

Разработка методов комплексного анализа 2D-ЖХ

Поиск систем с наиболее ортогональным режимом разделения для RPLC×RPLC с подбором оптимальной колонки и элюента

Обзор технической информации

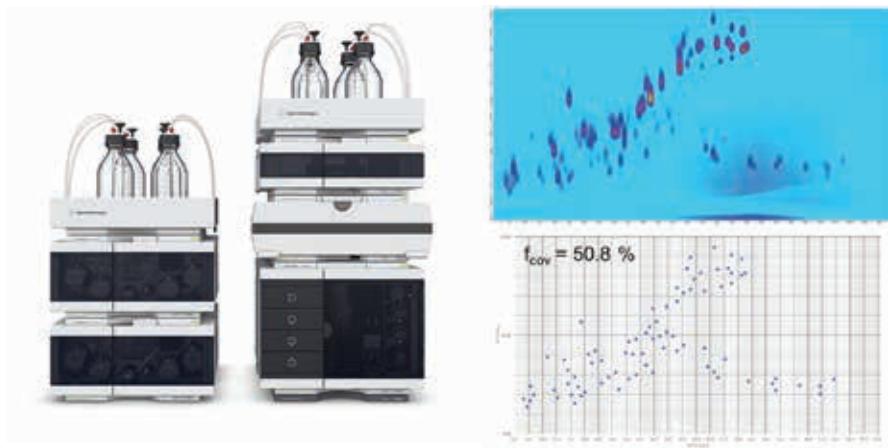
Автор

Соня Кригер (Sonja Krieger)
Agilent Technologies, Inc.
Вальдброн, Германия

Аннотация

Комплексный анализ методом 2D-ЖХ имеет высокий потенциал для анализа проб сложного состава, благодаря более высокой разделительной способности по сравнению с традиционной (1D) ВЭЖХ. Наиболее часто используется комбинация двух обращенно-фазовых систем (RPLC×RPLC). Важно, что системы ортогонального разделения используются в первом и втором измерении, что позволяет в полной мере использовать достижимое преимущество разделительной способности по сравнению с традиционной ВЭЖХ.

В данном техническом обзоре описывается способ разработки метода комплексного анализа 2D-ЖХ с использованием обращенно-фазовой жидкостной хроматографии в обоих измерениях для анализа проб сложного состава. Разработанный метод комплексного анализа 2D-ЖХ должен обеспечивать максимальную разделительную способность за счет максимального фракционного охвата двумерного пространства разделения.



Agilent Technologies

Введение

Для хроматографического разделения большого числа соединений, содержащихся в пробах сложного состава, требуются хроматографические методики, обеспечивающие высокую разделительную способность или пиковую емкость. Пиковая емкость определяется как максимальное число пиков, разделяемых за заданное время при заданном разрешении. Теоретическое понятие пиковой емкости используется в качестве показателя для характеризации разделительной способности в хроматографических экспериментах¹. Комплексная двумерная жидкостная хроматография (комплексная 2D-ЖХ или ЖХ×ЖХ) предполагает широкие возможности для анализа проб сложного состава, благодаря более высокой разделительной способности по сравнению с традиционной одномерной жидкостной хроматографией (1D-ЖХ)². В предыдущих рекомендациях по применению было показано, что при использовании системы Agilent 1290 Infinity 2D-ЖХ практическая пиковая емкость может быть увеличена в три-четыре раза по сравнению с одномерными методиками ВЭЖХ или УВЭЖХ без изменения времени анализа³.

Увеличение разделительной способности комплексной 2D-ЖХ по сравнению с 1D-ЖХ может быть объяснено с помощью правила произведения для пиковой емкости⁴. Теоретически пиковая емкость комплексного анализа методом 2D-ЖХ (n_{2D}) является произведением пиковой емкости первого (1n) и второго (2n) измерений (уравнение 1).

$$n_{2D} = {}^1n \times {}^2n$$

Уравнение 1.

Это уравнение справедливо только тогда, когда системы разделения, используемые в первом и втором измерениях, полностью независимы друг от друга (ортогональны) и разделение, полученное в первом измерении, сохраняется при переходе к второму измерению. На практике пиковая емкость комплексного анализа методом 2D-ЖХ может быть вычислена следующим образом (уравнение 2)^{1,2}:

$$n_{2D} = \frac{{}^1n \times {}^2n}{\beta} \times f$$

Уравнение 2.

В уравнении 2 коэффициент β учитывает частичное повторное перемешивание соединений, разделенных в первом измерении, которое происходит в петлях проб при переходе от первого измерения ко второму (недостаточность выборки). Для заданного разделения в первом измерении недостаточность выборки становится менее серьезной с уменьшением времени модуляции, поскольку фракции, переносимые из первого измерения во второе, становятся меньше.

Коэффициент f корректирует недостаточную ортогональность разделения в первом и втором измерении или неполный охват двумерного пространства разделения. В качестве показателя для корректирующего фактора f можно использовать фракцию двумерного пространства разделения, которая, в принципе, может быть охвачена пиками (фракционный охват f_{cov})².

Более подробное описание концепции пиковой емкости в комплексном анализе 2D-ЖХ см. в справочнике *Agilent Technologies «Двумерная жидкостная хроматография: принципы, практическая реализация и варианты применения»*⁵.

При разработке методов для комплексной 2D-ЖХ на первом шаге следует выбрать режим разделения для первого и второго измерения. Уравнение 2 указывает на важность использования ортогональных систем разделения в первом и втором измерении. К режимам разделения с высокой степенью ортогональности, относятся, например, комбинации ионообменной хроматографии и обращенно-фазовой ЖХ, эксклюзионной хроматографии и обращенно-фазовой ЖХ или нормально-фазовой ЖХ и обращенно-фазовой ЖХ⁵. Несмотря на корреляцию механизмов разделения, которая присутствует в комбинации двух обращенно-фазовых систем, эта комбинация режимов наиболее широко используется в комплексном анализе методом 2D-ЖХ^{2,6}. Это может быть связано с широким спектром применения и высокой эффективностью обращенно-фазовых систем, совместимостью с масс-спектрометрическим детектированием, хорошей совместимостью между первым и вторым измерением, а также доступностью неподвижных фаз с различной селективностью^{2,5}.

При разработке метода комплексного анализа 2D-ЖХ с обращенной фазой в обоих измерениях (RPLC×RPLC), необходимо выбирать пару колонок с различной селективностью. Одним из способов классификации колонок для обращенно-фазовой хроматографии в зависимости от их селективности является модель гидрофобного вычитания. Эта модель описывает взаимодействия между колонками для обращенно-фазовой хроматографии и различными аналитами в соответствии с гидрофобностью, пространственными ограничениями, кислотностью, основностью и ионообменной емкостью. С помощью этой модели можно рассчитать коэффициент селективности колонки в качестве показателя различий в селективности между двумя колонками для обращенно-фазовой хроматографии^{1,2,5-8}. Таким образом можно выбрать две колонки для обращенно-фазовой хроматографии, обеспечивающие с наибольшей вероятностью широкий фракционный охват в комплексном анализе методом 2D-ЖХ⁵. Тем не менее, следует иметь в виду, что удерживание и селективность зависят не только от колонки, но и от подвижной фазы (органический растворитель, pH) и температуры^{2,6}. Кроме того, возможность получить в комплексном анализе методом 2D-ЖХ широкий фракционный охват определяют как обе характеристики систем разделения (колонка и подвижная фаза), так и характеристики пробы. Сочетание двух систем разделения может обеспечить широкий фракционный охват для одной пробы и более узкий для другой^{2,5}.

Для заданной пробы относительную селективность двух колонок или систем разделения можно оценить, например, по соотношению времен удерживания на двух колонках^{1,7}.

В данном техническом обзоре описывается способ разработки метода комплексного анализа 2D-ЖХ с использованием обращенно-фазовой жидкостной хроматографии в обоих измерениях для анализа проб сложного состава.

Система Agilent 1290 Infinity II 2D-ЖХ комплектуется дополнительными кранами выбора растворителей и колонок, чтобы обеспечить возможность проведения подбора оптимальных колонок и растворителей без каких-либо аппаратных изменений. Шесть различных неподвижных фаз для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии выбираются с учетом различий

в селективности в соответствии с моделью гидрофобного вычитания. На первом этапе для первого измерения выполняется подбор колонок с выбранными неподвижными фазами и растворителей (ацетонитрил, метанол) с разными значениями pH подвижных фаз (кислые, в буфере с pH 5 и pH 8). Для выбора подходящих систем разделения (неподвижной и подвижной фазы) для комплексного анализа методом 2D-ЖХ рассчитывается соотношение коэффициентов удерживания выбранных соединений для всех возможных комбинаций. Комбинации с самыми низкими корреляциями тестируются для комплексного анализа методом 2D-ЖХ с полным градиентом во втором измерении, и определяется фракционный охват полученных 2D-ЖХ хроматограмм. Для комбинации с самым широким фракционным охватом разрабатывается смещенный градиент для разделения во втором измерении для дальнейшего увеличения фракционного охвата.

Экспериментальная часть

Оборудование

Система Agilent 1290 Infinity II 2D-ЖХ была сконфигурирована для двумерного подбора колонок и растворителей и состояла из следующих модулей:

- насосы Agilent 1290 Infinity II High-Speed Pumps (2 x G7120A)
- автосampler Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), оборудованный системой охлаждения (опция 100)
- терmostаты колонок Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostats (2 x G7116B), оснащенные 8-поз. краном выбора колонок (G4239C) и набором капилляров (G4239C, опция 005)
- детектор на диодной матрице Agilent 1290 Infinity II DAD (2 x G7117B), оснащенный проточной кюветой Max-Light с длиной оптического пути 10 мм
- приводы крана Agilent 1290 Infinity (4 x G1170A), оснащенные кранами-переключателями растворителя (G4235A)
- привод крана Agilent 1290 Infinity (G1170A) с 2-поз./4-порт. двойным краном (головка крана для 2D-ЖХ, давление до 1200 бар (кат. № 5067-4214)), оснащенный двумя петлями-дозаторами объемом 80 мкл

Для проведения подбора колонок и растворителей в первом и втором измерении без необходимости каких-либо замен оборудования, насосы Agilent 1290 Infinity II High-Speed Pumps для обоих измерений были оснащены двумя кранами-переключателями растворителей. С учетом встроенных в насосы кранов-переключателей растворителя для каждого канала насоса, таким образом, было возможно переключение между 13 растворителями. Для обоих измерений использовался термостат колонок Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat, оборудованный восьмипозиционным краном выбора колонки. Это позволило переключаться между шестью колонками с дополнительными позициями байпаса и отходов.

Масс-спектрометрическое детектирование (MC) проводили во время одномерного подбора колонок и растворителей с использованием квадрупольно-времяпролетной системы ЖХ-МС Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF, оснащенной двойным источником с ионизацией распылением в электрическом поле (ESI) Agilent Jet Stream (G1958-65268). Квадрупольно-времяпролетная система ЖХ-МС использовалась в режиме MC, следовательно, времяпролетная система ЖХ-МС могла использоваться аналогичным образом. При подборе колонок и растворителей в первом измерении выход детектора на диодной матрице первого измерения был подключен к МС.

Программное обеспечение

- Программное обеспечение Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition версии C.01.07 [27] и программное обеспечение для сбора данных Agilent 1290 Infinity 2D-LC версии A.01.02 с пакетом исправления SP1
- Программное обеспечение Agilent MassHunter Workstation, ПО сбора данных для времяпролетного Agilent серии 6200 и квадрупольно-времяпролетного Agilent серии 6500 версии B.05.01, ПО для количественного анализа B.06.00
- Программное обеспечение GC Image LCxLC Edition версии 2.5b0 для анализа данных 2D-ЖХ (GC Image, LLC., Линкольн, Небраска, США)

Колонки

Подбор условий и первое измерение 2D-ЖХ:

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959758-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959758-906)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959758-912)
- Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 858768-901)
- Agilent ZORBAX RRHD SB-CN, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 858700-905)
- Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959764-918)

Второе измерение 2D-ЖХ:

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-302)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-306)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-312)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 959757-318)
- Agilent ZORBAX RRHD SB-CN, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (кат. номер 857700-305)
- Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм (заказ)

Реактивы

Все применяемые растворители имели класс чистоты «для ВЭЖХ». Ацетонитрил и метанол были приобретены в компании Merck (Дармштадт, Германия). Свежая вода высшей степени чистоты была получена в системе Milli-Q Integral, оборудованной мембранным картриджем с размером пор 0,22 мкм (Millipak, EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс, США). Ацетат аммония, гидрокарбонат аммония, муравьиная кислота, уксусная кислота и раствор амиака были приобретены в Sigma-Aldrich (Штайнхайм, Германия).

Пробы

Проба, использованная в данном исследовании, содержала 70 соединений и представляла собой смесь четырех готовых смесей, состоящих из поликлинических ароматических углеводородов, фталевых эфиров, фенонов, пестицидов и урацила в качестве маркера неудерживаемого компонента.

Поликлинические ароматические углеводороды (ПАУ), смесь 25, США EPA 16 (YA20950025AB, Dr. Ehrenstorfer, Аугсбург, Германия). 16 соединений, 2 000 мкг/мл в ацетоне/бензole:

Аценафтен
Аценафтилен
Антрацен
Бензо[а]антрацен
Бензо[а]пирен
Бензо[b]флуорантен
Бензо[k]флуорантен
Бензо[ghi]перилен
Хризен
Дibenzo[ah]антрацен
Флуорантен
Флуорен
Индено[1,2,3-cd]пирен
Нафталин
Фенантрен
Пирен

Фталевые эфиры, смесь анализаторов 3 (YA08060300HE, Dr. Ehrenstorfer, Аугсбург, Германия), 17 соединений 1 000 мкг/мл в гексане:

Бензилбензоат
Бис(2-п-бутоксиэтил)фталат
Бис(2-этоксиэтил)фталат
Бис(2-этилгексил)фталат
Бис(2-метоксиэтил)фталат
Бис(4-метил-2-пентил)фталат
Бутилбензилфталат
Диамилфталат
Ди-*p*-бутилфталат
Дициклогексилфталат
Диэтилфталат
Дигексилфталат
Дизобутилфталат
диметилфталат
Динонилфталат
Ди-*p*-октилфталат
Гексил-2-этилгексилфталат

Феноны, контрольная проба для скоростной ВЭЖХ быстрого разрешения (Agilent Technologies, Вальдброн, Германия), девять соединений, 100 мкг/мл в воде/ацетонитриле:

Ацетанилид
Ацетофенон
Бензофенон
Бутирофенон
Гептансоферон
Гексансоферон
Октаноферон
Пропиоферон
Валероферон

Пестициды, смесь 34 (L18000034AL, Dr. Ehrenstorfer, Аугсбург, Германия), 27 соединений 10 мкг/мл в ацетонитриле:

Атразин
Дезэтил-атразин
Дезэтил-атразин дезизопропил
Хлорксурон
Хлорпрофам
Хлортолурон
Кримидин
Цианазин
Диурон
Фенурон
Изопротурон
Линурон
Метамитрон
Метазахлор
Метабензтиазурон
Метабромурон
Метолахлор
Метоксурон
Метрибузин
Монолинурон
Прометрин
Пропазин
Профам
Себутилазин
Симазин
Тербутилазин
Тербутрин

Урацил (Sigma-Aldrich, Штайнхайм, Германия), 1 000 мкг/мл в воде.

Проба была получена с помощью комбинации следующих объемов каждой из перечисленных готовых смесей и содержала примерно по 9 мкг/мл каждого из соединений: 5 мкл смеси ПАУ, 10 мкл смеси фталевых эфиров, 100 мкл смеси фенонов, 1 000 мкл смеси пестицидов и 10 мкл раствора урацила. Для подбора колонок и растворителей для первого измерения с масс-спектрометрическим детектированием пробу разводили ацетонитрилом в соотношении 1:10.

Методики

Подбор колонок и растворителей для первого измерения

Колонки	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP Agilent ZORBAX RRHD SB-CN Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH (2,1 × 100 мм, 1,8 мкм каждая)
Растворители	A) H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота; B) ацетонитрил + 0,1% муравьиная кислота A) H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота; B) метанол + 0,1% муравьиная кислота A) 10 мМ раствор ацетата аммония, pH 5; B) ацетонитрил A) 10 мМ раствор ацетата аммония, pH 5; B) метанол A) 10 мМ раствор гидрокарбоната аммония, pH 8; B) ацетонитрил A) 10 мМ раствор гидрокарбоната аммония, pH 8; B) метанол
Градиент	0 мин — 20% B 10 мин — 95% B
Время окончания	15 мин
Время промывки колонки после анализа	5 мин
Скорость потока	0,500 мл/мин
Температура	40 °C
Вводимый объем	1 мкл; ввод с водяной пробкой 2 мкл
Диодно-матричное детектирование	220 нм/4 нм, опорные 400/100 нм и 254/4 нм, опорные 400/100 нм; скорость передачи данных при частоте 40 Гц
MC-детектирование	Использовалась квадрупольно-времяпролетная система ЖХ-MC Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF в режиме положительных ионов со скоростью сбора данных 5 спектров/с и следующими условиями источника с ионизацией распылением в электрическом поле (ESI) Agilent Jet Stream: Temperatura gaza 300 °C Potok gaza 8 л/мин Davlenie v raspysilitеле 50 фунтов на кв. дюйм Temperatura gaza periferyjnogo sloya 300 °C Skorost' potoka vspomogatel'nogo periferyjnogo gaza 9 л/мин Napryazhenie na kapillare 3 000 В Napryazhenie vychodnogo konusa 500 В

Двумерный скрининг

Первое измерение

Колонки	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH (2,1 × 100 мм, 1,8 мкм каждая)
Растворители	A) H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота; B) метанол + 0,1% муравьиная кислота A) 10 мМ раствор ацетата аммония, pH 5; B) ацетонитрил A) 10 мМ раствор ацетата аммония, pH 5; B) метанол
Градиент	0 мин — 20% B при 0,100 мл/мин 50 мин — 100% B при 0,100 мл/мин 60 мин — 100% B при 0,100 мл/мин 61 мин — 20% B при 0,400 мл/мин
Время окончания	70 мин
Температура	40 °C
Вводимый объем	5 мкл; ввод с водяной пробкой 5 мкл
Диодно-матричное детектирование	220 нм/4 нм, опорные 400/100 нм и 254/4 нм, опорные 400/100 нм; скорость передачи данных 20 Гц, время остановки 60 мин
Второе измерение	
Колонки	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH (3,0 × 50 мм, 1,8 мкм каждая)
Растворители	A) H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота; B) метанол + 0,1% муравьиная кислота A) 10 мМ раствор ацетата аммония, pH 5; B) ацетонитрил A) 10 мМ раствор ацетата аммония, pH 5; B) метанол
Скорость потока	2,500 мл/мин
Градиент	0,00 мин — 20% B 0,27 мин — 100% B
Время остановки градиента ^{2D}	0,40 мин
Время модуляции	0,50 мин
Модуляция	Петли 80 мкл; конфигурация совместных потоков; время модуляции 0,50 мин; модуляция включена: от 0 до 60 мин
Температура	60 °C
Диодно-матричное детектирование	220 нм/4 нм, опорные 400/100 нм и 254/4 нм, опорные 400/100 нм; скорость передачи данных 80 Гц, время остановки 60 мин

Итоговый метод 2D-ЖХ

Первое измерение

Колонка	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 2,1 × 100 мм, 1,8 мкм
Растворители	A) 10 mM раствор ацетата аммония, pH 5; B) ацетонитрил
Градиент	0 мин — 20% B при 0,100 мл/мин 50 мин — 100% B при 0,100 мл/мин 60 мин — 100% B при 0,100 мл/мин 61 мин — 20% B при 0,400 мл/мин
Время окончания	70 мин
Температура	40 °C
Вводимый объем	5 мкл; ввод с водяной пробкой 5 мкл
Диодно-матричное детектирование	220 нм/4 нм, опорные 400/100 нм и 254/4 нм, опорные 400/100 нм; скорость передачи данных 20 Гц, время остановки 60 мин
Второе измерение	
Колонка	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH, 3,0 × 50 мм, 1,8 мкм
Растворители	A) 10 mM раствор ацетата аммония, pH 5; B) метанол
Скорость потока	2,500 мл/мин
Градиент	0,00 мин — 30% B 0,27 мин — 35% B
Время остановки градиента ^{2D}	0,40 мин
Время модуляции	0,50 мин
Модуляция градиента	30% B при 0,00 мин до 100% B при 60 мин 35% B при 0,27 мин до 70% B при 30 мин до 100% B при 40 мин
Модуляция	Петли 80 мкл; конфигурация совместных потоков; время модуляции 0,50 мин: от 0 до 60 мин
Температура	60 °C
Диодно-матричное детектирование	220 нм/4 нм, опорные 400/100 нм и 254/4 нм, опорные 400/100 нм; скорость передачи данных 80 Гц, время остановки 60 мин

Результаты и обсуждение

Для описания подхода к разработке метода для комплексного 2D- ЖХ анализа использовалась сложная смесь, содержащая полициклические ароматические углеводороды, эфиры фталевой кислоты, феноны и пестициды. Готовая проба содержала 70 соединений, в том числе урацил, используемый в качестве маркера неудерживаемого компонента.

В качестве первого шага проводился подбор колонок и растворителей первого измерения для выявления систем обращенно-фазового разделения, которые показывают различия в селективности в анализируемой пробе. Для одномерного подбора колонок и растворителей были выбраны шесть материалов с ОФ с учетом классификации хроматографической селективности в соответствии с моделью гидрофобного вычитания. Выбранные материалы с ОФ включают: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, Agilent ZORBAX RRHD Bonus-RP, Agilent ZORBAX RRHD SB-CN и Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH. В доступной в сети Интернет базе данных (www.hplccolumns.org) приведены характеристики 600 колонок с обратной фазой, позволяющие сравнивать их по коэффициенту селективности. Например, в данном примере видно, что Bonus RP и Eclipse PAH обеспечивают другую селективность по сравнению с колонками Eclipse Plus C18 или Eclipse Plus C8. Выбранные подвижные фазы включают разные органические растворители (ацетонитрил и метанол) при различных значениях pH (кислые, в буфере с pH 5 и pH 8). В режиме подбора колонок и растворителей первого измерения было применено масс-спектрометрическое детектирование (MC) для отслеживания выбранных соединений в разных хроматограммах.

На рис. 1 показаны хроматограммы, полученные при одномерном анализе с использованием колонки Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле (A) и колонки Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле (B).

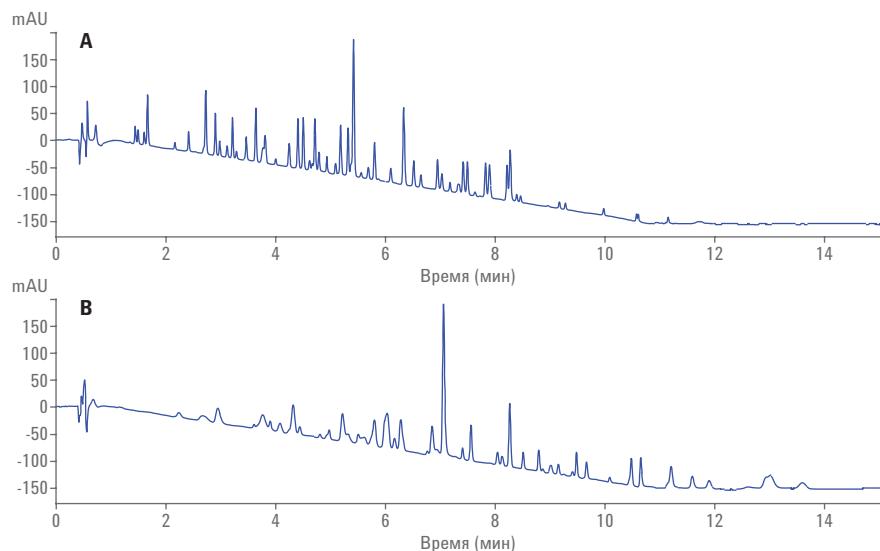


Рис. 1. Одномерный анализ пробы с концентрацией 9 мкг/мл со спектрофотометрическим детектированием при 220 нм; (A) Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле; (B) Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле.

Идентификация компонентов пробы и отслеживание пиков на разных хроматограммах стало возможным благодаря детектированию точно измеренных масс с использованием времепролетной масс-спектрометрии. Как и следовало ожидать, ионизация полициклических ароматических углеводородов и фенонов при выбранных условиях невозможна. Кроме того, некоторые соединения, содержащиеся в пробе, являются изомерами (например, прометрин и тербутрин) и, следовательно, не могли быть выделены на основе детектирования методом времепролетной масс-спектрометрии. В целом в большинстве хроматограмм можно с уверенностью идентифицировать 30 пестицидов и фталевых эфиров. На рис. 2 показаны хроматограммы соединений, идентифицированных при одномерном анализе с использованием колонки Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле (A) и колонки Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле (B).

Для идентифицированных компонентов пробы были экспортированы сведения о соединении из ПО MassHunter. По значениям времен удерживания идентифицированных соединений и времени выхода неудерживаемого компонента, определенного по времени удерживания урацила, с использованием программы Excel были рассчитаны коэффициенты удерживания (k) для идентифицированных соединений

для всех комбинаций колонок и растворителей. Чтобы определить, какая комбинация двух систем разделения (комбинация колонки и растворителя) обеспечивает наиболее существенную разницу в селективности для анализируемой пробы, была рассчитана корреляция между коэффициентами удерживания для всех возможных комбинаций систем разделения.

Как правило, комбинации систем разделения, использующие ацетонитрил в одной системе и метanol в другой, показали более низкую корреляцию по сравнению с комбинациями, в которых в обеих системах применялся один и тот же органический растворитель. Соответственно, в комплексном анализе методом двумерной жидкостной хроматографии с использованием обращенной фазы в обоих измерениях обычной практикой является использование ацетонитрила в одном измерении и метанола в другом².

Для анализируемой пробы значение pH подвижной фазы не оказывает значительного влияния на селективность. Тем не менее следует отметить, что для проб, содержащих соединения с широким диапазоном кислотности/основности, разницы в селективности можно добиться даже на аналогичных колонках при разных значениях pH².

Для перечисленных далее комбинаций систем разделения была рассчитана самая низкая корреляция между коэффициентами

удерживания (для сравнения показана также комбинация с высокой степенью корреляции между коэффициентами удерживания).

- Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле и Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле ($R^2 = 0,957$)
- Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле и Bonus RP с $H_2O + 0,1\%$ муравьиной кислоты в метаноле + 0,1% муравьиной кислоты ($R^2 = 0,957$)
- Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле и Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с $H_2O + 0,1\%$ муравьиной кислоты в метаноле + 0,1% муравьиной кислоты ($R^2 = 0,960$)
- Eclipse Plus C18 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле и Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле ($R^2 = 0,998$)

Указанные выше комбинации систем разделения были протестированы в системе для комплексного анализа методом 2D-ЖХ с полным градиентом, используемым во втором измерении, для определения комбинации, обеспечивающей максимальный фракционный охват двумерных хроматограмм для анализируемой пробы.

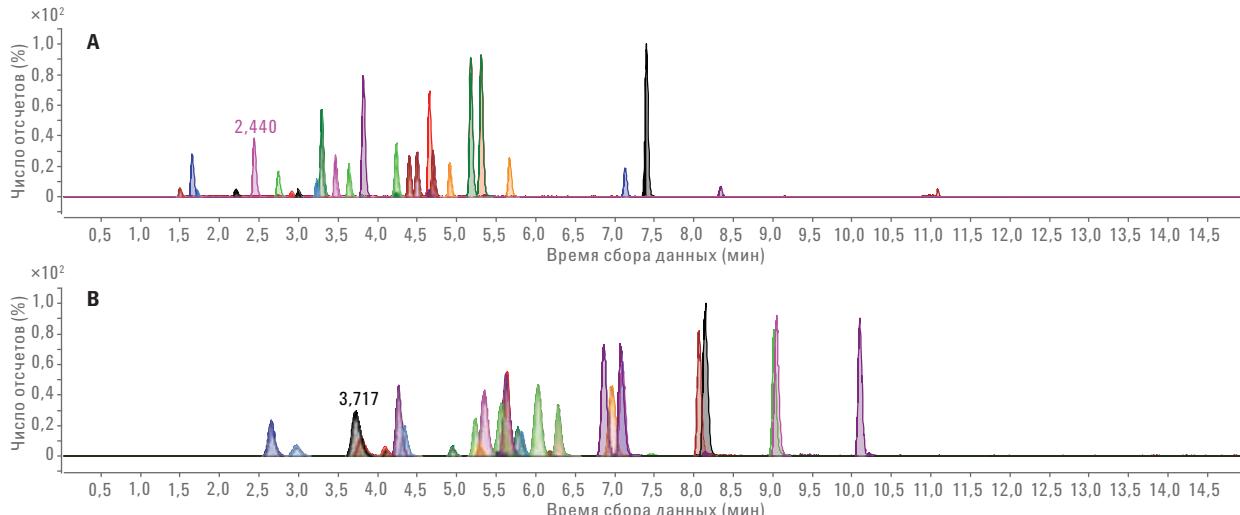


Рис. 2. Одномерный анализ пробы с концентрацией 0,9 мкг/мл с МС-детектированием; показаны хроматограммы идентифицированных соединений по выделенному иону; (A) Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле; (B) Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле.

В качестве средства определения фракционного охвата двумерных хроматограмм был выбран метод Гилара–Столла. Гилар с соавторами геометрически описал ортогональность двумерных систем путем построения зависимости нормализованных данных удерживания в двумерном пространстве разделения, разделенных на ячейки по размеру ширины пика в обоих измерениях. Ортогональность затем определяли из процента ячеек, занимаемого пиками⁹.

В модифицированном варианте подхода Гилара, предложенном Столлом, используется выбираемый пользователем размер ячейки и включаются пустые ячейки по периметру занятых ячеек. Он основан на предположении, что соединение может элюировать в этих пустых ячейках по периметру занятых ячеек, даже если для фактической анализируемой пробы это не так^{1,10}.

Для определения фракционного охвата для комбинаций систем разделения, протестированных в установке для комплексного анализа методом 2D-ЖХ, значения времени удерживания пиков, детектированных после двумерного разделения, были нанесены на график с размером ячеек, соответствующим средней ширине пика при 5с в первом (0,34 мин) и втором (0,6 с) измерении. Были подсчитаны ячейки в пределах периметра ячеек, занятых пиками. Затем

был рассчитан фракционный охват как процент включенных ячеек по сравнению с ячейками внутри полезного окна разделения. Полезное окно разделения было выбрано от 6 мин ($k = 2$) до конца градиента в первом измерении и от начала до конца градиента на 24 секунде во втором измерении. На рисунке 3 показаны хроматограммы и графики времен удерживания, используемые для определения фракционного охвата, полученные на системе для комплексного анализа методом 2D-ЖХ с колонкой Eclipse, PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле в первом измерении в сочетании с колонкой Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле во втором измерении, и наоборот. Для сравнения показаны также хроматограмма и график времен удерживания, полученные в системе для комплексного анализа методом 2D-ЖХ с колонкой Eclipse Plus C18 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле в первом измерении и колонкой Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с 10 мМ ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле во втором измерении. В таблице 1 приведен фракционный охват, определенный для всех комбинаций систем разделения, испытанных в системе для комплексного анализа методом 2D-ЖХ.

Как видно из таблицы 1, самое высокое значение фракционного охвата было получено для комбинации колонки ZORBAX

Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле и колонки Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле. Как и следовало ожидать, найденные значения фракционного охвата до некоторой степени коррелируют с коэффициентами корреляции, рассчитанными по результатам одномерного скрининга колонок и растворителей. Однако следует отметить, что при расчете коэффициентов корреляции в подборе первого измерения учитывались только некоторые компоненты пробы (пестициды и фталевые эфиры).

В двумерном испытании различных комбинаций систем разделения во втором измерении использовался полный градиент в диапазоне от 20 до 100% В. Это означает, что каждая фракция, введенная во второе измерение, подвергается одинаковому градиенту от 20 до 100% В. Полный градиент обеспечивает эффект подавления спектральной полосы при переходе от первого измерения ко второму, который приводит к очень узкой ширине пика во втором измерении. И наоборот, фракционный охват, как правило, бывает ниже, и соединения обычно распределяются по диагонали, так как соединения со слабым удерживанием в колонке с обращенной фазой в первом измерении, как правило, будут демонстрировать слабое удерживание и в колонке с обращенной фазой во втором измерении. Для данной

Таблица 1. Фракционный охват полезного двумерного пространства разделения для комбинаций систем разделения, испытанных в системе для комплексного анализа методом 2D-ЖХ.

Колонка и подвижная фаза для первого измерения	Колонка и подвижная фаза для второго измерения	Фракционный охват (%)
Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	17,2
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле	18,4
Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	Agilent ZORBAX RRHD Bonus RP с H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота в метаноле + 0,1% муравьиная кислота	13,0
Agilent ZORBAX RRHD Bonus RP с H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота в метаноле + 0,1% муравьиная кислота	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	14,6
Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота в метаноле + 0,1% муравьиная кислота	10,2
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с H ₂ O + 0,1% муравьиная кислота в метаноле + 0,1% муравьиная кислота	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	14,9
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	9,6
Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле	8,0

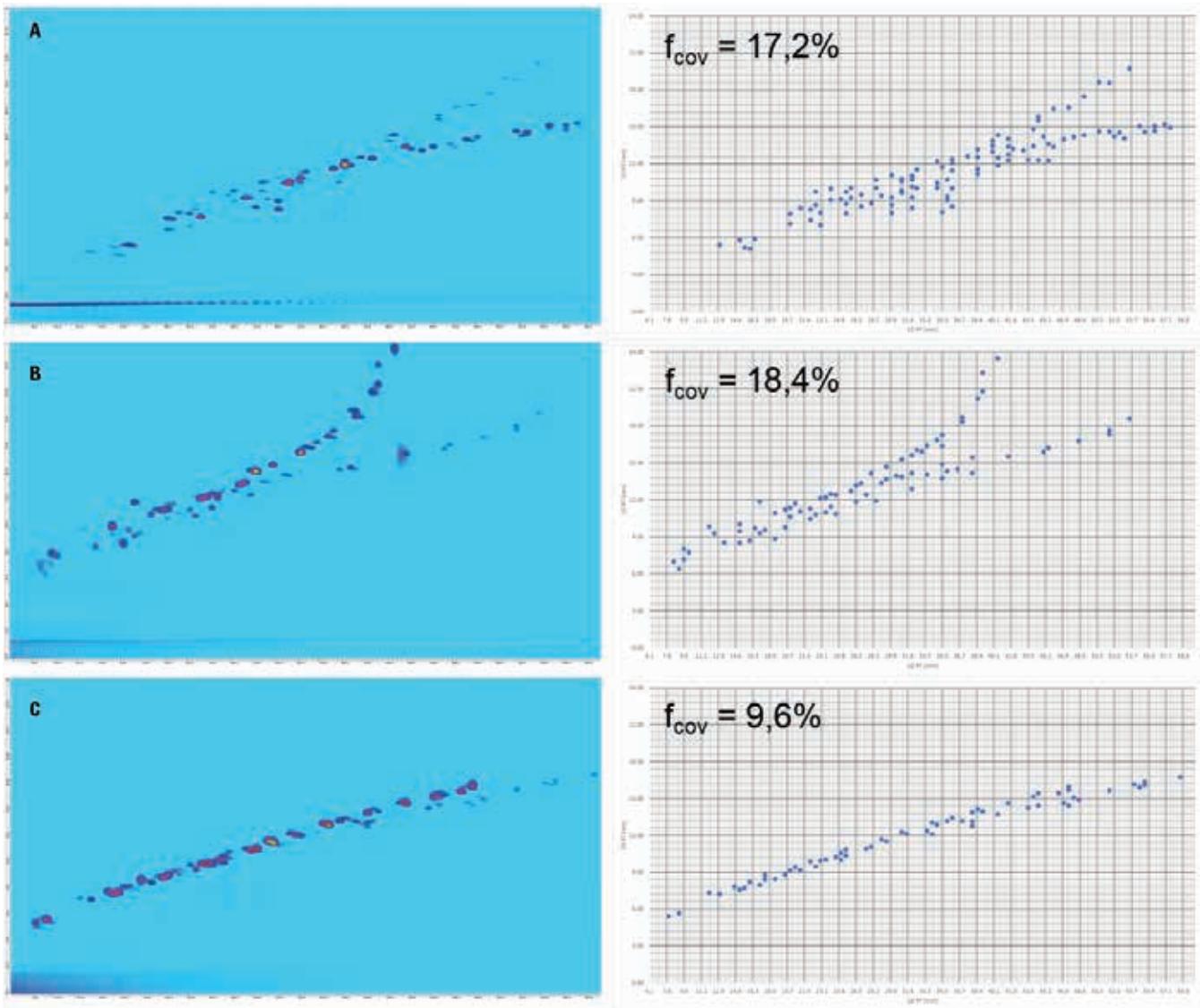


Рис. 3. Хроматограммы 2D-ЖХ со спектрофотометрическим детектированием при 220 нм и графики времен удерживания различных комбинаций систем разделения, испытанных в системе для комплексного анализа методом 2D-ЖХ: (А) 1D: Agilent ZORBAX RRHT Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле, 2D: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле; (В) 1D: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле, 2D: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле; (С) 1D: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле, 2D: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus Phenyl-Hexyl с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле.

комбинации систем разделения фракционный охват может быть увеличен за счет использования смещенного градиента во втором измерении^{2,11}. Использование смещенного градиента означает, что градиент во втором измерении непрерывно изменяется с увеличением времени удерживания в первом измерении таким образом, что каждая фракция вводимая в колонку второго измерения испытывает более пологий и несколько иной градиент.

После разработки смещенного градиента для комбинации колонок Eclipse PAH с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле в первом измерении и Eclipse Plus C8 с 10 мМ раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле во втором измерении фракционный охват может быть увеличен. Но в этом случае снижение эффекта подавления спектральной полосы в результате увеличения процентного содержания органики в начале градиента

второго измерения, испытываемое полициклическими ароматическими углеводородами, элюирующими позже из колонки первого измерения, Eclipse PAH, приводит к широким пикам этих соединений во втором измерении (данные не показаны). Как правило, для достижения лучшего эффекта подавления спектральной полосы выгодно разместить более гидрофобную колонку во втором измерении².

Для комбинации колонок Eclipse Plus C8 с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле в первом измерении и Eclipse PAH с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле во втором измерении для увеличения фракционного охвата был разработан смещенный градиент, показанный на рис. 4.

На рис. 5 показана хроматограмма, полученная в результате заключительного комплексного анализа методом 2D-ЖХ с использованием колонок Eclipse Plus C8 с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле в первом измерении и Eclipse PAH с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле и смещенным градиентом во втором измерении. Для определения фракционного охвата была выбрана сетка с размером ячеек 0,41 мин в первом измерении и 2,5 с во втором измерении (средняя ширина пика при

5σ). Увеличение ширины пиков во втором измерении можно объяснить более плавным градиентом, испытываемым отдельными фракциями, введенными в колонку второго измерения при использовании смещенного градиента. Благодаря применению смещенного градиента второго измерения возможно значительное увеличение фракционного охвата более чем до 50% и разделение компонентов пробы с частичным или полным совместным элюированием.

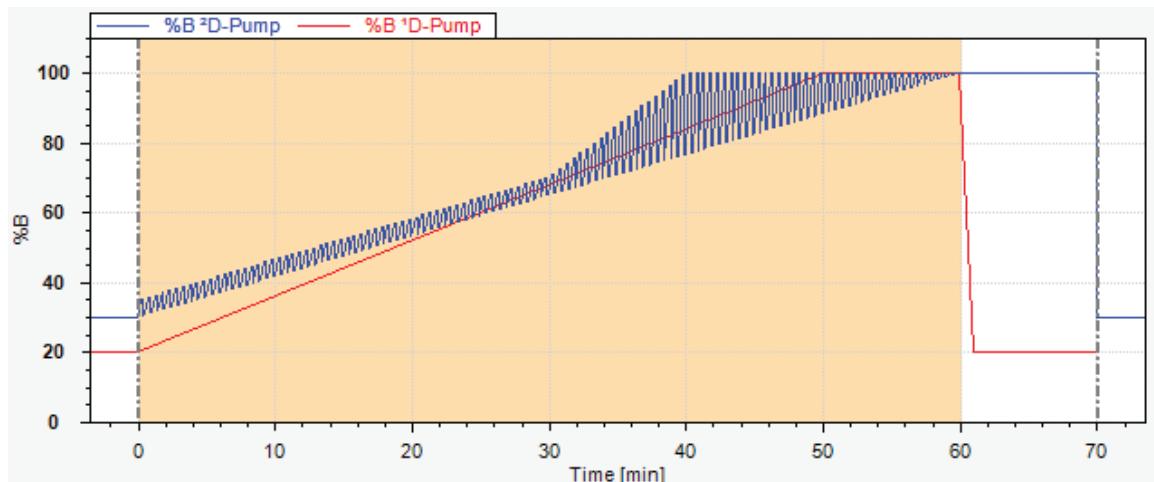


Рис. 4. Смещенный градиент, разработанный для разделения во втором измерении комплексного анализа методом 2D-ЖХ с использованием колонок Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле в первом измерении и Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле во втором измерении.

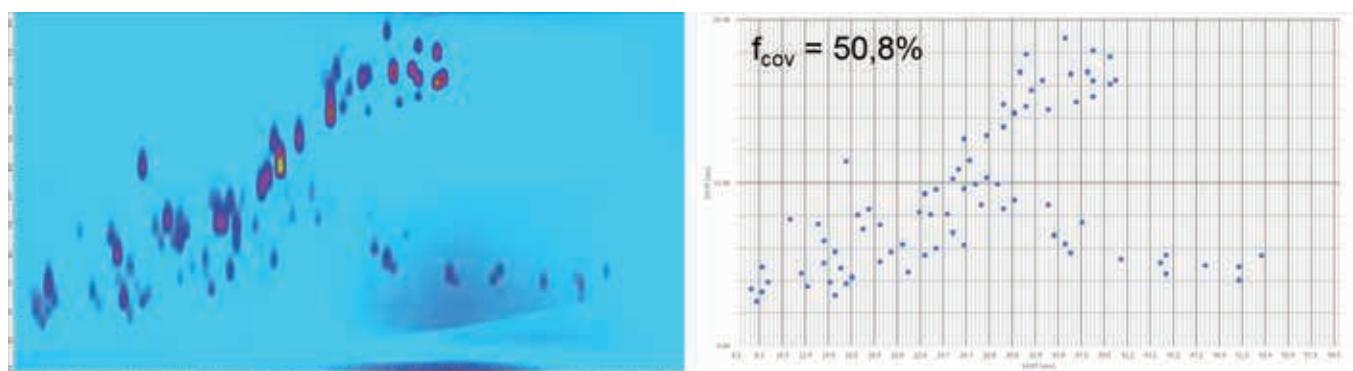


Рис. 5. Хроматограммы 2D-ЖХ со спектрофотометрическим детектированием при 220 нм и графики времени удерживания, полученные путем комплексного анализа методом 2D-ЖХ с использованием колонок Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8 с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в ацетонитриле в первом измерении и Agilent ZORBAX RRHD Eclipse PAH с 10 mM раствором ацетата аммония при pH 5 в метаноле во втором измерении.

Выводы

Комплексный анализ методом 2D-ЖХ имеет высокий потенциал для анализа проб сложного состава, благодаря более высокой разделительной способности по сравнению с традиционной (1D) ВЭЖХ. Наиболее часто используемая комбинация режимов разделения в комплексной двумерной жидкостной хроматографии представляет собой комбинацию из двух систем с использованием обращенной фазы (RPLC×RPLC). Чтобы в полной мере использовать достижимое преимущество в разделительной способности по сравнению с традиционной ЖХ, важно, что и в первом и втором измерении используются системы ортогонального разделения. Классификация колонок с обращенной фазой в соответствии с их селективностью, выполненная с использованием модели гидрофобного вычитания, предполагает средство для выбора колонок ОФ с различной селективностью. В подборе колонок и растворителей первого измерения может быть оценена относительная селективность двух разделительных систем для заданной пробы по корреляции коэффициентов удерживания. Для сравнения ортогональности различных комбинаций систем разделения в системе комплексного анализа методом 2D-ЖХ может быть использован фракционный охват итоговой хроматограммы 2D-ЖХ. Для заданной комбинации систем разделения возможно значительное увеличение фракционного охвата за счет использования смещенного градиента во втором измерении.

Литература

- Rutan, *et al.* Fractional coverage metrics based on ecological home range for calculation of the effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations, *J. Chromatogr. A* **2012**, 1255, 267–276.
- Li, *et al.* Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 153–167.
- Vanhoenacker, *et al.* Increasing Peak Capacity with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-6123EN, **2015**.
- Giddings. Two-dimensional separations: concept and promise, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1258A–1260A, 1262A, 1264A *passim*.
- Carr, Stoll. Two-Dimensional Liquid Chromatography; Principles, Practical Implementation and Applications, *Agilent Technologies Primer*, publication number 5991-2359EN, **2015**.
- Graesbøll, *et al.* Using the hydrophobic subtraction model to choose orthogonal columns for online comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2014**, 1326, 39–46.
- Allen, *et al.* Impact of reversed phase column pairs in comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2014**, 1361, 169–177.
- Bassanese, *et al.* Protocols for finding the most orthogonal dimensions for two-dimensional high performance liquid chromatography, *Talanta* **2015**, 134, 402–408.
- Gilar, *et al.* Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6426–6434.
- Davis, *et al.* Dependence of effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations on the distribution of peak capacity between the two dimensions, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 8122–8134.
- Li, Schmitz. Use of Shift Gradient in the Second Dimension to Improve the Separation Space in Comprehensive Two-dimensional Liquid Chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 6511–6517.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без
предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Опубликовано в США 1 февраля 2016 г.
5991-6542RU



Agilent Technologies