

利用MaxPeak™ Premier色谱柱减少HPLC系统的非特异性吸附

Kenneth D. Berthelette, Maureen DeLoffi, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

在LC系统中，非特异性吸附可能是与系统内部表面有相互作用的分析物回收的一个主要难题。一些化合物（例如寡核苷酸和某些代谢物）会与LC系统和色谱柱内的金属表面发生相互作用，导致分析物完全损失或峰形受到干扰。这些相互作用可以通过多种方法来减轻，但采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术（应用于MaxPeak Premier色谱柱）可以在不牺牲色谱柱性能或使用寿命的情况下解决这些问题。此前，该技术仅适用于特定的色谱柱填料和粒径，硬件的适用性受到限制。

MaxPeak Premier色谱柱最近推出了采用精选3.5 μm粒径的色谱柱填料，让HPLC系统的分析人员得以充分运用改进的硬件。为了展示该色谱柱的可扩展性，并比较NSA对HPLC系统的影响，我们将之前开发的方法从1.7 μm ACQUITY™ Premier色谱柱扩展到了3.5 μm XBridge™ Premier色谱柱，并在两套不同的HPLC系统上进行了测试。同时还使用了标准不锈钢硬件色谱柱来检验MaxPeak HPS硬件在分离方面的优势。缩放后的方法在两套HPLC系统上的表现与UPLC™相似，对于金属敏感化合物，峰面积也有类似的改善。

优势

- 提高了两套不同HPLC系统对于金属敏感分析物的回收率
- 从UPLC缩放到HPLC方法的分离性能相当
- 采用HPS硬件，在UPLC和HPLC系统上观察到的峰面积改善相当

简介

非特异性吸附(NSA)可能是许多工作流程中的一个棘手问题。如果进样间的结果不同, 或者在LC分析过程中分析物回收率不佳, 可能会导致成本高昂的返工和调查。而MaxPeak Premier色谱柱专为解决这一问题而设计。这项技术采用了一种改性表面, 结合杂化的有机-无机化学特性, 可阻止分析物与LC色谱柱和硬件中的金属表面发生相互作用¹。使用HPLC仪器的QC工作流程无法利用该技术。QC工作流程在很大程度上依赖于能够产生可重现结果的稳定方法, 以此处理样品和放行批次。分析失败会直接影响产品的可用性, 进而影响销售。

MaxPeak Premier色谱柱以前有亚2 μm和2.x μm颗粒, 现在终于开发出了适用于HPLC的粒径。HPLC色谱柱配置借助这项技术, 可以将QC工作流程上游开发的方法从UPLC无缝转换到HPLC仪器上。为展示这一点, 我们将使用ACQUITY UPLC H-Class系统在ACQUITY Premier BEH™ C₁₈, 1.7 μm色谱柱上开发的方法转换到使用两种不同HPLC系统(Alliance HPLC和Arc™ HPLC系统)的XBridge Premier BEH C₁₈ 3.5 μm色谱柱上。该方法最初的开发目的是为了凸显MaxPeak Premier色谱柱产品提供的不同选择性²。我们对标准硬件和MaxPeak HPS硬件进行了方法转换中每个步骤的比较。为协助方法转换, 我们使用了沃特世方法转换计算器。方法转换计算器会自动执行缩放所需的所有数学运算, 包括速率、进样体积和梯度时间的调整^{3,4}。方法转换成功完成, UPLC与HPLC平台之间的性能无变化。此外, MaxPeak Premier色谱柱与不锈钢色谱柱在UPLC和HPLC系统上表现出相当的优势。对于关键分析, 在HPLC系统上使用MaxPeak Premier色谱柱可以显著提高重现性⁵⁻⁷。

实验

样品描述

配制储备液并混合, 使用95:5 10 mM甲酸铵(pH 3.0):乙腈配制, 获得由硫脲(4 μg/mL)、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)、磷酸氢化可的松(10 μg/mL)和磷酸地塞米松(10 μg/mL)组成的混合溶液。

液相色谱条件

液相色谱系统:

配备PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class Plus系统

配备TUV检测器的Arc HPLC系统

配备TUV检测器的Alliance HPLC系统

检测:	UV 254 nm
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm (P/N: 186002350) ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 色谱柱, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm (P/N: 186009452) XBridge BEH C ₁₈ 色谱柱, 3.5 μm, 4.6 × 100 mm (P/N: 186003033) XBridge Premier BEH C ₁₈ 色谱柱, 3.5 μm, 4.6 × 100 mm (P/N: 186010660)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	2.0 μL (UPLC)和19.2 μL (HPLC)
流速:	0.5 mL/min (UPLC)和1.165 mL/min (HPLC)。
流动相A:	10 mM甲酸铵(pH 3.0)
流动相B:	乙腈
UPLC梯度条件	流动相B在5.3分内从5%线性增加至95%。总运行时间为7分钟
HPLC梯度条件:	5%流动相B等度保持1.91分钟。流动相B在21.83分内从5%线性增加至95%。总运行时间为30.74分钟。 。

数据管理

色谱软件:

Empower™ 3 Feature Release 5

结果与讨论

先前开发的方法首先在ACQUITY UPLC H-Class系统上进行了测试，使用不锈钢和MaxPeak Premier色谱柱，这两种色谱柱都装填了同一批次的ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm颗粒。图1展示了在不锈钢和MaxPeak HPS硬件上获得的结果。

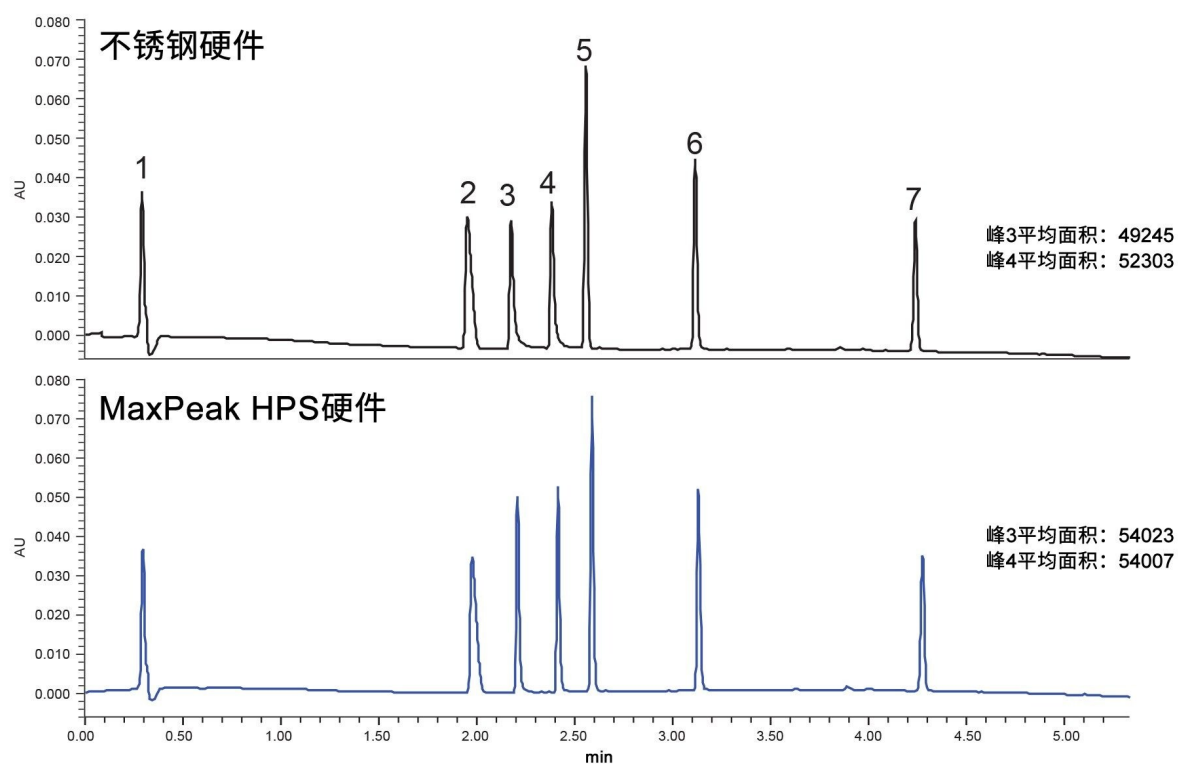


图1.在配备PDA的ACQUITY UPLC H-Class Plus系统上，使用两根装填有同一批固定相的2.1 × 50 mm，1.7 μm颗粒色谱柱分离测试混合物。如图所示，测试色谱柱的色谱柱硬件有所不同。1) 硫脲，2) 美托洛尔，3) 磷酸氢化可的松，4) 磷酸地塞米松，5) 强的松，6) 阿米替林，7) 邻苯二甲酸二丙酯。

本研究中获得的结果与原始研究中获得的结果相当²。MaxPeak HPS硬件为两种金属敏感化合物（磷酸地塞米松和磷酸氢化可的松）提供了更好的峰形、更高的峰面积和峰高。此外，对其他存在的化合物未观察到负面影响。由于本次结果与之前的研究结果相当，因此将该方法缩放到两套不同的HPLC系统中。

为确保正确缩放方法，研究中使用了ACQUITY方法转换计算转换器。方法转换计算器基于原始色谱柱的输入、原始方法详细信息（例如梯度时间和新的色谱柱尺寸生成新的方法条件。该计算器还可以根据不同的系统延迟体积推荐梯度保持时间，确保新方法能够与原始方法等效。图2展示了方法转换计算器，左侧显示了原始方法的详细信息输入，右侧显示了新方法计算出的值。

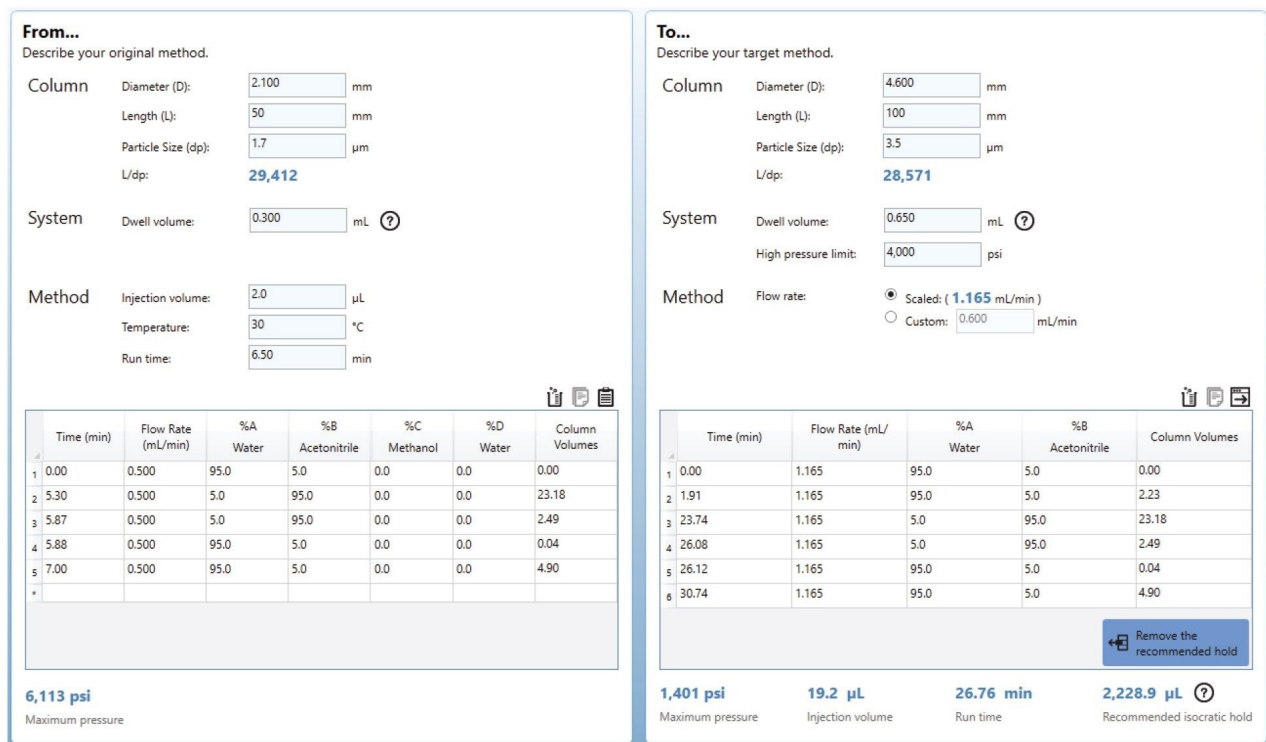


图2.ACQUITY方法转换计算器。原始方法的详细信息，包括梯度表、色谱柱尺寸、系统延迟在左侧输入。新的色谱柱尺寸和系统延迟（如果适用）在右侧输入，新的梯度表、流速和进样体积会自动计算出来。

实验中未计算系统延迟体积，输入的值来自相应系统的支持文献。如图2右下角的新梯度表所示，推荐的保留时间为1.91分钟。这是为了确保在H-Class Plus系统上观察到的驻留体积与两套HPLC系统上观察到的相匹配。在此次转换中，我们将使用4.6 × 100 mm，粒径3.5 μm的色谱柱。选择该配置是因为它的L/dp比率（或柱长/粒径比率

) 与原始测试条件相当。通过在方法转换过程中匹配L/dp, 两次分离之间的总体性能应该相当。

在新方法条件下, 使用不锈钢和MaxPeak HPS硬件色谱柱对两套不同的HPLC系统进行了测试。两根色谱柱均在实验室内部装填, 并使用同一批固定相。首先使用Alliance HPLC。Alliance HPLC是一种较老旧的HPLC系统, 但在QC等不同行业中仍然广泛使用。图3显示了使用Alliance HPLC系统(配备可变波长紫外检测器(TUV))测试两种色谱柱获得的结果。

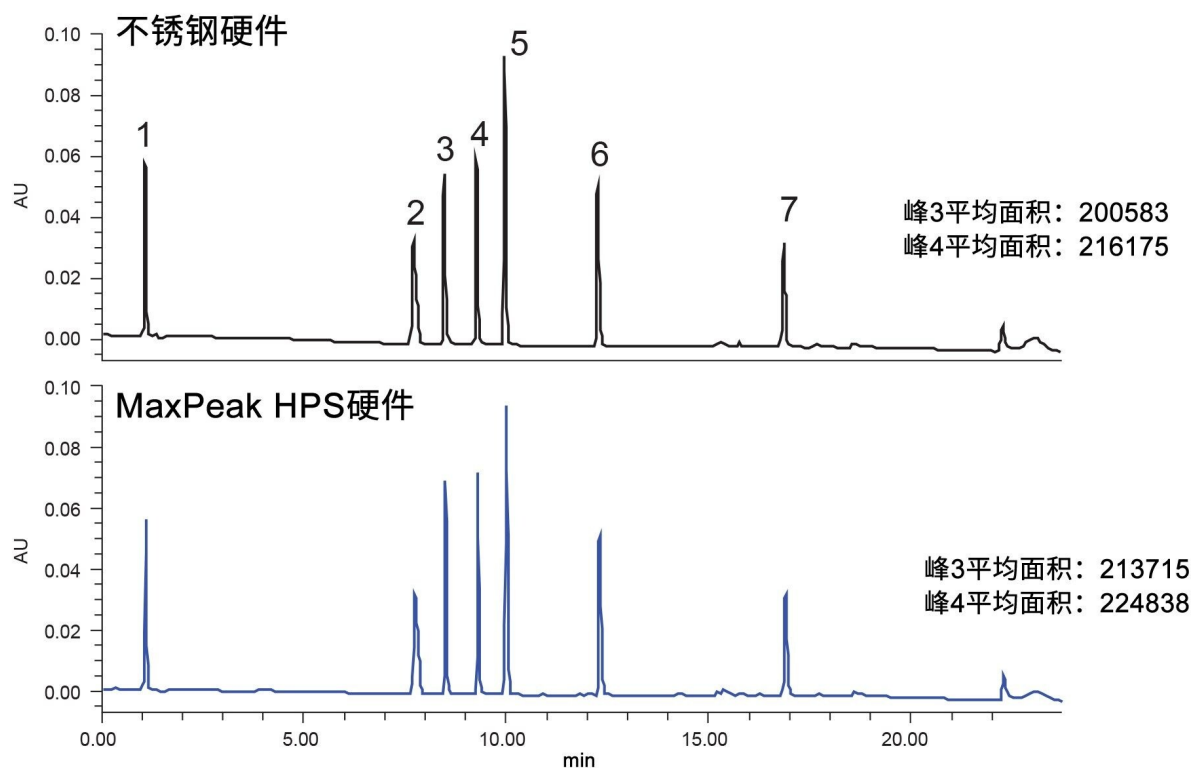


图3.在配备TUV的Alliance HPLC系统上, 使用两根装填有同一批固定相的 $4.6 \times 100 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$ 粒径色谱柱分离测试混合物。如图所示, 测试色谱柱的色谱柱硬件有所不同。1) 硫脲, 2) 美托洛尔, 3) 磷酸氢化可的松, 4) 磷酸地塞米松, 5) 强的松, 6) 阿米替林, 7) 邻苯二甲酸二丙酯。

如图所示, 在Alliance HPLC上获得的总体结果与在H-Class Plus系统上获得的结果非常相似。Alliance HPLC的峰面积更大, 运行时间更长, 这是考虑到进样体积增加和色谱柱配置变化的预期结果。将不锈钢硬件与MaxPeak HPS硬件进行比较, 结果显示峰面积增加了约5%, 与H-Class Plus系统的情况相似。在Arc HPLC系统(一款较新的HPLC系统)上进一步确认了MaxPeak HPS硬件在HPLC上的优势。Alliance HPLC和Arc HPLC系统采用了相同

的方法条件、进样体积和色谱柱。图4展示了在Arc HPLC系统上获得的结果。

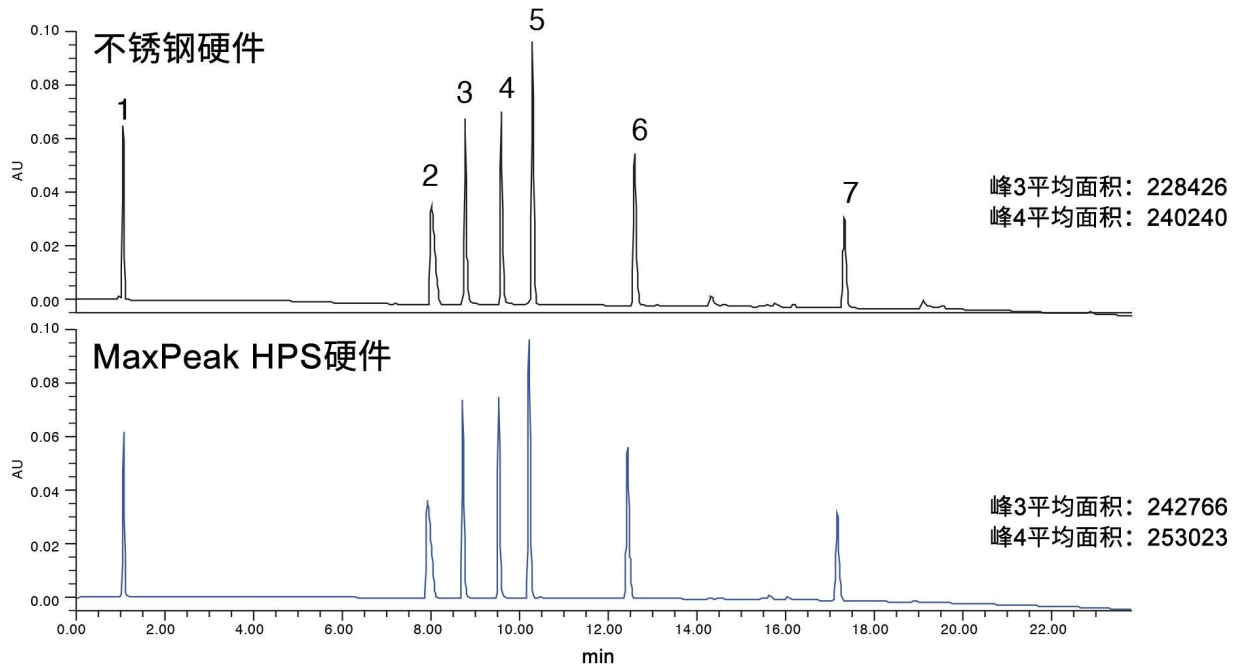


图4.在配备TUV的Arc HPLC系统上，使用两根装填有同一批固定相的 $4.6 \times 100 \text{ mm}$ ， $3.5 \mu\text{m}$ 粒径色谱柱分离测试混合物。如图所示，测试色谱柱的色谱柱硬件有所不同。1) 硫脲，2) 美托洛尔，3) 磷酸氢化可的松，4) 磷酸地塞米松，5) 强的松，6) 阿米替林，7) 邻苯二甲酸二丙酯。

如预期所见，MaxPeak Premier色谱柱中的MaxPeak HPS硬件不仅改善了金属敏感化合物的峰面积，同时对混合物中的其他探针没有负面影响。结合Alliance HPLC系统上获得的结果，MaxPeak HPS硬件已被证明对于HPLC系统中的金属敏感化合物具有显著的改善效果，这意味着，使用ACQUITY Premier色谱柱开发的方法可以在必要时顺利地扩展到HPLC上。

结论

MaxPeak高性能表面(HPS)技术被用于色谱柱和LC仪器硬件，旨在减少分析物与裸露金属表面之间不必要的相互作用。这些相互作用会因吸附损失而导致分析物回收率不佳，还会导致峰形问题和重现性差。ACQUITY Premier

色谱柱系列已成功用于各种工作流程以提高分离性能，然而，这些方法还无法扩展到HPLC色谱柱和系统。

Select XBridge和XSelect™ Premier色谱柱有2.5 μm和3.5 μm粒径可供选择，适用于UHPLC或HPLC分析。这样一来，分析人员就可以缩放并将方法从UPLC色谱柱和仪器转换到HPLC，这是将QC检测从设计转换到开发时经常发生的情况。为证明这一点，我们将之前在ACQUITY H-Class Plus系统上使用UPLC色谱柱开发的方法转换到了Alliance HPLC和Arc HPLC系统上的HPLC色谱柱。无论是哪种系统或粒径，应用HPS技术的色谱柱硬件均能提高金属敏感化合物的分析物回收率，且不会改变其他探针的性能。只需更换为MaxPeak Premier色谱柱，HPLC分析即可获得重现性、分析物回收率和峰形改善的优势。

参考资料

1. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal.Chem.* 93 (2021) 5773-5781.
2. Boissel C, Walter TH. 使用ACQUITY Premier色谱柱改善峰形并扩大选择性范围，沃特世应用纪要，[720007014ZH](#)，2020年9月
3. Du X, DeLaney K, Birdsall R, Friedman T. 从ACQUITY Premier系统到Arc Premier系统的方法缩放，沃特世应用纪要，[720007862ZH](#)，2023年2月
4. Berthelette KD, Haynes K. Future-Proofing Validated Pharmacopeia Methods: A Case Study of Improving Throughput and Decreasing Operational Cost. *LC-GC The Column*.5-July-2023, Vol 19, Issue 7.20-23.
5. Boissel C, Walter TH, Shiner SJ. ACQUITY Premier解决方案改善去铁胺（一种铁螯合药物）的UPLC-MS分析，沃特世应用纪要，[720007239ZH](#)，2021年4月
6. Deloffi M 比较采用MaxPeak HPS技术与PEEK内衬色谱柱硬件的MaxPeak Premier色谱柱，沃特世应用纪要，[720007210ZH](#)，2021年3月
7. Clements B, Rainville P. 借助采用MaxPeak技术的CORTECS Premier色谱柱快速分析头孢菌素和相关药物，沃特世应用纪要，[720007750ZH](#)，2023年1月

特色产品

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

[Arc HPLC系统 <https://www.waters.com/135068659>](https://www.waters.com/135068659)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

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

720008071ZH, 2023年10月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)