

使用VanGuard™完全集成技术(FIT)保护柱延长色谱柱使用寿命

Kenneth D. Berthelette, Bonnie A. Alden, Donna Osterman, Maureen DeLoffi, Jonathan E. Turner

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

分析基质中存在的化合物是许多行业常见的工作流程，包括但不限于食品和环境检测、生物分析以及法医学、代谢组学和制药。制剂中存在的填料和粘结剂等辅料经过几次重复进样后可能会污染液相色谱(LC)分析柱，导致色谱结果不佳，有时还会导致分析失败。适当的样品预处理可以延长色谱柱使用寿命，但并非所有分析都适合采用固相萃取(SPE)或样品过滤等技术。除样品预处理以外，延长色谱柱使用寿命还有一种常用方法，即使用可定期更换的保护柱或保护柱芯。设计保护装置的目的是，事先捕集化学和/或颗粒组分，避免这些组分到达并损坏分析柱。本研究比较了一种标准的无保护柱配置与VanGuard完全集成技术(FIT)保护柱配置在分析加标婴儿配方奶粉中的表现。如果定期更换柱芯，VanGuard FIT保护柱配置可提供更长的色谱柱使用寿命。

优势

- 使用VanGuard FIT保护柱延长色谱柱使用寿命
- 定期更换FIT柱芯可保持使用纯标准品溶液所能够实现的色谱柱性能
- 与传统保护柱和卡套相比，VanGuard FIT保护柱更易于使用

简介

色谱柱污染是导致色谱柱使用寿命缩短、分析结果不佳和工作效率下降的常见原因。污染通常是由基质组分引起的，无论是填料等辅料还是磷脂等内源性化合物，它们都会从溶液中沉淀析出或粘在分析柱的筛板和孔内。有些分析可以通过适当的样品前处理或开发适当的分析方法来去除这些组分。固相萃取或过滤是去除潜在有害组分最常用的样品预处理方法。但是，对于某些分析，样品前处理并不适用，因为它会引入差异性或删除需要分析的重要化合物。在这些情况下，使用保护柱或保护柱芯来保护分析柱的措施较为谨慎，可确保色谱柱随时间推移始终保持适当的性能。

保护装置通常是短(<20 mm)柱或柱芯，安装在液相色谱系统中分析柱的上游。在常规检测过程中，这种保护柱或柱芯率先接触基质化合物而先被污染。与分析柱不同的是，保护柱被污染后可以更换。定期更换保护柱或柱芯可保护分析柱免受可能会带来问题的基质组分影响，从而延长色谱柱使用寿命¹⁻²。此外，保护柱和柱芯通常比分析柱便宜，因此更换它们在经济上更划算。MaxPeak™ Premier VanGuard FIT保护柱配置引入了一种更新且对用户更为友好的保护柱使用方法。VanGuard FIT保护柱在入口处装配完全集成的保护柱芯，与使用一体化设计的传统保护装置相比，VanGuard FIT保护柱为分析柱提供的保护水平并无差别。本文介绍Vanguard FIT保护柱在分析含加标分析物的悬浮基质样品时的工作原理。

实验

样品描述

制备两个待测样品。首先用10:90乙腈:水配制2-乙酰呋喃、乙酰苯胺、苯乙酮、苯丙酮、对羟基苯甲酸丁酯和苯戊酮（浓度各4 µg/mL）的纯混标溶液。利用该混标测量不存在基质时的柱效。通过混合75 mL上述混标与250 µL按说明书配制的非处方婴儿配方奶粉制备挑战性样品。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY™ UPLC™ I-Class PLUS，配备二元溶剂

	管理器(BSM)、 样品管理器 - 固定定量环(SM-FL)和PDA检测器
检测条件:	UV 254 nm
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH™ C ₁₈ , 2.1 × 100 mm, 1.7 μm (P/N: 186009453) ACQUITY Premier BEH C ₁₈ , 2.1 × 100 mm VanGuard FIT, 1.7 μm (P/N: 186009457)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	5.0 μL
流速:	0.6 mL/min
流动相A:	Milli-Q水
流动相B:	乙腈
梯度曲线:	以10% B等度保持0.25 min, 在2.25 min内线性增 加至95% B。 保持0.1 min, 然后以10% B重新平衡色谱柱3.0 min。总运行周期为6 min。

数据管理

色谱软件	Empower™ 3 SR2
------	----------------

结果与讨论

VanGuard FIT保护柱配置是一种专为分析柱设计的创新、完全集成的保护柱设计。与既往的保护柱设计不同，VanGuard FIT保护柱将保护柱芯完全组装到保护柱入口中，而不是作为单独的组件/装置。VanGuard柱芯直接拧入VanGuard FIT保护柱入口，无需使用管路和垫圈，能够减少谱带展宽并提高性能。图1A所示为其他的保护柱设计，均需要额外的连接来安装保护柱或保护柱芯卡套。如果安装不正确，这些连接处很容易发生漏液。而图1B所示的VanGuard FIT保护柱则无需额外的连接，减少了该问题。VanGuard FIT保护柱和VanGuard柱芯卡套在实际的保护柱芯中采用相同设计（如图1C所示），即拧入适当的卡套中。

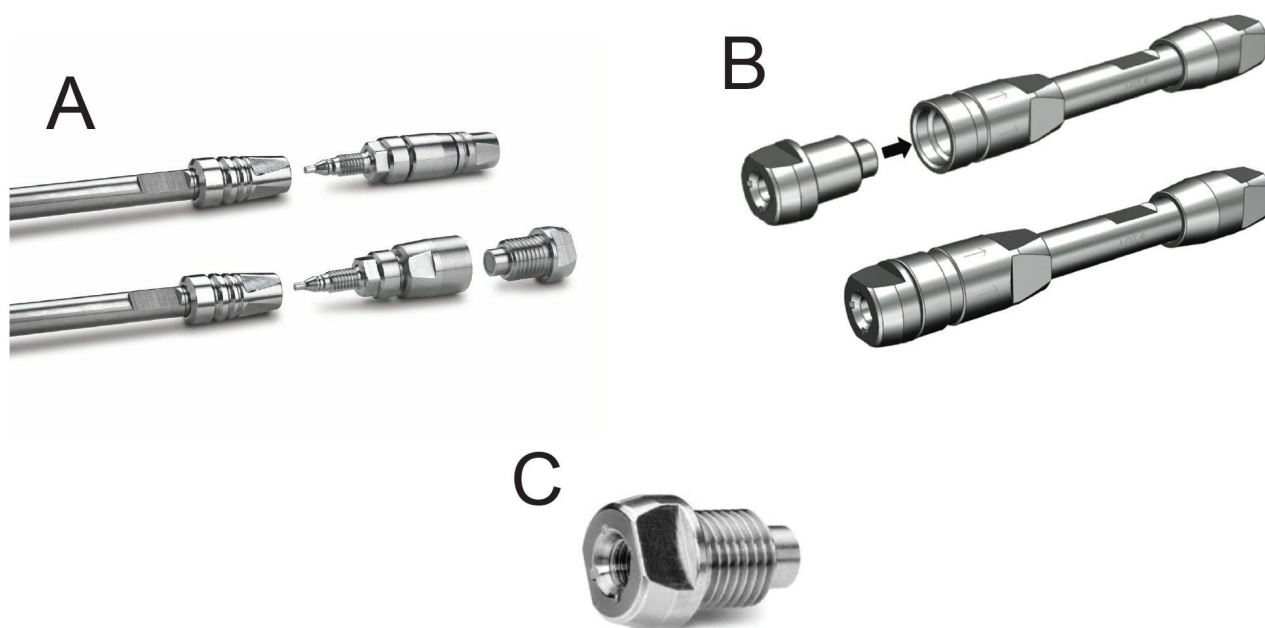


图1.保护柱和柱芯设计。

- A.使用柱芯卡套或全填充保护柱的非集成式设计，
- B. *VanGuard FIT*集成式柱芯卡套设计，
- C.保护柱芯设计。

VanGuard FIT保护柱除在易用性方面有所改进外，只要定期更换柱芯，该设计还可以保护分析柱免受基质组分的影响。首次使用保护装置时需要确定柱芯的更换频率，以保持所需的色谱柱性能。本文所述研究使用两根标准ACQUITY Premier BEH C₁₈色谱柱来分析加标婴儿配方奶粉。在检测过程中，使用13.4%峰高处的峰宽来监测峰

容量并作图。图2展示了与分析纯标准品的第三根色谱柱相比，两根色谱柱的峰容量的百分比图。

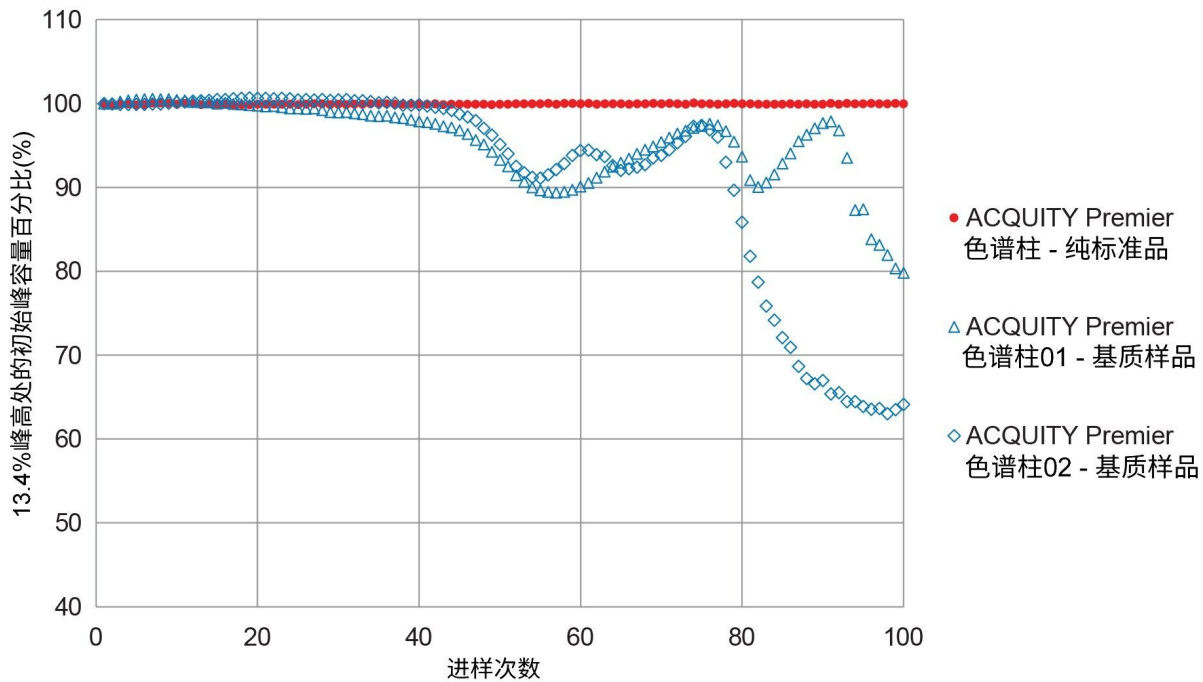


图2.三根色谱柱的初始峰容量百分比(%)图，其中两根色谱柱用于分析基质样品，一根色谱柱用于分析纯标准品。使用13.4%峰高处的峰宽来计算峰容量，用 4σ 表示。

用于分析基质样品的两根色谱柱在大约45~50次进样时开始表现出性能下降。一旦性能开始下降，分析床即可能受到影响，导致性能越来越差。因此我们决定在进样40次后更换保护柱芯以减少对分析柱的污染。此频率看似很高，但实际上是由分析条件以及样品决定的。对于其他样品（例如血浆），更换保护柱芯的进样频率可能不同。此外，液相色谱方法条件也可能会导致色谱柱污染，在使用保护装置时应予以考虑³。若使用的液相色谱条件无法充分清除两次进样之间的辅料，随着时间推移，这些辅料会不断累积，从而导致色谱柱污染。因此，应根据既定的实验室方案基于具体分析来确定保护柱芯的更换频率。

确定更换频率后，VanGuard FIT保护柱即可投入常规应用，同时监测系统压力和分析性能，以确保分析性能良好。采集和监测系统压力可以作为判断色谱柱何时开始失效（即使性能仍未超出可接受范围）的指标。图3展示了在每根色谱柱上执行的前130次进样的系统压力图。如上所述，每40次进样更换一次VanGuard FIT柱芯。

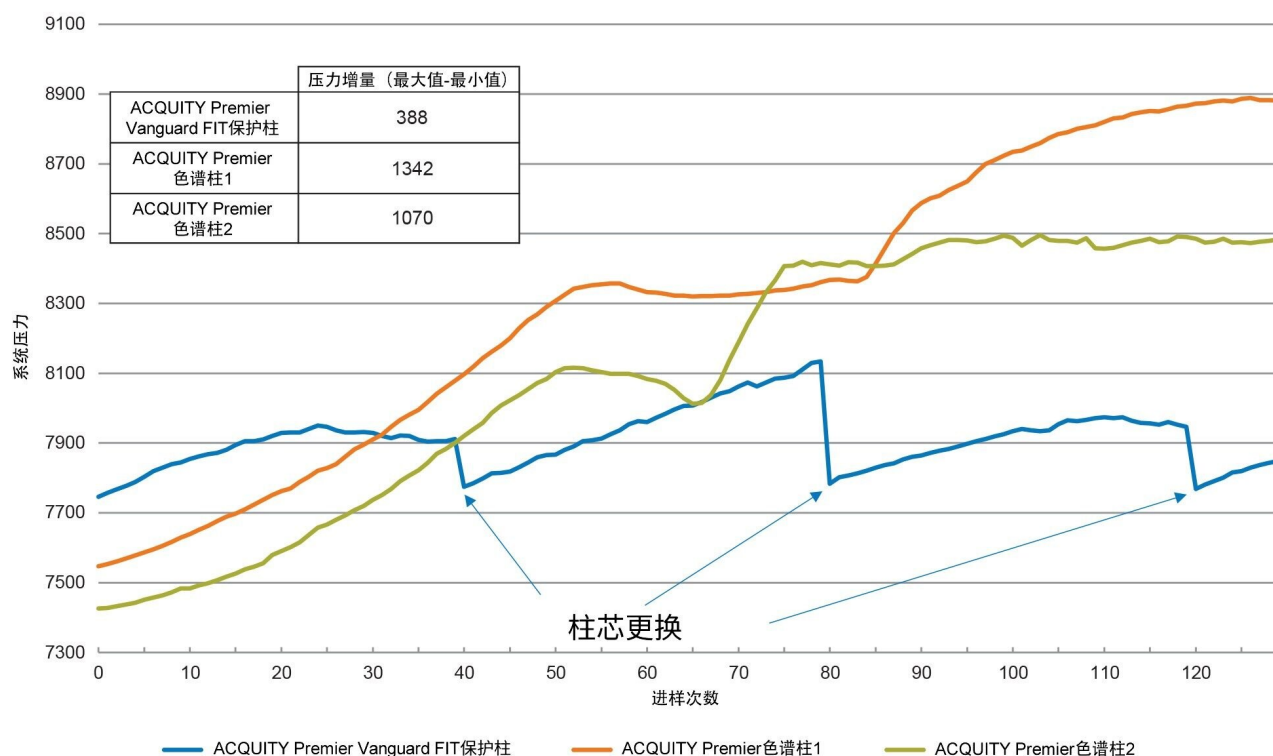


图3.130次进样过程中的系统压力图。在色谱柱重新平衡过程中记录约4 min时的系统压力。

两个无保护柱配置的系统压力在130次进样过程中增加，其中最大幅度的增加发生在测试早期，介于第1次进样与第50次进样之间。在此期间，这两根色谱柱的整个系统压力增加了至少1000 psi，而VanGuard FIT保护柱在定期更换保护柱芯的情况下，仅表现出<400 psi的压力增量。在本例中，增加的压力可能源自基质组分，它们可能堵塞入口筛板，或者由于溶解度问题而从流动相中沉淀析出³。无论是哪一种情况，这些压力增加都是判断色谱柱失效或即将失效的首要指标。遗憾的是，仅靠系统压力并不能确定色谱柱是否已经失效，需要根据色谱分析结果来确定。图4和5展示了两根ACQUITY Premier色谱柱（图4）和ACQUITY Premier VanGuard FIT保护柱（图5）上分析加标基质的色谱图。

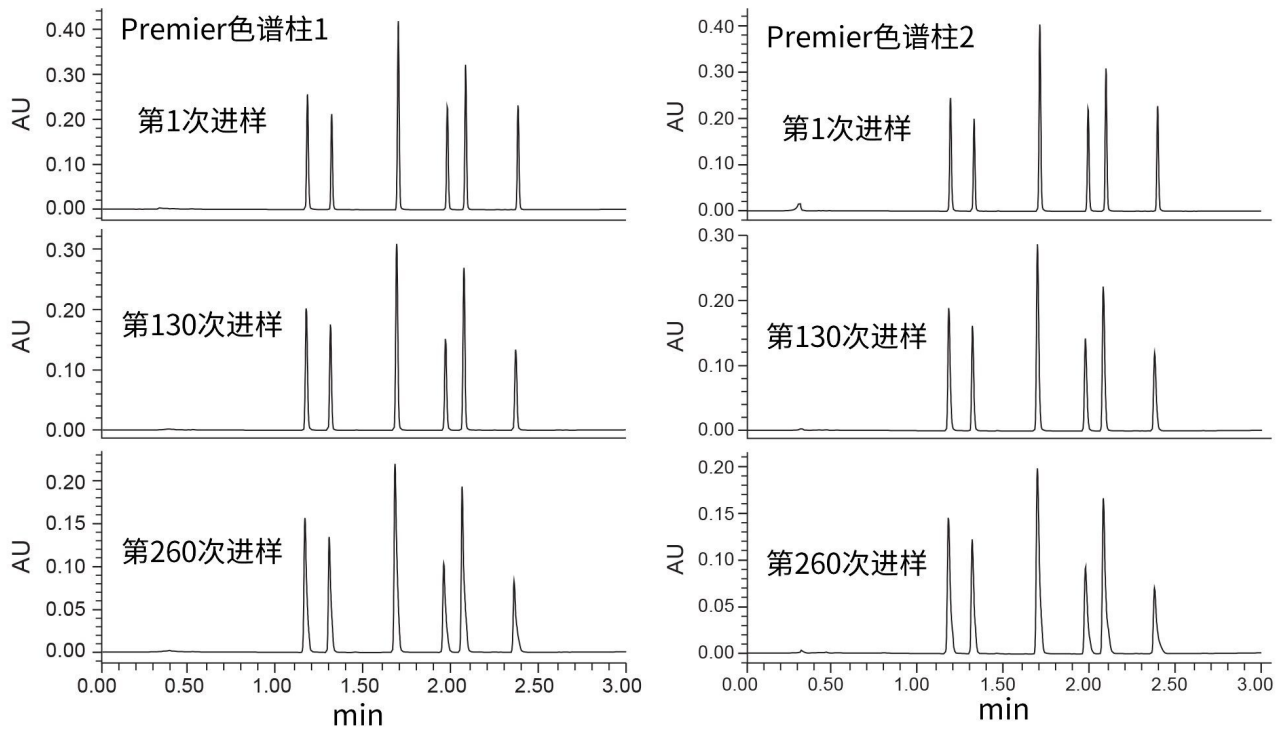


图4.加标基质在两根ACQUITY Premier色谱柱上第1次进样、第130次进样和第260次进样的色谱图，表现出性能下降。峰洗脱顺序为：2-乙酰呋喃、乙酰苯胺、苯乙酮、对羟基苯甲酸丁酯、苯丙酮、苯戊酮。

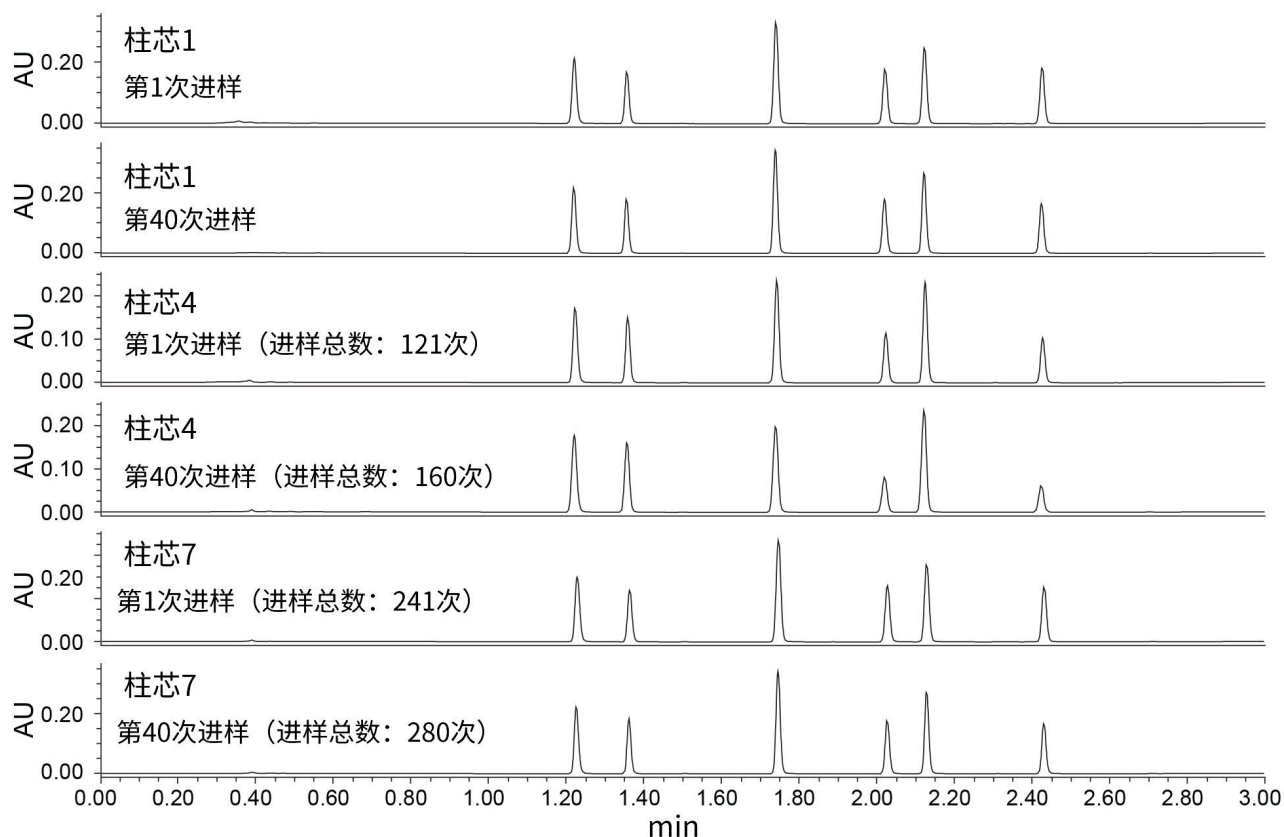


图5.在各柱芯1、4和7上第1次进样和第40次进样的色谱图，展示了在VanGuard FIT保护柱上的早期、中期和晚期进样。还展示了色谱柱上的进样总数。峰洗脱顺序为：2-乙酰咪喃、乙酰苯胺、苯乙酮、对羟基苯甲酸丁酯、苯丙酮、苯戊酮。

无保护柱配置在第130次进样时的峰形与第1次进样时相比可接受，但是当采集到第260次进样时，观察到一些显著差异。值得注意的是，苯戊酮和对羟基苯甲酸丁酯在第260次进样时出现峰拖尾，表明色谱柱失效。而VanGuard FIT保护柱不存在这一问题，因为定期更换保护柱芯可以保持色谱柱的整体性能。柱芯1上第1次进样与柱芯7上第40次进样之间的峰形无变化，总共进样280次。峰高发生一些细微变化，但是由样品蒸发导致的，而非色谱柱性能问题。通过对200多次进样过程中的峰容量绘图，进一步证明了VanGuard FIT保护柱在定期更换柱芯的情况下所发挥的持续性能。图6以十次进样的平均值说明每根色谱柱的初始峰容量百分比。使用十次进样的平均值，对初始峰容量百分比而不是峰容量作图，将数据归一化，以便更好地比较所测试的色谱柱，同时对误进样的数据进行“平滑”处理。

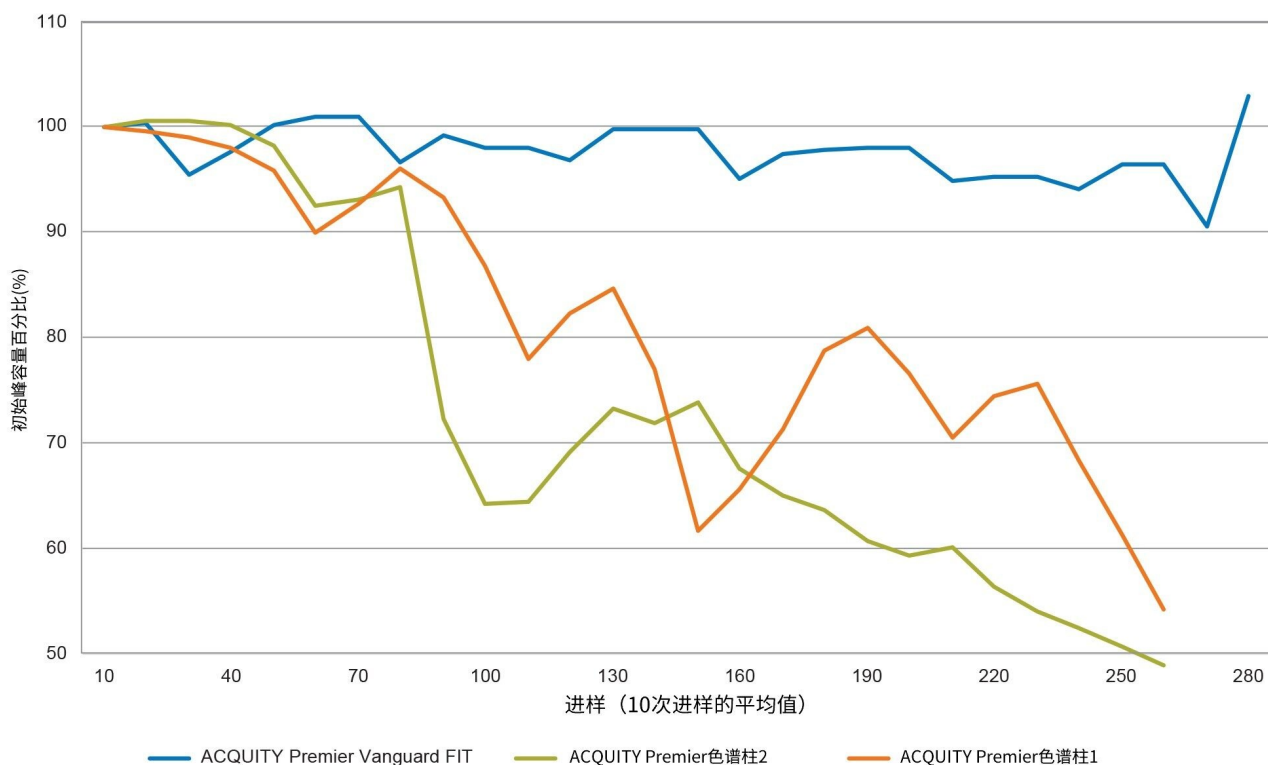


图6. 三根被测色谱柱在13.4%峰高处测得的初始峰容量百分比图。以平均值($n=10$)作图以减少显示的数据点数量并尽可能减小潜在的误进样的影响。

和预期一样，即使进样超过200次，VanGuard FIT保护柱也可以保持性能，柱效损失低于10%。而在无保护柱配置上执行相同数量的进样时，柱效下降至初始值的60%以下，产生重大性能损失。一开始，无保护柱配置的性能可能相似，即使快到约40次进样，但当超出该点后，两根色谱柱都开始出现显著的柱效下降。显著变化发生在约80次进样时，而性能下降是在约50次进样时开始的。在常规检测中使用VanGuard FIT保护柱，尤其是用于含有高含量已知会污染色谱柱的基质组分样品时，可以延长色谱柱使用寿命，保持数据质量，同时尽可能减少更换分析柱的需求。

结论

在分析复杂样品（如血浆或药物制剂）时，为保持色谱柱性能，通常需要进行样品预处理。但是，对于某些分析

，预处理不可行或不能实施。例如，USP专论方法对样品前处理要求非常严格，通常只允许过滤或稀释。在此类分析中不进行样品预处理可能会将大量辅料或内源性化合物引入色谱柱，造成色谱柱污染。如果样品预处理不可行，在分析柱之前使用保护装置可以极大地延长色谱柱使用寿命。保护装置为短的固定相填充床，可以定期更换以免污染分析柱。更换防护装置的频率取决于所分析的样品和分析条件。

VanGuard FIT保护柱配置是MaxPeak Premier色谱柱系列的一部分，是一种集成式保护配置。该硬件使用的保护装置不似传统保护柱还需额外的流路连接。如本应用纪要所述，这一简便易用的设计改进不影响VanGuard FIT柱芯保护分析柱免受污染的能力。将VanGuard FIT保护柱用于复杂的基质样品，例如药物制剂或血浆，将有助于保持分析柱性能。VanGuard FIT保护柱与MaxPeak高性能表面(HPS)技术相结合，与老式保护柱相比具有显著优势。

参考资料

1. Capparella M, Foster W, Larrousse M, Phillips D, Pomfret A, Tuvim Y. Characteristics and Applications of a New High-Performance Liquid Chromatography Guard Column. *Journal of Chromatography A*. (1995) 141-150.
2. Skulason S, Ingolfsson E, Kristmundsdottir T. Development of a Simple HPLC Method for Separation of Doxycycline and its Degradation Products. *Journal of Pharma and Biomedical Analysis*. (2023) 667-672.
3. Berthelette K, Fountain K, Summers M. Improving Method Robustness for Routine Analysis of Pharmaceutical Formulations. Waters Application Note, [720004807](#), 2013.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

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

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007713ZH, 2022年8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