

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱改善碱性分析物的峰形

与使用甲酸流动相的传统 C18 色谱柱相比，可提高 LC/MS 灵敏度

作者

Anne Mack

安捷伦科技有限公司

摘要

本研究使用甲酸和乙腈梯度对 6 种碱性药物化合物进行了分离。比较了两种表面多孔颗粒填料 C18 色谱柱：表面带电荷的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 和传统的 C18 键合相色谱柱。使用简单的甲酸流动相时，这些碱性分析物在带电荷表面色谱柱上获得的峰形优于传统 C18 柱。尽管使用更复杂的缓冲液流动相可以提高传统 C18 色谱柱的性能，但由于缓冲盐的离子抑制作用，会降低 LC/MS 灵敏度。

前言

表面多孔颗粒填料液相色谱柱是液相色谱领域常用的工具。与全多孔颗粒填料色谱柱相比，这种色谱柱能够在较低压力下获得更高柱效^[1]。其高柱效主要是由于色谱柱的传质距离更短并且填料颗粒的粒径分布非常窄^[2]。

表面多孔颗粒填料色谱柱最常用的粒径为 2.5–3 μm。这些颗粒产生的柱效与传统亚 2 μm 色谱柱相当，而产生的反压仅约 50%。高柱效有助于分离相邻洗脱峰，而低反压使液相色谱仪更具灵活性。

安捷伦最近在 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 颗粒上开发出了一种新型化学键合相。制备此键合相时首先使二氧化硅表面带正电荷，然后用 C18 键合相对颗粒进行官能化。InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱在弱离子强度的流动相条件下（例如甲酸）为碱性分析物提供了更高的载样量和更好的峰形。甲酸是理想的流动相改性剂，可为液相色谱分析创造简单且高度可重现的条件。使用甲酸作为改性剂可获得能够在不同 LC 检测器之间轻松进行转移的方法，并且其与 LC/MS 检测具有出色的兼容性。2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱十分灵活，可用于多种仪器和检测器平台，能够在使用不同仪器的实验室之间轻松转移。

本研究展示了带电荷表面多孔颗粒填料色谱柱 InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 的性能。与传统的 C18 色谱柱相比，该色谱柱改善了碱性药物化合物的峰形和灵敏度。

实验部分

实验采用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS (LC/TQ) 系统。对标准配置的系统进行了改进，以减小系统体积和扩散。表 1 示出了配置详情。本实验中使用的 2 种液相色谱柱如表 1 中所列。表 2 至表 4 列出了 LC 和 TQ 方法的参数。

表 1. 系统配置

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统配置	
Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)	<ul style="list-style-type: none">脱气机密封垫清洗泵35 μL 溶剂混合器：Agilent Jet Weaver, 35 μL/100 μL (部件号 G4220-60006)固件：B.07.23 [0009]
Agilent 1290 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129B)	<ul style="list-style-type: none">样品恒温器 (部件号 G7167-60101)流量计参数：针座组件 PEEK 0.12 mm, 样品定量环 20 μL, 分析头 20 μL自动进样器 → 加热器：不锈钢毛细管, 0.12 × 105 mm, SL/SL (部件号 5500-1238)样品瓶，螺口，棕色，带书写签，经认证，2 mL, 100/包 (部件号 5182-0716)瓶盖，螺口，蓝色，PTFE/红色硅橡胶隔垫，100/包 (部件号 5182-0717)样品瓶内插管，250 μL，玻璃，带聚合物支脚，100/包 (部件号 5181-1270)固件：D.07.23 [0009]
Agilent InfinityLab 液相色谱系列集成式柱温箱 (G7130A)	<ul style="list-style-type: none">集成类型：G7129B3.0 μL 热交换器加热器 → 色谱柱：A-Line Quick Connect 快速连接组件，105 mm, 0.075 mm (部件号 5067-5961)色谱柱 → 流通池：不锈钢毛细管, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (部件号 5067-4784)固件：B.07.23 [0009]
Agilent Ultivo LC/TQ (G6465A)	<ul style="list-style-type: none">安捷伦喷射流 ESI 离子源
Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)	<ul style="list-style-type: none">超低扩散最大光强卡套式流通池，10 mm, 0.60 μL (部件号 G4212-60038)紫外灯 (5190-0917)固件：D.07.23 [0009]
安捷伦液相色谱柱	<ul style="list-style-type: none">Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-942)表面多孔颗粒传统 C18 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm

表 2. UHPLC 方法参数

方法	色谱柱	流动相	洗脱条件	进样量	柱温
1	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-942)	A: 水 B: 乙腈 C: 2% 甲酸水溶液	0.4 mL/min, 5 min 内 B 从 2% 升至 35%，整个分析过程中 C 保持在 5%	5 μL 标样 (5 μg/mL) ---或--- 0.5 μL 样品 (50 ng/mL)	30 °C
2	表面多孔颗粒传统 C18 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm	A: 水 B: 乙腈 C: 2% 甲酸水溶液	0.4 mL/min, 5 min 内 B 从 10% 升至 50%，整个分析过程中 C 保持在 5%		
3	表面多孔颗粒传统 C18 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm	A: 水 B: 乙腈 C: 200 mmol/L 甲酸铵水溶液, pH 3.0	0.4 mL/min, 5 min 内 B 从 11% 升至 51%，整个分析过程中 C 保持在 10%		

本研究中分析的 6 种药物化合物购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。图 1 给出了化合物结构，表 5 列出了分析浓度。甲酸铵同样购自 Sigma-Aldrich。甲酸（部件号 G2453-85060）和 LC/MS 级乙腈（部件号 G2453-85050）购自安捷伦。水经 Milli-Q 系统 (Millipore, Burlington, MA, USA) 0.2 μm 滤膜过滤，分子量为 18。

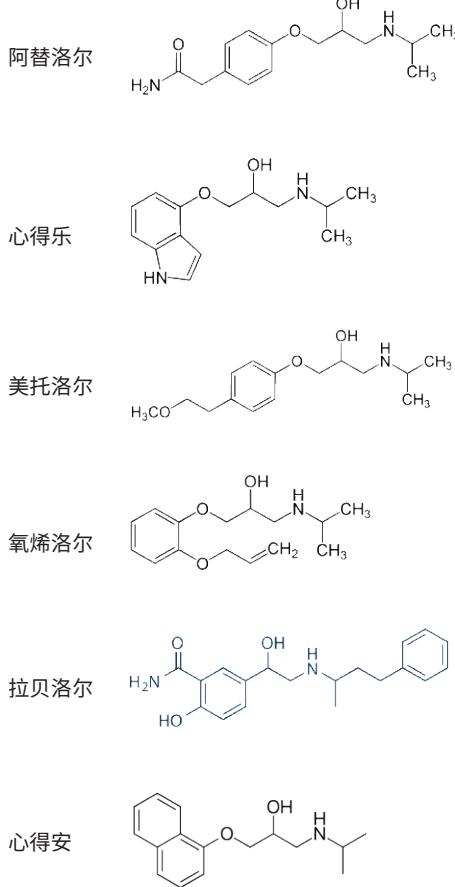


图 1. 目标化合物

表 3. LC/TQ 离子源方法参数

质谱离子源	设定值
干燥气温度	150 °C
气体流速	12 L/min
雾化器	20 psi
鞘气温度	250 °C
鞘气流速	5 L/min
毛细管电压	2000 V

表 4. LC/TQ 采集方法参数

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	CE (V)	极性
阿替洛尔	267	145	110	28	正
阿替洛尔	267	56	110	28	正
拉贝洛尔	329	161.9	110	35	正
拉贝洛尔	329	91	110	60	正
美托洛尔	268.2	133	110	20	正
美托洛尔	268.2	77	110	69	正
氧烯洛尔	266	116	113	12	正
氧烯洛尔	266	72	113	16	正
心得乐	249	116	110	16	正
心得乐	249	56	110	28	正
心得安	260	116	95	16	正
心得安	260	56	95	28	正

表 5. 标样浓度

分析物 (按洗脱顺序)	高浓度标样 (用水配制)	低浓度标样 (用水配制)
阿替洛尔	5 μg/mL	50 ng/mL
心得乐	5 μg/mL	50 ng/mL
美托洛尔	5 μg/mL	50 ng/mL
氧烯洛尔	5 μg/mL	50 ng/mL
拉贝洛尔	5 μg/mL	50 ng/mL
心得安	5 μg/mL	50 ng/mL

结果与讨论

图 2 使用表 5 中列出的高浓度标样比较了表 2 所述的 3 种分析条件下的性能。最上方的色谱图显示了使用简单的甲酸流动相在 InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱上获得的 6 种碱性药物化合物的分离情况。中间的色谱图展示了使用相同流动相时传统 C18 色谱柱的性能，相比表面带电荷的 C18，其获得的峰更宽。底

部色谱图显示，使用甲酸铵缓冲液流动相可以改善传统 C18 色谱柱的峰宽。改善程度如峰宽图所示。在每次分离中，均对乙腈梯度进行了略微调整，以确保在色谱比较中所有分析物的整体保留特性相似。利用相同的分析物在表 5 所示的低浓度下对带电荷表面和传统 C18 色谱柱再次进行比较，如图 3 所示。选择每根色谱柱的最佳性能条件：CS-C18 使用甲酸，

传统 C18 使用甲酸铵。虽然在两种色谱柱上所有分析物的峰形均可接受，但由于流动相中甲酸铵盐的离子抑制作用，导致传统 C18 的灵敏度降低。

使用 LC/MS 在高浓度和低浓度条件下检测上述碱性药物化合物时，InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱结合甲酸流动相可提供更出色的结果。

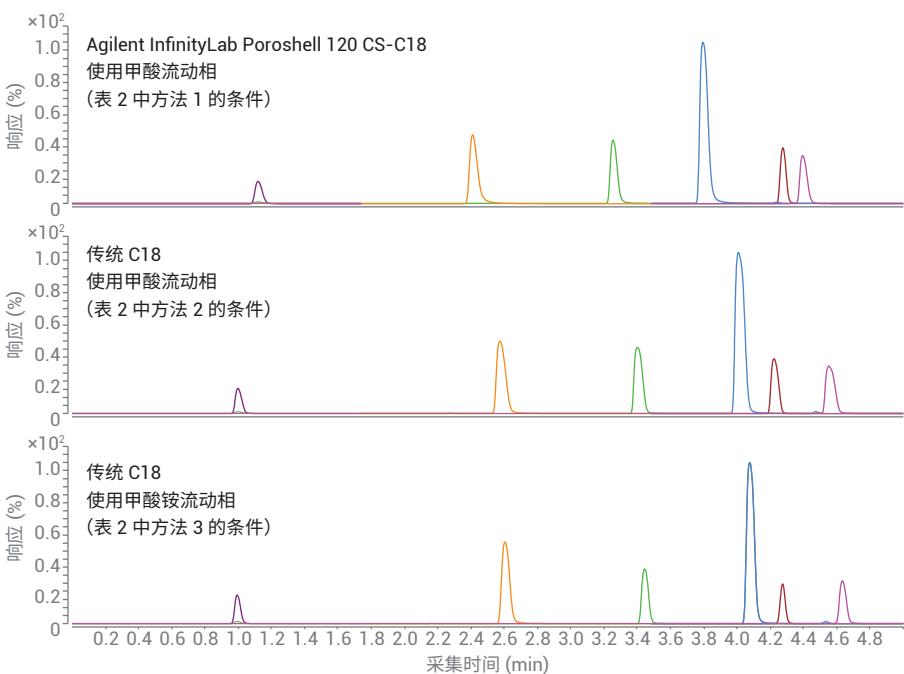
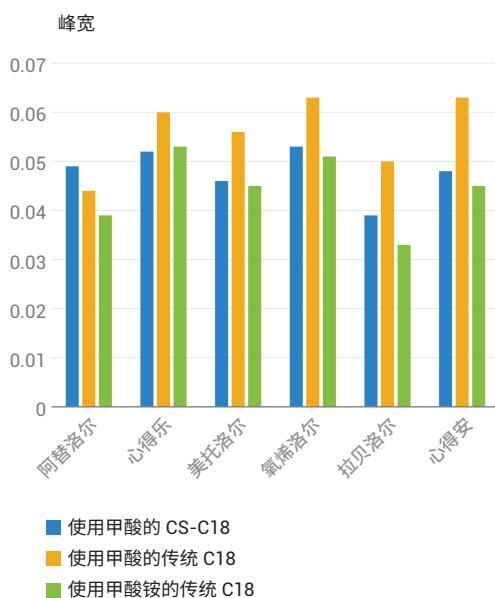


图 2. 碱性药物化合物的色谱性能比较



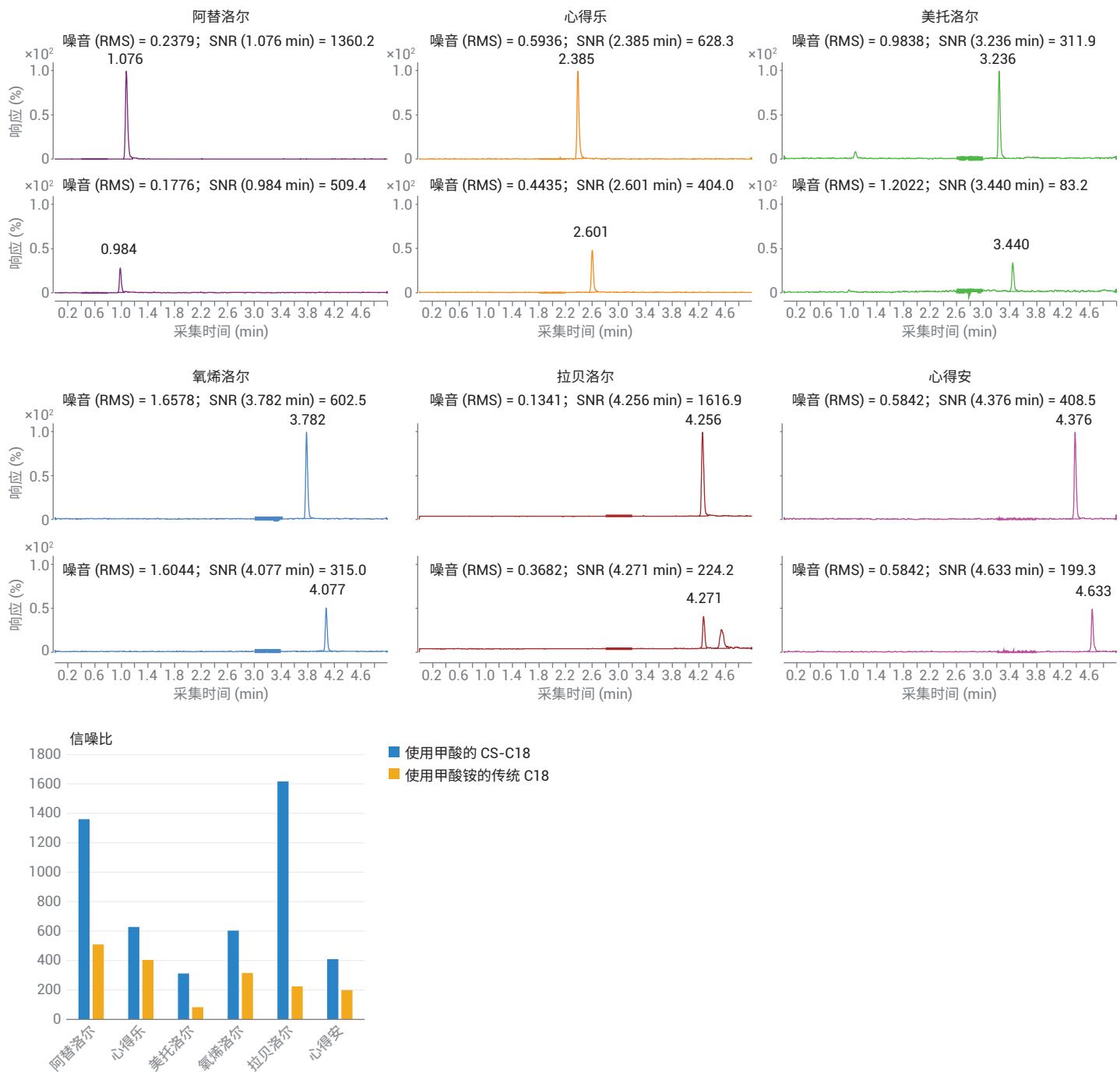


图3. 低浓度标样 LC/MS 灵敏度比较

结论

表面带电荷的 InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱可为碱性分析物提供更出色的性能。在使用简单的甲酸流动相时，CS-C18 色谱柱比传统 C18 键合相具有更优异的性能。获得的峰形更高且更尖锐，提供了更高的分离度和灵敏度。传统的 C18 色谱柱使用更复杂的缓冲液流动相时可产生相似的峰形，但缓冲盐的离子抑制作用会导致 LC/MS 灵敏度降低。

参考文献

1. Gratzfield-Hugsen, A.; Naegele, E. Maximizing Efficiency Using Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns (使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱最大限度提高柱效)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-5602EN, **2016**
2. Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography, 第 4 版, Wiley, 2004, 第 34 页

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE.2064930556

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2020
2020 年 6 月 12 日, 中国出版
5994-2094ZHCN