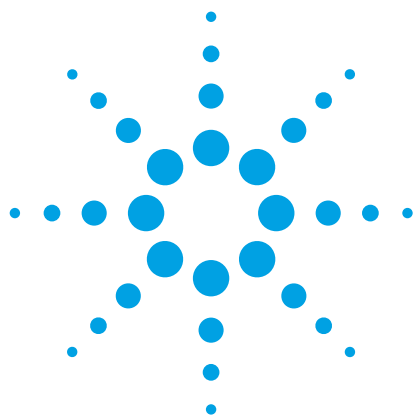




Stabilität einer Agilent Poroshell HPH C18-Säule bei niedrigem und hohem pH-Wert

Application Note

Autor

William Long
Agilent Technologies, Inc.

Einführung

Die Stabilität einer HPLC-Säule ist eine der wichtigsten Eigenschaften, die den Erfolg einer Methode bestimmen. Während der Entwicklung eines RP-LC-Analyseprotokolls, und in der Annahme, dass es validiert wird, bedenken Chromatographenanwender üblicherweise verschiedene Punkte. Einer der wichtigsten Punkte ist die Frage, wie lange die Säule unter bestimmten Analysebedingungen einsetzbar sein wird. Silica hat viele Eigenschaften, durch die es als Trägermaterial für Reversed-Phase-HPLC-Säulen hervorragend geeignet ist. Die Löslichkeit von Silica steigt jedoch erheblich, wenn die mobile Phase pH-Werte von 7-8 und darüber erreicht. In einer von Rockland Technologies durchgeführten Untersuchung der Stabilität von HPLC-Säulen auf Silicabasis bei hohen pH-Werten wurden verschiedene wichtige Erkenntnisse erlangt: Endcapping schützt das Silica vor Auflösung, fest gebundene Phasen erhöhen die Säulenstabilität und organische Puffer in der mobilen Phase führen zu einer deutlich längeren Lebensdauer der Säule als Phosphatpuffer bei ähnlichem pH-Wert. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zersetzung der gebundenen Phase des Packungsmaterials bei pH 9-10 hauptsächlich auf die Auflösung des Trägermaterials Silica zurückzuführen und nicht in erster Linie das Ergebnis einer Hydrolyse von kovalenten Siloxanbindungen war. Die chemische und thermische Stabilität von RP-Säulen kann durch die Verbesserung und Entwicklung von Substraten und Bindungsschemie grundsätzlich noch gesteigert werden [1-4].

Im Allgemeinen wird empfohlen, dass die Methodenentwicklung für die Reversed-Phase-Chromatographie mit mobilen Phasen mit niedrigem pH-Wert beginnt, unabhängig davon, ob die Analyten sauer, neutral oder basisch sind. Für das Befolgen dieser Faustregel gibt es mehrere gute Gründe. Bei niedrigem pH-Wert sind saure Analyten neutral und werden gut zurückgehalten. Die Restsilanolgruppen der Silicaoberfläche des Packungsmaterials sind protoniert. Daher treten weniger sekundäre Wechselwirkungen zwischen sauren und basischen Analyten und der Silicaoberfläche auf. Leider werden aber basische Substanzen, die bei niedrigem pH-Wert eine positive Ladung tragen, häufig schlecht retiniert oder weisen unter diesen Bedingungen eine schlechte Peakform auf. Ein weiterer Grund für die Verwendung eines niedrigen pH-Wertes besteht in der schlechten Stabilität von Silicasäulen bei hohen pH-Werten.



Agilent Technologies

Wie zuvor berichtet, wurden bisher zwei Ansätze verfolgt, um Stabilität von Silica-HPLC-Säulen bei hohem pH-Wert zu erreichen. Ein Weg zur Verbesserung der Stabilität ist die Anwendung spezieller Bindungsarten wie bei der Agilent ZORBAX Extend C18-Säule [3]. ZORBAX Extend C18-Säulen verwenden eine zweizählige Bindung, um das Silica vor der Auflösung bei hohen pH-Werten zu schützen. Ein anderer Weg, um die Stabilität bei hohem pH-Wert zu erreichen, besteht darin, das Silica selbst zu modifizieren, um es weniger löslich zu machen. Dieser Ansatz wird bei Poroshell-Säulen verfolgt: Die 2,7-µm- und jetzt auch die 4-µm-Partikel sind organisch modifiziert und daher gegenüber Angriffen bei hohen pH-Werten weniger empfindlich.

In dieser Arbeit wird die Lebensdauer einer Agilent Poroshell HPH C18-Säule mit einer typischen mobilen Phase mit niedrigem pH-Wert (0,1 % TFA) und mit einer mobilen Phase mit hohem pH-Wert (10 mM Ammoniumbicarbonat, pH 10) bei einer Gradientenanalyse mit Acetonitril evaluiert.

Material und Methoden

Es wurde ein Agilent 1290 Infinity System verwendet, das aus folgenden Komponenten bestand:

- Agilent 1290 Infinity Binäre Pumpe, kann bis zu 1 200 bar liefern (G4220A), modifiziert mit PEEK-Dichtung im Lösemittel-Bypass-Ventil (Rotordichtung, PEEK FL, Best.-Nr. 5068-0171)
- Agilent 1290 Infinity Säulenofen (TCC) (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity Hochleistungsprobengeber (G4226A) mit PEEK-Rotordichtung (Rotordichtung, PEEK FL, Best.-Nr. 5068-0170)
- Agilent 1260 Infinity Diodenarray-Detektor (DAD) (G4220A) mit 10 mm Schichtdicke und 1-µl-Durchflussszelle
- Agilent OpenLAB, Version C.1.05, wurde zur Steuerung der HPLC und zur Verarbeitung der Daten verwendet
- Agilent Poroshell HPH C18, 2,1 × 50 mm, 4 µm (Best.-Nr. 699770-702)

Die Proben enthielten Chinin, Nortryptilin, Amitriptylin, Hexanophenon, Acetophenon, 4-Chlorzimtsäure und 2-Hydroxy-5-methyl-benzaldehyd. Sie wurden in Wasser/Acetonitril (50:50) mit Konzentrationen von 1 mg/ml hergestellt. Es wurden übliche mobile Phasen verwendet, wie z. B. 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und Ammoniumbicarbonatpuffer. Der Puffer wurde folgendermaßen hergestellt: Ammoniumbicarbonat wurde in Wasser gelöst, sodass eine 10 mM-Lösung erhalten wurde. Danach wurde der gewünschte pH-Wert der Lösung mit konzentrierter Base (Ammoniumhydroxid) eingestellt. Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat zur Herstellung von Pufferlösungen wurden von Sigma-Aldrich, Corp. gekauft. Das Acetonitril stammte von Burdick and Jackson und wurde von Honeywell gekauft. Das Wasser stammte aus einer Millipore-Anlage (18 MΩ).

Der UV-Detektor war auf 254 nm, 80 Hz, eingestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Stabilitätstests wurden mit einer mobilen Phase mit niedrigem pH-Wert (0,1 % TFA) und mit einer mobilen Phase mit hohem pH-Wert (10 mM Ammoniumbicarbonat, pH 10) durchgeführt.

Stabilität in 0,1%iger TFA

Im ersten Experiment wurden an einer neuen Säule 2000 Injektionen durchgeführt. Eine Probe, die Chinin, Phenol, Nortryptilin, Acetophenon, 4-Chlorzimtsäure und Hexanophenon enthielt, wurde alle vier Minuten injiziert. Die Probe enthielt die typischen sauren, basischen und neutralen Verbindungsarten, die man in fast allen schwierigen Proben findet. 0,1%ige TFA ist eine in der Chromatographie üblicherweise verwendete mobile Phase (pH ~2). Man kann sehen, dass alle Substanzen über das gesamte Experiment hinweg mit dem gleichen Elutionsvolumen eluieren. Dies zeigt, dass die Poroshell HPH C18-Säule stabil war und für Routineanalysen bei niedrigen pH-Werten verwendet werden kann (Abbildung 1). Die Peakform blieb über den gesamten Test hinweg hervorragend. Die Analysendauer der Methode betrug ungefähr sieben Minuten pro Injektion. Es waren für die Durchführung also ungefähr 10 Tage und jeweils ungefähr 5 l Acetonitril und wässrige mobile Phase erforderlich.

Stabilität in 10 mM Ammoniumbicarbonat, pH 10

Ein zweites Experiment wurde mit 10 mM Ammoniumbicarbonat bei pH 10 durchgeführt (Abbildung 2). Diese mobile Phase wird üblicherweise mit Hybridsäulen verwendet, nicht aber mit Standard-Silica-HPLC-Säulen. Diese mobile Phase unterstützt die Steuerung des pH-Wertes, da sie eine gute Pufferkapazität hat, und ermöglicht die Detektion mittels MS, da der Puffer flüchtig ist. Es wurde berichtet, dass Carbonatpuffer Silica-Säulen sehr viel stärker beschädigen als beispielsweise Glycin- und Borat-Puffer [5]. Die gleichen Materialien, die für die 0,1 %-TFA-Tests verwendet wurden, wurden als Proben für die Lebensdauer bei einem hohen pH-Wert verwendet. Ein großer Unterschied zwischen diesen beiden Tests war die Elutionsreihenfolge. Wie in Abbildung 3 gezeigt, ändert der veränderte pH-Wert der mobilen Phase die Elutionsreihenfolge der Analyten. Dies weist auf eine starke Veränderung der Selektivität hin.

In diesem Experiment wurde eine Poroshell HPH C18-Säule mit Gradientenmethode unter Verwendung von Ammoniumbicarbonat und Acetonitril bei pH 10 evaluiert. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, blieb die Retentionszeit aller Verbindungen über die 2000 Injektionen hinweg stabil, mit Ausnahme von Nortryptilin. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits berichtet, wobei auf Säulen anderer Hersteller eine größere Verschiebung des Nortryptilin-Peaks auftrat [6].

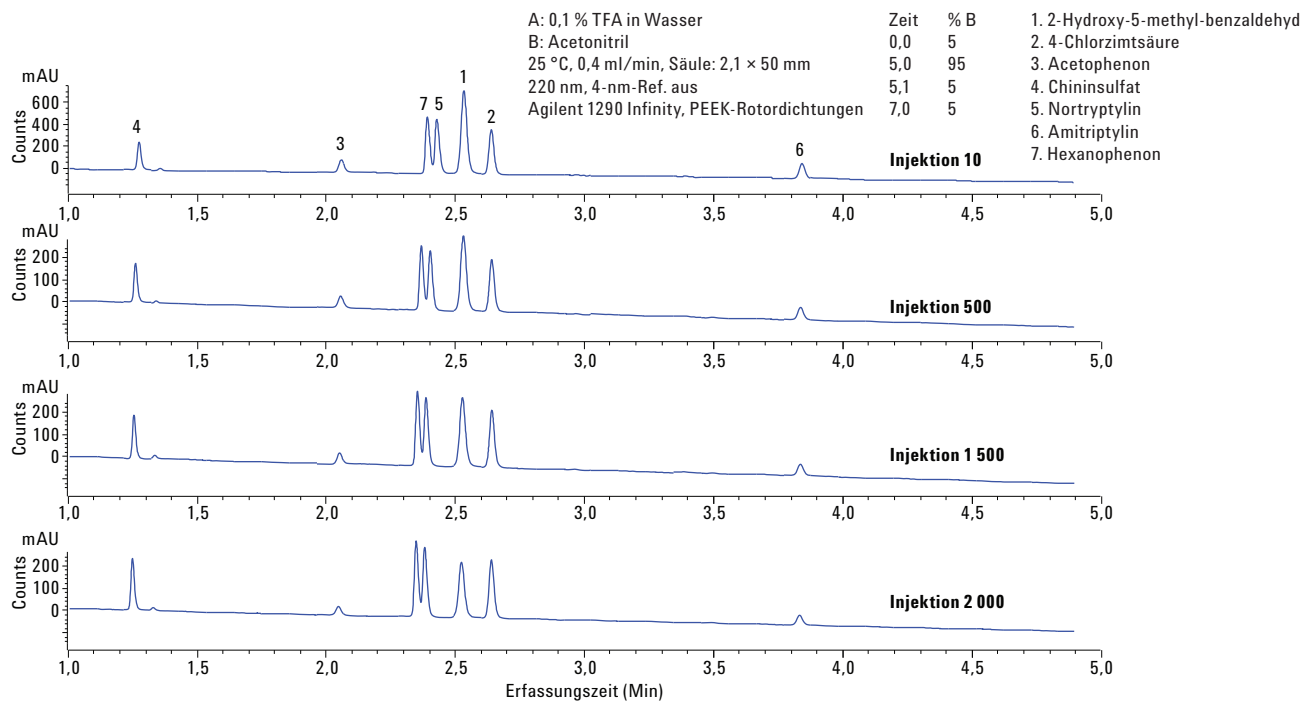


Abbildung 1: Lebensdauer einer Agilent Poroshell HPH C18-Säule mit einer üblichen sauren mobilen Phase, 2000 Injektionen, 0,1 % TFA.

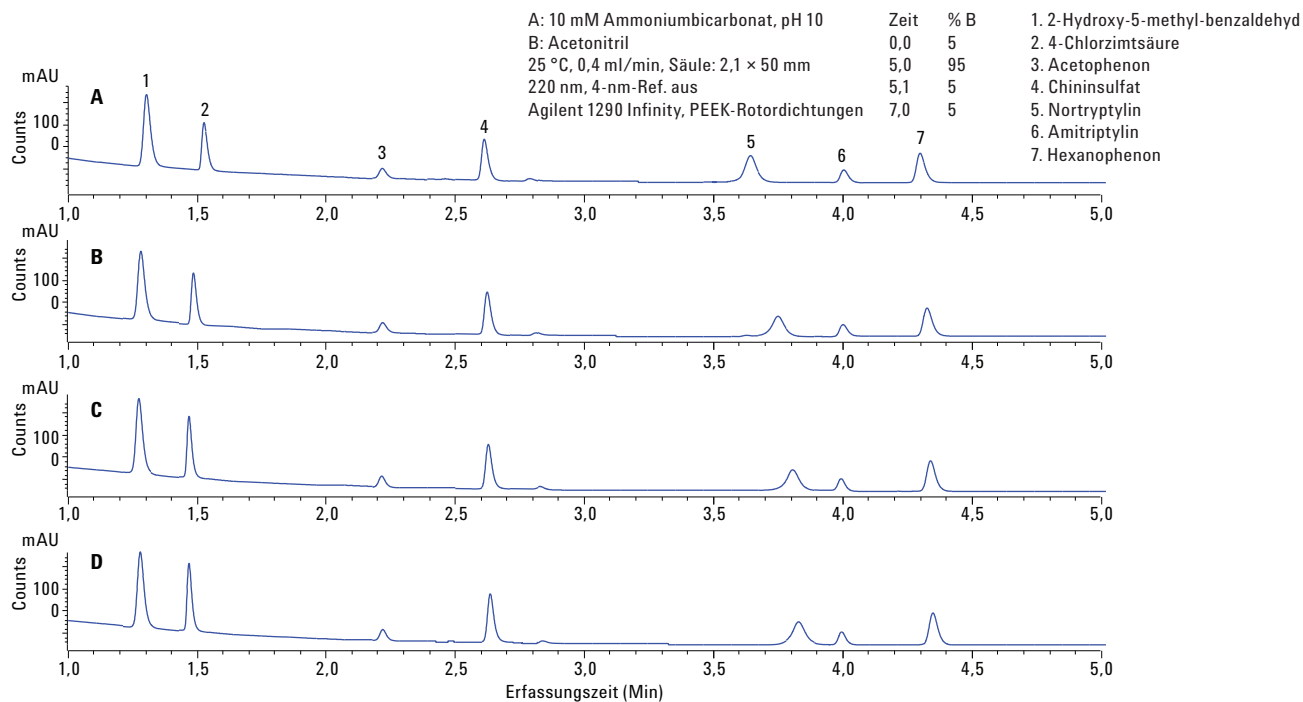


Abbildung 2: Lebensdauer einer Agilent Poroshell HPH C18-Säule mit einer basischen mobilen Phase, 2000 Injektionen, 10 mM Ammoniumbicarbonat, pH 10.

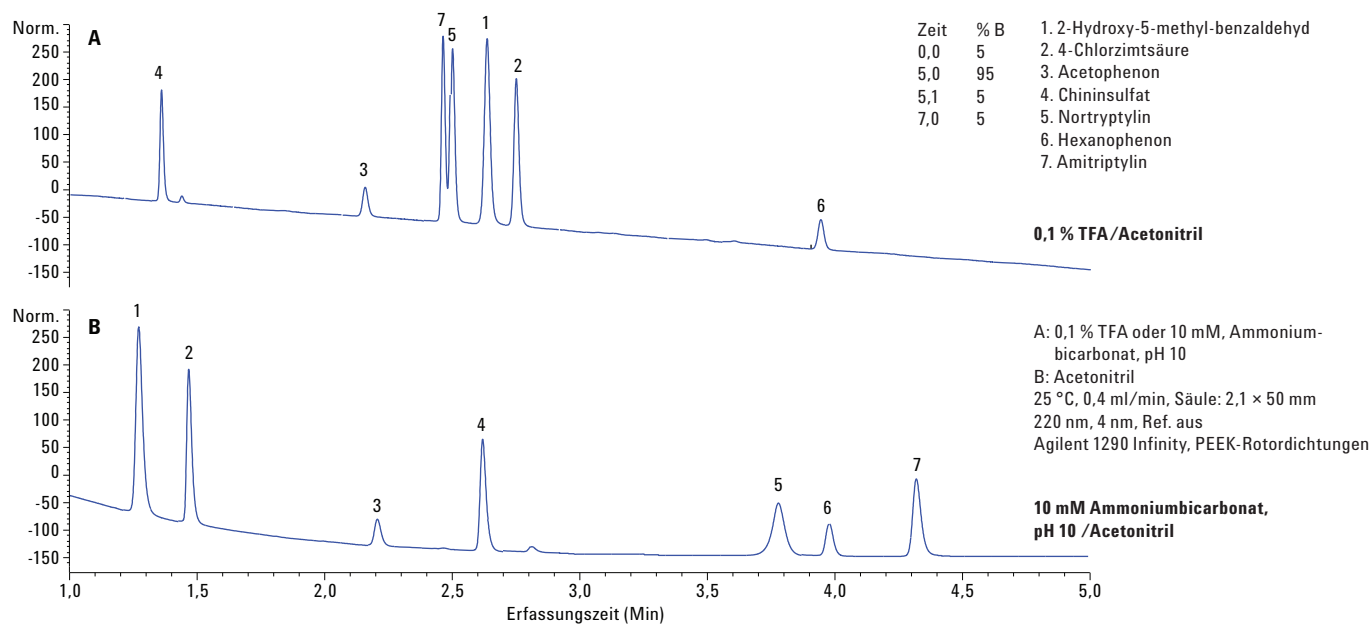


Abbildung 3: Agilent Poroshell HPH C18-Säulen können bei niedrigem pH-Wert mit 0,1 % TFA oder bei hohem pH-Wert mit 10 mM Ammoniumbicarbonat, pH 10, verwendet werden, um äußerst unterschiedliche Selektivitäten zu erzielen.

Schlussfolgerungen

Während mobile Phasen mit erhöhtem pH-Wert, wie z. B. Ammoniumbicarbonatpuffer, herkömmliche Silica-HPLC-Säulen beschädigen können, zeigte die Agilent Poroshell HPH C18-Säule mit dieser mobilen Phase eine hervorragende Leistung. TFA hat ebenfalls das Potenzial, HPLC-Säulen zu beschädigen, indem die Säure die gebundene Phase hydrolysiert. Diese Säulentechnologie ermöglicht es Forschern, die Möglichkeiten von Hybridpartikeln zusammen mit einer porösen Partikeloberfläche zu nutzen. Poroshell HPH-Partikel behalten die hohe Leistungsfähigkeit mit der hohen Effizienz und dem geringen Rückdruck der porösen Partikeloberfläche, wie sie in anderen Poroshell 120-Phasen verwendet wird, bei. Die Poroshell HPH-Säule bietet nicht nur die Vorteile einer porösen Partikeloberfläche, sondern auch chemische Stabilität bei mobilen Phasen mit hohem pH-Wert.

Literatur

1. J. J. Kirkland; J. W. Henderson; J. J. DeStefano; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, 762, 97-112.
2. J. J. Kirkland; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **1995**, 691, 3-19.
3. J. J. Kirkland; J. B. Adams Jr.; M. A. van Straten; H. A. Claessens. Bidentate Silane Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4344-4352.
4. C. Ye; G. Terfloth; Y. Li, A. Kord. A systematic stability evaluation of analytical RP-HPLC columns. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2009**, 50, 426-431.
5. H. A. Claessens; M. A. van Straten; J. J. Kirkland. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **1996**, 728, 259-270.
6. W. J. Long. *Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH stable Poroshell HPH chemistries*; Agilent Technologies, Inc. Publikationsnummer 5991-5022EN, **2014**.

Weitere Informationen

Diese Daten stellen typische Ergebnisse dar. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Gedruckt in den USA,
15. Dezember 2015
5991-6525DEE



Agilent Technologies