

# 强保留固定相的色谱特性

Dafydd MILTON

**摘要** 在新方法的发展过程当中, 色谱方法最重要的目标之一是得到具有一致性且可重现的分离。选取具有高重现性和良好性能的高效液相色谱(HPLC)柱是实现这一目标最基本的要素。对装入HPLC柱的色谱介质进行物理测试毋庸置疑也是非常重要的, 该测试可以揭示HPLC柱的部分色谱特性。柱的本身特性以及如何与一个宽范围的分析物相互作用只能通过严格的色谱评估来获得。

在新方法的发展过程当中, 色谱方法最重要的目标之一是得到具有一致性且可重现的分离。选取具有高可重现性和良好性能的高效液相色谱(HPLC)柱是实现这一目标最基本的要素。

对装入HPLC柱的色谱介质进行物理测试毋庸置疑也是非常重要的, 该测试可以揭示HPLC柱的部分色谱特性。柱的本身特性以及如何与一个宽范围的分析物相互作用只能通过严格的色谱评估来获得。

## 1 色谱测试

反相填充材料的保留特性可以通过疏水相互作用进行分类, 包括对配基的疏水性和接枝密度的测定; 空间异构和形状选择性; 以及诸如硅羟基和表面金属之间的行为等次级相互作用。硅羟基和被分析物之间的相互作用对于色谱性能方面的影响主要由固定相的pH值来决定。在硅胶表面的硅羟基可以形成氢键(既可以作为供体也可以作为受体), 而且这些已经解离的硅羟基可以在质子化的碱作用下发生离子交换。

为确保其一致性并按预测进行分离, 填充入Synchronis HPLC柱(Thermo Fisher Scientific, Runcorn, U.K.)当中的色谱固定相可以进行一系列由Tanaka<sup>[1]</sup>开发的色谱诊断性测试。这些测试可以确切地查明经过谨慎选择的被分析物和固定相之间的相互作用, 并对固定相的疏水性、形状选择性以及与碱、酸和螯合剂之间的次级相互作用等方面进行表征。

## 2 测试1: 疏水性相互作用

### 2.1 疏水性保留能力

首先是通过测定疏水保留能力(HR)对疏水性相

互作用进行表征。一个中性疏水性碳链(戊基苯)的保留因子给出了固定相疏水性的衡量, 可测定出硅胶表面的碳固载量。Synchronis C18柱固定相表面被浓密地覆盖了一层修饰基团, 其表面碳固载量达到16%, 因而展现出非常强的疏水保留能力。

### 2.2 疏水选择性

第二是通过测定疏水选择性(HS)对疏水相互作用进行表征。戊基苯和丁基苯之间的选择性因子提供了固定相表面覆盖率的测定, 这两种烷基苯之间的差异只有一个亚甲基, 而其选择性主要基于配基的键合密度。

### 2.3 空间异构选择性

空间异构选择性(SS)可以作为固定相区分具有相似结构和疏水性但具有不同形状的分子方面能力的

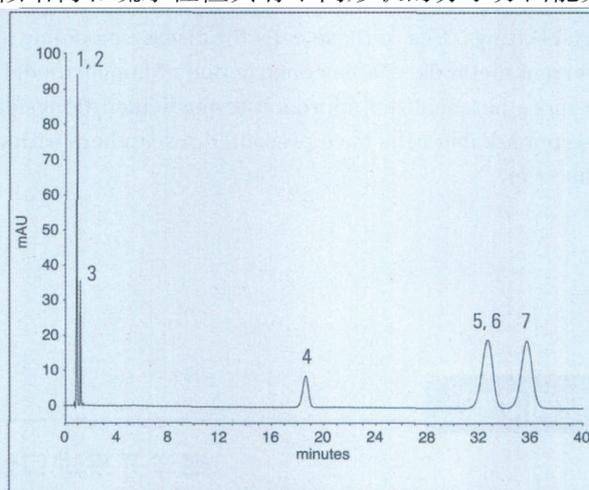


图1 测试1: 疏水性相互作用的样品谱图。柱: Synchronis C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 mm  $\times$  4.6 mm。流动相: 水: 甲醇 (35 : 65, v/v)。流速: 1.0 mL/min。柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。检测波长: 254 nm。进样体积: 10  $\mu\text{L}$ 。样品: 1) 茶碱; 2) 咖啡因; 3) 苯酚; 4) 丁基苯; 5) *o*-三联苯; 6) 戊基苯; 7) 三亚苯。

## 作者简介

Dr. Milton is Product Manager, Thermo Fisher Scientific, Tudor Rd., Runcorn, Cheshire WA71TA, U.K.; tel.: +44 1928 534 334; e-mail: dafydd.milton@thermofisher.com.

该文已获得American Laboratory/Labcompare再版许可。

指标。*o*-三联苯和三亚苯之间的选择性因子可以归为空间异构选择性的体现,这一分子模型当中,前者分子具有扭转和弯曲的特点,而后者具有一个相当稳定的刚性结构,因而保留特性与前者有明显的不同。

## 2.4 氢键结合容量

固定相的氢键结合容量(HBC)可以通过咖啡因对苯酚的相对保留值得到。这里提供了一种对有效硅羟基官能团数量和封尾程度进行测定的方法。得到的一个较低的评价值证明了固定相与咖啡因形成氢键的可用硅羟基较少,从而说明固定相的封尾还是比较完全的(见图1)。

## 3 测试2: 与碱和螯合物之间的相互作用

### 3.1 对于碱性化合物的活性

在pH值高于7的条件下,解离的硅羟基会导致质子化的碱性化合物(如阿密曲替林)峰形变差。次级离子交换和硅羟基相互作用会造成保留时间和峰不对称性的偏移。阿密曲替林的保留因子和拖尾因子可以指示柱的全部工作性能。使用Synchronis柱分析阿密曲替林展示出非常好的峰形,证明了硅胶表面封尾良好。

### 3.2 对于螯合剂的活性

由于存在螯合作用,硅胶表面的金属相互作用会改变被分析物的选择性和峰形。奎扎因(一种螯合剂)因为硅胶当中的金属混杂产生的次级相互作用而改变了其保留因子和拖尾因子。使用Synchronis柱分析观察得到的峰形证明了柱中的金属残留量非常低,

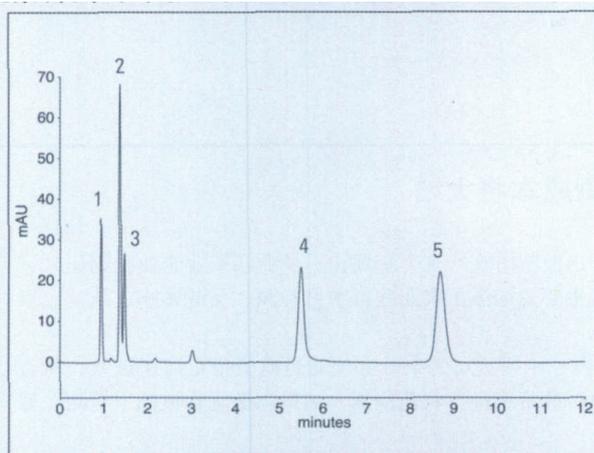


图2 测试2: 碱性化合物和螯合物相互作用的样品谱图。柱: Synchronis C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 mm  $\times$  4.6 mm。流动相: 10 mmol/L磷酸盐 (pH 7.6): 甲醇(20 : 80, v/v)。流速: 1.0 mL/min。柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。检测波长: 254 nm。进样体积: 5  $\mu\text{L}$ 。样品: 1) 茶碱; 2) 苄胺; 3) 苯酚; 4) 奎扎因; 5) 阿密曲替林。

而且比其他的色谱固定相要稍好一些。

## 3.3 pH 7.6条件下的离子交换容量(IEC7)

苄胺和苯酚之间的选择性因子常用于评估硅胶表面总的硅羟基活性。在pH值超过7的情况下,硅羟基会发生解离并与离子交换位点相结合,从而对苄胺的保留能力产生影响(见图2)。

## 4 测试3: 与酸之间的相互作用

### 4.1 对于酸性化合物的活性

固定相对于酸性化合物的惰性在保留能力和选择性方面的一致性也非常重要,这是因为酸性化合物很容易被吸附到反相填料上。通过测定4-氯苯乙酸钠的选择性因子和拖尾因子来评估固定相对酸性化合物分离的适用性。Synchronis柱展示了很好的峰形,说明其对酸性化合物具有很好的惰性。

### 4.2 pH 2.7条件下的离子交换容量(IEC2)

Tanaka<sup>[1]</sup>指出在pH < 3条件下质子化胺的保留特性可以用来测定硅胶表面离子交换位点。硅羟基(Si-OH)在pH < 3条件下通常不会解离,因此不会对质子化胺的保留行为有所贡献,但在解离状态的酸性硅羟基(SiO<sup>-</sup>)可以。后者会对质子化胺的保留行为有所贡献。自由硅羟基对于保留能力的贡献可以用苄基胺和苯酚在pH 2.7条件下的选择性因子进行表征。如图3所示,苄胺在Synchronis C18柱上几乎没有保留,这意味着硅胶表面不存在酸性硅羟基。

## 5 药学分析中柱重现性的实证

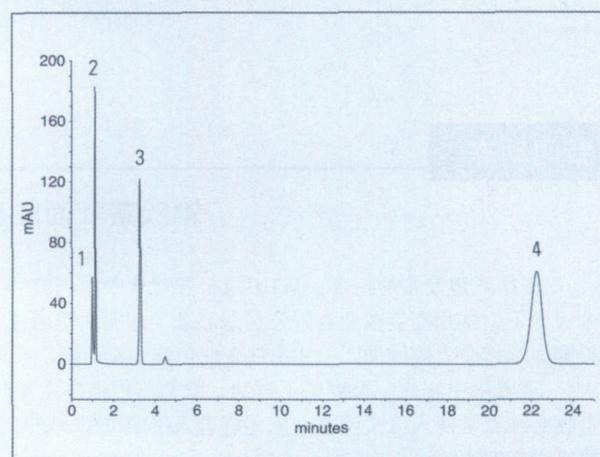


图3 测试3: 酸性化合物相互作用的样品谱图。柱: Synchronis C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 mm  $\times$  4.6 mm。流动相: 10 mmol/L磷酸盐(pH 2.7): 甲醇(45 : 55, v/v)。流速: 1.0 mL/min。柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ 。检测波长: 254 nm。进样体积: 5  $\mu\text{L}$ 。样品: 1) 茶碱; 2) 苄胺; 3) 苯酚; 4) 氯苯乙酸钠。

通过对色谱固定相初级和次级的相互作用机制进行严格的表征,柱性能的不确定性可以降低到最小。由表1数据可见,Syncronis C18柱使用USP方法

表1 叠氮胸苷的柱与柱之间的分析重现性

柱编号	保留时间/min	峰面积
1	25.82	11532105
2	26.03	11543904
3	25.90	11527718
4	25.66	11463144
5	25.92	11520618
柱间精密度	0.5%(RSD)	0.3%(RSD)

对叠氮胸苷的分析,证明柱与柱之间的重现性非常好。其柱与柱之间的保留时间与峰面积的差异低于0.5%,远比方法建立要求的(RSD为2%)要低。

## 6 结论

色谱固定相可通过对色谱柱装填材料的严格表征来降低其种种差异多样性,通常使用特定的被分析物进行分析,并对分析测试的结果出具严格详尽的说明书。由此,我们可以确信在色谱方法建立后,柱与柱之间能够获得相当一致的谱图。

## 参考文献

- [1] Kimata K, Waguchi K. et al. J Chromatogr Sci, 1989, 27: 721 - 8.

# Chromatographic Characterization of a Highly Retentive Stationary Phase

Dafydd MILTON

When developing a new method, one of the most important goals for the chromatographer is to achieve a consistent, reproducible separation. The selection of a highly reproducible and well--characterized HPLC column is essential if this goal is to be attained. The physical testing of the chromatographic media that is packed inside an HPLC column, while undoubtedly important, will reveal only some of the characteristics of the column. The true nature of the column and how it will interact with a wide range of analytes can only be understood through rigorous chromatographic evaluation.

## 新闻动态

### 输欧茶叶面临严检 检测成本将大增

根据欧盟发布的指令,从10月1日起对从中国进口的茶叶采取特别控制措施。这个新规让不少浙江茶业企业感到压力。今天下午,杭州嘉盛茶业有限公司总经理吴建明对笔者说,欧盟新规主要是加强了农药残留项目检测,受此影响,茶叶出口检测成本将会大幅增加,一些出口企业可能无利可图。

笔者从宁波检验检疫局了解到,欧盟新规措施主要包括以下内容:中国进口的茶叶必须通过欧盟指定口岸进入,所有货物必须有常规入境文件才会被允许进入指定口岸;另外,欧盟将对10%的货物进行农药检测,如果该批货物被抽中检测,就要进行100%检测。

据悉,我省茶叶出口企业已经积极行动应对欧盟新规,对仓库所有存货进行农残检测同时,通知基地和定点单位对农残进行检测,并从运输、仓库、生产加工各个批次分开分批管理,确保符合要求。

我省农业部门和商检部门早在上半年就已经向全省发出预警,要求茶场按照规程使用农药,生产企业做好加工全过程质量控制。省农业厅茶叶科科长罗列万表示,在出口方面,为了减少茶叶用药交叉影响,我省已经加大了茶园统防统治工

转至 P22