

摘要

自动化液相色谱方法开发： 基本原理与色谱柱、硬件和软件



William Long 博士
液相色谱柱市场部应用科学家
安捷伦科技公司

概述

高效液相色谱 (HPLC) 的方法开发是一项关键任务，但是需要从大量可能的色谱柱、流动相、仪器和操作参数中进行选择，使其成为了一个复杂而耗时的过程。此外，如果开展 HPLC 方法开发的分析人员在一开始没有制定清晰的计划，则方法开发可能会变得更加复杂。

在本文中，专家制定了清晰的 HPLC 方法开发目标，并确定了开发过程中应注意的关键要素。文中讨论了几种 HPLC 方法开发策略。最终，高效的方法开发需要在初始投资和开发方法的支出之间进行适当的平衡。对于新技术的评估，作者建议选择可扩展、灵活、向上向下兼容并具有自动化功能的仪器。



Andreas Borowiak
分析型 HPLC 产品经理
安捷伦科技公司

第一步：HPLC 方法开发

为确保 HPLC 方法开发过程顺利进行，必须考虑制定开发目标：

- 要分析的样品种类及其复杂性
- 高效分离是否必要，以及可能最适合于当前分离的色谱柱填料粒径（如亚 2 μm 、5 μm ）
- 必须达到的样品分析速度
- 实验室中任何可能的仪器限制
- 操作人员的技能水平，尤其是在方法需要技术精湛的分析人员的情况下

图 1 提供了方法性能标准的若干示例，其中许多性能标准是方法验证过程中的必需条件。为避免可能的问题，请忽略任何限定使用特定仪器平台或色谱柱的系统适用性标准。例如，指定绝对保留时间或某一精确塔板数的柱效标准可能会阻碍实验室利用未来更先进的设备和仪器技术进行后续方法优化。

策略 1:

“手动” HPLC 方法开发

一个标准的方法开发实践方案涉及到调整各种影响选择性的参数（如 pH 值、色谱柱和流动相类型），以确定最佳分离条件。在每一步完成后，技术人员都必须对结果进行分析，并确定如何进行下一步。

赞助方：



Agilent Technologies

LC|GC
north america

倾向于使用手动 HPLC 方法开发技术的人员应当首先选择采用高质量的 C18 或 C8 色谱柱（如 Agilent InfinityLab Poroshell 120）。填充小颗粒填料的更短的新型色谱柱有助于以高效率和高分离度实现更快速的分析。

其次，选择一种简单可靠且适用于广泛样品的流动相。许多化合物可电离，因此它们的保留特性和选择性受 pH 值的严重影响。因此，筛选 pH 值是确定良好分离条件的一条重要途径。首先考虑使用低 pH 值的水相组分（例如，pH 值为 3 的磷酸盐缓冲液，三氟乙酸或甲酸）并以乙腈或甲醇作为有机改性剂。然后通过优化流动相获得期望的保留特性和分离度。

满足以下条件即可认为实现了优化：峰分离度足够高 ($R_s \geq 2$)；第一个峰的保留因子 $k' = 1$ 或更高；且分析只需 20 分钟或更短时间即可完成。

选择性。 如何控制色谱分离的分离度？如图 2 所示，分离度受三个重要因素的影响：塔板数（即柱效）、选择性（即分离因子）和保留特性（即容量因子 k' ）。

可以看到，通过使用更长的色谱柱、使用填料颗粒更小的色谱柱或换用表面多孔色谱柱可增加塔板数 (N)，并提高分析效率。

还可以通过调整 k' 来改善分离度。可通过改变有机相与缓冲液流动相的比例来调整 k' ，但该方法并非最有效的方法。相反，改变选择性 (α) 是影响分离度最有效且最简便的方法；可以通过改变键合相或流动相来实现。

影响选择性的其他因素如图 3 所示。

如果可采用多种色谱柱选择（如 InfinityLab Poroshell 系列），则调整选择性将更加容易。这些表面多

孔色谱柱提供了高柱效、相对较低的反压以及长寿命。该系列产品包含各种固定相，支持快速、简便的方法开发。

InfinityLab Poroshell 系列产品的最新更新包括：可追踪色谱柱使用情况的全新色谱柱 ID 标签、可最大程度提高选择性并改善碱性化合物峰形的高 pH 值色谱柱，以及提供三种填料粒径（1.9 μm 、2.7 μm 和 4 μm ）。

最近的一项研究强调了在工艺开发过程中使用新技术的优势。研究人员发现，Poroshell 120 EC-C8 色谱柱能够在低于 400 bar 的压力下使布洛芬分析时间从 15 分钟缩短至 2.4 分钟。

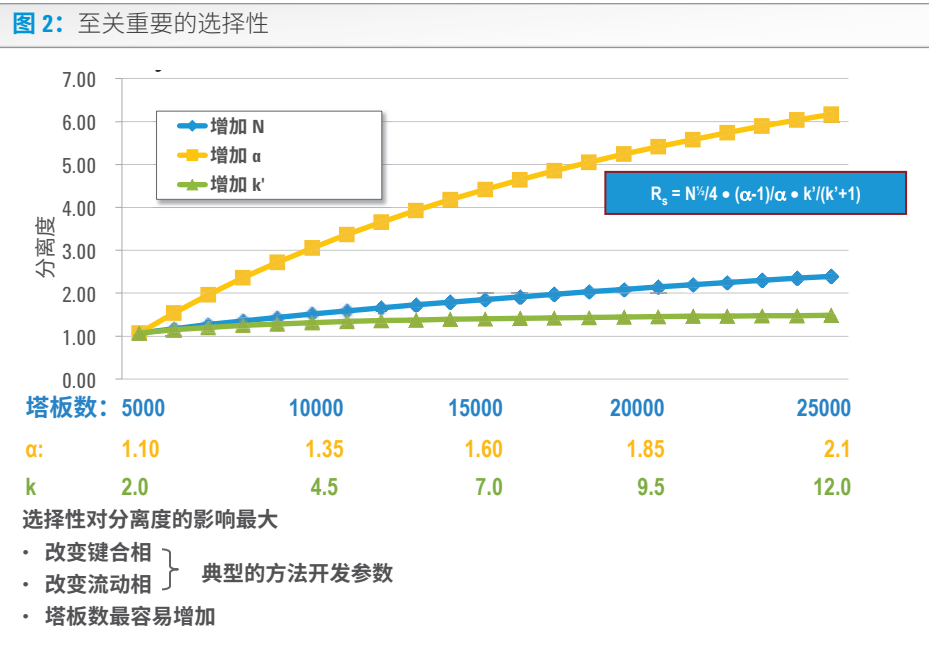
图 1：常见分离目标和方法性能标准的示例

良好的系统适用性参数	方法性能标准
<ul style="list-style-type: none">分离度：≥ 2峰形：USP Tf 接近 1 (<2)进样重现性：峰面积、Tf 等 (RSD 0.1%-0.25%)绝对保留因子：$1 < k < 10$相对保留因子：α 或 k_2/k_1信噪比：> 10	<ul style="list-style-type: none">准确度精密度耐用性稳定性分析选择性/特异性线性范围定量限 (LOQ, 10x S/N)检测限 (LOD, 3x S/N)

避免采用下列系统适用性标准：

柱效 (理论塔板数)
绝对保留时间

**这些标准可能会阻碍您后续采用新技术
缩短方法时间！**

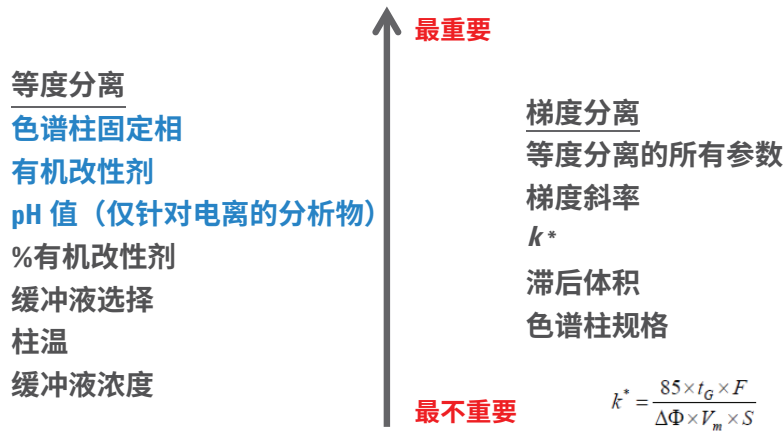


如果以实际分析方法应用为例，分析人员可以以 3.5 mL/min 的流速在约 10.5 天内完成 5000 次样品分析；而采用旧款色谱柱，相同的分析次数将需要 70 天。

筛选梯度。在选择更短的高效色谱柱后，快速启动方法开发过程的另一种方法是筛选梯度（例如，低 pH 值下 5%-95% 的乙腈梯度，根据柱长选择梯度时间）。如果整个梯度范围内均有峰流出，则方法开发人员会发现梯度方法比较理想；如果所有峰都集中于色谱图的一侧，则等度方法可能更合适。图 4 列出了若干色谱柱体积和推荐的筛选梯度时间。在本示例中，采用筛选方法进行三次以得到基本方法；较短的高

效 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱是该过程的核心，总耗时不到一小时。

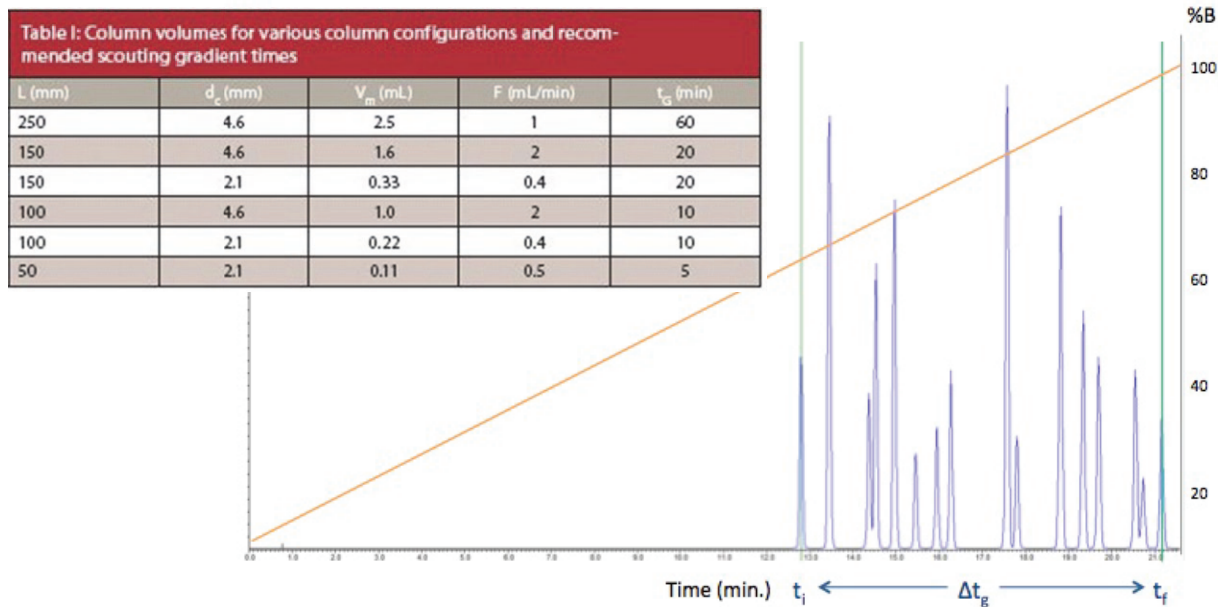
图 3：影响选择性的因素



摘自“Introduction to Modern Liquid Chromatography”, 3rd Edition, Snyder, Kirkland, Dolan, 2010, p.29, Wiley & Sons.”

图 4：起始点：筛选梯度

方法开发的一个不错的起始点是筛选梯度。John Dolan 建议的条件是低 pH 值下 5%-95% 的乙腈，梯度时间取决于柱长。如选择 100 mm 色谱柱时，使用 10 分钟梯度。该示例显示的是 150 mm 色谱柱。



改变溶剂。在 HPLC 方法开发过程中，应先优化有机改性剂，之后再优化键合相。应遵循这一顺序的理由如下：首先，大多数 HPLC 仪器能够轻松适应流动相的快速更换；用甲醇替换乙腈很简单（反之亦然），这两种溶剂都易于获取，并适用于任何键合相。例如通过简单地将乙腈换为甲醇即可使碱性化合物获得更好的峰形。

控制流动相 pH 值。还可通过控制流动相 pH 值调整峰形。进行该操作之前，分析人员必须首先考虑化合物是否可电离，从而考虑其是否对 pH 值敏感。**图 5** 展示了各种化合物的保留时间如何随 pH 值变化。

标准色谱柱可能有 pH 值限制；然而，可以采用 InfinityLab Poroshell HPH 色谱柱，该色谱柱可用于高 pH 值流动相条件，不会影响保留性能且具有优异的寿命和柱效。

更换色谱柱。如果之前的步骤没有能够对 HPLC 方法实现完全优化，则分析人员接下来可以考虑改变键合相，这有助于快速简便地提高选择性和分离度。**图 6** 展示出在使用相同梯度时，如何通过简单更换色谱柱固定相改变化合物的洗脱顺序。需注意，该谱图采集自三重四级杆质谱仪，分离分别采用了 C18、Phenyl-Hexyl 和 Bonus RP 填料极性柱。

图 5：可电离化合物的保留时间随 pH 值的变化（取决于化合物）

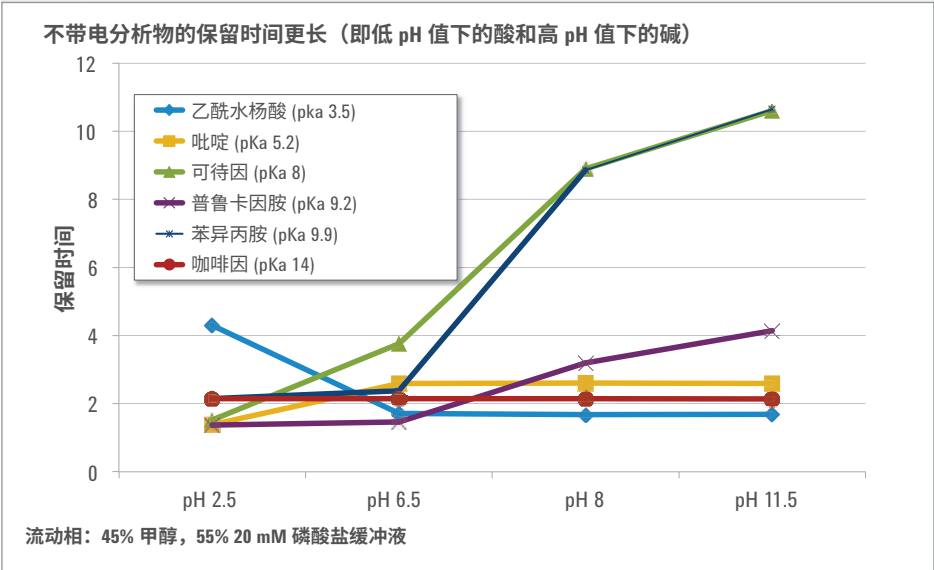
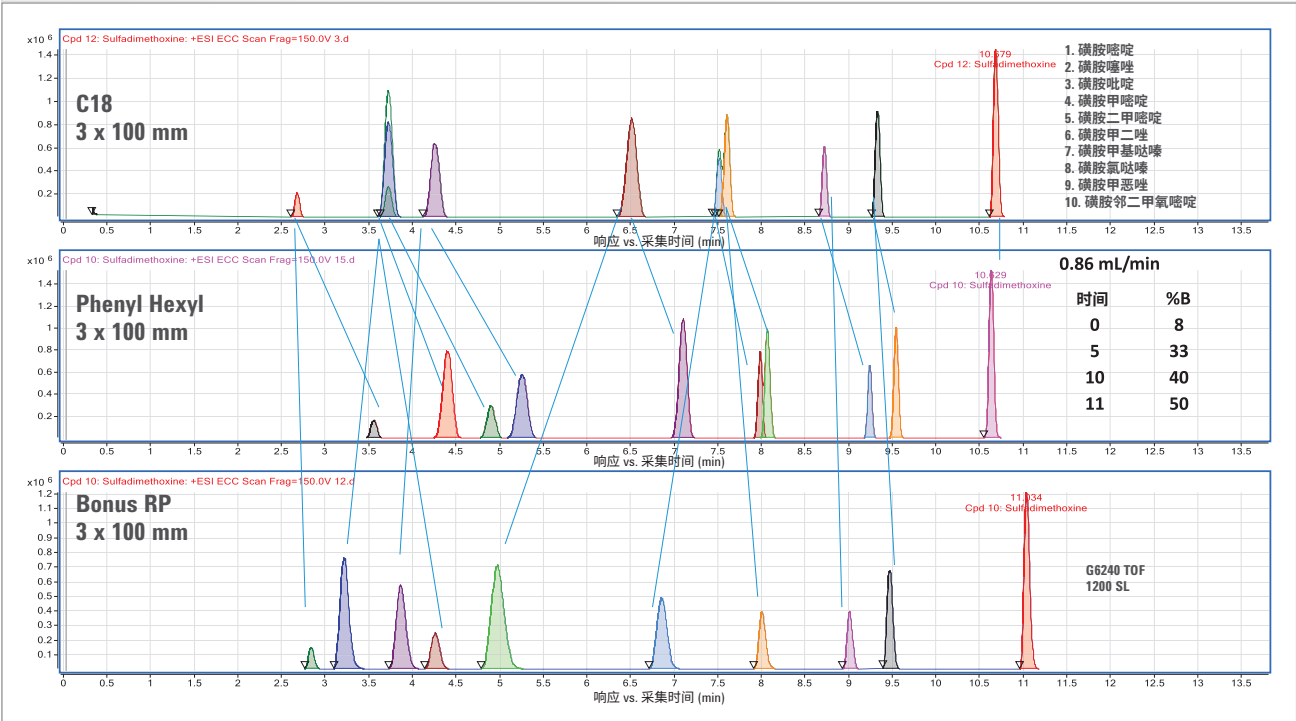


图 6：选择性：在 0.1% 甲酸条件下不同固定相上分离磺胺类药物的选择性比较



色谱柱选择对方法开发还有哪些影响？

- 研究表明，封端与未封端色谱柱的色谱柱洗脱顺序可能相差很大
- 氰基色谱柱可用于分离极性和非极性化合物的混合物
- HILIC 色谱柱非常适合分离在反相色谱柱上无法很好保留的化合物，可用于分析极性化合物（如多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素）

如下一节所述，使用自动化软件进行色谱柱筛选同样非常有帮助。一套安捷伦系统（如 1260 Infinity II 方法开发系统）能够自动化筛选多达 100 种不同的色谱柱条件、15 种流动相或或四种不同的色谱柱，而另一型号的系统（1290 Infinity II 方法开发系统）能够自动化筛选更多的条件和色谱柱。

策略 2:

自动化 HPLC 方法开发

HPLC 方法开发的另一种选择是使用专用的方法开发软件以预测可能的最佳分离条件。用于自动化方法开发的工作流程解决方案在改善方法开发效率方面具有许多优势，例如：

- 缩短仪器闲置时间
- 减少对液相色谱系统的手动干预
- 缩短手动数据分析所需的时间，以投入更多时间完成其他任务
- 更出色的系统性能
- 高性价比

自动化色谱柱切换。如上所述，尝试不同的色谱柱是优化分离条件的一个重要方面。利用自动色谱柱切换阀筛选固定相，使该任务更快速、更简便。例如，Agilent 1290 Infinity II 柱温箱和色谱柱选择阀使方法开发人员能够测试各种固定相并轻松评估各种色谱柱选择性。

每个 1290 Infinity II 柱温箱最多可容纳八根色谱柱。可以在系统中加入四个柱温箱，在无需手动系统干预的情况下即可实现对总共 32 根色谱柱进行测试。

Agilent 1290 Infinity II 柱温箱具有两个独立的加热区，对温度进行筛选时，可用于预加热下一根色谱柱，从而缩短平衡时间。

色谱柱 ID 标签。如果工艺开发人员不清楚色谱柱的使用历史，则可能难以对结果进行解释（例如，较差的结果能否归因于色谱柱断裂或老化？）。因此，对色谱柱使用情况记录不足可能导致假阴性结果。了解色谱柱已执行的进样次数以及色谱柱过去经历过的 pH 值和温度条件至关重要。

其中一种解决方案是色谱柱 ID 标签，Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱可提供这种标签。这些标签保存有关色谱柱的重要信息，诸如执行的进样次数、第一次/最后一次进样的日期、pH 值和温度稳定性信息、完整的产品描述（包括序列号和批次号）等。如果为色谱柱选择了可能损坏色谱柱的不兼容方法，附带软件还将向用户发出警报。

自动化溶剂选择。当开发人员想要通过筛选流动相溶剂优化分离方法时，自动化操作提供了超高效率。在手动方法中，重新灌注溶剂管管线以及用新流动相溶剂重新平衡系统可能需要花费大量的时间。而采用安捷伦溶剂选择阀技术使用户能够从多达 12 种不同流动相中进行选择（例如缓冲液、有机溶剂或各种改性剂）；也可增加额外的溶剂选择阀。

方法开发软件。可采用两种主要的软件方法实现自动化方法开发。第一种方法采用方法预测软件，这种软件能够使用算法通过迭代循环预测和测试分离条件。安捷伦硬件（如 1260 Infinity II 和 1290 Infinity II）与第三方软件的组合可用于完成该类型方法预测。以下示例的第三方软件均以质量源于设计 (QbD) 原则作为方法学基础，符合这一要求：

- **ChromSwordAuto** 是一种具有四个模块的智能色谱数据系统，分别用于：方法筛选（如快速查找最有前景的固定相和流动相组合）；等度及梯度方法优化和针对后期项目的精细优化；通过不同实验设计的自动创建、性能和分析开发稳定的质量控制方法及方法转移；以及数据浏览分析和报告生成（见**图 7**）
- **Fusion QbD** 是一种适用于各种色谱类型（包括反相色谱、正相色谱、手性色谱、HILIC、离子交换色谱、体积排阻色谱和 SFC）的模块化信息学平台。各模块可用于：智能化液相色谱方法开发，可最大程度缩短运行时间并最大程度提高一致性；分析方法验证，具备全面的 CDS 自动化特性，包括验证分析方法所需的一整套实验利用；针对制剂和工艺优化的产品开发以及非液相色谱方法开发（例如 GC、CD、溶出度分析和 MS 检测优化）；呼吸系统药物开发；以及 QC 测试（见**图 8**）。实验设置简单，并符合仪器配置要求，但是在需要的情况下也可超出仪器的功能范围。软件自动生成完整实验，并支持研究相关变量，然后在色谱数据软件中重建该实验

- ACD/AutoChrom** 软件旨在解决分析人员在开发稳定性指示方法时所面临的挑战，这些方法需要药品、工艺杂质、降解物和赋形剂之间实现基线分离（见图 9）。该软件使用以 QbD 策略为中心的五步过程，其中包括仪器控制（例如与 Agilent ChemStation、Agilent OpenLAB ChemStation 等软件兼容）；使用扣除溶剂背景的紫外光谱和 LC/MS 解卷积以及分子离子的鉴定结果自动进行数据处理和峰追踪；先进的处理界面，可用于审核和调整处理和峰追踪结果（如有必要）；概览界面设计，允许同时比较各种数据（色谱数据及相关的光谱、结构和文本信息）以便更快速地制定更明智的决策；用于方法优化和稳定方法设计的色谱模拟；以及生成高质量结果或将数据上传至可搜索、可共享知识库的能力。用户可编辑 QbD 策略并在任意阶段设置关键质量属性

图 7: ChromSword：支持产品开发早期和后期的方法开发策略

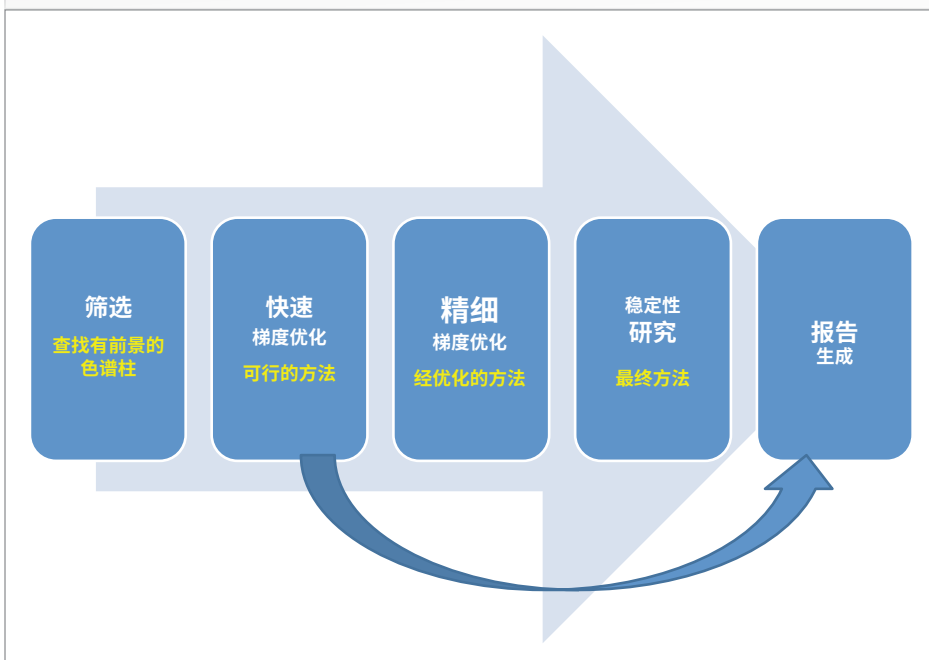
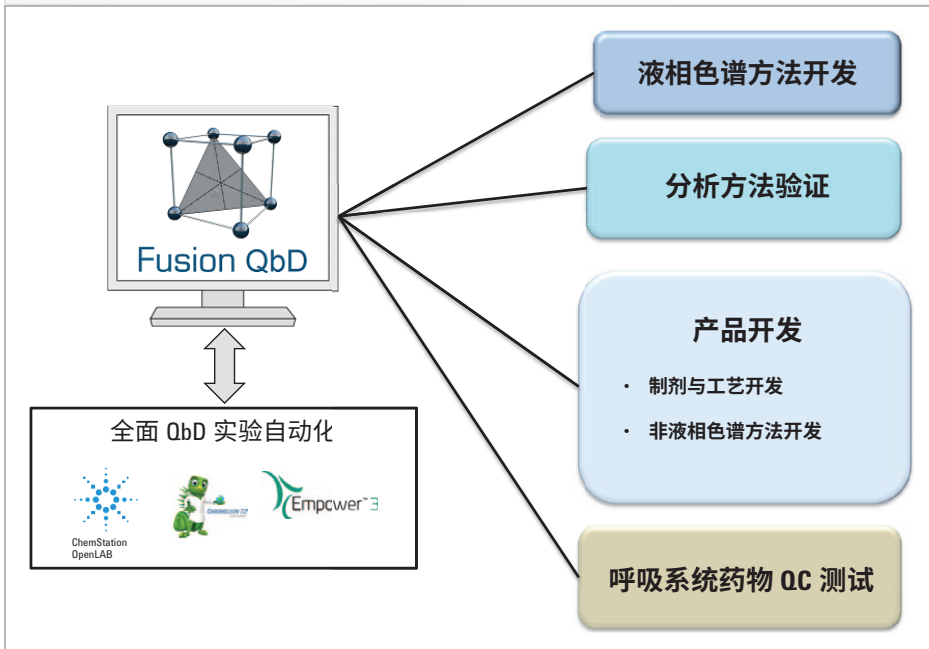


图 8: Fusion QbD：模块化软件平台



方法筛选软件。实现自动化方法开发的另一种方法是方法筛选。例如，分析人员可使用 Agilent 1260 Infinity II 和 1290 Infinity II 仪器与安捷伦方法筛选向导软件，以简单的自动化方式设置非常复杂的筛选方案。在 10 个步骤中，经验丰富的开发人员或新开发人员均可设计工作流程，甚至是手性分离等高级工作流程。

用户可定义整个筛选过程；从预加载的下拉菜单中选择色谱柱和溶剂；定义二元、三元或四元梯度和温度；审核和选择筛选方法；并且定义进样量和重复次数。如果设置不兼容，系统将自动向用户发出警报。

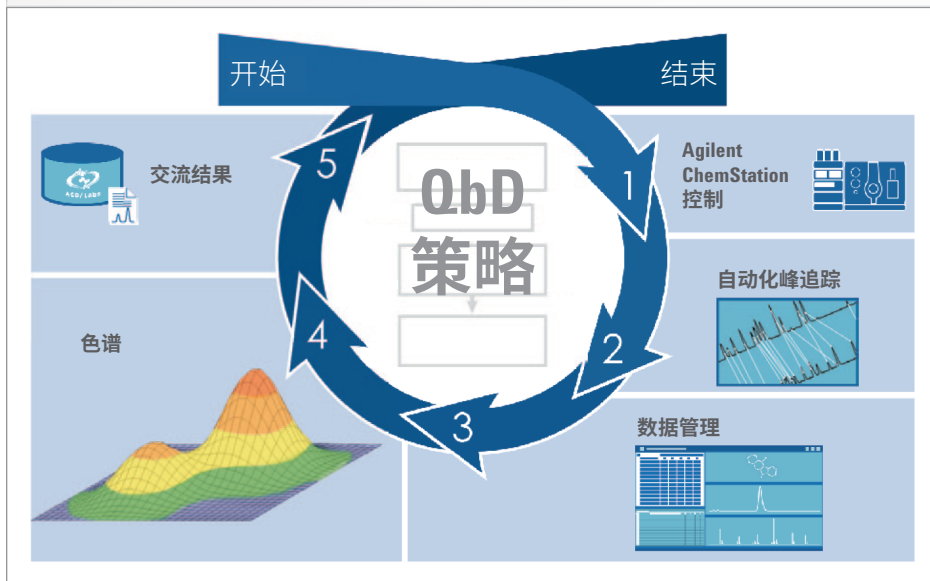
一旦筛选运行完成并在筛选条件下采集了数据，OpenLAB ChemStation (CDS) 数据分析和报告功能即可帮助用户快速高效地处理筛选数据。通过查看气泡图中的数据并根据不同的质量标准（如峰的数目、最小/最大分离度和最大对称性）筛选结果，查找最合适的结果。

简化的方法转移

简化方法转移的一个因素是色谱柱选择。Poroshell 系列色谱柱采用各种填料粒径（1.9 μm 、2.7 μm 和 4 μm ）的设计，可实现扩展性和更简单的转移。例如，在 2.7 μm Poroshell 色谱柱上开发的方法可轻松转移至 4 μm 或 1.9 μm Poroshell 色谱柱。

为减少方法转移至其他目标系统后保留行为发生的意外变化，可采用智能系统模拟技术 (ISET) 作为 1290 Infinity II 方法开发系统的组成部分。

图 9：ACD/AutoChrom：改善复杂色谱分析性能的五步策略



ISET 使您能够利用实时目标系统模拟直接开发方法。借助 ISET，方法开发系统将模拟其他目标仪器的特性，并最大程度减少变异。

总结

可通过多种方式提高 HPLC 方法开发的效率，如适当的色谱柱选择、计划周密系统化离线方法，或使用适合自动化方法开发的硬件和软件。最终，高效的方法开发需要在初始投资和开发方法的支出之间进行适当的平衡。在新技术的评估中，应通过选择可扩展、灵活、向上向下兼容现有液相色谱系统且可实现最高程度自动化的仪器和系统保护您的投资。