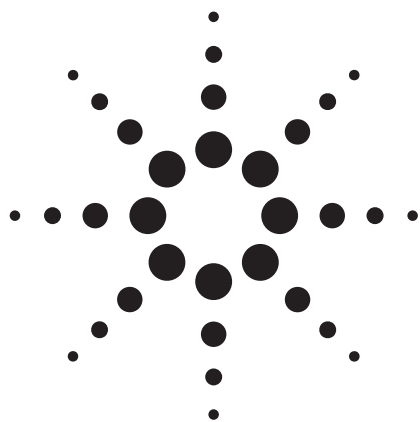




通过减小色谱柱尺寸降低溶剂消耗量

应用报告

通用色谱，食品行业

作者

John W. Henderson Jr.
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
美国

摘要

将液相色谱柱内径（ID）、长度和粒度等柱尺寸减小，将使溶剂消耗量最多降低 86%，每次分析的分析时间缩短高达 67%。我们采用 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱对无糖饮料进行等梯度分析、对山桃木烟熏调料进行梯度分析，通过更换色谱柱减小前述柱参数中的 1 项、2 项或全部 3 项，以验证其对节省溶剂和缩短分析时间的影响。



Agilent Technologies

前言

让工作更加环保是一种流行趋势。在高效液相色谱（HPLC）领域中，减少有机溶剂的用量对这一努力具有重大影响。除对环境的影响外，降低溶剂用量将更加经济，也很有必要。当前（2009年）世界范围内的乙腈短缺，已经对液相色谱（LC）行业产生影响，节省乙腈已成当务之急。

二十世纪九十年代末期，安捷伦投入市场的溶剂节省柱（3.0 ID）首开了 HPLC 溶剂节省的先河。在本应用报告中，我们将两种传统的使用 4.6 mm × 150 mm 色谱柱的常规液相色谱方法，转换成了溶剂节省方法。其一是无糖饮料的分析，等梯度分离糖精、咖啡因、阿斯巴甜和苯甲酸。另一个是对山桃木烟熏调料（一种腌制和调味肉的芳香液体）中各组分的分离。这是一种复杂混合物，采用梯度法才能分离其多个组分。

液相色谱更新进展是将较小粒度填料填充到较短的色谱柱中，减少了溶剂用量，另外还节省了分析时间。两种采用 4.6 mm × 150 mm 色谱柱的方法转换成更短的快速分离柱（RR）（3.5 μm 粒度）和快速分离高通量柱（RRHT）（1.8 μm 粒度）方法，进一步节省了溶剂和分析时间。

最后，我们将溶剂节省柱技术和 RRHT 柱尺寸结合起来，最大限度地减少了溶剂用量。

实验部分

样品：

以水为基质的山桃木烟熏浓缩液和无糖饮料，均购自当地食品店。两种原料不经任何样品前处理过程，用注射式过滤器（0.2 μm）直接滤入自动进样器样品瓶。

原方法色谱柱：

- ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm 部件号 959993-902

溶剂节省色谱柱：

- ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 mm × 150 mm, 5 μm 部件号 959993-302

- ZORBAX Eclipse Plus C18 Solvent Saver Plus, 3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm 部件号 959961-302
- ZORBAX Eclipse Plus C18 Solvent Saver HT 3.0 mm × 50 mm, 1.8 μm 部件号 959941-302

流动相：

A 瓶：水

B 瓶：乙腈

组成见图 1 和 2

液相色谱仪器：

Agilent 1200 系列 SL 型柱恒温箱，配置如下：

- G1312B 二元泵，流速取决于柱尺寸，见各图
- G1316B 柱温箱配件（TCC），设置为 25 °C
- G1315C 二极管阵列检测器（DAD）
 - 山桃木烟熏调料：202 nm，4 nm 带宽，参比波长 360 nm，100 nm 带宽。G1315-60025 流通池（6 mm 光程，5 μL 体积），原方法相应时间设置为 1s，设定值随分析时间缩短而增大。
 - 无糖饮料：202 nm，4 nm 带宽，参比波长 360 nm，100 nm 带宽。G1315-60025 流通池（6 mm 光程，5 μL 体积），原方法相应时间设置为 1s，设定值随分析时间缩短而增大。

手紧接头（安捷伦部件号 5065-4426（10/包））可以轻松安装或拆卸 TCC 中的色谱柱并直接连接到 DAD 流通池上。

结果和讨论

减少柱内径

溶剂节省 3.0 mm ID 柱的效果很明显，因为分析人员只要将 4.6 mm ID 柱换成相当的 3.0 mm ID 柱，即可降低溶剂用量 50% 以上，还能提高灵敏度。

溶剂节省是因流速降低而实现的，与柱内径的平方之比成正比：

$$F_{3.0 \text{ ID}}/F_{4.6 \text{ ID}} = \text{柱内径}_{3.0 \text{ ID}}^2 / \text{柱内径}_{4.6 \text{ ID}}^2$$

以下公式显示在流动相线速度恒定的情况下流速减慢：

$$F_{3.0\text{ ID}} = F_{4.6\text{ ID}} \times \frac{\text{柱内径}_{3.0\text{ ID}}^2}{\text{柱内径}_{4.6\text{ ID}}^2}$$

图 1 显示了无糖饮料的等梯度分析结果。流速从 1.0 mL/min 降低到 0.43 mL/min 可使每次分析所用的流动相减少 57%。由图可见，3.0 mm ID 进样量减半的情况下，两张色谱图的峰高相同，表明灵敏度提高约 1 倍。

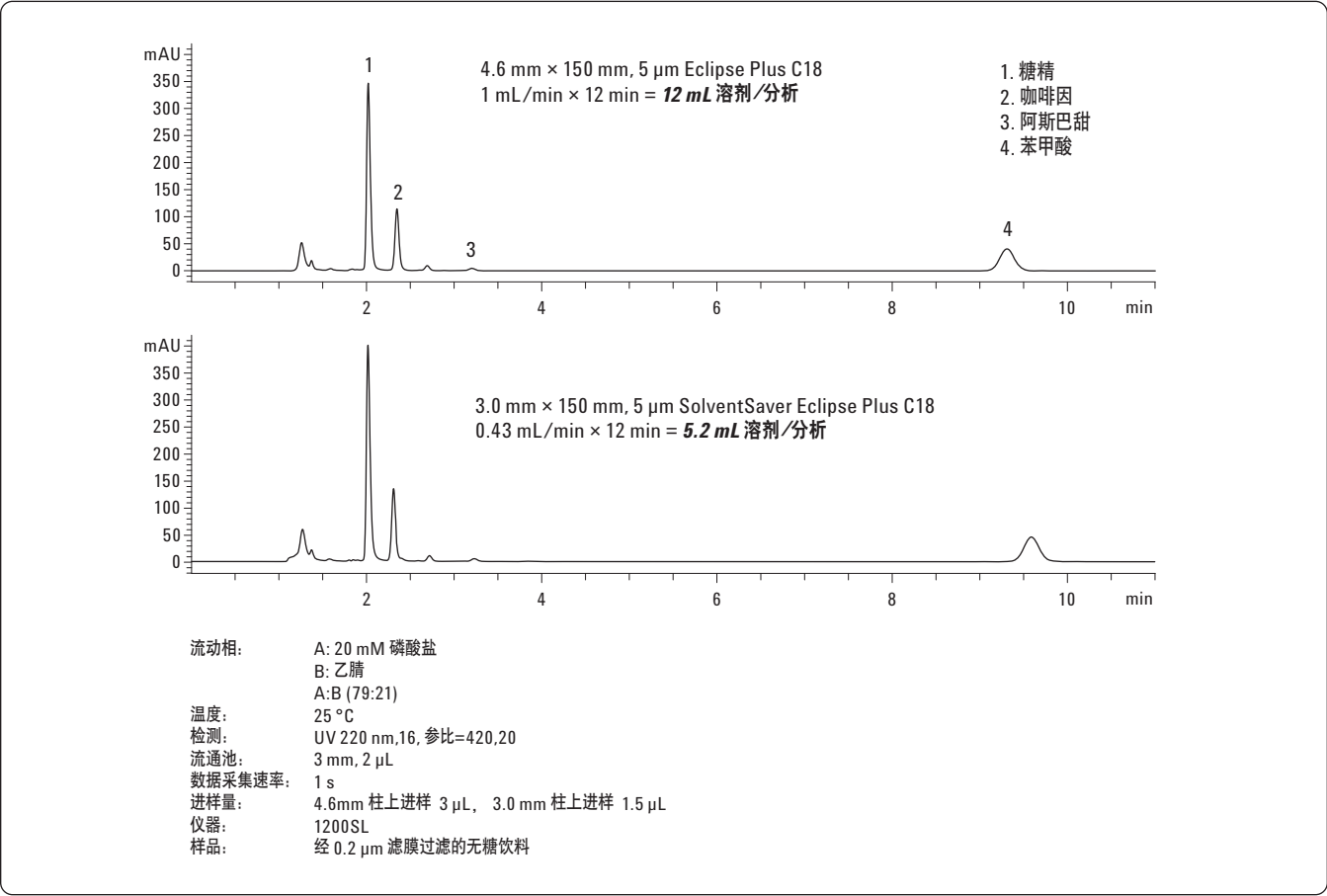


图 1. 在溶剂节省 Eclipse Plus 柱上分离无糖饮料节省流动相 57%

柱内径减少也适用于梯度方法。图 2 显示了用 4.6 mm × 150 mm, 5 μm Eclipse Plus C18 柱和 3.0 mm × 150 mm, 5 μm 柱对天然山桃木烟熏浓缩液的梯度分离。用 3.0 mm ID 柱降低流速使每次分析的流动相用量减少了 58%。但一些后出峰化合物的保留时间向右移动, 说明这些化合物在 3.0 mm ID 柱上保留更长。

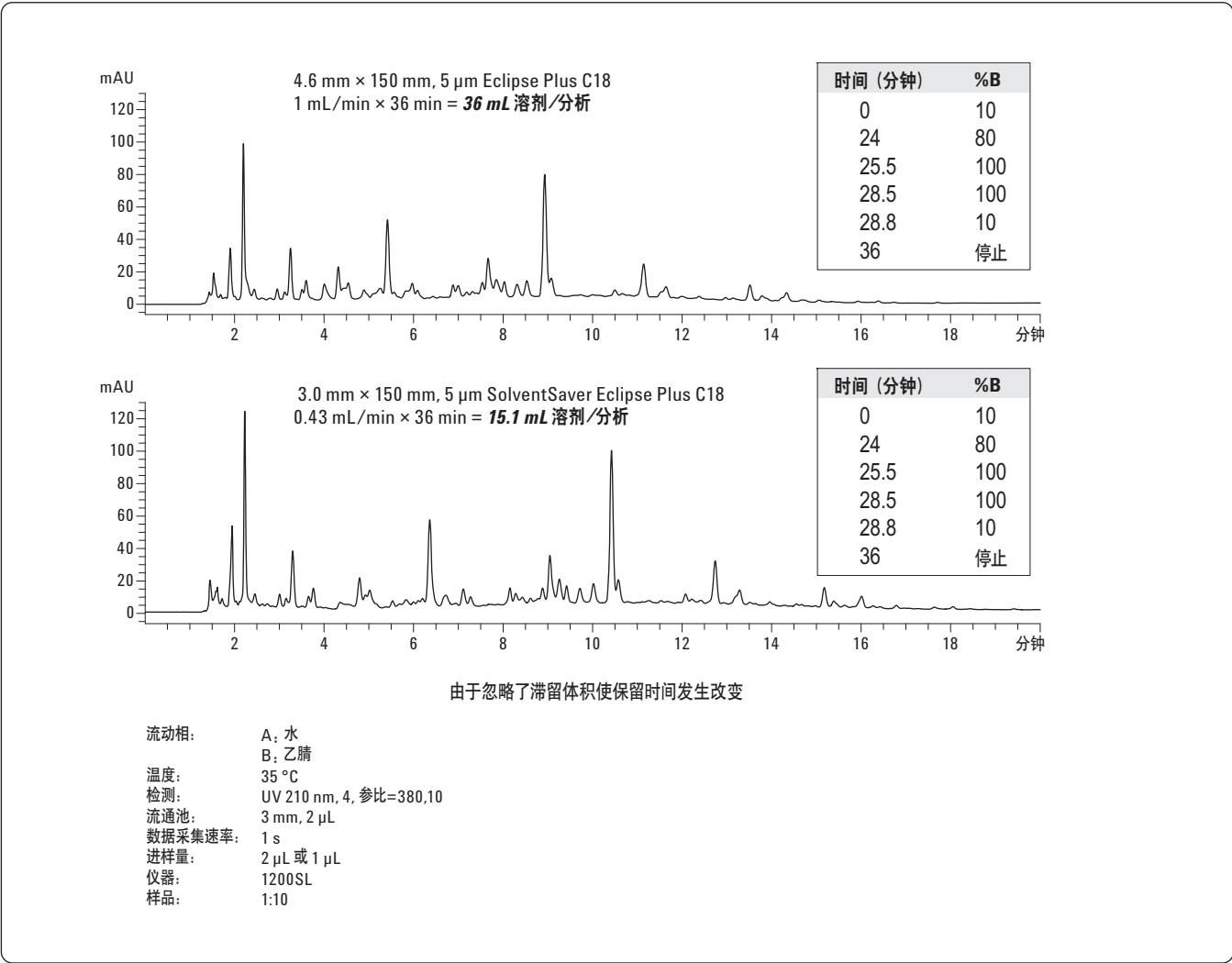


图2. 用溶剂节省 Eclipse Plus C18 柱分析天然山桃木烟熏浓缩液, 节省流动相 57%

峰保留的差异是因延迟时间不同，或者是梯度从 G1316B 二元泵中的形成点到达柱头的时间不同造成。由于流路体积相同，但流速降低了，要用更长的时间才能使梯度达到色谱柱。因此导致出峰延后。

有一种使保留差异最小化的方法，即减少从梯度形成点到色谱柱之间的流路体积。流路中的这一部分称为延迟体积。去掉 G1316B 泵中的静态混合器和连接毛细管，就能很轻松地将延迟体积变小，使延迟体积更接近，进而使色谱图更相近（图 3）^[1]。

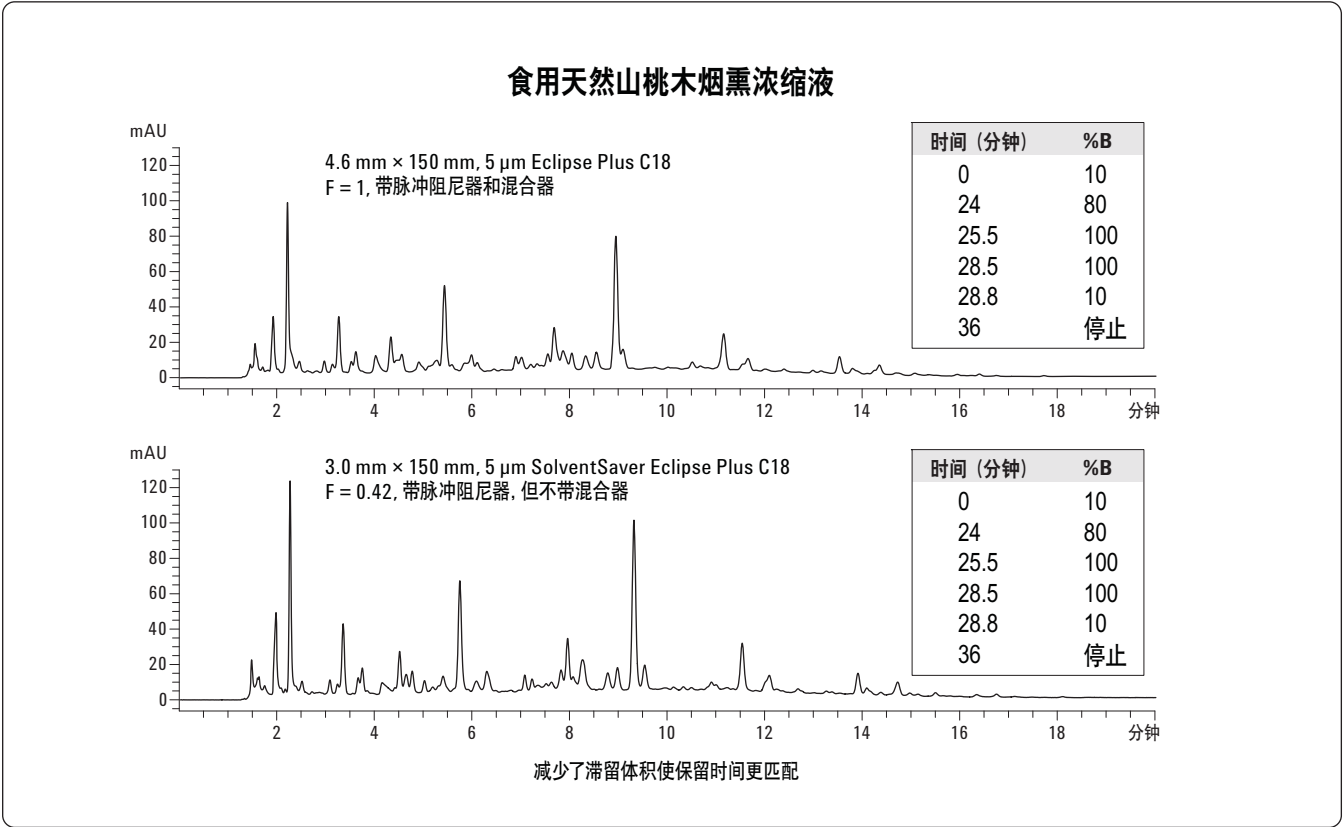


图3. 去掉了 G1316B 泵中的静态混合器，减少了滞留体积，使峰更匹配

减少柱长和粒度

除使用溶剂节省柱外，另一个减少溶剂消耗和缩短分析时间的方法是将原来较长的 5 μm 柱换成较短的 RRHT 1.8 μm （或 RR 3.5 μm ）

柱。图 4 显示转换成更短 RRHT 柱的梯度方法。溶剂减少与柱长成正比。分析时间也明显缩短，与柱长的变化成正比。

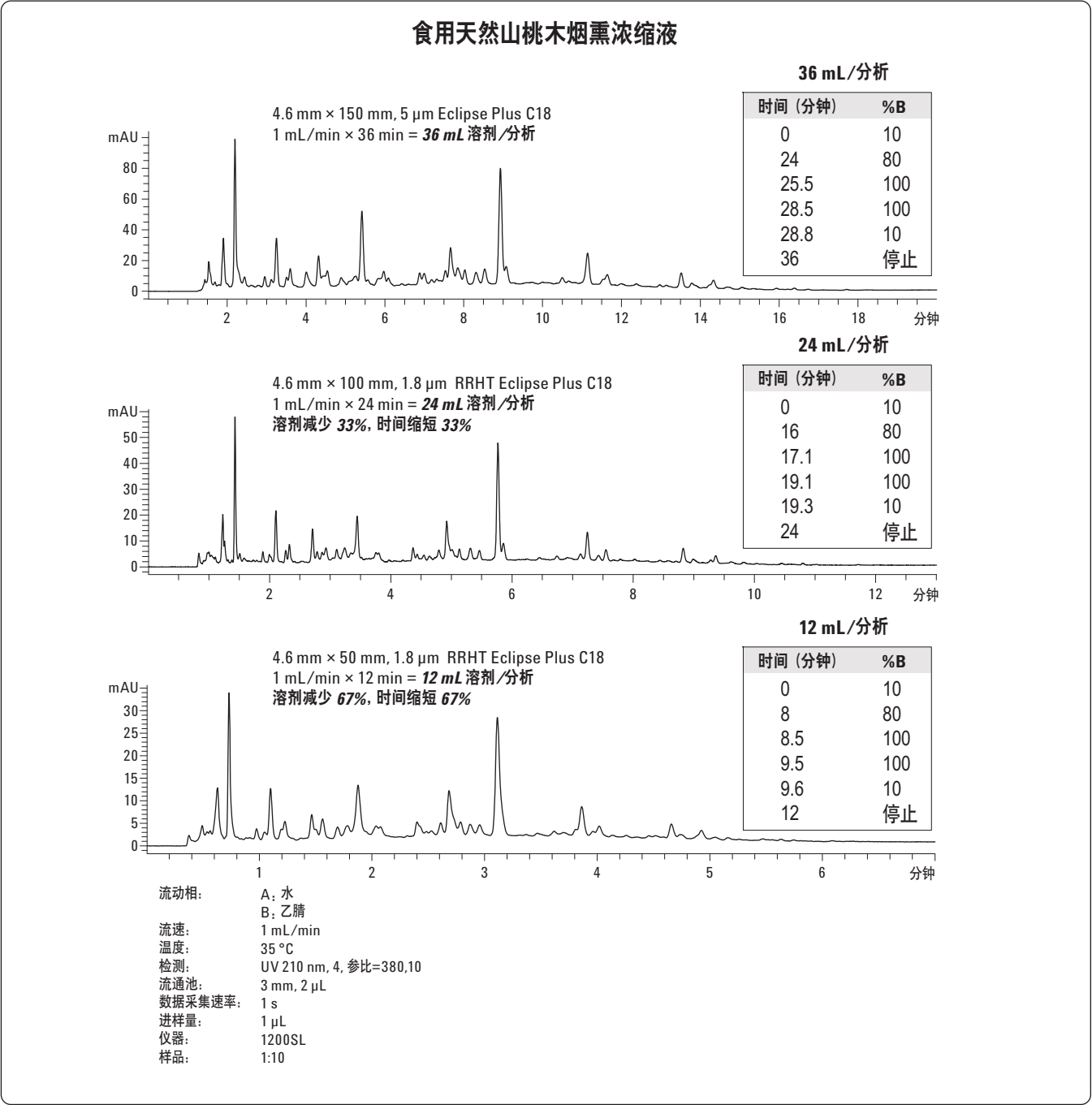


图 4. 用 RRHT 柱缩短分析时间并减少溶剂用量

综合考虑减少柱内径、柱长和粒度

将更小粒度填料填充到柱长更短的 3.0 mm 内径柱中, 还可使溶剂用量和分析时间进一步减少 (图 5)。与原 4.6 mm × 150 mm 方法相比, 溶剂节省了 57% 到 86%, 分析时间从 36 分钟缩短到 24 到 12 分钟, 节省幅度与所用的 RRHT 配置有关。

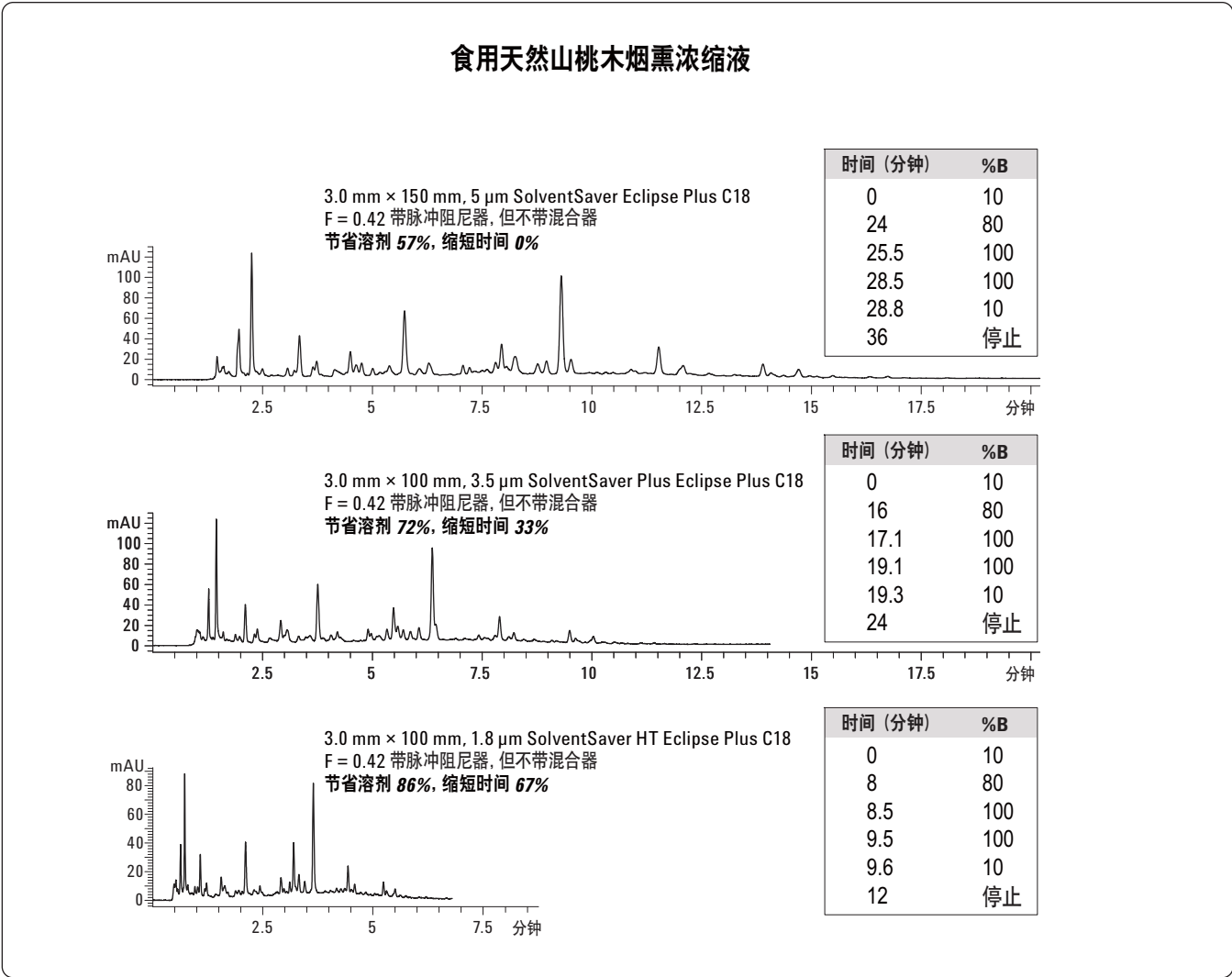


图 5. 通过 RR 和 RRHT 方法转换进一步节省溶剂

图 6 显示了三种粒度和三种柱长（参数见图 5）下无糖饮料的等梯度分离结果。同样，换成 RR 或 RRHT 柱后，分析时间最多缩短 67%，溶剂最多节省 86%。通常，与本无糖饮料的分析实例类似，原方法的分离度足够大，因此，缩短分析时间并未对分离造成显著影响。而对于那些有许多色谱峰的分离，如山桃木烟熏调料的分析，相邻峰的分离度可能会降低。但这可以从时间和溶剂

的节省上得到补偿。通常，还可以通过对更快、更短 RRHT 方法的流动相进行优化，再将分离度调高。有时为了提高方法的分离度还将添加溶剂，但最终优化的 RRHT 方法与原方法相比，溶剂仍有相当大幅度的节省。如果不便进行方法优化，RRHT 柱还有多种规格（30、50、75 和 150 mm），可以选择既保证足够的分离度，又能节省时间和溶剂的合适柱长。

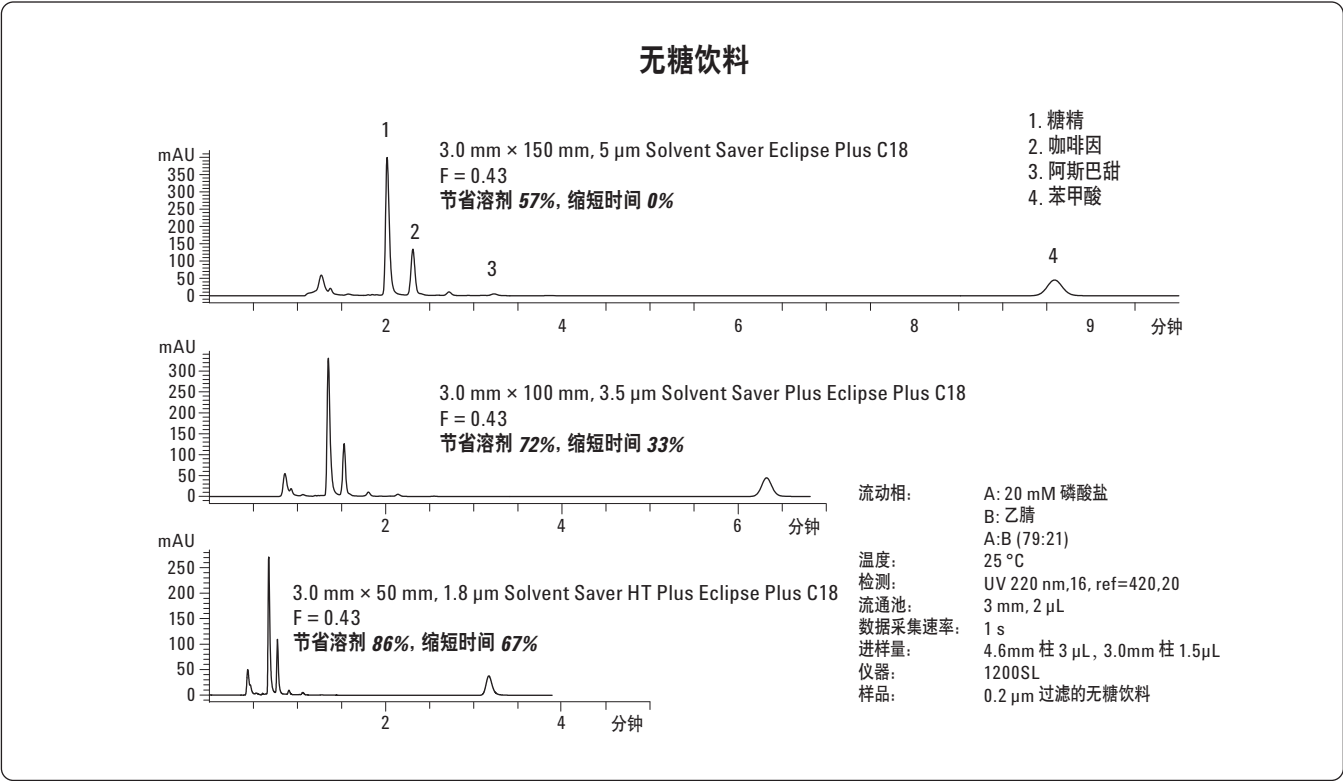


图 6. 通过 RR 和 RRHT 方法转换进一步降低溶剂用量

高流速

50 mm (和 100 mm) RRHT 柱可以与较早型号的液相色谱 (如 Agilent 1100) 兼容, 但其最佳性能是针对 Agilent 1200 高分离快速液相色谱系统设计的。该系统可以承受高达 600 bar 的压力, 将流速从 0.43 mL/min 提高到 1.25 mL/min, 分析时间缩短了约三分之二, 而总溶剂消耗保持不变。缩短时间的代价是压力升高, 如图 7 所示。

即使在如此高的流速下(对 4.6 mm ID 色谱柱相当于 2.9 mL/min), 增加的压力没有超出 1200 LC 系统和 ZORBAX RRHT 柱(600 bar) 的压力限度。将更小内径、更短柱长、更小粒度和更高流速这几个因素结合在一起, 可以节省流动相 83%, 缩短分析时间 85%。

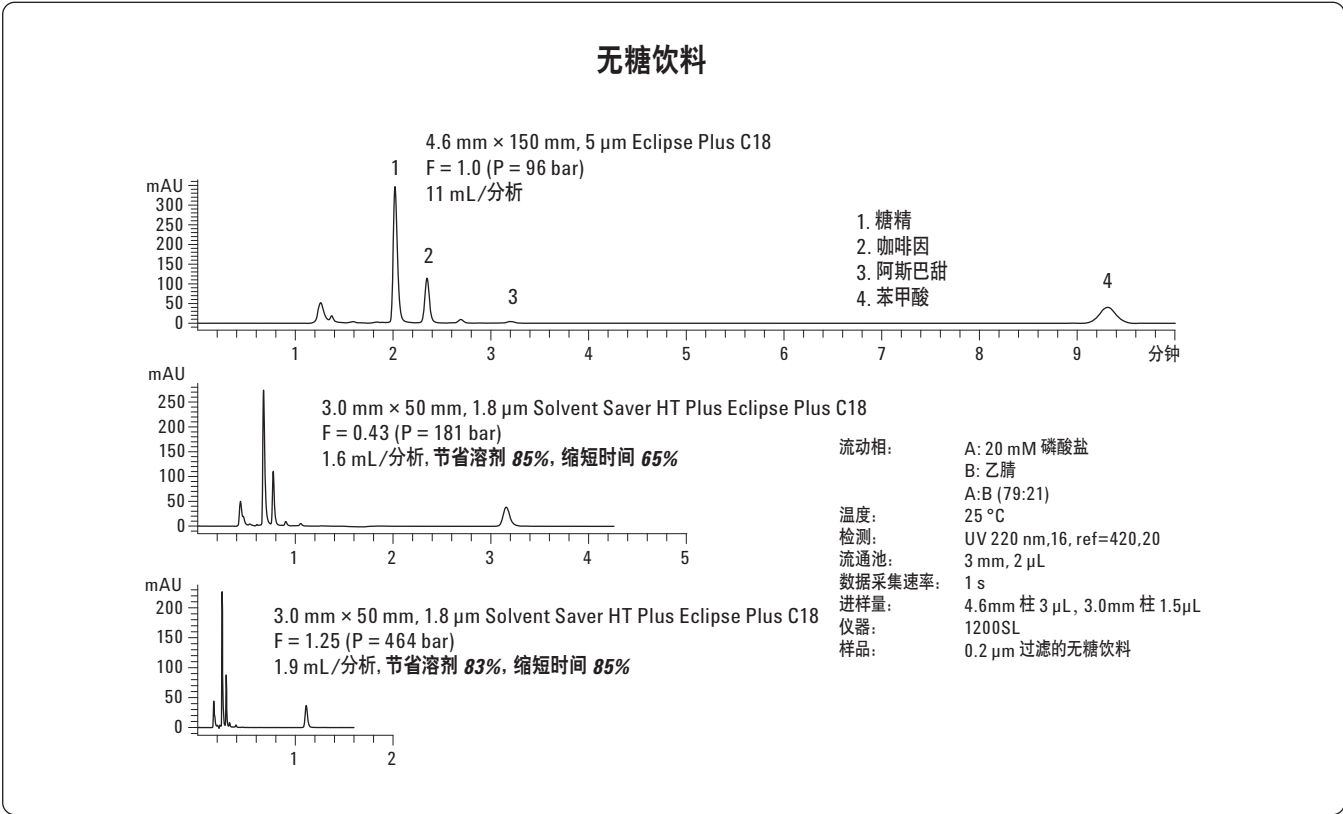


图 7. 采用高流速节省更多时间

结论

结果显示, 调节三个色谱柱参数: 内径、柱长和粒度, 明显减少了溶剂消耗, 并 (或) 缩短了分析时间。减少色谱柱内径和柱长能节省最多溶剂, 此改变与粒度变化相平衡时, 就会得到所需的分离度。对每个应用或实验室的最佳选择, 取决于每种方法的目的和各实验室的条件。

通常将 4.6 mm 内径色谱柱换成 3.0 mm 内径柱, 可以节省溶剂 57%。换成更短的 3.0 mm 内径 RRHT 柱可以使溶剂消耗减少更多, 并缩短分析时间。有几种柱长可以选择, 以平衡对分离度的要求和节省溶剂与缩短时间需要之间的矛盾。当方法从 4.6 mm 转移到 3.0 mm 内径溶剂节省柱上时, 还能提高灵敏度。

溶剂节省柱 (3.0 mm ID) 和 RRHT 短柱 (1.8 μ m) 均与 Agilent 1100 和 1200 液相色谱系统兼容。而 Agilent 1200 和 RRHT 柱的设计压力更高, 因此还可以通过加快流速进一步缩短分析时间。

参考文献

1. John W. Henderson, Jr., William Long, and Cliff Woodward, "High Throughput Gradient Optimization by Easily Minimizing Delay Volume," Agilent Technologies publication 5989-6665EN
2. John W. Henderson Jr. and William J. Long, "Tailoring Speed, Sensitivity, and Resolution in an RRHT Analysis of Cardiac Drugs," Agilent Technologies publication 5989-5899EN

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

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、描述和规格, 如有变更, 恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司版权所有, 2009 年
中国印刷
2009 年 4 月 8 日
5990-3882CHCN



Agilent Technologies