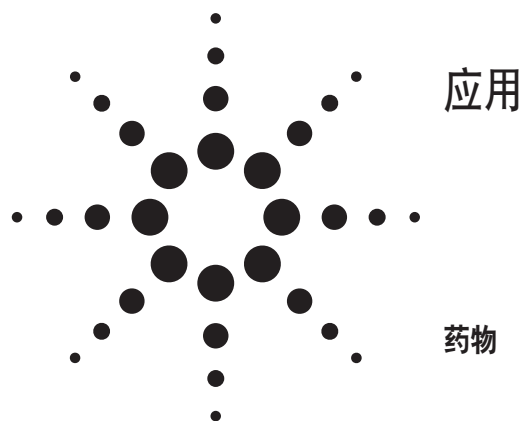


从 RRHT 短柱过渡到 3.5 μm 和 5 μm 长柱



作者

John W. Henderson Jr., William J. Long, and Cliff Woodward
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

粒径为 1.8、3.5 和 5 μm 的 ZORBAX 填料具有相同的选择性。从而扩大了 RRHT 方法库，今天建立的 RRHT 方法能直接转成分析型方法。这给了没有使用升级新技术的方法开发人员一个机会，在较旧的技术上重现新方法。我们将几个 RRHT HPLC 方法轻松过渡(scale)为分析型方法。这种过渡包含了几种化学键合相和梯度方法的应用。所有方法，包括 RRHT 方法（1.8 μm 柱），均在 Agilent 1100 液相色谱仪(LC)上操作。建议过渡后对流速和数据采集速率进行考察，以优化方法。

引言

提高实验室效率需要更快速的分离，因此用快速分离高通量(RRHT)柱开发 HPLC 应用方法已成为趋势。在许多情况下，是将用标准分析柱建立的老方法转移到更短的高效 RRHT 柱上。许多实验室都已配备了较长的 3.5 和 5 μm 柱，这些柱子可能会继续广泛应用。在这里我们介绍了几个在 RRHT 柱和分析柱上建立 HPLC 应用方法的实例。虽然分析时间较长，但分离能力是相同的。把用 RRHT 短柱开发的方法转移到长分析柱上很简单，只换柱子就行。ZORBAX 填料在 1.8 μm 与更大的 3.5 μm 到 5 μm 柱之间的可扩展性，充实了高通量分析方法库，使色谱工作者用较大粒径填料的柱子也能用这些开发的高通量方法。

实验部分

详细的方法参数分别列在相应的图中。所有分离均在 Agilent 1100 液相色谱仪(LC)上进行，系统包括二元泵、二极管阵列检测器和半微量流通池(G1315-60011)。连接 1100 组件的液体流路管线直径均为 0.12 mm。



Agilent Technologies

结果与讨论

要成功地将一个方法从常规电泳技术过渡到高通量技术，必须满足以下几个条件：固定相填料必须具有同样的选择性，与颗粒大小无关，得到相同的洗脱模式/曲线。HPLC 仪器必须能承受更高的系统压力，因为柱子填充了更小的填料颗粒，可能需要更高的流速，LC 必须有更快的数据采集速率，以准确地对更窄峰定量。过渡到更小内径柱子（4.6 mm 到 2.1 mm）时，还需要对仪器进行某些改造，如采用更小的检测池，采用更小内径的连接管路以最大限度地见效柱外效应。本文工作的重点是从 RRHT 方法过渡到常规分析型 HPLC 方法。虽然也需要耐用、重现性好的柱子，但不需要 Agilent 1200 高分离度快速液相色谱。

保留因子(k)和选择性系数(α)

柱填料的性质，如粒径、粒径分布，柱床填充好坏、键合相化学性质都会影响色谱分离。前三个参数与分离度方程中的柱效(N)相关：

$$\text{分离度} = (1/4) (\alpha - 1) \sqrt{N} \left(\frac{k}{k+1} \right)$$

这些参数对分离度的影响众所周知。例如，更小粒径的填料能提高柱效，这是 RRHT 柱的基础。上述其它参数还与分离度方程中的保留因子(k)和选择性系数(α)有关。如果不同粒径的柱填料性质都相同，那么不同粒径柱子之间的保留值和选择性系数也应该相同。

实际上，这正是我们所看到的：图 1 显示两种固定相 ZORBAX StableBond-C8 柱和 Eclipse XDB-C8 柱的 1.8- μm 和 5- μm 两种不同粒径填料之间的选择性非常相似（图 1 显示 1.8- μm 和 5- μm 两种不同粒径的 ZORBAX StableBond-C8 柱的选择性非常相似，1.8- μm 和 5- μm 两种不同粒径的 Eclipse XDB-C8 柱的选择性也非常相似）。ZORBAX XDB-C8 和 SB-C8 之间选择性的差异，是键合方式差异所造成的。图 2 的例子显示 ZORBAX 1.8- μm 填料与 3.5- μm 填料具有相同的选择性。同样，两种不同的键合相表现出了不同的选择性，这是由于其不同的官能团造成的，但相同键合相的不同粒径之间的选择性基本上是一致的。配备几种粒径的各种键合相对方法开发人员非常有利，因为改变固定相是改变选择性和分离度的快速方法。

等度方法的扩展

几种 ZORBAX 粒径之间的重复的（可重现的一致的）选择性，使 RRHT 方法过渡到常规分析方法非常简单和直接，只需要换柱子。图 3 显示了分离防晒乳中活性组分不同方法，从 RRHT 方法到 100-mm 3.5- μm Eclipse Plus-C18 柱分析方法，到更长的 150-mm 5- μm 柱分析方法。因为对相同的化合物，不同尺寸的 ZORBAX 颗粒具有非常相似的保留因子和选择性系数，所以分离结果一致。正如所预料的，系统压力随着粒径增加而减小。尽管如此，RRHT 方法还是可以轻松地在 LC 系统上运行，不必顾虑高压。

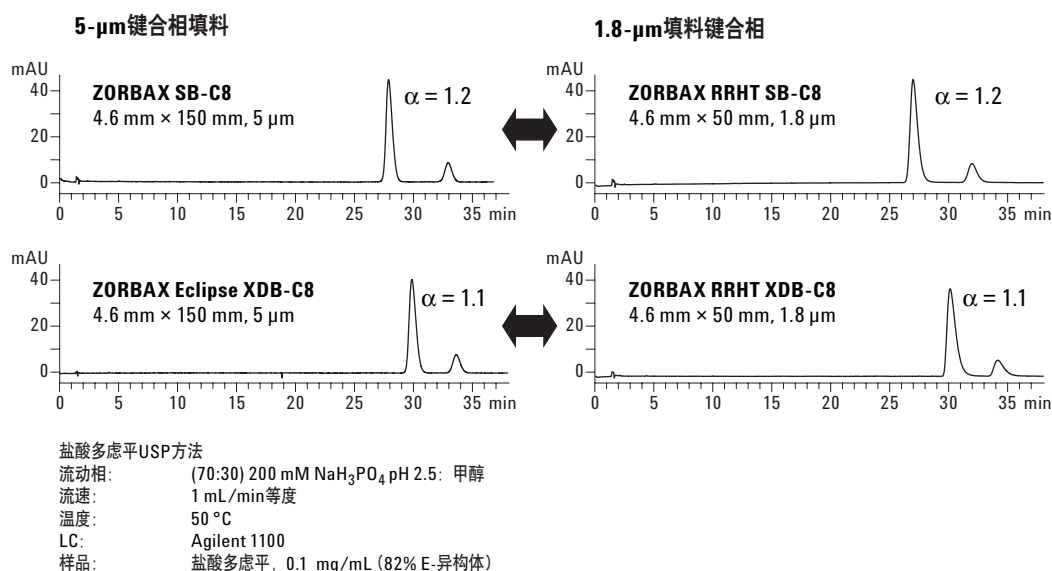


图 1. 5- μm 和 1.8- μm 粒径色谱柱之间选择性(α)的重现性

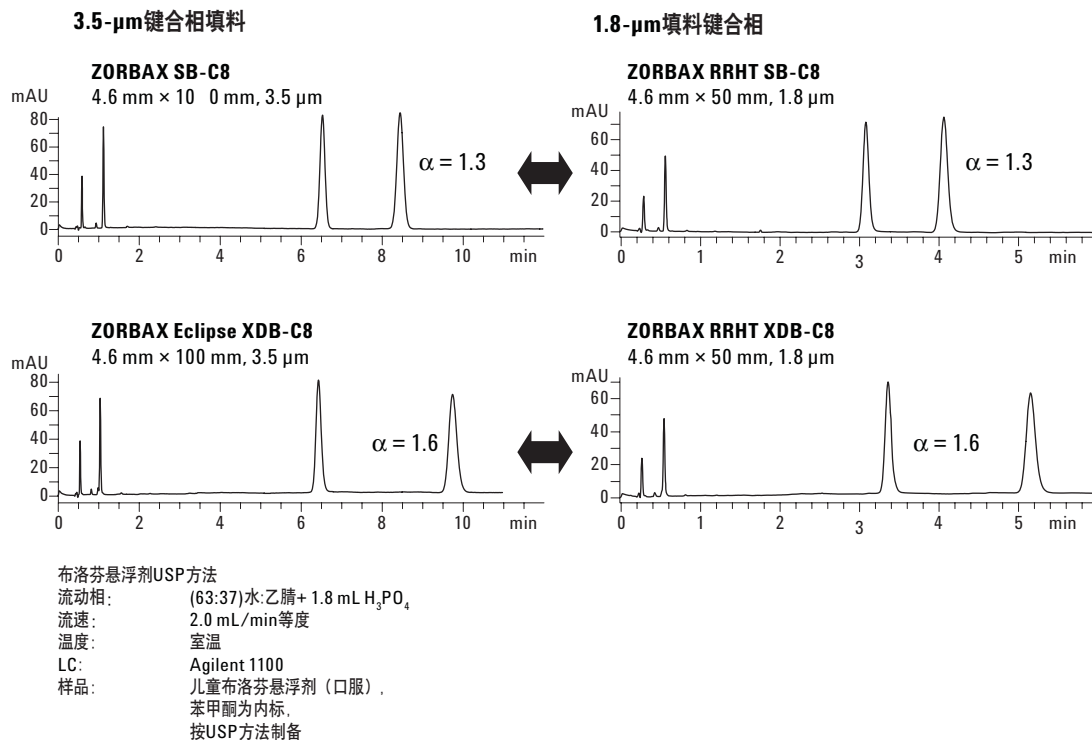


图2. 5- μm 和1.8- μm 粒径色谱柱之间选择性/选择性系数(α)的重现性

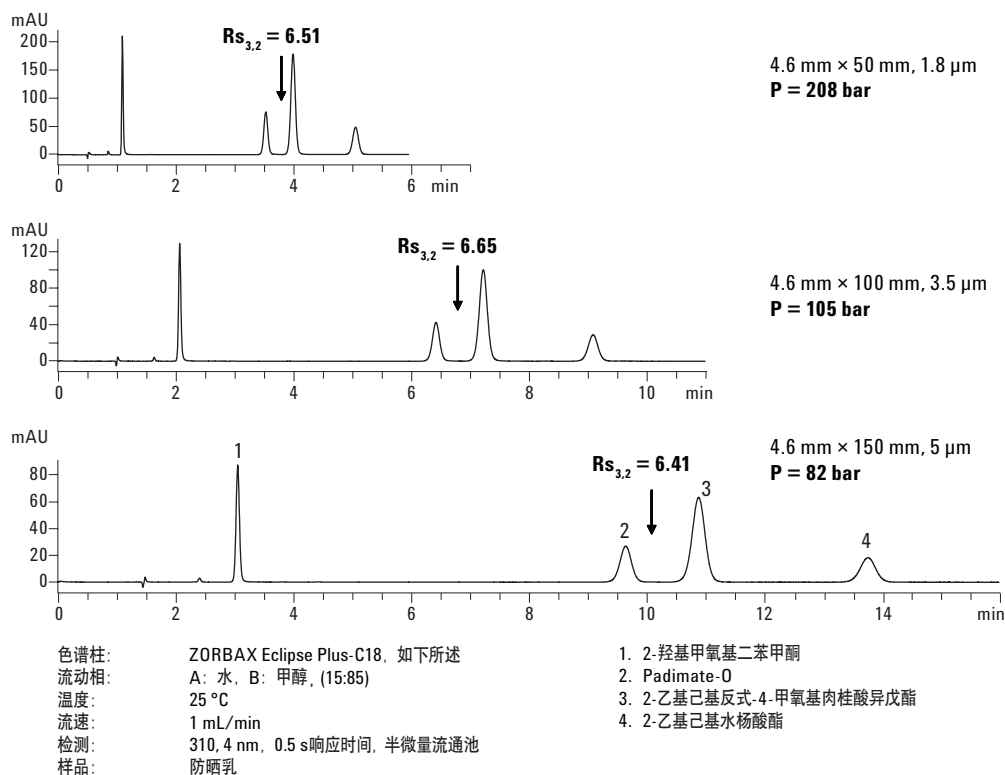


图3. ZORBAX Eclipse Plus-C18 柱的扩展性

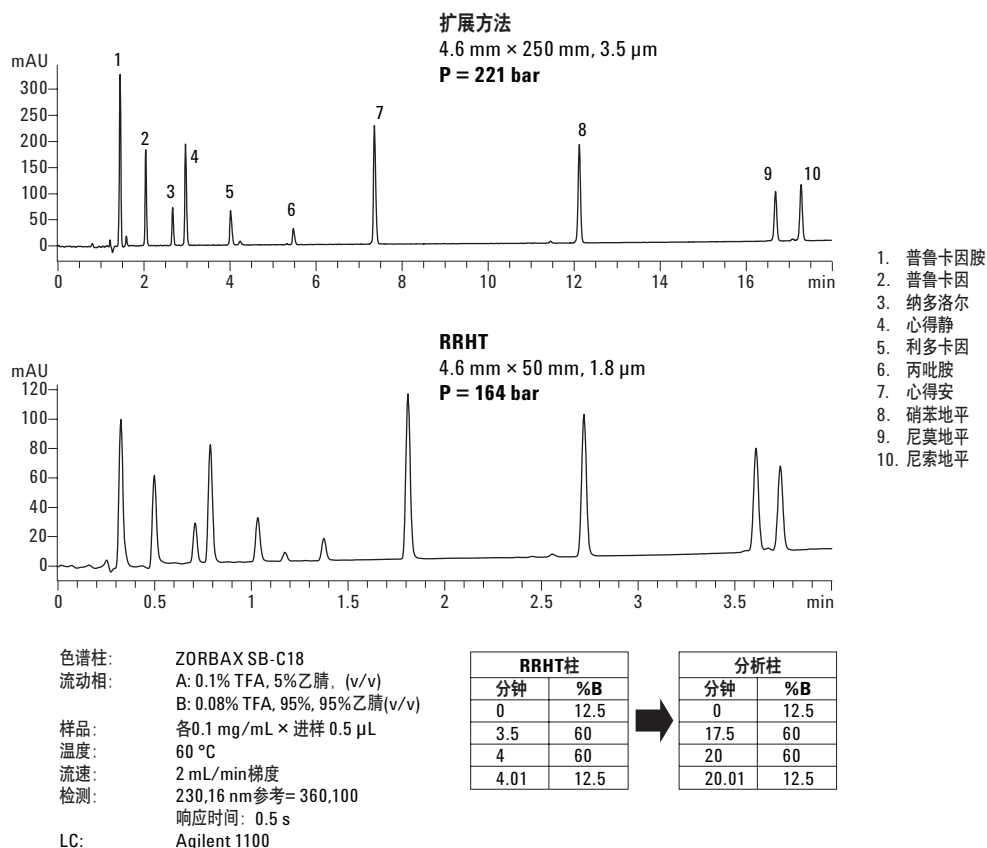


图4. 1.8 μm 到 3.5 μm 柱的梯度扩展性

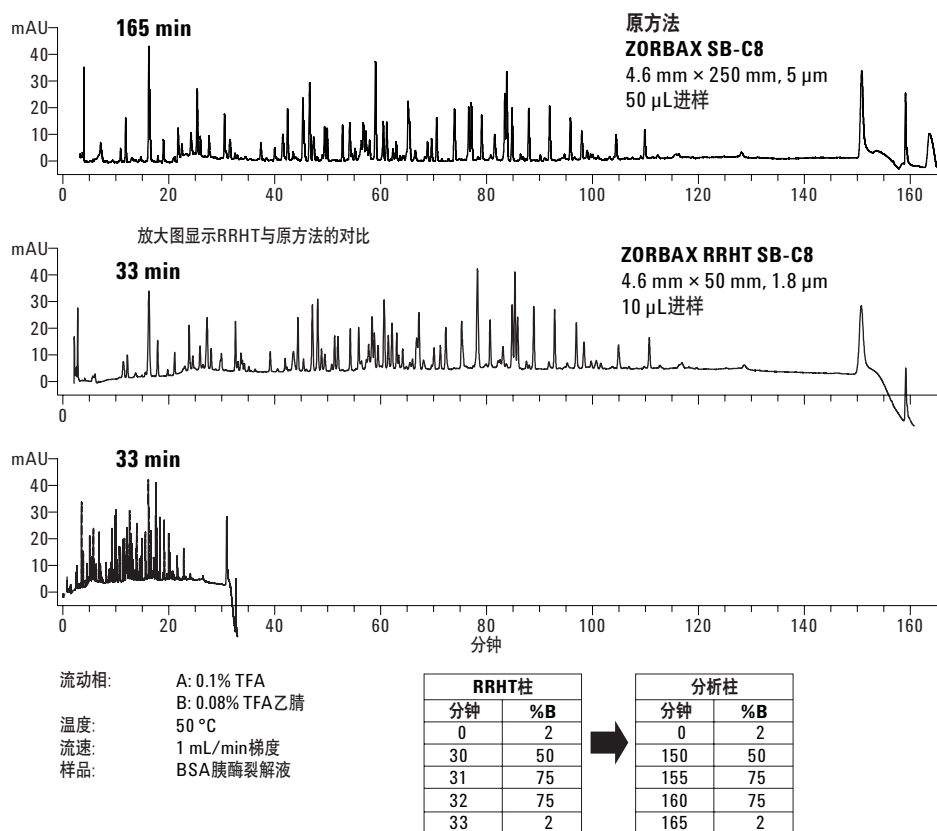


图5. 1.8 μm 到 5 μm 柱的梯度扩展性

梯度的扩展

图 4 和图 5 显示了两个梯度方法放大的实例，把在 RRHT 柱上进行的分析过渡到较长柱子上。放大方法除了简单地换色谱柱之外，还要保持梯度保留因子 (k^*) 或梯度曲线一致。梯度保留因子的定义是：

$$k^* = t_G \times F / \Delta\Phi \times V_c$$

在这里：

t_G = 梯度时间

F = 流速

$\Delta\Phi$ = 梯度洗脱中有机相体积的变化

V_c = 柱体积

为了保持一样的梯度曲线，两根柱子的等式右侧必须相等。图 4 和图 5 中的放大包含了柱子体积的放大（同样内径，但不同长度），要保持 k^* 不变，等式中的其它变量也必须呈比例变化。一个办法是保持比例相等，因为分析柱的体积是 RRHT 柱的 5 倍，所以将梯度时间也乘以 5。其它选择，将流速乘以 5 或 $\Delta\Phi$ 除以 5 都不可行。另外，无论对心血管药物还是多肽的分离，因为 RRHT 和分析型柱的内径都相同， t_G 按柱长的比例放大，将在不同时间坐标轴（x-轴）上得到相似的色谱图。

在 5- μm 柱上优化为 1.8- μm 柱设计的方法

以上所举的色谱柱扩展例子不需要为了优化分离度进行微调。但是，要改善方法有一个参数可以调节，这

就是流速。在最佳流速下操作不仅能改善柱效，还可以提高分离度。流速的优化，更确切地说是流动相线速度的优化，van Deemter 曲线已对小多孔填料的情况进行了描述。

图 6 显示了 1.8-、3.5-和 5- μm 多孔填料的典型 van Deemter 曲线叠加图。每一种粒径的最佳线速度， u ，都是不同的（线速度转换成流速）。在最佳值处 H 最小， H 是理论塔板高度（塔板数， $N = \text{柱长}/H$ ）。 H 值越小，意味着 N 越大，即柱效越高。最佳 u 值与操作条件密切相关，如，流动相组成和温度，所以最佳 u 值必须经过实验测定。但 1.8- μm 填料的理想 u 值，要大于 3.5- μm 填料的理想 u 值，同样也大于 5- μm 填料的。对于一个特定的方法，先在理想 u 左右的流速下操作，然后调节流速得到最大 N 值，是优化一个放大或缩小方法的办法。

将 1.8- μm 方法转化成 5- μm 方法时要考虑的另一个方法参数是检测器数据采集速率。这在化学工作站二极管阵列和多波长检测器设置中称为曳塞积。要得到最佳结果，选择峰宽设置应尽可能接近感兴趣的最窄峰 [2]。由于从 RRHT 柱洗脱出的峰较窄（请注意图 3 中 RRHT 和分析柱峰宽的区别），用分析柱时，不优化数据采集速率将使单位时间内采集到比必需数据点多的数据点，这将导致基线波动或使数据文件过大。

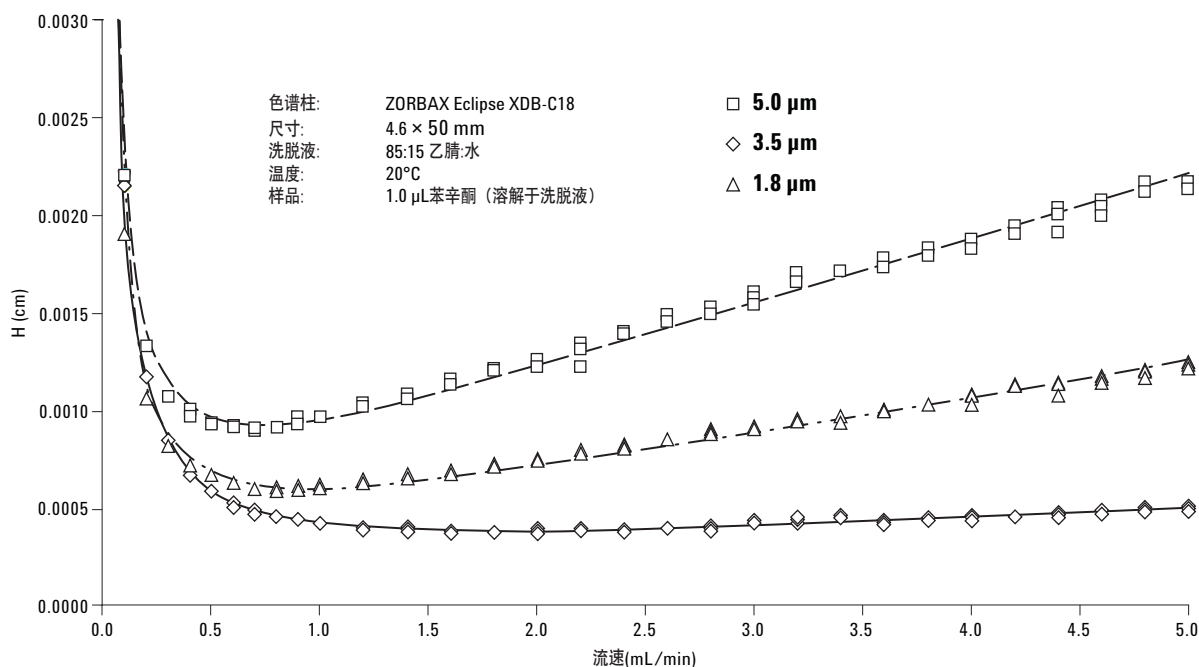


图6. 1.8、3.5和5 μm 粒径填料的 van Deemter 曲线

结论

高通量方法及其相关技术已逐渐被 HPLC 实验室所接受。常规分析柱也仍被普遍承认。当使用 ZORBAX 柱时，在这两种技术之间进行方法转换非常简单，特别是从 RRHT 过渡到分析柱。本文涉及到了各种键合相、5 种 HPLC 应用、等度分析和梯度分析，这些方法在 RRHT 短柱和较长的常规分析柱上都成功地进行了应用。唯一的改变是更换了柱子。因为 ZORBAX 柱的保留行为和选择性非常相似，与粒径无关，才有可能做到这一点。RRHT 应用现有技术就能进行，不需要升级仪器。针对特定的柱配置，方法中的两个参数，流速和数据采集速率，应当进行细微调节以改进色谱性能和分析方法。

参考文献

1. J. W. Henderson, Jr. and W. J. Long, "Exploiting RRHT Columns with Different C18 Selectivities to Quickly Develop Methods for Endocannabinoids," Agilent Technologies publication 5989-6128EN, Jan 2007.
2. J. W. Henderson, Jr. and W. J. Long, "Optimize Data Sampling Rate to Take Advantage of RRHT Columns," Agilent Technologies publication 5989-5810EN, Nov 2006.

更多信息

如需进一步了解有关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告。

© 安捷伦科技公司，2007

2007 年 8 月，中国印刷
5989-6169CHCN



Agilent Technologies