Agilent Poroshell HPH C18의 저/고 pH 안정성

응용 자료

저자

William Long

Agilent Technologies, Inc.

소개

HPLC 컬럼의 안정성은 분석법의 성패를 결정하는 중요한 요인 중 하나입니다. 크로마토그래피 전문가들은 RPLC 분석 프로토콜을 개발하고 그 검증 결과를 예상하면서 대개 여러 가지 문제를 고려합니다. 그 중 중요한 것 하나는 컬럼이 특정한 분석 조건 하에서 얼마나 오래 견디느냐 입니다. 실리카는 역상 HPLC 컬럼의 서포트로서 훌륭한 역할을 하기에 좋은 특성을 많이 가지고 있습니다. 그러나, 이동상이 pH 7-8 이상에 도달하면 용해도가 크게 증가합니다. Rockland Technologies의 고 pH 실리카 HPLC 컬럼 안정성에 대한 연구에서 중요한 사실이 다수 확인되었습니다. 엔드 캡핑은 실리카의 용해를 보호하고, 조밀하게 결합된 상이 컬럼 안정성을 증가시켰으며, 유사한 pH에서 유기 이동상 완충액은 인산염 완충액보다 컬럼 수명이 상당히 길었습니다. 여러 연구 결과 pH 9-10에서 결합상 패킹의 기능 저하는 주로 실리카 서포트 용해로 인해 발생했으며 기본적으로 공유 실록산 결합의 가수분해로 인한 것이 아님이 밝혀졌습니다. 원칙적으로, RP 컬럼의 화학 및 열 안정성은 기질과 결합 화학의 개선과 발전으로 개선할 수 있습니다[1-4].

일반적으로 분석물질이 산성이든 중성이든 염기성이든 역상 분석법 개발은 저 pH 이동상으로 시작하는 것이 좋습니다. 몇 가지 타당한 이유로 다음 지침을 따라야 합니다. 우선 저 pH에서 산성 분석물질은 중성이며 잘 유지됩니다. 패킹의 실리카 표면에 있는 잔류 실라놀은 양성자화됩니다. 따라서 산성과 염기성 분석물 및 실리카 표면 사이에 2차 상호작용이 거의 없습니다. 안타깝게도 저 pH에서 양전하를 운반하는 염기 화합물은 대개 오래 유지되지 않거나 이 같은 조건에서 피크 모양이 양호하지 않습니다. 저 pH 사용의 추가적인 이유는 고 pH에서 실리카 컬럼의 안정성이 낮다는 것입니다.

Agilent Technologies

앞서 보고한대로, 실리카 HPLC 컬럼에서 고 pH 안정성을 달성하는 방법으로 두 가지가 사용됐습니다. 그 중 한 가지는 Agilent ZORBAX Extend C18 컬럼에서와 동일하게 특수 결합을 이용하는 것입니다[3]. ZORBAX Extend C18은 이좌 결합을 사용하여 고 pH에서 실리카의 용해를 방지합니다. 고 pH 안정성을 달성하는 또 다른 방법은 실리카 그 자체를 변화시켜 용해도를 낮추는 것입니다. 이 접근 방법을 사용하여, 2.7-µm와 4-µm Poroshell 미립자를 유기적으로 변형한 후 고 pH의 공격에 견디도록 만듭니다.

이 연구에서는 아세토니트릴과 그레디언트 분석법을 이용하여 일반적인 저 pH 이동상(0.1 % TFA) 및 고 pH 이동상(pH 10에서 10 mM 중탄산 암모늄)으로 Agilent Poroshell HPH C18의 수명을 평가합니다.

재료 및 방법

Agilent 1290 Infinity 시스템이 사용되었으며, 다음과 같이 구성됩니다:

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프, 최대 1,200bar 제공 가능(G4220A), 용매 우회 밸브에 PEEK Seal을 이용해 개조(Rotor Seal PEEK FL p/n 5068-0171)
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치(TCC)(G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 고성능 자동시료주입기 (Autosampler)(G4226A), PEEK Rotor Seal 포함 (5068-0170 Rotor Seal PEEK FL)
- Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기 (DAD)(G4220A), 10-mm 경로 길이, 1-µL 흐름 셀 장착
- Agilent OpenLAB 버전 C0.05를 사용해 HPLC를 제어하고 데이터를 처리함
- Agilent Poroshell HPH C18, 2.1 × 50mm, 4µm (p/n 699770-702)

시료는 퀴닌(quinine), 노르트립틸린(nortriptyline), 아미트립틸린(amitriptyline), 헥사노페논(hexanophenone), 아세토페논(acetophenone), 4-클롤로신남산(4-chlorocinnamic acid), 2-하이드록시-5-메틸-벤즈알데하이드(2 hydroxy-5-methyl-benzaldehyde) 등이었으며 물/아세토니트릴(50/50)로 1mg/mL를 준비했습니다. 0.1% trifloracetic acid(TFA) 및 중탄산암모늄 완충액과 같이 실험실에서 일반적으로 사용되는 이동상을 사용했습니다. 완충액은 농축 염기(수산화암모늄)를 이용해 원하는 pH로 조정하기 전에 물에 중탄산 암모늄을 용해해서 10 mM 용액을 생성하여 준비했습니다. 완충액을 만들기 위해 사용된 인산염 나트륨 이염기와 인산염 나트륨 일염기는 Sigma Aldrich사에서, 아세토니트릴은 Honeywell사에서 구입한 Burdick & Jackson이었으며, 물은 Millipore 18 MΩ이었습니다.

UV 검출기는 254nm, 80Hz에서 작동했습니다.

결과 및 토의

저 pH 이동상(0.1% TFA)과 고 pH 이동상(10 mM 중탄산 암모늄, pH 10)을 이용해 안정성 검사를 실시했습니다.

0.1% TFA에서의 안정성

첫 실험에서 새로운 컬럼에 2,000회 주입했습니다. 퀴닌(quinine), 페놀(phenol), 노르트립틸린(nortriptyline), 아세토페논(acetophenone), 4-클로로신남산(4-chlorocinnamic acid) 및 헥사노페논(hexanophenone)을 포함하고 있는 시료를 4분마다 주입했습니다. 시료는 거의 모든 난해한 시료에서 발견되는 일반적인 산, 염기 및 중성 화합물 종류를 포함하고 있었습니다. 0.1%의 TFA가 일반적으로 사용되는 크로마토그래피 이동상입니다(pH ~2). 실험 전체에 동일한 용리 부피에서 피크가 모두 유지되었음을 확인할 수 있습니다. 이는 Poroshell HPH-C18 컬럼이 저 pH에서 안정적이고 유용했다는 것을 의미합니다(그림 1). 피크 모양은 시험 내내 아주 양호하게 유지되었습니다. 분석법의 실행 시간은 주입 당 약 7분이었으며, 약 10일이 걸렸고, 아세토니트릴과 액체 이동상이 각각 약 5L씩 필요했습니다.

pH 10의 10mM 중탄산 암모늄에서의 안정성

두 번째 실험은 pH 10에서 10mM 중탄산 암모늄을 이용해 실시했습니다(그림 2). 이 중탄산 암모늄은 하이브리드 컬럼에 일반적으로 사용되지만, 표준 실리카 HPLC 컬럼에는 거의 사용되지 않습니다. 이 이동상은 적절한 버퍼링 용량을 가지기 때문에 pH를 조정하는데 도움이 되며, 완충액이 휘발성이므로 MS 검출을 사용할 수 있습니다. 탄산염 완충액은 글리신 및 붕산염과 같은 완충액보다 실리카 컬럼을 훨씬 더 손상시키는 것으로 보고되었습니다[5]. 0.1% TFA 시험에 사용된 것과 동일한 물질을 고 pH에서 수명 시험 시료로 사용했습니다. 이 두 시험의 두드러진 차이는 용리 차수였습니다. 그림 3과 같이, 이동상의 pH를 변경했을 때 분석물질의 용리 차수가 변화되었으며, 이는 선택성의 큰 변화를 의미합니다.

이 실험에서는 pH 10에서 중탄산 암모늄과 아세토니트릴을 이용해 그레디언트 분석법으로 Poroshell HPH-C18 컬럼을 평가했습니다. 그림 2에서 보이는 바와 같이, 노르트립틸린을 제외하고 모든 화합물의 머무름 시간은 2,000회의 주입 실행 동안에 안정적으로 유지되었습니다. 이전에 다른 공급업체의 컬럼에서 노르트립틸린의 피크 전환이 나쁘게 나타나는 것과 유사한 결과가 보고되었습니다[6].

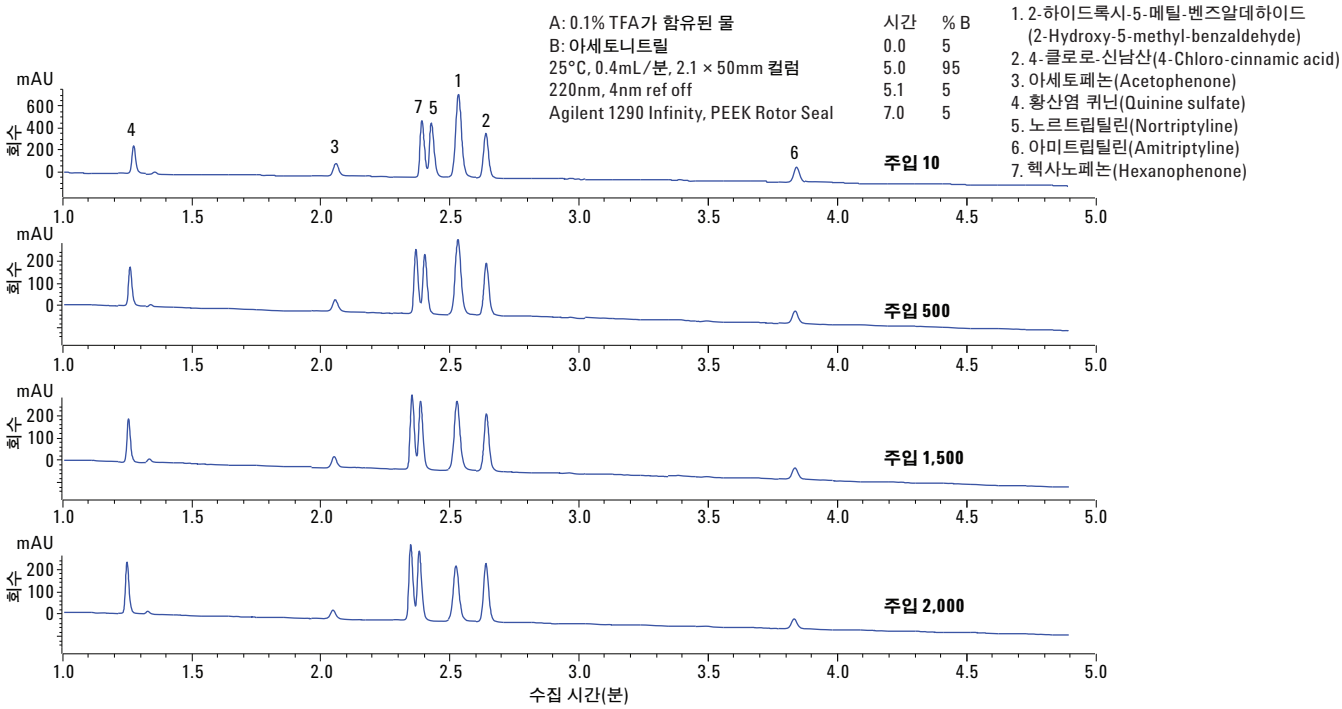

그림 1. 일반적인 산성 이동상, 2,000 주입. 0.1% TFA에서 Agilent Poroshell HPH C18 수명

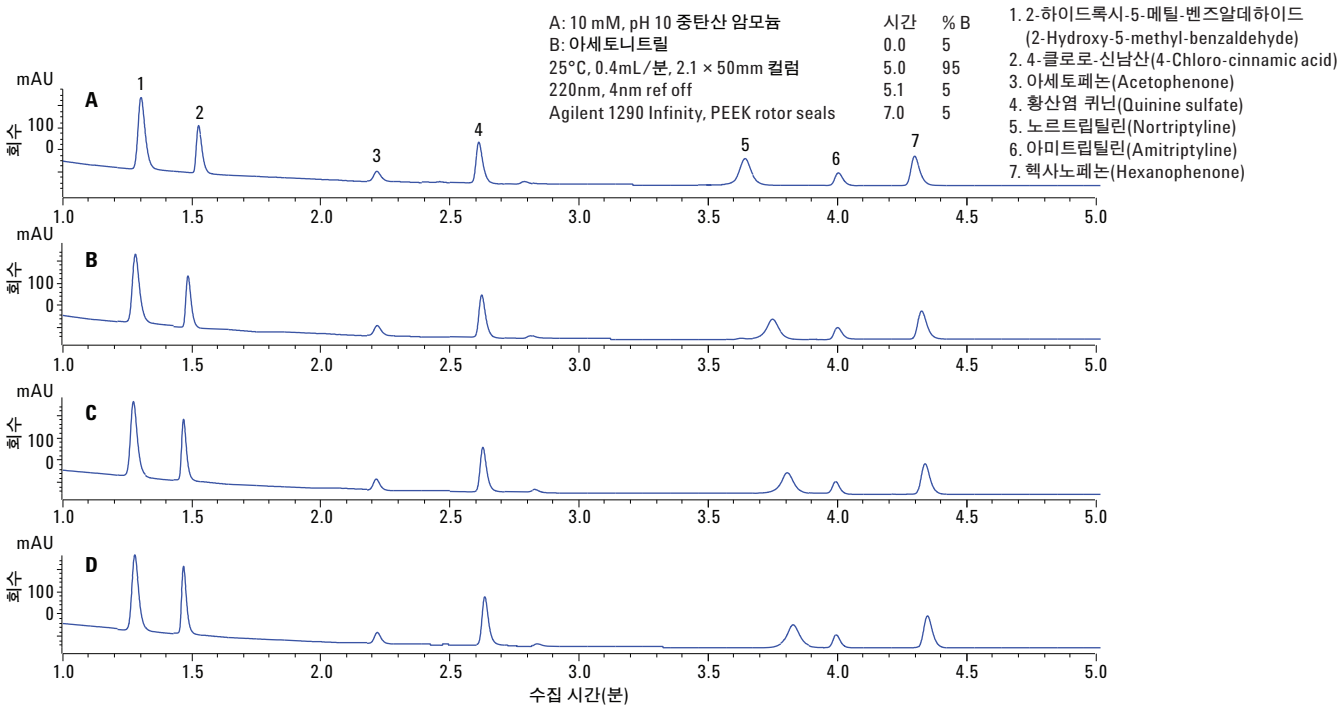

그림 2. 염기성 이동상, 2,000 주입. 10 mM 중탄산 암모늄 pH에서 Agilent Poroshell HPH C18의 수명

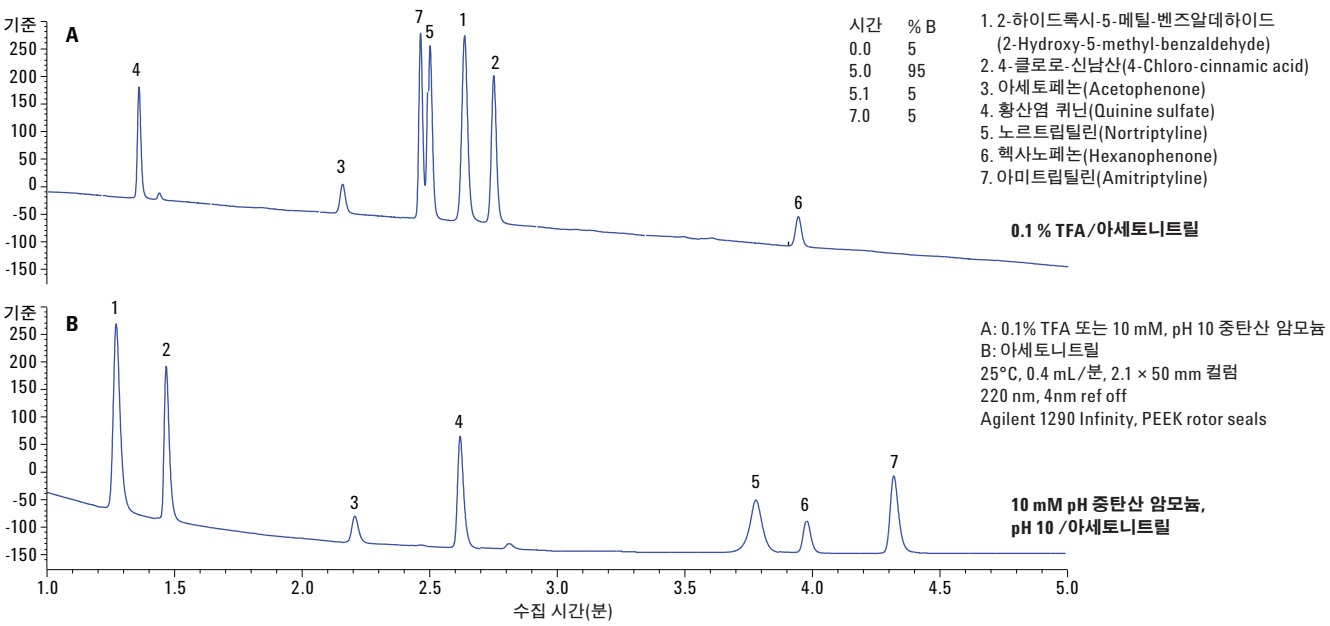

그림 3. Agilent Poroshell HPH C18은 0.1% TFA에서 저 pH로 또는 10mM 중탄산 암모늄 pH 10에서 고 pH로 사용해 매우 다른 선택성을 확보할 수 있습니다

결론

중탄산 암모늄 완충액과 같은 높은 pH의 이동상은 기존 실리카 HPLC 컬럼의 기능을 떨어뜨리지만, Agilent Poroshell HPH-C18 컬럼은 이 이동상에서 원활하게 작동했습니다. 또한 TFA는 결합상을 가수분해로 제거하여 HPLC 컬럼의 기능을 저해할 가능성이 있습니다. 연구원은 이러한 컬럼 기술을 이용해 표면 다공성 미립자와 함께 하이브리드 미립자의 특성을 사용할 수 있습니다. Poroshell HPH 미립자는 다른 Poroshell 120 상에 그랬듯 높은 효율성 및 표면 다공성 미립자의 낮은 역압(backpressure)을 통해 높은 성능을 유지했습니다. Poroshell HPH 컬럼은 표면 다공성 미립자의 이점을 유지할 뿐만 아니라 고 pH 이동상 조건에서도 화학적 안정성을 제공합니다.

참조 문헌

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 (역상 고성능 액체 크로마토그래피에 대해 pH 7 및 11 이동상을 이용한 실리카 기반 엔드캡핑된 컬럼의 안정성). *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(역상 고성능 액체 크로마토그래피에 대해 pH 7 및 11 이동상을 이용한 실리카 기반 엔드캡핑된 컬럼의 안정성). *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 Liq uid Chromatography(역상 고성능 액체 크로마토그래피를 위한 이좌 시레인 고정상). *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4344-4352.
4. C. Ye; G. Terfloth; Y. Li, A. Kord. A systematic stability evaluation of analytical RP-HPLC columns(분석 RP-HPLC 컬럼의 체계적 안정성 평가). *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 (역상 고성능 액체 크로마토그래피에서 실리카 기반 컬럼 안정성에 대한 완충액의 효과). *J. Chromatogr. A*. **1996**, *728*, 259-270.
6. W. J. Long. *Extending Column Lifetimein Pharmaceutical Methods with Hig pH stable Poroshell HPH chemistries (고 pH 안정적 Poroshell HPH 화학적 특성을 이용한 의약품 분석법에서 컬럼 수명의 연장)*; Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-5022EN, **2014**.

추가 정보

상기 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품 및 서비스에 대한 더 자세한 정보는 웹 사이트 www.agilent.com/chem에서 확인하실 수 있습니다

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과
관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 예고 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
한국에서 발행
2015년 12월 15일
5991-6525KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies