



安捷伦液相色谱柱介绍 及选择建议

主要内容



üZorbax液相色谱柱介绍

üZorbax反相色谱柱选择建议

Zorbax^â 液相色谱柱

常规分析柱

Zorbax Eclipse Plus柱
Zorbax Eclipse XDB
Zorbax Stable Bond 柱
Zorbax Extend C18柱
Zorbax Bonus-RP 柱
Zorbax SB-Aq 柱
Zorbax RX HPLC 柱
原先的Zorbax ODS柱
Zorbax 正相柱
其他Zorbax 柱

高通量和LC/MS柱

Zorbax 高通量柱, LC/MS HPLC柱
Zorbax 快速分离柱
Zorbax 快速分离高通量柱
Zorbax 溶剂节省色谱柱
Zorbax 微径色谱柱
Zorbax 毛细管柱和纳流柱

制备柱

Zorbax PrepHT制备柱

生化分析柱

Zorbax 300 SB 柱
Zorbax 300Extend柱
Zorbax Poroshell柱
Zorbax Eclipse AAA柱
Zorbax GF-250/450 凝胶柱
Zorbax SAX和SCX柱
MARS
mRP column

Agilent^â 液相色谱柱

Agilent TC-C18柱
Agilent HC-C18柱
Agilent HC-C8柱
Agilent TC-C18(2)柱
Agilent HC-C18(2)柱
Agilent Prep-C18

安捷伦Zorbax[®] HPLC色谱柱

严格的质量控制

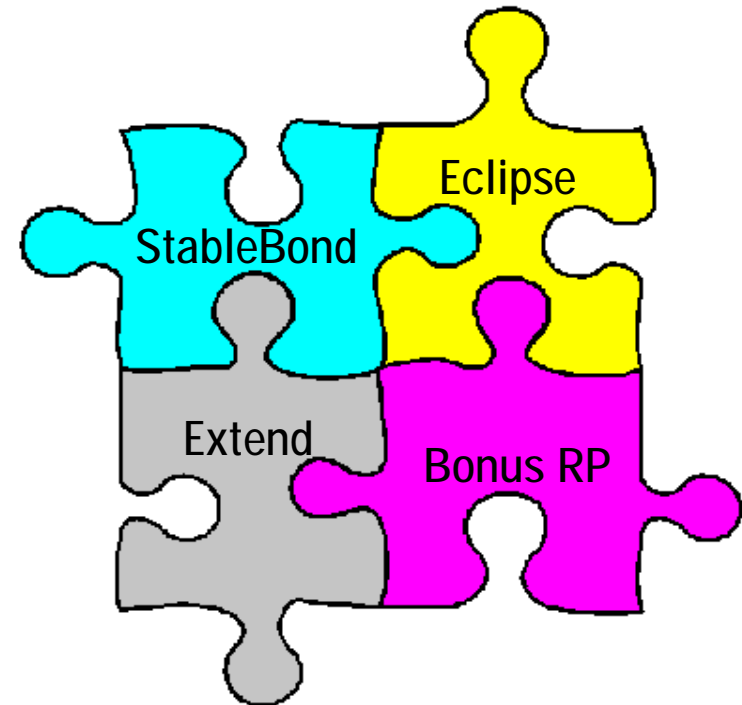
产品研究与开发

硅胶生产

键合

柱装填

- 具可追溯性
- 可订购生产批号不同的色谱柱
- 特殊规格定制



ZORBAX[®] 硅胶类型

A类硅胶

Original ZORBAX SIL (1970s)

由于带负电荷的残留硅羟基和酸性表面上金属含量高 (硅羟基的pKa低), 导致碱性化合物发生拖尾

B类硅胶 (高纯)

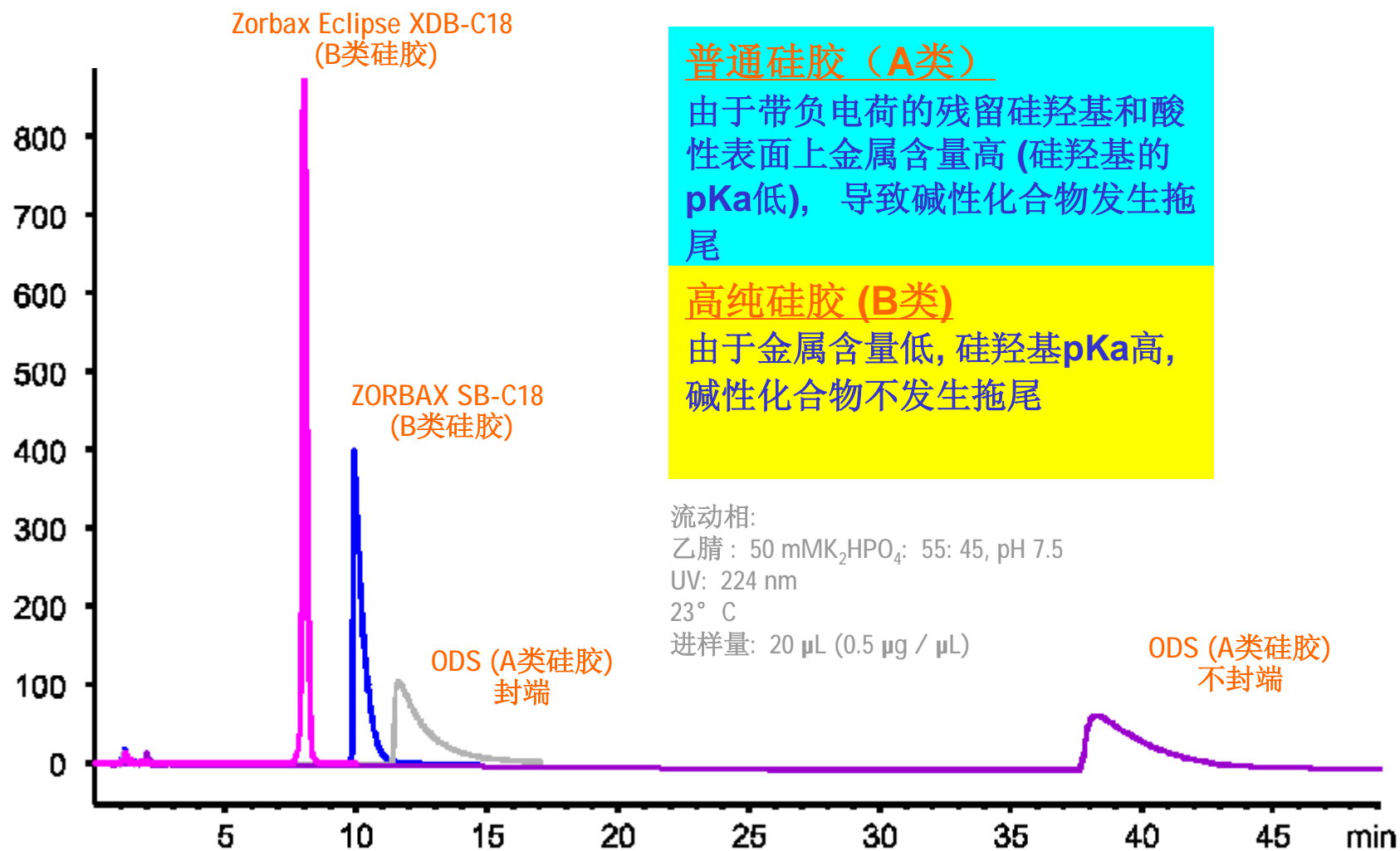
ZORBAX Rx-Sil (1987)

由于金属含量低, 硅羟基pKa高, 碱性化合物不发生拖尾

金属浓度 (ppm)											
二氧化硅	Na	K	Mg	Al	Ca	Ti	Fe	Zr	Cu	Cr	Zn
Zorbax Rx-SIL	10	< 3	4	1.5	2	nd	3	nd	nd	nd	1
Zorbax SIL	17	nd	nd	57	9	32	21	88	< 1	nd	88
Nucleosil	56	N/A	N/A	nd	130	57	76	nd	N/A	N/A	nd
Hypersil	2900	N/A	40	300	38	65	230	N/A	N/A	N/A	N/A
nd = 未检出											

Zorbax Rx-SIL: 11种金属 < 35 ppm (未检出其他杂质, <1ppm); 99.995% 纯度的二氧化硅

选择适用于pH7.5流动相的色谱柱



普通硅胶 (A类)

由于带负电荷的残留硅羟基和酸性表面上金属含量高 (硅羟基的 pKa低), 导致碱性化合物发生拖尾

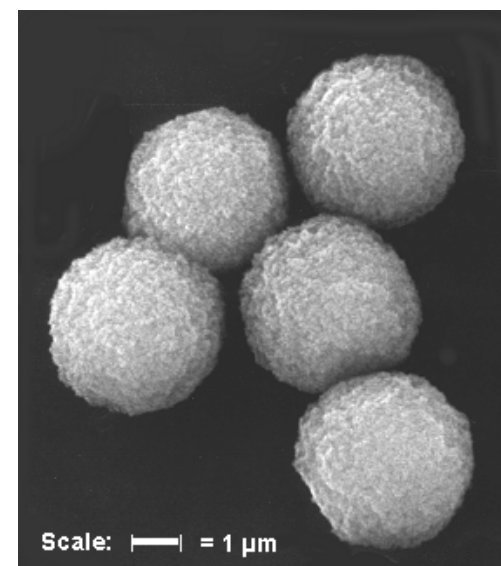
高纯硅胶 (B类)

由于金属含量低, 硅羟基pKa高, 碱性化合物不发生拖尾

Zorbax液相色谱柱硅胶特点

Zorbax硅胶的制备方法由液相色谱柱著名创始人J.J. Kirkland发明，属于安捷伦公司的专利技术。

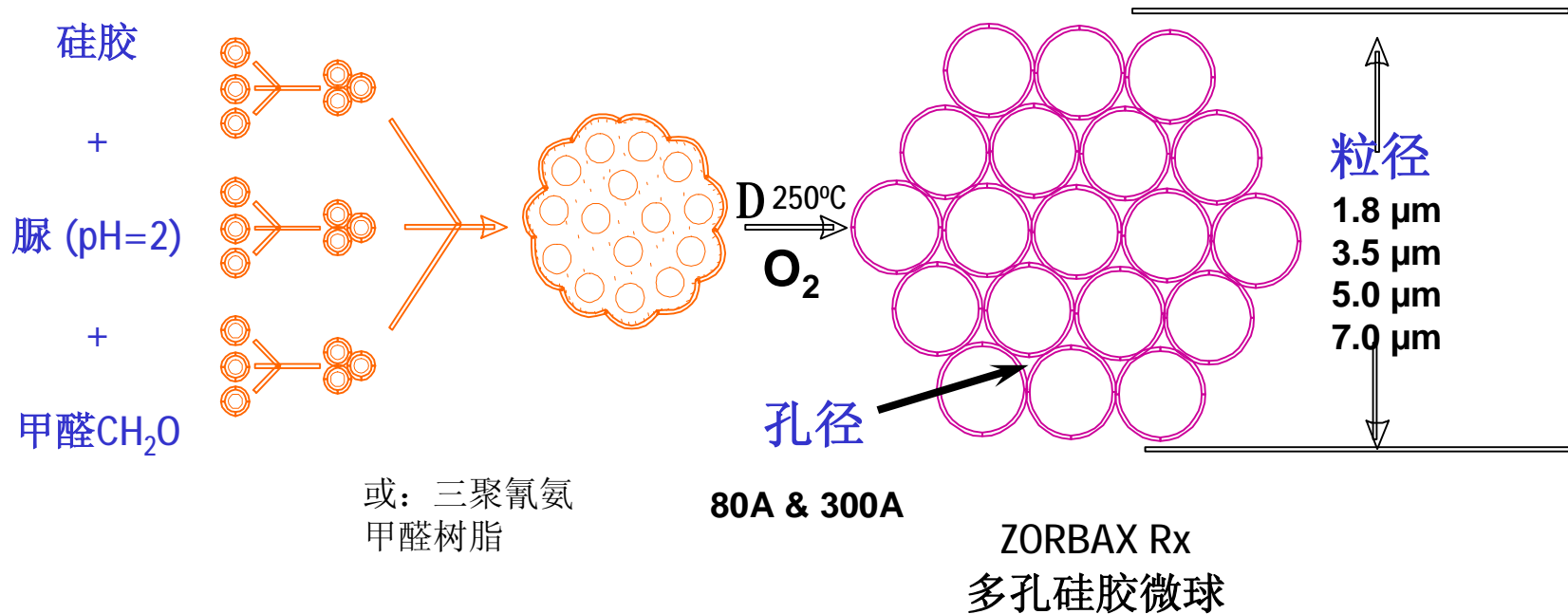
- 高纯度硅胶
游离硅羟基活性降低
提供更好的峰形
- 专利的硅珠堆砌法
更好的重现性
填料颗粒更好的强度
提供不同粒径的颗粒



Zorbax液相色谱柱硅胶特点

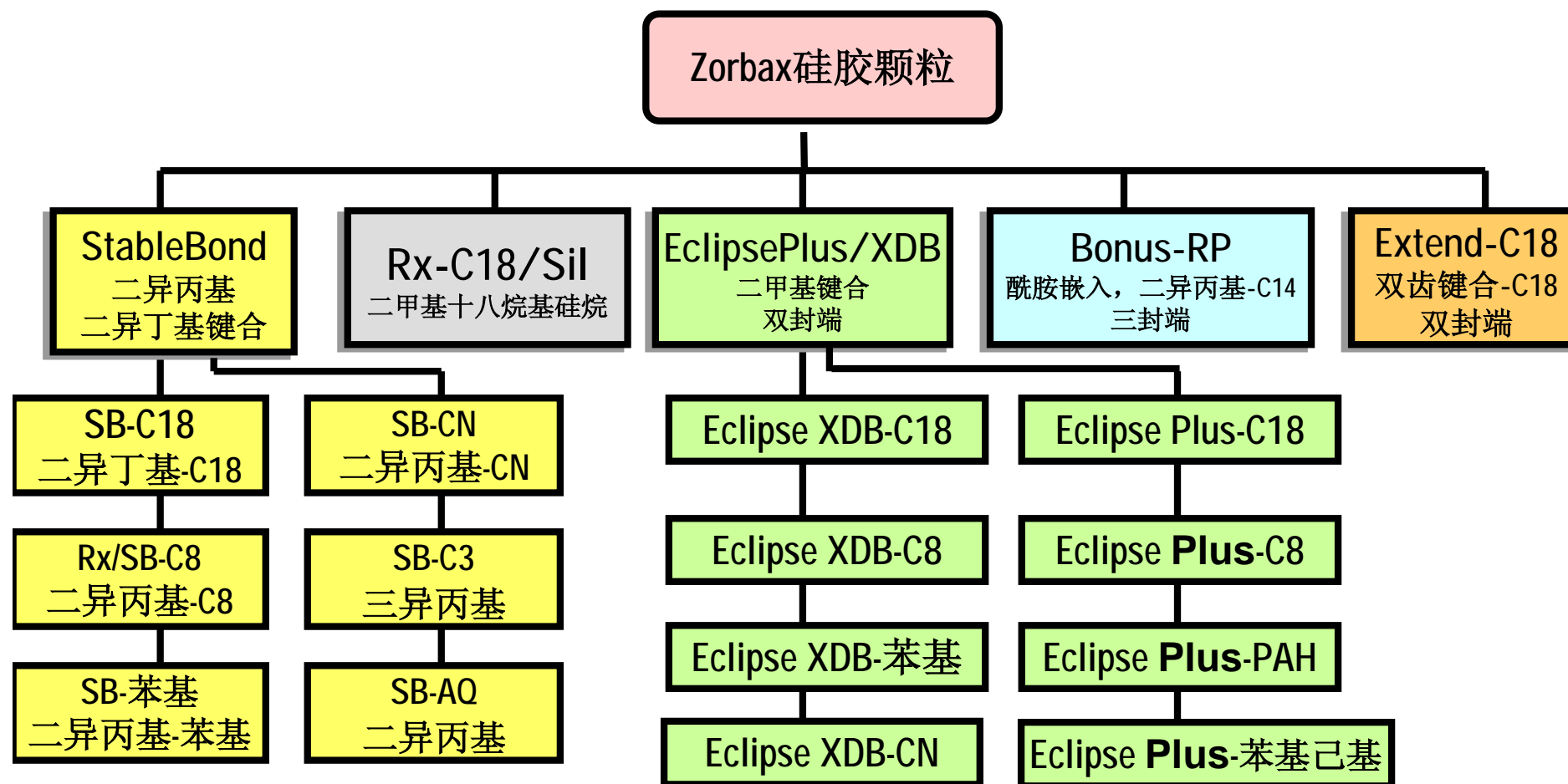
专利的硅珠堆砌技术

纯度，强度，对孔径与粒度严格控制——优级ZORBAX键合相基础



安捷伦拥有此项填料专利技术

Zorbax主要的几种键合相技术



Zorbax主要键合相技术介绍

üZorbax Eclipse XDB/Plus键合相

- Zorbax StableBond 键合相
- Zorbax Extend 键合相
- Zorbax Bonus RP 键合相

Zorbax Eclipse键合相

Eclipse Plus

- Ø行业领先的峰形
 - Ø更好的专利技术处理硅胶基质
 - Ø改进的双封端技术：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
- Ø不同粒径 – 1.8, 3.5, 5um
- Ø最高的分离效率
- ØC18, C8, PAH, 苯基-己基

- 致密键合
- 双封端
- 超纯坚固的ZORBAX硅胶
- 宽的 pH使用范围2-9
- 对于所有样品都有较好的峰形
- 专利技术
- 完整的质控过程 –
- 方法开发的首要选择

Eclipse XDB

- ØC18, C8, 苯基, CN
- Ø不同粒径 – 1.8, 3.5, 5, 7um
- Ø对于快速方法开发有很广泛的应用谱图库
- Ø多种色谱柱规格，从毛细柱到制备柱
- Ø使用1.8um 颗粒实现快速有效的方法转化

Eclipse系列的色谱柱所适合的pH范围为2-9，是液相中最为常见的流动相范围。而且在中等pH时，由于其对碱性化合物的峰形分离优异(尤其是Eclipse Plus)，因此一般做为方法开发的首选色谱柱。

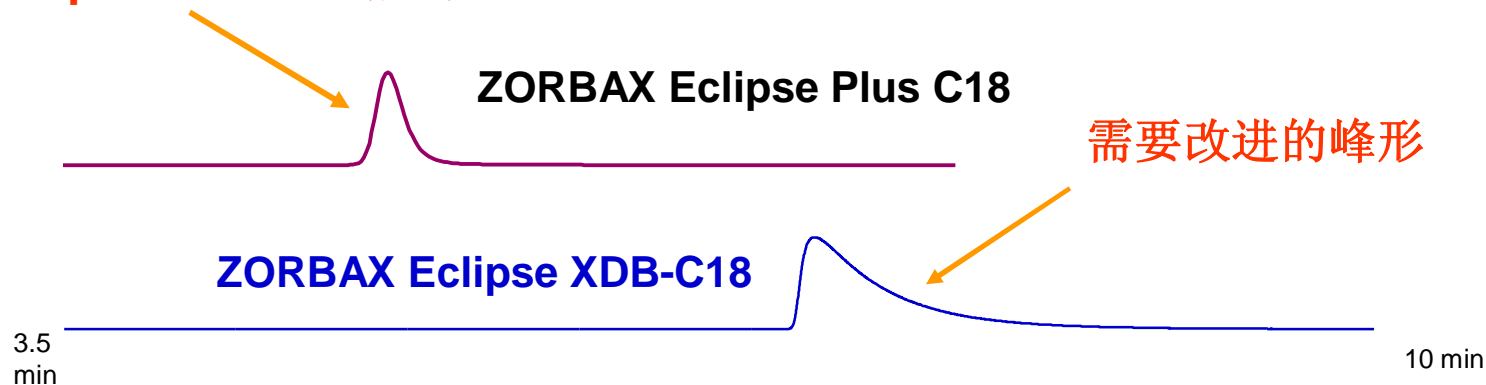
ZORBAX Eclipse Plus 解决了“峰形”问题

由于硅胶上残留的硅羟基，碱性化合物通常会出现拖尾的现象

- 低的灵敏度
- 很差的分离度
- 在指定时间内分离的峰数少
- 很难定量

PLUS--针对碱性化合物
而特别研制的色谱柱

Eclipse Plus可以做到!!

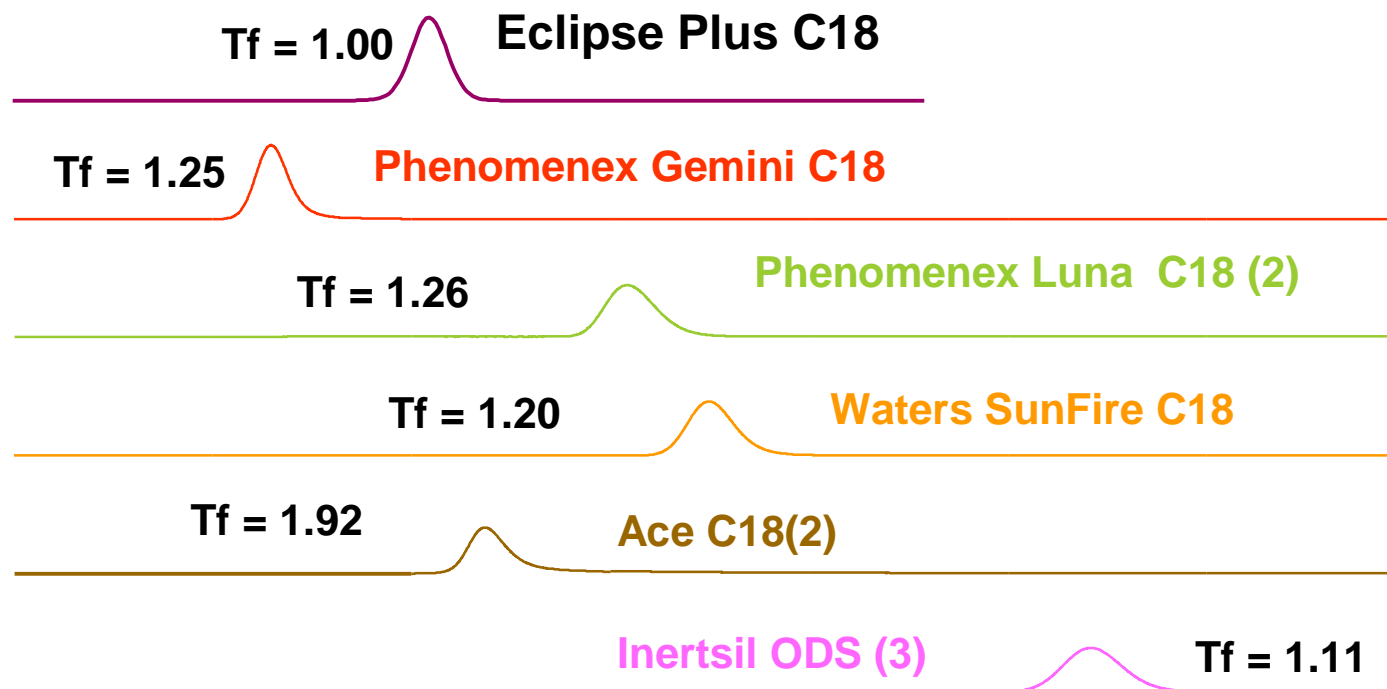


阿米替林 ~0.1ug, 60% 乙腈 8mM 磷酸钾缓冲盐 pH 7.0, 215nm, 1.0mL/min, 4.6x100mm 5 μ 色谱柱

ZORBAX Eclipse Plus

在甲醇流动相中分离阿米替林时峰形出色

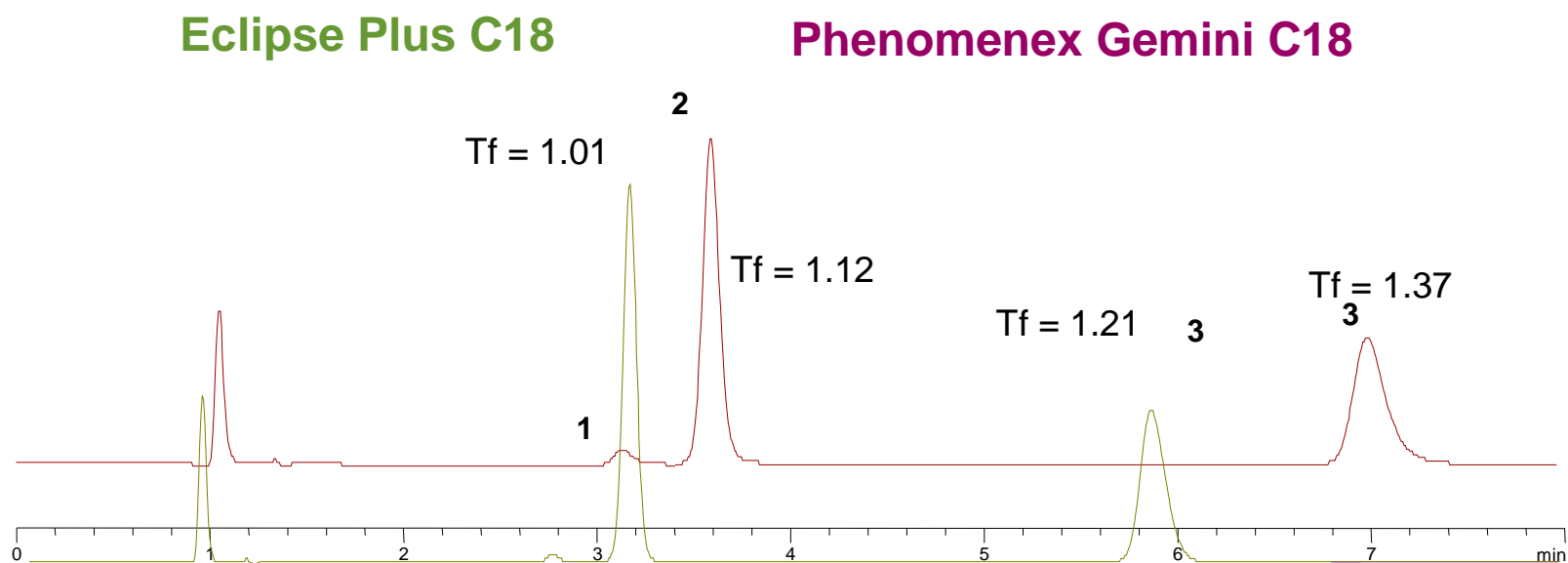
阿米替林 ~ 0.1 μ g 80% 甲醇 8mM 磷酸钾缓冲盐 pH 7.0,
检测器: UV 215 nm, 流速: 1.0 mL/min 色谱柱: 4.6x100mm 5 μ m



在甲醇中峰形通常会比较好，**Eclipse Plus** 在这个条件下非常出色。

Eclipse Plus C18 对于酸碱混合物的分离 峰形都是最好

1. 水杨酸 2. 乙酰水杨酸 3. 右美沙芬

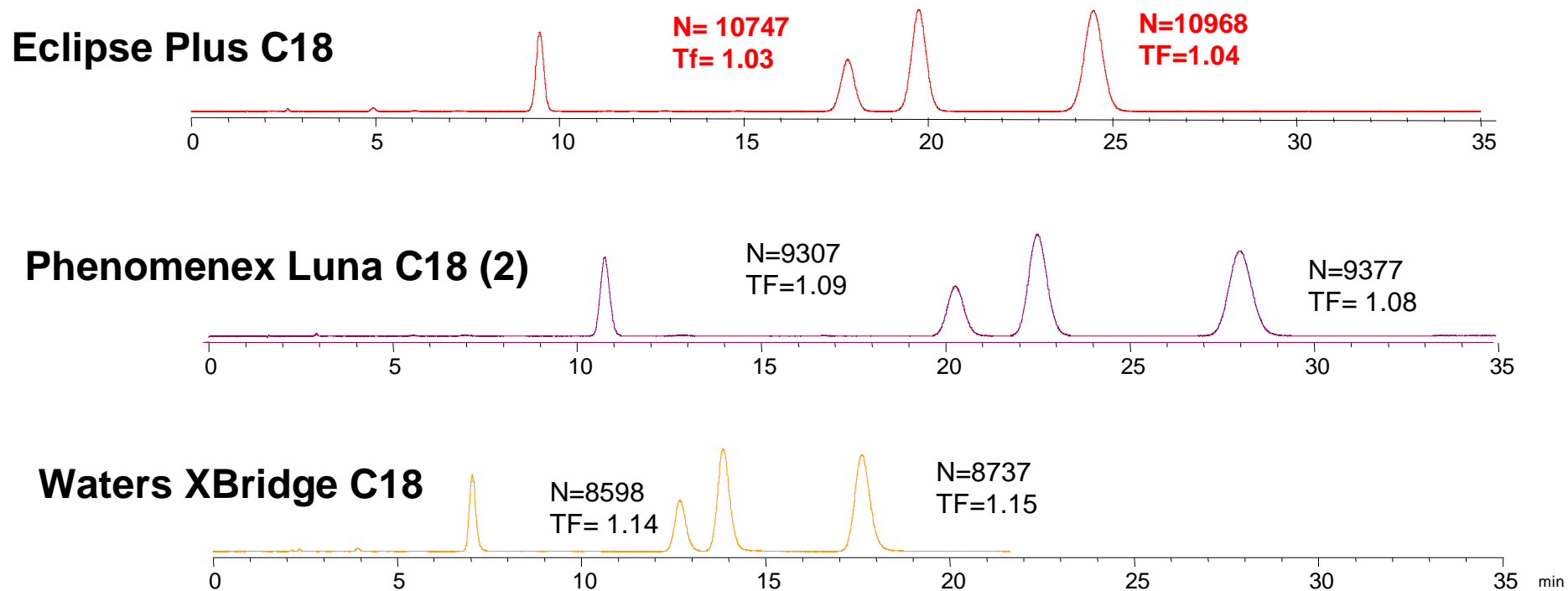


Eclipse Plus 色谱柱对各种类型的化合物—酸、碱和中性化合物—也可以得到优秀的结果

Eclipse Plus 分析样品的峰形最好

色谱柱: 4.6 x150 mm, 5um 流动相: 60:40 水:甲醇 流速: 1 ml/min 柱温: 40 ° C UV 254 nm

样品: 皮质类固醇: 1. 曲安西龙 2. 泼尼松 3. 氢化可的松 4. 可的松



类固醇不是碱性化合物

Eclipse Plus 同样有最好的峰形和柱效!

Zorbax Eclipse 色谱柱 (可定制规格)

Eclipse Plus:

填料键合相: **C18, C8, PAH, 苯基-己基。**

填料粒径: **1.8 um, 3.5 um, 5 um。**

色谱柱规格: 内径 **2.1 mm 3.0mm 4.6 mm,**
长度从**30 mm到250mm。**

Eclipse XDB:

填料键合相: **C18, C8, CN, Phenyl。**

填料粒径: **1.8 um, 3.5 um, 5 um, 7 um。**

色谱柱规格: 内径从**2.1 mm 21.2 mm,**
长度从**30 mm到250mm。**
以及毛细管柱(**0.3 mm和0.5 mm**)。

Zorbax主要键合相技术介绍

üZorbax Eclipse XDB/Plus键合相

üZorbax StableBond 键合相

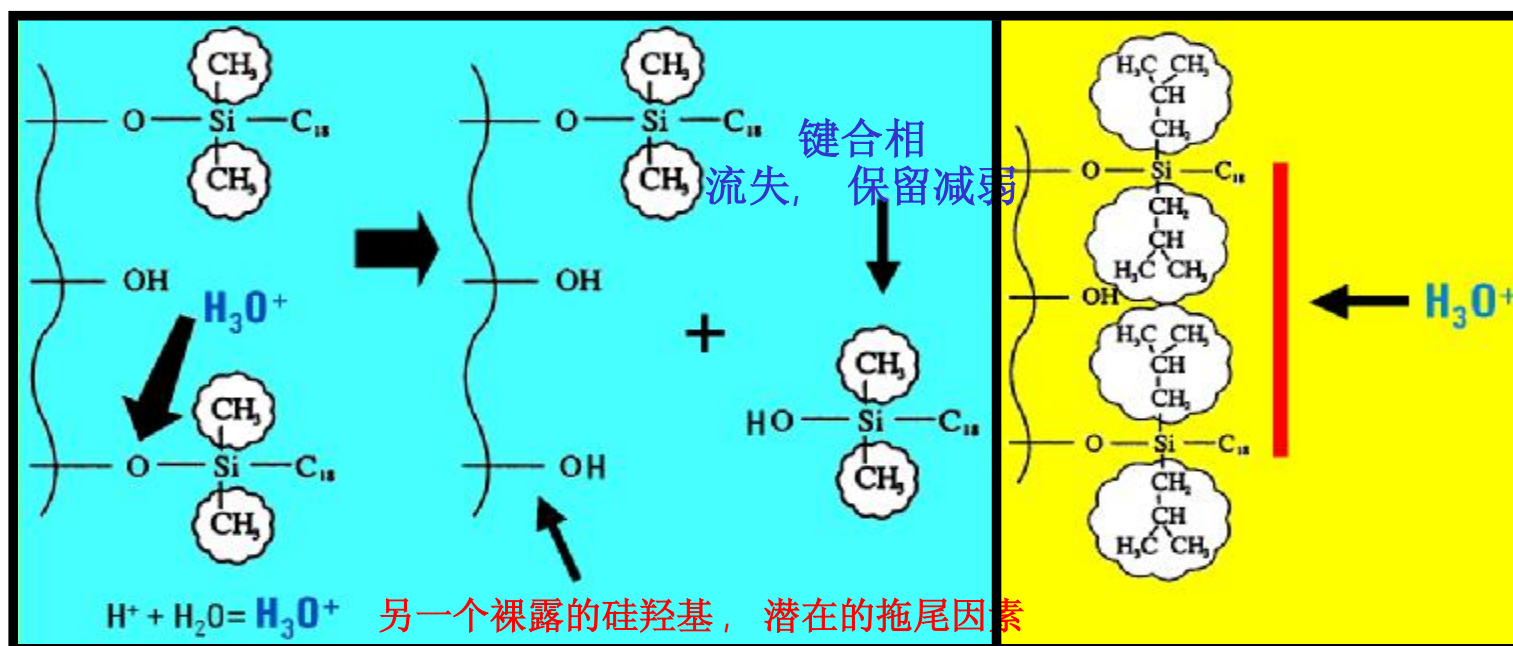
- Zorbax Extend 键合相
- Zorbax Bonus RP 键合相

ZORBAX StableBond 色谱柱特点

专利的键合技术，为键合相提供了空间保护作用。

具有行业领先的低pH流动相稳定性。

pH可以低至 1，且允许在高温(80°C)下操作。

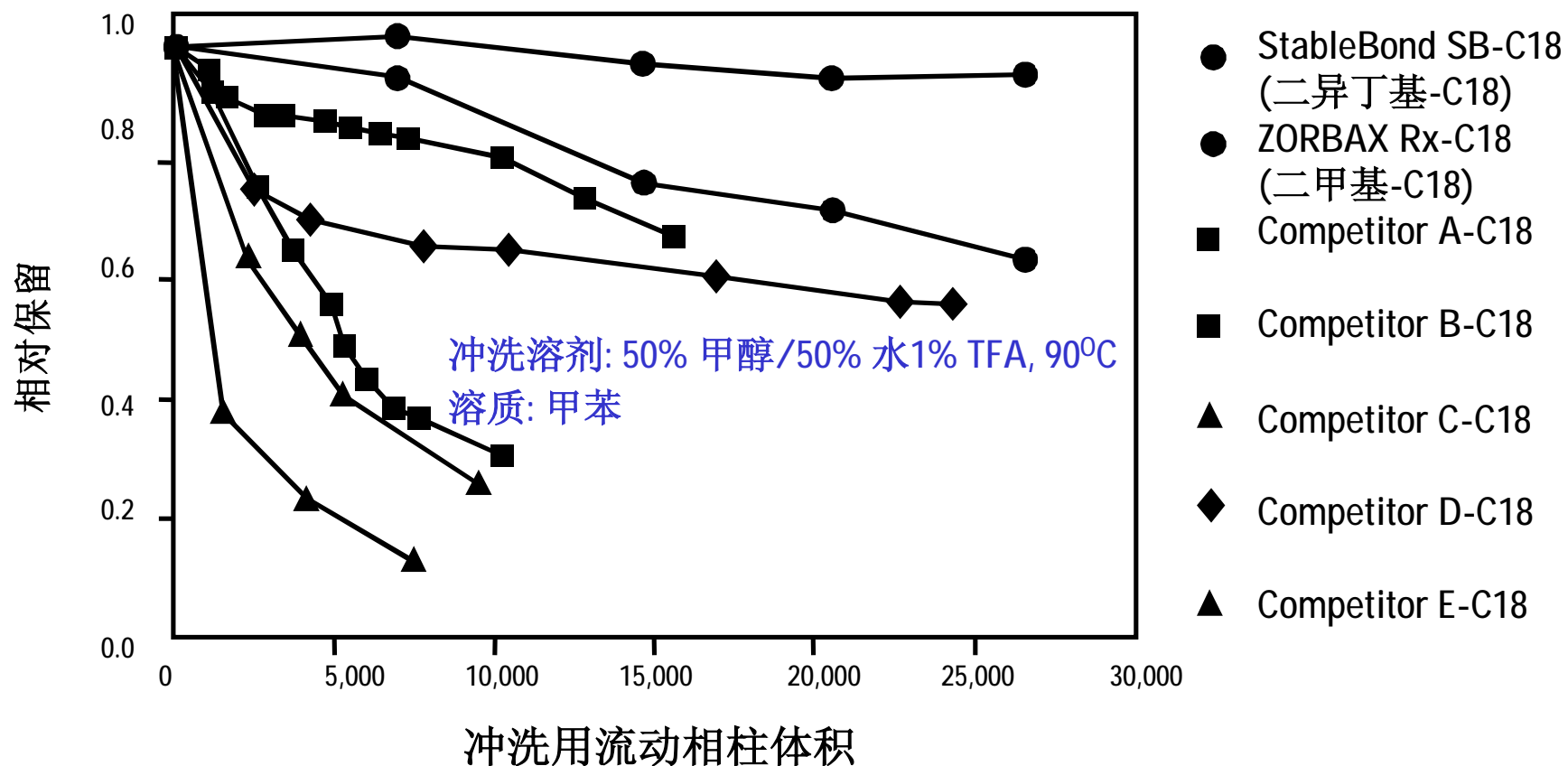


普通硅胶柱低 pH < 2 不稳定, 发生水解

Zorbax StableBond
空间位阻保护---抗水解能力

ZORBAX StableBond 色谱柱

在低pH和高温(pH 0.8, 90° C)卓越的稳定性



从上面的对比实验可以看出，StableBond系列色谱柱在低pH及高温下具有很好的稳定性。

SB系列中不容忽视的C18键合相：SB-Aq

通用性强—100%水相及100%有机流动相

推荐用于强极性组分的分离

在含高水相的流动相中可获得高的保留

高纯度去活硅胶基质

超乎想象的稳定性—在低pH和高温($\leq 80^{\circ}\text{C}$)下,具有最长的柱寿命和最好的重现性

可用于PH 1的酸性流动相

最高可用到80°C的条件

保留的重现性较好---不发生“固定相坍塌”

品种齐全

提供从窄径柱, 常规柱, 到制备柱

液质联用短柱及快速分离柱等

可用于:

高酸性流动相

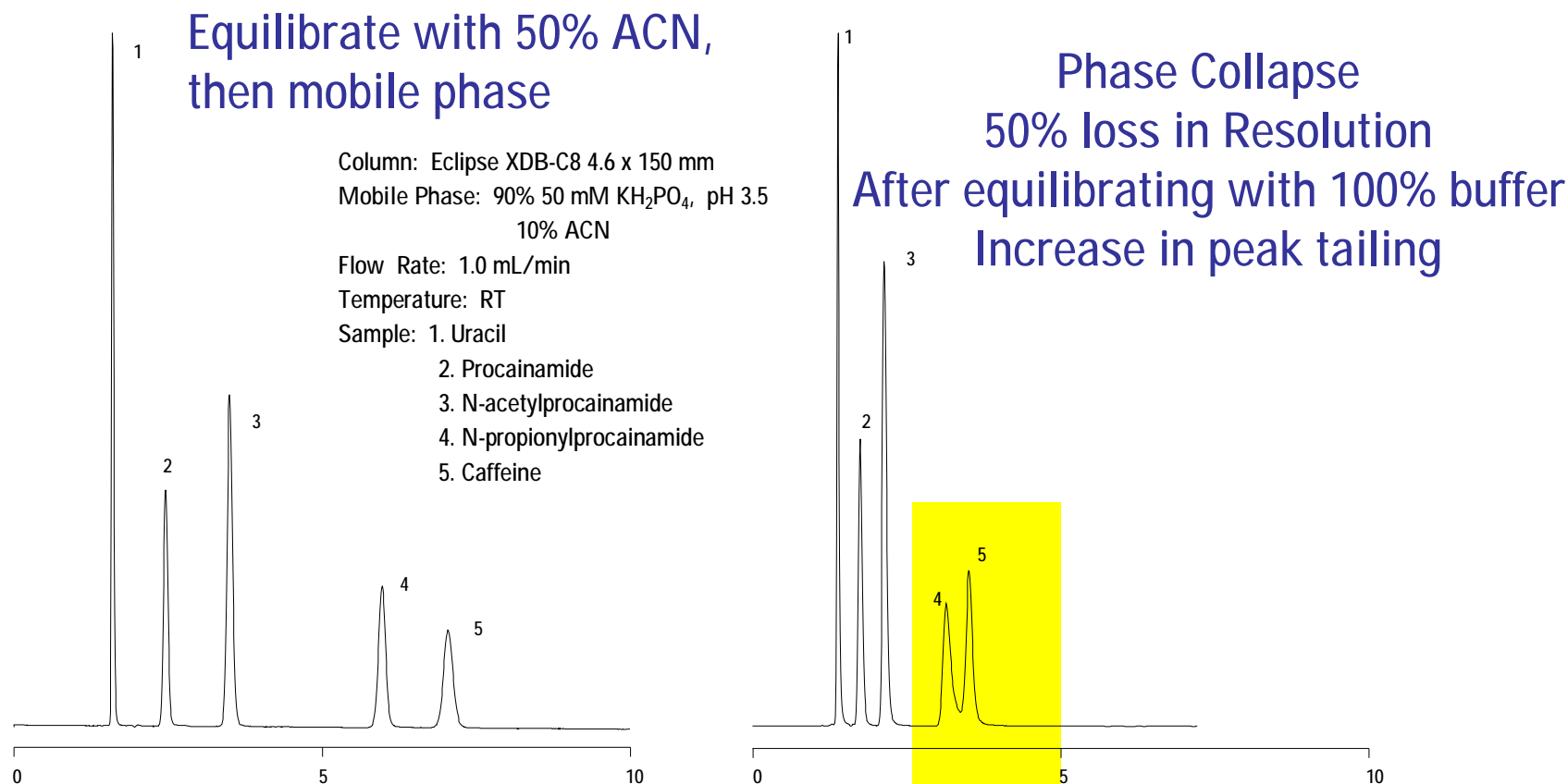
高极性样品

100%纯水流动相兼容

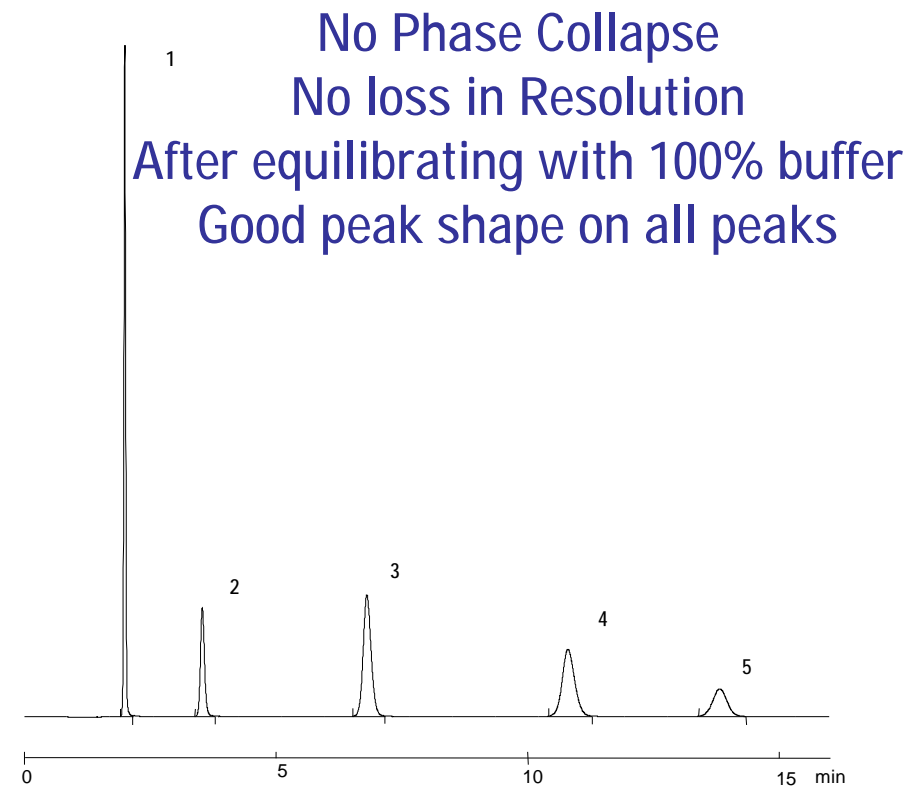
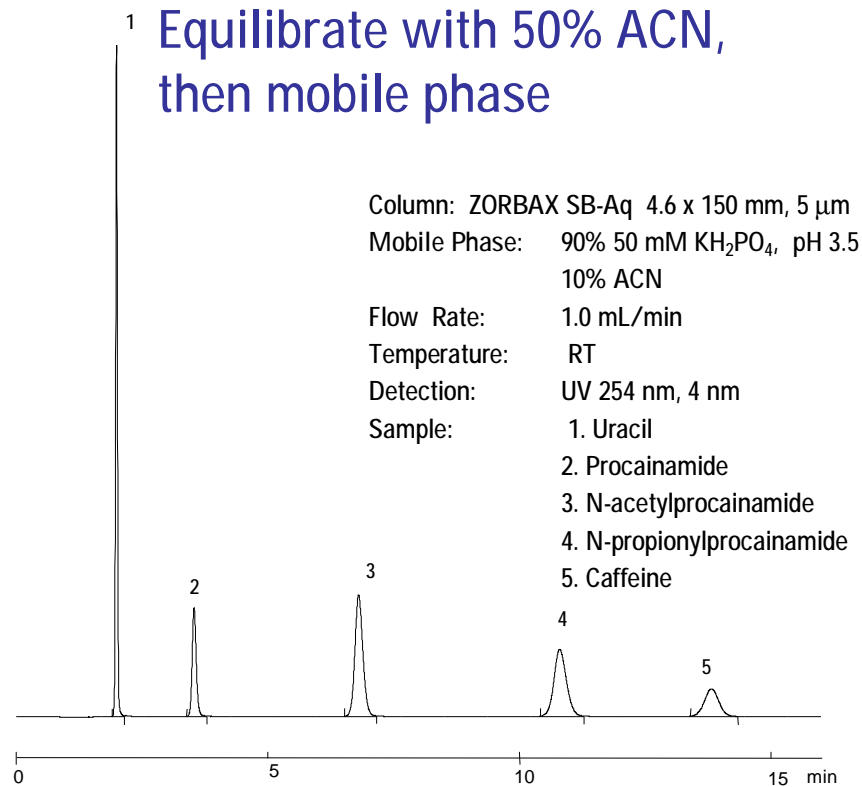
如果流动相中水相或缓冲盐相的比例超过85%，
强烈推荐选用能耐高水相的色谱柱，请看以下两张幻灯片对比实验。

高水相比比例的流动相往往会导致普通C18/C8键合相出现保留时间的变化

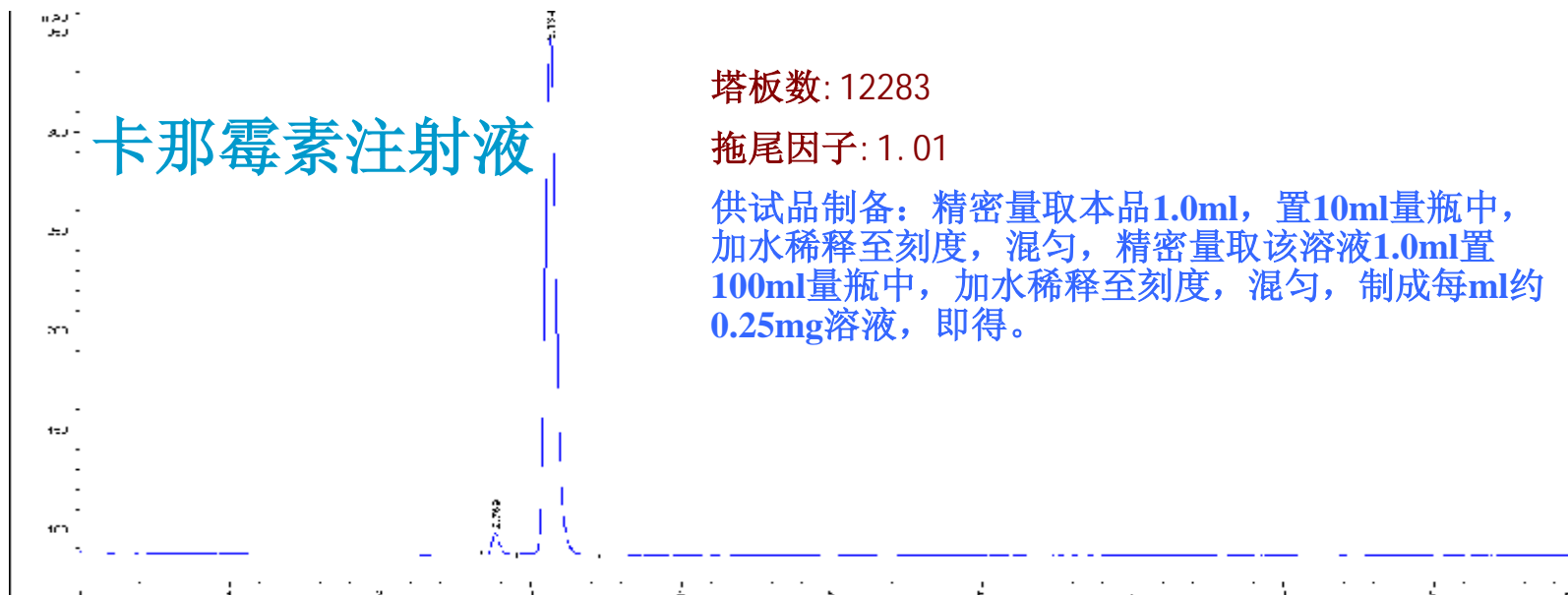
Example: Procainamides on Hydrophobic-C8 Column



SB-Aq在高水相比比例的流动相条件下 保留时间具有很好的重现性



耐100%水相色谱柱—SB-Aq



色谱条件:

色谱柱: Zorbax SB-Aq C18, 4.6' 250mm, 5mm
(880975-914)

柱温: 35°C

流动相: 1%三氟乙酸水溶液

蒸发管温度: 115°C, 空气流速: 3.5mL/min
流速: 1.0mL/min

仪器配置:

二元泵 (G1312A)

手动进样器 (G1328B)

柱温箱 (G1316A)

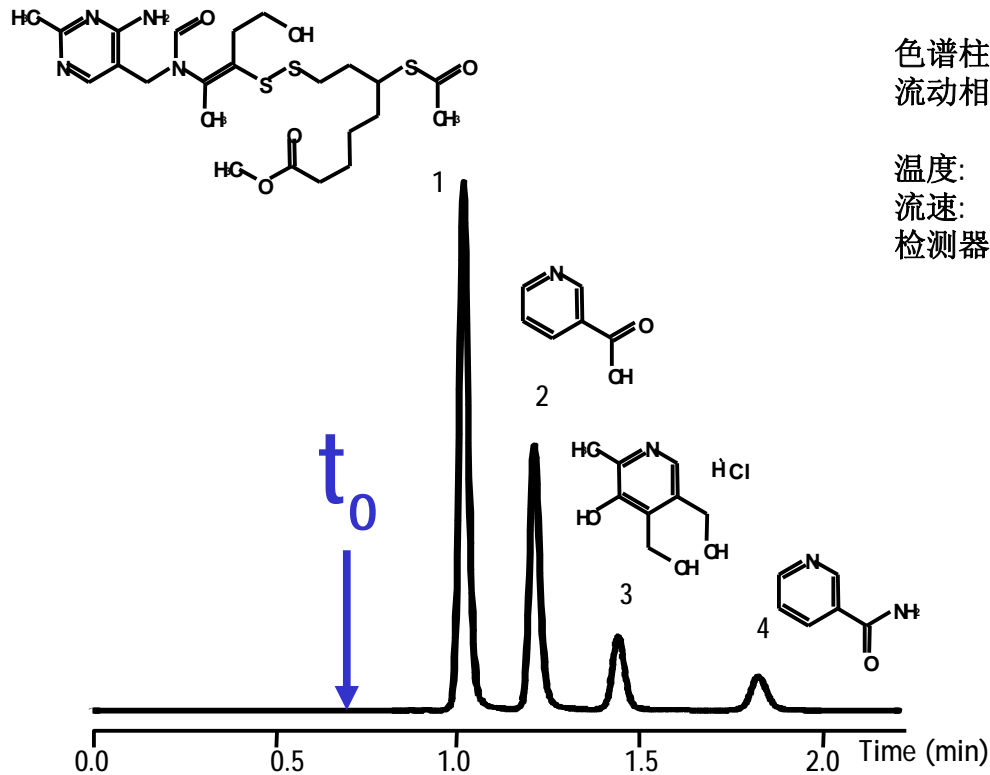
数模转换器 35900E

蒸发光散射检测器 Alltech 2000

仪器控制及数据处理: Agilent
Chemstation

SB-Aq可增强强极性样品的保留

水溶性维生素(不需离子对试剂)



- 未使用离子对试剂, SB-Aq 色谱柱对极性组分也能提供较好的保留
- 方法重复性比使用离子对试剂更好

Zorbax StableBond 色谱柱

StableBond(80Å)色谱柱

键合相: C18, C8, CN, C3, Phenyl, Aq

填料粒径: 1.8 μm , 3.5 μm , 5 μm , 7 μm

规格: 毛细管柱, 快速分离柱, 分析柱, 半制备柱, 高通量制备柱。

StableBond (300Å) 色谱柱

键合相: C18, C8, CN, C3

填料粒径: 3.5 μm , 5 μm , 7 μm

规格: 纳流色谱柱, 毛细管柱, 标准分析柱, 半制备柱, 高通量制备柱。

大孔径填料适用于大分子分析

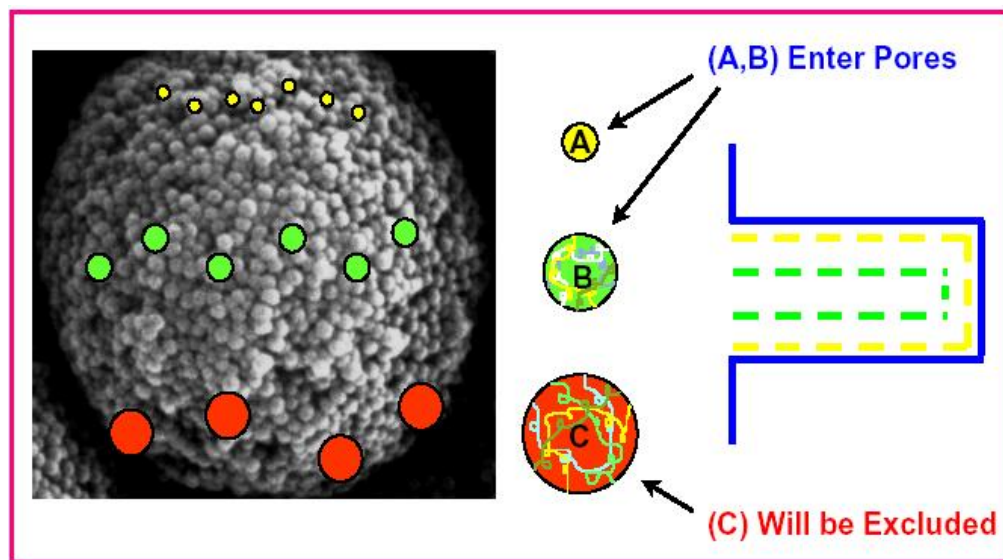
大孔径300Å 全多孔色谱柱

可用于分离蛋白质和多肽

分子量虽小但流体动力学体积较大的分子

Poroshell (多孔壳)色谱柱

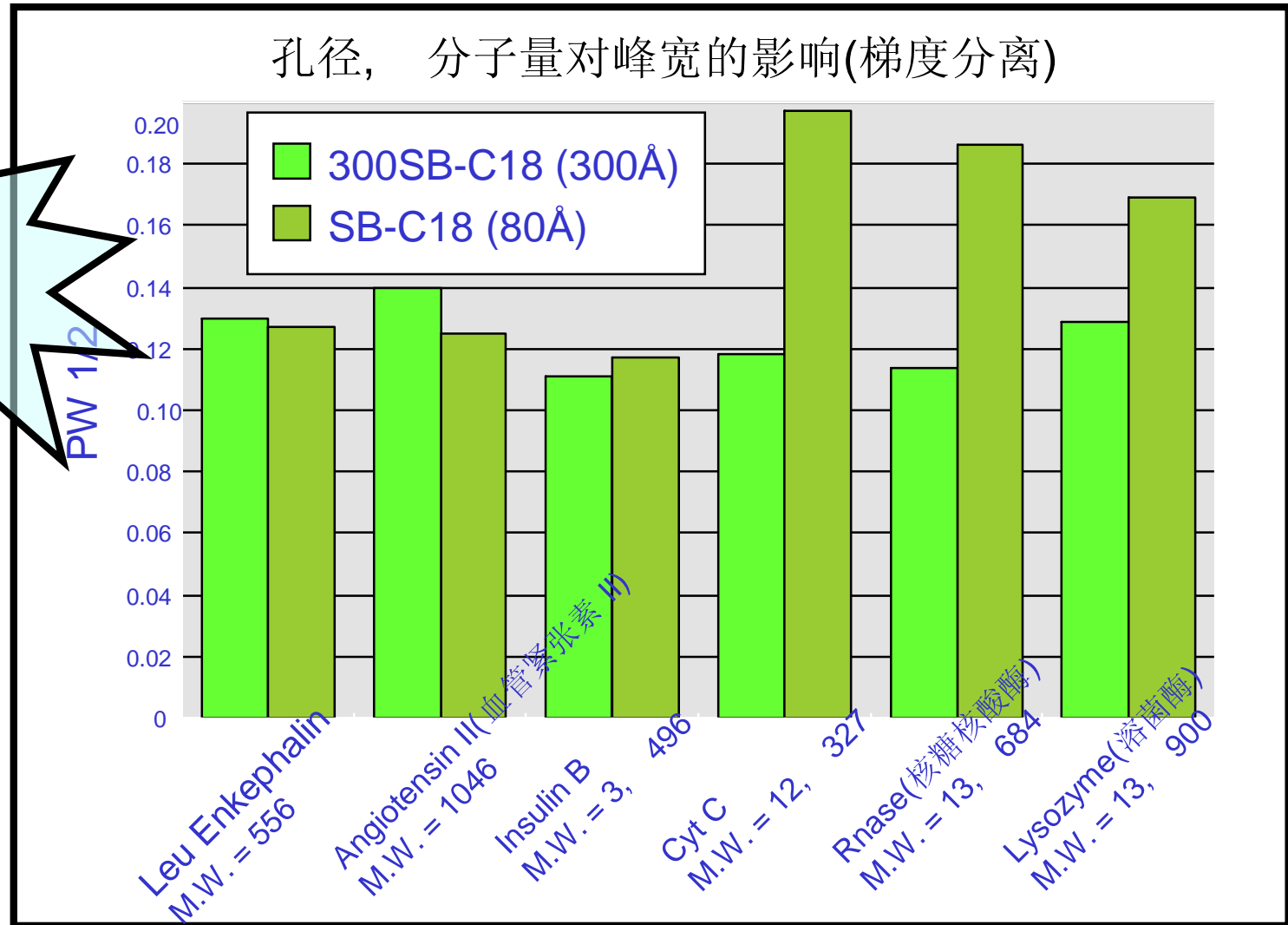
高流速下，高柱效分析大分子的蛋白质和多肽



色谱柱填料孔径必须适合待测物分子自由进出填料孔，与孔内表面的键合相进行分离分配

300Å 孔径可改善蛋白质和多肽峰形

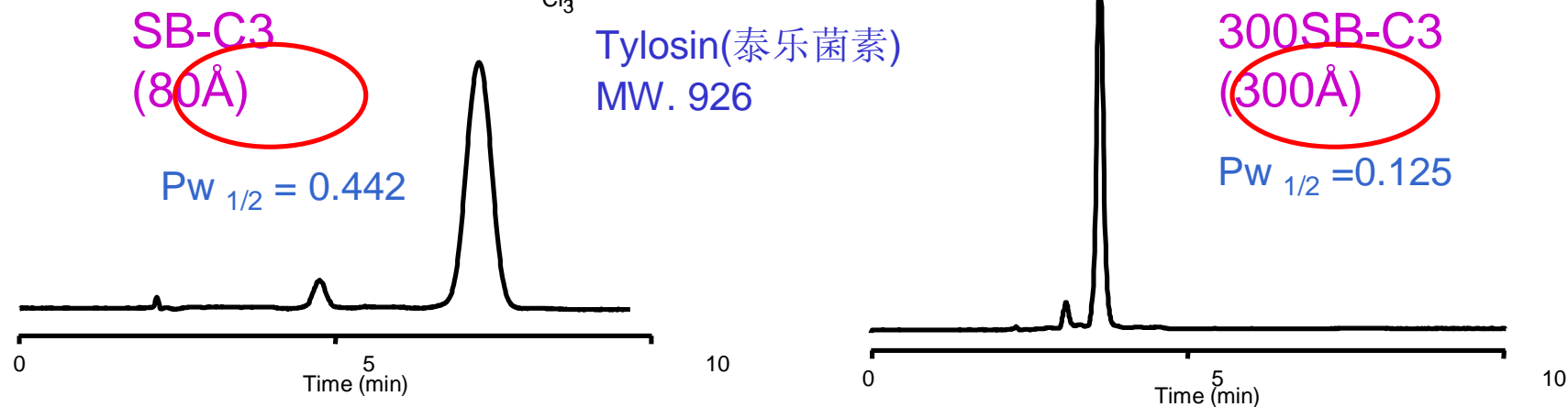
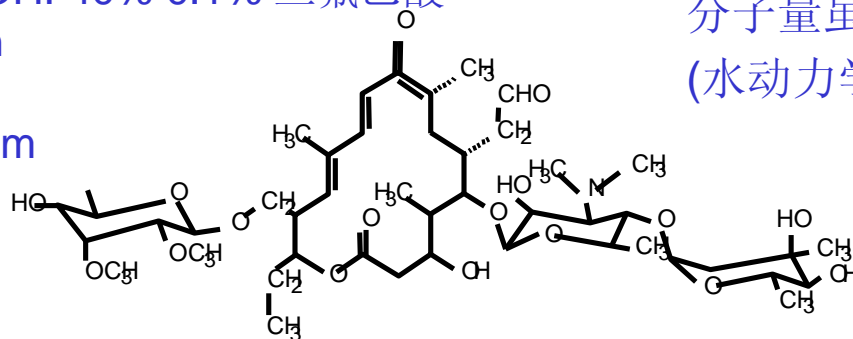
选择合适的
填料孔径分析
大分子可获得
最佳峰形



300Å 孔径可改善大分子的峰形

色谱柱: 4.6 x 150 mm, 5 mm
流动相: 60% MeOH: 40% 0.1% 三氟乙酸
流速: 0.75 mL/min
温度: RT
检测器: UV 282 nm

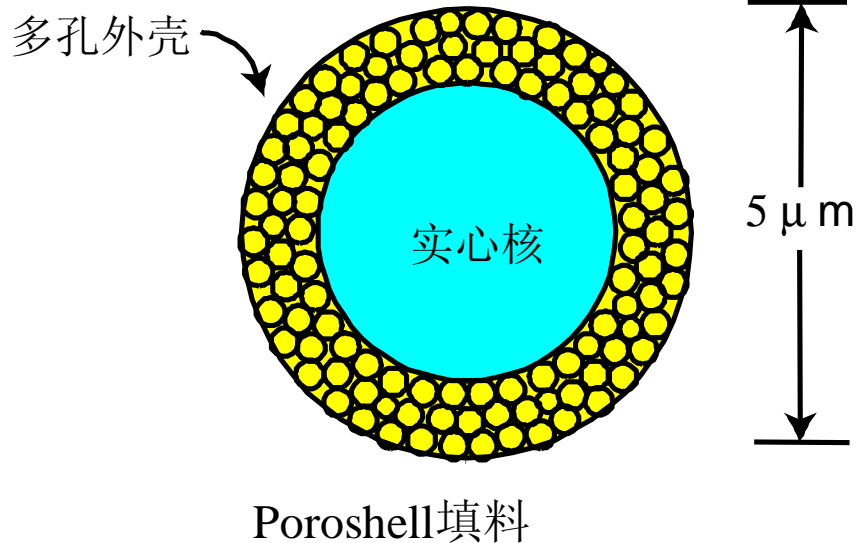
分子量虽小但 hydrodynamic volume
(水动力学体积)较大的分子



- 溶液中的分子尺寸决定适宜的色谱柱孔径
- 窄的峰宽表明待测分子进入填料孔没有受到阻碍

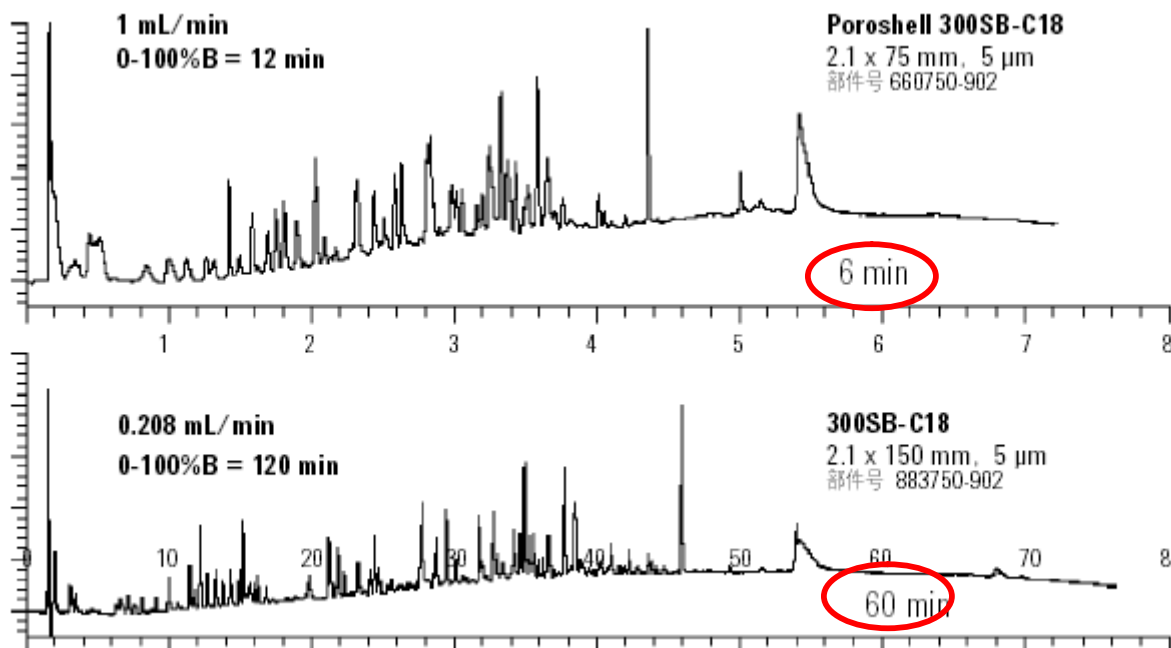
多肽和蛋白质分析

- 300SB 谱柱
- 300Extend
- GF-系列体积排阻色
- Poroshell 300SB与300Extend用于蛋白质



是快速分离蛋白质和多肽的理想色谱柱
Poroshell I 填料颗粒由实心硅胶核和
300Å 孔径表面多孔层构成
蛋白质(分子量可达1,000 kDa)和单克隆
抗体的高柱效和高回收率
四种不同的键合相, 300SB-C18, 300SB-
C8, 300SB-C3和300Extend-C18, 优
化回收率和选择性

快速，高分辨率分离蛋白质和多肽



仪器: **Agilent 1100**二元泵系统

流动相: **A: 95%水, 5%乙腈, 0.1% 三氟乙酸(TFA)**

B: 5% 水, 95%乙腈, 0.07%三氟乙酸(TFA)

流速: 如图示

活塞冲程: **20 μ L**

检测: **UV:215 nm**

温度: **70° C**

进样体积: **20 μ L(0.22 μ g/1 μ L)**

样品: **BSA的胰蛋白酶消解产物**
(15小时, 70 pmol)

完成一次单独的蛋白质消解产物色谱分析要用一小时或更长时间。采用 **ZORBAX Poroshell** 色谱柱, 同样的复杂分离在 **1/10** 的时间内就可完成。

Zorbax主要键合相技术介绍

üZorbax Eclipse XDB/Plus键合相

üZorbax StableBond 键合相

üZorbax Extend 键合相

•Zorbax Bonus RP 键合相

ZORBAX Extend-C18色谱柱特点

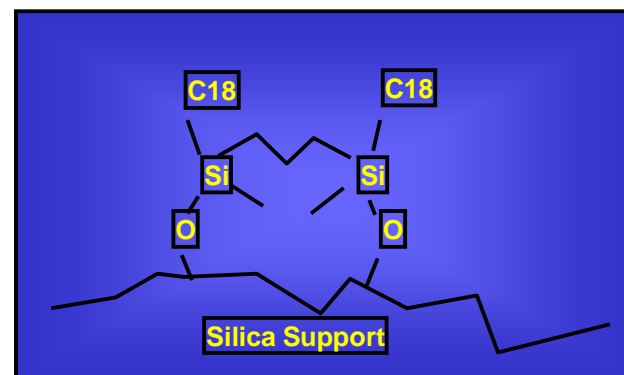
专利双齿键合技术，为高pH流动相设计

最宽的pH流动相使用范围，可用于pH 2-11.5

双封端保证了碱性化合物优异的峰形

硅胶基质，比聚合物基质有更高柱效和更好峰形

pH: 2~11.5
温度: pH ≥ 7 , $\leq 40^{\circ}\text{C}$; pH < 7 , 60°C
碳覆盖率: 12%
表面积: $180\text{m}^2/\text{g}$
粒径: 3.5, 5mm
孔径: 80 \AA
键合试剂: 双齿 C18
封端: 双

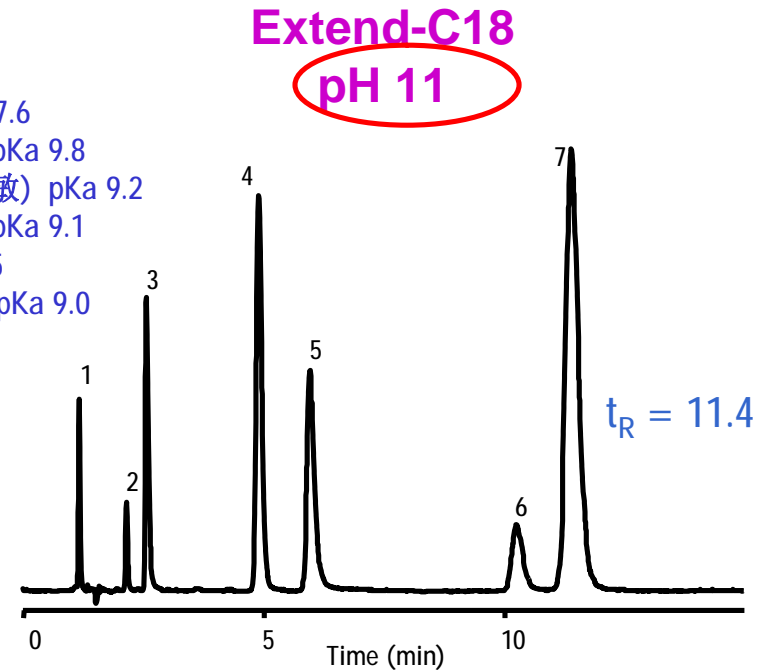
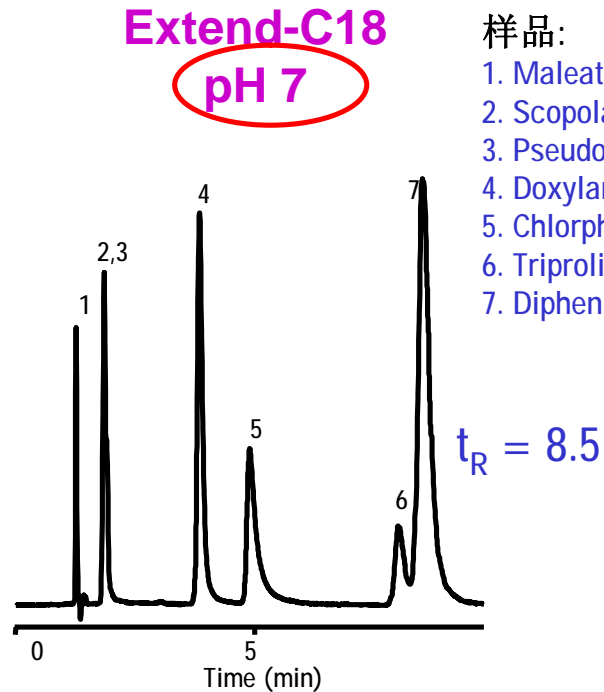


Zorbax Extend C18高pH流动相 分析碱性成分

色谱柱: ZORBAX Extend-C18, 4.6 x 150 mm, 5 mm

流动相: 30% 缓冲液: 70% MeOH pH 7 缓冲液 20 mM Na₂HPO₄ pH 11 缓冲液 20 mM TEA

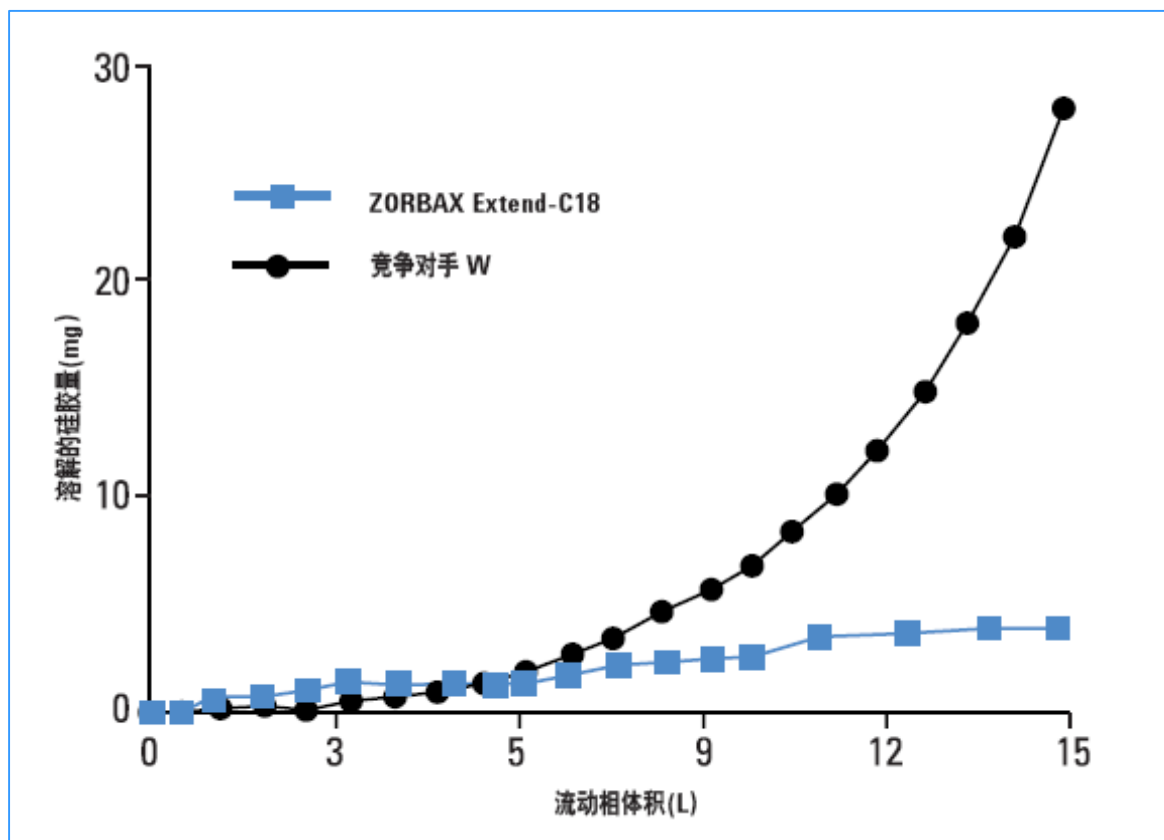
流速: 1.0 mL/min 温度: RT 检测器: UV 254 nm



高PH下,EXTEND C18可增加碱性化合物的保留及改善碱性成分峰形

ZORBAX Extend-C18 HPLC色谱柱

—— Extend-C18 在高pH有长的柱寿命



色谱柱: ZORBAX Extend-C18
4.6 x 150 mm
部件号 773450-902

流动相: 20%甲醇
80% 0.1 M 碳酸缓冲液, pH 10.0

流速: 1.0 mL/min

温度: 室温

Zorbax Extend C18色谱柱

Zorbax Extend (80Å)色谱柱

填料粒径: 1.8 μm , 3.5 μm , 5 μm

色谱柱规格: 内径(mm): 1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 21.2

长度(mm): 30, 50, 100, 150, 250

Zorbax Extend (300Å)色谱柱

填料粒径: 3.5 μm , 5 μm

色谱柱规格: 内径(mm) : 2.1, 4.6

长度(mm) : 50, 100, 150, 250

以及毛细管柱规格。

Zorbax主要键合相技术介绍

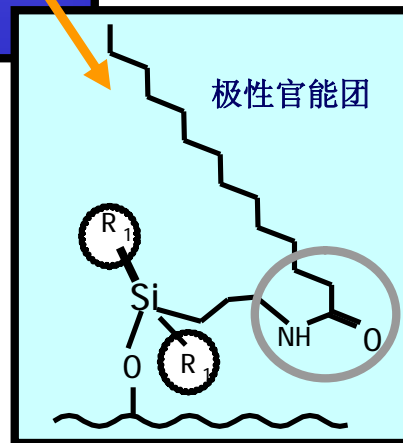
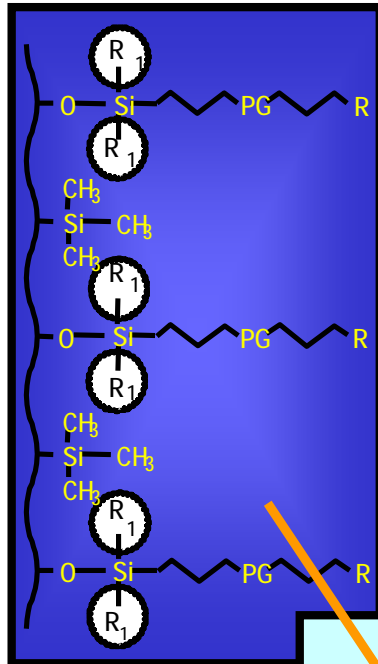
üZorbax Eclipse XDB/Plus键合相

üZorbax StableBond 键合相

üZorbax Extend 键合相

üZorbax Bonus RP 键合相

C18键合相的另一种选择



Zorbax Bonus-RP

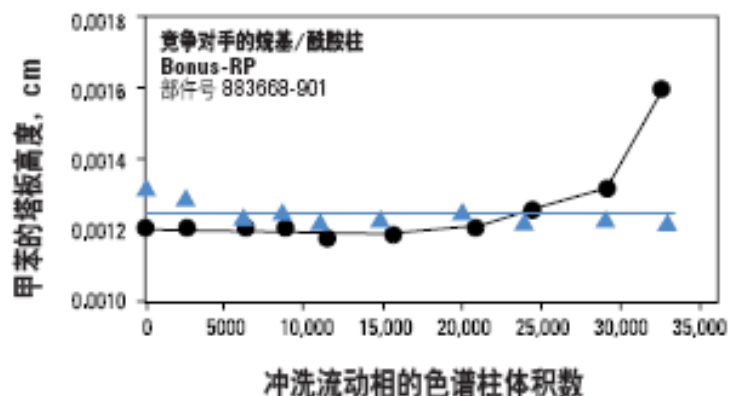
- 极性酰胺键合相：与普通C18键合相相比，具有独特的选择性，耐受高水相比例
- 空间位阻保护键合相和三封端：增强低 pH 稳定性，碱性化合物峰形良好

Zorbax Bonus-RP C18

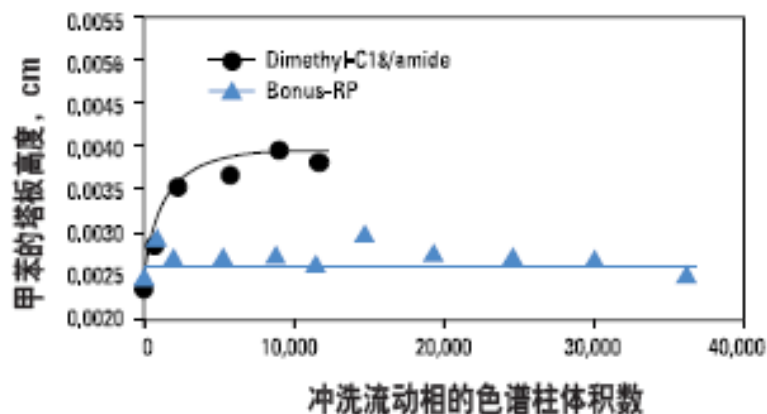
pH: 2~9
温度: $\leq 60^{\circ}\text{C}$
碳覆盖率: 9.5%
表面积: $180\text{m}^2/\text{g}$
粒径: $3.5, 5\ \mu\text{m}$
孔径: $80\ \text{\AA}$
键合试剂: C18
封端: 三

ZORBAX Bonus-RP HPLC色谱柱在中低pH值的稳定性测试

在低pH和中等pH时，ZORBAX Bonus-RP很稳定



二甲基-C18/酰胺
Bonus-RP
部件号 883668-901



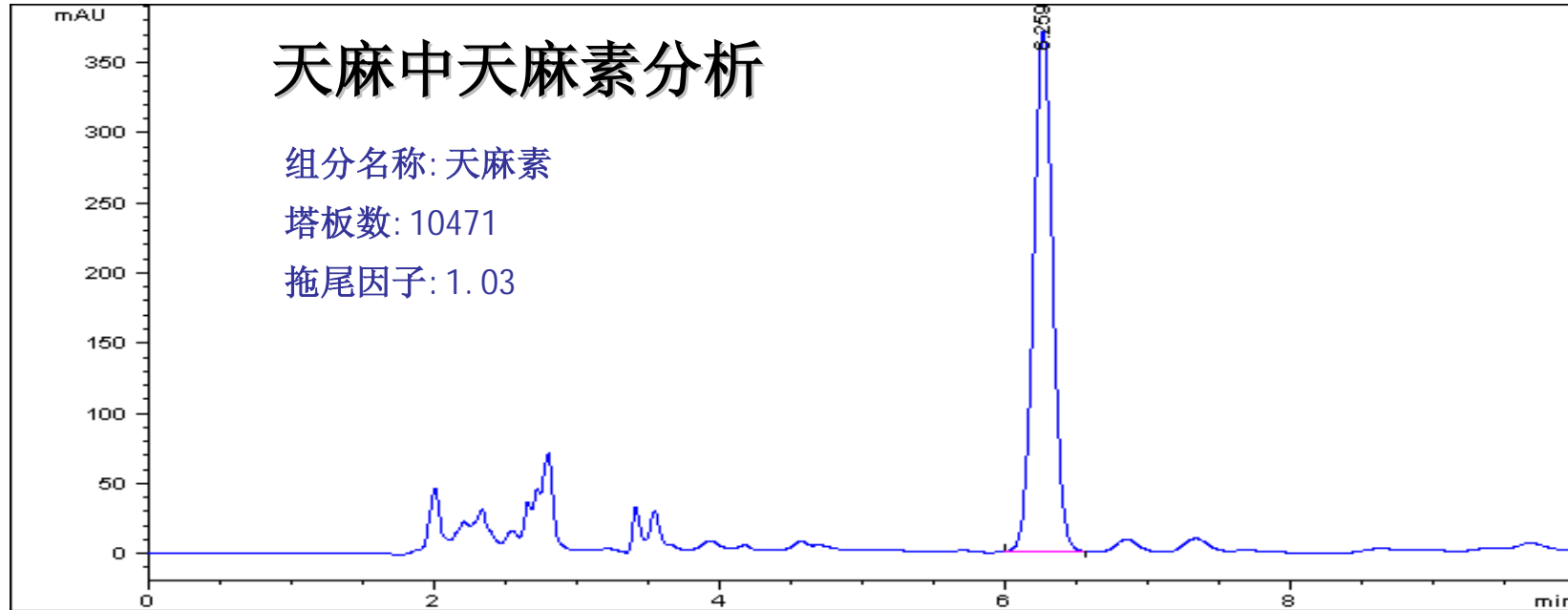
色谱柱: 4.6 x 150 mm
 流动相: 60% 25 mM 磷酸盐缓冲液
 pH 7.0:40% ACN
 流速: 1.5 mL/min
 温度: 23°C

Bonus-RP的三封端增强了在pH7的稳定性，每10,000倍柱体积约相当于一个月的工作时间。

立体保护侧基比类似的极性烷基键合相在低pH时稳定性更高和色谱柱寿命更长。

色谱柱: 4.6 x 150 mm
 流动相: 50% 甲醇
 冲洗柱: 50% 0.1%三氟乙酸(TFA)
 流速: 1.0 mL/min
 温度: 60°C
 流动相: 80%甲醇
 测试: 20%水
 流速: 1.0 mL/min
 温度: 23°C

Zorbax Bonus-RP ---可用于100%水相的色谱柱



色谱条件:

色谱柱: **Zorbax Bonus RP, 4.6' 250mm, 5mm (880688-901)**

柱温: 35°C

流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液 (4:96)

检测波长: 220nm

流速: 1.0mL/min

进样体积: 10ml

仪器配置:

四元泵带真空脱气机 (G1354A)

自动进样器 (G1367A)

柱温箱 (G1316A)

紫外检测器 (G1314A)

仪器控制及数据处理: **Agilent Chemstation**



Agilent Technologies

Group/Presentation Title
Agilent Restricted

Bonus-RP与XDB-C8和SB-C8的不同的选择性

流动相:

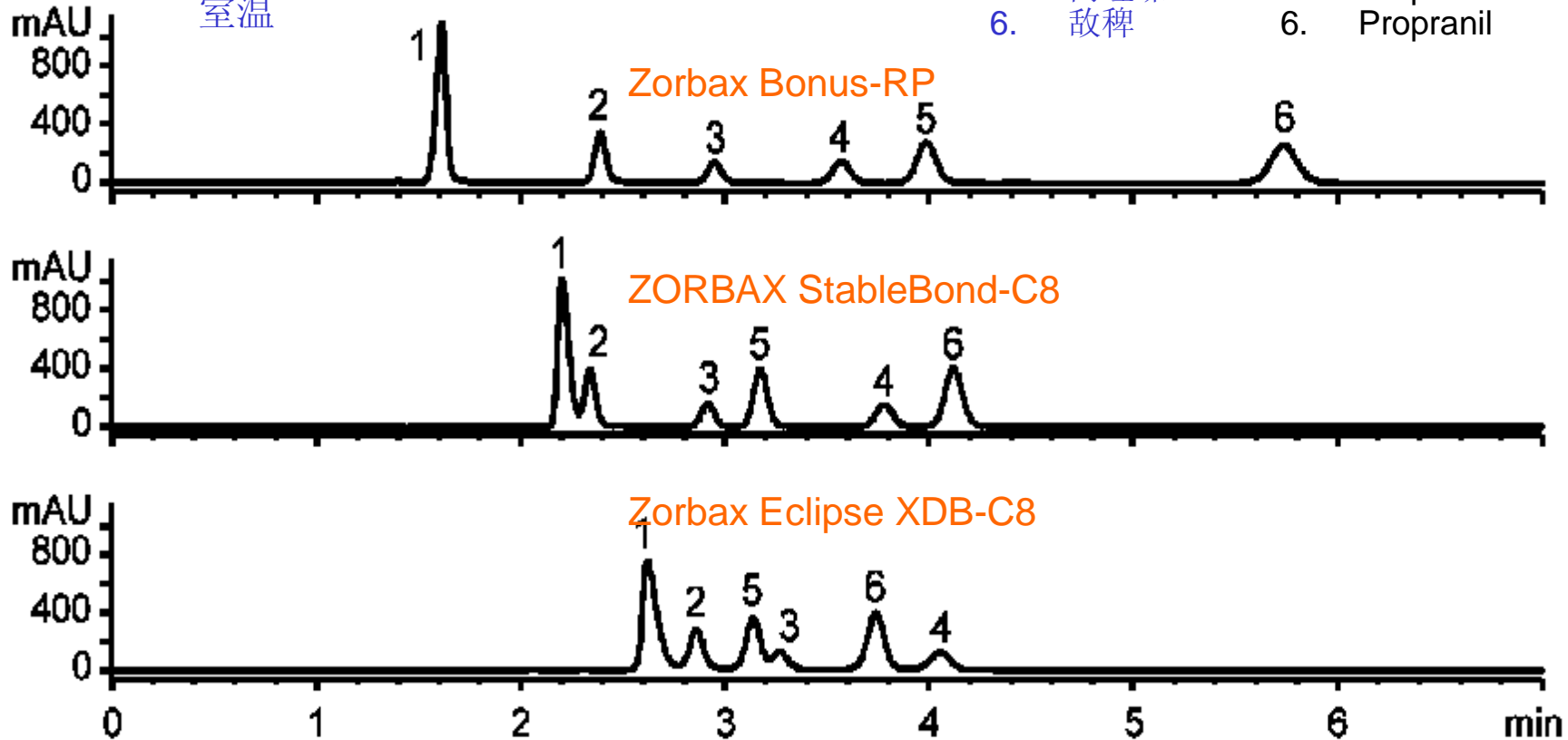
甲醇: 0.1%三氟乙酸 = 70: 40

UV: 254 nm

流速: 2 mL/ min.

室温

- | | |
|----------|----------------|
| 1. 扑草净 | 1. Prometryne |
| 2. 特丁塞草隆 | 2. Tebuthiuron |
| 3. 萎去津 | 3. Atrazine |
| 4. 敌草隆 | 4. Diuron |
| 5. 丙唑嗪 | 5. Propazine |
| 6. 敌稗 | 6. Propranil |



Zorbax Bonus-RP 色谱柱

填料粒径: 1.8 μm , 3.5 μm , 5 μm , 7 μm

色谱柱规格: 内径(mm) 1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 21.2

柱长(mm) 30, 50, 75, 100, 150, 250

分析柱, 快速分离柱, 节省溶剂柱, 窄径柱, 微径柱, 制备柱

ZORBAX主要反相键合相

系列	StableBond	Eclipse Plus	Eclipse XDB	Extend	Bonus-RP
键合相	C18, C8, C3, Phenyl, CN, AQ	C18, C8, PAH, phenyl-hexyl	C18, C8, Phenyl, CN	C18	C18
粒径	1.8, 3.5, 5, 7 μ m	1.8, 3.5, 5 μ m	1.8, 3.5, 5, 7 μ m	1.8, 3.5, 5 μ m	3.5, 5, 7 μ m
内径	毛细管柱, 1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 9.4, 21.2mm	2.1, 3.0, 4.6mm	1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 9.4, 21.2mm	毛细管柱, 1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 21.2mm	1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 21.2mm
柱长	20, 30, 50, 75, 100, 150, 250mm	30, 50, 75, 100, 150, 250mm	20, 30, 50, 75, 100, 150, 250mm	30, 50, 100, 150, 250mm	30, 50, 75, 100, 150, 250mm
耐受pH范围	1~8	2~9	2~9	2~11.5	2~9
特点	低pH流动相极其优异的稳定性; 丰富的键合相选择	方法开发首选柱, 对于碱性化合物峰形优异	方法开发首选柱, 对于碱性化合物峰形优异	高pH流动相优异的稳定性	独特的选择性; 高水相分离碱性化合物



主要内容

üZorbax液相色谱柱介绍

üZorbax反相色谱柱选择建议

色谱柱的选择

已知方法:

键合相的选择

色谱柱耐受范围

选择性

色谱柱规格的选择

检测要求

分离规模

分析时间及溶剂节

省

未知方法:
参见<色谱
柱的方法开
发>部份



Agilent Technologies

在已知方法中如何选择HPLC色谱柱

举例2005版药典方法：

pH 值应为 2.0~3.0。

盐酸氨溴索片
Yansuan Anxiusuo Pian

Ambroxol Hydrochloride Tablets

本品含盐酸氨溴索($C_{13}H_{18}Br_2N_2O \cdot HCl$)应为标示量的 95.0%~105.0%。

【性状】 本品为白色或类白色片。

【鉴别】 (1)在含量测定项下记录的色谱图中,供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

(2)取溶出度项下的溶液,照紫外-可见分光光度法(附录 IV A)测定,在 244nm 与 308nm 的波长处有最大吸收。

色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以 0.01mol/L 磷酸氢二铵溶液(用磷酸调节 pH 值 7.0)-乙腈(50 : 50)为流动相;检测波长为 248nm。取盐酸氨溴索对照品约 5mg,加甲醇 0.2ml 溶解,再加甲醛溶液(1→40)40 μ l,摇匀,置 60 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,氮气吹干。残渣用水溶解,再加流动相稀释至 20ml,取 20 μ l 注入液相色谱仪,按氨溴索与杂质 B(相对保留时间约为 0.8)的分离度应大于 4.0。

现代
ZORBAX柱*

Eclipse XDB

StableBond

StableBond Aq

ZORBAX Rx-C18

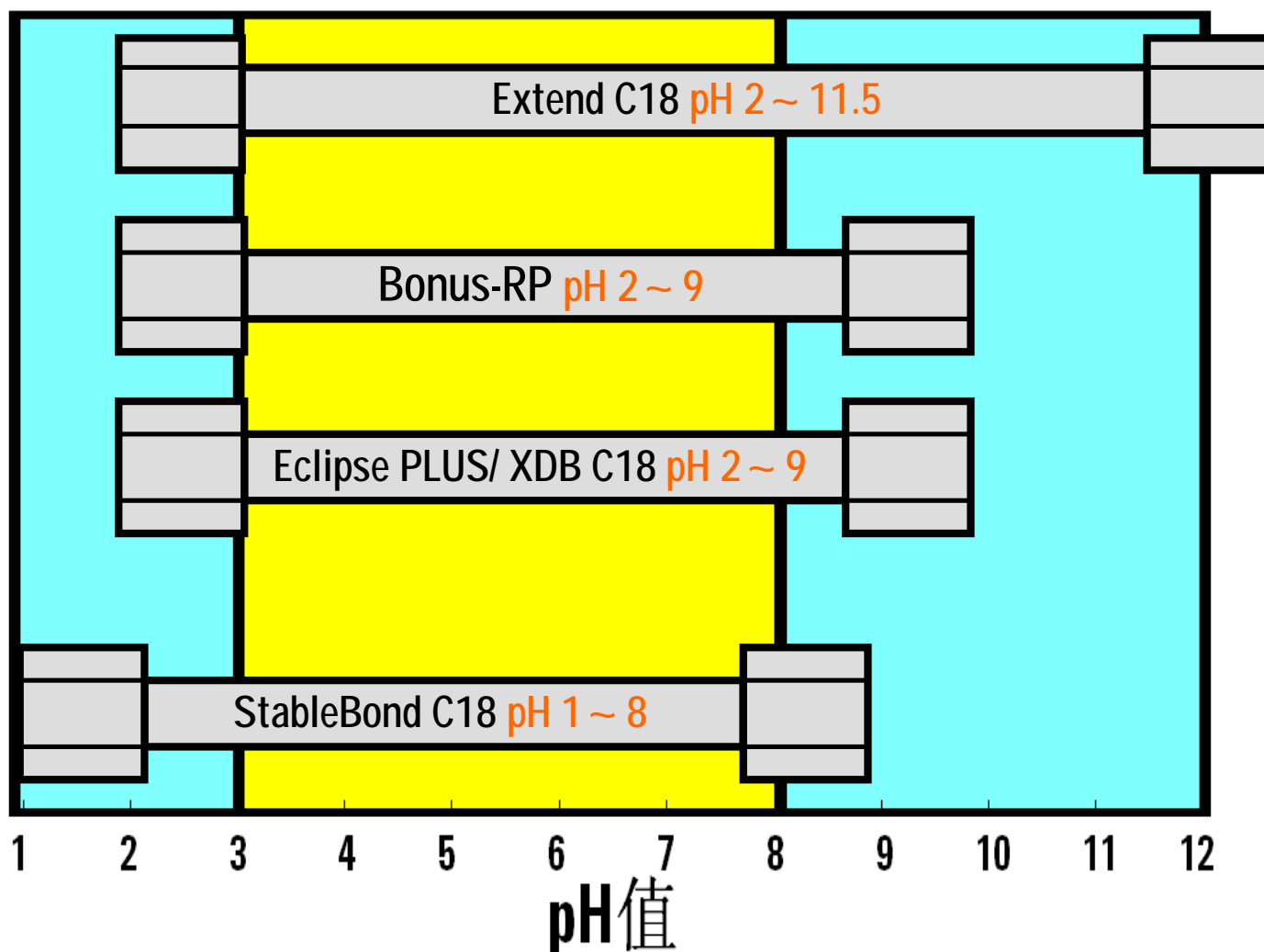
Bonus-RP

Extend-C18



C18柱

液相柱---pH选择策略



对于一个已知方法，选择色谱柱的首要思路应先从色谱条件尤其是流动相的pH值入手，考虑色谱柱所能耐受的流动相范围及柱温，这是保证方法稳定的基础和关键。

安捷伦常见的液相色谱柱pH适用范围、温度，保存建议

键合相	pH 适用范围	温度上限	长期保存建议
Zorbax 300SB C18	1~8	90°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax SIL	0.8~8	∞	100% 乙腈
Zorbax NH ₂	2~7.5	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax CN	2~8	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax ODS	2~8	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax C8	2~8	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax TMS	2~7	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax Carbohydrate	2~7.5	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax 300SCX	2~6.5	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Zorbax SAX	2~7	40°C (pH < 6)	100% 乙腈
Agilent TC C18	2~8	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Agilent HC-C18	2~9	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Agilent HC-C8	2~8	60°C (pH < 6)	100% 乙腈
Agilent Prep-C18	2~10	60°C (pH < 6)	100% 乙腈

在已知方法中如何选择HPLC色谱柱

在确定该方法选用**C18**固定相后，
请注意其所使用的流动相范围。

色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以 0.01mol/L 磷酸氢二铵溶液(用磷酸调节 pH 值至 7.0)-乙腈(50 : 50)为流动相；检测波长为 248nm。取盐酸氨溴索对照品约 5mg，加甲醇 0.2ml 溶解，再加甲醛溶液(1→40)μl，摇匀，置 60℃ 加热 5 分钟，氮气吹干。残渣用水溶解，再加流动相稀释至 20ml，取 20μl 注入液相色谱仪，氨溴索与杂质 B(相对保留时间约为 0.8)的分离度应大于 0。

pH 值应为 2.0~3.0。

盐酸氨溴索片
Yansuan Anxiusuo Pian
Ambroxol Hydrochloride Tablets

本品含盐酸氨溴索($C_{13}H_{18}Br_2N_2O \cdot HCl$)应为标示量的 95.0%~105.0%。

【性状】 本品为白色或类白色片。

【鉴别】 (1)在含量测定项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

(2)取溶出度项下的溶液，照紫外-可见分光光度法(附录 IV A)测定，在 244nm 与 308nm 的波长处有最大吸收。

现代
ZORBAX柱*

Eclipse XDB

StableBond

StableBond Aq

ZORBAX Rx-C18

Bonus-RP

Extend-C18

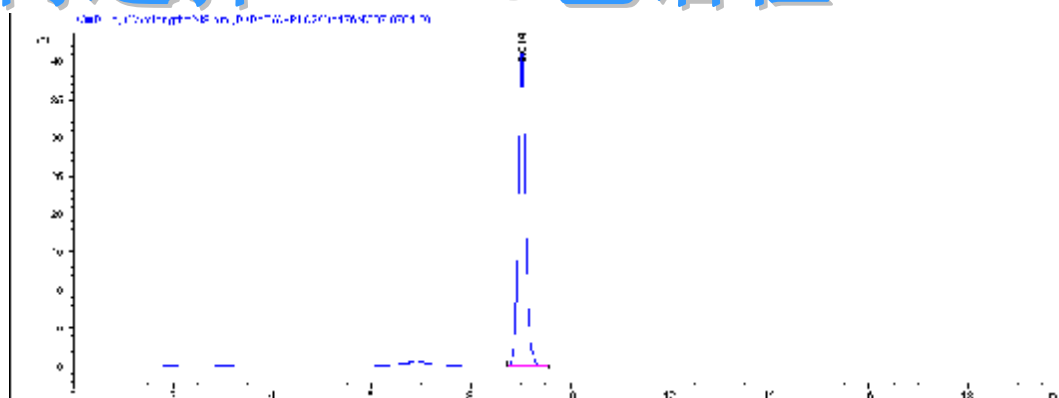


Eclipse系列是Zorbax色谱柱中在中等pH值首推的一款色谱柱。因此从Eclipse开始试起。

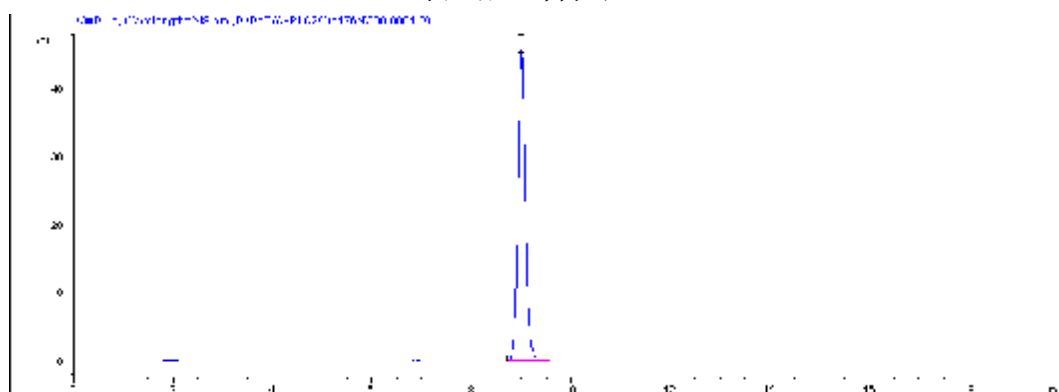


Agilent Technologies

在已知方法中如何选择HPLC色谱柱



对照品谱图



实际样品谱图

色谱条件:

色谱柱: Agilent Zorbax XDB-C18

4.6×250mm, 5 μ m (部件号: 990967-902)

流动相: 乙腈: 0.01mol/L 磷酸二氢铵 (以磷酸
调节 pH 为 7.0) =50:50

流速: 1.0mL/min 柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测: 248nm 进样量: 20 μ L

组分名称 (样品品谱图)	保留时间 (min)	峰面积 (mAU*s)	塔板数 (N)	分离度 (Rs)	拖尾因子 (USP Tf)
盐酸氨溴索 Ambroxol Hydrochloride	9.00	490.6	16992	/	1.10

在已知方法中如何选择HPLC色谱柱

举例：

大 黄

Dahuang

RADIX ET RHIZOMA RHEI

本品为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎。秋末茎叶枯萎或次春发芽前采挖，除去细根，刮去外皮，切瓣或段，绳穿成串干燥或直接干燥。

【含量测定】 照高效液相色谱法（附录Ⅵ D）测定。

色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-0.1%磷酸溶液(85：15)为流动相；检测波长为 254nm。理论板数按大黄素峰计算应不低于 3000。

现代
ZORBAX柱*

Eclipse XDB

StableBond

StableBond Aq

ZORBAX Rx-C18

Bonus-RP

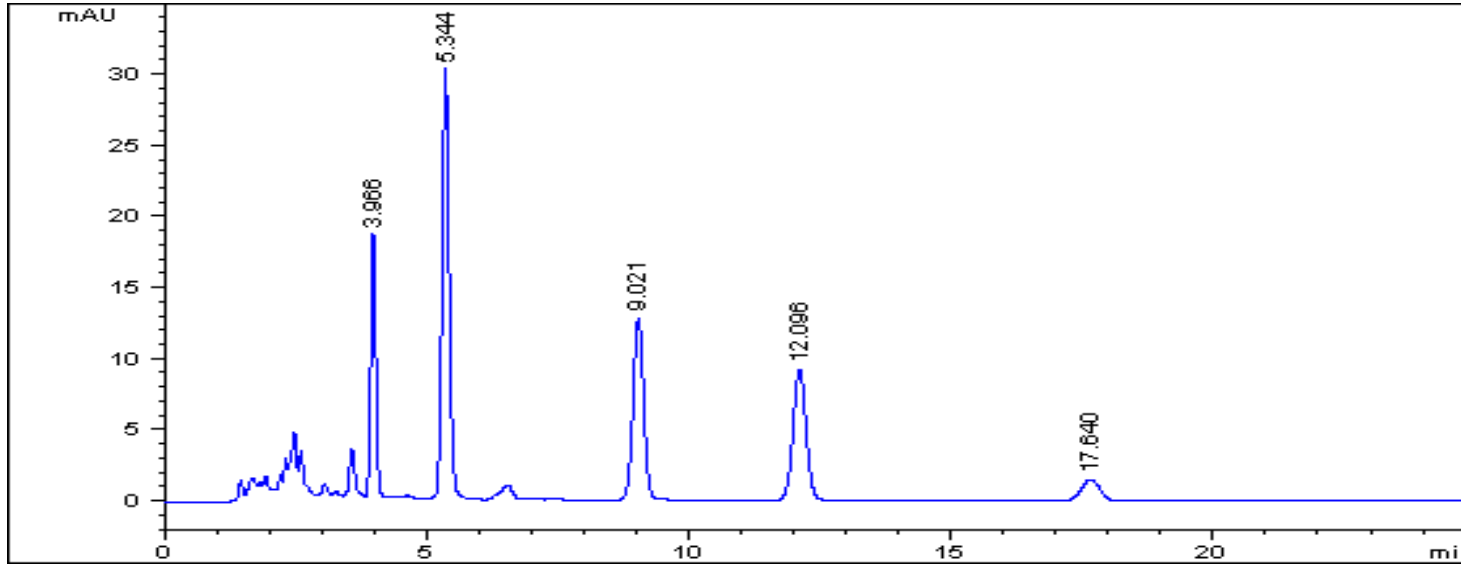
Extend-C18



SB-C18

低pH流动相，使用SB C18能提供最佳的稳定性。

在已知方法中如何选择HPLC色谱柱



色谱条件:

色谱柱: Zorbax SB C18 4.6×150mm

5μm (883975-902)

柱温: 25°C

流动相: 甲醇-0.6%磷酸 (75:25)

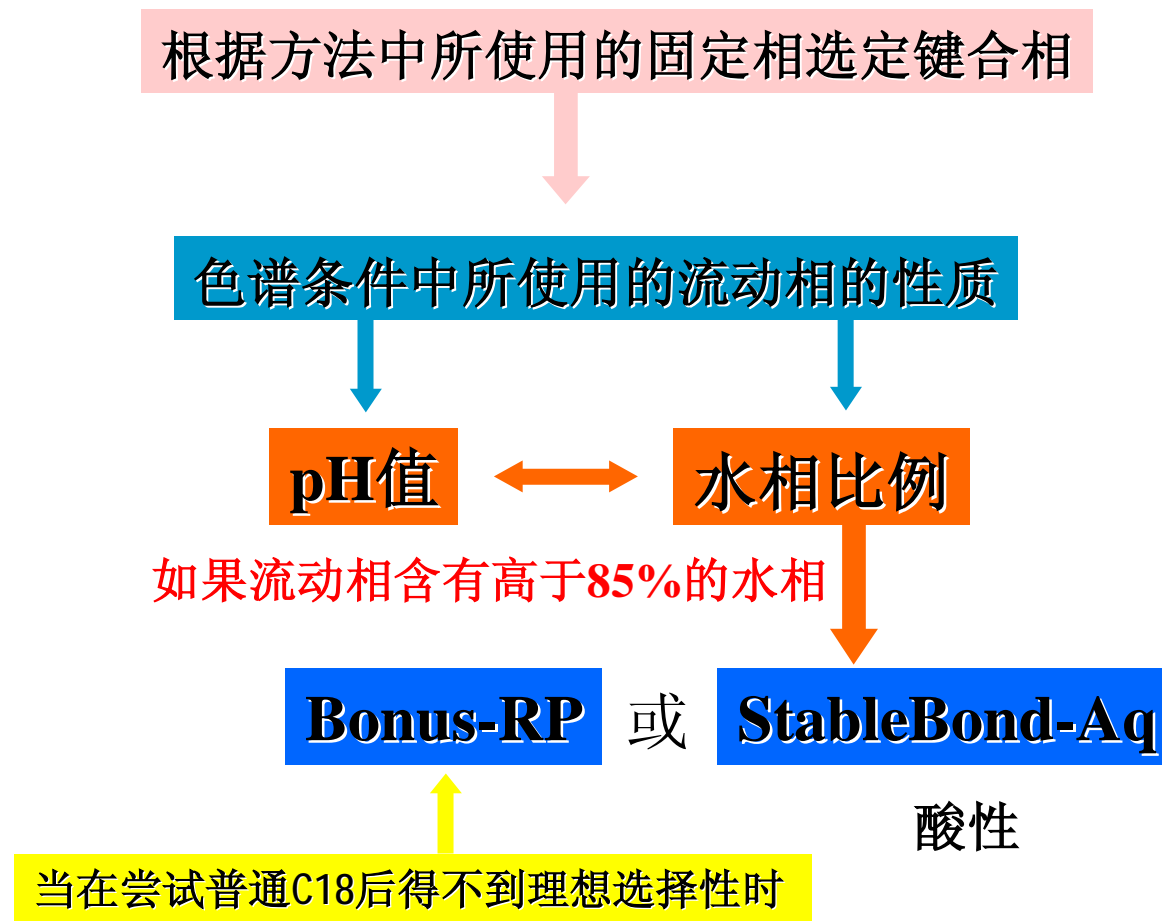
检测波长: 254nm

流速: 1.0ml/min

进样体积: 5μl

组分名称	k'	保留时间 (min)	峰高 (mAU)	峰面积 (mAU*s)	塔板数	拖尾因子
大黄素	5.014	9.021	12.78	177.8	10115	1.02
大黄酚	7.064	12.096	9.23	158.8	11586	1.01
大黄酸	2.563	5.344	30.28	281.2	8174	1.09
芦荟大黄素	1.644	3.966	18.45	123.5	8387	1.06
大黄素甲醚	10.76	17.64	1.49	37.0	11579	1.00

在已知方法中如何选择HPLC色谱柱



色谱柱的选择

已知方法:

键合相的选择

色谱柱耐受范围

选择性

色谱柱规格的选择

检测要求

分离规模

分析时间及溶剂节

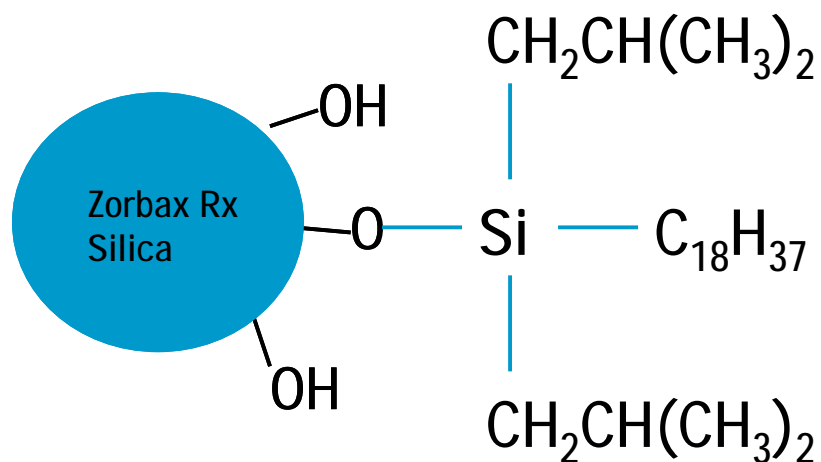
省

未知方法:
参见<色谱
柱的方法开
发>部份



Agilent Technologies

Zorbax 液相色谱柱: StableBond or Eclipse?



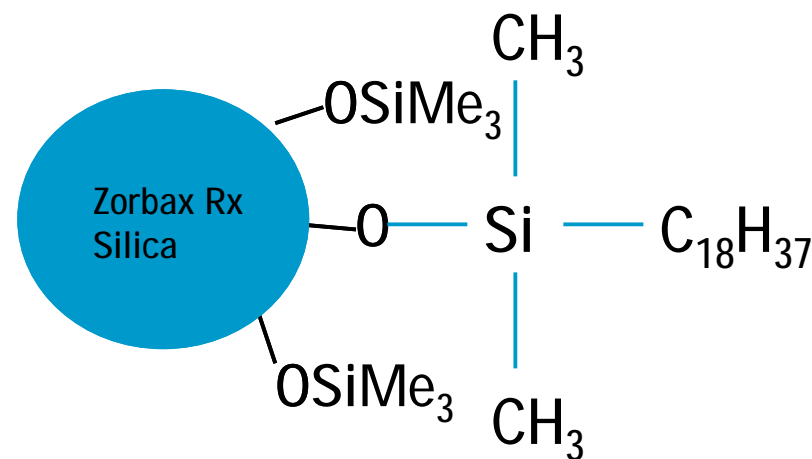
StableBond

立体保护键合技术

不封端

6 种键合相

StableBond: 推荐低pH下使用, 保证长寿命
Eclipse: 推荐 pH范围在 2 – 9之间使用



Eclipse Plus/XDB

致密键合相

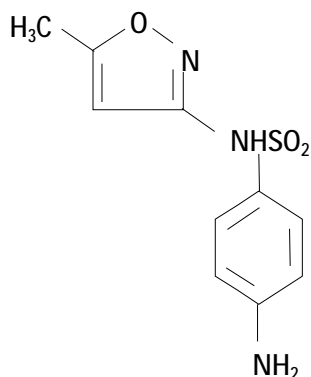
双封端

Plus三种键合相 XDB 四种键合相

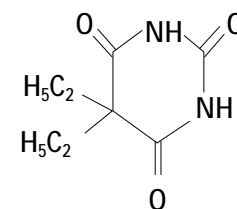
Zorbax 液相色谱柱选择性比较

—— 酸碱混合物分离

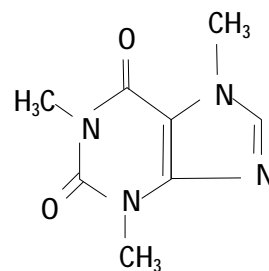
Sulfamethoxazole
Acid (pKa 5.6)



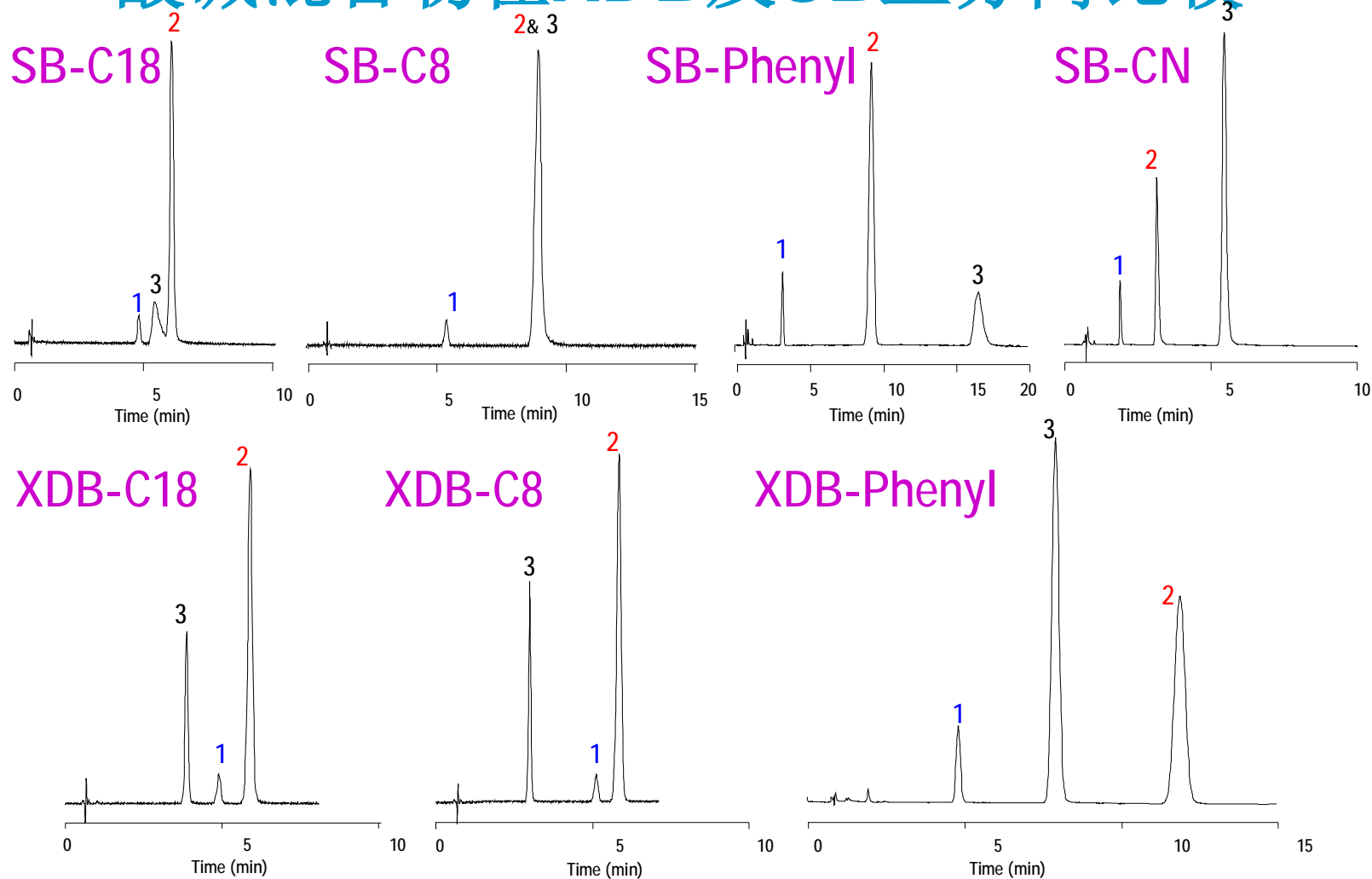
Barbital
Neutral (pKa 8.0)



Caffeine
Base (pKa 14.0)



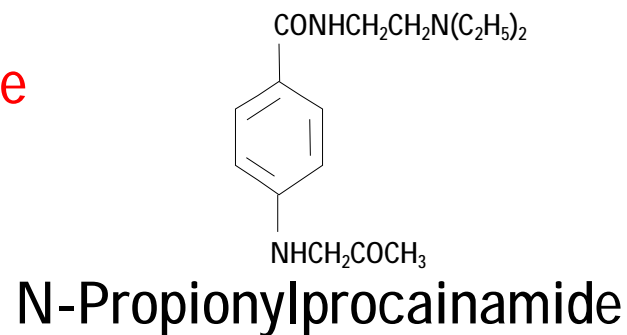
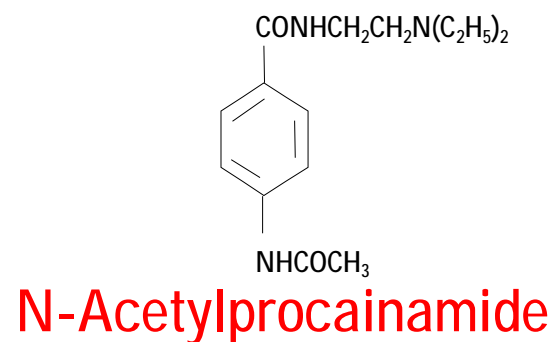
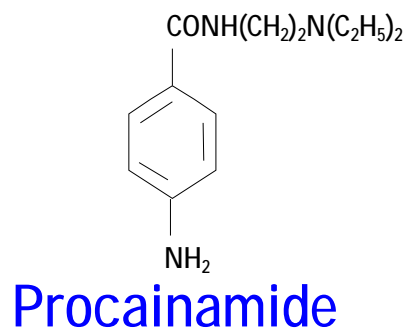
酸碱混合物在XDB及SB上分离比较



(1) Barbital (2) Sulfamethoxazole (3) Caffeine

Columns: 4.6 x 75 mm, 3.5 μm Mobile Phase: 80% 25 mM NaH_2PO_4 , pH 3.0 : 20% MeOH Flow Rate: 1.0 mL/min Temperature: 35° C
Detection: UV 254 nm

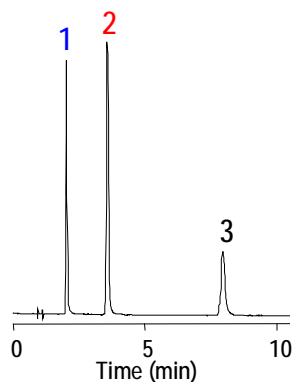
分离 Procainamides 不同的键合相选择性比较



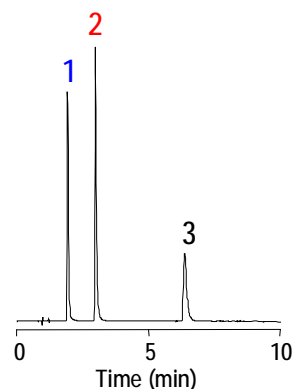
Increasing Hydrophobicity

XDB分离Procainamides

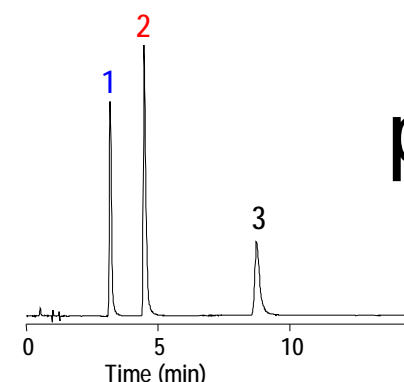
XDB-C18



XDB-C8



XDB-Phenyl



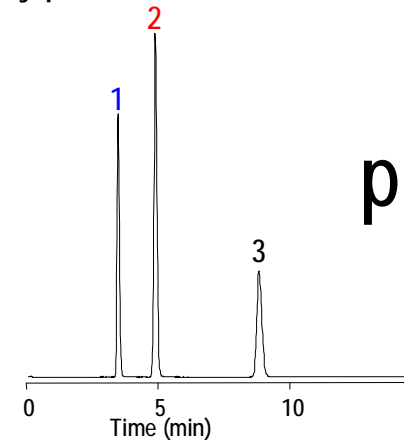
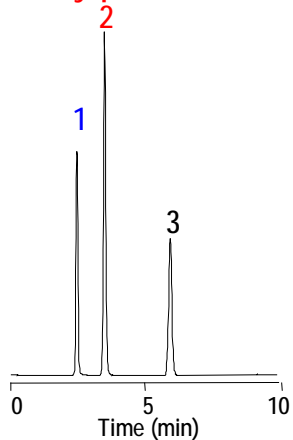
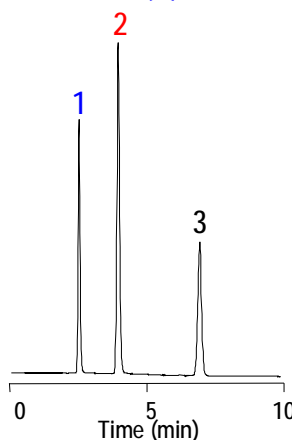
pH 7

Columns: 4.6 x 150 mm, 5 μ m Mobile Phase: 90% 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0 : 10% MeOH Flow Rate: 1.5 mL/min Temperature: 35° C Detection: UV 254 nm

(1)Procainamide

(2)N-Acetylprocainamide

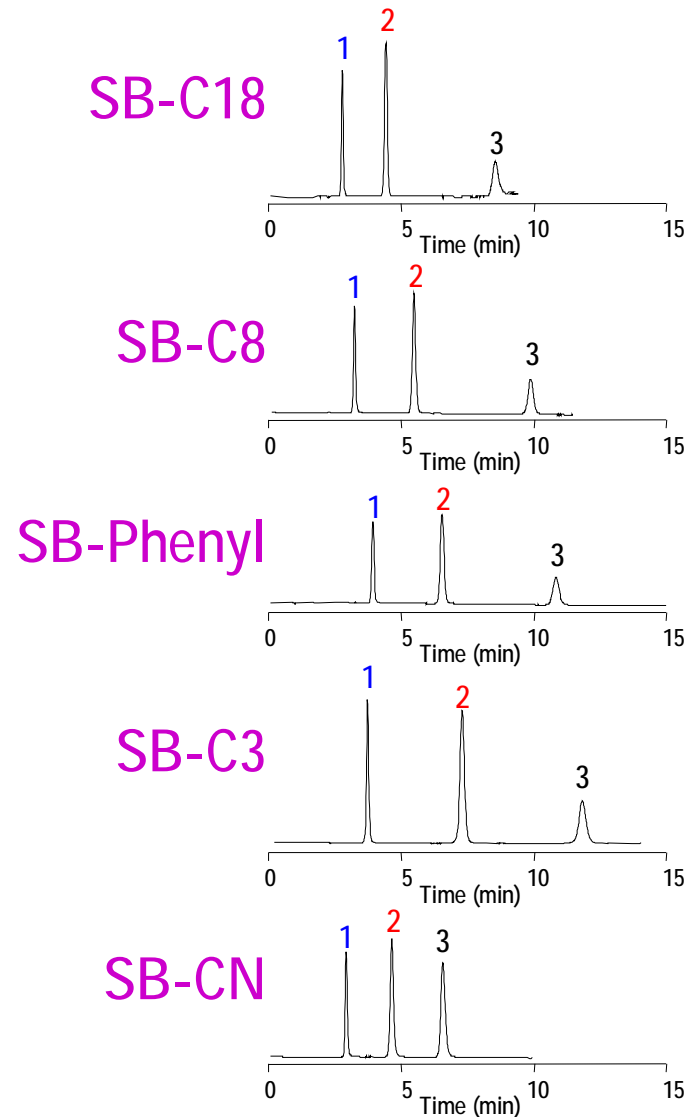
(3)N-Propionylprocainamide



pH 3.5

Columns: 4.6 x 150 mm, 5 μ m Mobile Phase: 90% 20 mM KH₂HPO₄, pH 3.5 : 10% AcN Flow Rate: 1.0 mL/min Temperature: 35° C Detection: UV 254 nm

StableBond分离Procainamides



pH 3.5

(1) Procainamide

(2) N-Acetylprocainamide

(3) N-Propionylprocainamide

Columns: 4.6 x 150 mm, 5 μ m

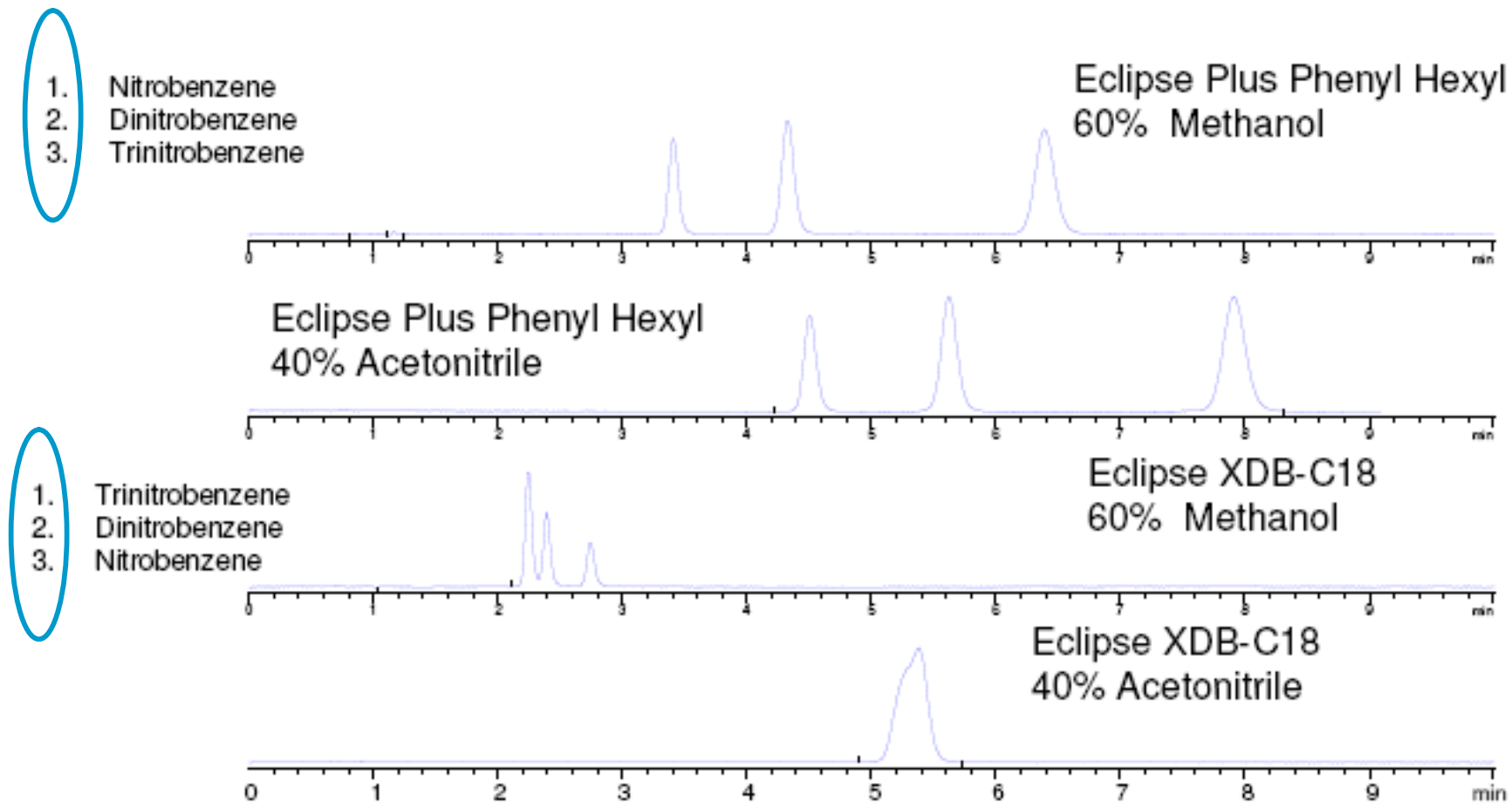
Mobile Phase: 90% 20 mM KH_2HPO_4 , pH 3.5 : 10% AcN

Flow Rate: 1.0 mL/min

Temperature: Ambient

Detection: UV 254 nm

苯基-己基柱提供与C18/C8不同的选择性



Zorbax反相色谱柱选择的建议

General guidance on choosing a column based on sample type

较强极性	极性	中等极性	弱极性
SB-Aq Bonus-RP SB-C8 Eclipse XDB-Phenyl	Eclipse Plus/XDB-C8/C18 Eclipse XDB-CN Eclipse XDB-Phenyl SB-C3	Eclipse Plus/ XDB-C18 Eclipse Plus/ XDB-C8 Eclipse XDB-CN Eclipse XDB-Phenyl SB - all	Eclipse Plus XDB-C8 Eclipse Plus/ XDB-C18 Eclipse XDB-CN SB-C8 SB-C18

Other columns will work in some cases and could provide a better separation, depending on the actual analytes and excipients present in the sample.

结论：色谱柱的键合相选择，主要从色谱柱的耐受性出发。而对于化合物选择性，流动相和色谱柱键合相不同，都会产生差异。

色谱柱的选择

已知方法:

键合相的选择

色谱柱耐受范围
选择性

色谱柱规格的选择

检测要求
分离规模
分析时间及溶剂节

省

未知方法:
参见<色谱
柱的方法开
发>部份



Agilent Technologies

Zorbax 色谱柱的选择

键合相的选择

色谱柱耐受范围

选择性

色谱柱规格的选择

检测要求



通常质谱、ELSD检测器要求提供窄内径的色谱柱，如2.1 mm, 3.0mm。

按分离规模来选择

色谱柱类型		内径 (mm)	上样量	流速 (ml/min)	灵敏度提高	应用范围
微型柱	毛细管柱 (填充或开管)	0.5, 0.3	1~10mg	1~15 ul/min	+++++	较高灵敏度, LCMS, 多肽, 蛋白
	微径柱	1.0	10~50 mg	10~100 ml/min	++++	高灵敏度, LCMS
	纳流柱 (填充或开管)	0.1, 0.075	100~200ng	200~500 nl/min	+++++++	较高灵敏度, LCMS, 多肽, 蛋白
分析柱	窄径柱	2.1	50~120 mg	0.1~0.5	++	高灵敏度, LCMS, 节省溶剂
	溶剂节省柱	3.0	150~500 mg	0.3~1.5	+	分析, 节省溶剂
	常规柱	4.0/4.6	0.1~1.5mg	0.5~3		常规分析
制备柱	半制备柱	9.4	1~10mg	5~10		mg级的制备
	制备柱	>20	>20mg	>20		数百mg~g的制备

安捷伦提供各种规格的色谱柱, 请参见消耗品手册。

Zorbax 色谱柱的选择

键合相的选择

色谱柱耐受范围

选择性

色谱柱规格的选择

检测要求

分离规模

分析时间及溶剂节省



节省溶剂或减少分离时间

减小柱内径 ----- 节省溶剂

- 流速改变，但分离时间不变
- 灵敏度提高

减小柱长 ----- 节省时间同时节省溶剂

- 较为简单，但要确保满足所需的分离度

同时减小多种参数-----节省时间同时节省溶剂

- 较短的色谱柱内填充较小粒径的柱填料
 - 快速分离液相色谱柱(3.5um)
 - 高分离度快速分离色谱柱 (1.8 um)

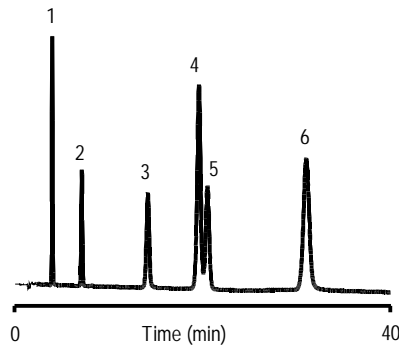
更小内径的色谱柱可以减少溶剂的使用

Column Type	I.D. (mm)	Flow Rate (mL/min)	Typical Flow Rate Range	Particle Sizes (mm)	Applications
Analytical	4.6	1.0	1 – 2.5 mL/min	1.8, 3.5, 5	Analytical
Solvent Saver	3.0	0.42	0.3 – 1.0 mL/min	1.8, 3.5, 5	Analytical, reduce solvent
Narrow Bore	2.1	0.21	0.1 – 0.5 mL/min	1.8, 3.5, 5	LC/MS, reduce solvent
Microbore	1.0	0.047	0.03 – 0.2 mL/min	3.5, 5	Sample limited, LC/MS
Capillary	0.5	0.012	10 – 40 uL/min	3.5, 5	Peptide Mapping, Sample limited LC/MS
Capillary	0.3	4.25 uL/min	2 – 20 uL/min	3.5, 5	Peptide Mapping LC/MS
Nano	0.1	0.473 uL/min	0.1 – 1ul/min	3.5	Proteomics, LC/MS
Nano	0.075	0.266 uL/min	0.1 – 0.6 uL/min	3.5	Proteomics, LC/MS

不同内径的色谱柱分离抗菌药

Column: ZORBAX SB-C18 Mobile Phase*: 20% ACN: 80% Citrate/phosphate pH 2.6 *200/87/713 ACN/0.2M Na₂HPO₄/0.1M citric acid
Temperature: ambient Sample: Antibacterials 1. Sulfamerazine 2. Furazolidone 3. Oxolinic acid 4. Sulfadimethoxine 5. Sulfaquinoxoline 6. Nalidixic acid

SB-C18
4.6 x 150 mm, 5 um



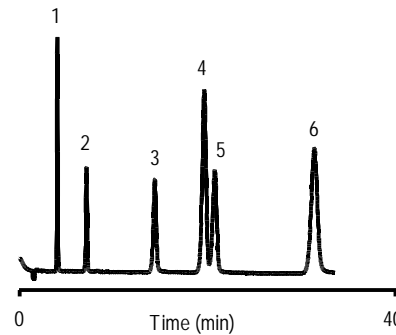
Solvent Used: 31 mL

Flow Rate: 1.0 mL/min

Injected: 3 uL

Detector Cell Volume: 8 uL

Solvent Saver SB-C18
3.0 x 150 mm, 5 um



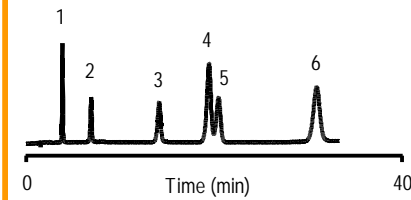
Solvent Used: 15 mL
% Solvent Saved = 52%

Flow Rate: 0.5 mL/min

Injected: 2 uL

Detector Cell Volume: 8 uL

SB-C18
2.1 x 150 mm, 5 um



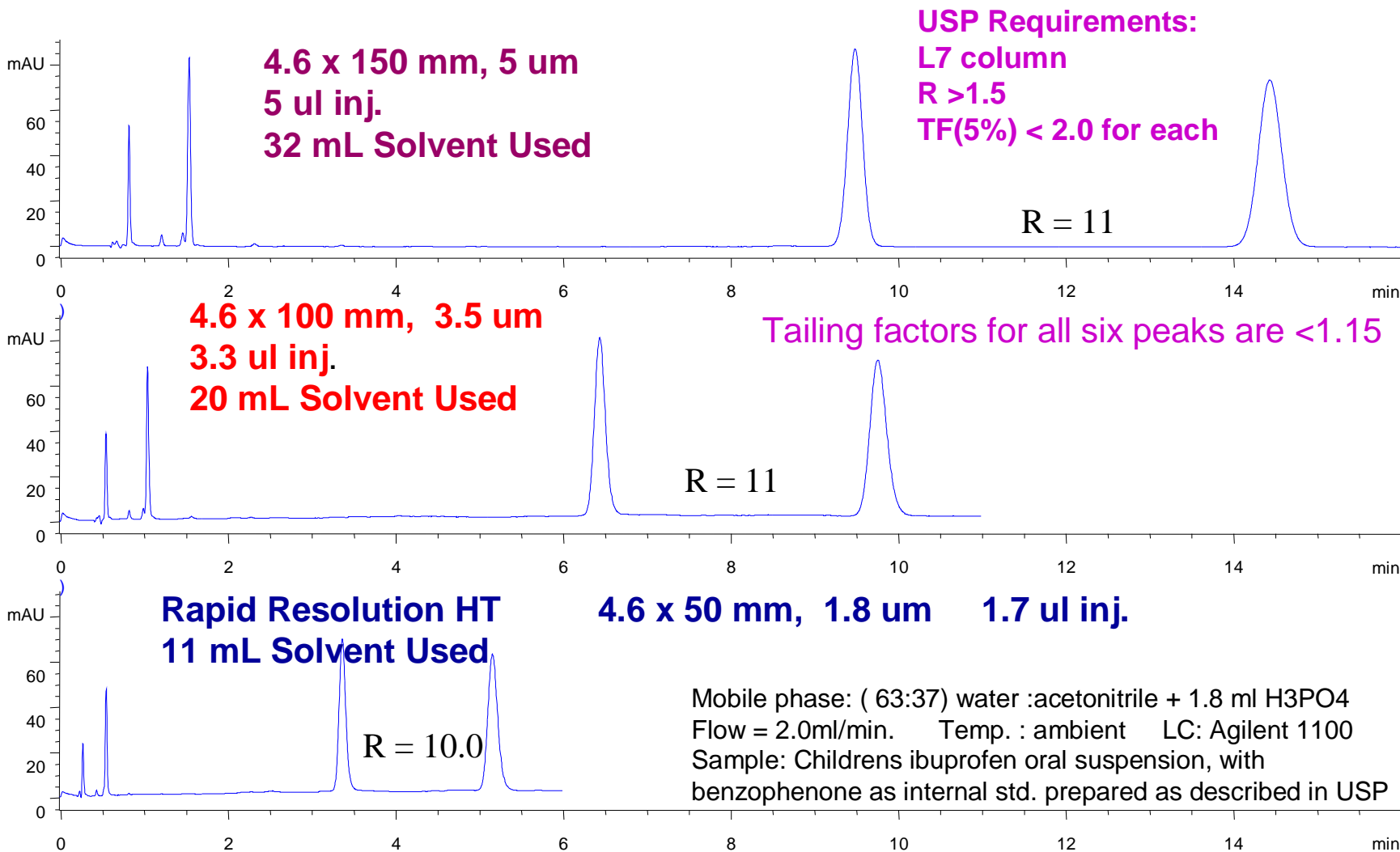
Solvent Used: 8 mL
% Solvent Saved = 74%

Flow Rate: 0.25 mL/min

Injected: 1 uL

Detector Cell Volume: 2 uL

减少色谱柱的柱长及填料粒径 获得快速高分离度的结果并节省溶剂



色谱柱的选择

已知方法:

键合相的选择

色谱柱耐受范围
选择性

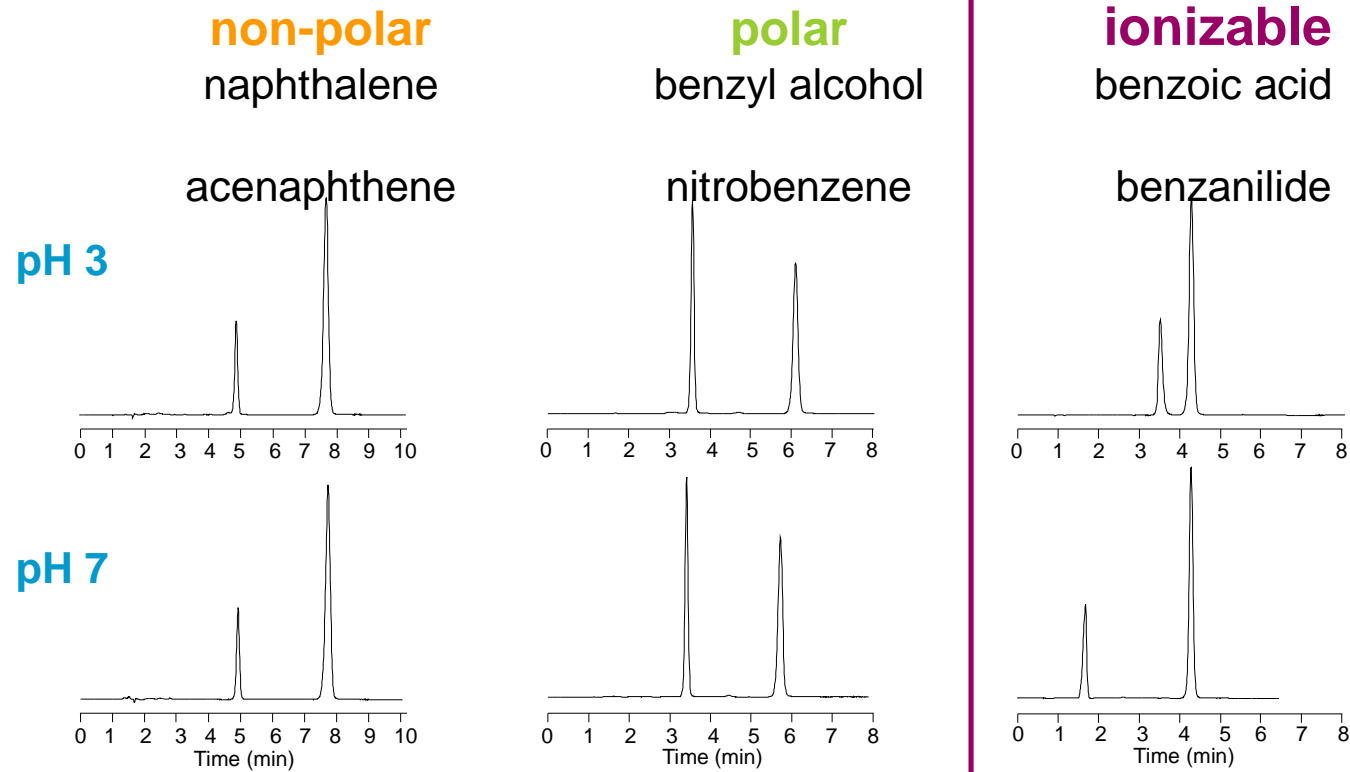
色谱柱规格的选择

检测要求
分离规模
分析时间及溶剂节

省

未知方法:
<色谱柱的
方法开发>
部份
(反相色谱)

pH 什么时候影响分离度？ 化合物类型比较

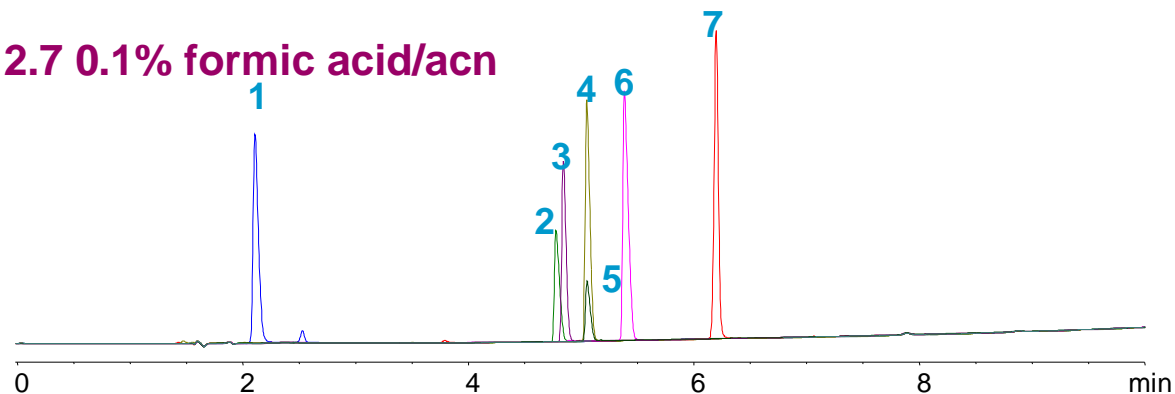


分析离子化的化合物时 改变pH值对于方法开发至关重要

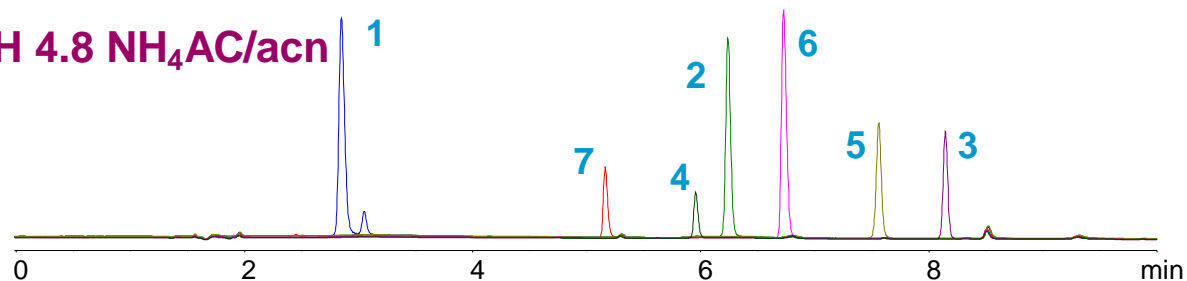
- ∅ 不带电的化合物有较好的保留 (比如酸性化合物在低pH值, 碱性化合物在高pH)
- ∅ 硅胶上的硅羟基在中等pH值时离子化增加对碱性化合物的保留(可以存在离子交换的作用)
- ∅ 在方法开发中选择流动相的pH值优化保留及选择性
- ∅ Eclipse Plus在中等pH范围对碱性化合物的峰形最佳
- ∅ 高pH时可以选择Extend C18,低pH值选择SB色谱柱

流动相pH值变化对选择性的影响

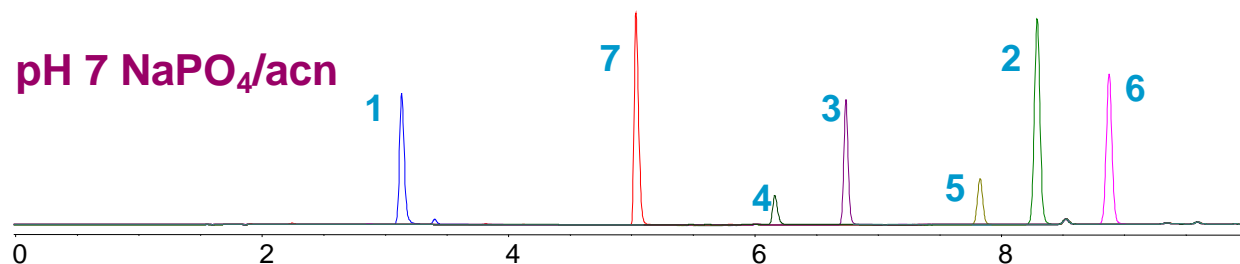
pH 2.7 0.1% formic acid/acn



pH 4.8 NH₄AC/acn



pH 7 NaPO₄/acn



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

Ø可以看出pH值的变化影响了化合物的出峰顺序及分离度。

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

从低pH到高pH范围的方法开发指南

5989-7282CHCN



ZORBAX 色谱柱使您对液相色谱方法开发

充满信心

性能说明一切... 我们行业领先的液相色谱用于碱性、酸性和中性化合物的分析均能得到优异的色谱峰

无论您正在开发新方法还是改进现有的方法.....

安捷伦的 ZORBAX 液相色谱柱在各种应用条件下都能提高您的工作效率, 并获得重现性好的结果, 使您对方法开发具有足够的信心。

ZORBAX Eclipse Plus 液相色谱柱是液相色谱方法开发的首选

这些色谱柱采用先进的工艺制造, 提供以下卓越的性能:

• 具有硅胶基色相色谱柱的长寿命

• 可从 1.8 μm 色相色谱柱大到使用 5 μm 色相色谱柱, 且方法转换可靠, 不需要重新认证

• 您可以选择 Eclipse Plus 快速分离高通量色相色谱柱实现超快速分离

• 承载 ZORBAX 的长寿命和高重现性

用更少的时间分析更多的样品——选择 ZORBAX 快速分离高通量色相色谱柱

获得更高的工作效率、可靠的分析结果, 使您:

• 样品分析速度提高达 20 倍

• 缩短 95% 的分析时间

• 方法易于放大, 且可实现与常规液相色谱分析方法的可靠转换

• 可用粗柱分析复杂的样品

• 用 LC/MS 实现高灵敏度检测稳定性化合物

这一方法开发指南介绍了分析样品中检测物的基本原理, 在宽 pH 范围内, ZORBAX 液相色谱柱可优化分离度——您可以轻松转移和成功地布在我们所提供的各种色相色谱柱中选择适合的色相色谱柱。

从简单的分析到复杂的方法开发, 安捷伦的 ZORBAX 液相色谱柱能保证您每次都能轻松地获得正确的结果。

Our measure is your success.

www.agilent.com/chem/resources

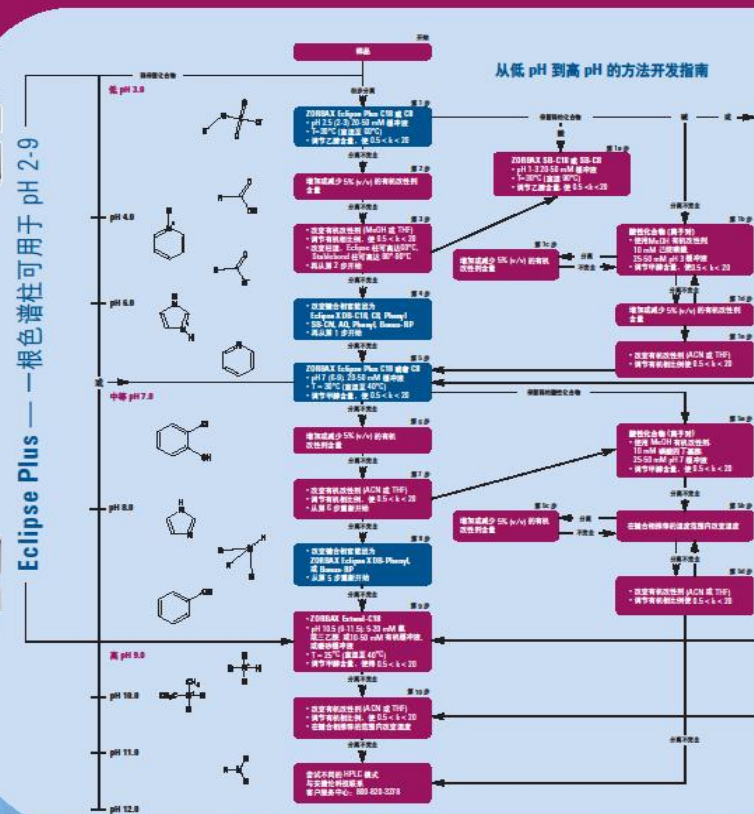


www.agilent.com/chem/hsconnect



产品 | 应用 | 软件 | 服务

Eclipse Plus —— 一根色谱柱可用于 pH 2-9



Agilent Technologies

© 安捷伦科技公司 2007 2007年11月 中国印制 5989-7282CHCN

Agilent Technologies

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方法开发通常从pH3.0开始尝试

Ø如果样品中的某些化合物酸性较强，需要将流动相的pH调节在1-2时，请选择 **SB-C18**

Ø色谱是经验科学，选择性的优化，只能通过不同的键合相来尝试实现。

方法开发步骤2 – 在中等pH值下

从低pH值到中等pH值



Ø在低pH得不到满意的结果时，尝试中等pH,中等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

方法开发步骤3 – 在高pH值下

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碱性较强的样品

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

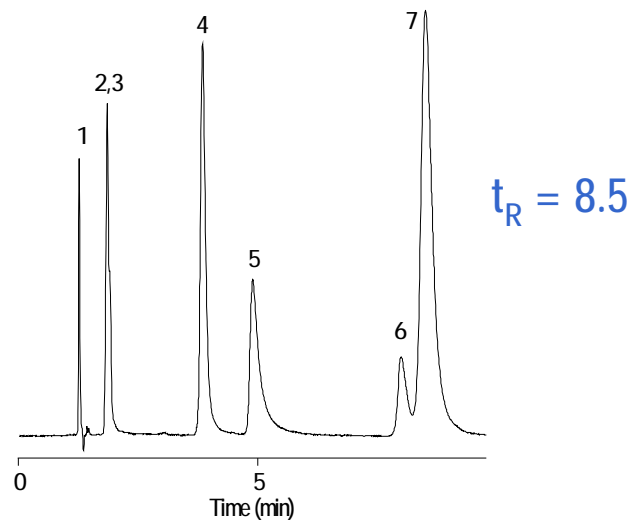
Ø改进选择性

Ø此时，pH一般高于8，唯一的选择只有Extend-C18

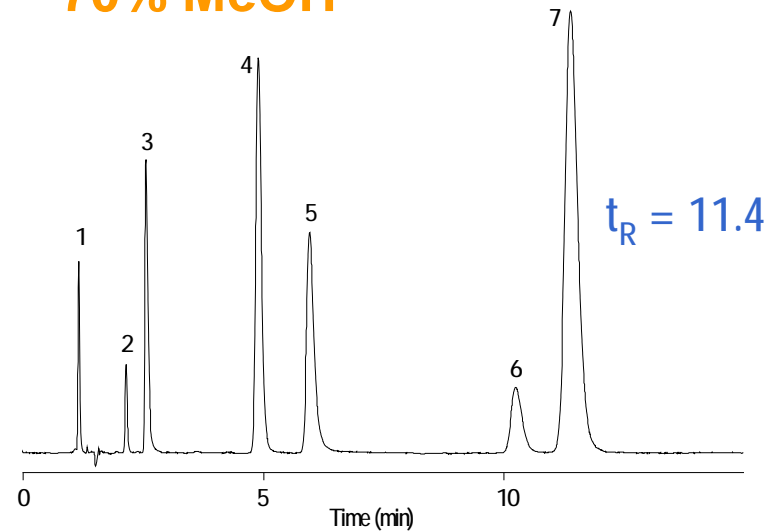
采用Extend-C18在高pH下增加抗阻胺剂的保留

Column: ZORBAX Extend-C18, 4.6 x 150 mm, 5 mm 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 在高pH条件下增加了碱性化合物的保留。

安捷伦其它液相色谱柱

大分子化合物

反相色谱分析——

大孔径300Å 全多孔色谱柱

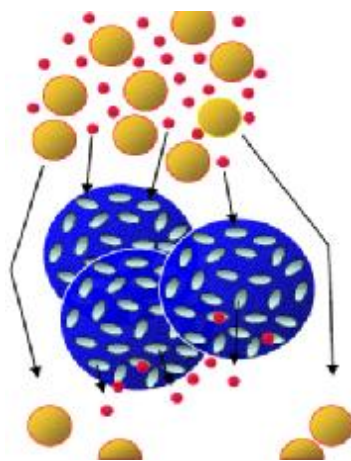
可用于分离蛋白质和多肽

凝胶色谱分析——

最容易预测和理解的HPLC模式

主要用于生物大分子和合成高聚物

质量控制



如何选择凝胶色谱柱

1. 判断GFC还是GPC分析——据流动相

流动相为水相的为GFC
(凝胶过滤色谱)

Agilent 可选柱为:

- Ø 水相GFC启始工具箱
- Ø Zorbax PSM的无“S”的色谱柱, 如 PSM 300,
- Ø Zorbax GF-250/450
- Ø PL aquagel-OH柱

流动相为有机相的为GPC
(凝胶渗透色谱)

Agilent 可选柱为:

- 有机GPC启始工具箱
- Plgel柱
- Zorbax PSM的有“S”的色谱柱

2. 按分子量范围考虑

应落在分子量—淋出曲线线性部分, 若范围太窄, 则可以将不同规格的柱子串联使用。

3. 分析分离还是制备分离—根据内径选择

GF-250/450有制备与半制备柱

- 使用时最大问题是严禁超压 (超流量)
- 用后防干, 防盐析, 防霉菌

Zorbax SAX和SCX离子交换柱

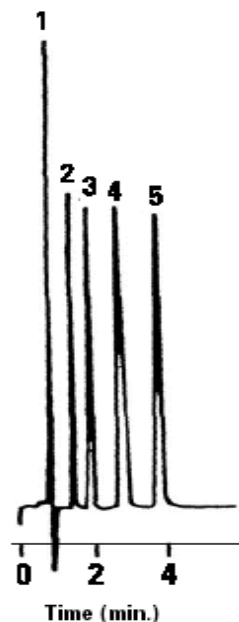
Ø 基于稳定可靠的Zorbax硅胶基质，永久键合的季胺或磺酸基

Ø 对于水溶性小分子化合物和生物大分子提供高效分离

Ø 与有机改性剂兼容

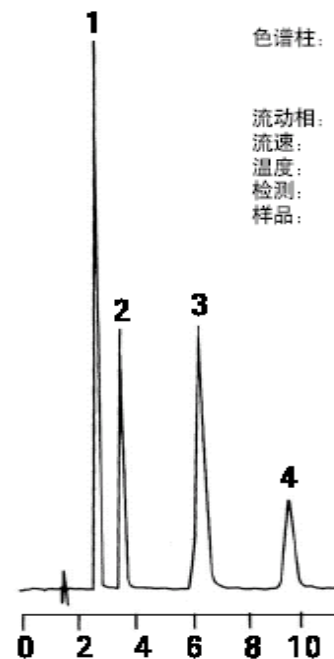
Ø Bio-SCX II系列专门为优化多肽和蛋白质的2D LC/MS分离而设计，具有极强的保留性能和良好的峰形

咳嗽——感冒药- ZORBAX 300SCX



色谱柱: ZORBAX 300SCX
4.6 x 250 mm
部件号 880952-704
流动相: 100 mM NH₄H₂PO₄(pH 6.5)
流速: 3 mL/min
温度: 20°C
检测: UV 210 nm
样品: 峰鉴定:
1. 噻啉胺
2. 茶碱
3. 愈创木脂酸甘油酯
4. 咖啡因
5. 苯肾上腺素

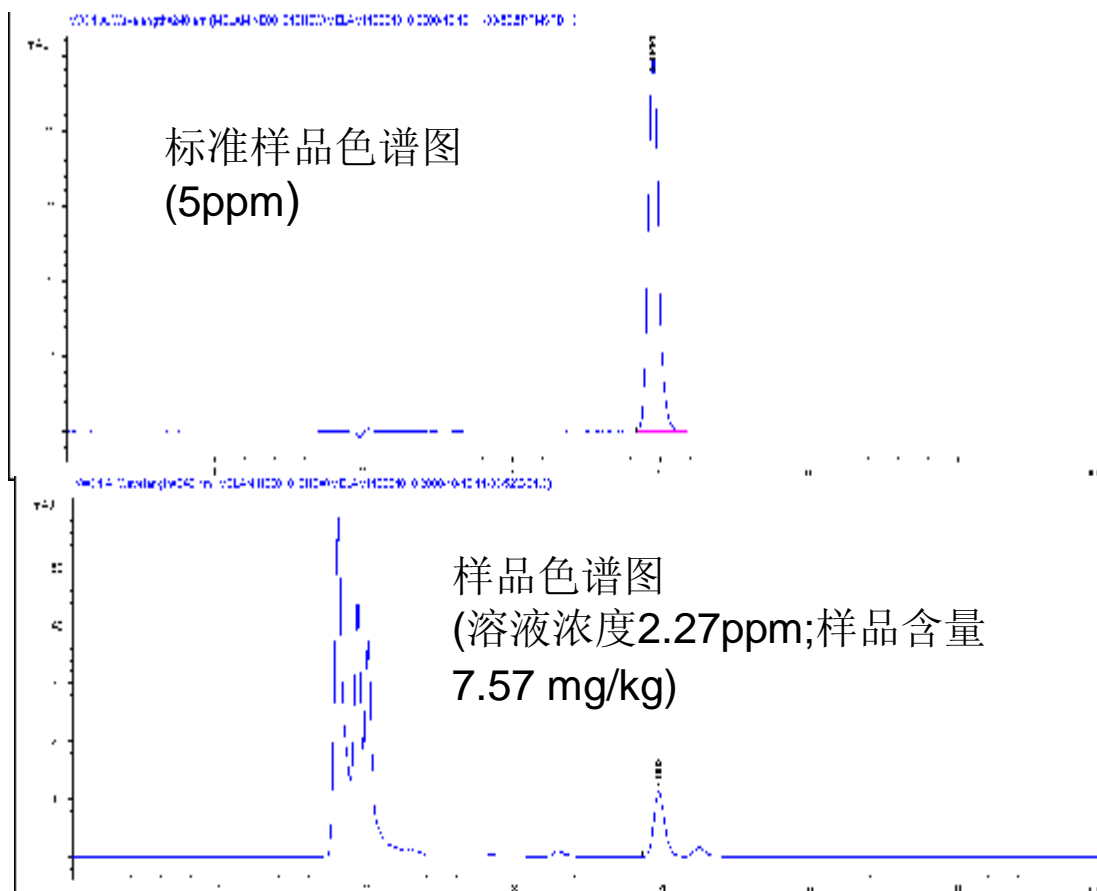
核苷：单核苷酸的分离



色谱柱: ZORBAX SAX
4.6 x 250 mm, 5 μm
部件号 880952-703
流动相: 0.1M NH₄H₂PO₄(pH 6.5)
流速: 2 mL/min
温度: 20°C
检测: UV(254 nm)
样品: 峰鉴定:
1. 乳清酸
2. UMP
3. GMP
4. CMP

Zorbax SCX用于三聚氰胺分析

(国标快速方法GB/T 22400-2008)



色谱柱: ZORBAX 300SCX
4.6×250mm, 5um

检测: 240nm;

流速: 1.5mL/min;

柱温: 30℃;

进样量: 10 μ L;

流动相: 50mM 磷酸盐缓冲液
(pH3.0):乙腈=60: 40

手性柱

β -环糊精键合到多孔硅胶颗粒上，粒径5-10 μm ，———L45

ChiraDex Chiral (79925CB-584) + 卡套 5021 + 1845:

应用：巴比妥酸盐，苯并噻唑，钙拮抗剂，PTH-氨基酸

另外：**Ultron**手性柱

ES-OVM Column含有卵类粘蛋白，

分离药物对映异构体，比如己基巴比妥，布洛芬和普罗吩胺，氟苯氧丙胺、氯曲米通、cloperastin的对映体。

ES-Pepsin柱将胃蛋白酶键合在120Å，5 μm 硅胶颗粒上。

应用：最适合于分离其它色谱柱难分离的碱性化合物。药物，多肽，eperisone，敏克静。

特殊应用色谱柱

氨基酸分析

- Eclipse AAA色谱柱(氨基酸分析)

糖分析柱

- Zorbax糖分析柱

寡核苷酸分析柱

- Zorbax Oligo色谱柱(IEX/RP色谱柱)
- 300Extend-C18

多环芳烃分析柱

多环芳烃柱(Eclipse PAH)

感谢您的关注与支持！



免费热线

800-820-3278

400-820-3278