

安捷伦液相色谱方法开发应用文集

创建一致、 高效而经济的 液相色谱方法



Agilent Technologies

优化液相色谱工作流程 最大限度提高方法开发效率

如今的方法开发需要针对 HPLC 和 UHPLC 系统进行灵活而高效的初始方法开发、条件筛选和方法转换。

Agilent InfinityLab 方法开发解决方案将出色的仪器和色谱柱、智能备件、直观的软件以及专业服务相结合，可满足上述需求。总体而言，这些创新技术能够协助您：

- 找到选择性、分离度和速度的最佳组合
- 使用单个系统即可自动筛选数百组色谱条件
- 实现自动化无人值守运行，降低成本

内容提要

本文集收录了内容涵盖教育和理论、仪器和软件自动化，以及特定市场的现有和新兴应用。同时，我们的产品和应用专家将帮助您最大程度提高效率。

InfinityLab Poroshell 120 方法开发方案

为您节省时间和成本

稳定的方法开发方案对于确保分析方法的耐用性、稳定性和可靠性至关重要。Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱、色谱柱 ID 标签和 Quick Connect Fittings 快速连接接头是确保分析效率和重现性始终如一必不可少的工具。

InfinityLab Poroshell 120 系列色谱柱提供 12 种填料和 1.9、2.7、4 μm 3 种填料粒径可选，可实现快速简便的方法开发。此外，还可与 ZORBAX 填料配合使用，轻松实现方法转换。

最佳产品	低 pH 值流动相分析的最佳选择	高 pH 值流动相分析的最佳选择	可替代选择性色谱柱的最佳选择	众多极性化合物的最佳选择
EC-C18	SB-C18	HPH-C18	Bonus-RP	SB-Aq
EC-C8	SB-C8	HPH-C8	PFP	EC-CN
Phenyl-Hexyl				HILIC

使用此通用方案开发快速、稳定的液相色谱方法

1 测试初始条件：采用含 0.1% 甲酸的乙腈（低 pH），梯度 10%-95%，30 °C

2 调整斜率（有机相百分比随时间变化），使结果中包括第一个峰和最后一个峰。针对目标分析物进行优化

3 如果采用乙腈得到的峰形或保留特性较差，请将有机改性剂换为甲醇

4 调整柱温（最高至允许上限）

5 尝试不同的色谱柱固定相以改变保留特性和选择性

在选择不同选择性的色谱柱时，如需帮助，请访问 www.hplccolumns.org

最大程度提高液相色谱方法开发的效率。
请访问 www.agilent.com/chem/livelcmetdev

自动化和灵活性

真正完善的全程方法开发解决方案，结合了出色的仪器、色谱柱、智能备件、直观的安捷伦软件以及基于质量源于设计的合作软件。



安捷伦样品前处理解决方案

通过去除不良基质干扰物提高分析方法开发速度。**Agilent Bond Elut SPE 和 Captiva** 过滤样品前处理产品能够稳定、可靠地净化样品，有效改善分析准确度并减少系统维护需求。



满足您最复杂的
方法开发需求

Agilent 1290 Infinity II
方法开发系统



适用于常规方法开发

Agilent 1260 Infinity II
方法开发系统



适用于快速方法开发和序列生成

安捷伦方法筛选向导是一款简单易用却非常高效的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 插件工具



适用于对选择性和效率要求更高的方法筛选

Agilent InfinityLab
Poroshell 120 色谱柱

Agilent
CrossLab

洞察敏锐，成就超群

AGILENT CROSSLAB 服务

由全球科学技术专家团队提供的全套综合服务以及学习解决方案
(包含专门针对分析方法开发的培训)。

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/crosslab/method-application-consulting

目录

交互式文件用户：单击下列标题可访问相应信息。

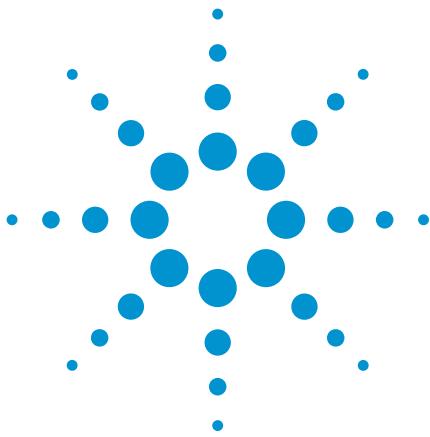
通用分析方法开发原理	6
通过优化仪器、方法和样品发挥 Agilent InfinityLab Poroshell 120 1.9 μm 色谱柱的最大潜能	7
Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱间的方法转换	17
在高 pH 条件下使用 Poroshell HPH-C18 色谱柱作为方法开发工具	31
利用 Poroshell 120 4 μm 色谱柱轻松进行方法转换并改善分析性能	39
分析方法开发自动化	45
采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案为各种 HPLC 系统开发通用分析方法	46
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	56
使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪进行基于质量源于设计的方法开发	68
使用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案自动筛选固定相和流动相	78
特定市场的应用	90
使用 Agilent Poroshell 120 PFP 开发紫杉醇中 USP 相关化合物的分析方法	91
利用配备 Agilent Poroshell 120 色谱柱的 HPLC 快速筛查类固醇的方法	97
黄油抗氧化剂分离中 Poroshell 120 固定相的选择性对比	104

如需搜索随附应用简报中的字或词, 请单击下方的搜索按钮打开 Acrobat 的搜索窗口。

 搜索

最大程度提高液相色谱方法开发的效率。
请访问 www.agilent.com/chem/livelcmetdev

通用分析方法开发原理



优化仪器、方法和样品，以发挥 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 1.9 μm 色谱柱的最大潜能

应用简报

整体分析

作者

Anne Mack
安捷伦科技公司

摘要

通过对六种化合物进行等度洗脱分析，来验证仪器、方法和样品这几个变量对色谱柱性能的影响。在本研究中使用的是高效 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 μm 色谱柱，其能够产生接近 14000 的塔板数。主要研究了系统毛细管、检测器流通池、数据采集速率、进样量、样品溶剂和样品浓度对色谱柱性能的影响。



Agilent Technologies

前言

表面多孔颗粒填料液相色谱柱是液相色谱领域常用的工具。与对应的全多孔颗粒色谱柱相比，这种色谱柱能够在较低压力下获得较高柱效 [1]。这主要是由于该色谱柱的传质距离更短并且填料颗粒的粒径分布明显更窄 [2]。表面多孔颗粒填料的当前趋势是通过不断缩小填料粒径实现柱效的进一步提高。更高的柱效能够加快分析速度并改善分析结果，分离度和灵敏度均有明显提高。

由于孔径较大（内径为 4.6 mm 或 3 mm）的色谱柱需要更快的流速才能达到等效的线性流速，因此与其相比，填充有细小颗粒的小尺寸液相色谱柱的分析速度更快、分离度更出色，从而提高了分析效率，并且减少了溶剂使用量，而且对液相色谱/质谱和蒸发光散射检测均表现出更好的兼容性。只需将内径较大的色谱柱更换为内径较小的色谱柱，便可获得这些益处。但要充分利用小尺寸色谱柱，必须对液相色谱仪器、方法和样品都进行优化。

以往有研究表明，柱外体积对各种色谱柱尺寸和填料粒径有影响。在本实验中，唯一的变量是自动进样器和色谱柱之间的连接毛细管的直径和长度，因此对柱外体积进行了简化。我们的分析表明，柱外体积的影响取决于色谱柱尺寸，但与填料粒径无关。但在细小颗粒色谱柱

中，柱外体积的影响会更加明显。就 $2.1 \times 50 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱而言，当柱外体积仅为 $2 \mu\text{L}$ 时，柱效便开始降低。另外，我们发现，即使柱外体积在 $1.2\text{-}9.1 \mu\text{L}$ 的范围内，都不会对内径较大 (4.6 mm) 的色谱柱产生显著影响。进一步的研究表明，当将数据归一化以说明柱效百分比降低与系统柱外体积之间的关系时， $5 \mu\text{m}$ 色谱柱的柱效降低程度与相同尺寸的 $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱相似 [3]。

最后，证明了使用小尺寸的全多孔 $2 \mu\text{m}$ 颗粒色谱柱可减少液相色谱系统体积这一影响 [4-5]。本研究包括对与高效表面多孔 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, $1.9 \mu\text{m}$ 色谱柱配套使用的液相色谱仪器、方法和样品进行优化。

实验

本实验采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统。表 1 示出了配置详情。对于部分实验，仪器配置在此基础上有所修改。在整个研究中，在必要和适当的时候提供了该配置信息。本实验中还使用了一根安捷伦液相色谱柱，其具体信息在表 1 中列出。

大部分分析的液相色谱方法参数在表 2 中示出。在整个研究进行的几个实验中，将改变某个参数来验证其对色谱分析的影响，修改的地方会对数据加以标记。

表 1. UHPLC 系统配置

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统配置

Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)	35 μ L 溶剂混合器: Jet Weaver, 35 μ L/100 μ L (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)	针座组件, 超低扩散, 用于 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226-87030) 自动进样器与加热器: 不锈钢毛细管, 0.075 \times 220 mm, SV/SLV (5067-4784) 样品瓶, 螺口盖, 棕色, 带书写签, 经认证, 2 mL, 100/包 (5182-0716) 螺口盖, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包 (5182-0717) 样品瓶内插管, 250 μ L, 玻璃, 带聚合物支脚, 100/包 (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	双热交换器, 低扩散, 1.6 μ L, (G1316-60005) 加热器与色谱柱: Agilent InfinityLab 快速连接组件, 105 mm, 0.075 mm (5067-5961) 色谱柱与流通池: 不锈钢毛细管, 0.075 \times 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)	Agilent 超低扩散最大光强卡套式流通池, 10 mm (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版修订版 C.01.05 [35]	G4220A: B.06.53 [0013] G4226A: A.06.50 [003] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.53 [0013]
安捷伦液相色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m (699675-902)

除非另有说明, 否则所有分析均使用上述仪器配置。

表 2. UHPLC 方法参数

色谱柱	流动相	流速 (mL/min)	洗脱	进样量 (μ L)	样品	柱温箱 ($^{\circ}$ C)	二极管阵列 检测器
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m	20 mM 磷酸钠水溶液, pH 7, 与乙腈以 40/60 预混合	0.5	等度	0.5	尿嘧啶、对羟基苯甲酸丁酯、阿米替林、萘、邻苯二甲酸二丙酯、苊 详细信息见表 3	25	254 nm, 80 Hz

除非另有说明, 否则所有分析均使用上述方法参数。

本研究对表 3 所示的六种化合物进行了分析。除非另有说明, 否则测试标样按照表 3 中的浓度制备。所有分析物均购自 Sigma-Aldrich。磷酸钠也购自 Sigma-Aldrich。乙腈购自 Honeywell (Burdick and Jackson)。水经 Milli-Q 系统 (Millipore) 0.2 μ m 滤膜过滤, 电阻率 18 M Ω 。

表 3. 样品信息

化合物	分类	在流动相中的浓度	保留因子 (k')
尿嘧啶	空白标记	n/a	n/a
对羟基苯甲酸丁酯	弱酸	0.05 mg/mL	1.3
阿米替林	碱	0.25 mg/mL	2.2
萘	中性	0.25 mg/mL	3.3
邻苯二甲酸二丙酯	极性中性	0.5 mg/mL	3.8
苊	中性	0.5 mg/mL	6.1

除非另有说明, 否则所有分析均使用上述样品。

结果与讨论

除非另有说明，否则所有优化实验均使用相同的标准、方法和系统完成。对于每个实验，一次改变一个变量，以验证该项参数对 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 μm 色谱柱的效果。每个实验中都说明了对羟基苯甲酸丁酯 ($k' = 1.3$)、萘 ($k' = 3.3$) 和苊 ($k' = 6.1$) 的柱效，以表明对早期、中期和晚期洗脱化合物的影响。

仪器优化

小体积的仪器配置应与小体积的色谱柱配套使用。分两个步骤对 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪的系统体积进行了优化。首先，将内径为 0.12 mm 的标准红色毛细管替换为内径为 0.08 mm 的黑色毛细管。其次，将 1.0 μL 的标准流通池替换为 0.6 μL 的流通池。表 4 示出了系统配置差异的详细信息。图 1A 示出了结果。从图 1A 中可以看出，当毛细管体积减小时，观察到所有峰的保留时间都出现较小漂移。当流通池体积减小时，所有峰都变高、变窄且更加高效。柱效值在图 1B 中绘出。系统体积对早期洗脱化合物影响较大。毛细管和流通池二者都对液相色谱的系统体积有很大影响。因此，这两个因素都可以单独影响小体积高效色谱柱如 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 μm 的性能。

本研究的后续实验使用了较小的液相色谱系统体积配置，见表 4。

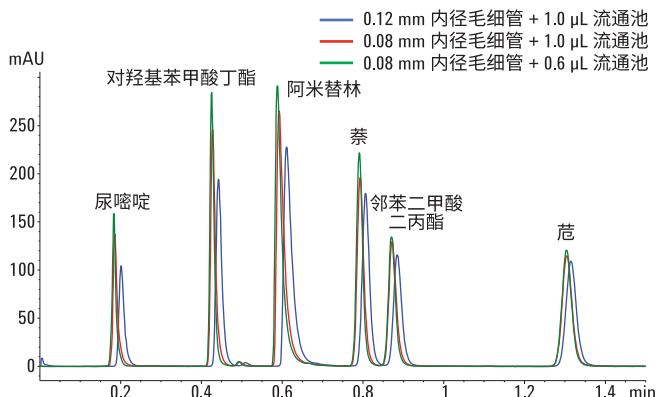


图 1A. 使用内径较小的毛细管和体积较小的检测器流通池减小了液相色谱系统体积，从而提高了 Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱的性能

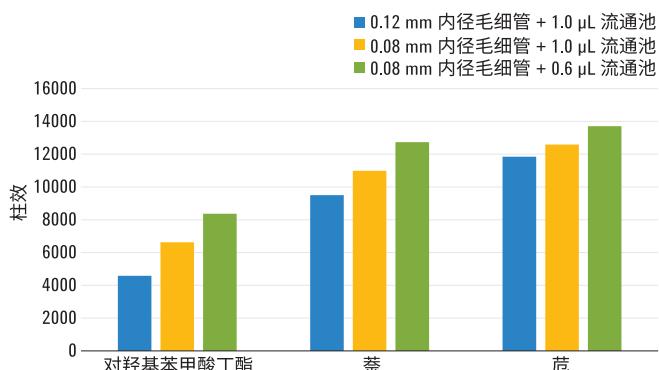


图 1B. 使用内径较小的毛细管和体积较小的检测器流通池减小了液相色谱系统体积，从而提高了 Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱的性能

表 4. 有关毛细管和流通池的仪器修改比较

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统配置修改	更大的系统体积	更小的系统体积
Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)	自动进样器与加热器：不锈钢毛细管，0.12 × 340 mm (5067-4659)	自动进样器与加热器：不锈钢毛细管，0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	双热交换器，低扩散，1.6 μL , (G1316-60005) 加热器与色谱柱：Agilent InfinityLab 快速连接组件，105 mm, 0.075 mm (5067-5961) 色谱柱与流通池：不锈钢毛细管，0.12 × 340 mm (5067-4659)	热交换器，低扩散，1.0 μL ，长型，朝下 (G1316-80012) 加热器与色谱柱：Agilent InfinityLab Quick-Turn 接头 (5067-5966) 色谱柱与流通池：不锈钢毛细管，0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)	Agilent 标准最大光强卡套式流通池，1.0 μL , 10 mm (G4212-60008)	Agilent 超低扩散最大光强卡套式流通池，0.6 μL , 10 mm (G4212-60038)

方法优化

在优化了液相色谱系统的硬件之后，还应考虑对方法进行优化。当涉及到高效率色谱柱如 $1.9\text{ }\mu\text{m}$ InfinityLab Poroshell 时，通常需要探讨检测器的数据采集速率及其对色谱柱性能的影响。数据采集速率是指仪器在整个分析过程中进行测量的频率。在色谱峰中测量足够数量的数据点是至关重要的，这样才能准确反映色谱柱的效率。数据点太少会显示人为因素造成的宽峰，例如图 2A 中的对羟基苯甲酸丁酯。在本例中，我们测试了二极管阵列检测器的数据采集速率，但如果其他液相色谱检测器用于本方法中，也需要设定其采样速率。需要注意的是，ChemStation 中的默认方法将二极管阵列检测器的数据采集速率设定为 2.5 Hz ，当建立适用于 $1.9\text{ }\mu\text{m}$ Poroshell 色谱柱的新方法时，必须提高数据采集速率，才能反映色谱柱的性能。根据图 2B，本方法应使用至少 40 Hz 的速率，但数据采集速率越高，可能会增加基线噪声并降低方法灵敏度。

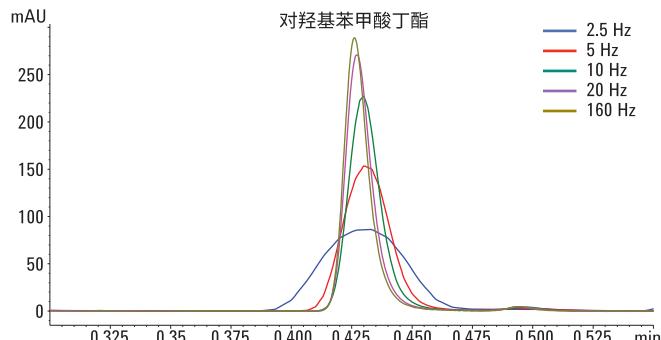


图 2A. Agilent InfinityLab Poroshell $1.9\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱必须使用较高数据采集速率，才能准确测量色谱柱的效率，对于早期洗脱化合物如对羟基苯甲酸丁酯 ($k' = 1.3$) 尤其如此

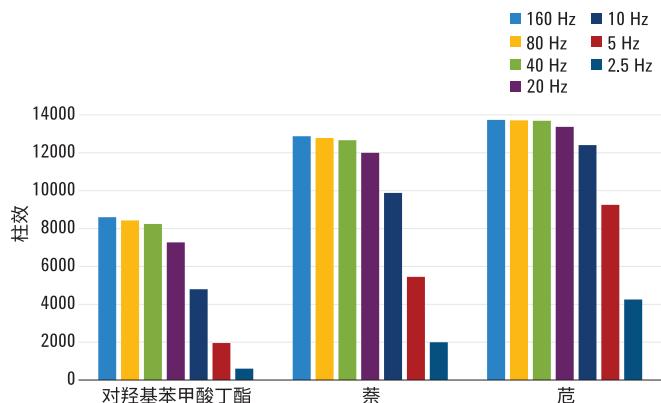


图 2B. Agilent InfinityLab Poroshell $1.9\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱必须使用较高数据采集速率，才能准确测量色谱柱的效率，对于早期洗脱化合物如对羟基苯甲酸丁酯 ($k' = 1.3$) 尤其如此

可用于优化小体积色谱柱性能的另一个方法参数是进样量。进样量可与整个系统体积一起考虑，而且在适于分析的情况下应保持尽可能小。图 3A 示出了进样量对色谱分析的影响。当用 2.1×50 mm 色谱柱进行分析时，比较 $0.5 \mu\text{L}$ 的进样量与 $16 \mu\text{L}$ 的进样量，结果表明峰宽和色谱性能具有很大的差异。图 3B 示出的柱效值证实了我们在液相色谱系统体积中所观察到的趋势。进样量越

大导致峰越宽，这种效果在早期洗脱化合物中更明显。为了在载样的可能影响中单独分析进样量的影响，在整个实验中均向色谱柱中进样相同量的样品。用流动相连续稀释初始样品，同时对进样量进行适当地缩放。图 4 示出了不论被测试的进样量如何均向色谱柱中进样相同量的样品，结果显示了每种化合物的面积均保持恒定。

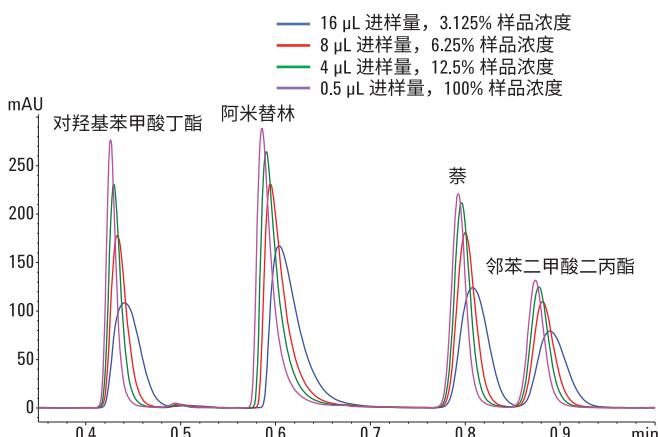


图 3A. 进样量对整个系统体积有影响，因此务必保持较小，以保持高效色谱柱如 $1.9 \mu\text{m}$ Agilent InfinityLab Poroshell 的性能

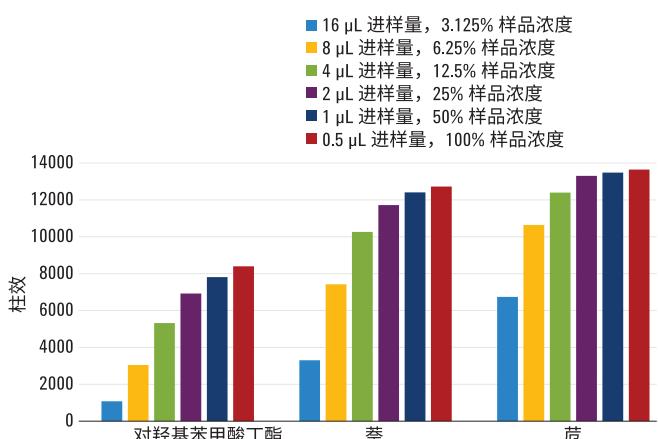


图 3B. 进样量对整个系统体积有影响，因此务必保持较小，以保持高效色谱柱如 $1.9 \mu\text{m}$ Agilent InfinityLab Poroshell 的性能

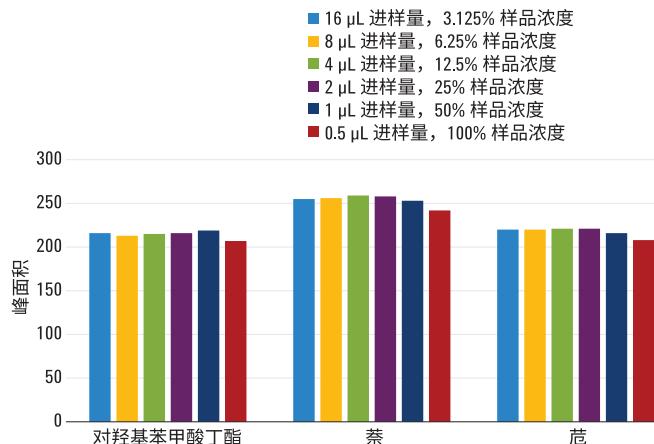


图 4. 峰面积测量结果表明，在对进样量进行比较时，向色谱柱中进样相同量的样品降低了其他变量如载样的可能性，并且可对进样量的影响进行单独研究

样品优化

除了优化仪器和方法之外，也可对样品进行优化以提高所观察到的色谱柱性能。样品溶剂会影响色谱性能。在图 5A 中，用不同溶剂以 1:10 稀释样品，然后进样 1.5 μ L。部分溶剂如 THF 和 DMSO 在 254 nm 处产生了较大的基线干扰，这对于极早期洗脱化合物可能存在问题。使用样品溶剂可能产生的一个较大问题是峰形变形，比如邻苯二甲酸二丙酯的样品溶剂为 THF 和 IPA 时就发生了变形。而且 THF 还明显改变了其余峰部分的峰形。为了防

止产生与样品溶剂有关的峰形问题，务必确保样品是在强度与流动相相当或比其更低的溶剂中制备的。图 5B 示出了样品溶剂对柱效的影响。强溶剂如 THF、DMSO 和 IPA 增宽了色谱峰，从而大大降低了柱效。性能最好的样品是在流动相或水中制成的样品。有趣的是，在水中制成的样品的结果最好。这可能是因为样品都被集中在色谱柱上。但问题是，该样品中的有些分析物在水中的溶解度不佳。图 5A 中的色谱图显示萘和苊的峰高低，正是因为它们在水中的溶解度不佳。

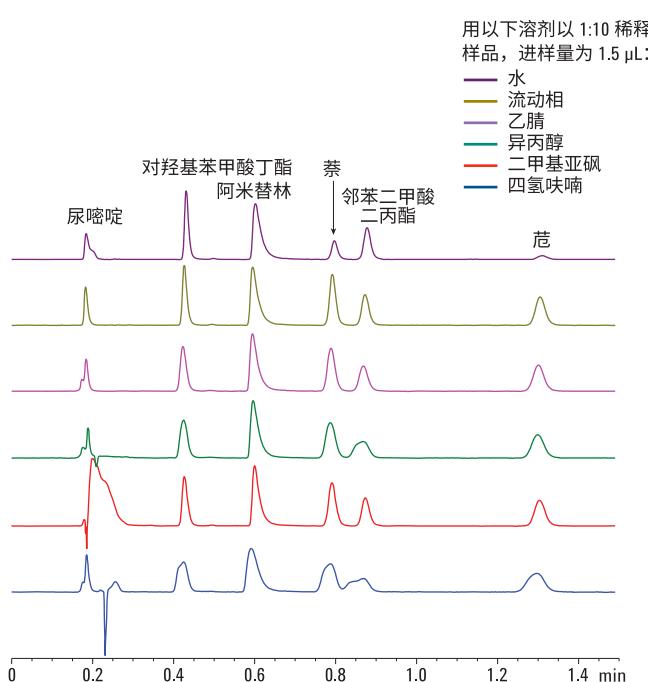


图 5A. 样品溶剂的强度应与流动相相当或比其更低，否则可能会出现峰形不佳，从而导致柱效不佳。随着进样量的增加，更为关键的是选择正确的样品溶剂强度，对于小体积色谱柱如 Agilent InfinityLab Poroshell 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m 尤其如此

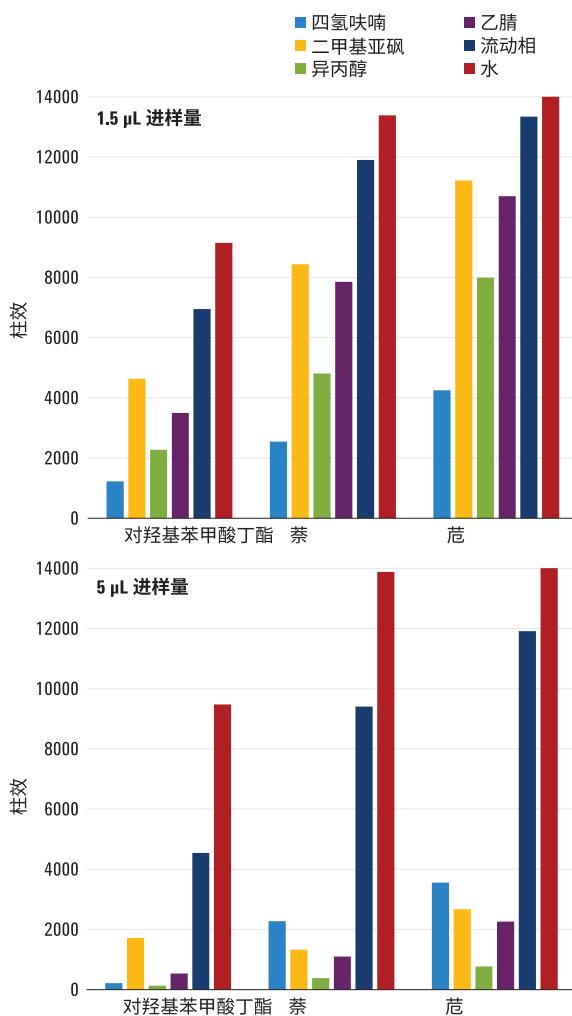


图 5B. 样品溶剂的强度应与流动相相当或比其更低，否则可能会出现峰形不佳，从而导致柱效不佳。随着进样量的增加，更为关键的是选择正确的样品溶剂强度，对于小体积色谱柱如 Agilent InfinityLab Poroshell 2.1 \times 50 mm, 1.9 μ m 尤其如此

样品中的分析物浓度也会影响方法的性能。对于图 6 中所示的实验，用流动相制备了不同浓度的阿米替林溶液，其他参数保持不变。图 6A 示出了将样品加载到色谱柱中后峰形和保留时间的变化。在这种情况下，通过柱效和拖尾因子来测量性能，如图 6B 所示。加载到色谱柱中的阿米替林并没有明显的最佳浓度。理想情况下，会选择柱效高同时拖尾因子低的浓度。所有分析物在载样后都具有独特的行为，因此最重要的是单独考虑每种化合物。

为了使 InfinityLab Poroshell 2.1×50 mm, $1.9\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱的性能最佳，应针对给定分析尽最大可能优化样品溶剂和分析物浓度。但在有些分析中，可能不能改变这些样品特性。

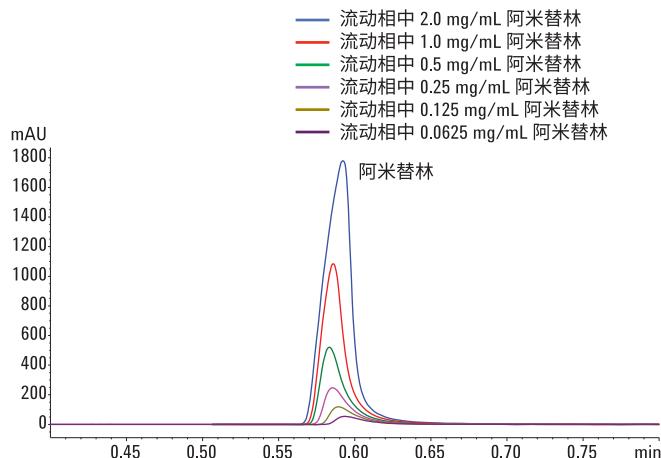


图 6A. 方法性能可根据分析物和加载到色谱柱上的样品量发生变化

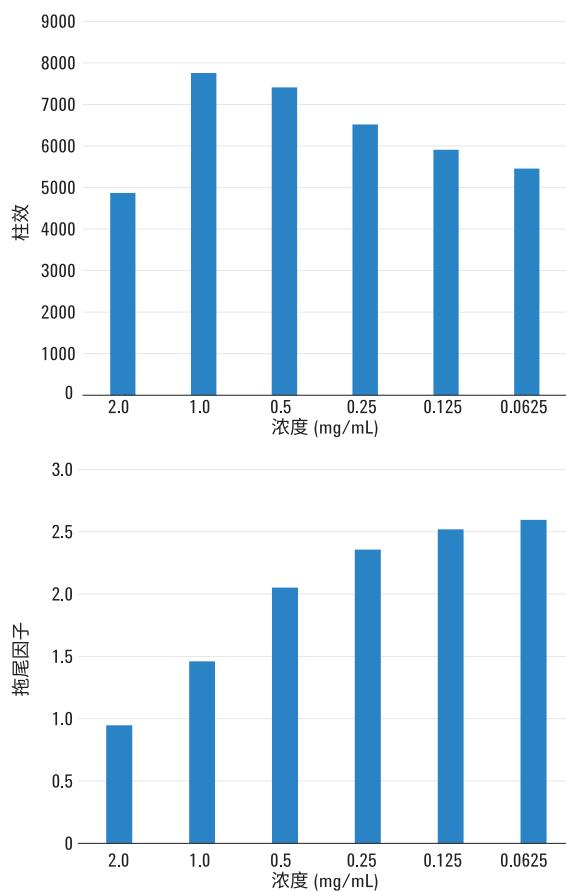


图 6B. 方法性能可根据分析物和加载到色谱柱上的样品量发生变化

结论

高效 Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱是一种强力色谱分离工具。但应谨慎对液相色谱仪器、方法和样品进行优化，以确保充分发挥分离能力。仪器应配置小体积的毛细管和流通池。应将方法的数据采集速率设定到足够高，并且在可行的情况下应将进样量保持尽可能低。样品溶剂的强度应与流动相相当或比其更低，并且分析物的浓度应足够低以免使色谱柱超载或破坏峰形。

参考文献

1. A. Gratzfield-Hugsen, E. Naegele. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱最大程度提高柱效，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-5602CHCN, 2016
2. V. R. Meyer. Practical High Performance Liquid Chromatography. 第 4 版，第 34 页，Wiley, 2004
3. W. Long, A. Mack. 减小管路体积以优化色谱柱性能，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-4964CHCN, 2009
4. A. Mack. 通过改善 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散性能，实现 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能的最大化，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-9502CHCN, 2012
5. A. Mack. 采用 Agilent 1290 Infinity 超低扩散液相色谱系统对吗啡及其代谢物进行 HILIC/MS/MS 分析，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0208CHCN, 2012

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。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

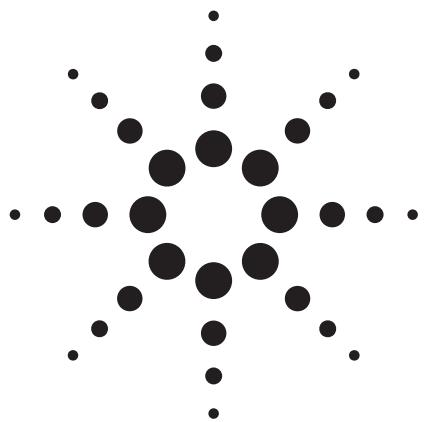
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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, 中国出版
5991-7560CHCN



Agilent Technologies



Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱间的方法转移

技术综述

前言

随着表面多孔填料颗粒的开发，使从较大的 5 μm 全多孔填料颗粒色谱柱和亚 2 μm 全多孔填料颗粒色谱柱向表面多孔填料颗粒色谱柱的方法转移成为可能。从采用较大填料颗粒色谱柱向采用表面多孔颗粒色谱柱进行方法转移带来的好处之一是显著缩短了分析时间，这是由于表面多孔填料颗粒色谱柱柱长短得多并能以较高流速运行，达到与大填料粒径色谱柱相似的分辨率[1-4]。表面多孔颗粒传质距离短、粒径分布较窄，与亚 2 μm 全多孔填料色谱柱具有类似的高柱效。从全多孔亚 2 μm 填料颗粒色谱柱向表面多孔填料颗粒色谱柱进行方法转移也是可行的。许多研发实验室选择使用亚 2 μm 填料颗粒色谱柱。然而，在有些情况下，亚 2 μm 填料颗粒色谱柱分析方法因需较高工作压力，可能无法转移到所有 HPLC 系统上运行。而大多数情况下，亚 2 μm 填料颗粒色谱柱分析方法能直接转移到表面多孔颗粒色谱柱上，不需对方法进行调整。对于有相似化学键合相和相同保留机制的 Agilent Poroshell 120 EC-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 等色谱柱而言，方法转移更为简单可行。此外，表面多孔颗粒色谱柱可运行与亚 2 μm 颗粒色谱柱的相同分析，但反压较低。它允许分析人员通过增加流速获得更高的分析通量，或在不超过系统压力上限的情况下增加柱长提高分辨率。

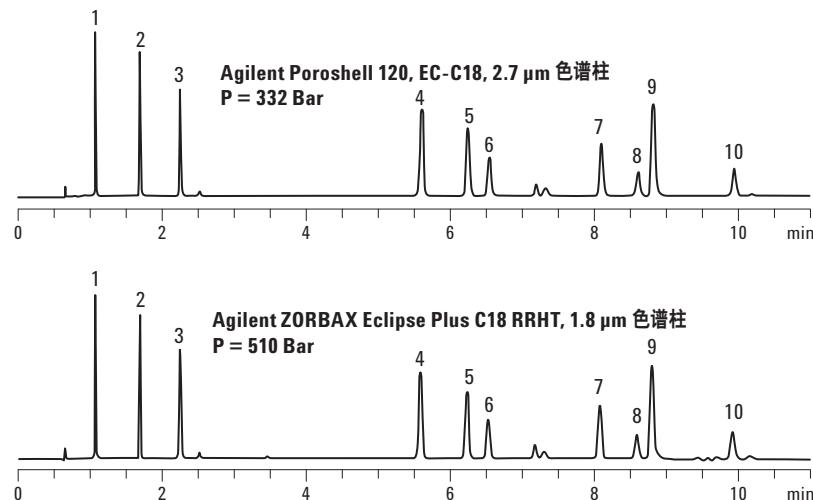
Agilent ZORBAX 系列色谱柱的优势之一是不同填料粒径色谱柱间可进行比例缩放。这就允许将研发方法快速、可靠地转移至实验室制备及高通量分析阶段。



Agilent Technologies

采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱最近的几次对比实验显示，二者分离谱图非常类似。Poroshell 120 色谱柱能够以 Eclipse Plus C18 等亚 2 μm 色谱柱的约 60 % 柱压，提供其 90 % 的柱效。Poroshell 120 表面多孔填料颗粒色谱柱拥有较大粒径色谱柱的低柱压，同时拥有亚 2 μm 颗粒色谱柱的分离性能。

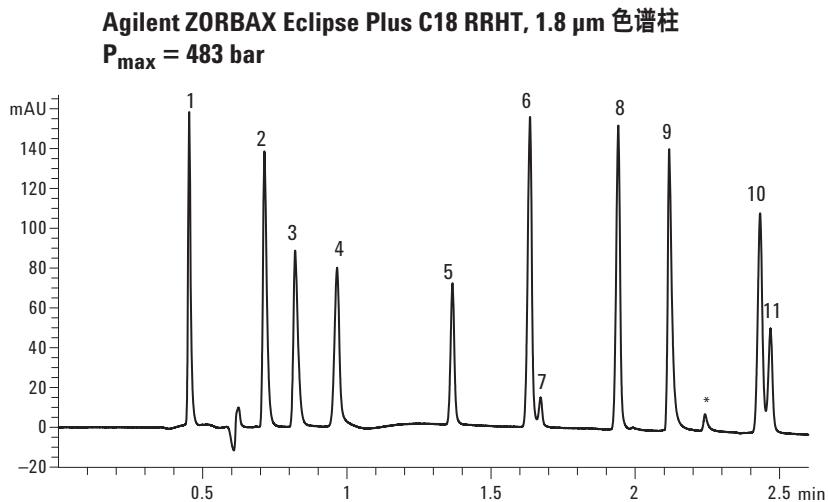
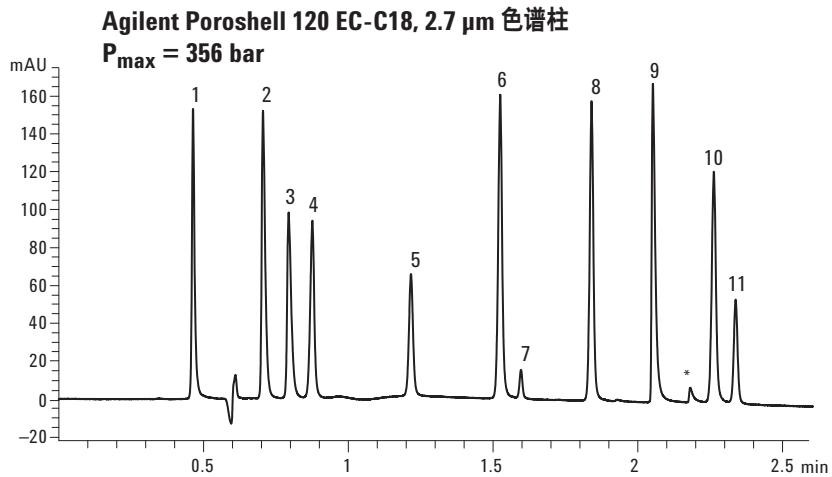
图 1 和图 2 为上述色谱性能的展示实例。图 1 为使用 0.1 % 甲酸流动相分离环境酚类，图 2 为使用 pH 4.8 的 10 mM 乙酸铵流动相分析软饮料中的添加剂。在这两组对比试验中，组分的保留顺序相同。然而，更加深入的问题是，Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Eclipse Plus C18 色谱柱在更加广泛的操作条件下，分离包括酸碱及中性化合物在内的更多化合物时，选择相似性如何？



分析条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm \times 100 mm, 2.7 μm 安捷伦部件号 689975-902
	Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHT C18, 4.6 mm \times 100 mm, 1.8 μm 安捷伦部件号 959964-902
流动相	A: 0.1% 甲酸 B: 乙腈 + 0.1% 甲酸
柱温	40 °C
检测波长	275 nm
进样量	10 μL
流速	2 mL/min
初始梯度	8% B, 在 10 min 的时间内升至 30%
1. 对苯二酚	6. 邻甲酚
2. 间苯二酚	7. 2-硝基苯酚
3. 邻苯二酚	8. 2, 3-二甲基苯酚
4. 对硝基苯酚	9. 2, 5-二甲基苯酚
5. 对甲酚	10. 1-萘酚

图 1. 使用乙腈和甲酸流动相以及 Agilent Poroshell 120 EC-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 两种色谱柱对环境酚类进行分析的比较图



分析条件

色谱柱 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm \times 100 mm, 2.7 μ m
 安捷伦部件号 695975-302

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT, 3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m
 安捷伦部件号 959964-302

流动相 A: 20 mM 乙酸铵, pH 4.80
 B: 乙腈

梯度程序 t_0 时 B 为 14%, 后在 2.1 min 内升至 52%

流速 0.851 mL/min

柱温 30 °C

- | | |
|-----------|--------------|
| 1. 抗坏血酸 | 7. 阿斯巴甜 |
| 2. 安赛蜜 | 8. 山梨酸 |
| 3. 糖精 | 9. 奎宁 |
| 4. 对羟基苯甲酸 | 10. 脱氢乙酸 |
| 5. 咖啡因 | 11. 对羟基苯甲酸甲酯 |
| 6. 苯甲酸 | * 奎宁杂质 |

图 2. 使用乙腈和乙酸铵流动相以及 Agilent Poroshell 120 EC-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 两种色谱柱对软饮料添加剂进行分析的对比图

实验部分

方法开发通常是以常规梯度洗脱为基础的。使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm 短色谱柱，可对几种不同的流动相进行快速评估。本实验的常规梯度流速为 2.0 mL/min。初始有机相比例 5%，后在 2 min 内升至 95%，保持 1 min。使用甲酸铵缓冲液和乙酸铵缓冲液等挥发性缓冲液组成的质谱兼容性流动相。通过将足量的甲酸铵或乙酸铵溶于水中，制成浓度为 10 mM 的溶液，再滴加适当浓度的酸调至所需 pH 值，制成缓冲液。缓冲液的 pH 范围是 3-6.5。

本实验采用 Agilent 1200 液相色谱方法开发解决方案：

- G1312B SL 型二元泵
- G1367D SL 型自动进样器(ALS)
- 两个 G1316C SL 型柱温箱(TCC)
- G1315C SL 型二极管阵列检测器(DAD)，采用 G1315-60024 微量流通池（光程 3 mm，体积 2 μ L）
- 采用 B.04.01 版化学工作站进行 HPLC 控制和数据处理

采用 Microsoft Excel 7.0 进行相关数据计算和曲线绘制

本实验使用四种类型的 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱：

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm × 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱 部件号 699975-902
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3 mm × 100 mm, 2.7 μ m 色谱柱部件号 695975-302
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱部件号 959943-902
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3 mm × 100 mm, 1.8 μ m 色谱柱部件号 959964-302

表 1 总结了本实验所研究化合物的清单，这些化合物用水或 50/50 水/乙腈溶液制备，单独进样。

表 1. 包括酸、碱和中性化合物在内的用 50/50 乙腈/水溶液制备的 66 种化合物列表，分别单独进样至 4.6 × 50 mm 色谱柱

检测化合物列表

呋喃唑酮	非那西丁
氯霉素	乙酰苯胺
英普咪定	苯酚
炔诺酮	间苯二酚
醋酸可的松	对苯二酚
氯霉素	4-硝基苯酚
盐酸丁螺环酮	邻甲基苯酚
苯佐卡因	1-萘酚
乙胺嘧啶	盐酸丙米嗪
磺胺喹恶啉	3, 4-二羟基-L-苯丙氨酸
磺胺间甲氧嘧啶	dl-苯丙氨酸
尼莫地平	盐酸麻黄碱
磺胺二甲氧嘧啶	洛哌丁胺
磺胺甲基异恶唑	二苯呋喃
磺胺氯达嗪	盐酸普鲁卡因
磺胺甲氧嗪	硝酸益康唑
磺胺甲噻二唑	吉非罗齐
磺胺甲嘧啶	β-雌二醇
磺胺噻唑	美托洛尔
磺胺嘧啶	普罗替林
苯甲醛	羟基间苯二甲酸
菲	氟灭酸
联苯	盐酸丙吗卡因
危	萘普生
甲氧基奈	苯海拉明
二甲氧基苯	二氟尼柳
α-羟孕酮	尼索地平
孕酮	双氯芬酸
泼尼松龙	氢化可的松
去氧皮质酮	盐酸普鲁卡因胺
马来酸氯苯吡胺	利多卡因
小檗碱	特非那丁
盐酸金霉素	马来酸氯苯那敏

讨论

Wilson、Nelson、Gilroy、Dolan、Snyder 和 Carr 等诸多学者，都曾对色谱柱性能差异进行过研究[5,6]。美国药典收录了很多色谱柱[7]和判定色谱柱之间是否能进行互换的方法。硅胶的化学结构和键合特性等差异能改变色谱柱的选择性。硅羟活性通过次级相互作用显著影响峰形。此外，硅羟基也可以通过氢键或离子交换作用影响柱选择性。与较低 pH 值相比，上述影响在较高 pH 值条件下更为明显[8]。Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱均由安捷伦采用同一硅胶制备工艺生产装填。这两种色谱柱皆为高惰性柱，在分离碱性化合物时也可获得优异的峰形。硅羟基活性除了受 pH 值影响以外，也受到溶剂类型的影响。甲醇是氢键型溶剂，洗脱强度弱于质子惰性的乙腈[10]。通过广泛的条件筛选，色谱柱间的选择性差异将会显露出来。

图 3 显示了使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱运行常规梯度分析不同类型的 66 种化合物时，各化合物在两种色谱柱上保留时间的相似性。高相关系数(R^2)表明在分离过程中，两种安捷伦 C18 色谱柱与组分间的相互作用类似性极高，斜率约为 1 表明相互作用强度类似[9,10]。

使用乙腈和 pH 3-6.5 的 10 mM 甲酸铵或乙酸铵缓冲液为流动相的常规梯度洗脱

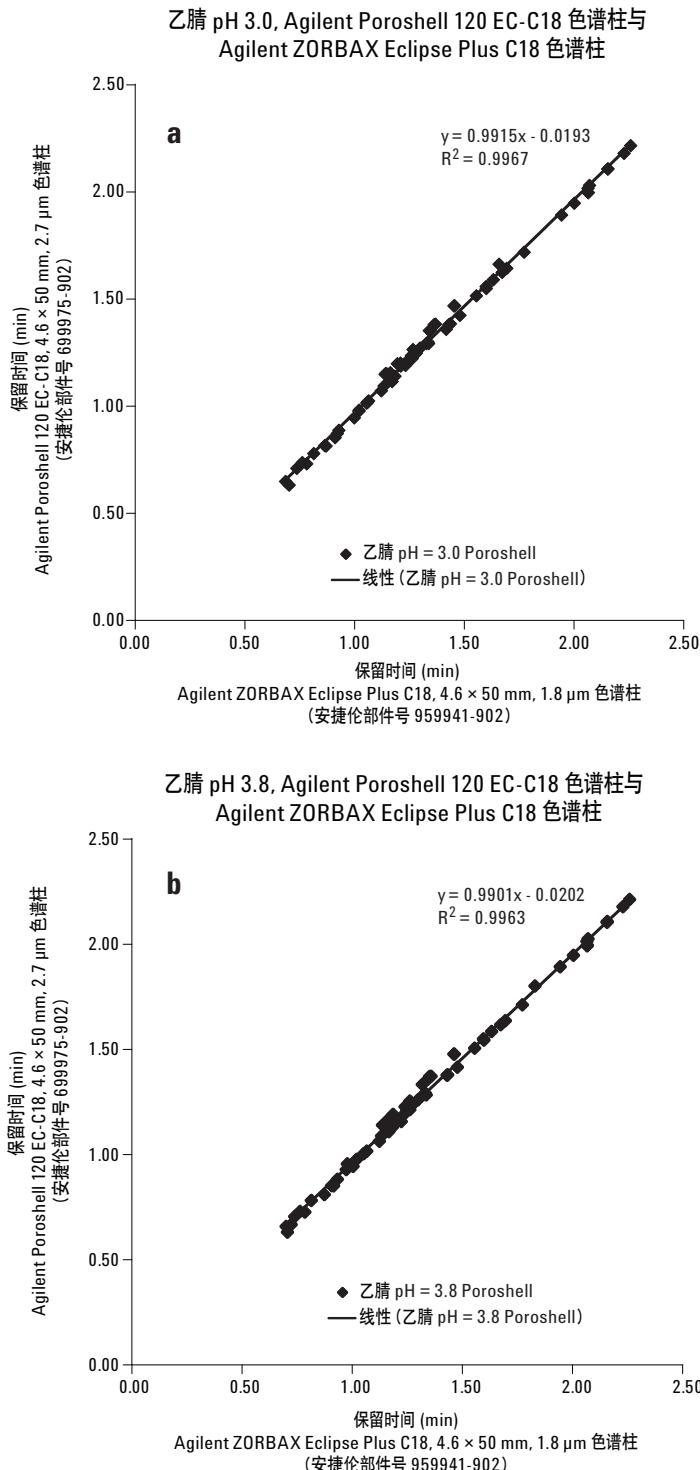
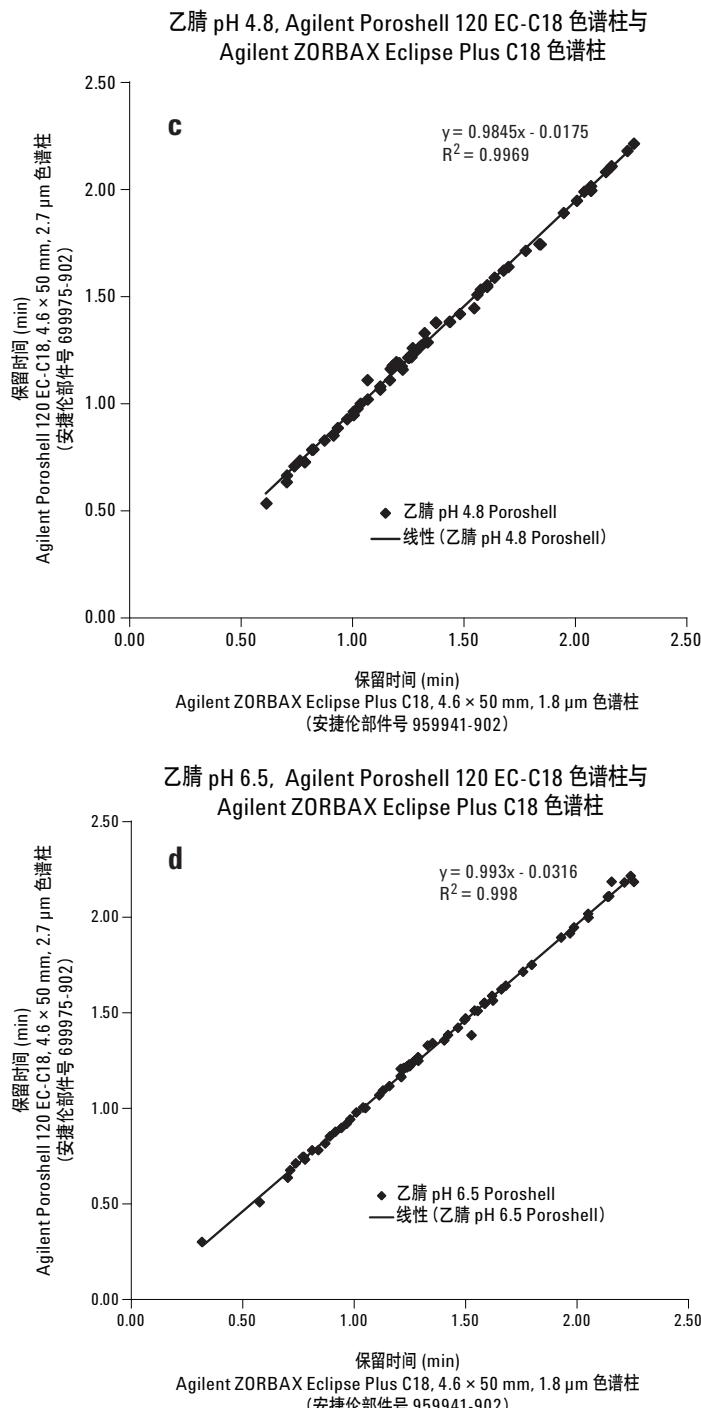


图 3. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图 (续)



分析条件

流动相

A: 10 mM 缓冲液

B: 有机相 (乙腈)

梯度程序

t_0 时 B 为 5%, 后在 2 min 内升至 95%, 保持 1 min

流速

2 mL/min

样品

1 μ L 浓度为 1 mg/mL 标准品的水或水/乙腈溶液

图 3. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图

图 4 显示了采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱在 pH 3 至 6.5 的范围内, 以乙腈为流动相, 分离 66 个化合物的保留时间散点图。图 4 显示了在 pH 3 至 6.5 的范围内, 以甲醇为流动相的保留时间散点图。表 2 列出了各组实验数据的斜率和 R^2 值。如表所示, 两曲线的相关性非常高。虽然离子型化合物的保留时间有时会发生改变, 但在两种色谱柱上的变化趋势是一致的。当对比乙腈和甲醇流动相条件下的实验数据时, 发现相关曲线斜率存在轻微差别 (斜率分别为 0.99 和 1.01), 这些轻微差别可能意味着 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱在氢键相互作用方面存在一些差异, 但该现象不会影响两种色谱柱间的方法转移, 且这仅为大量实验和本文化合物研究的测定结果。

采用甲醇和 pH 3-6.5 的 10 mM 甲酸铵或乙酸铵缓冲液为流动相的常规梯度洗脱

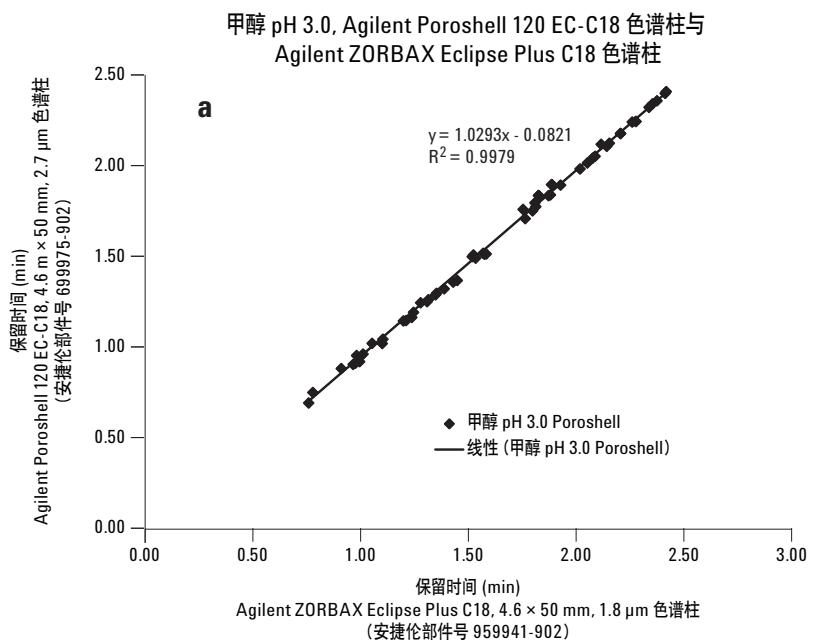


图 4. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图 (续)

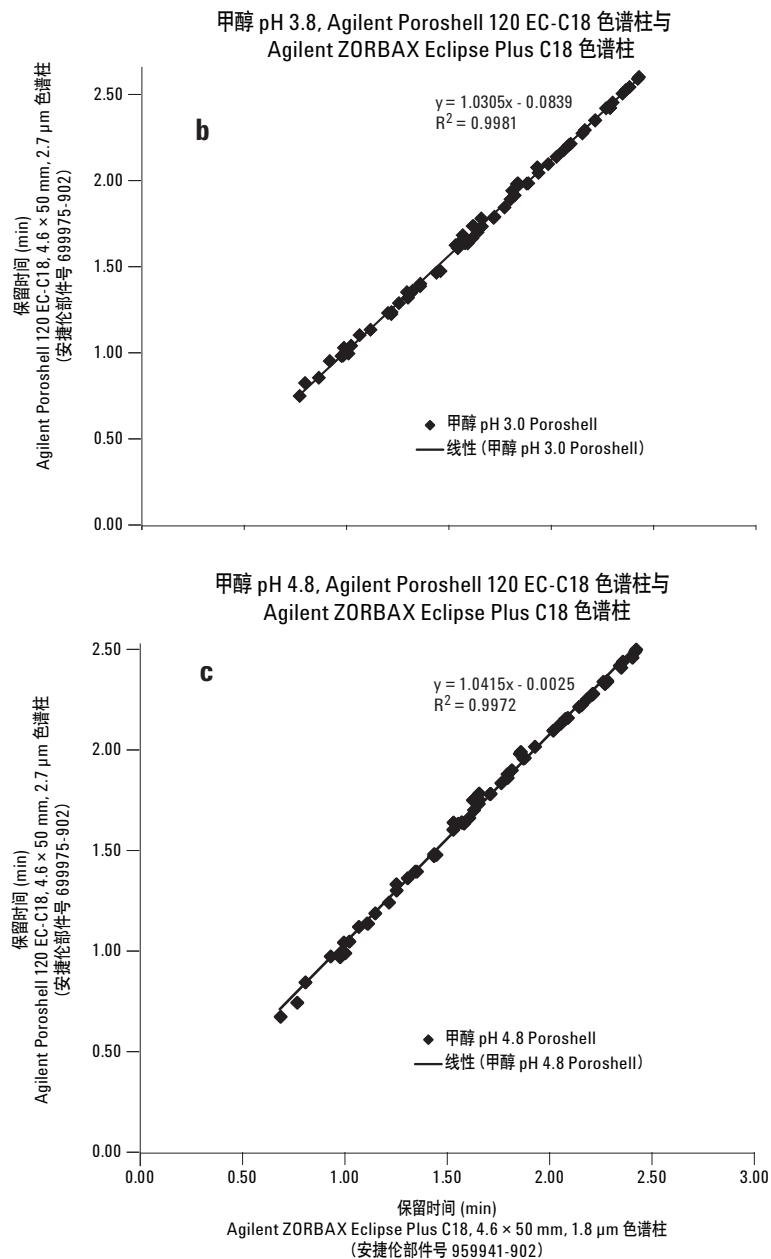
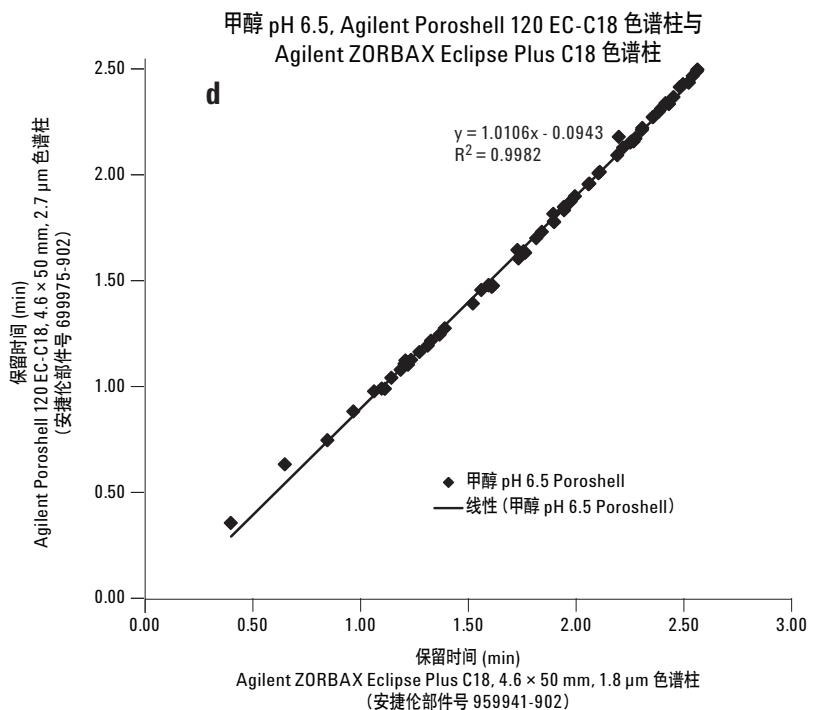


图 4. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图 (续)



分析条件

流动相

A: 10 mM 缓冲液

412 413

B: 有机相 (甲醇)

梯度

t_0 时 B 为

流速

2 mL/min

图 4. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μ m 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus

乙腈	甲醇
a. pH = 3.0 y = 0.9915x - 0.0193 R ² = 0.9967	a. pH = 3.0 y = 1.0293x - 0.0821 R ² = 0.9979
b. pH = 3.8 y = 0.9901x - 0.0202 R ² = 0.9963	b. pH = 3.8 y = 1.0305x - 0.0839 R ² = 0.9981
c. pH = 4.8 y = 0.9845x - 0.0175 R ² = 0.9969	c. pH = 4.8 y = 1.0415x - 0.002 R ² = 0.9972
d. pH = 6.5 y = 0.993x - 0.0316 R ² = 0.998	d. pH = 6.5 y = 1.0106x - 0.0943 R ² = 0.9982

相对于亚 $2 \mu\text{m}$ 色谱柱而言, Agilent Poroshell 120 色谱柱的另一优点在于柱压较低。柱压与色谱柱填料粒径相关, 较大粒径色谱柱一般比较小粒径色谱柱产生的压力低。除粒径因素外, 柱压还受溶剂线速度、给定组成和温度条件下溶剂的黏度等因素的影响。在本梯度洗脱实验中, 黏度最大的溶剂组成比例是组成处于 40/60 和 50/50 之间的甲醇/水体系, 25°C 时黏度为 1.62 cP 。黏度最大的乙腈流动相溶剂组成是 10/90 乙腈/水体系, 25°C 时黏度为 1.01 cP [11]。由文献可知, 溶剂黏度与温度成反比。Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱在两种溶剂条件下柱压与线速度的关系如图 5 和图 6 所示 (使用 100 mm 柱长的色谱柱说明)。如上所述, 该优点允许 Poroshell 120 色谱柱在与 $2 \mu\text{m}$ 色谱柱相同的柱压下使用更长的色谱柱 (实现更大进样量), 或使用更高的流速。

在孔径尺寸差异更重要的情况下, 色谱柱间就容易出现选择性差异, 尤其是分离分子量位于 1500 和 2500 之间的化合物。此外, 分离具有结构选择性的 PAH 等化合物, 不同色谱柱对其选择性的差异难以确定。

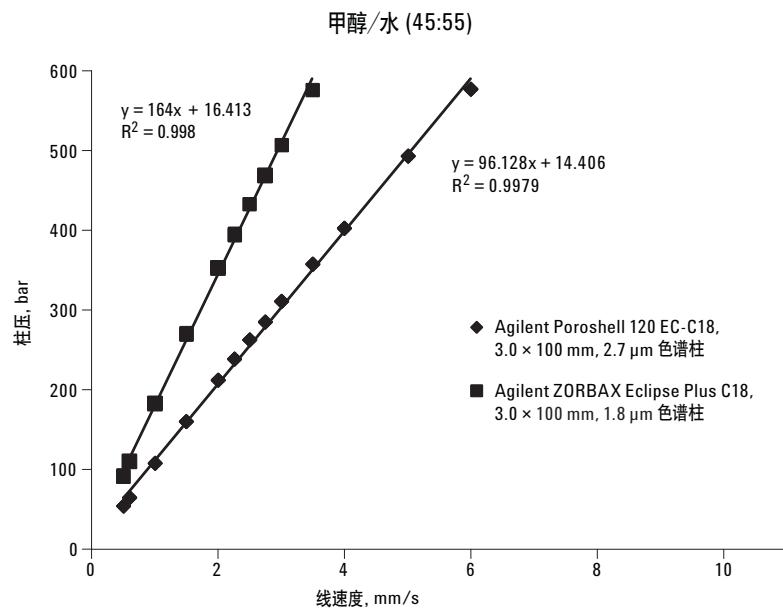


图 5. 不同线速度条件下所测柱压表明, 相同柱长的 Agilent Poroshell 120 EC-C18, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱比 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱柱压低

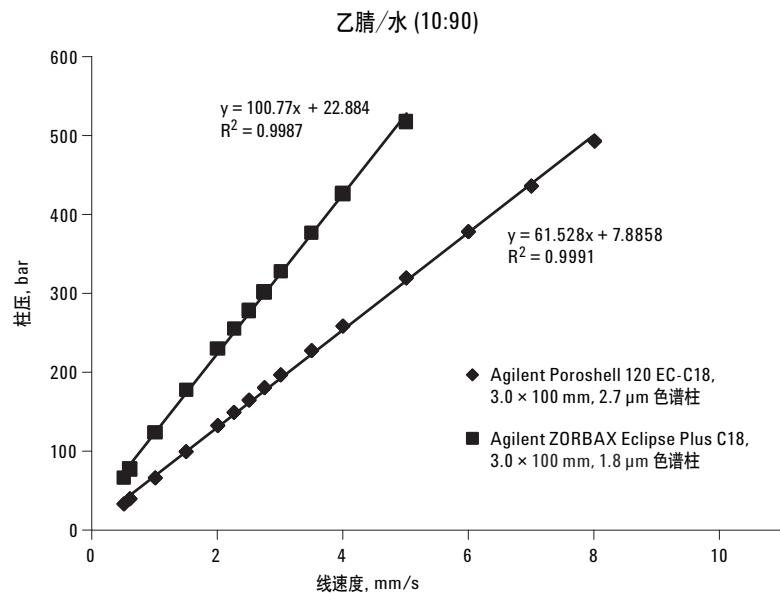


图 6. 在不同线速度条件下测得柱压表明, 相同柱长的 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱比 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 μm 色谱柱柱压低

结论

本研究表明, Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱在广泛的 pH 值和流动相条件下, 具有同等的选择性。两种色谱柱采用类似的材料, 并以性质相似的化学键合相进行制备。两种色谱柱在低 pH 值、不影响其他化合物分离效果的前提下, 能够提供分离碱性化合物的极佳峰形。使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的优势是可在较低反压条件下获得高效分离。本研究表明, 如有需要, 基于 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的方法能可靠地转移至 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上, 且方法的反向转移风险低。

参考文献

1. W. Long, A. Mack, “使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分析环境中的酚类” 2010 年 8 月 3 日, 5990-6156CHCN。
2. W. Long, A. Mack, “将现有肉类抗生素分析方法转换和优化为使用 MS/MS 检测的安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱分析方法” 2010 年 8 月 5 日, 5990-6238CHCN。
3. A. Gratzfeld-Hüsgen, E. Naegele, “Maximizing Efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns”, Agilent Technologies Publication 5990-5602EN, 2010.
4. A. Mack, W. Long, Fast, “使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 表面多孔色谱柱对食品和饮料添加剂进行快速低压分析”, 安捷伦出版物 5990-6082CHCN, 2009.
5. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, “Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography IV. Type-B alkyl-silica columns”, Journal of Chromatography A, 1000 (2003) 757–778.
6. N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, “Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in condition”, Journal of Chromatography A, 961 (2002) 195–215.
7. United States Pharmacopeia “The PQRI approach for selecting columns of equivalent selectivity” <http://www.usp.org/USPNF/columnsPQRIapproach.html>.
8. V. Meyer, *Practical High Performance Liquid Chromatography*, Fourth Ed., p 34, Wiley, 2004.
9. K. Croes, A. Steffens, D. Marchand, L. Snyder, “Relevance of π–π and dipole–dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography”, Journal of Chromatography A, Volume 1098, Issues 1-2, 9 December 2005, Pages 123-130.
10. W. Long, A. Mack, “Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns using Acetonitrile or Methanol”, Agilent Technologies Publication 5990-4711EN, 2009.
11. Agilent Method Translator, June 1, 2006, 5989-5130EN.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误, 以及由于提供、展示或使用本材料所造成的直接或间接损失概不负责。

本出版物所含信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

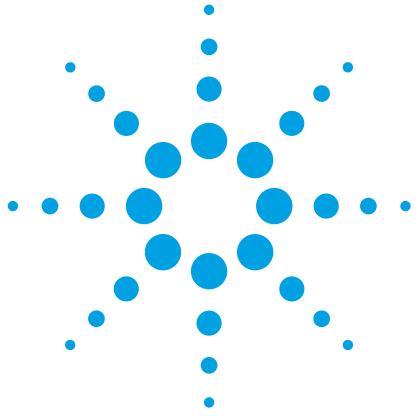
©安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017

中国印刷

2017 年 3 月 1 日

5990-6588CHCN

 Agilent Technologies



在高 pH 下使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱作为方法开发的工具

技术概述

前言

开发出适合化学分析和药物分析的 HPLC 方法是一项极具挑战性的任务。为获得足够的分离度并实现稳定分离，涉及到对各种色谱参数的筛选。尽管开发方法的途径有很多，比如一次一因子实验法，以及质量源于设计 (QbD)，不过优化分离的目标和因子还是相同的。有很多因素影响色谱分离度 (RS)，如效率 (N，取决于粒径、粒子形态以及色谱柱长度)、保留因子 (k，取决于溶剂强度) 和选择性 (a，取决于键合相和流动相) 的 (图 1)，其中选择性 a 是最重要的因素。

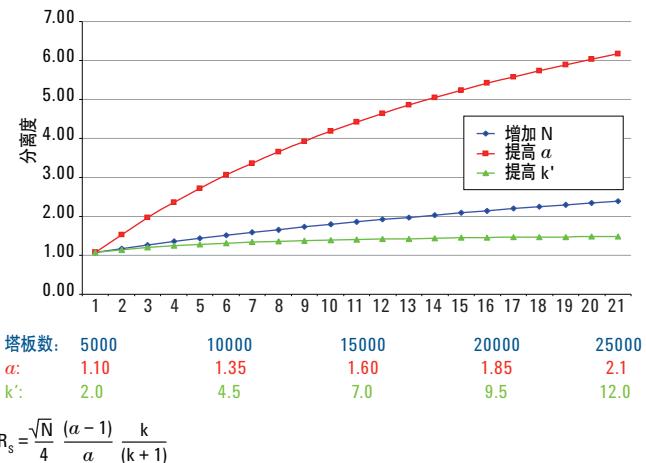


图 1. 典型的方法开发参数：选择性、效率以及保留时间对分离度的影响



Agilent Technologies

方法开发涉及到简单及复杂混合物的分离。选择性受固定相、有机改性剂类型、梯度斜率、流速以及温度等多个因素的影响。对于可离子化的化合物来说，缓冲液的 pH 值也是一个重要参数。优化可离子化化合物的分离以寻找稳定条件已经成为液相色谱方法开发的重要组成部分 [1]。大部分制药和生物化合物都含有可离子化的官能团（如羧基或氨基）。在反相液相色谱（RPLC）分离方面，使用 pH 是一种增加选择性的有效工具。低 pH 下可分离质子化的酸和碱，但是高 pH 条件下这些酸与碱会去质子化。分析物在反相色谱上的保留很大程度取决于其电荷，因此可利用 pH 使选择性发生较大的变化。在酸性 pH 下，酸会呈中性，因此保留时间最长；碱由于完全带电荷而保留时间最短。在碱性 pH 下（高于化合物的 pKa），碱则呈中性，因此保留时间最长；而酸会完全离子化使得保留时间最短。为了使碱性分析物在 RPLC 上获得最佳的峰形、保留时间以及样品上样量，流动相的 pH 至少应该比目标化合物的 pKa 高两个单位。中性化合物的保留则不受 pH 影响。在本文中，使用专门设计的且在高 pH 流动相中能保持稳定的 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱，通过 pH 的调节来达到对选择性的控制。

材料与方法

本文使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统。

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 G1312B
- 安捷伦自动液体进样器 (ALS) G1367C
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (TCC) SL G1316C
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD) G4220A (光程 10 mm, 体积 1 μ L)
- 使用 OpenLab (C.01.05 版) 控制 HPLC 并处理数据
- Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 \times 50 mm, 2.7 μ m (部件号 699775-702) 或 Poroshell HPH-C18, 4.6 \times 50 mm, 2.7 μ m (部件号 699975-702)

某些实验中还采用了 Agilent 6140D 单四极杆液质联用系统。

表 1. 保留相关性实验中用到的化合物

样品名	
1,2-邻苯二甲醚	雌酮
1,2-二硝基苯	炔雌醇
1,2,3-三甲氧基苯	4-羟基苯甲酸乙酯
1,2,4-三甲氧基苯	苯氯苯丙酸
1,2,5-三甲氧基苯	氟西汀
1,3-邻苯二甲醚	呋喃唑酮
1,3-二硝基苯	橙皮苷
1,4-二硝基苯	氯化可的松
2,3-二甲苯酚	易加乐斯 1330
2,4-二氯苯酚	酮洛芬
2,4-二甲基苯甲酸	拉贝洛尔
2,5-二羟基苯甲酸	间硝基苯酚
2,5-二甲基苯酚	甲芬那酸
2-羟基马尿酸	纳多洛尔
2-萘磺酸	萘普生
3,4-二甲氧基苯甲酸	柚皮素
3-硝基苯酚	尼索地平
对羟基苯甲醛	醋酸炔诺酮
4-羟基苯甲酸	去甲替林
4-硝基苯酚	对甲酚
5-羟基间苯二甲酸	对硝基苯酚
8-羟基喹啉	五氯酚
醋丁洛尔	非那西丁
乙酰水杨酸	菲
阿普洛尔	心得乐
阿米替林	氯杂环己烷
睾酮	吡罗昔康
安替比林	普伐他汀
对乙酰氨基酚	泼尼松
阿替洛尔	普鲁卡因
阿托伐他汀	孕酮
β -雌二醇	丙嗪
倍氯米松	心得安
苯佐卡因	普罗替林
苯甲酸	乙胺嘧啶
二苯甲酮	奎宁
苯甲醇	间苯二酚
倍他米松	水杨酸
联苯 (DMSO)	水杨酸
布他卡因	磺胺氯哒嗪
丁基苯	磺胺嘧啶
对羟基苯甲酸丁酯	磺胺索辛
丁羟茴醚	磺胺甲嘧啶
丁羟甲苯	磺胺二甲嘧啶
苯丁酮	磺胺甲噻二唑
咖啡因	新诺明
邻苯二酚	磺胺甲氧哒嗪
氯霉素	磺胺间甲氧嘧啶
皮质酮	磺胺喹噁啉
地昔帕明	磺胺噻唑
地塞米松	舒林酸
双氯芬酸	睾酮
邻苯二甲酸二乙酯	丁卡因
二氟尼柳	托美汀
邻苯二甲酸二异丙酯	去炎松
邻苯二甲酸二辛酯	曲米帕明
邻苯二甲酸二丙酯	Ultranox 276
多塞平	尿嘧啶
	苯戊酮

使用的流动相由挥发性缓冲液如甲酸铵、乙酸铵和碳酸氢铵缓冲液组成，可与质谱兼容。将适量的甲酸铵或碳酸氢铵溶于水中，制成 10 mM 的溶液，然后用浓酸（甲酸或乙酸）或浓碱（氢氧化铵）调至所需的 pH，即可得到上述缓冲液。用于评估的混合物包括酸（乙酰水杨酸和二氟尼柳）、碱（普鲁卡因酰胺、双嘧达莫和地尔硫卓）以及中性化合物（苯己酮及杂质苯戊酮）。非离子化的咖啡因也进行了评估。

使用 pH 影响选择性

图 2 展示了由酸性、碱性及中性化合物组成的混合物的洗脱顺序是如何随流动相的 pH 值的改变而变化。在本研究中，添加了有机改性剂乙腈于普通梯度中（浓度在 4 分钟内从 10% 升至 90%）。该图分别给出了使用质谱兼容的 pH 3（甲酸铵）、pH 4.8（乙酸铵）以及 pH 10（碳酸氢铵）的缓冲液得到的色谱图。流速为 2 mL/min。

如图所示，三张色谱图中使用了相同的梯度和色谱柱。中性化合物（苯己酮）和非离子化化合物（咖啡因）的洗脱时间保持不变。这两种化合物的洗脱不受 pH 改变的影响。随着流动相的 pH 从 4.8 升至 10，酸性化合物开始带电荷，保留时间也变短了。从图 2 中的红箭头可以清楚地看到这一点。随着 pH 的升高，如蓝箭头所示，碱的保留时间变长。各个峰的洗脱顺序变化很大，同样发生变化的还有峰间距。在这三张色谱图中，峰形都非常出色。在本研究中，使用 pH 10 的缓冲液得到化合物的峰间距比使用其他两个缓冲液的大。与使用低 pH 流动相相比，使用高 pH 流动相时碱的保留时间更长，峰形也更好。

观察选择性的另一种方法是对两种不同条件下酸、碱和中性化合物的保留时间作图。该研究中用到的化合物见表 1。在本例中，使用 Poroshell 120 HPH-C18 色谱柱，采用相同梯度以及两种不同有机改性剂（甲醇和乙腈），在两种不同 pH 条件（pH 3 和 pH 10）下对 117 种化合物进行了分析。采用的普通梯度为流速 0.42 mL/min，起始时有机相比例为 5%，在 4 分钟内升至 95%，保持 2 分钟。

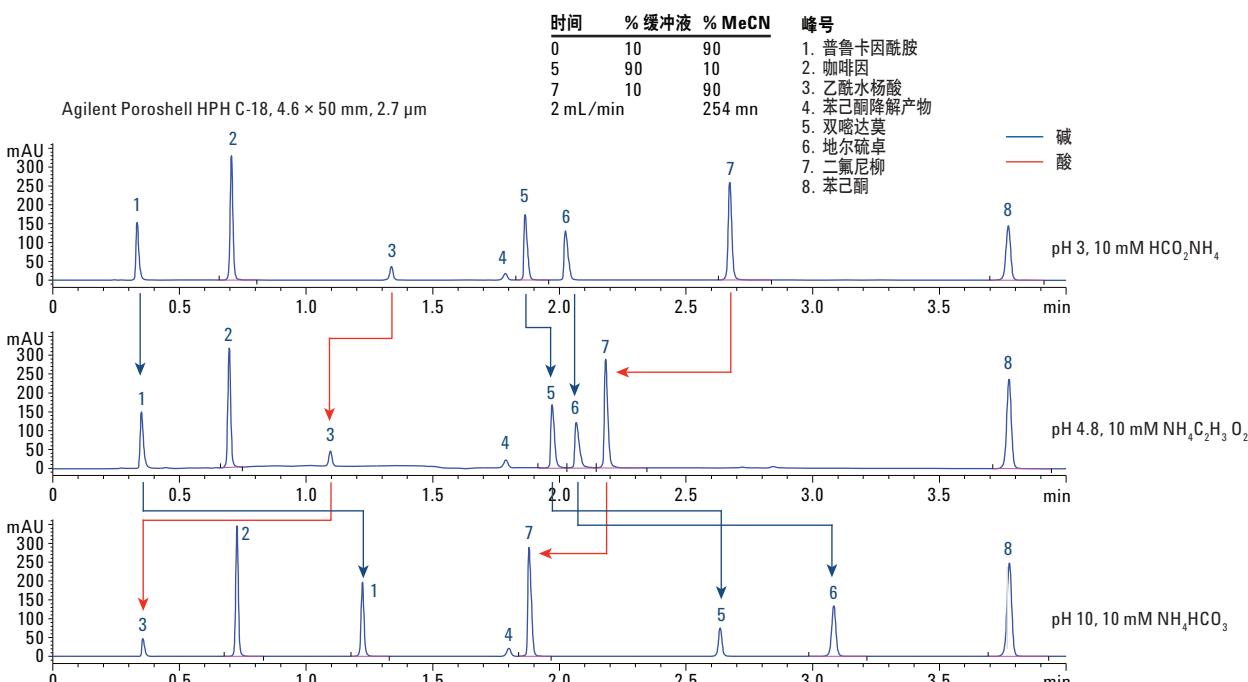


图 2. 使用 Agilent Poroshell HPH-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 液相色谱柱时通过改变 pH 控制选择性（pH 分别为 3、4.8 和 10）

如图 3A 所示，一部分分析物呈现了斜率为 1 的完美直线。使用甲醇作为有机改性剂时这些化合物为中性或不可离子化。它们包括取代苯类化合物、类固醇、酚类和苯酮。正如所预料的那样，这些物质的保留时间不受流动相 pH 的影响。以往的研究中应用了这一方法并做了讨论，在该研究中，研究人员在相似的色谱条件下对两种极其相似的色谱柱（Agilent Poroshell 120 EC-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18）进行了对比 [2]。在直线上面的是碱类分析物。pH 3 时，这些化合物带电荷，当 pH 升至 10 时，它们不带电荷，保留时间也变长了。保留时间相关系数可用于衡量在两种不同 pH 条件下分离的差异。高度相关的图其相关系数接近 1。这表明两种 pH 条件下色谱分离相似。相反，如果相关系数很小（接近 0.5 甚至更低），则表明分离更为正交或是不同。图 3B 所示为第二种对比，即用乙腈作为有机改性剂，对比低 pH 和高 pH 的梯度时保留时间的情况。在本例中，相关系数比使用甲醇时的更小 [2,3,4]。

高 pH 下提高了 LC/MS 对碱性化合物的灵敏度

在第三个实验中，在正离子电喷雾模式下使用普通梯度比较了几种碱在高 pH 和低 pH 条件下的 LC/MS 分析结果。人们通常认为分析物分子的离子化情况取决于流动相的 pH，使用高 pH 流动相时，LC/MS 正离子电喷雾模式下的离子化效率会显著降低，因为此时化合物成为中性了。但是，许多研究人员对不同类型的样品（包括蛋白质、肽和氨基酸）作了观察，结果在高 pH 下发现离子化效率对流动相 pH 不敏感，甚至会提高效率。

已有报道称，使用高 pH 缓冲液的流动相在 ESI+ 模式下成功测定了碱性化合物 [5-10]。在 ESI+ 模式下，高 pH 流动相不会抑制碱性化合物的离子化；相反，会生成大量正离子，而且在高 pH 条件下分析物的响应通常比使用酸性流动相的响应更强。这一发现极为重要，它将普通洗脱方法的适用性，扩展到之前很难保留的极性碱性化合物的分析。

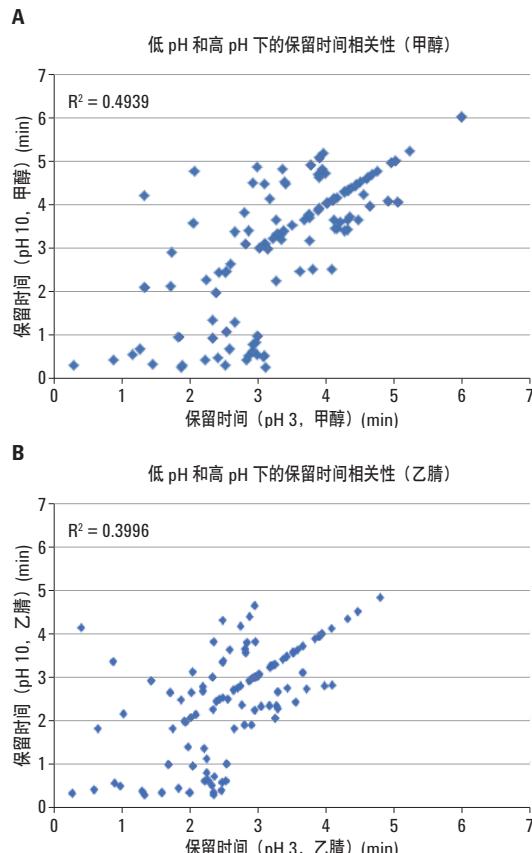


图 3. 使用 Agilent Poroshell HPH-C18 柱在 pH 3 和 pH 10 下分析所得的保留时间的相关性。A) 甲醇, B) 乙腈

在本实验中，使用乙腈作为有机改性剂来运行梯度。水相溶剂含 0.1% 甲酸、低 pH 流动相改性剂或 10 mM pH 10 的碳酸氢铵。在上述的示例中，制备了 0.01 mg/mL 利多卡因的水溶液。进样量为 1 μ L。如图所示，使用的色谱柱为 Poroshell HPH-C18 柱，下图为低 pH 下分析所得的色谱图，分析物在柱上只有轻微保留，而且峰出现拖尾。上图中，分析物的峰保留更好，峰形更佳，而且峰高是下图的 2 倍。由于上图中流动相中有机相的含量更高，有利于 LC/MS 检测，因此峰面积也明显比下图的大。总而言之，有机相越易挥发，离子化效率越高，而导致较高的信号强度。

另外还对普鲁卡因酰胺和地尔硫卓进行了分析。这两种化合物信号强度的增加没有利多卡因那么显著。雾滴形成过程中溶剂挥发速率是流动相蒸汽压的函数。乙腈:水比例越大,流动相挥发性越强,对ESI离子化也越有利。

图4A至4C的结果表明,在对碱性化合物进行ESI+LC/MS分析时,高pH流动相是替代低pH流动相的理想选择。

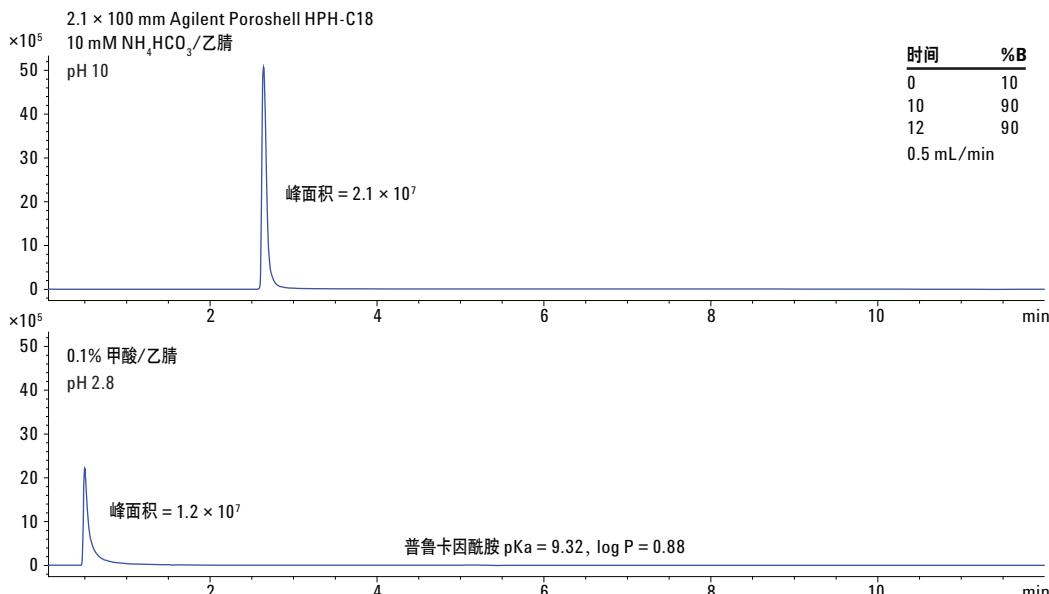


图4A. 使用正离子电喷雾模式时高pH及低pH条件下碱(普鲁卡因酰胺)的LC/MS分析结果的对比, pKa 9.32, logP 0.88。Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 x 100 mm

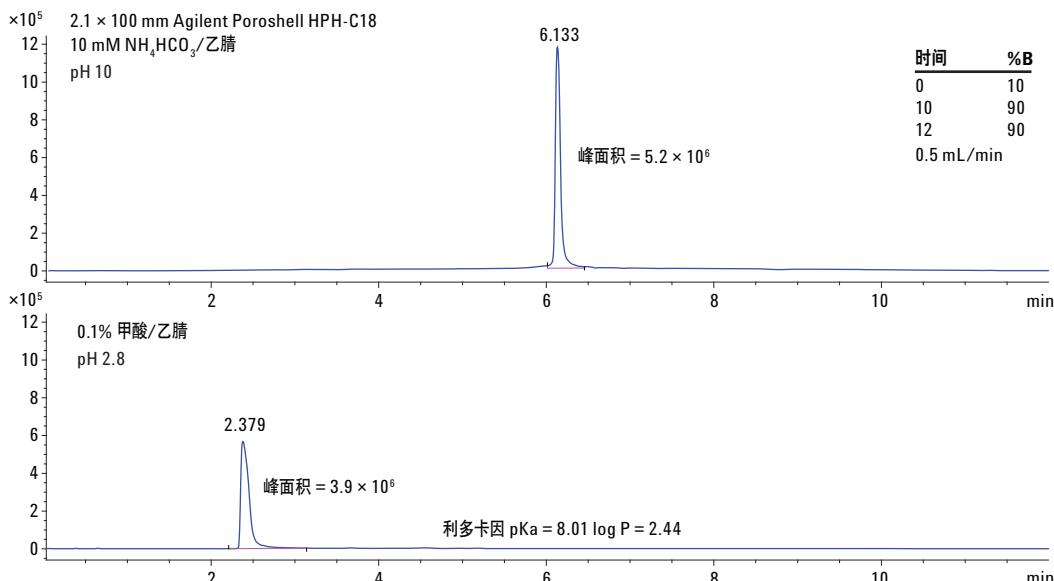


图4B. 使用正离子电喷雾模式时高pH及低pH条件下碱(利多卡因)的LC/MS分析结果的对比, pKa 8.01, logP 2.44。Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 x 100 mm

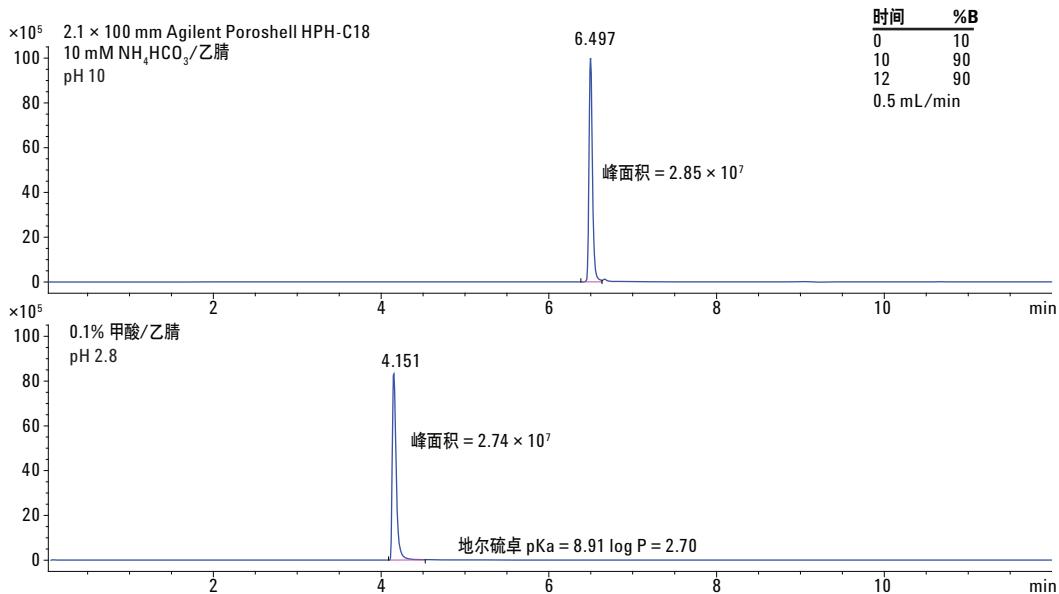


图 4C. 使用正离子电喷雾模式时高 pH 及低 pH 条件下碱（地尔硫卓）的 LC/MS 分析结果的对比，
pKa 8.91, logP 2.70。Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 × 100 mm

高 pH 条件下 Poroshell HPH-C18 的稳定性

HPLC 色谱柱的稳定性是影响方法性能的关键因素之一，人们对此开展了广泛研究。温度、水相缓冲液类型及浓度、有机溶剂的选择、添加剂、以及流动相的 pH 对 色谱柱的稳定性都有影响。预筛选化合物及色谱柱可帮助科学家们更快地实现成功分离。HPLC 色谱柱的稳定性是影响方法性能的关键因素之一。采用一根耐用的色谱柱而获得稳定的 HPLC 方法是对新临床及制造项目的重要支持。如果方法开发过程中色谱柱不稳定，会使得结果不准确并导致开发失败。

色谱柱恶化是由硅胶溶解、键合相消除、或者封端流失（水解）导致硅醇暴露等引起的。众所周知，硅胶柱的溶解或水解与 pH 和温度有关（pH/温度越高，恶化速率越快）。色谱柱恶化的其他原因还包括样品前处理不充分（样品脏）以及柱床不稳定。

特定 pH 下衡量色谱柱稳定性的一个很好的标准是进样 500 次。这有利于在方法已建立的条件下开发、调整并使用色谱柱。在本研究的这一部分，使用碳酸氢铵和乙腈在 pH 10 下对 Poroshell HPH-C18 色谱柱进行了评估。分析物包括酸性、中性以及碱性化

合物。为了评估来自不同制造商的色谱柱，采用了常规的压力梯度，通过改变分析物来适应选择性方面的差异。在所有情况下，至少使用了两种酸、碱以及中性化合物。

此处讨论的方案评估了流动相改性剂对色谱柱稳定性的影响 [11]。样品溶液的影响可忽略不计，因为样品的上样量只有几 μg 。所选择的测试混标用于评价色谱柱性能，而不是评价测试样品本身对色谱柱稳定性的影响。开发过程中，为了最大限度减少来自柱床稳定性的问题，采用了低的流速。如图 5A 所示，除了去甲替林外，进样 2000 次期间，其他所有化合物的保留时间均相当稳定。去甲替林的 pKa 非常接近流动相的 pH，保留时间变得越来越长。

在同样的实验条件下对其他品牌的另一根色谱柱进行了测试。在进样 2000 次期间，大部分分析物的保留时间保持不变。去甲替林的洗脱时间迅速变得越来越晚。进样在 500 次以内时，去甲替林与邻近的中性化合物苯己酮开始共流出。峰继续向苯己酮峰移动，在进样 2000 次后完全共流出。这一实验表明与 Poroshell HPH C18 色谱柱相比，非安捷伦的色谱柱恶化程度更大。随着样品的改变，峰高也会发生变化。

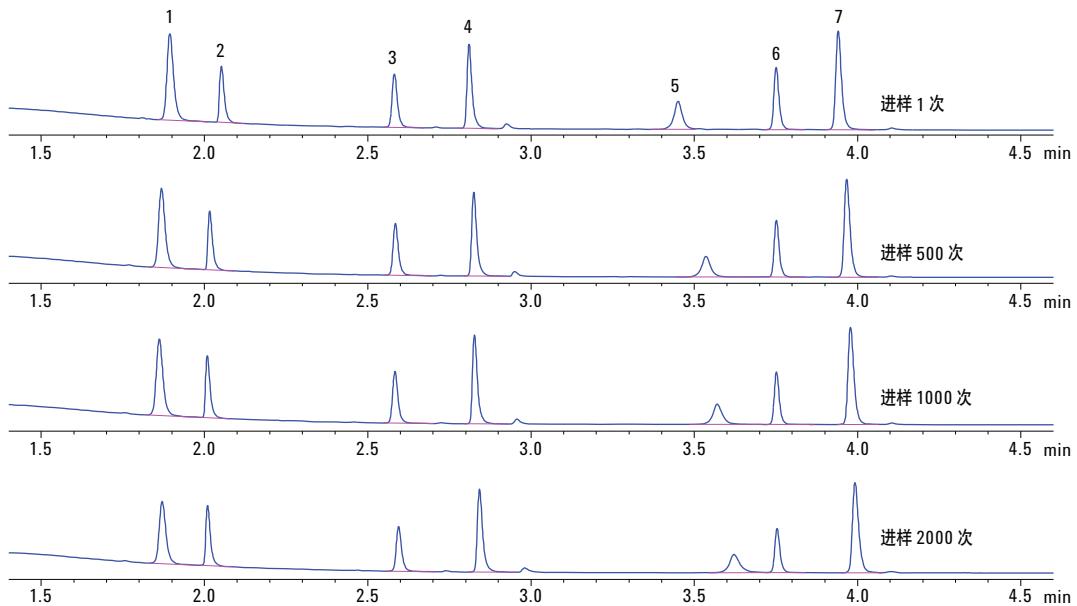


图 5A. 即使在高 pH 碳酸氢铵条件下 Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱也获得了出色的保留 (方法总运行时间 = 7 min, 流速 0.4 mL/min)

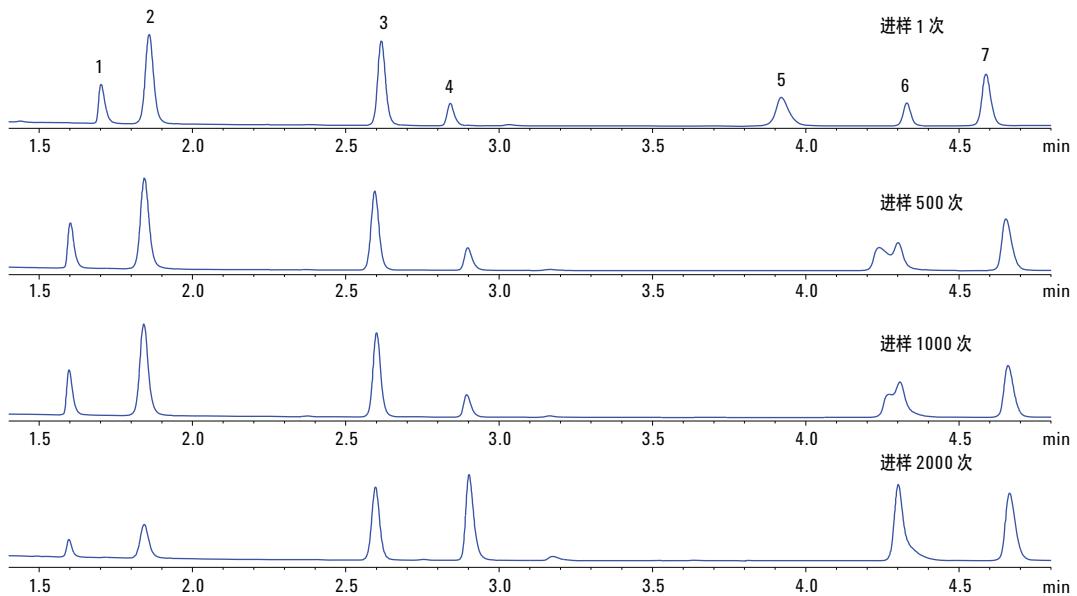


图 5B. 竞争者 3 μm 色谱柱在高 pH 碳酸氢铵条件下出现了更严重的降解

结论

采用 Agilent Poroshell HPH C18 色谱柱时，可利用 pH 调整选择性，而且不会牺牲色谱柱在高 pH 下的寿命。保持梯度不变而改变 pH，8 种酸、碱以及中性化合物的洗脱顺序会发生很大的变化，色谱分离度也因此会有所改变。在第二个实验中，使用普通梯度对 pH 3 和 pH 10 下的保留时间作图并确定相关系数。用 R^2 衡量正交性。我们发现两种 pH 条件提供了不同的选择性。使用 pH 作为方法开发的工具非常有效，尤其当样品含有酸性或碱性化合物时更是如此。我们还研究了高、低 pH 下几种碱性化合物在梯度 HPLC 上的正离子电喷雾质谱特性。在本例中，我们发现碱性化合物的峰形得到了改善，而且保留时间也延长了。我们还发现，从峰面积角度来说，信号增强了。这一影响并非普遍现象，有可能与化合物有关。在任何情况下，碱类化合物在高 pH 时的信号都没有变弱。最后，我们确定，在 25 °C 下使用 pH 10 的碳酸氢铵时，Poroshell HPH C18 色谱柱的使用寿命更长（可超过 2000 次进样）。在 Poroshell HPH C18 柱上利用 pH 作为方法开发的工具，色谱工作者可最大限度提高方法开发和分析的灵活性，而 Agilent Poroshell 120 系列产品的耐用特性和长寿命也能让其从中获益。

参考文献

1. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd Edition, p. 29. John Wiley & Sons, Inc., New York (2010)
2. Anon., “Poroshell 120 EC C18 和 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱之间的方法转换”，安捷伦科技公司技术概览，出版号 5990-6588CHCN, 2011
3. K. Croes, A. Steffens, D. Marchand, L. Snyder. *J. Chromatog. A.* **1098**, 123 (2005)
4. W. Long, A. Mack, “Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns Using Acetonitrile or Methanol”（对比使用乙腈或甲醇时不同 Agilent ZORBAX Phenyl 色谱柱在选择性方面的差异），安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-4711EN, 2009
5. Raluca-Iona Chirita-Tampu, C. West, L. Fougere, C. Elfakir, *LC.GC Europe*, **26**, 128 (2013)
6. H. P. Nguyen, K. A. Schug, *J. Sep. Sci.*, **31**, 1465 (2008)
7. S. Zhou, K. D. Cook, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, **11**, 961 (2000)
8. B. E. Boyes, *Separations and Analysis of Peptides at High pH*, 4th WCBP, San Francisco, Ca. (2000)
9. F. E. Kuhlmann, A. Apffel, S. M. Fischer, G. Goldberg, P. Goodley, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, **6**, 1221 (1995)
10. C. R. Mallet, Z. Lu, J. R. Mazzeo, *Rapid Commun. Mass Spec.*, **18**, 49 (2004)
11. C. Ye, G. Terfloth, Y. Li, A. Kord, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **50**, 426 (2009)

www.agilent.com

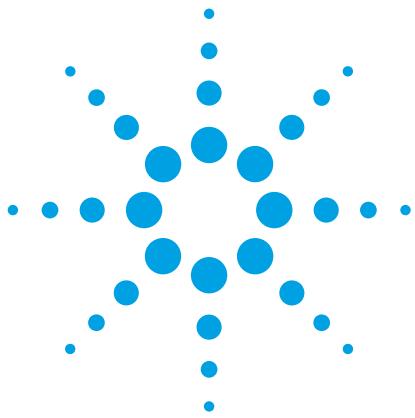
安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，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
5991-4893CHCN



Agilent Technologies



利用 Agilent Poroshell 120 4 μm 色谱柱轻松实现方法转移并改善性能

应用简报

食品检测与农业

作者

William Long
安捷伦科技公司

摘要

本研究中将最初在 $4.6 \times 100 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱上开发的分离九种酚类化合物的方法转移至采用 $4 \mu\text{m}$ 和 $2.7 \mu\text{m}$ 颗粒的 Agilent Poroshell 120 EC-C18, $4.6 \times 100 \text{ mm}$ 色谱柱。将这些色谱柱的性能与填充以 $1.8 \mu\text{m}$ 全多孔颗粒的尺寸类似的色谱柱的性能进行比较。同时对梯度和流速进行扩展，并保持恒定的保留因子，以确定每种色谱柱的最佳流速。通过切换为 Poroshell 120 EC-C18 $4 \mu\text{m}$ 色谱柱并对梯度进行优化，峰容量由 50 增加至 67。本应用简报提供了简单的方法转移指南。采用 $4 \mu\text{m}$ 色谱柱的方法的背压低于 200 bar，这种方法可轻松转移至任何 HPLC 系统。



Agilent Technologies

前言

多酚类物质是植物的次级代谢物，通常参与抵御紫外线辐射或病原体。过去十年来，人们日益关注膳食植物中的多酚类物质 [1-3]。

食品中的多酚类物质可影响苦味、涩味、色泽、味道、气味和氧化稳定性。所有植物性酚类化合物都是由共同的中间体苯丙氨酸或类似的前体莽草酸转化而来 [4]。

在植物中发现的酚类-黄酮类化合物包括鞣花酸、儿茶酚、没食子酸、槲皮素、间苯二酚、丹宁酸、香草醛、水杨酸、乙酰水杨酸和苯甲酸。

环境中的酚类化合物主要在工业生产中产生。这些酚类化合物包括塑料中所用的抗氧化剂、农药中的酚类、煤炭、石油和木材的燃烧以及酚醛树脂生产过程中产生的酚类物质。在许多情况下，酚类化合物由自然过程产生。但是，当这些化合物排放到地下水时，它们会严重影响许多水生生物。因此，酚类化合物的分析测定非常重要，因为这些化合物具有毒性且使用广泛 [5,6]。

多年来，这类化合物的分析普遍采用 5 μm HPLC 色谱柱。许多研究人员愿意为避免高压、不熟悉的仪器和可能的色谱柱堵塞问题牺牲效率和稳定性。与使用类似尺寸的 5 μm 色谱柱的方法相比，Agilent Poroshell 120 4 μm 色谱柱可改善分离能力。Poroshell 120 4 μm 色谱柱的背压仅略高于 5 μm 色谱柱，可轻松用于相同的仪器。此外，其使用与 5 μm 色谱柱相同的 2 μm 滤芯，使其有助于避免色谱柱堵塞，并且无需额外的样品前处理。

本研究将梯度方法从 4.6 \times 100 mm, 5 μm 色谱柱转移至 Poroshell 120, 4.6 \times 100 mm, 4 μm 色谱柱或 Poroshell 120 2.7 μm 色谱柱。为确定最佳峰容量下的流速，我们对梯度进行了扩展。最后，我们比较了各实验的背压，证明 Poroshell 120 色谱柱能够轻松应用于任何液相色谱系统。

实验部分

本研究采用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪。利用流动相 A (0.1 % 甲酸水溶液) 和流动相 B (0.1% 甲酸的乙腈溶液) 对 G1312B SL 二元泵进行设置。梯度如表 1 所示，其中将时间段相对于流速成比例缩放，以在整个实验过程中获得恒定的保留因子。泵配有脉冲阻尼器，并移除混合柱。

表 1. 4.6 \times 100 mm 色谱柱采用的梯度程序

% B	时间 (min)						
5	4	2	1.33	1	0.8	0.67	0.34
40	34	17	11.33	8.5	6.8	5.67	2.84
40	40	20	13.33	10	8	6.67	3.34
5	42	21	14	10.5	8.4	7	3.5
5	50	25	16.67	12.5	10	8.34	4.17
流速 (mL/min)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5

使用 G1367C 自动液体进样器，进样量为 20 μL 。G1316B 柱温箱设置为 35 °C。G4212A 二极管阵列检测器设置为 270.4 nm，且参比波长为 360.100 nm，配有光程为 10 mm 且容量为 1 μL 的 G4212-60008 流通池。采用 Agilent Open Lab 软件 1.05C 版控制 HPLC 并处理数据。

色谱柱

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 100 mm, 4 μm
(部件号 695975-902)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 100 mm, 2.7 μm
(部件号 695975-902)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 100 mm, 1.8 μm
(部件号 959964-902)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 100 mm, 5 μm
(部件号 959996-902)

目标化合物及其相应的结构如图 1 所示。用水将化合物稀释至 1 mg/mL。将等量样品混合得到混合样品，并用水按 1:10 的比例进行稀释。所有样品均采用硫脲作为死体积标记物以测定 t_0 。

硫脲、氢醌、间苯二酚、苯酚、4-硝基苯酚、对甲酚、邻甲酚、2,3-二甲基苯酚、2,5-二甲基苯酚、1-萘酚和甲酸购自 Sigma-Aldrich 公司，乙腈购自 Honeywell。水经 Milli-Q 系统 (Millipore) 过滤，电阻率为 18 MΩ，现场制备。

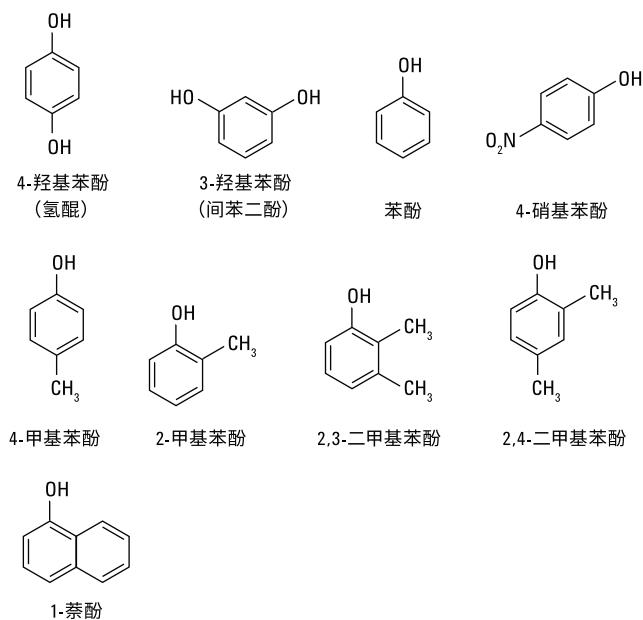


图 1. 目标化合物

结果与讨论

Coman 和 Moldovan 的研究 [6] 展示了一种对饮用水和地表水中常见酚类进行分离和定量分析的优异方案。本研究旨在通过提高分析的峰容量或通过大幅缩短色谱运行时间对色谱方法进行改进。采用甲酸代替乙酸来降低流动相 pH。此外，我们在水相和有机流动相中均添加了甲酸，使基线水平更高。然而，在改变这些色谱条件时必须保持 k^* 值不变，以便在改善峰容量的同时不会影响选择性。如之前一份应用简报所述 [6]，对初始梯度进行扩展，保持色谱柱体积恒定并保持方法选择性不变。在本研究中，所采用的流速为 0.5 mL/min 至 3.5 mL/min，以 0.5 mL/min 的间隔递增。根据公式 1，开发出表 1 所列的条件。这些条件手动计算得到，用作采用 100 mm 色谱柱的色谱程序的基础。从表中可以看到，对于色谱程序中的所有步骤，其时间均随流速增加而成比例缩短。

公式 1

$$k^* = (t_g F) / (d/2) 2L(\Delta\%B)$$

其中：

t_g 为梯度时间

F 为流速

L 为柱长

d 为色谱柱内径

$\Delta\%B$ 为梯度时段内的有机相含量

图 2 为样品色谱图，其中包括采用 $1.8\text{ }\mu\text{m}$ 和 $5\text{ }\mu\text{m}$ 全多孔 ZORBAX Eclipse Plus C18 以及 $4\text{ }\mu\text{m}$ 和 $2.7\text{ }\mu\text{m}$ Poroshell 120 EC-C18 获得的图。从图中可以看出，四种色谱柱的洗脱顺序和相对间隔均相同。但是，两种表面多孔型色谱柱 ($4\text{ }\mu\text{m}$ 和 $2.7\text{ }\mu\text{m}$) 的保留时间略低于两种全多孔色谱柱 ($5\text{ }\mu\text{m}$ 和 $1.8\text{ }\mu\text{m}$)。该方法可在这些色谱柱之间轻松转移。

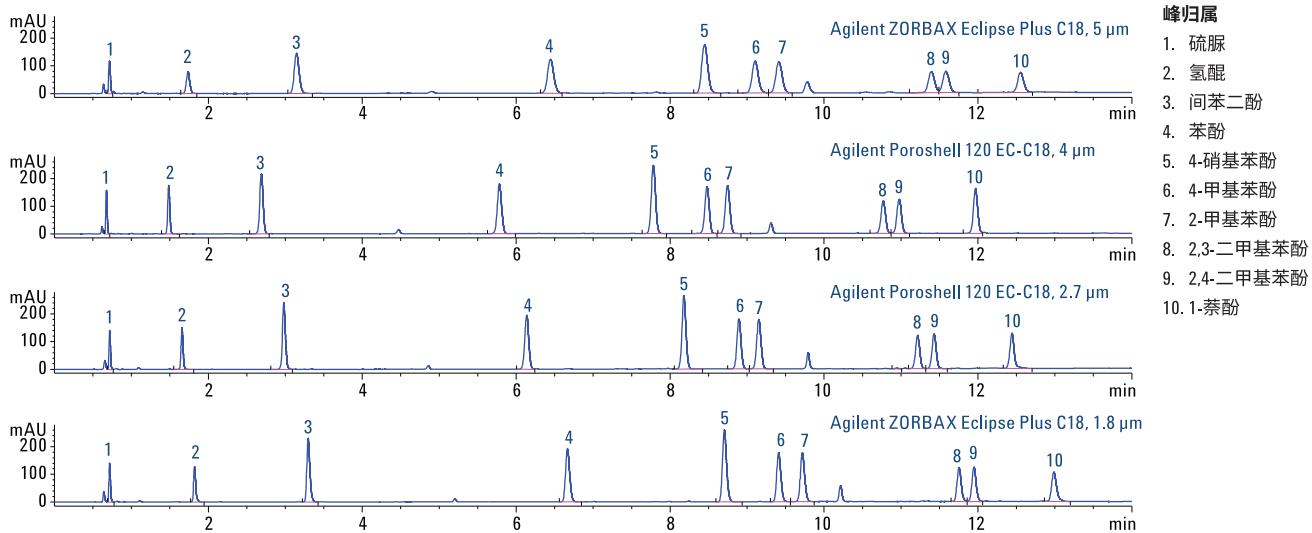


图 2. 在 1.5 mL/min 下得到的叠加色谱图

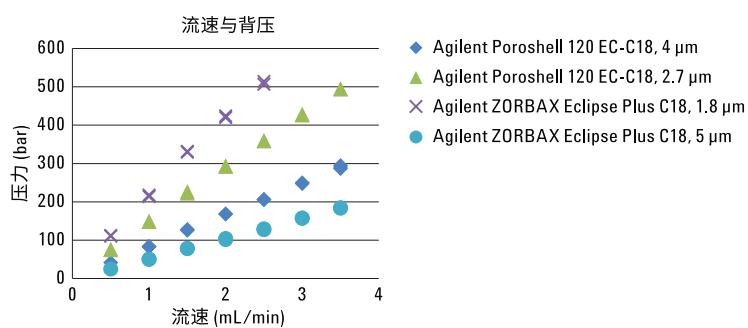


图 3. 不同色谱柱的背压与流速之间的关系

图 3 示出四种色谱柱的背压和粒径之间的关系，粒径较大的色谱柱具有较低的背压。采用图 2 所示的条件 (1.5 mL/min) 时， $5\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱和 $4\text{ }\mu\text{m}$ Poroshell 120 色谱柱的背压低于 200 bar 。使用 $4\text{ }\mu\text{m}$ Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的大多数方法均在该流速下运行。

$$\text{条件峰容量 } nc = (t_{R,n} - t_{R,1})/w$$

公式 2

其中：

$t_{R,n}$ 和 $t_{R,1}$ 为最后一个及第一个洗脱峰的保留时间

w 为 4σ 峰宽, $= (W\% / 2.35) \times 4$

$W\%$ 为半峰高处的峰宽

各色谱图的峰容量如图 4 所示。在 2.5 mL/min 下, 采用 1.8 μm ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱获得了最高的峰容量。在更快的流速下能够获得更高的峰容量。但是, 这样将超出 600 bar 的背压上限。100 mm Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱在 2 mL/min 和 3 mL/min 之间获得了次高的峰容量。

从图 4 中可以看出, 在较低流速下, 2.7 μm Poroshell 120 和 1.8 μm ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱具有几乎相同的峰容量。Poroshell 120 EC-C18, 100 mm, 4 μm 色谱柱在 1 mL/min 和 2 mL/min 之间获得了次高的峰容量, 该流速处于使用

4.6 mm 内径色谱柱的大多数色谱法的起始范围内。5 μm 色谱柱在 1 mL/min 和 1.5 mL/min 之间具有最佳峰容量。一般来说, 对于相同尺寸的全多孔色谱柱, 较大粒径的色谱柱在较低的最佳流速下获得的峰容量也较低。

图 5A 和 5B 示出各种色谱柱上两个色谱峰对的分离度变化。色谱峰对 6/7 为 4-甲基苯酚和 2-甲基苯酚, 色谱峰对 8/9 为 2,3-二甲基苯酚和 2,4-二甲基苯酚。这些高度相关的化合物的色谱峰对代表大多数方法开发化学家每天所面对的问题。如图 5B 所示, 2.7 μm Poroshell 120 色谱柱在 2.5 mL/min 下获得的最佳峰分离度为 2.4, 1.8 μm 色谱柱在 2.5 mL/min 下获得的最佳峰分离度为 2, 4 μm Poroshell 120 色谱柱在 2.5 mL/min 下获得的最佳峰分离度为 1.9, 5 μm 色谱柱在 1.5 mL/min 下获得的最佳峰分离度为 1.2。与峰容量一样, 较大粒径的色谱柱具有较低的最佳峰分离度。此外, 较大粒径的色谱柱在较低流速下获得最佳峰分离度。

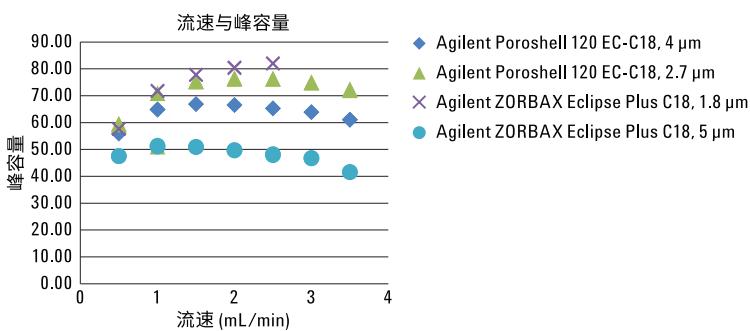


图 4. 在 0.5 mL/min 至 3.5 mL/min 流速范围内得到的峰容量优化结果

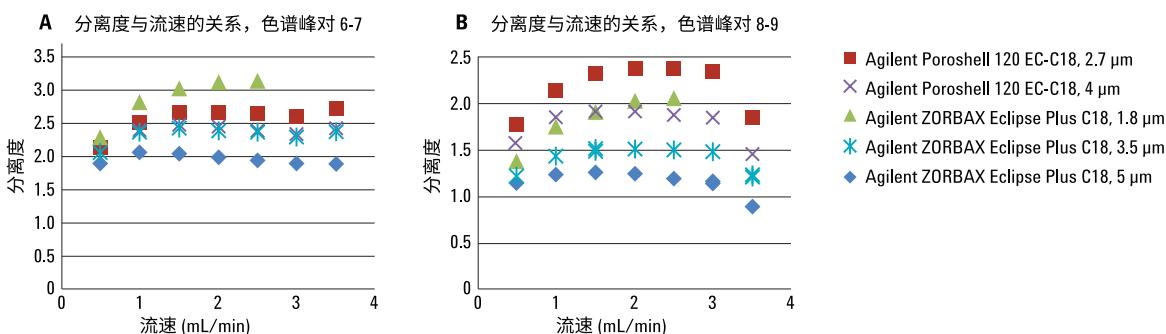


图 5. 在 0.5 mL/min 至 3.5 mL/min 流速范围内得到的分离度优化结果

结论

与填充以传统全多孔颗粒的色谱柱相比，填充以表面多孔颗粒的 HPLC 色谱柱具有许多优势。Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4 μm 色谱柱相比于 5 μm 全多孔色谱柱大幅提升了柱效和峰容量。

表面多孔型 2.7 μm Poroshell 120 EC-C18 色谱柱提供了与 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱类似的柱效和选择性，同时不会产生较高的背压。由于 Poroshell 120 EC-C18 和 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱之间具有类似的选择性，因此可轻松转移方法以缩短运行时间、改善通量并提高峰容量。

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。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。

参考文献

1. Rainha, N.; Koci, K.; Coelho, A. V.; Lima, E.; Baptista, J.; Fernandes-Ferreira, M. HPLC–UV–ESI–MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. *Phytochem.* **2013**, *86*, 83–91
2. Vagiri, M.; Ekholm, A.; Andersson, S. C.; Johansson, E.; Rumpunen, K. An optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10501–10510
3. Proestos, C.; Sereli, D.; Komaitis, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **2006**, *95*, 44–52
4. Mradu, G.; Saumyakanti, S.; Sohini, M.; Arup, M. HPLC Profiles of Standard Phenolic Compounds Present in Medicinal Plants. *Int. J. Pharmacog. Phytochem. Res.* **2012**, *4*, 162–167
5. Coman, C.; Moldovan, Z. RP-HPLC Method for the Separation of Some Phenol Derivatives Using Gradient Elution and UV Detection. *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, *23*, 699–701
6. W. J. Long; A. E. Brooks. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分析环境中的酚类，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-6156CHCN, **2010**

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。

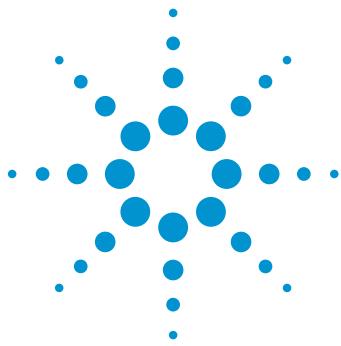
本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2017
2017 年 3 月 1 日, 中国出版
5991-5510CHCN



Agilent Technologies

分析方法开发自动化



采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案为各种 HPLC 系统开发通用分析方法

应用智能系统模拟技术 (ISET) 即时模拟目标系统

应用简报

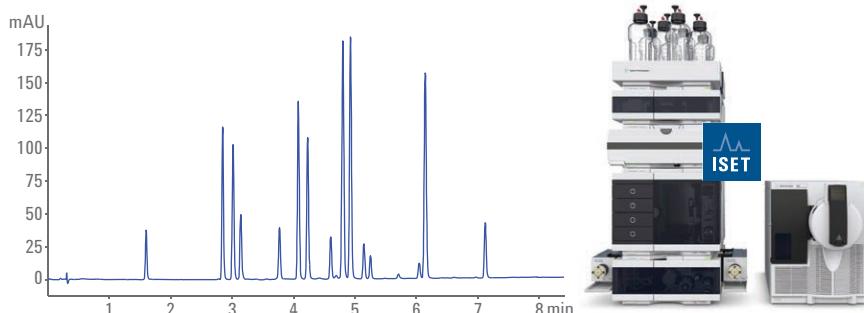
小分子药物

作者

Edgar Naegele 和 Andreas Borowiak
安捷伦科技有限公司
Waldbonn, Germany

摘要

本应用简报介绍了一种组合式的分析方法开发方案，其利用 Agilent ChemStation 方法筛选向导开发分析方法，然后采用安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 直接模拟目标 HPLC 系统，用以执行方法转移。本文所述的工作流程被成功应用于差异极大的目标系统（例如 Agilent 1100 系列液相色谱系统和 Waters Acquity UPLC H-Class 系统），证明该方案为只需使用一套母系统的通用分析方法开发方案。



Agilent Technologies

前言

如今,由于液相色谱系统的制造商或采用的技术各不相同,分析方法开发人员需要为不同部门甚至是同一个分析实验室开发多种液相色谱方法,这项工作极具挑战性。为了解决方法开发工作流程需要使用多种方法开发系统的问题,本应用简报介绍了一种组合式工作流程,其采用安捷伦智能系统模拟技术(ISET)将分析方法开发流程与即时目标系统模拟相结合。理想情况下,分析人员可将Agilent 1290 Infinity II方法开发解决方案作为母系统为不同目标系统开发分析方法,无需手动进行系统更换,也无需使用只能处理有限数量目标液相色谱运行的专用分析方法开发系统。

在之前发表的工作流程中,我们通过筛选流动相和色谱柱开发了UHPLC方法,随后将其转移至标准HPLC条件,并对目标液相色谱系统进行了ISET模拟¹。相比之下,本应用简报介绍的工作流程应用1290 Infinity II方法开发解决方案和目标液相色谱系统的ISET模拟直接为目标系统开发分析方法。图1为该工作流程的概述图。首先,在ISET条件下筛选色谱柱、溶剂和温度,选出合适的方法。初筛之后需对方法进行精细筛选,进一步优化分离度和运行时间最优的分离方法。确定合适的分离分析方法之后,将该方法转移至目标系统,通过多次进样测试方法的稳定性。

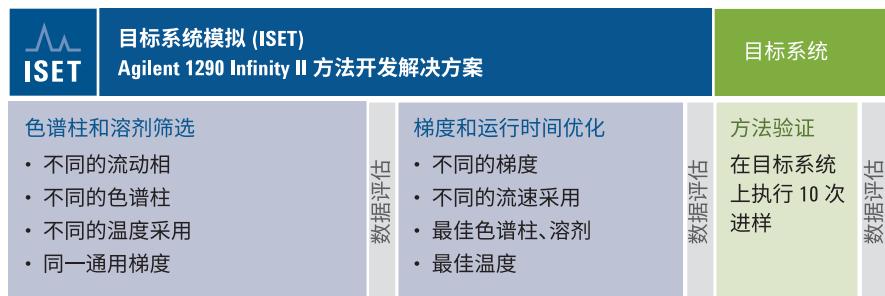


图1. 将Agilent ChemStation方法筛选向导与安捷伦智能系统模拟技术(ISET)相结合,用于直接为特定目标系统开发色谱方法的通用工作流程

本应用简报介绍了一套工作流程,其将Agilent ChemStation方法筛选向导与ISET相结合,用于为特定目标系统直接开发分析方法。结果表明,使用一套硬件设置可以为差异极大的目标系统(如Agilent 1100系列液相色谱系统和Waters Acquity UPLC H-Class系统)开发分析方法。为了测试该工作流程,我们使用含有15种化合物的复杂样品进行方法开发,并比较了使用Agilent 1290 Infinity II方法开发解决方案和所选目标系统运行所得分析方法的等效性。

实验部分

仪器

Agilent 1290 Infinity II方法开发解决方案包括以下模块:

- 启用ISET的Agilent 1290 Infinity II全能泵(G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II高容量柱温箱(G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II二极管阵列检测器(G7117B)
- Agilent 6140单四极杆液质联用系统(G6140B)

此外,如需进行自动化方法开发,需使用以下部件运行1290 Infinity II方法开发解决方案:

- Agilent InfinityLab Quick Change快速更换8色谱柱选择阀(G4239C)
- Agilent 1290 Infinity阀驱动(G1170A)和InfinityLab Quick Change快速更换12位/13通阀(G4235A)
- 低扩散毛细管工具包,内径0.12 mm,部件号5067-4248

仪器设置

1290 Infinity II全能泵与InfinityLab Quick Change快速更换12位/13通阀集成,用于在Agilent OpenLAB CDS ChemStation版仪器配置中进行溶剂选择。在ChemStation的泵设置对话框中定义溶剂。Agilent 1290 Infinity II高容量柱温箱(MCT)配备InfinityLab Quick Change快速更换8色谱柱选择阀,并集成在ChemStation仪器配置中。所有色谱柱都配有色谱柱ID标签(部件号5067-5917),以便ChemStation自动识别色谱柱,并在ChemStation MCT对话框进行色谱柱分配。使用方法筛选向导自动创建色谱柱、梯度筛选方法以及仪器冲洗和色谱柱平衡方法。采用ISET技术模拟目标系统。

Agilent 1100 系列液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列脱气机 (G1379A)
- Agilent 1100 系列标准自动进样器 (G1329A)
- Agilent 1100 系列柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315B)

Waters Acquity UPLC H-Class 系统包括以下模块：

- Acquity UPLC H-Class Bio 四元溶剂管理器
- Acquity UPLC Bio 样品管理器 (FTN)
- Acquity UPLC 色谱柱管理器
- Acquity UPLC TUV 检测器

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation, LC 和 LC/MS 系统版, 版本 C.01.07, 附带 Agilent ChemStation 方法筛选向导 A02.06 版
- Agilent OpenLab CDS 2.1 版, 用于控制 Waters Acquity H-Class 系统

色谱柱

以 Agilent 1100 系列液相色谱系统为目标系统时：

- Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-902
- Agilent InfinityLab Poroshell EC-C8 USP L7, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号 683975-902
- Agilent InfinityLab Poroshell Bonus-RP USP L60, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm, 部件号 693968-901
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm, 部件号 959963-902

以 Waters Acquity UPLC H-Class 为目标系统时：

- Agilent InfinityLab Poroshell EC C18, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-902
- Agilent InfinityLab Poroshell EC PFP, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-408
- Agilent InfinityLab Poroshell EC Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-912
- Agilent InfinityLab Poroshell EC C8, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm, 部件号 695675-906

最终方法

系统	Agilent 1100 系列液相色谱系统	Waters Acquity UPLC H-Class
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm	Agilent InfinityLab Poroshell EC PFP, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm
温度	40 °C	40 °C
溶剂	A) 水, 含 0.1% (v:v) 甲酸 B) 乙腈, 含 0.1% (v:v) 甲酸	A) 水, 含 0.1% (v:v) 甲酸 B) 乙腈, 含 0.1% (v:v) 甲酸
流速	1.7 mL/min	0.85 mL/min
梯度	0 min 时 10% B, 11.5 min 时 49% B, 17 min 时 55% B	0 min 时 10% B, 7.5 min 时 47% B, 7.6 min 时 10% B
停止时间	17 min	9.5 min
后运行时间	3 min	无
紫外检测	254/10 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 20 Hz	

样品

使用含 15 种农药和药物的复杂混合物作为测试样品。将各种化合物溶于乙腈 (1 mg/mL) 中，然后等量混合。表 1 列出了这些化合物及其分子式和质量。

化学品

所有溶剂均为 HPLC 级，购自德国 Merck 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。所有化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

结果与讨论

目标系统：

Agilent 1100 系列液相色谱系统

以 Agilent 1100 系列液相色谱系统为目标系统开发复杂样品分离方法的初始方法开发过程采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案进行，使用方法筛选向导和 ISET 技术筛选色谱柱、溶剂和温度。此筛选方案使用四根标准 HPLC 色谱柱（参见“实验部分”），两种溶剂（甲醇和乙腈）以及三种温度（30 °C、40 °C 和 50 °C）。初始通用梯度为有机溶剂在 30 分钟内从 5% 升至 70%。图 2 所示为采用初始方法筛选向导进行筛选后，复杂测试样品的最佳分离结果。

表 1. 测试样品（每种化合物的 1 mg/mL 乙腈溶液混合物）的组成

名称	化学式	m/z [M+H] ⁺
脱乙基莠去津	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{ClN}_5$	188.06
甲氧隆	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$	229.07
环嗪酮	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$	253.16
脱乙基特丁津	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{ClN}_5$	202.08
噻唑隆	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$	222.06
绿麦隆	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$	213.08
莠去津	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	216.10
敌草隆	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	233.02
溴谷隆	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_2$	259.00
吡唑草胺	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}$	278.10
硝苯地平	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$	347.10
另丁津	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClN}_5$	230.11
特丁津	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClN}_5$	230.11
利谷隆	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$	249.02
尼莫地平	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$	419.18

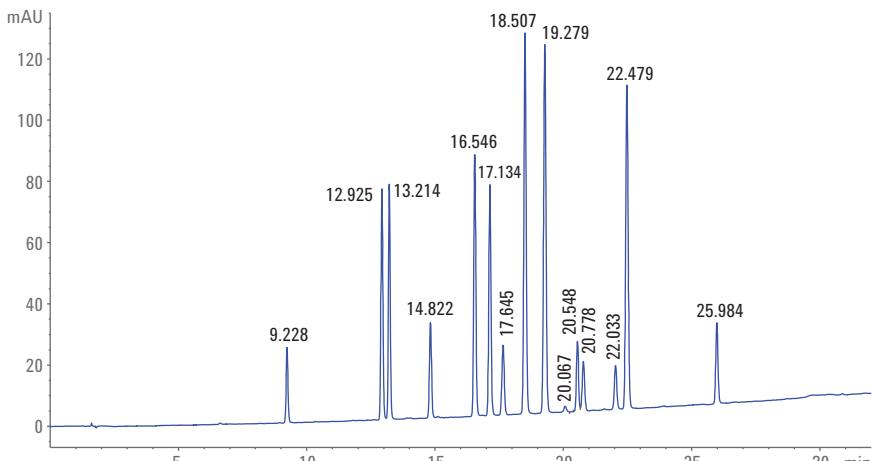


图 2. 复杂测试样品的最佳分离结果，采用 Agilent ChemStation 方法筛选向导筛选方案初筛所得的方法获得。在模拟所选目标液相色谱系统 (Agilent 1100 系列液相色谱系统) 的 ISET 条件下运行此筛选方案

为了优化该方法，将有机相的初始比例设为 10%，停止时间和比例设为最后一个组分洗脱后 30 秒。采用第二个方案对该方法进行优化，其中梯度斜率和流速均以 10% 的固定比率增加，分别用于优化流速和梯度时间。为了优化最终色谱图中 12.037 和 12.156 分钟处洗脱的关键化合物对的分离度，我们降低了第 11.5 分钟至第 17 分钟（运行结束时间）之间的梯度斜率。在最终方法中，采用分离速度和关键化合物对之间的分离度取得平衡的最适条件（图 3）。

为了在方法开发和优化过程中鉴定化合物，采用单四极杆质谱仪追踪化合物质量。经过最终优化的方法被直接转移至目标系统（1100 系列液相色谱系统），并进行了 10 次重复进样（图 4）。

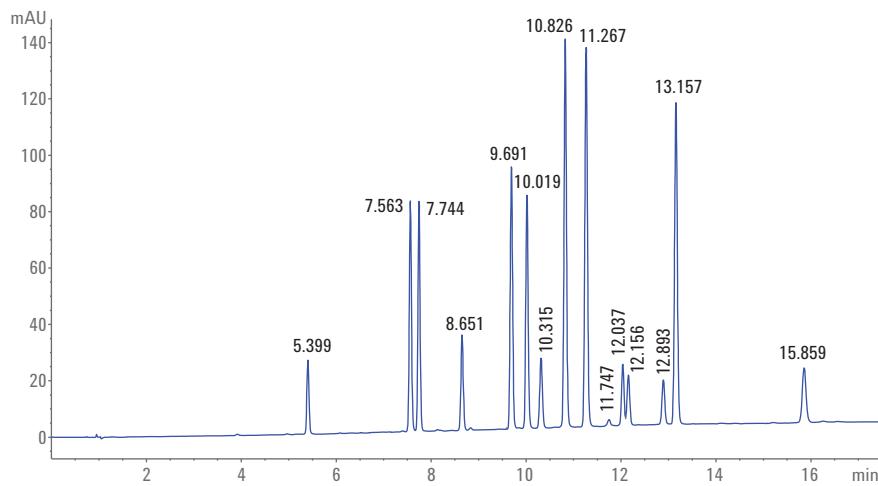


图 3. 复杂测试样品的最佳分离结果，采用经 Agilent ChemStation 方法筛选向导精细筛选方案优化的方法获得。在模拟所选目标液相色谱系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）的 ISET 条件下运行此筛选方案

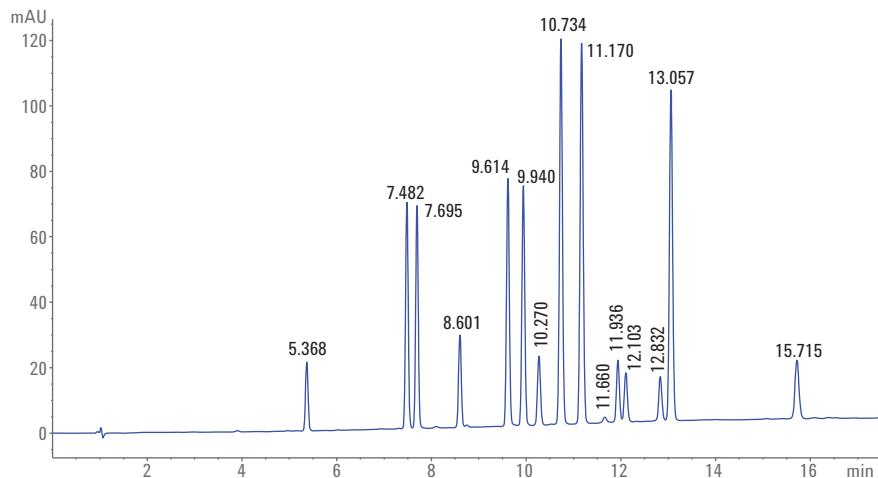


图 4. 在目标系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）上获得的最终分离结果

评估目标系统重复运行的结果显示，保留时间的典型标准偏差小于等于 0.003 分钟。相应的 RSD 值普遍低于 0.03 °C。方法开发系统和目标系统之间的保留时间差异普遍低于 1%（表 2）。

和图 5）。第一步大规模筛选方案用时约 35 小时，优化步骤用时约 8 小时，在目标系统上进行的评估用时约 5 小时，因此完整的方法开发总共耗时约 48 小时。

表 2. Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和目标系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）所得的保留时间、标准偏差和 RSD 值比较（ \bar{t} = 保留时间， \bar{x} = 平均值， σ = 标准偏差， RSD = 相对标准偏差）

编号	化合物	Agilent 1100 系列 液相色谱系统	Agilent 1100 系 列液相色谱系统	Agilent 1100 系 列液相色谱系统	Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方 案	Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方 案	Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方 案	Δt (%)
		\bar{x} (tr) (min)	σ (tr) (min)	RSD (%)	\bar{x} (tr) (min)	σ (tr) (min)	RSD (%)	Δt (%)
1	脱乙基莠去津	5.365	0.002	0.035	5.401	0.002	0.037	0.7
2	甲氧隆	7.479	0.003	0.037	7.565	0.002	0.027	1.1
3	环嗪酮	7.692	0.003	0.037	7.745	0.001	0.016	0.7
4	脱乙基特丁津	8.599	0.002	0.027	8.653	0.002	0.022	0.6
5	噻唑隆	9.613	0.002	0.023	9.692	0.002	0.020	0.8
6	绿麦隆	9.939	0.002	0.023	10.021	0.002	0.019	0.8
7	莠去津	10.269	0.002	0.020	10.316	0.002	0.016	0.5
8	敌草隆	10.734	0.002	0.017	10.827	0.002	0.023	0.9
9	溴谷隆	11.170	0.002	0.020	11.269	0.003	0.024	0.9
10	吡唑草胺	11.658	0.003	0.023	11.748	0.002	0.016	0.8
11	硝苯地平	11.935	0.003	0.025	12.039	0.002	0.017	0.9
12	另丁津	12.103	0.002	0.019	12.158	0.002	0.016	0.5
13	特丁津	12.833	0.002	0.019	12.895	0.002	0.016	0.5
14	利谷隆	13.058	0.003	0.020	13.159	0.003	0.020	0.8
15	尼莫地平	15.718	0.004	0.027	15.861	0.003	0.019	0.9

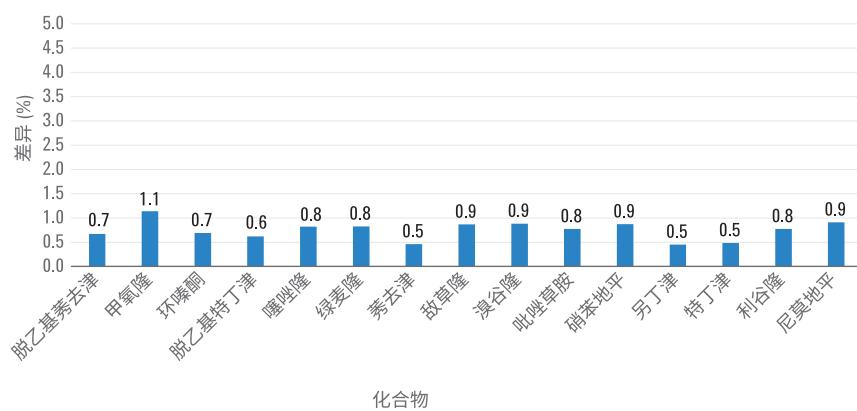


图 5. 采用目标系统（Agilent 1100 系列液相色谱系统）和 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案分离各化合物的保留时间差异

目标系统：

Waters Acquity UPLC H-Class

使用粒径较小的 (1.9 μm) Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱开发以 Waters H-Class 系统为目标系统的分离方法。选用 C8、C18、phenyl-hexyl 和 pentafluorophenyl (PFP) 固定相色谱柱进行初筛。这些色谱柱具有适用于 UHPLC 仪器的典型尺寸 (2.1 \times 100 mm)。以甲醇和乙腈为有机溶剂运行初始方案，并测试三种不同的温度。初始通用梯度时长为 20 分钟，有机溶剂比例从 5% 升至 70%。与预期结果相同，C8 和 C18 填料色谱柱的分离效果与传统液相色谱方法相当（数据未显示）。出人意料的是，相较于 C8 和 C18 固定相色谱柱，PFP 固定相色谱柱的化合物洗脱时间明显提前，而且选择性也略有不同（图 6）。

由于所有化合物都已实现分离，最后一个峰在保留时间 12 分钟处即洗脱，我们选择了该分离方法进行优化。在第二步优化过程中，通过测试不同的流速和梯度，让 PFP 色谱柱以更短的运行时间和最佳分离度分离农药样品。最后，经过优化的方法以 0.85 mL/min 的流速和 10% 到 47% 乙腈梯度在 7.4 分钟即可实现化合物分离（图 7）。

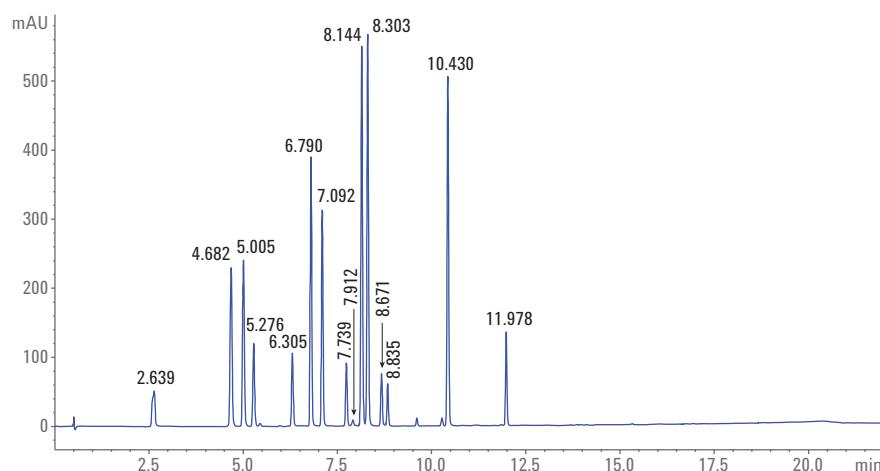


图 6. 采用 20 分钟内乙腈从 5% 升至 70% 的梯度和 40 °C 的柱温，在 PFP 色谱柱上分离农药样品所得的结果。在模拟所选目标液相色谱系统 (Waters H-Class) 的 ISET 条件下运行此筛选方案

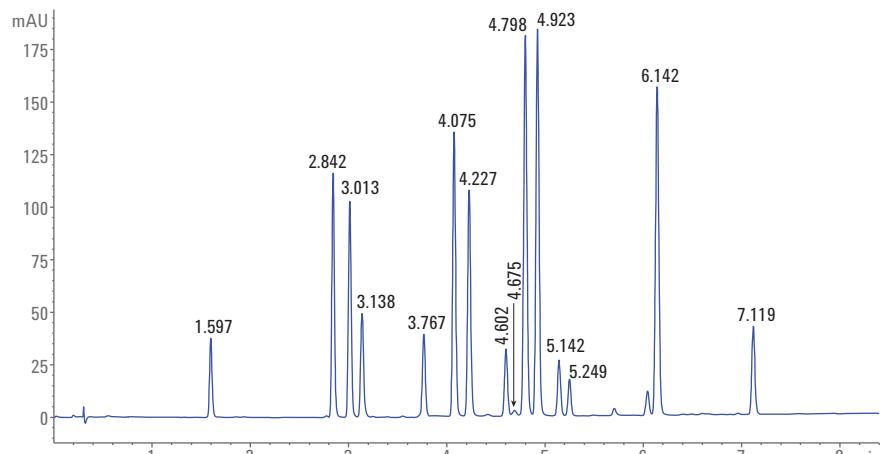


图 7. 采用 7.4 分钟内乙腈从 10% 升至 47% 的梯度和 40 °C 的柱温，在 PFP 色谱柱上对农药样品进行最终优化分离的结果。在模拟所选目标液相色谱系统 (Waters H-Class) 的 ISET 条件下运行此筛选方案

将该方法直接转移至目标系统 (Waters H-Class 系统) 进行评估。对比 1290 Infinity II 方法开发系统 (图 7) 和 Waters H-Class 系统 (图 8) 获得的色谱图可确定保留时间。

通过 10 次重复运行进行统计评估。评估结果表明, 保留时间的典型标准偏差低于 0.01 分钟。由于保留时间较短, 相应的 RSD 值普遍低于 0.2%。开发系统与目标系统之间的保留时间差异普遍低于 2% (表 3 和图 9)。完整的方法开发大约需要 37 小时。

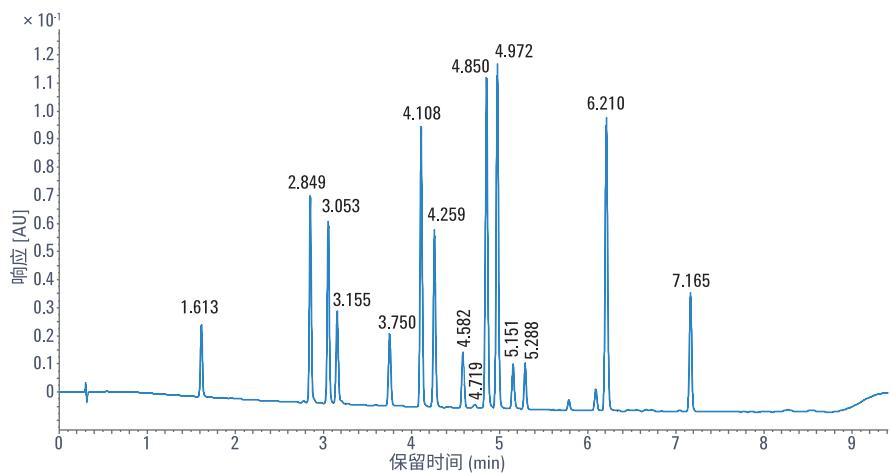


图 8. 农药样品在 Waters H-Class 系统上的最终优化分离结果, 方法条件如下: 使用 PFP 色谱柱, 梯度为 7.4 分钟内乙腈从 10% 升至 47%, 流速为 0.85 mL/min, 柱温 40 °C

表 3. Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和目标系统 (Waters H-Class 液相色谱系统) 所得的保留时间、标准偏差和 RSD 值比较 (tr = 保留时间, \bar{x} = 平均值, σ = 标准偏差, RSD = 相对标准偏差)

编号	化合物	Waters	Waters	Waters	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 1290 Infinity II	Δtr (%)
		H-Class \bar{x} (tr) (min)	H-Class σ (tr) (min)	H-Class RSD (%)	方法开发解决方案 \bar{x} (tr) (min)	方法开发解决方案 σ (tr) (min)	方法开发解决方案 RSD (%)	
1	脱乙基莠去津	1.616	0.004	0.220	1.587	0.003	0.164	-1.8
2	环嗪酮	2.852	0.003	0.105	2.833	0.004	0.159	-0.6
3	甲氧隆	3.056	0.003	0.112	2.997	0.005	0.161	-1.9
4	脱乙基特丁津	3.157	0.003	0.101	3.126	0.005	0.168	-1.0
5	莠去津	3.753	0.003	0.070	3.764	0.005	0.132	0.3
6	噻唑隆	4.110	0.003	0.062	4.062	0.005	0.113	-1.2
7	绿麦隆	4.261	0.002	0.055	4.213	0.005	0.114	-1.1
8	另丁津	4.585	0.002	0.046	4.601	0.005	0.104	0.3
9	吡唑草胺	4.734	0.041	0.871	4.676	0.005	0.104	-1.2
10	溴谷隆	4.864	0.038	0.788	4.781	0.006	0.122	-1.7
11	敌草隆	5.992	0.055	1.101	4.908	0.005	0.097	-1.7
12	特丁津	5.166	0.043	0.824	5.137	0.005	0.100	-0.6
13	硝苯地平	5.340	0.150	2.806	5.240	0.005	0.089	-1.9
14	利谷隆	6.212	0.001	0.024	6.121	0.006	0.105	-1.5
15	尼莫地平	7.167	0.001	0.016	7.108	0.005	0.066	-0.8

结论

本应用简报介绍了采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和 Agilent ChemStation 方法筛选向导，并借助 ISET 控制为特定目标系统直接开发分析分离方法的方案。使用该方案成功开发了以 Agilent 1100 系列液相色谱系统和 Waters Acquity UPLC H-Class 系统为目标系统的复杂样品分离方法。对于这两套系统，采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案开发的方法在开发系统和目标系统上的运行结果均表现出优异的相关性。保留时间偏差普遍低于 2%。采用 1290 Infinity II 方法开发解决方案进行方法开发并在目标系统上进行评估所需的时间通常为两天或更短。

参考文献

1. Huesgen, A. G. Fast screening of mobile and stationary phases with the Agilent 1290 Infinity LC and seamless method transfer to an Agilent 1200 Series LC using ISET (通过 Agilent 1290 Infinity LC 对流动相与固定相进行快速筛选并利用 ISET 实现到 Agilent 1200 系列液相色谱的无缝方法转移)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0989EN, 2012

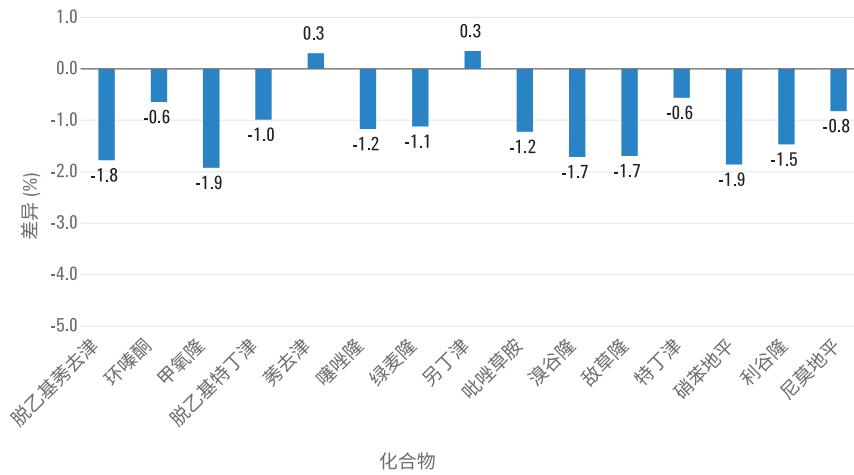


图 9. 采用目标系统 (Waters H-Class 系统) 和 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案分离各化合物的保留时间差异

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

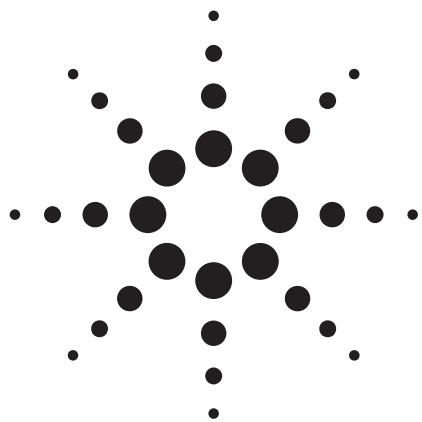
仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、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, 中国出版
5991-7794CHCN



Agilent Technologies



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 \times 50 mm RRHT 色谱柱时，完成多次分析所需的时间仅为 4.6 \times 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 光程半微量流通池的 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

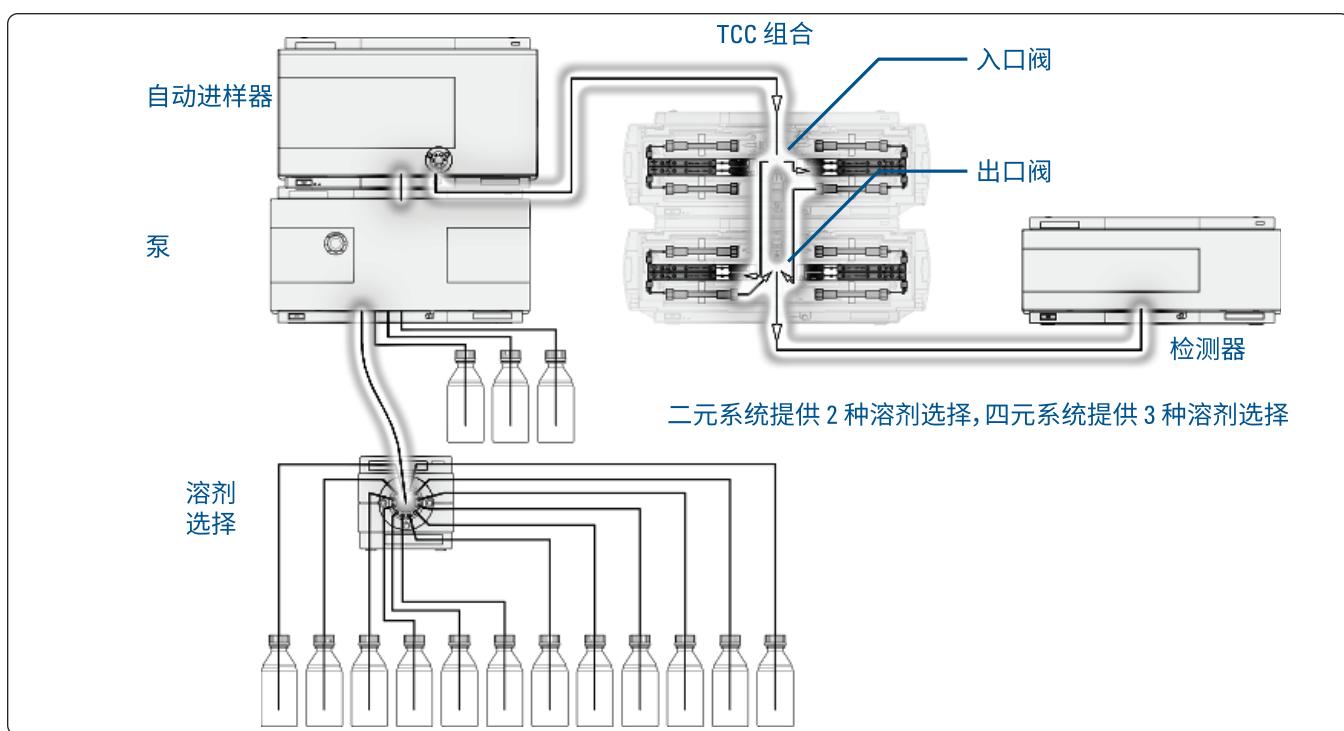


图 1. 仪器配置图

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 ARCO。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

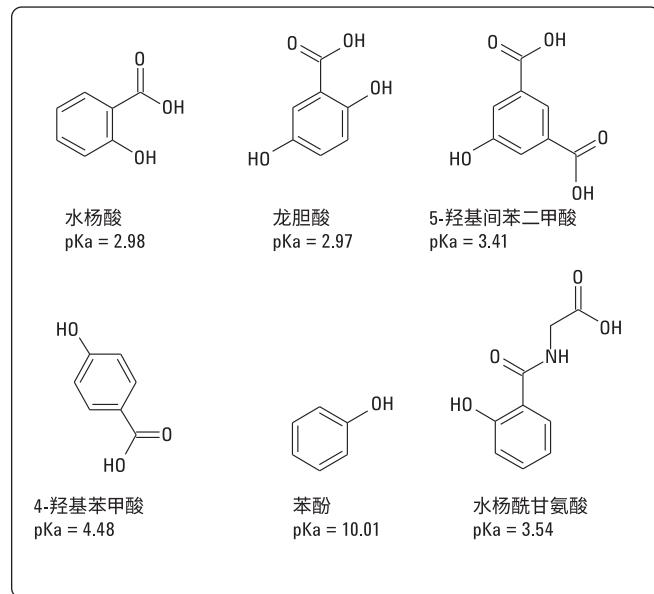


图 2. 混合物组分的结构和 pKa 值

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。

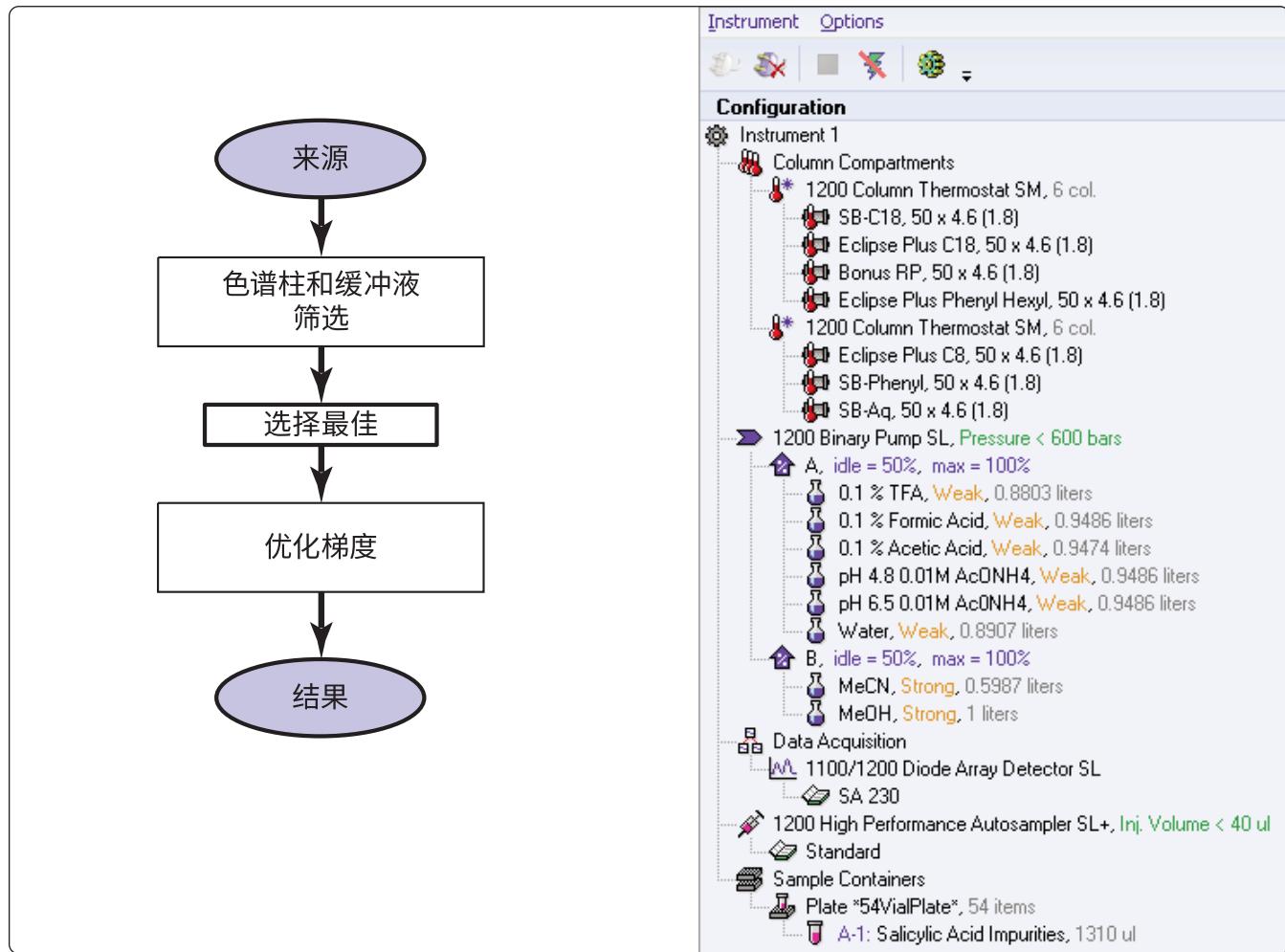


图 3. Autochrom 策略屏幕截图

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

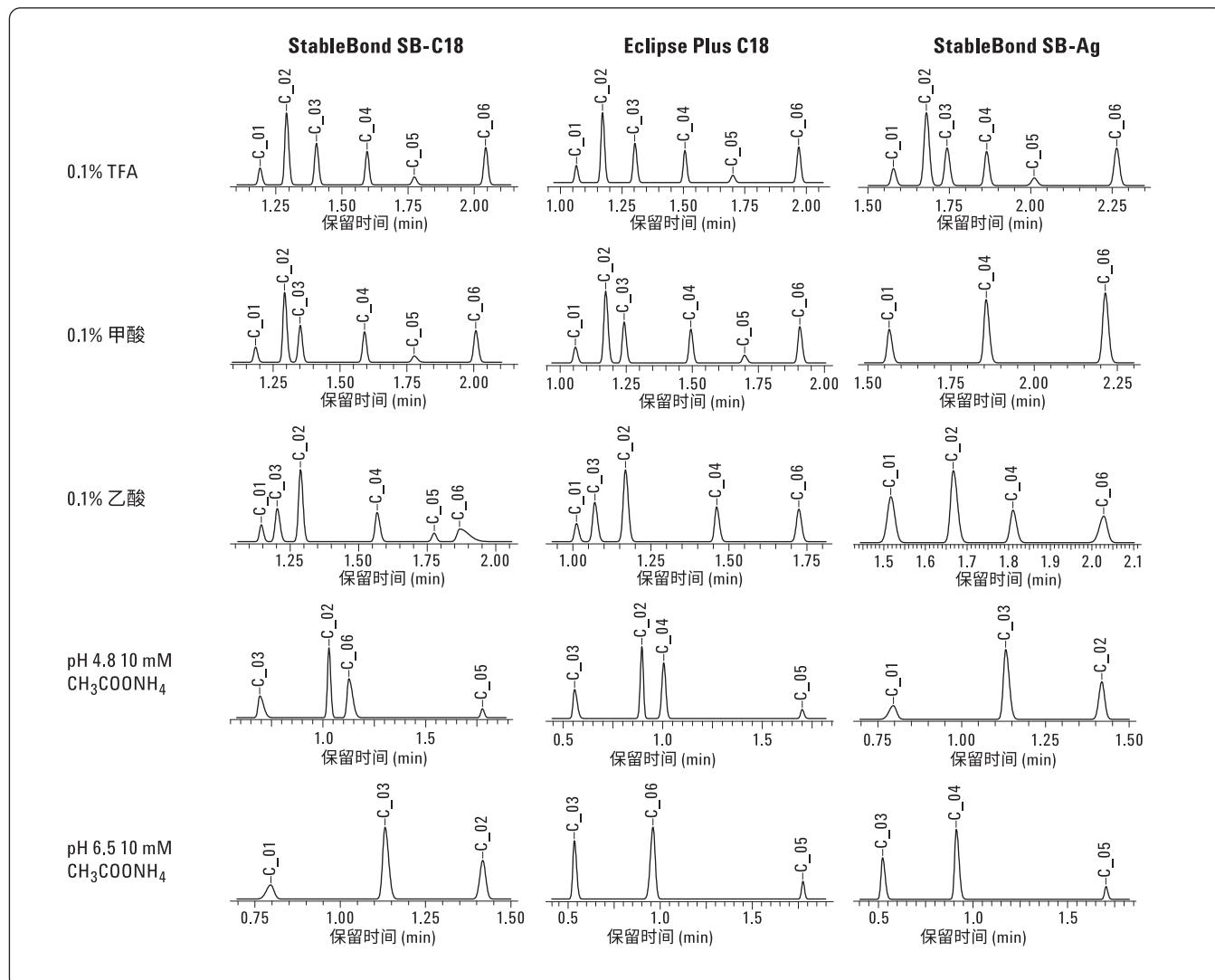


图 4. 由第 1 波实验得到的 15 幅色谱图

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

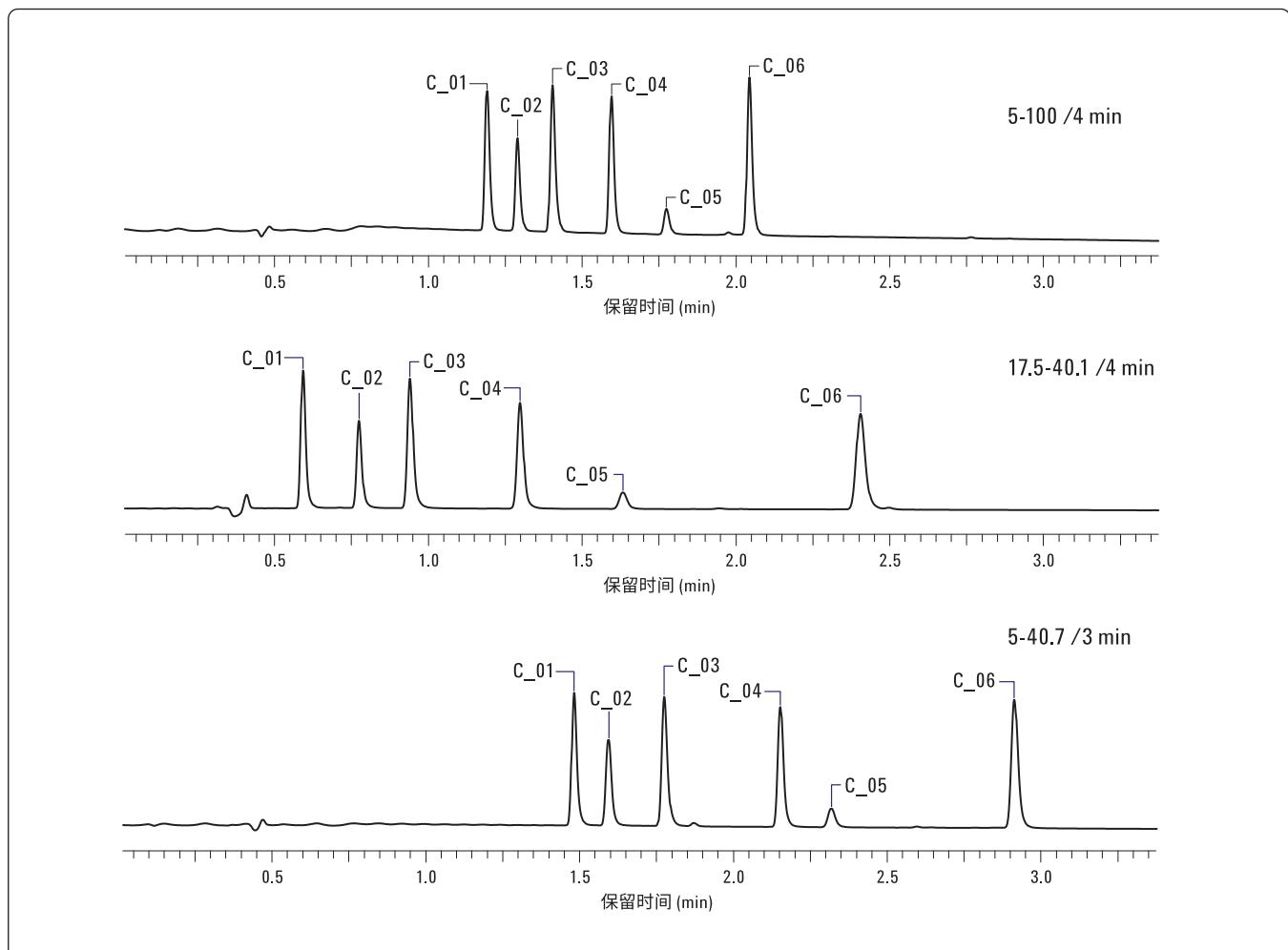


图 5. 由梯度优化实验得到的实验色谱图

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

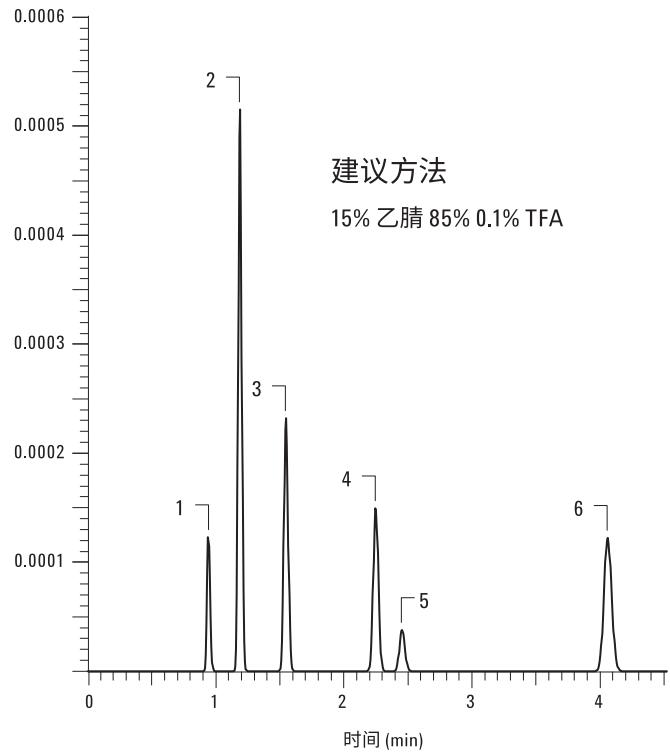


图 6. 第一批三幅色谱图和系统建议的分析 (未创建模型, 需要更多数据)

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

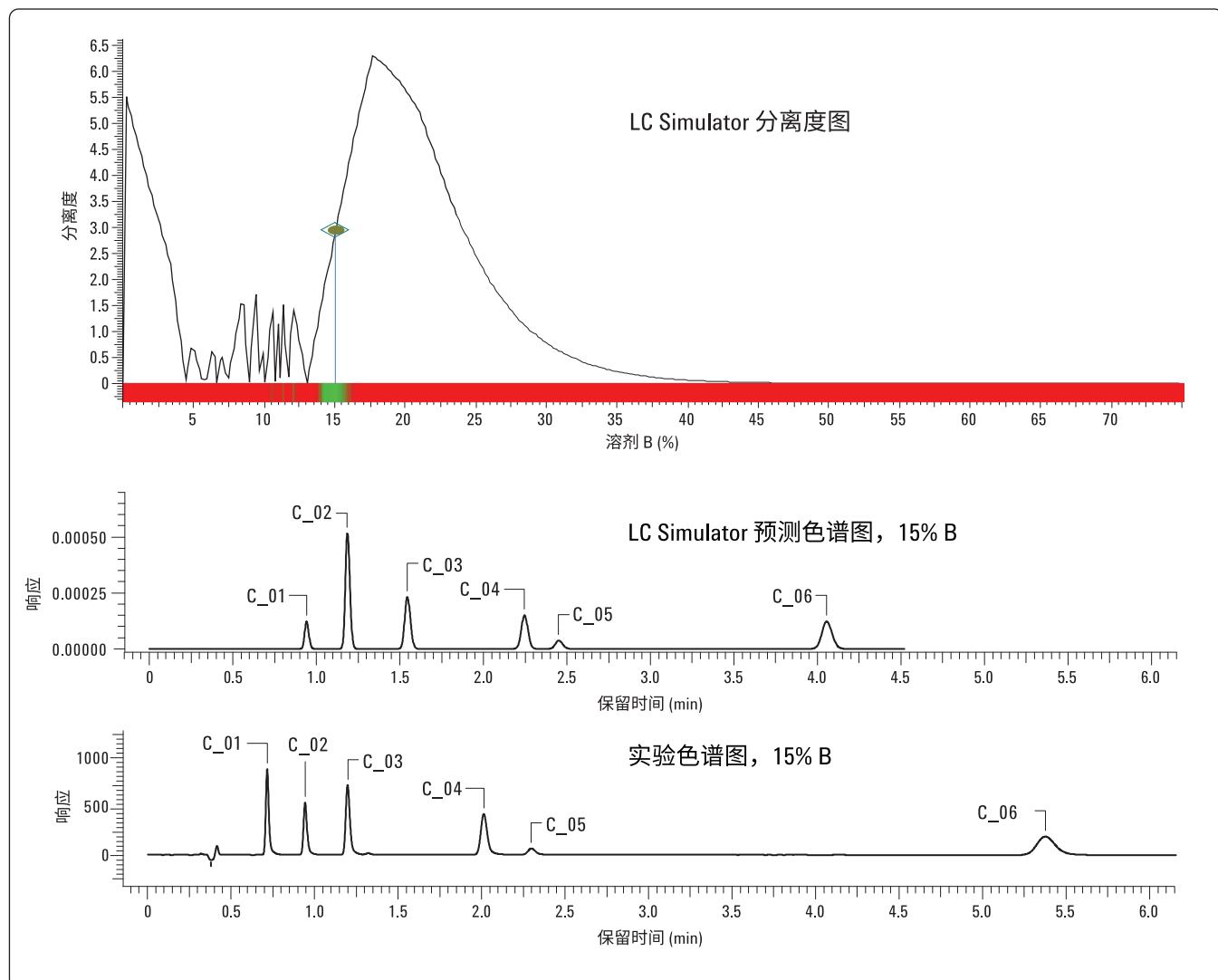


图 7. LC Simulator 分离度图和预测色谱图与 ChemStation 实验色谱图的比较

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。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。

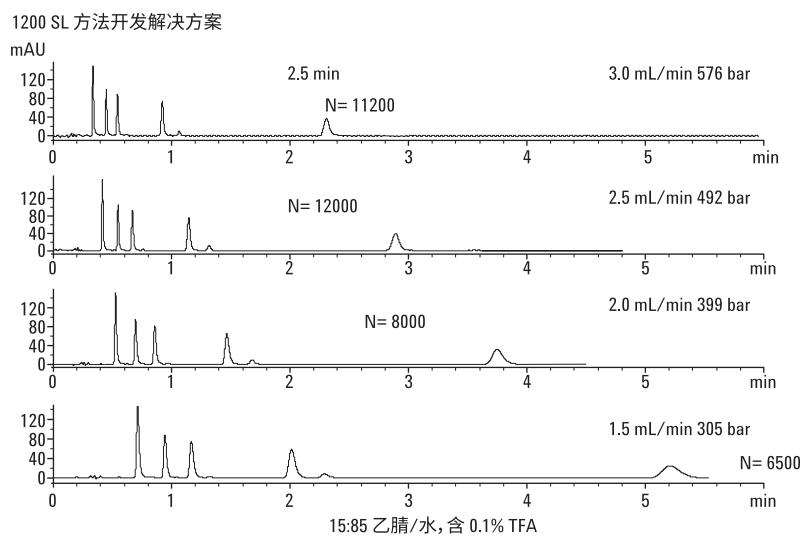


图 8. 在 1.5 mL/min 至 3 mL/min 之间的不同流速下得到的四幅色谱图

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 μ m 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 μ m) 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 μ m, 3.5 μ m, 5 μ m Particle Columns of Different Selectivity and Length,” Poster HPLC 2009 Dresden DE
7. Rob Edam, Mattias Purtsh, Angelika Gratzfeld-Huesgen, Michael Frank, Helmut Schulenburg-Schell, Freddy van Damme, “Automated Method Development With Sub-2 μ m 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。

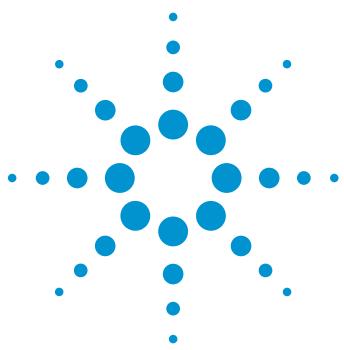
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示
或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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



利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪进行基于质量源于设计的方法开发

在 Waters Empower 3 CDS 控制下与 ISET 参与的方法转移相结合的高效方法开发工作流程

应用简报

药物开发与 QA/QC

作者

Vinayak A.K 和 Andreas Tei
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了基于质量源于设计 (QbD) 原则分离氨氯地平及其已知 EP 杂质的 UHPLC 方法。第二步，将该方法转换并转移到 HPLC 系统中。利用安捷伦仪器控制框架 (ICF) 作为接口，通过 Waters Empower 3 色谱数据处理系统 (CDS) 控制 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪。系统集成了 Fusion QbD (S-Matrix Corp, Eureka, CA) 软件，以实现基于 QbD 的方法开发过程。

使用免费方法转换工具将 UHPLC 条件下在亚 2 μm 色谱柱上开发的方法转移至利用 HPLC 系统的常规 QA/QC 工作流程。在进一步优化和评估过程中，使用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发系统上的安捷伦智能系统模拟技术 (ISET) 对目标 HPLC 系统的性能特点进行模拟。在转移至目标系统后，满足所有关键方法属性 (CMA)，并对重现性进行了验证。



Agilent Technologies

前言

满足 ICH Q8 (R2) 和 ICH Q2 (R2) 指导原则的基于质量源于设计 (QbD) 的方法开发及方法验证越来越受到制药分析研发领域的关注²。在不同色谱柱固定相的筛选过程中，在较短的亚 2 μm 色谱柱上使用 UHPLC 方法可显著提高柱效。然而，开发完成后需要将最终方法转移至 QA/QC 部门，而该部门中的大部分液相色谱系统为传统 HPLC 系统。在不影响关键方法属性 (CMA) 的前提下从 UHPLC 向 HPLC 进行方法转移是一个具有挑战性的过程²。由于系统延迟体积和梯度混合精度存在差异，因此即使在 UHPLC 系统中采用传统 HPLC 色谱柱开发的方法，在转移至 HPLC 系统后仍无法确保性能完全相同。为克服这些问题，安捷伦开发出安捷伦智能系统模拟技术 (ISET)，以模拟常用目标系统的特性³。

本应用简报展示了作为基于 QbD 的稳定方法开发过程的通用 UHPLC 解决方案的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪的使用，以及第三方 QbD 软件 (Fusion QbD) 与 Waters Empower 3 CDS 控制下的 1290 Infinity II 液相色谱仪的使用。最后，还展示了安捷伦 ISET 如何模拟 QA/QC 环境下常用的处于第三方软件控制下的不同目标液相色谱系统的性能特点。



图 1. 在 Waters Empower 3 CDS 控制下的安捷伦智能系统模拟技术参与的方法转移

实验部分

仪器

利用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱方法开发系统进行方法开发。1290 Infinity II 方法开发解决方案的各个模块和组件包括：

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A) 和 12 位/13 通溶剂选择阀 (G4235A)
- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，保持在 4 °C
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备 8 位/18 通色谱柱选择阀 (5067-4233)
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)

所有 Agilent 1290 Infinity II 模块的最低固件要求为：B、C 和 D.06.70

利用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪对转移后方法的重现性进行验证。1260 Infinity 液相色谱仪的各个模块包括：

- Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 自动进样器 (G1367E)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B)

软件

- Fusion QbD 自动化液相色谱方法开发软件 (S-Matrix Corp, Eureka, CA) (版本：9.7.1, Build 458)
- Waters Empower 软件 (版本 3 build 3471)，配备系统适用性测试包
- 沃特世仪器控制软件 (ICS) 2.1 HF1 包括安捷伦 ICF 和驱动程序包 (A.02.03 DU1 HF2)
- ISET 4 (驱动程序版本 A.02.11)

试剂与样品

所有溶剂均为 HPLC 级 (RCI Labscan Ltd, Thailand)。苯磺酸氨氯地平 (API) 标准品以及已知的 EP 杂质 A、B、D、E、F 和 G 购自印度 Anant Pharmaceuticals Pvt Ltd。在整个实验中，按照欧洲药典 (EP) 规定的苯磺酸氨氯地平样品前处理方案进行操作，其中在 API 中加入已知杂质⁴。

工作流程

方法开发工作流程以筛选过程作为起始，通过筛选七种短亚 2 μm 色谱柱组合两种有机溶剂和七种不同 pH 值水相溶剂的液相，确定苯磺酸氨氯地平标准品和杂质分析的最佳色谱分离条件。使用在 Empower 3 控制下的 1290 Infinity II 液相色谱方法开发系统和 Fusion QbD 软件，进行该色谱柱固定相的筛选实验（图 2）。对于初始筛选阶段发现的最佳色谱条件（满足筛选阶段的分析目标概况 (ATP) 要求），通过多变量统计实验根据 QbD 原理创建设计空间来进一步完整优化，从而形成稳定的 UHPLC 方法（满足优化阶段的 ATP 要求）。

第二步，将该 UHPLC 方法转移至填料粒径不同的两根 HPLC 色谱柱上。为了模拟目标系统的性能特点，Agilent 1290 Infinity II UHPLC 在启用 ISET 工具后，即在模拟模式下运行。模拟 Agilent 1260 Infinity 系统的梯度混合行为和自动进样器延迟体积。

将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪在模拟模式下的性能结果与目标系统的结果进行比较。确定系统适用性杂质（杂质 B 和 G）和 API 的保留时间 (RT)、峰面积和分离度的重现性。

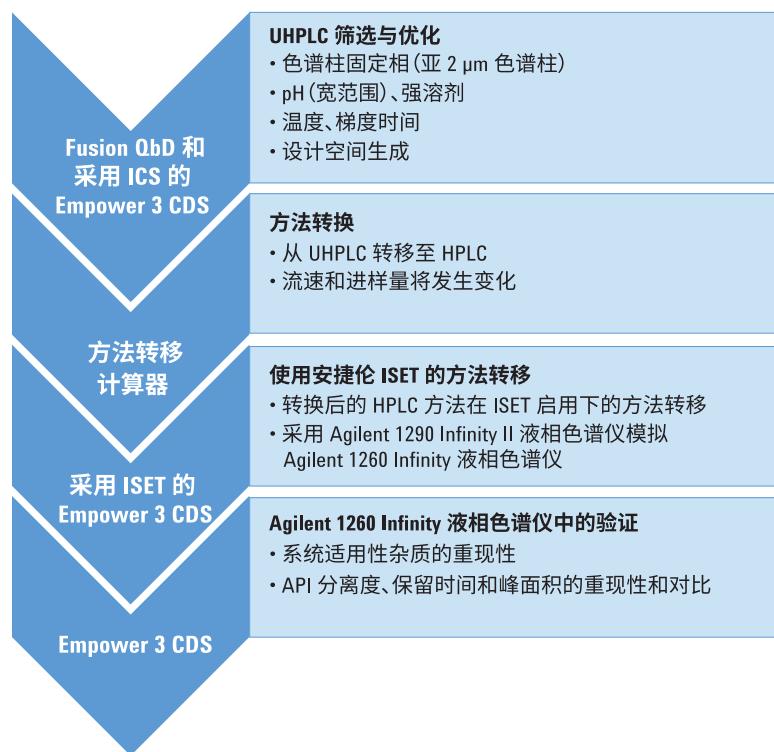


图 2. 本研究采用的整体工作流程。流程图左侧显示所使用的软件包，右侧显示工作流程的详细步骤

结果与讨论

UHPLC 筛选与优化

筛选阶段的 ATP 旨在开发满足 EP 方法的系统适用性标准（氨氯地平杂质 B 和 G 之间的分离度应高于 2.0）的快速 UHPLC 方法。表 1 显示，为实现这一目标，对各种亚 2 μm 色谱柱固定相、各种 pH 和有机溶剂（乙腈和甲醇）进行了筛选。表 2 列出了提供最佳总体色谱条件的色谱柱固定相筛选实验。实验结果证明这一条件下的色谱性能令人满意，可满足所有 ATP 标准（图 3）。

表 1. 筛选阶段实验中所用的关键方法参数 (CMP)。对七种 pH 缓冲液、七根色谱柱、三种不同流速和两种强有机溶剂进行了筛选

CMP	范围/水平
强溶剂类型	甲醇, 乙腈
泵流速 (mL/min)	0.8、1.0、1.2
pH	2.00-10 mM 三氟乙酸 3.00-20 mM 甲酸 4.00-5 mM 甲酸 + 10 mM 甲酸铵 5.00-5 mM 乙酸 + 10 mM 乙酸铵 7.00-10 mM 乙酸铵 8.00-10 mM 碳酸氢铵 9.00-10 mM 乙酸铵 + 5 mM 氨水
色谱柱类型 (3.0 \times 50 mm, 1.8 μm)	Agilent ZORBAX Eclipse plus c18 Agilent ZORBAX Eclipse plus c8 Agilent ZORBAX SB Aq Agilent ZORBAX Eclipse Plus phenyl hexyl Agilent ZORBAX SB CN Agilent ZORBAX SB C18 Agilent ZORBAX Bonus RP*

* Bonus RP 色谱柱的色谱柱内径为 2.1 mm

表 2. 筛选阶段实验中 CMP 的最佳条件

CMP	水平设置
强溶剂类型	乙腈
泵流速 (mL/min)	1.200
pH	2.00
色谱柱类型	Agilent ZORBAX Eclipse plus C8

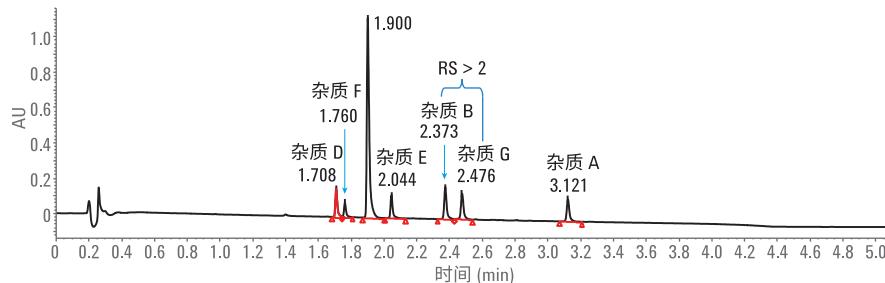


图 3. 杂质 B 和 G 之间的分离度高于 2，满足筛选阶段的 ATP 标准

优化阶段的 ATP 旨在缩短筛选阶段最佳条件的分析时间，同时不影响 EP 方法的系统适用性标准以及 API 与其他杂质的分离度。如表 3 所列，实验中改变了泵流速、梯度时间和柱温等关键方法参数 (CMP)。对这些实验进行数据分析后得到了稳定的设计空间 (图 4)，这一空间满足先前确定的 ATP 标准。在设计空间中绘制满足 ATP 目标的经验证的可接受区域 (PAR)。针对 PAR (表 4) 及相应色谱图 (图 5) 中的五种不同条件绘制系统适用性杂质的分离度值。Fusion QbD 的点预测工具可预测关键方法属性 (CMA) 值以及经过比较和验证的实验值 (表 5)。对优化后的最终 UHPLC 方法的重现性进行验证，绘制了六次重复测定的叠加图 (图 6)。

表 3. 优化阶段中改变的 CMP

CMP	范围/水平
泵流速 (mL/min)	1.200-1.500
梯度时间 (min)	1.0 ≤ 梯度时间 ≤ 4.0
最终保持时间 (min)	0.5 ≤ 最终保持时间 ≤ 1.5
柱温箱温度 (°C)	25.0、30.0、35.0

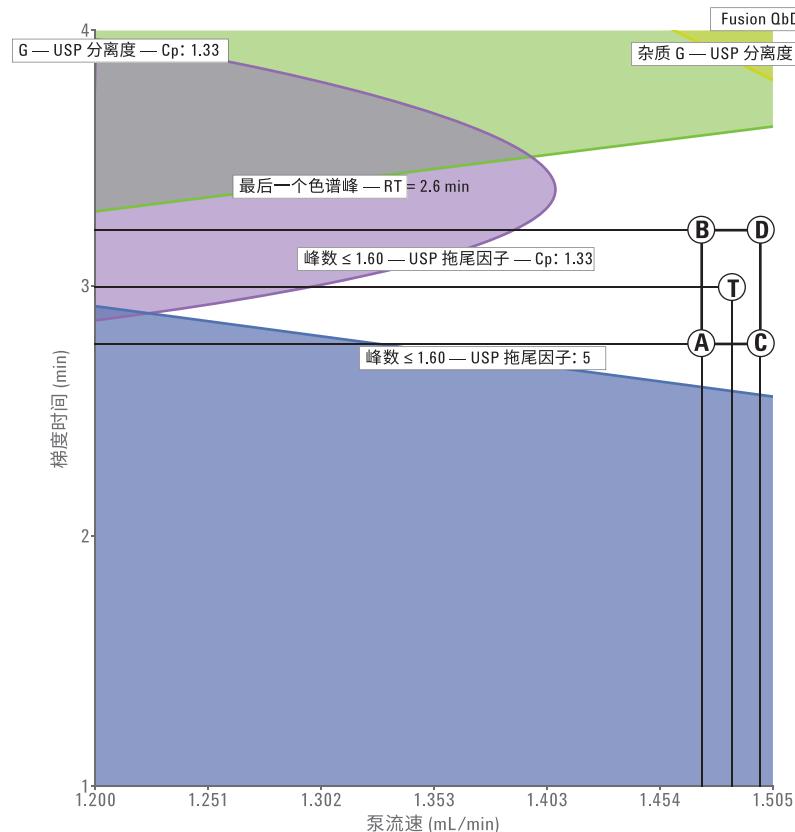


图 4. 显示 PAR 的最终设计空间

表 4. 反映了 PAR 五个点的系统适用性杂质的 CMP 和分离度

条件	流速	梯度时间	最终保持时间	柱温箱温度	杂质 B 和 G 之间的分离度
A	1.47	2.76	0.5	30	3.28
B	1.47	3.08	0.5	30	3.16
T — 中心点	1.48	2.92	0.5	30	3.20
C	1.50	3.08	0.5	30	3.22
D	1.50	2.92	0.5	30	3.10

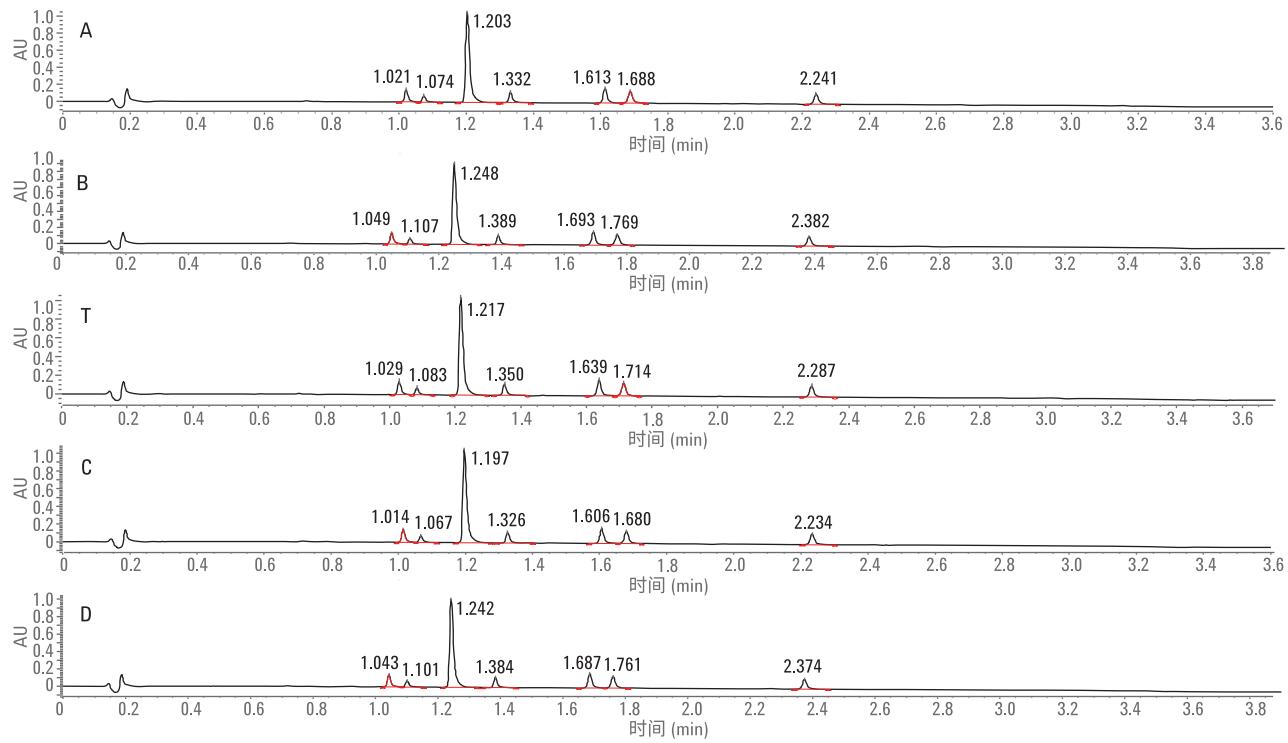


图 5. 反映 PAR 中五个点 (A、B、T、C、D) 条件的色谱图

表 5. Fusion QbD 软件根据 PAR 的中心点 (T) 预测的响应 CMA 值。将实验结果与预测值进行比较，结果处于 σ 置信限内

CMA	预测值	实验值	-2σ 置信限	$+2\sigma$ 置信限
峰数 ≥ 2.00 — USP 分离度	6.14	6.00	5.68	6.60
峰数 ≤ 1.60 — USP 拖尾因子	5.80	6.00	5.06	6.65
最后一个色谱峰 — 保留时间	2.28	2.28	2.28	2.29
杂质 B 和 G 之间的 USP 分离度	2.97	3.20	2.90	3.20

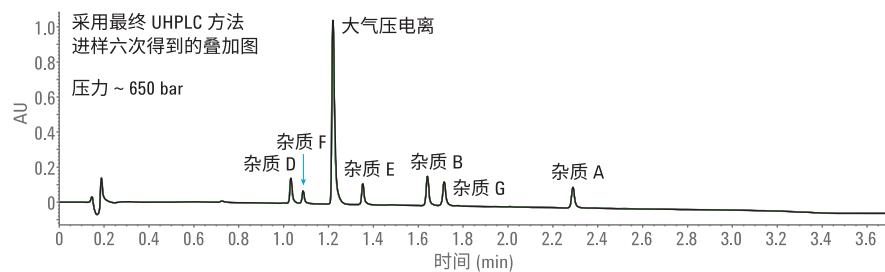


图 6. 使用六幅色谱图叠加得到的最终 UHPLC 方法的重现性

方法转换与转移

将亚 $2\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱上开发的 UHPLC 方法转换至使用传统填料粒径的三种不同的 HPLC 方法。利用瑞士日内瓦大学开发的 Microsoft Excel 方法转换计算器实现这一目的⁵。首先，将 UHPLC 方法转换至具有 27 分钟合理分析时间的 HPLC 方法（采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus, $4.6 \times 150\text{ mm}$, $3.5\text{ }\mu\text{m}$ 作为色谱柱 1，表 6）。使用目标系统（Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪）的 ISET 模拟模式对 1290 Infinity II 系统上的方法进行评估，然后利用 1260 Infinity 液相色谱系

统的结果进行验证（图 7）。模拟的溶剂输送模块和自动进样器为 G1312B v1.0 和 G1367E 100 μL 注射器 v1.0。在不降低 ATP 标准的情况下实现了方法向色谱柱 1 (HPLC 方法 1) 的转移，且分析时间合理，而观察到的压力范围为 300 bar 左右（传统 HPLC 泵压力限值的 70%）。这可能是受压力限制的传统 HPLC 系统用户的一个关注点。因此，将 UHPLC 方法转移至采用大填料粒径色谱柱（色谱柱 2 为 ZORBAX Eclipse Plus, $4.6 \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ ）的 HPLC 方法 2，有助于降低反压（表 6）。方

法转换计算器建议采用 1.2 mL/min 的较低流速和 37 分钟的较长分析时间。在 HPLC 方法 3 中，将流速提高至 1.8 mL/min 缩短了分析时间，且不损失分离度。同样用 1260 Infinity 液相色谱系统上的结果对 HPLC 方法 3 进行验证（图 8），该方法可用于存在压力限制的系统。表 7 和表 8 汇总了相应方法在模拟系统与实际系统上的 RT 和分离度偏差。采用 HPLC 方法 1 和 3 进行六次重复测定，以检查相应方法的重现性以及 API 的分离度、RT 和峰面积的 RSD 值，结果表明系统适用性杂质的 RSD 值 $\leq 1.1\%$ （表 9）。

表 6. UHPLC 及所有其他转换后 HPLC 方法的方法参数

参数	UHPLC 方法	HPLC 方法 1	HPLC 方法 2	HPLC 方法 3
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus $3.0 \times 50\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$	Agilent ZORBAX Eclipse Plus $4.6 \times 150\text{ mm}$, $3.5\text{ }\mu\text{m}$	Agilent ZORBAX Eclipse Plus $4.6 \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$	Agilent ZORBAX Eclipse Plus $4.6 \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$
流速 (mL/min)	1.5	1.8	1.2	1.8
进样量 (μL)	2	14	14	14
梯度	时间 %B 0.00 25 0.30 25 3.20 95 3.70 95 3.80 25 4.30 25	时间 %B 0.00 25 2.87 25 19.79 95 22.71 95 23.29 25 26.21 25	时间 %B 0.00 25 4.10 25 28.27 95 32.44 95 33.27 25 37.44 25	时间 %B 0.00 25 2.87 25 19.78 95 22.70 95 23.28 25 26.20 25
压力 (bar)	~ 650	~ 300	~ 130	~ 180

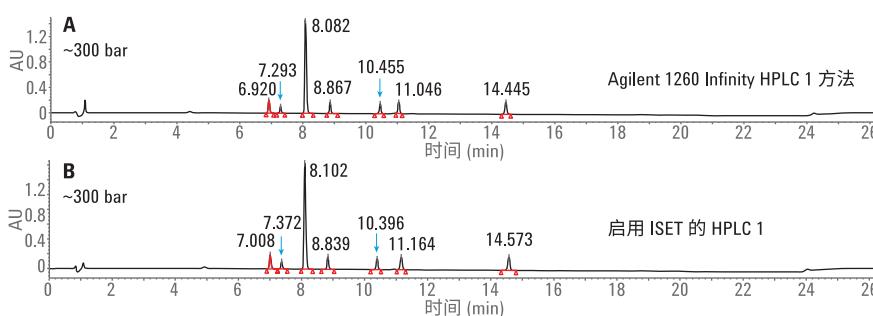


图 7. 叠加色谱图，示出对于 HPLC 方法 1，ISET 模拟的方法在 Agilent 1290 Infinity II 系统和 Agilent 1260 Infinity 系统上的相似性

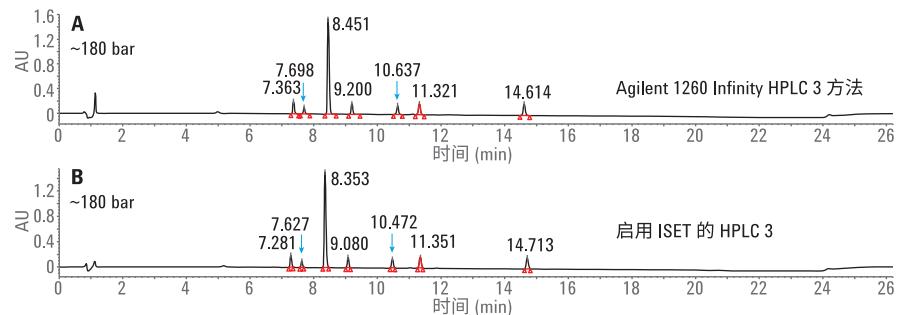


图 8. 叠加色谱图, 示出对于 HPLC 方法 3, ISET 模拟的系统与 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统的相似性

表 7. 计算得到的 HPLC 方法 1 的百分比偏差。发现所有偏差均处于可接收标准的允许限度内 (分离度 -5% 和保留时间 $\pm 5\%$)

	API 分离度	API RT (min)	杂质 B RT (min)	杂质 G RT (min)	杂质 G 分离度
Agilent 1260 Infinity HPLC 1	8.01	8.08	10.45	11.05	5.63
启用 ISET 的 HPLC 1	8.46	8.06	10.38	11.07	6.52
百分比偏差 (%)	+4.3	-0.24	-0.6	+0.1	+13.6

表 8. 计算得到的 HPLC 方法 3 的百分比偏差。发现所有偏差均处于可接收标准的允许限度内 (分离度 -5% 和保留时间 $\pm 5\%$)

	API 分离度	API RT (min)	杂质 B RT (min)	杂质 G RT (min)	杂质 G 分离度
Agilent 1260 Infinity HPLC 3	7.63	8.45	10.63	11.35	5.9
启用 ISET 的 HPLC 3	7.32	8.35	10.47	11.32	7.3
百分比偏差 (%)	-4.2	-0.24	-0.6	+0.1	+13.6

表 9. 表明 HPLC 方法 1 和 3 重现性的 RSD 值

	杂质 G Rs	杂质 G RT	API RT	API Rs	杂质 G 峰面积	API 峰面积
HPLC 方法 1						
平均值 (min)	5.46	11.03	8.07	8.05	748439	5778226
SD	0.05	0.008	0.008	0.01	2951.619	5852.5
RSD	0.96	0.07	0.10	0.14	0.39	0.10
HPLC 方法 3						
平均值 (min)	5.52	11.04	8.07	8.07	752041.8	5784162
SD	0.06	0.005	0.004	0.01	3421.39	4937.24
RSD	1.13	0.04	0.05	0.16	0.45	0.08

结论

利用安捷伦仪器控制框架 (ICF) 软件作为接口，通过 Waters Empower 3 色谱数据处理系统、Waters ICS 和 Fusion QbD 软件控制 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪，可开发出快速而稳定的 UHPLC 方法。根据 QbD 原理，在优化后生成设计空间。根据可接受标准对五点设计空间进行验证，结果表明空间满足所有标准。CMA 的预测值与实验值相符。方法满足系统适用性要求（杂质 B 和 G 的分离度 >2 ），且所有色谱峰在 3.7 分钟的梯度时间内均达到了基线分离。最终 UHPLC 方法具有重现性（API 和杂质 G 峰面积 RSD < 0.5 ）与稳定性。

使用安捷伦 ISET 技术实现了从 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统到 Agilent 1260 Infinity 系统的无缝方法转换。该方法可适应目标系统的压力限值。对模拟模式下的结果与目标系统的结果进行了比较。结果证明，将 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪、ISET、ICF 以及第三方 CDS 和 Fusion QbD 相结合，可实现方法开发、QbD 原理和方法转移。

参考文献

1. Metzlaff, M. Agilent 1290 Infinity II LC with ISET – Emulation of the Agilent 1100 Series LC Through Waters Empower Software (采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪 — 通过 Waters Empower 软件模拟 Agilent 1100 系列液相色谱仪)。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6541EN, 2016
2. Vinayak, A. K. 采用智能系统模拟技术实现 Agilent 1290 Infinity UHPLC 中基于 QbD 的方法开发以及到 HPLC 的无缝方法转移。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5701CHCN, 2015
3. Huesgen, A. G. Fast screening of mobile and stationary phases with the Agilent 1290 Infinity LC and seamless method transfer to an Agilent 1200 Series LC using ISET (通过 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪对流动相与固定相进行快速筛选并利用 ISET 实现到 Agilent 1200 系列液相色谱的无缝方法转移)。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0989EN, 2012
4. European pharmacopeia 8.7, 04/2016:1491, pg: 5703
5. HPLC 计算器：用于色谱柱性能评估和 HPLC 方法转移的软件 <http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/telechargement-en.htm>

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

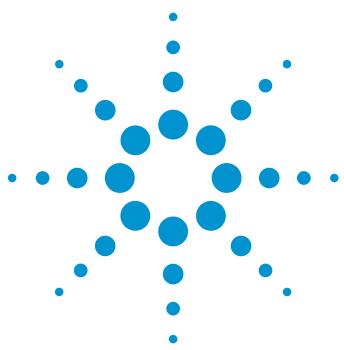
仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、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, 中国出版
5991-7505CHCN



Agilent Technologies



使用 Agilent 1290 Infinity II 方法 开发解决方案自动筛选固定相和 流动相

技术概述

作者

Edgar Naegele 和 Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司
Waldbonn, Germany

摘要

本技术概述展示了如何使用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案自动筛选固定相和流动相。该解决方案配备 Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱，可在最多八根色谱柱之间进行自动切换。Agilent 1290 Infinity II 全能泵配有两个溶剂选择阀，最多可连接 26 种不同的溶剂。Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件的安捷伦方法筛选向导有利于轻松设置方法，在一个序列中采用色谱柱、流动相和温度的不同组合。



Agilent Technologies

前言

在当今的制药、食品和环境分析实验室中，可采用 UHPLC 方法分析多种具有不同化学性质的化合物。这些分析中用到了多种不同的固定相、溶剂和改性剂。因此，开发相应的方法来解决这些分析问题可能非常耗时。为克服这一挑战，可采用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案对固定相和流动相进行自动筛选。Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱最多可容纳八根不同的色谱柱，能够在较宽的温度范围内进行精确的温度控制。通过具有最低内部体积和最高效率的热交换器进行热传递，保证了出色的保留时间稳定性，可获得优异的保留时间重现性¹。Agilent 1290 Infinity II 全能泵配备两个溶剂选择阀，最多提供 26 个通道，可支持不同溶剂和缓冲液。这项功能支持 1000 多种可能的分析条件。为设置相应的方法，提供了安捷伦方法筛选向导作为 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件的插件工具。该向导能够在简单的设置方案中对色谱柱、溶剂、梯度和温度进行筛选。在设置过程结束时，创建包括所有可能组合的方法序列。该序列还包含必要的冲洗方法、色谱柱平衡方法和色谱柱储存条件。

本技术概述展示了 1290 Infinity II 方法开发解决方案的典型设置。具体而言，从硬件角度展示了 Agilent Infinity II 高容量柱温箱和 1290 Infinity II 全能泵的设置。从软件角度介绍了方法筛选向导中的色谱柱、溶剂和温度筛选的实验设置以及最终创建的筛选序列。

实验部分

仪器

Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案包括下列模块：

- Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，包括阀驱动 (选件 #058)，配备包括毛细管工具包 (选件 #005) 的 Agilent Quick-Change 快速更换色谱柱选择阀 (G4239C, 1300 bar)，最多可安装八根色谱柱
- Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (2x G1170A)，配备 Agilent Quick-Change 快速更换 12 位/13 通溶剂选择阀 (2x G4235A)

软件

用于液相色谱和液质联用系统的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，C.01.07 版（最低驱动程序要求 A.02.11 SP1），包含方法筛选向导 A.02.05 版

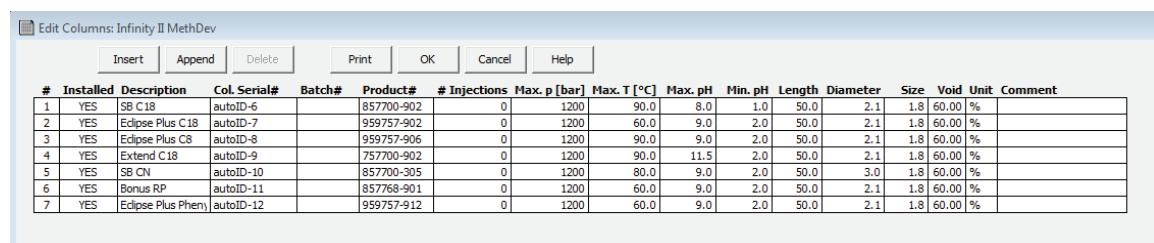
色谱柱

- Agilent ZORBAX RRHD SB-C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 857700-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 959757-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 959757-906)
- Agilent ZORBAX RRHD Extend C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 757700-902)
- Agilent ZORBAX RRHD SB-CN, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 857700-305)
- Agilent ZORBAX RRHD Bonus RP, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 857768-901)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm (部件号 959757-912)

仪器设置

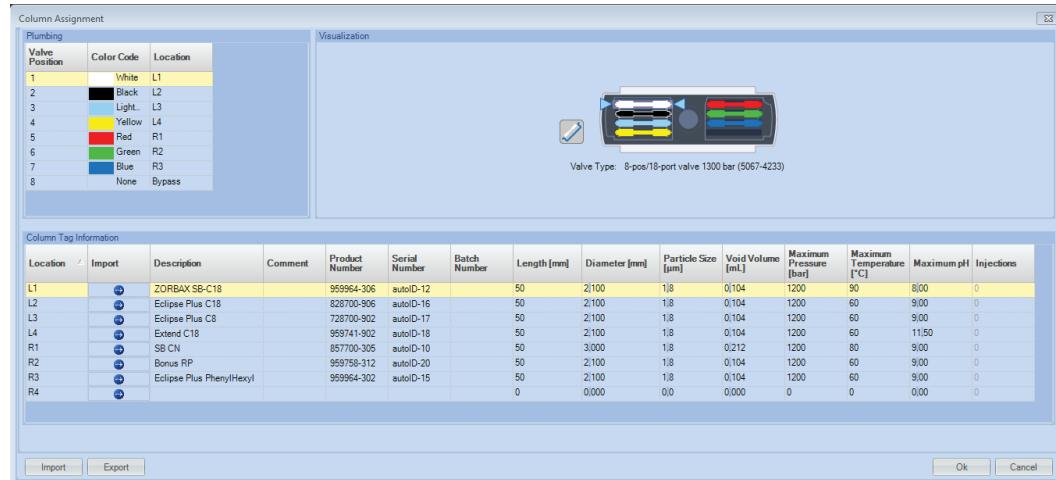
用于所有应用的色谱柱均在 ChemStation 色谱柱列表中进行定义（图 1）。此外，还需要给出每根色谱柱的描述、几何数据、粒径以及 pH、压力和温度等限制。已安装的色谱柱应在表格的第一列（图 1）中标记为 YES（是），以确保色谱柱描述已分配至相应的结果。

该色谱柱列表直接与 1290 Infinity II 高容量柱温箱的 Column Assignment（色谱柱分配）相连（图 2）。在该色谱柱分配中，可以选择位置在 1290 Infinity II 高容量柱温箱左侧或右侧的色谱柱，并为其关联一个颜色代码。



#	Installed	Description	Col. Serial#	Batch#	Product#	# Injections	Max. p [bar]	Max. T [°C]	Max. pH	Min. pH	Length	Diameter	Size	Void	Unit	Comment
1	YES	SB C18	autoID-6		857700-902	0	1200	90.0	8.0	1.0	50.0	2.1	1.8	60.00	%	
2	YES	Eclipse Plus C18	autoID-7		959757-902	0	1200	60.0	9.0	2.0	50.0	2.1	1.8	60.00	%	
3	YES	Eclipse Plus C8	autoID-8		959757-906	0	1200	90.0	9.0	2.0	50.0	2.1	1.8	60.00	%	
4	YES	Extend C18	autoID-9		757700-902	0	1200	90.0	11.5	2.0	50.0	2.1	1.8	60.00	%	
5	YES	SB CN	autoID-10		857700-305	0	1200	80.0	9.0	2.0	50.0	3.0	1.8	60.00	%	
6	YES	Bonus RP	autoID-11		857768-901	0	1200	60.0	9.0	2.0	50.0	2.1	1.8	60.00	%	
7	YES	Eclipse Plus Phenyl	autoID-12		959757-912	0	1200	60.0	9.0	2.0	50.0	2.1	1.8	60.00	%	

图 1. Agilent ChemStation 色谱柱列表。提供了所有可用色谱柱的概况



The dialog box contains two main tabs: 'Plumbing' and 'Column Tag Information'.

Plumbing Tab: Shows a table of 8 valve positions (1-8) with color codes (White, Black, Light, Yellow, Red, Green, Blue, None) and locations (L1-L4, R1-R4). It also includes a diagram of an 8-pos/18-port valve and the text 'Valve Type: 8-pos/18-port valve 1300 bar (5067-4233)'.

Valve Position	Color Code	Location
1	White	L1
2	Black	L2
3	Light	L3
4	Yellow	L4
5	Red	R1
6	Green	R2
7	Blue	R3
8	None	Bypass

Column Tag Information Tab: Shows a table of columns assigned to specific locations (L1-L4, R1-R4). Each row includes a 'Import' button, a description, a comment, product number, serial number, batch number, length, diameter, particle size, void volume, maximum pressure, maximum temperature, maximum pH, and injections.

Location	Import	Description	Comment	Product Number	Serial Number	Batch Number	Length [mm]	Diameter [mm]	Particle Size [µm]	Void Volume [ml.]	Maximum Pressure [bar]	Maximum Temperature [°C]	Maximum pH	Injections
L1	Import	ZORBAX SB-C18		95964-306	autoID-12		50	2.100	1.8	0.104	1200	90	8.00	0
L2	Import	Eclipse Plus C18		828700-906	autoID-16		50	2.100	1.8	0.104	1200	60	9.00	0
L3	Import	Eclipse Plus C8		728700-902	autoID-17		50	2.100	1.8	0.104	1200	60	9.00	0
L4	Import	Extend C18		959741-902	autoID-18		50	2.100	1.8	0.104	1200	60	11.50	0
R1	Import	SB CN		857700-305	autoID-10		50	3.000	1.8	0.212	1200	80	9.00	0
R2	Import	Bonus RP		959758-312	autoID-20		50	2.100	1.8	0.104	1200	60	9.00	0
R3	Import	Eclipse Plus PhenylHexyl		959964-302	autoID-15		50	2.100	1.8	0.104	1200	60	9.00	0
R4	Import						0	0.000	0.0	0.000	0	0	0.00	0

图 2. Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱中的色谱柱分配。每根色谱柱都分配了一个明确位置

可以在 1290 Infinity II 高容量柱温箱的 Method (方法) 选项卡中选择每种方法使用的色谱柱 (图 3)。与之前的版本不同，色谱柱被分配至 1290 Infinity II 高容量柱温箱中的相应位置，然后进行相应的选择。合适的色谱柱可在通过显示所有已分配色谱柱的下拉菜单进行选择，也可通过单击 1290 Infinity II 高容量柱温箱的图像中具有对应颜色代码的色谱柱来选择。屏幕会显示阀的当前位置，该位置自动关联至所选色谱柱。阀位置、所选色谱柱的颜色代码以及产品编号会显示在 Agilent ChemStation 中，以便快速查看 (图 4)。

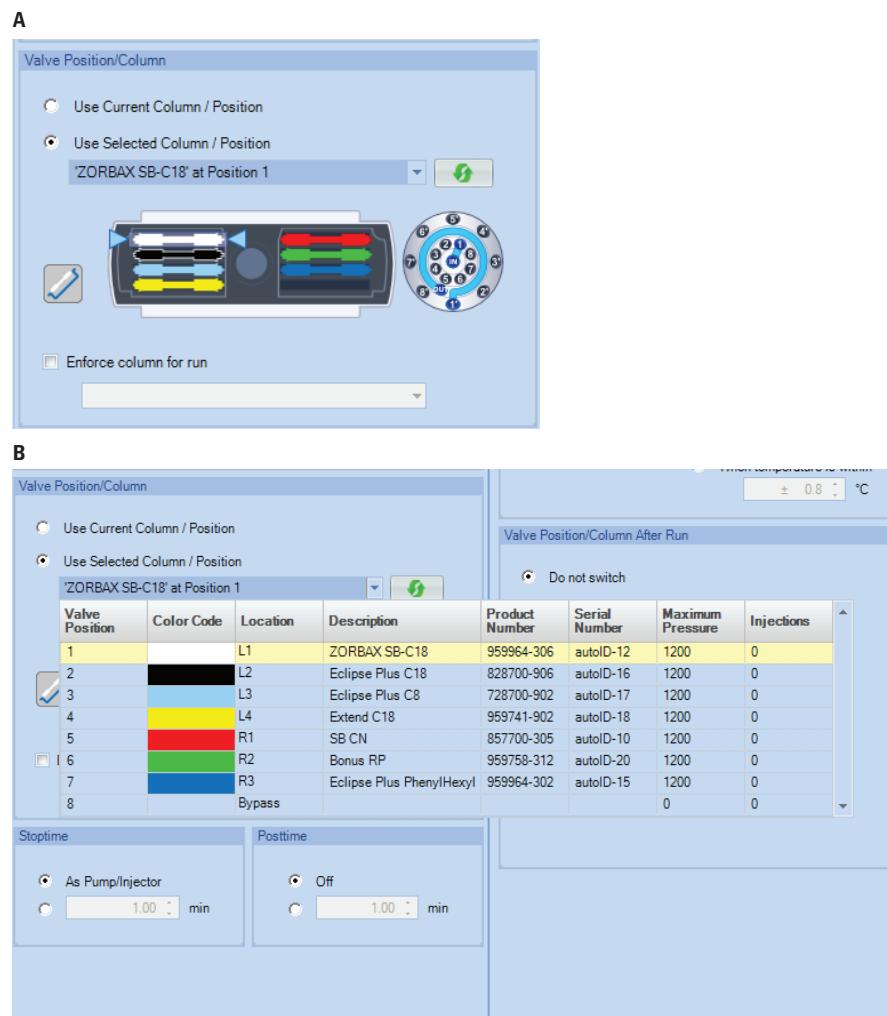


图 3. 使用下拉菜单从 1290 Infinity II 高容量柱温箱的 Method (方法) 选项卡中进行的色谱柱选择

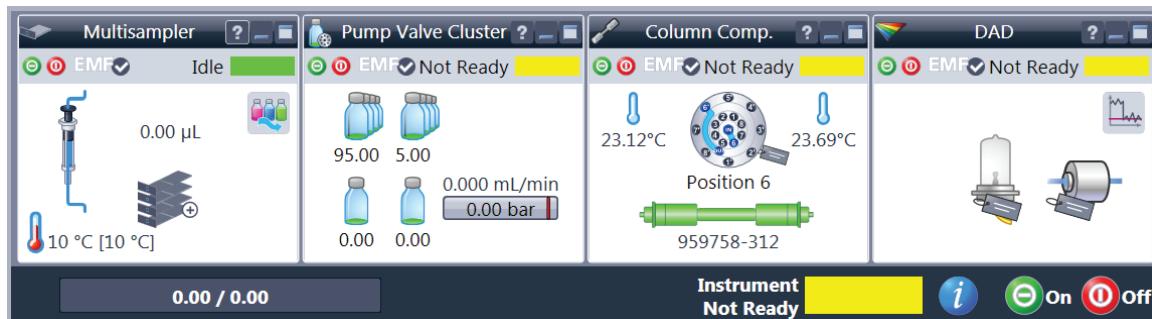


图 4. Agilent ChemStation 的仪器面板，突出显示了当前色谱柱

溶剂分配方式与此类似。在仪器配置中将溶剂选择阀分配至泵通道（图中未显示）。在 Pump Valve Cluster Configuration（泵阀簇配置）选项卡中，溶剂选择阀可使用所关联的溶剂命名（图 5）。可通过在下拉菜单中选取正确的溶剂或溶剂类型来选择压缩系数校准，还可添加 pH 和摩尔浓度值。在 Pump Valve Cluster Method（泵阀簇方法）选项卡中，为通道 A 和通道 B 选择正确的溶剂，阀将自动切换至正确位置（图 6）。ChemStation 仪器面板的泵部分会显示可用的多种溶剂（图 4）。

Pump Valve Cluster Configuration: Instrument 3						
Channel	Solvent	pH	Molarity (mM)	Solvent Name	Solvent Type	Viscosity (cP)
A: Valve 1 - Pos. 1					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 2	10 mM ABC, pH 8			10 mM ABC, pH 8	100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 3	Water			Water	100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 4	Water + 0.1% TFA			Water + 0.1% TFA	100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 5					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 6					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 7					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 8					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 9					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 10					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 11					100.0 % Water V.03	▼
A: Valve 1 - Pos. 12					100.0 % Water V.03	▼
B: Valve 2 - Pos. 1	Methanol			Methanol	100.0 % Methanol V...	▼
B: Valve 2 - Pos. 2	Methanol + 0.1 % TFA			Methanol + 0.1 % TFA	100.0 % Methanol V...	▼
B: Valve 2 - Pos. 3	ACN + 0.1 % TFA			ACN + 0.1 % TFA	100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 4					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 5	ACN			ACN	100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 6					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 7					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 8					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 9					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 10					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 11					100.0 % Acetonitrile...	▼
B: Valve 2 - Pos. 12					100.0 % Acetonitrile...	▼
Channel C	Solvent 3			Solvent 3	100.0 % Acetonitrile...	▼
Channel D	Solvent 4			Solvent 4	100.0 % Water V.03	▼

图 5. Agilent ChemStation 中的 Pump Valve Cluster Configuration（泵阀簇配置）选项卡

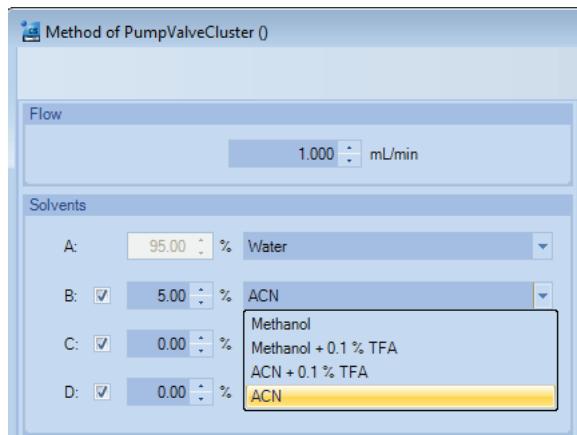


图 6. Agilent ChemStation 中的 Pump Valve Cluster Method（泵阀簇方法）选项卡

方法筛选向导

方法筛选向导能够轻松设置多个序列，以对不同的液相色谱条件（包括不同的色谱柱、溶剂、梯度和温度）进行筛选。最后，方法筛选向导可自动创建序列，其中包括溶剂更换、重新平衡以及在更换色谱柱和溶剂时进行色谱柱储存。用户能够通过选择筛

选色谱柱、梯度、温度和溶剂的方法，来选择方法筛选的选项。在色谱柱筛选的对话框中，可检查研究中必需的色谱柱（图 7）。如果色谱柱具有不同的内径和长度，则将方法转移至当前的色谱柱几何尺寸，以保证结果的可比性。

可以在溶剂筛选对话框中设置必须使用的不同溶剂（图 8）。Agilent 1290 Infinity II 全能泵是一款四元泵，可用于产生二元、三元或四元梯度。本研究采用二元泵配置，泵连接了两个溶剂通道，以输送具有二元梯度的溶剂。

Step 3 of 10: Set up column screening																	
	Use	Name	Serial No.	Diameter [mm]	Length [mm]	Particle Size [μm]	Void Vol [ml]	Max Temp [°C]	App Max Temp [°C]	Min pH	Max pH	Max pressure [bar]	Standby Temp [°C]	Eq. Factor	TCC #	Location	
	<input checked="" type="checkbox"/>	ZORBAX SB-C18	autoID-12	2.100	50.000	1.800	0.104	90.0	60.0	2.0	8.0	1200	not controlled	1.000	1	Position 1 left	
	<input checked="" type="checkbox"/>	Eclipse Plus C18	autoID-16	2.100	50.000	1.800	0.104	60.0	60.0	0.0	9.0	1200	not controlled	1.000	1	Position 2 left	
	<input checked="" type="checkbox"/>	Eclipse Plus C8	autoID-17	2.100	50.000	1.800	0.104	60.0	60.0	0.0	9.0	1200	not controlled	1.000	1	Position 3 left	
	<input checked="" type="checkbox"/>	Extend C18	autoID-18	2.100	50.000	1.800	0.104	60.0	60.0	0.0	11.5	1200	not controlled	1.000	1	Position 4 left	
	<input checked="" type="checkbox"/>	SB CN	autoID-10	3.000	50.000	1.800	0.212	80.0	60.0	2.0	9.0	1200	not controlled	1.000	1	Position 1 right	
	<input checked="" type="checkbox"/>	Bonus RP	autoID-20	2.100	50.000	1.800	0.104	60.0	60.0	0.0	9.0	1200	not controlled	1.000	1	Position 2 right	
	<input checked="" type="checkbox"/>	Eclipse Plus PhenylHexyl	autoID-15	2.100	50.000	1.800	0.104	60.0	60.0	0.0	9.0	1200	not controlled	1.000	1	Position 3 right	

图 7. 用于色谱柱筛选的安捷伦方法筛选向导对话框。在 Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱安装的色谱柱中，可以检查当前研究必需的色谱柱。可根据不同的色谱柱几何尺寸自动调整流速等条件

Step 4 of 10: Set up solvent screening																			
Combine Solvents from quaternary pump: <input type="radio"/> binary <input type="radio"/> ternary <input checked="" type="radio"/> quaternary																			
A									B										
Solvents on channel A:									Solvents on channel B:										
<input checked="" type="checkbox"/> 02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03) <input checked="" type="checkbox"/> 03: Water (Calib.: 100.0 % Water V.03) <input checked="" type="checkbox"/> 04: Water + 0.1% TFA (Calib.: 100.0 % Water V.03)									<input checked="" type="checkbox"/> 01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03) <input checked="" type="checkbox"/> 02: Methanol + 0.1 % TFA (Calib.: 100.0 % Methanol V.03) <input checked="" type="checkbox"/> 03: ACN + 0.1 % TFA (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03) <input checked="" type="checkbox"/> 05: ACN (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03)									<input type="button" value="Select All"/> <input type="button" value="Invert"/>	

图 8. 用于溶剂筛选的安捷伦方法筛选向导对话框。在二元混合设置中使用 Agilent 1290 Infinity II 全能泵

创建最终序列，并包括所有必要的溶剂更换（蓝色）、色谱柱平衡（绿色）和作为无进样单独运行的色谱柱储存方法（黄色）（图 9）。

方案中将要使用的溶剂体积可通过方法筛选向导进行计算，结果显示在 Solvent Usage（溶剂用量）选项卡 10 个步骤中的第 10 步：汇总（图 10）。

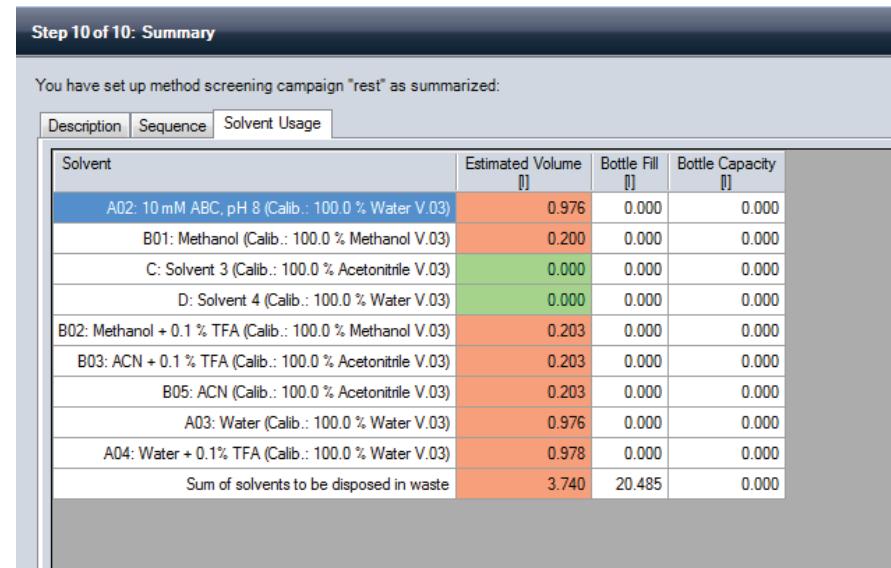


图 10. 安捷伦方法筛选向导计算了整个方案设置的溶剂用量

Description	Sequence	Solvent Usage	Row	Method	Type	Run Time [min]	Post Time [min]	Val	Column	Solvent(s)	Gradient	Temp [°C]	
1		RushBypass0001.m	1	Rush		3.000	7.50	0.00	Bypass	50.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 50.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03)			
2		RushBypass0002.m	2	Rush		3.000	0.50	0.00	Bypass	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)			
3		Equilibration0001.m	3	Equilibration		1.000	0.52	0.00	ZORBAX SBC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	30.0		
4	Sample 1	1 Injection0001.m	4	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	ZORBAX SBC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 30.0	
5		Equilibration0002.m	5	Equilibration		1.000	2.02	0.00	ZORBAX SBC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	40.0		
6	Sample 1	1 Injection0002.m	6	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	ZORBAX SPC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 40.0	
7		Equilibration0003.m	7	Equilibration		1.000	2.02	0.00	ZORBAX SPC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	50.0		
8	Sample 1	1 Injection0003.m	8	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	ZORBAX SPC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 50.0	
9		Equilibration0004.m	9	Equilibration		1.000	2.02	0.00	ZORBAX SPC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	60.0		
10	Sample 1	1 Injection0004.m	10	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	ZORBAX SPC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 60.0	
11		Storage0001.m	11	Column storage		1.000	1.81	0.00	ZORBAX SPC18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)			
12		Storage0001.m	12	Column storage		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	30.0		
13	Sample 1	1 Injection0005.m	13	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 30.0	
14		Equilibration0006.m	14	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	40.0		
15	Sample 1	1 Injection0006.m	15	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 40.0	
16		Equilibration0007.m	16	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	50.0		
17	Sample 1	1 Injection0007.m	17	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 50.0	
18		Equilibration0008.m	18	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	60.0		
19	Sample 1	1 Injection0008.m	19	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 60.0	
20		Storage0002.m	20	Column storage		1.000	1.81	0.00	Eclipse Plus C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)			
21		Storage0009.m	21	Column storage		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	30.0		
22	Sample 1	1 Injection0009.m	22	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 30.0	
23		Equilibration0010.m	23	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	40.0		
24	Sample 1	1 Injection0010.m	24	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 40.0	
25		Equilibration0011.m	25	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	50.0		
26	Sample 1	1 Injection0011.m	26	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 50.0	
27		Equilibration0012.m	27	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	60.0		
28	Sample 1	1 Injection0012.m	28	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 60.0	
29		Storage0013.m	29	Column storage		1.000	1.81	0.00	Eclipse Plus C8	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)			
30		Equilibration0013.m	30	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Extend C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	30.0		
31	Sample 1	1 Injection0013.m	31	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Extend C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 30.0	
32		Equilibration0014.m	32	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Extend C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	40.0		
33	Sample 1	1 Injection0014.m	33	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Extend C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 40.0	
34		Equilibration0015.m	34	Equilibration		1.000	2.02	0.00	Extend C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	50.0		
35	Sample 1	1 Injection0016.m	35	Injection		1.000	2.50	2.00	D1B-D1	Extend C18	95.0 % A02: 10 mM ABC, pH 8 (Calib.: 100.0 % Water V.03), 5.0 % B01: Methanol (Calib.: 100.0 % Methanol V.03), 0.0 % C: Solvent 3 (Calib.: 100.0 % Acetonitrile V.03), 0.0 % D: Solvent 4 (Calib.: 100.0 % Water V.03)	Gradient 1 50.0	

图 9. 用于序列设置的安捷伦方法筛选向导对话框包括溶剂更换方法、平衡方法和色谱柱储存方法

安捷伦方法筛选向导的初始方法

参数	值
流速	1 mL/min
梯度	0 min 时 B 为 5%， 1.5 min 时 B 为 75%， 2 min 时 B 为 95%
停止时间	2.5 min
后运行时间	2 min
进样量	1 μ L
检测条件	254/10 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 80 Hz
使用	30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 进行温度筛选

使用溶剂的溶剂筛选

流动相 A

水, 碳酸氢铵缓冲液 (ABC), pH 8,
水 + 0.1% TFA

流动相 B

甲醇 (MeOH), MeOH + 0.09% TFA,
乙腈 (ACN), ACN + 0.09% TFA

样品

HPLC 混标

化学品

所有化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。所有溶剂均购自德国 Merck 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

结果与讨论

在方法筛选方案中, 将七根色谱柱与三种水相溶剂和四种有机溶剂结合使用。将高容量柱温箱的第八个位置用作旁路, 在需要更换溶剂时对系统进行快速冲洗。此外, 在 30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 下进行温度筛选。在整个方案中使用通用梯度。由方法筛选向导创建必要的序列, 共进行了 166 次进样以及相应的冲洗、平衡和储存运行。

图 11 示出在 40 °C 下使用水和乙腈作为溶剂分离样品混标的色谱柱筛选结果。对代表所用七种色谱柱的七幅色谱图进行了比较。采用这一温度和溶剂组合, Agilent ZORBAX SB-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 色谱柱表现出最佳分离效果, 其次是 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、Agilent ZORBAX Extend C18 和 Agilent ZORBAX Bonus RP 色谱柱。在 Agilent ZORBAX SB-CN 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱上获得的分离结果表明, 无需对这两种色谱柱进行进一步优化。

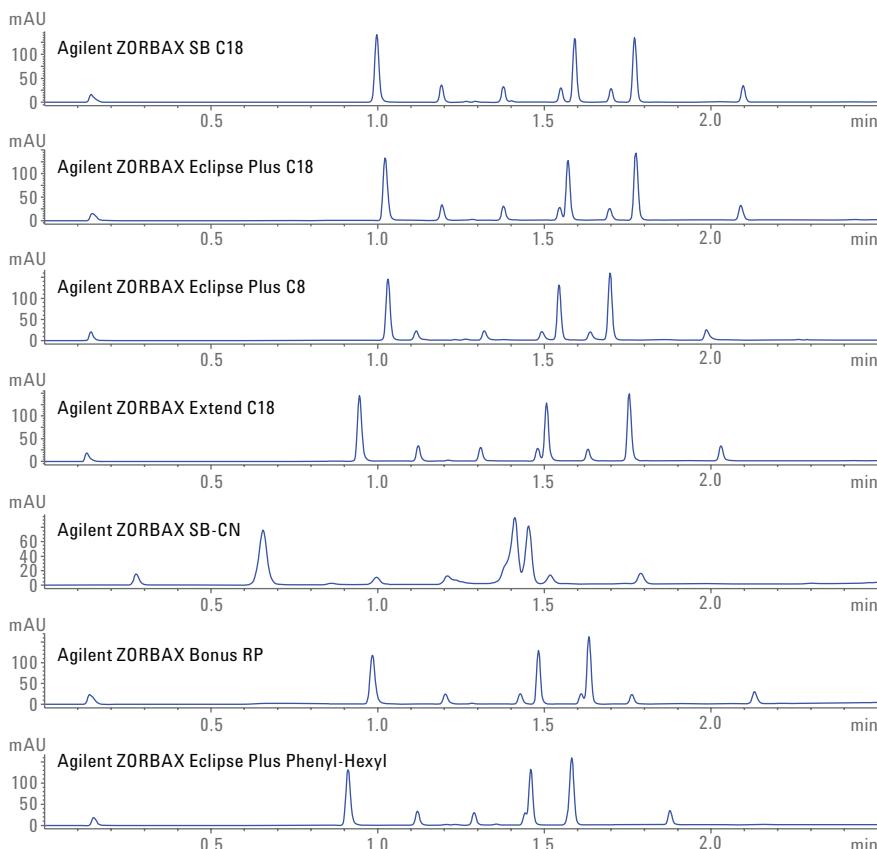


图 11. 在 40 °C 下使用水 (A) 和乙腈 (B) 对七种不同的色谱柱进行色谱柱筛选

图 12 示出在 40 °C 下采用 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱获得的溶剂筛选结果。对于这一色谱柱和温度组合，采用 10 mM 碳酸氢铵缓冲液和乙腈获得了最佳分离效果。

图 13 示出采用水和乙腈在 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱上获得的温度筛选结果。对于这一色谱柱和溶剂组合，在 60 °C 下获得了最佳分离效果。

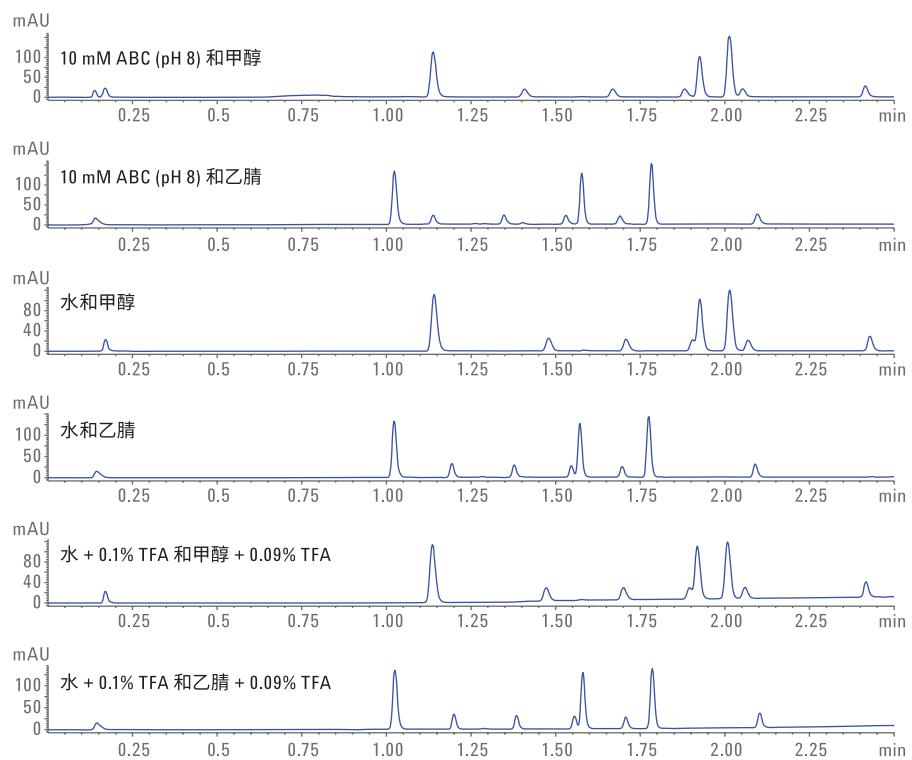


图 12. 在 40 °C 下采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱进行溶剂筛选

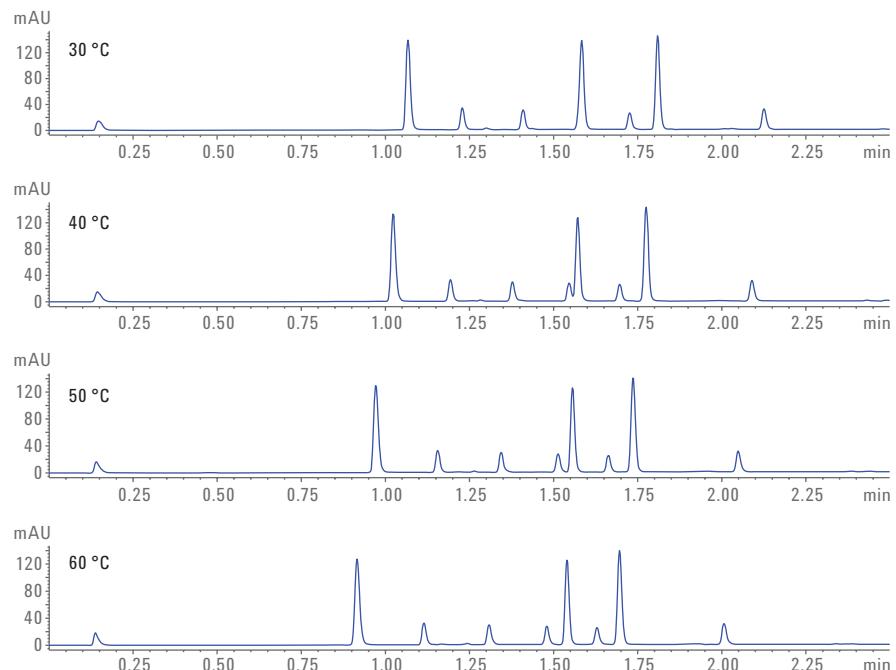


图 13. 利用温度筛选评估温度对 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱在水和乙腈中选择性的影响

为便于数据分析，尤其是运行包含多次进样的大型方案时的数据分析，可以将预配置的报告模板与 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版的智能报告工具结合使用。这些报告按检出的色谱峰或分离度列出色谱运行结果。此外，该报告创建的气泡图使用户能够找到最有希望的结果，有助于搜索最佳分离条件。图 14 和图 15 示出 50 °C 下所有进样的气泡图，显示了检出色谱峰的最大数量（图 14）以及分离度总和（图 15 在 50 °C 下每次进样所检出的最大分离度总和，以气泡图显示）。气泡的大小表示检出色谱峰的数量（图 14）或分离度总量（图 15）。两幅气泡图均在 Y 轴上显示最大保留时间，并在 X 轴上显示进样。

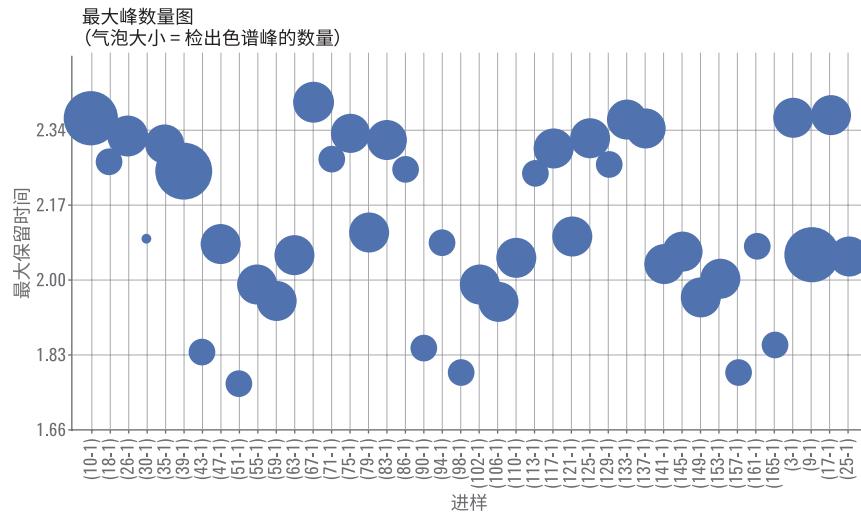


图 14. 在 50 °C 下每次进样所检出的最大峰数量，以气泡图显示

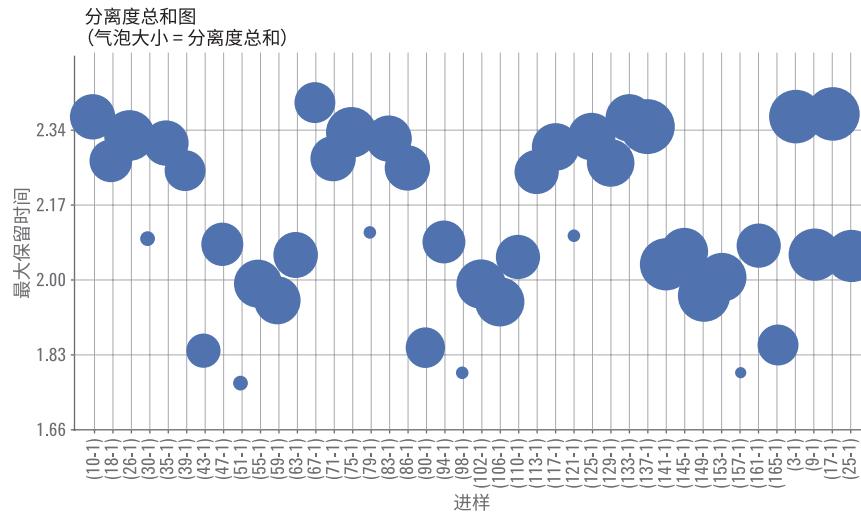


图 15. 在 50 °C 下每次进样所检出的最大分离度总和，以气泡图显示

经过全面数据评估后，确定的最佳分离条件为在 60 °C 下运行 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱，并使用水和乙腈作为流动相（图 16）。

结论

本技术概述展示了如何使用 Agilent 1290 Infinity II 方法开发解决方案和安捷伦方法筛选向导协助对固定相和流动相进行自动化筛选。方法筛选向导能够以任意可能的组合形式创建色谱柱、溶剂、梯度和温度筛选运行。所创建的筛选序列可运行所有组合，自动包括溶剂冲洗方法、色谱柱平衡和色谱柱储存方法。Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱是该系统的组成部分，最多可容纳八根色谱柱。Agilent 1290 Infinity II 全能泵配有两个溶剂选择阀，最多可输送 26 种不同溶剂。通过组合，可产生 1000 多种不同的筛选条件。使用预配置的报告模板有助于进行数据分析，加快了对最佳分离条件的寻找速度。

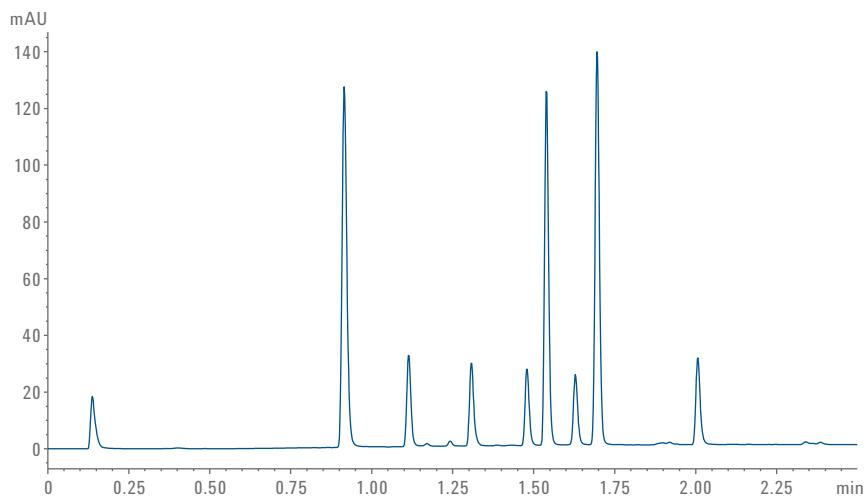


图 16. 经筛选方案评估后找出的最佳分离条件。使用水和乙腈作为洗脱液，在 60 °C 下运行 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱

参考文献

1. Schneider, S., Performance Characteristics of the Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat (Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱的性能特性)，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5991-5533EN，2015

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。

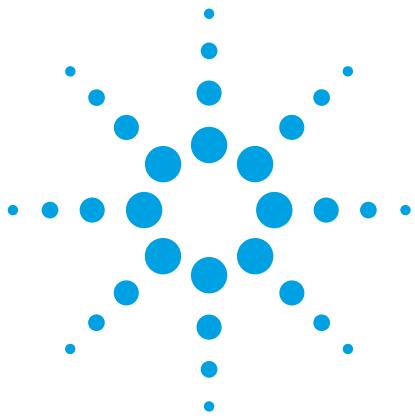
本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2017
2017 年 3 月 1 日, 中国出版
5991-5934CHCN



Agilent Technologies

特定市场的应用



使用 Poroshell 120 PFP 色谱柱开发适用于分析紫杉醇中 USP 相关化合物的方法

应用简报

临床研究

作者

Rongjie Fu

安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

采用表面多孔型 Agilent Poroshell 120 PFP $4.6 \times 250 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$ 色谱柱运行一种用于分析紫杉醇中 USP 相关化合物的分析方法。本研究采用美国药典介绍的检测紫杉醇中相关化合物的方法。将该分析方法转移至 $3.0 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ Poroshell 120 PFP 色谱柱后，可节省大量的溶剂和时间。两种色谱柱均满足所有系统适用性要求。

前言

紫杉醇 (Paclitaxel) 是一种药物，也称 Taxol 和 Onxol，1967 年首次从太平洋紫杉（短叶红豆杉）的树皮中分离出来。20 世纪 90 年代以后，采用合成方法和植物细胞发酵技术进行生产。美国药典 (USP) 中介绍了三种用于相关化合物分析的 HPLC 方法，分别基于不同的紫杉醇来源。对天然来源的紫杉醇中相关化合物的分析采用 PFP 色谱柱 [1]。

Agilent Poroshell 120 PFP（五氟苯基）固定相可以为卤代化合物的位置异构体提供卓越的保留时间和选择性。这些 PFP 色谱柱还可以用于非卤代化合物的选择性分析，如含羟基、羧基、硝基和其他极性基团的极性化合物。当官能团处于芳香或其他刚性环状系统上时，色谱柱选择性会增强 [2]。



Agilent Technologies

本研究介绍了一种利用 $4\text{ }\mu\text{m}$ Poroshell 120 PFP 色谱柱开发的 USP 相关化合物分析方法转移至 $2.7\text{ }\mu\text{m}$ Poroshell 120 PFP 色谱柱上的性能。该方法转移能够节省大量时间和溶剂。

材料与方法

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。标准品购自 USP。冰乙酸、甲醇和乙腈购自北京百灵威科技有限公司。根据 USP 的紫杉醇专论章节所述的方法配制标样和分析溶液。采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行 HPLC 分析，该系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)

色谱柱

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, $4.6 \times 100\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$
(部件号 689975-902)
- Agilent Poroshell 120 PFP, $3.0 \times 100\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$
(部件号 695975-308)
- Agilent Poroshell 120 PFP, $4.6 \times 250\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$
(部件号 690970-408)

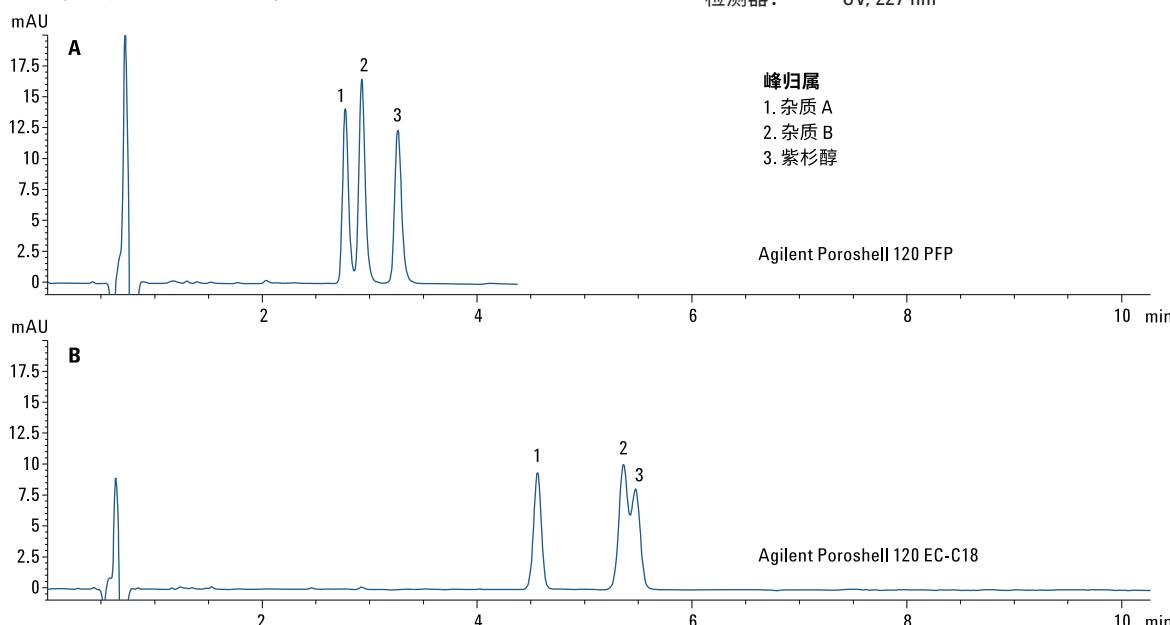


图 1. 使用 Agilent Poroshell 120 PFP 和 EC-C18 色谱柱分离紫杉醇及其杂质的选择性比较

结果与讨论

选择性比较

Poroshell 120 PFP 固定相可以为卤代化合物的位置异构体提供卓越的保留时间和选择性。在之前的一份简报中，利用该色谱柱成功分离了拉帕替尼中的同分异构体 [4]。PFP 色谱柱还可用于非卤代化合物的选择性分析，尤其是用于分析芳香或其他刚性环状系统上的官能团。紫杉醇及其杂质是此类化合物的代表，在 Poroshell 120 PFP 和 EC-C18 色谱柱上得以分离（图 1）。两种色谱柱表现出不同的选择性。PFP 色谱柱具有较短的保留时间，但是在杂质和紫杉醇之间具有良好的分离度。相反，EC-C18 色谱柱具有较长的保留时间，却无法完全分离杂质 B 和紫杉醇。

条件

色谱柱:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, $4.6 \times 100\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$ (部件号 689975-902)
	Agilent Poroshell 120 PFP, $3.0 \times 100\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$ (部件号 695975-308)
样品:	紫杉醇、杂质 A 和杂质 B，溶于含 0.5% 乙酸的甲醇中
流动相:	水:乙腈 (55:45)
柱温:	$30\text{ }^\circ\text{C}$
流速:	$4.6 \times 100\text{ mm}$ 色谱柱为 1.5 mL/min $3.0 \times 100\text{ mm}$ 色谱柱为 0.64 mL/min
进样量:	$4.6 \times 100\text{ mm}$ 色谱柱为 $4\text{ }\mu\text{L}$, $3.0 \times 100\text{ mm}$ 色谱柱为 $2\text{ }\mu\text{L}$
检测器:	UV, 227 nm

峰归属

1. 杂质 A
2. 杂质 B
3. 紫杉醇

系统适用性测试

USP 中包括用于标记为天然来源的紫杉醇的测试 1。用于分析紫杉醇中相关化合物的色谱条件要求“液相色谱仪配备 227 nm 检测器，并使用 5 μm 填料 L43 的 4.6 mm \times 25 cm 色谱柱”[1]。

在该实验中，我们首先在 USP 方法中规定的液相色谱条件下使用 Poroshell 120 PFP, 4.6 \times 250 mm, 4 μm 色谱柱。图 2 示出在该色谱柱上分析相关化合物的系统适用性分析结果。色谱图表明杂质 A 和杂质 B、杂质 B 和紫杉醇之间获得了足够高的分离度，满足系统适用性要求（如表 1 所列）。

条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 \times 250 mm, 4 μm
(部件号 690970-408)
样品: 紫杉醇、杂质 A 和杂质 B, 溶于含 0.5% 乙酸的甲醇中
流动相: A: 水
B: 乙腈; 0-35 min, 35% A; 35-60 min, 35% A-80% A;
60-70 min, 80% A-35% A; 70-80 min, 35% A
柱温: 30 °C
流速: 2.6 mL/min
进样量: 10 μL
检测器: UV, 227 nm

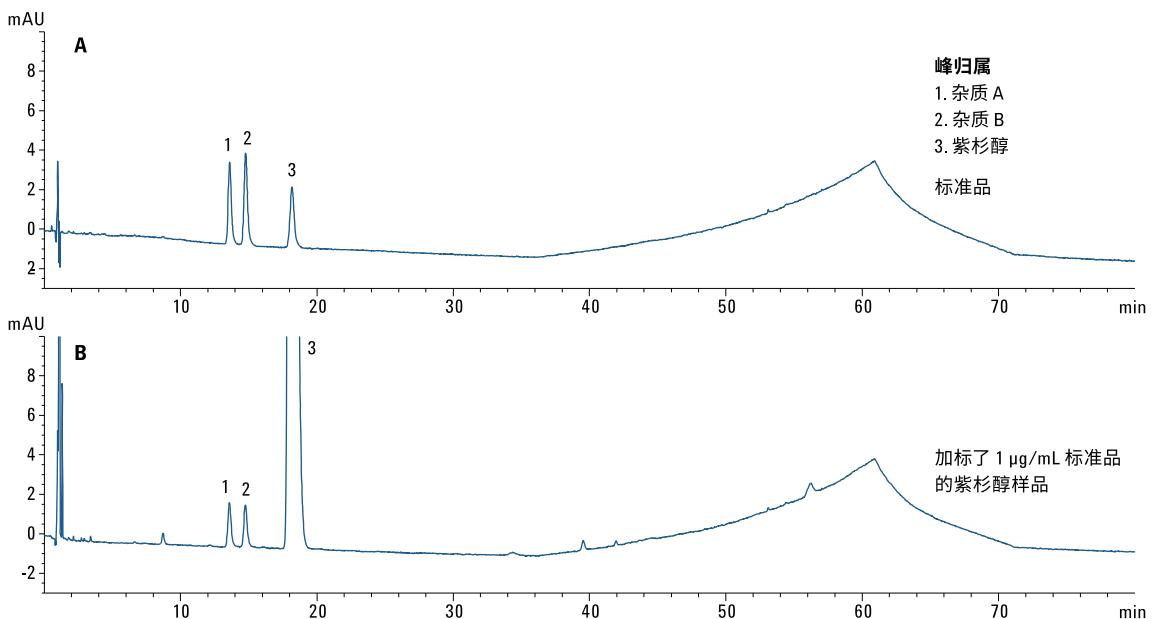


图 2. 使用 Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 \times 250 mm, 4 μm 色谱柱获得的紫杉醇标准品和加标样品的色谱图

表 1. 紫杉醇中相关化合物的 USP 色谱系统适用性要求及测定值

USP 要求	Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 \times 254 mm, 4 μm	Agilent Poroshell 120 PFP, 3.0 \times 100 mm, 2.7 μm
紫杉醇相关化合物 A 的相对保留时间约为 0.78,	$T_R\text{A} = 0.75$	$T_R\text{A} = 0.75$
紫杉醇相关化合物 B 的相对保留时间为 0.86	$T_R\text{B} = 0.81$	$T_R\text{B} = 0.81$
紫杉醇相关化合物 A 与紫杉醇相关化合物 B 之间的分离度 R 不小于 1.0	$Rs_{1,2} = 2.7$	$Rs_{1,2} = 2.2$
重复进样的相对标准偏差 不大于 2.0%	$RSD = 0.78\%$	$RSD1 = 0.59\%$

方法转移

将分析方法转移至 Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m 色谱柱（图 3）。分析时间由原色谱柱的 80 分钟缩短至 32 分钟。杂质 A 与杂质 B 的分离度为 2.2，与采用 4.6 × 250 mm 色谱柱获得的分离度 2.7 相当。窄径色谱柱显著节省了时间和溶剂，同时仍可提供满足 USP 系统适用性要求的结果。根据 USP 所述紫杉醇中相关化合物的分析方法，使用两种色谱柱测定了 USP 色谱系统适用性要求。表 1 列出了 USP 系统要求以及在色谱柱上测得的结果。由表可知，在色谱柱上运行的方法完全满足 USP 色谱系统要求。

条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 PFP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 695975-308)
样品: 紫杉醇、杂质 A 和杂质 B，溶于含 0.5% 乙酸的甲醇中
流动相: A: 水
B: 乙腈; 0-14 min, 35% A; 14-24 min, 35% A-80% A;
24-28 min, 80% A-35% A; 28-32 min, 35% A
柱温: 30 °C
流速: 1.1 mL/min
进样量: 2 μ L
检测器: UV, 227 nm

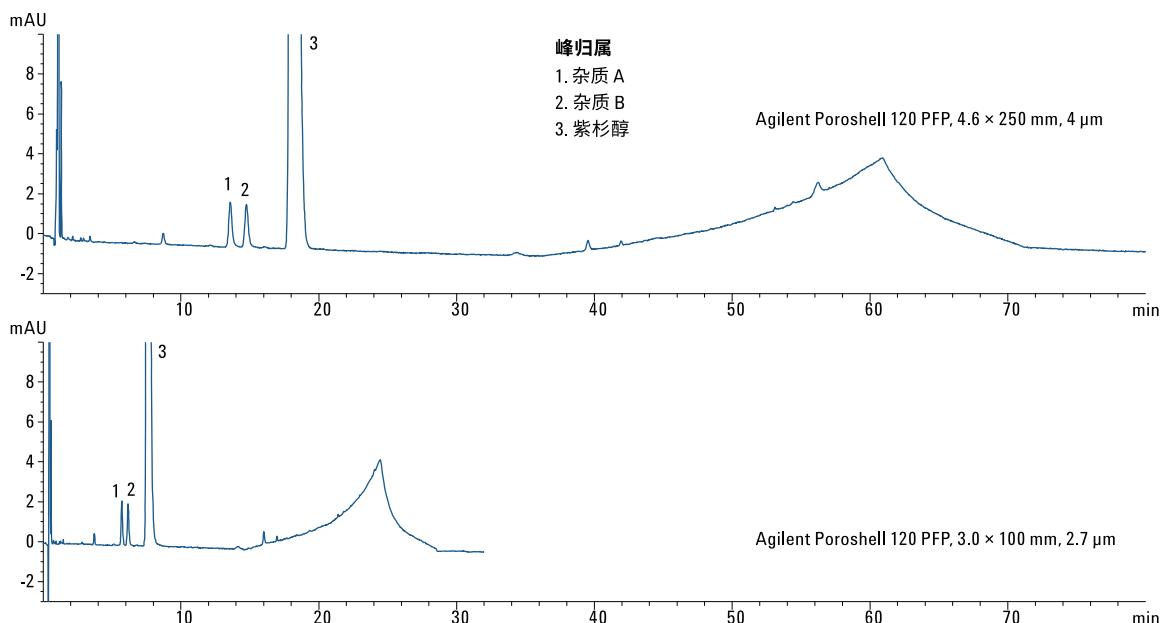


图 3. 使用 Agilent Poroshell 120 PFP, 4.6 × 250 mm, 4 μ m 色谱柱和 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m 色谱柱获得的紫杉醇加标样品色谱图

根据 2014 年 8 月 1 日以后实施的 USP37 NF32S1 指南要求，不允许改变梯度分离的柱长、色谱柱内径和填料粒径。

因此，为实现 Poroshell 120 PFP 色谱柱的分离速度和分离度优势，需要进行一些方法开发工作，并需要对多个实验参数进行测试。这些参数包括稳定性、线性、准确度、精密度、检测限、定量限、分析特异性/选择性、范围和耐用性。方法开发过程在此前的一份安捷伦应用简报中进行了详细介绍 [4]。

结论

本应用简报表明 Agilent Poroshell 120 PFP, 4 μm 色谱柱适用于紫杉醇中 USP 相关化合物的分析，该分析采用 USP 方法条件。通过方法改进，采用窄径 $3.0 \times 100 \text{ mm}$ 色谱柱能够使分析时间缩短 60%，并节省大量溶剂。

参考文献

1. Anon. USP Paclitaxel, United States Pharmacopeia 35 NF 30. United States Pharmacopeia, Rockville, MD, USA
2. Long, W; Horton, J. 采用 *Agilent Poroshell 120 PFP* 色谱柱分析位置异构体，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-4373CHCN, 2014
3. Rongjie Fu, Linhai Zhang. *Analysis of Positional Isomers in Lapatinib with Agilent Poroshell 120 PFP Columns* (采用 *Agilent Poroshell 120 PFP* 色谱柱分析拉帕替尼的位置异构体)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-5262EN, 2014
4. Long, W.; Brooks, A.; Yun Zou. *Improved Simvastatin Analysis Using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm , 3.5 μm and 1.8 μm Columns* (采用 *Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm , 3.5 μm 和 1.8 μm* 色谱柱改善对辛伐他汀的分析)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5990-3883EN, 2009

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。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。

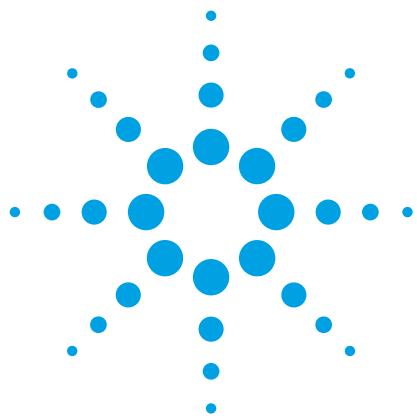
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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
5991-6283CHCN



Agilent Technologies



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]。

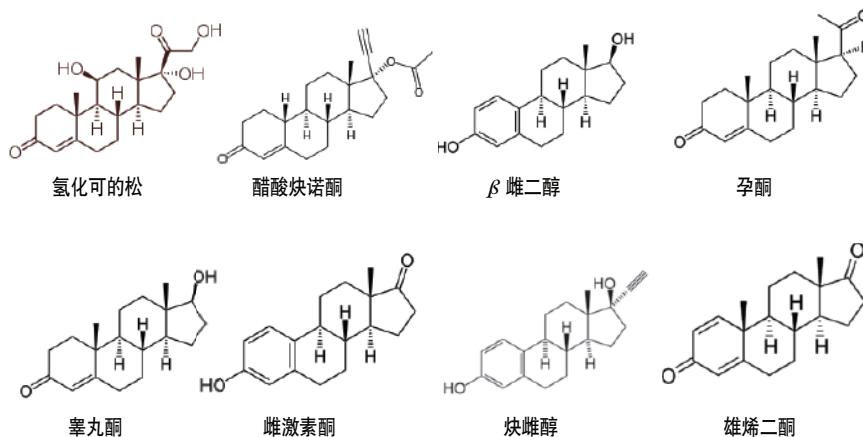


图 1. 几种甾体的结构



Agilent Technologies

调整选择性以优化甾体的分离

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。

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

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，对甾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 \times 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-902)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm (p/n 695775-902)
- Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-901)
- Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 \times 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、睾丸酮、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. 雌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 ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.460
醋酸炔诺酮	17 β -羟基-9-去甲-17 α -孕甾-4-烯-20-炔-3-酮-17-醋酸酯	C ₂₂ H ₂₈ O ₃	340.456
雌二醇	雌甾-1, 3, 5 (10) -三烯-3,17 β -二醇	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38
孕酮	孕-4-烯-3,20-二酮	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46
睾丸酮	17 α -羟基雄甾-4-烯-3-酮	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42
炔雌醇	3-羟基-19-去甲-17 α -甾-1,3,5 (10) -三烯-20-炔-17-醇	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	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 ₁₉ H ₂₄ O ₂	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 ₁₈ H ₂₂ O ₂	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。这表示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，

- 峰编号
 1. 氢化可的松
 2. β -雌二醇
 3. 雄烯二酮
 4. 塞丸酮
 5. 炔雌醇
 6. 雌激素酮
 7. 醋酸炔诺酮
 8. 孕酮

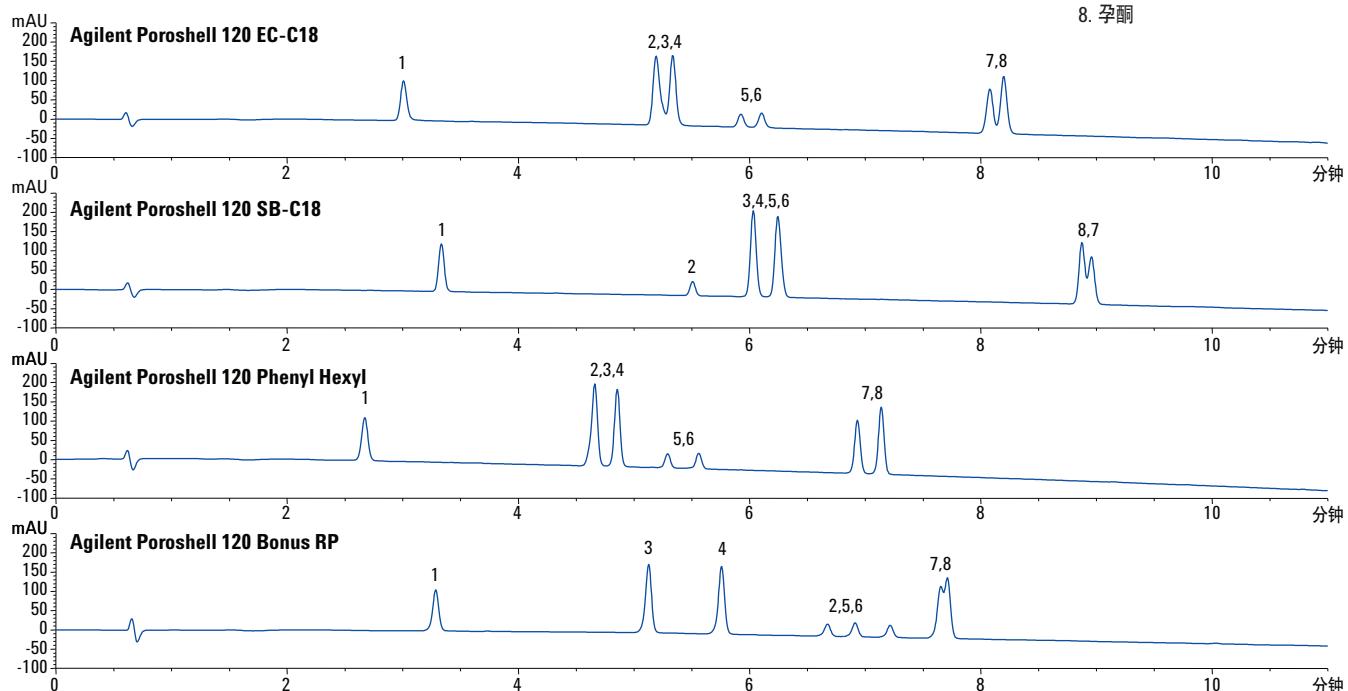


图 2. Agilent Poroshell 120 色谱柱用乙腈为流动相时对甾体的分离

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。这可能是因为 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度（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。

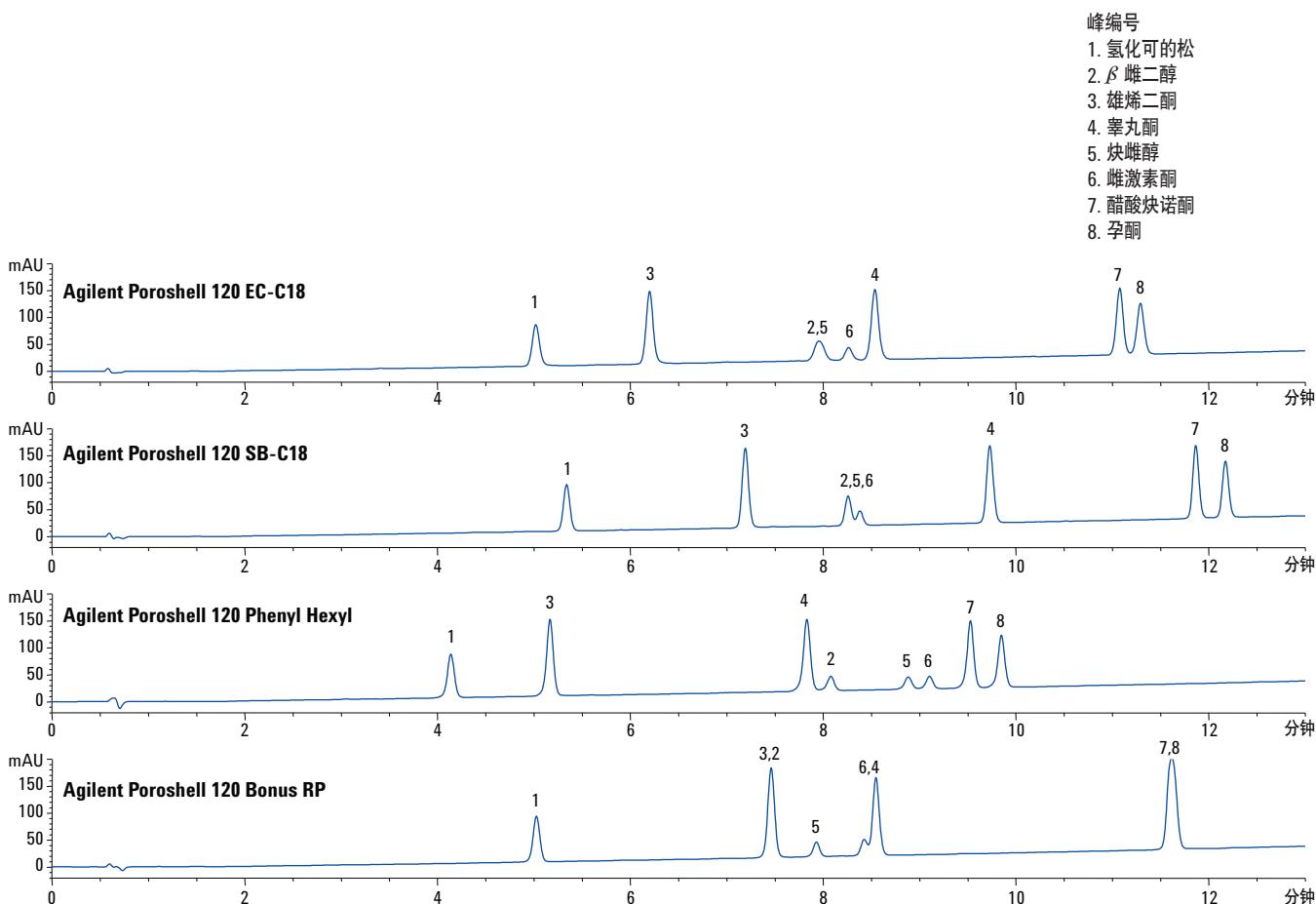


图 3. Agilent Poroshell 120 色谱柱用甲醇为流动相时对甾体的分离

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。

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

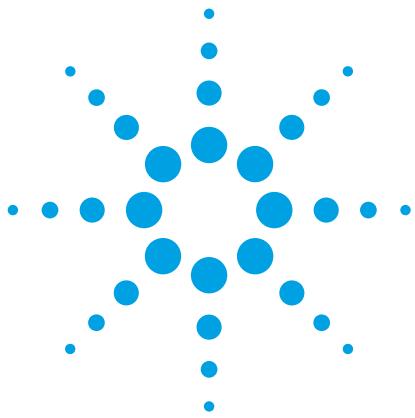
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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



Agilent Poroshell 120 固定相在黄油 抗氧化剂分离中的选择性比较

应用简报

食品检测与农业

作者

Rongjie Fu

安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

对 Agilent Poroshell 120 的各种固定相（包括 EC-C18、SB-C18、SB-Aq、Bonus-RP 和 Phenyl-Hexyl）在九种人工抗氧化剂分离中的选择性进行了比较。然后采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱并以水（含乙酸改性剂）和乙腈作为流动相，对黄油样品中这些化合物的分析方法进行优化。该方法能够很好地分离抗氧化剂，并适用于定量分析。

前言

油和脂肪等含不饱和脂肪酸的食品容易引起脂质氧化，导致食品酸败、出现异味及其营养价值降低。通常将合成的抗坏血酸棕榈酸酯和酚类抗氧化剂加入食品中以防这些不饱和脂肪酸发生氧化。相关部门允许使用一种或几种抗氧化剂来增强食物的抗氧化功能，但过量摄入抗氧化剂可能对人体健康造成一定的影响。例如，2,4,5-三羟基苯丁酮具有致突变作用，丁基羟基苯甲醚和2,6-二叔丁基-4-甲酚可能致癌，而没食子酸丙酯可能导致肾损伤 [1]。

欧洲和美国的监管机构规定了某些抗氧化剂的最高浓度，并禁止使用其他抗氧化剂 [2]。因此，食品及食品成分中抗氧化剂的测定非常重要。表 1 列出了最常加入食品中的九种抗氧化剂及其结构和缩写。

目前，中国采用一种标准 HPLC 方法来测定脂肪中的抗氧化剂。该方法使用长 15-25 cm、内径 4.6 mm 并填充有 5 μm C18 键合二氧化硅颗粒的色谱柱，以及由乙酸（洗脱液 A）和甲醇（洗脱液 B）组成的流动相。但是，该方法的



Agilent Technologies

分析速度相当慢，分析时间达到 30 分钟以上 [3]。脂肪加工业的 QC 实验室正在寻求缩短分析时间的方法，因为已经发现某些抗氧化剂于室温下会在溶剂中发生明显降解。因此，出于经济实用性考虑，需要一种快速、准确而稳定的方法。

本应用简报介绍了使用配备 Poroshell 120 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪分析黄油中的九种抗氧化剂。实验中比较了各种固定相的分离选择性。由于 Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱相比其他固定相具有更出色的选择性和保留时间，因此选择该色谱柱进行方法开发，然后对方法进行优化，使其适合分析各种黄油样品。

表 1. 本研究所用的人工抗氧化剂

峰号	名称	CAS	结构
1	没食子酸丙酯 (PG)	121-79-9	
2	2,4,5-三羟基苯丁酮 (THBP)	1421-63-2	
3	2-叔丁基对苯二酚 (TBHQ)	1948-33-0	
4	去甲二氢愈创木酸 (NDGA)	500-38-9	
5	丁基羟基苯甲醚 (BHA)	25013-16-5	
6	Ionox-100	88-26-6	
7	没食子酸辛酯 (OG)	1034-01-1	
8	2,6-二叔丁基-4-甲酚 (BHT)	128-37-0	
9	没食子酸十二酯 (DG)	1166-52-5	

材料与方法

HPLC 分析采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪，该液相色谱仪包括：Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)、Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C) 和 Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)。

色谱柱

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 695975-302)

Agilent Poroshell 120 SB-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 685975-302)

Agilent Poroshell 120 SB-Aq, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 685975-314)

Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 695968-301)

Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
(部件号 695975-312)

用甲醇配制分析物浓度分别为 0.1 mg/mL 的混标储备液。用乙腈:异丙醇 (50:50 v:v) 将储备液稀释成一系列浓度不同的标准溶液以考察分析方法的线性，标准溶液的浓度包括 0.2、0.5、1、2、5 和 10 ppm。

黄油从超市购得，分别产自美国、瑞士、澳大利亚和新西兰。按照中国国家标准方法配制样品溶液 [3]。对于加标样品，在萃取之前，加入溶于溶剂中的抗氧化剂储备液。称取 1.0 g 黄油并加入 5.0 mL 乙腈饱和的正己烷进行萃取。将该混合物涡旋混合以溶解黄油，向其中加入 10 mL 正己烷饱和的乙腈，再次涡旋混合 1 分钟，静置直至发生分层。收集乙腈层，并采用正己烷饱和的乙腈再次进行萃取。将收集的乙腈混合，并用氮气流浓缩至 1 mL 的体积，然后用异丙醇配制成 2 mL。使用安捷伦 0.2 μ m 再生纤维素膜过滤器 (部件号 5064-8222) 对这些溶液进行过滤，然后将其转移至自动进样器样品瓶中等待进样。

结果与讨论

选择性比较

Poroshell 120 色谱柱填充表面多孔颗粒填料，具有类似于亚 2 μ m 颗粒的性能，而背压比填充亚 2 μ m 颗粒的色谱柱低 40%-50%。最近推出了可用于 Poroshell 120 色谱柱的新型固定相，使这种色谱柱可通过改变选择性来进行方法开发。

随后尝试采用各种键合相进行方法开发，证明可以由这些色谱柱轻松获得不同的选择性。图 1 和图 2 为采用乙酸:甲醇和乙酸:乙腈流动相的五种不同反相方法所得到的叠加色谱图。除采用 Poroshell 120 Bonus-RP 色谱柱和甲醇有机相这一条件外，所有色谱方法均获得了对称的峰形。这可能是由 Poroshell Bonus-RP 键合相中嵌入的酰胺基团引起的，流动相中含甲醇时，与酸性分析物具有很强的氢键吸引作用。

五种色谱柱之间选择性的差异由键合相的差异造成，例如键合类型、封端以及二氧化硅表面硅醇基的含量和类型。影响选择性的其他因素（包括流动相组成、温度和 pH）在本研究中完全相同。这五种键合相均以 2.7 μ m Poroshell 120 表面多孔二氧化硅为基础。其中包括高度封端的 EC-C18 色谱柱，可提供最佳的总体峰形；SB-C18 和 SB-Aq 未封端色谱柱，与硅醇基发生相互作用，并提供 C18 固定相的可替代选择性；Bonus-RP，可提供独特选择性的极性嵌入式胺类分析专用柱；以及 Phenyl-Hexyl 键合色谱柱，改善了对芳香族化合物的选择性。

采用乙腈/1.5% 乙酸作为流动相时，Phenyl-Hexyl 和 EC-C18 色谱柱无法很好地分离峰 6 和峰 7。SB-C18 和 SB-Aq 均可分离所有九个峰，但 SB-C18 相比 SB-Aq 具有更长的保留时间，且峰 6 和峰 7 之间的分离度较差。将流动相改为甲醇:1.5% 乙酸时，所有色谱柱上的洗脱顺序均发生变化，且若干峰的分离度较差，但 SB-Aq 仍可很好地分离全部九种化合物。在 SB-Aq 色谱柱上对两种流动相进行了仔细比较，采用乙腈:1.5% 乙酸能够使所有化合物获得更出色的分离度和更高的性能。因此，选择 Poroshell 120 SB-Aq 并以乙腈:1.5% 乙酸作为流动相进行进一步方法开发。

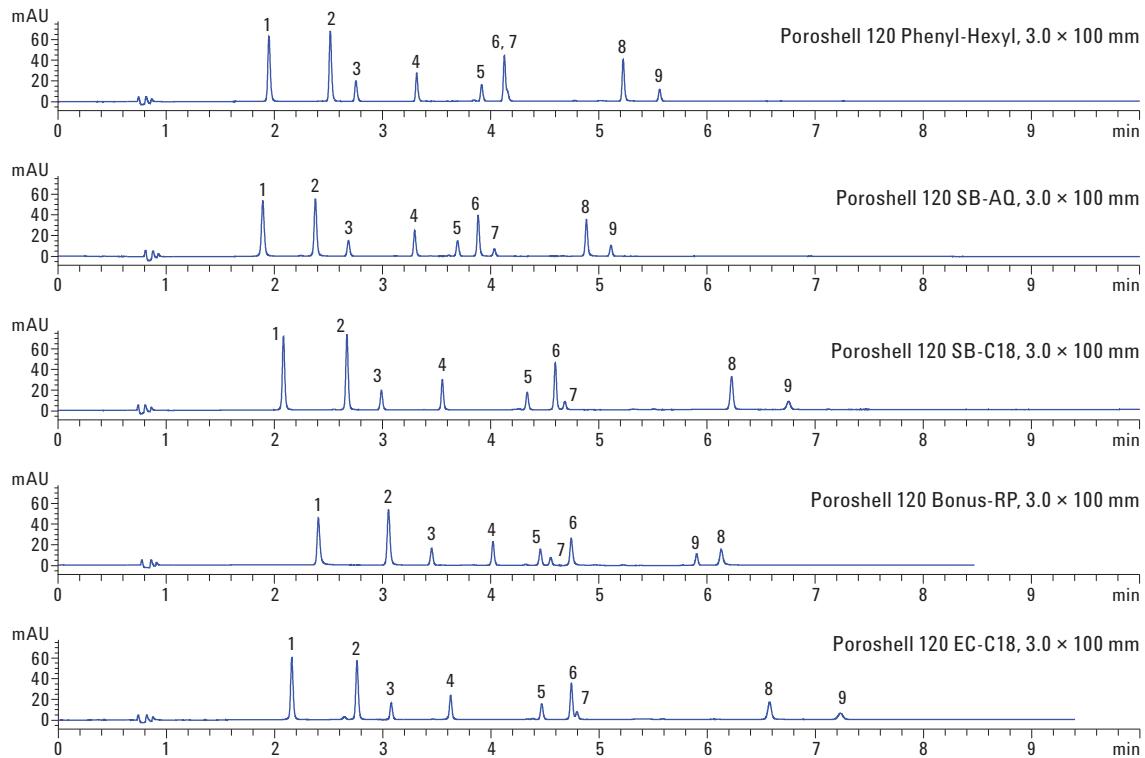


图 1. 在选择性不同的各种 Agilent Poroshell 120 固定相上获得的乙腈:1.5% 乙酸中九种抗氧化剂的色谱图

条件, 图 1

洗脱液:	A 1.5% 乙酸, B 乙腈
进样量:	2 μ L 10 ppm 混合物, 溶于 10% 甲醇中
流速:	0.6 mL/min
梯度:	时间 (min) %B
	0 25
	0.5 25
	5 80
	8 80
柱温:	40 °C
检测器:	UV, 280 nm

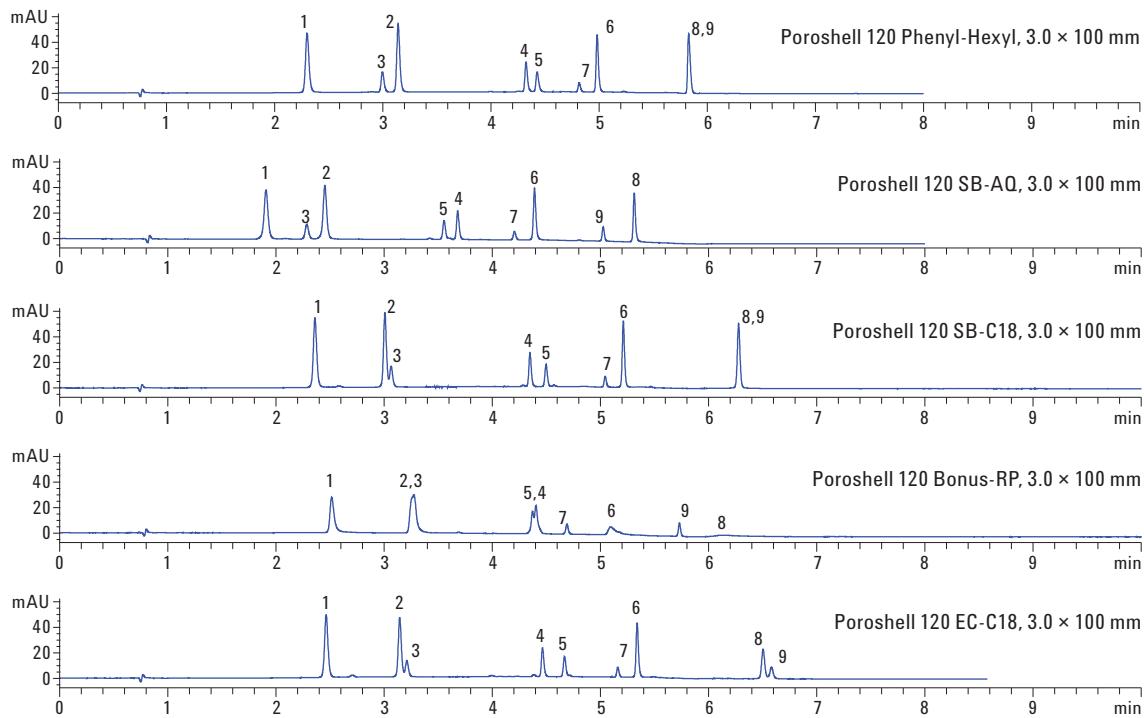


图 2. 在选择性不同的各种 Agilent Poroshell 120 固定相上获得的甲醇:1.5% 乙酸中九种抗氧化剂的色谱图

条件, 图 2

洗脱液:	A 1.5% 乙酸, B 甲醇	
进样量:	2 μ L 10 ppm 混合物, 溶于 10% 甲醇中	
流速:	0.6 mL/min	
梯度:	时间 (min)	%B
	0	40
	1	40
	5	80
	8	80
柱温:	40 °C	
检测器:	UV, 280 nm	

在 Poroshell 120 SB-Aq 上的方法开发

方法应按照上文有关 Poroshell 120 SB-Aq 和乙腈:1.5% 乙酸流动相的描述进行调整，但实际样品（黄油）比标准品更复杂。在处理黄油中的干扰组分时，为获得良好的分离，可调整梯度以使目标抗氧化剂获得理想的分离度。

图 3 显示了在改进的梯度下，九种 10 ppm 抗氧化剂所得到的色谱图。所有化合物都具有对称的峰形，最后一个峰的洗脱时间从原梯度下的 5.2 分钟延长至 8.5 分钟。实际样品分离必须使用稍长一些的梯度，以获得理想的分离。

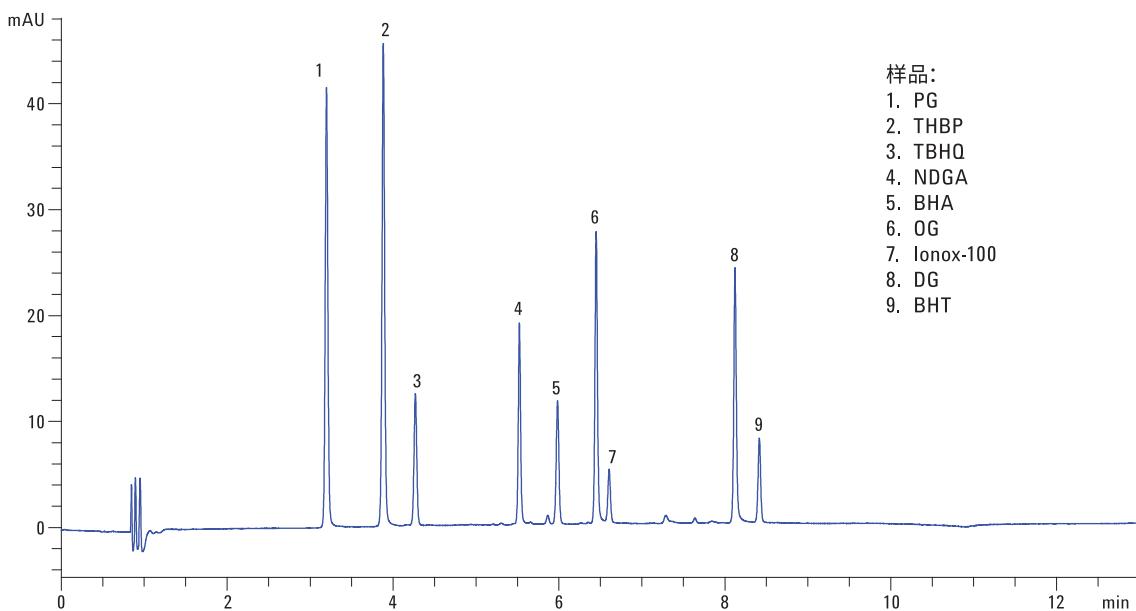


图 3. 采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱分离 10 ppm 标准品所得到的色谱图

条件, 图 3

洗脱液:	A 1.5% 乙酸, B 乙腈
进样量:	2 μ L 10 ppm 混合物, 溶于 50% 乙腈/50% 异丙醇中
流速:	0.6 mL/min
梯度:	时间 (min) %B
	0 10
	9 75
	10 95
停止时间:	15 分钟
柱温:	40 °C
检测器:	UV, 280 nm

利用紫外检测器在 280 nm 下得到的线性相关系数和检测限 (LOD) 数据如表 2 所示。所有九种化合物的线性系数均非常出色。在信噪比为 3 的情况下计算得到 LOD。所有抗氧化剂的 LOD 均小于等于 0.1 ppm。这相当于黄油样品中的 0.2 mg/kg 左右或更低。

稳定的保留时间对于准确鉴定复杂食品基质中的分析物至关重要。图 4 显示了对 1 ppm 混标进行八次连续进样所得到的叠加色谱图。所有峰的保留时间均具有良好的重现性，在 Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱上进行八次重复进样所得的峰保留时间的相对标准偏差均小于 0.1%。

表 2. 九种抗氧化剂的线性相关系数和理论 LOD

编号	名称	校准曲线	范围 (ppm)	LOD (信噪比 = 3)	
				相关系数	(ppm)
1	PG	$Y = 9.144X + 0.936$	0.2-10	0.9997	0.046
2	THBP	$Y = 10.075X + 1.028$	0.2-10	0.9998	0.039
3	TBHQ	$Y = 2.815X + 0.309$	0.2-10	0.9997	0.074
4	NDGA	$Y = 3.659X + 0.306$	0.2-10	0.9997	0.111
5	BHA	$Y = 2.631X + 0.330$	0.2-10	0.9997	0.082
6	OG	$Y = 5.796X + 0.550$	0.2-10	0.9997	0.037
7	Ionox-100	$Y = 1.132X + 0.130$	0.2-10	0.9994	0.200
8	DG	$Y = 5.208X + 0.112$	0.2-10	0.9995	0.090
9	BHT	$Y = 1.709X + 0.463$	0.2-10	0.9992	0.118

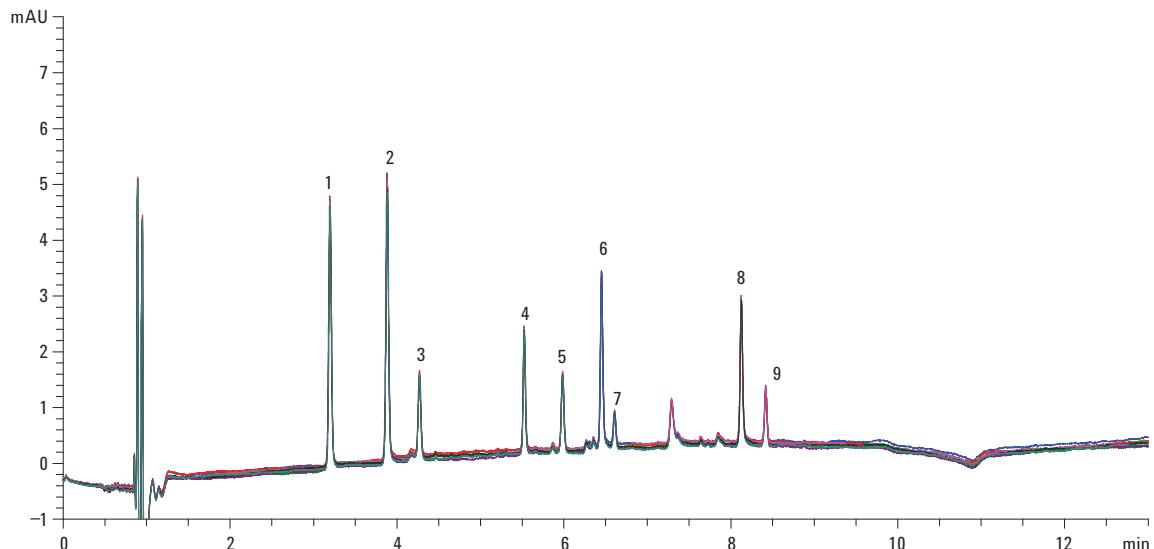


图 4. 采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱对 1 ppm 标准品进样八次所得到的叠加色谱图。条件与图 3 相同

对五种不同黄油的萃取物（图 5）和 1 ppm 加标黄油（图 6）进行分析，以考察系统适用性。将样品与 1 ppm 加标样品的色谱图进行比较，可以看到黄油基质中的额外峰，但对标准峰仅产生了几个干扰峰。例如，峰 3 在未加标的样品 1 和样品 5 中难以区分，而峰 9 则在未加

标样品 2 中难以区分。尽管存在一些干扰物质，但使用该 HPLC 方法仍可测量黄油中 ppm 级抗氧化剂的含量。如果需要较低含量的 LOD，三重四极杆质谱仪将是更理想的检测器选择。

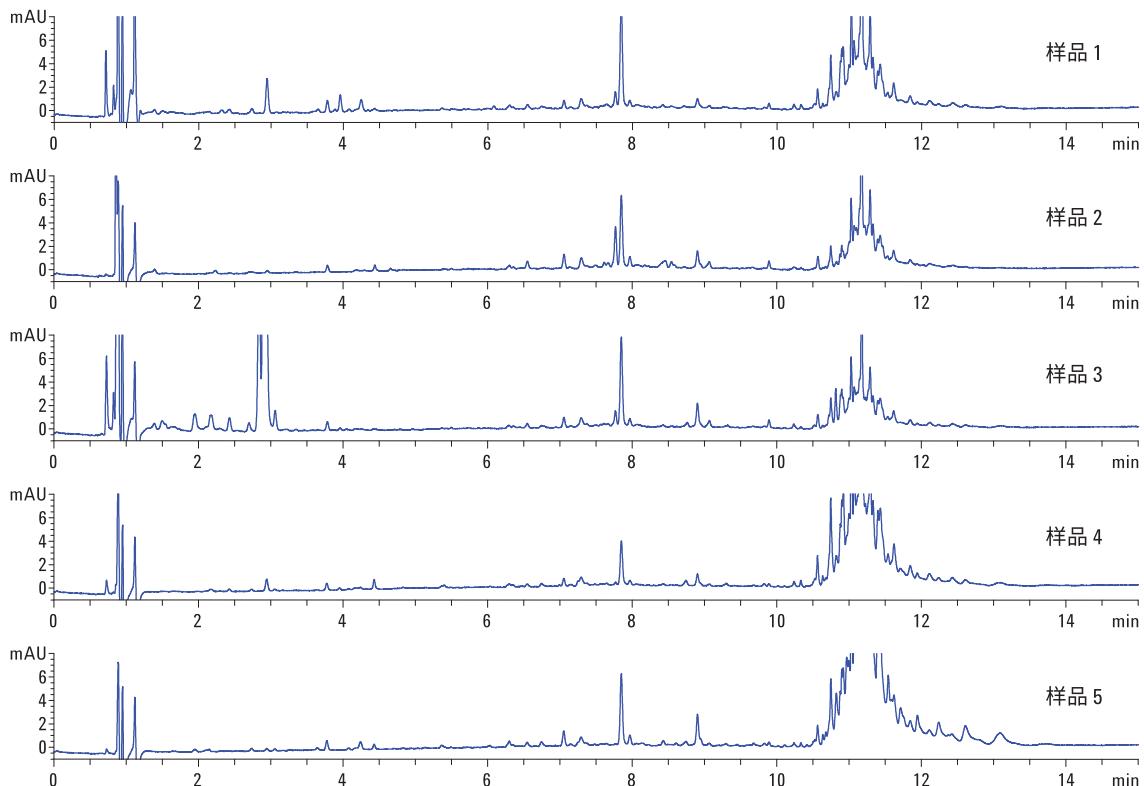


图 5. 采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱分离五种不同的黄油。条件与图 3 相同

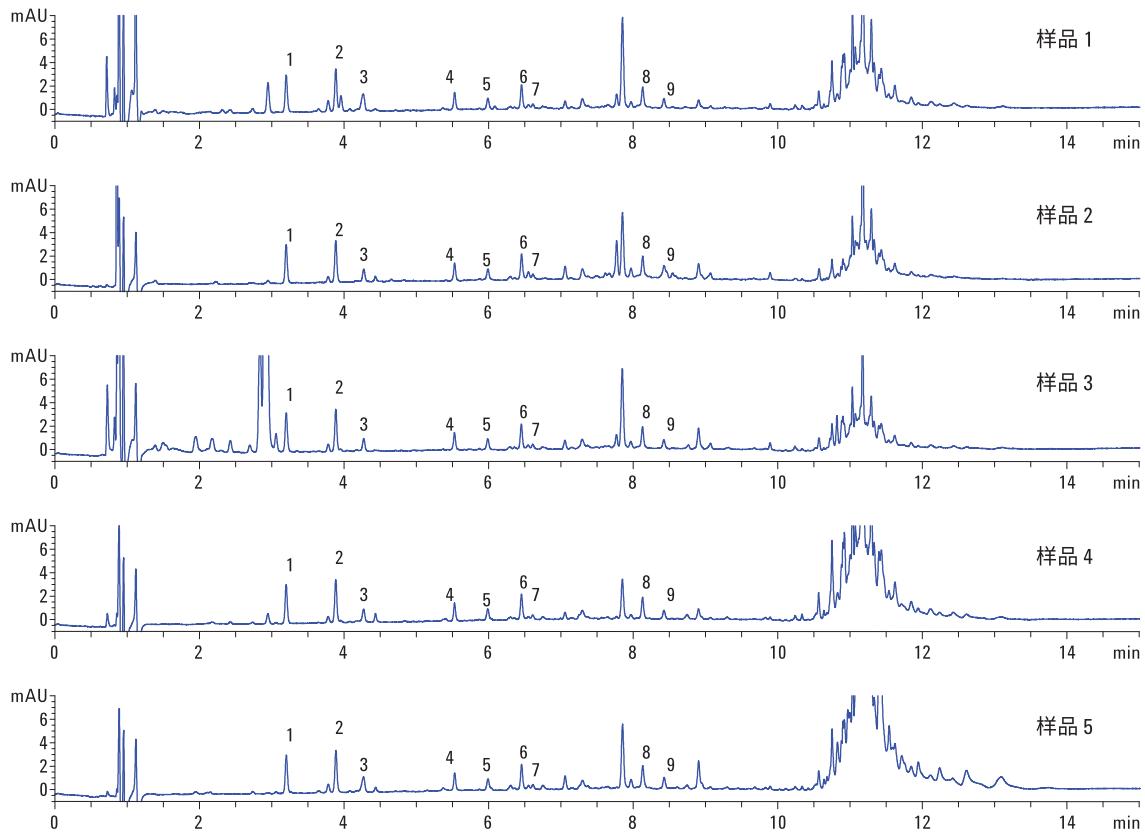


图 6. 采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq 色谱柱分离加入 1 ppm 标准品的五种不同的黄油。条件与图 3 相同

结论

Agilent Poroshell 120 色谱柱填充表面多孔颗粒填料，具有类似于亚 2 μm 颗粒的性能，而背压比填充亚 2 μm 颗粒的色谱柱低 40%-50%。最近推出的 Poroshell 120 色谱柱的新型固定相使它们能够通过多种化学键合相提供独特而不同的选择性，适用于方法开发过程。

将 Poroshell 120 SB-Aq 与 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪结合使用，开发出一种用于测定黄油中抗氧化剂的快速分析方法。分析时间可缩短至 15 分钟，仅为传统 5 μm 色谱柱分析时间的三分之一。对黄油样品和加标黄油样品进行萃取，并考察系统适用性。最终获得了 ppm 级的满意结果。所开发的方法适用于食品行业的 QC 实验室对黄油中的抗氧化剂进行分析。

参考文献

1. Li Tao *et al.* *Food Res.Dev.(Japan)*, 24, 23 (2003)
2. Gerd Vanhoenacker, Frank David, Pat Sandra. "Ultrafast analysis of synthetic antioxidants in vegetable oils using the Agilent 1290 Infinity LC system" (使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统对植物油中的合成抗氧化剂进行超快速分析)。应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5990-4378EN (2009)
3. Anon. *Method for the determination of antioxidants in oils and fats for import and export - liquid chromatography.* SN/T 1050-2002. China Standard (2002)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。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
5991-1897CHCN



Agilent Technologies

如需了解有关开发快速、稳定的液相色谱方法的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/livelcmetdev

如需查找当地的安捷伦客户服务中心，请访问

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

此解决方案用于分析型液相色谱方法的开发。

本文中的信息、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，中国出版

5991-7849CHCN



Agilent Technologies