

Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 助您将 pH 值用作方法开发 工具

作者

Anne Mack
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 在低 pH 和高 pH 下的稳定性。将多种缓冲液和 5%–95% 的通用乙腈梯度相结合，考察了多种流动相 pH 值。使用两种样品（包括一种农药混合物）展示了流动相 pH 如何影响酸性、碱性和中性分析物的保留特性。

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]。这主要是由于其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 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。

Agilent 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。此键合相还可与低 pH 和高 pH 流动相兼容，这对于控制可电离化合物的保留和分离非常有利。2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱非常灵活，可用于在多种仪器和检测器平台上有效、可靠地分析各种类型的分析物。

本研究展示了带电荷表面多孔颗粒填料色谱柱 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 的性能及其在低 pH 和高 pH 下的出色使用寿命，这使其成为了可电离化合物方法开发的理想选择。

实验部分

本实验采用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统与 Agilent Ultivo LC/TQ。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。

本研究中分析的 9 种化合物购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。两种农药标准品均购自安捷伦（部件号 5190-0469-1、5190-0469-2）。表 2 列出了所有样品。

甲酸铵购自 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。

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)	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)	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)	集成类型: G7129B 3.0 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)	安捷伦喷射流 ESI 离子源
Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)	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 (部件号 5190-0917) 固件: D.07.23 [0009]
安捷伦液相色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 699775-942) Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-942)

表 2. UHPLC 方法参数

方法	色谱柱	流动相	洗脱条件	温度	进样/样品	检测
1 低 pH 使用寿命	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 699775-942)	A: 2% TFA 水溶液 B: 甲醇	0.3 mL/min, 50% B 等度洗脱, 60 min 运行时间 测试序列: 连续进样	85 °C	1 μL 尿嘧啶, 甲苯	DAD: 254 nm, 80 Hz
2 高 pH 使用寿命	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 699775-942)	A: 水 B: 乙腈 C: 10 mmol/L 碳酸氢铵 pH 10	0.4 mL/min, QC: 60% B, 40% A; 压力缓冲液: 100% C 保持 2 h 测试序列: 5 次 QC 进样, 压力缓冲液, 重复	50 °C	0.5 μL 尿嘧啶, 苯酚, 4-氯硝基苯, 萘	DAD: 254 nm, 80 Hz
3 低 pH 方法开发	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, 10 min 内 B 从 5% 升至 95%, 整个分析过程中 C 保持在 5%	30 °C	0.8 μL 尿嘧啶, 阿米替林, 对羟基苯甲酸丁酯, 邻苯二甲酸二丙酯, 萘	DAD: 254 nm, 80 Hz
					0.2 μL 安捷伦碱性农药 (部件号 5190-0469-1) + 酸性农药 (部件号 5190-0469-2), 混合比例 1:3	MSD: 参见表 3 和表 4
4 高 pH 方法开发	Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-942)	A: 水 B: 乙腈 C: 200 mmol/L 甲酸铵 pH 10	0.4 mL/min, 10 min 内 B 从 5% 升至 95%, 整个分析过程中 C 保持在 5%	30 °C	0.8 μL 尿嘧啶, 阿米替林, 对羟基苯甲酸丁酯, 邻苯二甲酸二丙酯, 萘	DAD: 254 nm, 80 Hz
					0.2 μL 安捷伦碱性农药 (部件号 5190-0469-1) + 酸性农药 (部件号 5190-0469-2), 混合比例 1:3	MSD: 参见表 3 和表 4

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 SIM 采集方法参数

编号	化合物名称	质量 (m/z)	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	极性
1	灭害威	209.3	10	135	正
2	噻菌灵	202.1	10	135	正
3	抑霉唑	297.1	10	135	正
4	吡唑草胺	278.0	10	135	正
5	克百威	222.1	10	135	正
6	莠去津	216.1	10	135	正
7	苯达松	239.1	10	135	负
8	2,4,5-T	252.9	10	135	负
9	三氯苯氧丙酸	266.9	10	135	负
10	地乐酚	239.1	10	135	负
11	三氟羧草醚	360.0	10	135	负

结果与讨论

对两根单独的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 LC 色谱柱施加压力，一根采用低 pH 溶液，一根采用高 pH 溶液。结果如图 1 所示。

使用高浓度的 2% 三氟乙酸 (pH 1) 溶液在 85 °C 的高温下对 CS-C18 色谱柱施加压力。使用甲苯进行重复 QC 进样，使色谱柱持续暴露在上述压力条件下，跟踪色谱柱的性能变化。在 pH 1 和 85 °C 条件下，当超过 20000 倍柱体积时，该色谱柱仍保持了高性能，保留时间和峰形几乎没有变化，证明了该色谱柱出色的低 pH 稳定性。

为了测试 CS-C18 的高 pH 稳定性，使用萘样品测试色谱柱，然后使其暴露于 10 mmol/L 碳酸氢铵 (pH 10) 的高 pH 压力缓冲液中 2 小时。重复上述操作，直至压力缓冲液总量达到 50000 倍柱体积，同时柱温升高至 50 °C 以进一步对色谱柱固定相进行压力处理。CS-C18 再次证明了其在高 pH 条件下的稳定性，在整个测试过程中保持了较为一致的峰形和保留时间。

CS-C18 出色的 pH 稳定性范围使其成为可电离化合物方法开发的理想选择。当在反相液相色谱 (RPLC) 模式下运行时，分析物处于中性状态时保留性最强。酸性物质在低 pH 下保留性更强，而碱性物质在高 pH 下保留性更强。中性化合物不受流动相 pH 的影响。同样，不改变电离状态的酸和碱也不会受到流动相 pH 变化的影响。

图 2 展示了将 pH 用作方法开发工具的一个简单示例。样品中包含一种酸，一种碱和三种中性物质。在 5%–95% 的通用乙腈梯度下运行样品，首先使用低 pH 流动相运行，然后使用高 pH 流动相再次运行。红色箭头表明酸性化合物发生了移动（随着 pH 值增加保留时间缩短），蓝色箭头表明碱性分析物发生了移动（随着 pH 值增加保留时间增加），而黑色箭头表明中性物质的保留时间不会因流动相 pH 发生变化。

图 3 展示了另一组在低 pH 和高 pH 下的通用乙腈梯度筛查，但使用了更复杂的酸性和碱性农药样品。图 3 中的峰编号可以通过表 4 中的相应化合物编号来辨别。峰颜色在低 pH 和高 pH 色谱图中一致。如图所示，在 pH 2.7 和 10 两种不同流动相之间存在明显的峰移动和非常不同的选择性。

图 4 简化了图 3 中的峰，用红色标识酸性物质，用蓝色标识碱性物质。现在可以很容易观察到，酸性农药在低 pH 甲酸中保留性更强，而碱性农药在高 pH 甲酸铵缓冲液 (pH 10) 中保留性更强。同样值得注意的是 2 个以黑色显示的峰。它们为可电离化合物，但是其 pKa 超出了 2.7–10 的 pH 测试范围。因此，这两种化合物在两种流动相之间不会改变电离状态，且表现类似中性化合物，保留时间不会发生改变。

上述分离过程中使用的简单乙腈梯度是方法开发的重要起点。如果存在可电离化合物，使用多种流动相 pH 对样品进行筛查可提供显著的选择性变化，从而提高保留和分离所有分析物的可能性。

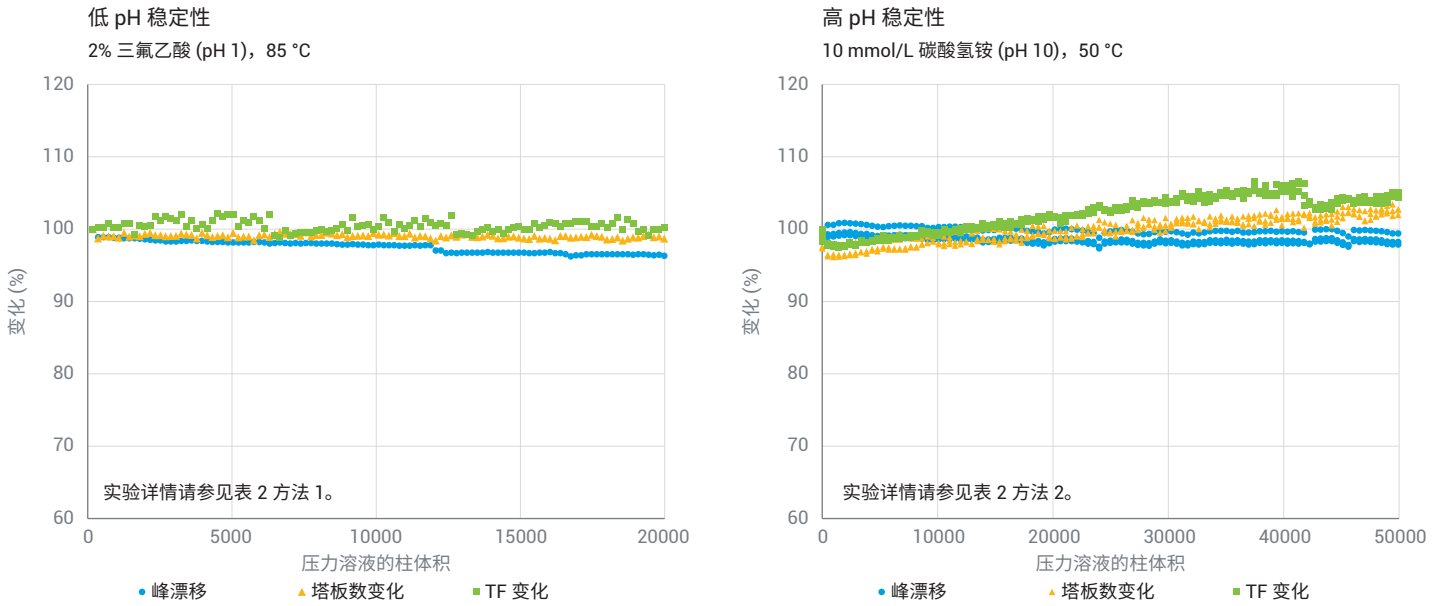


图 1. 即使在高温高压分析中, Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 仍可在低 pH 和高 pH 流动相中保持稳定

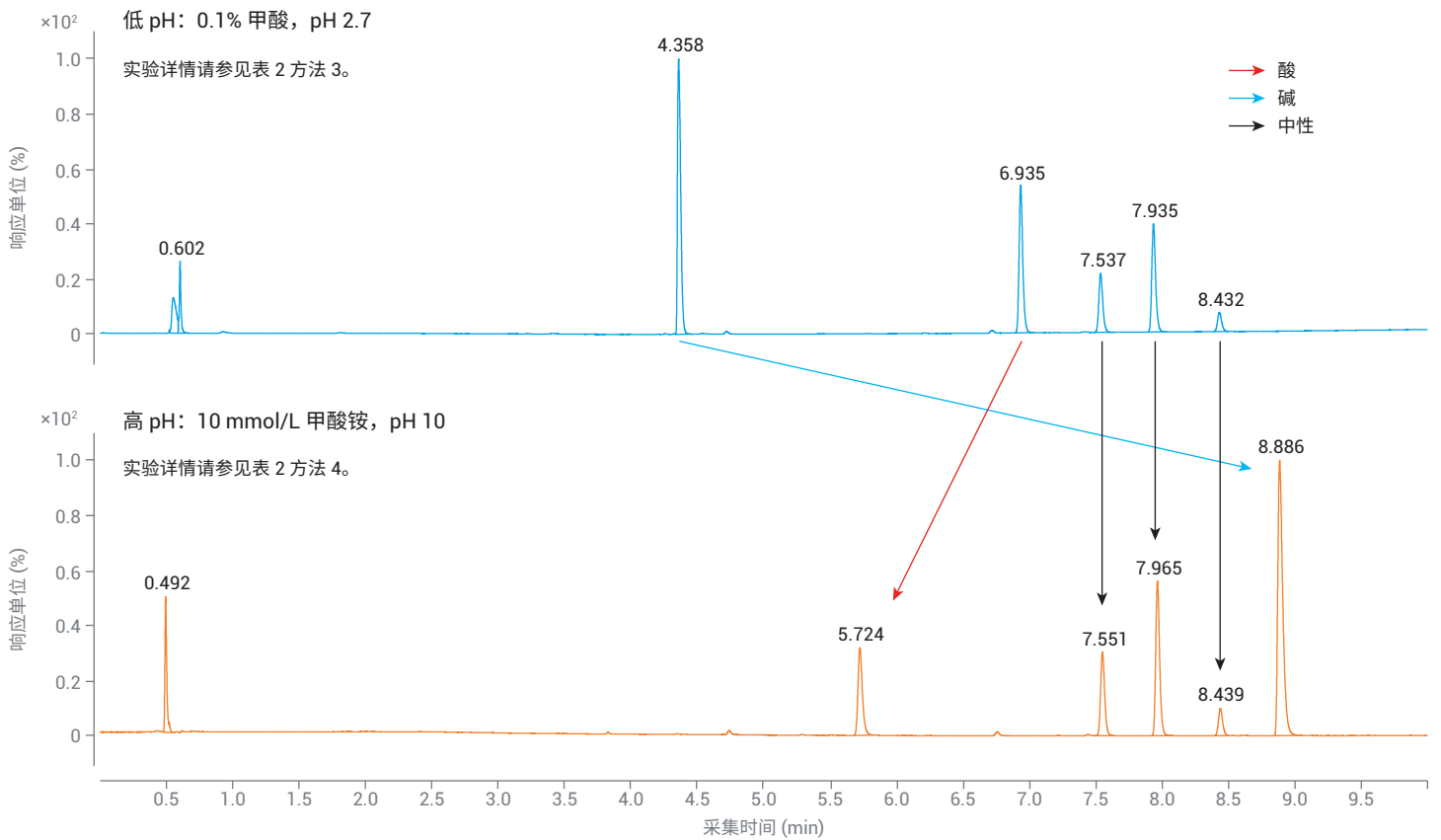


图 2. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 分离可电离化合物时, 流动相 pH 是强大的方法开发工具

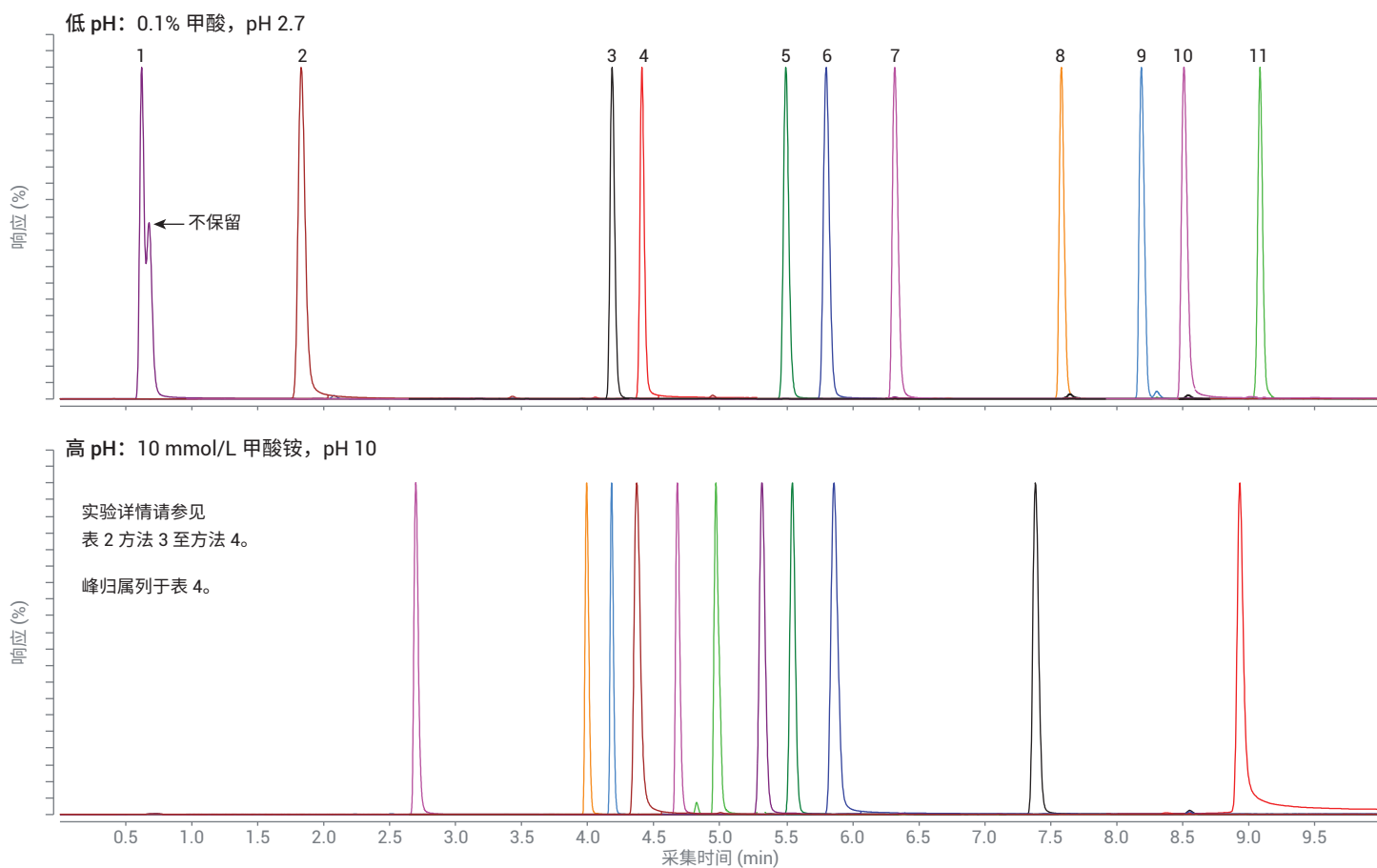


图 3. 改变流动相的 pH 值会显著改变 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱对这些酸性和碱性农药的选择性

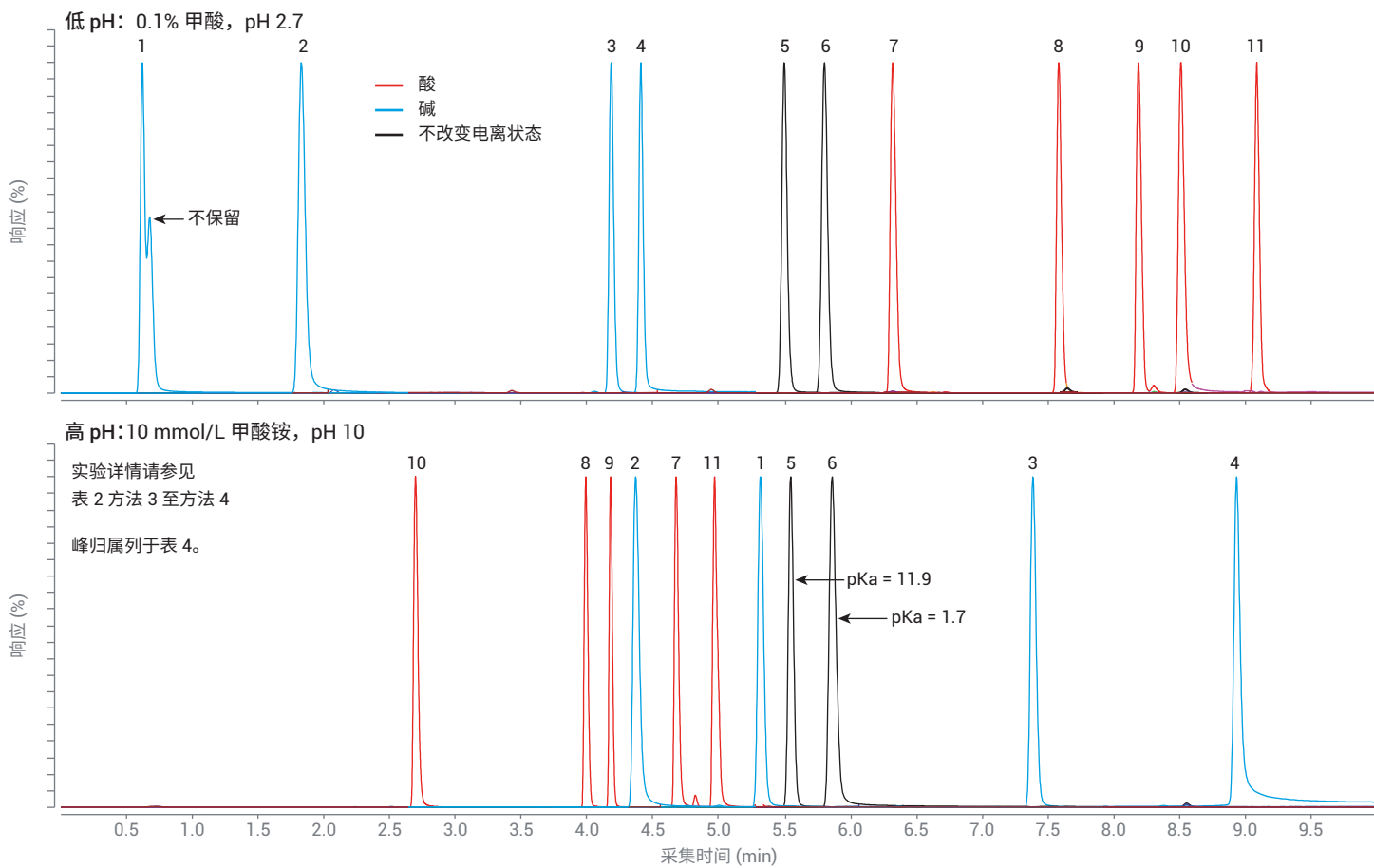


图 4. 对图 3 中的峰颜色进行简化, 可观察到酸性 (红色) 农药在低 pH 下保留性更强, 而碱性 (蓝色) 农药在高 pH 下保留性更强

结论

表面带电荷的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 CS-C18 色谱柱即使在高温高压条件下也能在低 pH 和高 pH 流动相中实现出色的使用寿命。使用两种样品混合物证明了使用流动相 pH 作为方法开发工具的有效性。在 RPLC 模式下，中性状态的分析物保留性更强：酸性物质在低 pH 下保留性更强，碱性物质在高 pH 下保留性更强，而中性物质不受流动相 pH 变化的影响。使用可兼容宽 pH 范围的色谱柱能够为可电离化合物的方法开发提供出色的灵活性。

参考文献

1. Gratzfield-Huguen, A.; Naegel, 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，第 34 页，Wiley，**2004**

www.agilent.com

DE.2693171296

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 8 月 17 日，中国出版
5994-2274ZHCN

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

