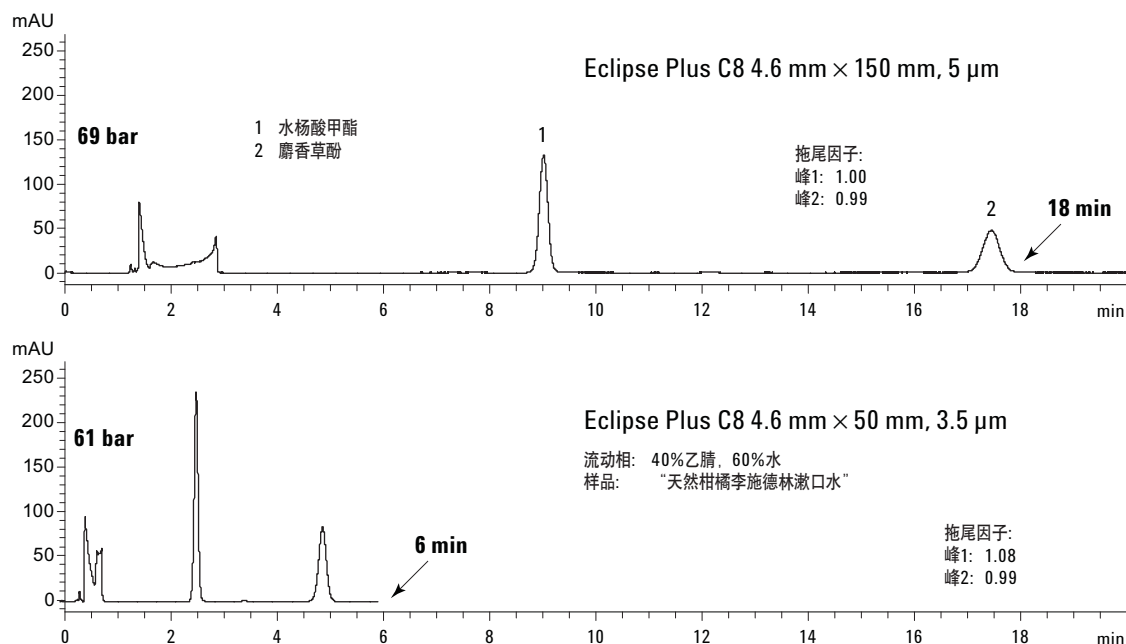


图5. 漱口水中活性成分的Plug & play RR分析

度的同时,明显缩短了分析时间,分析时间与柱长成正比。小粒径填料柱还明显提高了灵敏度。表1列出了这三个例子中分析柱和RR柱分离时最后洗脱峰的峰高、峰面积和变化的百分比。由于进样量相等,用两个柱子得到的峰面积都相同,但是RR柱的峰高(灵敏度测量[信噪比])却要高50%。三张图中还列出了这些例子的系统反压。RR柱因较小粒径(3.5 vs. 5 μm)造成的高反压问题,通过更短的柱长(50 vs. 150 mm)得到了弥补。分析柱(150 mm)和50-mm RR柱的反压相等,证实了安捷伦RR柱的plug & play能力。所有的压力都在安捷伦1100和1200系列液相色谱仪的操作范围内。如果需要,还可以选择较高的流速,进行更快的分析。

Eclipse Plus C8柱有1.8、3.5和5 μm三种粒径,适用于分析、高分离度快速和快速LC分析。表2列出了可供选择的各种配置。

碱性化合物的出色峰形

Eclipse Plus柱(C8和C18)的最显著的特点是分离各种类型样品:酸性、碱性和中性样品,都能得到出

色的峰形。在上述例子的各图中都列出了用美国药典拖尾因子计算表示的峰形。每个例子中,都接近于理想状态(1.0)。高性能一峰形,柱效和分离度一均归功于全程严格控制的、改进的专利硅胶生产和键合技术。

碱性化合物(特别是含氨基的分子)的高效反相色谱分离经常很困难。在低pH条件下(pH < 3),碱发生质子化(BH⁺),因而水溶性很强,保留较差。在pH 7时,某些氨基可能仍然质子化,而其它的则失去其质子(B)。硅胶上没有反应完全的硅醇基呈离子型(SiO⁻),将与质子化的离子样品发生相互作用。这种离子交换二级反应将导致峰拖尾。在低pH条件下,硅醇基未离子化(SiOH),与碱性分析物不发生相互作用。

图6显示了在pH 7时,同样条件下分析2个碱性化合物的实例。这两个已知化合物,阿密曲替林和右美沙芬,由于在中性pH条件下部分离子化,在B和BH⁺之间互相转化,用其它柱子分离时拖尾非常严重。但使用Eclipse Plus C8后,峰形非常好。Eclipse Plus进行了独特的ZORBAX硅胶处理、封端和键合,降低了离子化硅醇基的相互作用,显著改善了峰形。

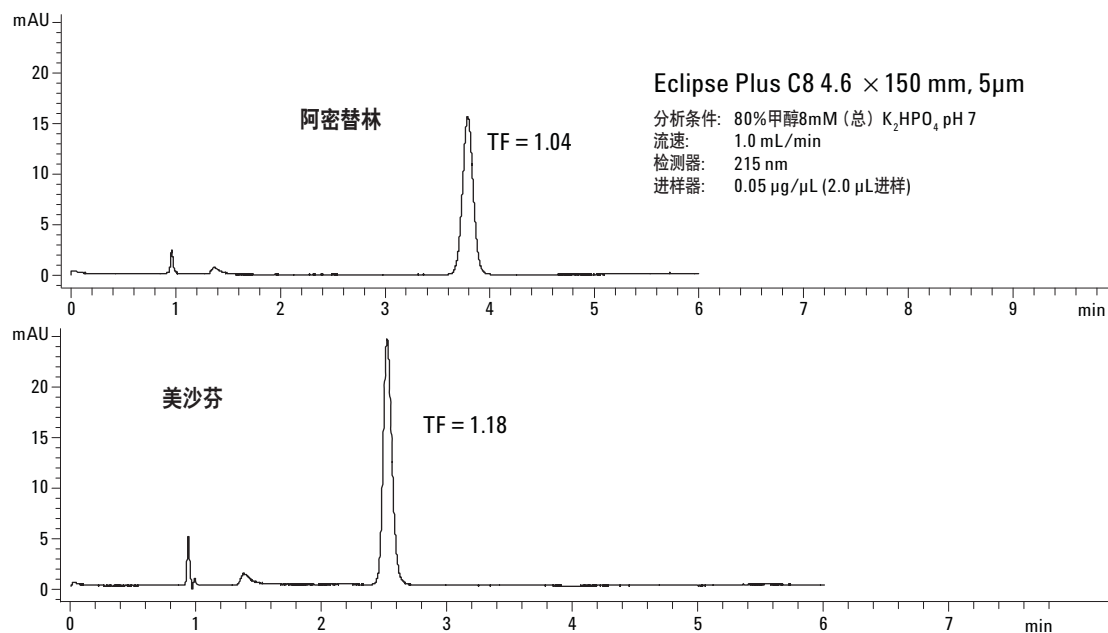


图6. 碱性药物在Eclipse Plus C8柱上的良好峰形

结论

Eclipse Plus C8柱可以用于改善许多HPLC应用。为酸、碱和中性化合物提供对称峰形，使Eclipse Plus C8柱成为方法开发的理想首选色谱柱。峰的对称性影响着分离度和柱效，将改善紧密相邻峰的分离。Eclipse Plus C8柱还具有和其它C8与C18键合相略微不同的选择性，这也使它成为方法开发的良好选择。紧密相邻峰之间选择性的微小差异，将造成分离度的很大区别。Eclipse Plus C8柱特有的良好峰形，再加上三种粒径的通用柱配置，可以将现有的较长时间分析轻松转变成高通量方法。

表 2. Eclipse Plus C8 柱配置

Eclipse Plus 订购详细资料			
色谱柱名称	尺寸(mm)	粒径(μm)	Eclipse Plus C8 USP L7
分析柱	4.6 x 250	5	959990-906
分析柱	4.6 x 150	5	959993-906
分析柱	4.6 x 100	5	959996-906
分析柱	4.6 x 50	5	959946-906
快速分离柱	4.6 x 150	3.5	959963-906
快速分离柱	4.6 x 100	3.5	959961-906
快速分离柱	4.6 x 75	3.5	959933-906
快速分离柱	4.6 x 50	3.5	959943-906
快速分离柱	4.6 x 30	3.5	959936-906
快速分离高通量柱	4.6 x 100	1.8	959964-906
快速分离高通量柱	4.6 x 50	1.8	959941-906
快速分离高通量柱	4.6 x 30	1.8	959931-906
溶剂节省柱	3.0 x 150	5	959993-306
增强型溶剂节省柱	3.0 x 150	3.5	959963-306
增强型溶剂节省柱	3.0 x 100	3.5	959961-306
溶剂节省高通量柱	3.0 x 100	1.8	959964-306
溶剂节省高通量柱	3.0 x 50	1.8	959941-306
窄径柱	2.1 x 150	5	959701-906
窄径柱	2.1 x 50	5	959746-906
快速分离窄径柱	2.1 x 150	3.5	959763-906
快速分离窄径柱	2.1 x 100	3.5	959793-906
快速分离窄径柱	2.1 x 50	3.5	959743-906
快速分离窄径柱	2.1 x 30	3.5	959733-906
快速分离高通量窄径柱	2.1 x 100	1.8	959764-906
快速分离高通量窄径柱	2.1 x 50	1.8	959741-906
快速分离高通量窄径柱	2.1 x 30	1.8	959731-906
保护柱芯, 4/μk	4.6 x 12.5	5	820950-937
保护柱芯, 4/μk	2.1 x 12.5	5	821125-937
保护柱卡套			820888-901

www.agilent.com/chem/cn

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中的错误，及因使用本资料所引发的相关损失不承担任何责任。

本资料中的信息、介绍和性能指标如有更改恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2007

2007 年 8 月中国印刷
5989-5803CHCN



Agilent Technologies