

使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分析环境中的酚类

应用报告

环境

作者

William J. Long 和 Anne E. Mack
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
美国

摘要

本文将最初使用 4.6×100 mm, 5 μm 色谱柱开发的 9 种酚类化合物的分离方法转移到 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6×100 mm, 2.7 μm 色谱柱上。通过调节梯度和流速, 保持保留指数不变以确定每根色谱柱的最佳流速。本文还提供了方法转移的简单指导原则。新的分离方法将分析时间从 20 min 缩短到不到 3 min, 并且峰容量更高, 由于两种色谱柱均采用 2 μm 筛板, 因此无需更改样品制备方法。将该方法进一步扩展到 50 mm 色谱柱, 得到的分离度略低于 100 mm 色谱柱, 然而只需 2 min 分析时间, 且与原方法的峰容量相同。尽管本方法与原方法相比压力有所增加, 但柱压仍低于 400 bar, 故此可以适用于任何高效液相色谱系统。



Agilent Technologies

前言

环境中存在的酚类化合物是从工业生产过程中产生的。包括酚醛树脂、抗氧化剂、农药的生产，以及木材、煤炭和石油的燃烧都会产生酚类化合物。其中一些酚类化合物有杀菌能力，可用做消毒剂，其它酚类化合物则是自然形成的。当酚类化合物被排放到环境中，则会污染水源，杀灭大量水生生物，造成严重危害，而且食物链的痕量级酚类化合物则会引起生物沉积。其它酚类化合物则具有雌激素作用或能引起内分泌紊乱。这些化合物往往通过水污染进入环境。由于它们具有毒性、不易降解并且在工业上应用广泛，因此必须对苯酚和取代苯酚进行分析测定。许多酚类化合物都出现在优先控制污染物列表中[1]。

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μm 色谱柱具有与亚 2 μm 全多孔填料颗粒色谱柱相似的性能，但是由于它们使用与 5 μm 填料色谱柱中同样的 2 μm 孔径色谱柱筛板，因此不需要进行额外的样品制备。这样就可以实现把在 5 μm 填料颗粒色谱柱上建立的方法向新型 Poroshell 120 色谱柱完美转移了[2,3,4]。

本文实现了将使用 4.6 \times 100 mm, 5 μm 色谱柱的梯度分析方法优化、转移到 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 100 mm 色谱柱上。梯度时间从 20 min 减少到 3 min, 并得到更高峰容量。使用 4.6 \times 50 mm 色谱柱, 分析时间可进一步减少, 并保持了与原方法相同的峰容量。

实验部分

本实验采用 Agilent 1200 快速分离高分辨率液相色谱(RRLC)系统:

- 安捷伦 G1312B SL 型二元泵; 流动相 A: 0.1% 甲酸溶液, B: 乙腈。开始保持 B 的浓度为 5% 作为起始梯度, 随后变为 B 升至 40%, 并保持一段时间, 然后重新平衡至初始条件。梯度时间根据色谱柱规格和流速调整 (表 1 和表 2)。此系统配有脉冲阻尼器和标准混合器

- 安捷伦 G1367C SL 型自动液体进样器(ALS)。4.6 \times 100 mm 和 4.6 \times 50 mm 色谱柱的进样量分别为 20 μL 和 10 μL
- 安捷伦 G1316B SL 型柱温箱(TCC), 柱温设定为 35 $^{\circ}\text{C}$
- 安捷伦 G1315C SL 型二极管阵列检测器(DAD), 检测波长为 270, 4 nm; 参比波长为 360, 100 nm, 配备 G1315-60024 微量流通池 (光程 3 mm, 体积 2 μL)
- 采用 B.04.01 版安捷伦化学工作站进行高效液相色谱控制和数据处理

本实验采用五种类型的安捷伦色谱柱:

- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 100 mm, 2.7 μm 色谱柱
– 安捷伦部件号: 695975-902
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 \times 50 mm, 2.7 μm 色谱柱
– 安捷伦部件号: 699975-902
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 100 mm, 1.8 μm 色谱柱
– 安捷伦部件号: 959964-302
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 100 mm, 3.5 μm 色谱柱
– 安捷伦部件号: 959961-902
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 100 mm, 5 μm 色谱柱
– 安捷伦部件号: 959996-902

目标化合物及其各自结构见图 1。将各化合物分别溶于水配成 1 mg/mL 的溶液。取等量上述溶液混匀制成混合样品溶液。所有样品用硫脲做空白标记, 测定 t_0 。

以下化合物均购自 Sigma Aldrich 公司: 对苯二酚、间苯二酚、苯酚、4-硝基苯酚、对甲酚、邻甲酚、2, 3-二甲基苯酚、2, 5-二甲基苯酚、1-萘酚。甲酸购自 Sigma Aldrich 公司(Bellefonte, PA)。乙腈购自 Honeywell, Burdick 和 Jackson High Purity 公司 (Muskegon, MI)。所用水为 18 M- Ω Milli-Q 水(Bedford, MA)。

环境酚类

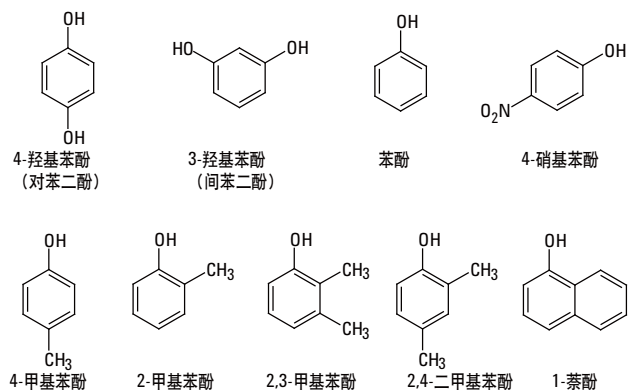


图 1. 目标化合物

结果与讨论

之前的研究得到了一种测定饮用水和地表水中酚类的极佳分析方法。本研究的目的是通过增加峰容量或者大量减少运行时间来改进原方法。把酸性改性剂由醋酸改为了甲酸，略微降低了流动相的 pH 值，得到了更平稳的基线。正如文献 5 所述，当优化了分离条件后（选择性和保留指数），我们就可以通过改变柱长、填料粒径和流速进一步改善色谱分离效果。通过改变这些柱参数增加峰容量时，选择性也不应降低，但此过程中必须保持 k^* 值不变。

公式 1: $k^* = (t_g F) / (d/2)^2 L (\Delta\%B)$

其中：

t_g 为梯度洗脱时间，

F 为流速

L 为柱长

d 为色谱柱内径

$\Delta\%B$ 表示梯度程序中有机相的比例

正如先前报告所述，为了保持柱体积恒定及方法的选择性，要对初始梯度程序进行调整。在本文中流速以 0.5 mL/min 作为间隔，在 0.5 mL/min 和 3.5 mL/min 范围之间变化。以公式 1 做指导，建立了如表 1 所列的梯度条件。虽然这些条件可以经手动计算得出，但是我们可以很简单的使用 Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC 方法转换和成本节省计算器[6]得出。本研究中这些梯度条件是 100 mm 色谱柱所使用的基本色谱程序。可以看出，随着流速的增加在此程序中的所有步骤均成比例地缩短。由图 2a 和 2b 的色谱图可见，5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱和 2.7 μm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的洗脱顺序相似。除上述色谱柱外，在 3.5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 和 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱上也进行相同的实验，色谱图分别见图 3a 和 3b。在 2 mL/min 流速下，4.6 \times 100 mm，1.8 μm 色谱柱产生的压力大约为 550 bar。因此，未再考虑进行进一步的优化。在所有情况下，洗脱顺序相同。用公式 2 计算每张色谱图的峰容量。简单说来，峰容量就是色谱图中给定宽度里所能容纳的从第一个到最后一个色谱峰的数量。

表 1. 采用 4.6 \times 100 mm 色谱柱的梯度程序

%B	时间 (min)						
	5	4	2	1.33	1	0.8	0.67
40	34	17	11.33	8.5	6.8	5.67	2.84
40	40	20	13.33	10	8	6.67	3.34
5	42	21	14	10.5	8.4	7	3.5
5	50	25	16.67	12.5	10	8.34	4.17
流速 (mL/min)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱有相似的选择性，可方便实现方法转移

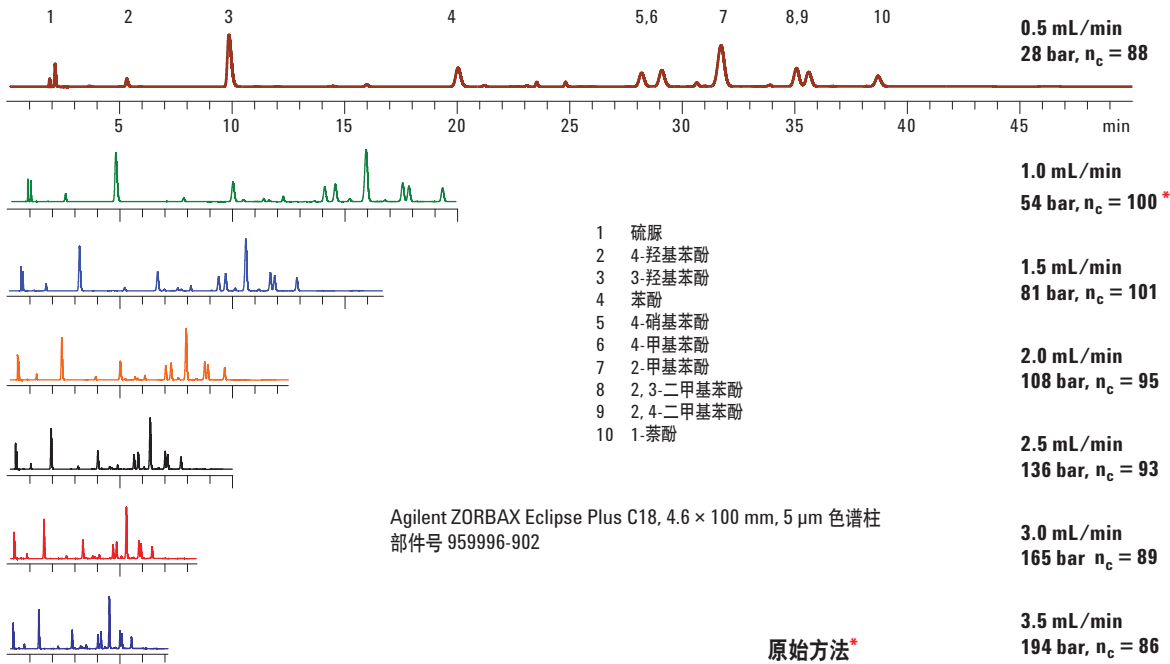


图 2a. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 5 μm 色谱柱分析的系列色谱图

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱有相似的选择性，可方便实现方法转移

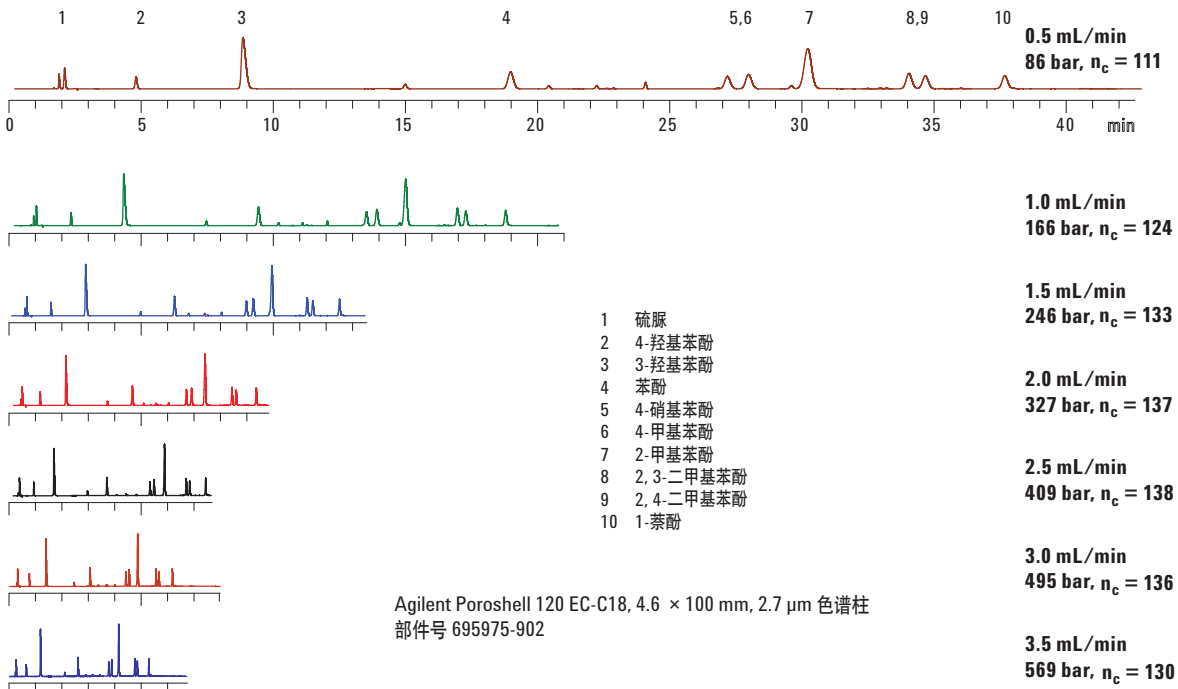


图 2b. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分析的系列色谱图

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱有相似的选择性，可方便实现方法转移

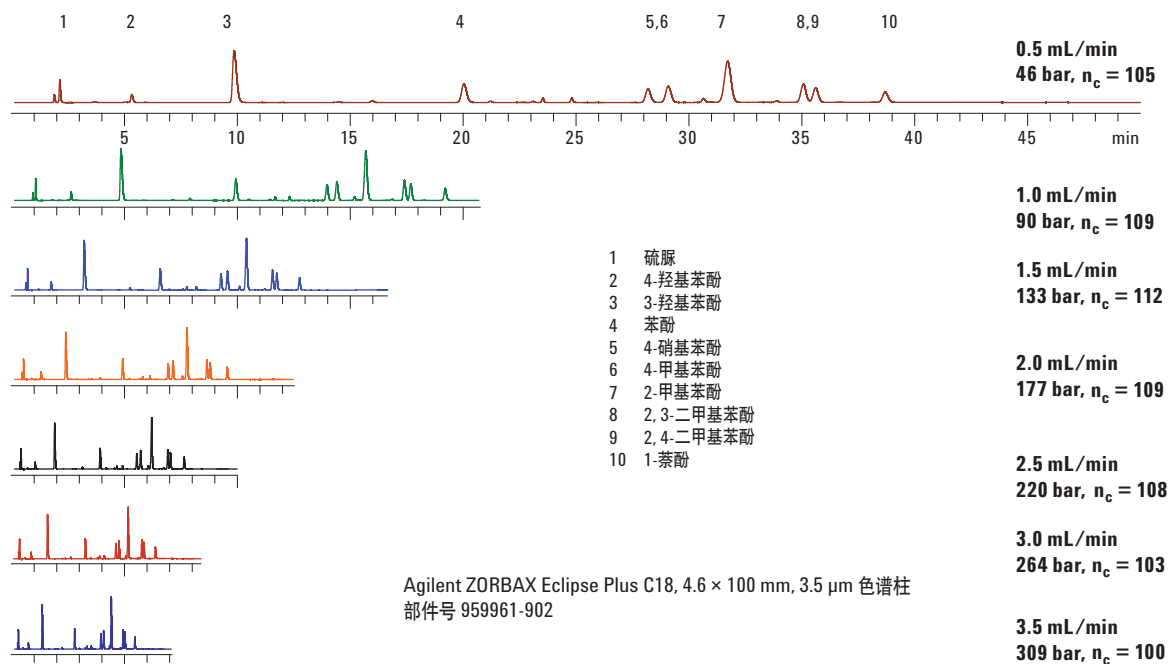


图 3a. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm 色谱柱分析的系列色谱图

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 和 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱有相似的选择性，可方便实现方法转移

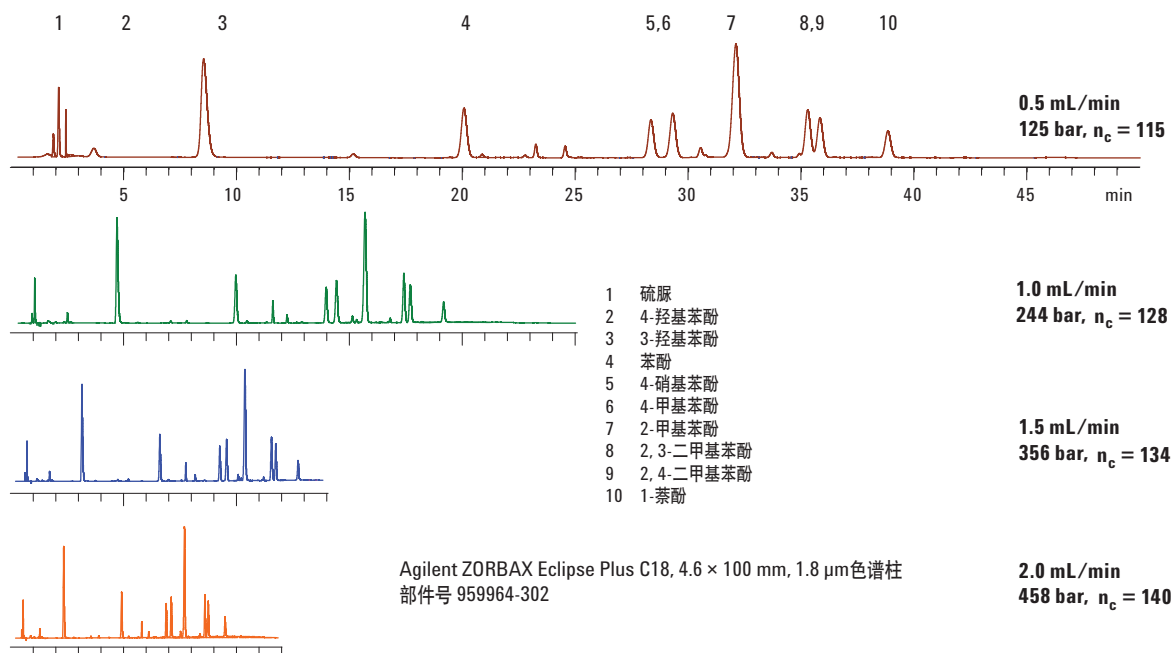


图 3b. 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱分析的系列色谱图

公式 2:

条件峰容量 $n_c = (t_{R,n} - t_{R,1})/w$

其中:

$t_{R,n}$ 和 $t_{R,1}$: 最后一个洗脱峰和第一个洗脱峰的保留时间

w 代表 4σ 峰宽

$w = (W_{1/2}/2.35) \times 4$

$W_{1/2}$ = 半峰宽

根据图 2a、2b、3a、3b 中每个色谱图的峰容量绘制图 4。发现采用 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱在 2 mL/min 流速下分析可获得最大峰容量，但如果流速更高，峰容量可能也会更高。当流速在 2-3 mL/min 范围内，100 mm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱获得第二大峰容量。图 5 显示在峰容量仅有少量损失的情况下，可实现更快分离。使用 5 μm 色谱柱在 1-1.5 mL/min 流速下峰容量最佳，而 3.5 μm 色谱柱在 1.5 mL/min 时峰容量最佳。一般情况下，使用相同规格的全多孔填料色谱柱，填料粒径越大最佳流速越低，峰容量也越低。使用 50 mm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱调整色谱条件进行了相关实验，梯度条件见表 2，结果见图 5。50 mm 和 100 mm

Agilent Poroshell 120 色谱柱的峰容量与相同粒径的 1.8 μm 色谱柱相似，但比粒径 3.5 或 5 μm 色谱柱的峰容量更高。全多孔填料颗粒色谱柱的峰容量与它们的粒径成反比。

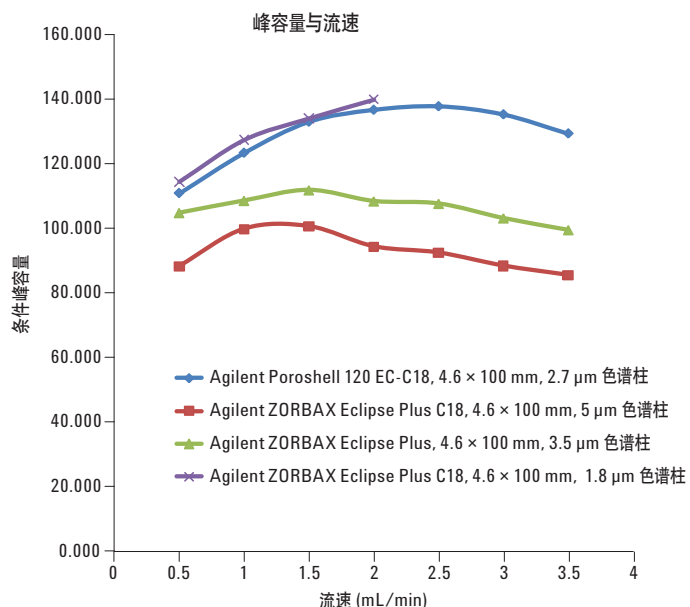


图 4. 在不同的流速下，Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和不同粒径全多孔 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱峰容量的比较

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm 色谱柱在 182 bar 压力下可获得与耗时 20 min 的原方法相同的峰容量，分析时间仅为 3 min

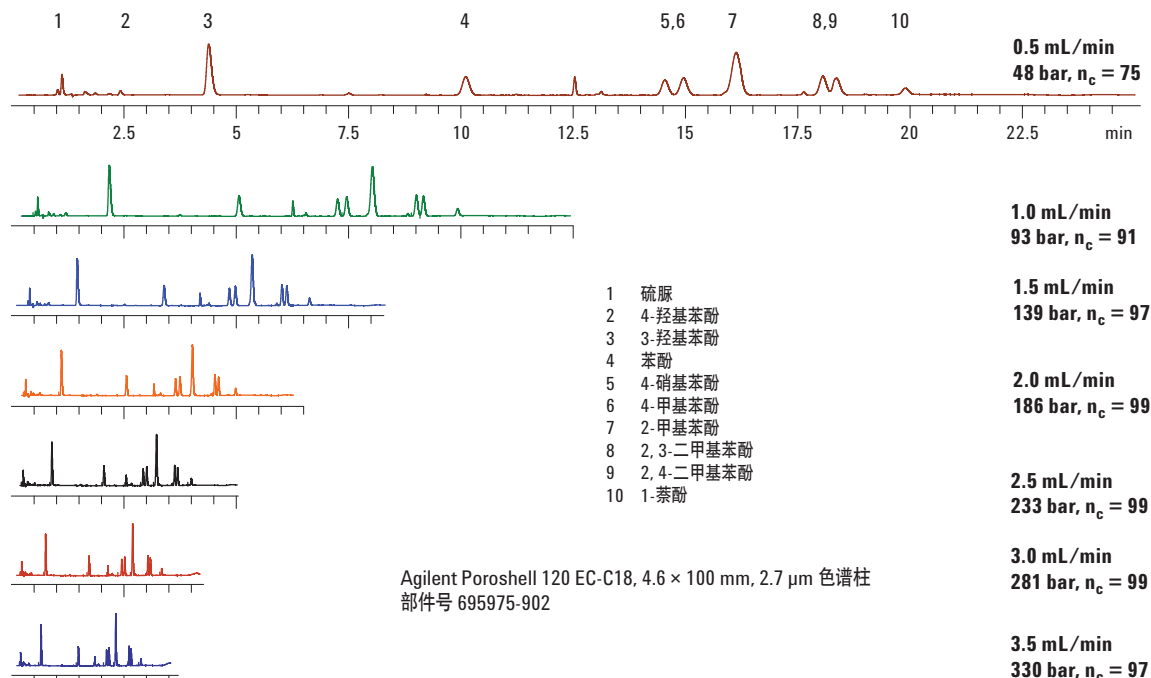


图 5. 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm 色谱柱分析的系列色谱图

表 2. 采用 4.6 × 50 mm 色谱柱的梯度程序

%B		时间 (min)						
5	4	2	1.33	1	0.8	0.67	0.34	
40	34	17	11.33	8.5	6.8	5.67	2.84	
40	40	20	13.33	10	8	6.67	3.34	
5	42	21	14	10.5	8.4	7	3.5	
5	50	25	16.67	12.5	10	8.34	4.17	
流速 (mL/min)		0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5

Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱峰容量的对比见图 6。在 2-3 mL/min 流速下, 50 mm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱在 3 min 时有最佳峰容量。仅在 2 min 时就洗脱出最后一个色谱峰, 而其峰容量与最初采用 4.6 × 100 mm, 5 μm 色谱柱并耗时 20 min 方法的峰容量相同。

在相应调整梯度程序的条件下, Agilent Poroshell 120 100 mm 色谱柱的峰容量比 50 mm 色谱柱的更高

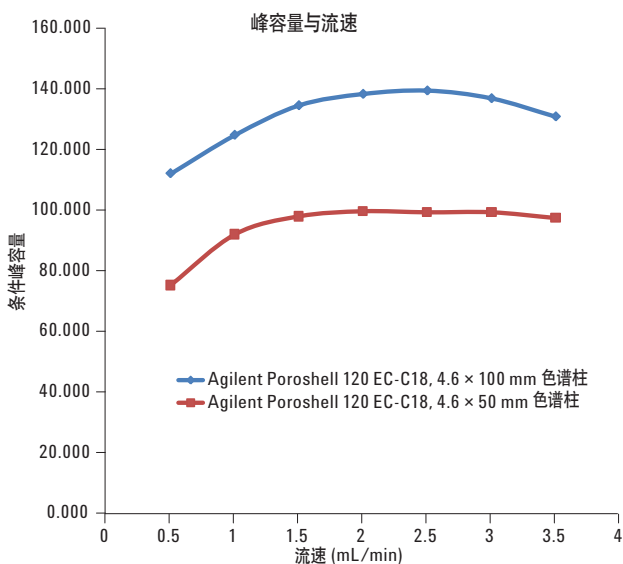


图 6. 在不同的流速下, 50 mm 和 100 mm Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的峰容量

结论

与常规全多孔填料颗粒色谱柱相比, 表面多孔颗粒的 HPLC 色谱柱呈现众多优势。表面多孔 2.7 μm Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱与 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱有相似的柱效和选择性, 且不产生高压。

如果使用 5 μm 较大填料颗粒色谱柱可以得到良好分辨率, 就可以通过选用其它色谱柱和适当调整梯度程序改善分离。由于 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱有着相似的选择性, 所以很容易实现从 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱到 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱的方法转移, 从而减少运行时间、增加分析通量, 并提高峰容量。

参考文献

1. V. Coman, and Z. Moldovan, "RP-HPLC Method for the Separation of Some Phenol Derivatives Using Gradient Elution and UV Detection." *J. High Resol. Chromatogr.* 2000, 23, (12) 699-701.
2. W. Long, and A. Mack, "Fast Analysis of Sulfa Drugs using the Agilent 1100 Series LC with Agilent Poroshell 120 EC-C18 columns," Agilent Technologies publication 5990-5572EN, 2010.
3. A. Gratzfeld-Hüsgen, and E. Naegele, "Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 columns," Agilent Technologies publication 5990-5602EN, 2010.
4. A. Mack, and W. Long, "Fast, Low Pressure Analysis of Food and Beverage Additives Using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column," Agilent Technologies publication 5990-6082EN, 2010.
5. Snyder, Kirkland, Glach "Practical HPLC Method Development," Chapter 8, 2nd ed. John Wiley & Sons, 1997
6. The Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Method Translator and Cost Savings Calculator <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/instruments/lc/pages/gp60931.aspx>

更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料所包含的错误，或与本材料的供应、性能及使用相关的偶发或继发损害概不负责。

本出版物所含信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2010

中国印刷

2010年8月31日

5990-6156CHCN



Agilent Technologies