



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，达到与大填料粒径长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。

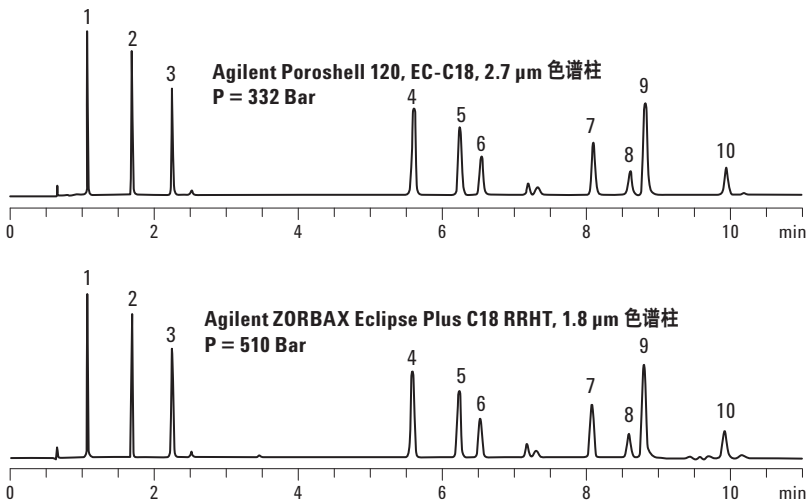
Agilent ZORBAX 系列色谱柱的优势之一是不同填料粒径色谱柱间可进行比例缩放。这就允许将研发方法快速、可靠地转移至实验室制备及高通量分析阶段。



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。

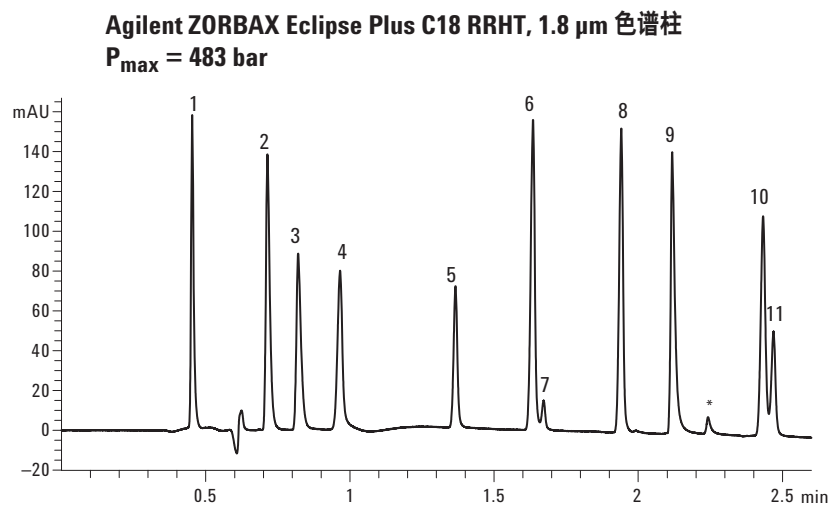
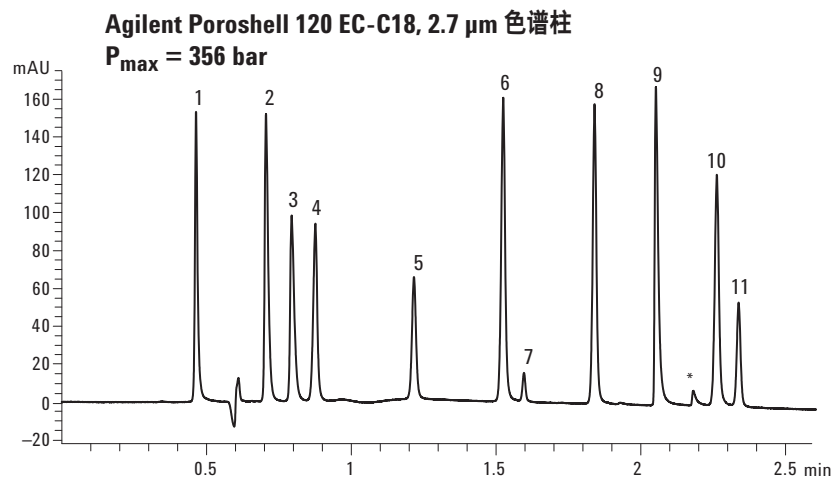
图 1 和图 2 为上述色谱性能的展示实例。图 1 为使用 0.1 % 甲酸流动相分离环境酚类，图 2 为使用 pH 4.8 的 10 mM 乙酸铵流动相分析软饮料中的添加剂。在这两组对比试验中，组分的保留顺序相同。然而，更加深入的问题是，Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Eclipse Plus C18 色谱柱在更加广泛的操作条件下，分离包括酸碱及中性化合物在内的更多化合物时，选择相似性如何？



分析条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm 安捷伦部件号 689975-902 Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHT C18, 4.6 mm × 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 × 100 mm, 2.7 μ m
 安捷伦部件号 695975-302

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT, 3.0 mm × 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

t₀ 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
磺胺噻恶啉	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
萘	萘普生
甲氧基萘	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。硅羟基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

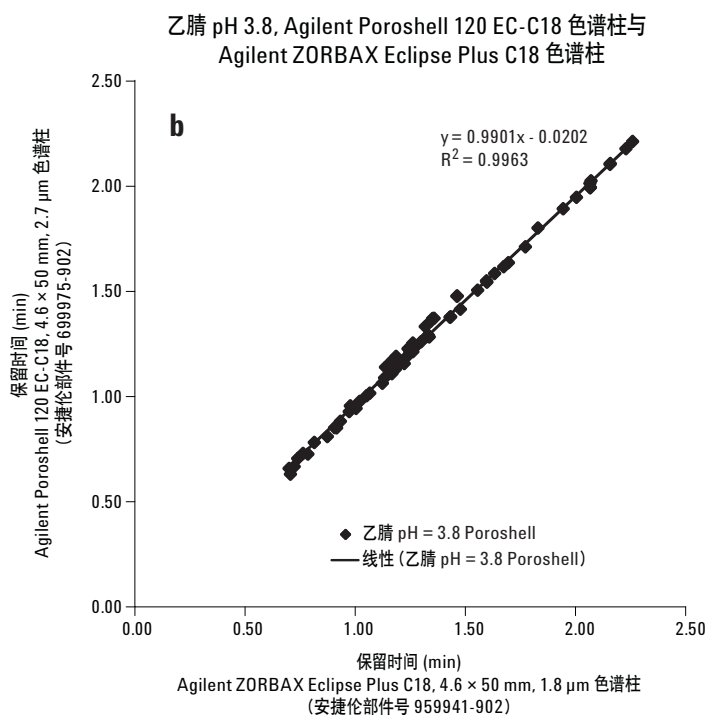
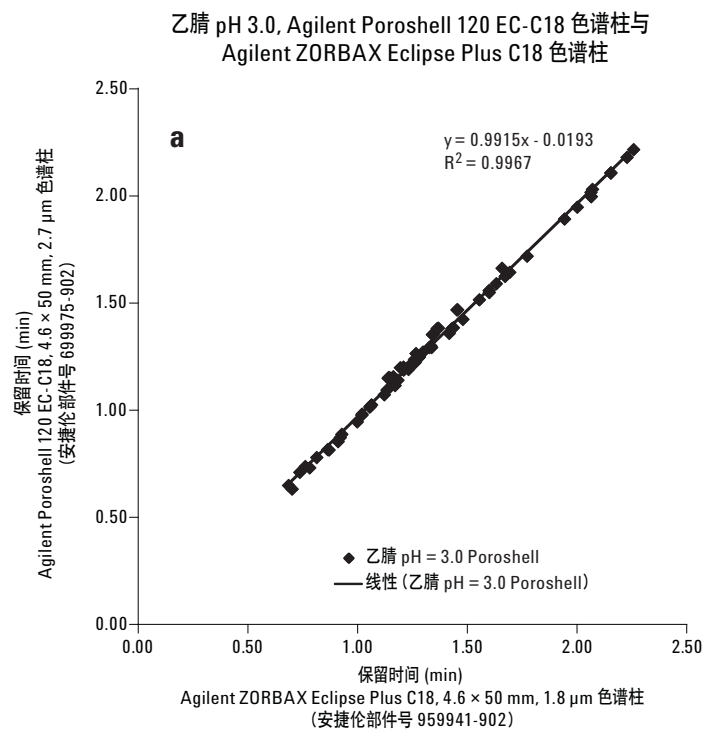
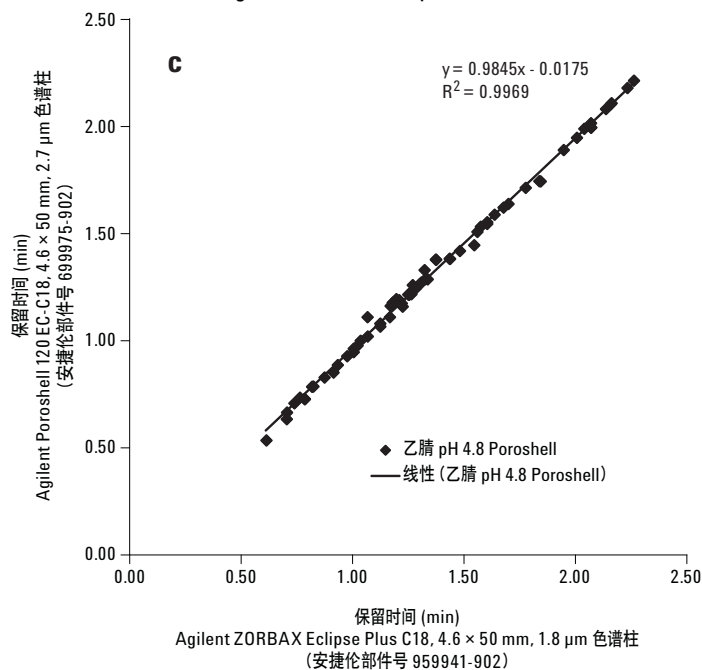
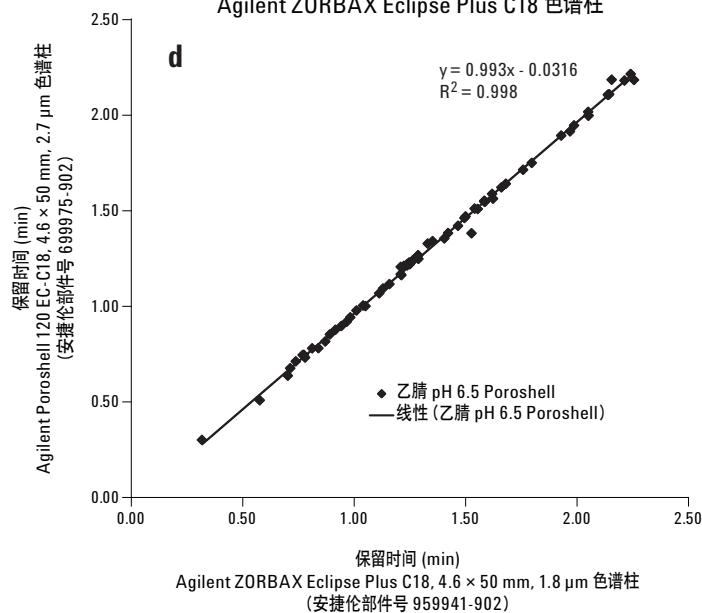


图 3. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图 (续)

乙腈 pH 4.8, Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱



乙腈 pH 6.5, Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱



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 μL 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 × 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

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 R² 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

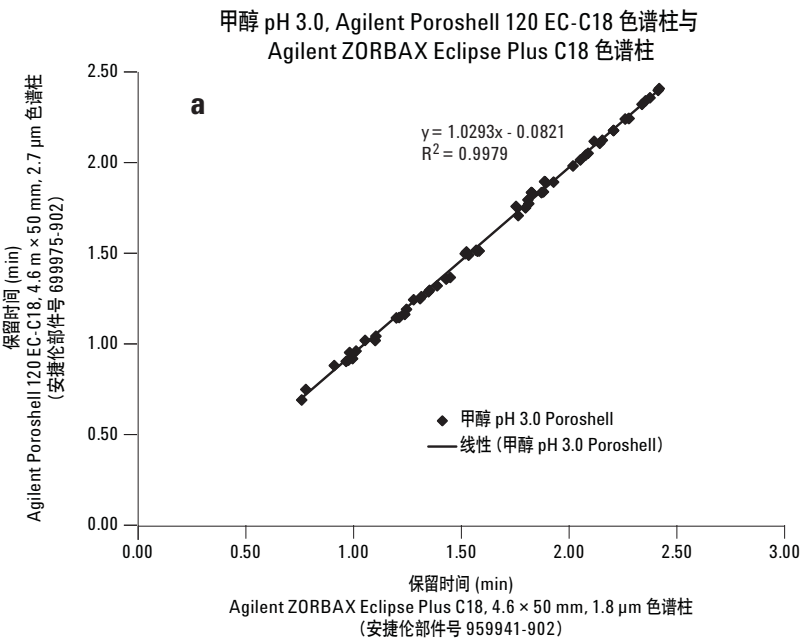


图 4. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图 (续)

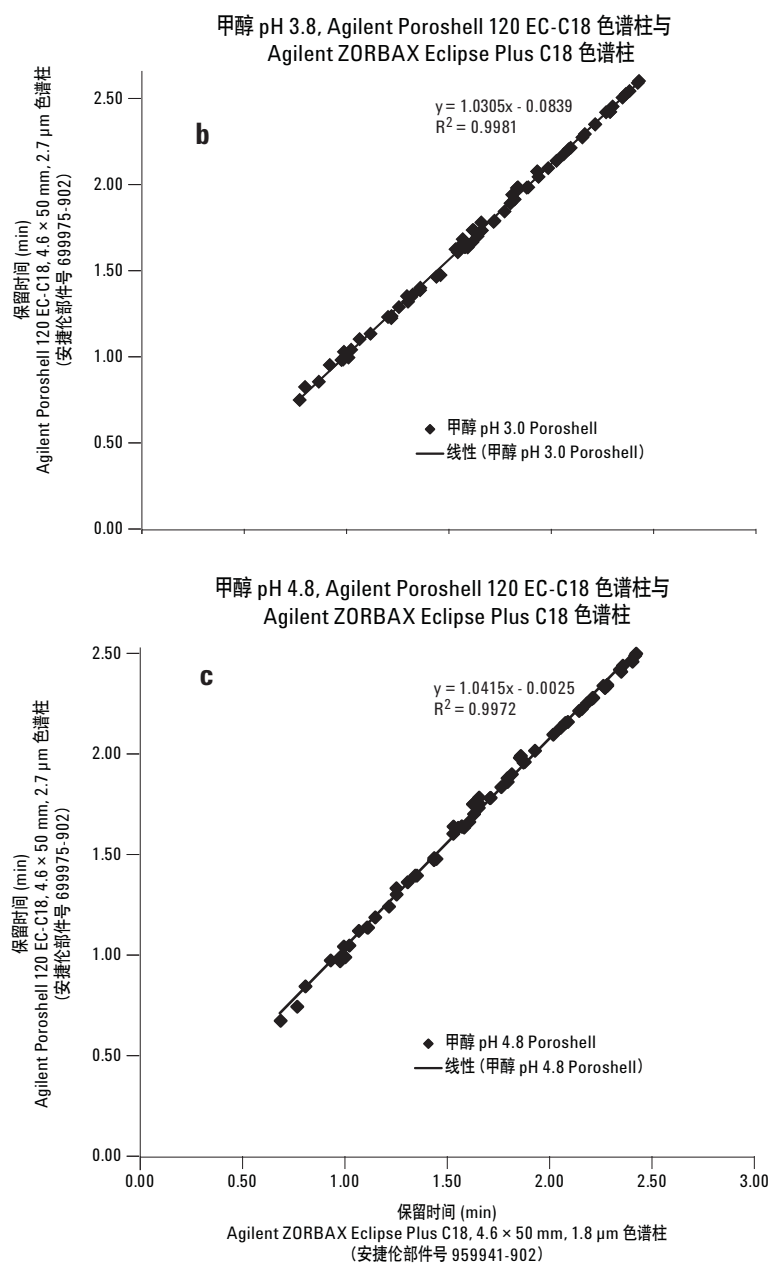
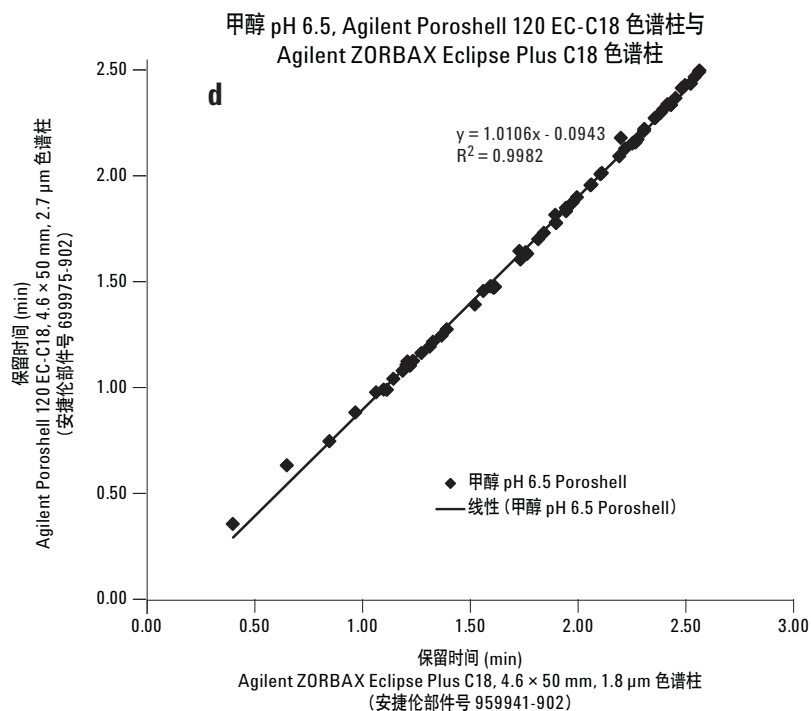


图 4. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱分离 66 个化合物的保留时间散点图 (续)



分析条件

流动相	A: 10 mM 缓冲液 B: 有机相 (甲醇)
梯度程序	t_0 时 B 为 5%, 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 4. 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

表 2. 相关数据汇总

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 μm 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μm 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 色谱柱在与亚 2 μm 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。

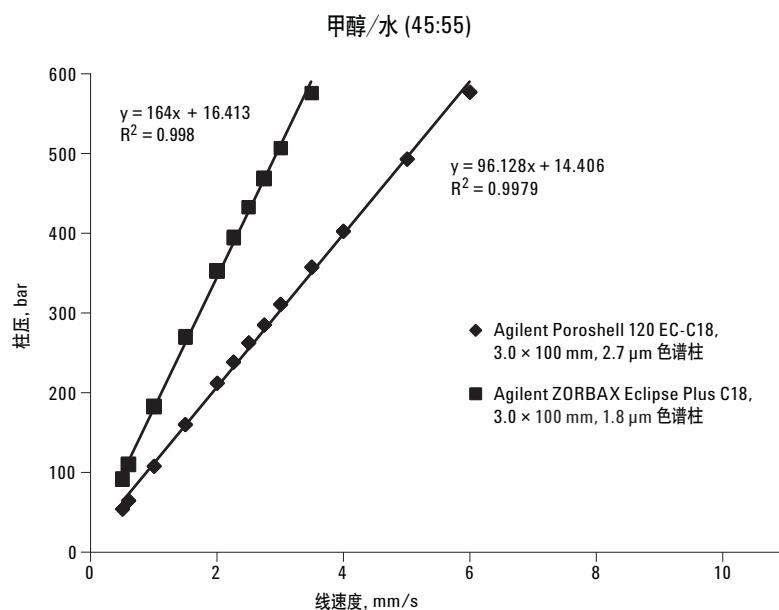


图 5. 不同线速度条件下所测柱压表明, 相同柱长的 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱比 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 μm 色谱柱柱压低

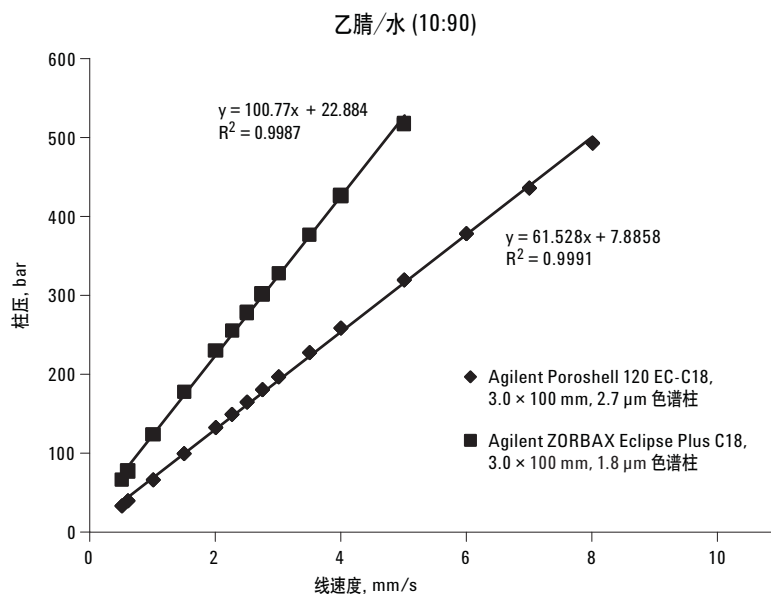


图 6. 在不同线速度条件下测得柱压表明, 相同柱长的 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱比 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 μm 色谱柱柱压低

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, 2011

中国印刷

2011 年 2 月 9 日

5990-6588CHCN



Agilent Technologies