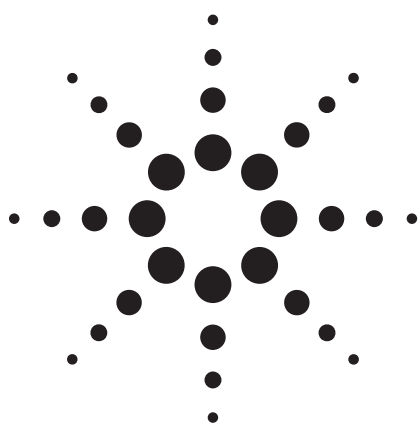


安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱分离雌激素的特殊选择性



应用

制药、环境

作者

John W. Henderson Jr. and William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

用一种新的 ZORBAX 固定相, Agilent ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基, 分离了 5 种雌激素类甾体化合物, 由于其对含苯基的化合物具有独特的选择性, 在同样条件下的分离结果优于 C18 柱和三种其它苯基柱。比较的结果说明, 选择性是优化分离度(使色谱峰完全分离)的最重要因素。选择性可以通过更换不同固定相的色谱柱改变, 因此, 方法开发时使用各种色谱柱(固定相)将增加发现最佳 HPLC 方法的机会。Eclipse Plus 苯基-己基固定相采用改性硅胶、封端和键合技术、苯基己基与分析物芳香基团发生分子间相互作用, 这些特点使 Eclipse Plus 苯基-己基柱成为方法开发人员必备的色谱柱。

前言

反相液相色谱方法开发策略包括改变流动相的有机相比例, 通常为甲醇和乙腈; 如果分析物是离子型化合物, 则可以改变流动相的水相 pH, 以及流动相的洗脱梯度。

其它可变因素, 如温度和流动相离子强度也可以有效地改变分离度。更换色谱柱也是常用的方法, 如果有更多的固定相可以选择, 以及拥有仪器自动化功能, 包括配备柱切换阀和液相色谱方法开发软件, 将使色谱柱考察更加方便 [1]。

要获得最佳分离度, 并开发最好的方法, 尝试各种固定相非常重要, 因为选择性是分离度方程中的一项重要因子[2]。选择性的改变比增加柱效(N)或保留(k')对分离度的影响更大。

方法开发人员要通过更换色谱柱使选择性差异最大化, Eclipse Plus 苯基-己基柱就是对必备系列色谱柱的最好补充, 其原因如下: 使用超密键合和双封端技术使 Eclipse Plus 柱具有卓越的柱效。Eclipse Plus 柱还采用了高性能硅胶、新封端试剂和独特的键合工艺, 优化了硅胶。固定相的苯基增进了与芳香族分析物的分子间相互作用, 从而增加了另一种保留机制, 并提高了选择性。而且, 固定相链接的己基在固定相的整个保留特性中也发挥了重要的作用。

这里, 我们将说明 ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基与 ZORBAX Eclipse Plus C18 相比, 在分离带苯基的雌激素类化合物中对提高选择性的贡献。虽然还不能说这两种截然不同的固定相有不同的选择性, 我们还将 Eclipse Plus 苯基-己基与其它苯基柱进行了比较, 发现分离度方面有类似改变。



Agilent Technologies

虽然在这里苯基-己基固定相是最佳选择，但包括烷烃 (C18、C8 和 C3)、苯基和其它类型的固定相 (如氰基、氨基链接) 在方法开发方面都有优势，因为每个方法的需求不同，固定相的选择性很难预测，最好由实验决定。

实验

色谱柱的比较在 Agilent 1200 高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统上进行：

- G1312B 二元泵，流动相 A：水，B：甲醇；流速：1 mL/min (40:60 A:B)
- G1376C 自动液体进样器 (ALS)，进样体积 3 μ L
- G1316B 温控柱温箱 25 $^{\circ}$ C
- G1315C 二极管阵列检测器 (DAD)，检测波长 220 nm，配置 G1315-60025 流通池 (6-mm 光程，5 μ L 体积)，响应时间设置 1 s

色谱柱：

- ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基 4.6 mm x 100 mm, 5 μ m，部件号 959996-912
- ZORBAX 快速分离 Eclipse Plus Phenyl- Hexyl 4.6 mm x 100 mm, 3.5 μ m，部件号 959961-912
- ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus 苯基-己基 4.6 mm x 100 mm, 1.8 μ m，部件号 959964-912
- ZORBAX 快速分离 Eclipse Plus C18 4.6 mm x 100 mm, 3.5 μ m，部件号 959961-902
- 某知名品牌苯基柱，均为 4.6 mm x 100 mm, 5 μ m，球形硅胶

其它来源的色谱柱没有 3.5 或 1.8 μ m 规格的，因此，直接用 5 μ m 色谱柱进行选择比较。

使用手紧接头 (安捷伦部件号 5065-4426[10/pkg]) 将色谱柱自柱温箱直接接入 DAD 流通池，轻松安装和拆卸。

样品瓶：棕色螺口瓶 (安捷伦部件号 5182-0716)

样品瓶盖：蓝色螺口盖 (安捷伦部件号 5282-0723)

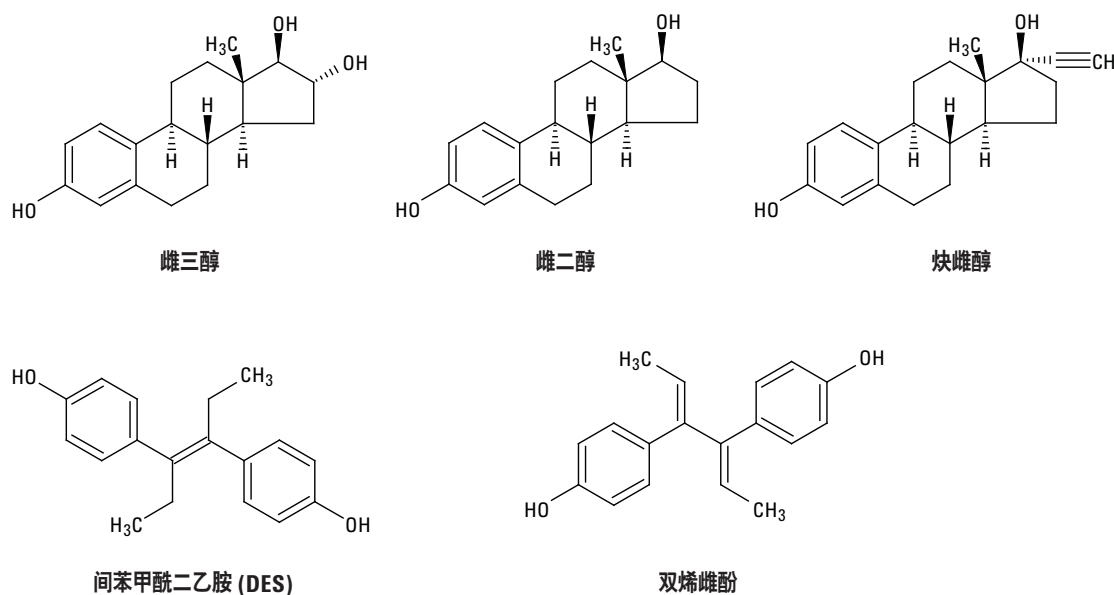


图 1. 本研究所分析的雌激素高度共轭

5 种雌激素类分析物购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO), 用甲醇溶解配制成约 0.5 mg/mL 的溶液。再各取 50 μL 雌激素溶液配制成混合样品, 并取用 250 μL 混合物用 750 μL 水稀释。分析物的名称和结构见图 1。

结果与讨论

要对各种固定相进行比较, 除色谱柱以外的所有色谱参数应保持恒定。用甲醇代替乙腈作为有机改性剂, 因为在甲醇中能增强苯基的分子间相互作用[3]。等梯度流动相比例为 60% 甲醇和 40% 水。

尽管不完全对, 烷烃键合相, 如 C18, 可能与苯基相具有不同的选择性, 并最终导致不同的分离度。图 2 就说明了这一点。但有趣的是, 用 C18 柱分离度都不高, 即使使用更小粒径的色谱柱 (3.5 vs. 1.8 μm)。同样柱长的色谱柱, 粒径越小, 柱效越高。尽管 C18 柱在柱效上有明显的优势, 但也不足以媲美苯基己基柱在雌激素分离中的选择性优势。

色谱柱的柱效 (N) 可用下式计算:

$$N = L/H$$

柱长(L)除以塔板高度, H (大概相当于两个粒径的长度)。因此 5- μm 柱的理论柱效大约为 $N = 100,000 \mu\text{m}/(2) (5 \mu\text{m}) = 10,000$ 。快速分离 (3.5 μm) 柱 $N = 14,300$, 或高 30%。

由图 2 可见, Eclipse 苯基-己基更好。用 3.5-或 1.8- μm Eclipse Plus 苯基-己基柱可以从两方面对方法进行进一步优化: 其一是使用同样长度但粒径更小的色谱柱, 得到更高的柱效 (更窄带宽、更高灵敏度和分离度), 其二是使用更小粒径但更短的色谱柱, 在保持色谱性能的同时缩短分析时间。

可以预测各种苯基柱之间的选择性差异不如与 C18 柱相比明显, 但对于这些雌激素化合物的分析来说, 我们发现选择性差异非常明显。用 4 种不同苯基柱分析雌激素的结果见图 3。由图 2 可见, Eclipse Plus C18 能够部分分离所有 5 种雌激素, 但在图 3 中, 两个苯基柱在同样条件下只能分离 5 个雌激素中的 4 种。正像所有 C18 柱都不尽相同一样, 苯基柱也有差别。主要差异包括硅醇基封端、苯基链接 (如己基、乙基和丙基)、% 碳载量以及硅胶特性等。这些性质组合在一起, 使 Eclipse Plus 苯基-己基在对雌激素的分离中得到了比其它四种苯基柱更好的分离度。

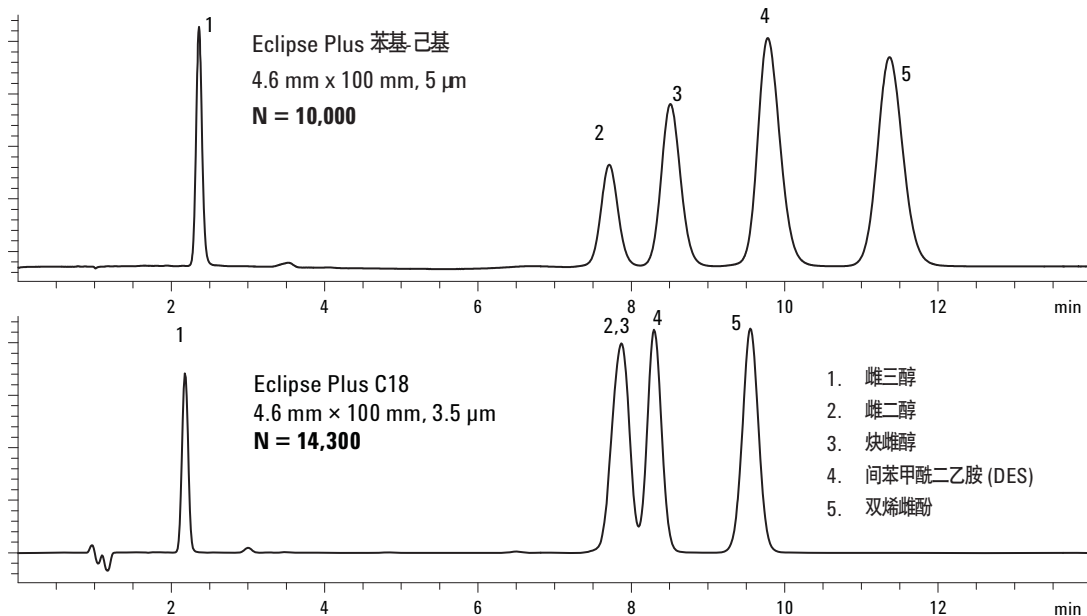


图 2. 虽然 3.5 μm 柱柱效提高了 30%, 但色谱柱选择性对分离度的影响更大

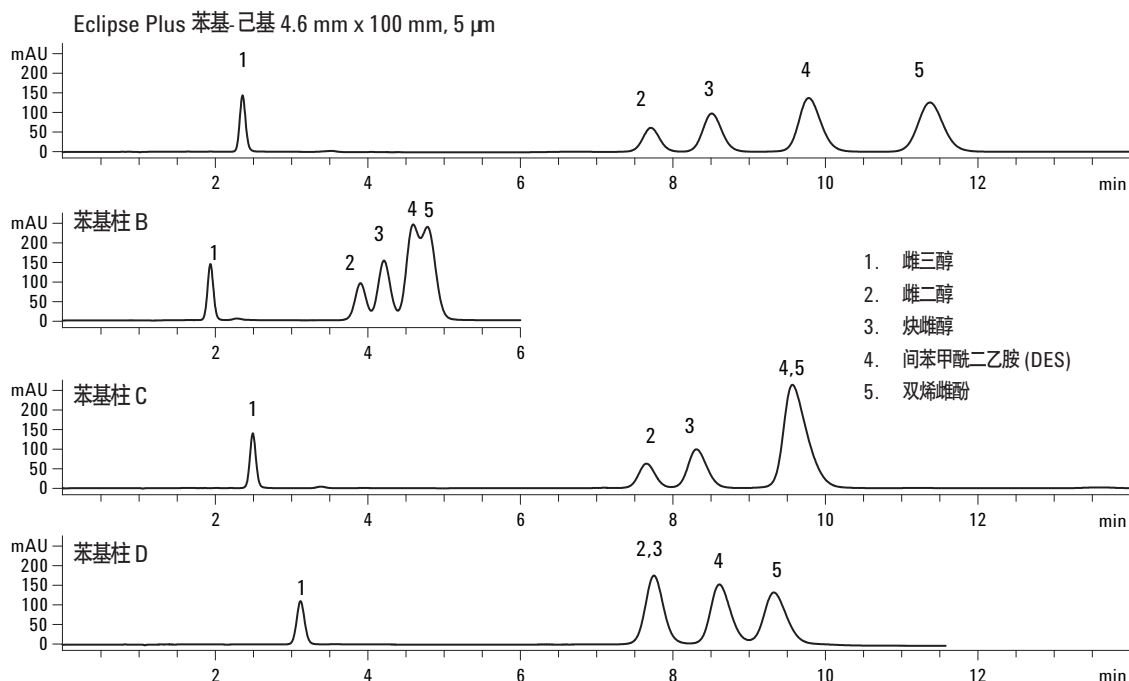


图3. 苯基柱之间的不同选择性

结论

Eclipse Plus 系列 HPLC 柱, 包括 Eclipse Plus 苯基-己基柱, 改进了硅胶生产和键合技术, 是改变选择性和迅速改善色谱分离的重要色谱柱。预测不同固定相之间的选择性差异常常不是件容易的事, 因此, 优化固定相应通过实验来确定。Eclipse Plus 苯基-己基柱与 Eclipse Plus C18 柱相比, 在选择性上呈现了较大差异, 但在雌激素的分析中与其它几种苯基类商品柱相比也有很大差异。除改善了硅胶生产和键合技术以外, Eclipse Plus 苯基-己基柱苯基-己基交联键合相与芳香族雌激素之间独特的分子间相互作用, 也是其能够成为雌激素分析首选色谱柱的原因。

参考文献

1. “Automated Method Development Using Agilent 1100 Series HPLC Systems, ChemStation, and ChromSword Software,” 安捷伦出版物 5988-8927EN

2. V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth Ed., p.34. Wiley, 2004
3. M. Yang, et al., “Impact of Methanol and Acetonitrile on Separations Based on π - π Interactions with Reversed Phase Phenyl Column” *J. of Chromatography*, 1097, 124–129, 2005

更多信息

如果需要了解有关我们产品和服务的更多信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦公司对本材料中可能存在的错误或有关提供、展示或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本文中的信息、说明和规格, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2008

中国印刷
2008年7月11日
5989-9130CHCN



Agilent Technologies