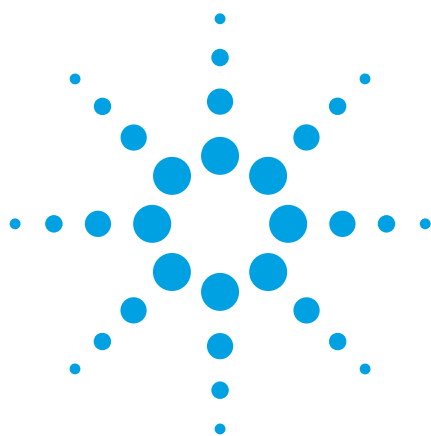




通过改善安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散性能，实现安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能的最大化

应用简报

常规分析

作者

Anne E. Mack
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

摘要

优化了安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统的最低可能柱外体积，以确保小规格色谱柱（安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18， 2.1×50 mm， $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱）的峰展宽最小并且得到最佳结果。安捷伦科技的超低扩散管路、超低扩散最大光程卡套式流通池（ $V(o) = 0.6 \mu\text{L}$ ）和液相色谱系统支架将 1290 系统的柱外体积减少了 60%。可以观察到其对色谱柱性能的影响。等度分析中早流出色谱峰的性能改善最大，其柱效（ $k' = 1.6$ ）提高高达 58%，明显改善了等度和梯度的分析结果。梯度分析时，根据不同条件下峰容量（ $k' = 1.3$ 到 5.3）的不同，柱效提高了 24%~32%。此外，对于等度分析和梯度分析时的色谱柱性能，流速和柱外体积的影响之间没有必然关系。



Agilent Technologies

引言

填充了小颗粒填料的小规格液相色谱柱具有更高的生产率、更快速的分析或者更高的分离度，减少了溶剂消耗并且与 LC/MS 和 ELSD 的兼容性更高。与之相比较，4.6 mm 或 3 mm 内径的大规格色谱柱则需要更快的流速才能达到同样的线性速率。只需将较大内径色谱柱更换为较小规格色谱柱即可获得这些优势。然而，如果要充分利用小规格色谱柱的优势，还必须使液相色谱系统的柱外体积最小化。这包括连接管路、针座、热交换器和检测器流通池。样品一旦进入液相色谱系统，即开始峰展宽。随着样品经过自动进样器，到色谱柱，再到检测器，最终到达检测器流通池，一直进行着峰展宽。将这一体积最小化对所有小规格色谱柱而言尤为重要，因为，与大内径色谱柱相比，这一体积占据系统柱外体积的比例更大。

早期的工作 [1] 解释了柱外体积对各种柱规格和填料粒径的影响。因为唯一的变量是自动进样器和色谱柱之间连接管路的长度和内径，所以本实验中将柱外体积简化。我们发现，柱外体积的影响取决于色谱柱规格，而不是填料粒径。对于一支 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 的色谱柱来说，额外体积为 $2 \mu\text{L}$ 时柱效即开始降低。此外，我们确认较大的 4.6 mm 内径色谱柱的柱效受范围从 $1.2 \mu\text{L}$ 到 $9.1 \mu\text{L}$ 的柱外体积的影响不明显。数据经过归一化以计算额外系统体积产生的柱效降低的比例，进一步的研究发现， $5 \mu\text{m}$ 色谱柱与相同规格的 $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱具有相似的柱效降低现象 [1]。

本实验中，安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统通过使用安捷伦超低扩散毛细管（0.08 mm 内径），安捷伦超低扩散最大光程卡套式流通池（ $V(\sigma) = 0.6 \mu\text{L}$ ）以及安捷伦液相色谱系统支架改善了最低柱外体积，获得了最佳柱效。由安捷伦 RRLC 测试样品中的一组烷基苯酮展示了等度和梯度性能的改善。色谱柱为 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 。

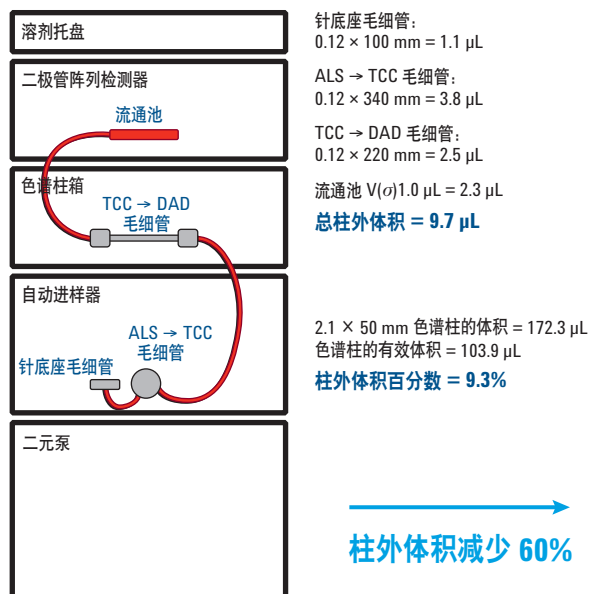
实验条件

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ (部件号 959757-902)
流动相 A	H_2O
流动相 B	CH_3CN
流速	0.4 mL/min (除非另外指明)
梯度程序	等度 (60% B) 或梯度 (1.2 min 内 25 到 95% B, 除非另外指明)
样品	Agilent RRLC 测试样品 (部件号 5188-6529) 标准加入 w/ $50 \mu\text{L}$ 2 mg/mL 硫脲到水/乙腈 (65:35), 进样量 $1\text{-}\mu\text{L}$ 。化合物名称、洗脱顺序, 以及等度和梯度分析的保留因子见表 1
恒温	26°C
色谱柱箱 (TCC)	
二极管阵列检测器 (DAD)	信号 = 254, 4 nm; 参比 = 关闭
系统	安捷伦 1290 Infinity 液相色谱 安捷伦超低扩散毛细管工具包 (部件号 5062-5189) 安捷伦超低扩散最大光程卡套式流通池, $V(\sigma) = 0.6 \mu\text{L}$ (部件号 G4212-60038) 安捷伦液相色谱系统支架 (部件号 5001-3726) MassHunter 版本 B.03.01、B.02.00 和 B.03.01 分别进行数据采集、定性和定量分析

表 1. 等度和梯度分析中所有烷基苯酮化合物的保留因子

化合物	等度 k'	梯度 k'
硫脲	0.0	0.0
乙酰苯胺	0.3	1.3
苯乙酮	0.9	2.4
苯丙酮	1.6	3.1
二苯甲酮	2.6	3.6
苯丁酮	3.0	3.8
苯戊酮	4.2	4.1
己酮	6.8	4.5
庚酮	11.1	4.9
辛酮	18.2	5.3

安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统： 默认堆放和毛细管路配置



安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统： 带液相色谱系统支架和超低扩散的优化配置

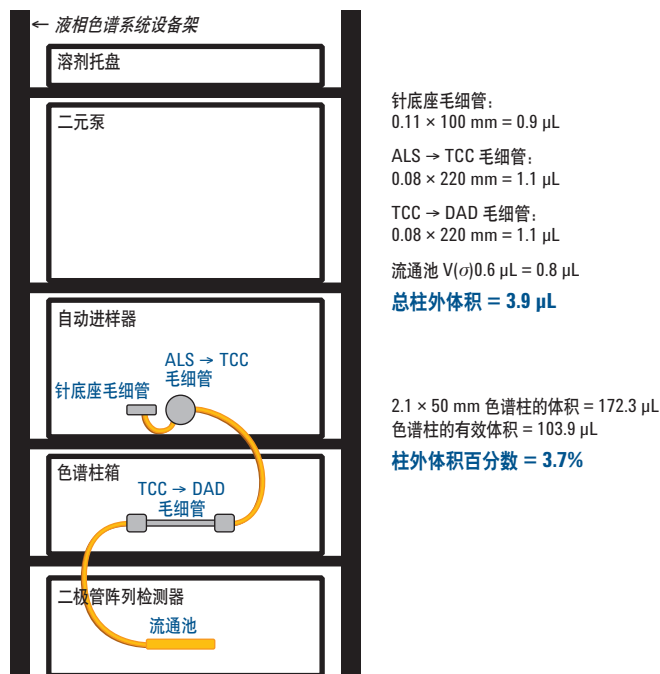


图 1. 安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统不带（左）和带（右）超低扩散优化配置的柱外体积对比

结果和讨论

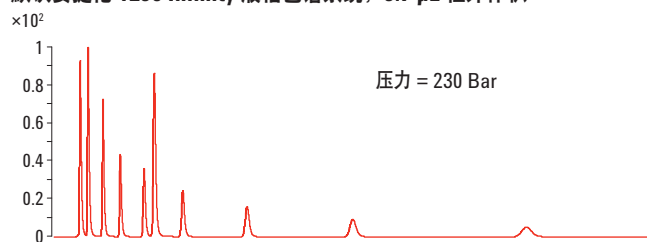
安捷伦超低扩散毛细管工具包中的细内径（0.08 mm 内径）毛细管代替安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统上的 0.12 mm 内径的标准毛细管（ALS $\rightarrow$ TCC 毛细管，TCC $\rightarrow$ DAD 毛细管和针座毛细管 [0.11 mm 内径]）。此外，用 $V(o) = 0.6 \mu\text{L}$ （超低扩散最大光程卡套式）流通池代替 $V(o) = 1.0 \mu\text{L}$ 流通池。进一步使用液相色谱系统支架对系统模块的堆放进行优化。由于二元泵重量大，常规做法是把 1290 液相色谱系统与二元泵堆放在底部，而使用安捷伦

液相色谱系统支架则可以将二元泵安全地放置在支架的顶部（从上到下：溶剂托盘、二元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器），这就使得使用最短连接毛细管成为可能。一段较短的 220 mm 长的毛细管连接自动进样器阀到色谱柱入口（与之相比较，默认系统配置中毛细管长度为 340 mm），同样长度的毛细管 220 mm 连接色谱柱出口到检测器流通池。其结果是从默认 1290 系统配置（9.7 μL ）到优化的系统配置（3.9 μL ）的柱外体积减少了 60%。详细的说明和默认配置与 1290 液相色谱优化配置柱外体积的对比见图 1。

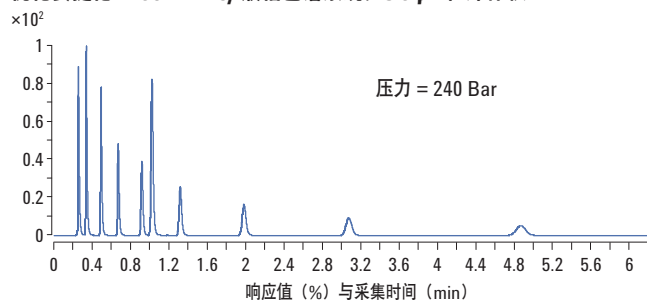
图 2 表明，等度分析中柱外体积减少 60% 时柱效显著地增加了 3-65%。优化后的安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统中分离度增加了 3-39%，其中关键峰对（苯甲酮 [k' = 2.6] 和苯丁酮 [k' = 3.0]）的分离度增加了 18%。早流出色谱峰比晚流出色谱峰受到的影响更大。色谱图下的柱状图表明了优化后液相色谱与默认

液相色谱性能比较中每个峰的半峰宽、柱效和分离度增加的百分数。柱效和分离度是半峰宽的函数，因此整个柱状图中三个值的趋势相同。只需将柱外体积降低 5.8 μL (60%) 即可实现等度分析中色谱性能的这些改善。

默认安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统，9.7 μL 柱外体积



优化安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统，3.9 μL 柱外体积



流动相 A H_2O
 流动相 B CH_3CN
 流速 0.4 mL/min
 等度 60% B
 样品 RRLC 测试样品 (部件号 5188-6529) 标准加入 w/ 50 μL 2 mg/mL 硫脲到水/乙腈中，进样量 1 μL
 TCC 26 $^\circ\text{C}$
 DAD 信号 = 254, 4 nm; 参比 = 关闭
 色谱柱 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.8 μm

- 分析物
1. 硫脲 (死时间标记物)
 2. 乙酰苯胺
 3. 苯乙酮
 4. 苯丙酮
 5. 苯丁酮
 6. 苯甲酮
 7. 苯戊酮
 8. 苯己酮
 9. 苯庚酮
 10. 苯辛酮

等度分析中从默认系统到优化安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统性能增加的百分数 (%)

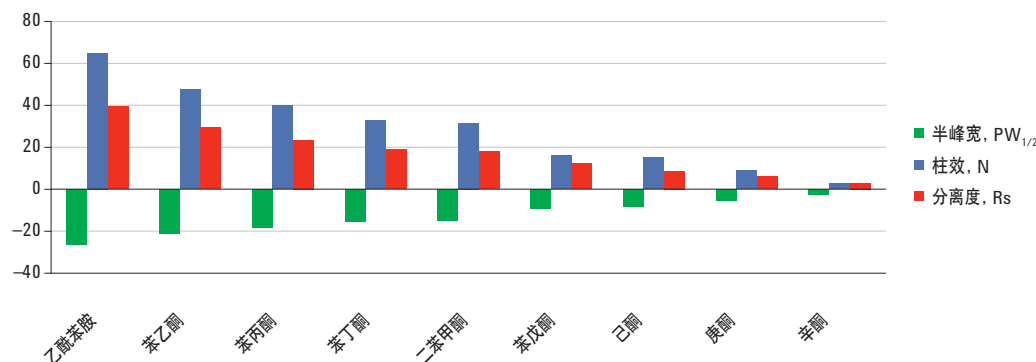


图 2. 液相色谱系统柱外体积减少 60% 对等度分析烷基苯类的影响

液相色谱系统柱外体积减少 60% 对等度分析中柱效增加的百分数 (%)

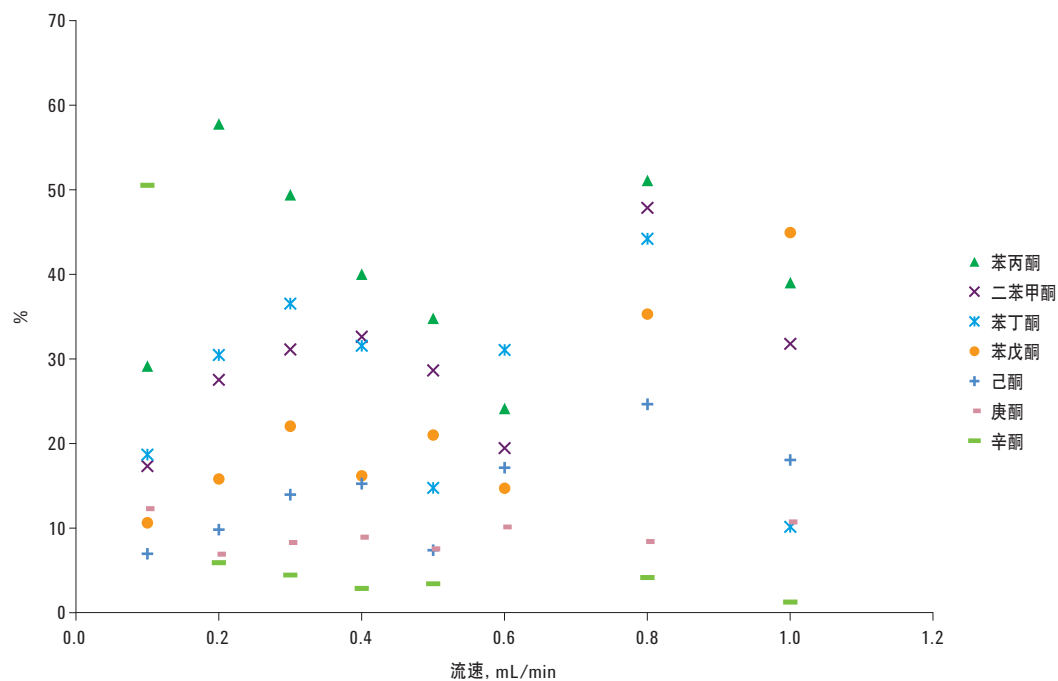


图 3. 散点图展示了等度分析烷基酮类时不同流速下柱外体积对柱效的影响

图 2 显示了 0.4 mL/min 时分析的色谱图和数据。图 3 中的散点图显示了从 0.1 mL/min 到 1 mL/min 分析时柱效增加的百分数。前面两个色谱峰（乙酰苯胺和苯乙酮）保留较差 ($k' < 1$)。这些数据不能代表良好色谱实验，因此从此图中去除。总柱效提高范围为 1% 至 58%（不包括乙酰苯胺和苯乙酮）。相对于色谱柱性能，等度分析时流速对柱外体积影响很小，甚至没有影响。

同样 10 组分混合物的梯度分析如图 4 所示。与图 2 相似，色谱图下的柱状图揭示了与默认配置相同相比的优化的安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统柱效增加的百分数。半峰宽和分离度的趋势相同，因为分离度取决于峰宽。因为柱效一般不作为梯度分析时色谱柱性能的标准，此图使用条件峰容量增加的百分数表示。条件峰容量是梯度时间内理论上可以被分开的峰的个数，因此，也取决于峰宽。见公式 1。

公式 1. 条件峰容量

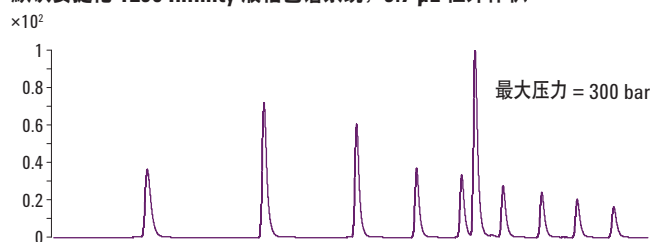
$$\text{条件峰容量} = n_c = \frac{t_{R,n} - t_{R,1}}{W}$$

$t_{R,n}$ 和 $t_{R,1}$: 最后一个色谱峰和第一个色谱峰的保留时间

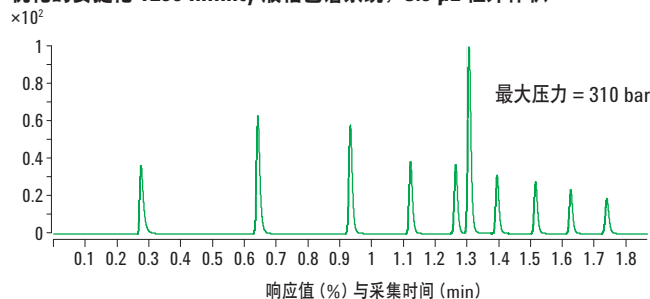
$$W: \frac{\overline{W_{1/2}}}{2.35} \times 4 \quad (4\sigma \text{ 峰宽平均值})$$

$W_{1/2}$ 是半峰宽值

默认安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统, 9.7 μL 柱外体积



优化的安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统, 3.9 μL 柱外体积



流动相 A	H ₂ O
流动相 B	CH ₃ CN
流速	0.4 mL/min
梯度程序	t (min) 0 1.2 %B 25 95
样品	RRLC 测试样品 (部件号 5188-6529) 标准加入 w/ 50 μL 2 mg/mL 硫脲到水/乙腈中, 进样量 1 μL
TCC	26 °C
DAD	信号 = 254, 4 nm; 参比 = 关闭
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.8 μm
分析物	1. 硫脲 (死时间标记物) 2. 乙酰苯胺 3. 苯乙酮 4. 苯丙酮 5. 苯丁酮 6. 苯甲酮 7. 苯戊酮 8. 苯己酮 9. 苯庚酮 10. 苯辛酮

梯度分析中从默认系统到优化安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统性能增加的百分数 (%)

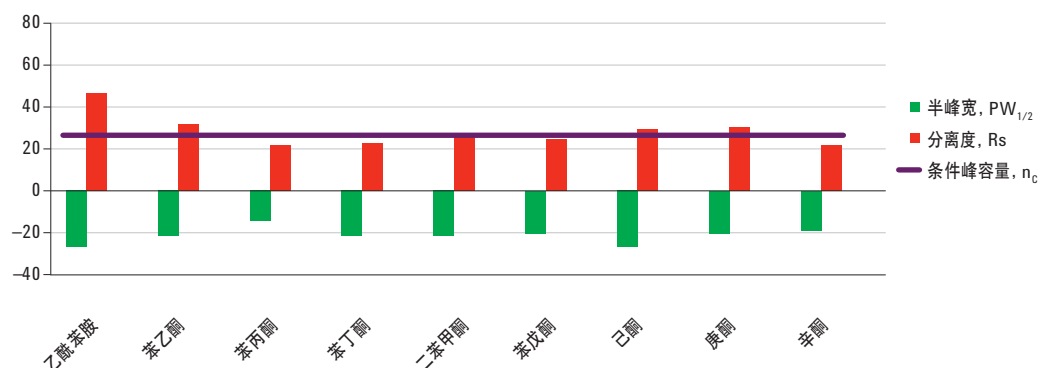


图 4. 液相色谱系统柱外体积减少 60% 对梯度分析烷基苯类的影响

此次梯度分析中液相色谱系统柱外体积减少 60% (5.8 μL) 使得条件峰容量增加了 27%。此外, 由于峰宽较窄, 使得所有峰的分离度均增加了 > 20%, 其中关键峰对 (苯甲酮和苯丁酮) 增加了 27%。

与图 3 相似, 图 5 是一个散点图, 显示了从 0.1 到 1 mL/min 内梯度分析时 (梯度时间根据柱体积进行相应的调整, 以维持各化合物的 k') 分离度和条件峰容量增加的百分数。同样, 第一个色谱峰, 乙醚酰苯胺流出较早, 并且, 与其他八种化合物相比保留值不正常, 因此作为异常值从此图中除去。条件峰容量增加了 24% 到 37%, 而分离度变化较大, 增加的范围从 18% 到 37% (不包括乙醚酰苯胺)。总之, 对于色谱柱性能来说, 快速梯度分析的流速显然对柱外体积的影响较小或者没有影响。

在安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统中使用超低扩散 0.08 mm 内径毛细管时系统压力增加, 如图 2 和 4 所示。本实验中, 观察到的压力差是 10 bar。然而, 如果不使用安捷伦液相色谱系统支架, 并且需要使用更长的 0.08 mm 内径毛细管 (长度与默认配置相同) 时, 系统压力的差别将大于 10 bar。因为这些毛细管可以容易地拆卸, 而且可以再次安装标准的 0.12 mm 内径毛细管, 所以安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统灵活性较大。根据方法的要求不同, 1200 bar 压限的仪器可以兼容小内径的 0.08 mm 内径毛细管以减少样品峰展宽, 也可以再次安装 0.12 mm 内径毛细管并且增加流量以适应更大样品通量的需要。

液相色谱系统柱外体积减少 60% 对梯度分析中分离度和峰容量增加的百分数 (%)

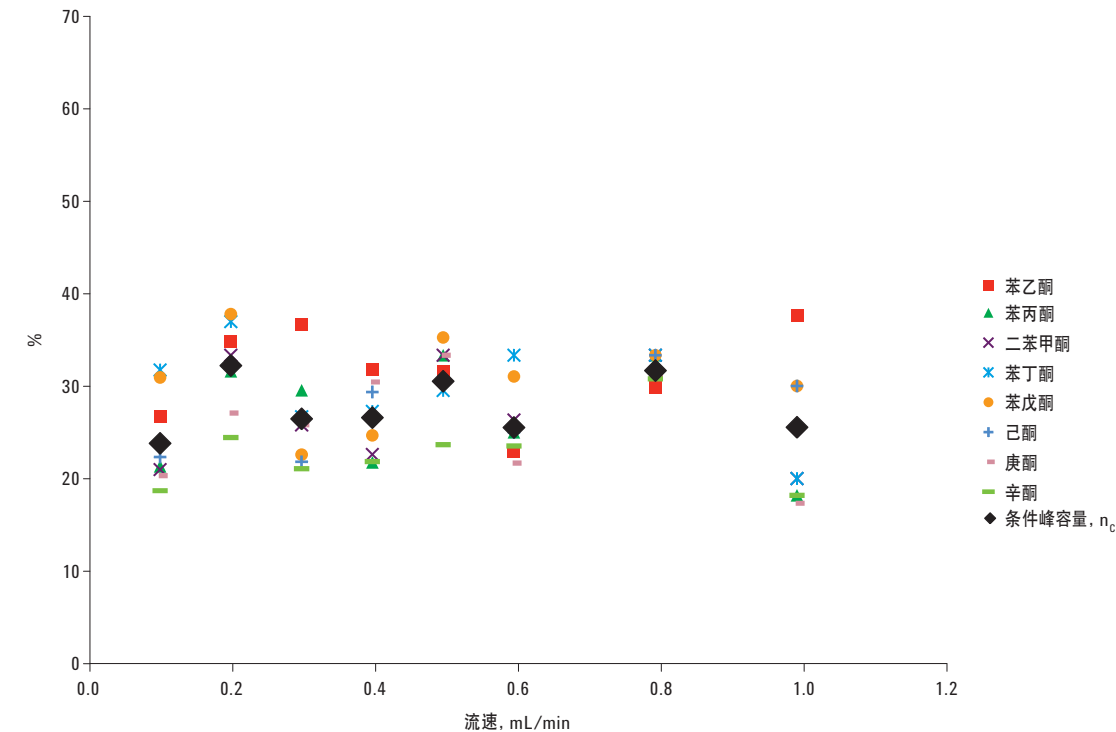


图 5. 散点图展示了梯度分析烷基酮类时不同流速下柱外体积对分离度和条件峰容量的影响

小结

通过使用新型的安捷伦超低扩散毛细管、安捷伦超低扩散最大光程卡套式流通池 ($V(o) = 0.6 \mu\text{L}$) 以及安捷伦液相色谱系统支架, 将安捷伦 1290 Infinity 液相色谱系统柱外体积减少了 60% ($5.8 \mu\text{L}$), 改善了安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, $2.1 \times 50 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱等度和梯度分析时的性能。梯度分析中的条件峰容量增加了 $> 24\%$ 。等度分析的柱效受到的影响更大, 对于保留因子 $k' = 1.6$ 的化合物, 其柱效增加了高达 58%。此外, 无论是增加还是降低流速均不会致使柱外体积影响变差。

参考文献

1. W. Long and A. Mack. Reduce Tubing Volume to Optimize Column Performance (减少管路体积以优化色谱柱性能). Agilent Publication 5990-4964EN. December 11, 2009. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-4964EN.pdf>

更多详细信息

如需了解有关我们产品和服务的更多信息, 请访问我们网站:
www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料中可能存在的错误或由于展示或使用这一材料而带来的直接或间接的损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2012

2011 年 11 月 29 日, 中国印刷

5990-9502CHCN



Agilent Technologies