

使用ACQUITY Premier色谱柱改善峰形并扩大选择性范围

Cheryl Boissel, Thomas H. Walter

Waters Corporation

摘要

沃特世近年来推出了一系列UPLC色谱柱，旨在改善可能与金属（对金属敏感的分析物）发生相互作用的化合物的性能。该系列包括五种不同的通用反相填料。本研究使用酸性、碱性和中性分析物的混合物考察了这些色谱柱之间的选择性差异。使用标准不锈钢色谱柱进行分离时，酸性分析物磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松表现出明显的峰拖尾。使用新型MaxPeak Premier色谱柱时（其采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术），观察到这些对金属敏感的分析物的峰形得到显著改善。在经证明的选择性范围内，MaxPeak Premier色谱柱提供的固定相使分析人员能够开发出用于各种分析混合物的分离方法。

优势

- ACQUITY Premier色谱柱能够改善金属敏感分析物的峰形
- ACQUITY Premier系列色谱柱提供一系列固定相选择性，其中包括五种适用于反相应用的填料

简介

长期以来，由于色谱柱和系统组件是以不锈钢等金属制成，使用HPLC分析对金属敏感的化合物一直面临重大的挑战。举例来说，与金属表面发生相互作用的化合物往往含有一个或多个磷酸盐和/或羧酸盐基团。研究表明，分析物与金属部件相互作用会导致峰展宽和拖尾、峰面积减小以及进样间差异性¹⁻³。为减轻这些相互作用，沃特世推出了采用MaxPeak HPS色谱柱硬件的一系列ACQUITY Premier色谱柱⁴。MaxPeak Premier色谱柱系列包括五种

适用于反相应用的通用固定相：BEH C₁₈、BEH Shield RP₁₈、HSS T3、CSH C₁₈和CSH苯己基。本研究比较了这些固定相在分离酸性、碱性和中性化合物方面的选择性差异。酸性分析物磷酸氢化可的松和磷酸地塞米松对金属敏感，使用标准不锈钢色谱柱进行分离时，会发生峰拖尾。我们比较了标准不锈钢色谱柱以及MaxPeak Premier色谱柱硬件中五种固定相分别获得的分离效果。结果展示了MaxPeak Premier色谱柱硬件的优势以及ACQUITY Premier色谱柱系列能够为反相分析提供的选择性范围。

实验

样品描述

被测混合物包含5 µg/mL硫脲、300 µg/mL酒石酸美托洛尔、40 µg/mL邻苯二甲酸二丙酯、10 µg/mL阿米替林、强的松、氢化可的松磷酸钠和地塞米松磷酸钠，溶于5%乙腈/95% 10 mM甲酸铵水溶液(pH 3.00)中。使用硫脲作为死体积(V₀)标志物。在先前未用过的色谱柱上连续进样三次该混合物。

方法条件：

LC条件：

| | |
|--------|--|
| 系统： | 配有CM-A、CM-AUX和PDA的ACQUITY UPLC H-Class |
| 检测条件： | UV 254 nm |
| 色谱柱： | 多种 |
| 柱温： | 30°C |
| 色谱柱配置： | 2.1 x 50 mm |
| 样品温度： | 20 °C |
| 进样体积： | 2 µL |
| 流速： | 0.5 mL/min |

LC条件:

流动相A: 10 mM甲酸铵水溶液, pH 3

流动相B: 乙腈

梯度: 流动相B在5.3 min内从5%增加到95% (线性)

数据管理:

色谱软件: Empower 3, Feature Release 4

结果与讨论

用于评估选择性差异的化合物的结构如图1所示。其中两种化合物为中性化合物（强的松和邻苯二甲酸二丙酯），两种化合物在分析条件下为质子化碱（美托洛尔和阿米替林），两种化合物为酸性盐（氢化可的松磷酸钠和地塞米松磷酸钠）。后两种化合物对金属敏感，使用常规的不锈钢色谱柱分离时会得到展宽的拖尾峰。图2B所示的色谱图中清楚地显示了这一结果，该色谱图使用标准ACQUITY UPLC色谱柱获得。当使用ACQUITY Premier色谱柱时，这些化合物获得了对称的窄峰，如图2A所示。与标准色谱柱相比，ACQUITY Premier色谱柱使这两种金属敏感化合物的拖尾因子降低了41-72%。使用t检验，发现这些差异在>95%的置信度下具有统计学显著性。此外，采用MaxPeak Premier色谱柱得到的峰面积比标准色谱柱得到的峰面积大5-53%。使用t检验，发现除5%的差异外，这些差异也具有统计学显著性。

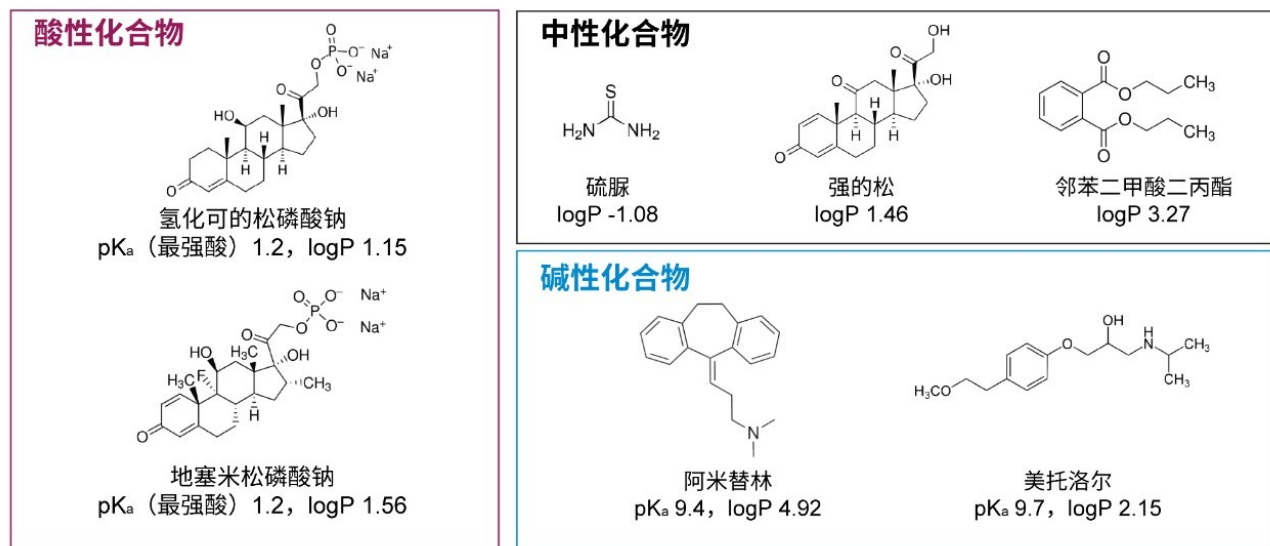


图1.被测化合物的结构和性质

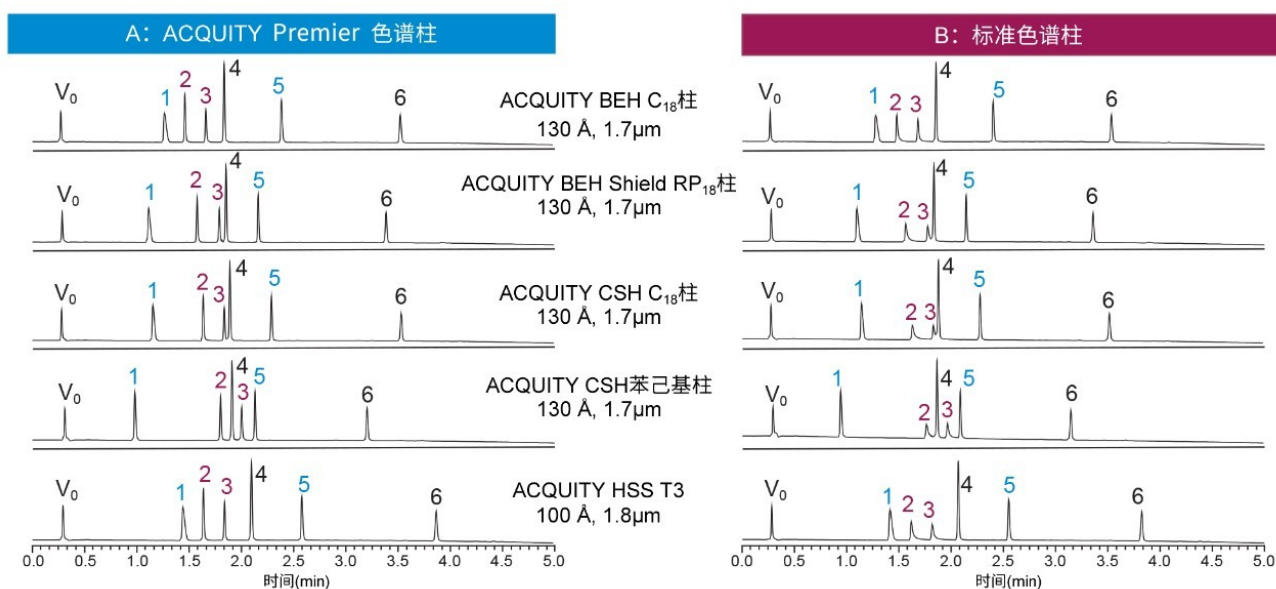


图2.使用MaxPeak Premier色谱柱与标准色谱柱得到的分离结果比较。峰鉴定： V_0 ：硫脲，1：美托洛尔，2：磷酸氢化可的松，3：磷酸地塞米松，4：强的松，5：阿米替林，6：邻苯二甲酸二丙酯

图2所示的色谱图展示了不同固定相之间保留性能和选择性的显著差异。表1列出了所测试的五种固定相的理化性质，因为这些属性对于理解这些差异起到重要作用。HSS T3色谱柱能够为中性和碱性化合物提供出色的保留性能。这是因为该固定相使用具有高表面积硅胶颗粒制成，且T3键合相的C₁₈表面浓度较低⁵。BEH Shield RP₁₈、CSH C₁₈和CSH 苯己基色谱柱对碱性化合物的保留性能较弱。这是因为BEH Shield RP₁₈⁶中存在嵌入的氨基甲酸酯基团，且CSH固定相中包含电荷改性剂⁷。CSH色谱柱能够为酸性化合物提供出色的保留性能，其原因在于这些材料表面携带正电荷。CSH 苯己基色谱柱采用烷基苯基键合相，使磷酸地塞米松（峰3）和强的松（峰4）的洗脱顺

序发生变化。

表1. 固定相的理化性质

| | BEH C ₁₈ | BEH Shield RP ₁₈ | CSH C ₁₈ | CSH苯己基 | HSS T3 |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|--------|-----------------|
| 未键合颗粒性质 | | | | | |
| 颗粒填料 | 杂化 | 杂化 | 杂化 | 杂化 | 硅胶 |
| 表面积(m ² /g) | 185 | 185 | 185 | 185 | 230 |
| 孔体积(cm ³ /g) | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.7 |
| 平均孔径(Å) | 130 | 130 | 130 | 130 | 100 |
| 键合相性质 | | | | | |
| 化学结构 | C ₁₈ | 嵌入式氨基甲酸酯 | C ₁₈ | 苯己基 | C ₁₈ |
| 表面浓度(μmol/m ²) | 3.1 | 3.2 | 2.3 | 2.3 | 1.6 |
| 是否使用电荷改性剂 | 否 | 否 | 是 | 是 | 否 |
| 是否封端 | 是 | 是 | 是 | 是 | 是 |

结论

上述结果表明，使用ACQUITY Premier色谱柱能够改善金属敏感分析物的峰形。使用简单的甲酸铵(pH 3)缓冲液作为水性流动相，可以在不改变流动相的情况下实现性能提升。还重点介绍了ACQUITY Premier色谱柱系列的选择性范围，其中包括五种不同的反相固定相，这些固定相的理化性质各不相同。该色谱柱系列为方法开发提供了一组有用的固定相，特别适用于分离包含一种或多种金属敏感化合物的混合物。

参考文献

1. Wakamatsu, A.; Morimoto, K.; Shimizu, M.; Kudoh, S. A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1823–1830.
2. Asakawa, Y.; Tokida, N.; Ozawa, C.; Ishiba, M.; Tagaya, O.; Asakawa, N. Suppression Effects of Carbonate on the Interaction between Stainless Steel and Phosphate Groups of Phosphate Compounds in High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.A* 2008, 1198–1199, 80–86.
3. Heaton, J. C.; McCalley, D. V. Some Factors That Can Lead to Poor Peak Shape in Hydrophilic

Interaction Chromatography, and Possibilities for their Remediation.*J. Chromatogr.A* 2016, 1427, 37–44.

4. Lauber, M.; Walter, T. H.; DeLano, M.; Gilar, M.; Boissel, C.; Smith, K.; Birdsall, R.; Rainville, P.; Belanger, J.; Wyndham, K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. *Waters White Paper*, [720006930EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404>> 2020.
5. McDonald, P. D.; McCabe, D.; Alden, B. A.; Lawrence, N.; Walsh, D. P.; Iraneta, P. C.; Grumbach, E.; Xia, F.; Hong, P. Topics in Liquid Chromatography Part 1. Designing a Reversed-Phase Column for Polar Compound Retention. *Waters White Paper*, [720001889EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1546076>>, 2007.
6. O' Gara, J. E.; Walsh, D. P.; Phoebe, C. H.; Alden, B. A.; Bouvier, E. S. P.; Iraneta, P. C.; Capparella, M.; Walter, T. H. Embedded-Polar-Group Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography. *LCGC N. America* 2001, 19, 632–642.
7. Iraneta, P. C.; Wyndham, K. D.; McCabe, D. R.; Walter, T. H. A Review of Waters Hybrid Particle Technology. Part 3. Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography. *Waters White Paper*, [720003929EN](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10167251>>, 2011.

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统](https://www.waters.com/10138533) <<https://www.waters.com/10138533>>
- [Empower 色谱数据系统](https://www.waters.com/513188) <<https://www.waters.com/513188>>
- [ACQUITY UPLC PDA检测器](https://www.waters.com/514225) <<https://www.waters.com/514225>>

720007014ZH, 2020年9月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.