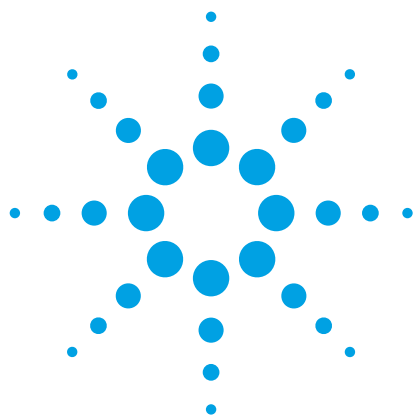




# 使用 Agilent ZORBAX RRHD 色谱柱和 Agilent 1290 Infinity LC 改善沃特世的芳酸分析方法

## 应用简报

食品检测与农业

### 作者

Anne Mack  
安捷伦科技公司

### 摘要

将沃特世的芳酸分析方法转移至配用了 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) Eclipse Plus C18 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity LC 上，未进行额外的方法开发。对 Waters Acquity UPLC 系统中的 Waters Acquity UPLC CSH C18 和 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱进行比较，安捷伦色谱柱的背压低了 10%，且峰形得到改善，对水杨酸的分析尤其如此，采用安捷伦色谱柱所得到的峰形变窄了 48% 且对称度提高 89%。对采用 RRHD 色谱柱的 Waters Acquity UPLC 和 1290 Infinity LC 进行比较，结果表明安捷伦系统比沃特世系统压力低 13%，且峰形变窄 3% 至 9%，分离度提高 7% 至 14%。

### 引言

本应用简报证明了沃特世出版物 [1] 中所述的方法能够充分转移至使用 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱的 1290 Infinity LC 上。该方法展示了使用 Waters Acquity UPLC CSH C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm 色谱柱在 Waters Acquity UPLC 系统上以梯度乙酸/乙腈分离 7 种芳酸的分析过程 [1]。对六种化合物的分析（不适用于 2,4-二氯苯氧基乙酸）可以逐步转移至采用 RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 色谱柱的 1290 Infinity LC 上。与沃特世产品相比，采用安捷伦色谱柱和安捷伦系统能够明显改善分析性能。



**Agilent Technologies**

材料与方法

液相色谱的方法参数尽可能保持一致。表 1 列出了分析条件。所有色谱图均采用 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 修订版 C.01.03 进行分析。所有数据均在一周内采集得到，必要时将消耗品冷冻或冷藏以免发生降解。每天都对色谱柱性能和系统性能进行验证，以确保实验过程中得到的结果具有可比性。

所有芳酸都显示在图 1 中，且粉末状冰乙酸购自 Sigma-Aldrich 公司。乙腈购自 Honeywell International 公司。所用的水为 18 Mohm.cm Milli-Q 超纯水。

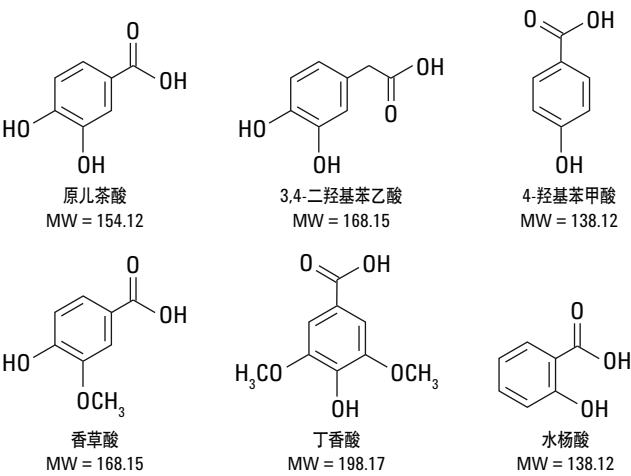


图 1. 芳酸

表 1. 使用 Waters Acquity UPLC 系统和 Agilent 1290 Infinity LC 系统分析芳酸所用的液相色谱方法参数

|      | Waters Acquity UPLC 系统                                                                   | Agilent 1290 Infinity LC 系统                                                                                            |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 色谱柱  | Waters Acquity UPLC CSH C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm<br>(部件号 186005296) , 序列号 01133209515691 | Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm<br>(部件号 959757-902) , 序列号 USDAY06281, 批号 B11188              |
| 流动相  | 0.1% 乙酸, 乙腈                                                                              |                                                                                                                        |
| 梯度   | 时间                                                                                       | %B                                                                                                                     |
|      | 曲线                                                                                       |                                                                                                                        |
|      | 初始                                                                                       | 2                                                                                                                      |
|      | 5.00                                                                                     | 60                                                                                                                     |
|      | 5.50                                                                                     | 60                                                                                                                     |
|      | 5.51                                                                                     | 2                                                                                                                      |
| 6.00 | 2                                                                                        |                                                                                                                        |
| 进样   | 4 μL 0.01 mg/mL 的样品水溶液, 部分样品环 (使用针溢出)                                                    | 4 μL 0.01 mg/mL 的样品水溶液, ADVR 开启                                                                                        |
| 检测   | 280 nm, 4.8 nm 分离度, 20 个点/秒, 快速滤光片时间常数                                                   | 信号 = 280.4 nm; 参比 = 关闭, 狭缝 4 nm, PW > 0.0031 min (响应时间 0.063 秒) 80 Hz                                                  |
| 配置   | 配有 Acquity UPLC PDA 的 Acquity UPLC 系统 (BSM, SM)                                          | 配有超低扩散套件 (5067-5189) 的 G4220A、G4226A、G1316C、G4212A, 超低扩散最大光强卡套式流通池, V(σ) = 0.6 μL (G4212-60038), 液相色谱系统设备架 (5001-3726) |
| 流速   | 0.6 mL/min                                                                               |                                                                                                                        |
| 柱温   | 30 °C                                                                                    |                                                                                                                        |
| 样品   | 单独标样: 原儿茶酸、3,4-二羟基苯乙酸、4-羟基苯乙酸、香草酸、丁香酸、水杨酸均溶于水:乙腈 (5:1), 2,4-二氯苯氧基乙酸不适用                   |                                                                                                                        |
|      | 储备液: 各标样均 1 mL (共 6 mL) , 浓度均为 0.278 mg/mL                                               |                                                                                                                        |
|      | 样品: 0.5 mL 储备液 + 9.5 mL 水, 浓度均为 0.0139 mg/mL                                             |                                                                                                                        |
| 样品   | 1.67 mg/mL                                                                               |                                                                                                                        |

结果与讨论

重复沃特世的芳酸分析方法

在 Waters Acquity UPLC 系统上使用 Waters Acquity UPLC CSH C18 色谱柱重复初始的芳酸分析（图 2 上方色谱图）。保留时间和峰形与公布的结果非常相似 [1]，但原儿茶酸是个例外（峰 1），图 2 中所示的原儿茶酸的谱峰比原始出版物中的谱峰拖尾更严重。与原始结果相比，由于所用样品浓度略高，所以图 2 所示的峰高略有增加。

采用 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱代替 Waters Acquity UPLC 色谱柱

然后在同一 Waters Acquity UPLC 系统上使用相同规格的 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱代替沃特世色谱柱（图 2 下方色谱图），使用相同的样品和流动相来运行同一仪器方法。所有谱峰均得到明显改善（包括峰宽、峰高和峰对称度），而系统压力则降低了 10%。最显著的是水杨酸的谱峰（峰 6）。与 CSH C18 色谱柱相比，水杨酸在 RRHD Eclipse Plus C18 上的谱峰变窄 48% 且对称度提高 89%（对称度沃特世 = 0.36，对称度安捷伦 = 0.68）。采用安捷伦色谱柱还使该芳酸的最低分离度提高了 10%，从 2.76 提高至 3.03。

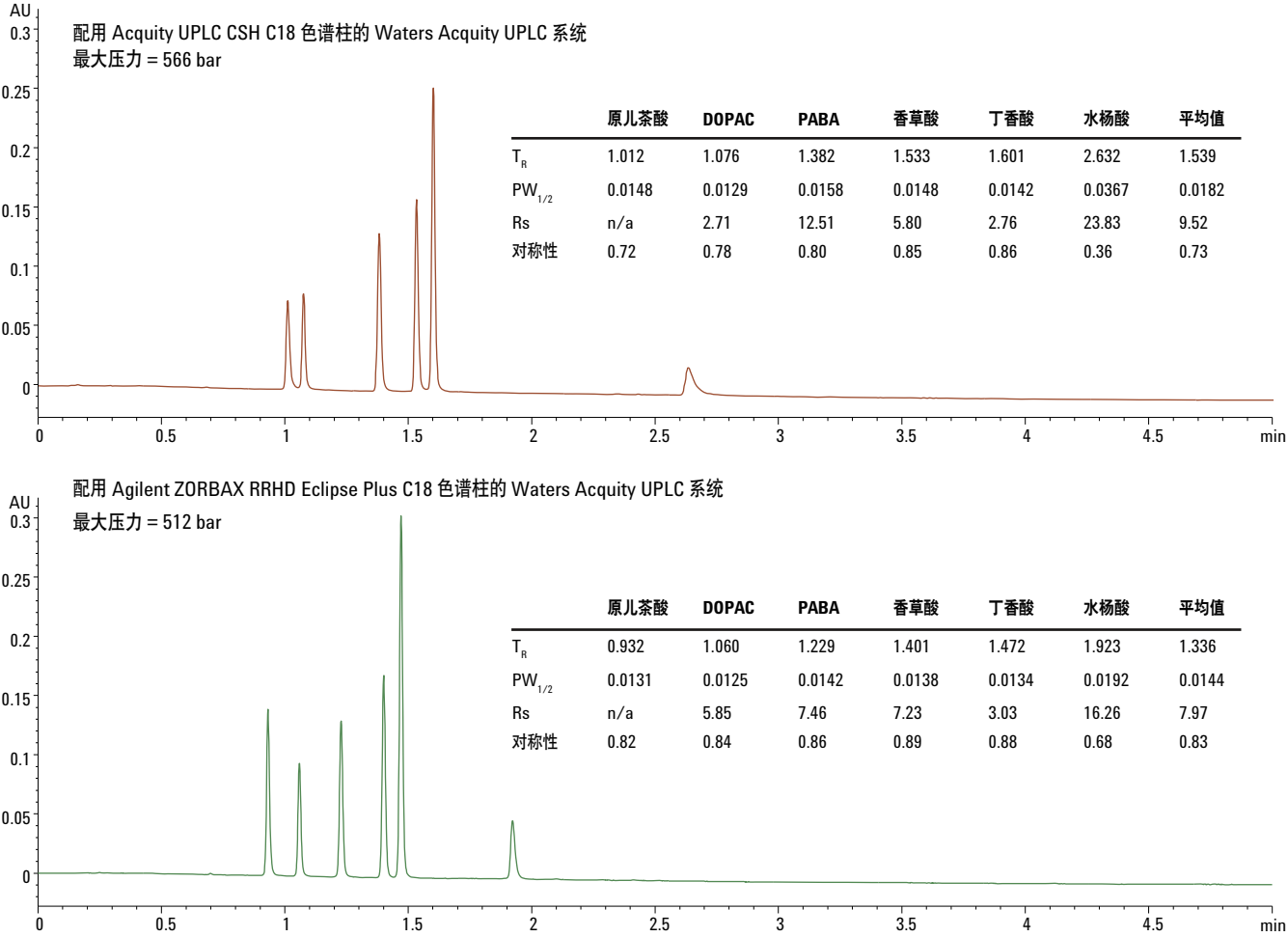


图 2. 在 Waters Acquity UPLC 系统上使用 Waters Acquity UPLC CSH C18 色谱柱（上图）和 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱（下图）得到的芳酸初始分析结果。沃特世色谱柱的性能与公布的结果相近 [1]，但可观察到安捷伦色谱柱显著改善了峰形

### 将 Waters Acquity UPLC 系统转移至 1290 Infinity LC

接下来，将 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱转移至 1290 Infinity LC（采用安捷伦发货时的默认配置）。液相色谱方法参数尽可能保持一致，且使用相同的流动相、样品和色谱柱（图 3 上方色谱图）。与沃特世系统相比，采用安捷伦系统所得到的谱峰都更宽、更短且洗脱时间更晚。但是，安捷伦系统所产生的压力要比沃特世系统低 17%（426 bar 对 512 bar），其原因可能在于安捷伦液相色谱系统的柱外体积和延迟体积更大。

### 优化 1290 Infinity LC 的柱外体积和延迟体积

可轻松对 1290 Infinity LC 进行改进，减小其柱外体积和延迟体积。首先，使用超低扩散 (ULD) 套件以内径 0.075 mm 的毛细柱代替内径 0.12 mm 的标准毛细柱。还安装了超低扩散最大光强卡套式流通池，并采用安捷伦液相色谱系统设备架布置各个模块，使系统所用的毛细柱尽可能最短。结果，ULD 1290 Infinity LC 比默认系统的柱外体积减小了 64%（4  $\mu$ L 对 11  $\mu$ L）[2]。所有色谱峰（图 3 中部色谱图）均明显增高，且变窄 11% 至 16%。由于峰宽得到改善，分离度也提高了 12% 至 24%，峰 4 和峰 5 所示的关键难分离化合物对（香草酸和丁香酸）的分离度提高了 24%，从 2.96 提高至 3.67。

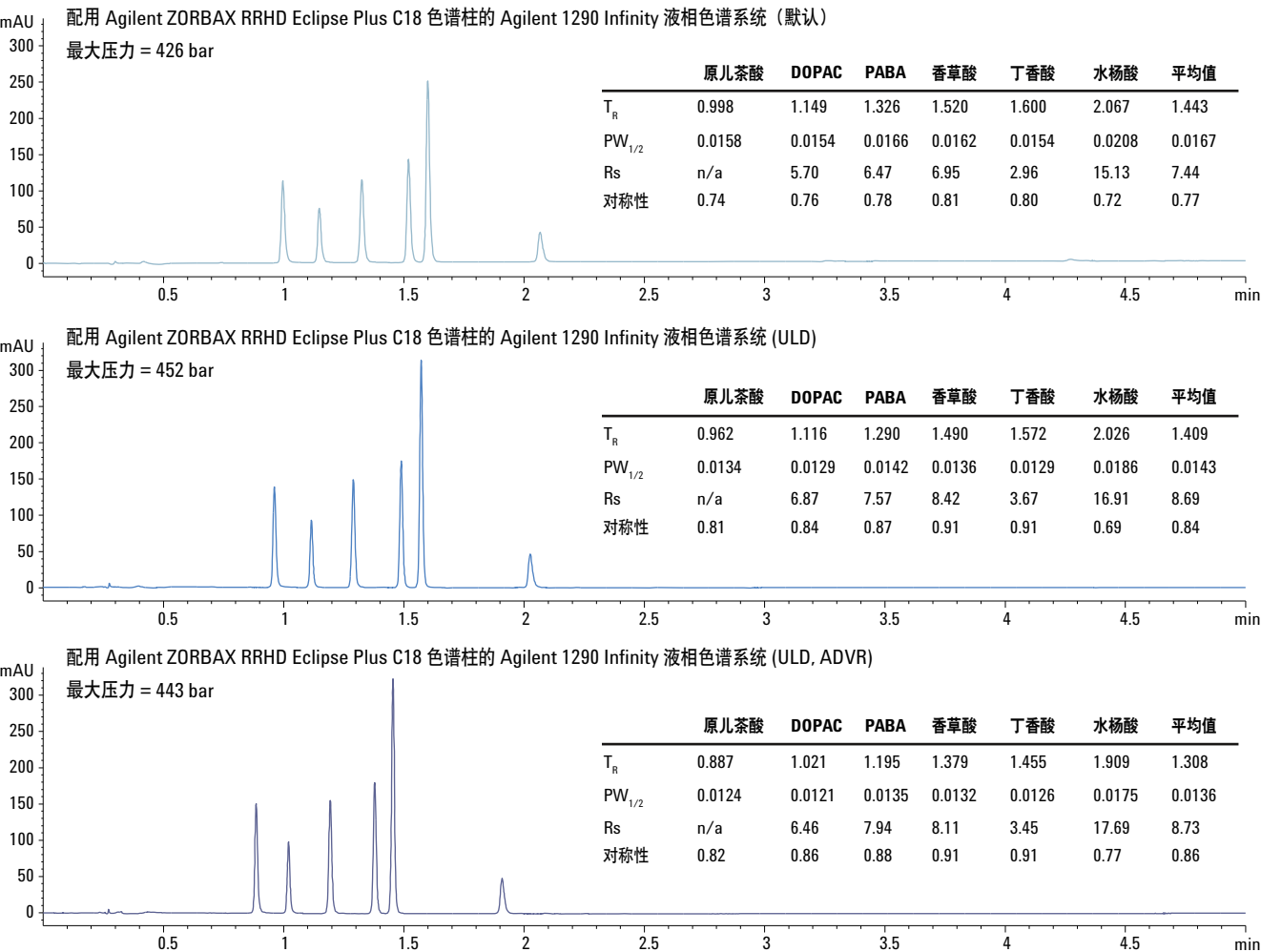


图 3. 在默认配置（上图）、超低扩散配置（中图）和小延迟体积配置（下图）的 Agilent 1290 Infinity LC 上使用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱分析芳酸所得到的结果。减少柱外体积能够锐化色谱峰并提高分离度，而减小延迟体积则能缩短梯度保留时间并进一步改善峰形

另外，对液相色谱方法参数的优化还可减小系统延迟体积。内置于 Agilent 1290 Infinity 自动进样器软件的延迟体积自动减小 (ADVR) 功能可在不进行其他硬件调整的条件下有效地将系统延迟体积减小 63% (从 123  $\mu\text{L}$  减至 49  $\mu\text{L}$ )。ADVR 将改变从自动进样器 (连续冲洗进样针) 到旁路之间的典型流路。此处，在进样后，将样品冲洗到色谱柱上，然后将进样阀从主流路切换至旁路。它移除了梯度流路中的进样针、度量计和相关毛细管，可使流动相更快到达柱头 [3,4]。尽管系统延迟体积对超快速梯度洗脱影响最大，但使用这一经典的芳酸梯度分析方法时仍能获得显著改善 (图 3 下方色谱图)。所有色谱峰的保留时间均缩短 6% 至 9%，对较早洗脱色谱峰的影响比较迟洗脱色谱峰的影响更大。峰宽也略有减小 (2% 至 7%)，其原因可能在于保留时间的缩短。

图 4 示出在 1290 Infinity LC 上使用 ULD 套件和流通池以及 ADVR 功能的效果，显示了体积的改变，可以看出柱外体积和系统延迟体积均有所减小。根据公布的仪器性能指标来看，标准 Waters Acquity UPLC 系统的延迟体积约为 120  $\mu\text{L}$ ，而系统的谱带展宽 (柱外体积) 还未报道 [5]。据报道，从沃特世低扩散 Acquity UPLC I-Class 的仪器性能指标可看出系统延迟体积约为 100  $\mu\text{L}$ ，而系统谱带展宽为 6  $\mu\text{L}$  至 9  $\mu\text{L}$  [6]。本实验中采用的是 Waters Acquity UPLC 系统，但图 4 所示的体积数据表明优化后的 1290 Infinity LC 比优化后的 Waters Acquity UPLC I-Class 系统具有更小的柱外体积和延迟体积 (分别为 4  $\mu\text{L}$  和 49  $\mu\text{L}$ )。

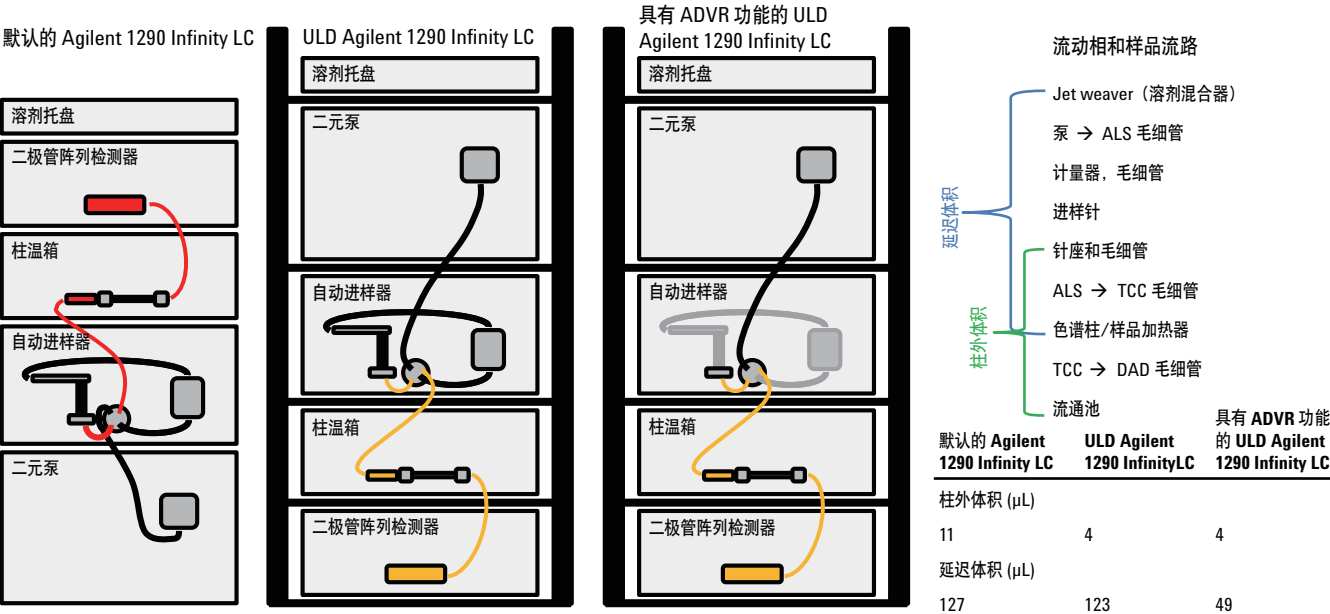


图 4. 三种配置的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统：默认配置 (左图)、超低扩散配置 (中图) 和低延迟体积配置 (右图)。这些系统改变对柱外体积和延迟体积的影响见图示下方的表格

<sup>1</sup> 这些体积代表了针对这一特定分析定制的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的体积。可根据其他分析所提出的仪器要求来对液相色谱系统体积进行更多改进。

使用 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱，对优化的 1290 Infinity LC（图 3 下方色谱图）与标准 Waters Acquity UPLC（图 2 下方色谱图）分析芳酸的结果进行了比较。安捷伦系统较低的柱外体积和延迟体积能使保留时间缩短 1% 至 5%，峰宽变窄 3% 至 9%。分离度提高 7% 至 14%，且关键难分离化合物对的分离度提高了 14%，从 3.03 提高至 3.45。尽管对安捷伦系统的优化是以提高系统压力为代价（优化系统的压力比默认系统高 4%），但 1290 Infinity LC 所产生的压力仍然比沃特世液相色谱要低（443 bar 对 512 bar，降低 13%），使用户能够更灵活地增加流速和色谱柱长度。1290 Infinity LC 具有更高的灵活性，可完全移出优化设置，且在分析需要更高的压力灵活性时，可以很方便地部分或完全重新安装原来的毛细柱。

### 对新转移的安捷伦分析与沃特世分析进行比较

与在 Waters Acquity UPLC 系统上使用 Waters Acquity UPLC CSH C18 色谱柱所进行的初始分析相比，使用配备 RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱的 1290 Infinity LC 所得到的结果证明已完全实现了方法转移（图 5）。对于芳酸分析，安捷伦解决方案比沃特世解决方案的系统压力低 22%（556 bar 对 443 bar）。安捷伦解决方案还可获得窄化 6% 至 52% 的色谱峰，且谱峰对称度提高了 6% 至 114%；在两种方案中，对水杨酸（峰 6）分析的改善最显著，对称度由 0.36 提高至 0.77。采用安捷伦系统和色谱柱解决方案还将所有色谱峰的分离度都提高了 25% 以上。

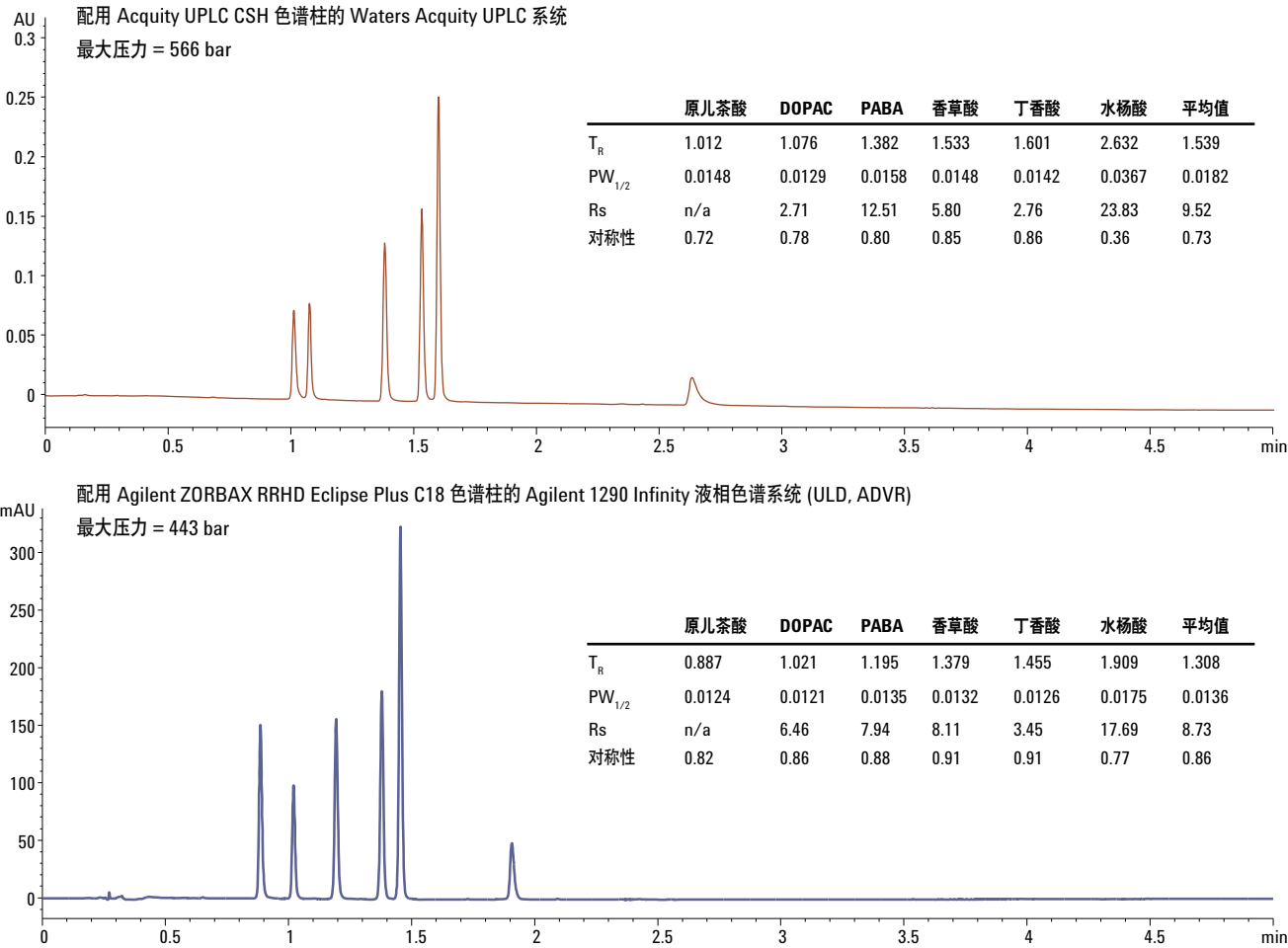


图 5. 在配用沃特世色谱柱的沃特世液相色谱系统上得到的初始芳酸分析结果如图 2（上图）所示，同一分析在配用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统上获得了改善（图 3）（下图）。可将该分析方法转移至安捷伦解决方案，使沃特世解决方案得以改善；所有色谱峰都更加尖锐、对称。最低分离度也得到了提高。

## 结论

沃特世出版物中所述的芳酸分析方法可被轻松转移至配用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity LC 上。在未做任何额外方法开发的情况下，安捷伦色谱柱及安捷伦系统均表现出优于沃特世产品的分析性能。

## 参考文献

1. 沃特世，CSH 技术：Acquity CSH 色谱柱应用报告，沃特世公司，出版号 720003537EN (2010)
2. A. Mack., “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，安捷伦科技公司，出版号 5990-9502CHCN (2012)
3. 安捷伦，Agilent 1290 Infinity 自动进样器，用户手册，安捷伦科技公司，部件号 G4226-90001 (2012)
4. 安捷伦，“Performance Characteristic of the Agilent 1290 Infinity Binary Pump” (Agilent 1290 Infinity 二元泵的性能特性)，技术概览，安捷伦科技公司，出版号 5990-4536EN (2009)
5. 沃特世，Acquity UPLC 系统：仪器性能指标，沃特世公司，出版号 720000900EN (2009)
6. 沃特世，Acquity UPLC I-Class 系统 (AM-FTN)：仪器性能指标，沃特世公司，出版号 720003948EN (2012)

## 如需更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接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（中国）有限公司，2012

中国印刷

2012 年 12 月 21 日

5991-1681CHCN



**Agilent Technologies**