

# 利用安捷伦 Poroshell 120 色谱柱建立甾类化合物的液相色谱快速筛选方法

## 应用报告

制药、生物制药和临床药学

### 作者

William Long  
安捷伦科技（中国）有限公司

### 引言

甾类化合物是胆固醇衍生的脂质。甾类化合物的主要特点是他的多元环体系，如图 1 所示，包括 3 个六元环和 1 个五元环。它可以连接多种官能团。与所有脂质一样，其主要特点是含有大量的碳氢键使得甾类成为非极性化合物 [1]。

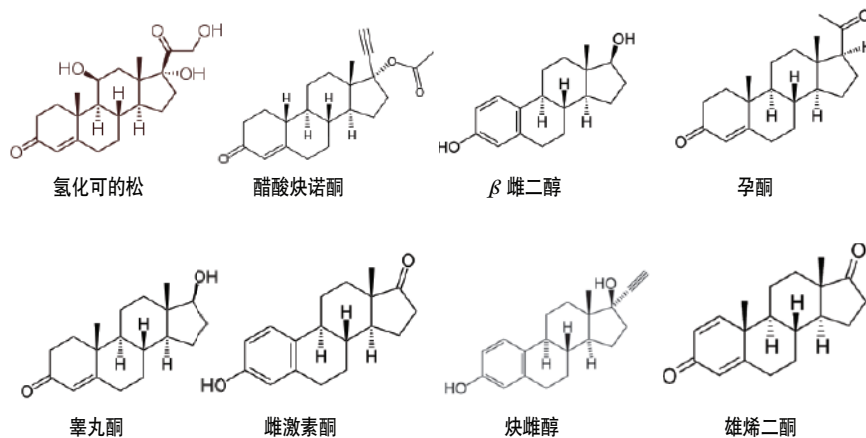


图 1. 几种甾体的结构



Agilent Technologies

## 调整选择性以优化馏体的分离

从分离度公式来考虑增加色谱分离度的最佳方法。分离度公式与柱效、选择性和保留因子有关。

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

为了获得较高的分离度，必须使这 3 个参数最大化。通过延长色谱柱增加理论塔板数 N，可以使保留时间增加并且峰宽变大。但这样做可能效果不好。相反地，为了增加塔板数，可以通过降低固定相粒径降低理论塔板高度。表面多孔填料（例如安捷伦 Poroshell 120）的柱效是 1.8 μm 填料柱效的 90%，而背压相对较低。

也可以通过调整选择因子改善分离情况。选择性是一个对分离影响最大的变量。改变选择性可以通过：

- 改变流动相组成
- 改变色谱柱温度
- 改变固定相组成

选择性是高效液相色谱中优化分离的最有效工具。选择性的改变可以通过使用不同的键合相实现，包括 C18、C8、极性包埋和苯基键合相，或者通过改变流动相实现。本研究采用了 Poroshell 120 色谱柱和 Agilent 1200 SL 方法开发解决方案，对馏体分离的方法开发进行快速评价。短柱长和高柱效使得分析时间短、色谱柱平衡快，从而可以快速完成对选择性的考察。

## 实验部分

采用了 Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱多方法解决方案。此系统由以下部分组成：

- 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- 1260 Infinity 高性能自动进样器 (G1367E)
- 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)，配备了 10 mm 的最大光强卡套式流通池
- G6140 单四极杆质谱仪

安捷伦 1200 Infinity 系列液相色谱多方法解决方案是一个高度灵活的系统，可以同时使用最多达 4 支 (100 mm) 色谱柱。此外，安捷伦 ChemStation 方法筛选向导自动设置方法和序列，可自动筛选可用的色谱柱、溶剂、预设梯度和温度。本研究中采用了 4 支安捷伦 Poroshell 120 色谱柱：

- Agilent Poroshell 120 StableBond SB-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-902)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 695775-902)
- Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-901)
- Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 695775-912)

柱温箱带有一个 6 位/6 通选择阀。这个新型的快速更换阀安装在一个滑道上，便于操作和维护。接口 1 连接至 StableBond C18 色谱柱；接口 2 连接至 EC-C18 色谱柱。接口 3 连接到 Bonus-RP 色谱柱；接口 4 连接到 Phenyl-Hexyl 色谱柱；接口 6 连接到支路毛细管上。

通过每个色谱柱的溶剂经过四个低扩散热交换器中的一个独立加热。G1160 12 溶剂选择阀连接到 G1312B 的 A1 阀位上。加上 SL 型二元泵的内部溶剂选择阀，此系统可以筛选的溶剂多达 15 种。流动相为含 0.1% 甲酸的甲醇或乙腈，和含 0.1% 甲酸的水。乙腈/水溶液 (50%/50% v/v) 用于淋洗色谱柱上的改性剂，使其保持合适的色谱柱存储体积。安捷伦 ChemStation (版本 B.04.02) 用于控制仪器和处理数据。

考察的化合物包括氢化可的松、醋酸炔诺酮、雌二醇、孕酮、睾酮、雌激素酮、炔雌醇和勃地酮。以上化合物均购自 Sigma Aldrich。结构和详细信息见图 1 和表 1。所有样品均分别溶解在乙腈中，浓度 10 mg/mL，之后用水稀释至 0.1 mg/mL。

## 调整色谱柱增加选择性

选择不同的色谱柱以改善分离的选择性。所选择的色谱柱包括：方法开发时推荐高度封端的 Poroshell 120 EC-C18 为首选；未封端的 Poroshell 120 StableBond SB-C18 可能会与硅羟基相互作用，是中等到低 pH 条件下的另一种可选的 C18 固定相；还使用了极性包埋的氨基柱（Poroshell 120 Bonus-RP）和 phenyl-hexyl 柱（Poroshell 120 Phenyl-Hexyl）；众所周知苯基键合相对芳香族化合物的选择性更好。

极性包埋的基团插入到疏水的 C14 烷基链上，使得基于全多孔 Poroshell 120 的 Bonus-RP 固定相将硅醇基与极性化合物的作用最小化，使其对各种化合物的分析均具有对称的峰形。这种固定相在中性 pH 条件下尤为有用，在这个条件下，与离子化硅醇基有较强的相互作用。极性包埋的基团也有助于润湿疏水链，避免高水流动相中固定相的塌陷。

Poroshell 120 Bonus-RP 多数情况与 C18 色谱柱适用范围基本一致，并克服了普通 C18 的一些缺陷，例如不适用于高水相。此外，对能够发生疏水作用和能够与氨基发生氢键作用的分子具有更好的保留性。与单一的烷基链的固定相相比，Bonus-RP 对酚类、有机酸和其他极性化合物的保留和选择性更强。原因是极性基团（氢键受体）和氢键供体（例如酚类和酸类）间有较强的氢键作用。Bonus-RP 上的保留性比 C18 略小——无需改变流动相条件即可对两种色谱柱进行比较。Bonus-RP 固定相对极性化合物选择性与 C18 不同。它还可在 100% 水相条件下使用。

由于分析物与键合相的芳香环及其离域电子发生相互作用，Phenyl-Hexyl 固定相显示出了独特的反相选择性，特别是对于极性芳香化合物和杂环化合物。Poroshell 120 Phenyl-Hexyl 与 C18 和 Bonus-RP 固定相的选择性均是互补的。对于带有芳香性吸电子基团（例如氟基或硝基）溶质会得到更好的保留性和选择性 [2,3,4]。

表 1. 甾体的命名和分子特征

常用名	IUPC 名	分子结构	分子量
氢化可的松	皮质醇	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	362.460
醋酸炔诺酮	17β-羟基-9-去甲-17α-孕甾-4-烯-20-炔-3-酮-17-醋酸酯	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	340.456
雌二醇	雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3,17 β-二醇	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272.38
孕酮	孕-4-烯-3,20-二酮	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314.46
睾酮	17α-羟基雄甾-4-烯-3-酮	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288.42
炔雌醇	3-羟基-19-去甲-17α-甾-1,3,5 (10) -三烯-20-炔-17-醇	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296.403
雄烯二酮（勃地酮）	(8R,9S,10R,13S,14S) -10,13-二甲基-7,8,9,11,12,14,15,16-八氢-6H-环戊[a]菲-3,17-二酮	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	284.39
雌激素酮	3-羟基-13-甲基-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16-八氢环戊[a]菲-17-酮	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270.366

Poroshell 120 Phenyl-Hexyl 对带有芳香基的化合物具有独特的选择性和优越的分离度。Poroshell 120 Phenyl-Hexyl 也可以实现对中等极性化合物的极好分离,而常规烷基固定相(C18和C8)对这些化合物的分离效果不佳。乙腈会降低芳香基和极化的分析物与 phenyl-hexyl 固定相间的  $\pi-\pi$  作用力,而甲醇能增加这种作用力,从而增加了保留性和选择性 [5]。但这并不意味着乙腈不能用于苯基固定相,或者不能提供足够的分离。这只代表甲醇能提供更有利于苯基固定相的选择性。

## 结果和讨论

从图 2 中可以看出,本文考察了所有色谱柱对 8 个化合物的分离状况。虽然 Phenyl Hexyl 色谱柱分离速度更快, Poroshell 120 EC-C18 和 Poroshell 120 Phenyl Hexyl 两支色谱柱的分离特征非常相似。这可能说明了 Phenyl Hexyl 色谱柱上的  $\pi-\pi$  作用被乙腈给弱化了。Phenyl Hexyl 色谱柱上雌二醇和雄烯二酮重叠不是那么严重。Poroshell 120 SB-C18 色谱柱上的分离情况完全不同,

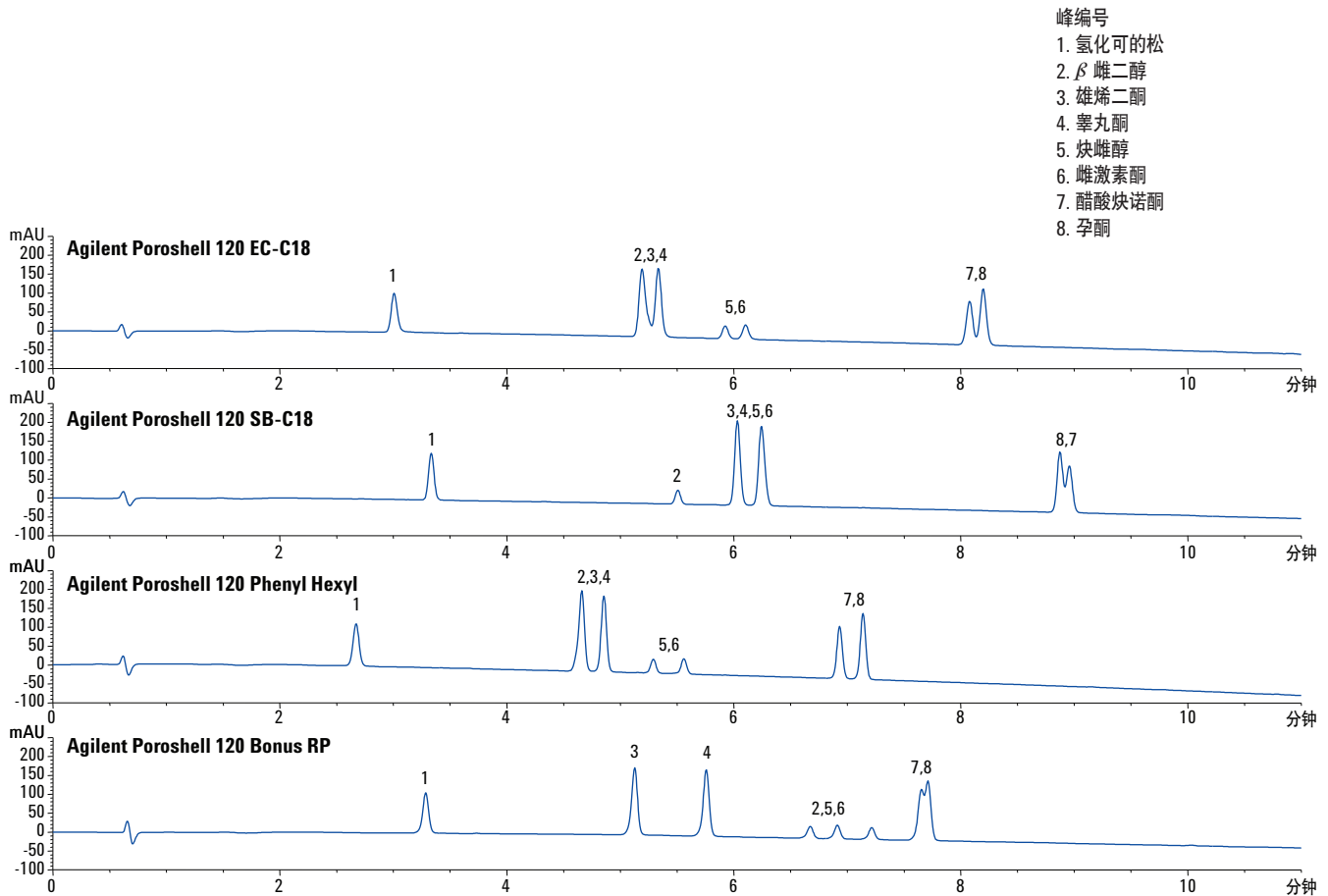


图 2. Agilent Poroshell 120 色谱柱用乙腈为流动相对甾体的分离

### 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120, 2.1 × 100 mm  
 流速: 0.4 mL/min  
 梯度: 25-80% 乙腈/10 min (含 0.1% 甲酸的水和乙腈)  
 温度: 25 °C  
 检测: DAD 260, 80 参比=关

雌二醇得到分离而炔雌醇和雌激素酮却没有得到分离。这可能是由于 SB-C18 固定相上有暴露的硅醇基，或者是 SB-C18 固定相上的二异丁基侧链提供了一定的结构选择性。这需要进一步的工作去验证。Poroshell 120 Bonus RP 固定相几乎分离了全部 8 个化合物。当使用乙腈为流动相时，提供了进一步方法开发的最佳方法选项。

图 3，使用甲醇为流动相在略高温（40 °C）下进行分离。此时，两种 C18 固定相（Poroshell 120 EC-C18 和 Poroshell 120 SB-C18）的分离特征基本相同。由于硅醇基作用，SB-C18 固定相上的保留时间增加了。Poroshell 120 Bonus-RP 色谱图上有 3 个重叠的峰对，使得用甲醇为流动相的方法开发存在困难。尽管如此，Poroshell 120 Phenyl Hexyl 固定相将 8 个化合物分开了，并且分离度大于基线分离。

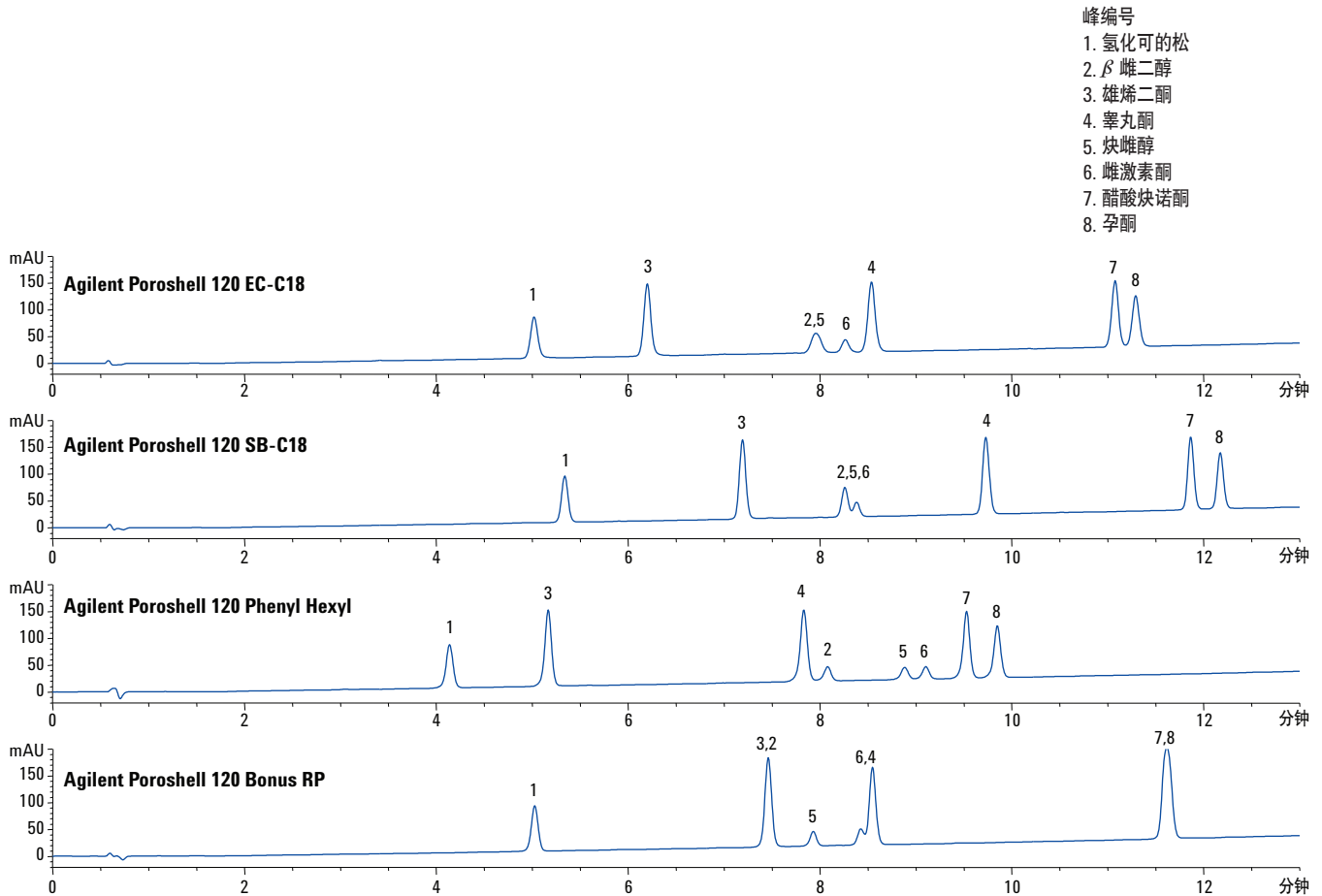


图 3. Agilent Poroshell 120 色谱柱用甲醇为流动相对甾体的分离

#### 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120, 2.1 × 100 mm  
 流速: 0.4 mL/min  
 梯度: 40-80% 甲醇/14 min (含 0.1% 甲酸的水和甲醇)  
 温度: 40 °C  
 检测: DAD 260, 80 参比=关

## 小结

方法开发方案中使用同一梯度程序，将有助于快速解决分析中的问题。本研究使用甾体为样品，展示了固定相和有机改性剂（例如乙腈和甲醇）是如何影响选择性的。这种选择性可以用来优化分离。本例中，广泛使用的 C18 固定相（如 Poroshell 120 EC-C18 和 SB-C18）不能提供足够的分离度。利用互补选择性的色谱柱（Poroshell 120 Bonus-RP 乙腈为流动相或 Poroshell 120 Phenyl Hexyl）获得了更好的结果，可以应用到数千种样品的分离。

## 参考文献

1. G. P. Moss. *Pure & Appl. Chem.* 61, 1783 (1989).
2. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. *Practical HPLC Method Development*. Wiley-Blackwell, New York (1997).
3. C. Markopoulou, T. Tweedlie, D. Watson, G. Skellern, H. Reda, P. Petersson, H. Bradstock, M. Euerby. *Chromatographia*. 70, 705 (2009).
4. G. P. O'Sullivan, N. M. Scully, J. D. Glennon. *Anal. Lett.* 43, 10 (2010).
5. N. S. Wilson, J. Gilroy, J. W. Dolan, L. R. Snyder. *J. Chromatogr. A*. 1026, 91 (2004).

## 更多详细信息

本文中的数据仅代表测定的典型结果。如需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](http://www.agilent.com)。

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

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, 中国印刷

5991-0451CHCN



**Agilent Technologies**