

MaxPeak Premier色谱柱在磷酸地塞米松及相关化合物分析中的批间稳定性

Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

通过Arc Premier系统与MaxPeak Premier色谱柱联用的超高效液相色谱方法评估多根色谱柱的批间重现性，研究了MaxPeak Premier XBridge BEH C₁₈和XSelect HSS T3不同批次的结构材料和填料。结果表明，在金属螯合物与非金属螯合物混合物的分析中，MaxPeak Premier色谱柱的重现性非常出色。全面考察各种色谱参数（包括相对保留时间、关键化合物对分离度和峰面积），评估不同色谱柱的重现性。这些色谱柱对所有研究的色谱参数均表现出优异的重现性。例如，所有分析物峰的峰面积%RSD始终在0.1%~5.6%的范围内。这些结果表明，MaxPeak Premier色谱柱的批间重现性非常高，这些色谱柱非常稳定耐用。

优势

- MaxPeak Premier XBridge BEH C₁₈和XSelect HSS T3色谱柱结构材料的批间重现性
- MaxPeak Premier XBridge BEH C₁₈和XSelect HSS T3色谱柱填料的批间重现性

简介

不锈钢以其独特的耐腐蚀性¹、可制造性和惰性而广泛用作制造液相色谱仪器和色谱柱的材料。但是，某些类别的分析物（例如金属螯合物）仍有可能与金属氧化物膜发生相互作用，因为这些金属离子具有缺电子性。例如，磷酸化分析物可能很容易吸附到色谱系统流路内不锈钢的缺电子表面。此类相互作用可能导致色谱峰形状不佳、分析物严重损失和定量不准确^{2,3}。

为解决这一问题，沃特世开发出一系列技术，并将其称为MaxPeak高性能表面(HPS)。MaxPeak HPS表面由高度交联层组成，化学性质与亚乙基桥杂化颗粒(BEH)相似，能够减少分析物与金属表面的不良相互作用，进而提高分析物回收率、灵敏度和重现性。色谱柱重现性是一个关键参数，对分析方法的长期可靠性和稳定性具有重要影响。这是因为柱间差异和批间差异可能导致不可接受的色谱性能，可能需要重新验证方法以获得监管机构的认可。因此，在开发分析方法时，所选色谱柱必须稳定且可重现，以降低在整个方法生命周期内出现不合格和超趋势结果的风险。

本研究的主要目的是考察三种不同XBridge BEH C₁₈色谱柱的批间重现性，这些色谱柱使用不同批次高性能表面材料制造而成。此外，本研究还将考察使用相同批次高性能表面材料但使用三个不同批次固定相的XBridge BEH C₁₈色谱柱的重现性。还将对XSelect HSS T3色谱柱进行相同的研究。为此，将使用之前针对金属敏感药物/相关化合物（结构见图1）分析开发的UHPLC方法来评价不同的XBridge BEH C₁₈和XSelect HSS T3色谱柱⁴。

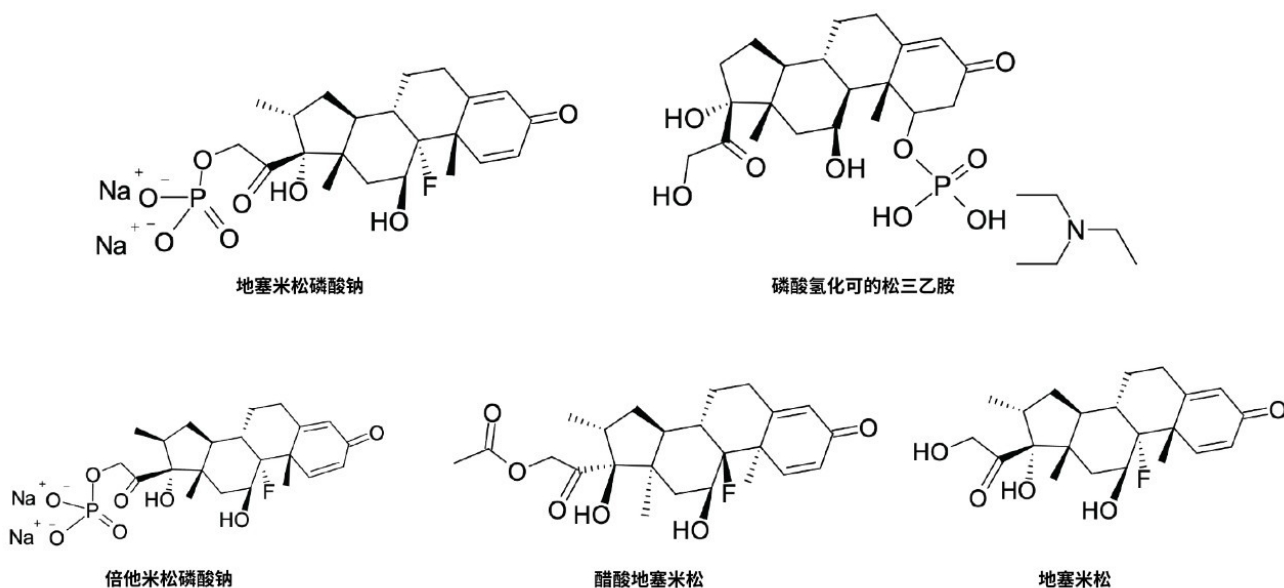


图1.磷酸氢化可的松、磷酸地塞米松及其三种相关化合物的化学结构

在考察不同批次色谱柱的色谱参数重现性时，保留时间、峰面积、峰对称性、柱效和各种其他参数可能会出现差异。将评价这些不同色谱柱所获色谱峰的保留时间及若干其他图谱特征的重现性。

实验

磷酸氢化可的松三乙胺、地塞米松磷酸钠、倍他米松磷酸钠、地塞米松和醋酸地塞米松均购自美国药典(USP)委员会（美国马里兰州罗克维尔）。准确称量所需量的各标准品并将其溶于50/50 (v/v)水/乙腈溶剂中，制备上述化合物的储备液。然后利用储备液制备包含两种API和三种磷酸地塞米松相关化合物的测试混合物。使用90/10 (v/v)水

/乙腈作为样品溶剂稀释各种标准品的储备液，制备该混合物。测试混合物中各分析物的最终浓度约为：0.1 mg/mL（磷酸氢化可的松三乙胺、地塞米松磷酸钠）和0.07 mg/mL（各种相关化合物）。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Arc Premier，配备四元溶剂管理器(rQSM)、样品管理器(rFTN)、色谱柱管理器、一台CM Aux、PDA检测器、ACQUITY QDa质谱检测器
检测器：	PDA
色谱柱：	MaxPeak HPS XSelect HSS T3, 4.6 × 100 mm, 2.5 μm pH范围：1-10 MaxPeak HPS XBridge BEH C ₁₈ , 4.6 × 100 mm, 2.5 μm pH范围：1-10
柱温：	35 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	3 μL
流速：	0.5
流动相A：	10 mM甲酸铵水溶液
流动相B：	乙腈（含0.1%甲酸）
梯度：	流动相B在5 min或15 min内从10%增加至90%* 梯度从t=0开始，最终保持2 min，然后返回初始条件。
UV检测波长：	254 nm

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY QDa质谱检测器
电离模式：	ESI+
采集范围：	100-500 Da
毛细管电压：	0.8 kV
离子源温度：	600 °C
锥孔电压：	15 V

数据管理

色谱软件：	Empower 3色谱数据系统
-------	-----------------

结果与讨论

相对保留时间

评价色谱柱批间重现性时需要考虑的关键参数是化合物的相对保留时间。表1总结了分析MaxPeak XSelect HSS T3和MaxPeak XBridge BEH C₁₈色谱柱所用不同批次HPS材料得到的磷酸地塞米松及其相关化合物（参考磷酸氢化可的松）的相对保留时间。结果表明，两种色谱柱填料的不同批次对所有分析物的相对保留时间均表现出非常高的重现性。例如，采用不同批次HPS材料的两种色谱柱填料对磷酸地塞米松及其相关化合物的相对保留时间% RSD始终≤0.1%。这些结果表明，HPS材料的内部生产工艺精度非常高。

色谱柱型号/HPS材料批号	t_R 磷酸氢化可的松 (min)	相对 t_R 磷酸倍他米松/磷酸氢化可的松	相对 t_R 磷酸地塞米松/磷酸氢化可的松	相对 t_R 地塞米松/磷酸氢化可的松	相对 t_R 醋酸地塞米松/ 磷酸氢化可的松
MaxPeak Premier XSelect HSS T3/1	8.16	1.06	1.08	1.40	1.70
MaxPeak Premier XSelect HSS T3/2	8.15	1.06	1.08	1.40	1.70
MaxPeak Premier XSelect HSS T3/3	8.16	1.06	1.08	1.40	1.70
%RSD	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈ /1	7.62	1.07	1.08	1.37	1.65
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈ /2	7.62	1.07	1.08	1.37	1.64
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈ /3	7.63	1.07	1.08	1.37	1.65
%RSD	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1

表1.使用本文所述UHPLC方法分析得到的磷酸倍他米松、磷酸地塞米松、地塞米松和醋酸地塞米松的相对保留时间。每个值表示6次重复进样的平均值。%RSD值表示在填充同一批次填料但采用不同批次HPS材料的3根色谱柱上进行18次进样的结果。

这里需要提到的是，本研究还考察了不同批次填料（采用同一批次结构材料）的重现性。结果表明（如表2所示），使用三个不同批次的填料时，两种色谱柱上进样磷酸地塞米松及其相关化合物的相对保留时间也具有出色的重现性，所有分析物的%RSD值 $\leq 0.1\%$ 。

色谱柱型号/HPS填料批号	t_R 磷酸氢化可的松 (min)	相对 t_R 磷酸倍他米松/ 磷酸氢化可的松	相对 t_R 磷酸地塞米松/ 磷酸氢化可的松	相对 t_R 地塞米松/ 磷酸氢化可的松	相对 t_R 醋酸地塞米松/ 磷酸氢化可的松
MaxPeak Premier XSelect HSS T3/1	8.16	1.06	1.08	1.40	1.70
MaxPeak Premier XSelect HSS T3/2	8.11	1.06	1.08	1.40	1.70
MaxPeak Premier XSelect HSS T3/3	8.15	1.06	1.08	1.40	1.70
%RSD	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈ /1	7.62	1.07	1.08	1.37	1.65
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈ /2	7.62	1.07	1.08	1.37	1.64
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈ /3	7.63	1.07	1.08	1.37	1.65
%RSD	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1

表2.使用本文所述UHPLC方法分析得到的磷酸倍他米松、磷酸地塞米松、地塞米松和醋酸地塞米松的相对保留时间。每个值表示6次重复进样的平均值。%RSD值表示在填充3种不同批次填料的3根色谱柱上进行18次进样的结果。

关键分析物对分离度

在评价柱间重现性时，需要考虑的另一个重要色谱参数是“关键分析物对”的分离度。关键分析物对表示色谱图中具有最低计算分离度的两种组分。本例的关键分析物对是磷酸倍他米松/磷酸地塞米松。本文还评价了采用不同批次HPS材料和不同批次填料的不同色谱柱可重现地分离关键分析物对的能力。结果表明（如表3所示），采用两种填料的所有色谱柱均能够以非常高的重现性分离这两种组分。本研究在采用不同批次结构材料的两种色谱柱上分离磷酸地塞米松和相关化合物，得到的典型色谱图如图2所示。

色谱柱型号	结构材料批号	填料批号	USP分离度 磷酸倍他米松/磷酸地塞米松
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	1	3	2.0
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	2	3	2.1
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	3	2.0
	%RSD		3.6
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	1	2.0
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	2	2.0
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	3	2.1
	%RSD		2.8
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	1	3	2.0
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	2	3	2.1
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	3	2.0
	%RSD		1.8
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	1	2.0
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	2	2.0
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	3	1.9
	%RSD		2.3

表3.本研究中所用所有色谱柱上关键分析物对（磷酸倍他米松/磷酸地塞米松）的USP分离度。每个值表示6次重复进样的平均值。RSD值表示在采用相同批号的HPS材料或色谱柱填料的3根色谱柱上进行18次进样的结果。

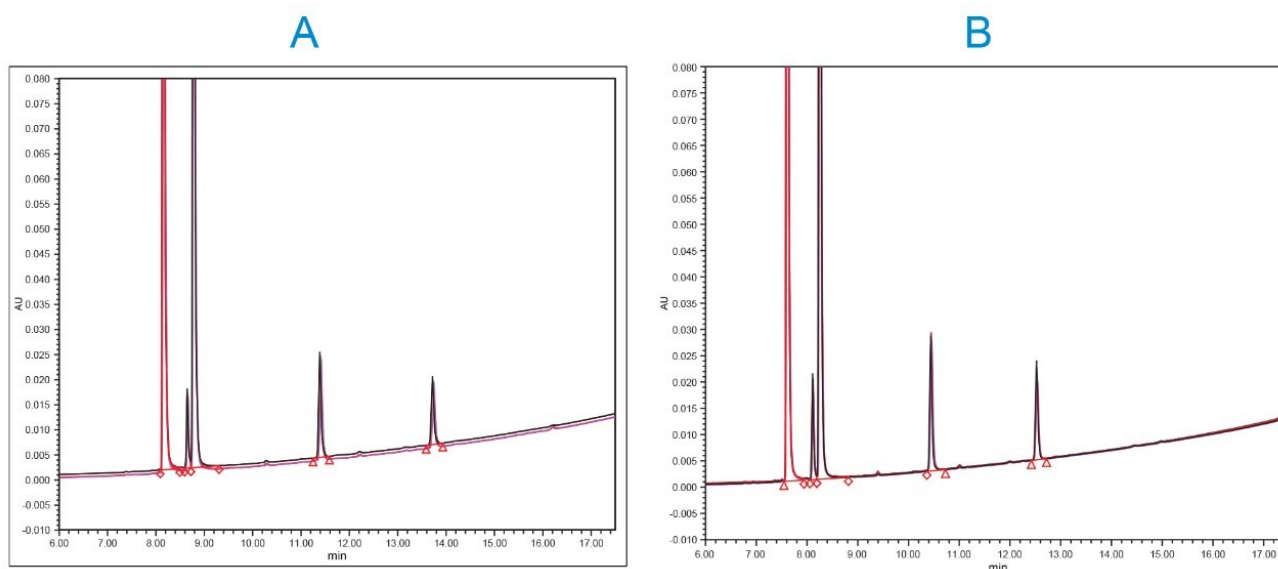


图2.18次进样的叠加色谱图：A.采用三个不同批次结构材料的MaxPeak Premier XSelect HSS T3色谱柱；B.采用三个不同批次结构材料的MaxPeak Premier XBridge BEH C₁₈色谱柱。根据洗脱顺序，这些峰分别是：磷酸氢化可的松、倍他米松磷酸钠、地塞米松磷酸钠、地塞米松和醋酸地塞米松。

峰面积

将相同量样品注入不同色谱柱时的峰面积一致性也是研究批间重现性需要考虑的另一个关键参数。在定量时，峰面积一致性是获得正确结果的关键。表4展示了在本研究所测不同色谱柱上分析得到的磷酸地塞米松、相关化合物和磷酸氢化可的松的峰面积。所有分析物在不同批次结构材料以及不同批次填料中均表现出优异的峰面积重现性。

o

色谱柱型号	HPS 材料批号	填料批号	峰面积 磷酸氢化可的松	峰面积 磷酸倍他米松	峰面积 磷酸地塞米松	峰面积 地塞米松	峰面积 醋酸地塞米松
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	1	3	738937	42539	683180	76803	53523
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	2	3	726356	41144	675114	76288	52652
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	3	742684	42635	687894	77394	53668
	%RSD		1.1	1.8	1.0	1.1	1.1
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	1	749502	42793	691590	77853	53324
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	2	827448	46396	770615	86805	59278
MaxPeak Premier XSelect HSS T3	3	3	742684	42635	687894	77394	53668
	%RSD		5.1	4.1	5.5	5.6	5.1
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	1	3	795018	48056	727737	84433	55953
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	2	3	808063	46992	740812	85934	56662
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	3	830079	48550	769476	82646	62878
	%RSD		0.5	0.6	0.5	2.0	1.9
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	1	833987	48558	770882	81644	63794
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	2	833235	48855	770869	82245	63625
MaxPeak Premier XBridge BEH C ₁₈	3	3	830079	48550	769476	82646	62878
	%RSD		0.2	0.1	0.1	0.5	0.4

表4. 在本研究所测不同色谱柱上分析得到的磷酸倍他米松、磷酸地塞米松、地塞米松和醋酸地塞米松的峰面积。每个值表示6次重复进样的平均值。%RSD值表示在采用相同批号的填料或结构材料的3根色谱柱上进行18次进样的结果。

结论

- 本应用纪要清晰展示了MaxPeak Premier XSelect HSS T3和XBridge BEH C₁₈色谱柱在磷酸地塞米松及相关化合物分析中的稳定性。
- 在分析方法中采用批间重现性高的MaxPeak Premier色谱柱非常有利，对于长期使用的方法而言尤其如此。
- 本应用纪要还展示了沃特世设备对柱温、流动相流速和流动相组成的良好控制。

参考资料

1. S.F. Cogan, G.S. Jones, D.V. Hills, J.S. Walter, L.W. Riedy. Comparison of 316LVM and MP35N Alloys as Charge Injection Electrodes, *J. Biomed. Mater. Res.* 28(2) (1994) 233–240.
2. T.H.W. M. Lauber, M. DeLano, C. Boissel, M. Gilar, K. Smith, R. Birdsall, P. Rainville, J. Belanger, K. Wyndham. Low Adsorption UPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces, Waters White Paper, [720006930EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf), 2020.

3. K.E. Collins, C.H. Collins, C.A. Bertran. Stainless Steel Surfaces in LC systems, Part II: Passivation and Practical Recommendations, *LC GC North America* 18(7) (2000) 688–692.
4. F.L. Alkhateeb, P.D. Rainville. 基于“分析方法质量源于设计”理念开发使用Arc Premier MaxPeak高性能表面(HPS)技术分析磷酸地塞米松及相关化合物的方法, 沃特世应用纪要, [720007272ZH <https://www.waters.com/nextgen/in/en/library/application-notes/2021/analytical-quality-by-design-based-method-development-for-the-analysis-of-dexamethasone-phosphate-and-related-compounds-using-arc-premier-maxpeak-high-performance-surfaces.html>](#), 2021.

特色产品

- [Arc Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359)
- [2998光电二极管阵列\(PDA\)检测器 <https://www.waters.com/1001362>](https://www.waters.com/1001362)
- [ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)
- [Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007350ZH, 2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.