

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱最大限度地提高柱效

应用串联色谱柱技术，5 min 内理论板数可达 100000

应用简报

食品、环境、化学品、医药

作者

Angelika Gratzfeld-Hüsgen 和
Edgar Naegele
安捷伦科技公司
Waldbronn, 德国

摘要

基于表面多孔技术的色谱柱可替代亚 2 μm 颗粒色谱柱。配备这些色谱柱的 Agilent 1290 Infinity LC 系统可实现高效分离。Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱可提供：

- 较低的反压
- 最高的柱效
- 可观的柱容量



Agilent Technologies

前言

近年来，亚 2 μm 填料颗粒色谱柱由于其柱效高而备受关注。它可在 van Deemter 方程估算的更高流速下运行。与最佳流速下的柱效相比，较高的流速引起的柱效损失可以忽略。亚 2 μm 填料颗粒色谱柱减少了运行及循环时间，可更快地获得分析结果。

这类色谱柱的缺点是由于粒径小，会显著地引起较高反压。在许多情况下，尤其对于亚 2 μm 长柱，液相色谱仪必须能够承受 400 bar 以上的反压。

表面多孔填料颗粒技术制备的色谱柱可显著降低反压，从而提供了另一种高分辨率分析方法¹。与亚 2 μm 颗粒填料色谱柱柱效相比，这些色谱柱柱效略低。但由于其反压较低，可通过串联色谱柱方式获得极高的塔板数。

本应用报告表明三根长的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱串联，可获得极高的柱效。除特殊液相色谱仪外，反压可以保持在 400 bar 以下。这种情况下，较高的流速可节省分析及平衡时间。最后，对 2.7 μm 多孔外壳色谱柱与亚 2 μm 颗粒色谱柱进行了比较。

实验部分

仪器

本实验选用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，该系统配备二元泵、自动进样器、柱温箱及带有 10 mm 光程流通池的二极管阵列检测器。

色谱柱

使用 Agilent ZORBAX 快速高分离度高通量 4.6 mm × 150 mm, 1.8 μm 色谱柱和 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4.6 mm × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱。耐压最高均可达到 600 bar。

软件

Agilent ChemStation 软件 B.04.02 版

结果和讨论

表面多孔填料色谱柱的潜在优势

表面多孔填料色谱柱技术是以填料颗粒的实心内核和表面多孔外壳为基础的。这种填料包括 1.7 μm 实心内核和 0.5 μm 多孔硅胶外壳。整个粒径大约为 2.7 μm。2.7 μm 表面多孔填料可使反压降低 40%–50%，并提供亚 2 μm 全多孔填料柱效的 80%–90%。与全多孔填料相比，表面多孔填料具有更窄的粒径分布，可获得装填更均一的色谱柱，从而减少组分在色谱柱中的扩散。与此同时，小颗粒和多孔外壳的传质阻力更低，从而在较高流速运行时无柱效损失^{1,2}。

系统配置

以下实验评估了 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱的性能。所有色谱柱内径均为 4.6 mm，柱长 150 mm。

- 计算单根色谱柱在 1.5 mL/min 下运行时的塔板数
- 计算三根色谱柱串联在 1.5 mL/min 下运行时的塔板数
- 计算三根色谱柱串联在更高流速下运行时的塔板数
- 等度和梯度洗脱条件下保留时间的精密密度
- 表面多孔色谱柱与亚 2 μm 颗粒色谱柱的比较

柱效（塔板数）通常在等度洗脱条件下测定。对于对称色谱峰运用下列公式计算理论塔板数 (N)：

$$N = 5.54 (RT/W)^2$$

RT：保留时间

W：半峰宽

计算单根色谱柱的塔板数

选用以下化合物评价单根色谱柱的塔板数：
尿嘧啶、苯乙酮、苯和甲苯。

结果色谱图及计算得到的塔板数如图 1 所示。

特定色谱条件下甲苯的塔板数/柱约为 35000。

计算三根色谱柱串联的塔板数

单根色谱柱的塔板数约为 35000。三根色谱柱串联，塔板数预计可达 105000。采用 90 mm × 0.12 mm 不锈钢管串联色谱柱。计算了不同流速下的理论塔板数。

色谱图如图 2 所示。如果采用 400 bar 液相色谱系统，在 1 mL/min 流速下运行时，理论塔板数约达 80000。当然，该液相色谱系统耐压高达 1200 bar，因此采用该系统可实现更高的流速和柱效。

1.5 mL/min 流速下，理论塔板数约达 103000，接近预期值。

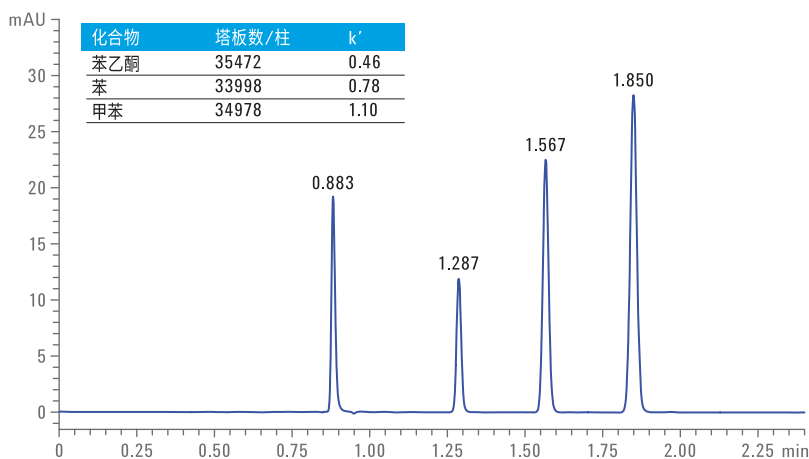
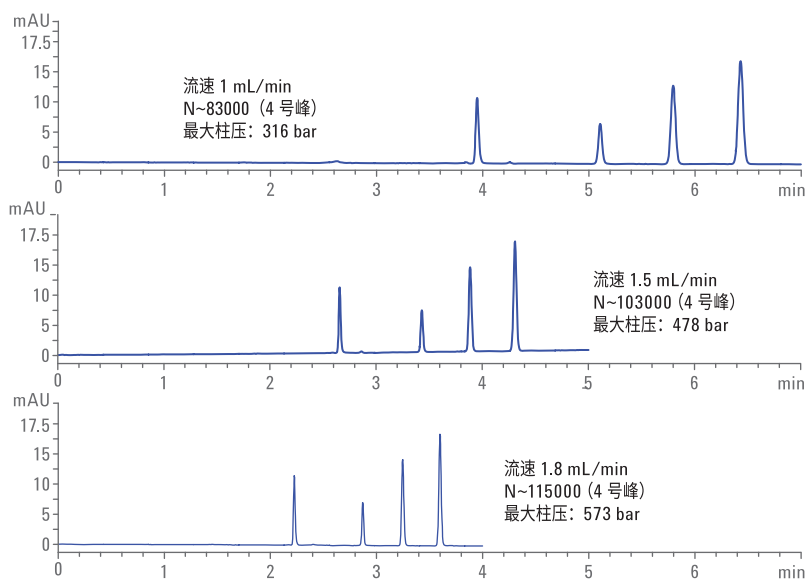


图 1. 计算 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4.6 × 150 mm 色谱柱塔板数的色谱图

色谱分析条件

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm
样品	硫脲、苯乙酮、苯、甲苯
流动相	水:乙腈 = 30:70
流速	1.5 mL/min
进样量	1 μL
柱温	50 °C
检测器	DAD 254/10 nm, 参比波长 360/100 nm, 20 Hz, 标准流通池



色谱分析条件

参数	值
色谱柱	硫脲、苯乙酮、苯、甲苯
样品	三根串联的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm 色谱柱
流动相	水:乙腈 = 20:80
流速	1, 1.5, 1.8 mL/min
进样量	1 μL
柱温	60 °C
检测器	DAD 254/10 nm, 参比波长 360/100 nm, 20 Hz, 标准流通池

图 2. 计算三根串联的 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 150 mm × 4.6 mm 色谱柱在不同流速下塔板数的三张色谱图

甲苯获得的最佳结果是 1.8 mL/min 流速下，在较高的 k' 下，三根色谱柱串联可获得良好的分析结果。流速为 1.2 mL/min (图 3)。

表 1. 1.8 mL/min 流速下的理论塔板数

化合物	塔板数	k'
苯乙酮	114120	0.29
苯	109931	0.46
甲苯	114800	0.62

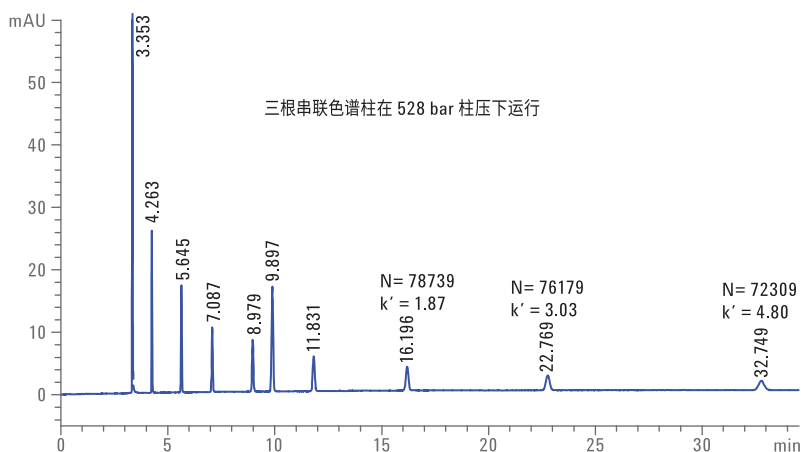


图 3. 三根串联色谱柱在柱压 528 bar，流速 1.2 mL/min，高 k' 值下的理论塔板数

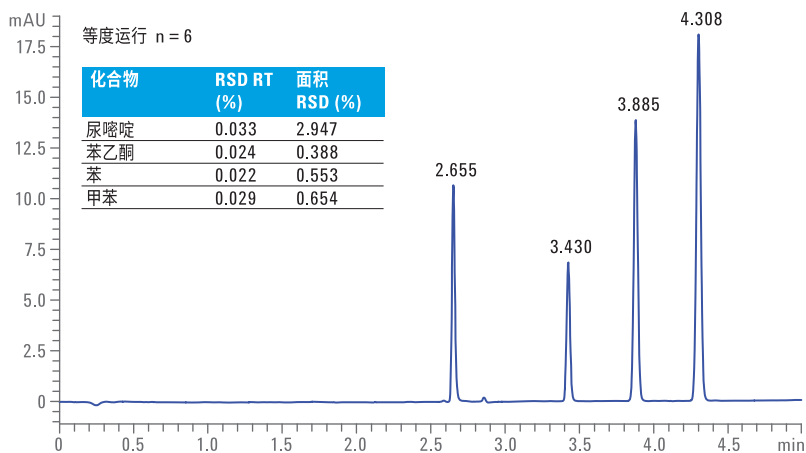


图 4. 等度条件下连续六次进样组分保留时间和峰面积精密度的叠加色谱图

等度条件下保留时间的精密度

图 4 是等度条件 1.5 mL/min 流速下，连续六次进样评估精密度的叠加图，除尿嘧啶外，保留时间精密度 RSD < 0.034%，峰面积精密度 RSD < 0.66%。

色谱分析条件

参数	值
样品	磺脲+测试样品：选用了一组共九种化合物，将其溶于水/乙腈 (65/35) 溶液中，每种化合物的浓度为 100 ng/ μ L。1. 乙酰苯胺，2. 苯乙酮，3. 苯丙酮，4. 苯丁酮 (200 ng/ μ L)，5. 二苯甲酮，6. 苯戊酮，7. 苯己酮，8. 苯庚酮，9. 苯辛酮
色谱柱	三根串联的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4.6 mm, 2.7 μ m 色谱柱
流动相	乙腈/水 60/40
柱温	60 $^{\circ}$ C
流速	1.2 mL/min
检测器	DAD 254/10 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz，标准流通池

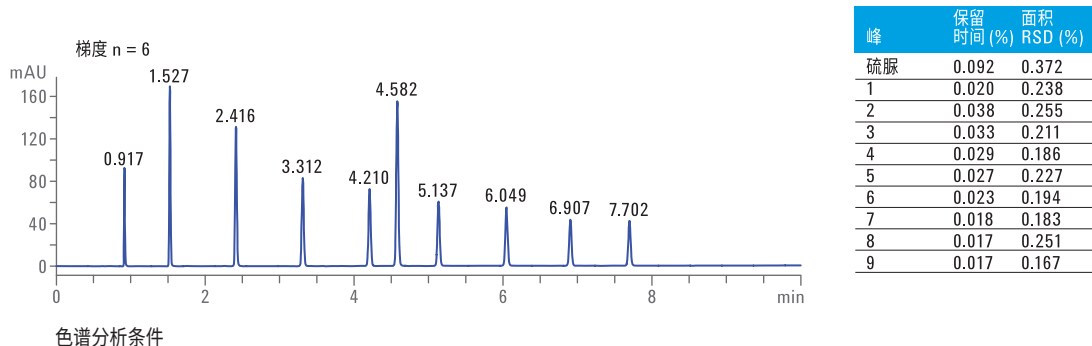
色谱分析条件

参数	值
样品	尿嘧啶、苯乙酮、苯、甲苯
色谱柱	三根串联的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4.6 mm, 2.7 μ m 色谱柱
流动相	水:乙腈 = 20:80
流速	1.5, mL/min
进样量	1 μ L
柱温	60 $^{\circ}$ C
检测器	DAD 254/10 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz，标准流通池

梯度条件下保留时间和峰面积的精密度
对在 10 min 内 35% 到 95% 梯度条件下分析的精密度进行评价。图 5 是连续 6 次进样评价精密度的叠加色谱图。

除硫脲外，所有化合物保留时间精密度良好 (RSD < 0.04%) (图 5)。

所有化合物进样量 1 μ L，峰面积 RSD < 0.38%。



色谱分析条件

参数	值
样品	硫脲+测试样品：选取了九种化合物，将其溶于水/乙腈 (65/35) 溶液中，每种化合物的浓度为 100 ng/ μ L。1. 乙酰苯胺，2. 苯乙酮，3. 苯丙酮，4. 苯丁酮 (200 ng/ μ L)，5. 二苯甲酮，6. 苯戊酮，7. 苯己酮，8. 苯庚酮，9. 苯辛酮
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4.6 mm, 2.7 μ m
流动相	水和乙腈
梯度程序	0 min 35% 乙腈，10 min 内升到 95% 乙腈
流速	1.5 mL/min
进样量	1 μ L
柱温	60 $^{\circ}$ C
检测器	DAD 245 /10 nm，参比波长 400/100 nm，20 Hz，标准流通池

图 5. 连续 10 个梯度运行的保留时间和峰面积精密度的叠加色谱图

表面多孔色谱柱与亚 2 μm 填料颗粒色谱柱峰容量对比

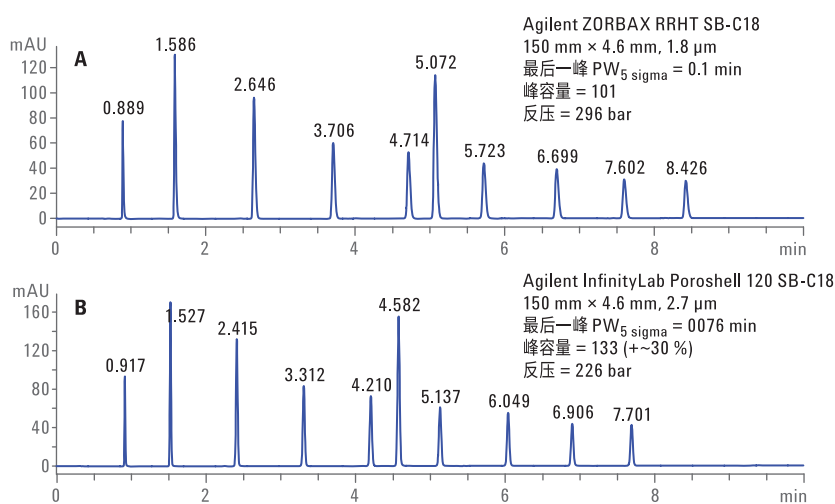
为了说明表面多孔色谱柱与亚 2 μm 填料颗粒色谱柱的不同，使用 150 mm \times 4.6 mm 内径的两种色谱柱对比分析了 10 种化合物的混合物（图 6）。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱显示出更短的洗脱时间和更窄的峰宽，因此多孔外壳色谱柱可获得更高的峰容量。InfinityLab Poroshell 120 色谱柱峰容量为 133 个峰，亚 2 μm 色谱柱只有 101 个峰，前者比后者峰容量高。与亚 2 μm 色谱柱相比，相同条件下，InfinityLab Poroshell 120 色谱柱柱效高出 30%。

色谱柱体积容量比较

为了考察表面多孔色谱柱与 1.8 μm 填料颗粒色谱柱的体积容量是相同还是前者比后者低，采用了高浓度样品进样。进样量 10 μL ，含量大约为 20 μg （图 7）。

在选定条件下，主峰无显著差异。由于采用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱较早洗脱出峰，因此峰宽较小。



色谱分析条件

参数	值
样品	磺脲+待测样品：选用了九种化合物，将其溶于水/乙腈 (65/35) 溶液中，每种化合物的浓度为 100 ng/ μL 。1. 乙酰苯胺，2. 苯乙酮，3. 苯丙酮，4. 苯丁酮 (200 ng/ μL)，5. 二甲苯酮，6. 苯戊酮，7. 苯己酮，8. 苯庚酮，9. 苯辛酮
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 150 mm \times 4.6 mm, 1.8 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4.6 mm, 2.7 μm
流动相	水和乙腈
梯度程序	0 min 35% 乙腈，10 min 内升到 95%
流速	1.5 mL/min
进样量	1 μL
柱温	60 $^{\circ}\text{C}$
检测器	DAD 245/10 nm，参比波长 400/100 nm，20 Hz，标准流通池

图 6. 应用表面多孔色谱柱与亚 2 μm 颗粒色谱柱分析苯酮类混合物的色谱图

信噪比对比

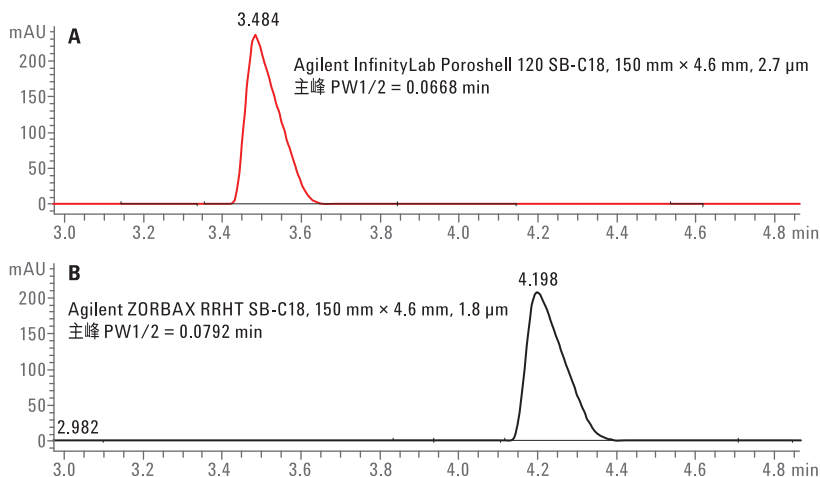
采用分析药物中的杂质来评估信噪比 (S/N)。杂质含量在 0.02%–0.03% 范围内。色谱条件见图 7。

图 8 是局部色谱图的叠加图。红色曲线代表 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱得到的色谱图，黑色曲线代表亚 2 μm 色谱柱得到的色谱图。

表 2 列出了两个色谱柱 S/N 的计算结果。使用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱和亚 2 μm 色谱柱分析杂质 1 和杂质 2。

表 2. 多孔外壳色谱柱与 1.8 μm 颗粒色谱柱的信噪比对比

峰	Agilent InfinityLab Poroshell 120 S/N	1.8 μm S/N
1	14	13.6
2	12.8	12



色谱分析条件

参数	值
测试样品	含杂质的 2.022 mg/mL 曲马多
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm
泵	
流动相 A	水 + 0.2 % TFA
流动相 B	ACN + 0.16 % TFA
梯度程序	5 min 内 B 由 17% 升至 45%，运行时间：7 min，后运行时间：3 min
流速	1.5 mL/min
自动进样器	
进样量	10 μL
洗针时间	10 s
柱温箱	
温度	30 °C
二极管阵列检测器	1290 270/10 nm，参比波长 360/100 nm，20 Hz，光程 10 mm 的标准流通池

图 7. 表面多孔色谱柱与亚 2 μm 色谱柱性能对比；进样量 10 μL = 20 μg

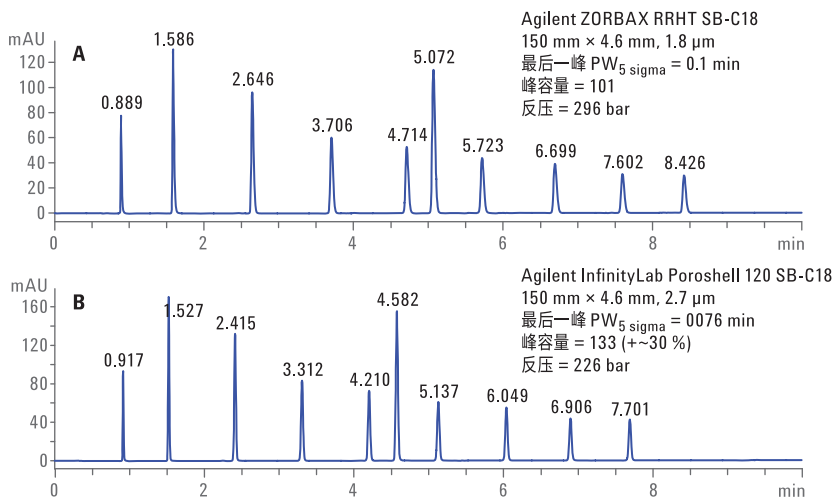


图 8. 信噪比对比，红色曲线代表多孔外壳色谱柱，黑色曲线代表 1.8 μm 颗粒色谱柱。改性剂选用 TFA

结论

表面多孔色谱柱可完全替代亚 2 μm 色谱柱。较低的反压允许在 4.6 mm \times 150 mm, 2.7 μm 色谱柱上使用 1 mL/min 的流速而不超过 400 bar 压力限制。在这种情况下, 理论塔板数可达 35000 或高于 235000/m。

三根串联 4.6 \times 150 mm 色谱柱的理论塔板数可达 100000, 在 5 min 内柱压不超过 600 bar。

Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱在等度和梯度洗脱分析中均获得极好的精密度。

相同色谱条件下, 可以预期采用 InfinityLab Poroshell 120 色谱柱通常比采用具有类似键合相的亚 2 μm 色谱柱洗脱时间短。较短的洗脱时间可获得更窄的峰和更高的峰容量。

参考文献

1. Cunliffe, J. M.; Maloney, T. D. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- μm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3104-3109.
2. Griiti, F.; *et al.* Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. of Chromatog. A* **2007**, *1157*, 289-303.

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2016

2016 年 6 月 1 日, 中国出版

5990-5602CHCN



Agilent Technologies