

应用纪要

在Agilent 1290液相色谱系统上使用 CORTECS C₁₈+色谱柱增强在低pH条件下 分析碱性分析物的性能

Kenneth D. Berthelette, Jennifer M. Nguyen, Jonathan E. Turner

Waters Corporation



摘要

在低pH条件下分析碱性分析物通常具有挑战性，在使用弱离子强度添加剂（例如甲酸）时尤其如此。已证明填充带电表面材料的色谱柱能够大幅减少有关碱性化合物的不良相互作用。本研究展示了填充此类固定相的色谱柱与常规C₁₈颗粒技术相比的性能改善。使用Agilent 1290液相色谱系统以及由碱性、中性和弱酸性探针组成的参比标准品，这种表面多孔颗粒CORTECS C₁₈+色谱柱为碱性分析物提供了更出色的峰形和更高的分离度。

优势

- 与竞争厂商的表面多孔颗粒色谱柱相比具有更高的峰容量
- 改善碱性分析物的峰形
- 在Agilent 1290液相色谱系统上使用反相质量控制标准品模拟系统性能监测

简介

药物化合物的酸/碱特性可能在药物的行为中发挥重要作用。特别是这些药物在生物基质中的离子化状态会影响理化性质和药代动力学，进而影响吸收、分布、代谢和排泄(ADME)属性，例如药物渗透性、生物利用度和体内清除。2014年，一项涉及600多种药物（其中400多种是碱性药物）的研究证明，这些碱性化合物中约有60%在生理pH条件下发生离子化。带电荷的碱性化合物不仅具有更高的极性并由此在水中具有更高的溶解度，而且还可能影响体内吸收的途径¹。

使用液相色谱工作流程进行分析对于评估碱性药物靶标的纯度很重要，但是通常会因离子化而出现问题，在低pH条件下尤其如此。在低pH条件下进行分析时，因正电荷引起的极性增强会减少化合物在反相液相色谱(RPLC)中的保留。此外，众所周知，由于与基质颗粒的次级相互作用，离子型分析物在载样量低于中性化合物的情况下，在反相色谱柱上表现出过载（即峰形不佳）^{2,3}。

可采用某些缓解策略尽可能减小这些相互作用，包括使用更强的流动相添加剂（例如三氟乙酸），或改用不同的固定相。三氟乙酸及其他流动相添加剂可以改善碱性探针的峰形，但是会导致其他问题，例如MS灵敏度下降。更换固定相也可能存在问题，因为选择性可能发生变化，但是可通过选择合适的固定相开发方法来减少这些问题。

本文所述研究在填充表面多孔颗粒(SPP)和C₁₈键合相的两种不同色谱柱上分离反相质量控制标准品(RP-QCRM)。选择的第一种色谱柱是CORTECS C₁₈+ 2.7 μm，第二种是由另一家供应商生产的表面多孔C₁₈材料，粒径也为2.7 μm。检查两种材料之间的峰形和峰容量差异。

实验

样品描述

反相质量控制标准品（部件号：186006363 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006363-reversed-phase-qc-reference-material.html>>）为2 mL含有7种化合物（尿嘧啶、对羟基苯甲酸丁酯、萘、普萘洛尔、邻苯二甲酸二丙酯、萘和阿米替林）的溶液(pH 7)，以即用型形式提供，无需进行额外的样品前处理。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Agilent 1290 Infinity I
检测条件：	UV检测（波长254 nm）
色谱柱：	CORTECS C ₁₈ ⁺ , 90 Å, 2.7 µm, 2.1 × 50 mm （ 部件号：186007395） 竞争厂商表面多孔C ₁₈ , 100 Å, 2.7 µm, 2.1 × 50 mm
柱温：	30 °C
样品温度：	室温
进样体积：	1 µL
流速：	1.0 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度：	参见下表

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	1.0	95	5	6
1.35	1.0	5	95	6
1.50	1.0	5	95	6
1.56	1.0	95	5	6
2.00	1.0	95	5	6
47.60	0.4	25	75	6
55.00	0.4	25	75	6

数据管理

色谱软件：

Empower 3 Feature Release 5

信息学软件：

Empower 3 Feature Release 5

$$P_c = 1 + \left(\frac{w_{avg}}{t_g} \right)$$

公式1.峰容量(P_c)的计算，其中 t_g 为梯度时间， w_{avg} 为平均峰宽。

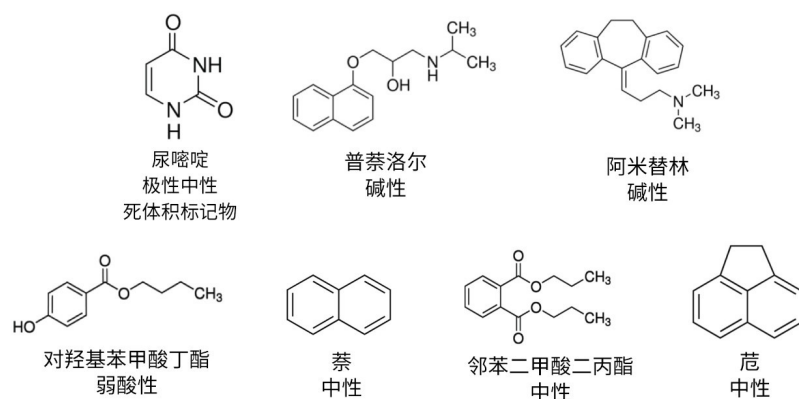


图1.RP-QCRM中包含的七种化合物的化学结构

结果与讨论

在CORTECS表面多孔颗粒(SPP)色谱柱系列产品中，CORTECS C₁₈+材料经过改性，在键合前包含少量碱性官能团。采用表面带电杂化(CSH)技术的色谱柱中也使用了相同的改性技术²。在低pH条件下，这些碱性基团带正电荷，已被证明具有弱阴离子交换功能以用于混合模式分离⁴。

为证明带正电荷表面的优势，采用CORTECS C₁₈+色谱柱分析反相质量控制标准品(RP-QCRM)，这是一种包含碱性、中性和弱酸性分析物的标准品，目的是测量和监测系统性能。该标准品在常规运行中还有助于在进样失败时提供故障排除所需的关键数据，从而缩短系统停机时间，且适用于任何系统。图2显示了使用CORTECS C₁₈+色谱柱与竞争厂商使用常规C₁₈固定相设计的表面多孔颗粒色谱柱进行RP-QCRM分离所得到的色谱图。

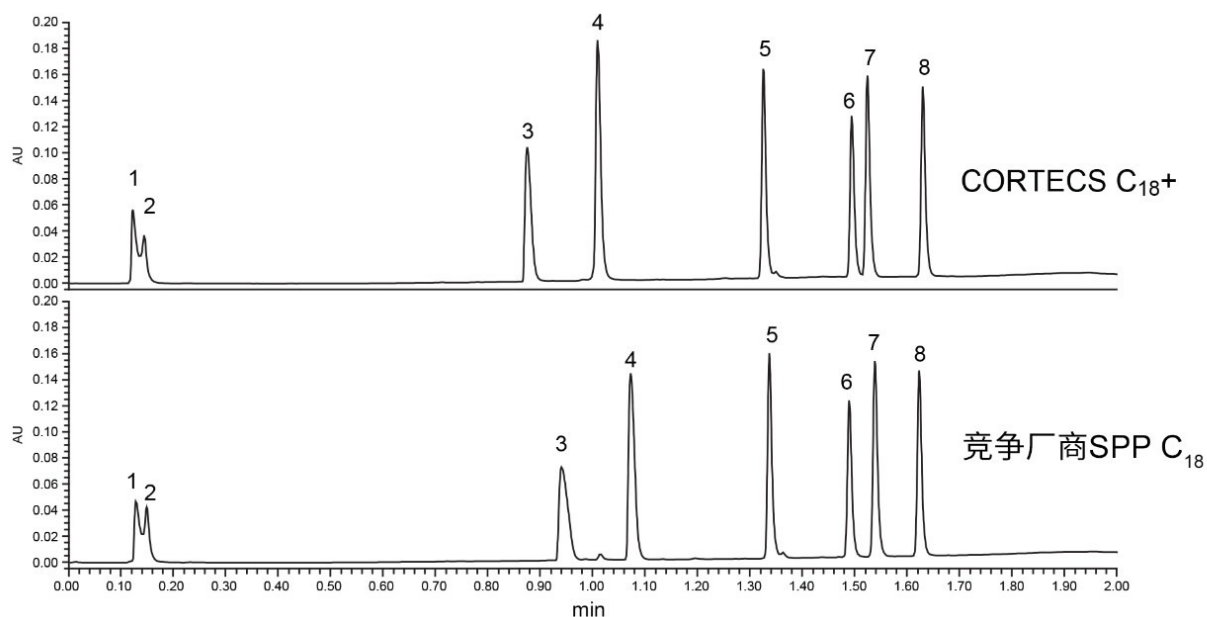


图2.使用A) CORTECS C₁₈⁺ 2.7 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm 色谱柱和B)竞争厂商表面多孔C₁₈ 2.7 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm 色谱柱所得到的RP-QCRM分离结果。1)溶剂峰、2)尿嘧啶、3)普萘洛尔、4)阿米替林、5)对羟基苯甲酸丁酯、6)萘、7)邻苯二甲酸二丙酯和8)苊。

竞争厂商表面多孔颗粒C₁₈色谱柱在中性和弱酸性探针的峰宽方面表现出与CORTECS C₁₈⁺相似的结果，但选择性与CORTECS C₁₈⁺色谱柱略有不同。碱性探针普萘洛尔和阿米替林在竞争厂商色谱柱上的峰形不佳，而在CORTECS C₁₈⁺上则获得了更出色的峰形。如表1所示，采用CORTECS C₁₈⁺进行分析时，碱性探针可获得更窄的峰宽，从而使分离的峰容量增加10%。中性和弱酸性探针在两种色谱柱之间表现出相似的峰宽，表明对这两种色谱柱的峰容量影响最大的因素是碱性探针的峰宽。

	峰宽 (13.4%峰高) (min)	
	CORTECS C ₁₈ +	竞争厂商SPP C ₁₈
普萘洛尔	0.0209	0.0294
阿米替林	0.0175	0.0207
对羟基苯甲酸丁酯	0.0155	0.0154
萘	0.0153	0.0158
邻苯二甲酸二丙酯	0.0160	0.0161
茚	0.0159	0.0158
平均峰宽	0.0169	0.0189
峰容量	90	81

表1.两种色谱柱得到的分析物峰宽和峰容量

虽然固定相上的少量电荷改善了峰形，但由于离子排斥效应，它也导致保留性略有下降，如图2所示。对于弱酸性探针对羟基苯甲酸丁酯，未观察到这种效应，因为该化合物在低pH条件下不带电荷。此分离中，碱性探针的保留性降低不会造成问题。在不同的分析中，可能需要考虑额外的因素来解释这种效应。与碱性探针峰形方面的优势相比，保留性的轻微损失是一个小缺点。无需额外的方法开发或使用不同的流动相添加剂，即可实现这一改善。

结论

CORTECS C₁₈⁺色谱柱填充有表面多孔颗粒，这些颗粒经改性后含有少量表面正电荷。这种改性操作减小了碱性探针与固定相之间的次级相互作用。众所周知，这种相互作用会导致峰形不佳和载样量较低，在低pH条件下使用硅胶固定相时尤其如此。本文所述研究展示了使用CORTECS C₁₈⁺色谱柱相比于未经改性的表面多孔颗粒C₁₈色谱柱对峰形的改善。就反相质量控制标准品分析而言，CORTECS C₁₈⁺色谱柱的峰容量比测试的其他色谱柱高10%，这完全是由于碱性分析物的峰形得到改善。只需更换色谱柱即可实现这一改善，无需进行任何方法开发或更换流动相。

参考资料

1. Charifson P, Walters W. Acidic and Basic Drugs in Medicinal Chemistry: A Perspective. Journal of Medicinal Chemistry. 2014. 9701-9717.
2. Ireneta P, Wyndham K, McCabe D, Walter TH. A Review of Waters Hybrid Particle Technology; Part 3 Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography. Waters White Paper. 720003929EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003929en.pdf>> .
3. Lauber M, Koza S, McCall S, Alden B, Ireneta P, Fountain K. High-Resolution Peptide Mapping Separations with MS-Friendly Mobile Phases and Charge-Surface-Modified C₁₈. Analytical Chemistry. (85) 2013. 6936-6944.
4. Smith K, Plumb R, Rainville P. Separation and Detection of TCA Cycle Metabolites and Related Compounds in Human Urine by UPLC MS/MS. Waters Application Note. 720006463EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/tca-cycle-metabolites-related-compounds-in-human-urine-uplc-ms-ms.html>> .

特色产品

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

720007282ZH, 2021年6月