Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

CORTECS苯基色谱柱对硝基芳香化合物分离的独特选择性

Lavelay Kizekai 和 Bonnie Alden
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- CORTECS®苯基色谱柱可提高硝基芳香化合物的分析速度和分析通量。
- 通过智能化的溶剂选择获得最佳的选择性和分析性能。
- 减少溶剂用量和废液生成量，降低运行成本。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®

ACQUITY UPLC PDA检测器

Empower® 3色谱数据软件(CDS)

CORTECS苯基色谱柱

CORTECS C_8色谱柱

中性适用性QC标准品

TruView™ LCMS认证最大回收样品瓶

关键词

ACQUITY UPLC，硝基芳香化合物，ACQUITY UPLC色谱柱计算器，1,3,5-三硝基苯，1,3-二硝基苯，硝基苯，TNT，中性，QCRM，选择性，CORTECS苯基2.7 µm色谱柱

简介

硝基芳香化合物几乎不会在自然界中自发形成，它们主要通过人工合成，染料、聚合物、杀虫剂和炸药中都含有该类物质。大规模地合成此类化合物会造成土壤和地表水污染，最终引发环境问题。硝基赋予了此类分子多样的化学性质和功能，但也导致这些物质难以进行生物降解。由于这类物质具有抵抗氧化降解的能力，其本身又具有急性毒性、致突变性，而且易被还原为致癌性的芳香胺，因此它们的抗降解性问题尤为棘手[1]。环境保护署(EPA)已将这些物质列为有害物质，并且认为它们会危害人体健康。

本应用纪要将探索如何应用CORTECS苯基色谱柱高效且有效地分离这类化合物，并研究甲醇和乙腈对分离的影响。无论是对于节省成本还是开发更出色的色谱方法而言，了解溶剂选择对分析选择性的影响都具有重要意义。本研究将使用一种计算溶剂强度的方法展示乙腈和甲醇在 CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱(2.7 µm填料)上的选择性差异[2]。

实验

ACQUITY UPLC条件(QC标准品)

流动相:	乙腈:水(70:30)
分离模式:	等度
检测条件:	UV 254 nm
色谱柱:	CORTECS苯基, 2.7 µm, 2.1 x 100 mm色谱柱(部件号186008321); CORTECS C8, 2.7 µm, 2.1 x 100 mm 色谱柱(部件号186008351)
柱温:	40 °C
弱洗针液:	乙腈:水 10:90
强洗针液:	水:乙腈 50:50
密封清洗液:	乙腈:水 20:80
流速:	0.5 mL/min
进样体积:	1.0 µL

ACQUITY UPLC条件(硝基芳香化合物)

流动相:	甲醇:水 45:55
分离模式:	等度
检测条件:	UV 254 nm
色谱柱:	CORTECS苯基, 2.7 µm, 2.1 x 100 mm色谱柱(部件号186008321); CORTECS C_8, 90Å, 2.7 µm, 2.1 x 100 mm 色谱柱(部件号186008351)
柱温:	40 °C
弱洗针液:	乙腈:水 10:90
强洗针液:	水:乙腈 50:50
密封清洗液:	乙腈:水 20:80
流速:	0.5 mL/min
进样体积:	1.0 µL
样品瓶:	TruView LCMS认证12 x 32 mm 螺纹颈口最大回收透明玻璃样品瓶, 配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫, 容积1.5 mL (部件号186005662CV)

QC标准品: 中性适用性QC标准品(部件号186006360)

数据管理: Empower 3 CDS

样品前处理

使用100%甲醇配制浓度为10 µg/mL的硝基芳香化合物溶液。将样品转移至TruView LCMS认证12 x 32 mm螺纹颈口最大回收透明玻璃样品瓶(配有盖子和预切割PTFE/硅橡胶隔垫, 容积1.5 mL, 部件号186005662CV), 用于进样。

结果与讨论

在本应用纪要中，我们首先使用CORTECS苯基, 2.7 µm, 2.1 x 100 mm色谱柱(部件号186008321)和CORTECS C_8, 2.7 µm, 2.1 x 100 mm色谱柱(部件号186008351)分离分析物，然后基于不同的溶剂选择研究分析的选择性，从而高效且有效地分析硝基芳香化合物。本研究采用沃特世(Waters®)中性适用性QC标准品(部件号186006360)作为CORTECS C_8和苯基2.7 µm色谱柱的选择性评判基准。使用乙腈作为强溶剂时，两种色谱柱均在不到一分钟的总分离时间内实现了中性适用性QC标准品的基线分离(见图1)。由图1可以看出，CORTECS C_8色谱柱和苯基色谱柱的疏水性非常相近。由于具有烷基链，CORTECS C_8色谱柱固定相对疏水性分子(萘和苊)的相似溶解度稍高。

本实验还研究了使用CORTECS C_8和苯基2.7 µm色谱柱分离硝基芳香化合物时，乙腈对分离效果的影响(见图2)。

CORTECS苯基色谱柱对峰1和峰3的选择性与CORTECS C_8色谱柱有一定的差异。峰1和峰2在CORTECS苯基色谱柱上的保留性也比CORTECS C_8色谱柱更出色。由于配体与分析物之间存在π-π相互作用，CORTECS苯基色谱柱的分离效果比CORTECS C_8色谱柱更胜一筹。采用CORTECS苯基色谱柱进行分析时，峰3与峰2之间的选择性为1.16，峰2与峰1之间的选择性为1.34。从理论上讲，可接受的选择性值应大于1.0[3]。

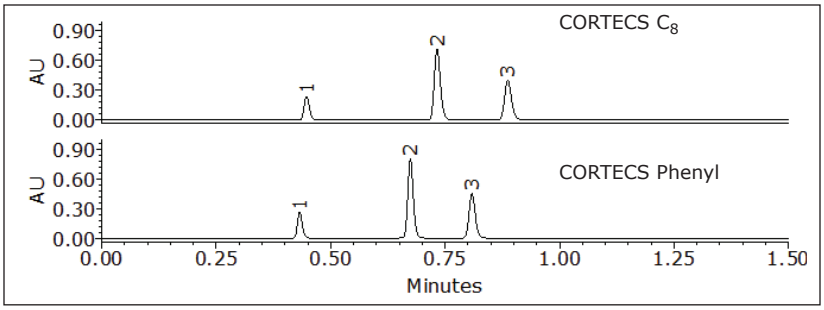

图1. 采用CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱，以乙腈:水(70:30)作为流动相分离中性适用性QC标准品(部件号186006360)。峰鉴定结果为：1)丙酮，2)萘，3)苊。

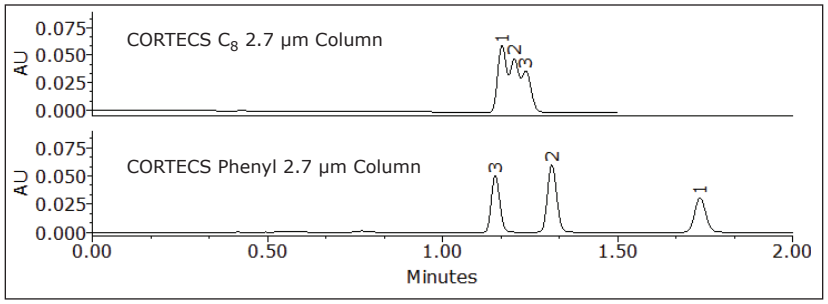

图2. 采用CORTECS C8和苯基2.7 µm色谱柱，以乙腈:水(40:60)作为流动相分离硝基芳香化合物。1) 1,3,5-三硝基苯，2) 1,3-二硝基苯，3)硝基苯。

为了加强π-π效应，我们将非质子溶剂乙腈替换为质子溶剂甲醇，然后评估了CORTECS C_8和苯基2.7 µm色谱柱对硝基芳香化合物的选择性。我们采用如下所示的公式1[1]确定适用的甲醇浓度，使其溶剂强度与乙腈相当。成功应用该方程的一个重要前提是确保色谱峰实现了基线分离，而采用CORTECS苯基色谱柱以40%乙腈作为流动相进行的分离满足此要求(见图2)。

$$\Phi_c = \Phi_b \frac{P_b}{P_c}$$

公式 1.

其中Φ_c表示待确定的甲醇浓度，Φ_b表示乙腈浓度；P_b和Pc分别表示乙腈的P'(5.8)和甲醇的P'(5.1)。P'值可根据液相色谱分析中溶剂的性质[2]获得，该值与每种溶剂特有的极性相对应。经计算，Φ_c应为45%甲醇。右侧的表格和色谱图展示了使用甲醇作为强溶剂时所得的分离结果(见表1和图3)。

使用甲醇作为流动相时，三种化合物均成功分离，而且各色谱峰都实现了基线分离。化合物在CORTECS C_8色谱柱上的保留性几乎没有变化，仅选择性略有改变。但使用甲醇替代乙腈时，我们观察到化合物在CORTECS苯基色谱柱上的分离度显著提升。甲醇的质子属性使其比非质子性的乙腈更适用于分离芳香化合物(如图2所示)。数据(表1)显示，两款色谱柱均能满足Rs>1.5和α>1.0的要求。用甲醇替代乙腈作为流动相能够提高分析的选择性。

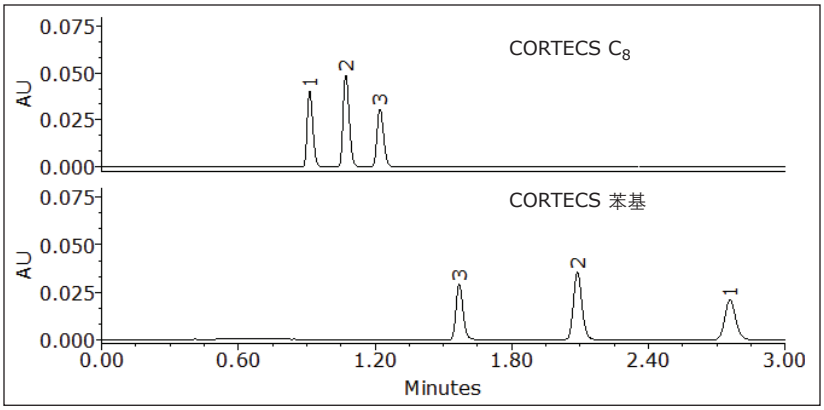

图3. 采用CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱，以甲醇:水(45:55)作为流动相分离硝基苯所得的色谱图。

	CORTECS C_8色谱柱			CORTECS 苯基色谱柱		
化合物	**1,3,5-TNB**	**1,3-DB**	**NB**	**NB**	**1,3-DB**	**1,3,5-TNB**
保留时间	0.912	1.071	1.221	1.569	2.088	2.758
K prime (K')	8.1	9.7	11.2	14.7	19.9	26.6
分离度(R_2)		3.3	2.9		8.2	8.4
选择性(α)		1.20	1.15		1.35	1.34

表1. 使用成本更低的甲醇替代乙腈作为流动相进行分离时所得的结果，数据表明选择性在可接受范围内。

分析硝基芳香化合物EPA 8330标准品混合物A和混合物B

我们采用CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱分析了两种硝基芳香化合物标准品混合物(EPA 8330混合物A和混合物B)，其中所含的硝基芳香化合物与炸药生产以及此类化合物的降解产物相关。分析物谱图如图4所示，其中峰1至峰8来自混合物A，峰9至峰14来自混合物B。我们将这些标准品转移至TruView LCMS认证最大回收样品瓶，然后采用CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱以甲醇:水(45:55)作为流动相进行分析(见下方的图4)。

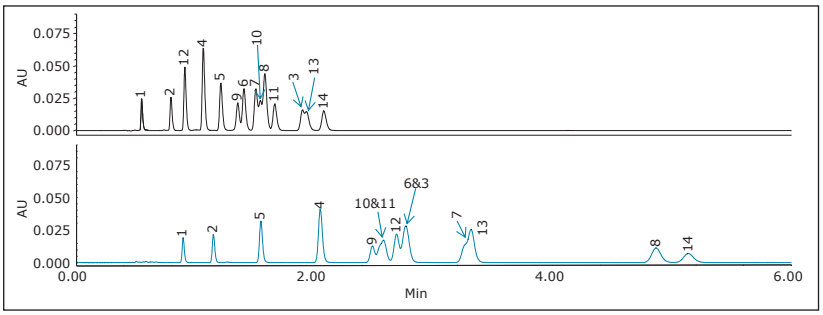

图4. 使用CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱分析EPA 8330混合物A_8与混合物B的混合物所得的谱图。1) HMX，2) RDX，3) 1,3,5-三硝基苯，4) 1,3-二硝基苯，5) 硝基苯，6) 2,4,6-三硝基甲苯，7) 2-氨基-4,6-二硝基甲苯，8) 2,4-二硝基甲苯，9) 三硝基苯甲硝胺，10) 4-氨基-2,6-二硝基甲苯，11) 2,6-二硝基甲苯，12) 邻硝基甲苯，13) 对硝基甲苯，14)间硝基甲苯。

使用CORTECS苯基色谱柱和质子性的流动相时，硝基芳香化合物的分离效果比使用CORTECS C_8色谱柱时更好。苯基配体提高了色谱柱的选择性，因此不仅分离窗口得到了改善，各个色谱峰之间的分离度也显著提高。例如在图4中，峰8与峰7、10和11实现了完全分离。为甲醇流动相设置一个平缓的梯度还能进一步优化分离效果。

结论

流动相在影响分离选择性方面所发挥的作用与固定相的作用同等重要。虽然反相液相色谱通常选用乙腈作为流动相，但甲醇也是一种可提高选择性的替代溶剂。使用乙腈作为流动相时，CORTECS C_8色谱柱未能成功分离硝基芳香化合物，而当采用质子溶剂甲醇时，CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱都对这类化合物表现出了独特的选择性。得益于其π-π键相互作用，CORTECS苯基色谱柱在使用乙腈和甲醇作为流动相时均表现出了独特的分离选择性。在研究等度分离中的溶剂选择时，Snyder公式[2]可作为优化选择性和缩短分析时间的一个重要工具。CORTECS C_8色谱柱和CORTECS苯基色谱柱是都是关键的方法开发工具，它们能够高效且有效地利用各种溶剂，实现最佳分离效果。

参考文献

1. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation, Ju KS,[1] Parales RE. [1]Department of Microbiology, College of Biological Sciences, University of California, 226 Briggs Hall, 1 Shields Ave., Davis, CA 95616, USA.
2. L.R. Snyder & J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Chromatography Second Edition.*
3. FDA Validation of Chromatographic Methods.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY UPLC、CORTECS和Empower是沃特世公司的注册商标。
TruView是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2016年 沃特世公司 中国印刷 2016年1月 720005580ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com