

thermo scientific



Acclaim® Trinity™ P1色谱柱

产品手册

Thermo Fisher
SCIENTIFIC

Acclaim® Trinity™ P1 色谱柱

产品手册

075561 Acclaim Trinity P1 , 3 µm, 4.6 x 100 mm
075562 Acclaim Trinity P1 , 3 µm, 4.6 x 50 mm
075563 Acclaim Trinity P1 , 3 µm, 3.0 x 150 mm
071387 Acclaim Trinity P1 , 3 µm 3.0 x 100 mm
071388 Acclaim Trinity P1 , 3 µm 3.0 x 50 mm
075564 Acclaim Trinity P1 , 3 µm, 2.1 x 150 mm
071389 Acclaim Trinity P1 , 3 µm 2.1 x 100 mm
075565 Acclaim Trinity P1 , 3 µm, 2.1 x 50 mm
071390 Acclaim Trinity P1 , 保护柱, 3 µm 3.0 x 10 mm
071391 Acclaim Trinity P1 , 保护柱, 3 µm 2.1 x 10 mm

目 录

第1节 - 前言	3
1.1. 色谱柱化学	3
第2节-入门-逐步操作规程.....	5
2.1 步骤1 – 目视检查色谱柱	5
2.2 步骤2-流动相制备	5
2.2.1 去离子水	5
2.2.2 溶剂	5
2.2.3 缓冲液制备	5
2.3 步骤3- 设置LC系统	6
2.4 步骤4-调节色谱柱	6
2.5 步骤5-在质量保证报告中再现色谱图	6
2.6 步骤6-实际样本分析	7
第3节 – 方法开发	7
3.1. 离子强度	7
3.2. 有机溶剂	7
3.3. 流动相pH值	7
3.4. 电解质类型	7
3.5. 等度对比梯度	8
3.6. 缓冲液类型	8
第4节 -色谱柱维护	9
4.1. 流动相	9
4.2. 保护柱	9
4.3. 色谱柱保存	9
4.4. 操作pH值: pH值 2.5 - 7.0 (推荐pH值 3.0 - 6.0)	9

4.5. 推荐的操作温度: 10 - 40 °C	9
4.6. 推荐的流速和压力限度	9
4.7. 色谱柱清洗规程	9
4.7.1 对于磷酸盐缓冲液中使用的3.0 mm内径色谱柱:	9
4.7.2 对于醋酸铵缓冲液中使用的3.0-mm内径色谱柱:	10
第5节 常见问题.....	11
5.1 什么是Acclaim Trinity P1?	11
5.2 我为什么需要Acclaim Trinity P1?	11
5.3 Acclaim Trinity P1是如何工作的?	11
5.4 我什么时候需要Acclaim Trinity P1?	11
5.5 使用Acclaim Trinity P1进行方法开发时, 我应该考虑哪些因素?	11
5.6 Acclaim Trinity P1应该使用哪些流动相?	12
5.7 在开始使用Acclaim Trinity P1之前应该怎么做?	12
5.8 如何保存Acclaim Trinity P1?	12
5.9 可以使用Acclaim Trinity P1分析阳离子分子吗?	12
5.10 我可以使用Acclaim Trinity P1分析阴离子分子吗?	12
5.11 我可以使用Acclaim Trinity P1分析中性分子吗?	12
5.12 我可以使用Acclaim Trinity P1色谱柱分离碱性、酸性和中性的混合物吗?	12
5.13 使用Acclaim Trinity P1分析柱时, 我是否需要使用保护柱吗?	12
5.14 如果色谱柱出现性能退化, 应该怎么办?	13
5.15 如果色谱柱表现出反压过高, 应该怎么办?	13
第6节 - 应用	14
6.1 药物反离子	14
6.2 酸性药物原料药和阳离子反离子	15
6.3 碱性药物原料药和阴离子反离子	17
6.4 药物配方	19
6.5 高通量分析	21

第1节 前言

Acclaim® Trinity™ P1 是一种新型高效硅胶色谱柱，专门设计用于可同时分离药物原料药和反离子。新型 Nanopolymer Silica Hybrid (NSH) 技术在对以下物质分离时可以获得无可比拟的色谱性能：

1. 原料药和反离子
2. 药物反离子的筛选
3. 酸性和碱性原料药以及各自反离子的混合物
4. 酸性、碱性和中性原料药的混合物

1.1. 色谱柱化学

Acclaim Trinity P1 色谱柱基于 Nanopolymer Silica Hybrid (NSH) 技术，其设计旨在使方法开发能够取得最大的灵活性。对内孔区采用有机层进行了改进，使内孔区具有反相和离子交换性质。相反，对外孔区在阳离子交换功能性上进行了改进（图 1）。尽管一些市售色谱柱采用具有阴离子交换和阳离子交换基团的功能性硅烷生产，但由于其两性或者两性离子的特点，决定了这些色谱柱仅能够作为阴离子交换材料或者阳离子交换材料使用（取决于流动相的 pH 值）。当这些物质形式上为中性时，其以盐形式保留离子，而不是通过离子交换相互作用。此外，由于具有相反电荷的官能团十分接近，并且趋近相互抵消，这些物质的保留机制较为复杂，使方法开发变得繁琐。相比而言，NSH 技术可以确保阴离子交换区（内孔区）和阳离子交换区（外孔区）具有明确的空间分离，从而使其同时具有两种保留机制，并可进行独立控制。

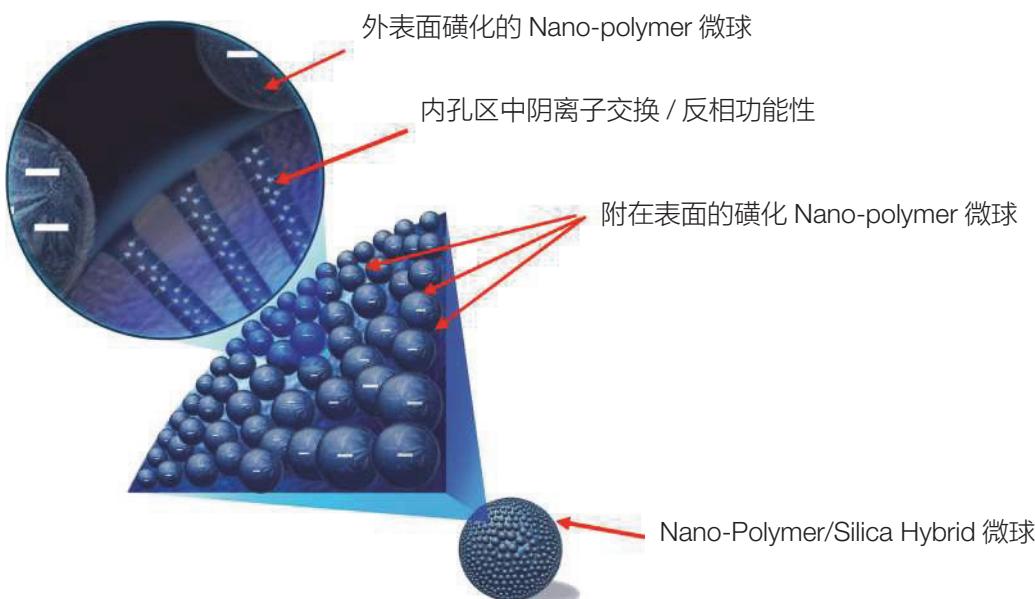


图 1. Acclaim Trinity P1 的色谱柱技术

1.2. 色谱特征

该新型 NSH 色谱柱技术为 Acclaim Trinity P1 提供了以下特征：

1. 多种保留机制，包括反相、阴离子交换和阳离子交换
2. 通过流动相离子强度、电解质类型、pH 值和有机溶剂调节选择性
3. 同时分离碱性、中性和酸性分析物的理想选择性
4. 在无离子对试剂时，保留离子和可电离分析物

1.3. 质量标准和操作条件

操作 pH 值范围： 2.5 - 7.0 (推荐 3.0 - 6.0)

温度上限： 45 °C

操作压力限： 4500 psi

推荐的流速范围： 0.2 - 0.5 mL/min (2.1 mm 内径规格)

0.4 - 1.0 mL/min (3.0 mm 内径规格)

0.8- 2.0 mL/min (4.6 mm 内径规格)

储存溶液： MeCN/20 mM NH₄OAc, pH 值为 5 的 v/v 90/10

水性相容性： 与 100% 水性流动相相容

有机相容性： 与常见的 HPLC 有机溶剂相容



始终使用缓冲溶液进行分析和储存。

警告

避免突然的压力波动。

1.4. 物理性质

色谱柱化学：含有 SCX、WAX 和 RP 功能的专有三模相

二氧化硅基质：高纯度多孔微球

粒度： 3 μm

第 2 节 - 入门 - 逐步操作规程

Dionex 建议您在使用前对 Acclaim Trinity P1 色谱柱进行柱效检查。色谱柱性能确认的目的是确保在运输过程中没有发生损坏。以下步骤 1 - 5 概述了执行此确认检查的必要步骤。使用随附于色谱柱包装盒中质量保证 (QA) 报告上所述的条件检查色谱柱。定期重复检查以跟踪色谱柱性能随时间的变化。注意，由于系统电子、管路连接、操作环境、试剂质量、色谱柱条件和操作员技术的不同，其结果可能在两个不同的 HPLC 系统上有轻微变动。

2.1 步骤 1 – 目视检查色谱柱

向 Dionex Corporation 报告任何损坏情况。根据损坏的性质，我们可能会要求您将损坏的色谱柱运回进行更换。

2.2 步骤 2- 流动相制备

为获得可靠、一致和准确的结果，需要不含离子和光谱杂质的流动相。用于制备流动相的化学品、溶剂和去离子水应具有最高的纯度。在流动相中维持低痕量杂质和低微粒水平有助于保护色谱柱和系统组件。当用于制备流动相的化学品、溶剂和水质量受损时，Dionex 不能保证适当的色谱柱性能。

2.2.1 去离子水

用于制备流动相的去离子水应为 1 型试剂级水或 HPLC 级水。去离子水应不含电离杂质、有机物、微生物和大于 $0.2 \mu\text{m}$ 的微粒。许多市售净水器针对 HPLC 应用而设计并适应于这些应用。



注意 将流动相的水性组分脱气，然后加入溶剂组分。如果可能，避免对含溶剂流动相进行过度清洗或脱气，因为挥发性溶剂可以从溶液中通过“沸腾”散出。

2.2.2 溶剂

所用溶剂不得含离子和紫外吸收杂质。使用超高纯度溶剂 (HPLC 级) 通常可确保您的色谱结构不受溶剂中杂质的影响。

2.2.3 缓冲液制备

根据具体应用，流动相系统可以由有机溶剂（例如乙腈或甲醇）和缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲液或醋酸铵缓冲液）组成。预混合和比例阀产生的流动相均可得到满意的结果。比例阀的使用在方法优化中提供了更好的灵活性，而预混合的流动相则提供更少的基线噪声和更好的系统间再现性。

示例 A： 制备 100 mM, pH 值为 5 的醋酸铵缓冲液

1. 称取 7.70 g 醋酸铵和 2.00 g 乙酸。充分混合。
2. 加入 998 g 去离子水至上述溶液。
3. 将所得流动相超声处理 10 min 以除去溶解的气体。



对于 CAD 或 ELSD 方法，所有化学品必须是高纯度 (99.99+%) 且不含非挥发物。

例如：

- 注意**
- 醋酸铵, 99.99+% (Sigma-Aldrich, 目录号 431311)
 - 甲酸铵, 99.995% (Sigma-Aldrich, 目录号 516961)
 - 乙酸, 99.7% (VWR, 目录号 BDH3092)

示例 B：制备 100 mM, pH 值为 6 的磷酸钠缓冲液

1. 称取 12.0 g 磷酸二氢钠和 0.2 g 焦磷酸钠 *。
2. 将上述盐完全溶解在 1000 g 去离子水中。
3. 向上述溶液中加入 1 g NaOH 溶液 (50% wt/wt)
4. 将所得流动相超声处理 10min 以除去溶解的气体。

* 添加少量焦磷酸钠可消除来自流动相、仪器和色谱柱硬件，可造成干扰的金属污染。

2.3 步骤 3- 设置 LC 系统

使用配有 LC 泵、柱箱和进样器（或自动进样器）的标准 LC 系统。对于具有发色团的分析物，可以使用 UV 或 DAD 检测器。对于非挥发性分析物没有或具有非常弱的发色团，则应该考虑 ELS 检测器，其需要使用挥发性流动相，例如醋酸铵缓冲液。系统应在使用前彻底冲洗。

2.4 步骤 4- 调节色谱柱

当第一次使用新的色谱柱时，在进行任何进样之前，应采用流动相进行彻底冲洗（例如，在推荐的流速，大约使用 20 柱体积）。

当切换到新的流动相时，确保新的流动相与色谱柱中以前的流动相相容，以避免由于沉淀造成色谱柱堵塞。在进行任何进样（例如 20 个柱体积）之前，应完全调节色谱柱。

对于 ELSD，当从非挥发性（例如磷酸盐缓冲液）流动相切换到挥发性（例如醋酸铵缓冲液）流动相时，在脱机情况下，色谱柱应该用乙腈 / 100 mM 醋酸铵 (50:50, v/v) 冲洗 20 倍柱体积，然后用乙腈 / 100 mM 醋酸铵 (75:25, v/v) 冲洗 10 倍柱体积，在最终与 ELS 检测器接线前，用 20 倍柱体积平衡至所需的流动相。

2.5 步骤 5- 在质量保证报告中再现色谱图

使用质量保证报告中描述的条件执行色谱柱性能检查，并将结果与报告中的结果进行比较。色谱柱完全平衡后，应进行多次进样，直至保留时间再现。



注意 出于各种原因，如 LC 系统、流动相、柱箱温度控制等的差异，您可能会发现与报告中的保留时间略有不同。如果您有问题，请联系 Dionex。

2.6 步骤 6- 实际样本分析

一旦在步骤 5 确认了色谱柱性能令人满意，则该色谱柱即可用于实际样本分析。如有任何技术问题，请联系 Dionex。



建议定期进行色谱柱性能检查，以监测色谱柱的条件。

注意

第3节 方法开发

为了优化色谱方法，流动相离子强度、pH 值、有机溶剂和电解质类型是可以单独或者同时调节的关键变量。

3.1. 离子强度

离子强度对带电荷和可电离分析物的保留十分关键。离子强度增加可导致阴离子和阳离子分析物保留的减少，但对中性分子无实质性影响。

3.2. 有机溶剂

疏水物质的保留会受到流动相有机溶剂的影响。当增加流动相有机含量（同时保持其他参数恒定，例如离子强度、pH 值、温度等），酸性、碱性和中性分析物在色谱柱上的保留会出现不同程度的下降，经常导致洗脱顺序的变化。由于更低的操作压力和更好的峰效率，乙腈是优于甲醇的首选溶剂。

3.3. 流动相 pH 值

流动相 pH 值是方法开发中的另一重要因素，尤其是对于带电荷分析物。通常在正常 HPLC 条件下，pH 值几乎对中性物质无实质性影响，对阳离子有微小但明显影响，对具有羧基官能团的阴离子分析物具有显著影响。

3.4. 电解质类型

流动相中电解质的类型会影响所有类型分析物的保留。

流动相中的阴离子影响阴离子分析物的保留。例如，高氯酸根离子是一种比氯离子更强的竞争性离子，可以导致相同盐浓度下阴离子分析物的保留更少。相反，在相同条件下，阴离子分析物不受电解质阴离子的影响。对于中性分析物，不同阴离子的保留时间会稍有不同。

流动相中的阳离子影响阳离子分析物的保留。例如， K^+ 是比 Na^+ 离子更强的竞争性离子，而 Na^+ 离子要比 Li^+ 离子更强。因此，在相同盐浓度下，阳离子分析物的保留情况按照 $K^+ < Na^+ < Li^+$ 的顺序排列。相反，阴离子分析物不受阳离子类型的影响。对于中性分析物，不同阳离子产生实质上相同的保留时间。

3.5. 等度对比梯度

对于许多涉及少于 3 个分子的应用，例如同时测定 API 和反离子，通常更容易开发等度方法。对于更复杂的分离，例如有关具有不同类型和电荷数以及不同疏水性分子混合物的分离，采用梯度方法可能更有利。实际上，已经证明离子强度梯度，有机改性剂梯度或者两种结合的形式在再现性和简化方面均得到满意的结果。

3.6. 缓冲液类型

Acclaim Trinity P1 必须使用缓冲的流动相。

本色谱柱设计用于采用醋酸铵缓冲液的应用情况，与 CAD、ELSD、MS 和 UV 相容 ($>225\text{ nm}$)。当应用要求时，色谱柱也可以与磷酸盐缓冲液一同使用。

当处理主动抗 UV 分析物时，可以考虑结合磷酸盐缓冲液进行 UV 检测。如果可能的话，按多个波长设定 UV 检测，包括针对有机酸设定的 1 个 210 nm 波长。当处理无发色团的分析物时，则应考虑 CAD、ELS 检测结合挥发性缓冲液(例如，醋酸铵)。确保流动相不含非挥发性物质，并且采用非挥发性流动相组分彻底冲洗了 LC 系统的所有通道。当处理含有和不含有发色团的分析物混合物时，最好在分析色谱柱之后串联 UV 和 ELS 检测器。在此情况下，要求使用挥发性流动相 (例如，醋酸铵)。由于在流动相中使用醋酸盐，在设定 UV 检测的波长值时通常大于 225 nm 。

第4节 色谱柱维护

4.1. 流动相

应新鲜制备所有流动相，并且使用不超过 5 天。对于在中性 pH 值下的磷酸盐缓冲液，应每隔三天制备新鲜的缓冲液。所有化学品和溶剂应具有最高水平的质量。所有缓冲溶液应无微粒。推荐使用串联滤器。

4.2. 保护柱

与分析色谱柱一同使用，并根据样本特性定期更换保护柱是一种良好的做法。当处理含有较多杂质的样本时使用保护柱尤为重要。如果未这样做，将导致色谱柱性能快速退化以及色谱柱早期失效。

4.3. 色谱柱保存

只要流动相 pH 值在 4 至 6 之间，可以在流动相中短期保存色谱柱。

对于中期储存，当使用磷酸盐缓冲液时，将色谱柱保存在 pH 值为 3 (70: 30 v/v) 的乙腈 /10 mM 磷酸盐缓冲液中；当使用醋酸铵作为缓冲液时，将色谱柱保存在 pH 值为 5 (70: 30 v/v) 的乙腈 /10 mM 醋酸铵中。对于长期保存，使用 pH 值为 5 (90: 10 v/v) 的乙腈 /10 mM 醋酸铵作为保存液。

4.4. 操作 pH 值： pH 值 2.5 - 7.0 (推荐 pH 值 3.0 - 6.0)

4.5. 推荐的操作温度： 10 - 40 °C

我们的评价建议 45 °C 条件下间歇使用色谱柱。通常通过调节流动相离子强度、pH 值、电解质类型和 / 或有机溶剂含量优化分离。不建议升高温度，并应该避免此种情况。

4.6. 推荐的流速和压力限度

通常，只要不超过压力限度，3.0 mm 内径色谱柱在 0.4 to 0.6 mL/min 流速下能够获得良好的色谱柱效率，同时可以使用更高的流速（例如 1 mL/min）进行快速分析。不得突然对色谱柱施加压力波动，这很重要。因此逐渐将流速由 0.2 mL/min 增加至预期流速。100-mm 长色谱柱的压力限度为 4500 psi。

4.7. 色谱柱清洗规程

当色谱柱需要进行清洗操作时，例如色谱柱性能退化和 / 或后压极高时，可使用以下规程作为指导原则。

4.7.1 对于磷酸盐缓冲液中使用的 3.0 mm 内径色谱柱：

1. 在 0.3 mL/min 流速时，使用 5 个柱体积的 20 mM 磷酸钠（或钾）缓冲液，pH 值 6 / 乙腈 v/v 50/50 清洗色谱柱。

2. 在 0.3 mL/min 流速时，使用 20 个柱体积的 100 mM 磷酸钠（或钾）缓冲液，pH 值 6 / 乙腈 v/v 90/10 清洗色谱柱（以强力清除滞留的离子物）。
3. 在 0.3 mL/min 流速时，使用 5 个柱体积的 10 mM 磷酸钠（或钾）缓冲液，pH 值 6 / 乙腈 v/v 50/50 清洗色谱柱。
4. 在 0.3 mL/min 流速时，使用 20 个柱体积的 10 mM 磷酸钠（或钾）缓冲液，pH 值 6.4 / 乙腈 v/v 20/80 清洗色谱柱（以强力清除滞留的疏水污染物）。
5. 使用至少 20 个柱体积流动相平衡色谱柱。



注意 2.1mm 内径色谱柱的流速应设定为 0.15 mL/min。

注意 4.6 mm 内径色谱柱的流速应设定为 0.6 mL/min。



注意 通过原位比例阀混合以下三种组分：乙腈、DI 水和 100 mM 含有焦磷酸钠 (0.2g/L) 的磷酸钠（或钾）溶液，pH 值为 6，可方便进行上述清洗。



注意 在清洗液中添加焦磷酸钠 (~0.2 g/L) 有助于去除流动相、样本、LC 系统等中的金属污染物。

注意



注意 如果上述处理未改善色谱柱的性能，则使用新的色谱柱进行替换。

注意

4.7.2 对于醋酸铵缓冲液中使用的 3.0-mm 内径色谱柱：

1. 在 0.3 mL/min 流速时，使用 5 个柱体积的 20 mM 醋酸铵溶液 / 乙腈 v/v 50/50 清洗色谱柱。
2. 在 0.3 mL/min 流速时，使用 20 至 50 个柱体积的 200 mM 醋酸铵溶液 / 乙腈 v/v 80/20 清洗色谱柱（以强力清除滞留的离子物）。
3. 在 0.3 mL/min 流速之间，使用 20 个柱体积的 20 mM 醋酸铵溶液 / 乙腈 v/v 20/80 清洗色谱柱（以强力清除滞留的疏水污染物）。
4. 使用至少 20 个柱体积的流动相平衡色谱柱。



注意 通过原位比例阀混合以下三种组分：乙腈、DI 水和 200 mM 醋酸铵溶液，可方便进行上述清洗。

注意



注释 如果上述处理未改善，则使用新的色谱柱进行替换。

第 5 节 常见问题

5.1 什么是 Acclaim Trinity P1?

Acclaim Trinity P1 是一种新型高效硅胶柱，专为药物应用而设计，包括同时分离原料药及其反离子。

该色谱柱基于 nanopolymer silica hybrid(NSH)技术，提供具有反相、阴离子交换和阳离子交换的多种保留机制。因此，通过同时或单独调整流动相缓冲液浓度、pH 值和溶剂含量可简单优化选择性。NSH 技术确保阴离子交换和阳离子交换区域具有明确的空间分离，可以实现最灵活的方法开发。易于优化的选择性可加速色谱分离，并提高生产力。

5.2 我为什么需要 Acclaim Trinity P1 ?

药物由具有各种疏水性的酸性、碱性和中性分子组成，例如 API 和反离子。尽管反相色谱柱（例如 C18）最常用于药物开发中，但它们通常不适于在不使用离子对试剂的情况下测定药物反离子和高亲水性 API。虽然几种市售的混合模式 HPLC 柱可在相当有限的条件下同时测定 API 和反离子，但它们不适用于疏水性较小的离子药物分子。Acclaim Trinity P1 以这样一种方式提供了一种独特的通用解决方案，即可以在同一分析中的同一色谱柱上同时测定 API 和反离子以及阳离子和阴离子反离子。

5.3 Acclaim Trinity P1 是如何工作的？

Acclaim Trinity P1 由高纯度、多孔硅胶微球组成。内孔区采用有机层以进行功能性改进，使之具有反向和阴离子交换性质。相反，对外孔区增添了阳离子交换功能。因此，Acclaim Trinity P1 同时具有反相、阴离子交换和阳离子交换保留的特性，因此可以分离中性、酸性和碱性分析物的混合物。

5.4 我什么时候需要 Acclaim Trinity P1 ?

在以下应用条件时，您应考虑使用 Acclaim Trinity P1，特别是当您的“常规”分离色谱柱（例如 C18）无法获得令人满意的结果时。

- API 和反离子的分析
- 药物反离子（阴离子和阳离子）的测定
- 分离酸性、碱性和中性的 API
- 分离药物相关的碱性分子

5.5 使用 Acclaim Trinity P1 进行方法开发时，我应该考虑哪些因素？

实际上，流动相离子强度（或缓冲液浓度）和有机溶剂含量是优化该方法最有效和便捷的途径。此外，缓冲液 pH 值和电解质（盐类添加剂）类型常常影响保留以及选择性（参见第 3 节 - 方法开发中的注意事项）。

5.6 Acclaim Trinity P1 应该使用哪些流动相？

虽然 Acclaim Trinity P1 与大多数 HPLC 流动相兼容，但其设计用于与 CAD、ELSD、MS 和 UV (> 225nm) 相容的醋酸铵缓冲液应用。根据应用，醋酸铵浓度可以在 5 mM 至 200 mM 之间。最佳柱寿命的推荐 pH 值范围为 2.5

至 7.0。特别维护条件下，该色谱柱可以在 pH 值 2.0 至 7.5 的条件下使用，如使用后立即使用储存液冲洗色谱柱（参见第 3 节 - 方法开发中的注意事项）。

5.7 在开始使用 Acclaim Trinity P1 之前应该怎么做？

请仔细阅读本用户指南，如果您对该色谱柱使用存有任何疑问，请联系 Dionex 技术支持。

5.8 如何保存 Acclaim Trinity P1 ？

详细信息，请参阅“第 4.3 节色谱柱保存”。

5.9 可以使用 Acclaim Trinity P1 分析阳离子分子吗？

可以。您可以将此色谱柱用于所有类型具有不同疏水性的药物相关碱性（或阳离子）分子，包括钠离子、钾离子、胆碱、儿茶酚胺、三环抗抑郁药物等。

5.10 我可以使用 Acclaim Trinity P1 分析阴离子分子吗？

可以。您可以将此色谱柱用于所有类型具有不同疏水性的药物相关酸性（或阴离子）分子，包括氯化物、溴化物、有机酸、酸性药物等。

5.11 我可以使用 Acclaim Trinity P1 分析中性分子吗？

可以。该色谱柱可以保留具有中度至高度疏水性的中性分子。为了保留高度亲水的中性分子，应考虑 HILIC 分离模式（流动相有机溶剂大于 90%）。

5.12 我可以使用 Acclaim Trinity P1 色谱柱分离碱性、酸性和中性的混合物吗？

可以。Acclaim Trinity P1 对于分离不同电荷及不同疏水性分析物的混合物是理想的选择，同时在分离方法开发中具有极大的灵活性。

5.13 使用 Acclaim Trinity P1 分析柱时，我是否需要使用保护柱吗？

是的。保护柱通过从流动相或样本中捕集高度保留的组分和微粒以保护更昂贵的分析柱。

5.14 如果色谱柱出现性能退化，应该怎么办？

详细信息，请参阅“第 4.7 节色谱柱清洗步骤”。

5.15 如果色谱柱表现出反压过高，应该怎么办？

首先确保在使用前，新鲜制备并过滤流动相，并且样本中不含微粒。然后，在监测柱压力变化的同时，反冲洗色谱柱一定时间（例如 10 至 30 min）。如果问题仍然存在，请更换新的色谱柱。

第 6 节 应用

Acclaim Trinity P1 经过精心设计，使用挥发性流动相（如醋酸铵）可为药物反离子以及各种药物提供最佳选择性。检测方法包括 ELSD、UV 和 MS。其它 HPLC 流动相（例如磷酸盐缓冲液）也可以在其操作要求内使用。

色谱条件和方法开发策略在以下实例中进行说明。

6.1 药物反离子

Acclaim Trinity P1 使用乙腈 / 醋酸铵流动相系统和 Corona Ultra 检测器为分离常见药物反离子，包括阳离子和阴离子提供了最佳选择性。图 2 显示了单次运行中 5 种阳离子和 5 种阴离子的基线分离。注意，以此方式设计色谱柱选择性旨在使阳离子在阴离子之前洗脱。这是唯一可用并可简单且可靠地分离阳离子和阴离子色谱柱。

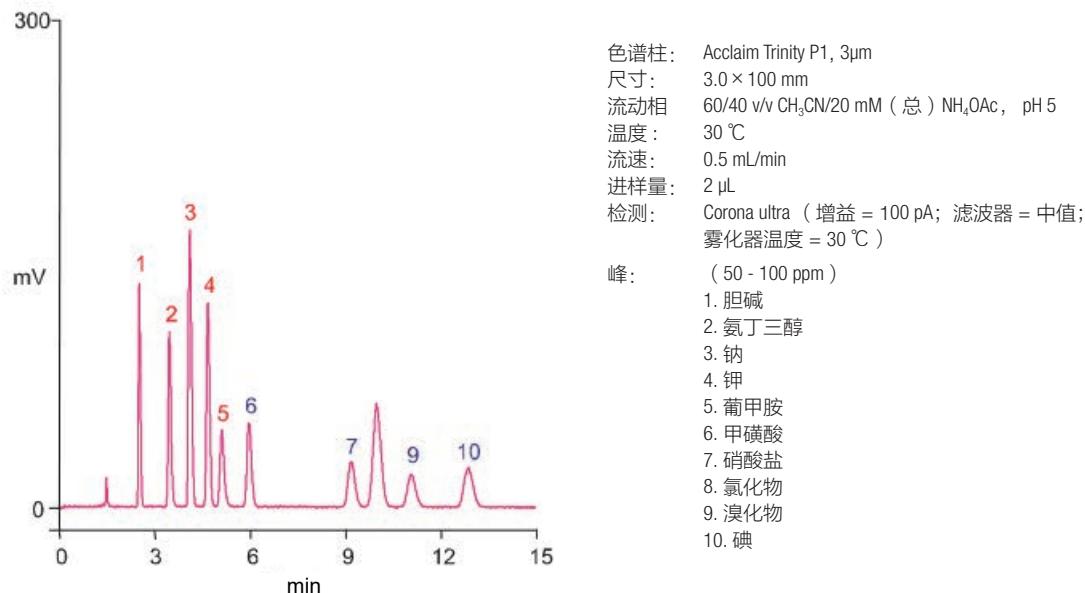


图 2 同步分离药物反离子 (等度法)

Acclaim Trinity P1 柱的理想选择性也在图 3 中得以证实，其中十六种最常用的药物反离子，包括六个阳离子和十个阴离子，在 50mm 长的色谱柱上可基线分离。注意，这里描述的方法作为用户开始其独立方法开发的“起点”。根据每个应用的具体要求，可以调节缓冲液浓度、pH 值和 / 或梯度以获得最佳结果。

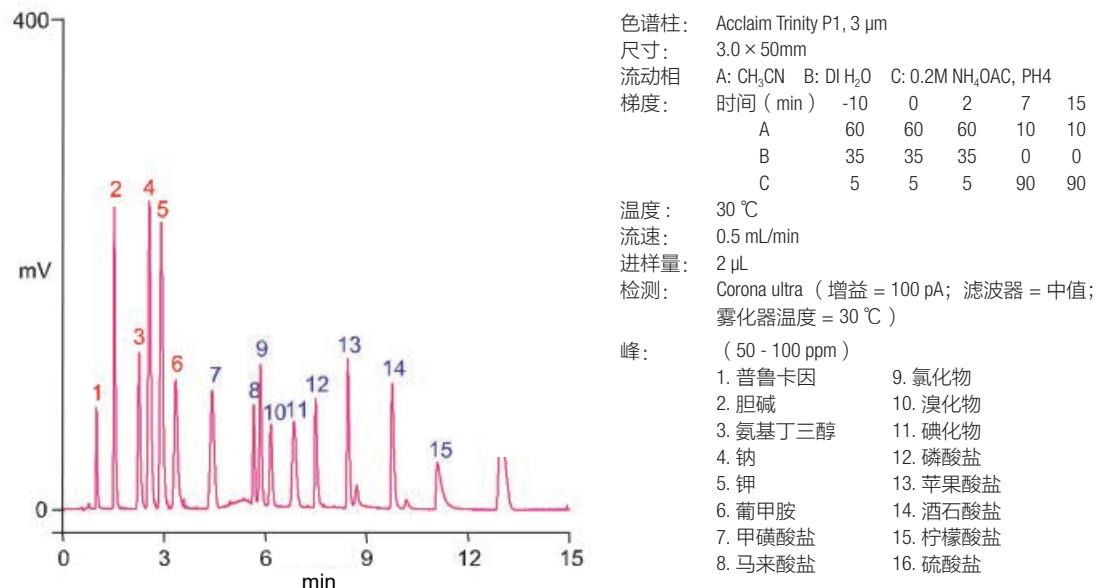


图3 同步分离药物反离子 (梯度法)

6.2 酸性药物原料药和阳离子反离子

在药物成分中, Na⁺离子是酸性药物最常用的反离子, 通常不能保留在任何反相色谱柱上。由于其新型柱化学性质, Acclaim Trinity P1 可以同时保留阳离子和阴离子。图4 显示了在 50 mm 长的色谱柱上 Na⁺离子和萘普生——疏水性酸性药物的分离。无机阳离子的保留受缓冲液浓度的影响大于流动相有机溶剂的影响。另一方面, 疏水性酸性药物更容易受有机改性剂的影响。因此, 当使用含有高浓度乙腈 (75%) 和 30 mM 醋酸铵的流动相时, 可以开发具有足够保留度和优异分离度的 3 min 方法。在该分离中, UV 和 ELS 检测器串联使用以获得互补结果。

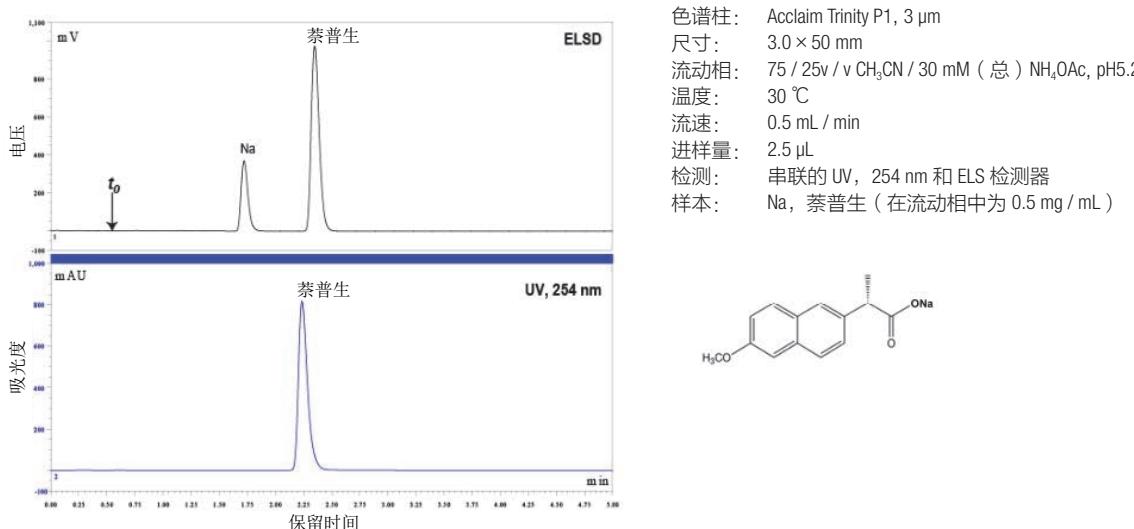


图4 酸性药物和反离子 - Na, 萘普生

流动相 pH 值是调节选择性和优化分离的重要参数。当 pH 值从 5.2 降低到 4.1 时，萘普生的负电荷显著降低，并且主要通过疏水相互作用保留。因此，萘普生在 Na^+ 离子之前洗脱，而不是在 pH 值 5.2 时的 Na^+ 离子之后洗脱(图 5)。流动相离子强度是调节选择性的另一个重要参数。如图 6 所示，通过将缓冲液浓度从 30 mM 降低至 20 mM，可以进一步增加萘普生和 Na^+ 离子之间的分离度。

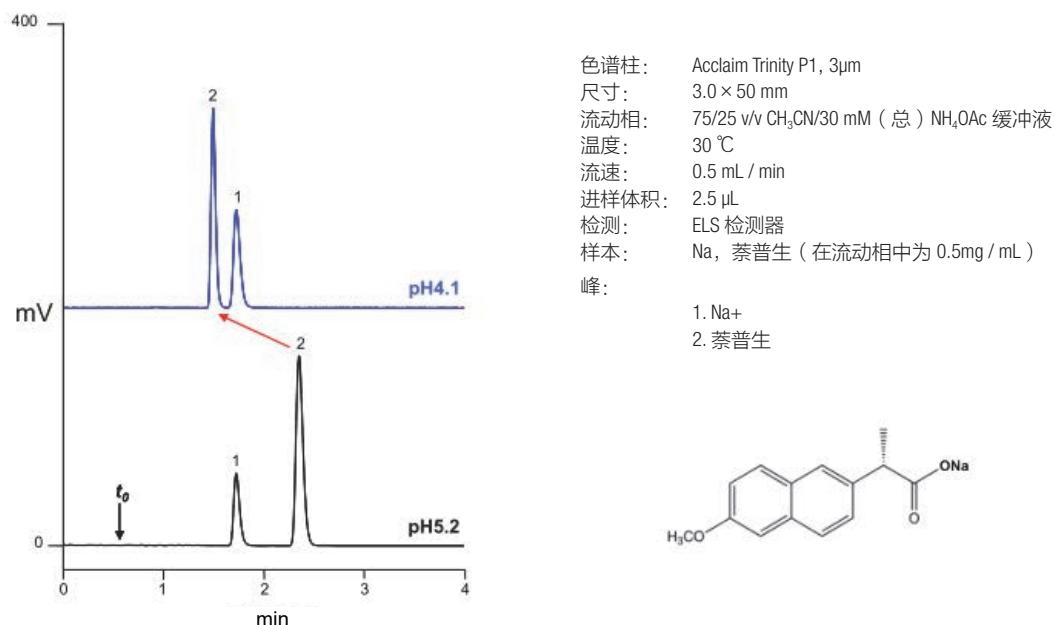


图 5 pH 值效应 – Na, 萘普生

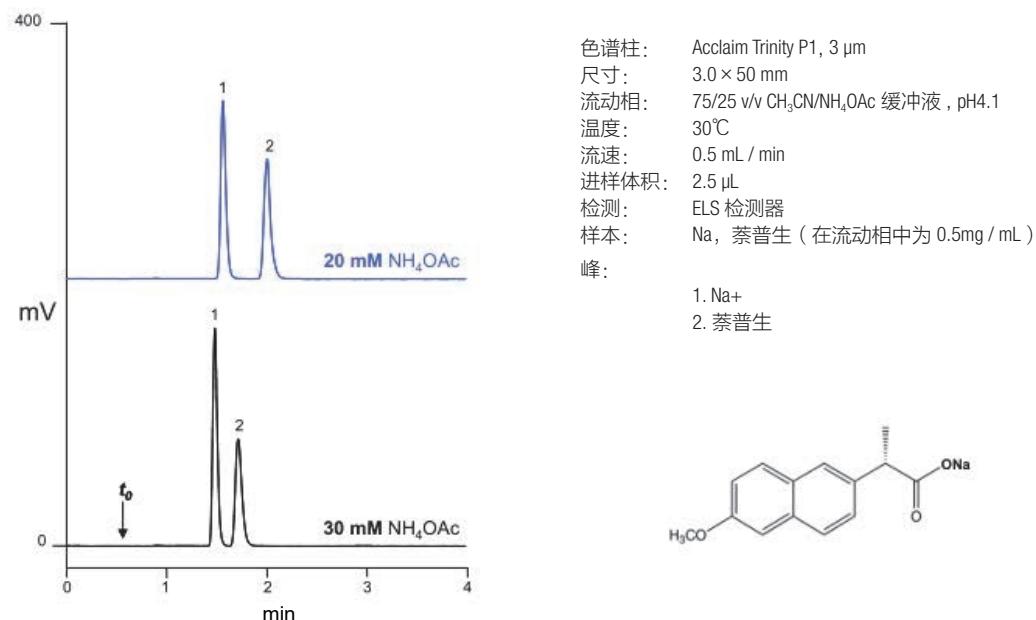


图 6 离子强度效应—Na, 萘普生

6.3 碱性药物原料药和阴离子反离子

碱性药物最常用的反离子是 Cl⁻ 离子，Cl⁻ 离子不能保留在任何反相色谱柱上。图 7 显示了流动相离子强度对 1,1-二甲基双胍盐酸盐分离度的影响。缓冲液浓度越低，阴离子和阳离子分析物的保留时间越长。图 8 给出了使用不同浓度的乙腈分离 1,1- 二甲基双胍盐酸盐。由于分析物的亲水性以及 Acclaim Trinity P1 提供的多重保留机制，在 90% 乙腈 (HILIC 模式) 下观察到比在 70% 乙腈下更久的保留性能。在乙腈浓度低于 70% 时，保留性能随流动相含水量增加而增强，尽管 20mM 醋酸铵浓度保持不变。因此，当使用高亲水性分子时，HILIC 是方法开发的附加杠杆作用。

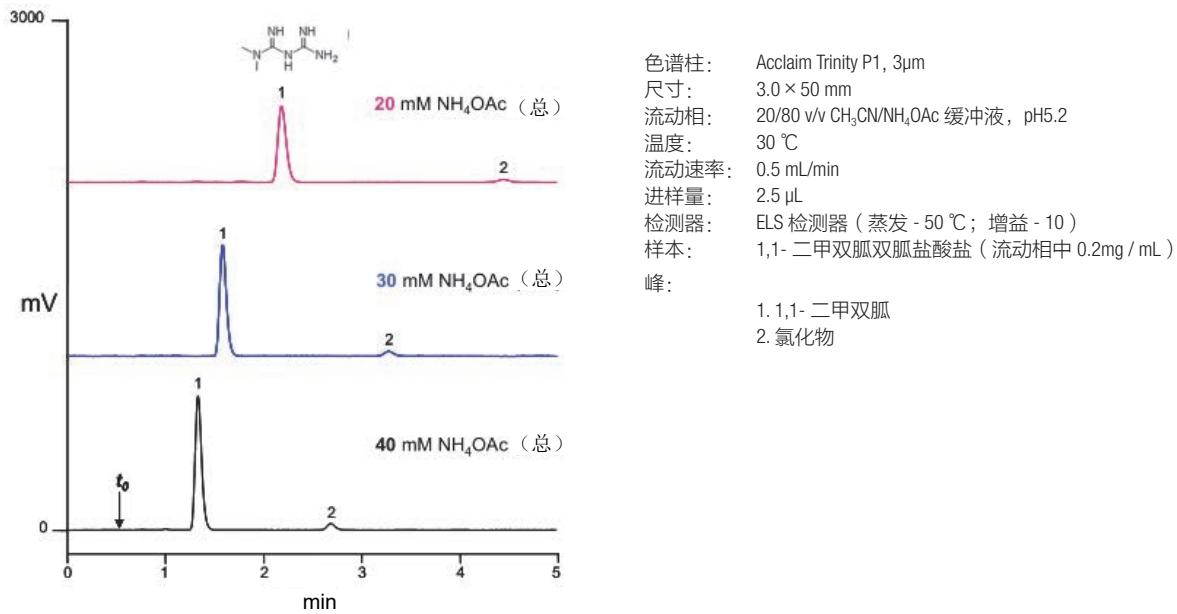


图 7 离子强度效应—1,1- 二甲基双胍盐酸盐

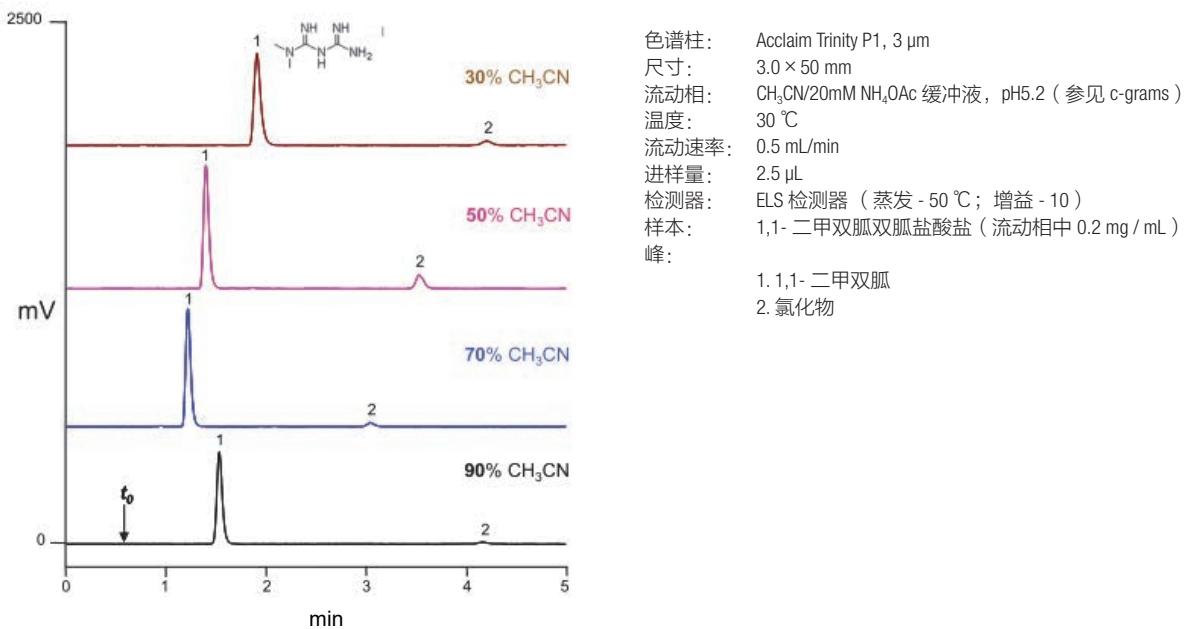


图 8 有机溶剂效应 - 1,1- 二甲基双胍盐酸盐

图 9 显示了 50 mm 长的 Acclaim Trinity P1 色谱柱分离 Cl⁻ 离子和利多卡因——一种常用药物。由于利多卡因具有挥发性而无法通过 ELSD 观察到，因此需要用 UV 和 ELS 检测器串联同时检查药物和反离子。在这种情况下，流动相仅含有 20% MeCN 和 30 mM 醋酸铵缓冲液，以获得足够的碱性药物保留因子 ($k' \sim 2$)。注意，碱性药物的保留因子可以通过使用较低的缓冲液浓度进一步增加，但 Cl⁻ 离子洗脱也将随之延后。

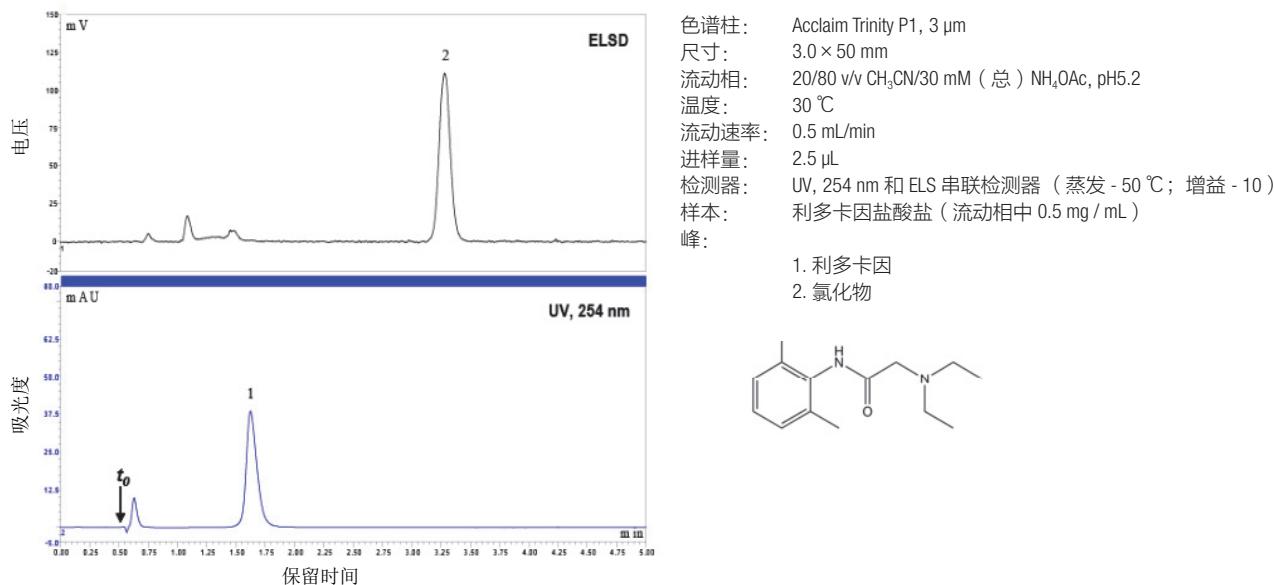


图 9 碱性药物和反离子 – 利多卡因 · HCl

图 10 显示了用 50 mm 长的 Acclaim Trinity P1 色谱柱分离 Cl⁻ 离子和伪麻黄碱——一种常用的碱性药物。

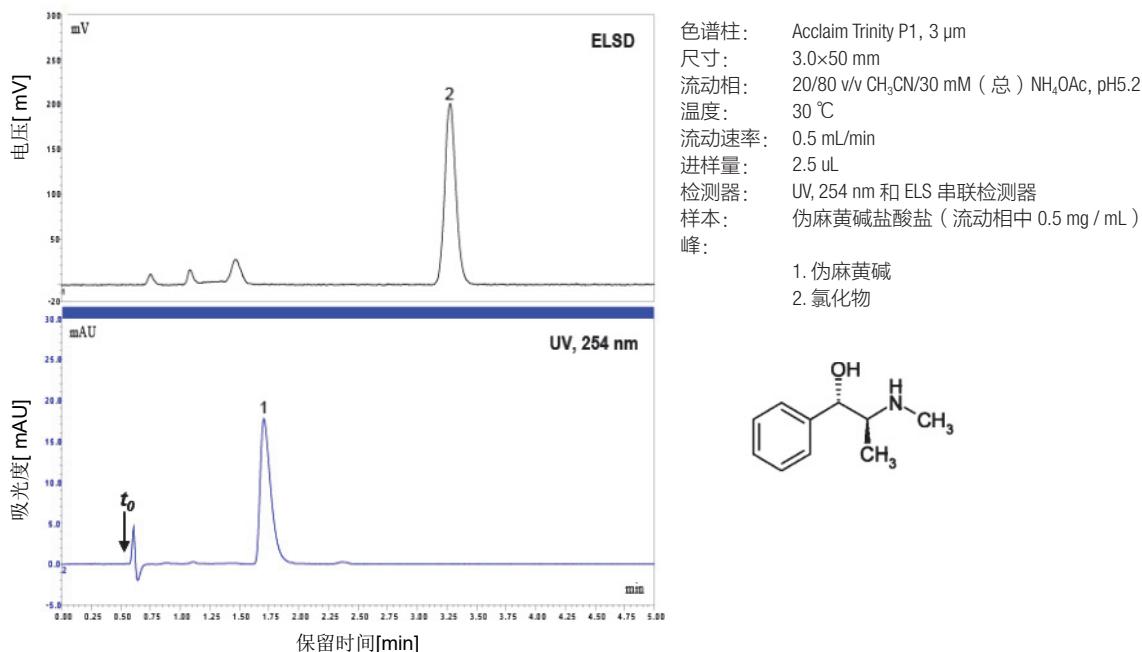


图 10 碱性药物和反离子 – 伪麻黄碱盐酸盐

6.4 药物配方

图 11 显示了非处方药物——包含伪麻黄碱盐酸盐和萘普生钠盐活性成分的 ALEVE®SINUS & HEADACHE 的分离度。考虑到电荷差异和疏水性的巨大差异，合理使用梯度法。首先， Na^+ 离子以低浓度缓冲液和低浓度有机溶剂洗脱。然后在同时增加缓冲液浓度和有机溶剂之后，洗脱伪麻黄碱，然后是 Cl^- 离子。最后，萘普生用高浓度有机溶剂和高浓度缓冲液洗脱。因为伪麻黄碱具有挥发性而无法通过 CAD 观察到，所以需要串联 UV 和 CAD 检测器同步测定原料药和反离子。

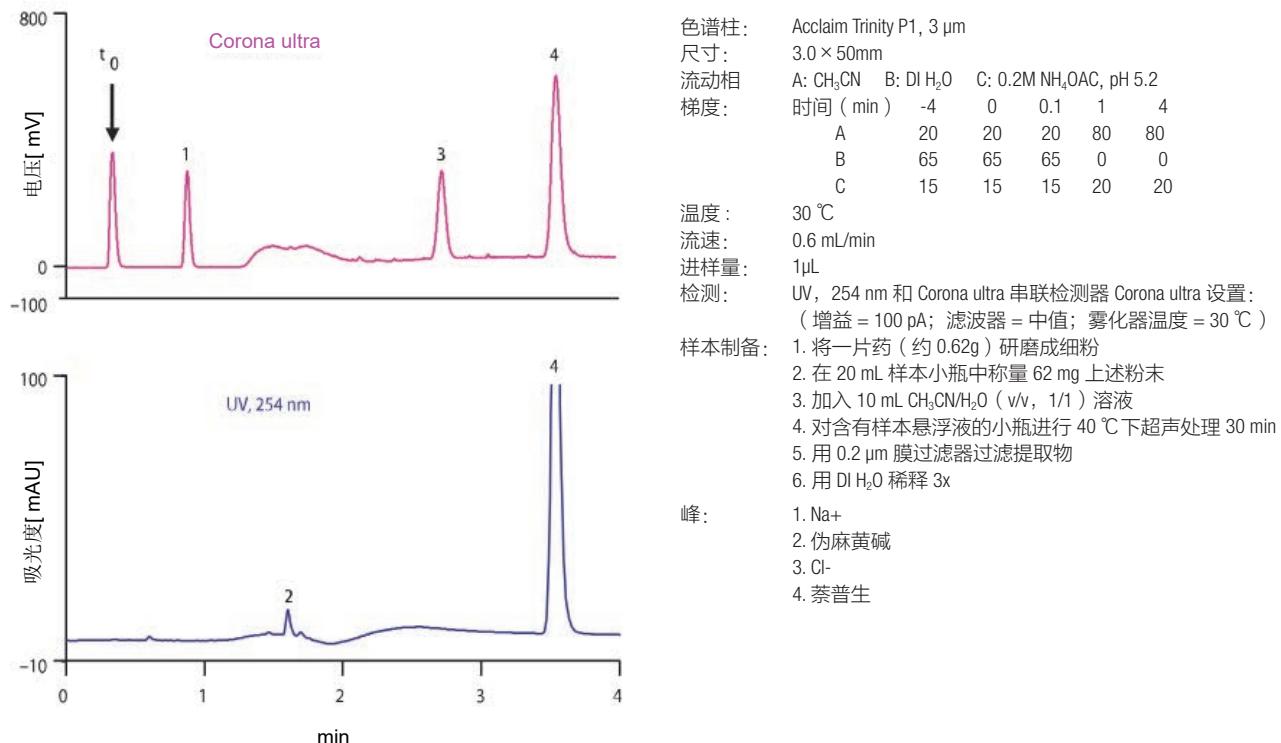


图 11 非处方药—ALEVE SINUS & HEADACHE

另一个示例是在含有伪麻黄碱、马来酸氯苯那敏和布洛芬的非处方药——Advil® Allergy & SINUS 中分离碱性和酸性原料药的混合物（图 12）。使用乙腈和醋酸铵缓冲液进行梯度洗脱，所有关注分析物得到了良好分离度，具有良好峰形，并且在小于 3 min 内没有干扰。如前所述，pH 值是方法优化的重要工具。如图 13 所示，当缓冲液 pH 值为 5.2 时，氯苯那敏处于干扰峰簇的顶部。仅将 pH 值降至 4.1，同时保持其余参数恒定，我们就可以将氯苯那敏从这些干扰中移开。

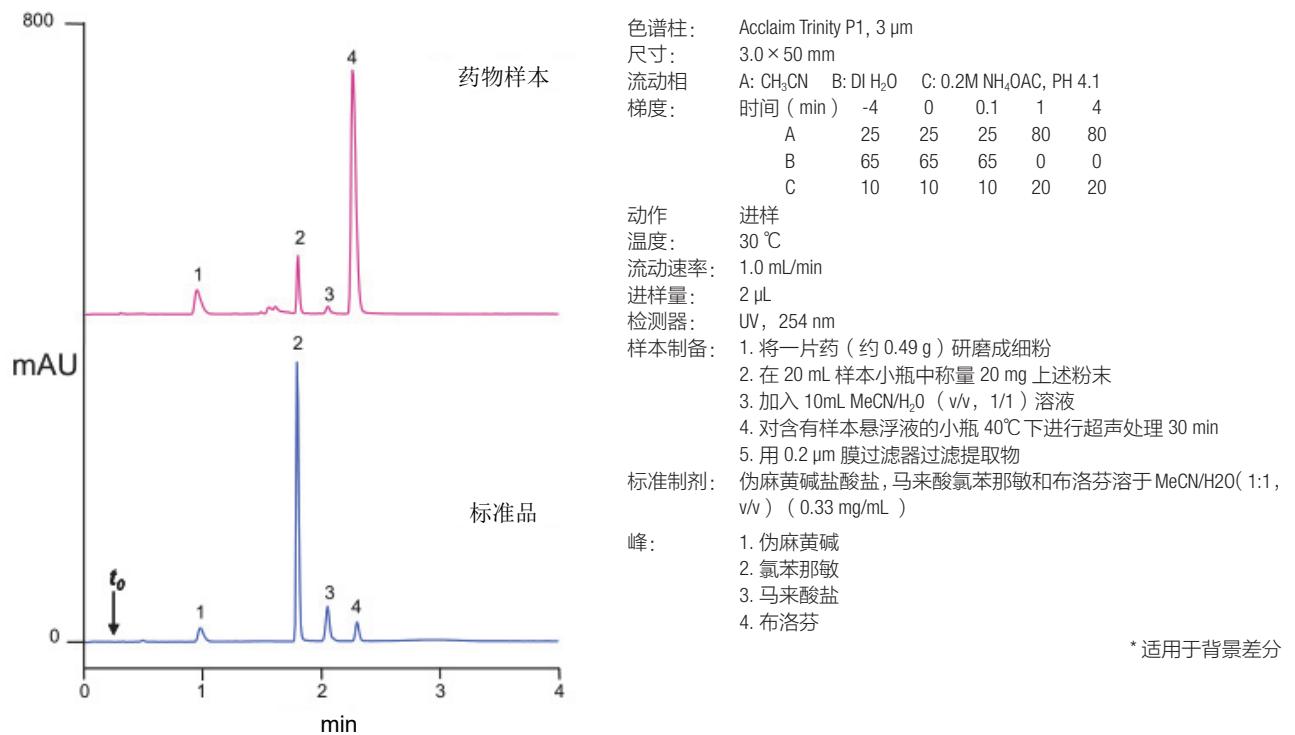


图 12 非处方药—Advil ALLERGY & SINUS

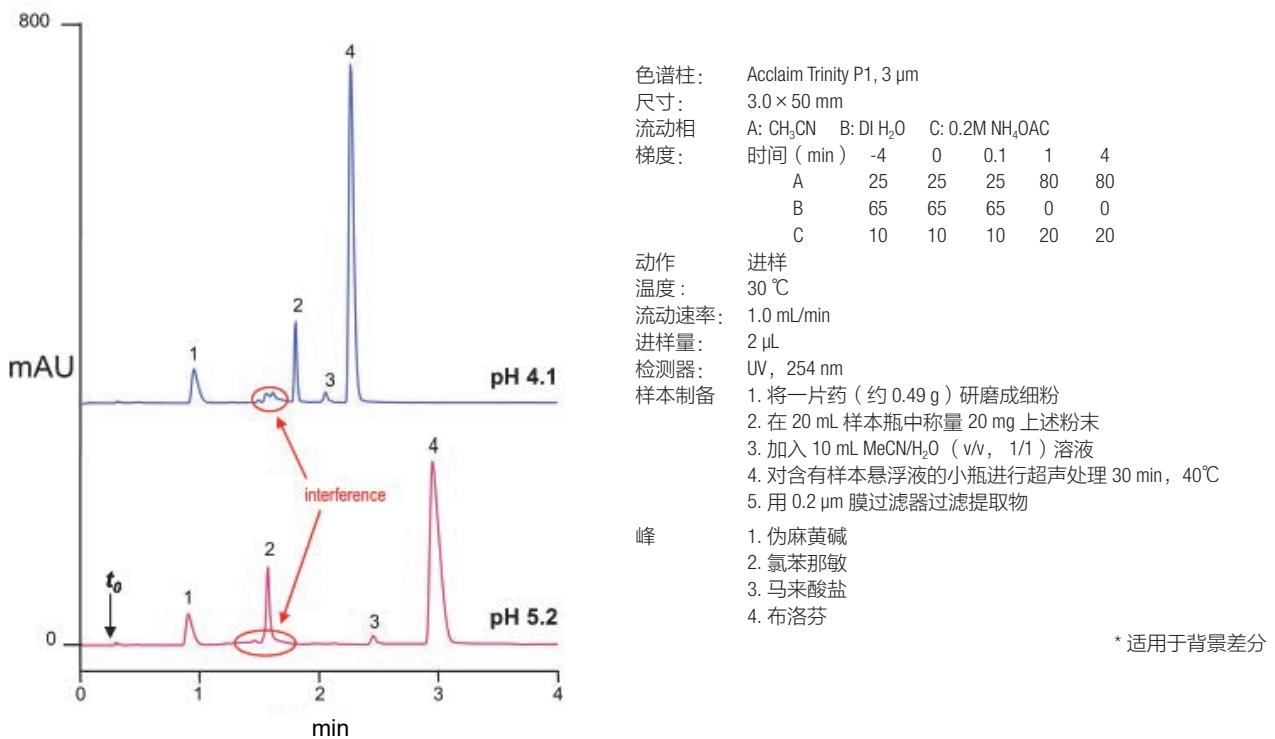


图 13 非处方药—Advil ALLERGY & SINUS (pH 值 效应)

6.5 高通量分析

由于 Acclaim Trinity P1 可调整选择性以达到最佳分离度，因此适用于高通量分析。如图 14 所示， Na^+ 离子和萘普生在 3min 内（下面的曲线）以足够的保留性能和优异的分离度分离。仅通过将流速增加三倍，分析时间就缩短到小于 1min（上面的曲线）。同样，为了分离碱性药物——氯苯那敏及其反离子——马来酸盐，仅增加流速就可以将分析从 3.2min 加速至小于 1min（图 15）。

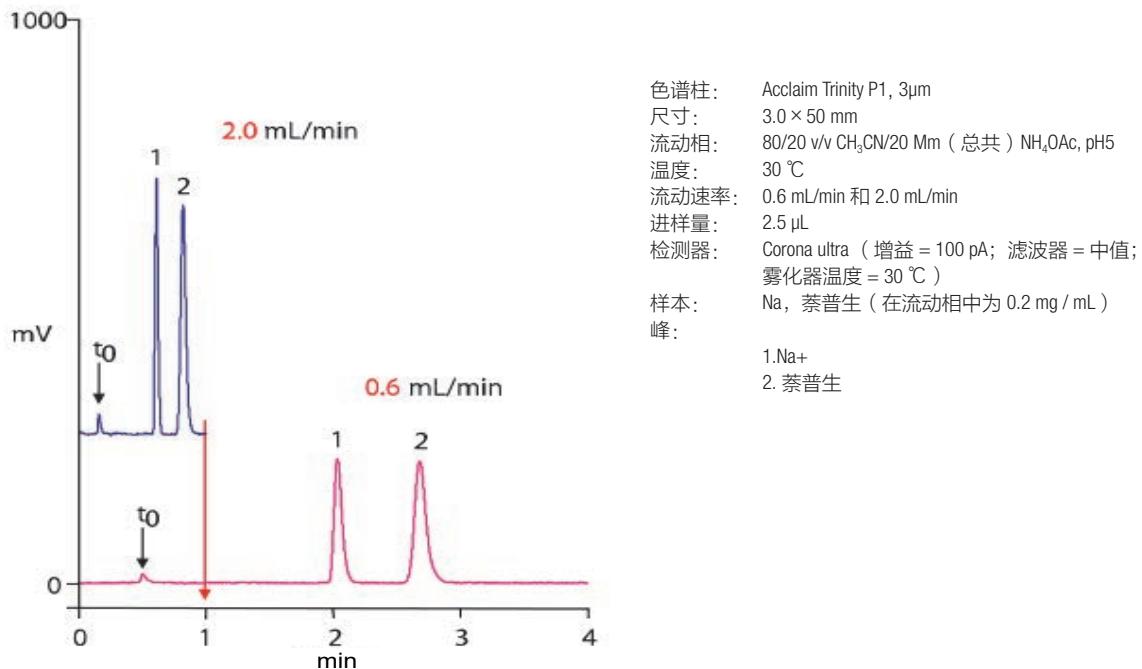


图 14 快速分析—Na, 萘普生

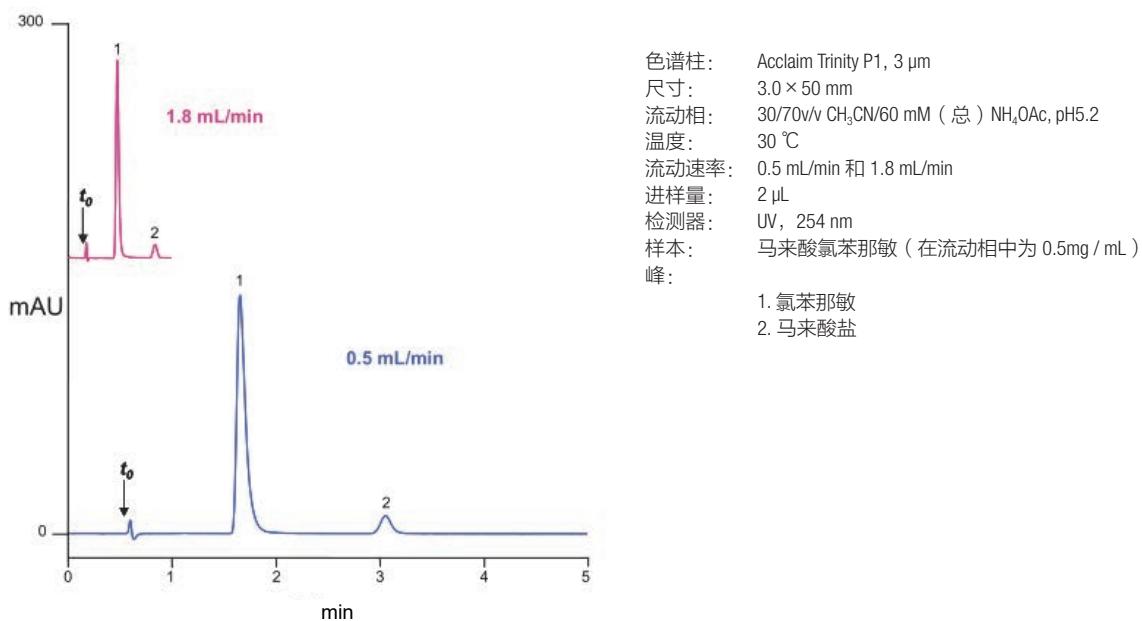


图 15 快速分析—马来酸氯苯那敏