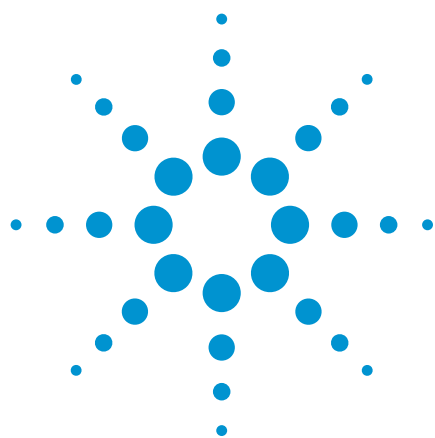




优化仪器、方法和样品，以发挥 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 1.9 μm 色谱柱的最大潜能

应用简报

整体分析

作者

Anne Mack
安捷伦科技公司

摘要

通过对六种化合物进行等度洗脱分析，来验证仪器、方法和样品这几个变量对色谱柱性能的影响。在本研究中使用的是高效 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μm 色谱柱，其能够产生接近 14000 的塔板数。主要研究了系统毛细管、检测器流通池、数据采集速率、进样量、样品溶剂和样品浓度对色谱柱性能的影响。



Agilent Technologies

前言

表面多孔颗粒填料液相色谱柱是液相色谱领域常用的工具。与对应的全多孔颗粒色谱柱相比，这种色谱柱能够在较低压力下获得较高柱效 [1]。这主要是由于该色谱柱的传质距离更短并且填料颗粒的粒径分布明显更窄 [2]。表面多孔颗粒填料的当前趋势是通过不断缩小填料粒径实现柱效的进一步提高。更高的柱效能够加快分析速度并改善分析结果，分离度和灵敏度均有明显提高。

由于孔径较大（内径为 4.6 mm 或 3 mm）的色谱柱需要更快的流速才能达到等效的线性流速，因此与其相比，填充有细小颗粒的小尺寸液相色谱柱的分析速度更快、分离度更出色，从而提高了分析效率，并且减少了溶剂使用量，而且对液相色谱/质谱和蒸发光散射检测均表现出更好的兼容性。只需将内径较大的色谱柱更换为内径较小的色谱柱，便可获得这些益处。但要充分利用小尺寸色谱柱，必须对液相色谱仪器、方法和样品都进行优化。

以往有研究表明，柱外体积对各种色谱柱尺寸和填料粒径有影响。在本实验中，唯一的变量是自动进样器和色谱柱之间的连接毛细管的直径和长度，因此对柱外体积进行了简化。我们的分析表明，柱外体积的影响取决于色谱柱尺寸，但与填料粒径无关。但在细小颗粒色谱柱

中，柱外体积的影响会更加明显。就 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱而言，当柱外体积仅为 $2 \mu\text{L}$ 时，柱效便开始降低。另外，我们发现，即使柱外体积在 $1.2\text{-}9.1 \mu\text{L}$ 的范围内，都不会对内径较大 (4.6 mm) 的色谱柱产生显著影响。进一步的研究表明，当将数据归一化以说明柱效百分比降低与系统柱外体积之间的关系时， $5 \mu\text{m}$ 色谱柱的柱效降低程度与相同尺寸的 $1.8 \mu\text{m}$ 色谱柱相似 [3]。

最后，证明了使用小尺寸的全多孔亚 $2 \mu\text{m}$ 颗粒色谱柱可减少液相色谱系统体积这一影响 [4-5]。本研究包括对与高效表面多孔 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, $1.9 \mu\text{m}$ 色谱柱配套使用的液相色谱仪器、方法和样品进行优化。

实验

本实验采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统。表 1 示出了配置详情。对于部分实验，仪器配置在此基础上有所修改。在整个研究中，在必要和适当的时候提供了该配置信息。本实验中还使用了一根安捷伦液相色谱柱，其具体信息在表 1 中列出。

大部分分析的液相色谱方法参数在表 2 中示出。在整个研究进行的几个实验中，将改变某个参数来验证其对色谱分析的影响，修改的地方会对数据加以标记。

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 μ L 溶剂混合器: Jet Weaver, 35 μ L/100 μ L (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)	针座组件, 超低扩散, 用于 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226-87030) 自动进样器与加热器: 不锈钢毛细管, 0.075 $\times$ 220 mm, SV/SLV (5067-4784) 样品瓶, 螺口盖, 棕色, 带书写签, 经认证, 2 mL, 100/包 (5182-0716) 螺口盖, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包 (5182-0717) 样品瓶内插管, 250 μ L, 玻璃, 带聚合物支脚, 100/包 (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	双热交换器, 低扩散, 1.6 μ L, (G1316-60005) 加热器与色谱柱: Agilent InfinityLab 快速连接组件, 105 mm, 0.075 mm (5067-5961) 色谱柱与流通池: 不锈钢毛细管, 0.075 $\times$ 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)	Agilent 超低扩散最大光强卡套式流通池, 10 mm (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版修订版 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 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μ m (699675-902)
除非另有说明, 否则所有分析均使用上述仪器配置。	

表 2. UHPLC 方法参数

色谱柱	流动相	流速 (mL/min)	洗脱	进样量 (μ L)	样品	柱温箱 ($^{\circ}$ C)	二极管阵列 检测器
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μ m	20 mM 磷酸钠水溶液, pH 7, 与乙腈以 40/60 预混合	0.5	等度	0.5	尿嘧啶、对羟基苯甲酸丁酯、阿米替林、萘、邻苯二甲酸二丙酯、萘 详细信息见表 3	25	254 nm, 80 Hz

除非另有说明, 否则所有分析均使用上述方法参数。

本研究对表 3 所示的六种化合物进行了分析。除非另有说明, 否则测试标样按照表 3 中的浓度制备。所有分析物均购自 Sigma-Aldrich。磷酸钠也购自 Sigma-Aldrich。乙腈购自 Honeywell (Burdick and Jackson)。水经 Milli-Q 系统 (Millipore) 0.2 μ m 滤膜过滤, 电阻率 18 M Ω 。

表 3. 样品信息

化合物	分类	在流动相中的浓度	保留因子 (k')
尿嘧啶	空白标记	n/a	n/a
对羟基苯甲酸丁酯	弱酸	0.05 mg/mL	1.3
阿米替林	碱	0.25 mg/mL	2.2
萘	中性	0.25 mg/mL	3.3
邻苯二甲酸二丙酯	极性中性	0.5 mg/mL	3.8
萘	中性	0.5 mg/mL	6.1

除非另有说明, 否则所有分析均使用上述样品。

结果与讨论

除非另有说明，否则所有优化实验均使用相同的标准、方法和系统完成。对于每个实验，一次改变一个变量，以验证该项参数对 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 μm 色谱柱的效率的影响。每个实验中都说明了对羟基苯甲酸丁酯 (k' = 1.3)、萘 (k' = 3.3) 和 芴 (k' = 6.1) 的柱效，以表明对早期、中期和晚期洗脱化合物的影响。

仪器优化

小体积的仪器配置应与小体积的色谱柱配套使用。分两个步骤对 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪的系统体积进行了优化。首先，将内径为 0.12 mm 的标准红色毛细管替换为内径为 0.08 mm 的黑色毛细管。其次，将 1.0 μL 的标准流通池替换为 0.6 μL 的流通池。表 4 示出了系统配置差异的详细信息。图 1 示出了结果。从图 1A 中可以看出，当毛细管体积减小时，观察到所有峰的保留时间都出现较小漂移。当流通池体积减小时，所有峰都变高、变窄且更加高效。柱效值在图 1B 中绘出。系统体积对早期洗脱化合物影响较大。毛细管和流通池二者都对液相色谱的系统体积有很大影响。因此，这两个因素都可以单独影响小体积高效色谱柱如 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 μm 的性能。

本研究的后续实验使用了较小的液相色谱系统体积配置，见表 4。

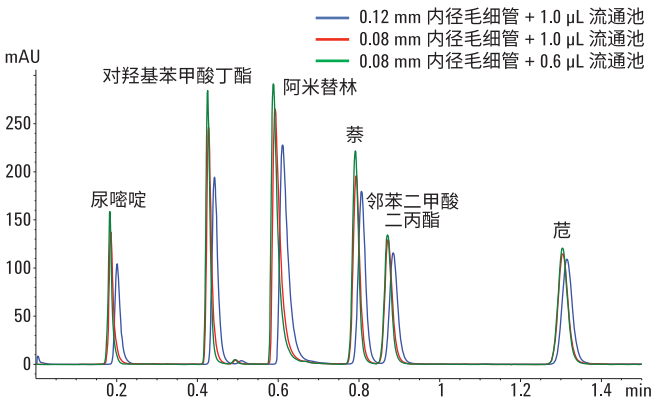


图 1A. 使用内径较小的毛细管和体积较小的检测器流通池减小了液相色谱系统体积，从而提高了 Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱的性能

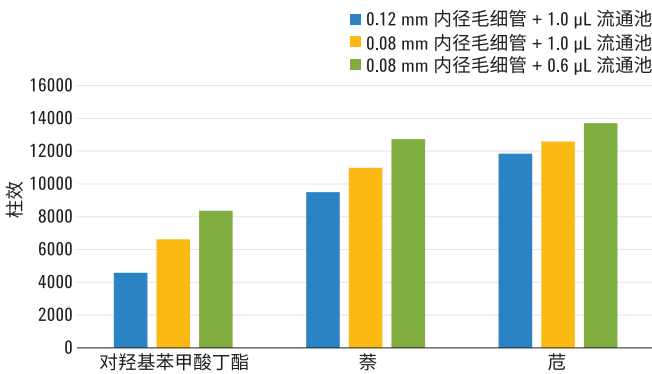


图 1B. 使用内径较小的毛细管和体积较小的检测器流通池减小了液相色谱系统体积，从而提高了 Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱的性能

表 4. 有关毛细管和流通池的仪器修改比较

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统配置修改	更大的系统体积	更小的系统体积
Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)	自动进样器与加热器：不锈钢毛细管，0.12 × 340 mm (5067-4659)	自动进样器与加热器：不锈钢毛细管，0.075 × 220 mm，SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	双热交换器，低扩散，1.6 μL，(G1316-60005) 加热器与色谱柱：Agilent InfinityLab 快速连接组件，105 mm，0.075 mm (5067-5961) 色谱柱与流通池：不锈钢毛细管，0.12 × 340 mm (5067-4659)	热交换器，低扩散，1.0 μL，长型，朝下 (G1316-80012) 加热器与色谱柱：Agilent InfinityLab Quick-Turn 接头 (5067-5966) 色谱柱与流通池：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)	Agilent 标准最大光强卡套式流通池，1.0 μL，10 mm (G4212-60008)	Agilent 超低扩散最大光强卡套式流通池，0.6 μL，10 mm (G4212-60038)

方法优化

在优化了液相色谱系统的硬件之后，还应考虑对方法进行优化。当涉及到高效率色谱柱如 1.9 μm InfinityLab Poroshell 时，通常需要探讨检测器的数据采集速率及其对色谱柱性能的影响。数据采集速率是指仪器在整个分析过程中进行测量的频率。在色谱峰中测量足够数量的数据点是至关重要的，这样才能准确反映色谱柱的效率。数据点太少会显示人为因素造成的宽峰，例如图 2A 中的对羟基苯甲酸丁酯。在本例中，我们测试了二极管阵列检测器的数据采集速率，但如果其他液相色谱检测器用于本方法中，也需要设定其采样速率。需要注意的是，ChemStation 中的默认方法将二极管阵列检测器的数据采集速率设定为 2.5 Hz，当建立适用于 1.9 μm Poroshell 色谱柱的新方法时，必须提高数据采集速率，才能反映色谱柱的性能。根据图 2B，本方法应使用至少 40 Hz 的速率，但数据采集速率越高，可能会增加基线噪声并降低方法灵敏度。

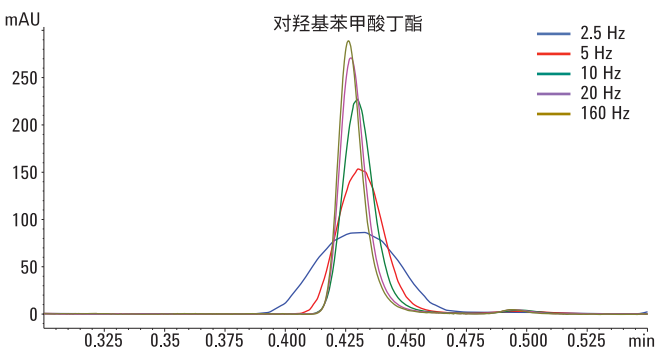


图 2A. Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱必须使用较高数据采集速率，才能准确测量色谱柱的效率，对于早期洗脱化合物如对羟基苯甲酸丁酯 ($k' = 1.3$) 尤其如此

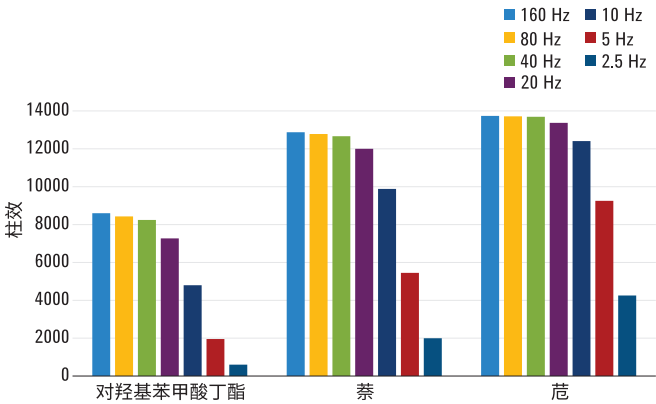


图 2B. Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱必须使用较高数据采集速率，才能准确测量色谱柱的效率，对于早期洗脱化合物如对羟基苯甲酸丁酯 ($k' = 1.3$) 尤其如此

可用于优化小体积色谱柱性能的另一个方法参数是进样量。进样量可与整个系统体积一起考虑，而且在适于分析的情况下应保持尽可能小。图 3A 示出了进样量对色谱分析的影响。当用 2.1×50 mm 色谱柱进行分析时，比较 $0.5 \mu\text{L}$ 的进样量与 $16 \mu\text{L}$ 的进样量，结果表明峰宽和色谱性能具有很大的差异。图 3B 示出的柱效值证实了我们在液相色谱系统体积中所观察到的趋势。进样量越

大导致峰越宽，这种效果在早期洗脱化合物中更明显。为了在载样的可能影响中单独分析进样量的影响，在整个实验中均向色谱柱中进样相同量的样品。用流动相连续稀释初始样品，同时对进样量进行适当地缩放。图 4 示出了不论被测试的进样量如何均向色谱柱中进样相同量的样品，结果显示了每种化合物的面积均保持恒定。

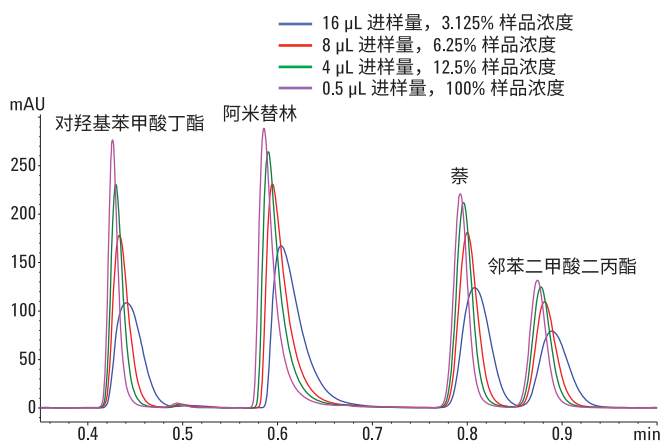


图 3A. 进样量对整个系统体积有影响，因此务必保持较小，以保持高效色谱柱如 $1.9 \mu\text{m}$ Agilent InfinityLab Poroshell 的性能

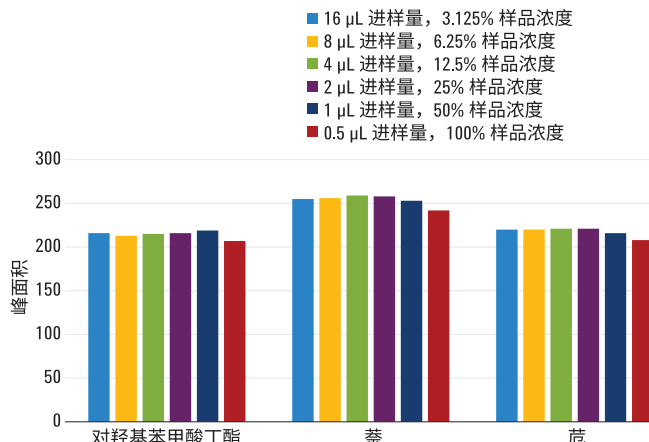


图 4. 峰面积测量结果表明，在对进样量进行比较时，向色谱柱中进样相同量的样品降低了其他变量如载样的可能性，并且可对进样量的影响进行单独研究

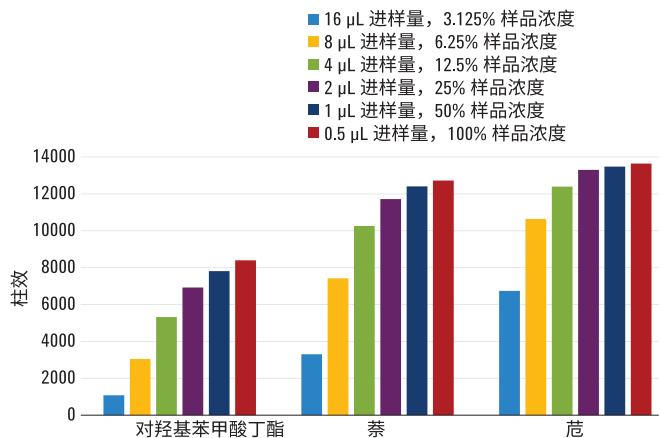


图 3B. 进样量对整个系统体积有影响，因此务必保持较小，以保持高效色谱柱如 $1.9 \mu\text{m}$ Agilent InfinityLab Poroshell 的性能

样品优化

除了优化仪器和方法之外，也可对样品进行优化以提高所观察到的色谱柱性能。样品溶剂会影响色谱性能。在图 5A 中，用不同溶剂以 1:10 稀释样品，然后进样 1.5 μL 。部分溶剂如 THF 和 DMSO 在 254 nm 处产生了较大的基线干扰，这对于极早期洗脱化合物可能存在问题。使用样品溶剂可能产生的一个较大问题是峰形变形，比如邻苯二甲酸二丙酯的样品溶剂为 THF 和 IPA 时就发生了变形。而且 THF 还明显改变了其余峰部分的峰形。为了防

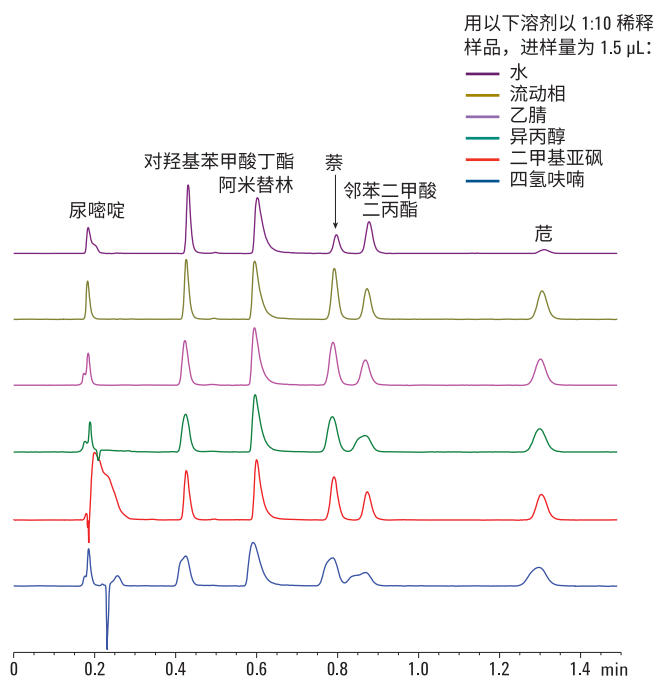


图 5A. 样品溶剂的强度应与流动相相当或比其更低，否则可能会出现峰形不佳，从而导致柱效不佳。随着进样量的增加，更为关键的是选择正确的样品溶剂强度，对于小体积色谱柱如 Agilent InfinityLab Poroshell 2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μm 尤其如此

止产生与样品溶剂有关的峰形问题，务必确保样品是在强度与流动相相当或比其更低的溶剂中制备的。图 5B 示出了样品溶剂对柱效的影响。强溶剂如 THF、DMSO 和 IPA 增宽了色谱峰，从而大大降低了柱效。性能最好的样品是在流动相或水中制成的样品。有趣的是，在水中制成的样品的结果最好。这可能是因为样品都被集中在色谱柱上。但问题是，该样品中的有些分析物在水中的溶解度不佳。图 5A 中的色谱图显示萘和范的峰高较低，正是因为它们在水中的溶解度不佳。

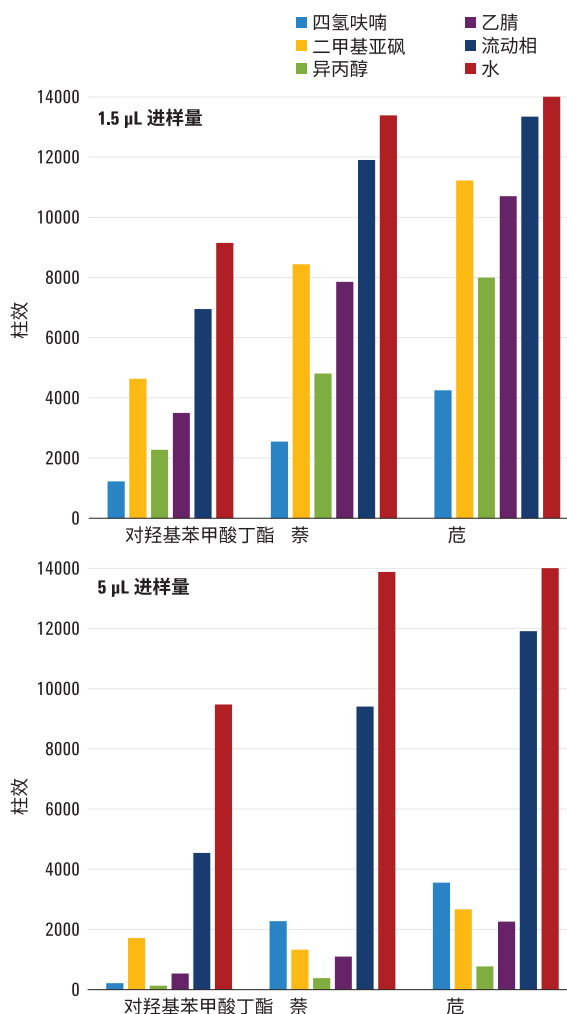


图 5B. 样品溶剂的强度应与流动相相当或比其更低，否则可能会出现峰形不佳，从而导致柱效不佳。随着进样量的增加，更为关键的是选择正确的样品溶剂强度，对于小体积色谱柱如 Agilent InfinityLab Poroshell 2.1 $\times$ 50 mm, 1.9 μm 尤其如此

样品中的分析物浓度也会影响方法的性能。对于图 6 中所示的实验，用流动相制备了不同浓度的阿米替林溶液，其他参数保持不变。图 6A 示出了将样品加载到色谱柱中后峰形和保留时间的变化。在这种情况下，通过柱效和拖尾峰来测量性能，如图 6B 所示。加载到色谱柱中的阿米替林并没有明显的最佳浓度。理想情况下，会选择柱效高同时拖尾因子低的浓度。所有分析物在载样后都具有独特的行为，因此最重要的是单独考虑每种化合物。

为了使 InfinityLab Poroshell 2.1 × 50 mm, 1.9 μm 色谱柱的性能最佳，应针对给定分析尽最大可能优化样品溶剂和分析物浓度。但在有些分析中，可能不能改变这些样品特性。

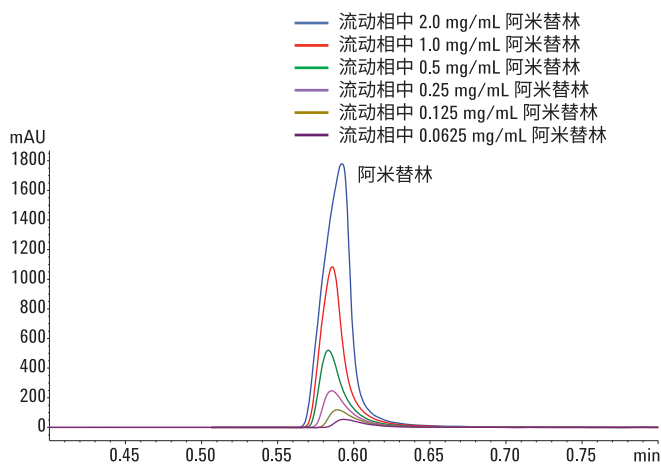


图 6A. 方法性能可根据分析物和加载到色谱柱上的样品量发生变化

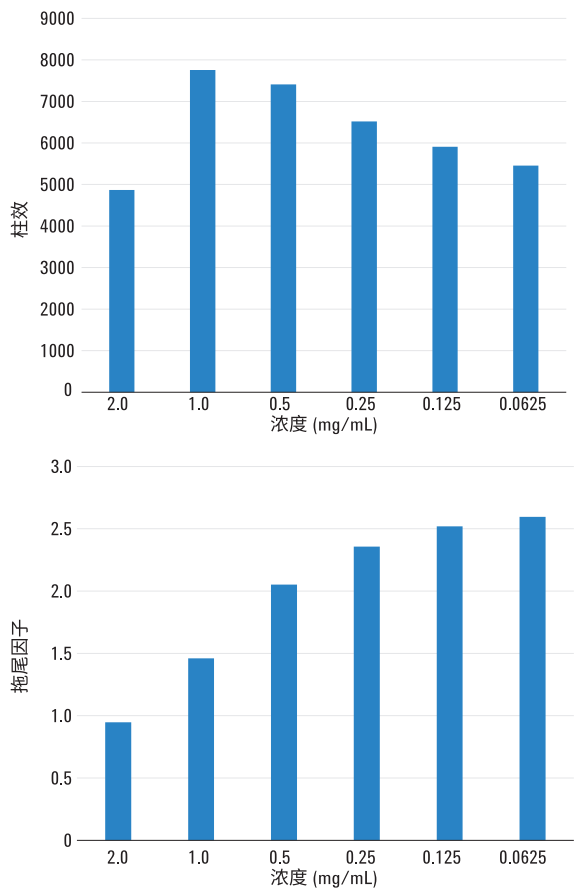


图 6B. 方法性能可根据分析物和加载到色谱柱上的样品量发生变化

结论

高效 Agilent InfinityLab Poroshell 1.9 μm 色谱柱是一种强力色谱分离工具。但应谨慎对液相色谱仪器、方法和样品进行优化，以确保充分发挥分离能力。仪器应配置小体积的毛细管和流通池。应将方法的数据采集速率设定到足够高，并且在可行的情况下应将进样量保持尽可能低。样品溶剂的强度应与流动相相当或比其更低，并且分析物的浓度应足够低以免使色谱柱超载或破坏峰形。

参考文献

1. A. Gratzfield-Hugsen, E. Naegele. 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. V. R. Meyer. Practical High Performance Liquid Chromatography. 第 4 版, 第 34 页, Wiley, 2004
3. W. Long, A. Mack. 减小管路体积以优化色谱柱性能, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-4964CHCN, **2009**
4. A. Mack. 通过改善 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的超低扩散性能, 实现 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱性能的最大化, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-9502CHCN, **2012**
5. A. Mack. 采用 Agilent 1290 Infinity 超低扩散液相色谱系统对吗啡及其代谢物进行 HILIC/MS/MS 分析, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-0208CHCN, **2012**

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com。

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

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，2017

2017 年 3 月 1 日，中国出版

5991-7560CHCN



Agilent Technologies