

Максимальное повышение эффективности хроматографического разделения с помощью колонок Agilent InfinityLab Poroshell 120

Эффективность на уровне 100 000 теоретических тарелок при длительности разделения менее 5 минут с использованием технологии последовательно соединенных колонок

Методические рекомендации

Пищевые продукты, окружающая среда, химическая и фармацевтическая промышленность

Авторы

Ангелика Грацфельд-Хюсген
(Angelika Gratzfeld-Hüsgen)
и Эдгар Нагель (Edgar Naegele)
Agilent Technologies
Вальдброн, Германия

Аннотация

Колонки, основанные на технологиях пористо-поверхностных частиц, являются альтернативой для колонок на основе частиц размером менее 2 мкм. Сочетание этих колонок с системой ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity обеспечивает высокую эффективность разделения. Колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 обеспечивают:

- пониженное обратное давление;
- высочайшую эффективность;
- сравнимую объемную емкость.



Agilent Technologies

Введение

В последнее время к колонкам с частицами размером менее 2 мкм проявляют большой интерес ввиду их высокой эффективности. Их можно использовать при скоростях потока выше оптимального значения, получаемого с помощью уравнения ван Деемтера. Потеря эффективности при более высоких скоростях потока незначительная по сравнению с эффективностью при оптимальной скорости потока. Это позволяет сократить длительность хроматографического анализа и аналитического цикла в целом и получать результаты быстрее.

Недостаток этих колонок заключается в значительно более высоком обратном давлении из-за малого размера частиц. Зачастую, особенно в случае длинных колонок с частицами размером менее 2 мкм, система ВЭЖХ должна допускать обратное давление выше 400 бар.

Технология колонок с пористыми частицами предлагает альтернативный подход к анализу с очень высоким разрешением¹, поскольку эти колонки обеспечивают значительно более низкое обратное давление. Эти колонки лишь чуть менее эффективны по сравнению с колонками на основе частиц размером меньше 2 мкм. Благодаря меньшему обратному давлению можно добиться очень высокого числа теоретических тарелок путем последовательного соединения колонок.

Настоящие методические рекомендации показывают, что последовательное соединение трех длинных колонок Agilent InfinityLab Poroshell 120 обеспечивает чрезвычайно высокую эффективность. Показано также, что при отсутствии соответствующих специальных систем ВЭЖХ можно работать при обратном давлении ниже 400 бар. Если же такие системы имеются, можно использовать более высокие скорости потока для экономии времени анализа и времени приведения колонки в равновесие. Кроме того, представлено сравнение результатов использования колонки с пористыми частицами размером 2,7 мкм и колонки с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм.

Экспериментальная часть

Оборудование

Для экспериментов использовалась система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, оборудованная бинарным насосом, автосамплером, термостатированным отсеком для колонок и детектором на основе диодной матрицы, оснащенный кюветой с длиной оптического пути 10 мм.

Колонки

Использовались колонки Agilent ZORBAX Rapid Resolution HT (4,6 × 150 мм, 1,8 мкм) и Agilent InfinityLab Poroshell 120 (4,6 × 150 мм, 2,7 мкм). Эти колонки можно использовать при давлении до 600 бар.

Программное обеспечение

ПО Agilent ChemStation, версия B.04.02

Результаты и обсуждение

Потенциальные преимущества колонок с пористыми частицами сорбента

Технология колонок с пористыми частицами сорбента основывается на частицах с твердой сердцевинной и пористой поверхностью оболочки. Эти частицы состоят из твердой сердцевины размером 1,7 мкм с пористой оболочкой из силикагеля толщиной 0,5 мкм. Общий размер частицы составляет приблизительно 2,7 мкм. Поверхностно-пористые частицы размером 2,7 мкм обеспечивают обратное давление на 40–50% ниже, чем полностью пористые частицы размером менее 2 мкм, при сохранении 80–90% от достигаемой с полностью пористыми частицами эффективности. Распределение поверхностно-пористых частиц по размерам уже, чем у полностью пористых частиц. Это обеспечивает более однородные характеристики в разных точках колонки и снижает диффузию в колонке. В то же время маленькие частицы и пористая оболочка позволяют снизить сопротивление массопереносу. Это позволяет использовать более высокие скорости потока без потери эффективности^{1,2}.

Конфигурирование системы

В нижеследующих экспериментах исследовались рабочие характеристики колонок Agilent InfinityLab Poroshell 120. Внутренний диаметр и длина всех используемых колонок составляли 4,6 мм и 150 мм соответственно.

- Оценка числа теоретических тарелок для одной колонки при скорости потока 1,5 мл/мин
- Оценка числа теоретических тарелок для трех последовательно соединенных колонок при скорости потока 1,5 мл/мин
- Оценка числа теоретических тарелок для трех последовательно соединенных колонок при более высоких скоростях потока
- Воспроизводимость времен удерживания в условиях изократического и градиентного анализа
- Сравнение колонок с пористыми частицами сорбента и с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм

Эффективность колонок (число теоретических тарелок) обычно измеряют в изократических условиях. Для расчета числа теоретических тарелок (N) в случае симметричного пика используют следующее уравнение:

$$N = 5,54 (RT/W)^2$$

RT — время удерживания, W — ширина пика на половине высоты.

Оценка числа теоретических тарелок для одной колонки

Для оценки числа теоретических тарелок в случае одной колонки использовались следующие соединения: урацил, ацетофенон, бензол и толуол.

Полученная хроматограмма и рассчитанные числа теоретических тарелок показаны на рис. 1.

Для толуола в указанных условиях хроматографирования результат составил приблизительно 35 000 теоретических тарелок на колонку.

Оценка числа теоретических тарелок для трех последовательно соединенных колонок

Эффективность одной колонки составляет приблизительно 35 000 теоретических тарелок. Можно ожидать, что три колонки обеспечат эффективность 105 000 теоретических тарелок. Колонки соединялись капиллярами из нержавеющей стали размером 90 × 0,12 мм. Число теоретических тарелок оценивалось при различных скоростях потока.

Полученные хроматограммы показаны на рис. 2. При использовании системы ВЭЖХ, рассчитанной на давление 400 бар, можно получить эффективность около 80 000 теоретических тарелок при скорости потока 1 мл/мин. Однако с помощью системы ВЭЖХ, использованной в настоящем исследовании, которая позволяет работать при давлениях до 1 200 бар, можно достичь более высоких скоростей потока и эффективности.

При скорости потока 1,5 мл/мин полученное число теоретических тарелок, приблизительно 103 000, близко к ожидаемому значению.

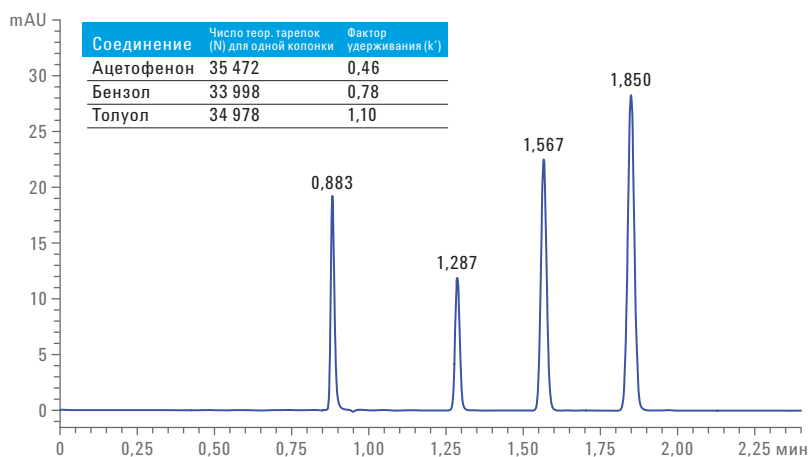


Рис. 1. Хроматограмма для оценки числа теоретических тарелок (N) колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 × 150 мм

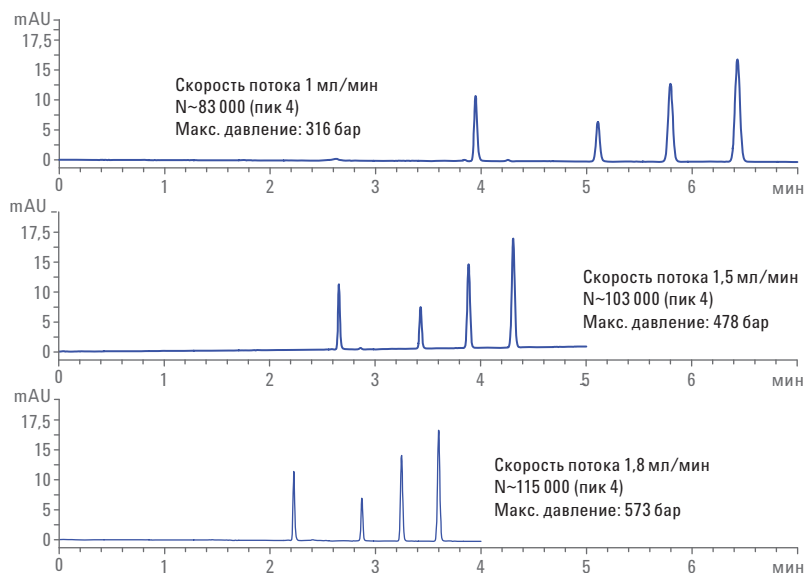


Рис. 2. Две хроматограммы для оценки числа теоретических тарелок (N) трех последовательно соединенных колонок Agilent InfinityLab Poroshell 120, 150 × 4,6 мм при разных скоростях потока

Хроматографические условия

Параметр	Значение
Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Проба	Тиомочевина, ацетофенон, бензол, толуол
Подвижная фаза	Вода:ацетонитрил = 30:70
Скорость потока	1,5 мл/мин
Вводимый объем	1 мкл
Температура колонки	50 °С
Детектор	Детектор на основе диодной матрицы, длина волны 254 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 360 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета

Хроматографические условия

Параметр	Значение
Проба	Тиомочевина, ацетофенон, бензол, толуол
Колонка	Три последовательно соединенные колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза	Вода:ацетонитрил = 20:80
Скорость потока	1, 1,5, 1,8 мл/мин
Вводимый объем	1 мкл
Температура колонки	60 °С
Детектор	Детектор на основе диодной матрицы, длина волны 254 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 360 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета

Наилучший результат для толуола, приблизительно 115 000 теоретических тарелок, получен при скорости потока 1,8 мл/мин, причем время удерживания составило менее 5 минут (табл. 1).

Для более высоких значений фактора удерживания k' хорошие результаты получены с использованием трех последовательно соединенных колонок. Использовалась скорость потока 1,2 мл/мин (рис. 3).

Воспроизводимость времен удерживания в изократических условиях

Воспроизводимость в изократических условиях оценивалась при скорости потока 1,5 мл/мин. Результаты показаны на рис. 4 вместе с наложением хроматограмм для шести последовательных анализов. Воспроизводимость времен удерживания характеризуется величинами относительного стандартного отклонения (RSD) < 0,034%, а воспроизводимость площадей пиков — RSD < 0,66%, за исключением урацила.

Таблица 1. Число теоретических тарелок при скорости потока 1,8 мл/мин

Соединение	Число теор. тарелок	Фактор удерживания (k')
Ацетофенон	114 120	0,29
Бензол	109 931	0,46
Толуол	114 800	0,62

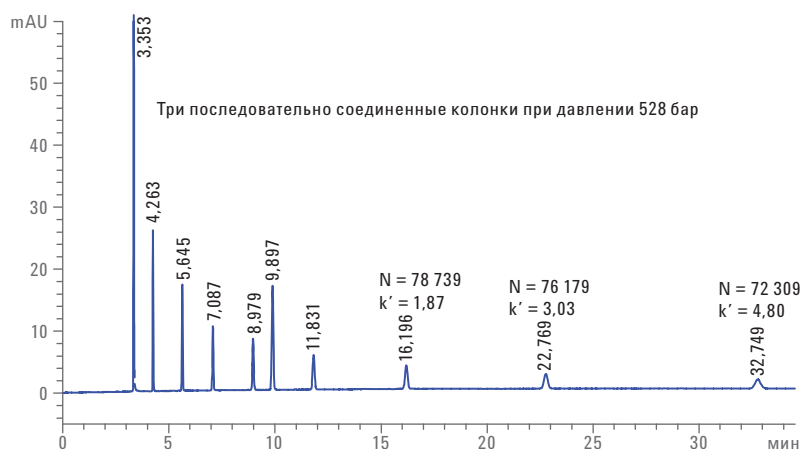


Рис. 3. Число теоретических тарелок для более высоких значений фактора удерживания (k') для трех последовательно соединенных колонок при давлении 528 бар и скорости потока 1,2 мл/мин

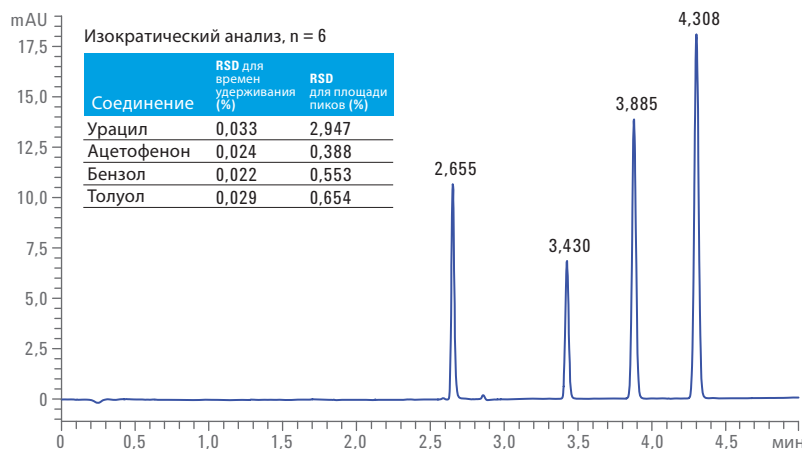


Рис. 4. Наложение хроматограмм для шести последовательных анализов в изократических условиях и данные по воспроизводимости для времен удерживания и площадей пиков

Хроматографические условия

Параметр	Значение
Проба	Тиомочевина + тестовая проба: набор из девяти соединений, 100 нг/мкл каждого, растворенных в смеси вода/ацетонитрил (65/35) 1. Ацетанилид, 2. Ацетофенон, 3. Пропиофенон, 4. Бутирофенон (200 нг/мкл), 5. Бензофенон, 6. Валерофенон, 7. Гексанофенон, 8. Гептанофенон, 9. Октанофенон
Колонка	Три последовательно соединенные колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза	Ацетонитрил/вода = 60/40
Температура колонки	60 °C
Скорость потока	1,2 мл/мин
Детектор	Детектор на основе диодной матрицы, длина волны 254 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 360 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета

Хроматографические условия

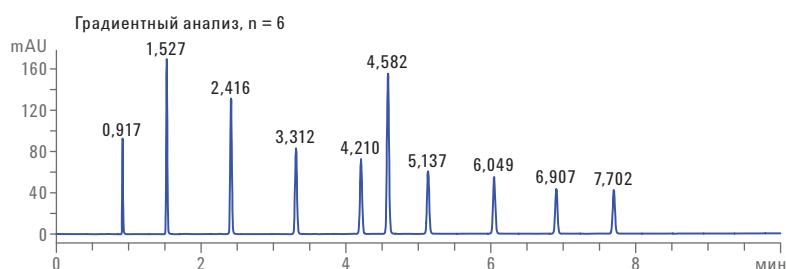
Параметр	Значение
Проба	Урацил, ацетофенон, бензол, толуол
Колонка	Три последовательно соединенные колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза	Вода:ацетонитрил = 20:80
Скорость потока	1,5 мл/мин
Вводимый объем	1 мкл
Температура колонки	60 °C
Детектор	Детектор на основе диодной матрицы, длина волны 254 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 360 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета

Воспроизводимость для времен удерживания и площадей пиков в условиях градиентного анализа

Воспроизводимость для градиентного анализа оценивалась с использованием градиента от 35 до 95% ацетонитрила в течение 10 минут. Результаты и наложение хроматограмм для шести последовательных анализов показаны на рис. 5.

Для всех соединений, кроме тиомочевина, была достигнута превосходная воспроизводимость времени удерживания (RSD < 0,04%), рис. 5.

Значения RSD для площадей пиков всех соединений были меньше 0,38% при вводимом объеме 1 мкл.



Пик	RSD для времен удерживания (%)	RSD для площади пиков (%)
Тиомочевина	0,092	0,372
1	0,020	0,238
2	0,038	0,255
3	0,033	0,211
4	0,029	0,186
5	0,027	0,227
6	0,023	0,194
7	0,018	0,183
8	0,017	0,251
9	0,017	0,167

Хроматографические условия

Параметр	Значение
Проба	Тиомочевина + тестовая проба: набор из девяти соединений, 100 нг/мкл каждого, растворенных в смеси вода/ацетонитрил (65/35) 1. Ацетанилид, 2. Ацетофенон, 3. Пропиофенон, 4. Бутирофенон (200 нг/мкл), 5. Бензофенон, 6. Валерофенон, 7. Гексафенон, 8. Гептанофенон, 9. Октанофенон
Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза	Вода и ацетонитрил
Градиент	При 0 минутах 35% ацетонитрила, при 10 минутах 95% ацетонитрила
Скорость потока	1,5 мл/мин
Вводимый объем	1 мкл
Температура колонки	60 °С
Детектор	Детектор на основе диодной матрицы, длина волны 245 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 400 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета

Рис. 5. Наложение хроматограмм для 10 последовательных градиентных анализов и данные по воспроизводимости для времен удерживания и площадей пиков

Сравнение пиковой емкости колонки с поверхностно-пористыми частицами и колонки с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм

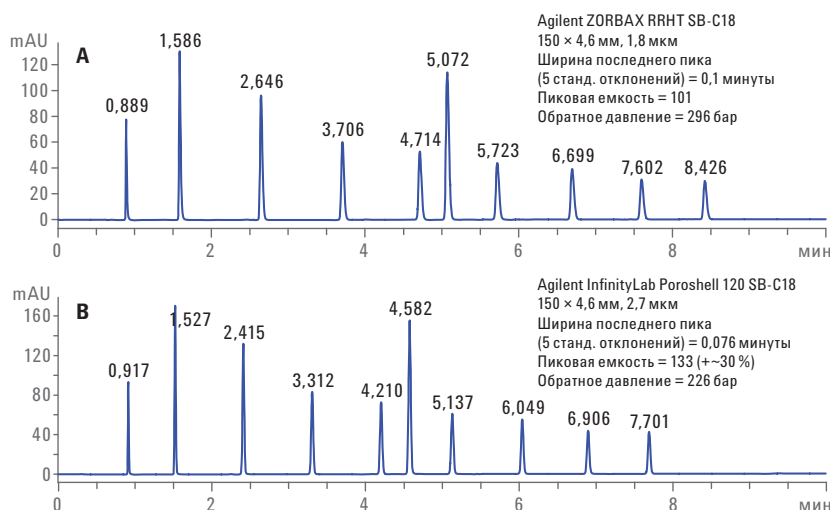
Для демонстрации разницы между колонкой с поверхностно-пористыми частицами и колонкой с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм проводилось сравнение результатов анализа набора из 10 соединений в двух колонках длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм (рис. 6).

В случае колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 наблюдались меньшие времена элюирования, а также меньшая ширина пиков, обеспечивающая более высокую пиковую емкость этой колонки с поверхностно-пористыми частицами. Пиковая емкость колонки InfinityLab Poroshell 120 составила 133 пика, что превосходит результаты колонки на основе полностью пористых частиц размером менее 2 мкм, для которой пиковая емкость составила 101. То есть в используемых условиях колонка InfinityLab Poroshell 120 на 30% эффективнее колонки на основе полностью пористых частиц размером менее 2 мкм.

Сравнение объемной емкости

Чтобы проверить, обладают ли колонки с поверхностно-пористыми частицами такой же или меньшей объемной емкостью, что и колонка, заполненная полностью пористыми частицами размером 1,8 мкм, вводилась проба высокой концентрации. Вводимый объем составлял 10 мкл при концентрации приблизительно 20 мкг в 10 мкл (рис. 7).

В выбранных условиях значительных различий для основного пика не наблюдалось. Ширина пика для колонки InfinityLab Poroshell 120 была несколько меньше, так как в этом случае пик элюировался раньше. Как правило, ширина пика оказывается меньше.



Хроматографические условия

Параметр	Значение
Проба	Тиомочевина + тестовая проба: набор из девяти соединений, 100 нг/мкл каждого, растворенных в смеси вода/ацетонитрил (65/35) 1. Ацетанилид, 2. Ацетофенон, 3. Пропиофенон, 4. Бутирофенон (200 нг/мкл), Бензофенон, 6. Валерофенон, 7. Гексафенон, 8. Гептанофенон, 9. Октанофенон
Колонки	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 150 × 4,6 мм, 1,8 мкм Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза	Вода и ацетонитрил
Градиент	0 минут — 35% ацетонитрила, 10 минут — 95% ацетонитрила
Скорость потока	1,5 мл/мин
Вводимый объем	1 мкл
Температура колонки	60 °С
Детектор	Детектор на основе диодной матрицы, длина волны 245 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 400 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета

Рис. 6. Хроматограммы смеси фенонов, полученные с использованием колонки с поверхностно-пористыми частицами и колонки с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм

Сравнение соотношения

«сигнал — шум»

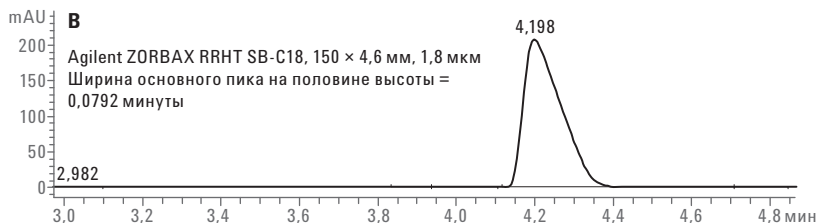
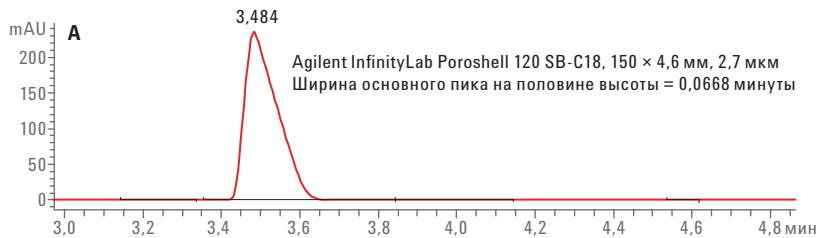
Для оценки соотношения «сигнал — шум» (S/N) проводился анализ примесей в фармацевтических препаратах. Диапазон содержания примесей составлял 0,02–0,03 процента. Условия хроматографирования перечислены на рис. 7.

На рис. 8 показано наложение участков полных хроматограмм. Красная хроматограмма получена с использованием колонки InfinityLab Poroshell 120, а черная — с использованием колонки на основе полностью пористых частиц размером менее 2 мкм.

В табл. 2 приведены найденные соотношения «сигнал — шум» для обеих колонок. Примеси 1 и 2 анализировались с использованием колонки InfinityLab Poroshell 120 и колонке на основе полностью пористых частиц размером менее 2 мкм.

Таблица 2. Сравнение соотношений «сигнал — шум» для колонок с поверхностно-пористыми частицами и полностью пористыми частицами размером 1,8 мкм

Пик	Соотношение «сигнал — шум» для колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120	Соотношение «сигнал — шум» для колонки на основе полностью пористых частиц размером 1,8 мкм
1	14	13,6
2	12,8	12



Хроматографические условия

Параметр	Значение
Проба	Трамадол, 2,022 мг/мл, содержащий примеси
Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 × 4,6 мм, 2,7 мкм
Насос	
Растворитель А	Вода + 0,2% трифторуксусной кислоты
Растворитель В	Ацетонитрил + 0,16% трифторуксусной кислоты
Градиент	От 17 до 45% В в течение 5 минут, время прекращения сбора данных: 7 мин, время подготовки к следующему анализу: 3 мин
Скорость потока	1,5 мл/мин
Автосамплер	
Вводимый объем	10 мкл
Время промывки	10 с
Термостатированный отсек для колонок	
Температура	30 °С
Диодно-матричный детектор	Модель 1290, длина волны 270 нм при ширине спектральной полосы 10 нм, опорный сигнал 360 нм при ширине спектральной полосы 100 нм, частота сбора данных 20 Гц, стандартная кювета с длиной оптического пути 10 мм

Рис. 7. Сравнение емкости колонок с поверхностно-пористыми частицами и с полностью пористыми частицами размера менее 2 мкм; вводимый объем 10 мкл = 20 мкг анализатора

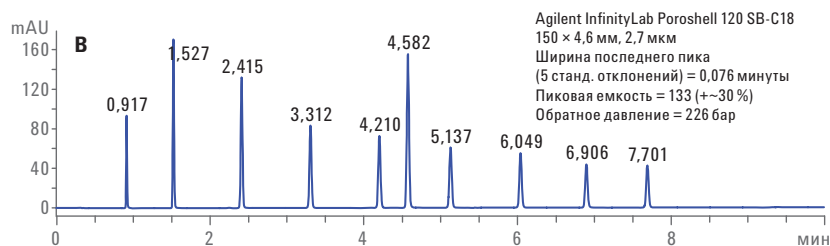
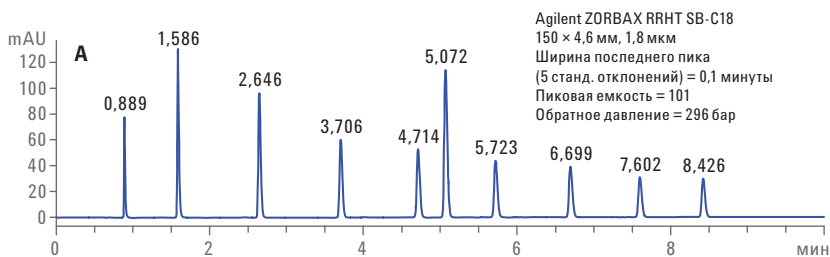


Рис. 8. Сравнение соотношения «сигнал — шум»; красная хроматограмма получена с использованием колонки с поверхностно-пористыми частицами, черная — с использованием колонки с полностью пористыми частицами размера 1,8 мкм; в качестве модификатора подвижной фазы использовалась трифторуксусная кислота

Выводы

Колонки с поверхностно-пористыми частицами сорбента представляют реальную альтернативу колонкам на основе полностью пористых частиц размером менее 2 мкм. Пониженное обратное давление позволяет использовать скорости потока 1 мл/мин для колонок размером 4,6 × 150 мм с размером частиц 2,7 мкм, не превышая предельного давления в 400 бар. В этом случае можно достичь эффективности 35 000 теоретических тарелок, то есть более 235 000 теоретических тарелок на метр.

Последовательное соединение трех колонок размером 4,6 × 150 мм позволяет получить эффективность 100 000 теоретических тарелок при времени анализа в пределах 5 минут и без превышения предельного давления в 600 бар.

Колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 демонстрируют превосходную воспроизводимость результатов в случае как изократического, так и градиентного анализа.

Можно ожидать, что в одинаковых условиях хроматографирования время элюирования для колонок InfinityLab Poroshell 120 будет, как правило, ниже, чем у аналогичных колонок с полностью пористыми частицами размером менее 2 мкм и той же привитой фазой. Сокращенное время элюирования приводит к меньшей ширине пиков и, следовательно, к большей пиковой емкости.

Литература

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. (Технология частиц сорбента со сплошной сердцевинной в качестве альтернативы частицам размером менее 2 мкм для высокой эффективности хроматографического разделения при низком обратном давлении) *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3104–3109.
2. Griiti, F. *и др.* Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. (Сравнение эффективности колонок, заполненных полностью и частично пористыми частицами сорбента на основе силикагеля с привитой фазой C18) *J. of Chromatog. A* **2007**, *1157*, 289–303.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Опубликовано в США 1 июня 2016 г.
5990-5602RU



Agilent Technologies