

Устойчивость колонок Agilent Poroshell HPH C18 к низким и высоким значениям pH

Методические рекомендации

Автор

Уильям Лонг (William Long)
Agilent Technologies, Inc.

Введение

Устойчивость колонок для ВЭЖХ является одним из важнейших факторов, определяющих успех методики. В процессе разработки аналитических методик, использующих обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, специалисты по хроматографии, имея в виду их валидацию в будущем, обычно рассматривают ряд аспектов. Одним из наиболее существенных является срок службы колонки при конкретном наборе условий анализа. Силикагель обладает многими свойствами, которые делают его прекрасным носителем для колонок для обращенно-фазовой ВЭЖХ. Однако его растворимость значительно увеличивается, когда pH подвижной фазы достигает значений 7–8 и выше. При исследовании устойчивости колонок для ВЭЖХ на основе силикагеля к высоким значениям pH в компании Rockland Technologies было сделано несколько ключевых выводов: блокирование концевых групп защищает силикагель от растворения, привитые фазы с высокой плотностью прививки повышают устойчивость колонки, а органические буферные растворы в качестве подвижной фазы обеспечивают значительно более длительный срок службы колонки по сравнению с фосфатными буферными растворами при тех же значениях pH. Исследования показали, что разрушение наполнителя с привитой фазой при pH 9–10 обусловлено, в основном, растворением силикагелевого носителя и далеко не в первую очередь связано с гидролизом ковалентных силоксановых связей. В принципе, химическая и термическая устойчивость колонок для обращенно-фазовой хроматографии может быть повышена за счет усовершенствования и разработки новых носителей и привитых фаз [1–4].

Как правило, разработку методик обращенно-фазовой хроматографии рекомендуется начинать с использования подвижных фаз с низкими значениями pH независимо от того, являются ли аналиты кислотными, нейтральными или основными соединениями. Есть несколько веских причин придерживаться этих рекомендаций. При низких значениях pH кислотные аналиты будут находиться в неионизированном состоянии и будут хорошо удерживаться. Остаточные силанольные группы на не занятой привитой фазой участках поверхности силикагелевого сорбента будут протонированы. В результате уменьшится количество вторичных взаимодействий между кислотными и основными аналитами и поверхностью силикагеля. К сожалению, основные соединения, несущие положительный заряд при низких значениях pH, в этих условиях зачастую будут плохо удерживаться или иметь плохую форму пиков. Еще одной причиной использования низких значений pH является недостаточная устойчивость колонок на основе силикагеля при высоких pH.



Agilent Technologies

Как сообщалось ранее, для обеспечения устойчивости колонок для ВЭЖХ на основе силикагеля при высоких значениях pH были применены два подхода. Один способ состоит в использовании специальной привитой фазы, как, например, в колонке Agilent ZORBAX Extend C18 [3]. В колонке ZORBAX Extend C18 для защиты силикагеля от растворения при высоких значениях pH применяется прививание бидентатными заместителями. Другим способом достижения устойчивости к высоким значениям pH является модификация самого силикагеля с целью уменьшения его растворимости. При использовании этого подхода частицы Poroshell размером 2,7 мкм (а теперь и 4 мкм) подвергаются органической модификации, что делает их менее чувствительными к воздействию высоких pH.

В данной работе оценивался срок службы колонки Agilent Poroshell HPH C18 с типичными подвижными фазами с низким pH (0,1%-я трифторуксусная кислота) и высоким pH (10 мМ гидрокарбоната аммония с pH 10) в условиях градиентного элюирования с использованием ацетонитрила.

Вещества и методики

Использовалась система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, состоящая из следующих компонентов:

- двухканальный насос Agilent 1290 Infinity, обеспечивающий давление до 1 200 бар (G4220A), модифицированный применением уплотнения из полиэфирэфиркетона (PEEK) в клапане байпаса растворителя (роторное уплотнение PEEK FL, кат. № 5068-0171);
- термостат колоночного отделения Agilent 1290 Infinity (G1316C);
- высокоэффективный автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A) с роторным уплотнением из PEEK (роторное уплотнение PEEK FL, кат. № 5068-0170);
- детектор на основе диодной матрицы Agilent 1260 Infinity (G4220A), оснащенный проточной кюветой объемом 1 мкл с длиной оптического пути 10 мм;
- программное обеспечение Agilent ChemStation версии C.1.05, используемое для управления прибором и обработки данных;
- колонка Agilent Poroshell HPH C18, 2,1 × 50 мм, 4 мкм (кат. № 699770-702).

Пробы содержали хинин, нортриптилин, амитриптилин, гексанофенон, ацетофенон, 4-хлоркоричную кислоту и 2-гидрокси-5-метил-бензальдегид и готовились с использованием смеси вода:ацетонитрил с соотношением 50:50 при концентрации 1 мг/мл. Использовались подвижные фазы, обычно применяемые в лабораторных условиях, такие как 0,1%-я трифторуксусная кислота (ТФУК) и буферный раствор гидрокарбоната аммония. Для приготовления буферного раствора гидрокарбонат аммония растворяли в воде для получения 10 мМ раствора и доводили его до нужного pH с помощью концентрированного основания (гидроксида аммония). Двухосновный и одноосновный фосфат натрия, использованные для получения буферных растворов, были приобретены в компании Sigma-Aldrich, Corp. Ацетонитрил производства Burdick and Jackson был приобретен у компании Honeywell, вода, очищенная с использованием системы Millipore, характеризовалась удельным сопротивлением 18 МОм·см.

УФ-детектирование осуществлялось при длине волны 254 нм с частотой 80 Гц.

Результаты и обсуждение

Тестирование устойчивости проводилось с использованием подвижных фаз с низким pH (0,1%-я трифторуксусная кислота) и высоким pH (10 мМ гидрокарбоната аммония, pH 10).

Устойчивость к 0,1%-я трифторуксусной кислоте

В первом эксперименте было выполнено 2 000 вводов проб в новую колонку. Пробу, содержащую хинин, фенол, нортриптилин, ацетофенон, 4-хлоркоричную кислоту и гексанофенон, вводили каждые четыре минуты. Проба содержала распространенные типы кислотных, основных и нейтральных соединений, которые встречаются практически во всех сложных пробах. Трифторуксусная кислота с концентрацией 0,1% является широко используемой в хроматографии подвижной фазой (pH ~ 2). Видно, что все пики характеризовались неизменными удерживаемыми объемами в течение всего эксперимента. Это подтверждает устойчивость колонки Poroshell HPH-C18 и ее пригодность для повседневных анализов при низких значениях pH (рис. 1). Прекрасная форма пиков сохранялась в течение всего эксперимента. Время анализа в методике составляло примерно семь минут на каждый ввод, что потребовало около 10 дней и примерно по 5 л ацетонитрила и водной подвижной фазы на весь эксперимент.

Устойчивость в 10 мМ гидрокарбоната аммония, pH 10

Второй эксперимент проводился с использованием 10 мМ гидрокарбоната аммония при pH 10 (рис. 2). Эта подвижная фаза широко используется для гибридных колонок, но обычно не применяется в стандартных колонках для ВЭЖХ на основе силикагеля. Она позволяет контролировать pH, поскольку имеет хорошую буферную емкость, и использовать масс-спектральное детектирование благодаря летучести буферного раствора. Сообщалось, что карбонатные буферные растворы повреждают силикагелевые колонки гораздо сильнее, чем глициновые и боратные буферные растворы [5]. Для испытаний срока службы колонки при высоких pH применялись те же вещества, что и для случая 0,1%-й трифторуксусной кислоты. Большое различие между этими двумя испытаниями состояло в порядке элюирования. Как показано на рис. 3, изменение pH подвижной фазы привело к изменению порядка элюирования аналитов, что свидетельствует о резком изменении селективности.

В этом эксперименте колонку Poroshell HPH-C18 оценивали с помощью градиентной методики с использованием в качестве компонентов подвижной фазы раствора гидрокарбоната аммония с pH 10 и ацетонитрила. Как можно видеть на рис. 2, время удерживания всех соединений оставалось стабильным в течение анализа всех 2 000 проб, за исключением нортриптилина. Похожие результаты были получены ранее с еще худшим сдвигом пика нортриптилина на колонках других производителей [6].

А: 0,1%-я ТФУК в воде
 В — Ацетонитрил
 25 °С, 0,4 мл/мин, колонка 2,1 × 50 мм
 УФ-детектирование при 220 нм с шириной полосы 4 нм (опорн. выкл.)
 Agilent 1290 Infinity, роторные уплотнения РЕЕК

Время	% В
0,0	5
5,0	95
5,1	5
7,0	5

1. 2-гидрокси-5-метил-бензальдегид
2. 4 Хлоркоричная кислота
3. Ацетофенон
4. Хинина сульфат
5. Нортриптилин
6. Амитриптилин
7. Гексанофенон

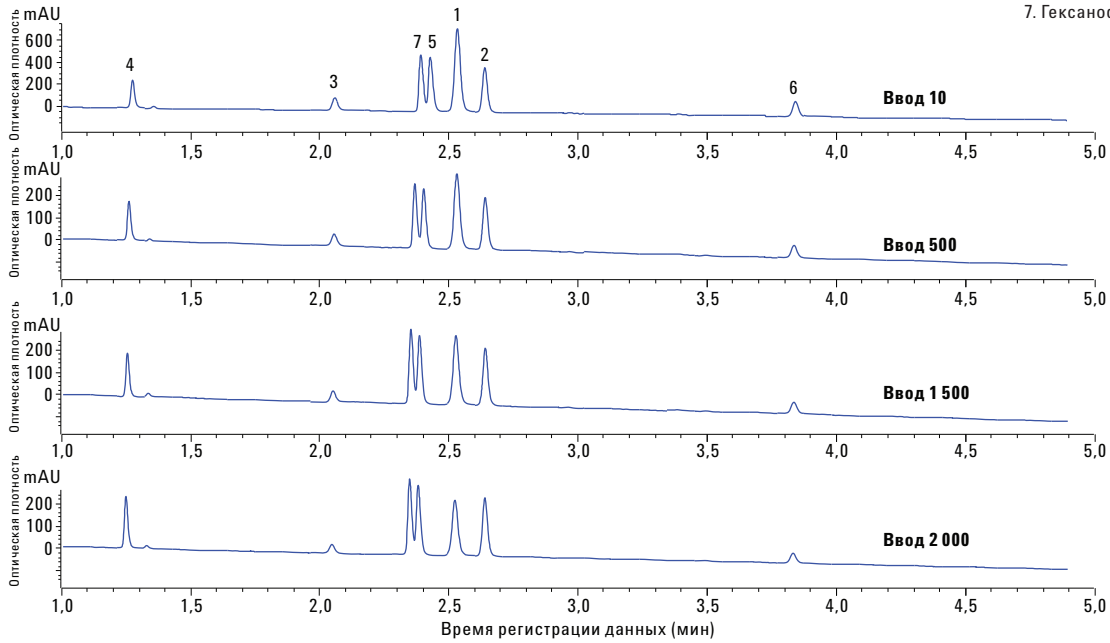


Рис. 1. Срок службы колонки Agilent Poroshell HPH C18 в распространенной кислотной подвижной фазе (0,1%-я трифторуксунная кислота), 2 000 вводов проб

А: Гидрокарбонат аммония 10 мМ, рН 10
 В — Ацетонитрил
 25 °С, 0,4 мл/мин, колонка 2,1 × 50 мм
 УФ-детектирование при 220 нм с шириной полосы 4 нм (опорн. выкл.)
 Agilent 1290 Infinity, роторные уплотнения РЕЕК

Время	% В
0,0	5
5,0	95
5,1	5
7,0	5

1. 2-гидрокси-5-метил-бензальдегид
2. 4 Хлоркоричная кислота
3. Ацетофенон
4. Хинина сульфат
5. Нортриптилин
6. Амитриптилин
7. Гексанофенон

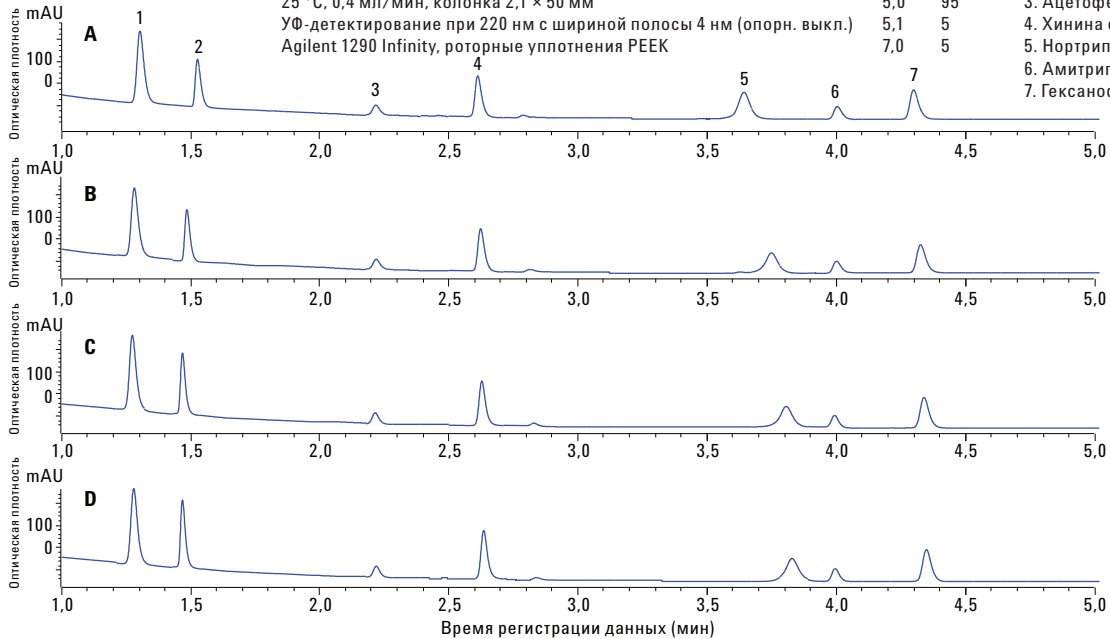


Рис. 2. Срок службы колонки Agilent Poroshell HPH C18 в основной подвижной фазе (10 мМ гидрокарбоната аммония, рН 10), 2 000 вводов проб

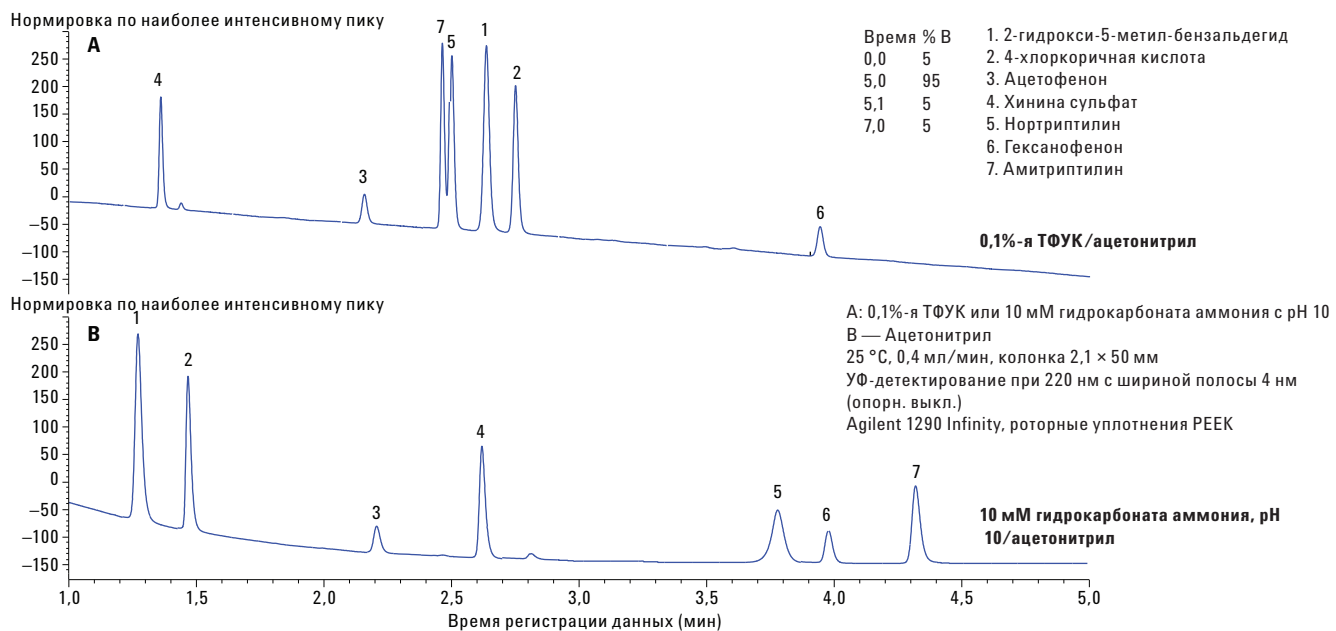


Рис. 3. Колонки Agilent Poroshell HPH C18 можно использовать как при низком рН с 0,1%-й трифторуксусной кислотой, так и при высоком рН с 10 мМ гидрокарбоната аммония (рН 10) для получения значительно отличающейся селективности

Выводы


В то время как подвижные фазы с высоким pH, например буферный раствор гидрокарбоната аммония, могут разрушать обычные силикагелевые колонки для ВЭЖХ, колонка Agilent Poroshell HPH-C18 прекрасно работает с такими подвижными фазами. Трифторуксусная кислота также может разрушать колонки для ВЭЖХ, вымывая привитую фазу посредством гидролиза. Технология колонок Agilent Poroshell HPH-C18 позволяет исследователям использовать совместные преимущества гибридных частиц и поверхностно-пористых частиц сорбента. Частицы Poroshell HPH обеспечивают высокие рабочие характеристики, высокую эффективность и низкое обратное давление благодаря применению поверхностно-пористых частиц, которые используются и в других сорбентах семейства Poroshell 120. Колонка Poroshell HPH обеспечивает не только преимущества, предоставляемые поверхностно-пористыми частицами, но также химическую устойчивость в условиях высоких значений pH подвижной фазы.

Литература

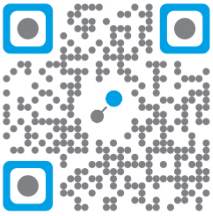
1. Киркланд Дж. Дж. (Kirkland, J. J.), Хендерсон Дж. В. (Henderson, J. W.), ДеСтефано Дж. Дж. (DeStefano, J. J.), ван Стратен М. А. (M. A. van Straten), Классен Х. А. (Claessens, H. A.). Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography (Устойчивость колонок на основе силикагеля с блокированием концевых групп для обращенно-фазовой ВЭЖХ при использовании подвижных фаз с pH 7 и 11). *J. Chromatogr. A* **1997**, 762, 97–112.
2. Киркланд Дж. Дж. (Kirkland, J. J.), ван Стратен М. А. (M. A. van Straten), Классен Х. А. (Claessens, H. A.). High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns (Влияние подвижных фаз с высоким pH на колонки на основе силикагеля для обращенно-фазовой ВЭЖХ). *J. Chromatogr. A* **1995**, 691, 3–19.
3. Киркланд Дж. Дж. (Kirkland, J. J.), Дж. Б. Адамс-мл. (J. B. Adams Jr.), ван Стратен М. А. (M. A. van Straten), Классен Х. А. (Claessens, H. A.). Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (Бидентантные силановые неподвижные фазы для обращенно-фазовой ВЭЖХ). *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4344–4352.
4. С. Е. (C. Ye), Г. Терфлот (G. Terfloth), Ю. Ли (Y. Li), А. Корд (A. Kord). A systematic stability evaluation of analytical RP-HPLC columns (Систематическая оценка устойчивости аналитических колонок для обращенно-фазовой ВЭЖХ). *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, 50, 426–431.
5. Классен Х. А. (Claessens, H. A.), ван Стратен М. А. (M. A. van Straten), Киркланд Дж. Дж. (Kirkland, J. J.). Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography (Влияние буферных растворов на устойчивость колонок на основе силикагеля в обращенно-фазовой ВЭЖХ). *J. Chromatogr. A* **1996**, 728, 259–270.
6. В. Дж. Лун (W. J. Long). *Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH stable Poroshell HPH chemistries (Продление срока службы колонок в методиках анализа фармацевтических веществ с помощью устойчивых к высокому pH неподвижных фаз Poroshell HPH)*; Agilent Technologies, номер внутренней публикации 5991-5022EN, **2014**.

Дополнительная информация

Представленные данные отражают типичные результаты. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: www.agilent.com/chem.




KAMPI LAB
Agilent Technologies
Authorized Distributor



<http://campilab.by>

ООО "КАМПИЛАБ"



www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США
15 декабря 2015 г.
5991-6525RU