

高效液相色谱 方法开发

使用新的色谱柱加快
方法开发速度



常见的方法开发途径

1. 按照“方法开发指南”按步操作—基于选择性改变参数— 比如: **pH值**, 色谱柱, 流动相等
2. 使用方法开发软件— 运行几个预设方法最后选用结果最好的一个方法
3. 在多种色谱柱及多种流动相下测试并比较结果, 最后选用最好的一个方法

很多人采用途径1进行方法开发。

常见的方法开发从哪里开始？

1. 选择C18键合相 – 种类很多，不同的键合特点
 - a) 一根短的色谱柱可以减少方法开发时间
 - b) 较小的色谱柱填料粒径可以在短时间内提高所需的分离度
 - c) **Eclipse Plus C18色谱柱可以改进分离结果– 更好的柱效和峰形**
2. 选择简单的流动相 – 可靠，并适用多种样品
 - a) 水相：磷酸缓冲液 pH 3, 三氟乙酸, 或甲酸
 - b) 有机相：乙腈或甲醇
3. 调速流动相得到更理想的保留和**分离度**
 - a) 所有的峰有适当的分离度($R_s \geq 2.0$) – 相应较高的柱效
 - b) 第一个峰的保留值最好至少等于1
 - c) 分离时间在20分钟内 – 更短
 - d) **更新的色谱柱选择，小粒径更短的色谱柱可以在短时间内提高分离度及柱效，加快方法开发速度**

分离度公式

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k}{(k+1)}$$

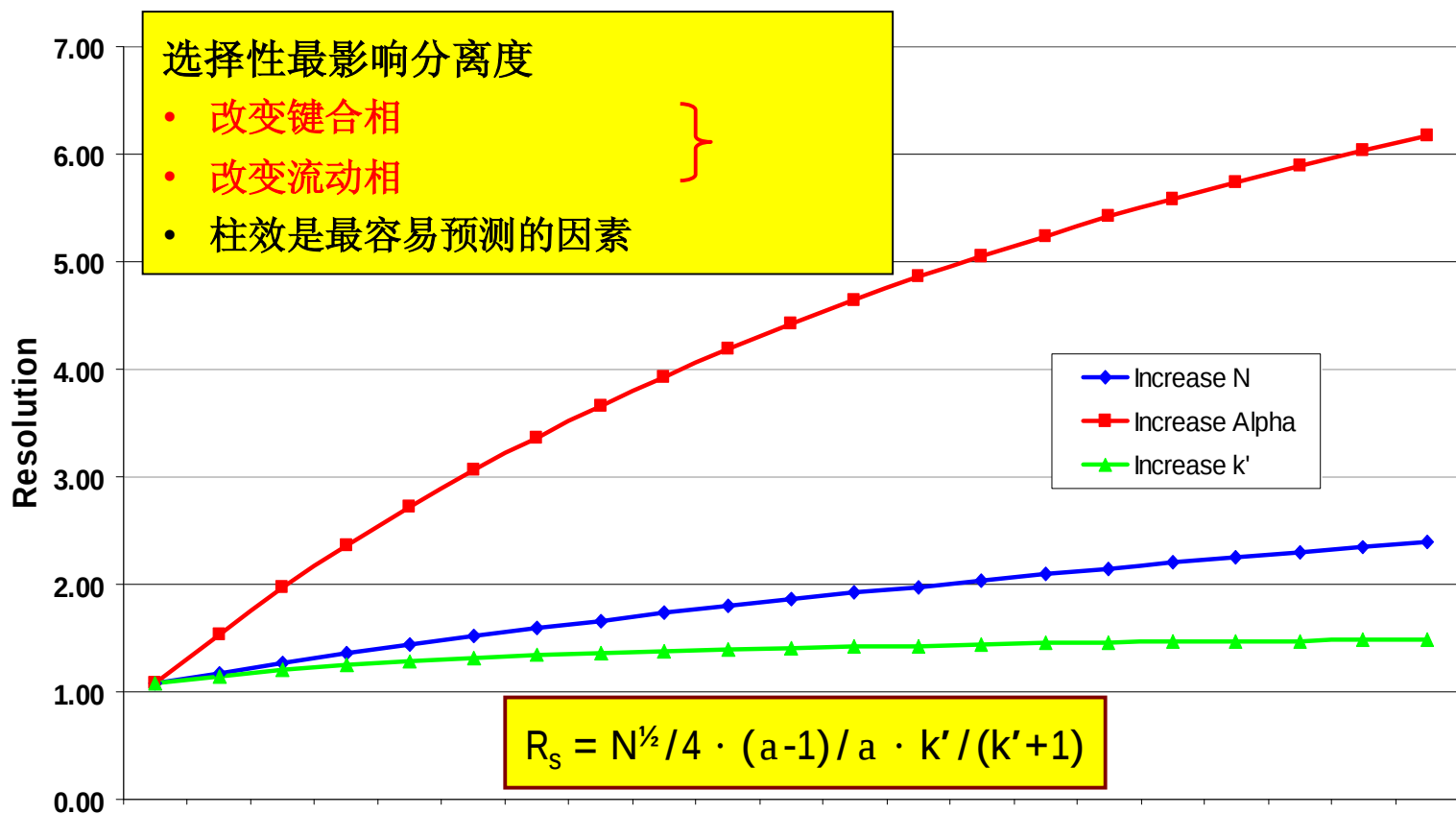
α 选择性—受流动相和固定相的影响

N 柱效 — 受柱长和颗粒度的影响

k 保留因子 (保留) — 受固定相和流动相，梯度斜率和延迟体积(梯度)的影响

常见的方法开发参数

– 选择性，柱效，保留值对分离度的影响



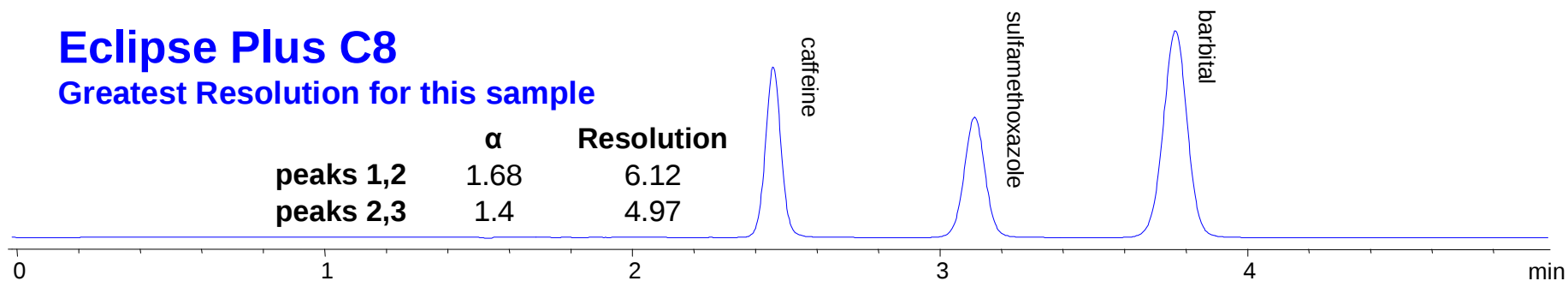
Plates:	5000	10000	15000	20000	25000
Alpha:	1.10	1.35	1.60	1.85	2.1
k':	2.0	4.5	7.0	9.5	12.0

选择性

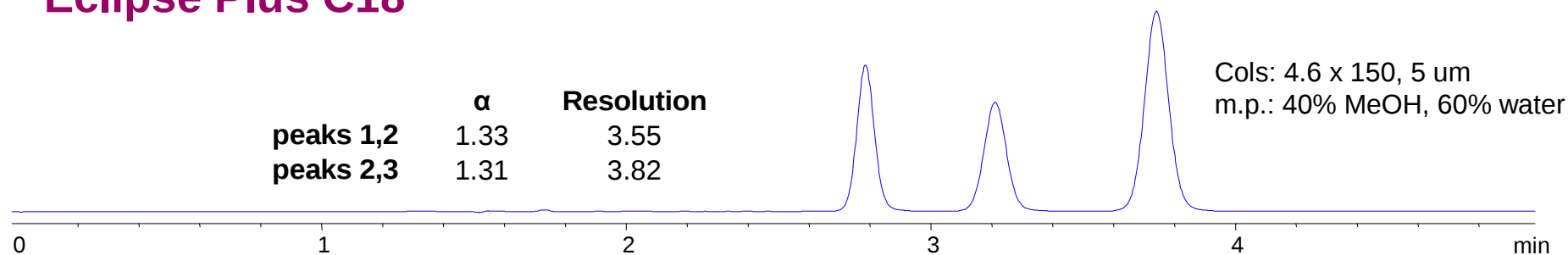
——选择性 α 细微的差异可以使得分离度上有较大的不同

Eclipse Plus C8

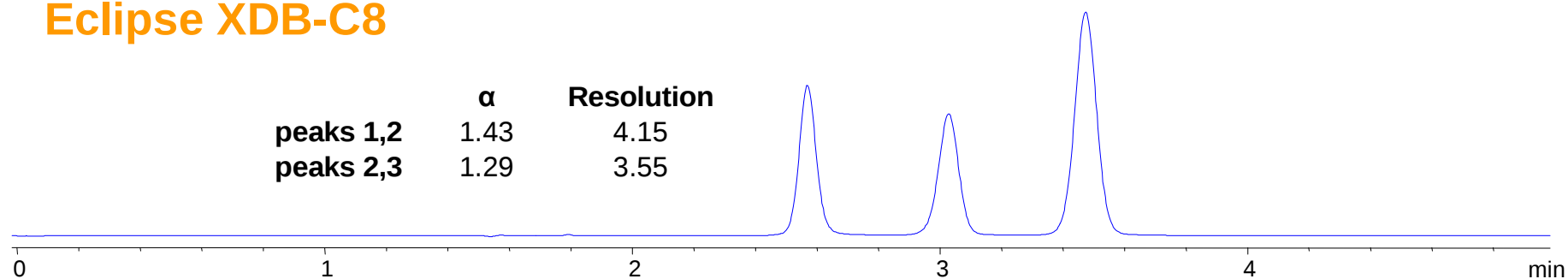
Greatest Resolution for this sample



Eclipse Plus C18



Eclipse XDB-C8



在最开始时如何制定方法开发方案?

使用两个重要参数改变选择性以提高分离度
– 流动相和键合相

流动相 (改变的第一选择, 因为最易行)

- 流动相 – 有机相 (乙腈, 甲醇等)
- 流动相 – pH – 在一个更宽的pH范围 – 有时会是pH 1-12

键合相 (提供多种最优化方法的可能)

- 很多种选择 C18 – C8, Phenyl, CN等
- AQ 柱可以用于高水相的流动相体系
- 选择新的色谱柱得到更好的峰形

好的液相色谱柱所应具备的性能

好的峰形

- 尤其对于碱性化合物,
- 可以不加额外的流动相添加剂
- 减小拖尾因子以提高分离度和定量准确性

高的柱效

- 1.8 μ m, 3.5 μ m和5 μ m, 不同的颗粒粒径可以满足任何分离的柱效要求
- 柱效N – 采用柱效进一步优化分离度

好的选择性

- C18是最受欢迎的键合相, 且适用于大部分化合物的分离
- C8 是在C18之后的受欢迎的键合相

在较宽的流动相范围内均可使用

- 简化方法开发
- 适于更多的应用

出色的重现性 – 不同批次的色谱柱都有很好的重现性

好的使用寿命 – 至少能分析 1000 个样品

采用新的色谱柱进行方法开发

1. 小颗粒的更短的色谱柱

- 1.8 μ m粒径的高分离度快速液相色谱柱 (RRHT) – 采用50mm或更短的柱长可以用于快速的方法开发
- 较长的色谱柱可以提高柱效
- 11种键合相可供选择

2. 改进的键合相可以提供更好的结果

- 更好的峰形和柱效可以提高分离度
- 对于建立好的方法至关重要
- 新的Eclipse Plus 色谱柱可以提供更好的峰形

一根色谱柱可以满足很多分离要求吗？

是！

新的 **ZORBAX Eclipse Plus** 色谱柱可以做到！

- 与其它厂商相比，有更好的结果！



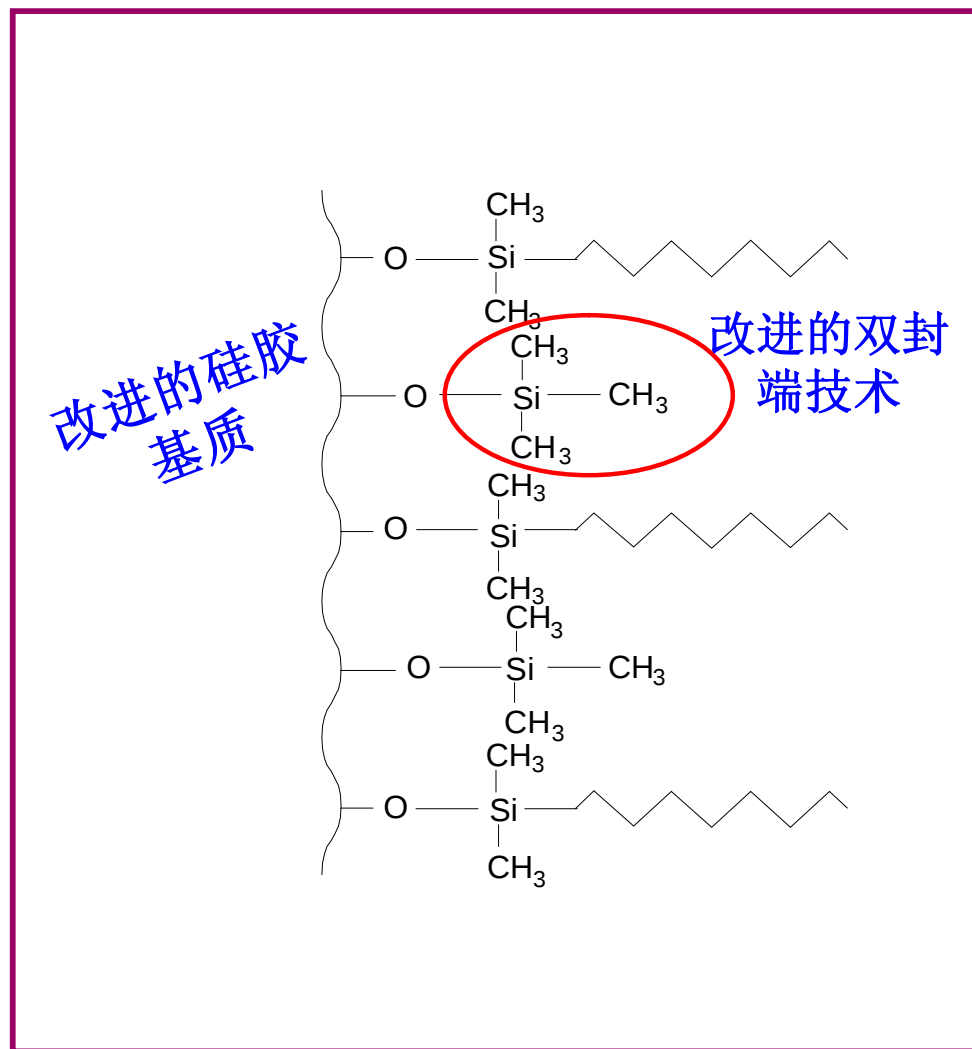
ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱

ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱:

- Ø 使用ZORBAX 硅胶— 采用更好的专利技术处理硅胶
- Ø 采用改进的键合试剂及键合过程
- Ø 更加严格的质控标准，批与批之间更加好的重现性



更好的峰形



改进所带来的好处:

更好的峰形

- 对于大部分的碱性化合物
- 对于大部分的流动相 – 无需额外的添加剂
- 与其它色谱柱相比

对于除了碱性化合物之外的样品同样也有更好的峰形和更好的柱效

- 酸碱混合物
- 中性化合物

Eclipse Plus C18 – 分离碱性化合物时没有拖尾 – 标准测试混合样品1

1. 吡啶 (碱)

2. 酚(酸)

流动相: 60/40 水/乙腈

Eclipse Plus C18

Ace 5 C18

SunFire C18

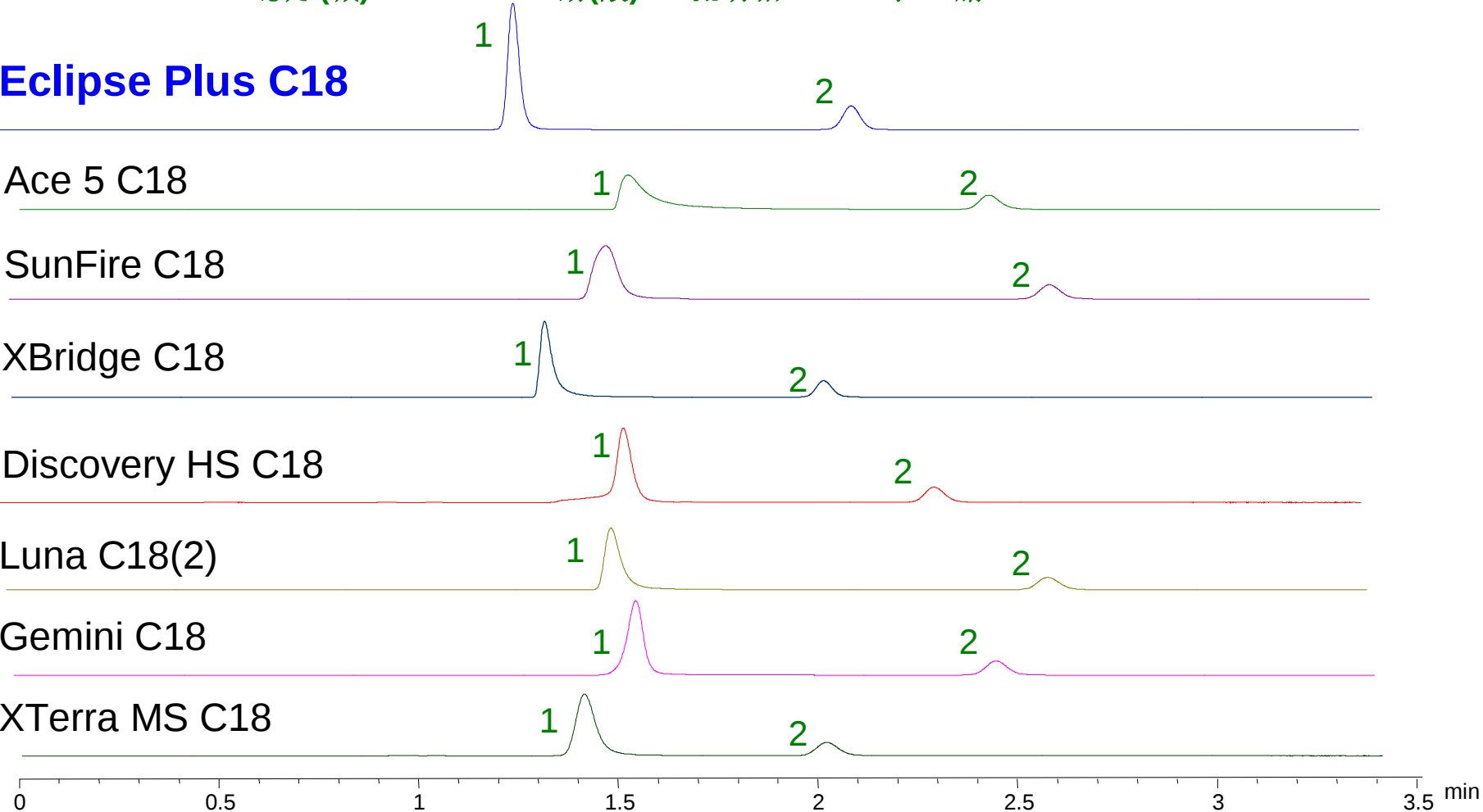
XBridge C18

Discovery HS C18

Luna C18(2)

Gemini C18

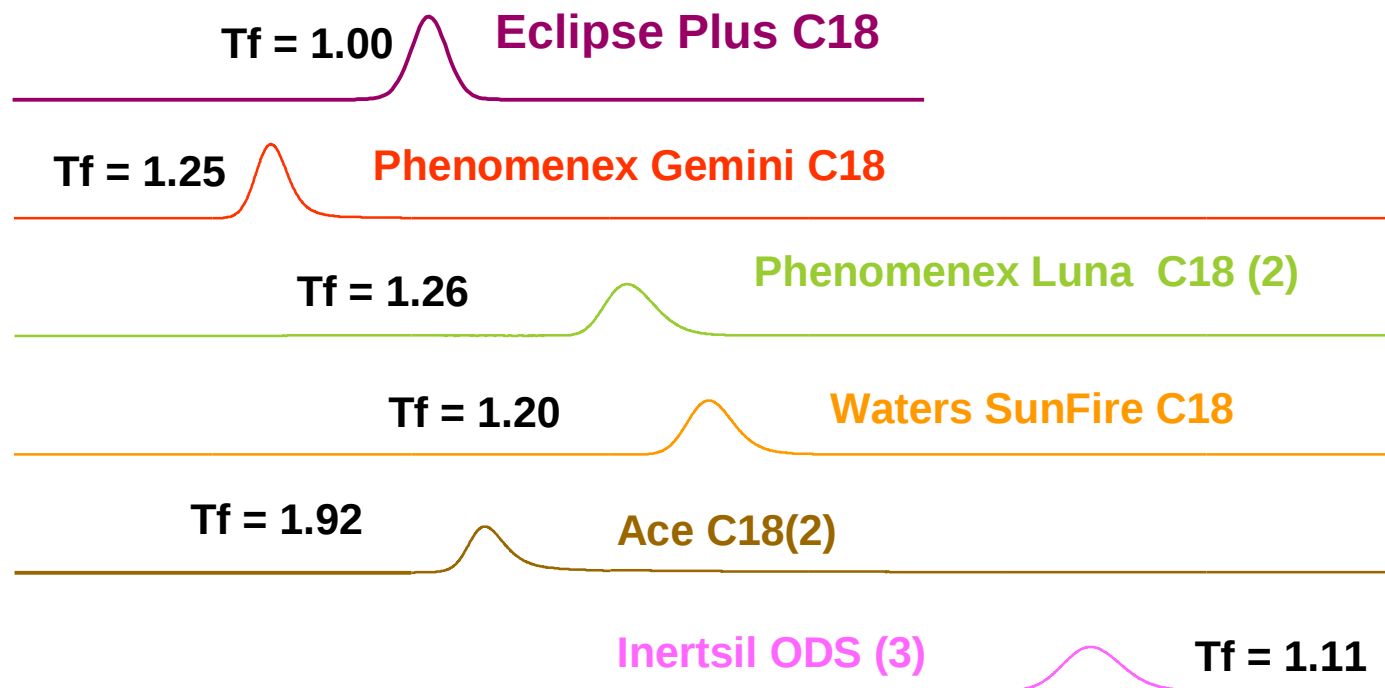
XTerra MS C18



ZORBAX Eclipse Plus

在甲醇和磷酸盐流动相中分离阿米替林峰形最好

Amitriptyline ~ 0.1 μ g 80% Methanol 8mM total Potassium Phosphate Buffer pH 7.0,
Detection: UV 215 nm, Flow Rate: 1.0 mL/min Columns: 4.6x100mm 5 μ columns

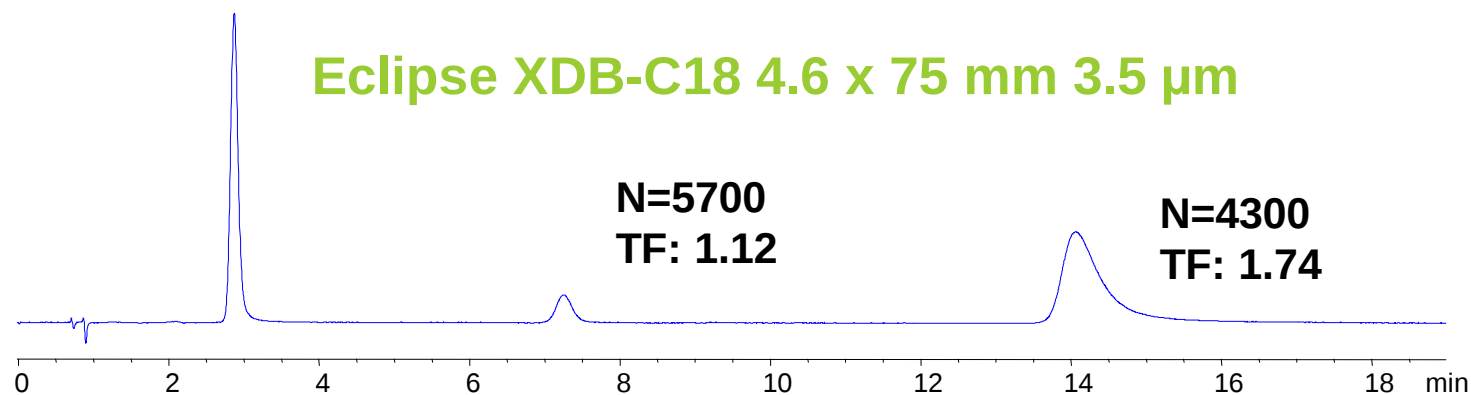
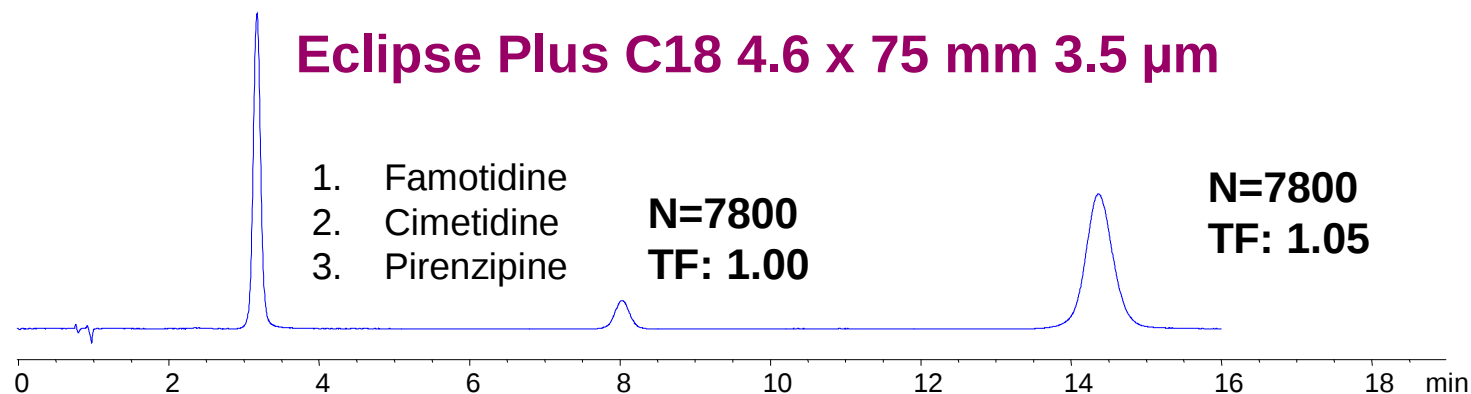


Peak Shape is normally better in Methanol mobile phases.
Eclipse Plus is superior under these conditions.

Eclipse Plus

在中等pH范围没有三乙胺添加剂下也可以提供更好峰形

Conditions: Columns: As listed Mobile Phase.: 20% MeOH, 80% 20 mM phosphate pH 7.0 Flow Rate =1 mL/min.
Detection: UV 254 semi micro flow cell

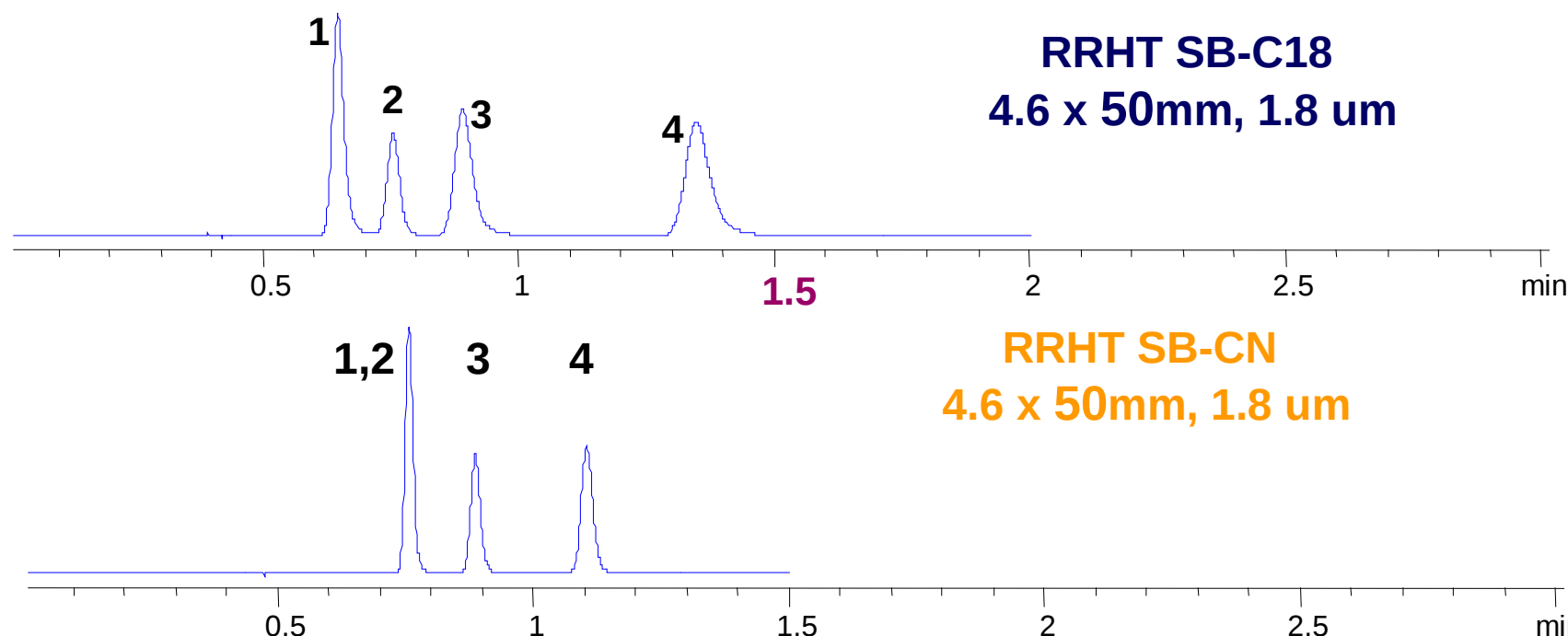


**High efficiency with a 3.5 μ m particle is easily achieved with Eclipse Plus
No mobile phase modifiers are needed for perfect performance!**

1. 采用RRHT进行快速方法开发:

采用短的RRHT C18色谱柱在短时间内得到更高柱效

Column: 4.6 x 50mm, 1.8um Mobile Phase: A= 0.1% Formic Acid, B=ACN + 0.1%Formic Acid (95:5) Flow rate: 1.5 mL/min Inj. Vol: 2 ul Sample: Xanthines: 1. 1-methylxanthine, 2. 1,3-dimethyluric acid, 3. 3,7-dimethylxanthine, 4. 1,7-dimethylxanthine

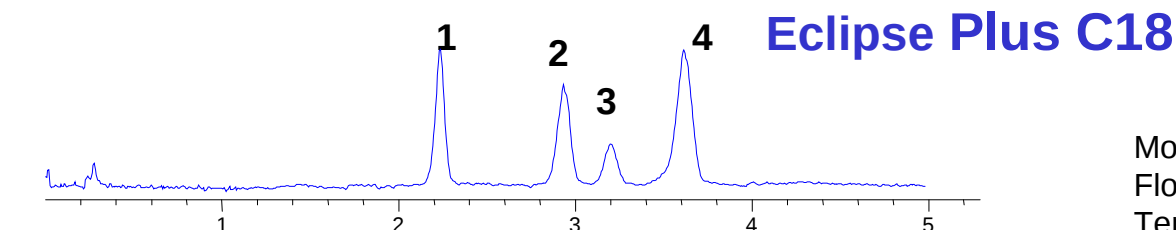


ØThe C18 gives the most effective resolution – and with a 4.6 x 50mm, 1.8um column the initial results are achieved in just a couple of minutes, with the highest efficiency.

ØThe 50mm length is short and fast – methods can be approximated or completed in just minutes!!

1. 采用RRHT进行快速方法开发:

不同的 ZORBAX RRHT C18键合相所具有的不同选择性



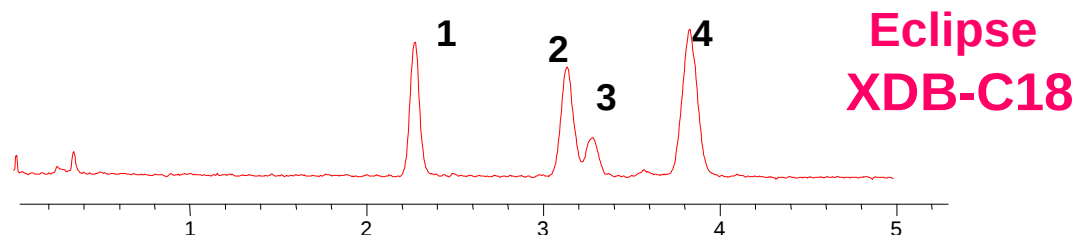
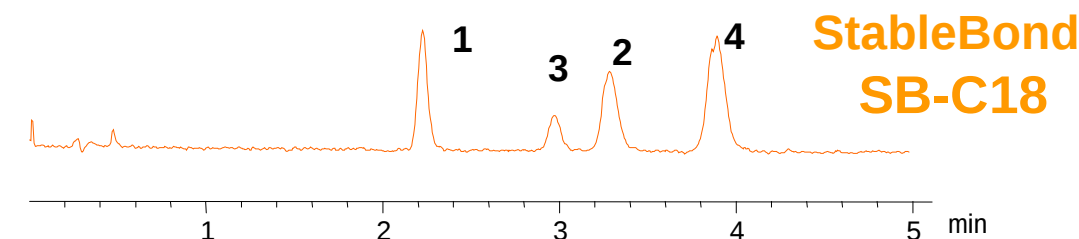
Mobile phase: (69:31) ACN: water
Flow 1.5 mL/min.

Temp: 30 ° C

Detector: Single Quad ESI
positive mode scan

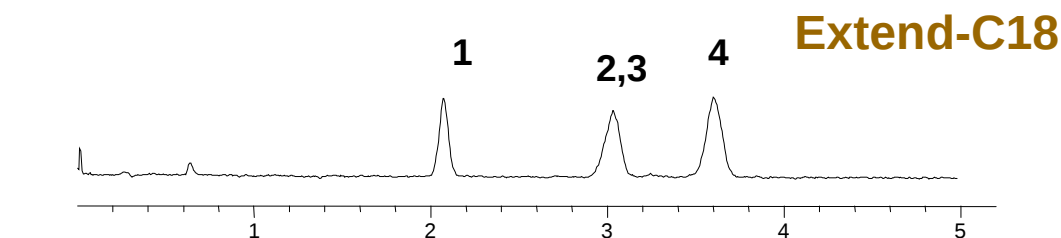
Columns: RRHT

4.6 x 50 mm 1.8 um



Sample:

1. anandamide (AEA)
2. Palmitoylethanolamide (PEA)
3. 2-arachinoylglycerol (2-AG)
4. Oleoylethanolamide (OEA)



不同的键合相具有不同的选择性，根据所分析的样品选择适合的键合相。

方法开发的起始步骤



Ø 选择一根性能优越的 C18或 C8键合相作为方法开发的起始，这个键合相应对于酸性、碱性及中性化合物都可以提供好的峰形和保留。

Ø 优化流动相中有机相的组成以改变其选择性。

Ø 如果必需的话，选择不同的键合相来完成方法的优化。

Ø 当pH在1-2时，选择 **SB-C18**

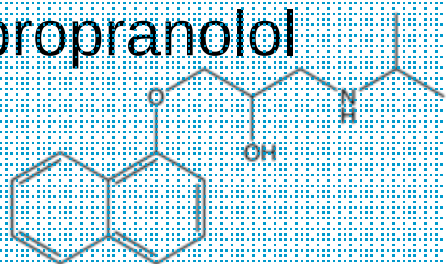
如果使用新的RRHT色谱柱，这些步骤可以很快地完成，使得寻找最佳方法变得更为容易。

为什么在方法优化中，建议您在改变键合相前应先尝试改变有机流动相？

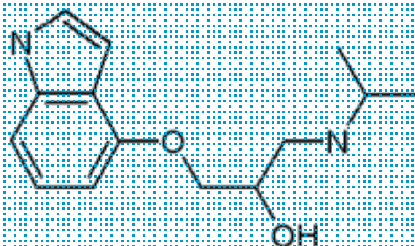
- Ø 易操作 – 乙腈和甲醇都是实验室常备溶剂。
- Ø 对于任何键合相，都会起一定的作用。

以下化合物的方法开发

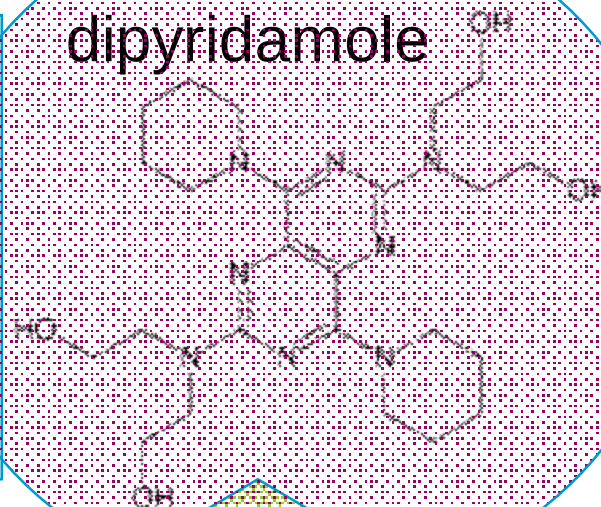
propranolol



pindolol



dipyridamole



β -阻滞剂

(β -blocker)

抗心律不齐药物

(Anti-arrhythmic)

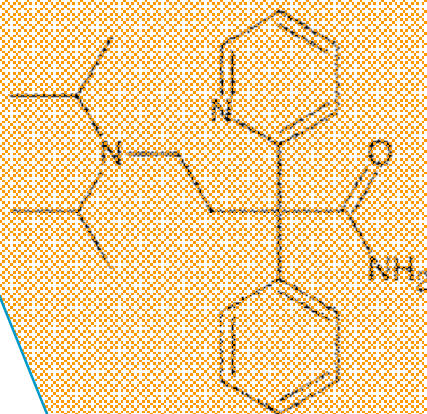
血管扩张药物

(Vasodilator)

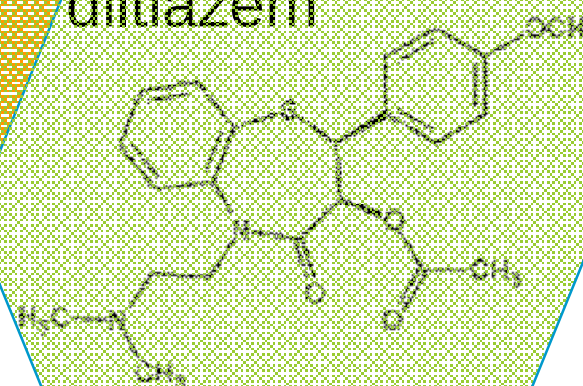
钙通道阻滞剂

(Ca²⁺ channel blocker)

disopyramide



diltiazem



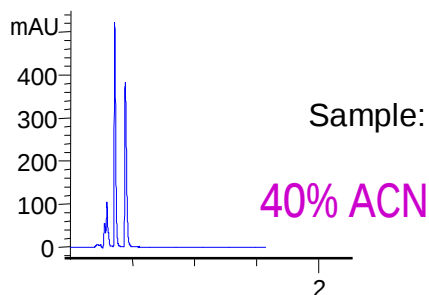
从低pH值开始，调速有机相比例 采用Eclipse Plus C18在乙腈流动相中分析几种强心剂

Column: ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 mm

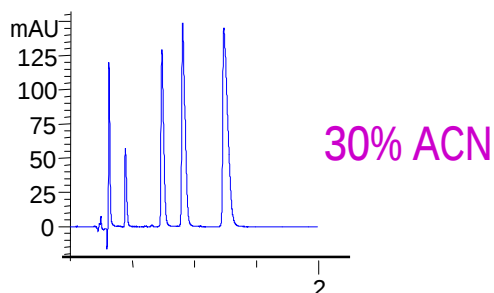
Mobile Phase: A: 25 mM NaH₂PO₄, pH 3.0 B: ACN

Flow Rate: 2.0 mL/min Temperature: 30° C Detection: UV 240 nm

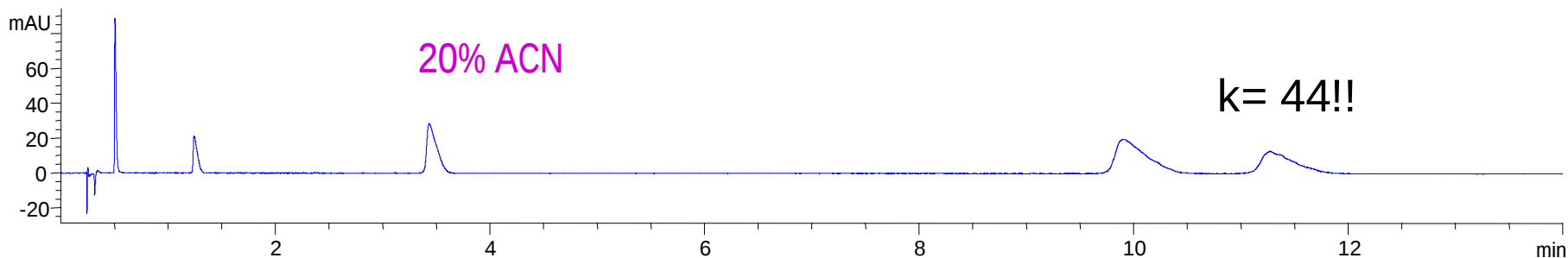
Sample: Cardiac Drugs 1. Pindolol 2. Diisopyridamide 3. Propranolol 4. Dipyridamole 5. Diltiazem



RRHT Eclipse Plus C18 可以在低有机相比例中快速优化方法。



Ø好的分离度
Ø快速分离
Ø节省时间



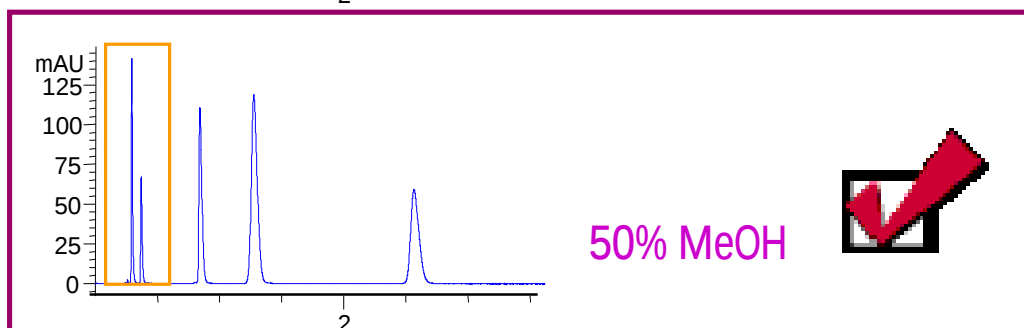
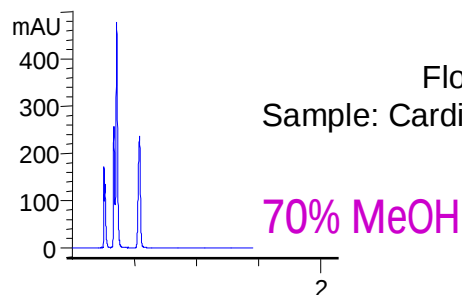
从低pH值开始，调速有机相比比例 采用Eclipse Plus C18在甲醇流动相中分析几种强心剂

Column: ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 mm

Mobile Phase: A: 25 mM NaH₂PO₄, pH 3.0 B: MeOH

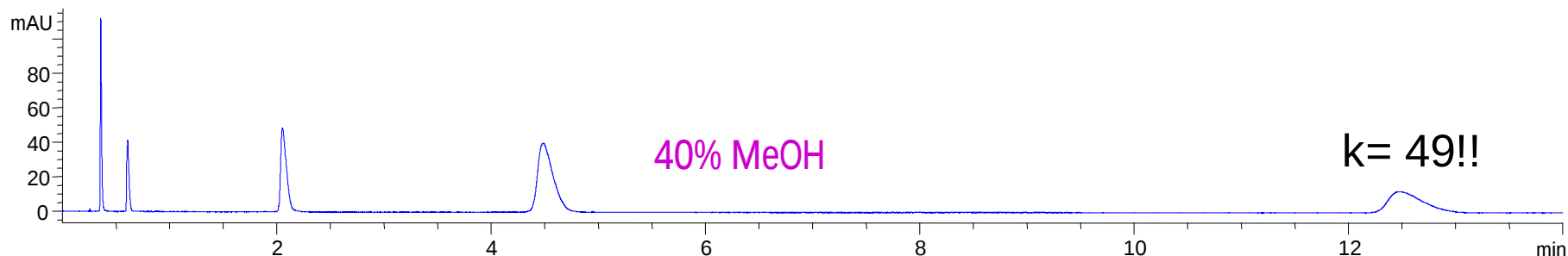
Flow Rate: 2.0 mL/min Temperature: 30° C Detection: UV 240 nm

Sample: Cardiac Drugs 1. Pindolol 2. Diisopyridamide 3. Propranolol 4. Diltiazem 5. Dipyridamole



Ø采用RRHT色谱柱可以快速地看出不同有机溶剂的影响

Ø甲醇改变选择性，但分析时间更长



方法开发 – 改变有机相种类

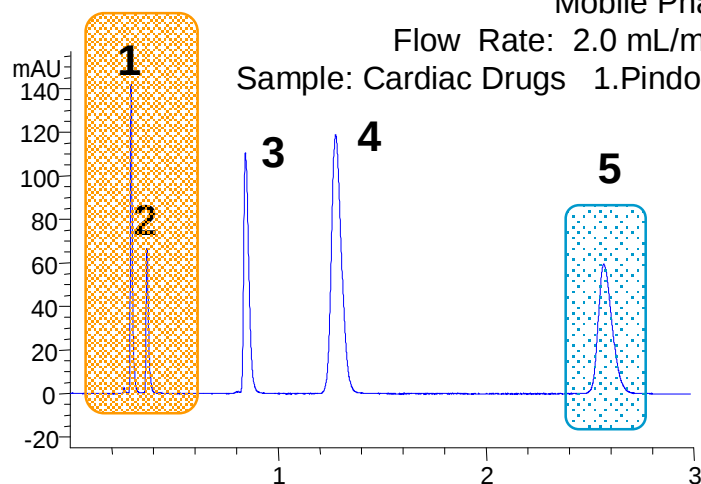
乙腈和甲醇的比较

Column: ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 mm

Mobile Phase: A: 25 mM NaH₂PO₄, pH 3.0 B: organic

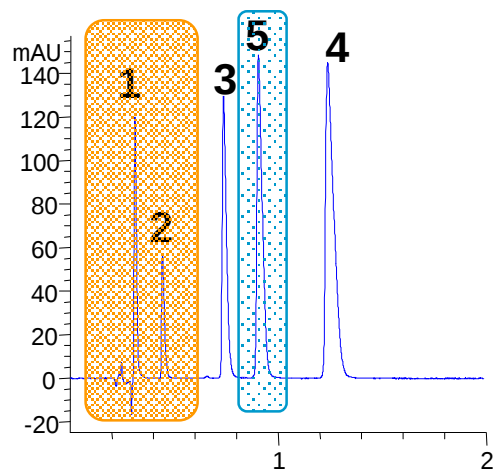
Flow Rate: 2.0 mL/min Temperature: 30° C Detection: UV 240 nm

Sample: Cardiac Drugs 1.Pindolol 2. Disopyridamide 3.Propranolol 4.Diltiazem 5. Dipyridamole



50% MeOH

Resolution of pairs
(2,3), (3,4), (4,5)
is better in MeOH.
Peak 5 selectivity shift

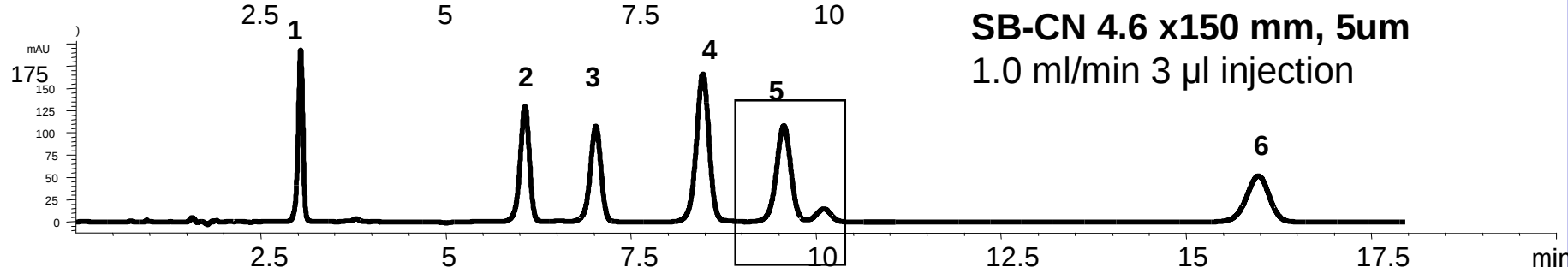
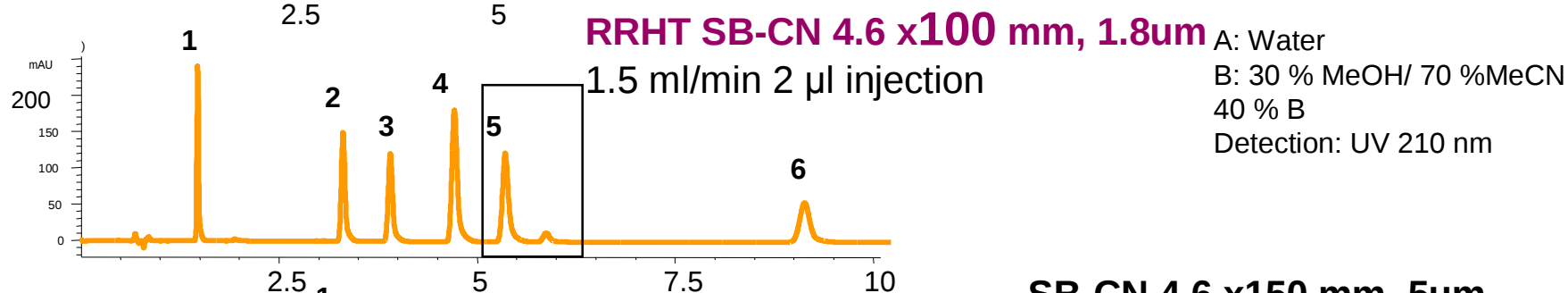
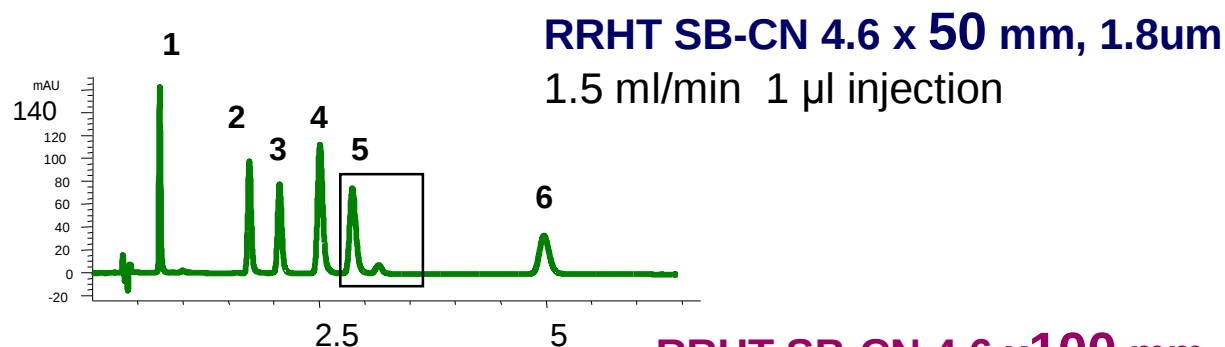


30% ACN

Resolution of critical pair
(1,2), is better in ACN

使用不同色谱柱规格的最佳条件比较

— 长度, 粒径, 分离度



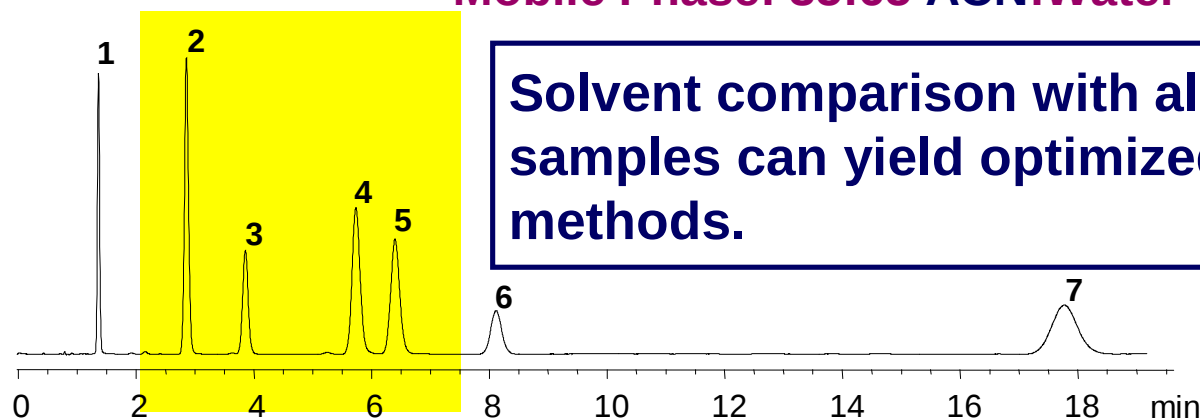
RRHT Columns allow rapid resolution optimization during initial method development. Column lengths compared quickly.

改变有机相-乙腈vs. 甲醇

采用ZORBAX Eclipse XDB-CN 分离雌激素

Column: ZORBAX Eclipse XDB-CN Column Dimensions: 4.6 x 150 mm, 5 μ m Mobile Phase: As shown
Flow Rate: 2.0 ml/min Injection Volume: 2.00 μ l Column Temperature: 25 $^{\circ}$ C Detector: UV, 210 nm

Mobile Phase: 35:65 ACN:Water

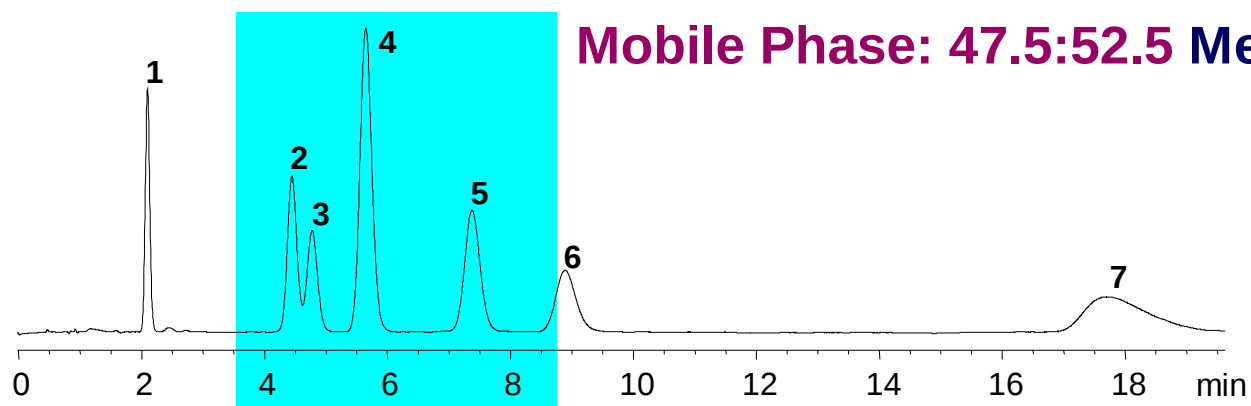


Solvent comparison with all samples can yield optimized methods.

Sample:

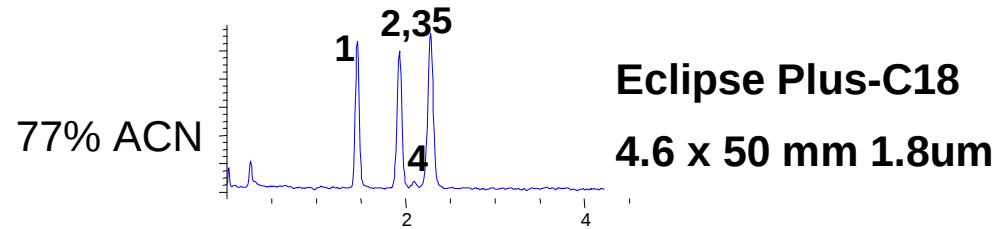
1. Estriol (0.00130 μ g/ μ l),
2. β -Estradiol (0.00130 μ g/ μ l),
3. Ethinyl Estradiol (0.00147 μ g/ μ l),
4. Dienestrol (0.00123 μ g/ μ l),
5. Diethylstilbestrol (0.00128 μ g/ μ l)
6. Ethynylestradiol 3-methyl ether (0.00103 μ g/ μ l)
7. Ethynodiol Diacetate (0.00139 μ g/ μ l)

Mobile Phase: 47.5:52.5 MeOH:Water

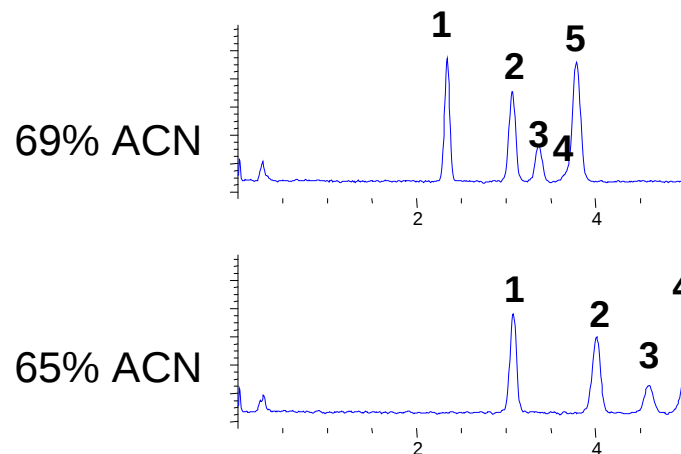


RRHT 色谱柱可以快速找出最佳有机相的选择

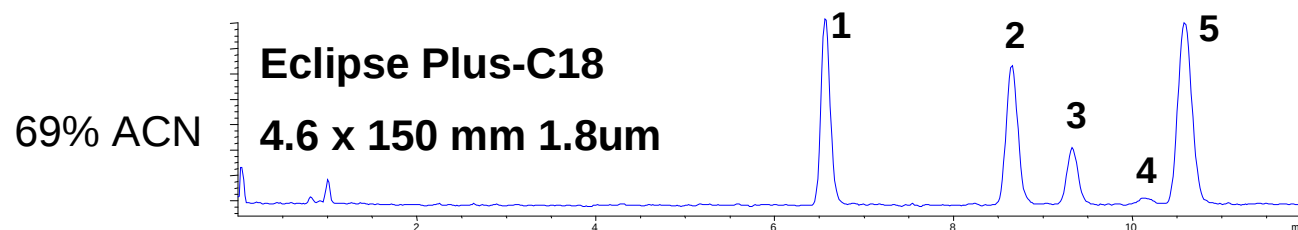
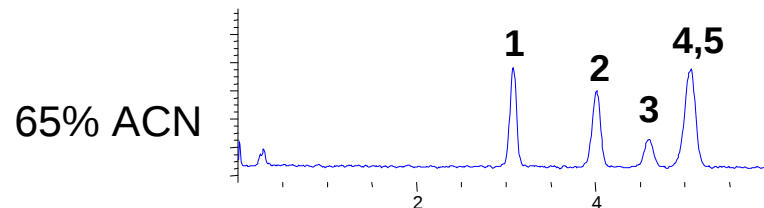
—— 更长的色谱柱提供更好的分离度



Endocannabinoids dissolved in methanol (1 mg/mL) and diluted 1:100 in water. Mobile Phase is 69% acetonitrile at 1.5 mL/min., 30° C. MS is ESI, positive mode, total ion scan.



1. Anandamide (AEA)
2. Palmitoylethanolamide (PEA)
3. 2-Arachinoylglycerol (2-AG)
4. 1(3)-Arachidonylglycerol
5. Oleoylethanolamide (OEA)



为什么改变键合相是有效的？

Ø 不同键合相对于极性 & 非极性化合物的作用是不同的。

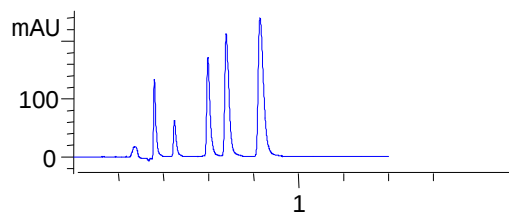
Ø 改变键合相有时可以提高选择性/分离度,减小分离时间。

采用**RRHT**进行键合相的选择可以提高工作效率!!

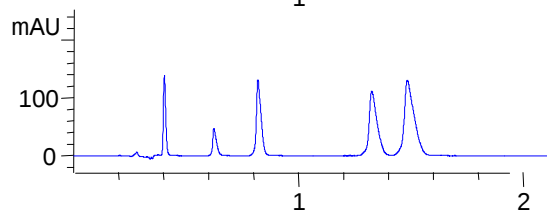
Ø 前提是，必须有多种**RRHT**键合相可供选择！

不同键合相表现出不同的选择性

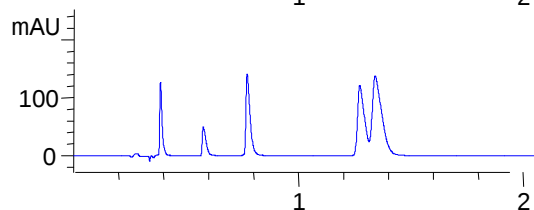
——流动相为30% ACN



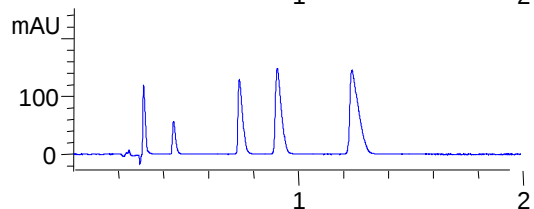
RRHT SB-CN
4.6 x 50 mm, 1.8 mm



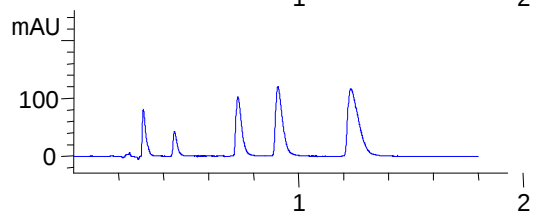
RRHT SB-Phenyl
4.6 x 50 mm, 1.8 mm



RRHT SB-AQ
4.6 x 50 mm, 1.8 mm



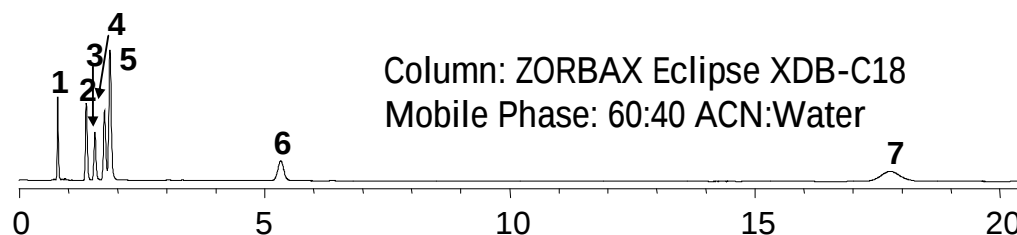
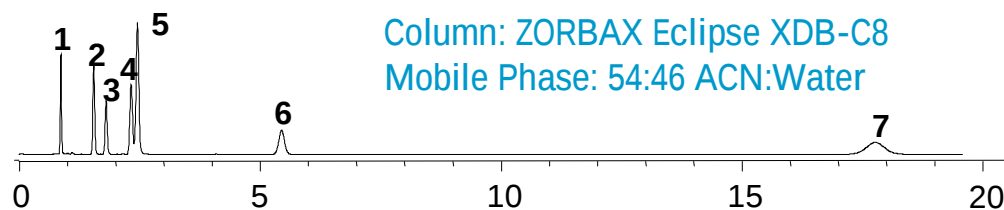
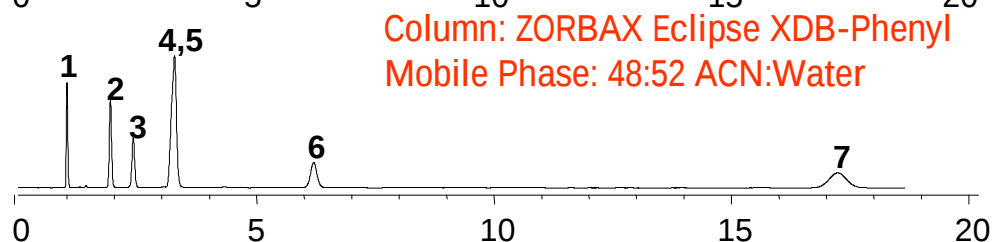
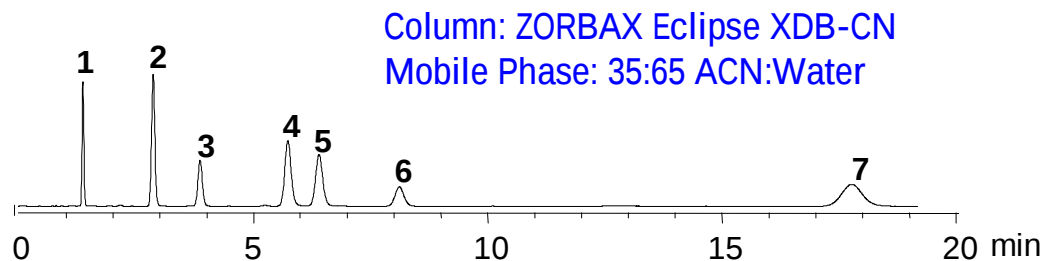
RRHT Eclipse Plus C18
4.6 x 50 mm, 1.8 mm



RRHT SB-C18
4.6 x 50 mm, 1.8 mm

- Ø 5 种不同的键合相比较
- Ø 每一个运行时间只需2分钟
- Ø 在最佳有机相比例下比较
- Ø 更多的键合相可以优化!

极性键合相在分离类固醇时与非极性键合相C18/C8的选择性比较



Column Dimensions: 4.6 x 150 mm, 5 μ m
Flow Rate: 2.000 ml/min
Injection Volume: 2.00 μ l
Column Temperature: 25 ° C
Detector: UV, 210 nm

Sample:

1. Estriol (0.00130 μ g/ μ l),
2. β -Estradiol (0.00130 μ g/ μ l),
3. Ethinyl Estradiol (0.00147 μ g/ μ l),
4. Dienestrol (0.00123 μ g/ μ l),
5. Diethylstilbestrol (0.00128 μ g/ μ l)
6. Ethynylestradiol 3-methyl ether (0.00103 μ g/ μ l)
7. Ethynodiol Diacetate (0.00139 μ g/ μ l)

Ø Eclipse XDB-CN is the optimum bonded phase – the only one that can resolve all the components in under 20 minutes.

为什么pH在方法开发中对选择性很重要？

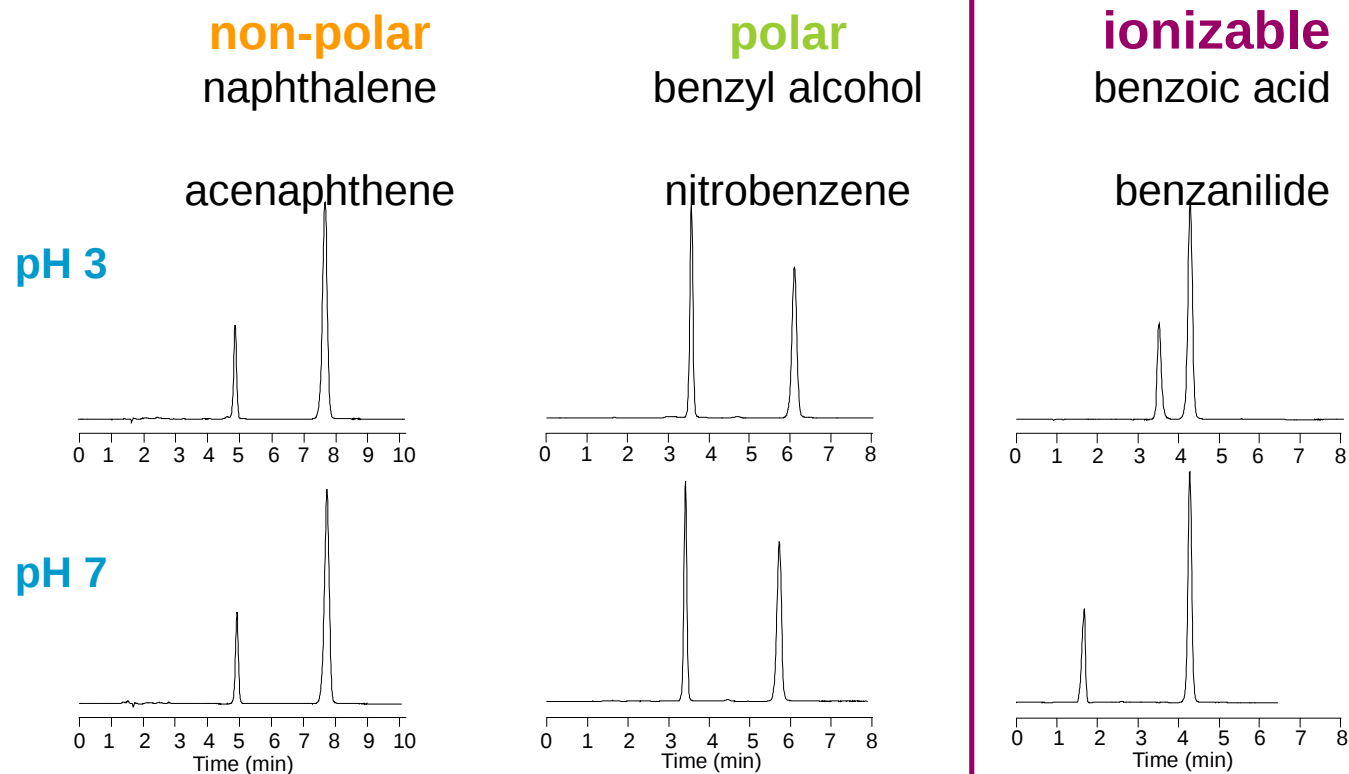
Ø为什么化合物对流动相的pH值敏感？

Ø流动相的pH值如何影响保留和分离度？

Ø流动相的pH值如何影响方法开发？

Ø流动相的pH值如何影响色谱柱选择？

pH 什么时候影响分离度？ 化合物类型比较



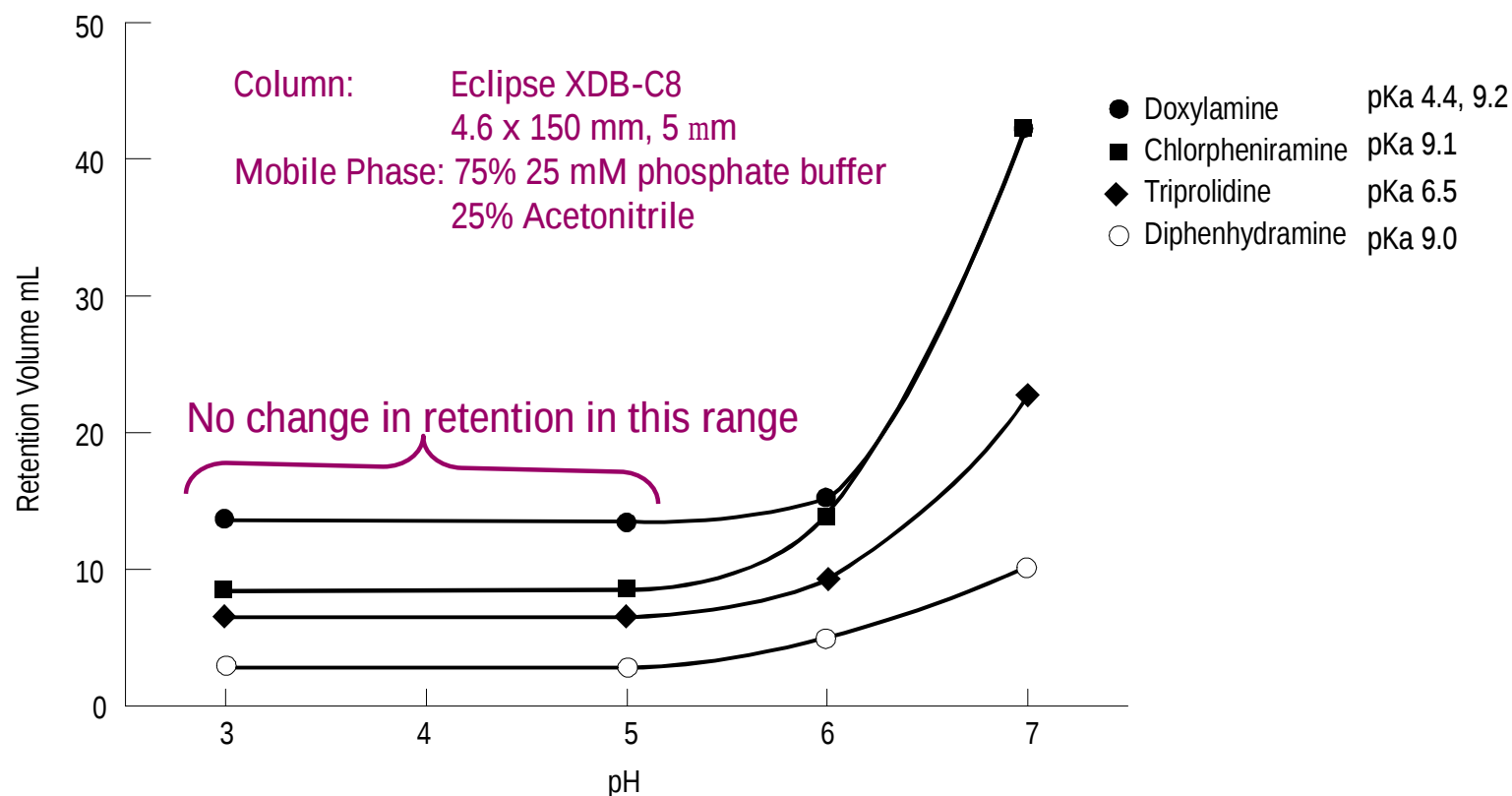
- Ionizable compounds – acids and bases can change retention and selectivity most with changes in pH

分析离子化的化合物时 改变pH值对于方法开发至关重要

- Ø 不带电的化合物有较好的保留 (比如酸性化合物在低pH值，碱性化合物在高pH)
- Ø 硅胶上的硅羟基在中等pH值时离子化增加对碱性化合物的保留(可以存在离子交换的作用)
- Ø 在方法开发中选择流动相的pH值优化保留及选择性
- Ø Eclipse Plus可以用在宽的pH值范围
- Ø 高pH时可以选择Extend C18



碱性化合物抗阻胺剂的保留 vs. pH值 - 在低pH值下变化较少



- Slight changes in pH may dramatically change retention and selectivity
- Always evaluate retention changes with pH during method development

方法开发步骤 – 在中等pH值下

从低pH值到中等pH值



Ø在等pH可能可以提供更好的选择性

Ø可能与你的样品更兼容

Ø在中等pH下方法优化步骤与低pH下相同

ØEclipse Plus 在中等pH值下性能优越

Ø如果需要改变选择性可以考虑其它键合相

Eclipse Plus 色谱柱是在中低pH值下进行方法开发的理想选择

Ø适用于 pH 2-9的流动相

Ø适合于中低pH值下的方法开发

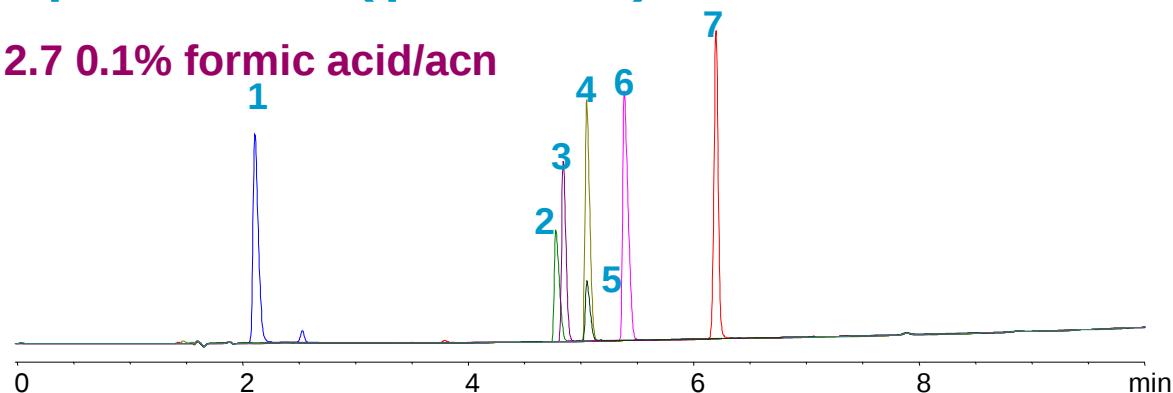
Ø使得对pH较敏感的分离得到优化

Eclipse Plus提供极好的峰形和柱效



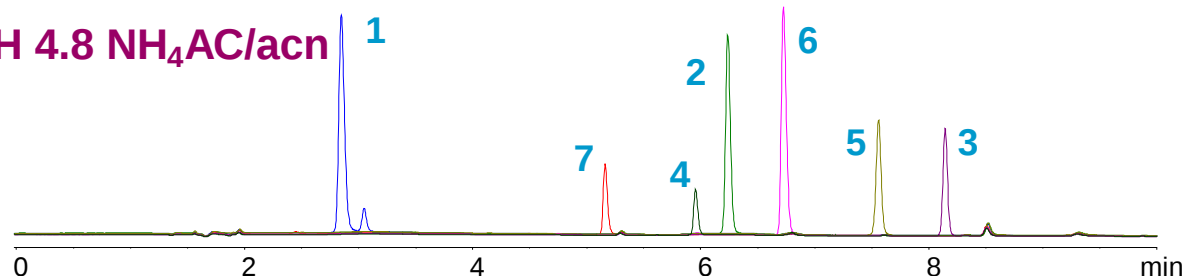
Eclipse Plus 可以在 宽的pH范围 (pH2-9) 下优化选择性

pH 2.7 0.1% formic acid/acn



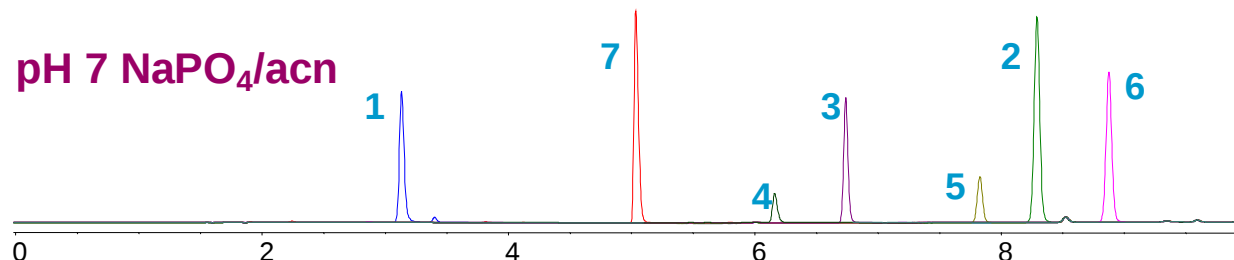
1. procainamide
2. buspirone
3. pioglitazone
4. eletriptan
5. dipyridamole
6. diltiazem,
7. furosemide

pH 4.8 NH₄AC/acn



Ø Selectivity and resolution can change with pH

pH 7 NaPO₄/acn

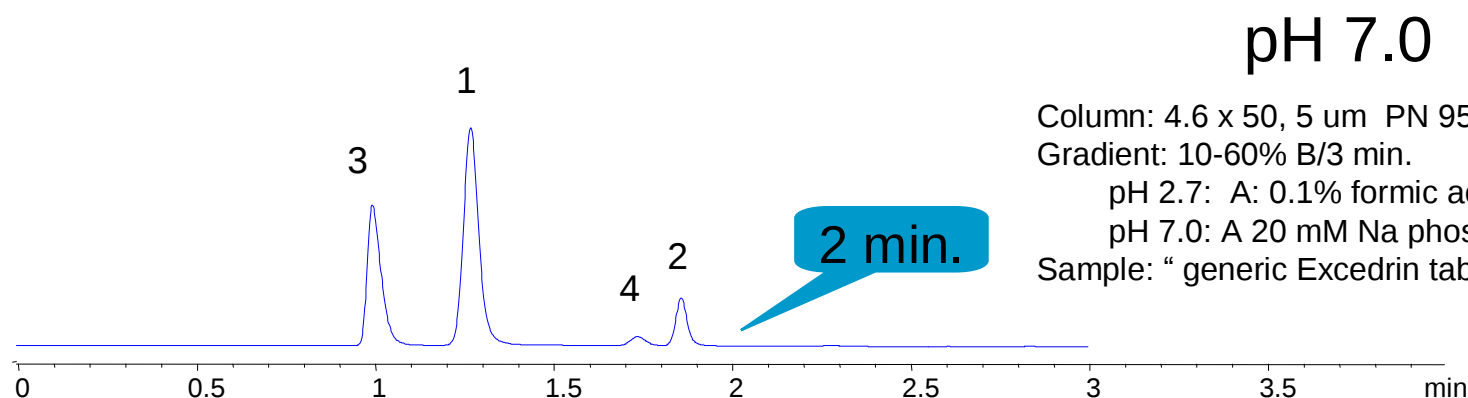
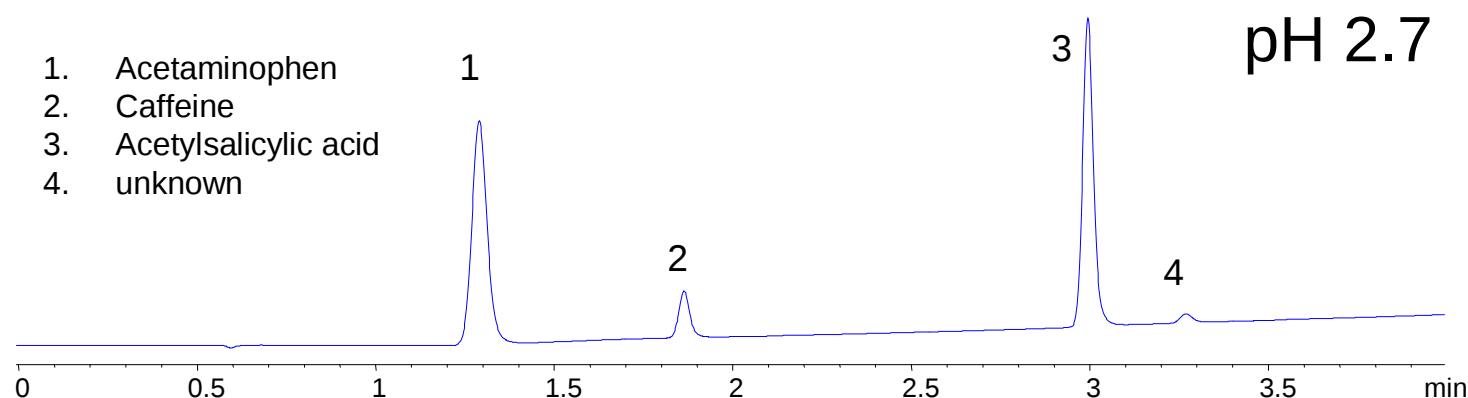


Ø Eclipse Plus can be used with many mobile phases and pH's

Conditions: Column: Eclipse Plus C18 4.6 x 100mm, 5um Gradient: 10 – 90% in 10 minutes Detection: UV 254 nm

pH 2和 pH 7 对选择性的影响有时非常显著

Eclipse Plus C8 4.6 x 50mm, 5 μ m



Column: 4.6 x 50, 5 μ m PN 959946-906

Gradient: 10-60% B/3 min.

pH 2.7: A: 0.1% formic acid B: 0.1% fa in ACN

pH 7.0: A 20 mM Na phosphate B: ACN

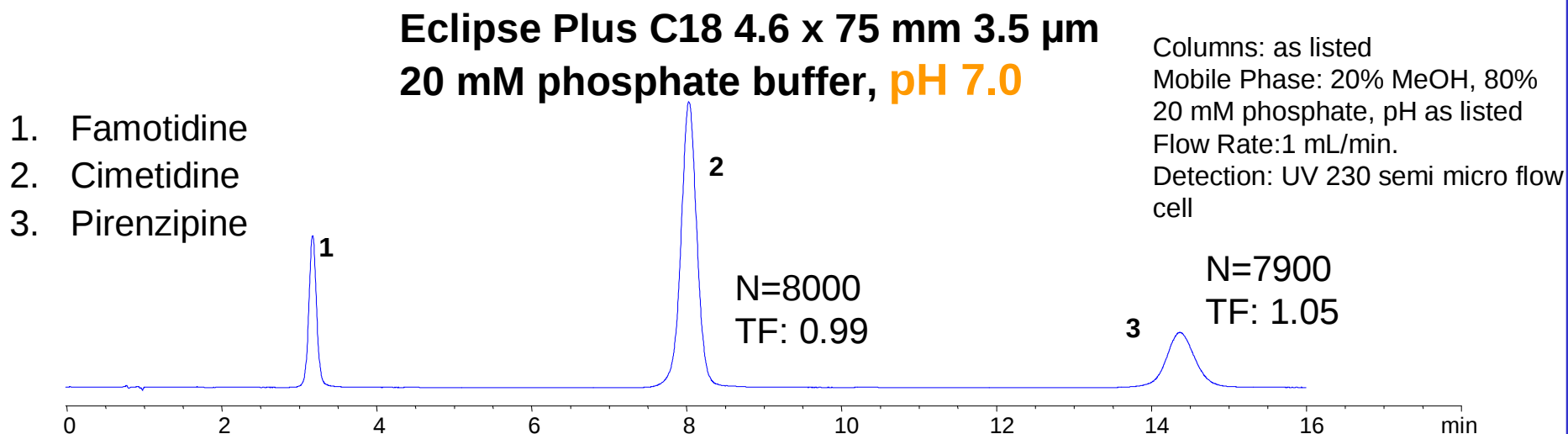
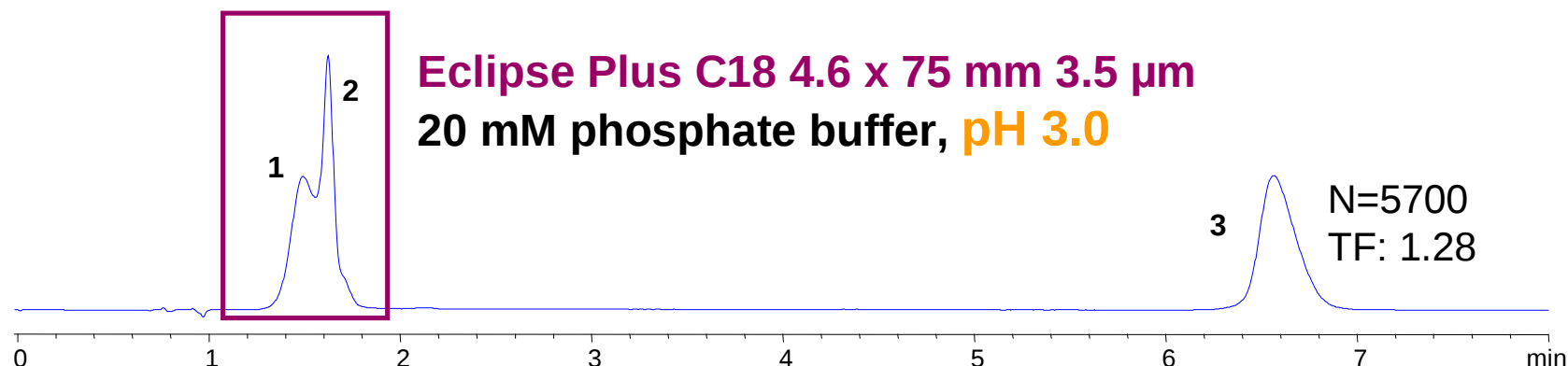
Sample: "generic Excedrin tablet"

Ø Selectivity can change dramatically from pH 2 – 7 with many samples, such as this analgesic tablet.

Ø Eclipse Plus can be used under both conditions

在中等pH值条件下选择性的不同是分离的关键

Eclipse Plus 在不同pH值下选择性比较

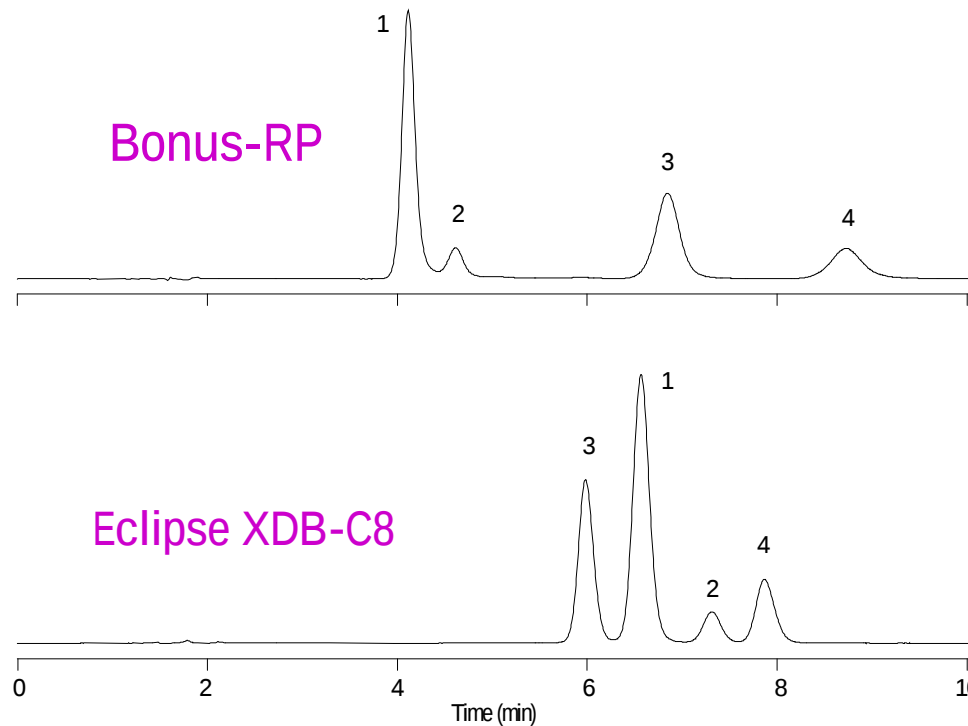


Ø For this sample resolution is not possible at pH 3, but is at pH 7
Ø Eclipse Plus was used to experiment at both pH's

可以选找另一种键合相改变选择性

Ø 另一种可选择的色谱柱是 **Bonus-RP**.

Ø 嵌入酰胺基的烷基键合相在中等pH下提供不同的选择性



Mobile Phase: 75% mM NaCitrate, pH 6
25% MeOH

Flow Rate: 1.0 mL/min

Temperature: Ambient

Detection: UV 254 nm

Injection Vol: 3 μ L

Sample: Cephalosporins

1. Cephalexin
2. Cephaclo
3. Cephuroxime
4. Cephoxitin

Mid pH was the second pH region to consider.

High pH can also be considered if low or mid pH did not resolve all analytes.

在高pH下开发方法 – 第三选择

从中等pH值到高pH值



STEP 9

- **ZORBAX Extend-C18**
- pH 10.5 (9-12) 5 mM ammonia, or TEA, or 10 – 50 mM 有机或硼酸缓冲液
- T = 25°C (ambient – 40°C)
- 调节MeOH for $0.5 < k < 20$

峰间距问题



STEP 10

- 改变有机相 (ACN or THF)
- 调节比例以使 for $0.5 < k < 20$

尝试其它的 **HPLC** 模式

在高pH下开发方法的原因

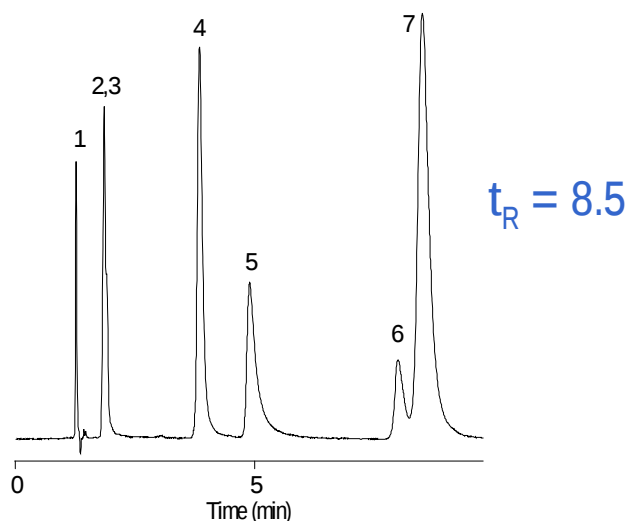
Ø 通过将碱性化合物转变成非离子化的形式以增加其保留

Ø 改进选择性

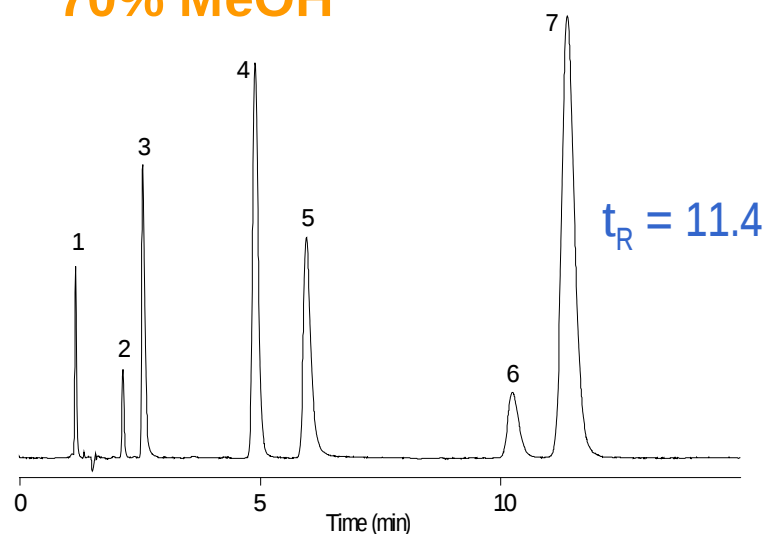
采用Extend-C18在高pH下增加抗阻胺剂的保留

Column: ZORBAX Extend-C18, 4.6 x 150 mm, 5 μ m Mobile Phase: See Below Flow Rate: 1.0 mL/min
Temperature: RT Detection: UV 254 nm Sample: 1. Maleate 2. Scopolamine 3. Pseudoephedrine 4. Doxylamine
5. Chlorpheniramine 6. Triprolidine 7. Diphenhydramine

pH 7
30% 20 mM Na₂HPO₄
70% MeOH



pH 11
30% 20 mM TEA
70% MeOH



Ø The retention of this sample of basic compounds increases at high pH.

小结

ü 采用1.8um RRHT色谱柱或Eclipse Plus键合相可以提高方法开发的速度，在最短时间内得到最优化方法。

ü 因为很多化合物是离子化的，所以pH值的调节对于这些化合物的保留和选择性影响是显著的，方法开发中应考虑到流动相pH值的改变。

ü 在方法开发中，应该尝试不同键合相，因为不同键合相带来不同的选择性。

ü 方法开发中还需要考虑到流动相的选择，包括有机相的选择，这些对分离都是至关重要的。