

新型复合模式色谱柱检测极性有机酸应用

李兵 金琦芸

赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京 100000

摘要

低分子量有机酸是一类广泛存在于自然界的有机物, 很多样品基体中都已测出不同种类不同含量的有机酸。目前常用测定方法有 HPLC 法、IC 法和衍生化 GC 方法。HPLC法分析有机酸时, 通常在常规反相色谱柱上保留较弱, 本文采用新型复合模式色谱柱, 建立了3种有机酸的液相色谱分析方法, 可得到良好的分析结果。色谱峰面积精密度 (RSD) 范围 (2.17%~3.29%), 标准曲线线性关系良好 $R^2>0.999$ 。本方法流动相条件简单, 重复性好, 可用于药品、食品中有机酸的检测。

关键词

有机酸, 混合模式色谱柱, 药物残留

1. 引言

有机酸是指一些具有酸性的有机化合物。最常见的有机酸是羧酸, 其酸性源于羧基 (-COOH)。磺酸 (-SO₃H)、亚磺酸(RSOOH)、硫酸(RCOSH)等也属于有机酸。有机酸可与醇反应生成酯。

近年来, 有机酸的使用在制药和食品领域越来越普遍, 在食品中常用的有机酸主要有乳酸, 柠檬酸, 酒石酸, 苹果酸等, 常被作为营养物质。在制药领域, 常用的有机酸主要有乙酸、三氟乙酸、甲酸等, 常被作为有机合成的原料, 因此不管是食品还是制药领域有机酸的检测都是有关部门重点关注的课题。

目前高效液相色谱法 (HPLC) 是有机酸最广泛的检测方法, 其分离模式是与检测方法多种多样, 可以根据样品的构成与性质来选择合适的色谱条件, 有机酸在水中很容易发生电离, 产生多峰现象。为了使有机酸尽可能的以分子形式存在, 一般使用酸性流动相来抑制有机酸的解离。通常在流动相中加入磷酸盐缓冲液、冰醋酸、磷酸等, 但小分子有机酸由于极性较强, 通常在 C18 色谱柱上保留较弱, 分离较差, 本实验使用新型复合模式色谱柱, 调整流动相 pH, 使有机酸完全解离, 通过离子交换模式对有机酸进行保留, 操作简单、快速、测定结果准确可靠。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Fisher UltiMate 3000 高效液相色谱仪

2.1.2 Thermo Fisher UltiMate 3000 RS Diode Array Detector

2.1.3 乙腈 (色谱纯, 美国Thermo Fisher公司) ; 实验用水为Thermo去离子水; 磷酸二氢钠 (色谱纯, 百灵威公司)

2.1.4 甲酸、乙酸、三氟乙酸(色谱纯, SIGMA)

2.2 化合物信息及溶液配制

2.2.1 3种有机酸信息 (表 1)

化合物信息表				
中文名	英文名	CAS	分子式	分子量
乙酸	Acetic Acid	64-19-7	C ₂ H ₄ O ₂	60.05
甲酸	Formic acid	64-18-6	CH ₂ O ₂	46.03
三氟乙酸	Trifluoroacetic acid	76-05-1	C ₂ H ₁ F ₃ O ₂	114.02

2.2.2 储备液: 分别精确称取3种有机酸适量, 水溶解, 配制储备液 10 mg/mL。

2.2.3 系列标准曲线: 以水作为溶剂, 取有机酸标准储备溶液, 分别配制浓度为 10.0 μg/mL、100.0 μg/mL、200.0 μg/mL、500.0 μg/mL、500.0 μg/mL、1000.0 μg/mL、2000.0 μg/mL 的有机酸标准系列溶液。

2.2.4 样品处理

称取多肽药物样品 20mg 于 10mL 具塞比色管中, 加水至 10mL, 超声提取 20min, 取适量样品在 10000rpm 下高速离心 15min, 取上清液过 0.45 μm 的滤膜后作为待测溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Thermo Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (150×3.0mm 3 μm)

柱温: 30 °C;

进样量: 5 μL;

流动相: A为25mM磷酸二氢钠 (氢氧化钠调节 pH至5.2) , B为乙腈

A:B=60:40

检测波长: 210nm

3. 实验结果与讨论

3.1 复合模式色谱柱原理

Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 色谱柱基于新型混合模式硅胶填料, 具有疏水和弱阴离子交换性能。与传统的反相固定相不同, 新型填料具有带可电离末端的烷基长链, 并且具有很大的潜力, 可用于分离各种含有混合物的阴离子化合物, 包括药物, 食品和饮料, 化学品等。

反相 (RP) 硅胶色谱柱 (例如 C18) 是用于众多液相色谱 (LC) 分离最广泛的固定相。然而, 亲水性离子化合物, 如小分子有机酸或无机离子在这些柱上保留和分离效果较差。混合模式色谱结合了离子交换色谱和传统反相色谱的各个方面。混合模式固定相具有疏水性和离子交换性。相与分析物的两种强烈相互

作用可用于独立控制可电离和中性分子的保留。因此，许多在 C18 色谱柱上难以处理的亲水性可电离化合物的应用挑战，可以很容易地在混合模式色谱柱上进行处理。

3.2 灵敏度和线性范围测试

采用上述仪器分析方法，对 3 种有机酸进行线性范围测试，线性相关系数 r^2 均大于 0.999，线性关系良好。3 种有机酸线性范围、线性相关系数、LOD ($S/N > 3$) 及 LOQ ($S/N > 10$) 结果见表 2，化合物线性方程图见图 1。

表 2. 3 种有机酸的线性范围、线性相关系数及 LOD、LOQ、RSD

化合物	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 (r^2)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD% ($n=6$)
乙酸	10-2000	0.99999	1.4	4.6	2.17
甲酸	10-2000	0.99998	1.0	3.4	2.58
三氟乙酸	10-2000	0.99991	4.9	16.7	3.29

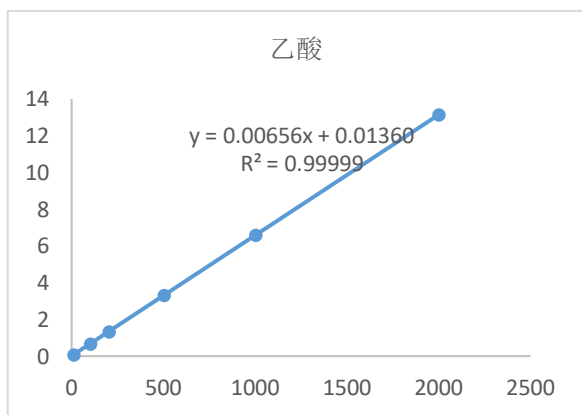


图 1 乙酸标准曲线图

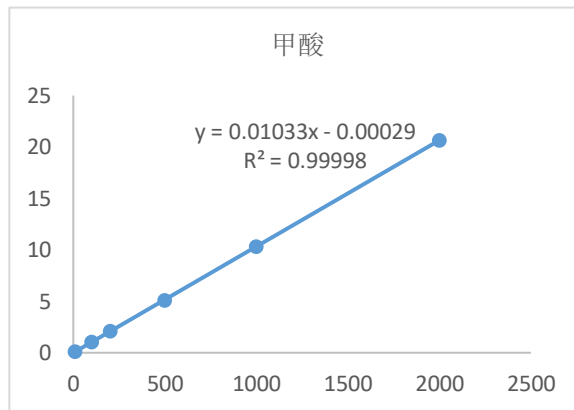


图 2 甲酸标准曲线图

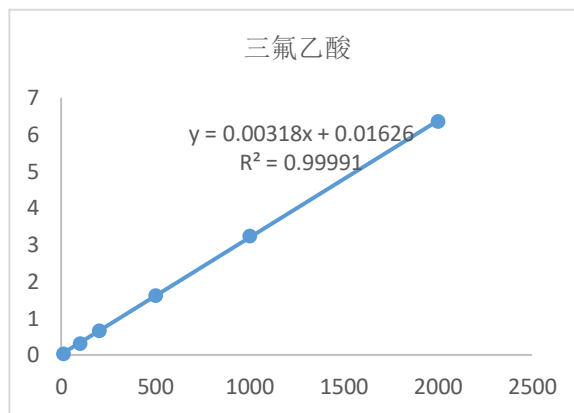


图 3 三氟乙酸标准曲线图

3.3 标准品及样品分析

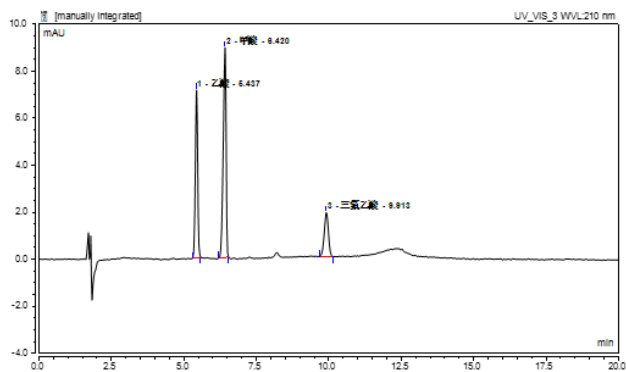


图 4 3种有机酸标准品谱图 (浓度 100 $\mu\text{g/mL}$)

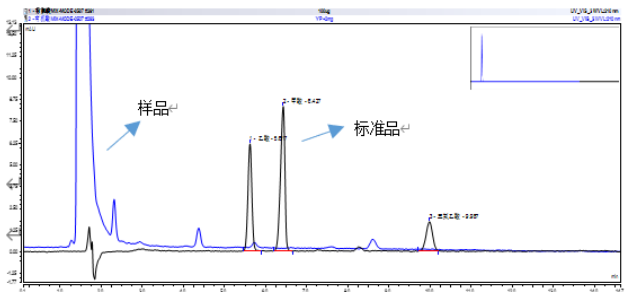


图 5 多肽药物样品及 3 种有机酸标准品对比谱图
(样品浓度 2mg/mL,混合标准品浓度 100ug/mL)

多肽原料药在合成过程中使用了乙酸、三氟乙酸，需要对乙酸及三氟乙酸的含量进行控制，所以对多肽样品中乙酸、三氟乙酸残留量进行测定，在实际样品测试中，乙酸被检出，其他物质未被检出，经计算乙酸在样品中浓度为 5.6ug/ml,含量为 0.28%，符合限量要求。



4. 结论

本文建立了液相色谱方法结合新型复合模式色谱柱对3种有机酸的检测方法。由实验结果可以看出，基于Thermo Fisher UltiMate 3000 高效液相色谱仪结合Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 色谱柱的检测方法具有优异的灵敏度、稳定性和线性范围，可用于有机酸在制药和食品领域的常规分析检测。

参考文献

1. 黎爽, 刘蕊, 马博凯, 反相高效液相色谱法测定水果中有机酸含量,《现代科学仪器》, 2013 年
2. 田林锋, 胡继伟, 黄先飞, 反相高效液相色谱法快速测定梨中 7 种有机酸含量,《食品研究与开发》, 2010 年
3. Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 Column Total Control of Selectivity
4. Product manual for Acclaim® Mixed-Mode WAX-1, ThermoFisher scientific



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
和质谱中国

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC