

使用ACQUITY Premier和XBridge Premier色谱柱分析磷酸化化合物相比不锈钢色谱柱获得更优异的峰回收率和峰形

Kenneth D. Berthelette, Steve Shiner

Waters Corporation

摘要

采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier液相色谱柱已被证明能够提高磷酸化化合物的回收率并改善峰形¹。本文所述研究分为两部分，旨在进一步证明MaxPeak Premier色谱柱的优势。第一部分证明，即便使用沃特世以外厂商的液相色谱系统，ACQUITY Premier LC色谱柱也能够改善分离质量。利用Agilent 1290液相色谱系统上安装的四根C₁₈色谱柱分离出一组小分子，其中包括两种磷酸化化合物。本研究的第二部分表明，使用2.5 μm颗粒也可以实现在亚2 μm颗粒上所获得的性能提升。在标准ACQUITY UPLC系统上安装两根C₁₈色谱柱，用于分析同一混合物。无论使用何种粒径，与不锈钢硬件制成的色谱柱相比，ACQUITY Premier色谱柱都能显著改善磷酸化化合物的分析结果。

优势

- 磷酸化化合物获得更出色的峰面积和更清晰的峰形
- 开箱即用，无需经过钝化或老化处理
- 拥有各种规模的色谱柱填料，轻松适用于不同平台

简介

由于阴离子官能团（羧酸盐和磷酸盐基团）与裸露金属之间的相互作用，分析物吸附到金属表面（特别是色谱柱硬件）是小分子分析工作流程中的常见问题之一。这种现象通常称为非特异性吸附，可能导致峰面积减小，在极端情况下会导致分析物完全损失。此外还可能发生峰形干扰，其中较为明显的是拖尾增加。减轻吸附效应的方法有很多，例如使用钝化添加剂（如亚甲基二膦酸）²，但这些技术非常耗时，且自身也会带来不利影响，并非始终有效。

实验

样品描述

每种探针的纯标准液均按所述的方法进行配制和混合。利用90:10乙腈:水的样品稀释液配制最终样品混合液。将硫脲(5 µg/mL)、酒石酸美托洛尔(300 µg/mL)、邻苯二甲酸二丙酯(40 µg/mL)、阿米替林(10 µg/mL)、强的松(10 µg/mL)、氢化可的松磷酸钠(10 µg/mL)和地塞米松磷酸钠(10 µg/mL)进样至系统中。

液相色谱条件

液相色谱系统：

Agilent 1290 Infinity I（亚2 µm粒径色谱柱），

ACQUITY UPLC H-Class（2~3 µm粒径色谱柱）

检测器：

UV检测波长254 nm，

Agilent 1290系统采用DAD检测器，

ACQUITY UPLC系统采用PDA检测器

样品瓶：

TruView LCMS认证透明玻璃样品瓶（部件号：186005668CV）

色谱柱：	ACQUITY Premier BEH C18, 1.7 μm , 2.1 x 50 mm, ACQUITY Premier HSS T3, 1.8 μm , 2.1 x 50 mm, XBridge Premier BEH C18, 2.5 μm , 2.1 x 50 mm, 竞争厂商A EC-C18, 1.9 μm , 2.1 x 50 mm, 竞争厂商A HPH-C18, 1.9 μm , 2.1 x 50 mm, 竞争厂商A HPH-C18, 2.7 μm , 2.1 x 50 mm
柱温：	30 °C
样品温度：	关
进样体积：	2 μL
流速：	0.50 mL/min (亚2 μm) 0.34 mL/min (2.x μm)
流动相A：	10 mM甲酸铵, pH 3.0
流动相B：	乙腈
梯度：	参见下表

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.50或0.34	95	5	6
5.30或7.79	0.50或0.34	5	95	6
6.30或9.26	0.50或0.34	5	95	6
6.40或9.41	0.50或0.34	95	5	6
8.00或11.80	0.50或0.34	95	5	6

数据管理

色谱软件：Empower 3 Feature Release 4

结果与讨论

采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的Waters MaxPeak Premier色谱柱可实现稳定、有效的检测，避免金属敏感化合物发生吸附。采用HPS技术的MaxPeak Premier色谱柱适用多种沃特世色谱柱填料，也适合在Waters ACQUITY Premier系统中使用。MaxPeak Premier色谱柱不仅在与MaxPeak Premier系统结合使用时可获得理想性能，它与任何制造商的任何液相色谱系统配合使用时都具有显著的优势。为证明这一点，使用Agilent 1290色谱仪在四根不同的C₁₈色谱柱上分离一组（六种）探针化合物。在梯度模式和DAD检测条件下测试两根ACQUITY Premier色谱柱和两根竞争厂商的不锈钢色谱柱。图1所示为代表性分离色谱图，图2为放大X轴以凸显峰形差异的色谱图。

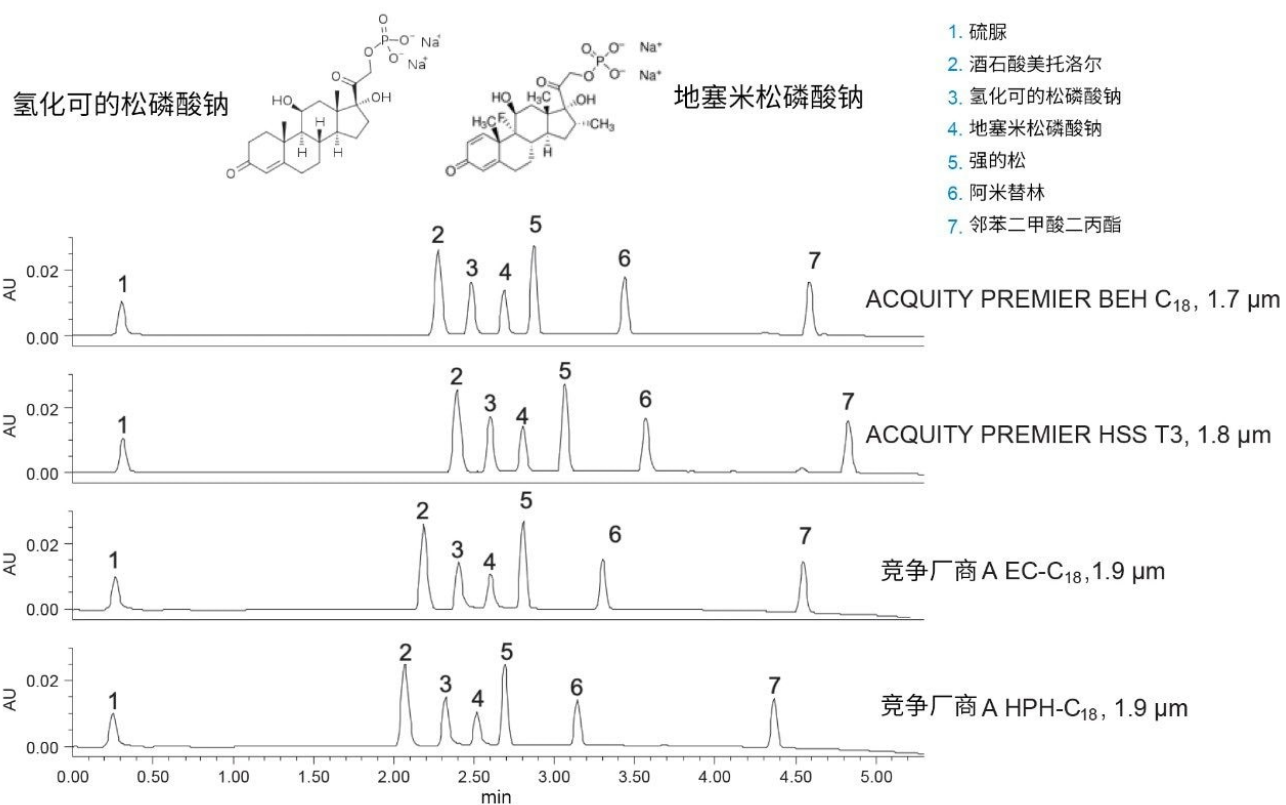


图1.在Agilent 1290色谱仪上使用4种亚2 μm C₁₈固定相得到的六种测试探针的分离结果。

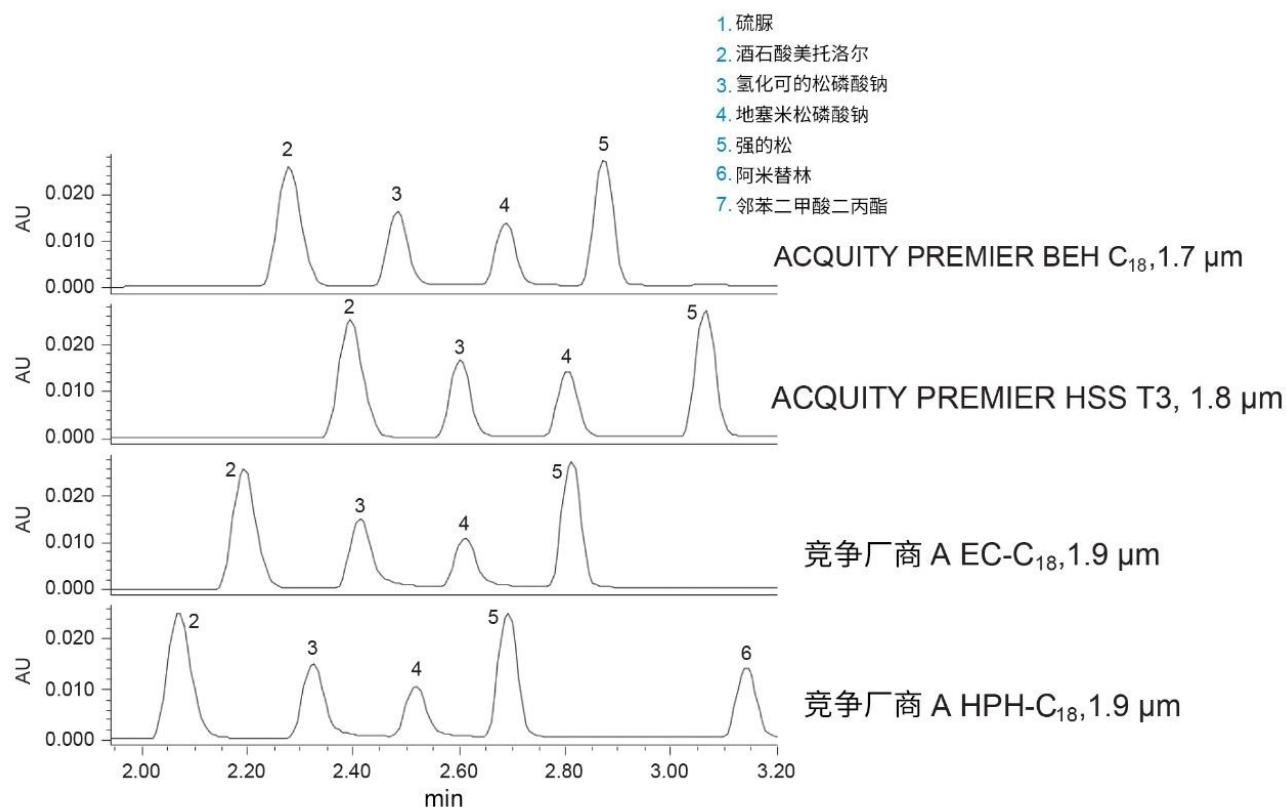


图2.在四根亚2 μm颗粒色谱柱上分析一组（六种）化合物得到的放大色谱图，分别展示了组分3和4（氢化可的松磷酸钠和地塞米松磷酸钠）的峰形差异。

虽然这些色谱柱对测试混合物中非金属敏感化合物的性能相当，但组分3和4（氢化可的松磷酸钠和地塞米松磷酸钠）的色谱分析结果表明，MaxPeak Premier色谱柱可大幅减小拖尾并显著增加峰面积。与竞争厂商的色谱柱相比，磷酸化化合物的USP拖尾减小约0.2个单位，地塞米松磷酸钠的峰面积大幅增加约30%。仅使用MaxPeak Premier色谱柱，这些分析物及其他对金属敏感的分析物就可以获得明显的益处。

为进一步证明MaxPeak Premier色谱柱的优势，在ACQUITY UPLC H-Class系统上将上述分离规格放大至更大粒径的色谱柱。方法转换无需调整梯度延迟，但需要更改流速和梯度时间，以便与粒径变化一致。色谱柱尺寸保持为2.1 × 50 mm。图3展示了在ACQUITY UPLC H-Class系统上使用两种粒径为2~3 μm的色谱柱（XBridge Premier BEH C₁₈和竞争厂商A HPH-C₁₈色谱柱）分析样品混合物得到的分离结果。图4展示了相同色谱图的基线放大图，以进一步显示峰形差异。

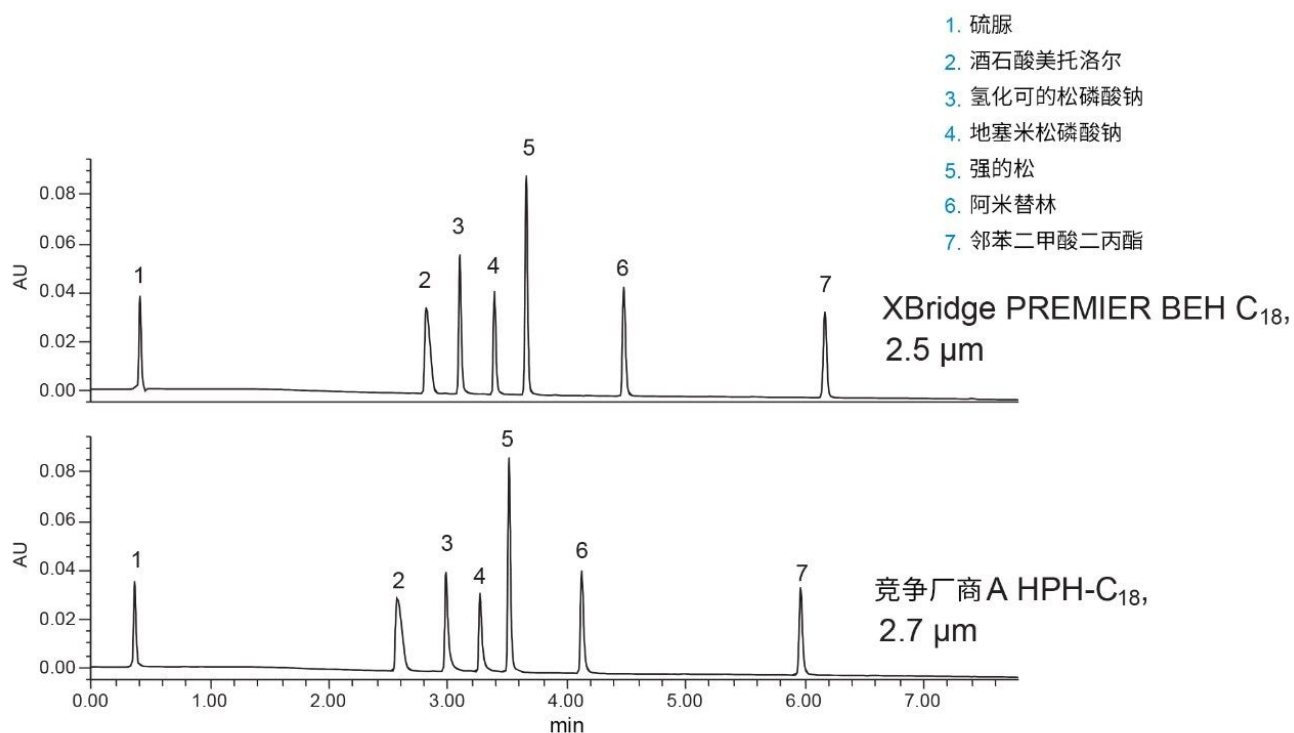


图3.在ACQUITY UPLC H-Class系统上使用两种2~3 μm C_{18} 固定相对六种测试探针的分离结果。观察到组分2的峰形不佳，原因在于仪器的系统谱带展宽较低，且阳离子美托洛尔分析物与两种填料的基质颗粒之间存在次级相互作用。

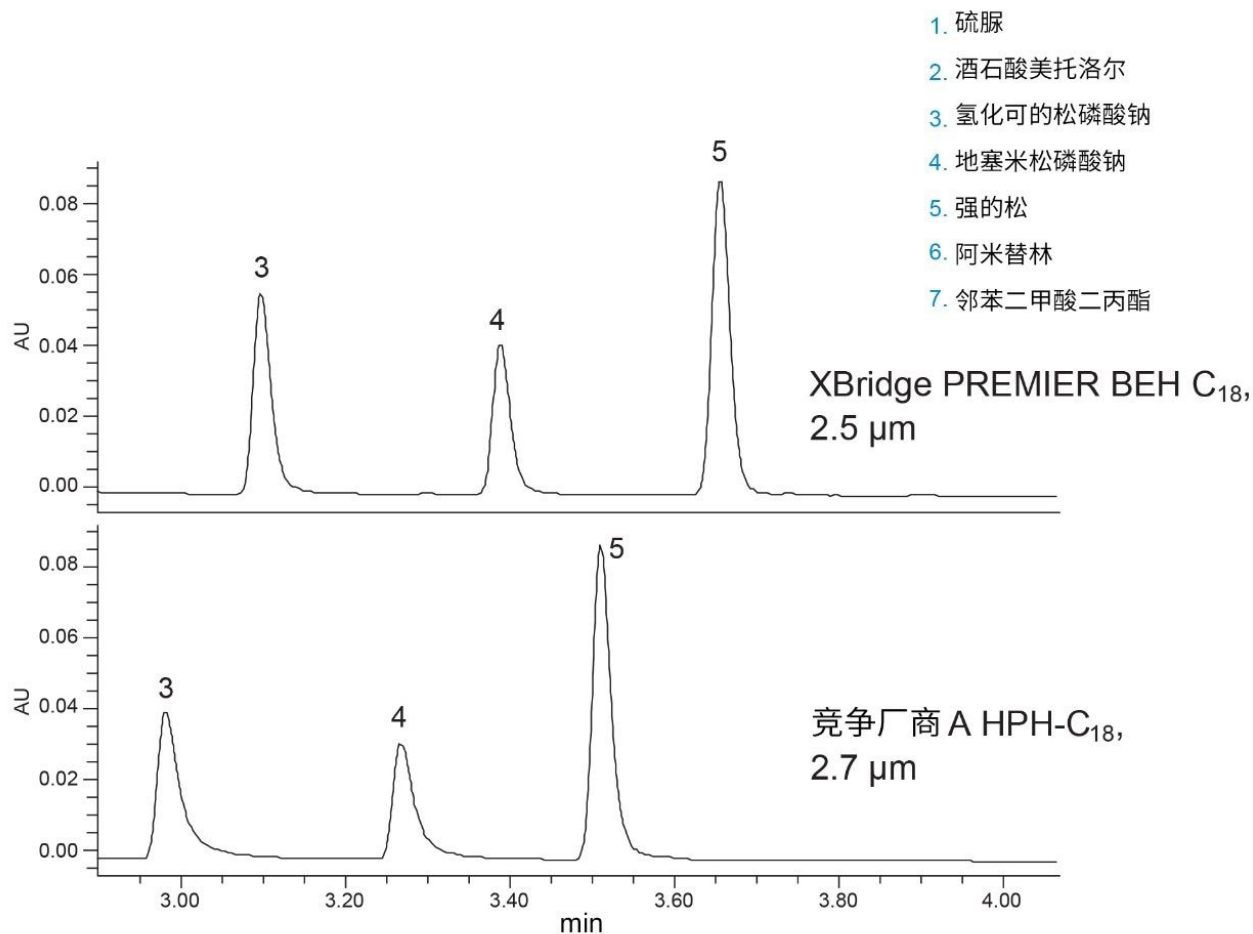


图4.图3的放大色谱图，分别展示了组分3和4（氢化可的松磷酸钠和地塞米松磷酸钠）的峰形和峰高差异。

即使采用粒径为2.5 μm的固定相，MaxPeak Premier色谱柱也能够为磷酸化化合物提供更清晰的峰形，同时对中性探针和碱性探针保持稳定性能。由于ACQUITY UPLC的系统扩散低，且碱性探针美托洛尔与基质颗粒存在次级相互作用，因此该分析物采用两种填料得到的峰形均比较差。与高扩散系统相比，低扩散系统更容易发生峰干扰，因为高扩散系统可人为展宽色谱峰，从而掩盖次级相互作用。如前文所述，使用竞争厂商的不锈钢色谱柱时，地塞米松磷酸钠的峰面积降低约30%。无论使用何种液相色谱系统或粒径，MaxPeak Premier色谱柱均表现出明显优势，但是与MaxPeak Premier系统联用时表现更为突出。

结论

本研究在两种测试条件下共使用六根色谱柱分离了六种化合物的混合物，其中包括两种磷酸化活性药物成分。在Agilent 1290色谱仪上安装四根亚2 μm色谱柱、两根MaxPeak Premier液相色谱柱和两种常规液相色谱柱。与常规不锈钢色谱柱相比，MaxPeak Premier色谱柱使磷酸化化合物获得更小的峰拖尾，峰面积增加约30%。然后将该分离方法转换至ACQUITY UPLC H-Class系统上的两种粒径为2~3 μm的色谱柱，即XBridge Premier BEH C₁₈和竞争厂商的C₁₈色谱柱。采用粒径较大的色谱柱时，观察到类似的结果：MaxPeak Premier色谱柱改善了总体分离质量。无论使用何种粒径或色谱系统，MaxPeak Premier色谱柱均可为磷酸化化合物的分离和分析提供明显的优势。这种优势在其他酸性分析物的应用中也可能体现。

参考资料

1. Hsiao, J.; Potter, O.; Van de Bittner, G.; Chu, T.; Yin, H. Improved LC-MS Methods for the Analysis of Anionic Analytes. Agilent Application Note, https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/AGILENT_ASMS2018_WP526.pdf <https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/AGILENT_ASMS2018_WP526.pdf> .
2. Boissel, C.; Walter, T. Improved Peak Shape and Wide Selectivity Range with ACQUITY Premier Columns. Waters Application Note, 720007014EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/improved-peak-shape-and-wide-selectivity-range-with-acquity-premier-columns.html>> , 2020.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/513188>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

MaxPeak Premier色谱柱 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135074078>>

720007197ZH, 2021年3月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号