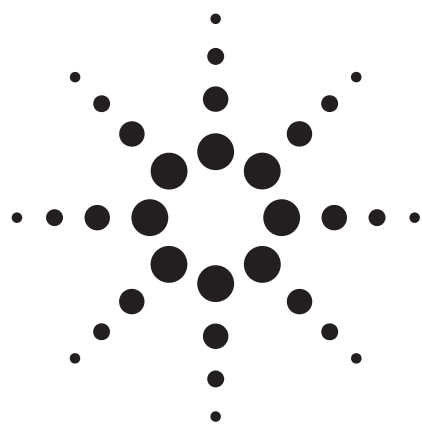




利用 Agilent ZORBAX 快速分离高通量色谱柱结合由 AutoChrom 12.01 版控制的 Agilent 1200 系列方法开发解决方案，快速开发水杨酸工艺杂质分离方法

应用简报

制药行业

作者

William J. Long
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Margaret Antler, Andrey Vazhentsev
Advanced Chemistry Development, Inc.
110 Yonge Street, 14th Floor
Toronto, Ontario M5C 1T4
Canada

摘要

采用由 12.01 版 ACD/AutoChrom 软件控制的 Agilent 1200 系列方法开发解决方案开发的分析方法，分离含水杨酸及其已报道工艺杂质的样品。在 AutoChrom 的控制下，将色谱柱置于 4 个温控区域中时，色谱仪能够筛选最多 7 种色谱柱、13 种缓冲液和 2 种有机溶剂。该软件可帮助安排最佳的后续实验，使分析人员能够获取成功几率最高的实验条件，专注于快速开发方法。本研究采用五种流动相改性剂对三种色谱柱（Agilent ZORBAX StableBond SB-C18、ZORBAX Eclipse Plus C18 和 StableBond SB-Aq）进行了筛选。在整个实验过程中，温度保持在 25 °C。首先对 15 种溶剂柱实验进行了筛选。随后开展了若干次实验来建立保留模型。最终获得了在 3 分钟内完成等度分离的解决方案。



Agilent Technologies

前言

快速分离高通量色谱柱 (RRHT) 旨在用 50 mm, 1.8 μm 色谱柱产生 150 mm, 5 μm 色谱柱的分离效果。可以在更高流速下获得同等分离度, 分离速度提高 3 至 5 倍 [1,2,3,4]。

分析方法开发是一项具有挑战性的耗时工作。它需要制定实验计划、配制多种流动相、将大量方法输入到色谱软件中并进行数据分析。流动相组成的细微变化会影响洗脱顺序, 因此整个方法开发过程中的峰追踪也是一项重要的任务 [5,6,7]。

选择性是分析方法开发的一项重要参数。使用较短的 1.8 μm 色谱柱快速筛查不同的选择性改性剂是一种值得关注的方法, 因为该方法能够节省时间和溶剂。在这些 RRHT 色谱柱上开发的分离方法可轻松转移至可在 400-1200 bar 范围内运行的其他仪器。一般来讲, 使用 4.6×50 mm RRHT 色谱柱时, 完成多次分析所需的时间仅为 4.6×150 mm, 5 μm 色谱柱的十分之一至三分之一。由此, 可在较短的时间内探索更多的方法开发选项。

水杨酸也称为 2-羟基苯甲酸, 是几种 β -羟基酸中的一种。它是多种护肤品中的重要添加剂, 也存在于中药采用的多种植物中 [8,9]。由苯酚钠和二氧化碳在高压和高温下通过科尔贝-施密特 (Kolbe-Schmitt) 反应批量制得水杨酸钠。将水杨酸钠酸化, 即得到所需的水杨酸 [10]。本研究将采用 RRHT 色谱柱、Autochrom 和 Agilent 1200 SL 方法开发解决方案快速评估方法开发选择。

实验部分

本研究采用基于 Agilent 1200 系列快速分离液相色谱组件的 Agilent 1200 系列方法开发解决方案。该系统包括: 能够提供最高 600 bar 压力的 G1312B 二元泵 SL; 两个 G1316C 柱温箱 (TCC); G1376D 高性能自动进样器 SL+; 配备 6 mm 光程微量流通池的 G1315C SL 二极管阵列检测器。两个 TCC 均配备 8 位/9 通选择阀。阀为新型快速更换阀, 安装在抽出式轨道上, 使连接和维护更方便。阀 1 作为色谱柱的入口, 而阀 2 作为出口。阀 1 的中心端口连接至自动进样器, 阀 2 的中心端口则连接至检测

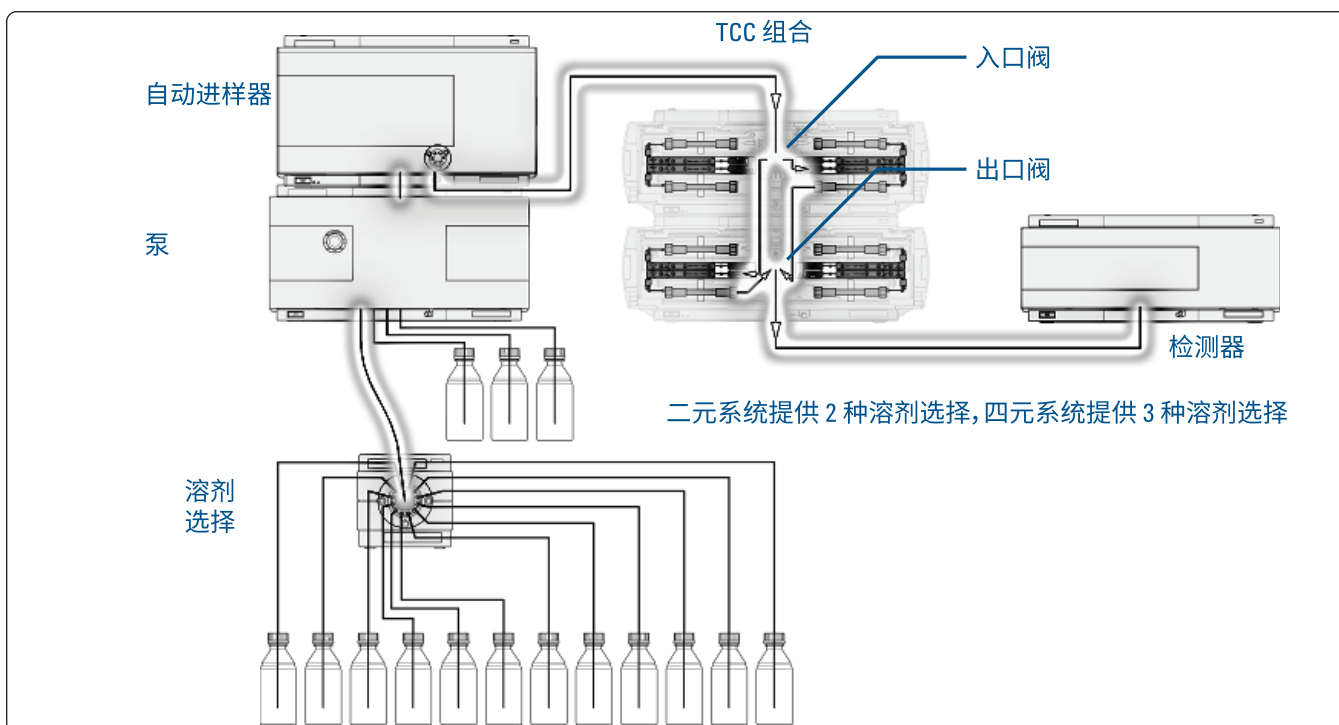


图 1. 仪器配置图

器的流通池。两个阀的端口 1 均连接至 StableBond C18 色谱柱，两个阀的端口 2 均连接至 Eclipse Plus C18。端口 7 连接至 StableBond Aq，端口 8 连接至旁路连接毛细管。使用七个独立低扩散热交换器中的一个对进入各色谱柱的溶剂进行加热。G1160 12 溶剂选择阀连接至 G1312B 的阀位 A1。与 SL 二元泵的内部溶剂选择阀相结合，使用该系统可以筛选最多 15 种溶剂，但本研究中仅限 6 种溶剂。使用下列流动相改性剂和缓冲液：0.1% 三氟乙酸 (TFA)、0.1% 甲酸 (FA)、0.1% 乙酸、用乙酸滴定至 pH 4.8 的 10 mM 乙酸铵，以及用乙酸滴定至 pH 6.5 的 10 mM 乙酸铵。采用水作为最终的弱溶剂清洗色谱柱上的改性剂，并妥善保存色谱柱。除乙酸购自 EM Science 以外，所有改性剂均购自 Sigma Aldrich。在整个研究中使用乙腈作为强溶剂。温度控制在 25 °C，流速设置为 1.49 mL/min。采用 Agilent Chemstation B0 4.01 SP1 与 Advanced Chemistry Development, Inc. (Toronto, Canada) 的 AutoChrom 12.01 版结合来控制液相色谱仪。

本研究使用三根安捷伦色谱柱：

- ZORBAX RRHT StableBond SB-C18, 4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm, 部件号 822975-902
- ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm, 部件号 959941-902
- ZORBAX RRHT StableBond SB-Aq, 4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm, 部件号 827900-914

本研究中检测了下列化合物：水杨酸 (SA)，三种杂质：4-羟基苯甲酸 (4HBA)、4-羟基间苯二甲酸 (4HIPA)、苯酚 (PHE) 以及两种代谢物：龙胆酸 (GA)、水杨酰甘氨酸 (SG)，均购自 Sigma Aldrich 或 ARCOS。结构和 pKa 值如图 2 所示。TFA、甲酸、乙酸和乙酸铵同样购自 Sigma Aldrich。乙腈购自 Honeywell。实验采用 Milli-Q 18 M-Ohm 水。

方法开发策略概述于图 3 的 Autochrom 屏幕截图中。计划在每种色谱柱的最大操作范围内筛选色谱柱和缓冲液，以选择色谱柱与缓冲液的最佳组合。然后对每种色谱柱

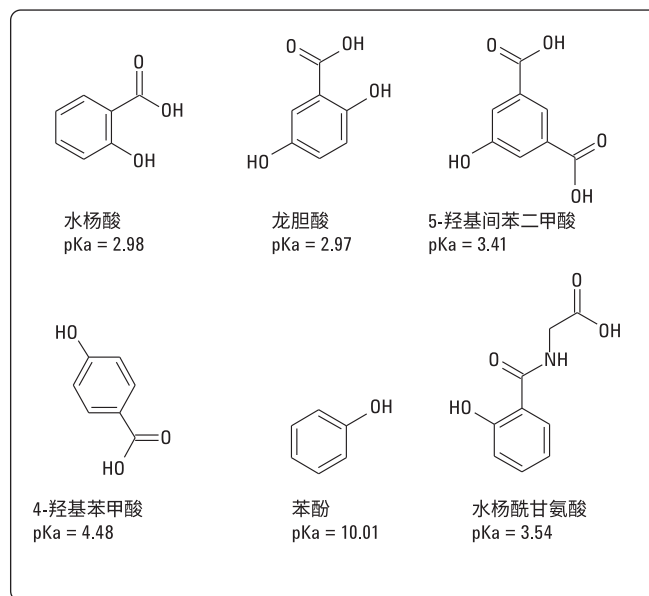


图 2. 混合物组分的结构和 pKa 值

选择不同的梯度；对 StableBond SB-C18 采用 5%-100% 有机相，对 Eclipse Plus C18 采用 8%-100% 有机相，对 StableBond Aq 采用 0%-100% 有机相。虽然两种 C18 色谱柱的梯度可以从较低的有机组分含量开始，但在 0% 有机相的条件下使用这些色谱柱可能导致固定相塌陷 [11]。AutoChrom 可控制每种色谱柱的用户自定义范围，以便在每种色谱柱的有效范围内创建筛选梯度。

分配给每次筛选运行的时间由用户控制，但计算的是梯度范围内包括 20 倍色谱柱体积的默认分析时间。该计算基于色谱柱尺寸、色谱柱死体积和所需的流速。除分析运行以外，色谱柱需要平衡和储存。对吹扫运行进行编程，将溶剂引导通过旁路毛细管，以免不相容的溶剂损坏毛细管。简而言之，可针对各种色谱柱溶剂筛选对创建、输入和执行五种方法。

对 AutoChrom 的 ChemStation 采集方法进行编辑，使混合物获得良好的色谱响应。在本例中，发现所有化合物均在 230 nm 检测波长下获得了良好的响应。采集 220 nm 至 400 nm 之间的紫外谱图。

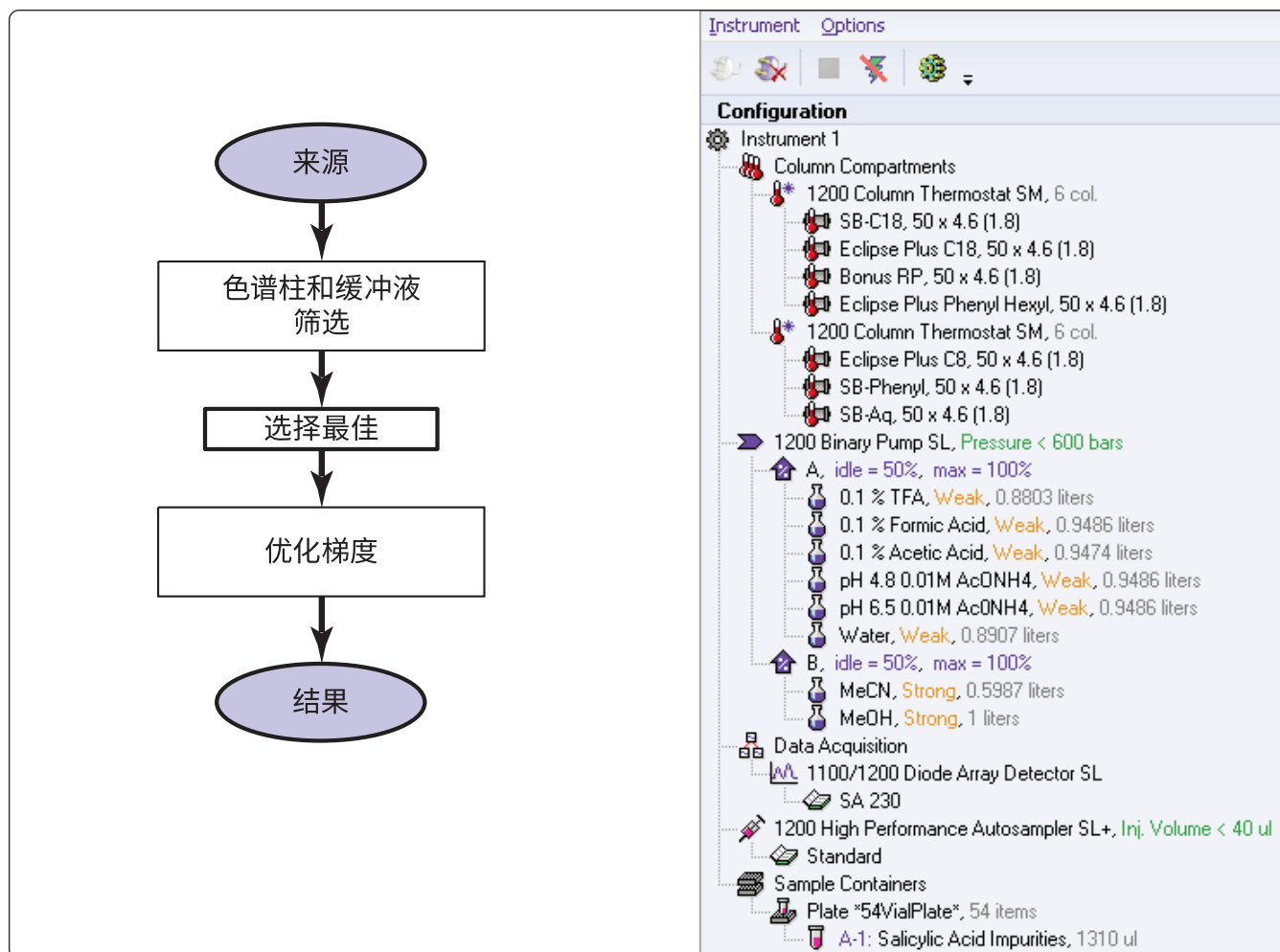


图 3. AutoChrom 策略屏幕截图

讨论

色谱峰追踪是分析方法开发中一个耗时的步骤。对于简单的混合物，通常通过在每种色谱条件下进样每种组分的单独标样来实现色谱峰追踪。而随着化合物数量和条件的增多，这种方法不再实用。还可以采用紫外谱图手动追踪组分。在分析方法开发过程中，许多分析人员需要花费大量时间精力来创建包含保留时间和紫外峰信息的详细电子表格。

ACD/AutoChrom 将 Agilent 1100 和 1200 系列液相色谱仪与液质联用系统的仪器控制与用于逻辑方法开发的软件相结合。在分析人员确定方法开发目标后，AutoChrom 生成 Agilent Chemstation 软件的方法文件，进行实验，引导分析人员完成数据处理，并帮助分析人员选择下一

步实验。AutoChrom 将运行色谱柱、缓冲液、温度和溶剂筛选实验，查找和追踪样品中的所有峰，并选择最佳结果。峰追踪是基于紫外谱图或质谱图的相似性。（本研究仅展示了紫外匹配。）紫外峰追踪应用程序 UV-MAP 可提取所检出各种组分的纯谱图。然后比较每次进样所得到的谱图。首先分配“最佳”匹配的峰。随后分配匹配度较差的峰。

AutoChrom 可引导分析人员完成方法优化。当用户接受 AutoChrom 的下一步实验建议时，软件将自动执行下一步实验。软件提供实验概述，并支持在必要时访问原始数据。实验汇总于峰值表中。

虽然与 AutoChrom 一起使用时，Agilent 1200 系列方法开发解决方案能够筛选最多七种色谱柱，但本研究中仅采

用了三种。由于针对这些化合物分析的 USP 方法规定使用 C18 色谱柱，因此对 StableBond SB-C18 和 Eclipse Plus C18 进行了评估 [11]。以前的研究对 SB-Aq 进行了评估，因此将该色谱柱纳入本研究的筛选过程 [10]。另外，将该色谱柱置于色谱柱选择阀的位置 7，以证明该系统能够挑选和选择待评估的条件。

AutoChrom 将实验划分为“波”。每一波都是计划的实验组。在本研究中，执行两波实验；首先进行色谱柱和缓冲液筛选，然后进行梯度优化。在每一波次结束时，软件建议要执行的下一步实验，但操作人员必须接受有

关如何（或是否）继续方法开发的建议。如果色谱工作者不接受软件建议的实验，则他们必须输入自己接下来要执行的实验。这使操作人员能够控制方法开发过程。

在第一波实验中，采用 G1160 阀上五种溶剂中的每一种对所有三种色谱柱进行筛选，然后用水清洗，并储存于 50:50 乙腈和水的混合物中。这一初筛的结果汇总于表 1 中。该表列出了实验、色谱柱及对所实现分离的“评级”。此外，通过紫外谱图相似性来追踪组分。图 4 示出由这些初筛得到的 15 幅相应色谱图。从表 1 和图 4 中可以看出，采用 StableBond SB-C18 和 Eclipse Plus C18 在

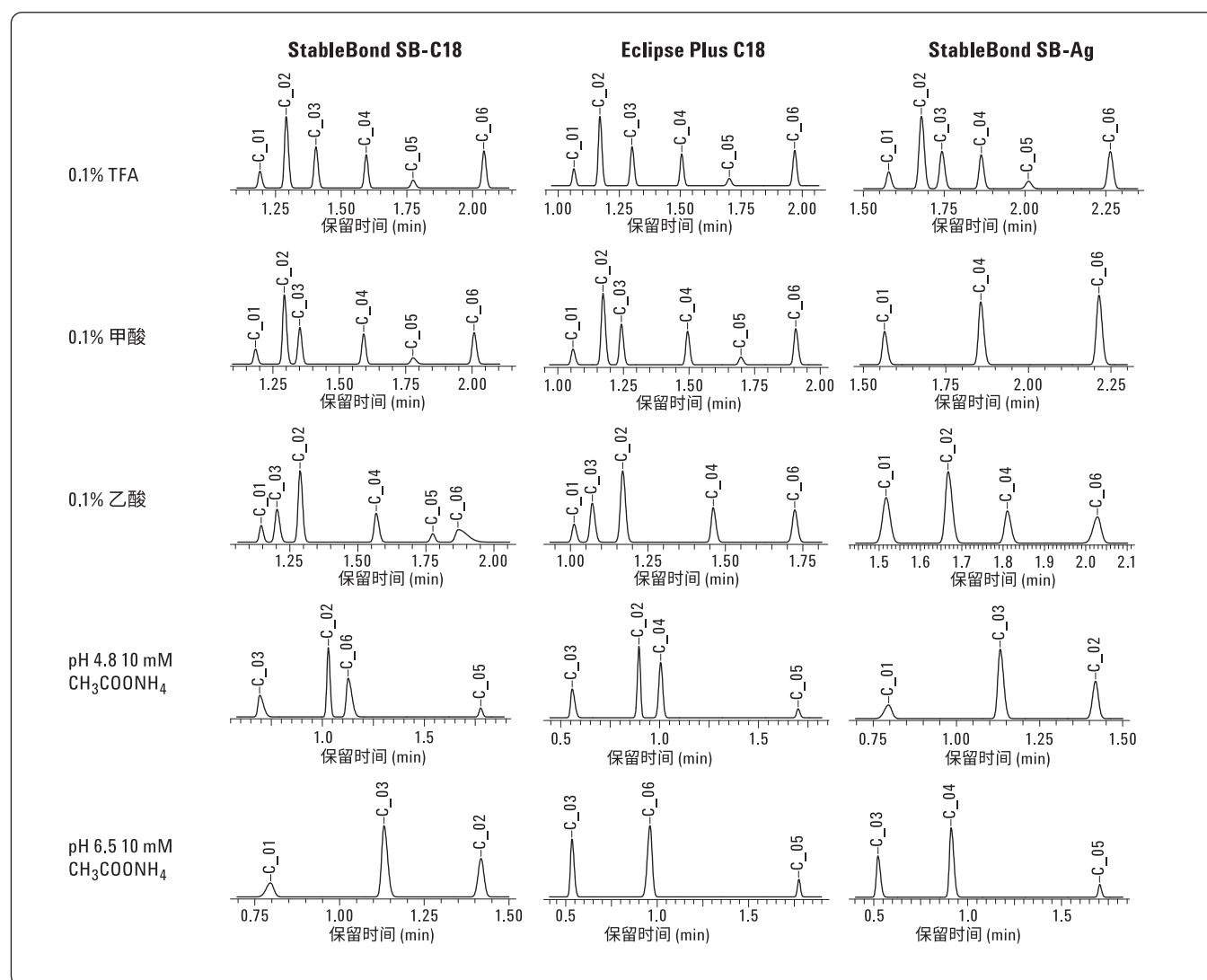


图 4. 由第 1 波实验得到的 15 幅色谱图

表 1. 第 1 波溶剂和色谱柱筛选结果

色谱柱和缓冲液	分离度得分	最低分离度	找到的峰/总峰	保留时间					
				峰_01	峰_02	峰_03	峰_04	峰_05	峰_06
SB-C18 和 0.1% TFA	1	3.629	6/6	1.19	1.29	1.404	1.595	1.774	2.044
Eclipse Plus C18 和 0.1% TFA	1	3.982	6/6	1.064	1.171	1.302	1.506	1.701	1.969
SB-Aq 和 0.1% TFA	1	2.067	6/6	1.577	1.679	1.742	1.864	2.011	2.264
SB-C18 和 0.1% 甲酸	1	1.947	6/6	1.184	1.292	1.35	1.59	1.775	2.005
Eclipse Plus C18 和 0.1% 甲酸	1	2.297	6/6	1.056	1.171	1.241	1.494	1.698	1.908
SB-Aq 和 0.1% 甲酸	0.4	—	3/6	1.564			1.855		2.214
SB-C18 和 0.1% 乙酸	1	1.961	6/6	1.144	1.287	1.202	1.567	1.776	1.869
Eclipse Plus C18 和 0.1% 乙酸	0.8	—	5/6	1.011	1.168	1.069	1.459		1.723
SB-Aq 和 0.1% 乙酸	0.6	—	4/6	1.517	1.667		1.81		2.029
SB-C18 和 pH 4.8	0.6	—	4/6		1.029	0.693		1.776	1.126
Eclipse Plus C18 和 pH 4.8	0.6	—	4/6		0.894	0.554	1.004	1.702	
SB-Aq 和 pH 4.8	0.4	—	4/6	0.796	1.418	1.131			
SB-C18 和 pH 6.5	0.4	—	4/6			0.533		1.778	0.961
Eclipse Plus C18 和 pH 6.5	0.4	—	4/6			0.522	0.912	1.704	
SB-Aq 和 pH 6.5	0.4	—	4/6			1.034	1.31	2.015	

0.1% TFA 中获得了最佳分离效果。AutoChrom 建议 Eclipse Plus C18 色谱柱与 0.1% TFA 缓冲液的组合略优于 SB-C18 色谱柱，应将其用于后续的方法开发。最佳实验的选择是基于检出组分的数量以及分离度得分，该分离度得分是色谱图上所有色谱峰之间归一化分离度的平均值。然而，在从筛选组中选择最佳方法时可能还需要注意其他问题。

图 2 列出了每种分析物的 pKa。从图中可以看出，pKa 大多介于 2.97 和 5 之间。苯酚也可被归类为弱酸。酸性化合物在可使化合物完全质子化的流动相中具有最佳保留特性。0.1% TFA (pH 2) 和 0.1% 甲酸 (pH 2.7) 流动相完全满足这一标准。在两种 StableBond 色谱柱 (SB-C18 和 SB-Aq) 上采用乙酸流动相 (0.1% pH 3.8) 时，表现出峰顺序改变和峰展宽。这可能是由于未封端的 StableBond 色谱柱中存在暴露的硅醇基团。pKa 小于等于 3 的两种分析物可与这些基团发生相互作用。对分析人员体现出的优势在于，可通过谨慎选择流动相条件来控制这些硅醇基团的电荷，从而使用这些硅醇基团。然而，本例的研究中采用的 pH 条件无法使二氧化硅上的硅醇基团带电荷。实验结果表明，StableBond 在含 TFA 的流动相中具有非常出色的长期稳定性 [12]。

软件建议的是最佳实验，分析人员必须接受该决策或选择其他决策。在分析人员基于色谱评级或其他理由选择分离条件后，软件将继续执行第二波实验，对方法进行优化。在本例中，尽管软件建议使用 Eclipse Plus C18 色谱柱，但我们仍选择了 StableBond SB-C18 执行后续的实验。通过在决策过程中结合分析人员的意见，可以在方法开发过程中考虑色谱柱稳定性等其他因素。

下一步是梯度优化。利用 AutoChrom 对筛选运行所得的色谱图进行处理，该软件提出了两组新的梯度条件。选择这些条件生成具有不同斜率的梯度，以便创建色谱保留模型。利用初始起始条件以及最早和最晚洗脱的组分来创建这些梯度。

采集这两个实验的结果，并与最佳优先实验汇总到一起。
表 2 列出了所采集的保留数据并汇总了实验。图 5 示出
由此次第二波次实验得到的三幅色谱图。本例中未创建
模型，但系统提出了新的条件。将实验数据与预测的保
留时间相结合，并在图 6 中给出了预测色谱图。

表 2. 梯度优化结果

梯度程序	保留时间					
	峰_01	峰_02	峰_03	峰_04	峰_05	峰_06
5% 至 100% (4 min)	1.19	1.29	1.404	1.595	1.774	2.044
17.5% 至 40.1% (4 min)	0.592	0.775	0.94	1.299	1.632	2.405
5% 至 40.7% (3 min)	1.479	1.592	1.772	2.15	2.315	2.91

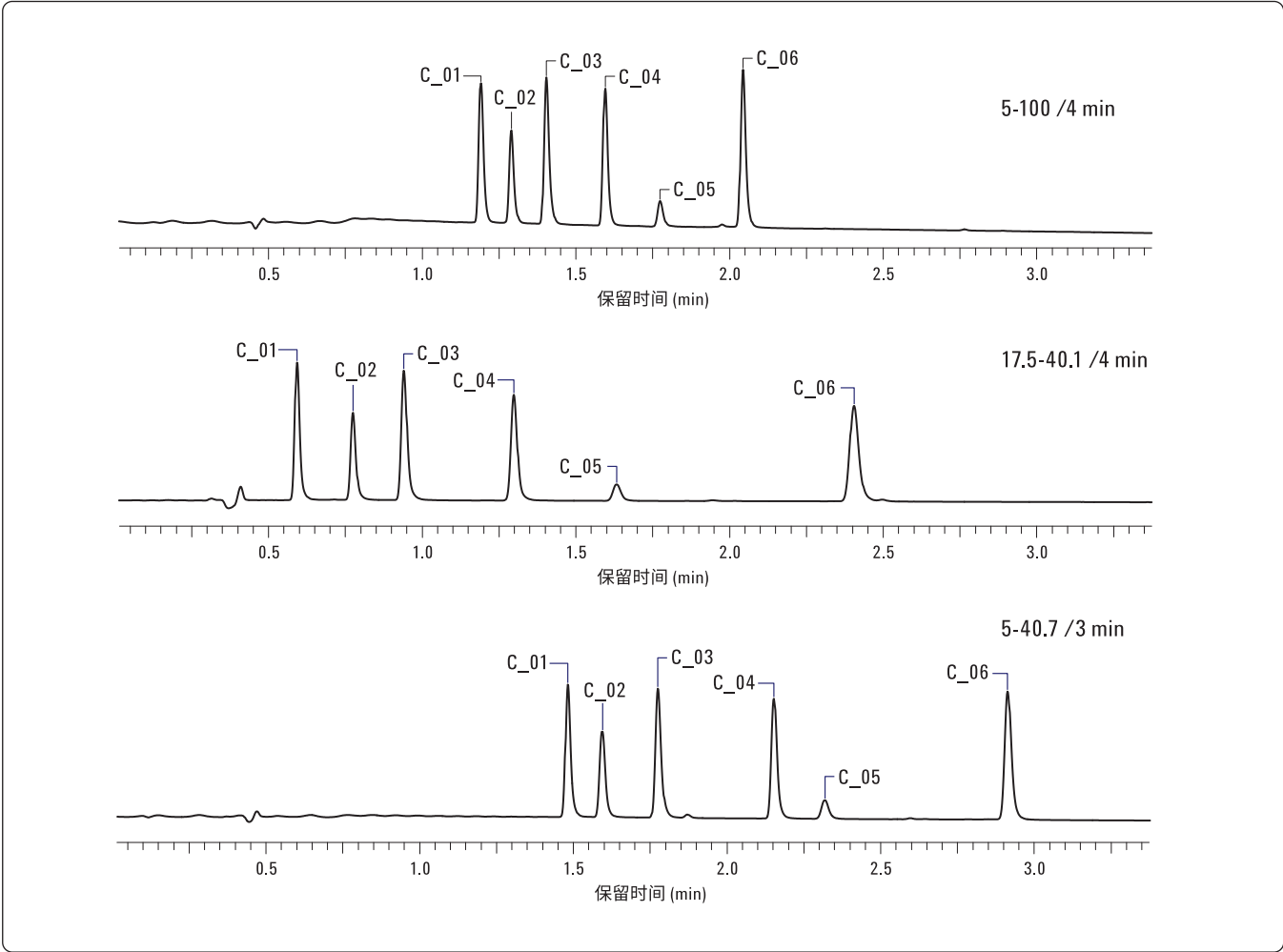


图 5. 由梯度优化实验得到的实验色谱图

	梯度程序	保留时间					
		峰_01	峰_02	峰_03	峰_04	峰_05	峰_06
实验值	5% 至 100% (4 min)	1.19	1.29	1.404	1.595	1.774	2.044
	17.5% 至 40.1% (4 min)	0.592	0.775	0.94	1.299	1.632	2.405
	5% 至 40.7% (3 min)	1.479	1.592	1.772	2.15	2.315	2.91
预测值	15%	0.716	0.943	1.198	2.011	2.295	5.37

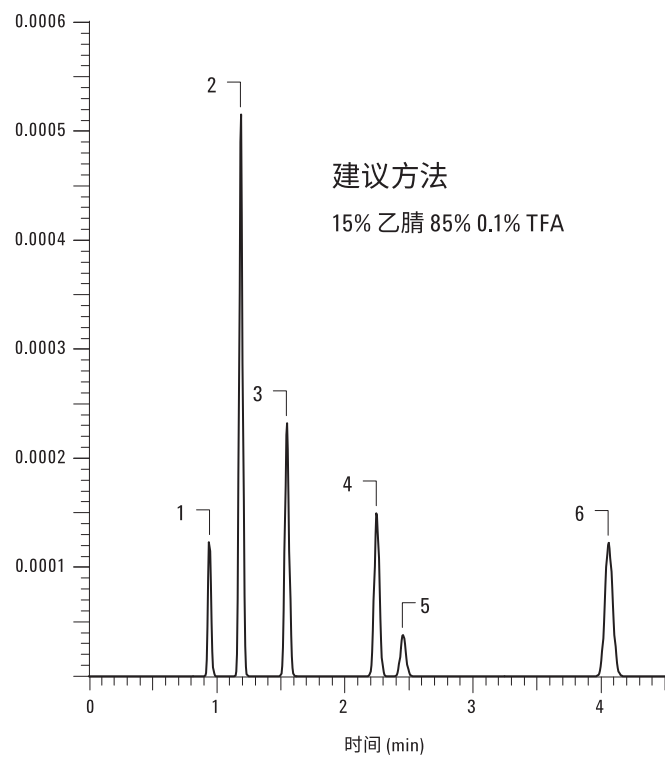


图 6. 第一批三幅色谱图和系统建议的分析（未创建模型，需要更多数据）

然后将梯度优化实验所得的三幅色谱图转移至 AutoChrom 中的 LC Simulator 程序中。该程序基于色谱模型以及针对合适方法的用户自定义标准（包括 k' 、运行时间、分离度、稳定性和色谱柱稳定性标准）来计算最佳分离条件。LC Simulator 基于实验数据计算分离模型，然后使用该模型确定最佳色谱条件（目标是开发等度解决方案）。绘制分离度图，使分析人员了解梯度改变如何影响关键物

质对的分离度。分离度图如图 7 所示。从图中可以看到，它以图形方式描述了返回 ChemStation 并在分析人员指导下实施的条件。从图 7 中可以看到，软件创建了一个模拟器模型。可根据该模型使用图形界面选择数据条件，由其生成预测色谱图。然后将所接受的条件直接发送至 ChemStation。采集实验数据。实验色谱图类似于 LC Simulator 预测的色谱图，但准确度不理想，对最后一种组分而言尤其如此。通过修改创建模型所用的方程并加入额外的实验数据，可以改善模型的准确度。完成建议

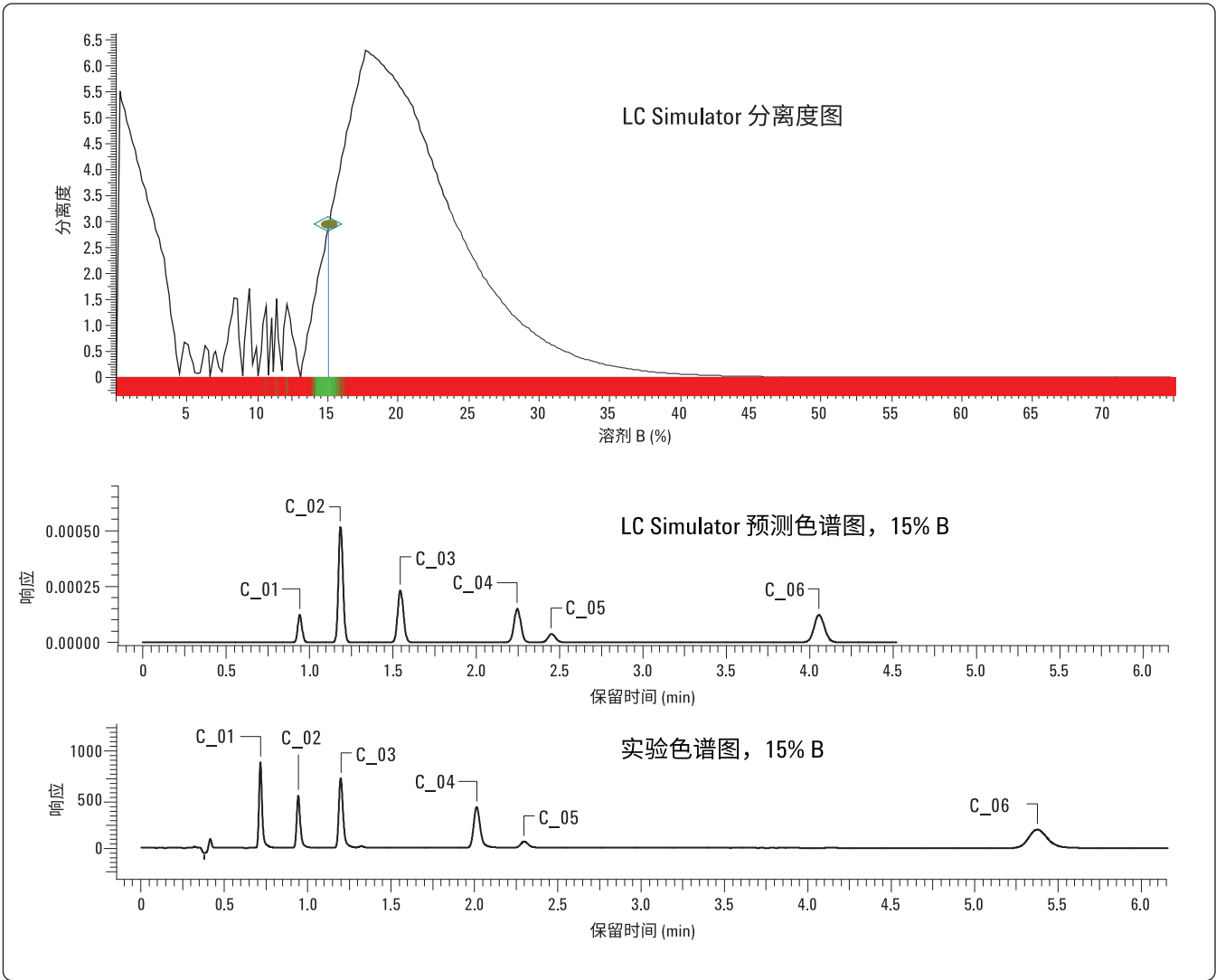


图 7. LC Simulator 分离度图和预测色谱图与 ChemStation 实验色谱图的比较

的实验后，由分析人员决定是否继续进行方法优化。如果方法不可接受，则可以在模型中加入第四轮实验以改善准确度，并由软件提出下一步实验的建议。在本例中，我们对该方法感到满意，此时只需停止方法开发即可。

最后一步是对流速进行优化。图 8 显示了在 1.5 mL/min 至 3 mL/min 之间的不同流速下得到的四幅色谱图。从图中可以看到，在较高流速下，方法效率大幅提升了近两倍。在 2.5 mL/min 下可获得最佳流动效率，但通常通过提高流速来改善通量。柱效仍可达到 11000。

结论

借助 AutoChrom 可在 20 小时内开发出一种用于分析水杨酸及相关化合物的快速等度方法。其中大部分时间都花费在筛选 15 种初始条件的数据采集上。使用 Agilent 1200 系列方法开发解决方案，一夜之间即可完成色谱柱与缓冲液筛选过程。较短的运行时间（5 分钟以内）使等度色谱方法的开发只需 3 分钟以内。AutoChrom 软件管理并记录了方法开发过程中所用的所有色谱条件。采用配备 ACD/AutoChrom 的 Agilent 1200 系列方法开发解决方案大大缩短了方法开发时间。由于在筛选和优化过程中实现了色谱柱和溶剂的无人值守自动切换，因此用户可以投入更多时间开展更重要的工作，而不是持续不断地操作 HPLC 系统。

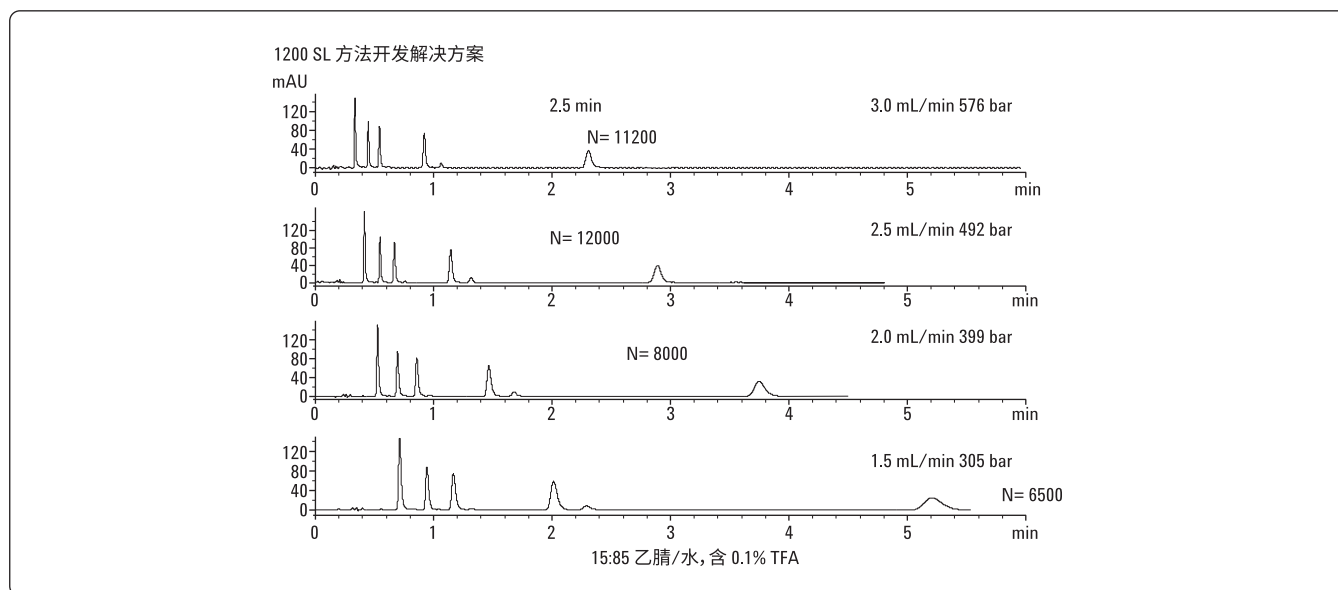


图 8. 在 1.5 mL/min 至 3 mL/min 之间的不同流速下得到的四幅色谱图

参考文献

1. Tatsunari Yoshida, Ronald E. Majors, and Hiroki Kumagai "High-Speed Analyses using Rapid Resolution Liquid Chromatography on ZORBAX Column Packed 1.8 μm Particles," *Chromatography*, Vol.28 No.2 (2007) 81–87
2. A. D. Broske, R. D. Ricker, B. J. Permar, W. Chen, M. Joseph, "The Influence of Sub-Two Micron Particles on HPLC Performance" (亚二微米颗粒对 HPLC 性能的影响), 安捷伦科技公司出版物 5989-9251EN, 2003 年 5 月
3. William J. Long 和 John W. Henderson Jr. "用 Agilent Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 快速分离高通量色谱柱 (1.8 μm) 快速分离紫杉烷", 安捷伦科技公司出版物 5989-9340CHCN, 2008 年 8 月 28 日
4. John W. Henderson Jr., William J. Long, "Exploiting RRHT Columns with Different C18 Selectivities to Quickly Develop Methods for Endocannabinoids" (利用带不同 C18 选择性的 RRHT 色谱柱快速开发适用于内源性大麻素的方法), 2007 年 1 月 19 日, 安捷伦科技公司出版物 5989-6128EN
5. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, "Practical HPLC Method Development, 2nd ED." Wiley-Interscience, New York, 1997
6. Angelika Gratzfeld-Huesgen, "An Open-Access LC/MS System Capable of Running Different Applications With up to Eight 1.8 μm , 3.5 μm , 5 μm Particle Columns of Different Selectivity and Length," Poster HPLC 2009 Dresden DE
7. Rob Edam, Mattias Purtsch, Angelika Gratzfeld-Huesgen, Michael Frank, Helmut Schulenburg-Schell, Freddy van Damme, "Automated Method Development With Sub-2 μm Particle Columns for LC Separation of Chemical and Agricultural Samples," Poster HPLC 2009 Dresden DE
8. A. Toiu, L. Vlase, I. Oniga, and M. Tamas, "HPLC Analysis of Salicylic Acid Derivatives from Viola Species," *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 44, No. 3, 2008 (357-358)
9. J. D. Goss, "Improved Chromatographic Separation of Salicylic Acid and Some Related Compounds on a Phenyl Column," *Journal of Chromatography A*, 828 (1998) 267–271
10. William J. Long and John W. Henderson Jr., "用不同的酸调节流动相分离水杨酸中的杂质", 安捷伦科技公司出版物 5989-7731CHCN, 2009 年 7 月 24 日
11. Salicylic Acid USP 23 (1995) 1395
12. B. A. Bidlingmeyer, A. D. Broske, "The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC. *J Chromatogr Sci.* 2004 Feb;42(2):100-6
13. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, "Modern Liquid Chromatography, Wiley and Sons, 1980

更多信息

有关我们的产品与服务的详细信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 3 月 1 日，中国出版
5990-4809CHCN



Agilent Technologies