

借助采用实心核颗粒和MaxPeak™ Premier HPS技术的CORTECS™ Premier色谱柱提高分离效率

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Jamie Kalwood, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

高效色谱柱通过缩小峰宽来提高分离度，这样可以更轻松地进行峰积分和鉴定，因为目标峰彼此之间以及与潜在背景或辅料峰之间分离度更好。分析人员可以通过多种方式提高分离效率，其中一种方法是使用填充小粒径固定相的色谱柱。另一种方法是使用较长的色谱柱。但是，使用这两种方法都有一个缺点，它们都会受限于系统的操作压力。另一种改进方法是使用实心核颗粒或表面多孔颗粒(SPP)，这种颗粒经证明可在不影响操作压力的情况下提高柱效¹。

本文将介绍如何提高三种分析物混合物分离效率的循序步骤。首先，使用在不锈钢硬件上填充全多孔颗粒(FPP)的色谱柱进行分析，设定分离基线。其次，使用填充有SPP的不锈钢色谱柱运行相同的分析，提高峰容量（效率的衡量指标），从而提高分离效率。第三，通过采用MaxPeak Premier高性能表面(HPS)色谱柱硬件的FPP填充柱进行分析，这其中包括一项创新技术，对于可与不锈钢色谱柱中金属离子结合的分析物，该技术能够改善其峰形和柱效。最后，使用填充有SPP的色谱柱（采用MaxPeak Premier HPS色谱柱硬件）进行最终分离，进一步提高分离效率。本文将展示所有四种色谱条件以及峰容量的计算结果。同时采用SPP和MaxPeak Premier HPS技术可将峰容量提高多达25%。

优势

- 使用MaxPeak Premier色谱柱硬件可获得更清晰的分析物峰
- 有效提高SPP效率
- 同时使用HPS和SPP色谱柱能够提高梯度分离的峰容量

简介

许多分析工作流程都会采用梯度方法来保留目标分析物并将其与背景和辅料峰分离。从代谢组学和生物分析到药物杂质检测，各种工作流程都依赖高效梯度方法实现分离目标。梯度分析中的效率通过峰容量进行衡量，如Neue所述²。提高分离效率有多种方式，包括将粒径减小至亚2 μm或使用更长的色谱柱。这两种改进方法的成本相同，但都需要提高分析系统的反压。其他改进（例如使用SPP）方式可以在不增加系统反压的情况下提高分离效率，避免了对分析方法或LC系统的更改。SPP包含一个实心核，周围覆有表面多孔的壳。这种颗粒形态可以减少分析物谱带的纵向扩散和涡流扩散，从而降低分析物在色谱柱内的扩散和峰宽，达到提高柱效的目的¹。

此外，根据目标分析物的不同，使用MaxPeak Premier色谱柱可以通过缩小峰宽来提高分离效率。MaxPeak Premier HPS技术于2020年推出，是一种具有特色的色谱柱和系统硬件，旨在减少酸性分析物与任何暴露金属表面之间的相互作用³⁻⁵。不同于其他用于减少分析物/表面相互作用的技术（例如，peek内衬不锈钢色谱柱或使用流动相添加剂），MaxPeak Premier HPS技术是色谱柱制造过程中的受控部件，可保持色谱柱的性能和压力容差⁶。已有研究表明，MaxPeak Premier HPS色谱柱硬件在改善磷酸化合物（如核苷酸、磷酸肽和磷酸类固醇）的分离效率和峰形方面尤其有效⁷⁻⁹。MaxPeak Premier HPS色谱柱硬件与SPP相结合，可大幅提高梯度方法的分离效率。

本应用纪要将介绍CORTECS品牌色谱柱所采用的MaxPeak Premier HPS技术与SPP相结合如何提高分离效率。分析物混合物首先在XBridge™ BEH C₁₈ XP色谱柱上使用标准硬件和全多孔BEH颗粒进行分析。接下来，使用CORTECS C₁₈色谱柱（同样使用标准硬件）和XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱对混合物进行分析。这两种技术都显著提高了分离效率，因此在最终实验中使用CORTECS Premier C₁₈色谱柱将这两种技术结合起来。对每根色谱柱进行5次重复进样，计算平均峰宽，然后计算所有色谱柱的峰容量并进行比较。

实验

样品描述

使用浓度为1 mg/mL的储备液水溶液制备含倍他米松、磷酸倍他米松和福替沙韦各10 µg/mL的样品。最终样品中乙腈的含量低于1%。

液相色谱条件

液相色谱系统:	配备色谱柱管理器和PDA的ACQUITY™ Premier QSM
检测:	UV 254 nm
色谱柱:	XBridge Premier BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 2.5µm (部件号: 186009827) XBridge BEH C ₁₈ XP, 2.1 x 50 mm, 2.5 µm (部件号: 186006029) CORTECS Premier C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 2.7 µm (部件号: 186010441) CORTECS C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 2.7 µm (部件号: 186007365)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	3.0 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	水
流动相B:	乙腈

流动相D1:

2%甲酸的水溶液

梯度条件:

表1.

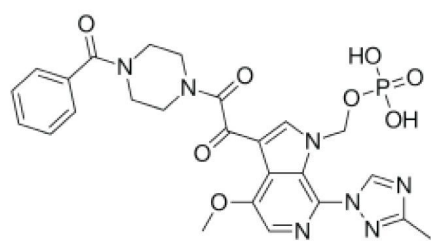
时间 (min)	%A	%B	%D1
0.00	90	5	5
0.50	90	5	5
7.00	0	95	5
7.01	90	5	5
10.00	90	5	5

表1.原始专论方法和现代化方法的梯度曲线

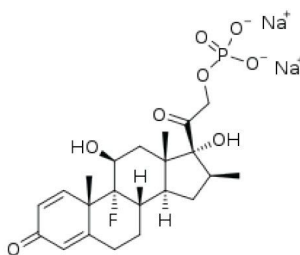
数据管理

色谱软件:

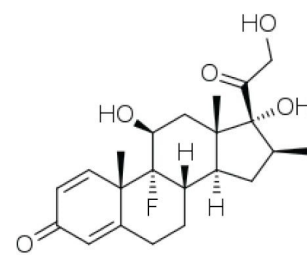
Empower™ 3 Feature Release 4



1.福替沙韦



2.磷酸倍他米松



3.倍他米松

图1.分析物的化学结构。

结果与讨论

XBridge BEH C₁₈ XP色谱柱是最常用的色谱柱之一。基质颗粒采用耐用设计，能够承受高压、高温以及流动相pH，使其成为方法开发的理想起始条件。虽然此色谱柱是一个很好的起始分析条件，但根据检测分析物和条件的不同，性能更好的色谱柱可能更适用。如图2所示，使用XBridge BEH C₁₈ XP色谱柱和良好的UV检测条件，得到的色谱结果合理。福替沙韦(1)和磷酸倍他米松(2)均表现出严重拖尾，USP拖尾因子分别为1.67和2.09。此外，根据图中所示的平均峰宽，确定此分离的峰容量计算值为201。

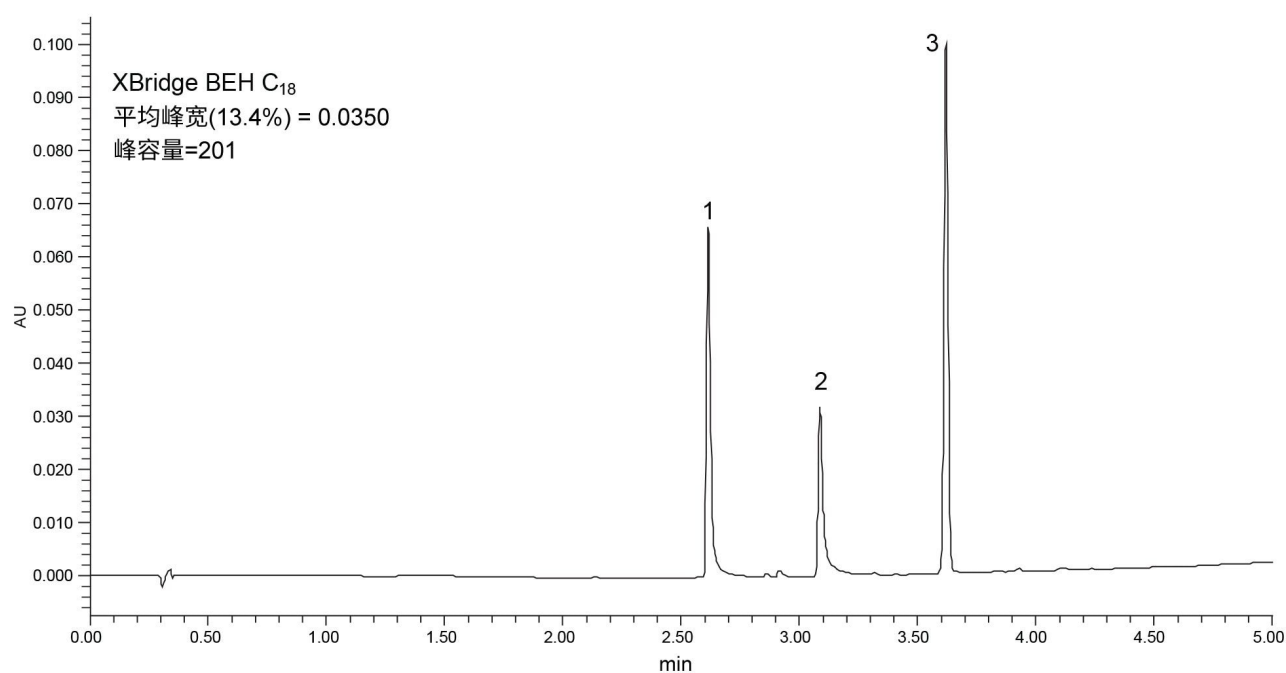


图2.使用XBridge BEH C₁₈ XP色谱柱分离三种分析物。图中显示有峰容量计算值。

1)福替沙韦，2)磷酸倍他米松，3)倍他米松。

由于峰形最差的化合物都对金属敏感，因此有两种可能的方法可以改善分离效果。第一种是使用CORTECS颗粒色谱柱，该色谱柱采用实心核颗粒设计，可提高分离效率。另一种方法是使用MaxPeak HPS色谱柱技术，此技术可以提高分离效率，尤其是金属敏感性化合物的分离效率。接下来使用CORTECS 2.7 μm色谱柱和XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱分离这些化合物。图3所示为这些测试得到的色谱图，将其与之前获得的XBridge BEH C₁₈ XP色谱柱结果进行比较。

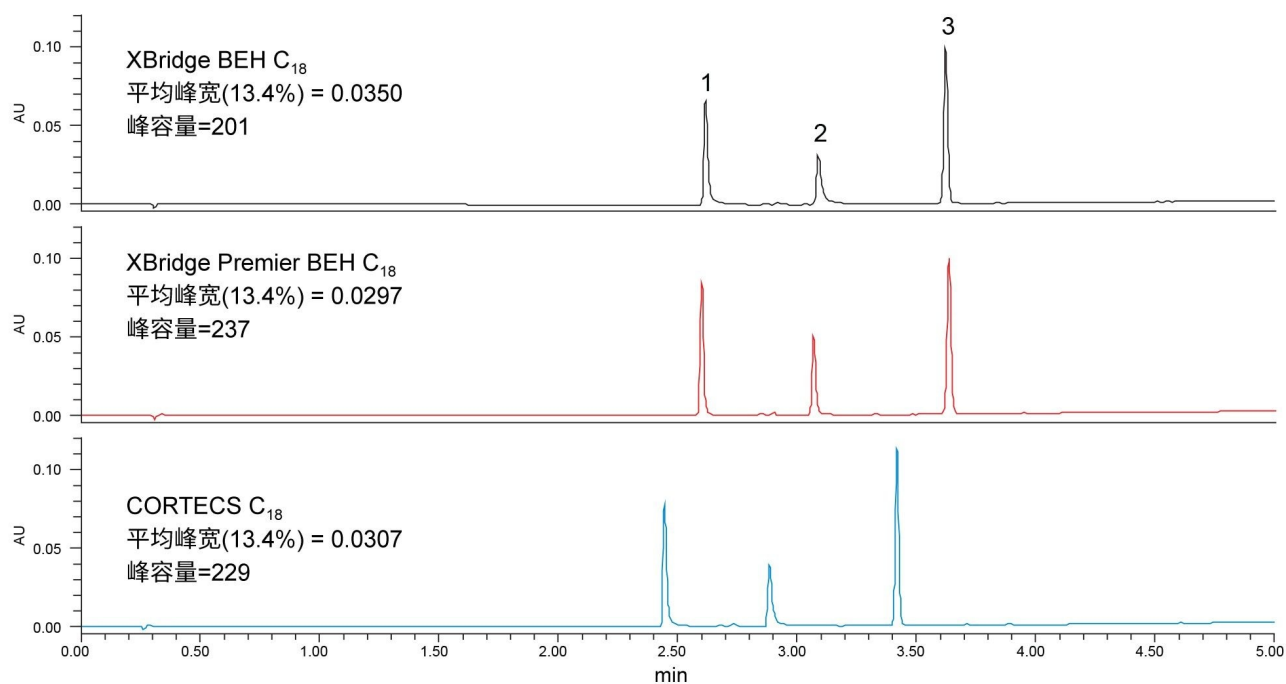


图3.使用XBridge BEH C₁₈ XP、XBridge Premier BEH C₁₈和CORTECS C₁₈色谱柱分离三种分析物得到的结果。图中显示有峰容量计算值。1)福替沙韦, 2)磷酸倍他米松, 3)倍他米松。

首先考察通过XBridge Premier BEH色谱柱获得的结果，福替沙韦和磷酸倍他米松的峰形得到了显著改善。使用HPS色谱柱分析化合物得到的USP拖尾因子分别降至1.23和1.26。USP拖尾因子和平均峰宽均实现了大幅降低，这也意味着峰容量增加。转而来看仍使用不锈钢硬件的CORTECS C₁₈色谱柱，所得峰形也得到了改善。福替沙韦和磷酸倍他米松的USP拖尾因子分别为1.57和1.91。使用CORTECS颗粒色谱柱的分离峰容量增加百分比刚超过10%。

从数据可以看出，峰形改善主要取决于与硬件的二次相互作用，对于金属敏感性分析物而言尤其如此。CORTECS颗粒可以改善整体性能，但不能改善金属敏感性分析物的峰形。理论上来说，HPS技术与高效CORTECS颗粒相结合应该能够获得出色结果。使用CORTECS Premier C₁₈色谱柱分离这些化合物，并将结果与原始分离结果进行比较（图4）。

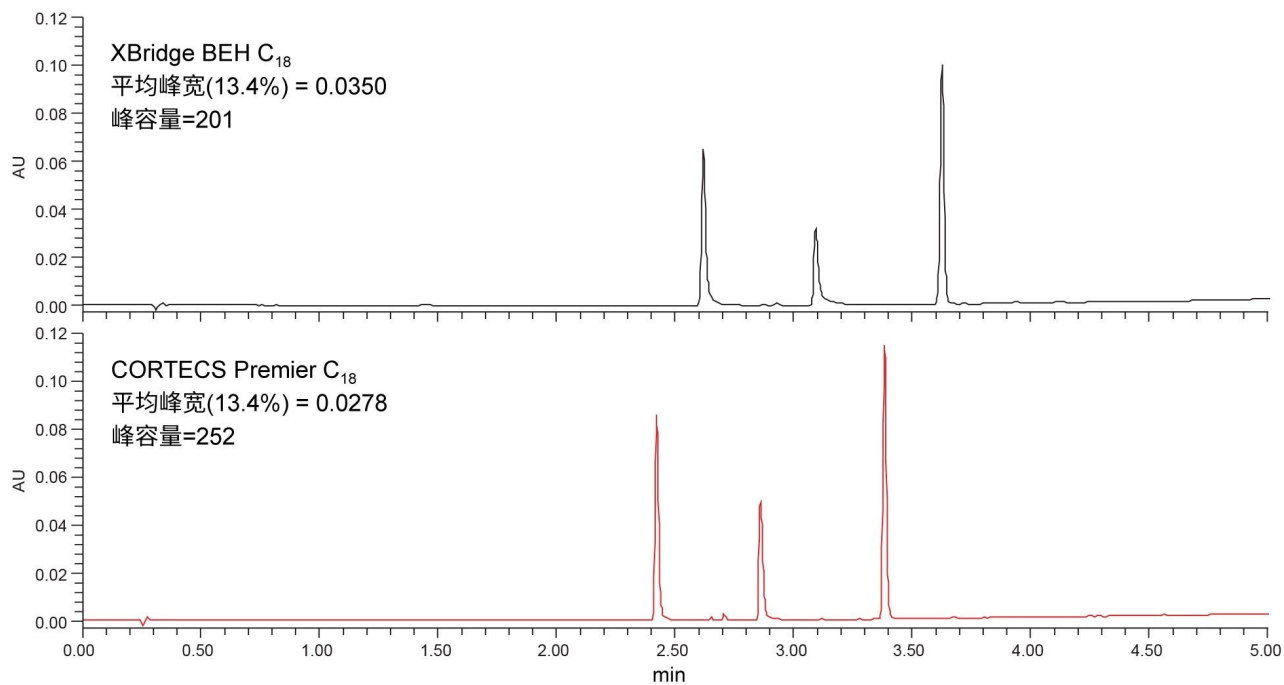


图4.使用XBridge BEH C₁₈ XP色谱柱和CORTECS Premier C₁₈色谱柱分离三种分析物。图中显示有峰容量计算值。
 1)福替沙韦, 2)磷酸倍他米松, 3)倍他米松。

从峰形来看，CORTECS Premier色谱柱生成的峰非常对称，福替沙韦和磷酸倍他米松的USP拖尾因子分别为1.22和1.20，这与使用XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱得到的结果相当。但是，使用CORTECS Premier色谱柱得到的峰容量高于使用XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱得到的峰容量。HPS技术（可改善金属敏感性分析物的峰形）与CORTECS颗粒相结合，可为此类分离提供理想的结果。高效分离适用于任何工作流程，但对于高度复杂的样品而言，这几乎是必需满足的条件。CORTECS颗粒与MaxPeak Premier硬件联用可提供出色的分离效率，尤其是对于金属敏感性分析物。

结论

柱效是许多分析方法的一个重要关注点，由于它与整体分析性能和质量直接相关，因此需要尽可能地提高。测定梯度分离效率的方法是测量峰容量，即一个梯度内可以洗脱的峰数量，具体取决于分析物的平均峰宽。峰宽更窄，峰容量就越高，则分离效率越高。某些对选择性影响很小的固定相和色谱柱硬件可以用来提高分离性能。使用

SPP可以提高分离效率，因为这些颗粒经过专门设计，能够大幅减少色谱柱扩散，从而提高效率。MaxPeak HPS技术还可以减少分析物与色谱柱硬件之间的二次相互作用，由此提高分离效率（尤其是对金属敏感性分析物），生成更尖锐、更对称的峰。将SPP填充入MaxPeak HPS色谱柱，可以显著改善分离度，这将为许多工作流程和分离工作带来很大帮助。

参考资料

1. Guiochon G, Gritti F. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *Journal of Chromatography A*. (2011) 1915–1938.
2. Neue U. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of Chromatography A*. (2005) 153-161.
3. Delano M, *et al.* Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Analytical Chemistry*. (2021) 5773–5781.
4. Walter TH, *et al.* Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC Supplements*. (2022) 28–34.
5. Lauber M, *et al.* 基于MaxPeak高性能表面(HPS)的低吸附HPLC色谱柱. 沃特世白皮书. [720006930ZH <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf), 2023年1月.
6. DeLoff 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](#), 2023年1月.
7. Berthelette K, Shiner S, Walter TH, Nguyen JM, Turner JE. 利用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱改善RNA核苷酸、核苷以及核酸碱基的分离效果. 沃特世应用纪要. [720007324ZH](#), 2023年1月.
8. Nguyen JM, Rzewuski SC, Lauber M. 使用ACQUITY Premier CSH C₁₈肽分析专用柱改善磷酸肽定量分析. 沃特世应用纪要. [720007211ZH](#), 2023年1月.
9. Tanna N, Plumb R, Mullin L. 使用ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱改善磷酸类固醇药物定量分析的灵敏度. 沃特世应用纪要. [720007095ZH](#), 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)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

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

720007872ZH, 2023年3月



© 2023 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](#)