

使用MaxPeak™ Premier色谱柱和系统性筛选策略快速开发用于香料大麻素的LC方法

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

Waters Corporation

摘要

方法开发所采用的策略会对结果以及达到该结果所需的时间产生重大影响。使用方法开发软件配合“分析方法质量源于设计(AQbD)”策略，可以开发出稳定的方法，但受限于软件获取和用户熟练程度。而其他策略则需要更多的人工干预，不仅要选择正确的条件，还要解析结果并根据数据做出决策。系统性筛选策略采用结构化决策过程，减轻了分析人员选择理想条件组合的压力，并简化了方法开发过程。

本文所述研究使用系统性筛选策略开发出一种分析方法，可用于分析由九种具有相似结构的香料大麻素组成的混合物。通过该策略，只用了三天时间进行方法开发和优化就确定了最终方法条件：使用XBridge™ Premier BEH Shield RP18色谱柱和碱性改性乙腈流动相。我们在UV和MS检测中对所有九种分析物实现了良好的分离和检测，并且对三个批次的材料进行了测试，以展示分离的批间重现性。

优势

- 使用XBridge Premier BEH Shield RP18 2.5 μm色谱柱对九种分析物进行基线分离
- 在三天内快速开发用于分析结构相似化合物混合物的方法
- 采用精简的系统性筛选策略，缩短决策制定时间
- 使用在不同地点进行填充的三批固定相进行重现性测试

简介

方法开发可能是一项艰巨的任务，即使对于专家级色谱工作者也是如此。分析人员必须要找到合适的方法条件来分离分析物，这本身就具有挑战性，此外通常还需要追踪这些条件的确定和选择过程，以供将来参考和记录。在同时开展多项方法开发活动的实验室中，不同的分析人员所开发的方法策略可能不同，这使得追踪活动变得更加困难；在这种情况下，为所有新方法开发工作实施标准化方案可能会有所帮助，包括筛选某些色谱柱填料以及某些流动相条件。实验室采用标准化方法开发策略有助于更好地理解轻松地记录产生最终方法条件的过程。此外，使用标准化方案，经验不足的用户也可以进行方法开发，让专家腾出时间来处理更具挑战性的分离工作。

目前有多种方法开发策略，例如软件辅助AQbD和全因子筛选。全因子筛选旨在测试HPLC方法中三个关键参数的各种组合：固定相填料、强溶剂和流动相pH。全因子筛选是一种全面策略，但这种策略不仅要制备所有不同的流动相，还会用到大量的分析人员和仪器时间。给定一组四个固定相时，全因子策略至少需要运行16次测试，还不包括每种条件的重复测试。收集数据后的分析和解释工作也需要大量时间。AQbD策略只测试一些关键参数，因此通常比全因子策略更快。我们通常采用实验设计(DOE)和软件辅助AQbD策略对关键分离参数进行建模，并指出稳定的方法开发区域。虽然这种策略可能有利于稳定性测试或验证，但AQbD不考虑不同的固定相，并且通常需要经过专门的培训才能运行软件。

还有一种更为简便的策略：系统性筛选策略。与全因子策略不同，系统性筛选策略首先评估流动相pH对分析物保留性的影响。运行至少两次分析后，分析人员即可轻松确定使分析物获得理想保留的pH，然后再来筛选色谱柱和强溶剂。对于四种固定相的典型组合，系统性筛选策略可以在10次进样（不包括重复样）后找出理想方法条件，比全因子策略节省时间。本应用采用系统性筛选策略开发了分离九种结构相似的香料大麻素化合物的方法。为确保获得准确的结果，本应用纪要中使用的所有色谱柱均采用了MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术。该技术专为减少金属表面与分析物之间的次级相互作用而设计，并已被证明可以改善整体分离质量¹⁻²。

最终方法使所有九种组分实现了基线分离，UV和MS检测均取得了良好的检测结果。开发完成后，使用于不同日期在两个不同地点填充的三批固定相进行简单的重现性实验。在三个批次中观察到的良好结果表明该方法具有良好的重现性，这是方法验证的第一步。

实验

样品描述

两种香料大麻素混合物均购自Cerilliant，以100 µg/mL标准储备液形式提供。分别取100 µL香料大麻素混合物(S-

038)和香料大麻素混合物2 (S-041)混合，用800 µL Milli-Q级水稀释，让最终分析物浓度达到10 µg/mL。最终进样的样品组成为80:20水:甲醇。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ UPLC H-Class Plus系统，配备四元溶剂管理器(QSM)和可选的溶剂选择阀、流通针式样品管理器(SM-FTN)、色谱柱管理器、辅助色谱柱管理器和QDa质谱检测器
检测：	UV @ 220 nm（除非另有说明） 使用MS全扫描和SIR进行峰追踪
色谱柱：	所有色谱柱的尺寸均为2.1 × 50 mm（粒径2.5µm） XBridge Premier BEH C ₁₈ 色谱柱(P/N: 186009827) XSelect™ Premier CSH苯己基柱(P/N: 186009879) XBridge Premier BEH Shield RP18色谱柱(P/N: 186009914) Atlantis™ Premier BEH C ₁₈ AX色谱柱(P/N: 186009390)
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	1.0 µL
流速：	0.7 mL/min

流动相A:	Milli-Q水
流动相B:	乙腈
流动相C:	甲醇
流动相D:	0.1%甲酸(D1)或200 mM氢氧化铵(D2)
梯度条件:	流动相D在整个梯度中始终保持在5%以确保添加剂浓度一致。线性梯度，B/C在4.90 min内从5%增加至95%95% B/C保持0.82分钟。返回到5% B/C的起始条件并保持1.6分钟。总运行时间为7.37分钟。优化梯度的详细信息见图片说明。

数据管理

色谱软件:	Empower™ 3 Feature Release 4
-------	------------------------------

结果与讨论

使用系统性筛选策略进行方法开发时，首先要设置最终方法的最低允许标准并定义将使用的系统。此标准可以很宽泛，也可以很具体，取决于实验室的要求。常用标准是USP分离度或拖尾因子，但某些分析可能还需要满足其他参数。这些标准不仅充当方法的目标，也是一个“停止点”，让分析人员知道是何时创建出满足分析需要的方法。当已经有足够的方法时，过度开发方法可能会浪费时间。更加糟糕的是，如果没有特定的标准，可能会发生方法开发数周后却发现最终版本产生的结果与前几次尝试的结果相似的情况。在本研究中，所有化合物的USP分离度值必须>1.5，USP拖尾因子必须在0.8~1.2之间。本研究使用配备四元溶剂管理器(QSM)和可选溶剂选择阀的ACQUITY UPLC H-Class Plus系统，旨在尽可能提高系统的溶剂通用性，减少预混合流动相添加剂和强溶剂的需求。配备溶剂选择阀的QSM支持混合所有4条溶剂管路（A、B、C、D），管路D最多有六种流动相可供选择(D1-D6)。

此外，为了获得理想的分离效果，测试的所有色谱柱均采用了MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术。该技术可减少色谱柱金属表面与目标分析物之间的次级相互作用。在不知道目标探针是否会与暴露金属相互作用的情况下，使用MaxPeak Premier HPS色谱柱是一个安全的着手点，它将消除这些相互作用的可能性，从而对最终分离更有信心。

鉴于这些标准，我们采用了之前的应用中所述的系统性筛选策略³⁻⁶。系统性筛选策略的第一步是评估分析物在高pH和低pH条件下的保留性，并确定获得理想保留的条件。这一步的重要目的是选择一款在高pH条件下性能稳定的色谱柱，例如XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱。与之前设置的最终方法要求不同，这一步仅评估保留性，为下一步选择使目标化合物的总体保留获得理想结果的条件。图2所示为pH探索实验的色谱图。

分析物在高pH和低pH条件下均表现出良好的保留，在色谱图中未保留过早。组分2-9似乎不受pH变化的影响，表明这些探针是中性的，或者pH变化不足以改变它们的电荷态。只有组分1(JWH-200)在两种pH条件下表现出保留性变化。JWH-200中存在的三级氮pKa约为7，因此可以在低pH条件下带电，或者在高pH条件下呈中性。化合物在低pH条件下保留较少的事实证实了这一点。该混合物中的其他化合物则含有带杂环氮的多环芳烃，并且在大多数pH条件下呈中性。

在执行系统性筛选策略并评估总体保留结果后，选择高pH条件进行下一步。虽然待测混合物和初步结果显示低pH条件仍然适合，但该策略的第一步是仅评估保留性，而不是总体分离性能。选择高pH流动相后，必须考虑下一步，包括筛选强溶剂和色谱柱固定相。在高pH条件下，只能使用杂化颗粒固定相。硅胶固定相在高pH条件下不适用，因为硅胶可能溶解并降低色谱柱性能⁷。

本研究选择四种色谱柱进行溶剂筛选，它们分别是XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱、XSelect Premier CSH苯己基柱、XBridge Premier BEH Shield RP18色谱柱和Atlantis Premier BEH C₁₈-AX色谱柱。如前文所述，XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱在高pH条件下稳定，是高pH分析的理想着手点。此外，该固定相也非常常见，成功率高。XSelect Premier CSH苯己基柱也采用杂化颗粒，可在高pH条件下使用。但是，这种基质颗粒在生产过程中带有少量正电荷，与BEH基质颗粒相比具有一定的选择性优势。此外，苯己基环会与固定相发生 π - π 相互作用，因此可以为带有芳香环的分析物提供独特的保留机制。XBridge Premier BEH Shield RP18色谱柱与C₁₈固定相类似，但Shield RP18官能团存在嵌入的氨基甲酸酯基团，与直链C₁₈相比具有一定的选择性优势。最后，Atlantis Premier BEH C₁₈-AX色谱柱是一种低键合相密度的C₁₈固定相，其阴离子交换官能团与BEH杂化颗粒键合。得益于较低的键合相密度，C₁₈可以与基质颗粒产生更多的相互作用，颗粒表面上的阴离子交换基团提供了独特选择性的潜力。使用这四种固定相进行甲醇筛选的结果如图3所示。将UV检测切换至220 nm进行筛选和优化，因为化合物在该波长下表现出更好的吸光度，并且使用高pH流动相时未检测到基线漂移。

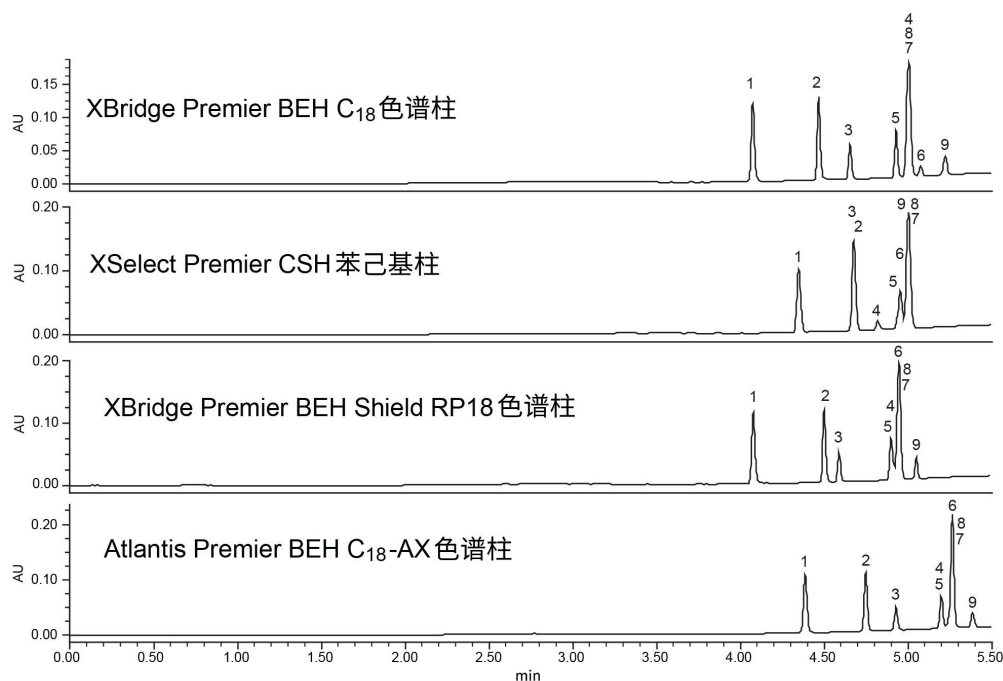


图3.在220 nm紫外波长下使用甲醇对色谱柱和溶剂进行筛选得到的色谱图。组分ID列于图1中。

使用甲醇流动相得到的色谱结果不太理想。每种固定相对九种组分的分离效果不佳，至少两种组分发生严重的共洗脱。如XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱所示，多种组分完全共洗脱，并不便于方法开发。优化这些条件以分离组分将是相当大的挑战，甚至不可能实现。幸运的是，系统性筛选策略的筛选步骤还在所选色谱柱上测试了乙腈流动相。色谱图如图4所示。

使用乙腈得到的结果优于使用甲醇得到的结果。在筛选的四种固定相中，化合物的共洗脱较少，总体分离效果更好。事实上，在使用乙腈流动相测试的四种固定相中，两种至少能够部分分离所有九种组分。Shield RP18和C₁₈-AX固定相仍有部分共流出的峰，但组分仍可以通过离散峰的形式被观察到。苯己基固定相仅显示出七个离散峰，这意味着至少有两个峰因与其他峰完全共洗脱而被“隐藏”。C₁₈固定相显示出八个离散峰，其中组分9与组分8共洗脱。通过更仔细地观察两次半成功分离的情况，并牢记前面指定的分离标准，可以发现，XBridge Premier BEH Shield RP18色谱柱在组分的USP分离度方面提供了理想的分离。采用Shield RP18固定相时，同量异位组分7和组分8的分离效果最好。此外，Shield RP18固定相的分离保留性稍差，为方法优化提供了更多机会。

方法优化包括但不限于：改变梯度斜率、调整柱温、少量调整流动相pH，以及使用更长或更短的色谱柱配置来改善分离或缩短运行时间。以上步骤均适用于样品，最终方法条件如图5所示。

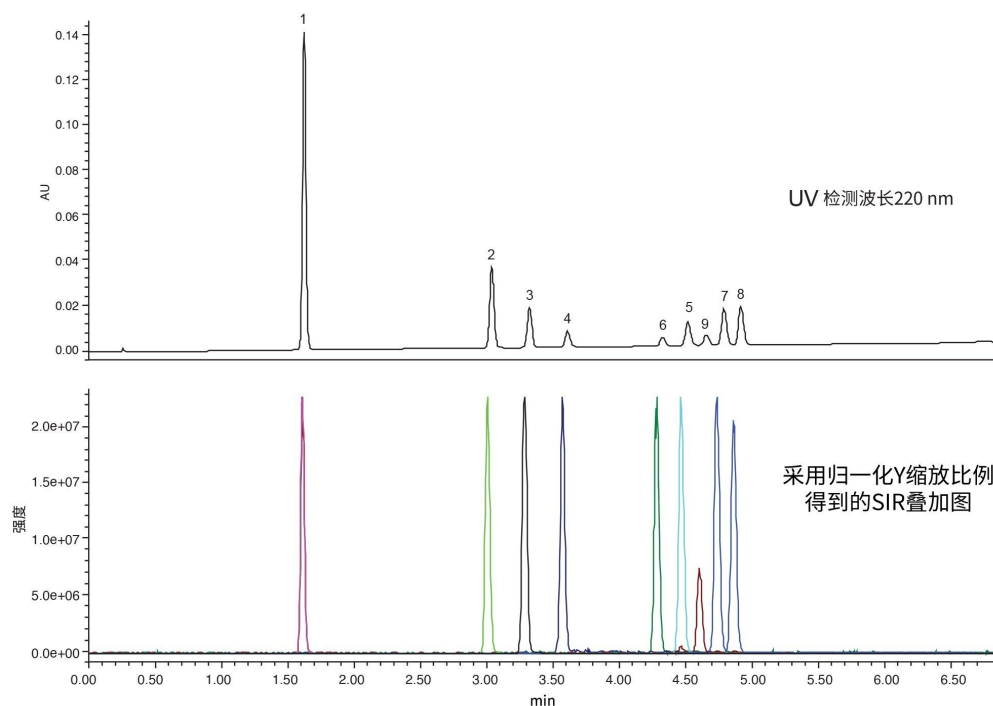


图5.使用UV和MS检测分离香料大麻素混合物的最终方法。XBridge Premier BEH Shield RP18, 2.5 μ m, 2.1 x 100 mm色谱柱。恒定使用5%的D6维持流动相pH值。采用乙腈在6.52 min内从50%增加到80%的线性梯度（梯度斜率为1.50%/V_c），总运行时间为11.46 min。组分ID列于图1。

经过优化的方法条件表明，所有九种组分均实现了基线分离，峰形良好，UV和MS检测器均能够检测到。在ESI+模式下对九种组分进行选择离子监测(SIR)，但组分4和6除外，这两种组分仅在ESI-模式下电离。经过优化的测试条件与筛选方法之间的峰强度差异是由于分析物稳定性和降解所致。在进行批次间测试之前制备新鲜样品。即使在进行重现性测试之前，该分离结果就已经达到了可接受水平，并且满足方法开发方案中设定的所有分离标准。色谱柱重现性超出了方法开发的范围，通常作为方法验证的一部分进行。图6显示了在两个不同地点填充的三个不同XBridge BEH Shield RP18固定相批次的批次间测试结果。批次131和136在爱尔兰韦克斯福德填充，批次132在马萨诸塞州米尔福德填充。这三种色谱柱使用的色谱柱硬件批次不同，并且由不同的技术人员在不同日期填充。

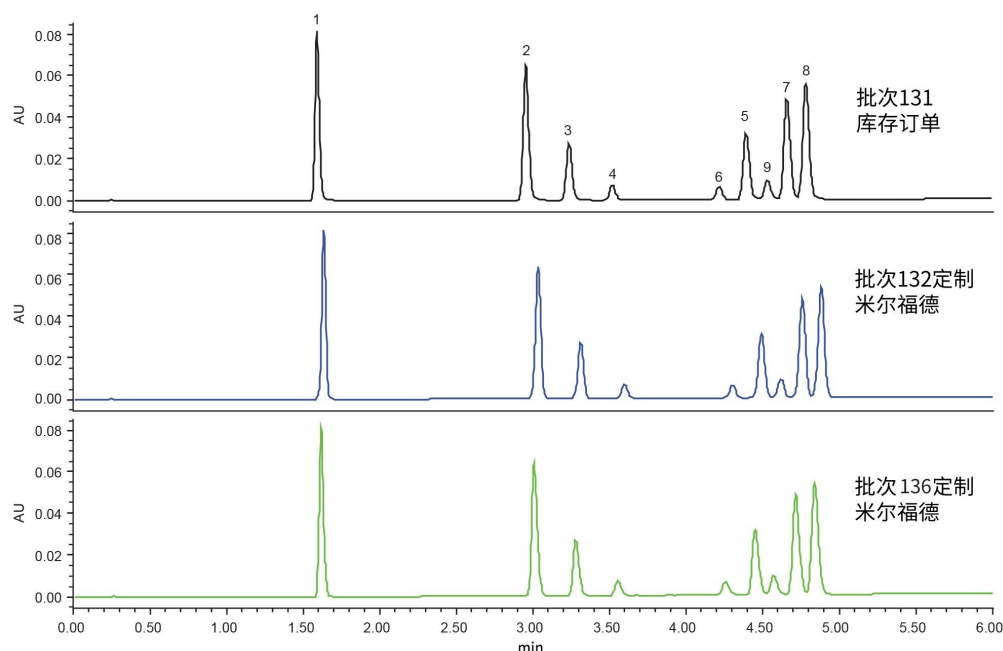


图6.在九种香料大麻素的经过优化的分析方法条件下，对XBridge BEH Shield RP18固定相进行批次间测试。所示数据为220 nm UV数据。组分的ID如图1所示。

三款色谱柱的分离性能相当。方法开发过程中设定的所有分离标准仍然得到满足，最低USP分离度为1.52。USP拖尾因子结果也在我们的限值范围内。系统性筛选策略可用于方法开发，即使是香料大麻素等棘手的混合物也能得到分离。我们在三天内开发出了一种分离所有九种化合物的方法，甚至使用三个不同批次的固定相测试了重现性。系统性筛选策略是一种精简的流程，可以加快方法开发过程并减少开发过程中的不确定性。通过将该流程与MaxPeak Premier色谱柱的可靠性和重现性相结合，分析人员可以消除他们对分离的疑虑，并获得支持未来工作流程的可靠且高质量的结果。

结论

逐步策略可能是方法开发活动的重要资产。标准化方案不仅可以确保所有分析人员以相同的方式开发方法，只要设计得当，还可以减少总体方法开发时间。本应用纪要介绍的系统性筛选策略不需要专门的软件或培训，并且可以简化方法开发过程。系统性筛选策略首先检查pH对保留性的影响，然后再筛选色谱柱和强溶剂。通过首先评估pH，可以锁定所选的属性，避免在后续活动中再出现，并影响后续步骤中使用的固定相的选择。

我们使用系统性筛选策略开发出了一种分析方法，可用于分析由九种具有相似结构的香料大麻素组成的混合物。借助于系统性策略，仅用三天时间就开发出使用乙腈、氢氧化铵和XBridge Premier BEH Shield RP18色谱柱的最终方法。本研究使用最终方法条件分离在两个不同地点和不同日期填充的三批材料，并得到了相当的结果。通过将系统性筛选策略与MaxPeak Premier色谱柱的可靠性相结合，获得了合适的分离效果，可用于包括未知样品的定量或鉴定在内的多种工作流程。

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. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette KD, Boissel C, Delano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner S. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC Supplement*, June (2022) 28-34.
3. Maziarz M, McCarthy S, Wrona M. 使用系统性筛选策略提高方法开发效率. 沃特世应用纪要. [720005026ZH](#). 2014年4月.
4. Berthelette KD, Nguyen JM, Turner, J. 在配备UV和QDa检测器的ACQUITY Arc上使用系统性筛选策略对10种抗生素化合物进行方法开发. 沃特世应用纪要. [720007352ZH](#). 2021年8月.
5. Berthelette KD, Turner JE, Walter TH, Haynes K. 使用系统性筛选策略和MaxPeak HPS技术开发去铁胺及其强制降解产物的UHPLC分析方法. 沃特世应用纪要. [720007834ZH](#). 2022年12月.
6. Hong P, McConville P. 在液相色谱方法开发中实施系统性筛选策略的全面解决方案. 沃特世白皮书. [720005268ZH](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf>> .
7. Kirkland JJ, van Straten MA, Claessens HA. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns. *J. Chrom A.* (1995) 3-19.

特色产品

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

[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)

720007916ZH, 2023年7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](#)