

TSKgel ODS-100V 和 ODS-100Z 反相 高效液相色谱柱

目录

1. 简介	2
2. 规格和特性	2
3. 填料的性质	3
4. 色谱特性	4
4-1.柱效	4
4-2.保留时间	4
4-3.色谱柱压降	4
4-4.H-u 曲线 (范第姆特曲线)	4
4-5.在 100%水流动相中的保留特性	5
4-6.残余离子交换活性	6
4-7.立体选择性	8
4-8.耐久性	8
4-9.样品溶液中有有机溶剂浓度的影响	9
4-10.批间差异和色谱柱表征	9
5. 应用数据	10
6. 总结	11



1. 简介

反相高效液相色谱 (RPC) 是最常用的高效液相色谱方法, 原因如下:

- (1) 高柱效兼具良好的选择性, 可实现复杂混合物的快速分离,
- (2) 该方法可分析从疏水性很强到亲水性很强很大范围内的化合物。
- (3) 该方法在保留性、选择性和柱效方面均具有良好的再现性; 以及
- (4) RPC 是操作简单、并且稳定的分析方法。

十八烷基硅烷 (ODS 或 C18) 键合色谱柱在反相高效液相色谱中最为常用。ODS 色谱柱以十八烷基硅烷试剂衍生的球硅胶颗粒填充。由于空间位阻, 硅胶表面大约仅有一半硅醇基可以发生反应。当流动相 pH 大于 4 时, C18 键合表面上的未反应基团可以发生解离, 使其能与带正电的化合物发生二级相互作用。这可能会导致定量分析中出现峰拖尾和准确度的损失。但是, 可以使用各种封尾技术以封信可接触的硅醇基, 防止或减少与残余硅醇基发生二级相互作用。

Tosoh 的科学家最近开发出了两种新的 ODS 型色谱柱, 它们采用高效的键合和封尾方法, 具有不同的表面特性。在本分离报告中, 这两种新型 ODS 填料及其色谱性能均配以丰富应用数据一起进行说明。

2. 规格和特性

表 1 是用直径为 3 μ m 或 5 μ m 的填料填充的 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱。

内径为 4.6mm 的色谱柱最适合于普通的分析, 而内径为 2mm 的则在 LC-MS 中或样品量有限的情况下使用。TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱的特性将在下面进行讨论。

色谱柱特性

- 粒度为 3 μ m 或 5 μ m 的球形、多孔、硅胶颗粒。
- 两种键合和封尾不同的表面化学特性,
- 相似的分离特性, 但几乎对所有的非极性化合物具有不同的选择性。
- 对碱性、酸性和螯合化和物均可得到良好的峰形
- 批间差异最小。
- 三批不同填料批次的色谱柱均可同时买到, 用于支持方法开发。
- 随色谱柱包含了填料批次的检测报告 (分析证书), 显示了在五种不同的流动相条件下进行的稳定性实验结果。
- 所有色谱柱均符合 USP L1 的要求, 全球范围内均有销售。

TSKgel ODS-100V 的特性

- 中等含碳量 (15%), 并且表面极性较大, 使其对亲水性化合物的保留相对较强。

TSKgel ODS-100Z 的特性

- 较高含碳量 (20%), 并且表面极性较小, 对疏水性中等或较强的化合物的保留相对较强。

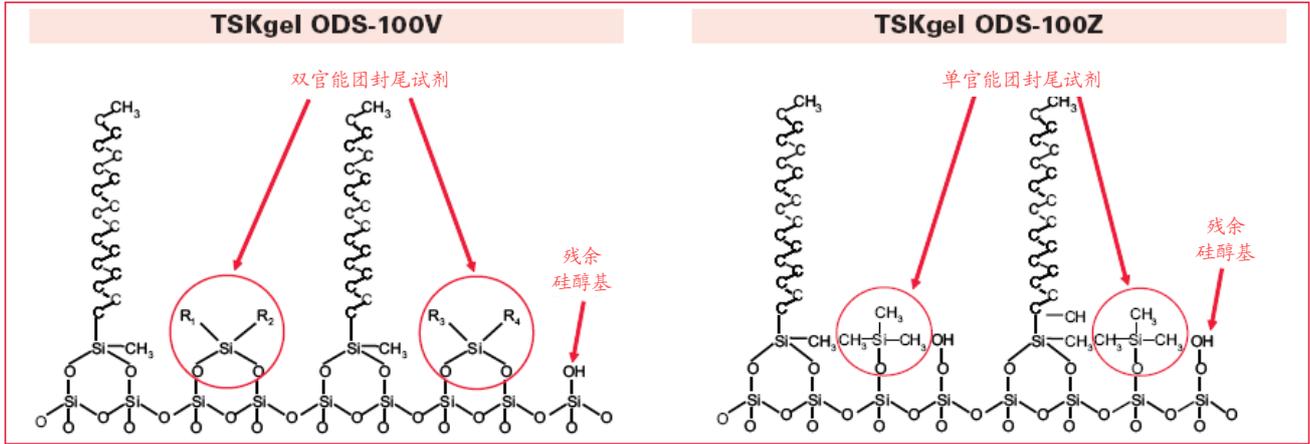
表 1: TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 产品线

货号	产品/产品名称	粒径(μ m)	色谱柱尺寸
21810	TSKgel ODS-100V	3	2.0mm x 15cm
21811	TSKgel ODS-100V	3	2.0mm x 7.5cm
21812	TSKgel ODS-100V	3	2.0mm x 5cm
21813	TSKgel ODS-100V	3	2.0mm x 3.5cm
21814	TSKgel ODS-100V, 3pk	3	2.0mm x 1.0cm
19308	货号 21814 的卡套		
21455	TSKgel ODS-100V	5	4.6mm x 15cm
21456	TSKgel ODS-100V	5	4.6mm x 25cm
21457	TSKgel ODS-100V	5	2.0mm x 5cm
21458	TSKgel ODS-100V	5	2.0mm x 15cm
21453	TSKgel ODS-100V 保护柱芯, 3pk	5	3.2mm x 1.5cm
19018	货号 21453 的 TSKgel 保护柱芯卡套		
21461	TSKgel ODS-100Z	5	4.6mm x 15cm
21462	TSKgel ODS-100Z	5	4.6mm x 25cm
21460	TSKgel ODS-100Z	5	2.0mm x 5cm
21459	TSKgel ODS-100Z	5	2.0mm x 15cm
21454	TSKgel ODS-100Z 保护柱芯, 3pk	5	3.2mm x 1.5cm
19018	货号 21454 的 TSKgel 保护柱芯卡套		

表 2: 物理特性

填料	粒度 (μm)	孔径 (nm)	孔容量 (mL/g)	表面积 (m ² /g)	官能团	含碳量 (%)	相态结构	封尾
TSKgel ODS-100V	3, 5	10	1.10	450	C18	15	单层	是
TSKgel ODS-100Z	5	10	1.10	450	C18	20	单层	是

图 1: 键合相结构



3. 填料的性质

表 2 表示 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱的性质。两种产品线均包含粒径为 3μm 或 5μm，孔径为 100Å 的反相填料。硅胶基质的比表面积为 450m²/g，比市面上最常见的反相色谱柱（通常为 175-350m²/g）大。表面积大加上较小的颗粒密度造成了含碳量高（%C/g 硅胶），带来良好的保留性质。

制备 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱采用的新键合化学原理在图 1 中作了描述。

TSKgel ODS-100Z 制备方法是使用双官能团的十八烷基硅烷试剂键合至表面，然后通过不断使用单官能团的三甲基硅烷封尾而成。TSKgel ODS-100V 的制备方法是首先与双官能团的十八烷基硅烷反应，然后以两种双官能团双烷基试剂封尾而成。两种物质均在能促进单体键合相层形成的条件下进行。

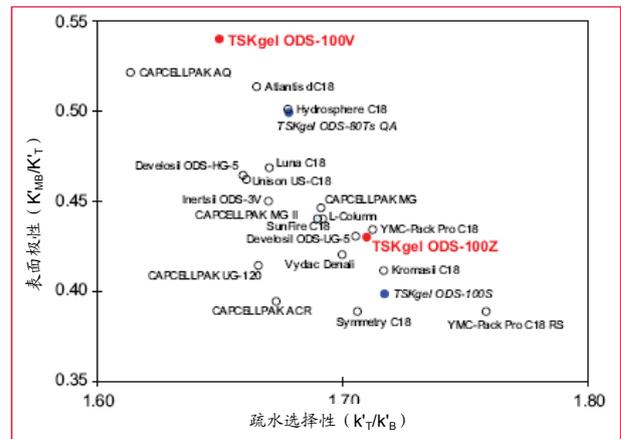
TSKgel ODS-100Z 的含碳量为 20%。ODS-100Z 的固定相疏水性很强，能够强烈保留小分子量的有机化合物。相比之下，TSKgel ODS-100V 的含碳量为 15%。对于反相填料，ODS-100V 固定相的极性大，有利于极性小分子有机化合物的保留。

色谱特性，如理论塔板数、对称因子和压力-流动特性均与硅胶基质有关，对于 ODS-100V 和 ODS-100Z 也一样。保留和选择性（疏水性、极性和空间因素）与固定相的化学组成有关，色谱柱之间各不同。由于有效的封尾作用，ODS-100V 和 ODS-100Z 两者的离子交换活性——残留硅醇基的指标，不相上下。

图 2 表示 TSKgel ODS-100V、TSKgel ODS-100Z 与其它市售 ODS 色谱柱的疏水性与表面极性参数之间的关系。

ODS-100Z 的疏水选择性较大，而表面极性则一般。而 ODS-100V 的疏水性小，表面极性大。

图 2: 市售 ODS 色谱柱的疏水选择性和表面极性



4. 色谱特性

4-1. 柱效

图3在各种 ODS 色谱柱上对比了由保留时间和峰宽计算得到的理论塔板数 (N)。TSKgel ODS-100V 和 ODS-100Z 色谱柱的理论塔板数在所有研究的色谱柱中是最高的。

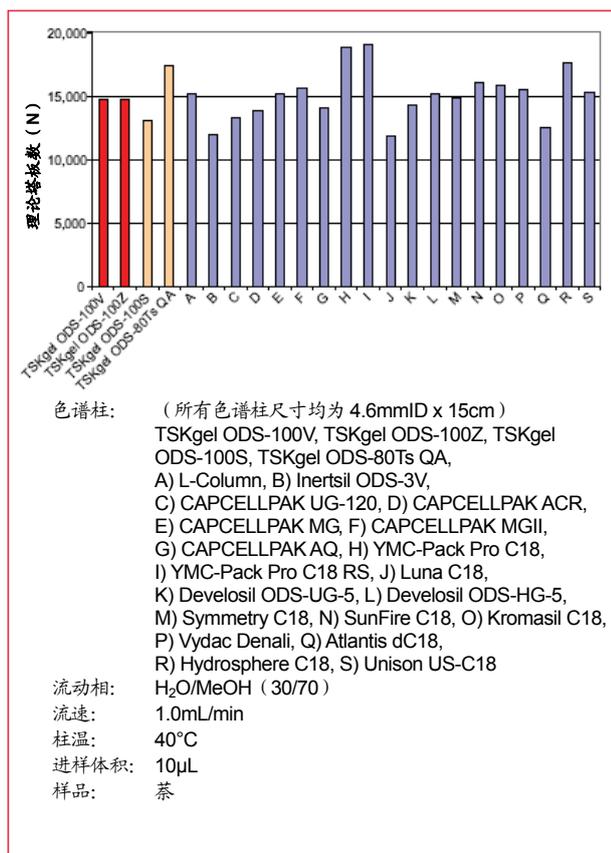
4-2. 保留时间

图4对比了在图3的条件下,各种 ODS 色谱柱中茶的保留特性。中性疏水化合物(如茶)的保留特性主要依赖于碳含量。因为 ODS-100Z 的碳含量约为 20%,茶被强烈地保留。而 ODS-100V 的碳含量约为 15%。其对茶的保留在所测试的 ODS 色谱柱中一般。

4-3. 色谱柱压降

图5以 H₂O/MeOH (30%/70%) 对比了色谱柱背压。相比于其它市售 ODS 色谱柱, ODS-100V 和 ODS-100Z 的压降中等。与大部分 ODS 色谱柱相比, ODS-100V 和 ODS-100Z 的理论塔板数大(如图3所示),但背压小。这一事实说明, ODS-100V 和 ODS-100Z 粒度分布范围窄,使得填料床均一,表现出优良的压力-流动特性。

图3.理论塔板数的对比



4-4. H-u 曲线 (范第姆特曲线)

图6表示在 15cm x 4.6mm 的 TSKgel ODS-100Z 色谱柱上线速度与理论塔板高度 (HETP 或 H) 的关系。

当使用含有甲醇的流动相 (o), 线速度约为 5cm/min 或流速约为 0.5mL/min 时, 柱效具有宽泛的最适宜条件 (HETP 最小)。

另一方面, 使用粘度更小的含乙腈的流动相 (Δ), 最佳柱效的条件变为线速度约为 10cm/min 或流速约为 1.0mL/min。进一步地, 使用含乙腈的流动相时, H-u 曲线变得更平滑。因此, 为获得最高的柱效, 最好是使用乙腈水溶液流动相, 来替代甲醇水溶液流动相。实际上, 流速通常根据色谱柱背压选择, 建议的流速在色谱柱附带的《操作条件与说明》(OCS) 说明书中进行了说明。

注: 线速度 (u, cm/min) 是每单位时间非保留溶质流经色谱柱时的直线距离。由色谱柱长度除以非保留溶质的保留时间计算而得。

图4.保留特性的对比

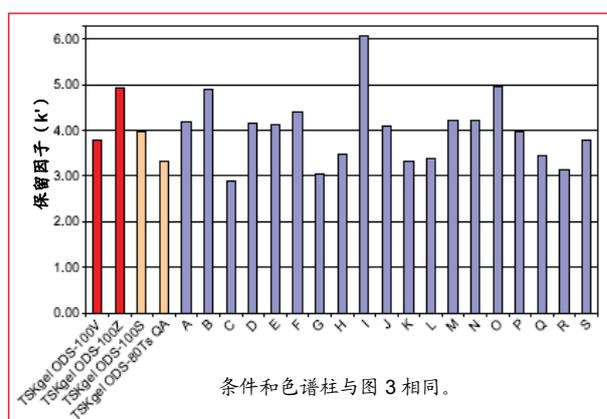


图5.色谱柱压降的对比

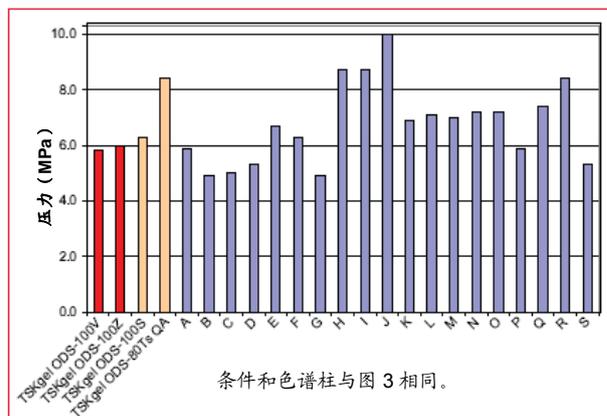


图 6.HETP 和线速度的关系

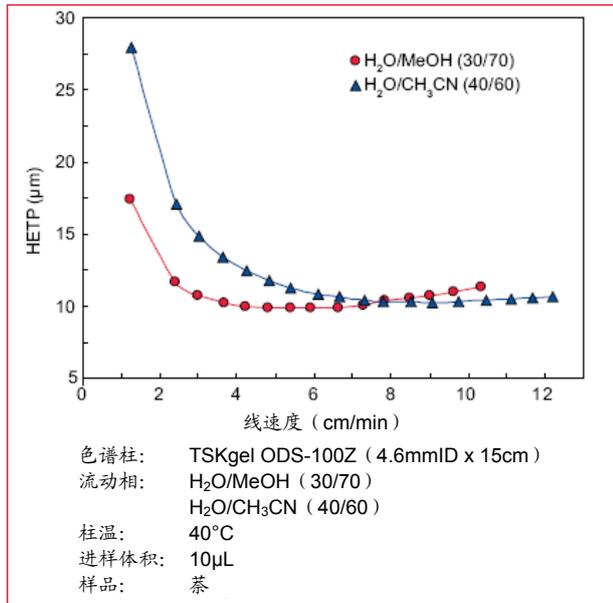


图 7.使用缓冲液而不使用有机溶剂作为流动相时保留度的降低(普通 ODS 色谱柱)

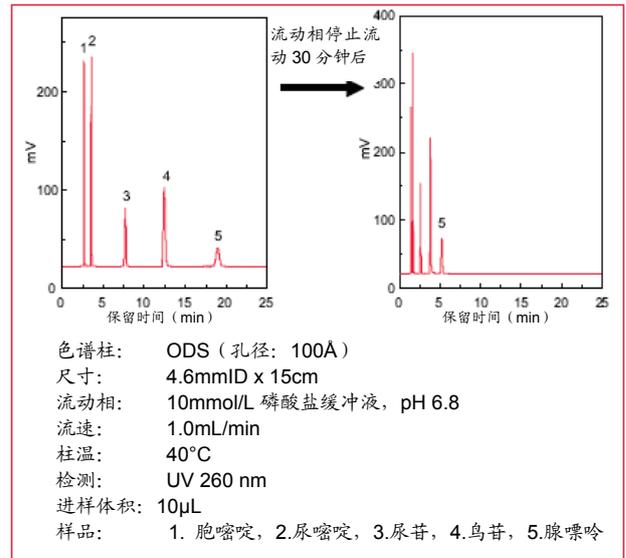
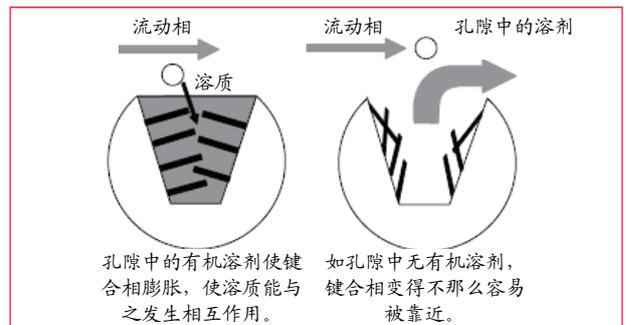


图 8.表示在不含有有机溶剂的流动相中保留度损失的示意图



4-5. 在 100%水流动相中的保留特性

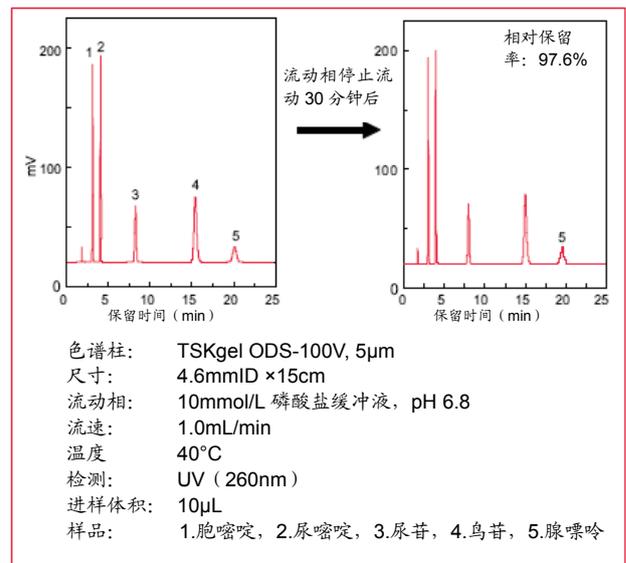
在使用多孔填料的反相色谱中, 样品组分在固定相与流动相之间分配, 并根据其疏水性被保留。但是, 当流动相中有机溶液的浓度很低或等于零时, 样品保留特性并不稳定, 如图 7 所示的标准 C18 键合相色谱柱。首先, 如预期一样, 溶质被保留 (左图), 但停止走柱时间达 30 分钟后, 溶质保留不能恢复至它们原来的保留值 (右图)。

注: 虽然观测到保留度明显损失需要更长的时间, 但是, 在 100%水流动相中, 不停止走柱 (和重新走柱), 也可观测到保留度的损失。

对该现象的解释如下: 当流动相中有机溶液的浓度低时 (或溶剂极性大时), 固定相不能轻易分散到流动相中, C18 烷基链更容易通过疏水作用互相吸附, 这种现象与水表面油滴的形成类似。最后的结果是, 在无有机溶剂的情况下, 水或缓冲液被推至孔隙外, 阻止样品分子进入孔内并保留在色谱柱内。图 8 用示意图说明了这一点。

使用 TSKgel ODS-100V 色谱柱而非标准的 C18 色谱柱时, 在上面的实验中, 走柱停止 30 分钟后, 样品保留度几乎不受影响, 如图 9 所示。这说明了 ODS-100V 色谱柱可以与不含有有机溶剂的流动相一起使用, 使该型色谱柱特别适合用于亲水性很强的化合物的分析。

图 9.使用不含有有机溶剂的流动相时保留损失最小 (ODS-100V)



4-6. 残余离子交换活性

ODS相一般通过用化学方法将C18烷基链键合至硅胶上来合成。反应完成后，硅胶表面大量的硅醇基由于空间位阻未发生反应。这些残余的硅醇基常常会影响样品的保留度与峰形。本节将对残余的离子交换活性如何影响碱性和酸性化合物的溶质保留度进行说明。

1) 对碱性化合物的保留

图10表示在 ODS-100V 中，在各种流动相 pH 值的条件下，中性化合物—苯和碱性化合物—地昔帕明保留度的变化。很明显，由于苯的化学性质不会因流动相 pH 而变化，因此，其保留度未受影响。但是，由于该化合物在高 pH 下，质子化的氨基数量减少，疏水性增强，地昔帕明的保留受到影响。

使用封尾方法不同的三种 TSKgel ODS 色谱柱，对比地昔帕明在不同的流动相 pH 值下，保留度和峰形的变化。研究结果见图11和图12。

图11表示当流动相 pH 增大时，所有 TSKgel ODS 色谱柱中地昔帕明的保留时间也增加。pH ≥ 5 时，所有三种色谱柱的保留度均逐渐在增大，但 TSKgel ODS-80Ts QA 却增加地最快。与 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 相比，TSKgel ODS-80Ts QA 封尾效率不佳，残余硅醇基的数量相对较大。因此，当 pH 增大时，解离的硅醇基与地昔帕明的氨基之间的静电作用更加强烈。

图12表示地昔帕明的不对称因子与流动相 pH 之间的关系。对于 ODS-80Ts QA，流动相 pH 越高，地昔帕明的不对称因子越大。但是，对于 TSKgel ODS-100V 色谱柱，对称因子无明显变化，而 TSKgel ODS-100Z 也只是稍微有所变化。并且，无论流动相 pH 的大小，峰拖尾程度最小。其原因是，TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 封尾效率很高，减少了可接近的残余硅醇基的数量。对于 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z，使用中性流动相时，由于碱性化合物在 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 峰拖尾很小，因此，即使碱性化合物被强烈地保留，也可以对它们进行分析。

图 10. 中性和碱性化合物的保留度与流动相 pH 的函数关系

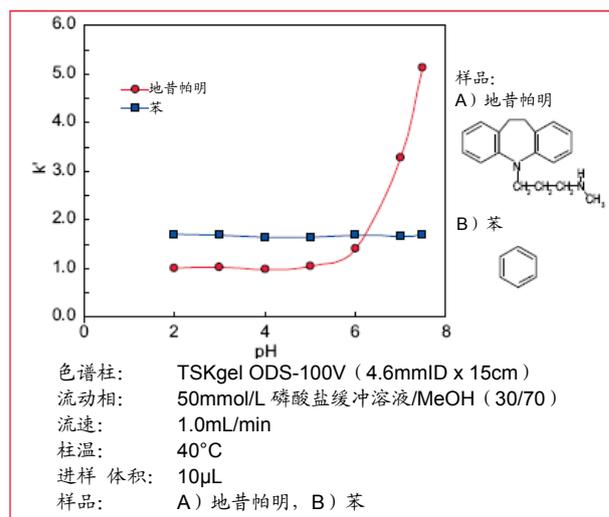


图 11. 在三种 TSKgel ODS 色谱柱上碱性化合物的保留度与 pH 的关系

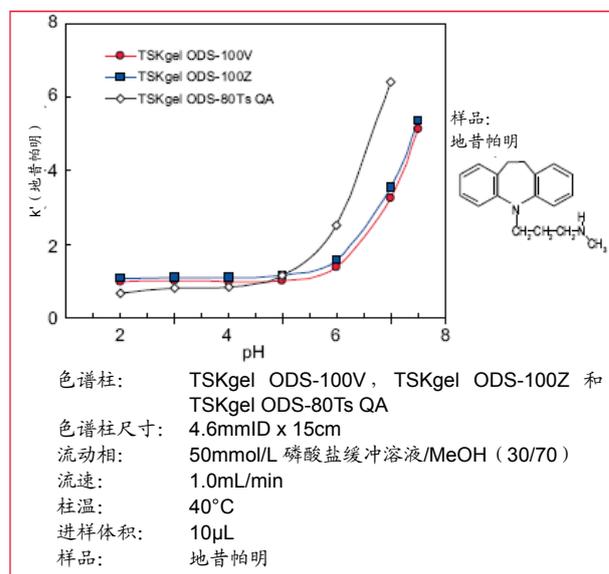


图 12. 碱性化合物的不对称因子与流动相 pH 的关系

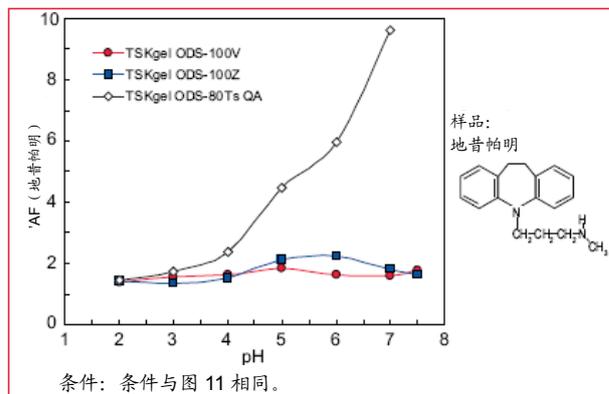


图 13 在众多市售 ODS 色谱柱上使用中性或中等强度的酸性流动相, 对碱性化合物的不对称因子进行了对比。相对于其它 ODS 色谱柱, TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱的不对称因子表明, 其峰拖尾程度最小。

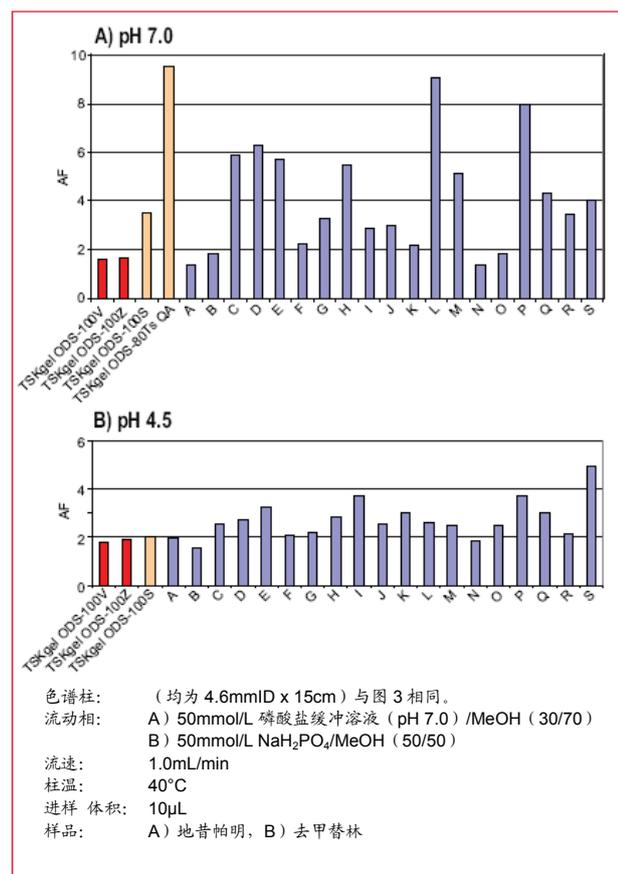
从图 10 至图 13 中可以清楚看到, TSKgel ODS-100V 和 ODS-100Z 色谱柱是低 pH 值或中性条件下分析碱性化合物时的性能最高的 C18 色谱柱。

图 14 对在 TSKgel ODS-100V 色谱柱上与在其它几种市售 AQ 型 (水相相容) ODS 色谱柱上得到的碱性化合物的色谱图进行了对比。相比 AQ 型 ODS 色谱柱, 在 TSKgel ODS-100V 色谱柱上得到的色谱图显示, 地昔帕明和丙咪嗪的峰拖尾均最小。

2) 对酸性化合物的保留

图 15 对比了同一组市售色谱柱使用酸性流动相时甲酸的不对称因子。在酸性流动相中, 酸性化合物的峰形通常是对称的, 但如图 15 所示, 在一些市售的 ODS 色谱柱中观察到峰的拖尾现象。

图 13. 在市售 ODS 色谱柱上对碱性化合物的峰形进行对比。



在 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 上, 甲酸的不对称因子接近 1, 说明峰形是对称的。图 16 对比了在 TSKgel ODS-100V 和其它市售 AQ 型色谱柱上的酸性化合物色谱图。在 TSKgel ODS-100V 色谱柱上可得到甲酸和乙酸的对称色谱峰。

图 14. 在 ODS-100V 和其它市售 AQ 型 ODS 色谱柱上分析碱性化合物时的柱效和峰形

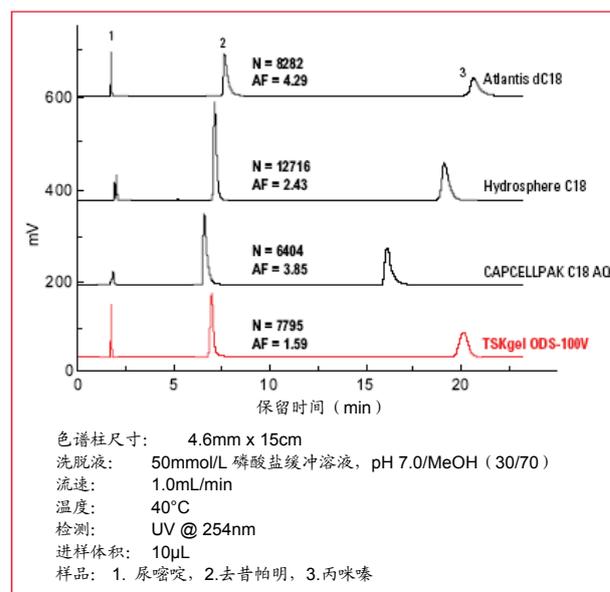


图 15. 酸性化合物在不同市售 ODS 色谱柱上色谱峰的不对称因子的对比

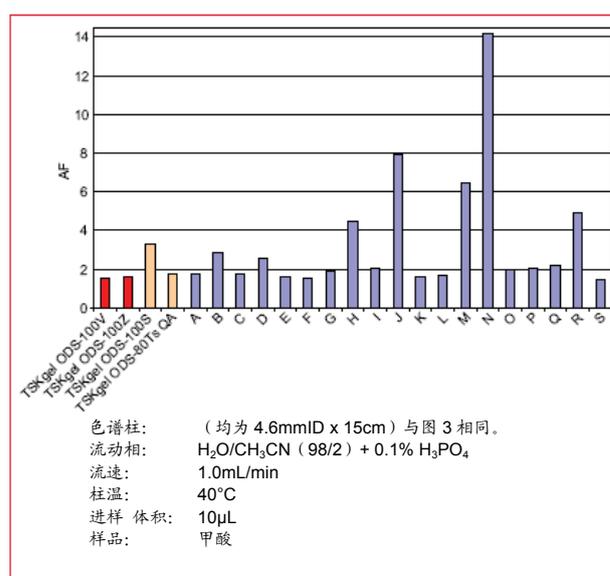
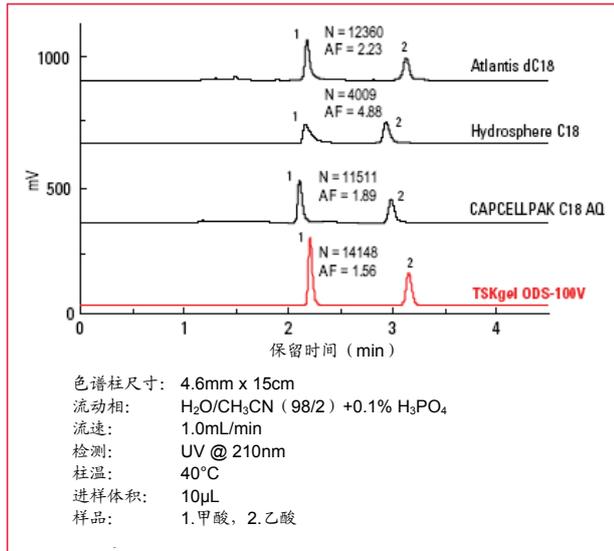


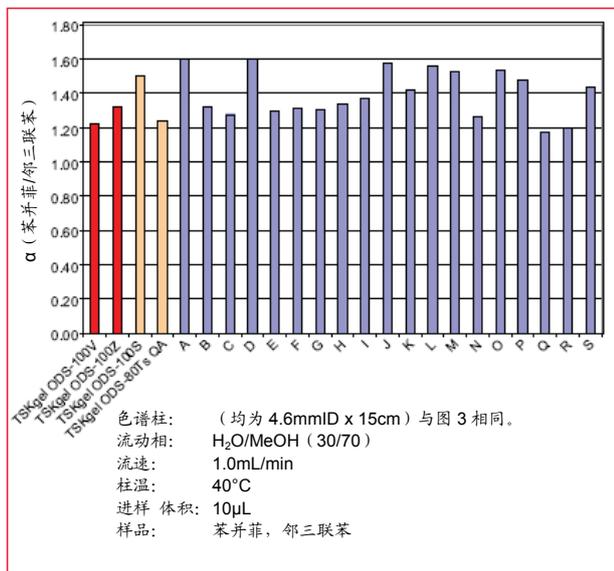
图 16. 市售 ODS 色谱柱分析酸性化合物得到的色谱图



4-7. 立体选择性

图 17 对比了各种市售 ODS 色谱柱的立体选择性。通常, 具有高烷基链表面密度的聚合物固定相的立体选择性优于单体固定相。对苯并菲和邻三联苯的选择性或分离系数 (α) 为 1.5 的色谱柱通常都是多交联固定相结构。TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱均为单层固定相, 并且, 由于 TSKgel ODS-100Z 的含碳量高于 TSKgel ODS-100V 的含碳量 (分别约为 20% 和 15%), ODS-100Z 的立体选择性预期较高, 如图 18 所示。因此, 对于杂环化合物, TSKgel ODS-100Z 更优。

图 17. 立体选择性的对比



4-8. 耐久性

一般而言, 在低 pH 值 (<2.0) 下长时间使用后, ODS 色谱柱显示出保留度的逐渐下降。为检测该效应, 以常用的酸性流动相 (含 0.1% TFA 的 50% 甲醇溶液) 长时间流经 TSKgel ODS-100Z 色谱柱。实验前和实验后的色谱图的对比见图 19。以 50L 流动相流经色谱柱后, 我们观察到, 强碱性化合物阿米替林的保留时间、理论塔板数和不对称因子的变化极小。

图 18. ODS-100V 和 ODS-100Z 立体选择性的对比

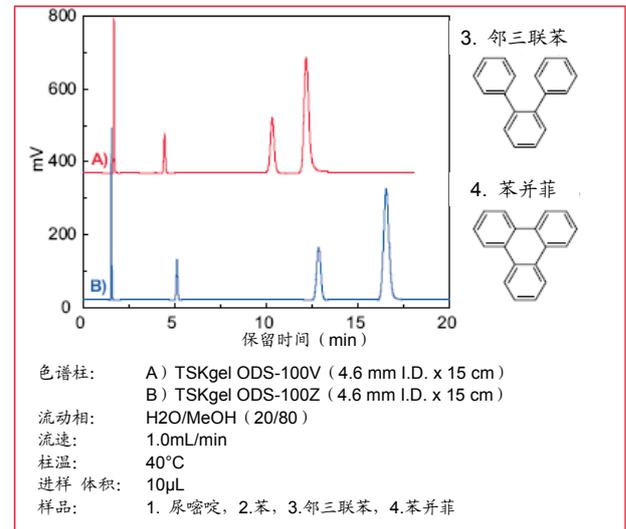
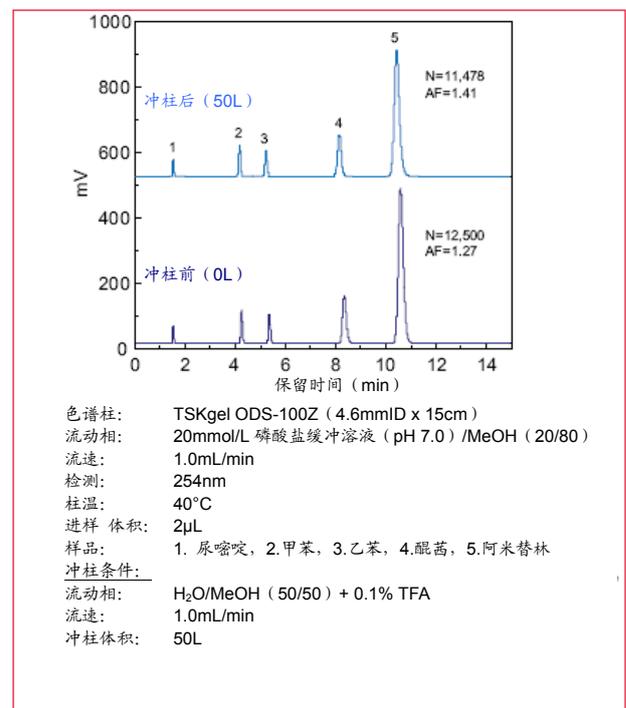


图 19. 以酸性流动相冲柱前和冲柱后色谱图的对比

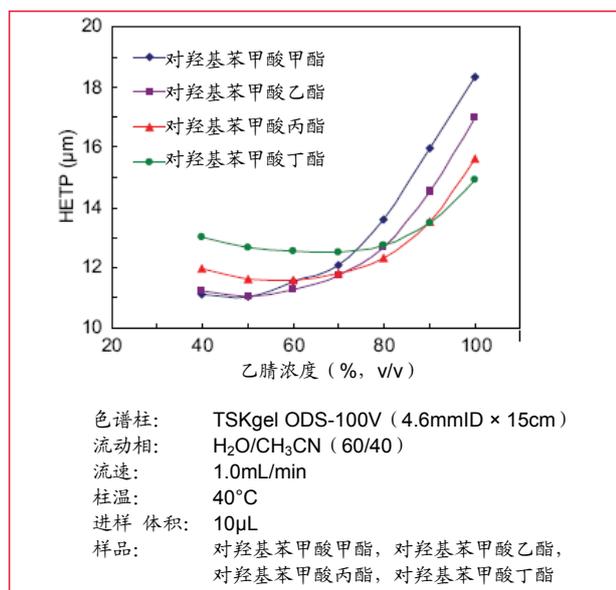


4-9. 样品溶液中有有机溶剂浓度的影响

在反相色谱柱中，流动相的极性越小（有机溶剂的浓度越高），任何时候，流动相中样品的比例就越大，而保留时间就越短。

当样品溶液中有有机溶剂的浓度大于流动相有机溶剂的浓度时，流动相与固定相之间样品组分的分配就会受到影响，导致样品中大部分极性化合物色谱柱峰展宽。我们使用对羟基苯甲酸酯研究了样品溶液中有有机溶剂浓度对峰宽（等板高度，HETP）的影响。分析结果见图 20。使用含有 40% 乙腈的流动相并以对羟基苯甲酸甲酯作为溶质，当样品中的有机溶剂的浓度增大至 50% 以上时，就会出现峰展宽。同样，当样品组分的疏水性增大时，溶质峰开始发生展宽时有机溶剂浓度也随之增大。样品疏水性越强，样品溶液中有有机溶剂浓度产生的影响就越明显。为避免柱效的损失，最好是尽量降低样品溶液中有有机溶剂的浓度（即利用大极性溶剂稀释，如水）或减少进样体积。

图 20. 样品中有有机溶剂对峰形的影响



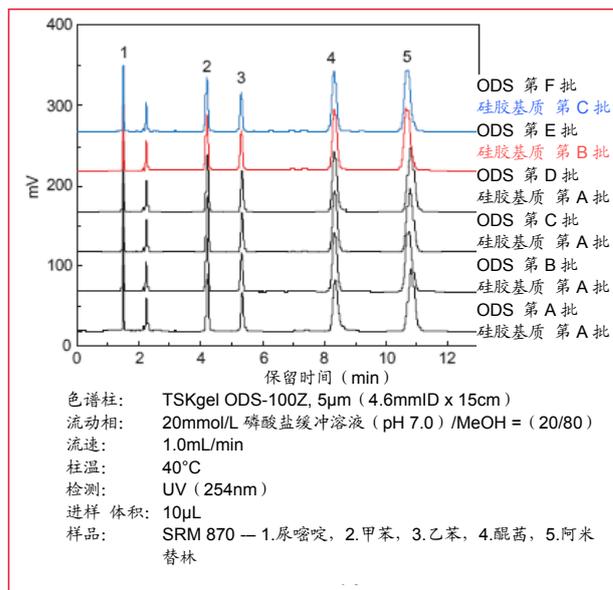
4-10. 批间差异和色谱柱表征

图 21 是在以各种批次的硅胶基质制造的 TSKgel ODS-100Z 色谱柱上 SRM870 测试混合物得到的色谱图。结果显示，色谱图之间未见明显差别，证实了制造的填料批间差异极小，一致性高。

注意，金属螯合物醌茜（峰 4）的峰形漂亮，有机碱阿米替林（峰 5）峰形对称。这些结果表明，分别对金属螯合物和对有机碱的活性都很低。

注: SRM 870 是一种色谱柱测试混合物，可以从 NIST (马里兰州盖瑟斯堡市国家标准与技术研究院) 处购买。该混合物用于表征 C18 色谱柱。

图 21. 凝胶和硅胶基质 (ODS-100Z) 的批间差异



5. 应用数据

图 22 至图 26 是 TSKgel ODS-100V 和 ODS-100Z 的几种应用实例。

维生素的分析见图 22。标准样品为维生素的混合物，范围从极性很大的水溶性维生素抗坏血酸（维 C）至疏水性很强的生育酚（维 E）衍生物。

线性梯度在 20 分钟内从 0% 变为 40% 乙腈（ACN）溶液。极性的维生素在水性或低有机物流动相的条件下在色谱图中最先出峰。从第 20 分钟至 22 分钟开始使用大梯度洗脱液，从 40% ACN 变至 100% ACN，洗脱视黄醇和生育酚衍生物。明显看出，TSKgel ODS-100V 对混合物的极性物质具有更好的全分离度，而对出峰较晚的非极性化合物，TSKgel ODS-100V 的分析时间短了很多。

儿茶素的分析见图 23。儿茶素类化合物是黄酮类植物化学物质，大量存在于绿茶中。儿茶素据称具有许多健康益处，因其预防癌症和心脏疾病的能力而受到人们的研究。图 23 中使用的儿茶素类混合物标准品在 TSKgel ODS-100Z 上明显比在 TSKgel ODS-100V 上得到更好的分离。

有机酸混合物的分析见图 24。有机酸在很多代谢过程、发酵以及食品中起着很重要的作用。图 24 表示 25 种有机酸在 25 分钟内以简单的 0.1% 磷酸流动相实现良好的分离。

图 22. 维生素类

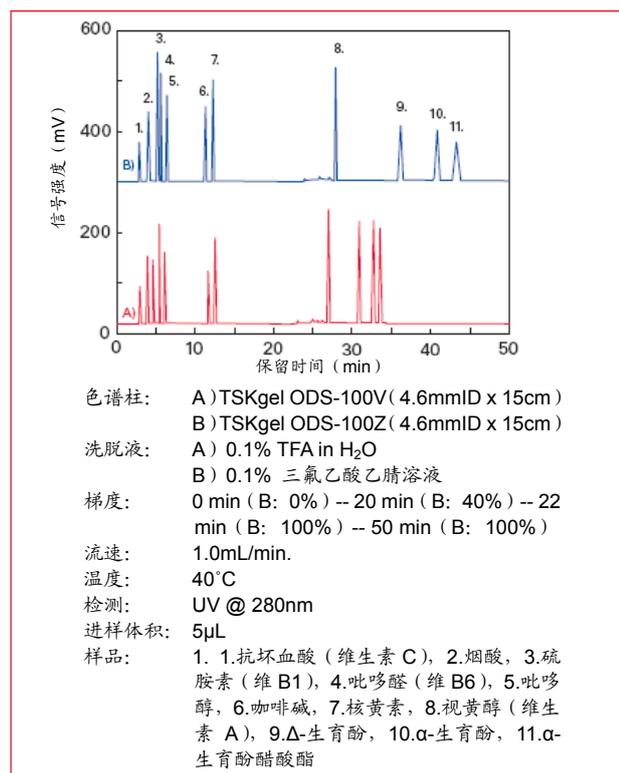


图 23. 儿茶素类

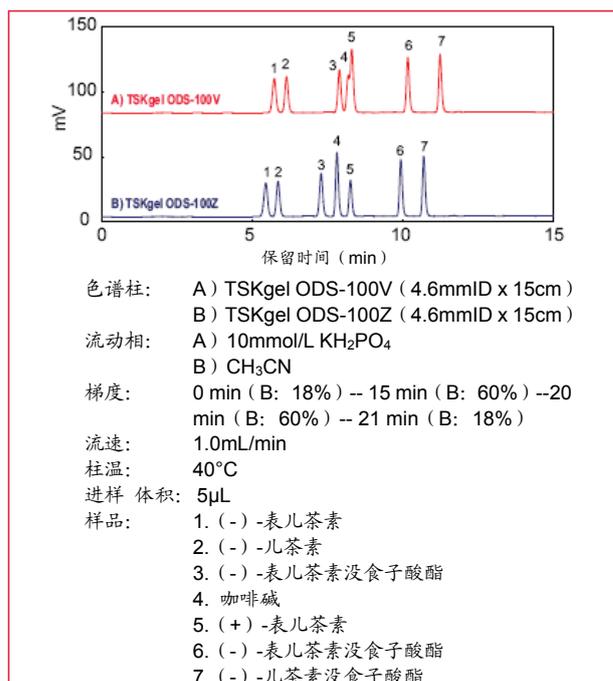
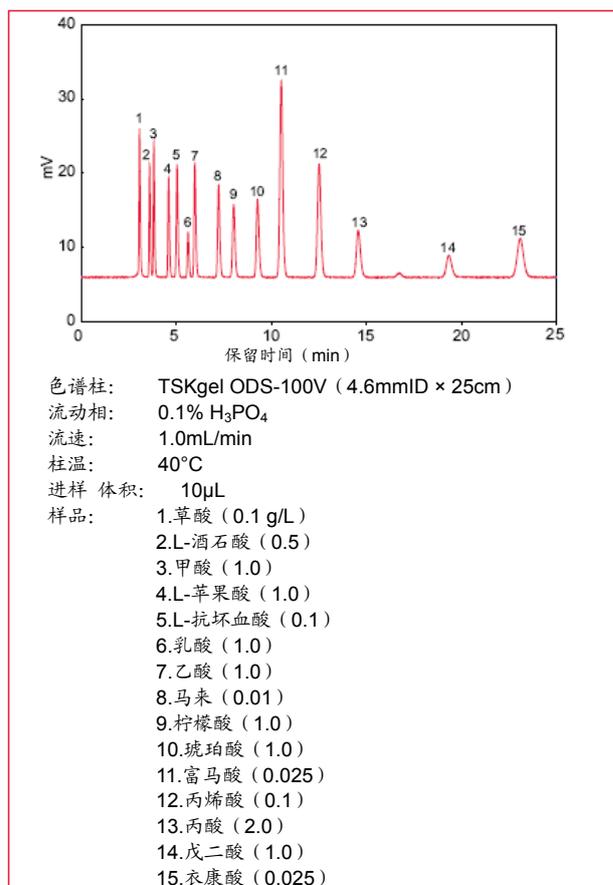


图 24. 有机酸



26种常见聚合物添加剂的基线分离见图25。注意，使用简单线性的乙腈梯度时，柱温要增加至50°C，以在TSKgel ODS-100V色谱柱上实现所需的基线分离。

在TSKgel ODS-100V色谱柱上对单磷酸核苷酸、双磷酸核苷酸、三磷酸核苷酸进行的分析见图26。通过加入短链的离子对试剂叔丁胺来完成分离，调节流动相的pH至6.8，在上述条件下磷酸基完全带电。乙腈用作有机改性剂。如所预料一样，含有单磷酸的核苷酸首先出峰，随后是双磷酸核苷酸、三磷酸核苷酸。为使出峰更晚的溶质从色谱柱中洗脱，流动相需要有梯度。核苷酸在UV 260nm下检测。

图25. 聚合物添加剂

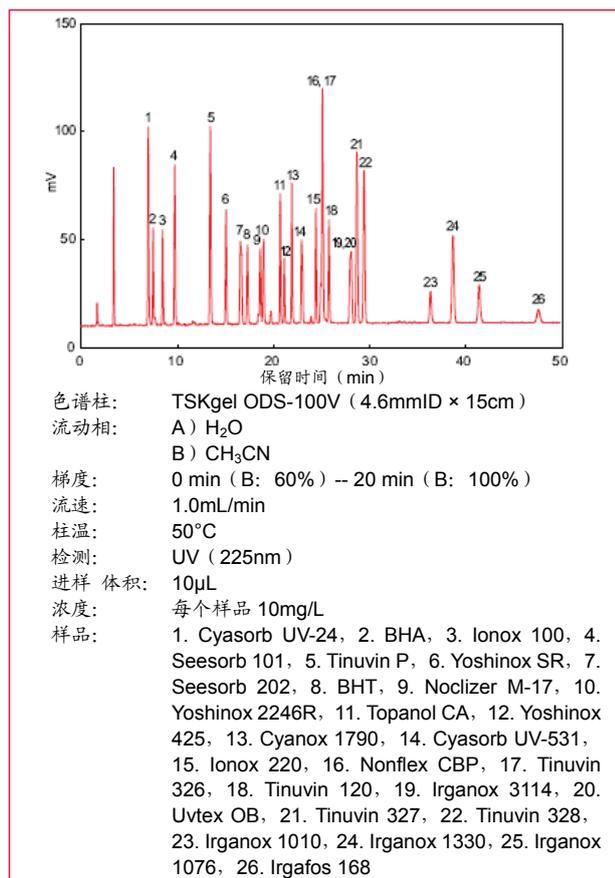
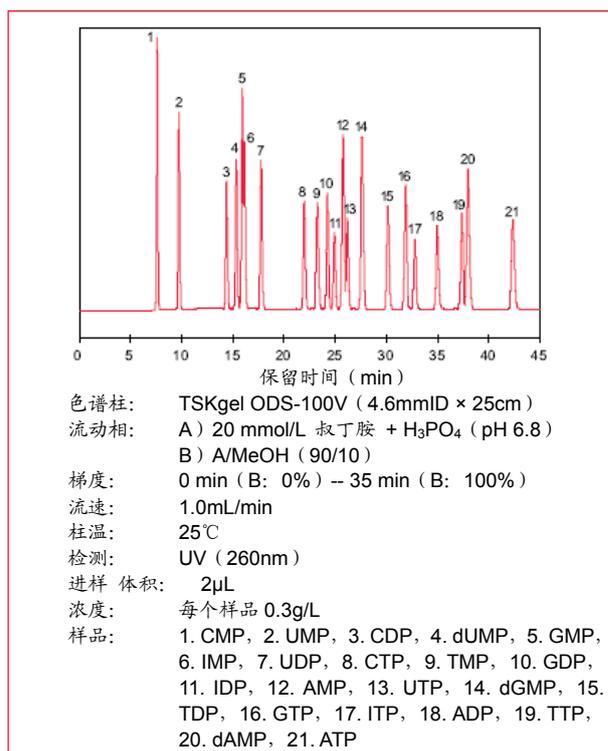


图26. 核苷酸



6. 总结

如上所述，因为 ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 色谱柱由相同的硅胶基质制造，具有相似的柱效(理论塔板数)和背压特性。同时，由于高效的封尾，残余离子交换活性低，对于碱性、酸性和金属螯合物可以得到拖尾最小的对称峰形。

由于 TSKgel ODS-100V 和 TSKgel ODS-100Z 的表面修饰方法不同，样品选择性也有所不同。一般而言，TSKgel ODS-100V 色谱柱最适于分析亲水性化合物，而 TSKgel ODS-100Z 色谱柱则更适于分析疏水性化合物。通过这两种 ODS 色谱柱，各种样品均可实现最佳的分离。



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区宜山路 1289 号 B 座 3F, 301 室
电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858
电子邮件：info@tosoh.com.cn
网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com