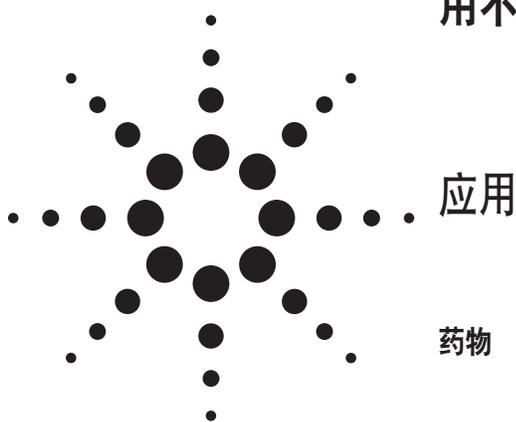


用不同的酸调节流动相分离水杨酸中的杂质



作者

William J. Long and John W. Henderson Jr.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

选择键合相和流动相的选择性工具是实现色谱分离条件优化的最好方法。本应用中，流动相添加剂如三氟乙酸（TFA）和乙酸改变了水杨酸及已报道的它的几种副产物之间分离的选择性。1.8 μm 短柱可实现快速样品分离，加上使用耐低 pH 的固定相，这两方面能够使这种被开发的重要参数得以快速评价。

引言

低 pH 下 HPLC 的优势

当分析有机酸时，ZORBAX StableBond SB-Aq 成为被经常选用的键合相。它在低 pH 下耐用且适用于含量很低或不含有有机溶剂的流动相。它的专利键合相包括二异丙基侧链基团对连接于硅胶表面的关键硅氧烷键的立体保护，使其在低 pH 下免于水解攻击。这保证了在低 pH 下的长柱寿命和重现性。StableBond SB-Aq 最新应用实例包括分析果汁中发现的有机酸

[1]、水溶性维生素[2]和药用化合物头孢布坦的异构体[3]。

在方法优化过程中，有机溶剂和流动相的 pH 是两个可改变的关键参数。用乙腈改为用甲醇作有机相来改变选择性的实例参见文献 4。

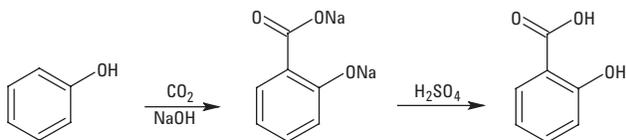
在一定的 pH 条件下，可电离的化合物将以带电离子形式存在。对于可电离化合物苯甲酸而言，其在 pH 3 和 pH 7 下的保留值及相应的色谱相互作用相差较大。在 pH 3 下，苯甲酸能够很好保留（质子化），而在 pH 7 下，其流出靠近死体积（离子化）。象苯甲醇和硝基苯这样的极性化合物，虽然是极性的但不发生电离，在 pH 变化时，保留值的变化小得多。

水杨酸的分析

水杨酸也称为 2-羟基苯甲酸，是几种 β 羟基酸之一。它是治疗痤疮、牛皮癣、皮肤硬结、鸡眼和疣的护肤品中的关键添加剂。它通过使皮肤细胞更易于脱落以防毛孔堵塞来达到治疗痤疮的目的。这种对皮肤细胞的作用使水杨酸成为治疗头皮屑的几种洗发精的活性成分。水杨酸也是除疣凝胶的活性成分。水杨酸盐的药用价值（主要是退热）从古代起就广为人知。这种无色晶状有机酸也广泛用于有机合成并作为植物激素发挥作用。这种物质存在于柳树皮中，其名称“*salicylic acid*”，即由柳树的拉丁名 *salix* 衍生而来。



商品水杨酸钠通过苯酚钠和二氧化碳在高压和高温下发生 Kolbe-Schmitt 反应而制备。产物酸化后得到期望的水杨酸。主要反应示于图 1。此外该反应也产生了几种副产物，包括 2,5-二羟基苯甲酸、5-羟基-1,3-苯二羧酸、4-羟基苯甲酸、苯酚和水杨酰甘氨酸。这些化合物的结构及其通用名和 pKa 值列于图 2。



Introduction to Organic Chemistry, Streitwieser and Heathcock, MacMillan, NY (1981). (参考文献 6)

图 1. 通过 kolbe-Schmitt 反应合成水杨酸

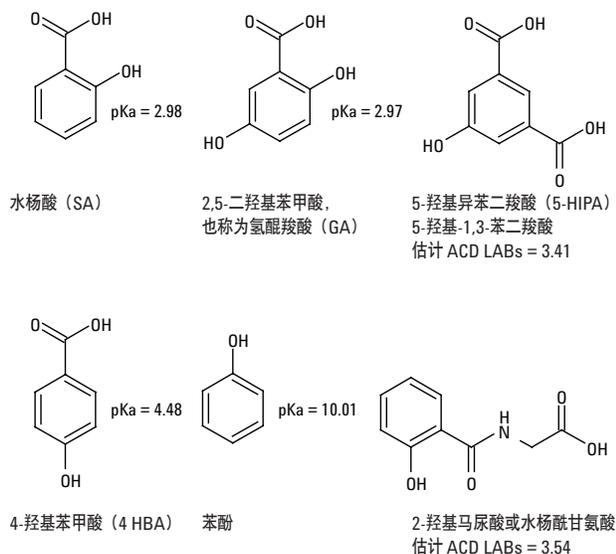


图 2. 水杨酸中主要杂质的结构

典型的纯度测定方法采用 5 μ m C18 色谱柱和含水-甲醇-冰醋酸 (60 : 40 : 1) 的酸性流动相。然而, 这种方法只能检测到三个主要杂质 (4-羟基苯甲酸、4-羟基异苯二甲酸和苯酚)。药典方法也提出流动相组成的改变会导致洗脱顺序的变化[7]。改变洗脱峰顺序的原因是由于它们均为可电离化合物。当流动相的组成改变时, 流动相的 pH 也随之变化。

本研究中, 色谱上的变化由改变流动相所用添加剂的变化引起。通常采用常规浓度的 TFA、磷酸、乙酸和甲酸改善水杨酸和五种杂质间的分离。

实验部分

LC 系统

Agilent 1200 高分离度快速液相色谱系统 (RRLC) (脱气机、二元泵、多基板自动进样器和波长设为 220 nm 的二极管阵列检测器) 和 StableBond SB-Aq, 1.8 μ m, 4.6 mm x 50 mm 色谱柱 (部件号 827900-914)。二元梯度设为在 10 分钟内甲醇 (B 相) 由 5% 增大到 30%。甲醇购自 Burdick and Jackson (HPLC 级)。

被测组分:

- 水杨酸 (SA)
- 苯酚 (Phe)
- 4-羟基苯甲酸 (4-HBA)
- 2,5-二羟基苯甲酸 (GA)
- 5-羟基异苯二甲酸 (5-HIPA)
- 2-羟基马尿酸 (SG)

上述样品购自 Sigma Aldrich 或 ARCOS。

加入 A 相的改性剂:

- 三氟乙酸 (TFA), 纯度 99% (pKa = 0.23)
- 磷酸 ACS 级 (纯度 85%) (pKa = 2.12)
- 冰乙酸, 99% (pKa = 3.8)
- 甲酸 ACS 级 99% (pKa = 4.8)

磷酸、甲酸和乙酸购自 EM Science, TFA 购自 Sigma Aldrich。

结果与讨论

磷酸、三氟乙酸、乙酸和甲酸常用于控制 HPLC 流动相的 pH。将酸加入流动相的水相中是对缓冲液的一种简捷且常常是有效的替代方法。此外, 在快速梯度中使用小容积柱, 快速分离高通量 (RRHT) 柱的小容积, 使色谱柱在几分钟内即能达到平衡。图 3 表明采用上述梯度, 分别使用常规浓度的上述四种酸作改性剂进行的分离。由于起始分离建立在使用非挥发性磷酸基础之上, 通常认为不适用于质谱检测器。TFA 有时也不能用于 LC-MS, 因为 TFA 能通过与被测物形成离子对而引起离子抑制。然而, 在某些情况下通过将洗脱物在柱后和质谱检测器前导入高浓度的其它

酸中，可以将 TFA 从离子对缔合物中置换出来。乙酸就是一种能很好地发挥这种作用而被用于此方法的酸。另一种离子对置换剂是 75% 丙酸 : 25% 异丙醇溶液。如图 3 所示，TFA 和磷酸达到了最好的分离效果，而在通常浓度下的甲酸和乙酸在最好的分离条件下也只能分离其中的五个化合物。此外，在使用甲酸和乙酸的例子中，4-HBA 和 GA 的洗脱顺序与使用 TFA 和磷酸的情况相比发生了交换。这可能是由于 pH 的改变引起，然而要确定实际的变化机理需要进一步的

研究工作。对于本研究而言，观察到洗脱顺序的改变就足够了。

图 4 表明较高浓度酸对分离的影响。几乎在所有的情况下都得到更尖锐的峰，SG 峰改善的程度最大。在图 3 中流动相的 pH 靠近除苯酚之外所有化合物的 pKa 值，所以，可以预期加入更多酸将会使溶液 pH 降至化合物完全不电离的程度，从而使峰形变得更好。

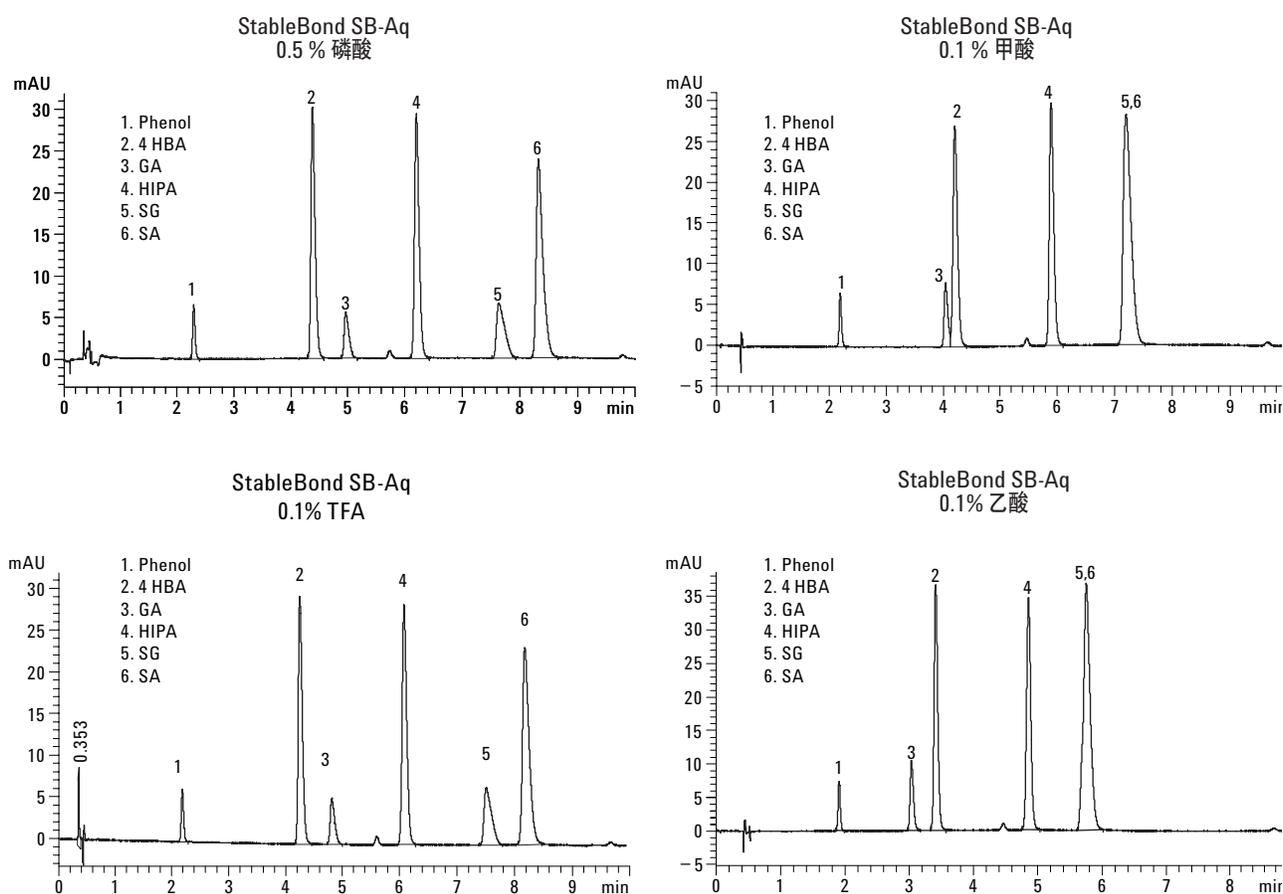


图 3. 不同酸改性剂对水杨酸及其杂质间分离的影响

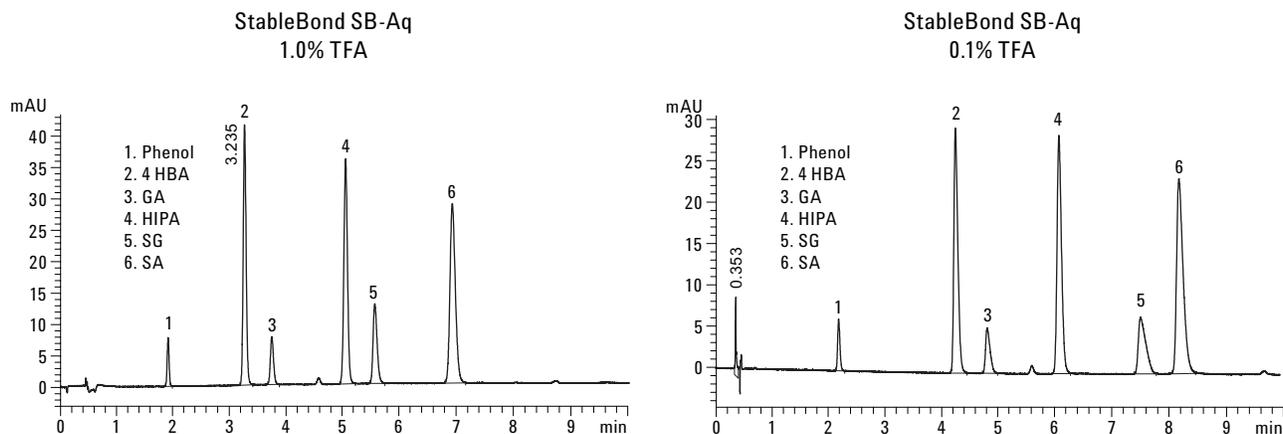


图 4. 酸修饰剂浓度对分离和峰形的影响

结论

由于 RRHT 50 mm 色谱柱具有平衡时间和分析时间短的优点，使方法开发中进行几种水相流动相改性剂的评价变得更为现实可行。更好的峰形和分离度可以简单地通过用一种酸改性剂代替另一种酸改性剂而实现。再者，将 pH 降低（增大酸强度）至被测成分的 pKa 以下将改善峰形。这种额外的方法开发在使用诸如 RRHT SB-Aq 等低容积短柱时显著减少所需时间。在上述情况下，使用简单的酸控制 pH，而此思路也能够扩展用于评价不同的流动相缓冲液并优化缓冲液浓度。

StableBond 色谱柱是低 pH 条件下应用的理想选择。它们独特的柱化学性质和多种键合相，如 SB-Aq，提供了在低 pH 下的宽泛的选择性、长寿命和重现性。

参考文献

1. M.A. Van Straten, H A. Claessens A. Dams, "Analysis of Organic Acids in Aqueous Solutions," Agilent publication 5989-1265EN, 2006.
2. "Quick Screening and Quantification of Water-Soluble Vitamins Using Rapid Resolution LC/MS/MS" S. Mosin Poster THPH 115 ASMS 2007.

3. Adebayo O. Onigbinde, "Separation of Ceftibuten Stereo Isomers with 100% Aqueous Mobile Phase Using Zorbax SB-Aq," Agilent publication 5988-7625EN, 2002.
4. William J. Long and John W. Henderson Jr., "Unique Selectivity and High-Throughput Applications of SB-Phenyl RRHT," Agilent publication 5989-5057EN, 2007.
5. A Brief History of Antipyretic Therapy, P. Mackowiak, Clinical Therapeutic Disease, 31,154-156, 2000.
6. Introduction to Organic Chemistry, Streitweiser and Heathcock, MacMillan, NY (1981).
7. Salicylic Acid, USP 23 (1995) 1395.

更多信息

如需了解本公司产品和服务的更多信息，请访问本公司网址 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

© 安捷伦科技公司，2008

2008年1月3日 中国印刷
5989-7731CHCN

