

含盐流动相损坏色谱柱原因分析

章志青

(台州科技职业学院,浙江台州,318020)

摘 要

用高压液相色谱(HPLC)分析某种原料药,采用 KH_2PO_4 缓冲液(pH值6.5)和甲醇组成的流动相进行梯度洗脱时,连续损坏两根新的色谱柱。经柱外梯度洗脱模拟实验发现:流动相pH值随着有机相比例的上升而上升,最终超过色谱柱允许的pH值上限而使色谱柱损坏;同时,当有机相的比例超过80%(体积比)时,有磷酸盐晶体析出,发生堵塞,从而加重了色谱柱的损坏。所以,在梯度洗脱时,应该做柱外模拟试验,确定有机相最高比例,以保护色谱柱。

关键词:高压液相色谱 梯度洗脱 有机相比例 pH值

高效液相色谱法(HPLC)作为一项现代分析技术,在医药领域得到了广泛应用,是评价药典先进性的指标之一^[1]。美国FDA药物分析专家曾测试过150多种药物在不同甲醇浓度下的保留值^[2],却没有研究流动相pH值的影响。缺少流动相pH值对药物色谱行为影响的研究资料,就不能全面描述药物的色谱行为(如Selectivity surfaces和Retention-surfaces)^[3,4],这在一定程度上影响了HPLC在药物分析领域中应用水平的提高。因此,我们对高效液相色谱分析中流动相配比比例及其pH值对色谱柱的影响进行了探讨。

1 实验部分

1.1 仪器

SHIMADZU LC-10ATVP(双泵)液相色谱仪配紫外检测器(浙大N2000工作站);KQ-2200型超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司);色谱柱:VP-ODS(150mm×4.6mm,5μm,pH值:2~7.5);精密pH计:METTLER(320S0.00-14.00)。

1.2 试剂与材料

甲醇、乙腈:均为HPLC级(TEDIA Company USA);水:二次去离子水;流动相:用0.45μm的微孔滤膜过滤,并超声脱气30分钟;磷酸二氢钾(分析纯);磷酸二氢钾缓冲液(0.02mol/L,pH值6.5);原料药样品;0.1%甲醇溶液。

1.3 色谱条件

流速:1.0ml/min;柱温:25℃;波长:255nm;流动相:甲醇和磷酸二氢钾缓冲液(0.02mol/L,pH值6.5)。梯度洗脱程序:0~1min内,甲醇占10%;1~10min内,甲醇由10%线性递增至90%;10~12min内,甲醇保持在90%;12~20min内,甲醇由90%线性递减至10%。

1.4 样品处理

称取0.01g样品溶于10ml甲醇中,超声脱气30min,进样前用0.45μm的微孔滤膜过滤,取10μl进样分析。

1.5 柱外模拟试验

在柱外模拟流动相梯度洗脱过程,取10ml磷酸二氢钾缓冲液(0.02mol/L;pH值6.5)于200ml烧杯中,并将精密pH计的电极插入烧杯中,用滴定管滴加甲醇,不断搅拌,记录甲醇的滴加量和相应的混合液(流动相)pH值。

2 结果与讨论

2.1 有机相比例与流动相pH值的关系

在以波长为255nm,柱温为25℃,甲醇和磷酸二氢钾缓冲液(0.02mol/L,pH值6.5)为流动相,流速为1.0ml/min的条件下进行梯度洗脱时,同种型号(VP-ODS)的两根新柱子相继发生损坏,因此

怀疑流动相有问题。

在柱外做模拟试验中发现,在 10ml 磷酸二氢钾缓冲液(0.02mol/L, pH 值 6.5)中滴加甲醇,混合液(即流动相)的 pH 值随着甲醇比例的上升而上升,最高可达 9.0。当甲醇比例为 60%时,流动相 pH 值已达 7.8,超过色谱柱允许 pH 值范围上限 7.5,将使柱子硅胶溶解,同时当甲醇高于 80%(体积比)时,会有磷酸盐析出发生堵塞,从而使色谱柱损坏(见表 1、图 1)。

用乙腈代替甲醇做模拟试验,同样也出现了与甲醇相似的结果,即混合液(即流动相) pH 值随着乙腈比例的增加而上升(见表 2、图 2)。

表 1 甲醇(v%)与流动相 pH 值
(流动相为甲醇和磷酸二氢钾缓冲液)

甲醇(v%)	流动相 pH 值
0	6.5
16	6.5
29	6.5
38	6.8
44	7.0
50	7.4
60	7.8
67	7.9
75	8.2
80	8.4
83	8.5
86	8.5
88	8.6
90	8.8
90	9.0

表 2 乙腈(v%)与流动相 pH 值
(流动相为乙腈和磷酸二氢钾缓冲液)

乙腈(v%)	流动相 pH 值
0	6.5
16	6.5
29	6.6
38	6.8
44	7.1
50	7.5
60	7.8
67	7.9
75	8.1
80	8.4
83	8.6
86	8.8
88	8.9
90	9.2

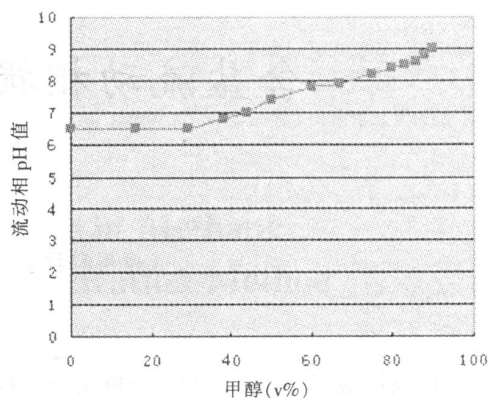


图 1 甲醇(v%)与流动相 pH 值的关系
(流动相为甲醇和磷酸二氢钾缓冲液)

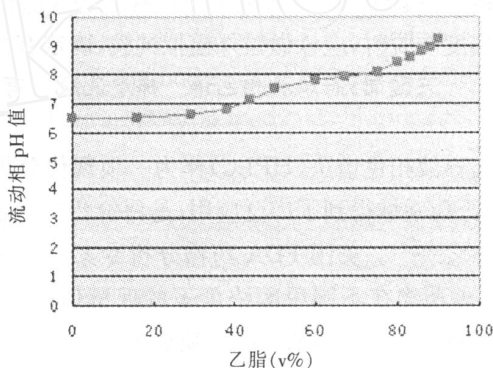


图 2 乙腈(v%)与流动相 pH 值
(流动相为乙腈和磷酸二氢钾缓冲液)

用 0.1%磷酸水溶液(pH 值 4.5)代替磷酸二氢钾缓冲液(pH 值 6.5)做模拟试验,随着甲醇比例的上升,则混合液(即流动相) pH 值基本保持不变,结果见表 3。

表 3 甲醇(v%)与流动相 pH 值
(流动相为甲醇和磷酸缓冲液)

甲醇(v%)	流动相 pH 值
0	4.5
16	4.5
29	4.5
38	4.5
44	4.5
50	4.5
60	4.5
67	4.5
75	4.5
80	4.5
83	4.5
86	4.6
88	4.6
90	4.6

2.2 有机相比例与磷酸二氢钾析出

在柱外做模拟试验中同时发现,甲醇比例高于 85 % (v %)、乙腈比例高于 83 % (v %),就有磷酸二氢钾晶体析出。可能是由于随着流动相中有机相比例的增加,流动相的极性逐渐减弱,根据相似相容原理,磷酸二氢钾的溶解度相应降低,当有机物达到一定比例时,磷酸二氢钾的溶解度降到饱和,便会析出。析出的晶体将会堵塞色谱柱,并损害整个色谱系统。

2.3 降低有机相比例,保护色谱柱

放弃原色谱条件,采用 V(甲醇) V(磷酸二氢钾缓冲液 0.02mol/L, pH 值 6.5) = 10:90,还是用同种色谱柱分析同种样品,色谱柱没有再损坏,连续使用 3 年至今。但分析时间有所延长。

3 结论

流动相为有机物和含盐缓冲液时,随着有机物

比例增加,流动相的 pH 值也会相应上升,当超过色谱柱允许的 pH 值范围,导致柱内硅胶溶解而损坏柱子;同时,有机物比例增加还会使无机盐溶解度降低,当有机物比例超过一定比例,无机盐就会析出。所以,在梯度洗脱时,应该做柱外模拟试验,确定有机相最高比例,以保护色谱柱。

参考文献

- [1] 安登魁,等. 药物分析学科的发展. 中国药学杂志, 1991, 26(2): 67.
- [2] Roos R T, et al. General reversed phase high-performance liquid chromatographic method for the separation of drugs using triethylamine as a competing base. J Chromatogr. 1986;370:403.
- [3] Jang N.-I, et al. Chromatographic characterization of some dideoxyribonucleosides. J. chromatogr. 1991;550:507.
- [4] Sacchero G, et al. Chromatographic behaviour of triazine compounds. J. Chromatogr. 1994;668:365.

Research the Reason of Phosphate Buffer Mobile Phase Damages Chromatography Column

Zhang Zhiqing

(Taizhou Institute of Technology, Zhejiang Taizhou 318020, China)

Abstract: A raw medical was analysed by high-pressure liquid chromatography (HPLC), in which potassium phosphate buffer (pH 6.3) was used as mobile phase by gradient elution, then two new column were damaged in this condition. The reason was founded in an outside-column simulated test: The pH of mobile phase was raised with the increase of organic phase ratio. At last, the pH of mobile phase exceeded the permitted upper limit of the column and hurted the column. At the same time, it was also founded that in the test: phosphate salt would crystallized when the organic phase ratio exceeded 80 % (v %). When the organic phase ratio was reduced to 10 % (v %), the same type column was used normally for 3 years.

Key words: HPLC; gradient elution; organic phase ratio; pH

重庆昌农化肥建设废锰渣生产三元复混肥项目

重庆昌农化肥有限公司拟用重庆嘉陵化学制品有限公司的废锰渣生产三元复混肥, 该项目投资 4527.13 万元, 占地面积 11942.07 平方米, 建设期为 12 个月, 位于在重庆市荣昌县工业园区杜家坝工业园重庆嘉陵化学制品有限公司厂区内。项目将新建年产 10 万吨废锰渣生产三元复混肥生产装置, 并配套建设 2 台直径分别为 3.2 米和 2 米的二段式煤气发生炉。锰渣烘干尾气通过重力管式换热器冷

却、缓冲罐, 再经水喷淋洗涤除尘处理后, 由 20 米高排气筒达标排放。锰渣烘干和产品烘干废气采用水喷淋洗涤, 产生的洗涤废水, 主要含有锰渣和复混肥, 经二级沉淀处理后, 清水回用于废气洗涤塔作喷淋水, 部分作造粒用水, 不外排。项目建设符合国家产业政策, 实现了循环经济, 建成投产后具有良好的环保效益、社会效益和经济效益。

(汪家铭)