



使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统 筛查精细化学品中的杂质

应用报告

精细化工

作者

迈克尔·伍德曼
安捷伦科技公司
桑特维利路 2850 号
威尔明顿，特拉华州 19808
美国

摘要

使用配有紫外/可见光 (UV/VIS) 二极管阵列检测器 (DAD) 的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统对辛基二甲基对氨基苯甲酸中的杂质进行分析。该系统用在 1.8 μm 填充粒度、内径为 3.0 mm 和 2.1 mm，长度不一的 C18 色谱柱上，压力为 600 bar (9000 psi) 或 1200 bar (18,000 psi) 时，进行化合物与杂质的色谱分离。报告表明，在低粘度乙腈 (ACN) 与高粘度甲醇 (MEOH) 溶剂条件下，Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统能够应用高分离度长色谱柱进行快速分析。



Agilent Technologies

前言

为了确保产品质量、性能以及消费者安全，分析原料、中间体以及最终用途广泛的成品中的杂质分析至关重要。使用高效液相色谱（HPLC）成功进行杂质分析的基本条件包括整个分离过程中的梯度洗脱和多波长监测，并可从其他检测器中获益，如蒸发光散射仪（ELSD）和质谱仪（MS）。由于杂质测定是首要目标，我们需要确保流动相、样品瓶及 HPLC 组件中无杂质，杂质的存在可能造成分析结果混乱。稀释空白和可能由于额外样品制备，如过滤而存在污染源的空白应小心制备。分析顺序可能包括生产原料、溶剂或稀释空白的运行。通过稀释主要成分到杂质检测必需的最低水平而制定的限值标准也包括在内。最后，多数情况下，还必须包括权威的高纯度参考标准。

对氨基苯甲酸（PABA）历来用于防晒剂配方中的抗紫外线成分。由于 PABA 的使用可增加致皮肤癌的风险，目前常用以辛基二甲基对氨基苯甲酸（OD-PABA）形式的衍生物。不过，OD-PABA 的降解可能形成 PABA，因此监测 PABA 在 OD-PABA 中的潜在存在非常重要。作为商业产品，考虑到安全性和经济性，OD-PABA 的纯度对于制造商来说十分重要。在本项工作中，我们研究 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统（1200 bar 压力限值的 UHPLC 系统）紫外/可见二极管阵列检测器用于检测 OD-PABA 样品杂质的能力。

本项工作分析的 OD-PABA 化合物的结构如图 1 所示。

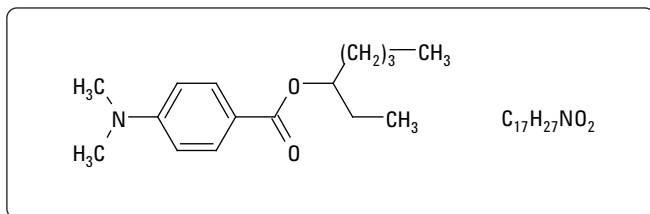


图1. 辛基二甲基氨基苯甲酸（OD-PABA）

实验

样品制备

OD-PABA 的异丙醇溶液的初始浓度为 1mg/mL，随后根据需要稀释到较低浓度。LC/DAD 系统的进样量为 0.2-2 μ L。

LC 方法详细内容

液相色谱条件

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统二元泵 G4220A,

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统自动进样器 G4226A

配切换阀的安捷伦柱温箱 G1316C

配有 10 mm 通径光纤流通池的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统二极管阵列紫外/可见检测器 G4212A

色谱柱: (具体使用见各自的色谱图)

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT, 3 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m
600 bar 部件号 827975-302

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m
1200 bar, 部件号 858700-902

Agilent ZORBAX SB-C18 RRHD, 2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.8 μ m
1200 bar, 部件号 859700-902

柱温: 40 $^{\circ}$ C

流动相: A = HPLC 级水

B = 乙腈 (ACN) 或甲醇 (MEOH) (具体流动相见各自的色谱图)

流速: 具体流速见各自的色谱图

梯度: 梯度条件为 40 %至 90%的乙腈或 50%至 100%的甲醇。梯度斜率一直维持在每柱容增加 3.5%的有机相，相应地改变梯度时间和流速。这是使用安捷伦方法转化器计算而确定的[1]。

UV 条件

监测 210, 254, 280 和 320 nm, 带宽 4 nm, 参考波长关闭

结果和讨论

OD-PABA 的 UV 响应，监测到 4 个波长，如图 2 所示，保留时间为 2 min。分离过程的多波长监测提供了一种简单的方法来捕获多种杂质，并协助最终波长条件的选择以达到所有分析物检测灵敏度最大化。

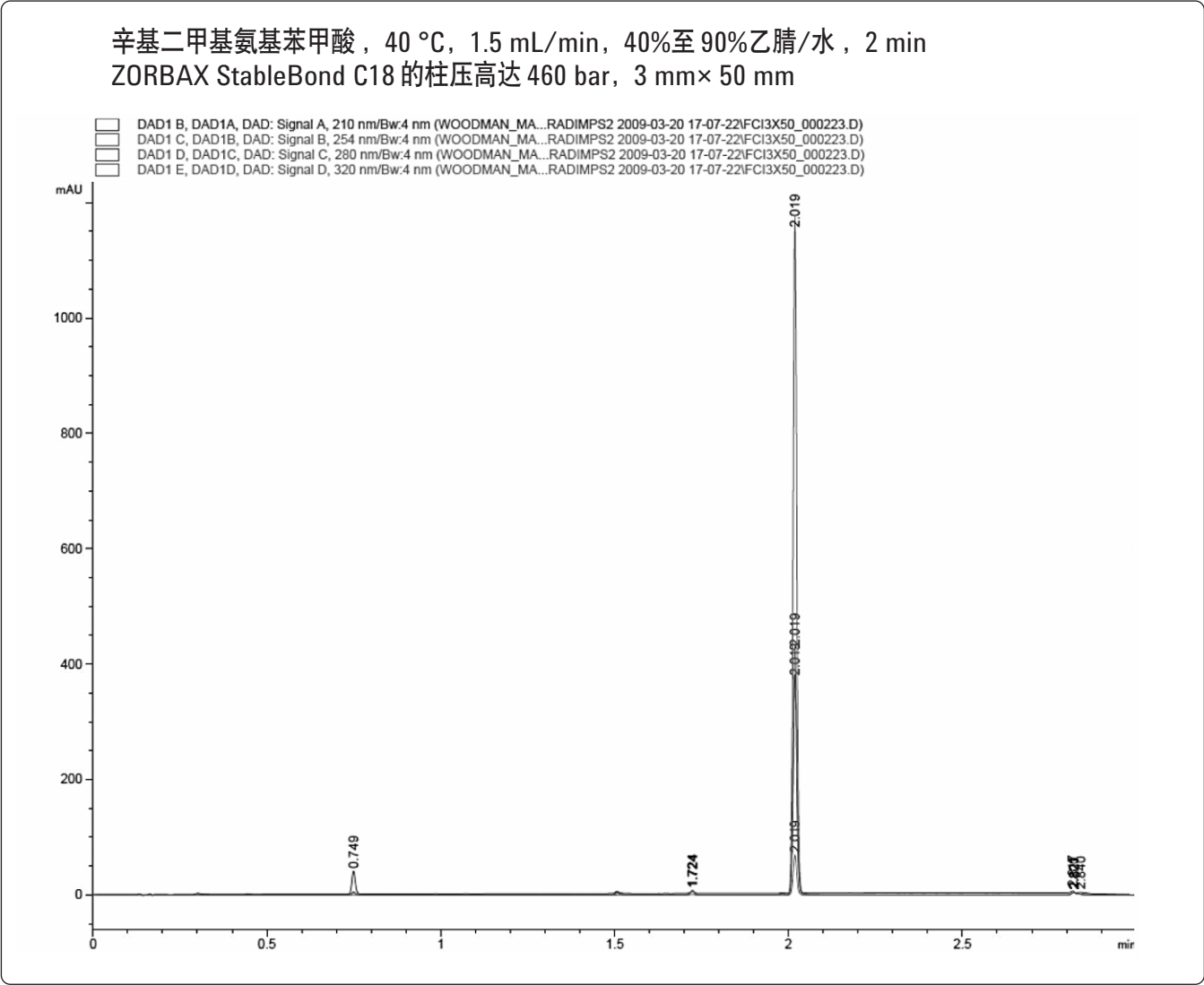


图2. OD-PABA 生产原料的多波长 UV 色谱图，3 mm× 50 mm ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) 色谱柱。色谱图表明了此类分离所遇到的典型困难，需要宽范围动态检测和灵敏的杂质测量。通过保留时间匹配和紫外光谱确定，0.75 分钟处的峰是 PABA，它是混合物中的主要杂质

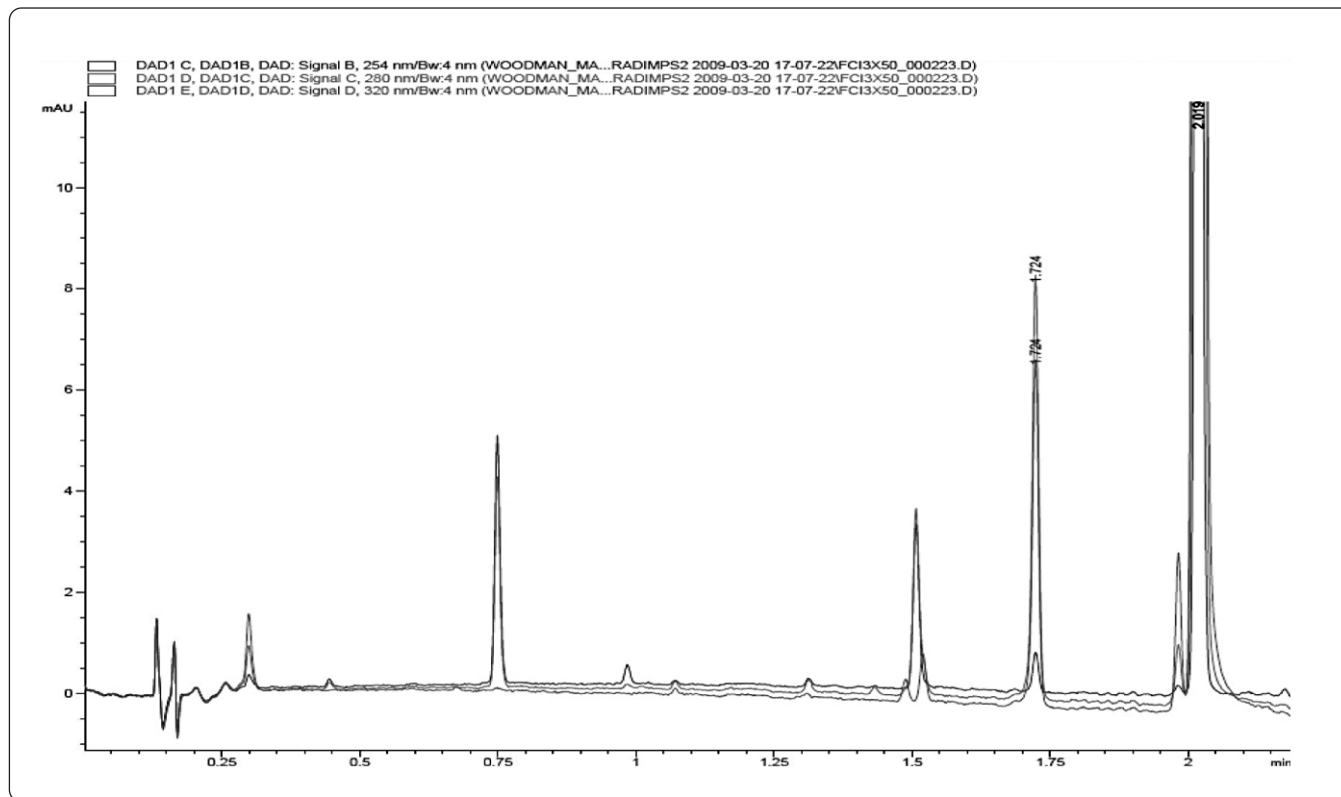


图3. 如图2所示的基于3 mm×50 mm的梯度分离色谱图的扩展展示

图3中的扩展的多波长色谱图显示了具体细节和杂质数量，也有几处对个别组分的分离度显然不够。尽管采用了小颗粒填充物，但由于色谱柱相对较短，从而限制了总分离度。当我们换位长色谱柱长度时，常会减少其直径，以减少同一时间内溶剂的消耗。

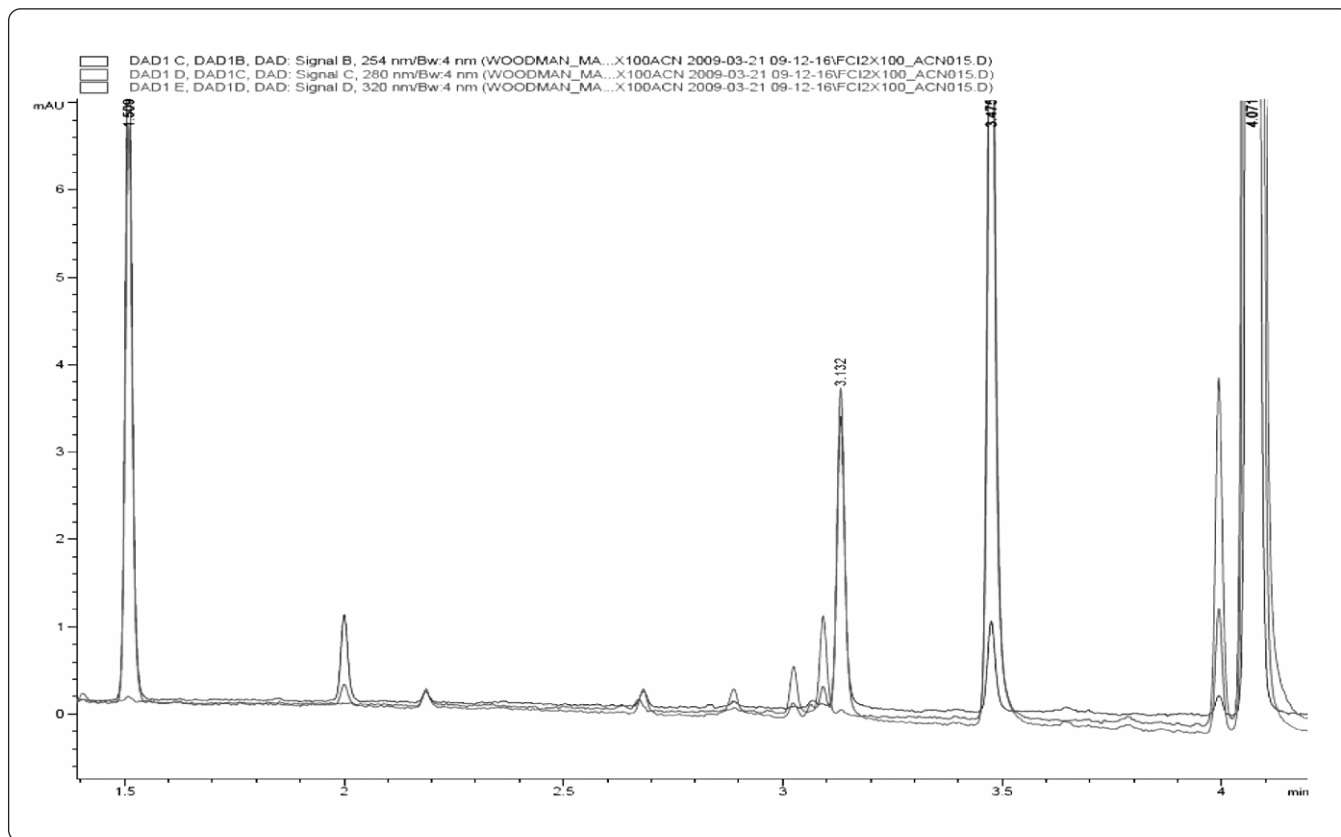


图4. 标准物质的分析，2.1 mm×100 mm Agilent ZORBAX StableBond C18 色谱柱，在1200 bar 压力限值下操作。乙腈-水梯度，0.74 mL/min，梯度时间4.0 分钟

从图4可见，增加柱长可以显著地提高一些已观测到的组分的分离效果。为了进一步提高分离度，需要开发更长的色谱柱、可替代的流动相或色谱柱填充化学物质。

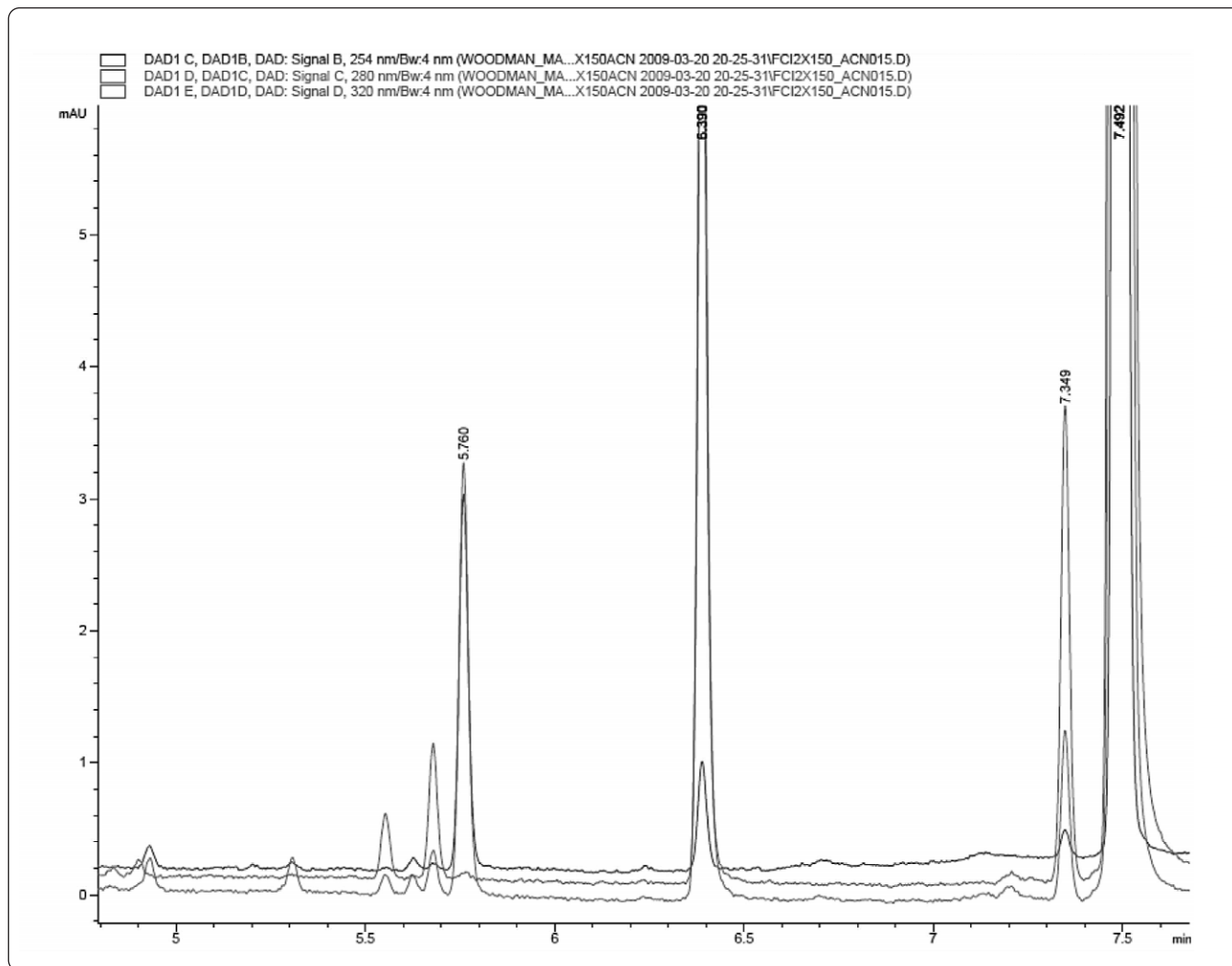


图5. 乙腈分离的扩展视图，使用相同梯度斜率在2.1 mm×150 mm 色谱柱，1200 bar 额定操作压力。Agilent ZORBAX StableBond C18, 1.8 μ m

增加柱长度显然可以增强分离度，但若在保守的压力范围内操作，增加的背压也会限制流速。配以 ZORBAX 快速分离高通量 (RRHD) 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的工作压力可达 1200 bar (约 18,000 psi)。为了确保系统的持久稳固运行，许多用户通常会指定一个压力上限，其值略小于额定操作压力的 80%。

辛基二甲基对氨基苯甲酸，0.52 mL/min，50%至 100%甲醇/水，5.7 min
柱压高达 845 bar 的 Agilent ZORBAX StableBond C18 色谱柱，2.1 mm×100 mm，1.8 μm

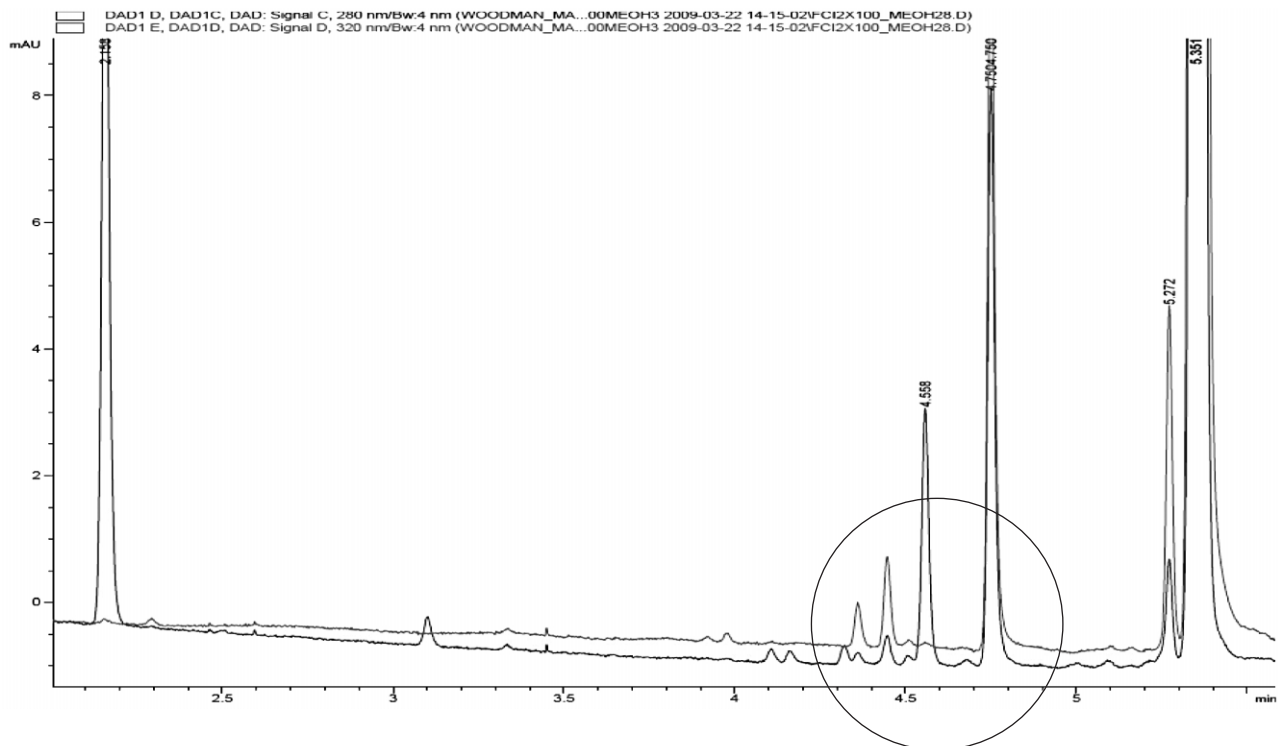


图 6. 样品混合物的分离，2.1 mm×100 mm Agilent ZORBAX StableBond C18 色谱柱，甲醇为有机相。流速 0.52 mL/min，梯度时间 5.7 min，梯度为 5%至 100% 甲醇

当考虑分离度计算公式的基本参数时，我们都十分熟悉容量、选择性以及效率的概念。增加柱长，和减少充填材料的粒度一样，也会提高整体分离效率。由于效率增加会使分离度相对降低，用户需通过摸索能促进分离选择性提高的可替代化学变量，以优化容量因子。

在图 6 中可见以甲醇替代乙腈为有机相所产生的显著效果。若此类分离高度依赖于低波长监测，人们可能会对甲醇的紫外截止（205 nm）产生疑问。然而，在本例中，本体高度共轭结构和相关杂质的结构使得检测器能在波长远高于反相色谱中普通有机溶剂的紫外截止波长处进行灵敏的检测。在与图 5 中示例相同的分析时间内，我们得到了更高的选择性，从而分离更多杂质，同时减少溶剂消耗，且无需使用昂贵的乙腈作有机相。

辛基二甲基氨基苯甲酸，0.52 mL/min，50%至 100%甲醇/水，5.7 分钟

柱压高达 845 bar，Agilent ZORBAX StableBond C18 色谱柱，2.1 mm×100 mm，1.8 μ m，40 $^{\circ}$ C

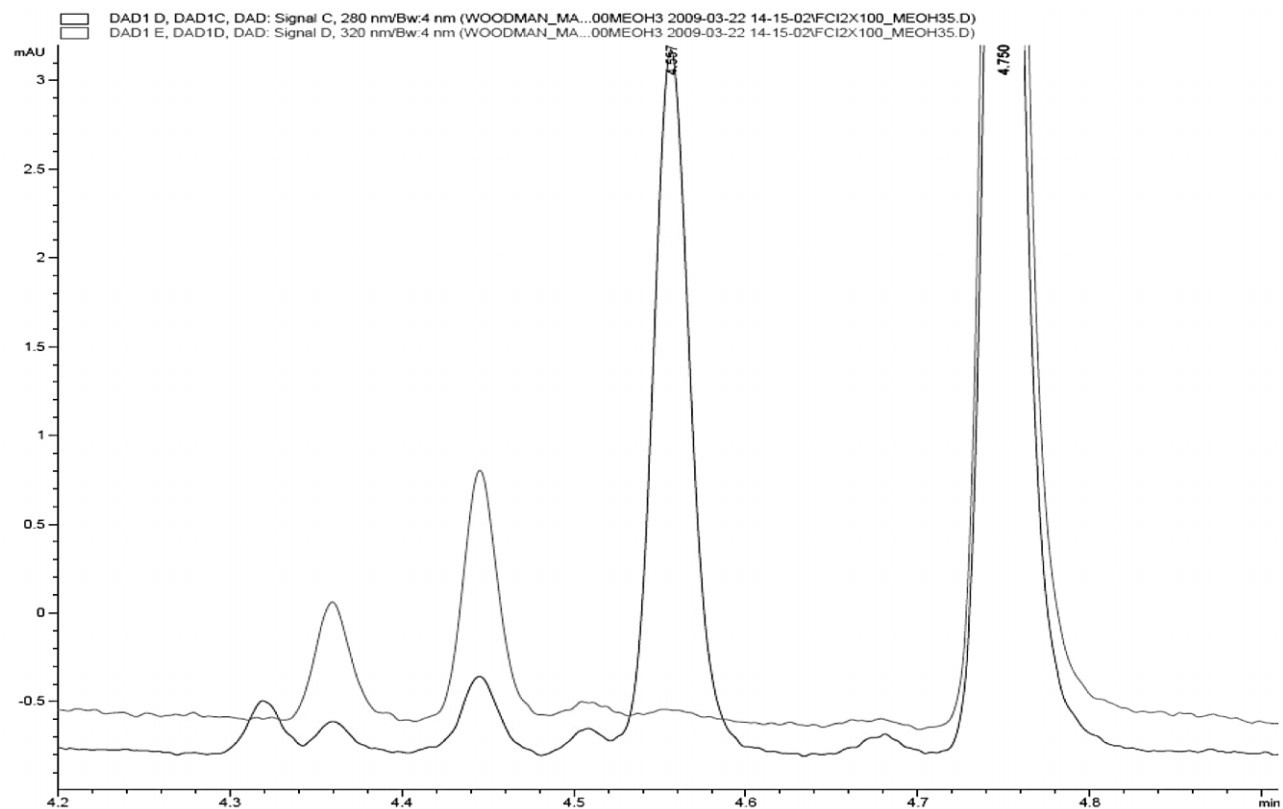


图7. 图6色谱中小区域的扩展视图，显示了多种低浓度杂质。条件如图6。最小峰的杂质浓度预计小于0.02%

结论

合成材料和高度提炼的天然产品中低浓度杂质的检测，对这些产品的最终利用至关重要。高效液相色谱快速分析利用高分离度色谱柱和适当的有机相，保证了结果的一致性和分析的高速度。利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，我们能很容易地证明 UHPLC 在系统工作范围内性能优异。通过增加流速，同时降低部分梯度时间段，较短的总分析时间内，重新生成梯度斜率，可以获得更高的分析通量。

欲了解更多信息

欲了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

参考文献

1. <http://www.chem.agilent.com/en-US/products/instruments/lc/pages/gp60931.aspx>

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担任何责任。

本出版物中的信息，描述和规格如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司版权所有，2009 年
中国印刷
2009 年 7 月 24 日
5990-4293CHCN



Agilent Technologies