



使用 100%的水相流动相与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 苯基己基柱和其他 ZORBAX 苯基柱分析极性化合物

应用报告

药品和食品

作者

William J. Long, Anne E. Brooks,
and William Biazzo
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

使用高效液相色谱法分析极性化合物（如酸或碱），通常需要用到离子对试剂或亲水作用（HILIC）色谱柱。本研究中，证明了在苯基柱上使用 100%水相流动相不会发生固定相塌陷。本文研究了不同的 Agilent ZORBAX 苯基固定相（StableBond SB-苯基、Eclipse XDB-苯基和 Eclipse Plus 苯基-己基）对于脂肪酸和儿茶酚胺类（碱性化合物）的选择性。另外，这些化合物的选择性差异进一步显示了流动相添加剂的作用。



Agilent Technologies

前言

使用反相液相色谱法通常很难对极性化合物（如酸或碱）进行分离。在高 pH 条件下，碱性化合物由于不带电荷而容易得到保留。然而，有些情况下，样品中可能存在高 pH 条件下不易分离的其他化合物。另一种可能的解决办法是使用离子对试剂以促进保留。但是，一般离子对试剂不适用于质谱仪。酸性化合物也是难以分离的样品，甚至很难产生保留行为。通常，有必要在低于化合物 pKa 值的条件下工作，此时化合物完全质子化（不带电荷），并且要求降低流动相中的有机相含量[1]。对于如 C8 或 C18 固定相等烷基色谱柱，使用有机相比例较低的流动相时，存在保留行为差或不易重现的问题。烷基色谱柱的一个独有特性是不易产生“反湿润”现象（或称固定相塌陷）[2]。当使用 100%水相流动相时，烷基柱可能是个不错的选择。本文将给出在 100%水相条件下对碱性和酸性化合物的分离结果。

碱性化合物儿茶酚胺是一类神经递质。这类物质缺乏或过多都可能改变对身体功能的控制。已有研究表明儿茶酚胺水平的改变与某些病理状态的诊断有关[3]。

酸及其盐类在食品中应用广泛，包括以下功能：调味，以提供理想的味道；控制 pH 值，延缓微生物生长；螯合可导致脂肪氧化的金属离子（铜，铁）；减少某些水果和蔬菜的颜色和纹理变化；以及通过改变果胶或蛋白质制成的凝胶以改变食品的质地[4]。

实验部分

在 Agilent 1200 系列高分离快速液相色谱（RRLC）系统上运行 HPLC 分析：

- G1312B SL 型二元泵，流动相 A 通道仅有水中的流动相改性剂发生变化，流速 1 mL/min
- 1376C SL 型自动液体进样器（ALS），进样量 5 μ L
- G1316B SL 型柱温箱，柱温 25 $^{\circ}$ C
- G1316C 二极管阵列检测器（DAD）以及 G1315-60024 微量流通池（5 mm 光程，6 μ L 容量），儿茶酚胺的检测波长设置为 268,4 和 360,50 nm；酸性化合物的检测波长设置为 220,4 和 360,50 nm

ZORBAX 色谱柱

- Eclipse Plus 苯基-己基柱 4.6 mm $\times$ 100 mm, 5 μ m (部件号 959996-912)
- Eclipse 苯基柱 4.6 mm $\times$ 100 mm, 5 μ m (定制)
- StableBond (稳定键合) 苯基柱 4.6 mm $\times$ 100 mm, 5 μ m (定制)
- Eclipse Plus 苯基-己基柱 4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μ m (部件号 959961-912)
- Eclipse 苯基柱 4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μ m (部件号 963967-912)
- StableBond 苯基柱 4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μ m (部件号 863953-912)

化学试剂及材料

18 M Ω Milli-Q 纯水现场制备。甲酸、三氟乙酸（TFA）和乙酸购自 Sigma Aldrich (Bellfonte, PA)。儿茶酚胺类化合物肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺、左旋多巴和酪氨酸也购自 Sigma Aldrich (Bellfonte, PA)，将其分别用水制成 1 mg/mL 的溶液后混合成最终浓度为 0.2 mg/mL 的溶液。L-(+)-酒石酸、DL-苹果酸、DL-乳酸、乙酸、柠檬酸和丙酸分别用水溶解并制成 1 mg/mL 的溶液，然后混合成最终浓度为 0.2 mg/mL 的溶液。所有化合物分别单独进样，以确定峰位和杂质。这些化合物的结构和 pKa 值见图 1。

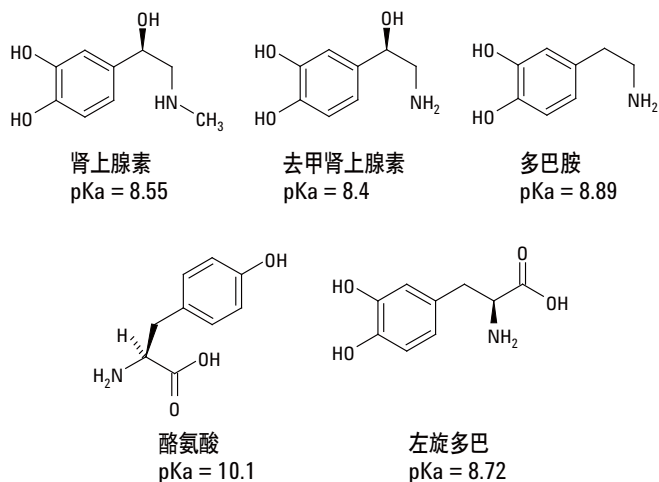


图 1a. 儿茶酚胺类化合物的结构式及 pKa

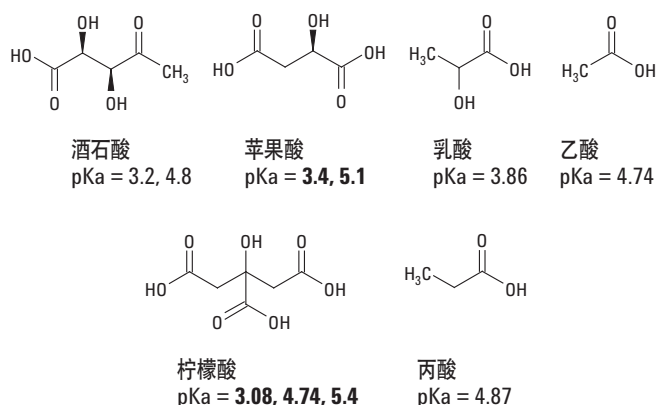


图 1b. 脂肪酸的结构式及 pKa

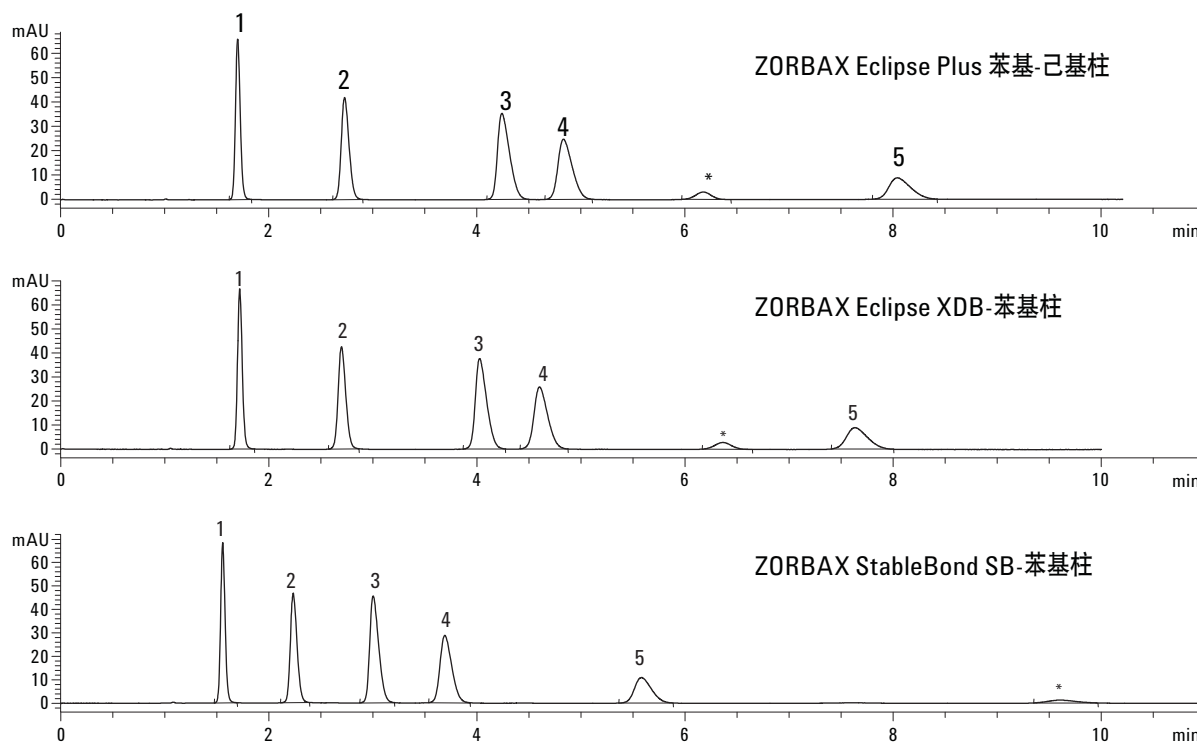
结果与讨论

ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱和 Eclipse XDB 苯基柱（一种乙基苯基固定相）给出了非常接近的分离结果（见图 2）。对于混合溶液中的大多数组分，更多地表现为相似的分离效果。最为显

著的例外是酪氨酸，在苯基-己基柱上的保留稍有增强，可能的原因是由于它的取代基较长，或是碳载率较高（9.5 vs. 7%）。StableBond SB-苯基柱虽然含有暴露的硅醇基，但是由于其保护基团较大，因此仍然具有较好的选择性，大部分峰以相同的顺序洗脱，仅有杂质峰和酪氨酸的出峰顺序交换了位置。保留时间最长且最后洗脱的杂质峰所处的位置极有利于分离。然而，通常，与封端的乙基苯基柱或 Eclipse XDB-苯基柱相比，色谱峰在 StableBond SB-苯基柱中的保留较弱。

图 3 显示了使用 Eclipse Plus 苯基-己基柱在不同酸性流动相下的运行结果。这些待测化合物的 pKa 值见图 1。由于这些化合物均为胺类，可以看出流动相的改变对分离结果的影响。值得注意的是，即使所有这些化合物均为弱碱，在浓度较高的三氟乙酸（TFA）流动相中仍然具有很强的保留。

图 3 中保留时间的变化可以有多种解释。如果我们对一组化合物的 pKa 进行进一步的研究，通常会发现化合物越是偏向电中性，



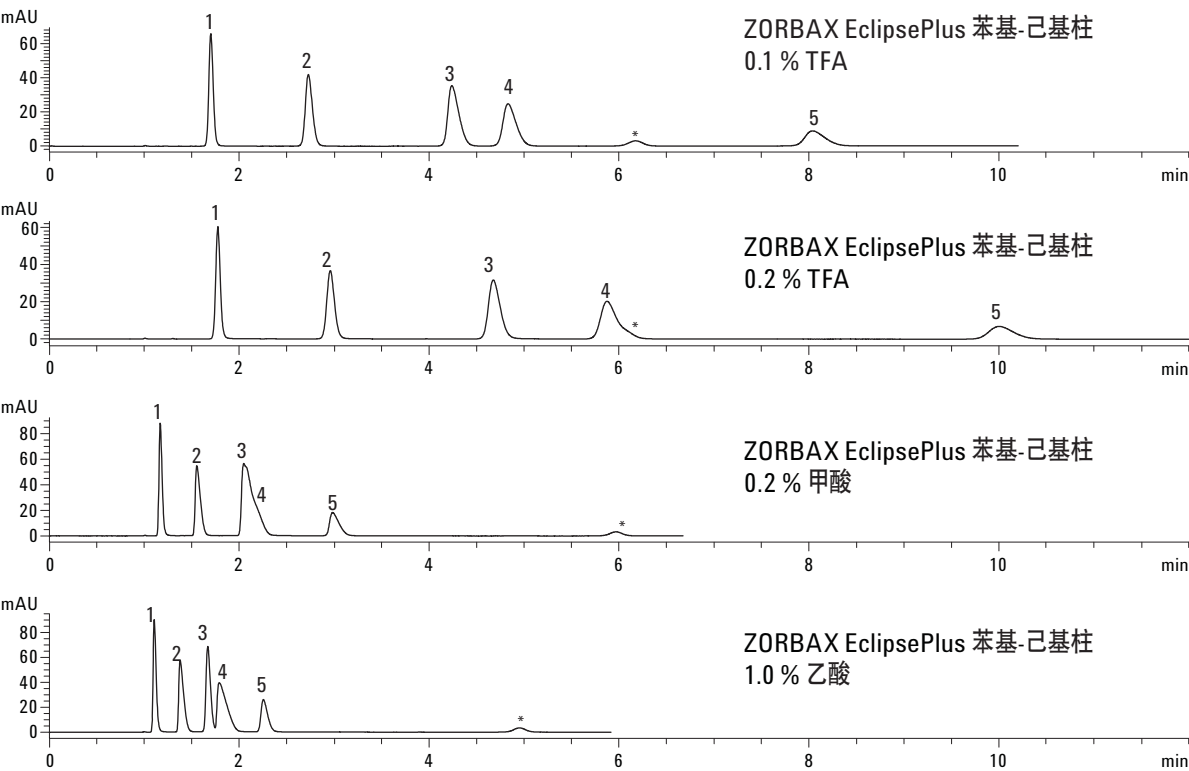
去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺、左旋多巴、杂质*、酪氨酸（浓度均为 0.2 mg/mL），进样量 5 μ L，4.6 mm $\times$ 100 mm，5 μ m 色谱柱。
流动相 = 0.1% TFA 水溶液，1 mL/min，265nm。

图 2. 比较 0.1% TFA 流动相下 ZORBAX 苯基柱的选择性

越易于保留。不带电荷的化合物比带电荷化合物更易于保留[5,6]。另一种解释是离子对作用。TFA 和甲酸通常被称为离子对试剂，而乙酸不是。可以看出，添加 TFA 能够促进保留。用两种磷酸盐缓冲液进行进一步的实验，如图 4 所示，较低的 pH 条件下有更好的保留，但是仍然比不上使用 TFA 流动相时的保留 [7,8]。

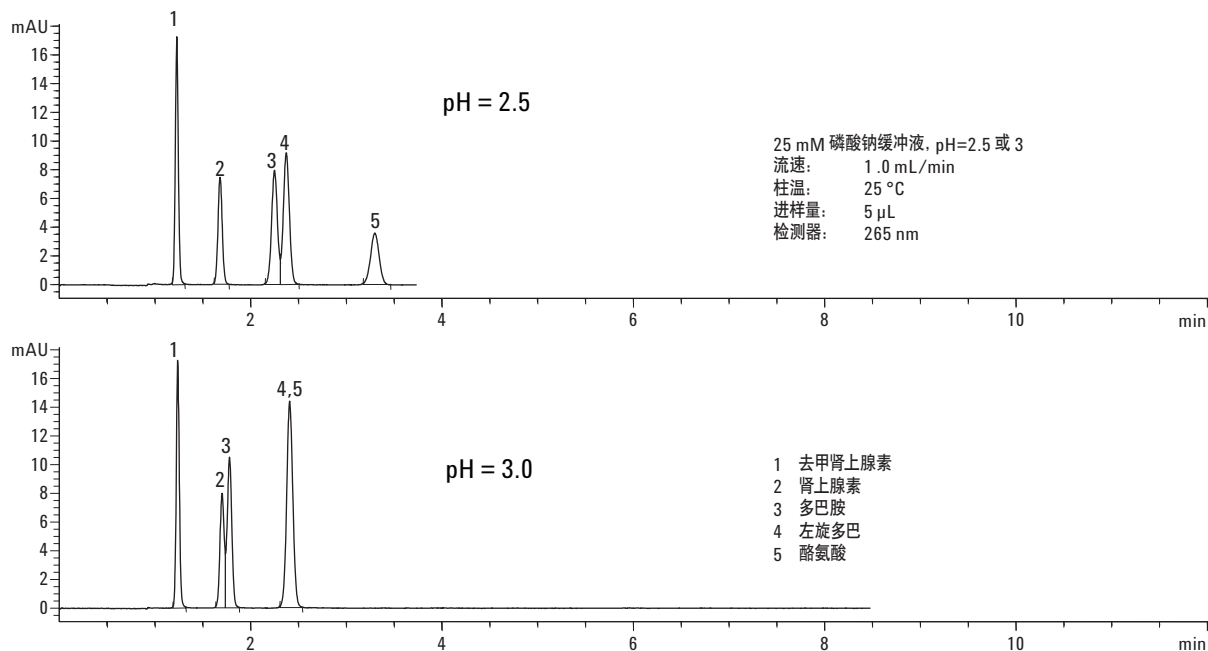
图 5 中，苯基-己基柱和苯基-乙基柱使这些脂肪酸得到了良好的分离。这表明，对于强极性化合物的分离，苯基柱是一种不错的

选择。ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱具有较长的烷基键合基团，其亲脂性比乙基苯基 Eclipse XDB-苯基柱或 Stable-Bond SB-苯基柱更强。另外，如选择的 pH 条件低于脂肪酸 pKa 值，即能够将这些脂肪酸完全分离。如图 5 所示，酸性化合物在亲脂性更强的 Eclipse Plus 苯基-己基柱上得到了更好的保留；然而，事实上，Eclipse XDB-苯基柱具有最佳分离，能把所有化合物分开。这在图 5 中可以看出，各个化合物的色谱峰之间几乎没有重叠。



去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺、左旋多巴、杂质*、酪氨酸 (浓度均为 0.2 mg/mL)，进样量 5 μ L，4.6 mm $\times$ 100 mm，5 μ m 色谱柱。
流动相 = 0.1% TFA 水溶液，1 mL/min，265 nm。

图 3. 比较 0.1% TFA 流动相下 ZORBAX 苯基-己基柱的选择性



去甲肾上腺素、肾上腺素、多巴胺、左旋多巴、杂质*、酪氨酸 (浓度均为 0.2 mg/mL), 进样量 5 µL, 4.6 mm × 100 mm, 5 µm 色谱柱。
 流动相 = 0.1% TFA 水溶液, 1 mL/min, 265 nm。

图 4. 使用 ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱比较流动相的选择性 (非离子对)

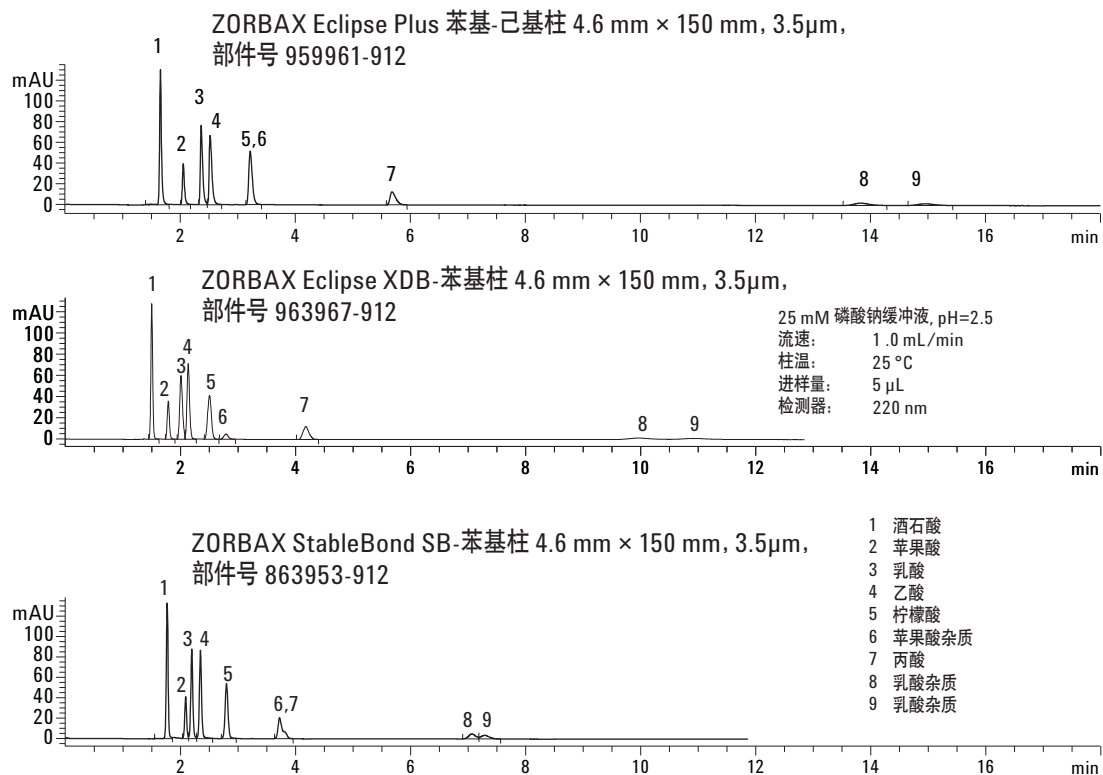


图 5. 使用 ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱和 25 mM 磷酸钠缓冲液分析脂肪酸, 比较流动相的选择性

本文报道了使用 100%水相流动相的分离结果。ZORBAX 苯基柱一个不太为人所知的特点是在高比例水相流动相条件下的分离能力。在一些应用中，有必要使用非极性 C18 固定相保留和分离极性被分析物。这时，通常要求流动相中的水相或缓冲溶液比例较高，以达到预期的分离效果。许多极性被分析物在反相色谱柱中无法得到很好的保留，除非洗脱溶剂中有机相的含量极低 (<5%)。

C18 反相色谱柱上的键合相使其表面具有高度的疏水性。如前所述降低流动相中有机相的比例可能导致被分析物保留行为的长期

损害（或暂时的暂停流动）。这种现象常被称为反湿润、保留损耗，或更通俗地叫做固定相塌陷[2]。反湿润的发生是不可预知的，但是如果停止洗脱剂在色谱柱中的流动可以引发这一后果。图 6 显示了反复地在两次进样之间停止流动 30 分钟所产生的后果。Eclipse Plus 苯基-己基柱轻松通过了这一测试。在四个停止流动测试周期内，未发现明显的保留时间或峰形变化。参考文献 2 所报告的研究工作中，在使用水溶性维生素（烟酸）作为测试样品时，StableBond SB-苯基柱显示了很好的性能。

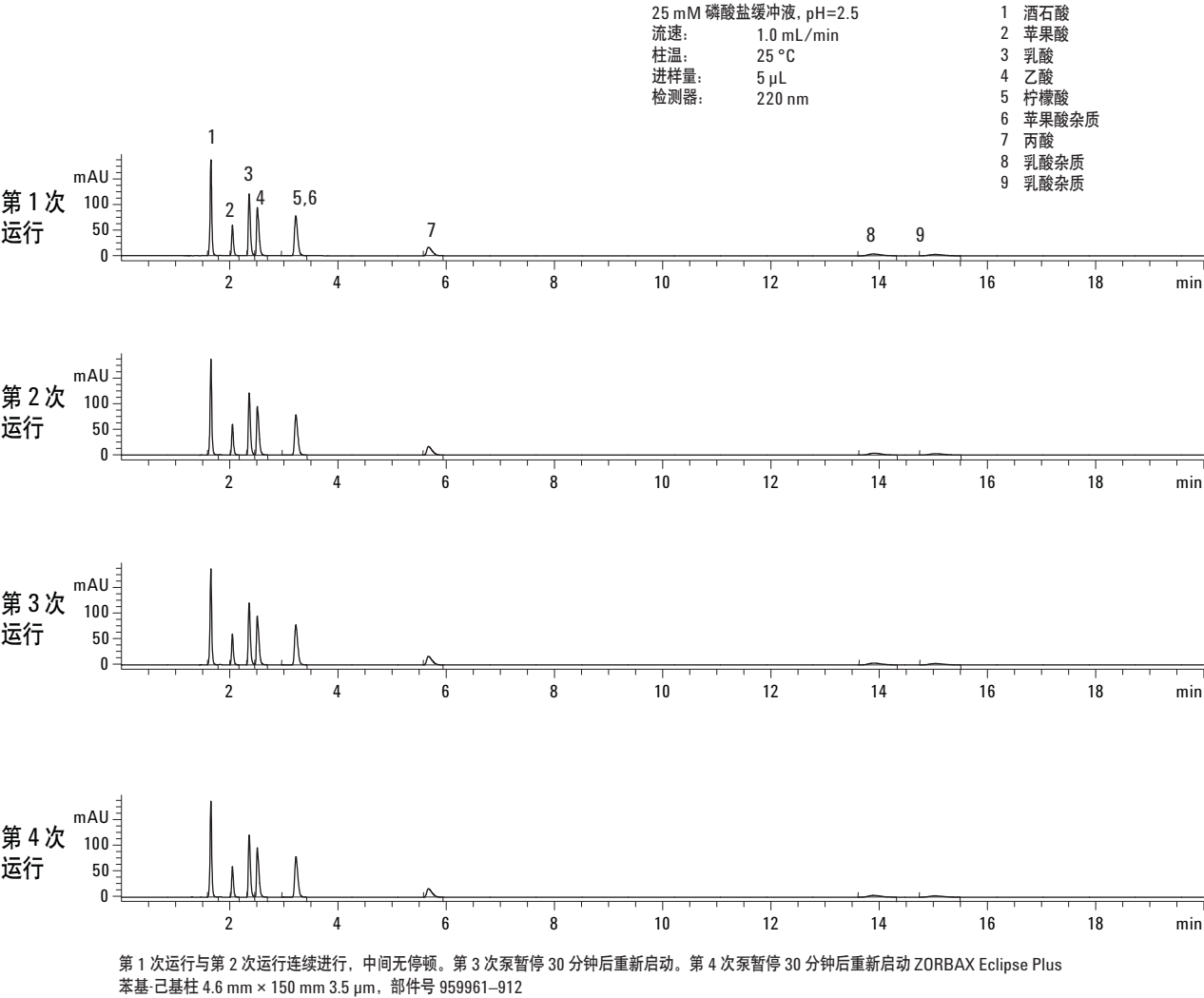


图 6. 反湿润耐受性试验

结论

使用 ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱、Eclipse XDB-苯基柱和 StableBond SB-苯基柱获得的分离效果可以在大多数的商用 HPLC 系统中得到实现。为了适合大多数研究人员的需要，可以对本文所述方法进行简单改变。该方法易于实施，并且不需要复杂的流动相组成。这些苯基柱对于酸性和碱性化合物具有不同的选择性和保留效果，并且不会引发固定相塌陷。

参考文献

1. L. R. Snyder, J. L. Glajch, and J. J. Kirkland, Practical HPLC Method Development Second Edition, John Wiley and Sons, 1997.
2. B. A. Bidlingmeyer and A. D. Broske, "The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 42, February 2004.
3. "Plasma Catecholamines: Their Measurement and Clinical Utility," *Lab Med*, 30, 512–516.
4. Self-Teaching Guide for Food Acidulants Bartek Corporation, <http://www.bartek.ca/pdfs/SelfTeachingGuide/STG.pdf>
5. W. Long and J Henderson, "Separation of Salicylic Impurities with Different Acid Mobile Phase Modifiers," January 2008, Agilent Technologies publication 5989-7731EN.
6. U. D. Neue, K. V. Tran, A. Mendezb, and P. W. Carr, "The Combined Effect of Silanols and the Reversed-Phase Ligand on the Retention of Positively Charged Analytes," *Journal of Chromatography A*, 1063 (2005) 35–45.
7. *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*, Wiley Interscience, 2007.
8. Evaluation of TFA as an Ion Pair Reagent in Separation of Small Molecules by Reversed Phased HPLC, *Analytica Chimica Acta*, 399 3 249–258 1999.

更多信息

更多有关产品和服务的信息，请访问我们的网站

www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技版权所有，2009 年
中国印刷
2009 年 3 月 17 日
5990-3616CHCN



Agilent Technologies