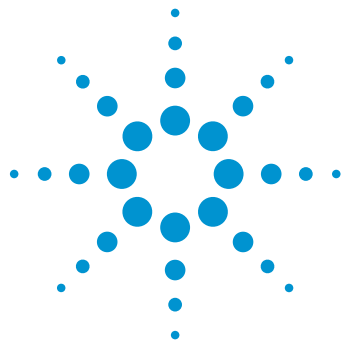




改善芳香酸分析：利用 1.9 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱显著节省时间、溶剂、样品和费用

应用简报

农药、食品检测、小分子药物

作者

Anne Mack
安捷伦科技公司
Wilmington, DE, USA

摘要

本研究使用甲酸和乙腈梯度对六种芳香酸进行了分析。评估了四种色谱柱在该分离中的性能。原始分析采用 $4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ 全多孔颗粒 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱，并与规格为 $2.1 \times 50 \text{ mm}$ 的 1.9、2.7 和 $4 \mu\text{m}$ 表面多孔颗粒填料 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱进行比较。所有色谱柱具有相似的选择性，色谱柱间的比较无需进行方法开发。所有色谱柱均成功分离了芳香酸，最小分离度为 1.8。与较长的 $5 \mu\text{m}$ 色谱柱相比，较短的 $1.9 \mu\text{m}$ InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱能够提供更出色的最小分离度（2.9 对比 2.4）、分析速度提高 12 倍，而所用的流动相减少 96% 且样品量减少 75%。进一步的方法改进表明， $1.9 \mu\text{m}$ InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱甚至能够以更快的速度完全分离这六种芳香酸，分析时间仅为 0.35 分钟，在分离速度比原始分析快 103 倍的情况下，最小分离度达到 2.3。



Agilent Technologies

前言

表面多孔颗粒填料液相色谱柱是液相色谱中的一种常用工具。与相应的全多孔颗粒色谱柱相比，表面多孔颗粒色谱柱能够在更低的压力下获得高效率¹。这主要是由于色谱柱的颗粒中缩短的传质距离和显著变窄的粒径分布²。当前表面多孔颗粒填料的发展趋势是通过减小粒径进一步提高效率。更高的效率可用于通过提高分离度和灵敏度加快分析速度或改善结果。

在安捷伦液相色谱柱系列产品中，已完成了大量有助于轻松实现方法可转换性和可扩展性的工作。全多孔颗粒 Agilent ZORBAX 和表面多孔颗粒 Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱的固定相化学性质相似，因此无需进一步的方法开发即可轻松更新方法³。

本研究展示了较小的 Poroshell 颗粒与传统 5 µm 分析相比能够如何改善芳香酸的分离。证明采用 Poroshell 色谱柱可节省大量的时间、溶剂、样品和费用。

实验部分

该实验使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统。该系统在其标准配置的基础上进行了改进，具有较低的系统体积和扩散性。表 1 列出了用于本实验的配置详细信息以及四种安捷伦液相色谱柱。

表 2 列出了所有分析采用的液相色谱方法参数。除快速 1.9 µm 分析以外，所有方法均按照色谱柱体积进行几何缩放，以保持色谱柱之间的色谱分离特性。

表 1. UHPLC 系统配置

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统配置	
Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)	35 µL 溶剂混合器: Agilent Jet Weaver, 35 µL/100 µL (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)	超低扩散针座组件, 用于 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226-87030) 自动进样器至加热器: 不锈钢毛细管, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784) 螺纹口样品瓶, 棕色, 带书写签, 经过认证, 2 mL, 100/包 (5182-0716) 蓝色螺口盖, 带 PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包 (5182-0717) 样品瓶内插管, 250 µL, 玻璃, 带聚合物支脚, 100/包 (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	低扩散双热交换器, 1.6 µL (G1316-60005) 加热器至色谱柱: InfinityLab Quick Connect 快速连接组件, 105 mm, 0.075 mm (5067-5961) 色谱柱至流通池: 不锈钢毛细管, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)	安捷伦超低扩散最大光强卡套式流通池, 10 mm (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版本, 修订版 C.01.05 [35]	G4220A: B.06.53 [0013] G4226A: A.06.50 [003] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.53 [0013]
安捷伦液相色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm (959990-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm (699675-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm (699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 4 µm (699770-902)

表 2. UHPLC 方法参数

色谱柱	流动相	流速 (mL/min)	梯度	进样量 (µL)	样品	柱温箱 (°C)	二极管阵列检测器
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm	A) 0.2% 甲酸水溶液	1.0	36 分钟内 B 由 8% 变为 35%	20	原儿茶酸、3,4-二羟基苯乙酸 (DOPAC)、4-氨基苯甲酸 (PABA)、香草酸、丁酸、水杨酸各 0.01 mg/mL, 溶于水中	25	280 nm, 80 Hz
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm	B) 乙腈	0.5	3 分钟内 B 由 8% 变为 35%	5	化合物按洗脱顺序列出, 结构如图 1 所示。	60	280 nm, 160 Hz
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm							
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 4 µm							
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm (快速)		2.2	0.3 分钟内 B 由 8% 变为 26%				

本研究中分析了六种芳香酸；它们的结构如图 1 所示。这些化合物中的每一种以及甲酸流动相改性剂均购自 Sigma-Aldrich。乙腈购自 Honeywell (Burdick and Jackson)。水经过 Milli-Q 系统 (Millipore) 0.2 μm 滤膜过滤，电阻率为 18 MW。

结果与讨论

六种芳香酸的原始分离采用 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm 全多孔颗粒 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱进行验证。该分离在 36 分钟内完成，最小分离度为 2.4，结果如图 2 所示。图 2 还显示了同一液相色谱方法被转移至 2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μm 表面多孔颗粒 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱后获得的结果。ZORBAX Eclipse Plus C18 和 Poroshell 120 EC-C18 具有相似的化学键合相，可提供相关性较高的总体选择性，因此无需改变方法。然而，由于这些色谱柱具有不同的尺寸，因此在较小的色谱柱体积下对梯度、流速和进样量进行几何缩放。还提高了 1.9 μm Poroshell 色谱柱的流速，使该小颗粒色谱柱在最佳流速下运行。所获得色谱图的速度提高了 12 倍，所用的流动相减少了 96%，进样量减少了 75%，同时仍可保持 2.9 的最小分离度。

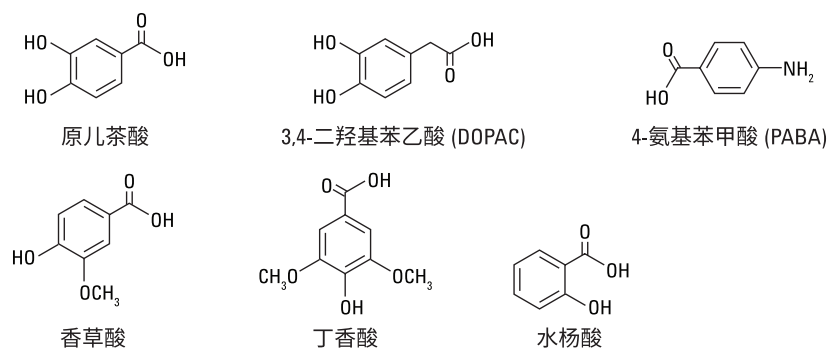


图 1. 目标化合物

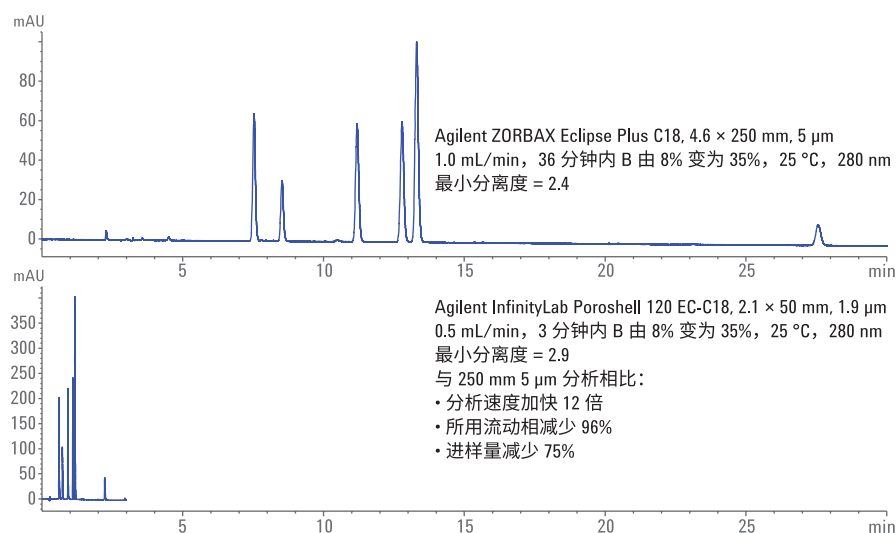


图 2. 通过转移至高性能 50 mm, 1.9 μm Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱改善了 250 mm, 5 μm Agilent ZORBAX 对芳香酸的分析；最小分离度得到提高，同时节省了大量的时间、样品、溶剂和费用

1.9 μm Poroshell 分析产生的压力为 472 bar。根据仪器压力指标不同，这一压力可能是一些分析人员无法接受的。在 Agilent Poroshell 120 系列中，有三种粒径可供选择：1.9、2.7 和 4 μm 。三种粒径不同的色谱柱采用相同的键合相，可轻松实现方法转移。图 3 表明所有三种粒径色谱柱对于该芳香酸分离具有相同的选择性；所有方法参数均相同。随着粒径的增加，压力有所下降。然而，采用较大粒径色谱柱的代价是分离度和峰容量的下降。在这种情况下，分析人员应根据他们是否受限于现有仪器的操作压力或者是否寻求最佳分离度来选择最适合其需求的色谱柱。

使用小粒径表面多孔填料的优点在于它们可提供高效率和高分离度。如果液相色谱系统耐受压力允许，这一高性能可用于运行超快速分析。在图 4 中，1.9 μm Poroshell 色谱柱已达到极限。使用高温以减小流动相粘性，由此使流速可以提高至 2.2 mL/min，产生 1150 bar 的压力。还对先前方法所用的梯度进行了微调，确保采用该色谱柱对这一芳香酸样品实现尽可能最快的分离。结果是所有六种化合物在 0.35 分钟内得到分离，且最小分离度为 2.3。与 250 mm, 5 μm Eclipse Plus 方法相比，该分析的速度提高了 103 倍，并且使用的流动相减少了 98%，同时保持了最小分离度。

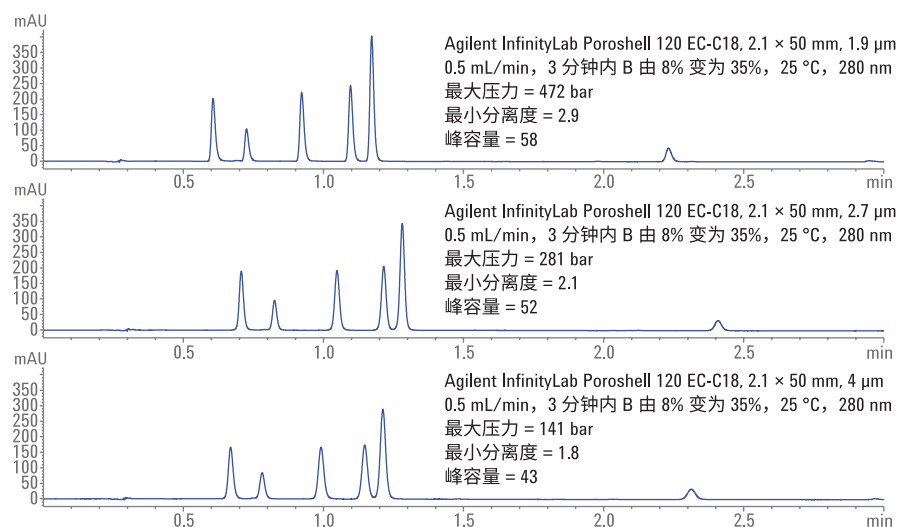


图 3. Agilent InfinityLab Poroshell 粒径之间具有相似的选择性，使分析人员能够根据仪器耐受压力限制或方法性能要求来选择色谱柱配置，无需进行额外的方法开发

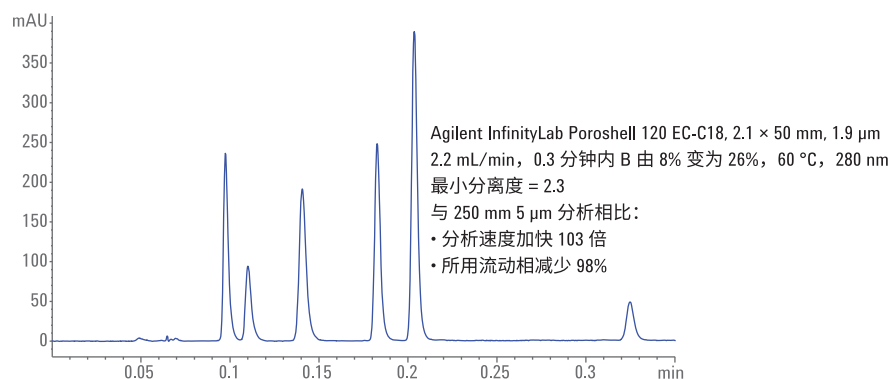


图 4. 使高性能 50 mm, 1.9 μm Agilent InfinityLab Poroshell 色谱柱在接近其压力限制下运行时可节省更多的时间、溶解和费用，且不影响方法性能

表 3 显示了所有色谱结果的汇总和比较。

表 3. 采用不同液相色谱柱分析芳香酸所得结果的比较

色谱柱	压力 (bar)	最小分离度	条件峰容量 (nC)	分析时间 (min)	流动相消耗量 (mL)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm	193	2.4	88	36 原始 5 µm 分析	36 原始 5 µm 分析
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm	472	2.9	58	3.0 比原始 5 µm 分析快 12 倍	1.5 所用的流动相比原始 5 µm 分析减少 96%
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm	281	2.1	52		
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 4 µm	141	1.8	43		
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm (超快速)	1150	2.3	37	0.35 比原始 5 µm 分析快 103 倍	0.77 所用的流动相比原始 5 µm 分析减少 98%

结论

高效 1.9 µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱可用于改善采用传统色谱柱（如 5 µm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18）的现有方法。Poroshell 和 ZORBAX 系列产品具有相似的键合相化学性质，因此可轻松实现方法转移，通常无需额外的方法开发。对液相色谱系统耐受压力而言，如果 1.9 µm 颗粒色谱柱产生的压力过高，还可以采用 Agilent Poroshell 120, 2.7 和 4 µm 颗粒色谱柱以提供相同的选择性。然而，当液相色谱系统耐受压力允许时，1.9 µm Poroshell 色谱柱可达到极限以完成超快速分离，此时与传统液相色谱柱相比，将节省大量的时间、溶剂、样品和费用。

参考文献

1. Gratzfield-Hugsen, A.; Naegele, E.
使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120
色谱柱最大程度提高柱效, 安捷伦
科技公司应用简报, 出版号
5990-5602CHCN, **2016**
2. Meyer, V. R. In *Practical High
Performance Liquid Chromatography*.
Fourth Edition, Wiley:2004; p. 34
3. Transfer of Methods between
Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX
Eclipse Plus C18 Columns (Poroshell
120 EC-C18 和 ZORBAX Eclipse Plus
C18 色谱柱之间的方法转移),
安捷伦科技公司应用简报,
出版号 5990-6588EN, **2011**

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 11 月 1 日, 中国出版
5991-7518CHCN



Agilent Technologies