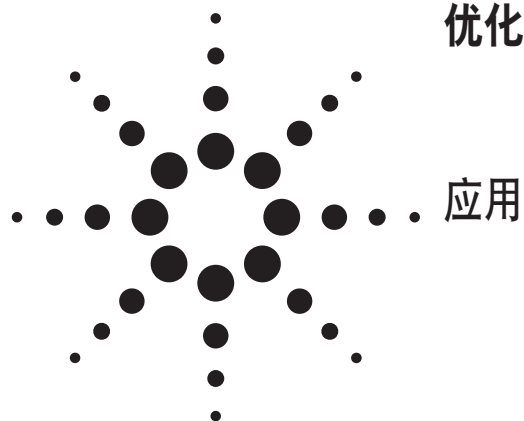


通过减少延迟体积轻松进行高通量分析的梯度优化



作者

John W. Henderson, Jr., William Long, and Cliff Woodward
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

开发高通量梯度分析方法的通常要包括缩短色谱柱再平衡时间和减少梯度延迟体积。使用 ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) 短柱，与分析型柱相比，明显缩短了再平衡时间，再加上一种简单的 G1312B 泵流路配置，减少系统延迟体积。用小体积柱进行梯度分析需要低延迟体积。通过将标准延迟体积配置和低延迟体积配置得到的色谱图进行比较，证明了这一点。为使用小体积色谱柱对泵进行优化后，得到了更窄的峰形，并提高了通量。另外，实验结果还显示，用 C8 固定相取代 RRHT C18 固定相，加快了分析速度。

引言

RRHT 短柱非常适用于高效液相色谱 (HPLC) 梯度方法。1.8 μm 短柱 (30 到 50 mm) 与常规的 5 μm 柱 (100 mm 到 250 mm) 相比，能在更高的流速下操作，因而再平衡更快。缩短再平衡时间是一种将梯度方法变成高通量梯度方法的关键策略。RRHT 短柱缩短了分析时间，也相应缩短了再平衡时间，原因很简单，因为柱体积成比例减少。

除此之外还有其它的优点，改变梯度方法往往比改变等度方法更困难，因为改变后的色谱结果 (例如，分离度) 可能会和原来的梯度色谱图不一致。这种现象在标准内径 (4.6 mm 内径) 过渡到窄内径 (2.1 mm 内径) 梯度方法时尤为突出。难点是要减少从梯度起始点到在柱头形成梯度之间的时间和体积。通常称为延迟时间或延迟体积。延迟的差异导致在梯度过程中任意时间点上色谱柱中流动相组成不同。从而造成保留差异，感兴趣色谱峰的分离度也可能不同。

本应用报告介绍了一种简单的泵配置方法，可以减少延迟体积，改善低体积 RRHT 梯度方法的色谱结果。



Agilent Technologies

实验

Agilent 高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统包括:

- G1365C 多波长检测器 (MWD), 检测波长 254 nm, 配置 G1315-60024 微量流通池, 响应时间设置 0.5 秒
- G1312B 二元泵, 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液 (v/v), B: 0.1% 甲酸乙腈溶液 (v/v), 流速: 使用 2.1-mm 内径柱时 1.5 mL/min, 使用 4.6-mm 内径柱时 5 mL/min。

柱温为室温, 柱温箱热交换器用一根 0.12-mm 内径毛细管旁路连接。

ZORBAX RRHT 柱:

- Eclipse Plus C18, 2.1 x 30 mm, 1.8 μ m, 部件号 59931-902
- Eclipse XDB-C8, 4.6 x 30 mm, 1.8 μ m, 部件号 924975-906

样品含尿嘧啶 (20 μ g/mL) 和烷基苯酮 (100 μ g/mL) C3 到 C10、C12 和 C14, 溶于 50% 乙腈/水中。

结果与讨论

高通量方法的关键点

在理想情况下, 短柱能提供特定分析所需要的足够分离度。对于小分子来说, 主要通过调节流动相或梯度影响分离。RRHT 柱采用 ZORBAX 1.8 μ m 填料, 与较长的常规 5 μ m 柱具有同样的柱效。例如, 4.6 x 250 mm 5 μ m 柱与 4.6 x 100 mm 1.8 μ m 柱的理论塔板数(N)大致相同:

$$N_{\text{理想}} = L/2d_p$$

在这里, L 是以微米计的柱长, d_p 是以微米为单位的填料直径。分母上的因子 2 有时因存在降低塔板数的非理想因素 (如, 柱外体积) 而发生改变 (例如 2.5)。

对于 250 mm 长的柱: $N_{\text{理想}} = 250,000/2(5) = 25,000$;
对于 100 mm 的 RRHT 柱 $N_{\text{理想}} = 100,000/2(1.8) = 27,778$ 。

100 mm RRHT 柱的较短柱长直接使速度加快了 2.5 倍。另外, 由于有 RRHT 粒径分布的专利设计, 反压比其它亚 2 微米色谱柱更低。

开发高通量梯度分析方法的一般途径是, 缩短色谱柱再平衡时间和减少梯度延迟体积。

RRHT 短柱自动缩短色谱柱再平衡时间

填充 1.8 μ m 填料的短柱, 即 RRHT 柱, 与更长的分析型色谱柱相比, 明显减少了柱体积。例如, 4.6 x 150 mm 柱的体积大约为 2.49 mL (不包含填料), 而同样直径的 50 mm 长的柱子则要小三分之二, 即少用 0.83 mL。2.1 x 30 mm 柱的体积只有 0.10 mL, 或比标准分析型柱小 25 倍左右; 因此, 柱子再平衡可能少用 25 倍的流动相, 即少用 25 倍的时间。ZORBAX 80-Å 填料置换柱体积使真实体积减少了大约 60%。填充后的 4.6 x 150 mm 柱体积大约为 2.49 mL x 0.60 = 1.5 mL, 而 2.1 x 30 mm 填充后的柱体积为 0.1 mL x 0.60 = 0.06 mL, 体积仍小 25 倍。

假设色谱柱再平衡到起始流动相条件需要 5 倍的柱体积。ZORBAX 4.6 x 150 mm 柱, 在 1 mL/min 流速下操作时, 5 个柱体积 x 1.5 mL/柱体积 = 7.5 mL, 7.5 mL / 1 mL/min = 7.5 分钟再平衡时间。

而 RRHT 柱再平衡则快得多:

- 2.1 x 30 mm: 5 个柱体积 x 0.06 mL/柱体积 = 0.3 mL, 0.3 mL / 0.2 mL/min = 1.5 分钟再平衡时间
- 4.6 x 30 mm: 5 个柱体积 x 0.3 mL/柱体积 = 1.5 mL, 1.5 mL / 1 mL/min = 1.5 分钟再平衡时间

实际上, 由于 1.8 μ m RRHT 短柱可以在更快的流速下操作而不会损失柱效, RRHT 的再平衡时间还可能更短。

用小体积 RRHT 柱进行梯度分析需要低延迟体积

为了保持色谱柱线性流速一致，2.1 mm 内径方法的流速通常比 4.6 mm 方法低 5 倍 (4.8 X)：

$$F_2 = F_1 (id_2/id_1)^2$$

F_2 和 F_1 是新流速和现有流速， id_2 和 id_1 分别为色谱柱内径。因为流速与内径的平方成正比，所以从 4.6 减少到 2.1 mm，流速大约减少 5 倍。

在梯度方法中，延迟时间（从梯度开始到柱头形成梯度所用的时间）将延长 5 倍。因为 4.6 和 2.1 内径这两种色谱柱都是在零时间进样，使用 2.1 内径柱时，样品在等度条件下在色谱柱中移动的时间要长 5 倍，直到梯度到达柱头。因为延迟时间有 5 倍的差异，导致色谱结果有很大不同。

有两种缩短延迟时间的办法：在更高的流速下操作，或者减少预柱体积，使梯度更快到达色谱柱。

有各种选择可能减少 1200 HPLC 系统的延迟体积，包括：

- 用 0.12-mm 内径管线取代 0.17-mm 内径管线
- 用一根短毛细管，或低扩散热交换器工具包 (G1316-80003 带 G1316-83200)，旁路连接柱温箱中的标准热交换器
- 对自动进样器编程，使样品定量环和流量计旁路连接（自动延迟体积降低 ON）
- 将二元泵从标准延迟体积配置改为低延迟体积配置

使 G1312B 二元泵在标准延迟体积和低延迟体积之间转换很简单[1]，只需要 1/4"和 9/16"扳手，以及两张示意图（图 1a 和 1b）。用一把 1/4"开槽螺丝刀 (PN 05023-0240)将毛细管连接到压力传感器上。

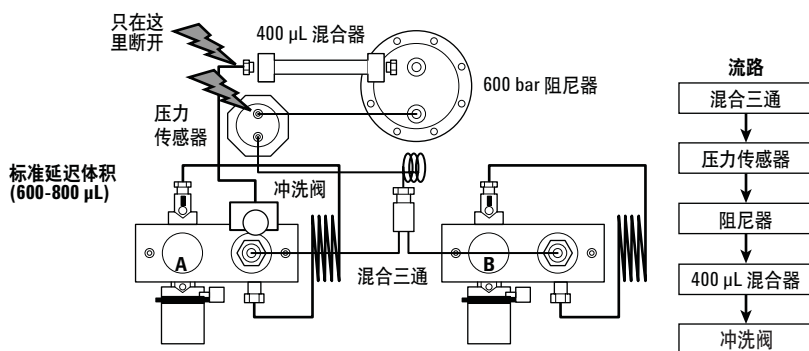


图 1a. G1312B LC 标准延迟体积配置显示，在流路中有两处便于减少延迟体积的连接

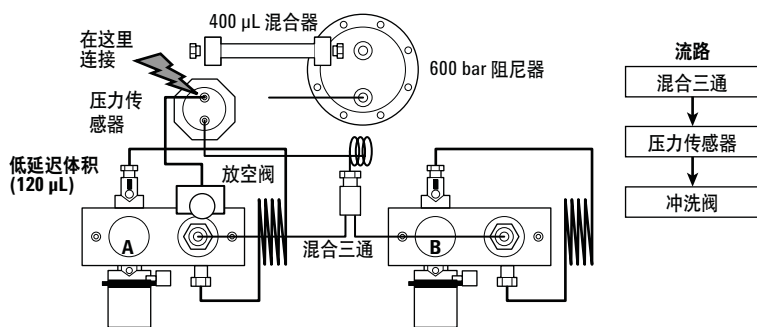


图 1b. G1312B LC 的低延迟体积配置。连接到冲洗阀的毛细管现在连接到了压力阻尼器上

从图 2 和图 3 中可以看出延迟体积最小化的结果。

图 2 是在 2.1 x 30 mm RRHT Eclipse Plus C18 上开发的烷基苯酮 RRHT 梯度方法，将二元泵配置标准延迟体积和低延迟体积的结果进行比较。虽然，按照惯例规定梯度从零时开始，0.5 分钟内升至 100%，但实际上，柱前体积使梯度在到达色谱柱之前有明显的延迟。从流出色谱柱时变宽的色谱峰（峰 1 到 10）可以看出这一点。大约 0.5 分钟后，梯度接触到进入的样品，才使峰 10 到 12 的峰形变窄。在低延迟体积配置

中，最早洗脱的峰仍在等度延迟当中，但后面的峰都更窄了，说明梯度更快地达到了柱头。配置低延迟体积后，总分析时间缩短了 30 %。

图 3 是用 4.6 x 30 mm RRHT Eclipse XDB-C8 代替 2.1 x 30 mm Eclipse Plus C18 柱的结果。流速为 5 mL/min，所以标准延迟体积和低延迟体积在延迟时间上的区别比较小。峰的展宽不如 2.1 内径方法那么明显，但泵采用了低延迟体积配置后，分析时间仍有 14% 的差别。

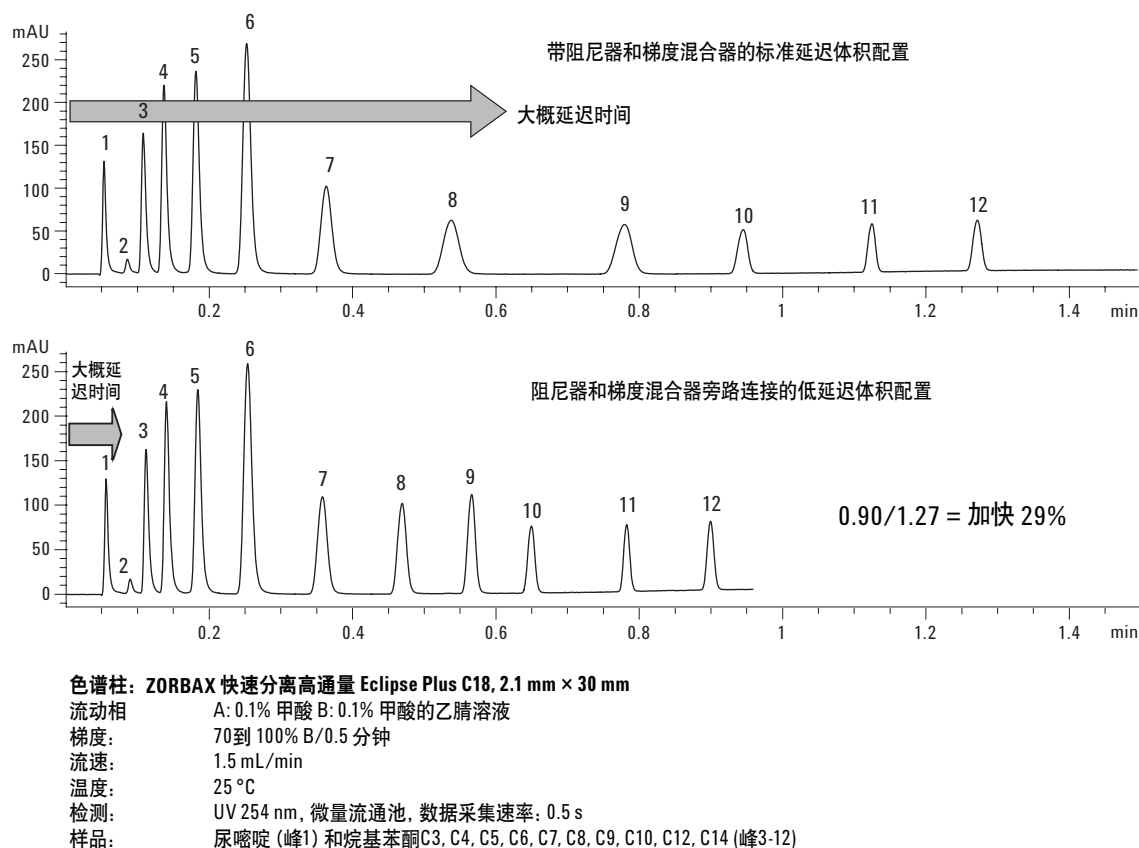


图 2. 窄径 RRHT 柱更小的延迟体积带来更高的通量

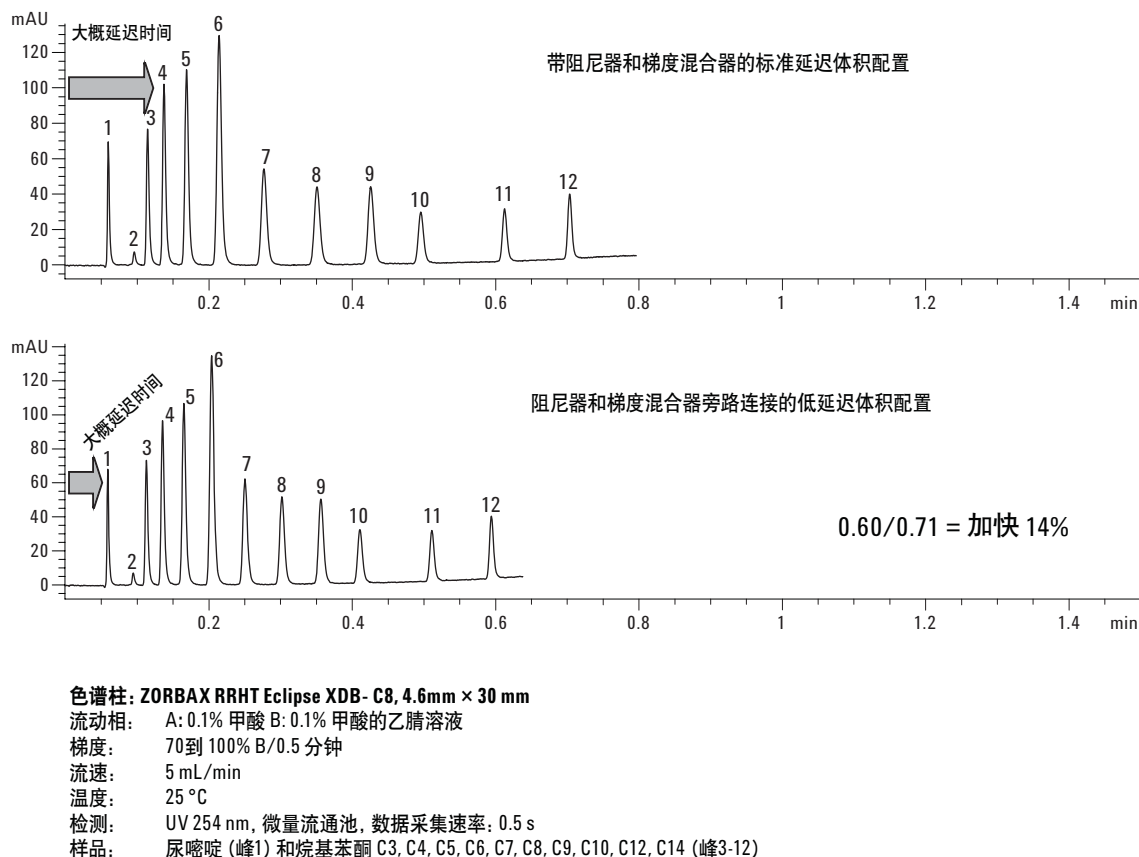


图 3. 小延迟体积对标准内径 RRHT 柱影响不太明显

固定相的选择性可以影响分析速度

不同的固定相 (Eclipse XDB-C8 和 Eclipse Plus C18 相比) 也能缩短保留时间, 尽管比 2.1 内径 Eclipse Plus C18 在更低的流动相线性流速下操作。将图 2 和图 3 比较, 分析时间从 0.9 分钟缩短到 0.6 分钟, 由于使用了更短的烷烃键合相, 使通量明显提高。拥有各种固定相是快速改变保留、选择性和分离度的有益工具。现在有大量不同柱长、内径的 1.8 μm 固定相, 可以用来优化高通量方法。

低体积静态混合器选件

在许多情况中, 有机溶剂低百分比混合洗脱 (< 20%) 在低延迟体积模式下可能出现基线异常的情况, 这是流动相组成中 UV 吸收的差异造成的。这种现象为波浪式基线。其它类型的检测器如质谱仪 (MSD) 不受影响。要最大限度地减少这种影响, 可以使用 200 μL 静态混合器 (部件号 5067-1565), 并结合 SL

型二元泵固件升级 (A.06.06 [001])。这种固件经过优化, 适用于使用 200- μL 混合器, 不带阻尼器。该固件将泵的冲程从 20 降到 10 μL 。

在水和乙腈中有很强不同 UV 吸收的一个流动相组分就是三氟乙酸 (TFA)。图 4 显示了低体积柱和低有机相梯度未用混合器和固件 A.06.06 [001] 的结果。在梯度的高水相部分, 没有混合器/固件时, 基线噪音非常大。

在许多案例中, 流动相中没有强差异吸收的成分。图 5 比较了不同的 1200 SL 型配置对抗菌素氯林可霉素及其前体林可霉素的分离。由于这两个化合物的疏水性差异很大, 所以需要采用低有机相梯度 (10 到 40% MeOH/2 分钟) 使它们在合适的时间被洗脱。因为缺乏生色团, 采用低 UV 波长 (205 nm) 检测, 选择小体积柱 (2.1 x 30 mm) 进行快速分析, 使用与小体积柱匹配的微量流通池。上图是在 1200 SL 系统低延迟体积模式下获得的, 带 SL 型二元泵固件

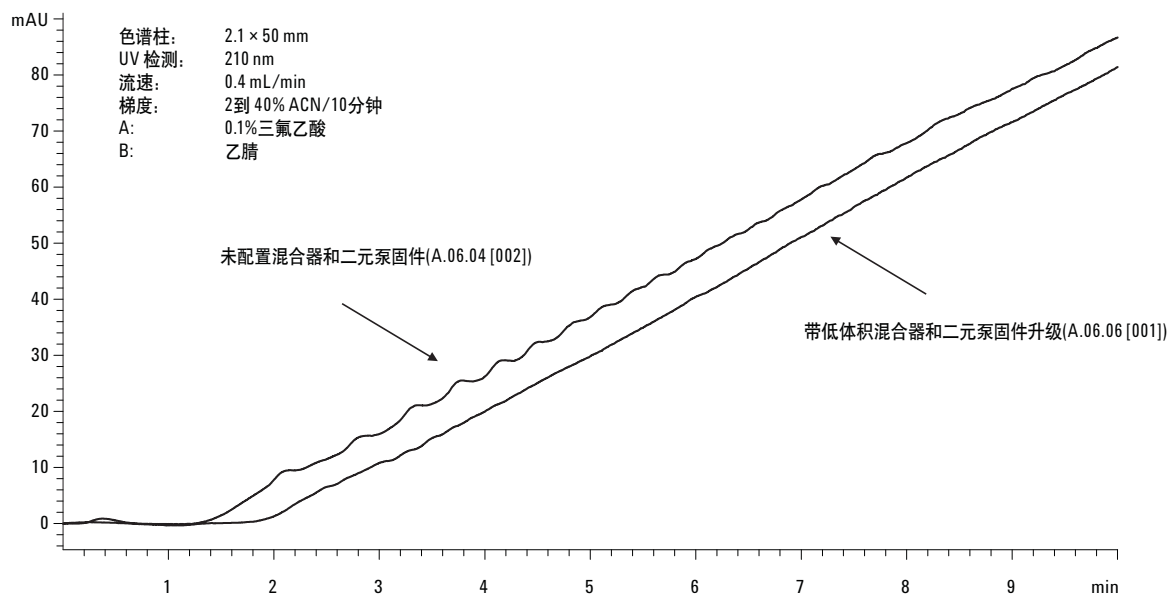


图 4. 低体积混合器和固件升级减弱了差异 UV 吸收对基线的影响

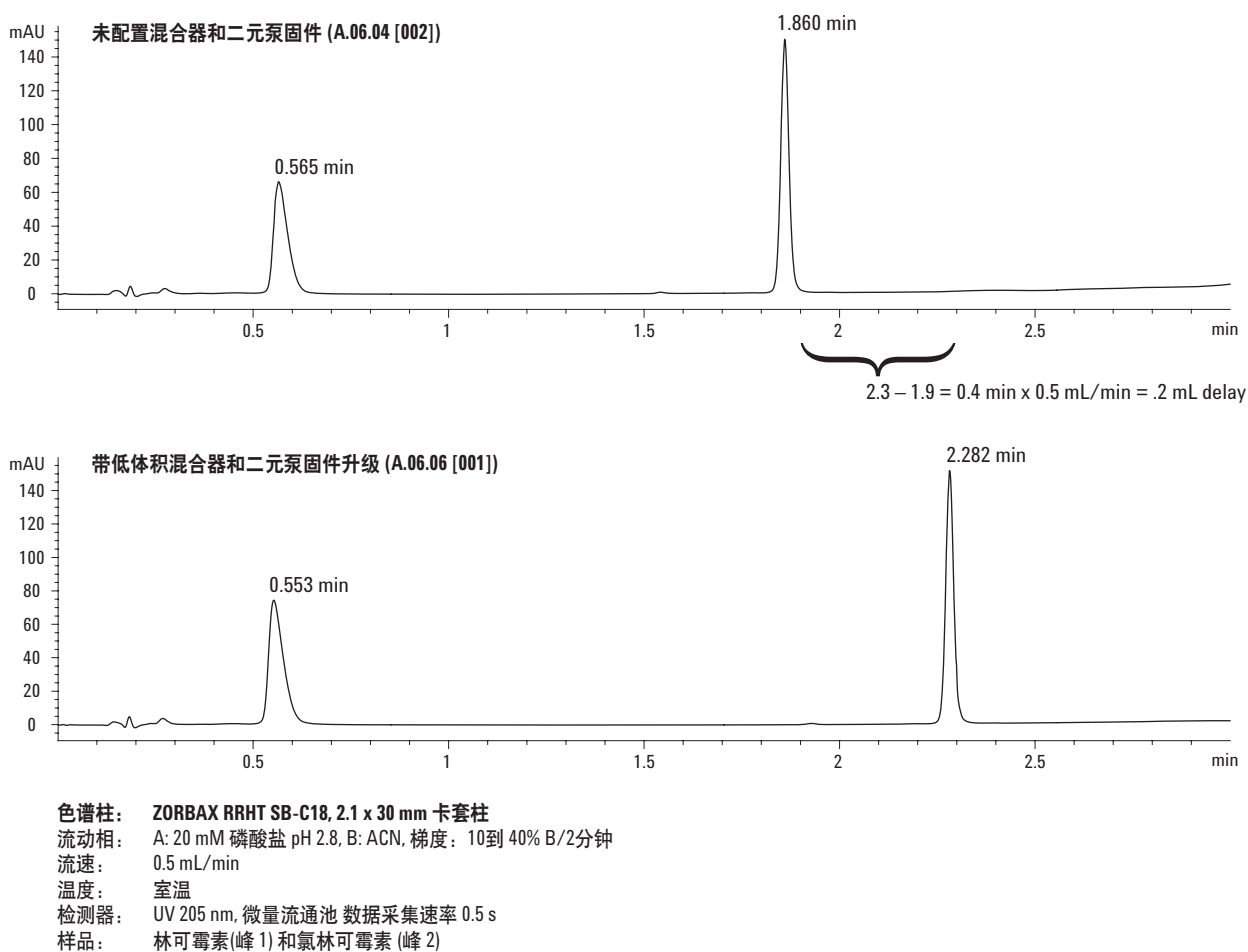


图 5. 低体积混合器选件使高水相梯度差异 UV 吸收的影响最小化, 仅增加了 0.2 mL 延迟

(A.06.04 [002])，旁路连接混合器和阻尼器。尽管和图 4 中产生波浪式基线的条件类似（低有机相梯度，小体积柱和低 UV 波长检测），但没有出现基线异常。下图采用了 200 μL 混合器，与 SL 型二元泵固件 (A.06.06 [001]) 一起安装。正如所预料和图中计算的一样，混合器的体积使延迟体积增加。由于第 1 个峰在等度延迟阶段洗脱，所以两个例子中第 1 个峰的保留时间都一样。

轻松测量并改变延迟体积，在不同 HPLC 仪器配置之间互相转移梯度方法，或用 RRHT 柱将方法转换成更快速方法时，是一种有用的工具。图 6 显示了几种选项。另外，连接或断开脉冲阻尼器，可以形成多种组合，适用于任何特殊梯度方法的最佳混合和/或最短或最佳匹配延迟体积等。



图 6. 延迟体积可以用各种混合器和毛细管调节

结论

小体积 RRHT 柱对高通量梯度方法非常有用，因为与更大体积的分析型色谱柱相比，快速再平衡可以使分析通量显著提高。

减少延迟体积是缩短分析时间、提高梯度通量的另一个途径，尤其是对于 2.1 mm 内径色谱柱。在 G1312B 二元泵中配置低延迟体积流路，可以使梯度流动相组成更快到达色谱柱，使等度延迟期或延迟时间最短。最终获得更窄的色谱峰和更快的分析。

最后，能选用不同固定相色谱柱也是一种优势，因为可以明显改变选择性、保留时间，还可能进一步缩短分析时间，最终提高实验室效率。

参考文献

1. Optimizing Performance of the Agilent 1200 Rapid Resolution LC System, Agilent Publication G1312-90300, March 2006, p.159.

更多信息

如果需要进一步了解我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 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，2007

2008 年 1 月中国印刷
5989-6665CHCN



Agilent Technologies