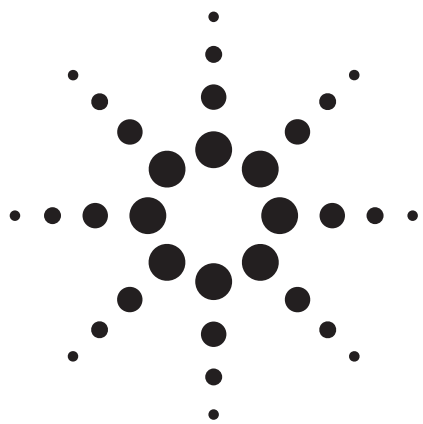




在 Poroshell 120 EC-C18 與 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱之間的方法移轉

技術概要

前言

由於開發了表面多孔性顆粒，遂能將表面多孔性顆粒自較大的 5- μm 全多孔性顆粒與 2- μm 以下的全多孔性顆粒實施方法移轉。從大型顆粒管柱實施轉移的優點之一，在於節省了大量的時間，因為表面多孔性顆粒在流速較快時效果最佳，且其解析度相似但管柱長度較短 [1–4]。表面多孔性顆粒的高效率，類似於 2- μm 以下的全多孔性顆粒，因為前者的質傳距離短，且粒徑分布更為窄。從全多孔性的 2- μm 以下管柱實施方法移轉，也有其優點。許多開發方法實驗室均選擇使用 2- μm 以下的管柱。不過在特定情況下，2- μm 以下管柱方法所需要的操作壓力，不一定能移轉至所有 HPLC 系統。在大部分情況下，使用 2- μm 以下管柱的方法，可直接移轉至表面多孔性顆粒管柱，不需要調整。其中又以安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 與安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 最為明顯，因為這兩款管柱的製造擁有相近的化學鍵結特性，並使用類似的滯留機制。此外表面多孔性顆粒管柱也能在減少背壓的情況下，執行與 2- μm 以下管柱相同的分析作業。此舉能讓分析者增加流速提升處理量，或是增加管柱長度加強解析度，不會超過系統壓力限制。

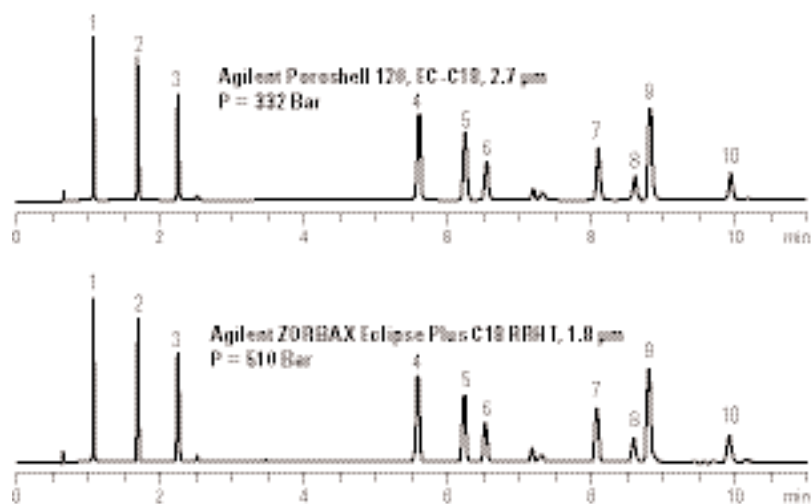
安捷倫 ZORBAX 系列 HPLC 管柱的有利條件之一，就是能在顆粒大小不同的管柱之間調整方法。此舉能迅速可靠地將分析法開發實驗室的方法移轉至製備實驗室，並提供高處理量的分析。



Agilent Technologies

最近有多項安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 與安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 的比較結果，顯示兩者之間的層析圖非常相近。Poroshell 120 的效率，可達到 2 μm 以下管柱的 90%（例如 Eclipse Plus C18），但壓力只有 60%。Poroshell 120 之中的表面多孔性顆粒，具備大型粒子的壓力低的優點，卻同時能達到 2 μm 以下顆粒的效能。

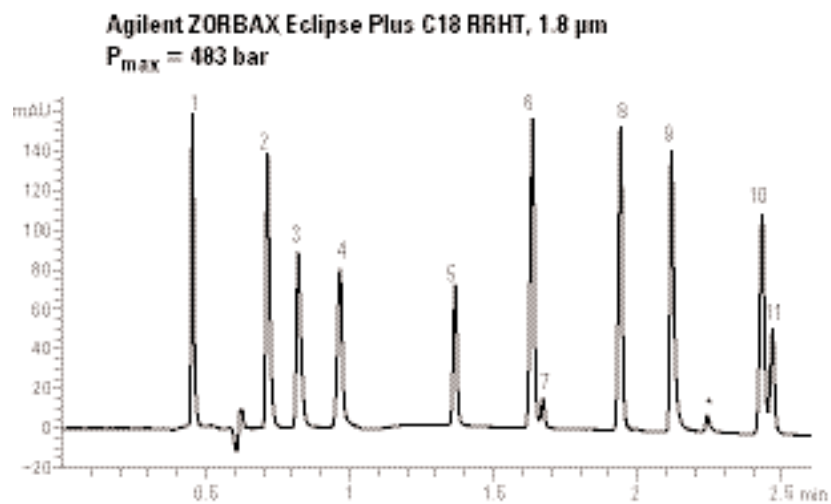
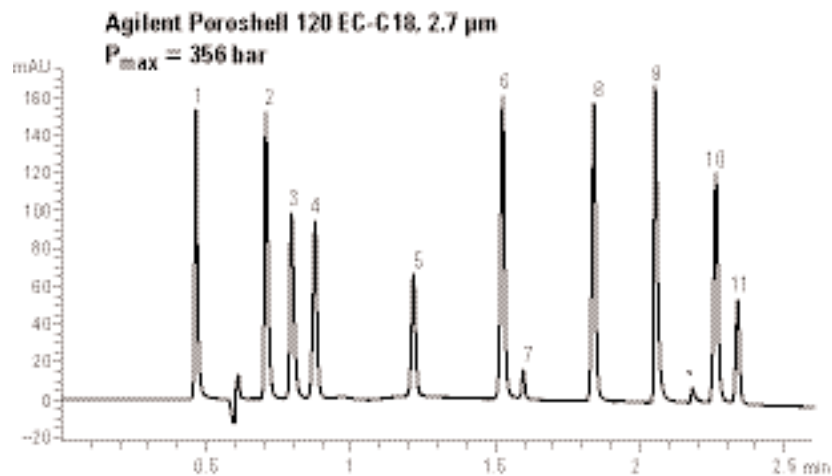
圖 1 顯示運用於環境中酚類化合物分離的層析圖相似性例子，其移動相使用 0.1 % 的甲酸；圖 2 則是使用 10 mM 醋酸銨 (pH 4.8) 分析汽水添加物。在上述兩種情況中，化合物的滯留順序相同。從這兩個例子的相似性又產生更廣泛的問題：Poroshell 120 EC-C18 與 Eclipse Plus C18 在更為廣泛的操作條件下，以及面對更多種類的化合物時（包括酸性與中性物質），兩者選擇性的相似程度為何。



實驗條件

管柱	安捷倫 Poroshell 120 EC-C18，4.6 mm × 100 mm，2.7 μm 安捷倫 p/n 689975-902 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus RRHT C18，4.6 mm × 100 mm，1.8 μm 安捷倫 p/n 959964-902
移動相	A：0.1% 甲酸 B：MeCN + 0.1% 甲酸
溫度	40 °C
偵測波長	275 nm
注入量	10 μL
流速	2 mL / 分鐘
最初	8% B，10 分鐘 30% B
1. 對-苯二酚	6. 鄰-甲酚
2. 間-苯二酚	7. 2-硝基苯酚
3. 鄰-苯二酚	8. 2,3 二甲基酚
4. 4-硝基苯酚	9. 2,5 二甲基酚
5. 對-甲酚	10. 1-萘酚

圖 1. 比較安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 及安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18：使用乙腈及甲酸移動相分析環境中酚類化合物



實驗條件

管柱	安捷倫 Poroshell 120 EC-C18，3.0 mm × 100 mm，2.7 μ m 安捷倫 p/n 695975-302 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT，3.0 mm × 100 mm，1.8 μ m 安捷倫 p/n 959964-302
移動相	A：20 mM 醋酸鉍，pH 4.80 B：乙腈
梯度衝提	t ₀ 時為 14% B，2.1 分鐘內逐漸增加至 52% B
流速	0.851 mL／分鐘
溫度	30 °C

- | | |
|------------|--------------|
| 1. 維生素 C | 7. 阿斯巴甜 |
| 2. 醋磺內酯鉀 | 8. 山梨酸 |
| 3. 糖精 | 9. 奎寧 |
| 4. 對-羥基苯甲酸 | 10. 去水醋酸 |
| 5. 咖啡因 | 11. 對羥基苯甲酸甲酯 |
| 6. 苯甲酸 | * 奎寧中雜質 |

圖 2. 比較安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 及安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18：使用乙腈及醋酸鉍為移動相分析汽水添加物

實驗

分析方法的開發，通常使用梯度沖提來建立。使用短的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 50 mm 管柱，可迅速評估多種不同移動相。本次研究使用的梯度沖提流速為 2.0 mL/分鐘，有機溶劑比例開始時為 5%，於 2 分鐘後有機溶劑比例增加至 95%，並維持此比例 1 分鐘。本次使用與質譜儀相容的移動相，其中包含具揮發性的緩衝液，例如甲酸銨緩衝液及醋酸銨緩衝液。此類緩衝液的製備方式，是將足夠的甲酸銨或醋酸銨溶解於水中以產生 10 mM 溶液，並利用適當的濃縮酸液透過滴定法將溶液調整至所需 pH 值。上述緩衝液的 pH 值範圍包含 3 到 6.5。

本次研究使用安捷倫 1200 方法開發解決 LC 系統：

- G1312B 雙幫浦 SL
- G1367D 自動液體進樣器 (ALS) SL
- 2 個 G1316C 柱溫箱 (TCC) SL
- G1315C 光二極體陣列偵測器 (DAD) SL，使用 G1315-60024 微型流動液槽（3-mm 路徑，2- μ L 容量）
- 使用 ChemStation 版本 B.04.01 控制 HPLC 及處理資料

相關的資料使用 Microsoft Excel 7.0 計算及繪圖。

本實驗使用 4 種安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱：

- 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18，4.6 mm $\times$ 50 mm，2.7 μ m p/n 699975-902
- 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18，3 mm $\times$ 100 mm，2.7 μ m p/n 695975-302
- 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18，4.6 mm $\times$ 50 mm，1.8 μ m p/n 959943-902
- 安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18，3 mm $\times$ 100 mm，1.8 μ m p/n 959964-302

表 1 總括本實驗的化合物清單。這些化合物分別以水或 50/50 的水/乙腈製備並注入。

表 1. 66 種化合物包括酸、基及中性物質，於 50/50 MeCN／水進行製備，並個別注入至 4.6 x 50 mm 管柱

測試化合物清單

富來頓 (furazolidone)	乙氧乙醯胺苯 (phenacetin)
氯黴素 (chloramphenicol)	乙醯胺苯 (acetanilide)
impramithue	酚 (phenol)
炔諾酮 (norethindrail)	間-苯二酚 (resorcial)
可的松醋酸酯 (cortisone acetate)	對-苯二酚 (hydroquinone)
氯黴素 (chloramphenicol)	4-硝基苯酚 (4-nitro phenol)
丁螺環酮鹽酸鹽 (Buspirone Hydrochloride)	鄰甲酚 (o-cresol)
對-氨基苯甲酸乙酯 (benzocaine)	1-萘酚 (1-naphthol)
乙胺嘧啶 (pyrimethamine)	鹽酸伊米帕明 (imipramine hydrochloride)
磺胺奎林 (sulfaquinoxaline)	3,4-二羥基苯氨酸 (3,4- dihydroxy l phenyl alanine)
磺胺—甲氧嘧啶 (sulfamonomethoxine)	DL-苯丙胺酸 (DL-phenylalanine)
nimopidin	鹽酸麻黃素 (ephedrine hydrochloride)
磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine)	易蒙停 (loperamide)
磺胺噁唑 (sulfamethoxazole)	二苯駢呋喃 (dibenzofuran)
磺胺氯嘧啶 (sulfachloropyridazine)	鹽酸普魯卡因 (procaine hydrochloride)
磺胺甲基噁唑 (sulfamethoxypyridazine)	exonazole nitrate
磺胺甲基塞唑 (sulfamethizole)	gembigrozil
磺胺甲基嘧啶 (sulfamerazine)	β -雌二醇 (beta estradiol)
磺胺塞唑 (sulfathiazole)	甲氧乙心安 (metoprolol)
磺胺嘧啶 (sulfadiazine)	丙氨環庚烯 (protriptyline)
苯甲醛 (benzaldehyde)	羥基間苯二甲酸 (hydroxy sophthalic)
菲 (phenanthrene)	氟滅酸 (flufenamic acid)
聯苯 (biphenyl)	鹽酸丙美卡因 (pramoxine hydrochloride)
奈嵌戊烷 (acenaphthene)	萘普生 (naproxen)
甲氧基萘 (methoxy naphthalene)	苯海拉明 (diphenhydramine)
二甲氧基苯 (dimethoxy benzene)	二氟尼柳 (diflunisal)
孕酮 (17- alpha hydroxyprogesterone)	nisoldipin
黃體素 (progesterone)	雙氯芬酸 (diclofenac)
潑尼松龍 (prednisolone)	Hydrocortisone (hydrocortisone)
去氧皮質固酮 (deoxycorticosterone)	鹽酸普魯卡因胺 (procainamide hydrochloride)
氯芬尼拉明 (chlorphenamine)	利多卡因 (lidocaine)
黃蓮素 (berberine)	特芬那定 (Terfenadine)
鹽酸金黴素 (chlortetracycline hydrochloride)	縮水蘋果酸氯芬尼拉明 (chlorpheniramine maleate)

討論

許多廠商都曾經研究管柱的效能差異，其中包括 Wilson、Nelson、Gilroy、Dolan、Snyder 與 Carr [5,6]。美國藥典 (The United States Pharmacopeia) 列出了許多管柱 [7] 和工具，以判定管柱之間得以交換使用的程度。其中的特性例如，二氧化矽的化學作用和鍵結，可能影響選擇性。矽烷醇活性會透過與分析物二次交互作用大幅影響波峰形狀，此外也可能透過氫鍵結或離子交換影響選擇性。這些效應在高 pH 值時比低 pH 值更為顯著 [8]。安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 與安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，是由安捷倫以相同設施中採用矽膠製造出的管柱。這兩種管柱都是高度惰性管柱，且能於使用鹼性化合物時產生優異的波峰形狀。除了 pH 值的效應以外，矽烷醇活性也可能受到溶劑中的差異影響。甲醇屬於氫鍵結溶劑，其沖提強度不及惰性的乙腈 [10]。藉由選擇各種不同條件，就更可能顯現選擇性的各種差異。

圖 3 顯示了 66 種化合物在安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 和安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱上的類似滯留情形，其中使用一般梯度沖提分析不同化學類別的各種化合物。高相關係數 (R^2) 代表這兩種安捷倫 C18 管柱在分離時所牽涉的交互作用具有高度相似性，而約為 1 的斜度則顯示交互作用的強度相近 [9,10]。

一般梯度沖提使用乙腈與 10 mM 甲酸銨或醋酸銨緩衝液，pH 值介於 3 至 6.5

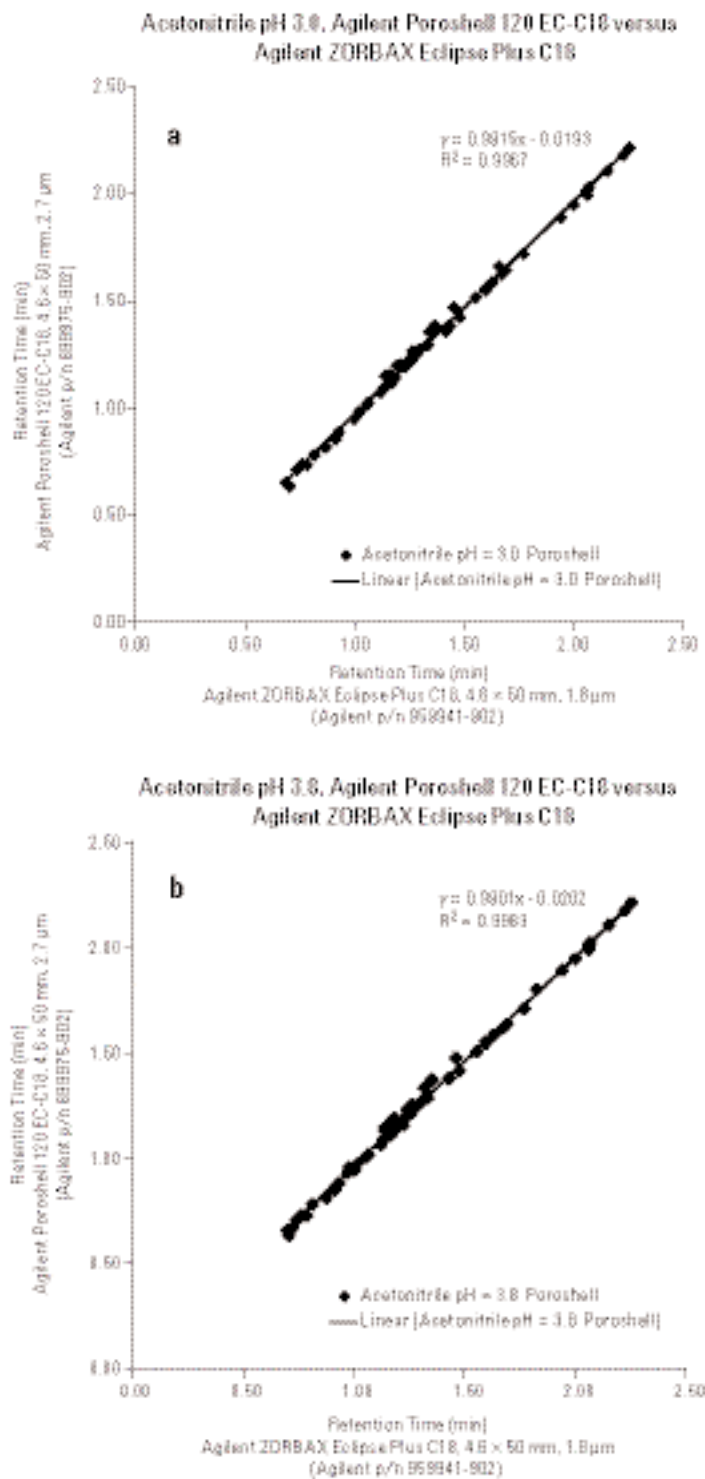
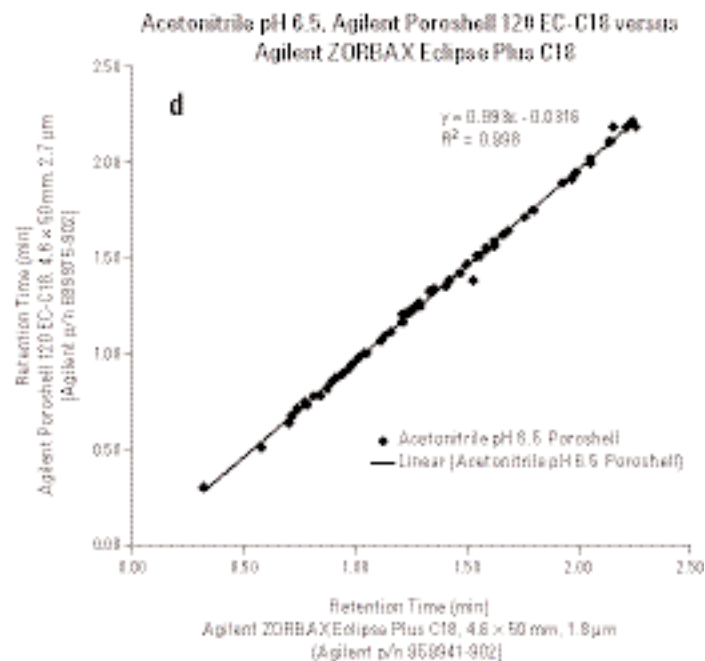
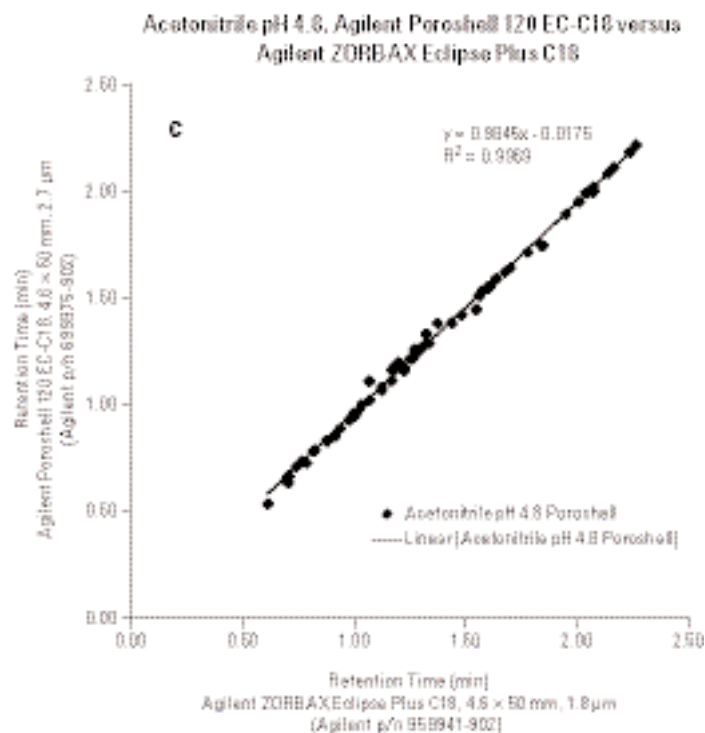


圖 3. 66 種化合物的滯留時間散佈圖：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (4.6 × 50 mm，2.7 μ m) 對比安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 50 mm，1.8 μ m)。(接續下頁)



實驗條件
移動相

A : 10 mM 緩衝液
B : 有機溶劑 (ACN)

濃度梯度

t_0 時為 5% B，2 分鐘後增為 95% B，維持在 95% B 1 分鐘

流速

2 mL/分鐘

樣品

1 μL 的 1 mg/mL 標準品配在 H_2O 或 H_2O/ACN

圖 3. 66 種化合物的滯留時間散佈圖：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (4.6 × 50 mm，2.7 μm) 對比安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 50 mm，1.8 μm)

圖 4 顯示 66 種化合物的滯留時間散佈圖：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 對比安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱(使用介於 3 和 6.5 之間不同 pH 值的乙腈)。圖 2 顯示介於 3 和 6.5 之間不同 pH 值甲醇中的散佈圖。表 2 總括斜率與 R2 值的組合。如圖所示，這兩個散佈圖之間具良好的關聯性。雖然滯留時間有時隨著離子化合物而變動，但兩種管柱均成比例變化。在比較乙腈和甲醇資料時關係曲線的斜率出現些許差異，可能代表安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 與安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 之間的 H 鍵結交互作用出現部分差異(斜度 0.99 與斜率 1.01)，但在方法移轉期間此等狀況不太可能造成任何問題，並且只有在研究大量實驗和化合物時才能測知。

一般濃度梯度使用甲醇，利用 10 mM 甲酸銨或醋酸銨製作緩衝液，
pH 值介於 3 至 6.5

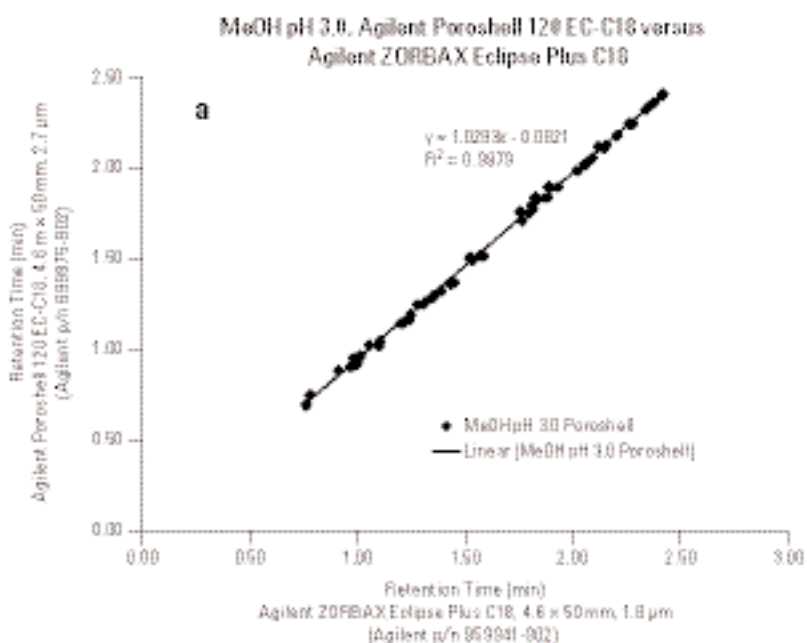


圖 4. 66 種化合物的滯留時間散佈圖：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (4.6 × 50 mm, 2.7 µm) 對比安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 50 mm, 1.8 µm)。(接續下頁)

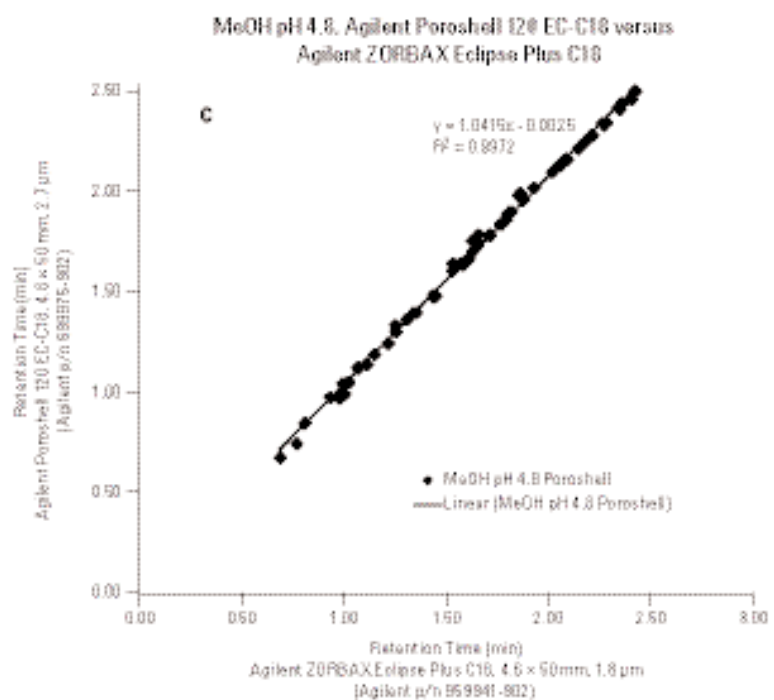
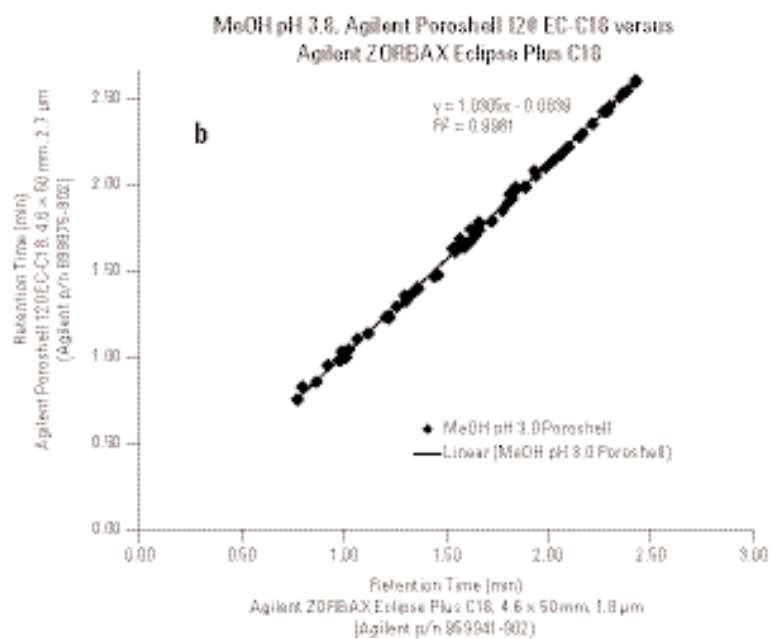
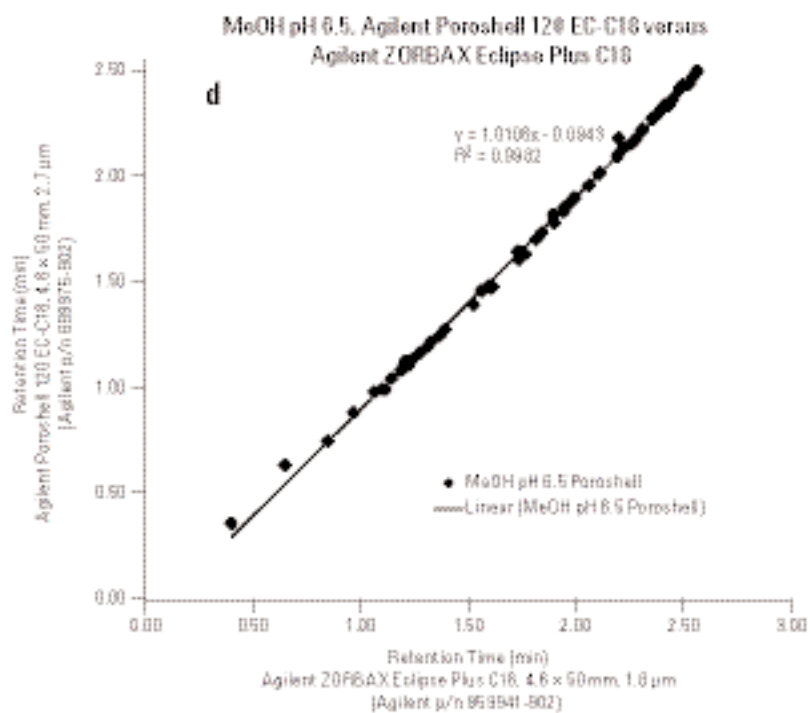


圖 4. 66 種化合物的滯留時間散佈圖：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (4.6 × 50 mm，2.7 μm) 對比安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 50 mm，1.8 μm)。(接續下頁)



參數條件

移動相： A：10 mM 緩衝液
B：有機溶劑 (MeOH)

梯度沖提： t_0 時為 5% B，2 分鐘後增為 95% B，維持在 95% B 1 分鐘

流速： 2 mL/分鐘

檢品： 1 μ L 的 1 mg/mL 標準品加入 H₂O 或 H₂O/ACN

圖 4. 66 種化合物的滯留時間散佈圖：安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (4.6 × 50 mm，2.7 μ m) 對比安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 50 mm，1.8 μ m)

表 2. 關聯性資料概要

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 $y = 1.0106x - 0.0943$ $R^2 = 0.9982$

安捷倫 Poroshell 120 管柱優於 2- μm 以下管柱的另一項優勢，就是作業壓力較低。壓力與管柱的顆粒大小有關；顆粒較大而產生的壓力，自然低於小顆粒的壓力。除了顆粒大小以外，管柱內部產生的壓力取決於多項其他因素，包括溶劑的線性速度，以及溶劑在特定組成和溫度情況下的黏度。雖然這是梯度沖提研究，但本研究中大部分的黏滯溶劑組成，於 40/60 及 50/50 之間的甲醇／水發生。25 °C 時本溶劑的黏滯度為 1.62 cP。黏滯度最高的乙腈為 10/90 乙腈／水，25 °C 時此溶劑的黏度為 1.01 cP [11]。如參考資料所述，溶液黏度與溫度之間具有反向關聯。圖 5 及圖 6 分別顯示兩種雙溶劑的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱與安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 μm 管柱壓力及線性速度對比圖（其中使用 100 mm 管柱）。如前所述，這項優點允許使用更長的管柱才會達到相同壓力（以及更大的注入量），或是更高的流速。

若選擇性的差異存在時，孔洞尺寸差異顯得更為重要，特別是介於 1500 和 2500 mW 之間的化合物。涉及形狀選擇性的化合物，例如 PAH 等，也可能造成問題。

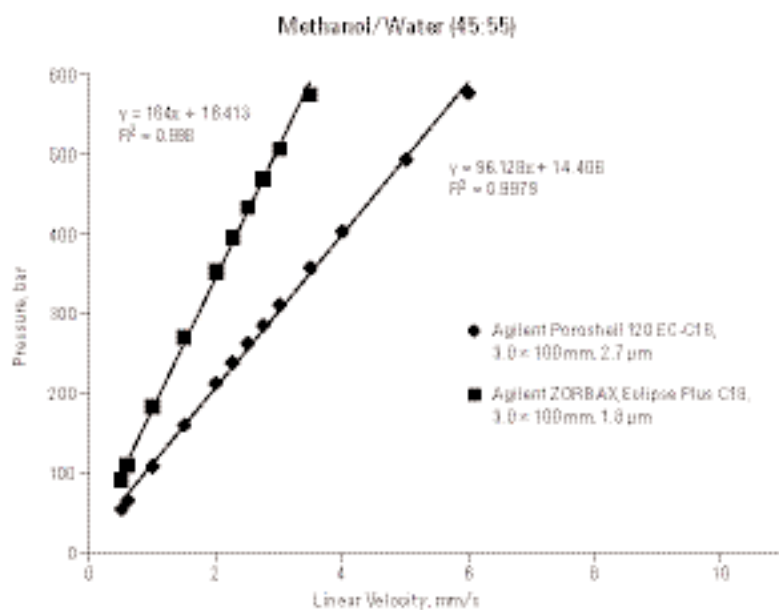


圖 5. 在不同線性速度下測量的壓力，顯示安捷倫 Poroshell 120 的作業壓力，低於類似長度的 1.8 μm 管柱

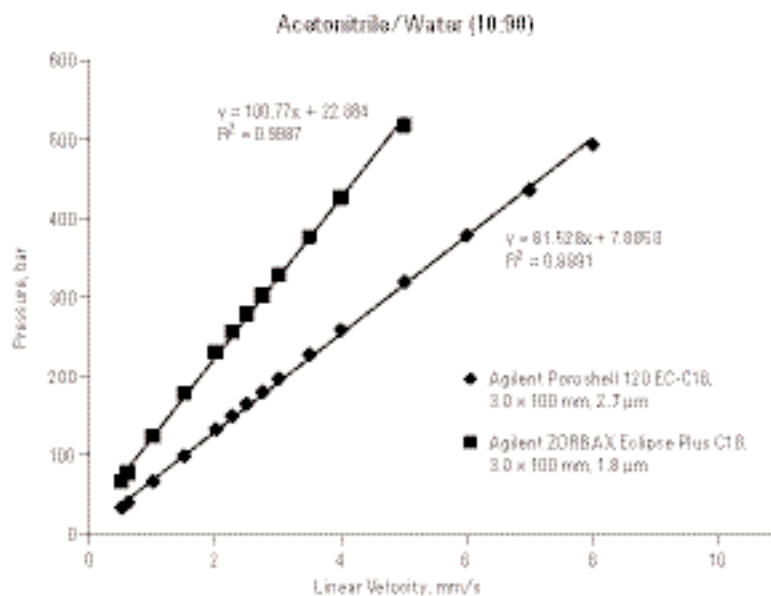


圖 6. 在不同線性速度下測量的壓力，顯示安捷倫 Poroshell 120 的作業壓力，低於類似長度的 1.8 μm 管柱

結論

本研究顯示安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 與安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱之間，在各種不同的 pH 值及移動相條件下，具備相同的選擇性。兩種管柱的化學物質，都使用類似製造材料，並具備相近的化學鍵結特性。鹼性化合物在兩種管柱內，都能達到優異的波峰形狀，不會犧牲低 pH 值的波峰形狀和其他化合物的效能。使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱的優點，是能在低背壓狀況下具有高效率。依據本研究顯示，視實際需求而使用安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱所開發的方法，可穩定移轉至安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱（反之亦然），且風險甚低。

參考資料

1. W. Long、A. Mack。〈使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱快速分析環境中酚類化合物〉(Fast Analysis of Environmental Phenols with Agilent Poroshell 120 EC-C18 Columns)。2010 年 8 月 3 日 5990-6156EN。
2. W. Long、A. Mack。〈移轉並最佳化現有分析肉類中的抗生素方法至安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，並加以改善，以分析肉類中的抗生素，再由 MS/MS 檢測〉(Transfer and Optimization of Existing Methods for Analysis of Antibiotics in Meat to Poroshell 120 EC-C18 Columns using MS/MS Detection)。2010 年 8 月 5 日 5990-6238EN。
3. A. Gratzfeld-Hüsken、E. Naegel。〈使用安捷倫 Poroshell 120 管柱提升獲得最佳效能〉(Maximizing Efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-5602EN，2010 年。
4. A. Mack、W. Long、Fast。〈使用表面多孔性表層粒子顆粒充填的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱，以快速以、低壓分析食品及飲料的添加劑〉(Low Pressure Analysis of Food and Beverage Additives using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 Columns)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6082 EN，2009 年。
5. J.J. Gilroy、J.W. Dolan、L.R. Snyder。〈逆相液相層析 IV 的管柱選擇性：B 類矽烷基管柱〉(Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography IV. Type-B alkyl-silica columns)。《層析期刊 A》(Journal of Chromatography A)，1000 (2003) 757–778。
6. N.S. Wilson、M.D. Nelson、J.W. Dolan、L.R. Snyder、P.W. Carr。〈逆相液相層析 II 的管柱選擇性。改變條件的影響〉(Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in condition)《層析期刊 A》(Journal of Chromatography A)，961 (2002) 195–215。
7. 美國藥典 (United States Pharmacopeia) 〈選擇具有相同選擇性管柱的 PQRI 法〉(The PQRI approach for selecting columns of equivalent selectivity) <http://www.usp.org/USPNF/columnsPQRIapproach.html>。
8. V. Meyer。《實用的高效能液相層析法》(Practical High Performance Liquid Chromatography)，第四版，第 34 頁，Wiley，2004 年。
9. K. Croes、A. Steffens、D. Marchand、L. Snyder。〈 $\pi-\pi$ 及偶極-偶極交互作用與逆向液相層析氰基及苯基管柱滯留的相關性〉(Relevance of $\pi-\pi$ and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography)。《層析期刊 A》(Journal of Chromatography A)，1098 卷，1-2 期，2005 年 12 月 9 日，123-130 頁。
10. W. Long、A. Mack。〈針對使用乙腈或甲醇的不同安捷倫 ZORBAX 苯基管柱比較選擇性差異〉(Comparison of Selectivity Differences Among Different Agilent ZORBAX Phenyl Columns using Acetonitrile or Methanol)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-4711EN，2009 年。
11. 安捷倫方法移轉軟體 (Agilent Method Translator)，2006 年 6 月 1 日，5989-5130EN。

www.agilent.com/chem

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2011 年

於美國印製

2011 年 2 月 9 日

5990-6588CHTW



Agilent Technologies