

在Alliance™ HPLC™系统上使用MaxPeak™ Premier色谱柱进行合成三苯甲烷染料分析的方法开发

Kenneth D. Berthelette, Maureen DeLoffi, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

使用HPLC方法开发结构相似的组分是一项艰巨的任务。了解液相色谱的原理并以结构化、精简的方法应用它们，这样不仅可以加快方法开发过程，还可以通过易于遵循的形式为活动提供可追溯性。使用结构化的方法开发方案，新手用户也可以在没有色谱专家监督的情况下独立开发方法。

利用结构化方案（系统性筛选策略）开发分离八种结构相似合成染料的方法。所有这些染料都属于三苯甲烷家族，具有相同的核心结构，但连接的基团不同。开发该方法所用的方案依赖于MaxPeak Premier色谱柱所采用的MaxPeak™高性能表面(HPS)技术，该技术旨在减少色谱柱与分析物之间存在的任何非特异性吸附(NSA)。采用该色谱柱技术，结合系统性筛选策略，开发出一种能为所有八种染料提供良好峰形并使其完全分离的方法。

优势

- 使用系统性筛选策略快速开发方法
- 使用MaxPeak Premier色谱柱，缓解任何NSA的影响，并且在第一时间提供准确的结果
- 使用100 mm色谱柱在20分钟内实现八种合成染料的完全分离

简介

开发方法可能是一项难题，尤其是对于具有相似化学性质（例如极性或pKa）的结构相似化合物。如果要求一名经验不足的新手分析人员在项目中开发方法，挑战将更加巨大。如果没有方法开发方案，新手用户将不得不严重依赖专家级用户，或者自己艰难地完成整个开发过程。无论采用哪种方式，方法的开发速度可能都会较慢。结构化方法开发策略（如本应用纪要中所述）不仅有助于新手用户积累经验，还可以为方法开发过程提供一定程度的可追溯性。每个阶段都有明确的概述和分配给每一步的目标，方法条件选择的理由就显而易见了。用于方法开发的系统性筛选策略具有上述可追溯性，同时在开发速度与获取尽可能多的数据之间实现了平衡，用户可准确了解所分析的样品。

系统性筛选策略采用四个步骤来开发方法¹⁻³。首先，分析人员需要确定新方法必须满足的标准。这些标准可以很简单，只需在峰之间实现足够的分离度或具有对称峰。接下来，分析人员使用合适的色谱柱进行高pH值和低pH值筛选。此步骤将确定哪种pH条件能够为探针提供最佳保留。这一步可以通过分析物的化学性质来预测，但在某些情况下（如强制降解研究），其化学性质是未知的，因此这一步在方法开发过程中至关重要。选定pH后，即可使用乙腈和甲醇流动相以及各种LC固定相，进行更传统的色谱柱和有机溶剂筛选。此步骤可提供最多的数据，并评估能够实现最佳分离的一组条件。最后，如有需要，可以进行方法优化，进一步改善分离质量。在优化过程中可以调整梯度斜率、流动相添加剂、色谱柱长度和其他参数，以满足方案第一步中设定的标准。

为证明系统性筛选策略的适用性，研究中制备并分析了八种合成染料的混合物。这八种分析物均为三苯甲烷染料，具有相同的骨架结构。每种分析物与该结构的连接方式各不相同，但结构的相似性使得分离这些化合物尤其困难。图1展示了分析物的化学结构。本研究使用XBridge™ Premier色谱柱，配合MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术，通过系统性筛选策略分离这些化合物，开发出满足所有标准的方法。这类色谱柱可减少分析物与色谱柱金属表面之间的任何次级相互作用，因此非常适用于方法开发。去除这些相互作用后，样品第一次进样的准确度和重现性将更高⁴⁻⁶。最终方法现在可以用于样品检测或进一步验证（例如稳定性等方面）。

实验

样品描述

配制浓度为1 mg/mL的储备液，并混合得到最终样品浓度。酸性品红、孔雀石绿、荧光素和酚红的浓度均为100 µg/mL。结晶紫、维多利亚蓝R和甲酚红的浓度为50 µg/mL。罗丹明B，10 µg/mL。最终样品稀释剂为95:5水:乙

腈溶液。

液相色谱条件

液相色谱系统：	配备TUV检测器的Alliance HPLC系统
检测：	UV 260 nm
色谱柱：	XBridge Premier BEH™ C ₁₈ 色谱柱, 3.5 μm, 4.6 × 100 mm (P/N: 186010660) XBridge Premier BEH苯基柱, 3.5 μm, 4.6 × 100 mm (P/N: 186010676) XBridge Premier CSH C ₁₈ 色谱柱, 3.5 μm, 4.6 × 100 mm (P/N: 186010643)
柱温：	30 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 μL
流速：	2.0 mL/min
流动相A：	水
流动相B：	乙腈
流动相C：	甲醇
流动相D：	2%甲酸水溶液或200 mM氢氧化铵水溶液
梯度条件：	5% D保持不变，以保持添加剂的浓度。B/C线性梯度在16.43分钟内从5%增加至95%。在95%有机相

下保持2.7分钟，然后在0.02分钟内恢复到5%有机相。重新平衡色谱柱5.51分钟。总运行时间：25分钟

数据管理

色谱软件：Empower™ 3 Feature Release 5

结果与讨论

在样品分析之前，需要确定方法开发目标。对于这组化合物混合物，必须实现基线分离并保持良好的峰形。由于研究所用的系统没有质谱仪或光电二极管阵列，因此完全分离化合物非常重要，这样才能通过标准品进样来鉴定峰。本研究在开发过程中使用单独的标准品，在优化过程中使用了混合物。图2更详细地展示了系统性筛选策略。

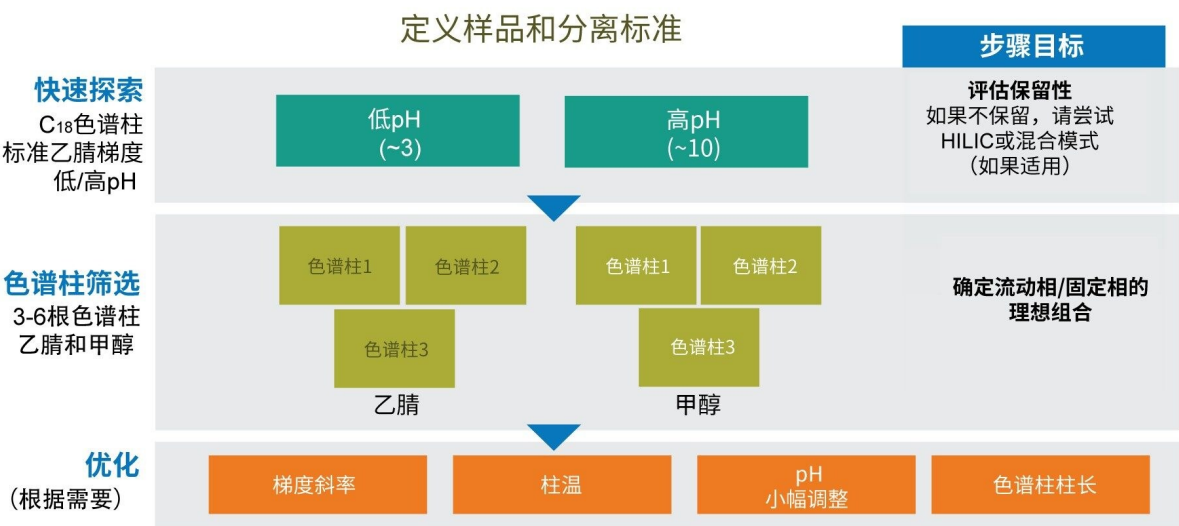


图2. 系统性筛选策略概览。

确定方法标准后，需要进行快速探索实验，评估分析物在高pH和低pH条件下的保留性。为实现这一点，需要在高

pH条件下稳定的固定相。纯硅胶固定相在高pH条件下不稳定，因为硅胶会溶解，导致色谱柱降解。此外，为简化操作，色谱柱还应具有C₁₈键合相，该键合相仅基于疏水性保留化合物，而不是基于其他次级相互作用。本研究选择了XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱。BEH颗粒不仅在高pH条件下保持稳定，同时MaxPeak HPS硬件的使用还减少了分析物与色谱柱中金属表面之间的任何次级相互作用。这些化合物的快速探索结果如图3所示。

使用甲酸流动相进行的低pH测试为这些分析物提供了最佳的整体保留性。在高pH条件下，酸性品红（峰1）未得到保留，因为该化合物的所有酸性部分都带电荷，极性极强。此外，由于酸性部分的电荷导致极性增加，甲酚红（3）、酚红（2）和荧光素（4）等化合物在高pH条件下的保留性也较差。在高pH条件下，酸性品红、甲酚红和酚红的磺酸基团以及荧光素的羧酸基团完全带电荷，而在低pH条件下仅部分带电荷或呈中性。另一方面，某些化合物，例如维多利亚蓝R（8）和结晶紫（7），在高pH条件下保留性更强。在图3中，峰8在该标准品的进样窗口之外洗脱，并且与序列中的下一个样品在同一次运行中洗脱。这解释了该化合物为何显示出非常宽且小的峰，因为该化合物在两次进样之间残留，导致大量的谱带展宽。结晶紫（7）在该标准品的进样窗口之外洗脱，但在后续进样中未检出。可能是化合物在两次进样之间未采集UV数据时洗脱，也可能是谱带展宽导致峰完全展平，无法检测。最后，高pH会造成孔雀石绿出现峰分裂效应，这种现象无法完全解释。离线MS分析表明化合物正在水合，但由于超出研究范围，因此未进行进一步分析。

鉴于在高pH条件下观察到的问题，研究选择了低pH条件进行进一步测试。如图3所示，低pH条件下分离效果良好，但碱性分析物的峰形较差。这种过载峰形是这些化合物的胺官能团与BEH基质颗粒之间的次级相互作用所致。带电碱性基团可能与基质颗粒上的游离硅烷醇发生相互作用，导致峰拖尾⁷⁻⁹。

进入方案的下一步，研究额外选用了两根色谱柱，在低pH条件下分析这些化合物。接下来选择的是XBridge Premier BEH苯基柱，因为其键合相可以为这些化合物提供一些独特的选择性。鉴于每种分析物中都含有多个苯环，苯基固定相不仅可以通过疏水性保留分析物，还可以通过 π - π 相互作用进行保留，特别是在使用甲醇流动相的情况下。最后选择的色谱柱是XSelect™ Premier CSH C₁₈色谱柱，它与之前使用的键合相相同，但基质颗粒不同。CSH颗粒带有少量正电荷，可防止碱性探针与颗粒之间发生任何次级相互作用，从而改善峰形。此外，由于颗粒带电荷，因此色谱柱具有一定的离子交换功能，有助于更好地保留酸性探针。图4展示了在甲醇条件下选择的三种色谱柱上的分析物分离结果。

对于这些化合物，可以确定三种固定相之间的选择性差异。首先，使用XSelect Premier CSH C₁₈色谱柱改善了碱性探针的峰形（5-8），同时这些探针的保留性略有下降。另一方面，与BEH C₁₈色谱柱相比，酸性探针（1-4）在CSH C₁₈色谱柱上的保留性更强。遗憾的是，对于这组混合化合物，这些差异并不有益，因为酸性探针的保留增加和碱

性探针的保留减少，导致了化合物的共同洗脱。与BEH C₁₈相比，XBridge Premier BEH苯基柱还表现出一些独特的选择性，所有探针均得到更好的保留。此外，与BEH C₁₈相比，甲酚红(3)和荧光素(4)峰在苯基柱上得到分离。遗憾的是，使用甲醇流动相时，没有色谱柱能够实现良好分离。图5展示了使用相同的三根色谱柱，但采用乙腈流动相时，样品的分离结果。

乙腈流动相呈现出与甲醇相似的情况。CSH C₁₈色谱柱仍显示出离子相互作用对保留性和峰形的影响。但是，如前所述，这会导致大量探针共洗脱。使用乙腈流动相时，与BEH C₁₈相比，苯基固定相显示出较少的独特选择性。由于苯基固定相独特的保留机制是由 π - π 相互作用决定的，因此使用乙腈会阻止这些相互作用。乙腈中含有大量的 π 电子，这些电子“遮蔽”了固定相之外的分析物，从而阻碍了这种二级保留机制。没有这些次级相互作用，苯基键合相对于疏水性更强的探针（如维多利亚蓝R (8)）提供的保留性略差。与C₁₈色谱柱相比，酸性探针(1-4)在苯基固定相上的保留性略强，这可能是由于键合相的疏水性和探针极性差异所致。

唯一能够实现合理分离的色谱柱和流动相组合是BEH C₁₈色谱柱和乙腈。选择这种组合进行优化，目的是在保持分离性能的同时改善碱性探针的峰形。改善这些探针峰形的方法之一是在保持低pH的条件下使用缓冲流动相。在本例中，我们测试了两种不同浓度的甲酸铵(pH 3.0)。具体方法是调整梯度曲线，使流动相B从5%增加至90%，并使用流动相D控制缓冲液浓度。图6所示为使用之前制备的0.1%甲酸溶液以及两种不同浓度的甲酸铵(pH 3)缓冲液得到的方法优化结果。

使用0.1%甲酸溶液的结果继续表明了碱性探针与BEH颗粒之间存在次级相互作用。这些影响表现为峰拖尾和轻微过载特性。然而，当使用缓冲流动相时，这些影响得到缓解。10 mM甲酸铵添加剂(pH 3.0)足以显著改善这些探针的峰形问题，同时对保留性能和选择性几乎没有影响。随着峰形的改善，该方法的标准已经满足，因此可以停止开发。该方法现在可用于分析样品或转移用于验证活动。通过系统性筛选策略和MaxPeak Premier色谱柱，我们为八种结构相似的合成染料开发了一种方法。这些化合物具有多种化学性质，但骨架结构相同，因此极难分离。

结论

研究中使用MaxPeak Premier色谱柱分离八种结构相似的合成染料。这些色谱柱现在提供HPLC型号，可减少分析物与色谱柱硬件中金属表面之间的次级相互作用，这为方法开发提供了一个良好的起点，因为从第一次进样开始就可以收集到准确且可重现的数据。使用这类色谱柱能够顺利开发新方法。现在，这种方法可以进一步验证或用

于样品分析。

参考资料

1. 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>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf)。
2. Maziarz M, Rainville P.使用系统性筛选策略高效开发盐酸萘甲唑啉、马来酸氯苯那敏和相关物质的分析方法，沃特世应用纪要，[720007850ZH](#)，2023年1月。
3. 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。
4. 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.
5. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette K, 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 Supplements* (2022) 28-34.
6. Zabala G, Berthelette K, Gu W, Haynes K. 使用改为2.5 μm 颗粒的MaxPeak Premier色谱柱提高USP专论方法分析对乙酰氨基酚的重现性，沃特世应用纪要，[720007938ZH](#)，2023年7月。
7. Fountain KJ, Hewitson H, Iraneta P, Morrison D. Practical Applications of Charged Surface Hybrid (CSH) Technology. Waters Application note. [720003720](#). September 2010.
8. Summers M, Fountain K. Improved Analysis of Goldenseal Root Extract Using Charged Surface Hybrid (CSH) Column Technology. Waters Application Note. [720004098](#). September 2011.
9. Alden BA, Isaac G, Chen W, Lauber MA.通过表面带电杂化颗粒苯己基柱分离与蒸发光散射检测分析脂质纳米颗粒成分，沃特世应用纪要，[720007331ZH](#)，2021年8月。

特色产品

Alliance HPLC系统 <<https://www.waters.com/534293>>

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

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

720008098ZH , 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](#)