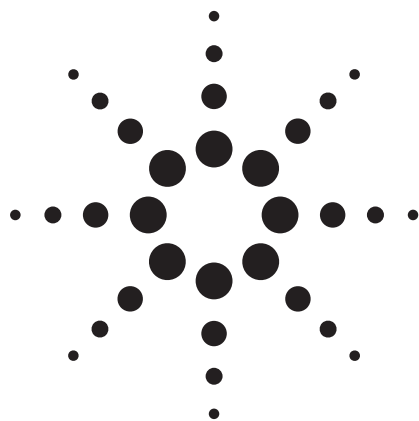




提高快速高效分离方法转换的效率 应用

作者

Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

由于亚二微米色谱柱的日益普及，以及对质谱友好方法的需求不断增加，亟需将已有的 HPLC 方法转化到直径和粒径较小的色谱柱上运行。尽管这种转化只是通过简单的数学运算按比例调整流速、梯度时间和进样量，仍有很多用户无法得到最佳结果。本文中，我们仔细分析了这个问题，并给出能够以更可预测和更有效的方式提高分析速度和/或分离度的计算方法。

引言

在填充有大粒径的 5 或 10 μm 填料的老色谱柱上开发的方法，经常可以通过改用粒径和直径更小的色谱柱而使方法更加现代化。它具有缩短分析时间，降低溶剂消耗，提高灵敏度，更易与质谱仪的离子源兼容等潜在的优点。简而言之，一根 5 μm 粒径、250 mm

柱长的色谱柱可以被 3 μm 粒径、150 mm 柱长的色谱柱所取代。如果长度与粒径的比例相等，则认为这两根色谱柱具备相同的分离能力。溶剂消耗量减少的比例为 L_1/L_2 ，在这里，每次分析的溶剂耗量降低 1.6 倍。如果可以成功注入相等质量的被分析物，由于其以相同的柱效在一根较小的色谱柱中运行，色谱峰的稀释作用降低了，因而灵敏度也将提高至 1.6 倍。

已经得到证实，与一般的 LC/UV (UV/Vis 光学检测) 方法相比，LC/MS (液相色谱/质谱) 离子源在较低的流速下灵敏度更高，电喷雾离子化方式尤其如此。因此，如能减小色谱柱的内径，则将有助于在较低的流速下提高单位时间的分析能力。不同色谱柱直径与流速的变化关系见式 1。

$$\text{流速}_{柱1} \times \left[\frac{\text{直径}_{柱2}}{\text{直径}_{柱1}} \right]^2 = \text{流速}_{柱2} \quad (\text{式 1})$$

柱长和直径减小的联合效应表现在降低溶剂消耗量，并且如果假设可以将相同质量的被分析物注入较小的色谱柱，色谱峰响应将有相应比例的提高。不过，我们一般根据色谱柱的大小来按比例调整进样量。进样



Agilent Technologies

量的调整比例可以通过原色谱柱的进样量乘以两根色谱柱的空体积比值计算得到。

$$\text{进样量柱 1} \times \left[\frac{\text{空体积柱 2}}{\text{空体积柱 1}} \right] = \text{进样量柱 2} \quad (\text{式 2})$$

对于等度洗脱，在上述条件下一般可以得到很好的方法转换结果，总体分离度没有或几乎没有变化。然而，如果希望改善方法转换的效果，还应考虑其它参数的影响。第一，是柱效与流速的关系，或者更确切地说，柱效与 van Deemter [1] 和他人所提出的线速度之间的关系；第二，是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。

Van Deemter 发现并给出了柱效与一系列参数之间关系的数学表达式，但是这里我们最感兴趣的，是对于任何一个给定粒径的 HPLC 填充柱，其存在最佳线速度，并且最佳线速度随着粒径的减小而提高。直观起见，常以图 1 代表 van Deemter 图，这是在原图基础上修改后的版本 [2]。

由图 1 可见，在作者设定的条件下，5 μm 填料在 1 毫米/秒时具有最佳的线速度。3.5 μm 填料的最佳线速度约为 1.7 毫米/秒，并且没有特别明显的最优值，表明 3.5 μm 填料在更大的流速范围内可以获得更稳定的柱效。对于 1.8 μm 填料，其最小板高（或最高柱效）的范围很宽，从 2 mm/秒开始，所有的数据都一样。这一信息对于实际应用而言，就是之前讨论的，可以通过提高线速度进一步缩短分析时间，从而常常可以进一步优化小颗粒填料的色谱方法。洗脱速度的提高，使得绝对峰宽降低，可能要求用户提高数据采集速率，减小信号过滤参数，以确保色谱分离被准确记录于采集的数据文件中。

第二点重要的考虑是通常被忽略的柱外扩散效应对实际柱效或经验柱效的影响。随着柱体积的降低，色谱峰洗脱体积也成比例地降低。如果同时还应用了较小粒径的填料，预期的峰体积会进一步降低。液相色谱是由许多毛细管和接头组成的，被分析物通过的区域尤其如此，这些将产生可测量的峰展宽。从进样器到流通池，所累积的扩散将降低色谱柱的性能，并且使

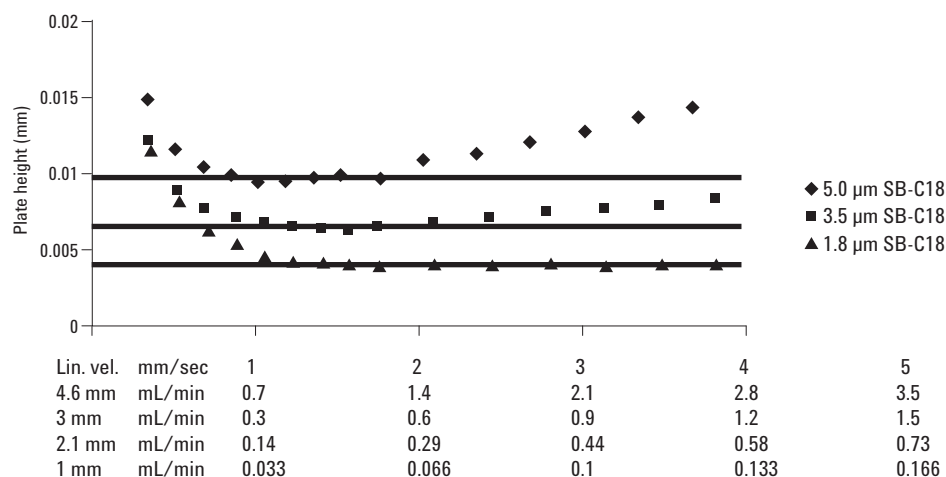


Figure 1. van Deemter plot with various flow rates and particle sizes.

得实测柱效远远低于由纯理论的方式得到的估计值。在一个 HPLC 系统中，检测到 20~100 μL 的扩散量是相当普遍的。对于最小的色谱柱和最小的粒径，两者应该得到最小的峰体积，而扩散效应对其色谱峰的影响是不成比例的。用户应注意减小柱外体积，即在实际使用时，可减少连接接头的用量以及进样阀和检测器流通池的体积。

对于梯度洗脱分离，从分析的开始阶段直到目标被分析洗脱，流动相的组成不断增加，成功地将方法转换到较小的色谱柱上时，要求保持梯度斜率不变。尽管许多出版物都以每分钟的变化量 (%) 来表示梯度斜率，以相对于柱体积的变化量 (%) 来表示更为有用。这样，能够准确地把方法转换中产生的柱体积变化考虑进新的梯度条件中。如果我们把梯度表中的每一段变化看作一个区段，可以通过下式来表示梯度斜率：

$$\text{梯度斜率} = \left[\frac{(\text{结束 \%} - \text{开始 \%})}{\text{\# 柱容量}} \right] \quad (\text{式 3})$$

注意，对于用户而言，与每分钟的变化量%相比，使用相对于柱体积的变化量 % 更容易通过改变梯度分离时间或流速来调节梯度斜率。如梯度斜率大，则梯度变化大且分离度较小，而较小的梯度斜率可得到较高的分离度，但在同时，溶剂消耗量增加，灵敏度降低。如果梯度时间增长，分析时间也会更长，除非是在允许的运行压力范围内通过增加流速来降低梯度斜率。

分离度随梯度斜率的减小而提高，这是因为有效体积因子 k^* 增大了。和等度分离类似，体积因子称为 k' ，该值增大，将直接导致分离度的提高。 k 值约在 5~10 之间时，这一效应非常明显，而超出这一范围后的影响极为有限。以下的例子中，我们将看到与上述讨论相关的计算结果。

实验条件

系统

Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱，包括：
G1379B 微脱气机
SL 型 G1312B 二元泵
SL 型带温控的 G1367C 自动进样器
SL 型 G1316B 柱温箱
SL 型 G1315C UV/VIS 二极管阵列检测器，流通池条件在各色谱峰中列出
32 位 ChemStation，B.02.01 版

色谱柱

Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm
Agilent ZORBAX SB-C18, 3.0 mm $\times$ 150 mm, 3.5 μm

流动相条件

有机相： 乙腈
水相： 25 mM 磷酸的 Milli-Q 水溶液

梯度条件

梯度斜率：以柱体积计，7.8% 或 2.3%，如图所示。流速和时间见各色谱图

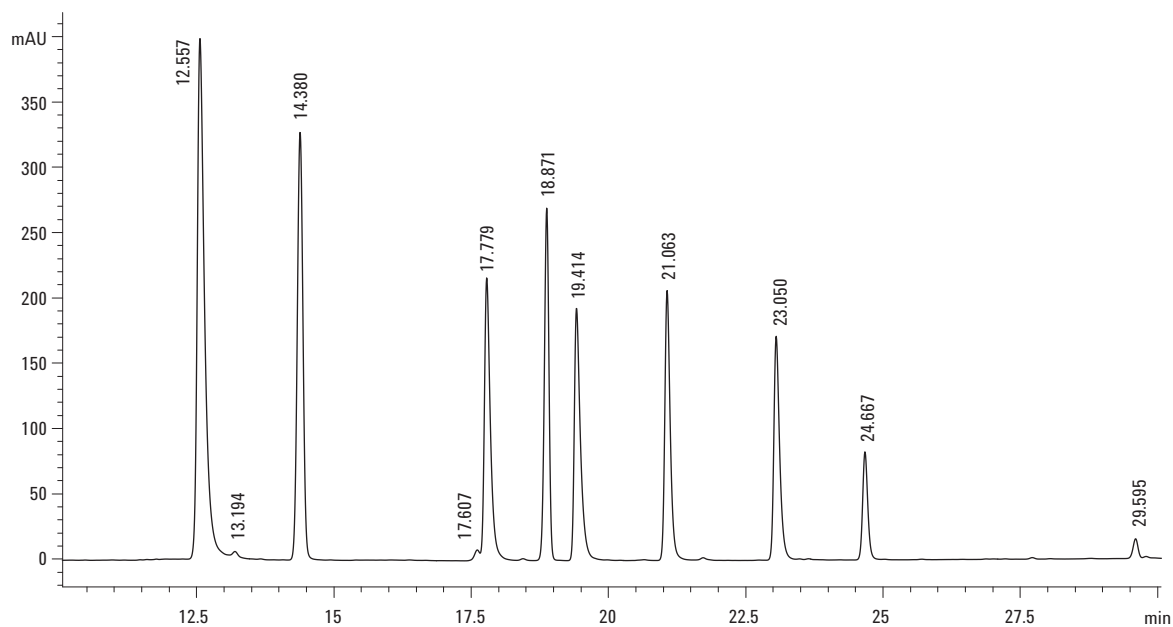
样品

氯代苯氧型除草剂标准品的甲醇混合溶液，浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$

结果

最初，在标准的 4.6 mm $\times$ 250 mm、5 μm Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱上参照 US EPA 方法 555 的条件运行分析，柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，分析结果见图 2。然后，按比例调整流速和时间，把方法转换到 3.0 mm $\times$ 150 mm、3.5 μm 色谱柱上，结果见图 3。每次分析的溶剂消耗量由 60 mL 降低至 15.5 mL。

接着，为加快分离速度，对分离条件进行再优化，在相同的斜率 7.5% 下，把流速从 0.43 mL/min 提高至 1.42 mL/min，同时按比例降低了梯度时间，结果见图 4。最后，在保持图 3 的原有时间不变的条件下提高流速，证明其可以提高分离度（见图 5）。这样，得到了相同时间条件下的梯度，梯度斜率降低为 2.3%。4、5 号色谱峰的分离度增加得相当显著。



条件:

以 ZORBAX SB-C18 色谱柱和快速 DAD 检测器运行 EAP 方法 555

ZORBAX SB-C18 4.6 mm × 250 mm, 5 μm

柱温: 25 °C

梯度: 乙腈比例由 10% 升至 90%, 水相为 25mM 磷酸溶液

梯度斜率: 7.8% 乙腈/柱体积

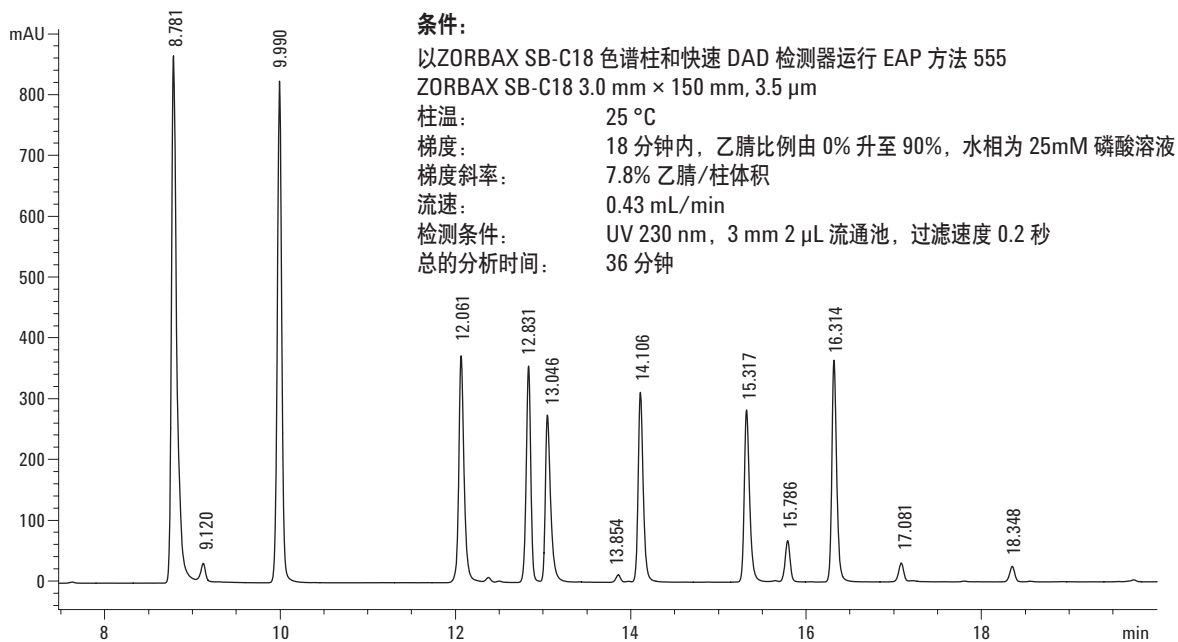
流速: 1 mL/min

A组化合物

总的分析时间: 60 分钟

检测条件: UV 230 nm, 10 mm 13 μL 流通池, 过滤速度 2 秒 (缺省值)

图 2. 除草剂在 4.6 mm × 250 mm 5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离



条件:

以 ZORBAX SB-C18 色谱柱和快速 DAD 检测器运行 EAP 方法 555

ZORBAX SB-C18 3.0 mm × 150 mm, 3.5 μm

柱温: 25 °C

梯度: 18 分钟内, 乙腈比例由 0% 升至 90%, 水相为 25mM 磷酸溶液

梯度斜率: 7.8% 乙腈/柱体积

流速: 0.43 mL/min

检测条件: UV 230 nm, 3 mm 2 μL 流通池, 过滤速度 0.2 秒

总的分析时间: 36 分钟

图 3. 除草剂在 3.0 mm × 150 mm 3.5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的梯度分离

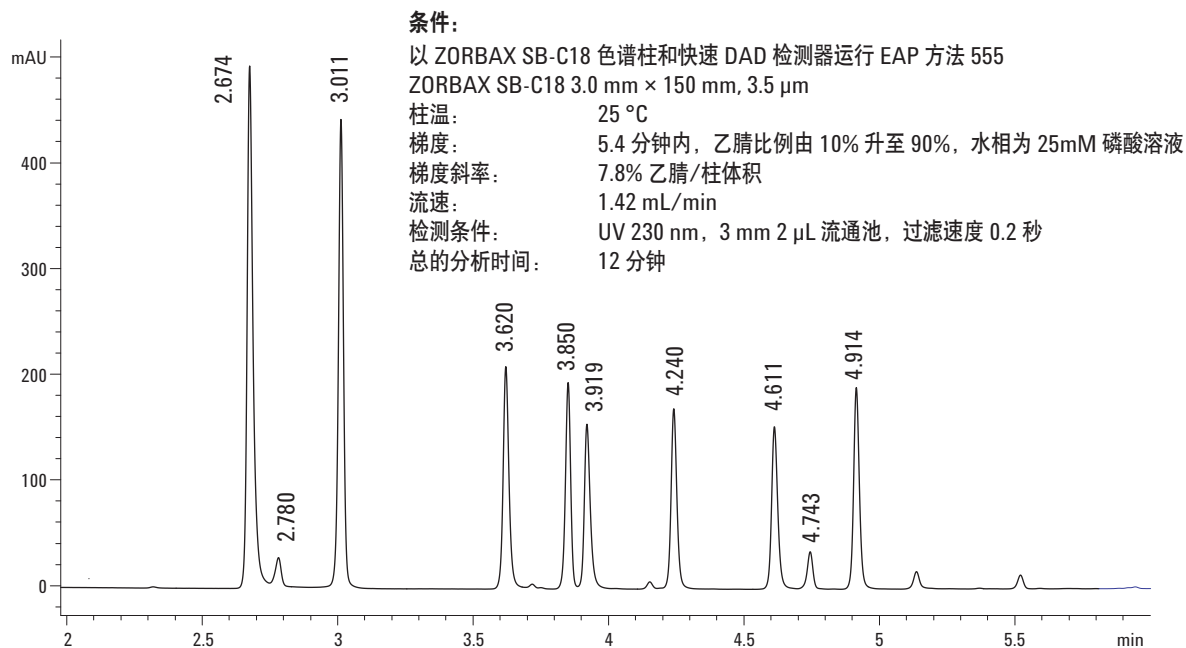


图 4. 除草剂在 3.0 mm × 150 mm 3.5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的高速梯度分离

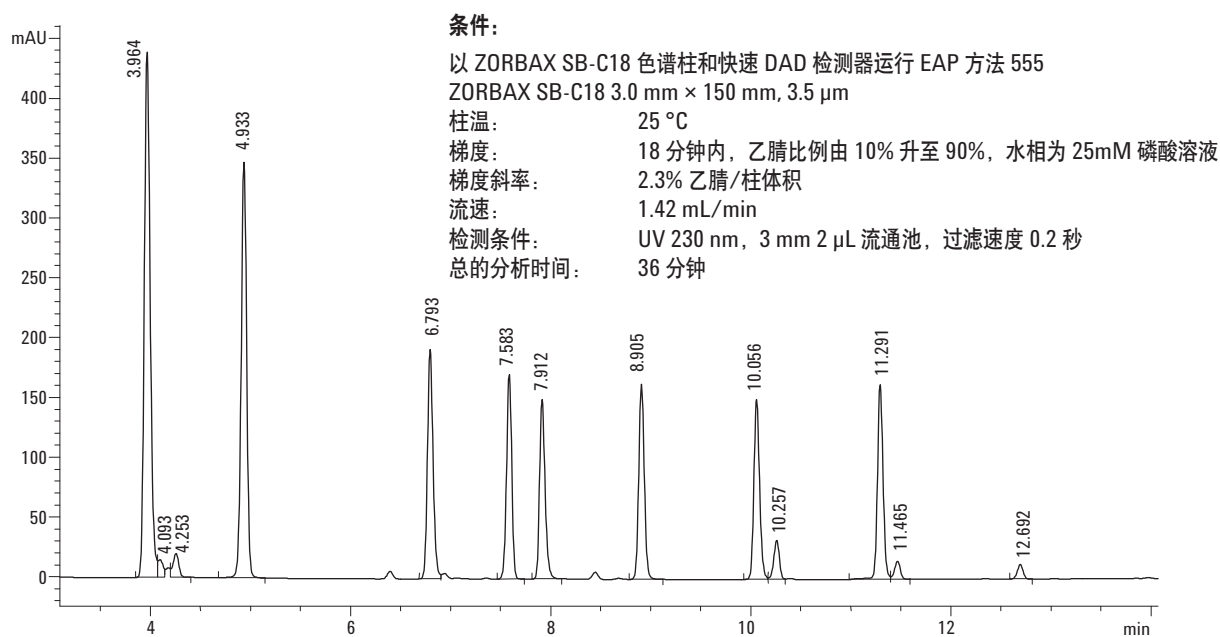


图 4. 降低梯度斜率后, 除草剂在 3.0 mm × 150 mm 3.5 μm ZORBAX SB-C18 色谱柱上的分离

图 4 的条件中, 以 7.8% 的斜率加上 3.0 mm × 150 mm、3.5 μm 填料所增加的线速度, 得到了与原来 4.6 mm × 250 mm 色谱柱相当的分离度, 但是总的分析时间缩短成 12 分钟。这对于高通量筛选和大量样品的定量分析是非常有利的。图 5 中, 梯度斜率减小为 2.3%, 把在 7.5~8 分钟内洗脱的最难分离的一对化合物的分离度由 1.9 提高至 3.3, 达到了很好的分离效果。

表 1 中, 用低死体积两通取代色谱柱, 并在进样器到检测器之间使用连接 0.12 μm 内径毛细管。注入 1 μL 的稀丙酮, 测试系统中不同流通池对峰展宽的贡献。

表 1. 不同流通池的容量检测

流通池	洗脱量 (μL)	半峰宽 (μL)	5σ 峰宽 (μL)
新型 SL 2 μL 3 mm	11	5	12
微量 6 mm 1.7 μL (n = 2)	14	6	18
半微量 6 mm 5 μL (n = 2)	13	6.5	18.5
标准 10 mm 13 μL	26	11	26
新型 SL 10 mm 13 μL	27	11	25

对多种流通池进行了测试, 并报告了平均结果。洗脱量代表了系统中所有管路的总体积。尽管 2 μL 与 13 μL 流通池的容量只相差 11 μL, 我们观察到, 洗脱量增加了 15~16 μL, 因为较大体积流通池内置的入口管线内径比较大, 这也使得洗脱量有所增加。

结论

对现有的梯度条件进行仔细分析, 同时具备如何准确计算新流速和梯度条件的相关知识, 这样, 就能简便而且可靠地将已有的方法转换成更加快速、分离度更高的新方法。另外, 对柱外扩散的了解, 对于高分离度、小色谱柱而言, 有利于确保获得良好柱效, 这对于成功的方法转换是非常重要的。

参考文献

1. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Chemical Engineering Science 1956, 5, 271-289
2. The Influence of Sub-Two Micron Particles on HPLC Performance, Agilent Technologies, application note 5989-9251EN, May 2003

更多信息

更多有关产品和服务的信息, 请访问我们的网站
www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦公司对本材料中可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的偶然或间接伤害不负任何责任。

本材料中的信息、说明和指标, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司版权所有, 2006

中国印刷
2006 年 8 月 9 日
5989-5177CHCN



Agilent Technologies