



液相色谱分离速度提高及选择性优化

安捷伦液相色谱柱介绍与选择

1

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

液相色谱方法开发中如何选择色谱柱？

1. 根据样品特性选择分离模式
2. 色谱柱的适应性和选择性
3. 色谱柱规格的选择

我要一根ODS柱

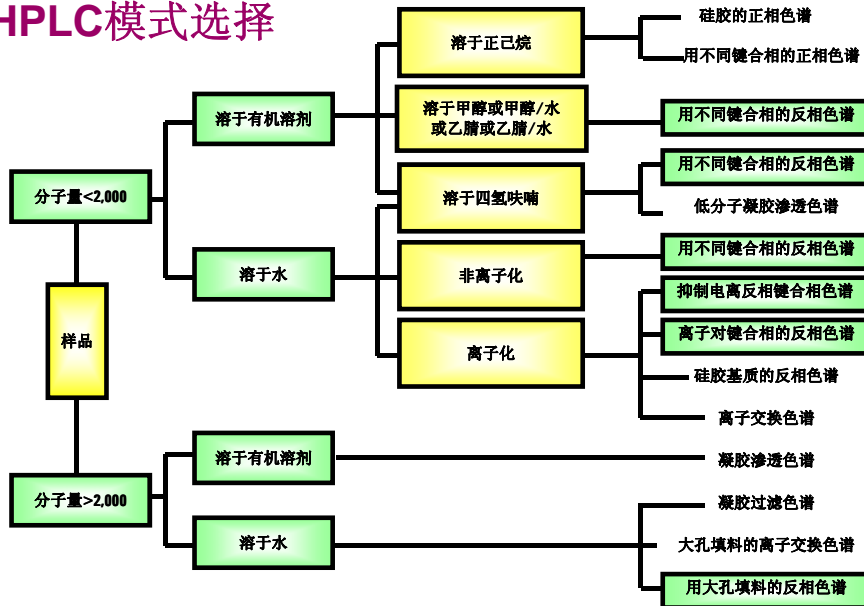


2

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

HPLC模式选择



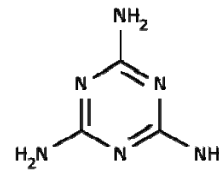
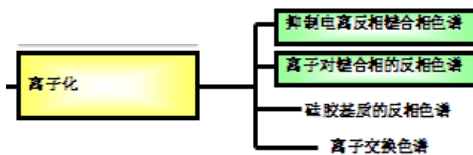
3

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

分离模式的选择实例-三聚氰胺分析

三聚氰胺是强极性，弱碱性化合物 (pKa=8)，微溶于水。



模式一：离子对键合相的反相色谱

对应国标方法GB/T 22388-2008第一法（反相离子对方法）

流动相：离子对试剂（辛烷磺酸钠）溶液：乙腈 = 92:8

色谱柱：ZORBAX SB-C8 4.6x250mm, 5μm

模式二：硅胶基质的反相色谱（HILIC）

对应安捷伦开发的HILIC模式方法

流动相：10mM乙酸铵：ACN=11：89

色谱柱：Zorbax Rx-Sil, 2.1×150mm, 5μm

模式三：离子交换色谱

对应安捷伦开发的离子交换方法

流动相：50mM 甲酸铵(pH3.0):乙腈=15:85

色谱柱：ZORBAX 300SCX 4.6×150mm, 5μm

4

Page 4

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

液相色谱方法开发中如何选择色谱柱？

1. 根据样品特性选择分离模式

2. 色谱柱的适应性与选择性

适应性：色谱柱的耐受范围

选择性：不同色谱柱对同一样品的分离不同

3. 色谱柱规格的选择

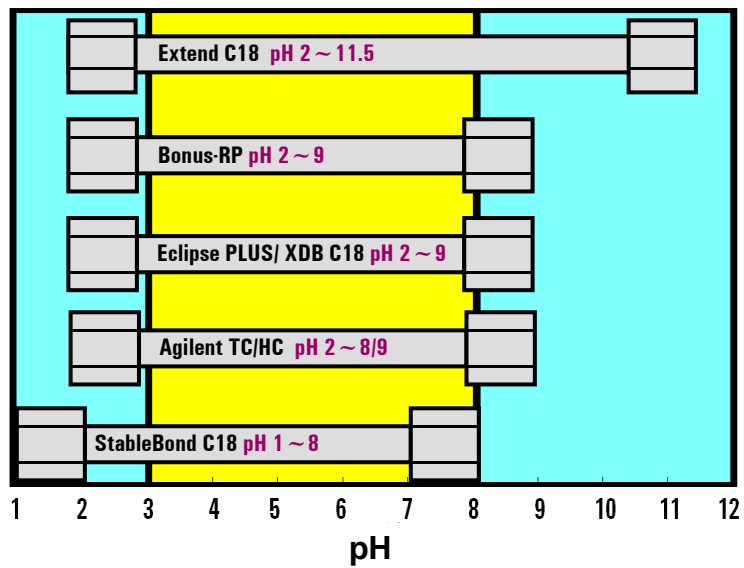


5

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

不同反相色谱柱的pH适应范围

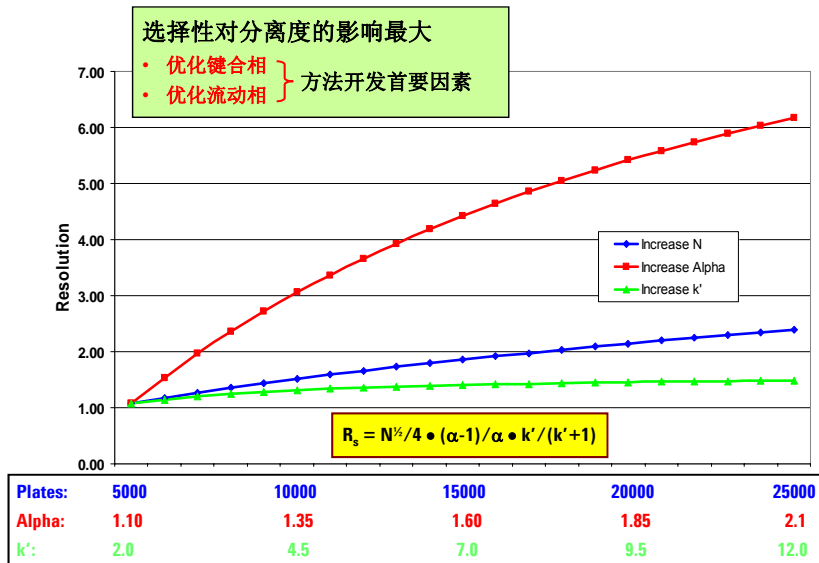


6

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

选择性、柱效、保留对分离度的影响



7

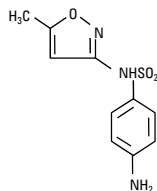
Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

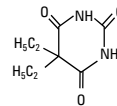
液相色谱柱选择性比较

— 以酸碱混合物为例

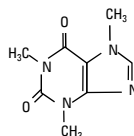
Sulfamethoxazole
Acid (pKa 5.6)



Barbital
Neutral (pKa 8.0)



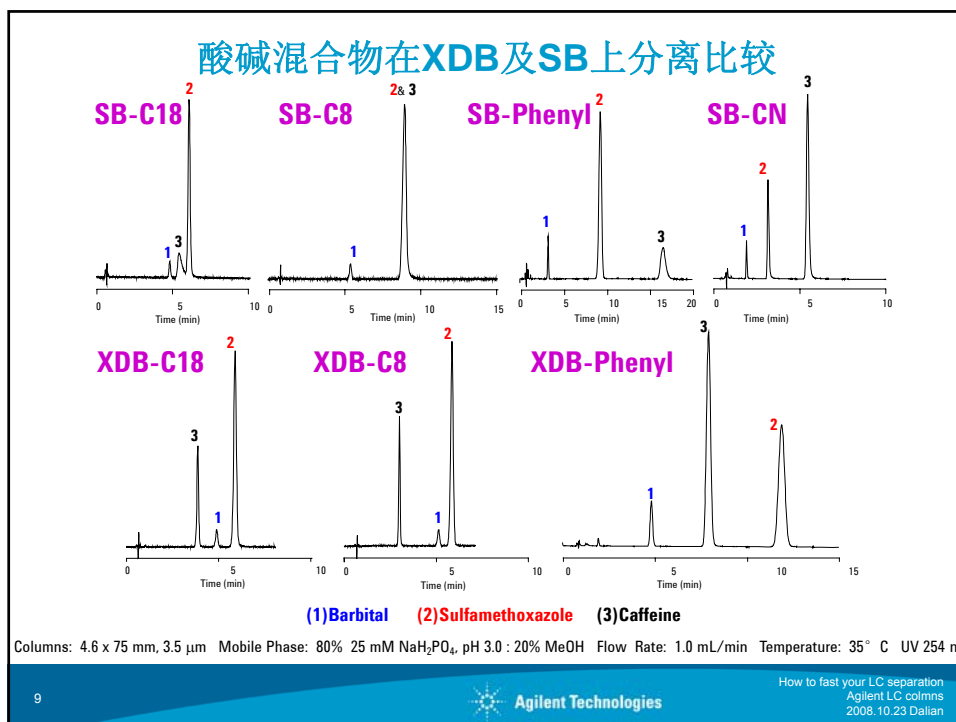
Caffeine
Base (pKa 14.0)



8

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian



9

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Zorbax® 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 色谱柱
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 Oligo HPLC柱
Zorbax SAX和SCX柱
MARS
mRP column

Agilent®
液相色谱柱

常规分析柱

Agilent TC /HC
Agilent TC/HC (2)

制备柱

Agilent prep 制备柱

10

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

安捷伦Zorbax® HPLC色谱柱

严格的质量控制

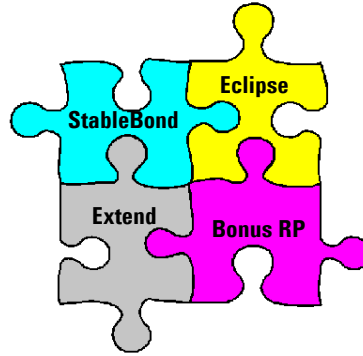
产品研究与开发

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)

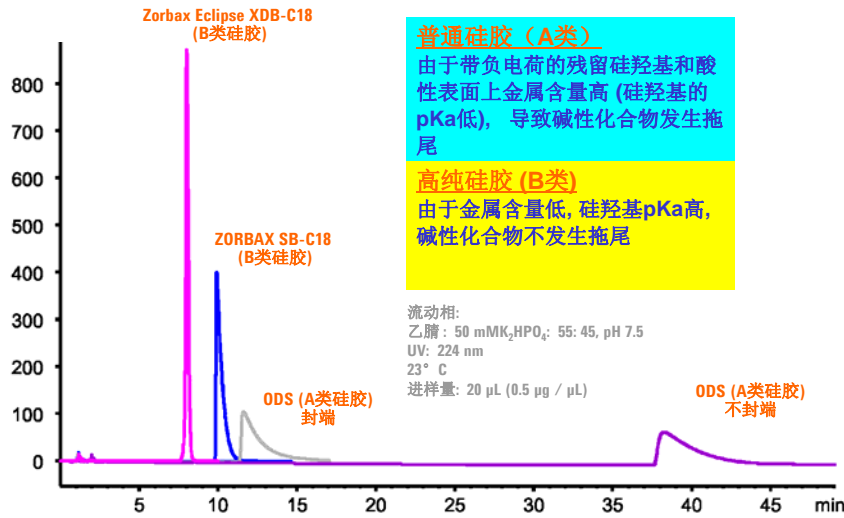
由于金属含量低, 硅羟基pKa高, 碱性化合物不发生拖尾

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



13

Agilent Technologies

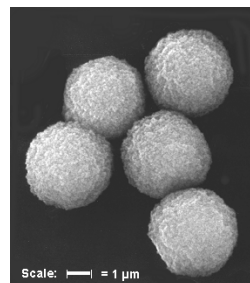
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

硅胶填料—液相色谱柱的基础.....

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



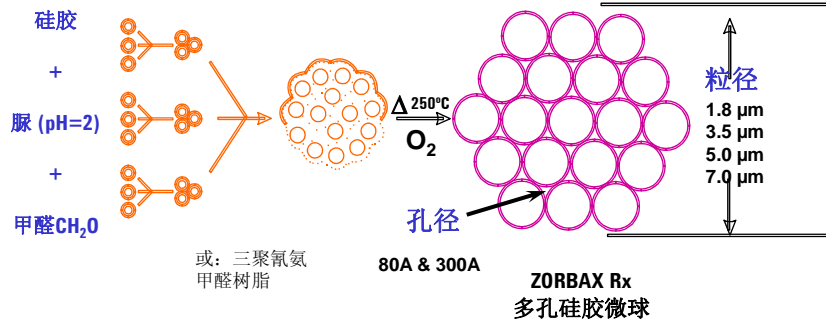
14

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

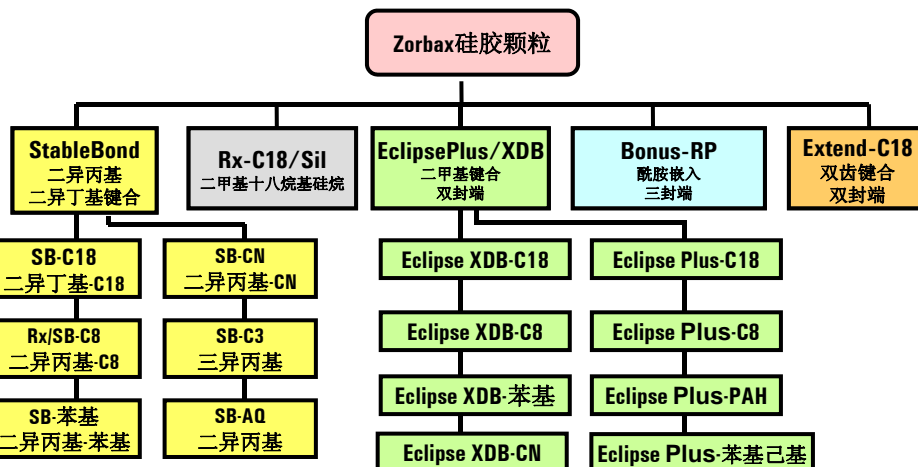
Zorbax专利的硅珠堆砌技术

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主要的键合相



Zorbax主要键合相技术介绍

✓Zorbax Eclipse XDB/Plus

- Zorbax StableBond
- Zorbax Extend
- Zorbax Bonus RP

Zorbax Eclipse

Eclipse Plus

- 行业领先的峰形
 - 更好的专利技术处理硅胶基质
 - 改进的双封端技术：改进的键合试剂及键合过程
- 更加严格的质控标准，批与批之间更加好的重现性
- 不同粒径 – 1.8, 3.5, 5um
- 最高的分离效率
- C18, 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

- C18, C8, 苯基, CN
- 不同粒径 – 1.8, 3.5, 5, 7um
- 对于快速方法开发有很广泛的应用谱图库
- 多种色谱柱规格，从毛细柱到制备柱
- 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。

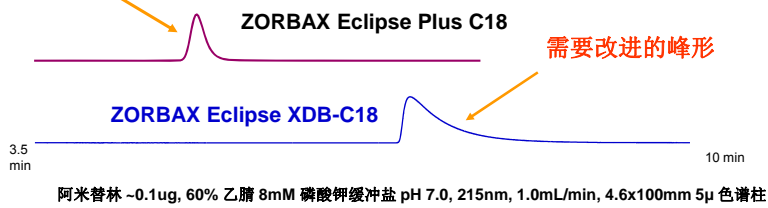
ZORBAX Eclipse Plus 解决了“峰形”问题

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!!



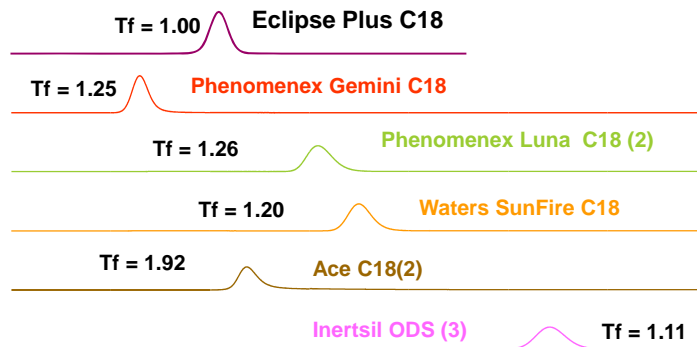
19

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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。

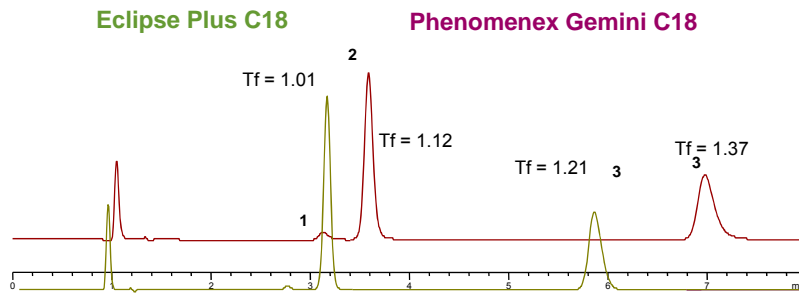
20

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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

21

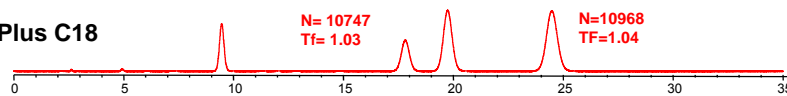
Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

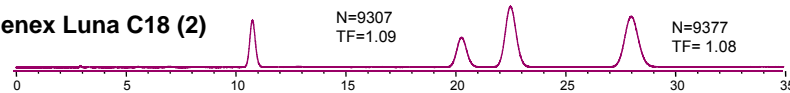
Eclipse Plus 分析样品的峰形最好

色谱柱: 4.6 x 150 mm, 5 μ m 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

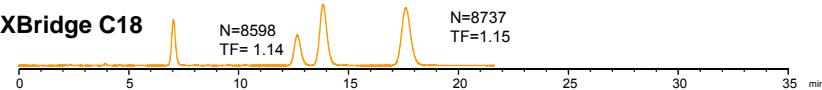
Eclipse Plus C18



Phenomenex Luna C18 (2)



Waters XBridge C18



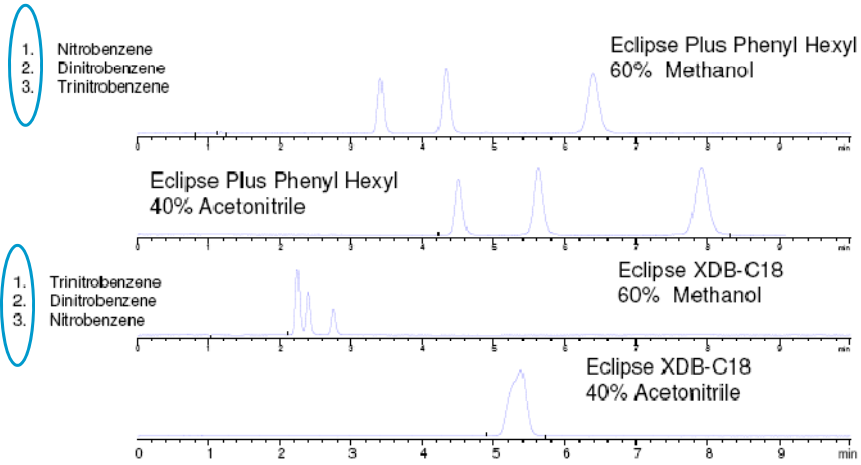
类固醇不是碱性化合物
Eclipse Plus 同样有最好的峰形和柱效!

22

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

苯基-己基柱提供与C18/C8不同的选择性



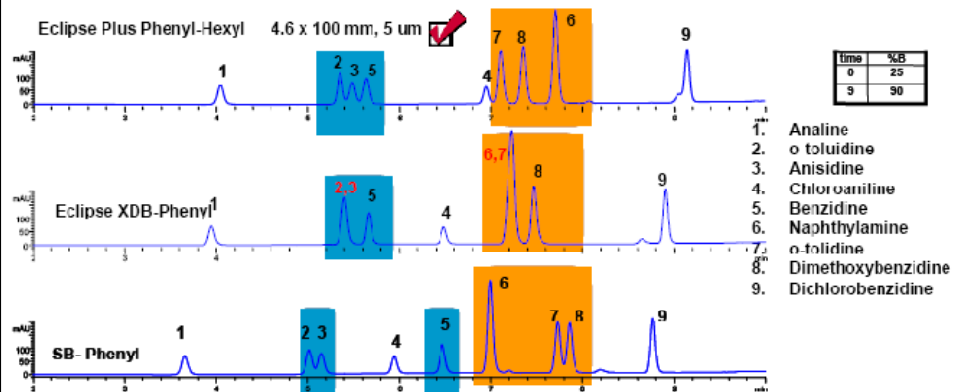
23

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Zorbax Eclipse PLUS 苯基-己基柱

---- 提供不同选择性



3种不同Zorbax苯基柱提供了更丰富的选择性

24

Agilent Technologies

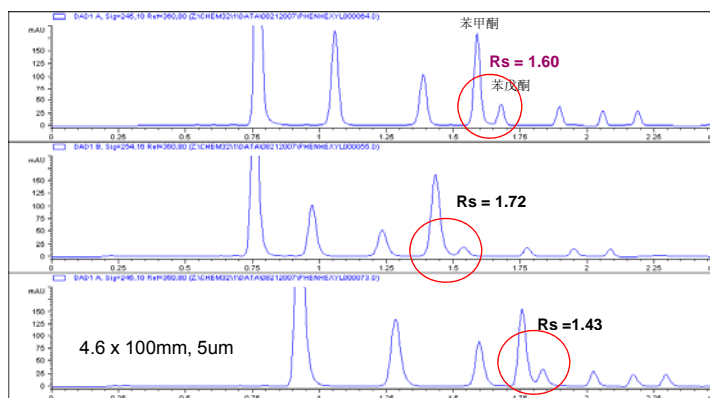
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Zorbax Eclipse Plus 苯基-己基柱 -----与其它厂商的苯基-己基柱的比较

Zorbax
Eclipse Plus
Phenyl-Hexyl

Waters
XBridge Phenyl

Phenomenex
Luna Phenylhexyl



Zorbax Eclipse Plus 苯基-己基柱显示出了更好的选择性及峰形。

25

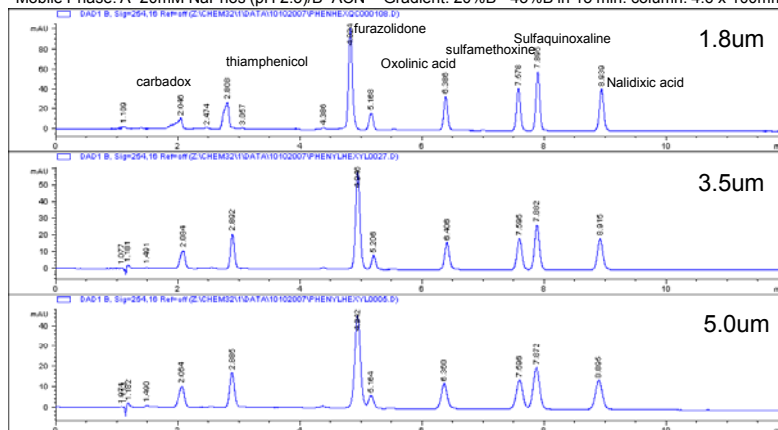
Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Zorbax Eclipse Plus 苯基-己基柱

-----不同粒径的色谱柱分析抗生素

Mobile Phase: A -20mM NaPhos (pH 2.5)/B- ACN Gradient: 20%B - 45%B in 15 min. column: 4.6 x 100mm



Zorbax Eclipse Plus苯基-己基柱可提供三种规格的填料。粒径越小，柱效越高，分离度越好。

26

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Zorbax Eclipse 色谱柱

Eclipse Plus:

填料键合相: C18, C8, PAH, 苯基-己基

填料粒径: 1.8 μm , 3.5 μm , 5 μm

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 μm , 3.5 μm , 5 μm , 7 μm

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)

27

 Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Zorbax主要键合相技术介绍

✓ Zorbax Eclipse XDB/Plus

✓ **Zorbax StableBond**

• Zorbax Extend

• Zorbax Bonus RP

28

 Agilent Technologies

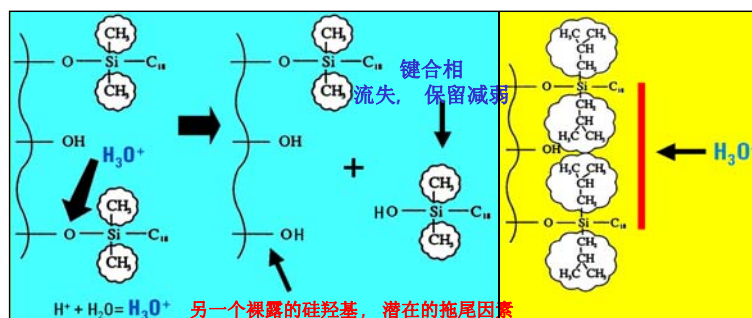
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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

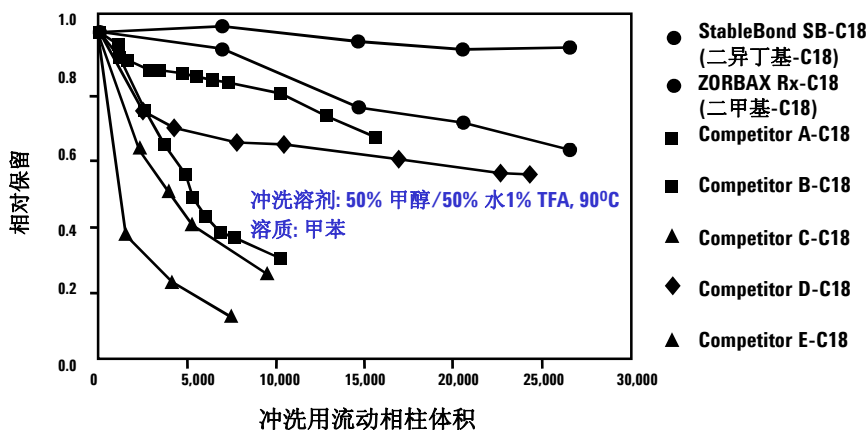
29

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

ZORBAX StableBond 色谱柱

在低pH和高温(pH 0.8, 90°C)卓越的稳定性



30

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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

强极性样品

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。

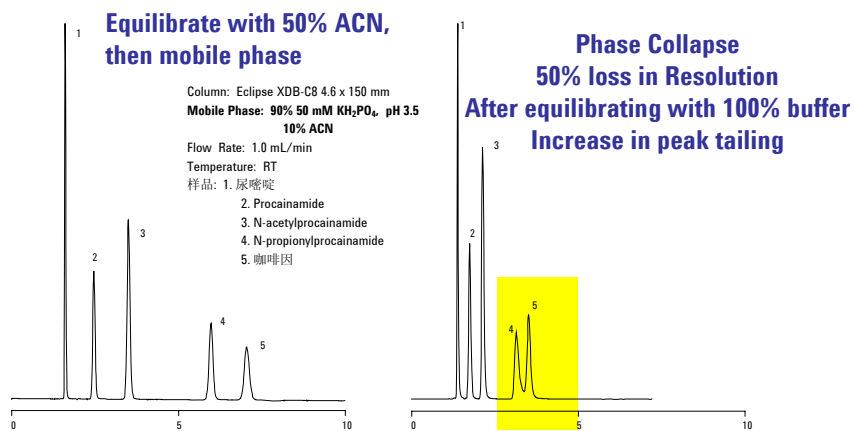
31

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

高水相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



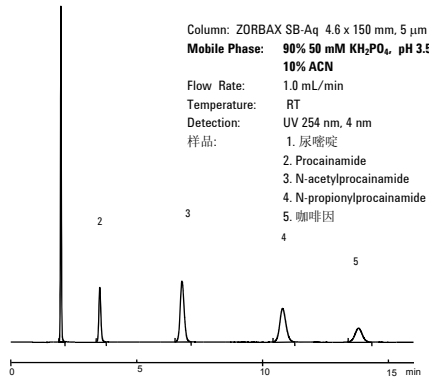
32

Agilent Technologies

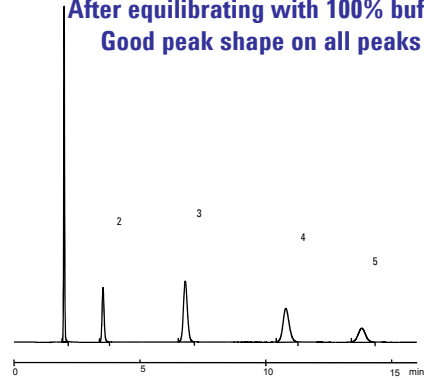
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

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

1 Equilibrate with 50% ACN,
then mobile phase



No Phase Collapse
 No loss in Resolution
 After equilibrating with 100% buffer
 Good peak shape on all peaks

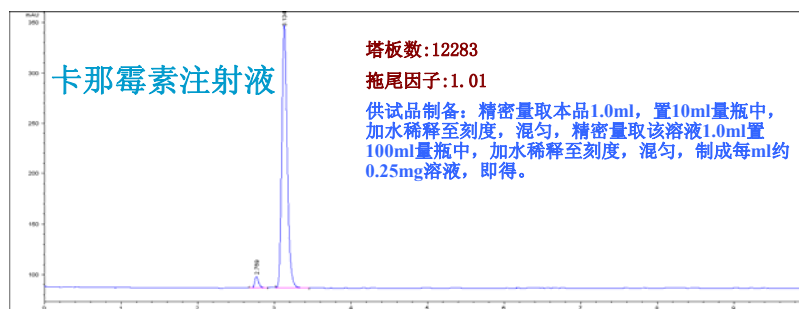


33

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

耐100%水相色谱柱—SB-Aq



色谱条件:
 色谱柱: Zorbax SB-Aq C18, 4.6x250mm, 5μm
 (880975-914)
 柱温: 35℃
 流动相: 1%三氟乙酸水溶液
 蒸发管温度: 115℃, 空气流速: 3.5mL/min
 流速: 1.0mL/min

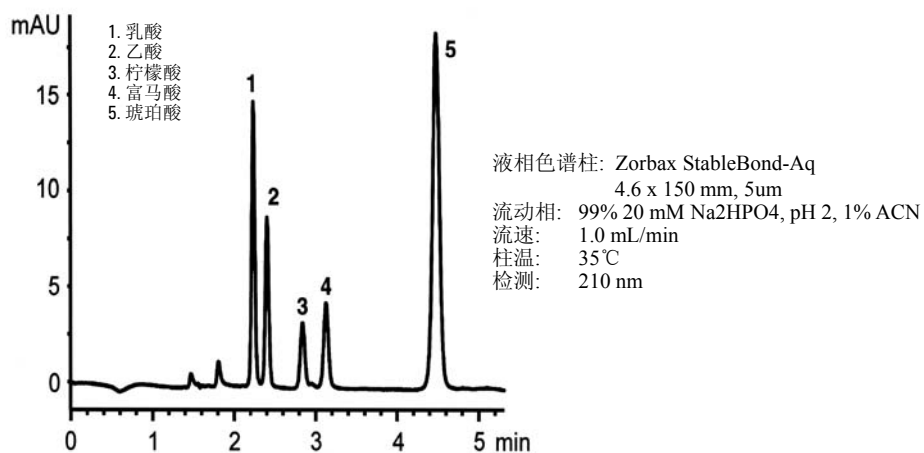
仪器配置:
 二元泵 (G1312A)
 手动进样器 (G1328B)
 柱温箱 (G1316A)
 数模转换器 35900E
 蒸发光散射检测器 Alltech 2000
 仪器控制及数据处理: Agilent
 Chemstation

34

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

有机酸在ZORBAX StableBond-Aq柱上的分离



35

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

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

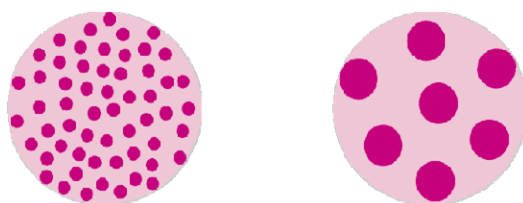
规格: 纳流色谱柱, 毛细管柱, 标准分析柱, 半制备柱, 高通量制备柱。

36

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

孔径的选择



较大孔径容许较大溶质分子顺畅出入孔隙，
而较小孔径限制较大溶质在颗粒内部的有效传质。

样品 $MW \leq 4,000$ ，选择 80\AA 的孔径

样品 $MW > 4,000$ ，选择 300\AA 的孔径

37

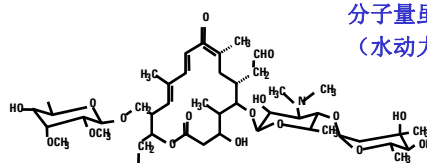
Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

300\AA 色谱柱可改善大分子的峰形

色谱柱: $4.6 \times 150 \text{ mm}$, 5 mm
流动相: $60\% \text{ MeOH}$: $40\% \text{ 0.1\% TFA}$
流速: 0.75 mL/min
温度: RT
检测器: $\text{UV } 282 \text{ nm}$

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



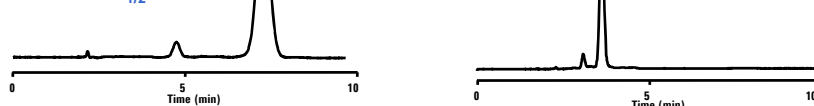
SB-C3
(80\AA)

Tylosin (泰乐菌素)
MW. 926

300SB-C3
(300\AA)

$Pw_{1/2} = 0.442$

$Pw_{1/2} = 0.125$



窄的峰宽表明待测分子进出填料孔隙没有受到阻碍

38

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Zorbax主要键合相技术介绍

- ✓ Zorbax Eclipse XDB/Plus
- ✓ Zorbax StableBond
- ✓ **Zorbax Extend**
- Zorbax Bonus RP

39

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

ZORBAX Extend-C18色谱柱特点

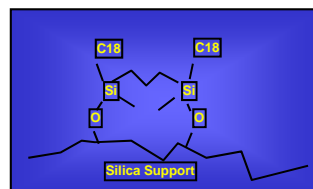
专利双齿键合技术，为高pH流动相设计

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: $3.5, 5\mu\text{m}$
孔径: 80 \AA
键合试剂: 双齿 C18
封端: 双



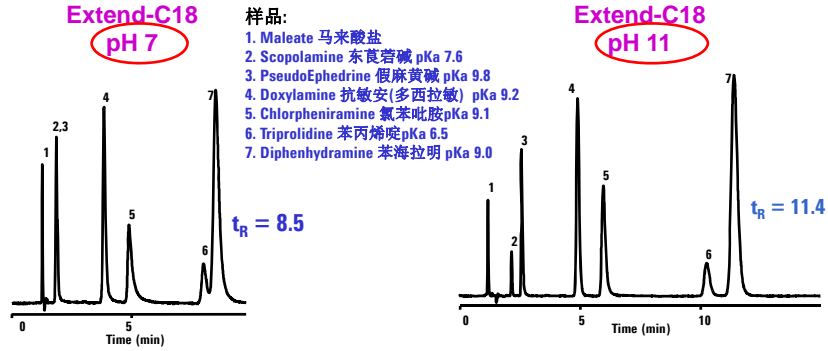
40

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

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

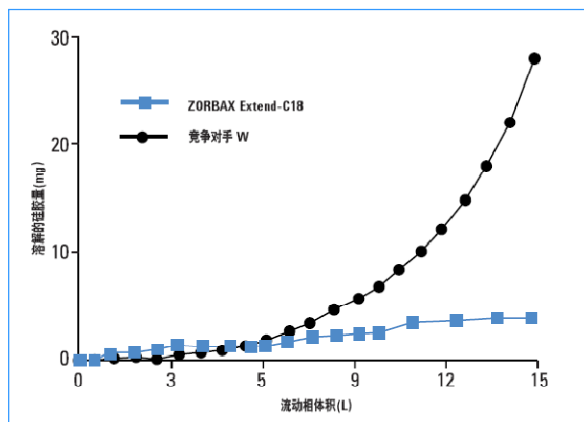
41

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

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

42

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

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。

43

 Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Zorbax主要键合相技术介绍

✓ Zorbax Eclipse XDB/Plus

✓ Zorbax StableBond

✓ Zorbax Extend

✓ **Zorbax Bonus RP**

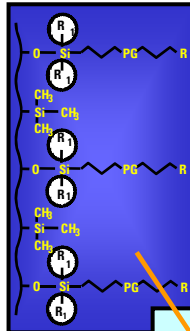
44

 Agilent Technologies

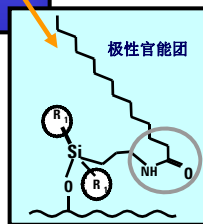
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

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: ≤ 60°C
 碳覆盖率: 9.5%
 表面积: 180m²/g
 粒径: 3.5, 5μm
 孔径: 80 Å
 键合试剂: C18
 封端: 三

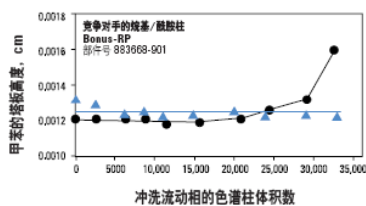
45

Agilent Technologies

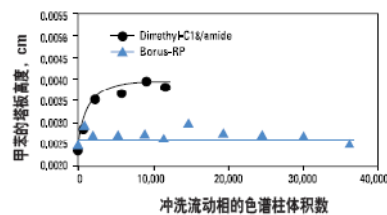
How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

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 803668-901



色谱柱: 4.6 x 150 mm
 流动相: 60% 25 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.0:10% 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。

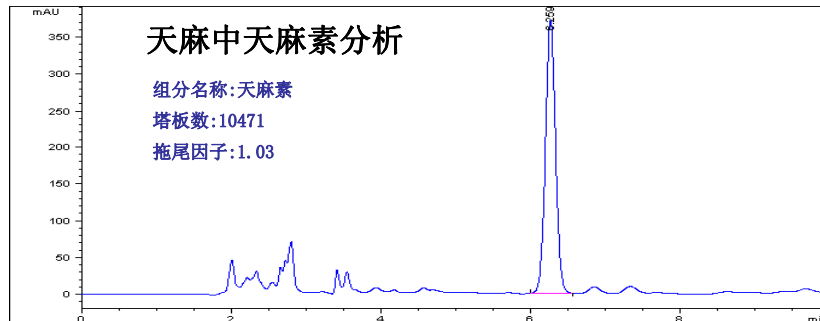
色谱柱: 4.6 x 150 mm
 流动相: 50% 甲醇
 冲洗柱: 50% 0.1%三氟乙酸(TFA)
 流速: 1.0 mL/min
 温度: 60°C
 流动相测试: 80%甲醇
 20%水
 流速: 1.0 mL/min
 温度: 23°C

46

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

Zorbax Bonus-RP ---可用于100%水相的色谱柱



色谱条件:
色谱柱: Zorbax Bonus RP, 4.6x250mm, 5 μ m
(880688-901)
柱温: 35 $^{\circ}$ 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: 10 μ l

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

47

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Zorbax Bonus-RP 色谱柱

填料粒径: 1.8 μ m, 3.5 μ m, 5 μ m, 7 μ m

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

48

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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

49

 Agilent Technologies

 How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

在实际应用中如何选择色谱柱

方法中所要求的固定相选定键合相

色谱条件中所使用的流动相的性质

pH值

水相比例

如果流动相含有高于85%的水相

Bonus-RP 或 StableBond-Aq

酸性

当碱性物质色谱峰峰形是首要考虑因素时

50

 Agilent Technologies

 How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

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，流动相的pH和色谱柱键合相不同，都会有差异。此表中总结的选择建议，是基于极性强弱，通常极性较强时，水相比比例较高，则建议首选能耐高水相的色谱柱。

51

Agilent Technologies

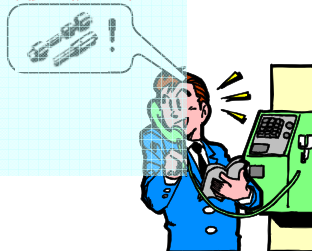
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

液相色谱方法开发中如何选择色谱柱？

1. 根据样品特性选择分离模式
2. 色谱柱的适应性和选择性
3. 色谱柱规格的选择

检测要求
分离规模
分离速度

我要一根ODS柱



52

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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	1~10µg	1~15 µl/min	+++++	较高灵敏度, LCMS, 多肽, 蛋白
	微径柱	1.0	10~50 µg	10~100 µl/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 µg	0.1~0.5	++	高灵敏度, LCMS, 节省溶剂
	溶剂节省柱	3.0	150~500 µg	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, 请参见消耗品目录。

53

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

液相方法对色谱柱的要求

- 峰形
- 分离度
- 色谱柱寿命
- 重现性
- **效率** *如何提高液相分离速度?*



54

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

提高液相分离速度 - 安捷伦色谱柱解决方案

采用新型填料技术色谱柱：

小粒径填料色谱柱 - 1.8 μ m RRHT或3.5 μ m RR

实心多孔层填料色谱柱 - Poroshell 300和Poroshell 120

Poroshell



RRHT

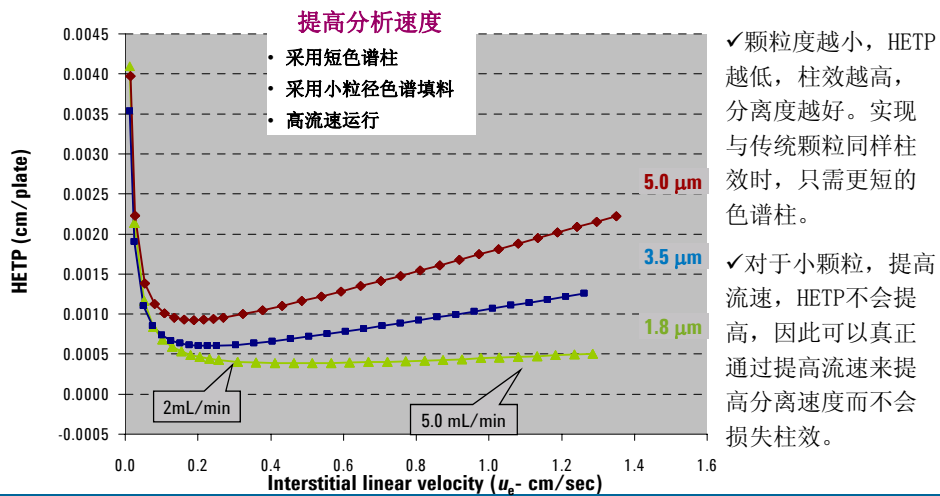


55

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

为什么小颗粒填料可以实现快速分离？

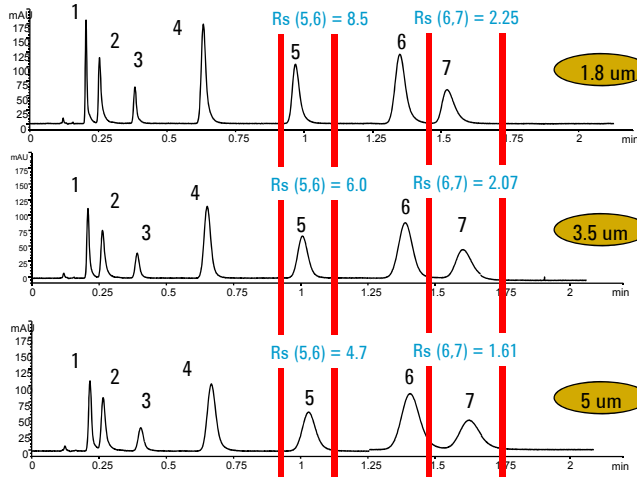


56

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

改善分离度和灵敏度：相同柱尺寸



**Smaller Particle Columns:
Same speed – Higher Resln.**

- 1 4-Acetamidophenol
- 2 Caffeine
- 3 2-Acetamidophenol
- 4 Acetanilide
- 5 Acetylsalicylic Acid
- 6 Phenacetin
- 7 Salicylic Acid

Column: SB-C18, 4.6 x 30 mm
 Detector: 254 nm
 Injection Volume: 1 μl
 Mobile Phase:
 1% Formic Acid Acetonitrile (82:18)
 Flow: 2.0 ml/min

- Resolution Enhancement RRHT (5,6) = 1.8x
- Resolution Enhancement RRHT (6,7) = 1.4x

57

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

缩短柱长

Column Length (mm)	Column Efficiency N(5 μm)	Column Efficiency N(3.5 μm)	Column Efficiency N(1.8 μm)	分析时间 *
150	12,500	21,000	35,000	-
100	8,500	14,000	23,250	Analysis Time -33%
75	6000	10,500	17,500	Peak Volume -50%
50	4,200	7,000	12,000	Solvent Usage -67%
30	N.A.	4,200	6,500	-80%
15	N.A.	2,100	2,500	-90%

Efficiency (N) ↑
 Pressure ↓

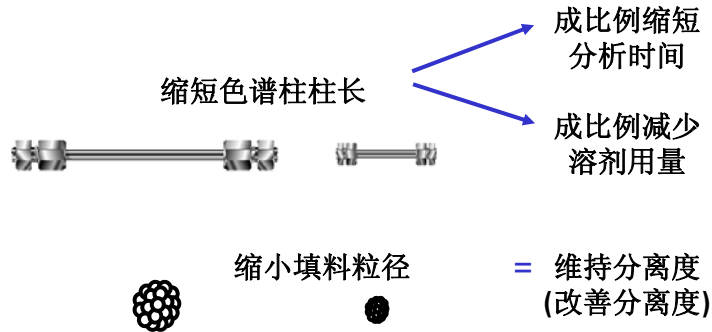
- 内装小颗粒的更短的色谱柱，可以获得与内装更大颗粒的长色谱柱的相同柱效

58

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

如何做到提高分离速度而不损失分离度？

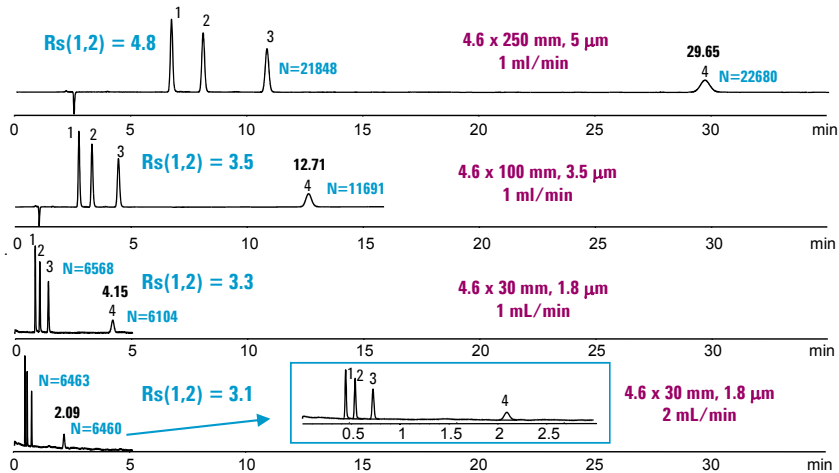


59

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

提高速度，保持良好的分离度



1.8 μ m RRHT Columns: • 14x faster than 4.6 x 250mm, 5 μ m
• Time Saving of up to 95%

60

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

色谱柱规格变小，不仅分离时间缩短，而且平衡时间也减少。

色谱柱尺寸 (mm)	柱内体积 (Vm)	平衡时间流速	
4.6 x 50	0.5 mL	1.0 mL/min	
4.6 x 30	0.3 mL	5 min	3 min
4.6 x 15	0.15 mL	1.5 min	1.5 min
4.6 x 150	1.54 mL	15 min	

色谱柱尺寸 (mm)	柱内体积 (Vm)	平衡时间流速	1.0 mL/min
2.1 x 50	0.10 mL	5 min	60 sec
2.1 x 30	0.06 mL	3 min	36 sec
2.1 x 15	0.03 mL	1.5 min	18 sec



单次样品运行时间 = 分析时间 + 色谱柱平衡时间
 色谱柱平衡时间 = 10倍柱内体积 ÷ 流速

61

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

小颗粒填料的优势

1. 更快的分离速度

- 使用小颗粒可以在更短的色谱柱上加快分离速度且保持一样的柱效
- 平衡时间缩短之后进一步加快分离速度

2. 更高的柱效

- 提高柱效，提高了分离度
- 提高柱效，提高了灵敏度

灵敏度 = 信噪比

3. 更低的运行成本

- 使用更少的有机溶剂
- 分离时间缩短，提高工作效率



62

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

600bar RRHT (1.8um Zorbax色谱柱)

Dimensions	Eclipse Plus C18	Eclipse Plus C8	Eclipse Plus Ph Hex	Eclipse PAH	Eclipse XDB-C18	Eclipse XDB-C8	Extend-C18	
4.6 x 150	959994-902							
4.6 x 100	959964-902	959964-906	959964-912	959964-918	928975-902	928975-906	728975-902	
4.6 x 75	959954-902							
4.6 x 50	959941-902	959941-906	959941-912	959941-918	927975-902	927975-906	727975-902	
4.6 x 30	959931-902	959931-906	959931-912	959931-918	924975-902	924975-906	724975-902	
4.6 x 20					926975-902	926975-906	726975-902	
3.0 x 150	959994-302							
3.0 x 100	959964-302	959964-306	959964-312		928975-302	928975-306	728975-302	
3.0 x 50	959941-302	959941-306	959941-312		927975-302	927975-306	727975-302	
3.0 x 30					924975-302	924975-306	724975-302	
3.0 x 20					926975-302	926975-306	726975-302	
2.1 x 150	959794-902							
2.1 x 100	959764-902	959764-906	959764-912	959764-918	928700-902	928700-906	728700-902	
2.1 x 50	959741-902	959741-906	959741-912	959741-918	927700-902	927700-906	727700-902	
2.1 x 30	959731-902	959731-906	959731-912		924700-902	924700-906	724700-902	
2.1 x 20					926700-902	926700-906	726700-902	
Dimensions	SB-C18	SB-C8	SB-Phenyl	SB-CN	SB-AQ	SB-C3	Bonus-RP	Rx-Sil
4.6 x 150	829975-902	829975-906	829975-912	829975-905	829975-914			
4.6 x 100	828975-902	828975-906	828975-912	828975-905	828975-914		828668-901	828975-901
4.6 x 75		830975-906					830668-901	
4.6 x 50	827975-902	827975-906	827975-912	827975-905	827975-914		827668-901	827975-901
4.6 x 30	824975-902	824975-906	824975-912	824975-905	824975-914			
4.6 x 20	826975-902	826975-906						
3.0 x 150	829975-302	829975-306	829975-312	829975-305				
3.0 x 100	828975-302	828975-306	828975-312	828975-305	828975-314	828975-309	828668-301	828975-301
3.0 x 50	827975-302	827975-306	827975-312	827975-305	827975-314		827668-301	827975-301
3.0 x 30	824975-302	824975-306		824975-305				
3.0 x 20	826975-302	826975-306						
2.1 x 150	820700-902	820700-906	820700-912	820700-905				
2.1 x 100	828700-902	828700-906	828700-912	828700-905	828700-914		828768-901	828700-901
2.1 x 50	827700-902	827700-906	827700-912	827700-905	827700-914		827768-901	827700-901
2.1 x 30	824700-902	824700-906	824700-912	824700-905	824700-914			
2.1 x 20	826700-902	826700-906						

推荐的2个起始选择：

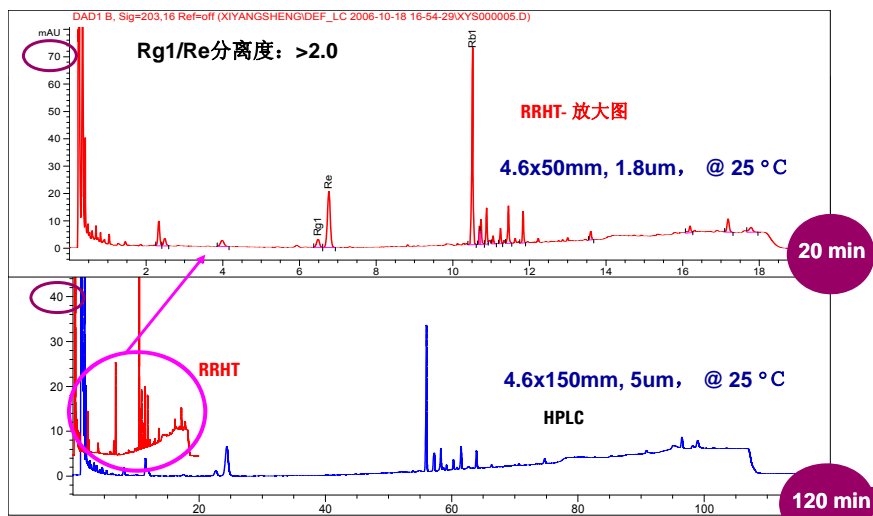
- 959941-902
 - 959741-902
- 都是Eclipse Plus C18

63

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallas

采用RRHT可以实现快速高效分离 人参皂苷分析实例

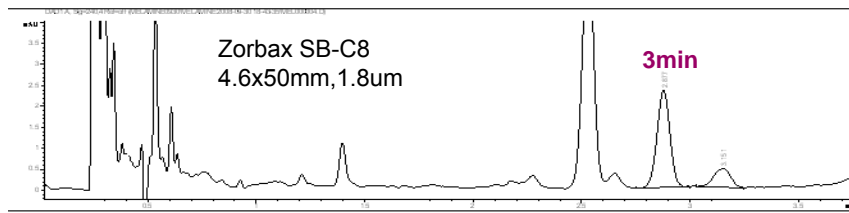
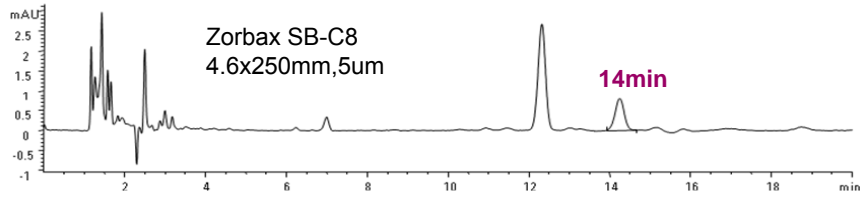


64

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallas

采用RRHT可以实现快速高效分离 三聚氰胺分析实例



65

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

压力公式

粘度 viscosity 流速 flow 长度 length

$$\Delta P = \frac{\eta FL}{K^0 \pi r^2 d_p^2}$$

specific
Permeability

column
Radius
柱内径

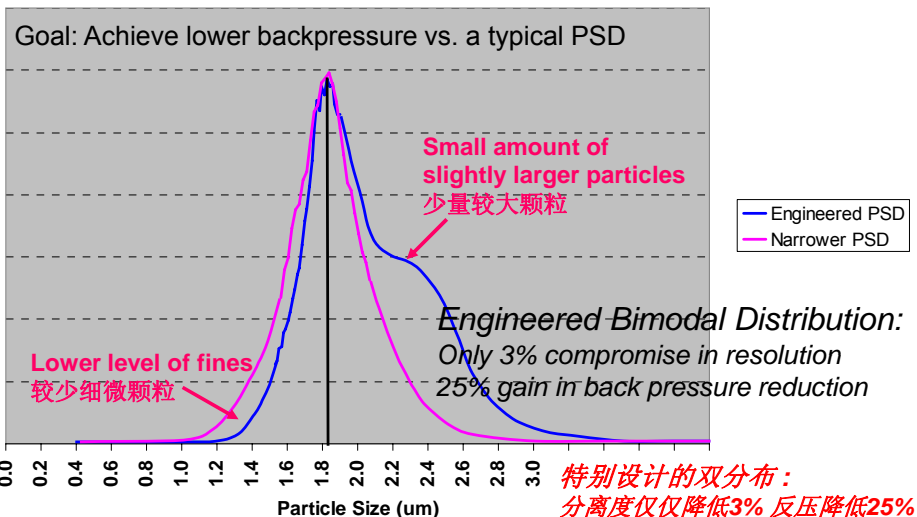
particle
Diameter
粒径

66

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

RRHT的典型颗粒尺寸分布和优化设计分布的比较

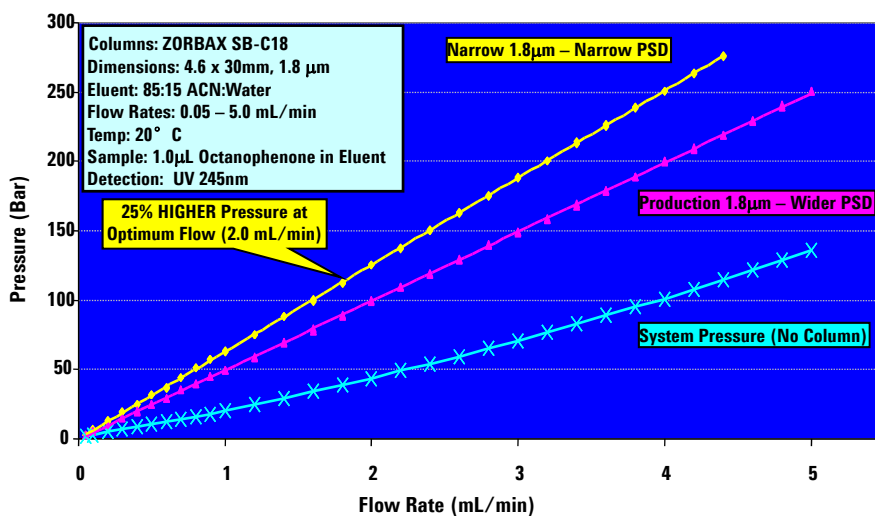


67

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

不同粒径分布的1.8 μ m SB-C18颗粒反压比较



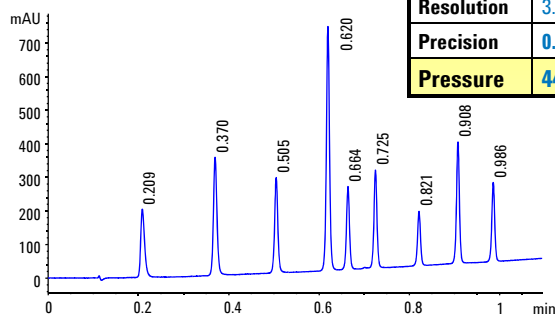
68

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

使用RRHT色谱柱在新的RRLC系统上

—在更低的压力下得到了比竞争厂家W更好的分离能力



	Rapid Resolution	Competitor W
Column	RRHT, SB-C18, 2.1 x 50mm, 1.8um	Competitor W, 2.1 x 50mm, 1.7um
Anal. Time	0.949 min	0.914 min
Resolution	3.69	3.50
Precision	0.025 – 0.094 %RSD	0.18 – 0.30 %RSD
Pressure	440 bar	700 bar (+60%)

Sample: Phenones Test Mix
 Flow Rate: 1ml
 Gradient: 35-95% ACN in 0.9min
 Temperature: 50°
 Injection volume: 1µl
 Injection Technique: ADVR, OI, MCO
 WL: 245nm
 Data Rate: 80Hz

69

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

高分离度快速液相色谱柱(RRHT)方法转化

- 降低色谱柱长
- 调整流速
- 调整进样体积
- 调整洗脱时间



70

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

缩短柱长

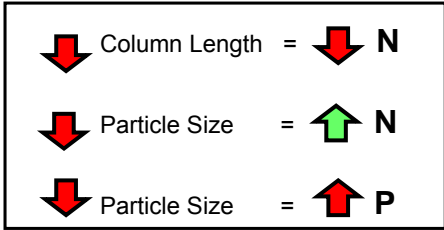
含有更小颗粒填料的更短的色谱柱

Plates塔板数 Selectivity选择性 Retention保留

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k'+1}$$

$$N \propto \frac{L}{d_p}$$

To Maintain Rs:
e.g.: $L/2 \rightarrow d_p/2$



保证柱长比粒径值一致，则可以保证同样的柱效。

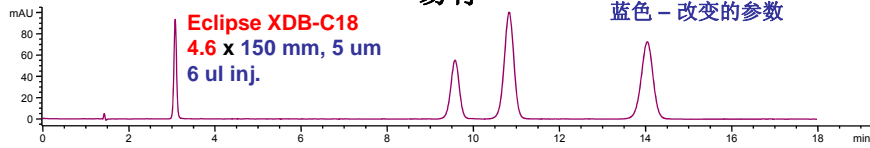
71

Agilent Technologies

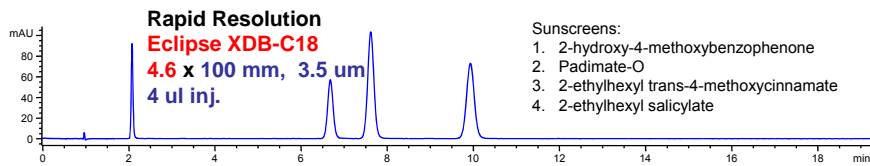
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

“按比例缩小(scaling)” – 很容易的方法转换

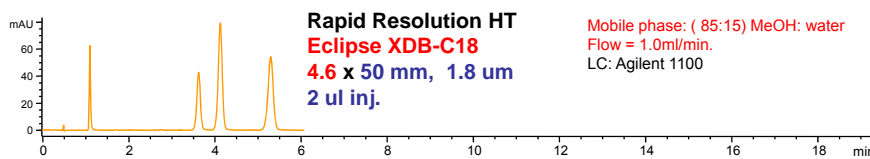
– 不改变色谱柱的内径在方法转换中简单
易行



红色 – 不需要改变的参数
蓝色 – 改变的参数



Sunscreens:
1. 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone
2. Padimate-O
3. 2-ethylhexyl trans-4-methoxycinnamate
4. 2-ethylhexyl salicylate



Mobile phase: (85:15) MeOH: water
Flow = 1.0ml/min.
LC: Agilent 1100

72

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

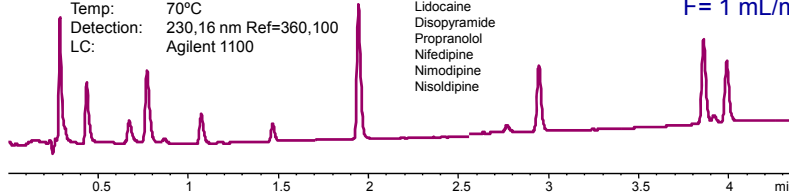
改变色谱柱内径时流速需要相应地改变

$$F2 = F1 \times (ID2/ID1)^2$$

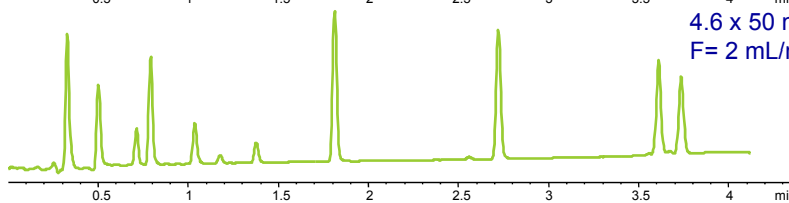
Column: 1.8 μ m SB-C18
 Mobile Phase: A: 0.1% TFA, 5% MeCN, (v/v)
 B: 0.08% TFA, 95% MeCN (v/v)
 Gradient: 0:12.5%B, 3.5:60%B, 4:60%B
 Sample: 0.1 mg/ml each x 0.5 μ l injection
 Temp: 70°C
 Detection: 230,16 nm Ref=360,100
 LC: Agilent 1100

Procainamide
 Procaine
 Nadolol
 Pindolol
 Lidocaine
 Disopyramide
 Propranolol
 Nifedipine
 Nimodipine
 Nisoldipine

3.0 x 50 mm, 1.8 μ m
 F= 1 mL/min



4.6 x 50 mm, 1.8 μ m
 F= 2 mL/min



73

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

进样体积转换

进样体积正比于柱体积

$$\text{Inj. Vol.}_{\text{col.1}} \times \left(\frac{\text{Volume}_{\text{column2}}}{\text{Volume}_{\text{column1}}} \right) = \text{Inj. Vol.}_{\text{col. 2}}$$

Zorbax column volume = 3.14 x r² x L x 0.6 (r and L in cm)

$$\text{i.e. } 20 \mu\text{l}_{\text{col.1}} \times \left(\frac{0.4 \text{ ml}_{\text{column2}}}{2.0 \text{ ml}_{\text{column1}}} \right) = 4 \mu\text{l}_{\text{col. 2}}$$

74

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

梯度坡度与时间和流速

k' ("K prime")梯度坡度影响K*-与等容量因子K'相当

提高K'或K*通常可提高分离度。可以分别通过降低溶剂强度或降低梯度坡度来实现

$$\% \text{ Gradient Slope} = \left(\frac{\text{End}\% - \text{Start}\%}{\# \text{ Column Volumes}} \right)$$

i.e. $8\% = \left(\frac{(100\% - 20\%)}{10 \text{ col. volumes}} \right)$

column volumes = (Flow x Gradient Time) / column volume

柱体积个数 = (流速x梯度洗脱时间) / 柱体积

Zorbax column volume = $3.14 \times r^2 \times L \times 0.6$ (r and L in cm)

75

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

时间转换

运行时间或梯度时间调整

$$\text{Time}_{\text{col.1}} \times \left(\frac{\text{Length}_{\text{column2}}}{\text{Length}_{\text{column1}}} \right) = \text{Time}_{\text{col.2}}$$

i.e. $25 \text{ min.} \times \left(\frac{150 \text{ mm}}{250 \text{ mm}} \right) = 15 \text{ min.}$

*assumes flow is proportional for columns 1 and 2

76

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

转换运行时间(梯度) 较短色谱柱 流速不提高

流速 = 进行相应转换
 进样体积 = 进行相应转换
 运行时间 = 根据柱长相应降低
 梯度时间 = 根据柱长相应降低

长度变化

150 mm → 50 mm = 减小 1/3

e.g. 15mins → 5mins

35-60% over 15mins → 35-60% over 5mins

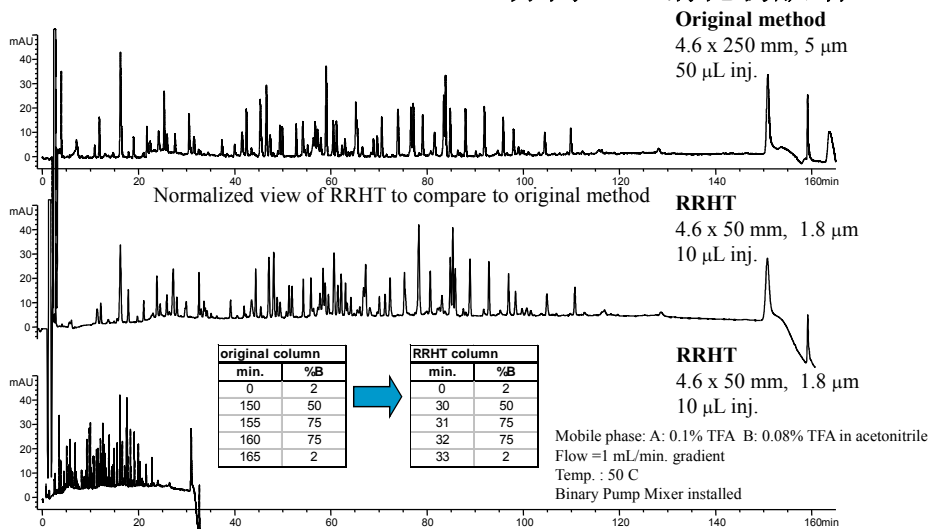
77

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

梯度转换:

ZORBAX SB-C18分离BSA消化物肽谱

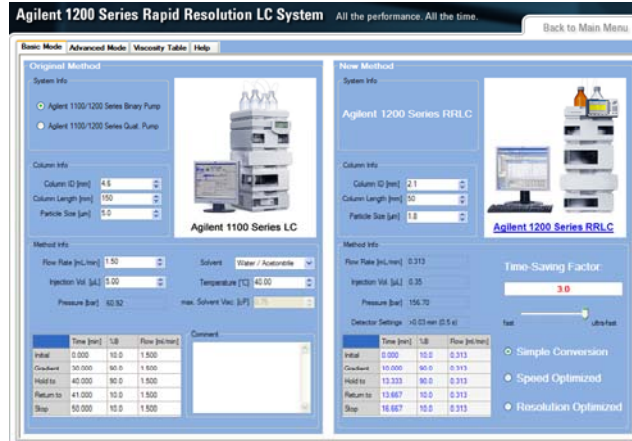


78

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

方法转换软件



免费下载网址:

<http://intranet.chem.agilent.com/Library/software/Public/AgilentMethodTranslator.zip>

79

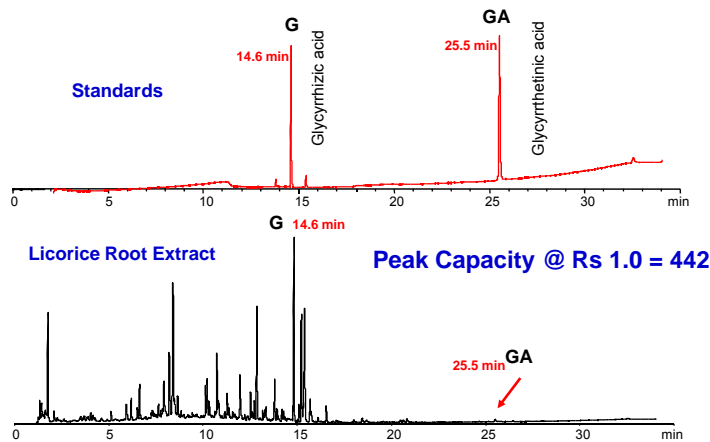
Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

欧亚甘草根部萃取物

— 需要高分离度的色谱柱来对关键化合物进行定性定量

条件: Agilent 1200 RR LC 色谱柱: ZORBAX RRHT SB-C18, 4.6 x 150mm, 1.8μm
流动相: A=1% 乙酸水溶液; B=1% 乙酸乙腈溶液 梯度: 5- 100% B in 30 min. 流速: 1.0 mL/min
温度: 室温 检测器: MWD 254 nm 样品: 欧亚甘草根部提取物, 旋涡处理并在使用前滤膜过滤

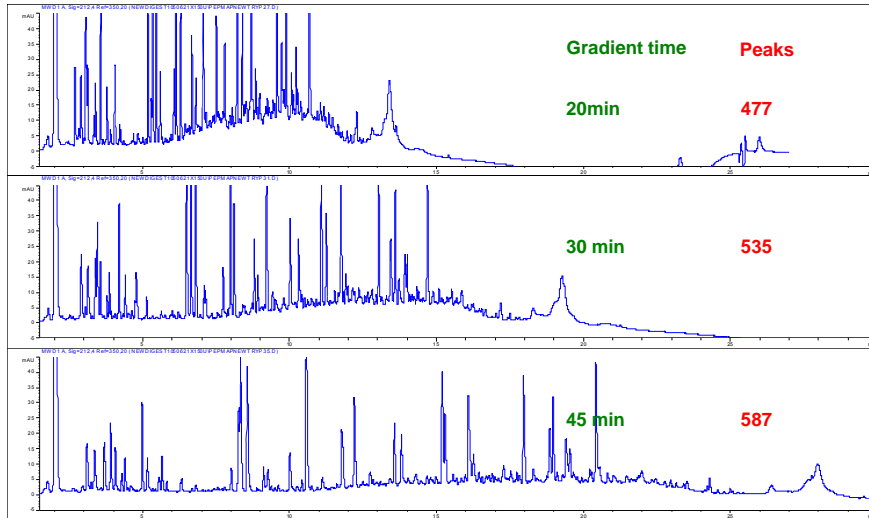


80

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Zorbax SB-C18(2.1x100mm, 1.8 μ m)分析BSA酶解肽谱

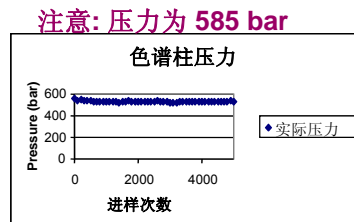
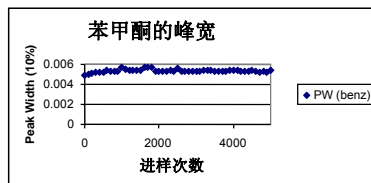
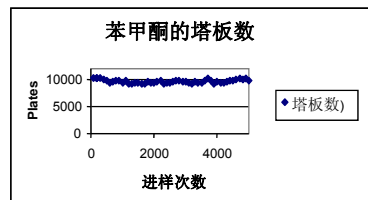
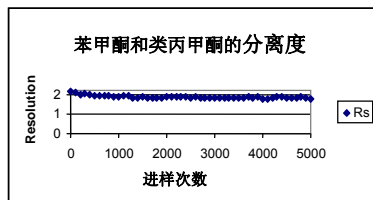


81

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

RRHT分析“干净”样品具有超长的使用寿命



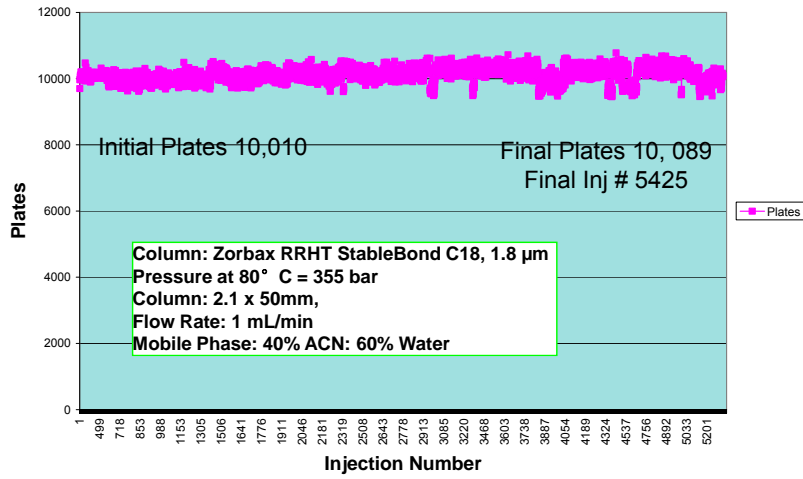
82

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

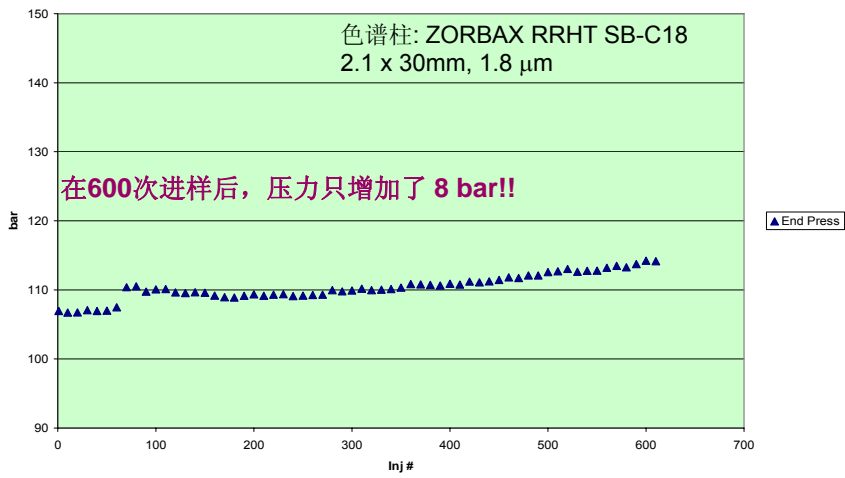
高温高流速下色谱柱稳定性

Long Lifetime of RRHT Column at 80C





RRHT分离蛋白样品(“脏的”样品)

Pressure vs. Injection #



600bar RRLC在线过滤器和接头

	Description	Part number	Porosity	Frit diameter	Flow rate	Part number Replacement Frits
	RRLC In-line filter, 2 mm, max 600 bar	5067-1551	0.2 μ m	2 mm	<1 mL/min	5067-1555 (10/pk)
	RRLC In-line filter, 4.6 mm, max 600 bar	5067-1553	0.2 μ m	4.6 mm	1 - 5 mL/min	5067-1562 (10/pk)

孔径0.2 μ m筛板能够有效保护RRHT色谱柱

•4.6mm/3.0mm ID的色谱柱可以配置P/N: 5067-1553+筛板: P/N5067-1562

•2.1mm ID色谱柱可以配置P/N: 5067-1551 +筛板: P/N5067-1555

手紧式聚酮 (Polyketone) 色谱柱接头可耐 600 bar压力 PN: 5042-8957 (10/pk)

85

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

1100快速液相升级包

5188-5323 4.6 mm RRHT 1100 Fast LC Kit – VWD

- 0.17 mm capillaries, 80 ul mixer, 5 ul semi-micro VWD cell
- two 4.6 x 50 mm Zorbax 1.8 μ m columns

5188- 5324 4.6 mm RRHT 1100 Fast LC Kit – DAD

- 0.17 mm capillaries, 80 ul mixer, 5 ul semi-micro DAD cell
- two 4.6 x 50 mm Zorbax 1.8 μ m columns

5188-5328 2.1 mm RRHT 1100 Fast LC Kit – MS/DAD

- 0.12 mm capillaries, 80 ul mixer, 1.7 ul micro DAD cell
- 0.12 mm std ALS and WP ALS needle seats
- two 2.1 x 50 mm Zorbax 1.8 μ m columns

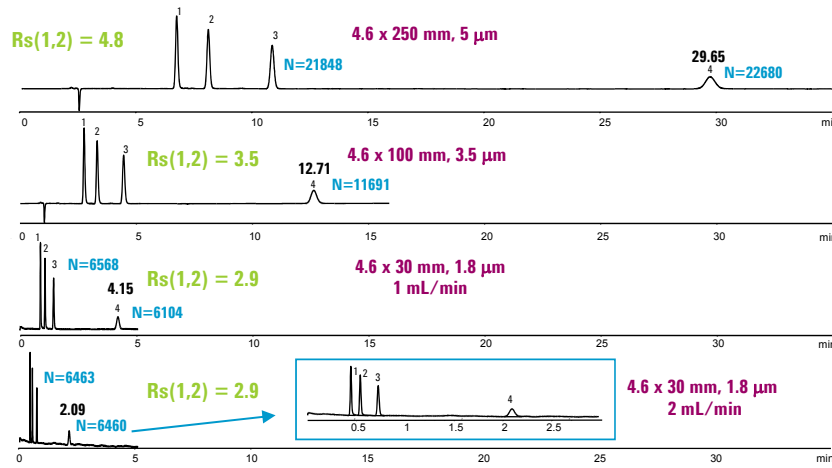
86

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

在1100液相上采用升级工具包更新后

采用RRHT色谱柱减少分析时间可达95%



Columns: ZORBAX SB-C18 Mobile Phase: 50% 20 mM NaH₂PO₄, pH 2.8; 50% ACN Flow Rate: 1 mL/min Temperature: RT
 Detection: UV 230 nm Sample: 1. Estradiol 2. Ethinylestradiol 3. Dienestrol 4. Norethindrone

87

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dalian

目前被USP接受的RRHT色谱柱

L1	Octadecyl silane chemically bonded to porous silica or ceramic micro-particles, 1.5 to 10 μm in diameter, or a monolithic rod	ZORBAX Eclipse Plus C18 ZORBAX Eclipse XDB-C18 ZORBAX StableBond SB-C18 ZORBAX Extend-C18
L7	Octylsilane chemically bonded to totally porous silica particles, 1.5 to 10 μm in diameter	ZORBAX Eclipse Plus C8 ZORBAX Eclipse XDB-C8 ZORBAX SB-C8
L11	Phenyl groups chemically bonded to porous silica particles, 1.5 to 10 μm in diameter	ZORBAX SB-Phenyl

The definitions of L1, L7 and L11 – C18, C8 and Phenyl – columns have been modified to include sub 2-micron particles! Agilent 1.8um choices are listed for each.

This reduces resistance to trying the columns from those pharma and generic pharma companies worldwide that follow these methods.

88

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dalian

提高液相分离速度 - 安捷伦色谱柱解决方案

采用新型填料技术色谱柱：

小粒径填料色谱柱 - 1.8 μm RRHT或3.5 μm RR

实心多孔层填料色谱柱 - **Poroshell 300**和**Poroshell 120**

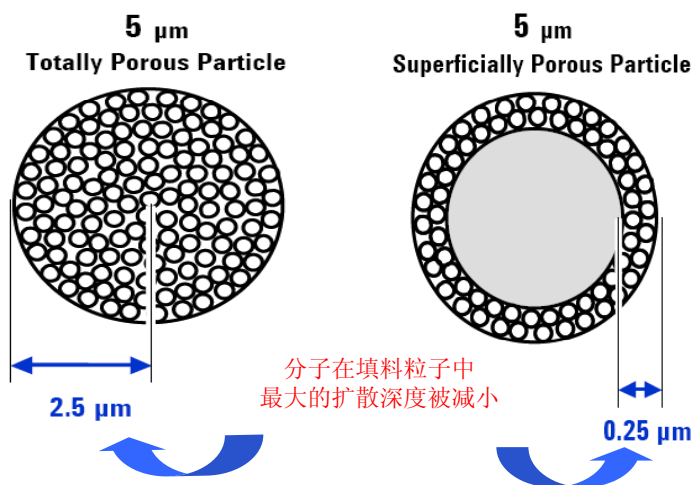


89

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

为什么Poroshell可以实现快速分离？



90

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Poroshell薄壳型液相色谱柱

—在普通液相上实现快速分离

Poroshell 300 ---适合大分子(>4000)快速分离

5 μ m填料颗粒

键合相: 300StableBond-C18, 300Extend-C18,
300StableBond-C8, 300StableBond-C3

Poroshell 120 ---适合小分子(<4000)快速分离 即将上市

2.7 μ m填料颗粒, 比亚二微米填料压力低50%

键合相: 120StableBond-C18, 120StableBond-C8, 120Eclipse Plus-C18,
120Eclipse Plus-C8, 120Extend-C18

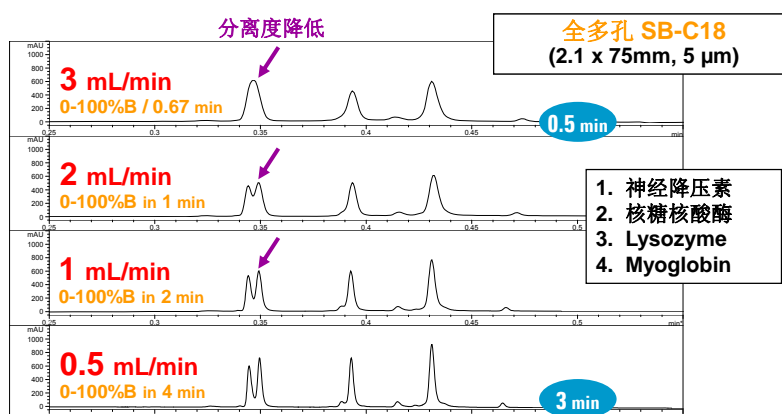
91

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

使用全多孔硅胶填料分离多肽/蛋白

—流速的影响



• 使用全多孔颗粒时, 随着流速增加, 峰明显变宽。

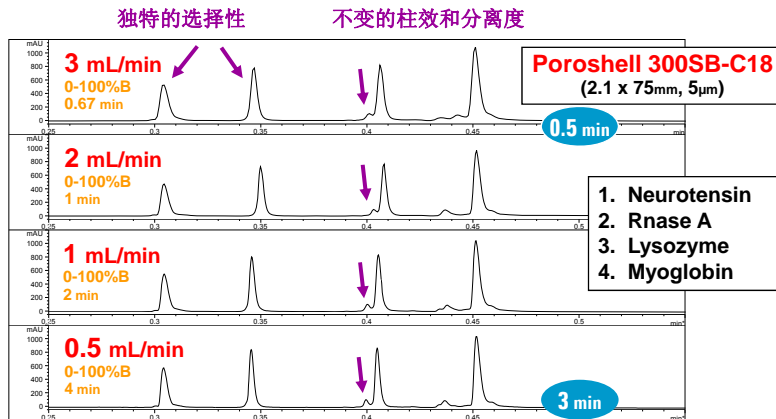
92

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

使用Poroshell色谱柱分离多肽/蛋白

--流速增加对分离度的影响



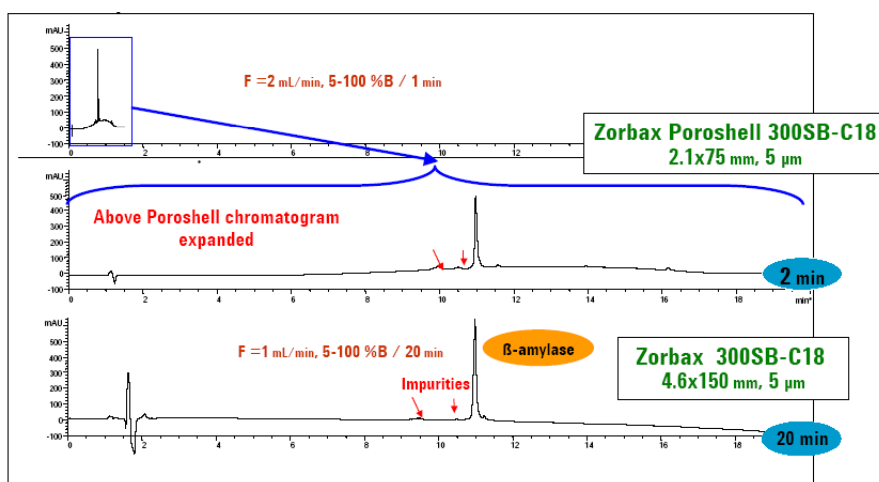
·使用Poroshell色谱柱，随着流速增加，分离度没有变化。

93

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Poroshell快速分析 β 淀粉酶



Poroshell在2分钟内同样能将杂质与 β 淀粉酶很好地分开

94

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Poroshell能在1分钟之内快速高效分离蛋白质和肽

Columns: Poroshell 300SB-C18
2.1 x 75 mm, 5 mm

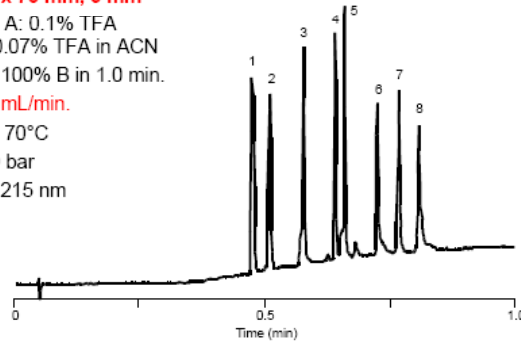
Mobile Phase: A: 0.1% TFA
B: 0.07% TFA in ACN
Gradient: 5 – 100% B in 1.0 min.

Flow Rate: 3.0 mL/min.

Temperature: 70°C

Pressure: 250 bar

Detection: UV 215 nm



Sample:

1. Angiotensin II
2. Neurotensin
3. RNase
4. Insulin
5. Lysozyme
6. Myoglobin
7. Carbonic Anhydrase
8. Ovalbumin

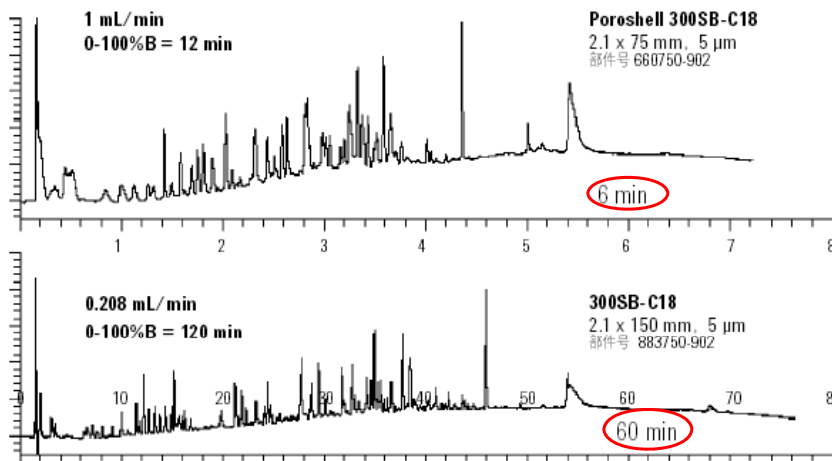
只有Poroshell能在高流速下高效地分离蛋白质和肽！

95

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Poroshell快速高分离度分析BSA酶解产物



96

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

安捷伦其它色谱柱



97

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

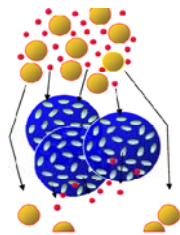
安捷伦凝胶色谱柱

GPC（凝胶渗透）色谱柱

- PLgel系列
- Zorbax PSM “S”系列

GFC（凝胶过滤）色谱柱

- PLaquagel-OH系列
- Zorbax PSM系列
- Zorbax GF-250/450（筛分蛋白和其他生物大分子的理想凝胶柱）



- 多种分子量范围选择
- 提供相应保护柱
- 宽分子量范围混床柱适合未知样品分子量初步确定

98

Agilent Technologies

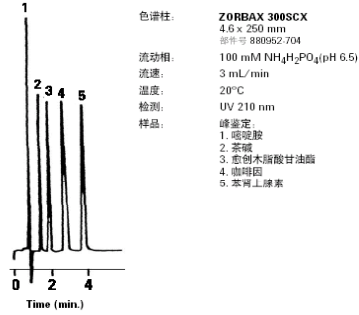
How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Zorbax SAX和SCX离子交换柱

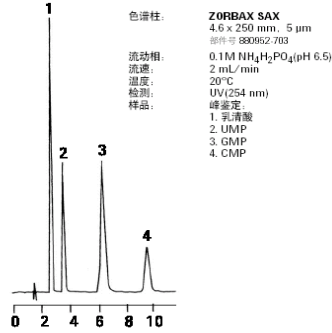
- 基于稳定可靠的Zorbax硅胶基质，永久键合的季胺或磺酸基
- 对于水溶性小分子化合物和生物大分子提供高效分离

- 与有机改性剂兼容
- 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



核苷：单核苷酸的分离

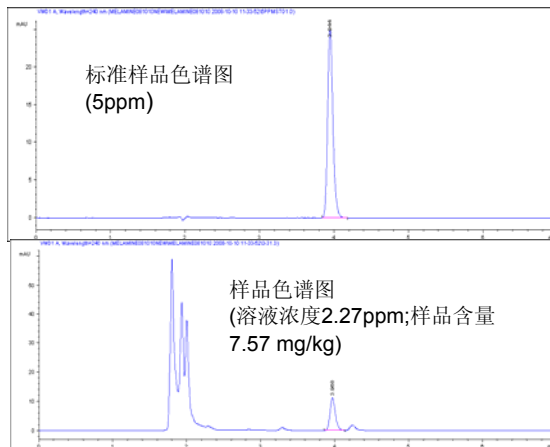


99

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

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, 5μm

检测: 240nm;

流速: 1.5mL/min;

柱温: 30°C;

进样量: 10μL;

流动相: 50mM 磷酸盐缓冲液
(pH3.0):乙腈=60: 40

100

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

手性柱

ChiraDex

β -环糊精键合到多孔硅胶颗粒上 —— USP L45

应用：巴比妥酸盐，苯并噻唑，钙拮抗剂，PTH-氨基酸

Ultron

ES-OVM 键合卵类粘蛋白 —— USP L57，附方法开发指南

应用：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 键合胃蛋白酶

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

糖分析柱

- Zorbax糖分析柱

寡核苷酸分析柱

- Zorbax Oligo (IEX/RP色谱柱)

多环芳烃分析柱

- Eclipse PAH

安捷伦全系列制备柱

Agilent Prep

颗粒 – 5,10um
表面积 – 400 m²/g
孔径 – 100Å
碳载量 C18 – 24%
固定相 – C18, Silica
内径 – (4.6), 21.2, 30 and 50 mm和散装填料
pH范围 – 2~10 (C18), 1~8 (Silica)

ZORBAX

颗粒 – 5, 7um
表面积 – 180 m²/g
孔径 – 80Å, 300Å
碳载量 – Eclipse XDB-C18 – 12%
固定相 – 所有ZORBAX分析柱的键合相
(反相、正相、GF、离子交换)
内径 – 9.4mm 和 21.2mm



103

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

安捷伦新一代反相色谱柱

— Agilent TC(2)/HC(2)



优异品质
称心价格

104

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Agilent TC-C18(2)&HC-C18(2)液相色谱柱

硅胶颗粒

高纯度, 高比表面积 (290m²/g), 孔径170Å

非ZORBAX 硅胶颗粒

键合相: 两种C18键合相

TC-C18(2), 常规碳载量(12%)

HC-C18(2), 较高碳载量(17%)

规格

4.6×250mm, 4.6×150mm, 5μm

105

 Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

Agilent TC-C18(2)&HC-C18(2)液相色谱柱

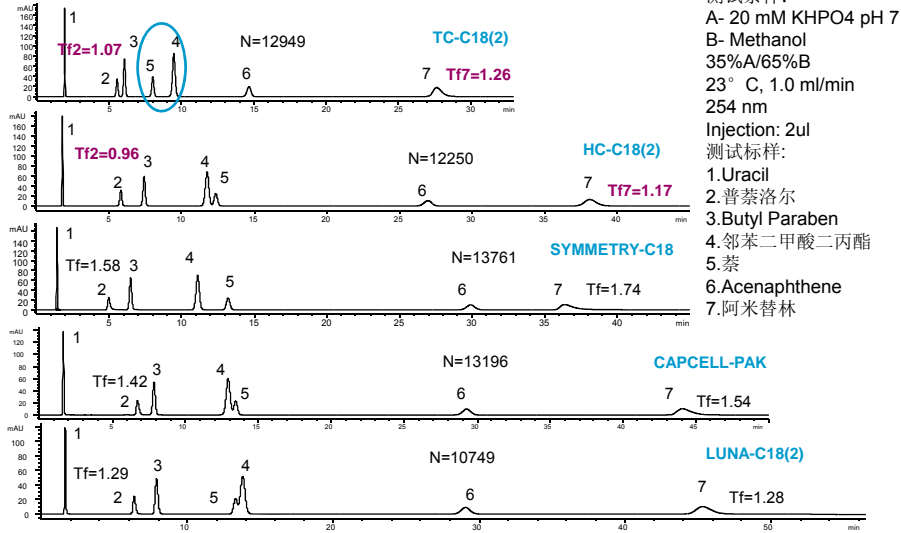
- 新一代TC(2)/HC(2)色谱柱对于碱性和酸性化合物都能提供优异的峰形。
- 与其它厂商的色谱柱相比, TC(2)/HC(2)峰形更佳, 柱效更好。
- TC(2)与HC(2)的选择性略有不同。

106

 Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

不同色谱柱的酸性/碱性/中性化和物测试

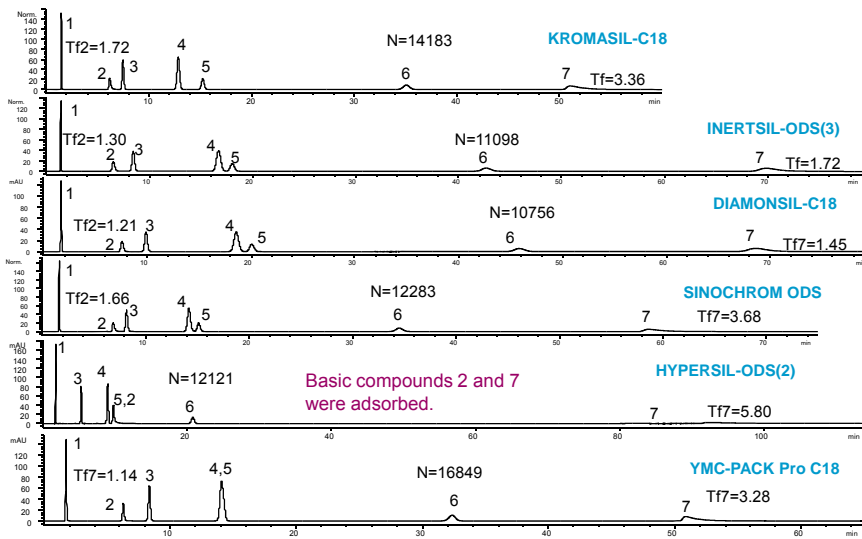


107

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dalian

不同色谱柱的酸性/碱性/中性化和物测试



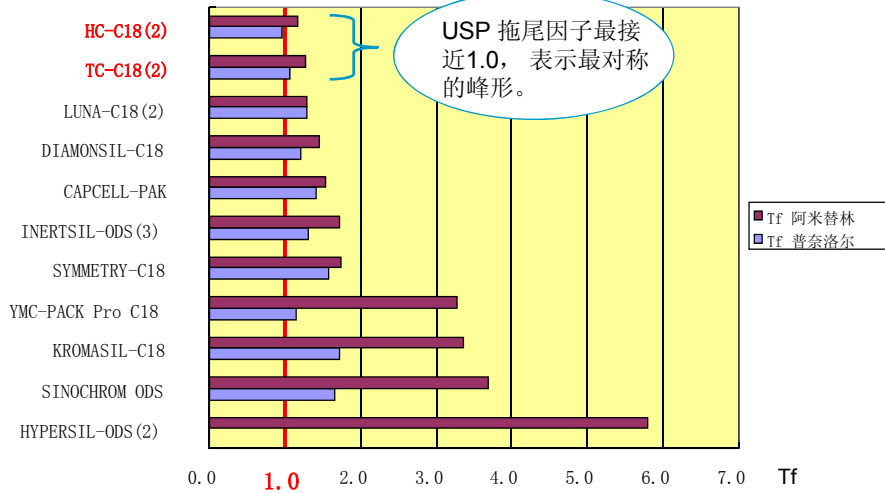
108

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dalian

TC(2) 和 HC(2) 对碱性化合物具有最好的峰形

可以从对称的峰形获得什么？— 更高柱效、更高灵敏度

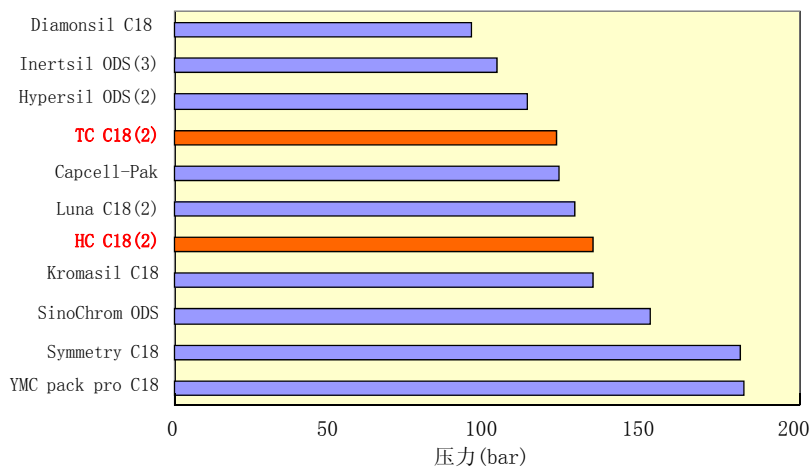


109

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

不同色谱柱的操作压力比较



流动相: 65% methanol, 35% phosphate pH7.0

110

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

不同色谱柱用于熊果酸和齐墩果酸分析比较

色谱条件

色谱柱: 4.6×250mm, 5μm

流动相: 10% 0.03M 磷酸盐, pH 3.0

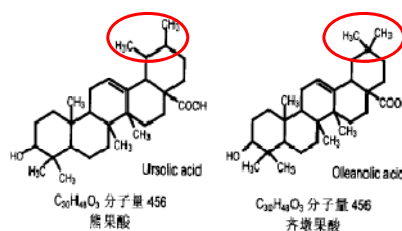
90% ACN

流速: 0.5ml/min

温度: 25°C

检测波长: 214nm

进样体积: 5ul

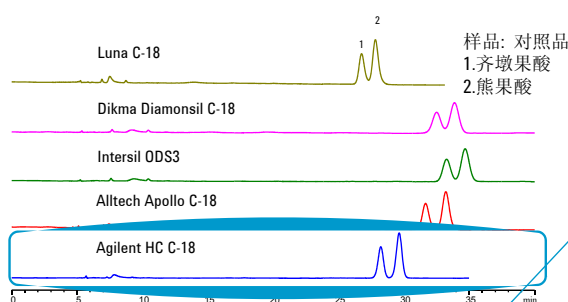


111

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

不同色谱柱用于熊果酸和齐墩果酸分析比较



• HC-C18对难分离物质具有
很好的分离度

最好的分离度

最高的柱效

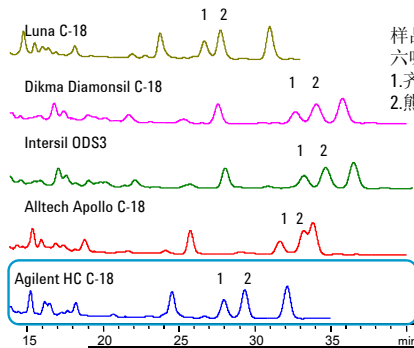
色谱柱	分离度 _{1,2}	理论板数	
		熊果酸	齐墩果酸
Agilent HC C-18	1.76	21056	20986
Alltech Apollo C-18	1.59	17670	18123
Intersil ODS3	1.24	14050	14109
Dikma Diamonsil C-18	1.12	11699	12017
Luna C-18	1.32	18711	18570

112

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

不同色谱柱用于熊果酸和齐墩果酸分析比较



样品:
六味地黄丸
1. 齐墩果酸
2. 熊果酸

• HC-C18对难分离物质具有
很好的分离度

最好的分离度

最高的柱效

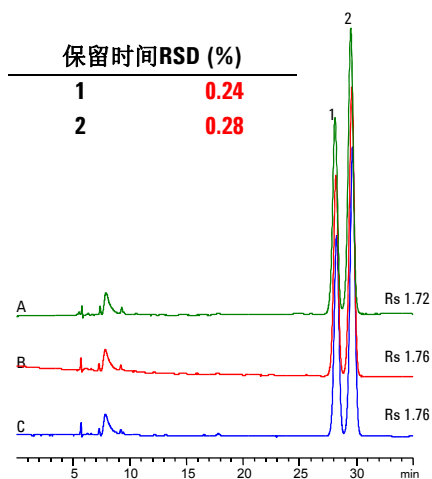
色谱柱	分离度 _{1,2}	理论板数	
		熊果酸	齐墩果酸
Agilent HC C-18	1.70	20094	21148
Alltech Apollo C-18	1.67	18085	20114
Intersil ODS3	1.30	15716	14798
Dikma Diamonsil C-18	1.17	13137	12476
Luna C-18	1.31	17050	18705

113

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Agilent HC-C18色谱柱批与批之间的重现性



色谱条件

色谱柱: Agilent HC C-18 4.6×250mm, 5 μ m
流动相: 10% 0.03M 磷酸盐, pH3.0
90% ACN
流速: 0.5ml/min
温度: 25 $^{\circ}$ C
检测波长: 214nm
进样体积: 5 μ l
样品: 1. 齐墩果酸 2. 熊果酸

• 极佳的重现性说明生产工艺的稳定性
• 同时保证了方法的重现性

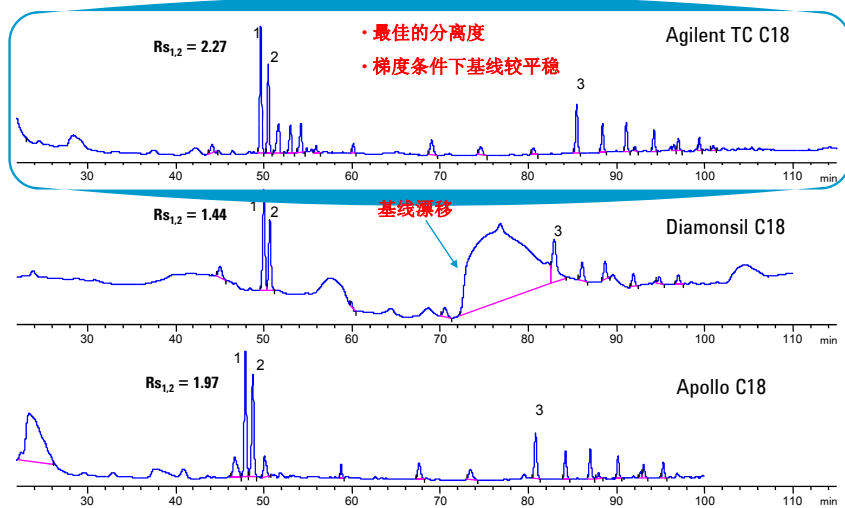
114

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

不同色谱柱用于人参皂苷Rg1,Re,Rb1分析的比较

样品: 1. Rg1 2. Re 3. Rb1; 色谱条件 参照中国药典2005年版方法



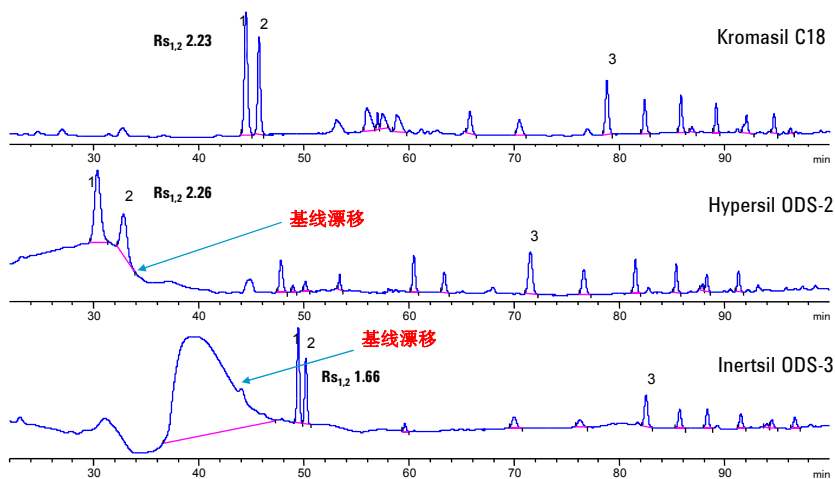
115

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

不同色谱柱用于人参皂苷Rg1,Re,Rb1分析的比较

样品: 1. Rg1 2. Re 3. Rb1; 色谱条件 参照中国药典2005年版方法

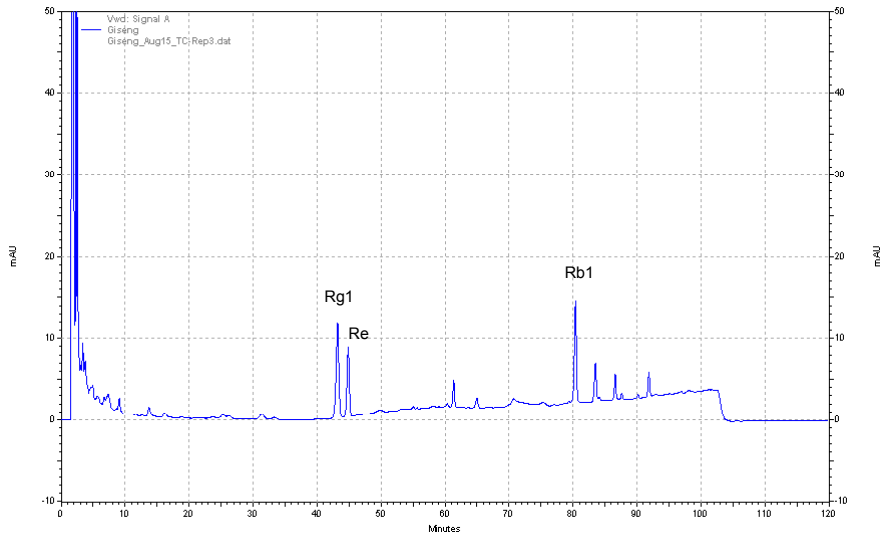


116

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dallan

人参样品, 条件参照中国药典



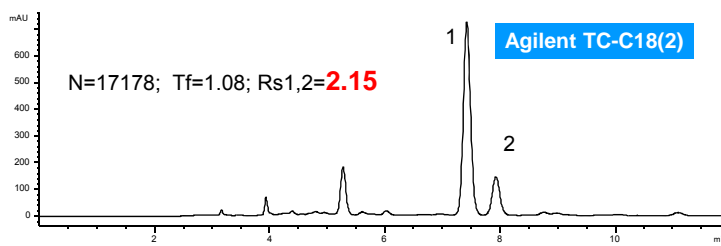
TC-C18(2) column with Gradient condition, detect at 203nm

117

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

中药双黄连口服液

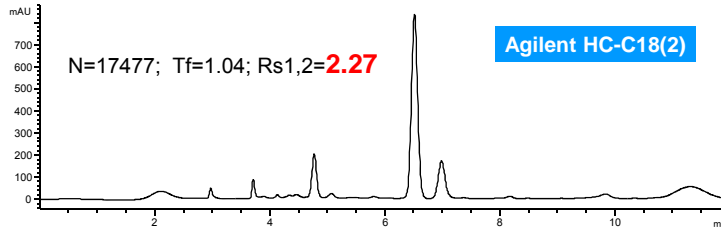


N=17178; Tf=1.08; Rs1,2=2.15

Agilent TC-C18(2)

Sample:
Shuanghuanaglian
Granules

1. 绿原酸
2. 杂质



N=17477; Tf=1.04; Rs1,2=2.27

Agilent HC-C18(2)

HPLC Conditions

Column: 4.6×250mm,
5μ

Mobile Phase: 85%
0.4% Phosphoric acid ;
15% ACN

Flow Rate: 1.0ml/min

Temperature: 30℃

UV Detection: 327nm

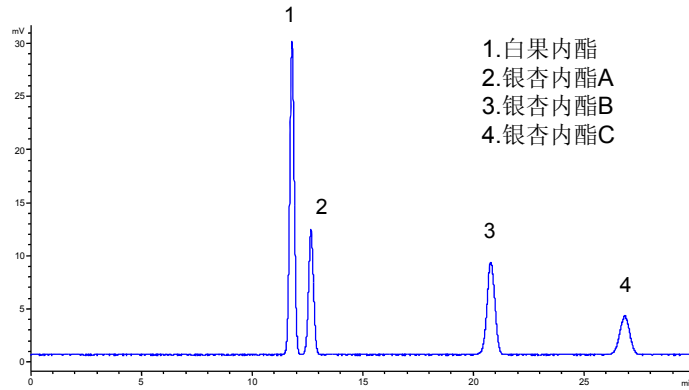
Injection volume: 10ul

118

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dalian

银杏内酯的分析 ELSD



- 1.白果内酯
- 2.银杏内酯A
- 3.银杏内酯B
- 4.银杏内酯C

TC-C18(2), 150mm, 20% THF/MeOH(10/25)

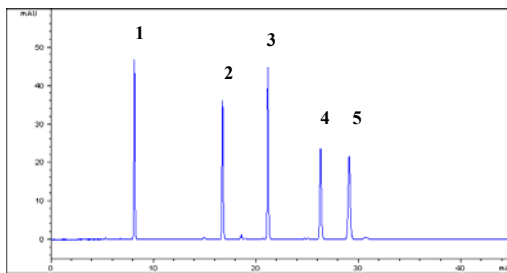
80% water, isocratic, 1ml/min

119

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Agilent TC-C18色谱柱分离头孢菌素类药物



色谱条件:

色谱柱: Agilent TC C18,
4.6×250mm, 5μm
(P/N: 5189925-902)
流动相: A:乙腈, B: 50mM 磷酸二氢钾.
时间 (min) A% B%
0 4 96
20 18 82
流速: 1 ml/min
柱温: 25℃
检测波长: 254 nm
进样: 5 ul

化合物名称	保留时间 (min)	分离度	塔板数 (N)	容量因子 (K')	拖尾因子 (USP Tf)
头孢羟氨苄	8.115	-	35122	2.25	1.06
头孢拉定	16.722	41.4	107365	5.68	1.07
头孢唑啉	21.140	19.3	163774	7.45	1.08
头孢硫脒	26.284	19.2	143360	9.514	1.06
头孢唑酮	29.070	7.9	98148	10.63	1.06

样品:

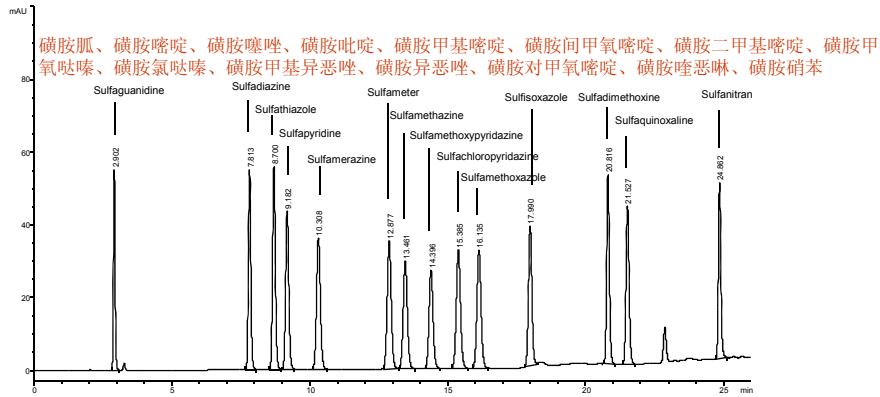
- 头孢羟氨苄
- 头孢拉定
- 头孢唑啉
- 头孢硫脒
- 头孢唑酮

120

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Agilent TC-C18色谱柱分离十四种磺胺类药物



色谱条件:

色谱柱: Agilent TC C18, 4.6×250mm, 5 μ m (P/N: 5189925-902)

流动相: A: 0.2% HAc, B: 甲醇; 0-3min, 10%B; 4min, 20%B; 8min, 20%B; 15min, 30%B; 17min, 45%B; 19min, 45%B; 24min, 65%B; 25min, 65%B; 27min, 95%B; 34min, 95%B

流速: 1ml/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测波长: 275nm

进样量: 20 μ l

121

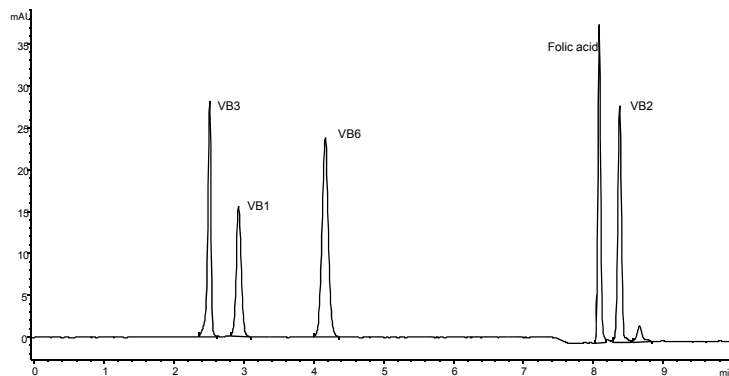
Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

奶粉原料中水溶性维生素分析

色谱柱: Agilent TC C-18 250X4.6mm 流动相: A 0.1%TFA Water B ACN 0-4min 5%B; 4-6min 25% B; 6-10min 25%B 后运行时间: 5min

柱温: 25 $^{\circ}$ C 流速: 1ml/min 检测波长: 280nm \pm 4 nm 参比: 500nm \pm 100nm



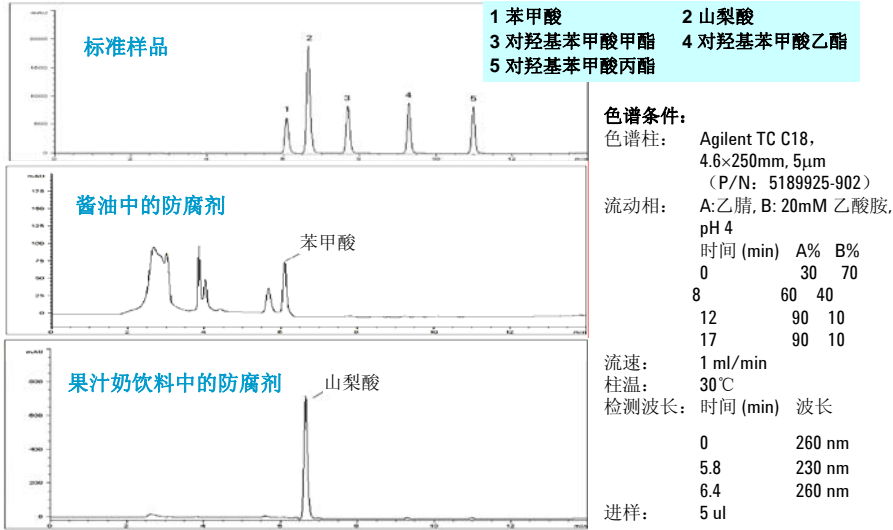
- 峰形尖锐、对称，分离度好
- 未使用离子对试剂，TC C-18 色谱柱对极性组分也能提供较好的保留
- 方法重复性比使用离子对试剂更好

122

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Agilent TC-C18 色谱柱对食品饮料中的防腐剂的测定

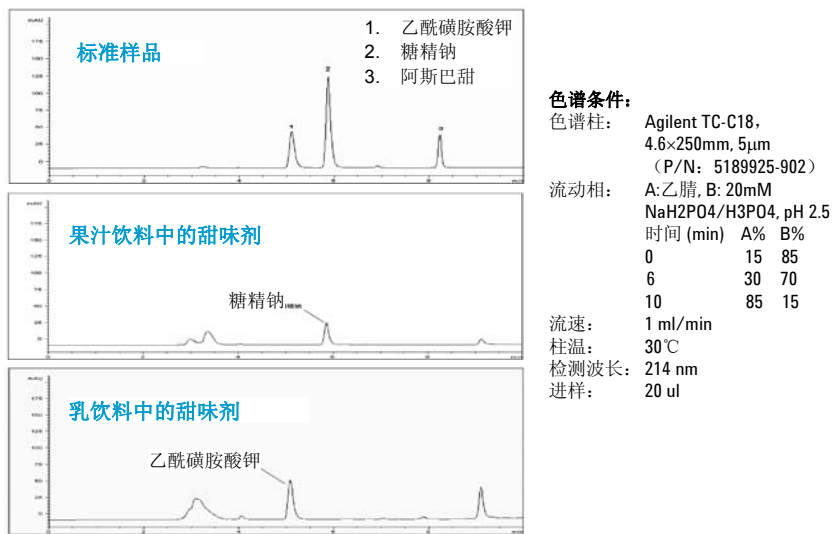


123

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Agilent TC-C18 色谱柱对食品饮料中的甜味剂的测定

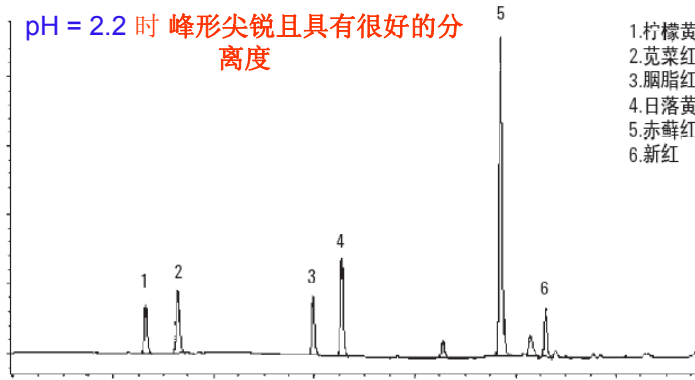


124

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
Agilent LC columns
2008.10.23 Dallan

Agilent HC-C18 色谱柱对食品中着色剂的测定



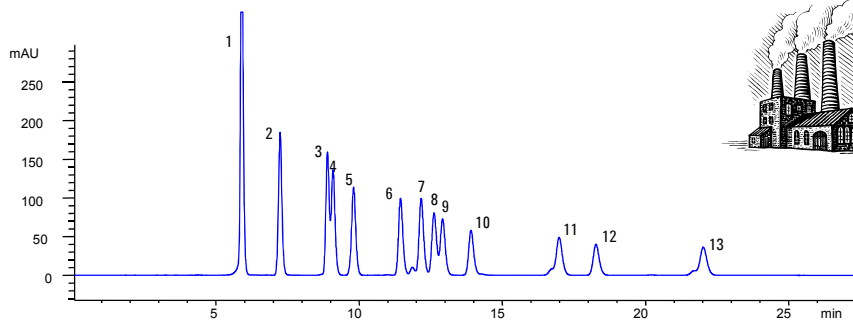
色谱柱: Agilent HC-C18 5 μ m, 4.6mm(i.d) \times 250mm, p/n 518905-902
 流动相A: Water (5mM NH₄OAc) 调节pH至4.5, B: Methanol
 梯度: 0-7min 15%-35% B; 7-12 min 35%-98% B; 12-18min 98% B; Post run 5 min
 流速 1 mL/min
 检测波长 254 nm

125

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dalian

Agilent HC-C18分离羰基-DNPH 衍生物 (EPA TO-11)



- 特点:
1. 高分离度, 尖锐的峰形, Agilent HC-C18表现出了很好的分离性能
 2. 环境样品, 对于非极性衍生物, Agilent HC-C18是理想的选择

色谱柱: Agilent HC-C18, 4.6 x 250mm, 5 μ m 流动相: 溶剂 A:水 B:乙腈 梯度:开始60% B, 30 min 75% B, 35 min 100% B
 流速: 1 mL/min 检测器: UV 230 nm 温度: 35 $^{\circ}$ C 样品: 10 μ l 进样
 样品: DNPH 衍生物 (Supelco 标准品s) (1) 甲醛-2,4-DNPH (2) 乙醛-2,4-DNPH (3) 丙醛-2,4-DNPH (4) 丙酮-2,4-DNPH (5) 丙醛-2,4-DNPH (6) 丁醛-2,4-DNPH (7) 异丁醛-2,4-DNPH (8) 2-丁酮-2,4-DNPH (9) 丁醛-2,4-DNPH (10) 苯甲醛-2,4-DNPH (11) 戊醛-2,4-DNPH (12) p-甲苯 甲醛-2,4-DNPH (13) 己醛-2,4-DNPH

126

Agilent Technologies

How to fast your LC separation
 Agilent LC columns
 2008.10.23 Dalian