

LC|GC

高效液相色谱 (LC) 操作最佳实践



充分发挥液相色谱系统的潜力

Mia Summers 和 Andreas Kugler



利用液相色谱柱特性

Anne Mack



进一步优化液相色谱方法

William Long



赞助方

Agilent

本定制电子书由安捷伦科技公司赞助，并与 *LCGC* 合作推出。



最大限度提高液相色谱工作流程效率

InfinityLab 是一套经过优化的液相色谱仪、质量选择检测器、色谱柱和备件产品组合，专为完美协同工作而设计。从常规分析到前沿研究，InfinityLab 可帮助您的实验室降低成本，达到前所未有的高效率。

InfinityLab 产品与 Agilent OpenLab 软件和 Agilent CrossLab 服务相结合，为您提供全程解决方案，使您的实验室日常工作更为高效。

了解确保获得最佳分析结果的更多信息：

www.agilent.com/chem/infinitylab



前言

繁忙的实验室中，获得更出色、更快速、更可靠的结果是首要关注的问题，其中许多实验室通常会寻求提高效率的新方法。有哪些新技术可用于确保最可靠的结果和更高效的实验室运行？

这本有关高效液相色谱 (LC) 操作最佳实践的电子书涵盖一些能够立即提高实验室效率的简单直接的技术。

首先，Mia Summers 和 Andreas Kugler 介绍适当的预防性维护如何避免许多常见问题，以及处理这些问题的有序方法可以减少诊断和解决问题所涉及的时间和难度。其中涵盖从适当的色谱柱选择到自动进样器和进样器问题以及溶剂受污染迹象的所有内容。

接下来，安捷伦科技公司的 Anne Mack 回顾了分析方法开发的挑战，并探讨了在方法开发过程中牢记分离目标的重要性。她还介绍了在选择液相色谱柱时必须考虑的物理特性，包括填料孔径、填料技术和实际粒径本身。

读者还将从安捷伦科技公司的 William Long 了解到，通常如何利用现有方法通过简单的调整（如采用全新色谱柱技术）来提高分离度并获得更出色的峰形，并确保该方法可重现地执行并提供可靠（甚至更出色的）结果。



赞助内容

图片获得 stock.adobe.com 许可

充分发挥液相色谱系统的潜力

Mia Summers 和 Andreas Kugler

概述

尽管现代液相色谱 (LC) 已是一项成熟的技术，但分析期间还是可能出现问题。出现挑战时，接踵而来的麻烦就会让人倍感困扰。在处理泄漏、气泡和堵塞等系统故障时尤其如此。此外，诊断色谱问题可能是一个耗时的过程。幸运的是，采取适当预防性维护能够避免许多常见问题，处理这些问题的有序方法可以减少诊断和解决问题所涉及的时间和难度。

流动相

如需确保液相色谱系统可靠而可重现地运行，清洁流动相至关重要。

省工省料带来的“利润”固然诱人，但使用高效液相色谱 (HPLC) 或质谱 (MS)

级溶剂能减少系统污染、意外色谱峰和重复分析次数，从长远来看将真正节省实验室的时间和成本。

溶剂受污染的迹象包括鬼峰、基线漂移、反压逐渐升高、脱气机频繁发生故障或色谱柱寿命异常缩短。其中，鬼峰通常是溶剂污染的首个迹象，具体表现为色谱图中位置不定或时而出现、时而消失的峰。鬼峰可能由低级别流动相或样品相关杂质造成，这些杂质积聚在系统中，在不同时间相继洗脱，有时由进样溶剂或梯度条件触发洗脱。当流动相中污染物的连续基线被注入的样品（用于补偿背景污染物的波长检测）打断时，也可能形成负峰。

某些鬼峰可能由方法条件造成，而不是系统或流动相污染。最可能的原因是样品运行时间过短，每次进样的一些晚洗脱



组分出现在随后的色谱图中。当样品混合物中的所有组分未从色谱柱中正确洗脱时，这些组分保留在色谱柱上，在随后的进样中缓慢地相继洗脱下来。如果分析人员怀疑有这种情况，

他们应采用有机组分比例大的反相流动相清洗色谱柱，然后在方法条件下执行若干次空白运行，以冲洗

色谱柱。最后，应采用更长的运行时间执行单次进样，以确认所有峰在程序运行时间内被洗脱。

流动相中的小颗粒可能导致液相色谱组件出现严重问题，包括脱气机故障与泵密封垫，甚至柱塞杆损坏。常见的颗粒来源是缓冲盐受到污染，或因对溶剂条件疏忽而导致沉淀。在梯度系统上使用缓冲液时，有机物含量不应过高，否则将导致缓冲液无法再溶解。

用溶解态固体制得的任何流动相组分均应通过孔径为 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 或更小的过滤器进行过滤。应注意过滤膜材料与溶剂的相容性。如果含溶解态固体或盐的流动相已经通过液相色谱系统，则分析完成后必须用水冲洗，确保溶解态固体或盐被去除。下一次分析即切换为不同的溶剂体系，可

能会导致沉淀。切换溶剂体系时，始终保持混溶也很重要。最佳做法是用与所需流动相混溶的中间溶剂逐渐过渡。请牢记，盐的存在可能会改变混溶性。例如，水和

异丙醇 (IPA) 在纯净状态下可混溶，但在高盐浓度下无法混溶。

另一种颗粒来源是水相流动相瓶中生长的微生物。在多溶

剂体系中，通常使用集成式溶剂比例阀，在分析时混合水性和有机组分。这样可简化分析人员的工作，但提高了水性流动相瓶和管线中的微生物生长风险。含缓冲液的溶液可能是更有利于微生物生长的环境。微生物颗粒有时无法凭肉眼辨别。它们可能集中在色谱柱入口筛板中，导致高反压和鬼峰的出现。它们通常小于色谱柱入口筛板的孔径，可通过入口筛板并集中在柱床上。同样，在线过滤器会有一定帮助，但微生物一旦大肆生长，将会遍布整个液相色谱系统，到这一步后很难去除。为避免应对微生物颗粒故障排除的挑战，最好采取措施防止其引入系统。将少量有机物加入水相流动相中（并稍微调整方法条件以实现补偿），可以防止微生物生长。使用棕色溶剂瓶防止流动相受到光照，这



将抑制蓝藻的生长。即便已采取这些步骤，最好也要每隔几天用洁净溶剂瓶中的新鲜水更换所有水相流动相。当系统不再使用时，利用反相方法中使用的有机溶剂对水管线进行冲洗。如果其中残留水分，脱气机就会成为另一个易于微生物生长的区域。在不使用时，务必确保管线不得储存在 100% 水溶液中，而是储存在有机溶剂中。

除安全考虑以外，溶剂蒸发还将改变预混合流动相的组成。适当密闭的溶剂瓶可以防止这种情况发生，但溶剂瓶不能完全密封，以免形成真空。将瓶盖钻孔即可满足条件，孔的大小恰好足够管线穿过，理想情况下可用带集成过滤器和放空系统的商业化设计顶盖，例如 Agilent InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖。

有时必须冲洗部分或全部系统，用于系统停用、储存或故障排除。如果系统中存在盐，则水明显是溶解盐并将其从系统中除去的首选。如果排除盐的存在，那么 IPA 可以作为系统理想的最终冲洗液，它能够与大多数常见的液相色谱溶剂（包括正相和反相）混溶。相对高的粘度和低表面

张力使其成为消除气泡的良好选择。它具有低蒸气压，意味着组分不会过快干燥。它还可抑制微生物的生长。

泵

液相色谱系统经常遇到的许多问题都可以追溯到泵。实际上，预计泵在数百巴的压力下提供连续稳定的液体流。泵产生的压力应保持一致。监测系统压力是有用的诊断手段。反压的稳定爬升通常表明模块组件被污染，通常被引入液相色谱系统中的颗粒污染。颗粒也可能使脱气机频繁故障或色谱柱过早失效。如上文所述，流动相是最常见的原因，但压力一旦开始上升，消除堵塞就成为优先解决的问题。

追溯反压升高的根源时，从检测器的下游开始。由于色谱柱通常是系统反压的最大贡献因素，因此辨别根本原因是色谱柱还是系统中的其他部件始终是一项挑战。因此，为排除故障，应始终取下色谱柱并用“限流毛细管”（如安捷伦部件号 5022-2159 不锈钢毛细管，内径 0.12 mm，长度 2000 mm）代替。该毛细管提供一定的反压，可实现可靠的故障排除。用户最好了解每套系统的正常反压范围。将管线与朝



脱气机稳定向上游移动的组件断开连接，直至反压下降。断开连接时导致压力恢复正常的部分是根源所在。

在一系列运行中，系统压力不应急剧变化，而较小的脉动（有时称为“增量”）是正常现象。先进的液相色谱系统（如 Agilent InfinityLab 液相色谱系列）使分析人员能够监测泵的脉动。虽然脉动因系统和方法而异，但急剧变化或与预期值的偏差是泵发生问题的明显迹象。最佳做法是熟悉并记录液相色谱系统的预期压力，有利于快速发现任何偏差。

压力变化有时会被忽视。毕竟，现代液相色谱泵在大多数情况下均可靠而稳定，现经过设置后可远程运行。有时，其他信号是泵问题的第一个迹象。如果检测基线噪音升高或保留时间开始发生显著偏移，则应检查泵。

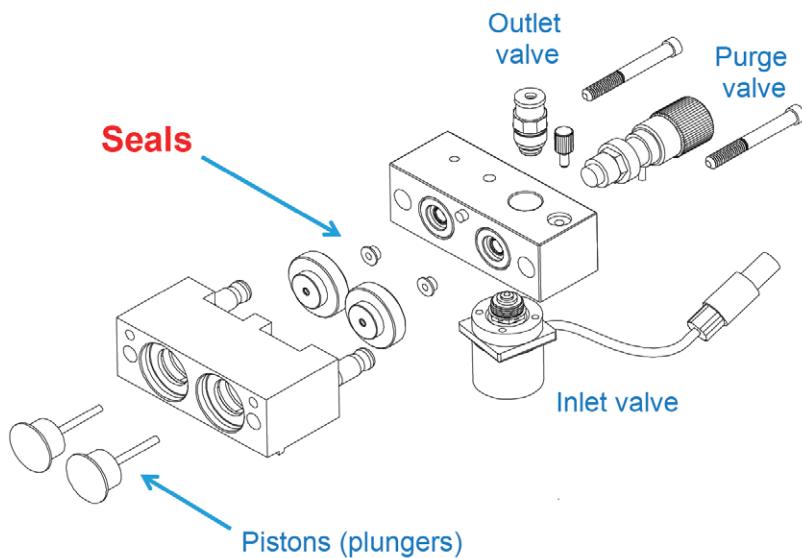
泵问题通常可以归结为三个常见原因：泵中的气泡、泵密封垫或泵阀。通常可以用有机溶剂吹扫来解决气泡问题。冲

洗系统去除气泡时最好用高粘度的 IPA，并安装限制毛细管以形成一定的反压。当然，应卸下该色谱柱。现代液相色谱泵提供特殊的仪器设置（活塞冲程），甚至可以使用自动冲洗或吹扫程序。使用 IPA 或将溶剂切换为 IPA/由 IPA 切换时，应注意不

要超过系统压力。在多管线系统中，同时冲洗所有管线。该操作可以解决问题。

气泡消除后如果系统问题仍然存在，则可以检查密封垫或阀是否磨损或损坏。密封垫污染或阀故障通常表现为影响基线的异常压力波动或意外降低或升高的系统压力，以及保留时间的偏移。缓冲盐、严苛的溶剂条件和极端 pH 值可能对密封垫提出挑战，可能需要更频繁地更换。虽然需要进行一些拆卸，但在大多数系统上更换密封垫或阀是一项相对快速的工作。许多制造商提供泵头维护工具包，其中包含所有可更换组件和详细说明。使用指定用于仪器或泵模块的适当电源非常重要。快速参考指南可以快速识别特定模块配套使用的部件。

“泵问题通常可以归结为三个常见原因：泵中的气泡、泵密封垫或泵阀。”

图 1：传统泵头

5063-6589, PTFE (reversed-phase)



0905-1420, Polyethylene (normal phase)

0905-1719, universal for 1290 systems

Tool kit
5064-8211

图 1 是传统安捷伦 HPLC 系统泵头的示意图。密封垫显示为红色。最好提前制定定期更换计划而不是等到问题发生再补救，在仪器频繁使用且必须保持最短系统停机时间的 QA/QC 环境中尤其如此。密封

垫采用不同材料制成。请务必使用与溶剂兼容的材料。

放空阀是用于冲洗和灌注泵的有用工具。Agilent 1200 系列液相色谱系统配有一个带 PTFE 滤芯的放空阀，该滤芯能够保护

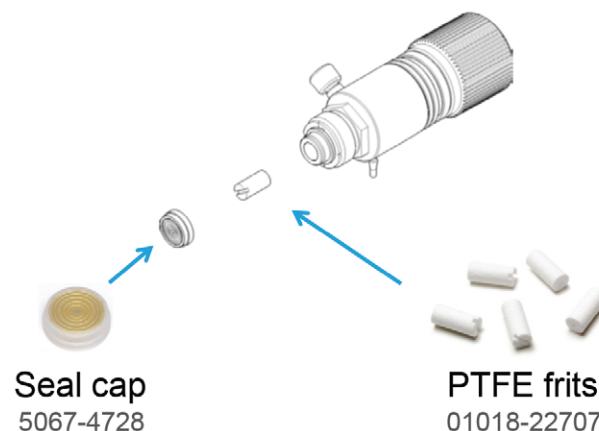


图 2：更换放空阀中的 PTFE 滤芯



14 mm wrench

- Dirty frit is a source of high pressure
- Pressure drop of >10 bar across the frit (5 mL/min water with purge valve open) could indicate a blockage
- Change after changing pump seals

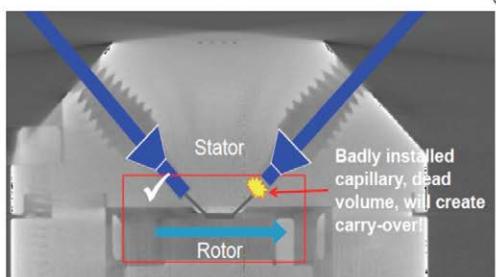
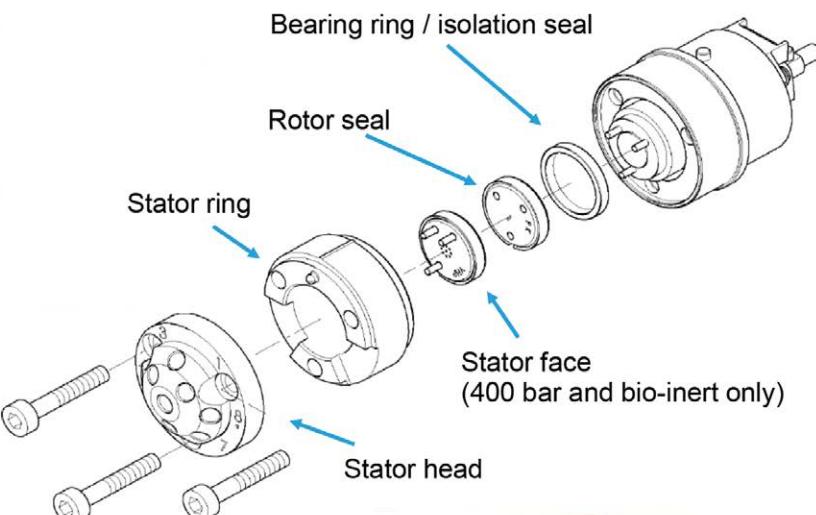
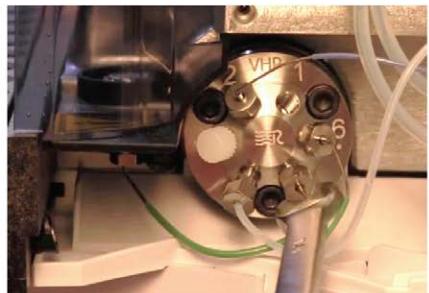


系统的其余部分免受颗粒污染，是保护液相色谱投资的一项很好的功能。而随着时间的推移，该 PTFE 滤芯可能会堵塞。在吹扫系统时，大部分压降将通过该滤芯。如果用 5 mL/min 的水时压力超过 10 bar，则需要更换滤芯。滤芯易于操作，并能快速更换（见图 2）。与泵密封垫一样，定期更换滤芯更有意义，不要等到问题发生再补救。

如上所述，保留时间偏移可能是由于泵出现问题，而如果泵运行正常（且当前泵设置与当前溶剂类型相符），问题可能

出在比例阀上。比例阀也称为梯度阀或溶剂选择阀，它会随时间推移而性能下降，届时需要更换。与脱气机一样，在使用含缓冲盐的流动相后用水冲洗，将延长阀的使用寿命。确定选择阀是否是问题根源的一种方法是，预混合等度方法中使用的流动相溶剂，绕过阀并直接连接至泵头。一次只能使用一根管线或泵头来确认标准分离。然后将溶剂源从一个溶剂管线/泵头移至另一个溶剂管线/泵头，是查出问题的一种好方法。

图 3：进样阀



- Exchange rotor seal when injection reproducibility indicates wear
- Rotor seal wear is often a cause of sample carry-over

自动进样器和进样器

自动进样器和进样器已成为复杂的设备，可能会成为某些色谱问题的根源。针头和针座之间的密封不良会导致交叉污染，导致鬼峰或定量分析重现性不足。针座和针头应被视为一个“功能”件，如果出现问题，必须同时更换。损坏的针头可能会损坏针座；如果仅更换针座，它将立即被旧

针头损坏，反之亦然。如果针头和针座堵塞，检查根本原因非常重要。上游的某些其他部件（如样品瓶盖或孔板密封膜）可能会释放出碎屑。

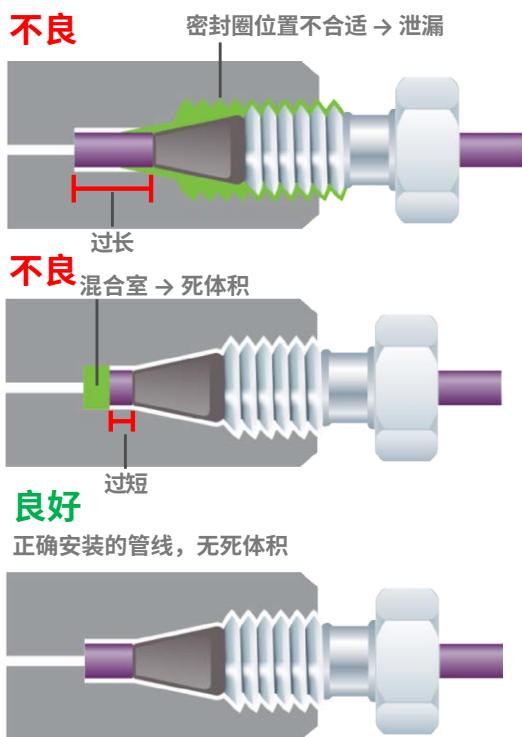
赞助商内容



Agilent InfinityLab：
建立出色的连接

轻松自如，体验更可靠的接头

图 4：正确和错误的接头连接



接头连接不佳

- 峰展宽、峰分裂或引起拖尾
- 通常会影响所有峰，但尤其影响早洗脱峰
- 可能导致交叉污染

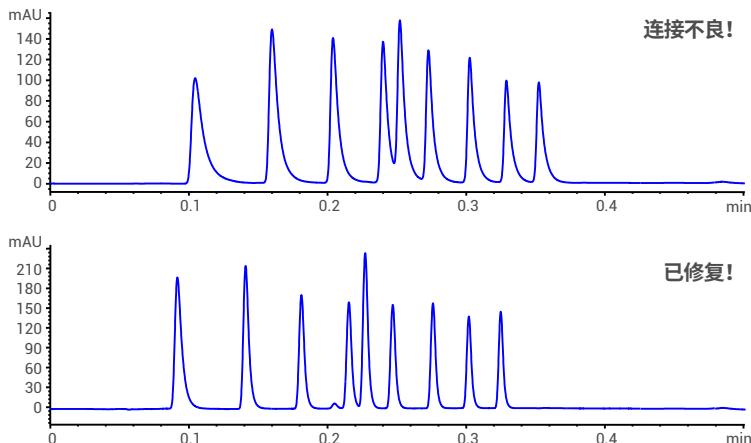


图 3 为进样阀的分解图和剖视图。转子密封垫会随着时间的推移而磨损或被颗粒损坏。磨损的转子密封垫会导致样品交叉污染和进样重现性不足，此时应予以更换。密封垫由多种材料制成。分析人员应确保针对溶剂和/或 pH 选择正确的材料。仪器制造商通常会在单个包装中提供包含自动进样器模块所有消耗品部件的工具包。

色谱柱

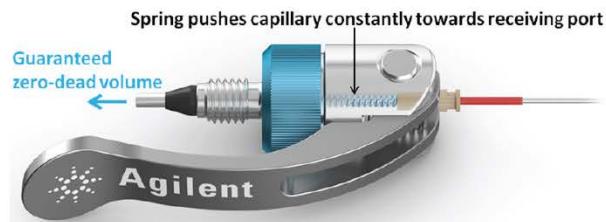
柱效低可能是由于色谱柱选择不当或色谱柱老化产生空隙。但也可能是由毛细管尺寸不

正确造成。应使用适合该系统的最小直径和最短管线。毛细管过长或内径 (ID) 过宽会导致柱外体积增大，导致色谱峰在到达色谱柱之前展宽。

不同制造商可能使用不同类型的接头。使用错误的接头可能会损坏仪器或导致泄漏/峰拖尾。最常见的是 Swagelok 型接头，采用 10-32 螺纹以及一个或多个锥形密封垫圈。在首次安装接头时，应将管线完全推入，之后再拧紧接头。否则间隙将形成峰展宽，通常色谱峰一致呈拖尾形式，甚至

图 5: Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头和 Quick Turn 接头

- Spring loaded design
- Easy! No tools needed
- Works for all column types
- Reusable
- Consistent ZDV connection



Quick Connect Fitting

- Finger tight up to 1300 bar
- Hand tighten the nut, then depress the lever



Quick Turn Fitting

- Finger tight up to 400 bar
- Up to 1300 bar with a wrench
- Compact design



保留更弱的色谱峰也是如此。图 4 显示了接头的正确和错误安装。而较新的色谱柱连接技术能避免这些问题。例如，Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头通

过弹簧功能解决了这些问题，该功能可自动适配色谱柱的接口底部深度（见图 5）。

出现问题时，检查色谱柱连接接头也很重要，因为损坏的接头也会损坏新色谱柱的接口底部。使用标准不锈钢接头时，在更换新色谱柱时使用新毛细管，因为新色谱柱的套接深度略有不同，或旧毛细管上的磨损接头将会损坏新的色谱柱接头。此外，注意不要过度拧紧色谱柱连接接

赞助商内容

Agilent InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖 — 减少溶剂蒸发





头（通常为标准不锈钢接头）。施加过大的力会损坏接头和色谱柱接口底部，并导致泄漏。然后，用户可能会尝试施加更大的力，导致密封连接泄漏。色谱柱迟早都要更换，原因有可能是泄漏持续存在，也有可能是色谱柱达到其寿命终点。

同样，Agilent InfinityLab Quick Connect快速连接接头等新型可拆卸接头能够解决这些问题，其弹簧功能可自动适应不同接口深度，损坏后也可更换密封垫圈。

色谱柱本身可能会出现各种问题。前文已经提到的一个问题是色谱柱会因粗暴操作或老化而产生空隙。如果在空隙上或附近出现色谱峰展宽或拖尾，并排除了柱外展宽，则可能需要更换色谱柱。并非系统引起的高反压可能是由于色谱柱使用过度，或许多不溶性组分（如制剂赋形剂）进样至色谱柱而导致色谱柱污染。微生物污染也可能在柱床上积聚。在所有这些情况下，可能需要用全新色谱柱替换该色谱柱。可以考虑对系统进行日常预防性维护并增加样品前处理技术（如过滤样品或固相萃取），以减少昂贵的故障排除和液相色谱系统的停机时间。

检测器

紫外检测器中可能只需要注意两个组件：灯和流通池。大多数灯含氘气，随时间推移会发生泄漏。由于方法响应基于色谱峰比，因此灯泡性能下降最初可能不明显，但基线噪音将随时间推移而相对色谱峰升高。检测信号差或基线噪音高是更换灯泡的明确迹象。更换灯时，务必避免接触灯泡。

流通池通常不需要维护，但可能会出现问题。如果在下游使用第二个检测器，则需要了解它产生的额外反压。第一个流通池中的反压过大会使其破裂。在这类应用中，可采用高压流通池。流通池也会变脏，必须将其冲洗干净。



赞助商内容

样品前处理白皮书

充分发挥液相色谱系统的潜力。您视为“足够好”的样品前处理方法真的足够好吗？



采用带 RFID 标签的新技术（如 Agilent InfinityLab 流通池和灯）有助于跟踪使用情况并预防性地计划更换，从而使系统保持最长的正常运行时间并提高实验室运行效率。

**Mia Summers**

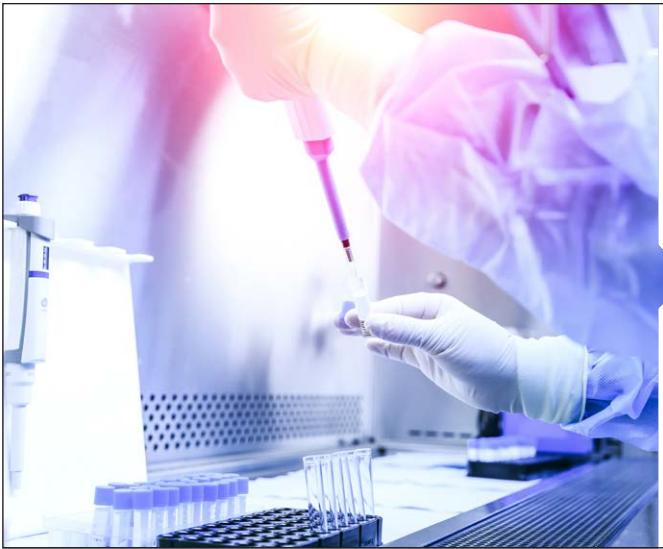
前液相色谱柱产品经理
安捷伦科技公司

结论

使用液相色谱系统时会发生多个常见问题，而良好的维护和预防措施将有助于系统运行多年而不出现重大问题。避免微生物生长；定期更换阀、密封垫和滤芯；实现适当的色谱柱连接并保持良好的流动相操作将大大有助于避免烦人、耗时而昂贵的系统停机。让一些工作人员接受故障排除专项培训，也会大有帮助。客户培训（如基础和故障排除课程）将帮助他们了解仪器的特殊功能和操作原理，以及如何解决问题、缩短停机时间、预先发现潜在问题并确保仪器正常运行。

**Andreas Kugler**

产品支持工程师
液相色谱备件
安捷伦科技公司



赞助内容

利用液相色谱柱 特性改善分析

Anne Mack

色

谱工作者在液相色谱 (LC) 方法开发过程中做出了许多决定，其中许多决定对于开发稳定分析至关重要。色谱柱选择是其中的决定之一，是实现成功分析的重要因素。本文将探讨各种色谱柱特性，并说明选择适当液相色谱柱如何改善色谱结果，包括通过不同选择性获得更出色的分离度和峰形、流动相组成和 pH 值的影响，以及延长色谱柱寿命。

分析方法开发挑战和定义目标

如今，一些挑战可能使高效液相色谱 (HPLC) 方法开发比以往更为混乱。选择色谱模式并使用合适的 HPLC 色谱柱就是

一项重大挑战。鉴于色谱工作者可以选择许多不同的色谱模式，因此选定使用的色谱模式可能会非常困难。但由于约 80% 的 HPLC 分离通过反相进行，因此良好封端的 C18 固定相是一个很好的起点。方法转移则是另一项挑战。许多公司在世界各地都设有实验室，需要在它们之间转移方法，并要求目标实验室中的方法性能与原始实验室中的完全相同。此外，制药行业广泛采用的合同实验室可能拥有许多不同的 HPLC 仪器品牌。这种多样性会使方法转移过程复杂化，因为来自不同供应商的系统可能有各种不同的系统体积、管线和接头差异以及许多其他不同操作特性。因此，需要一个途径来简化方法开发过程。

图 1：常见分离目标和性能标准

Good System Suitability Parameters

- Resolution: ≥ 2
- Peak shape: USP T_f close to 1 (<2)
- Injection Repeatability: areas, T_f , etc. (RSD 0.1 - 0.25%)
- Absolute retention factors: $1 < k < 10$
- Relative Retention: α or k_2/k_1
- Signal-to-Noise Ratio: >10

Method Performance Criteria

- Accuracy
- Precision
 - Ruggedness
 - Robustness
- Selectivity/Specificity
- Linearity
- Range
- Quantitation Limit (LOQ, 10x S/N)
- Detection Limit (LOD, 3x S/N)

AVOID THESE for System Suitability Criteria:

*Column efficiency (theoretical plates)
& Absolute retention time*

These inhibit the ability to speed up your method in the future!

在实际启动方法开发过程之前，应确定分离的目标。应考虑的事项包括：

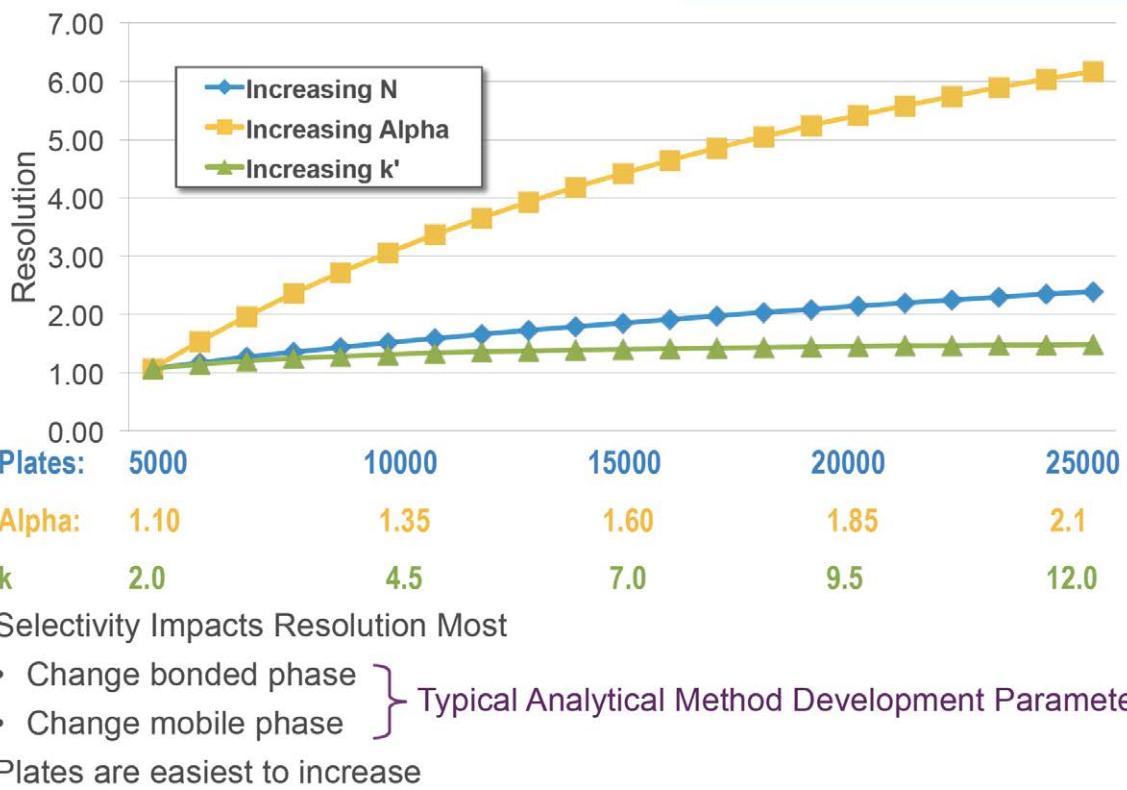
- 可能有多少个色谱峰？
- 色谱峰分离的难易程度如何？
- 效率和速度（运行时间或进样分析周期）是否重要？
- 可用仪器有哪些？
- 能否使用流动相梯度？
- 压力能否高于 400 bar？
- 分析常规样品的人员是谁？他们的受训水平如何？

这些问题（当然还有其他问题）有助于确定方法要求以及应在开发中投入多大精力。

除方法目标以外，还有必要根据应用设立一些目标。**图 1** 左侧列出了多数应用常用的方法目标，其中许多目标通常包括在系统适用性测试要求中。分离度是方法开发中更重要的标准之一，在非特异性检测器（如紫外检测器、蒸发光散射检测器或荧光检测器）中更是如此。首选分离度大于 2 的检测器，但两个相邻的色谱峰达到 1.5 的分离度即视为基线分离。在方法验证过程中确定系统适用性参数，对**图 1**右侧所示的方法性能参数进行评估。在设置系统适用性参数和标准时，最好避免使标准限制将来对方法的修改能力。例如，如果将效率或绝对保留时间用作系统适用

图 2：效率、选择性和保留因子是影响分离度的变量，其中选择性的影响最大

$$R_s = N^{1/2}/4 \cdot (\alpha - 1)/\alpha \cdot k'/(k' + 1)$$



性标准，则修改方法后可能需要全部重新验证。

方法开发：从哪里开始？

确定方法开发目的和目标后，将用图 2 右上方所示的分离度方程开始方法开发。如图 2 所示，柱效 (N)、选择性 (α) 和保留因子 (k') 是提高分离度的变量。图 2 的散点图显示了这三个变量中每个变量对分离度的

影响。 α 项（即选择性）对分离度的影响远大于柱效和保留因子。因此，在方法开发过程中，改变选择性将对实现分离所需的分离度产生最大影响。通过修改系统化学性质，即流动相（组成或 pH）、色谱柱键合相（如 C18、C8、苯基-己基或氰基）任一者或两者，均可改变 α 或选择性。柱温也会影响 α ，含酸或碱的情况下尤其如此。

HPLC 色谱柱的物理特性

在启动方法开发之前选择液相色谱柱时，必须考虑许多物理特性，包括填料孔径、填料技术和实际粒径本身。

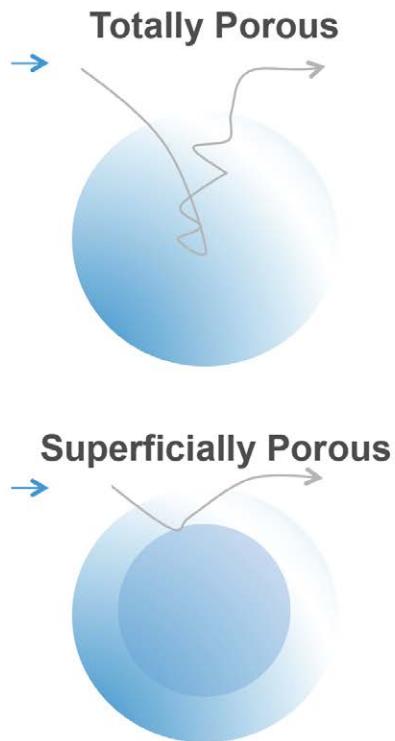
针对任意 HPLC 分析应用选择最佳孔径非常重要。80–120 Å 的较小孔径色谱柱填料用于分离较小的分子（即分子量小于 4000）。较小孔径的色谱柱也可最大程度提高载样量和保留特性。稍大的 120 Å 孔径是肽谱分析的理想选择，300 Å 孔径的色谱柱则适用于较大的分子，如完整的肽和蛋白质。1000–4000 Å 的更大孔径适用于分子量非常高的蛋白质。

在液相色谱发展早期，填料粒径远大于 10 µm。直至 20 世纪 70 年代早期，才开始制造专门用于 HPLC 的小尺寸全多孔硅胶颗粒。20 世纪 80 年代推出了 5 µm 颗粒，到 20 世纪 90 年代，3.5 µm 颗粒能够实现更快速的分离。过去 10 年间，用于超高性能液相色谱 (UHPLC) 应用的亚 2 µm 全多孔颗粒是日益流行的色谱柱填料技术。然而，亚 2 µm 颗粒需要专门的仪器才能充分发挥其功能。

表面多孔颗粒是一种全新的替代技术，与填充旧式传统 5 µm 颗粒的色谱柱相比，可显著提高柱效和峰容量，并能够与现有的常规 HPLC 系统配合使用。我们应当认识到表面多孔颗粒并不神奇；它们与 5 µm 颗粒色谱柱遵循相同的色谱原理，因此可以使用相同的方法开发过程。表面多孔颗粒填料具有实心内核，用于限制向外壳的扩散。**图 3** 示出这些颗粒更高效的原因；较短的扩散距离使峰展宽更少、柱效（塔板数）更高，同时在不影响效率的情况下实现更高的流速/更快的分析时间。

粒径的选择在某种程度上取决于分离的复杂性，因而取决于所需的分离度。一般来讲，粒径越小，柱效越高。然而，提高柱效的同时需要付出代价：由于压力与柱长和粒径的平方成正比，因此随着粒径的减小，将产生更高的系统反压。表面多孔颗粒具有三种不同粒径：1.9 µm、2.7 µm、4 µm。粒径的选择取决于分离要求和可用仪器。总直径决定压力，因此表面多孔颗粒与对应的全多孔颗粒 (TPP) 粒径在相似的压力下运行。多孔层的厚度决定柱效：使用表面多孔颗粒相比传统 5 µm TPP，能够使柱效最多提高 200%。

图 3：填料技术：与全多孔颗粒相比，表面多孔颗粒可改善传质，从而获得更高的效率



- **Totally porous particles**
 - diffusion throughout particle
- **Poroshell 120**
 - diffusion limited to outer shell
- **Results:**
 - Higher efficiency
 - Higher flow rate with minimal impact on efficiency

一般而言， $1.9\text{ }\mu\text{m}$ 表面多孔颗粒用于实现最高 UHPLC 性能， $2.7\text{ }\mu\text{m}$ 颗粒用于在较低运行压力下实现 UHPLC 性能，而 $4\text{ }\mu\text{m}$ 颗粒用于改善 HPLC 性能。

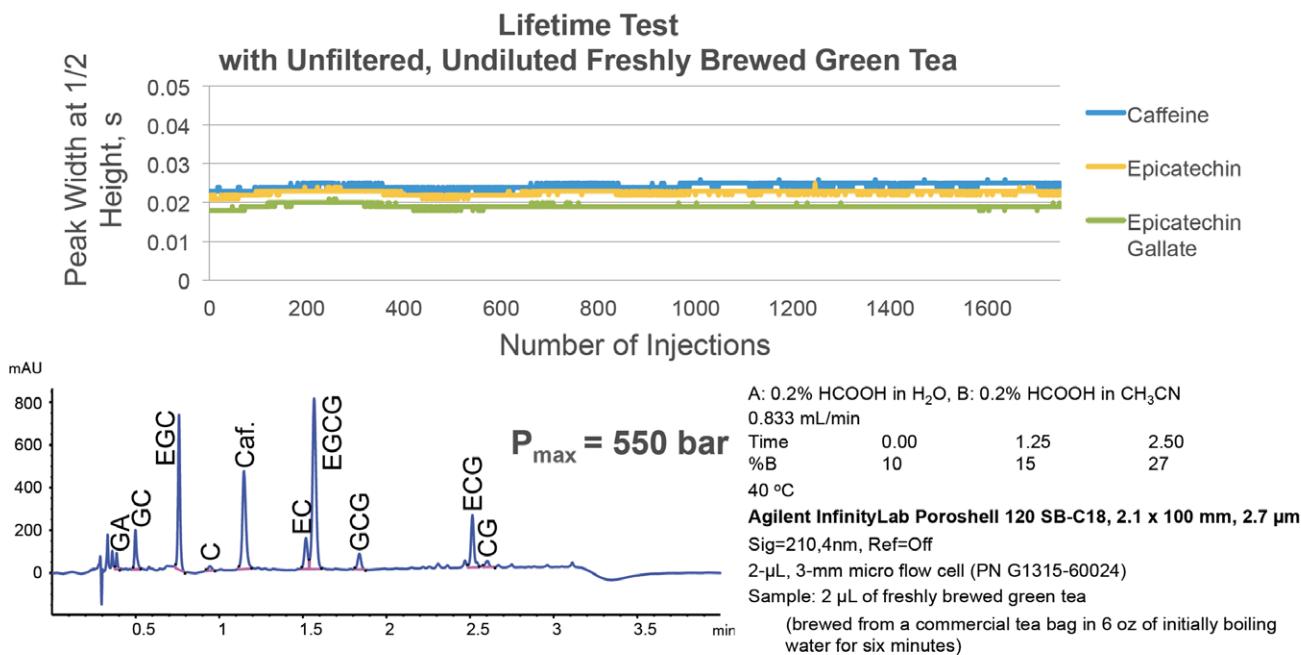
$2.7\text{ }\mu\text{m}$ 和 $4\text{ }\mu\text{m}$ 颗粒的另一个优势在于，较大的总尺寸意味着能够在色谱柱进样口使用 $2\text{ }\mu\text{m}$ 筛板，这与 $5\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱所使用的筛板相同，因此色谱柱与亚 $2\text{ }\mu\text{m}$ 颗粒色谱柱相比不容易堵塞，如图 4 所示的未稀释新鲜绿茶样品 1600 多次进样结果。

HPLC 色谱柱键合相选项

不同键合相突出了不同的化学相互作用，因此可以选择适当键合相来微调特定样品的分离条件。极性化合物与非极性化合物在不同的色谱柱化学键合相中表现不同。在分析物（如芳香族化合物）有 π 键的情况下，可使用苯基-己基固定相，因为这种固定相的 π - π 相互作用更强。除改善选择性以外，键合相的变化有时也会缩短分析时间。

图 4：在 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 色谱柱上分离茶样品时，该色谱柱具有长使用寿命

>1800 Injections at 550 bar - No Performance Change



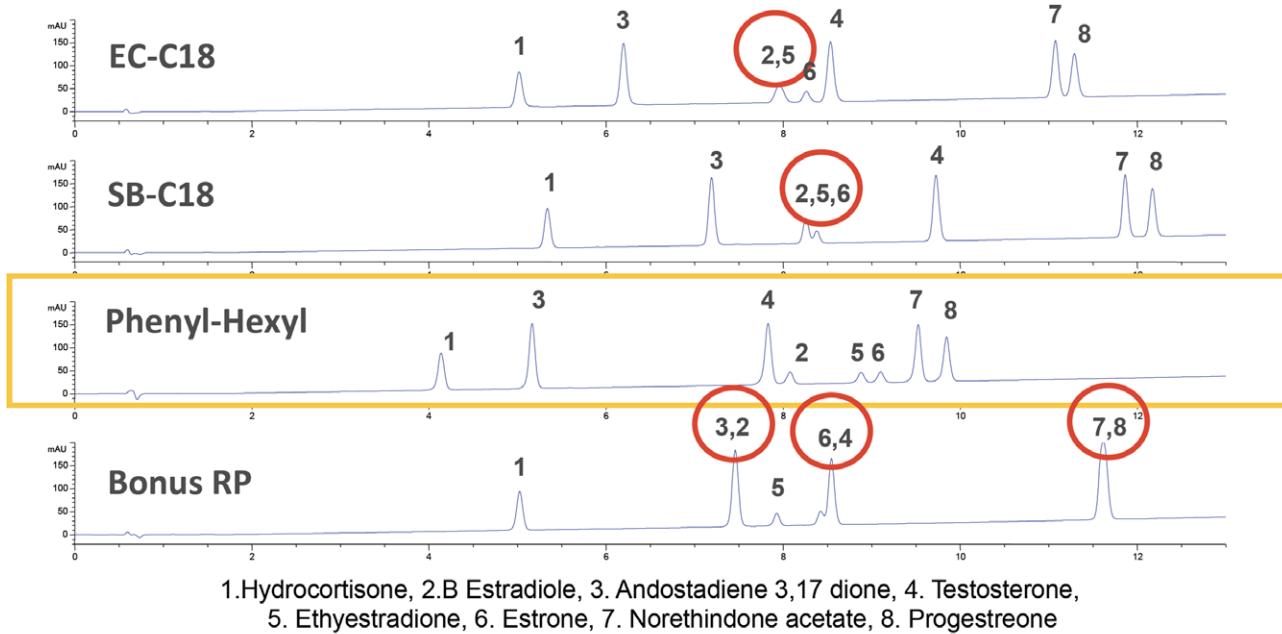
C18 和 C8 键合相是方法开发的首选。它们适用于 pH 2–9 的条件。在键合过程中，色谱柱二氧化硅表面上剩余 Si-OH 基团的封端或去活化也会影响选择性。许多 C18 和 C8 键合相都提供封端和非封端形式，并可在方法开发过程中进行评估。苯基-己基键合相是另一种优异的替代键合相，可用于利用与分析物和固定相间的 π-π 相互作用。苯基-己基键合相的选择性与苯基柱或二苯基柱非常相似。在键合相中嵌入极性基团的其他固定相也是很好的选

择，通常可对极性化合物产生独特的选择性。氰基固定相既可用于正相分离，也可用于反相分离，未键合硅胶固定相可用于极性极高分子的亲水相互作用色谱分析。五氟苯基固定相通常也用作极性化合物的正交固定相。

为了更详细地了解不同化学键合相的选择性，可以使用键合相特征测试。反相化学键合相的特征示例包括 Tanaka 测试和疏水减法模型 (HSM)。这些测试根据各种参数对化学键合相进行分类，并可用于计

图 5：利用甲醇梯度分离 8 种类固醇 – 选择适当的色谱柱固定相可简化方法开发

Best Resolution of all analytes with InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl



40-80 % Methanol/14 min, DAD 260, 80 nm 0.4 ml/min, 2.1 x 100 mm 40 C 0.1% Formic Acid
in Water and Methanol, Agilent 1260 Method Development Solution.

算两种色谱柱之间的相似因子 (F_s)。较小的 F_s 表示两种色谱柱极为相似，而较大的因子则表示两种色谱柱差异显著。在开发方法时，评估提供不同或正交选择性的色谱柱对于改善分离很有用。

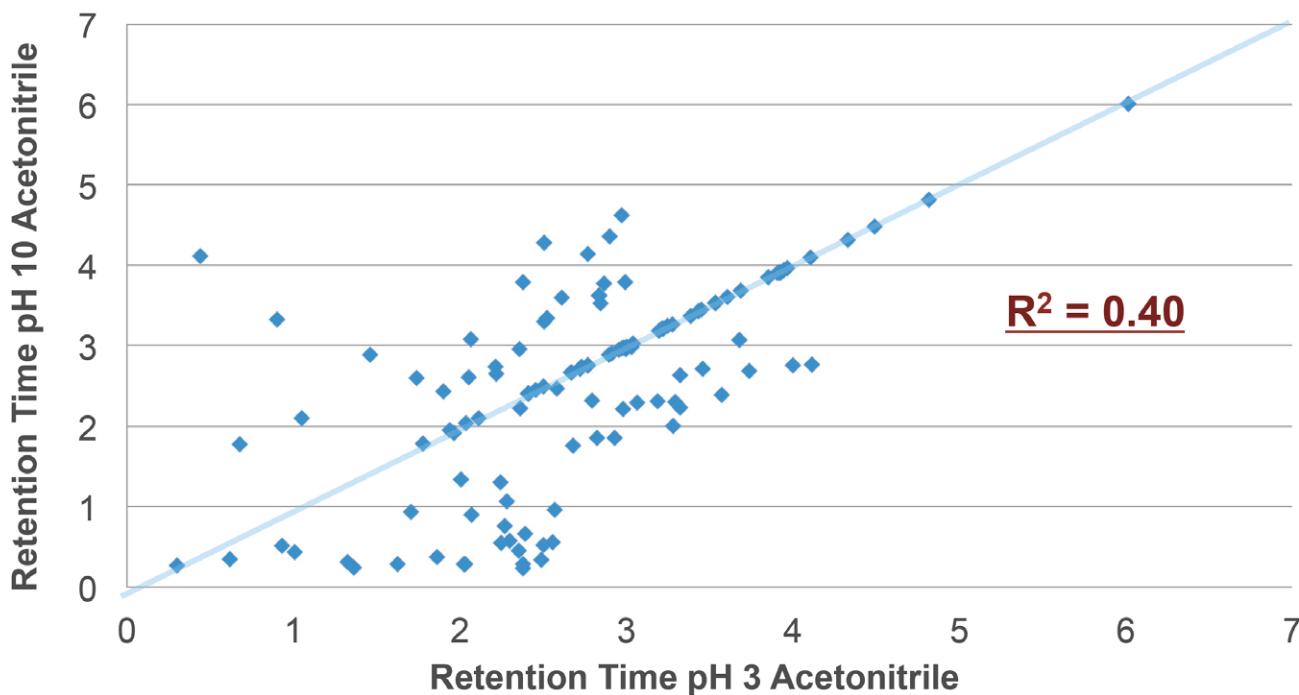
图 5 显示色谱柱选择性如何用于增强分离的示例，其中使用甲醇梯度流动相分离八种类固醇。对于多种键合相，可以看到选择性的变化。此外实现了适当的分离，但某些峰未得到分离。然而，在苯基己基固定相上，所有八种类固醇都得到基

线分离，其运行时间比任何其他固定相都短。无法确保所有固定相都在无需额外工作的情况下分离出所有样品中的所有化合物，但如图 5 所示，选择性受固定相变化的影响，这在方法开发过程的早期非常有用。

利用流动相 pH 改变选择性

流动相 pH 也会影响可电离化合物的保留特性和选择性。许多新型固定相可以在宽 pH 范围（如 2-10）内运行，因此现在可

图 6：不同的流动相 pH 可提供差异极大的选择性，表现为各种分析物在 pH 3 和 10 下的保留时间相关性较差

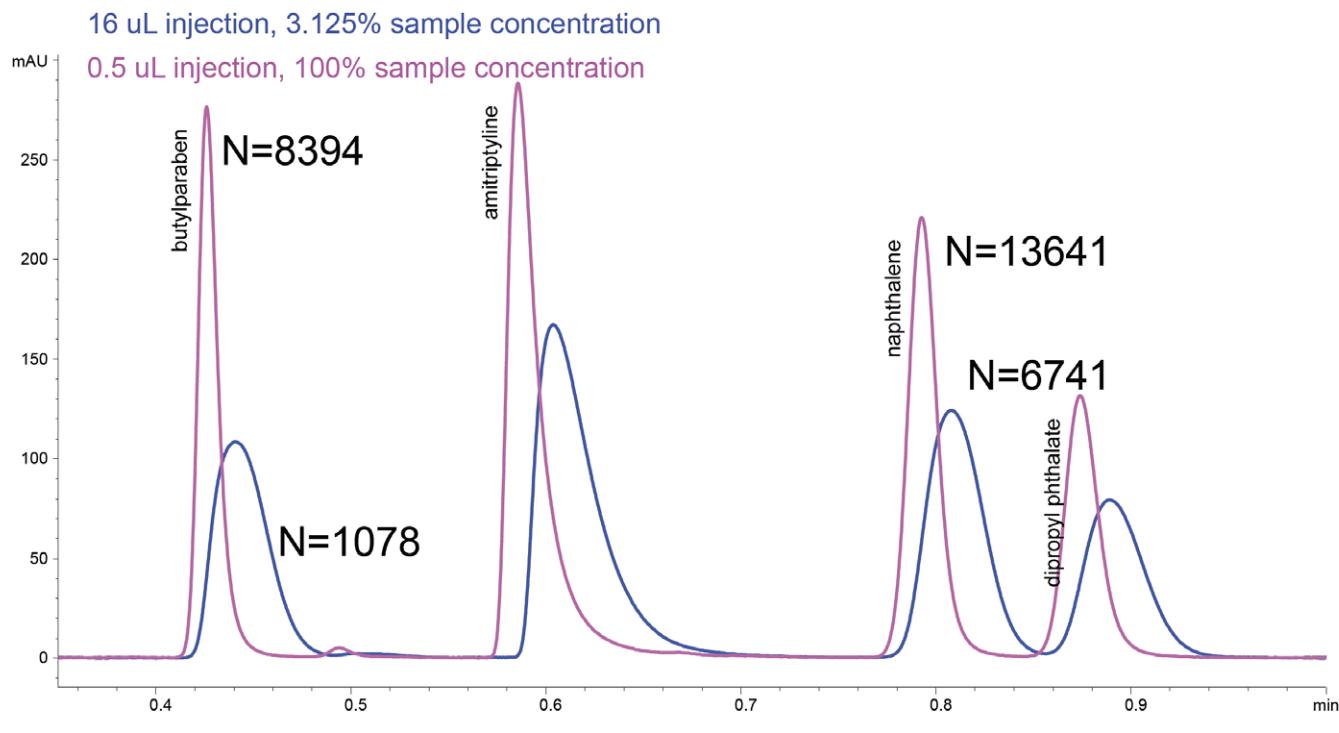


Column – Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18 2.7 μm .

利用 pH 同时改善保留特性和分离度，从而提高选择性并改善方法开发。图 6 示出如何使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18 2.7 μm 色谱柱比较其在 pH 3 和 pH 10 下对若干种化合物的选择性。该图中分散的数据点表现了 pH 对选择性的影响程度。相关系数 R^2 （此处称为正交性指标）非常低，达到 0.40。不可电离的化合物或在 3–10 范围内不电离的化合物，洗脱时间

处在 $y=x$ 的浅蓝色线上。分散的数据点表示将电离状态从 pH 3 改至 10 时，保留特性受影响的化合物。

图 7：进样量对整个系统体积有影响，因此务必保持进样量较小，以维持 Agilent InfinityLab Poroshell 120 1.9 μm 色谱柱等高效色谱柱的性能



最大程度改善高效液相色谱柱的分离效果

为了最大程度改善高效液相色谱柱的分离效果，必须考虑数据采集速率、进样量以及保护柱和接头对系统扩散的影响。

数据采集速率是检测器记录信息的频率；较低的数据采集速率会人为造成宽峰和短峰，从而降低效率和分离度。根据经验，使用在整个色谱峰中采集至少 20 个数据点的数据采集速率。鉴于高效分离会导致峰变窄，因此必须按比例提高数据采集速率。在使用高效液相色谱柱时，通常使用高达 10 至 20 Hz 甚至更高的数据采集速率。

赞助商内容

安捷伦液相色谱柱在线选择工具
按照方法参数、USP 方法或
化合物轻松找到最佳色谱柱





进样量对整个系统体积有影响，因此务必保持进样量较小，以维持高效色谱柱的性能。**图 7** 表明减小进样量后，即使同时保持色谱柱上载样量不变，也会显著提高效率，即使对后洗脱化合物也是如此。

低系统扩散对于保持表面多孔颗粒色谱柱的高柱效很有必要，因此使用专门设计用于高压力的亚 $2 \mu\text{m}$ 颗粒保护柱，对含复杂或“脏”基质的样品尤其重要，即使采用过前期样品前处理也是如此。分析柱的更换非常昂贵，而保护柱则不然。因此，使用保护柱来延长分析柱的寿命通常是个好主意。在选择保护柱时，应寻找与分析柱固定相兼容且不增加系统柱外体积的保护柱。

安装液相色谱柱时面临的一个常见问题是将色谱柱连接到仪器的接头。接头与色谱柱套接不当会导致泄漏、柱外死体积、色谱分离效果不佳（峰展宽和拖尾）以及分离度不足。不同供应商使用不同的套接深度、不同螺纹和不同密封垫圈，因此接头不可在系统间互换。Agilent InfinityLab 接头采用的设计使其每次都能正确抵住色谱柱入口。它们可以用手拧紧，耐压高达 1300 bar，使管线始终得到适当套接，并适用于许多不同制造商的仪器。

结论

从各种新型填料技术中选择一种色谱柱，可能在方法开发中发挥重要作用。可选择各种选择性不同的固定相，并使用 pH 作为一种选择性工具，同时牢记一些简单的参数能够最大程度发挥这些新型高效色谱柱的性能，从而快速高效地开发新方法或更新现有方法。



Anne Mack
应用科学家
安捷伦科技公司



让安捷伦的卓越洞察助您获得成功

试想，如果您能获得安捷伦全球专家团队的支持，并且在每一次为您的实验室提供服务时他们都会竭力提供敏锐洞察和专业见解，那么您可以提高多少分析效率。Agilent CrossLab 正好能满足您的这种需求。

请考虑我们涵盖安捷伦和非安捷伦仪器的法规认证服务、完整实验室搬迁、用于优化性能的实验室业务分析、现场培训和按需培训、以及全面的服务范围。我们还将与您协商，为优化您的结果开发方法并推荐最合适的色谱柱和备件。

如需了解更多信息，请访问 www.agilent.com/crosslab

实验室的真实案例

真实案例 44：
全实验室范围数据分析

系统数据见解有助于提高实验室性能。

请访问
www.agilent.com/chem/story44
查看此案例以及更多内容

赞助内容



进一步优化 液相色谱方法

William Long

许多现有的液相色谱 (LC) 方法都需要重新审视，以确保它们能够产生最佳分离效果，并确定其能否采用新型色谱柱技术或其他改进来改善结果。通常，通过简单的调整（如采用全新的色谱柱技术）提高分离度并获得更出色的峰形，并确保该方法可重现地执行并提供可靠（甚至更出色的）结果。许多现有方法也可以通过相对简单的调整而适用于质谱分析。

分离目标和方法标准

评估液相色谱方法的第一步是确定分离目标和方法性能标准。设定目标时要考虑的一般因素是效率和速度的重要性、样品的复杂性、可用的仪器以及操作人员的技能组合。

需要定义的常见性能指标如图 1 所示。足够高的分离度 (R_s) 和重现性至关重要。保留因子 (k') 应纳入考虑。例如，如果 k' 过低，可以改变溶剂或增加进样量，但具有高 k' 值的后洗脱峰可能展宽并难以检出。信噪比 (S/N) 通常应大于 10，理想情况下接近 100。

避免将柱效（理论塔板数 N ）或绝对保留时间定义为系统适用性标准，因为这些因子很容易改变，如果受到约束，可能会妨碍更快速分析方法的实现。

筛选梯度

运行筛选梯度是开发方法或调整已知方法的首选。*LCGC* 故障排除色谱柱专家 John Dolan 建议在 C18 色谱柱和低 pH 值条件下使用 5%–95% 的有机溶剂梯度。梯度时间可根据柱长和粒径而变化^[1]。

图 1：常见分离目标和性能标准

Good System Suitability Parameters

- Resolution: ≥ 2
- Peak shape: USP T_f close to 1 (< 2)
- Injection Repeatability: areas, T_f , etc. (RSD 0.1 - 0.25%)
- Absolute retention factors: $1 < k < 10$
- Relative Retention: α or k_2/k_1
- Signal-to-Noise Ratio: > 10

Method Performance Criteria

- Accuracy
- Precision
 - Ruggedness
 - Robustness
- Analytical Selectivity/Specificity
- Linearity
- Range
- Quantitation Limit (LOQ, $10 \times S/N$)
- Detection Limit (LOD, $3 \times S/N$)

AVOID THESE for System Suit. Criteria:

*Column efficiency (theoretical plates)
Absolute retention time*

***These may prevent the ability to speed
up your method in the future!***

梯度筛选运行将有助于确定首选等度方法还是梯度方法。如果色谱峰可在梯度范围内铺展开来，则表明首选梯度方法。如果色谱峰聚集并在较窄有机溶剂范围内洗脱，则等度方法可能足以满足要求。在较短的高效色谱柱上运行快速梯度（如 15 分钟梯度）可能需要或浪费额外的方法时间。

色谱柱和缓冲液筛选

色谱柱和缓冲液筛选可使用各种较短的快速色谱柱与不同流动相缓冲液的组合运行

筛选实验来实现。使用亚 2 μm 快速分离高通量色谱柱 (Agilent ZORBAX StableBond [SB-C18、Eclipse Plus C18、Bonus-RP 和 Eclipse Plus 苯基-己基]) 开展一组非甾体类抗炎药的分离实验，其中采用三种典型的低 pH 缓冲液 (0.1% 三氟乙酸 [TFA]、0.1% 甲酸和 0.1% 乙酸)，以乙酸铵作为中等浓度的缓冲液，并用水清洗色谱柱。筛选梯度从以下条件开始：对 SB-C18，采用 4% 乙腈；对 Eclipse Plus C18，采用 8% 乙腈；对 Bonus-RP 和 Eclipse Plus 苯基-己基柱，采用 0% 乙腈，共 20 种组合。

图 2：镇痛药分离中的色谱柱选择和缓冲液筛选

Experiment	Rs Score	Min Rs	C_01	C_02	C_03	C_04	C_05	C_06	C_07
SB-C18 & 0.1% TFA	1	2.456	1.051	1.242	1.454	0.793	0.954	1.352	1.529
SB-C18 & 0.1% Formic Acid	0.979	1.437	1.05	1.243	1.457	0.79	0.957	1.348	1.5
SB-C18 & 0.1% Acetic Acid	0.833	0.954	1.048	1.242	1.456	0.786	0.956	1.337	1.423
Eclipse Plus C18 & 0.1% TFA	1	3.288	0.965	1.151	1.371	0.681	0.825	1.286	1.466
Eclipse Plus C18 & 0.1% Formic Acid	1	1.921	0.962	1.149	1.37	0.677	0.825	1.279	1.422
Eclipse Plus C18 & 0.1% Acetic Acid	1	1.623	0.958	1.146	1.368	0.673	0.823	1.261	1.325
Eclipse Plus Phenyl Hexyl & 0.1% TFA	1	1.846	1.214	1.364	1.543	0.979	1.144	1.476	1.609
Eclipse Plus Phenyl Hexyl & 0.1% Formic Acid	0.915	1.246	1.215	1.367	1.545	0.98	1.149	1.474	1.589
Eclipse Plus Phenyl Hexyl & pH 4.8	1	1.518	1.22	1.371	1.55	0.986	1.15	1.111	1.071
First Choice	Eclipse Plus C18 w/0.1% TFA								
Second Choice	SB-C18 w/0.1% TFA								
Third Choice	Eclipse Plus C18 w/0.1% Formic Acid								
Fourth Choice	Eclipse Plus Phenyl Hexyl w/0.1% TFA								

20 次实验中的 9 次实验使所有化合物获得基线分离，但如图 2 所示，Eclipse Plus C18 的最小分离度最高，为 3.288。只需通过几次实验运行即可实现进一步优化，以缩短运行时间。

选择流动相添加剂

流动相添加剂的选择可以改变峰形和位置。使用磷酸、甲酸、TFA 和乙酸作为流动相改性剂，在 Agilent ZORBAX StableBond C18

色谱柱上分离水杨酸生产中发现的六种组分。采用乙酸的 StableBond 出现共洗脱峰，结果与采用甲酸得到的结果相当。磷酸和 TFA 均获得了良好的分离效果。为进一步优化分离，将 TFA 浓度增加至 1.0%，由此减小了峰拖尾。

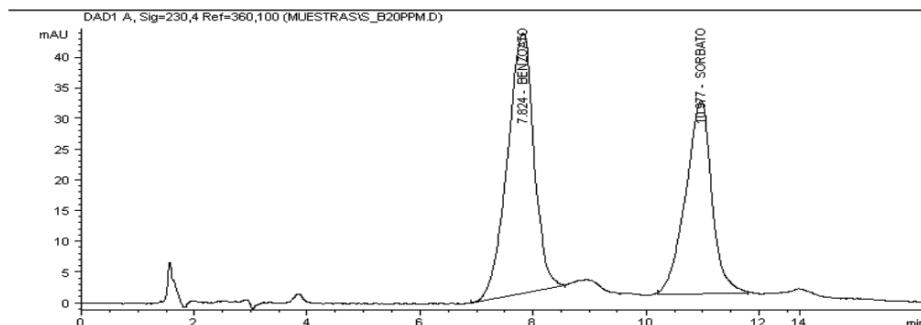
总而言之，在筛选梯度之后，通过对流动相和 pH 进行简单调整，通常能够快速实现更好的分离效果。



图 3：去甲替林和邻苯二甲酸二丙酯在 Eclipse Plus 和现有方法的 C18 色谱柱上的分离结果

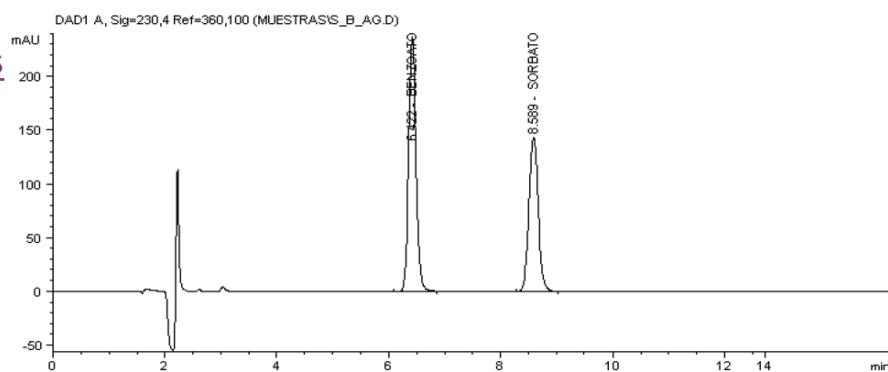
Analysis on Other C18

- Poor sensitivity
- Due to broad peaks
- Peaks do not tail, but are distorted.



Analysis on Eclipse Plus

- Better Sensitivity
- Sharp, Efficient Peaks
- Excellent peak shape



方法稳定性

方法在某些情况下可能相当出色，但在条件发生细微变化时会获得不利的结果。理想情况下，方法应保持 2.0 的最小分离度，以确保色谱峰完全分离。通常，经过细微调整即可提高最小分离度，从而改善方法的稳定性。

在 InfinityLab Poroshell EC 4.6 mm × 50 mm, 2 μm C18 色谱柱上以 1.0 mL/min 至 2.0 mL/min 的流速进行烷基酚的分离。如预期一样，压力从 99 bar 增加至 204 bar，

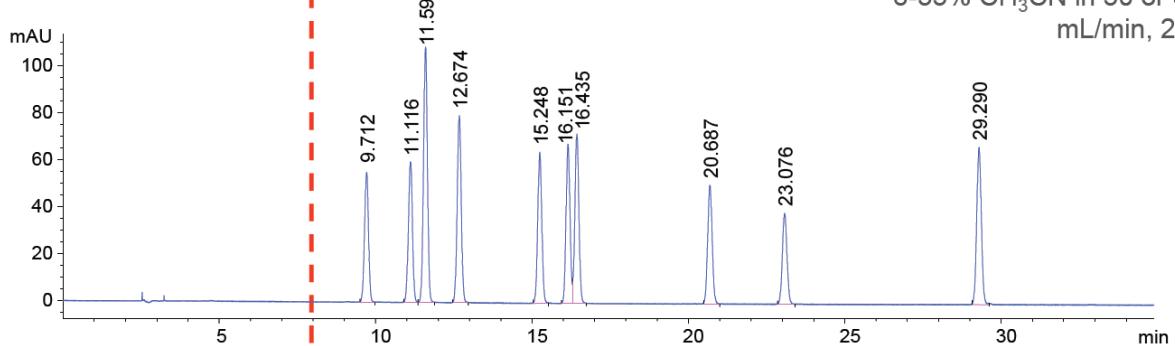
但在整个运行过程中，保持了 2.05 的合理分离度。

在三根不同的色谱柱上进行分离以测试方法稳定性。虽然一根色谱柱的分离度为 2.05，但其他两根色谱柱的分离度略低，分别为 2.03 和 1.99。目标之一是确保该方法的最低分离度达到 2.0，因此略微增加流动相中加入的水量，并使乙腈含量从 65% 降至 60%。通过这一细微调整，三根色谱柱的分离度提高至 2.55、2.54 和 2.56，确保了方法的稳定性。

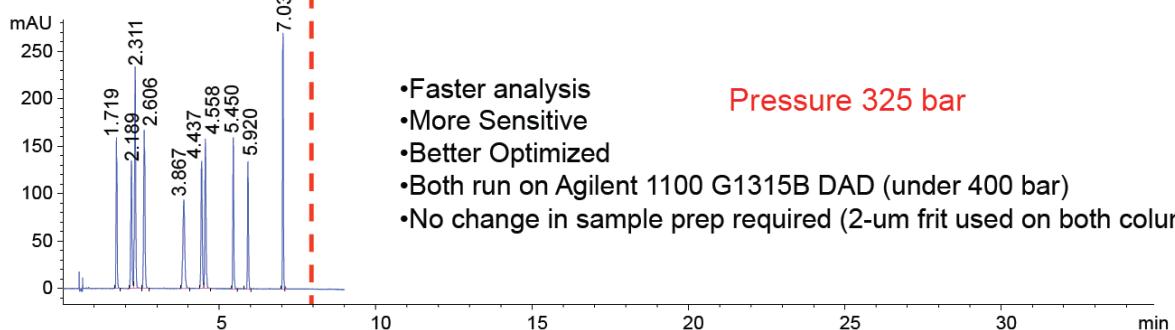
图 4：从 5 μm Zorbax 扩展至 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 色谱柱后得到的磺胺类药物分离结果

4.6 x 250 mm, 5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18

0.1% Formic Acid in water with
8-33% CH₃CN in 30 or 8 min, 1 or 2
mL/min, 25 C, 254 nm



4.6 x 100 mm, 2.7 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18



利用新型色谱柱技术

测试新技术（例如新色谱柱）是改进方法的另一种有效途径。例如，安捷伦针对 C18 色谱柱开发出全新的表面处理方法，以减小峰拖尾，并在不改变选择性的情况下改善高 pH 值下的稳定性。开发的表面多孔色谱柱（如 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 和 Eclipse Plus）也具有压力更低、性能更高、样品前处理更少的优势。

图 3 示出客户使用其方法和 25 mmol pH 7.4 的磷酸盐缓冲液在 Eclipse Plus 和另一种 C18 色谱柱上运行去甲替林和邻

苯二甲酸二丙酯样品的简单前处理过程。Eclipse Plus 改进的键合相可获得更出色的灵敏度、更尖锐的色谱峰、更出色的分离度和更平坦的基线。

安捷伦开发出名为“HPH”（高 pH 稳定性）的 InfinityLab Poroshell 色谱柱。该色谱柱利用 pH 值的变化来控制分离的选择性。该色谱柱的另一个分支是 InfinityLab Poroshell HPH C18 色谱柱，其在磷酸盐缓冲液中的使用寿命长于之前的色谱柱，并能保持卓越的性能。即使涉及复杂样品的方法也可经过极少调整而切换到该色谱

图 5：根据美国药典，对等度和梯度分离进行允许的方法调整

Parameters for System Suitability	USP34	USP37-NF32S1	
	Isocratic/Gradient	Isocratic	Gradient
Particle Size	-50%	L/dp: -25% to +50% or N: -25% to +50%	No Changes allowed
Column Length	±70%		
Column Inner Diameter	Flexible, w/ constant linear velocity	Flexible, w/ constant linear velocity	No Changes allowed
Flow rate	Based on column dimension: $F_2 = F_1 \times [(d_{c_2}^2 \times d_p) / (l_1 \times d_p)]$ Additional adjustments: ±50%	Based on dp: $F_2 = F_1 \times [(d_{c_2}^2 \times d_p) / (d_{c_1}^2 \times d_p)]$ Additional adjustments: ±50%, provided N decreases ≤20%	No Changes allowed
Injection volume	May be reduced, as far as is consistent with precision and detection limits; increase not permitted	May be adjusted, as far as is consistent with precision and detection limits	May be adjusted, as far as is consistent with precision and detection limits
Column Temperature	±10°C	±10°C	±10°C
Mobile phase pH	±0.2 units	±0.2 units	±0.2 units
Salt Concentration	within ±10% if the permitted pH variation is met	within ±10% if the permitted pH variation is met	within ±10% if the permitted pH variation is met
Ratio of Components in Mobile Phase	Minor component (≤50%): ±30% relative, but cannot exceed ±10% absolute; may only adjust 1 minor component in ternary mixtures	Minor component (≤50%): ±30% relative, but cannot exceed ±10% absolute; may only adjust 1 minor component in ternary mixtures	No Changes allowed * <small>* Not specified in <621>, assume no changes are allowed</small>
Wavelength of UV-Visible Detector	No changes allowed	No changes allowed	No changes allowed

柱，同时保持相似的选择性，并在中等 pH 范围内获得优异的使用寿命。

转子密封垫注意事项。使用高 pH 流动相进行操作时，仪器的某些部件可能会损坏。进样阀和某些其他阀中的转子密封垫由聚酰亚胺材料 (Vespel) 制成，在氢氧化铵或碳酸铵等化合物的 pH 值大于 10 的情况下容易受到影响。如果长时间使用高 pH 流动相，则可以使用 PEEK 转子密封垫来代替 Vespel。

使用表面多孔色谱柱进行的改进

简单地将全多孔色谱柱替换为表面多孔色谱柱（如 InfinityLab Poroshell 120），是

改善方法的另一种选择。图 4 显示了 5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱扩展至 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 色谱柱后对磺胺类药物的分离结果。在 InfinityLab Poroshell 色谱柱上，所有 10 个峰在约 7 分钟内洗脱，而这发生在长色谱柱上第一个峰洗脱之前。灵敏度得到改善，即使进样量更少，也获得了更高的信噪比，得到更尖锐的压缩峰，这是进一步优化的理想选择。无需改变样品前处理，两种分离均可在低于 400 bar 的压力下运行。

许多药典方法，例如美国药典 (USP) 中的方法，都有可能升级。USP 提供了关于允许调整的指南（图 5）。对于等度方



法，如果柱长 (L) 与粒径 (dp) 之比保持在原始值的 -25% 至 +50% 以内，或如果塔板数 (N) 在该比值范围内，则无需重新验证。只要线速度保持恒定，即可支持方法调整的这一灵活性。也可以改变进样量以满足检测限的要求。

对于不经重新验证的梯度方法，只允许进行极少改变；但是，USP 目前正在研究可能允许的调整。

简单的方法扩展

将萘普生的 USP 方法从 $5\text{ }\mu\text{m}$ 全多孔材料 (Agilent ZORBAX Eclipse Plus) 扩展到 $2.7\text{ }\mu\text{m}$ 表面多孔材料 (Agilent InfinityLab Poroshell 120)。标准方法的值为 $N = 10639$ 、 $Rs = 13.7$ 且 L/dp 比值为 30000。将方法转换到 $4.6\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ 色谱柱， N 几乎提高了 100%，而 L/dp 比率仅改变了 23%，符合 USP 对允许的方法调整的要求。尝试采用更短的色谱柱 ($4.6\text{ mm} \times 50\text{ mm}$)，该色谱柱使 N 从 10639 增加至 11281，并维持该方法所述的相似分离度 ($Rs > 11.5$)。

Poroshell 颗粒可在整个系列中扩展。

安捷伦建议针对不同类型的应用使用特定的色谱柱孔径。如果只是改善 HPLC 性能，使用 $4\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱可能足以满足要求，与 $5\text{ }\mu\text{m}$ 全多孔色谱柱相比，其性能通常能够提高约 200%。

$2.7\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱是一种常规色谱柱，可在极低压力下提供 UHPLC 性能。现在，这些色谱柱可用于 1000 bar 下，其典型压力约为亚 $2\text{ }\mu\text{m}$ 全多孔颗粒色谱柱的 50%，同时柱效达到约 90%，无需额外的样品前处理。 $1.9\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱具有与亚 $2\text{ }\mu\text{m}$ 全多孔颗粒色谱柱相似的极高 UHPLC 性能和压力，且柱效为亚 $2\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱的 120%。

将 LC 方法转换到 LC-MS

质谱 (MS) 广泛用于分析极性化合物到非极性极强的化合物。电喷雾电离 (ESI) 能够在 MS 中用于电离高分子量化合物和低分子量化合物，因此适用于各种样品。使用非极性更强的样品时，应避免使用 ESI，因为电荷感应效率低，且无法产生足够高的信号。大气压光电离 (APPI) 或大气化学电离 (APCI) 可用于电离这些化合物。

ESI 得到广泛应用。在许多情况下，鉴定未知化合物是方法改进的目标。另外，由于 LC-MS 仪器已更易于使用，且实验室中更容易获得，因此期望开发更适用于 MS 分析的方法。



赞助商内容

液相色谱产品样本：
液相色谱柱和方法
开发指南

ESI-MS 的方法注意事项包括：

- 流动相（和分析物 pKa）的 pH 值会影响离子的形成，从而影响信号
- 施加于电喷雾探针的电压将诱导离子形成
- 选择最佳流动相 pH 可以改善灵敏度
- 有机溶剂对电离几乎没有影响，但会影响蒸发，因此采用挥发性较高的流动相可能有利
- ESI 非常适合流速低于 0.5 mL/min 的条件
- ESI 与反相、疏水相互作用和正相 HPLC 兼容

ESI 的缓冲液注意事项包括：

- 建议缓冲液浓度低于 25 mmol/L，以避免信号抑制效应（最好低于 10 mmol/L）
- 由于沉积物积聚以及金属离子缓冲液干扰电离，因此 ESI 与非挥发性缓冲液的相容性差
- 酸性流动相通常更适用于正模式电离
 - 0.1%–1% 甲酸，0.1%–1% 乙酸，0.05%–0.2% TFA
 - 铵盐有利于形成铵加合物
 - TFA 导致离子抑制

- 使用 TFA “修复” — 柱后添加乙酸或丙酸

- 碱性流动相更适用于负离子模式电离

使用基于磷酸的流动相和乙腈 (Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm × 150 mm 色谱柱) 分离绿茶中发现的 10 种化合物。在 5 μm 色谱柱上，在约 15 分钟内很好地完成分离。然而，磷酸不适用于 MS，且方法目标是加快分离速度。

在选择性相当的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 色谱柱上进行分离，在约 60% 的反压下完成分析。使用 0.2% 甲酸、0.2% 乙酸、0.02% TFA 或用甲酸调节的甲酸铵缓冲液，可以获得相同类型的选择性，并实现类似的分离。

MS 灵敏度受到这些选择的显著影响。考察一个特定峰以作为评估分离的方法，发现使用乙酸得到的信噪比为 155，使用 TFA 得到的信噪比为 68，而采用缓冲流动相仅得到 33 的信噪比，因此在这种情况下，乙酸是一种理想的选择，该方法可以得到快速优化。

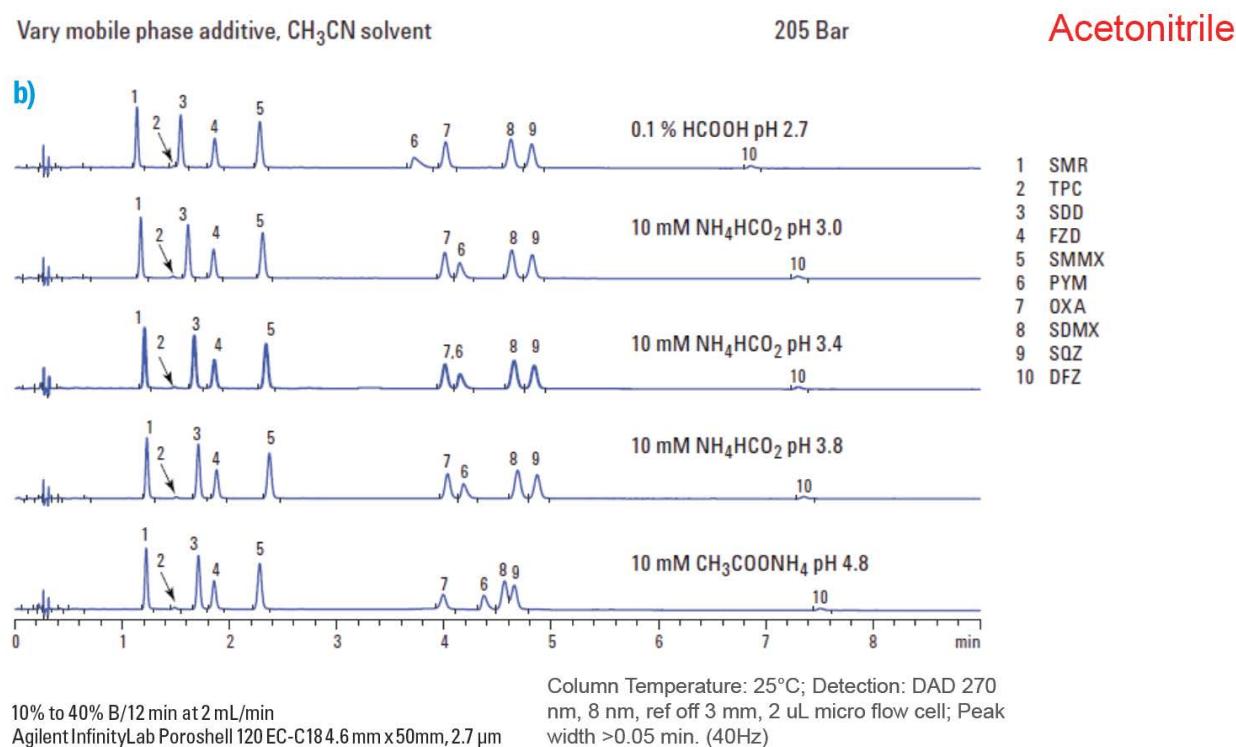
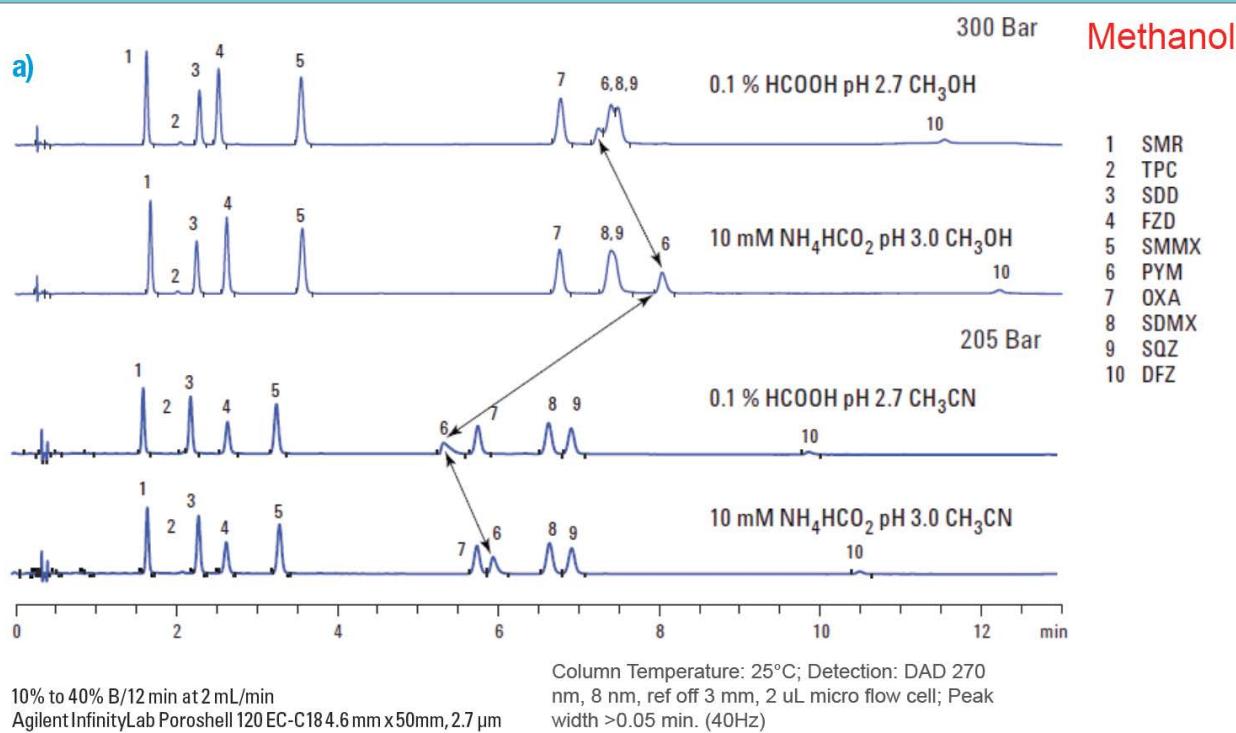
在优化过程中，还应考虑数据采集速率。快速数据采集将产生最窄的峰，从而得到最佳峰容量，但也意味着更高的基线噪音和降低的信噪比灵敏度。在稍慢的数据采集速率下

赞助商内容

自动化液相色谱方法开发
网络研讨会系列



图 6：使用 a) 甲醇流动相、b) 乙腈流动相将现有抗生素分析方法转移至 MS





能够实现最佳信噪比，但代价将是峰容量减小。因此，应根据特定方法的目标优化数据采集速率。

另一种方式是开发适用于 MS 的新方法。例如，一种用于分离动物治疗抗生素的现有 UV 方法显示，10 种化合物得到很好的分离。然而，该方法使用浓度极高的磷酸，且分离的运行时间为 35 分钟。由于不存在等效色谱柱，因此开始采用 10% 至 40% 甲醇或乙腈的通用梯度开发新方法。使用较短的 $4.6 \times 50 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和紫外检测，能够快速筛选甲酸、甲酸铵、乙酸和作为流动相缓冲液的乙酸铵的不同流动相组合。

如图 6a 中的甲醇运行结果所示，峰基本上根据所用缓冲液的类型不同而发生偏移。乙腈运行中的峰偏移（图 6b）较小且压力低得多。调节 pH 以改变洗脱顺序和峰间距。发现最佳流动相组合是 pH 3.8 的甲酸铵与乙腈，该组合使这 10 种化合物得到良好的分离。将流速增加至 0.42 mL/min ，对 MS 检测方法进行优化。

将该方法成功扩展至 $3 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ 色谱柱，该色谱柱适用于 UV 或 MS 检测。分离速度快，所用的溶剂比原始方法少得多。

结论

审视液相色谱方法以确定能否通过简单的调整改善色谱分析结果或使方法适用于 MS 分析，将使大多数实验室获益。色谱柱选择是实现成功分析的重要因素，凭借选择性的不同，通常可以应用新型色谱柱键合相提高分离度并获得更出色的峰形。

参考文献

1. J. Dolan, *LCGC* **31**(1), 30-35 (2013)



William Long

液相色谱柱应用科学家
安捷伦科技公司



满足数据完整性要求的同时提高分析效率

升级到 Agilent OpenLab CDS

选择正确的数据系统让一切大为改观。OpenLab CDS 是适用于色谱和单四极杆质谱工作流程的安全的色谱数据系统，能够简化您的实验室操作并高效地获得高质量结果。

OpenLab CDS 可确保数据可靠性并满足严格的法规要求，您可以选择所需的技术控制手段，例如审计追踪审查、访问控制、记录保护和电子签名。

了解有关 Agilent OpenLab CDS 的更多信息。

[www.agilent.com/chem/
openlabcds-streamline](http://www.agilent.com/chem/openlabcds-streamline)