

应用简报

食品/饮料检测、
发酵监测、农用化学品、
生物燃料、可替代能源



使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱分析糖类物质

作者

Anne Mack 和 Ta-Chen Wei
安捷伦科技公司

摘要

利用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱通过梯度和等度洗脱分离 11 种糖化合物。考察了 pH 和温度对葡萄糖端基异构体分离的影响。研究发现强碱和低温的组合为峰形和柱寿命提供了最佳解决方案。最终分离使用氢氧化铵流动相和 35 °C 的柱温。

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。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。更高的柱效能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。

迄今为止，表面多孔颗粒填料主要用于反相分离。随着表面多孔颗粒填料的成熟，该项技术越来越多地应用于化学键合相和色谱技术中，例如亲水相互作用液相色谱 (HILIC)。HILIC 非常适合极性分析物的分析，这种分析物通常很难在反相模式下实现保留和分离。本应用简报证明了 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.7 μm 色谱柱的 UHPLC 性能及其通过梯度和等度洗脱分离 11 种糖化合物的能力。

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 固定相使用结合到稳定杂化颗粒上的新型两性离子固定相，能够在高达 80 °C 和高达 pH 12 的条件下保持稳定。这种固定相能够分离各种极性的分析物。这些 HILIC-Z 固定相非常适合具有挑战性的强碱环境下分离，提供了一种稳定的解决方案。

实验部分

本研究采用配备 Agilent G4218A ELSD 的 Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱系统。所有连接毛细管均比较短，内径为

0.12 mm，可最大程度减小系统扩散。采用 Agilent OpenLAB 软件控制系统并处理数据。表 1 显示了所用的色谱方法。所有化合物均采用单标进样。表 2 列出了标准浓度和溶剂。

分析涉及的 11 种糖化合物购自 Sigma-Aldrich。甲酸铵、甲酸、乙酸铵和氢氧化铵也购自 Sigma-Aldrich。乙腈购自 Honeywell (Burdick and Jackson)。水经 Milli-Q 系统 (Millipore) 0.2 μm 滤膜过滤，分子量为 18。

表 2. 样品前处理和进样量

糖类物质	配制成饱和溶液的溶剂	进样量 (μL)
木糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.1
阿拉伯糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.1
果糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.1
甘露糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.2
葡萄糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.4
半乳糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.4
蔗糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	0.5
麦芽糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	1.0
乳糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	1.5
麦芽三糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	3.0
棉籽糖	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)	7.0

表 1. 方法参数

方法	流动相 A	流动相 B	流动相组成	流速 (mL/min)	色谱柱	柱温 (°C)	ELSD 设置
图 1	水	乙腈	12 分钟内 95%–80% B, 重新平衡 3 分钟	0.4	竞争 HILIC 色谱柱, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm	35、40 或 80	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz
	100 mM 甲酸铵水溶液, pH 4.5						
	100 mM 乙酸铵水溶液, pH 7.0						
	0.6% 氢氧化铵水溶液						
图 2	0.3% 氢氧化铵水溶液	乙腈	90% B 等度洗脱	0.4	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685775-924)	35	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz
	100 mM 乙酸铵水溶液, pH 7.0					80	
图 3	0.3% 氢氧化铵水溶液	0.3% 氢氧化铵乙腈溶液	6 分钟内 85%–60% B, 重新平衡 3 分钟	0.4		35	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz
图 4	0.3% 氢氧化铵水溶液	0.3% 氢氧化铵乙腈溶液	80% B 等度	0.4		35	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz

结果与讨论

糖类物质难以通过 HPLC 进行分析，因为许多化合物存在端基异构体的分离。图 1 显示了可通过强碱、高温或二者组合的方式控制葡萄糖端基异构体的分离。对于硅胶型液相色谱柱而言，这些条件非常苛刻，会对色谱柱寿命产生不良影响。

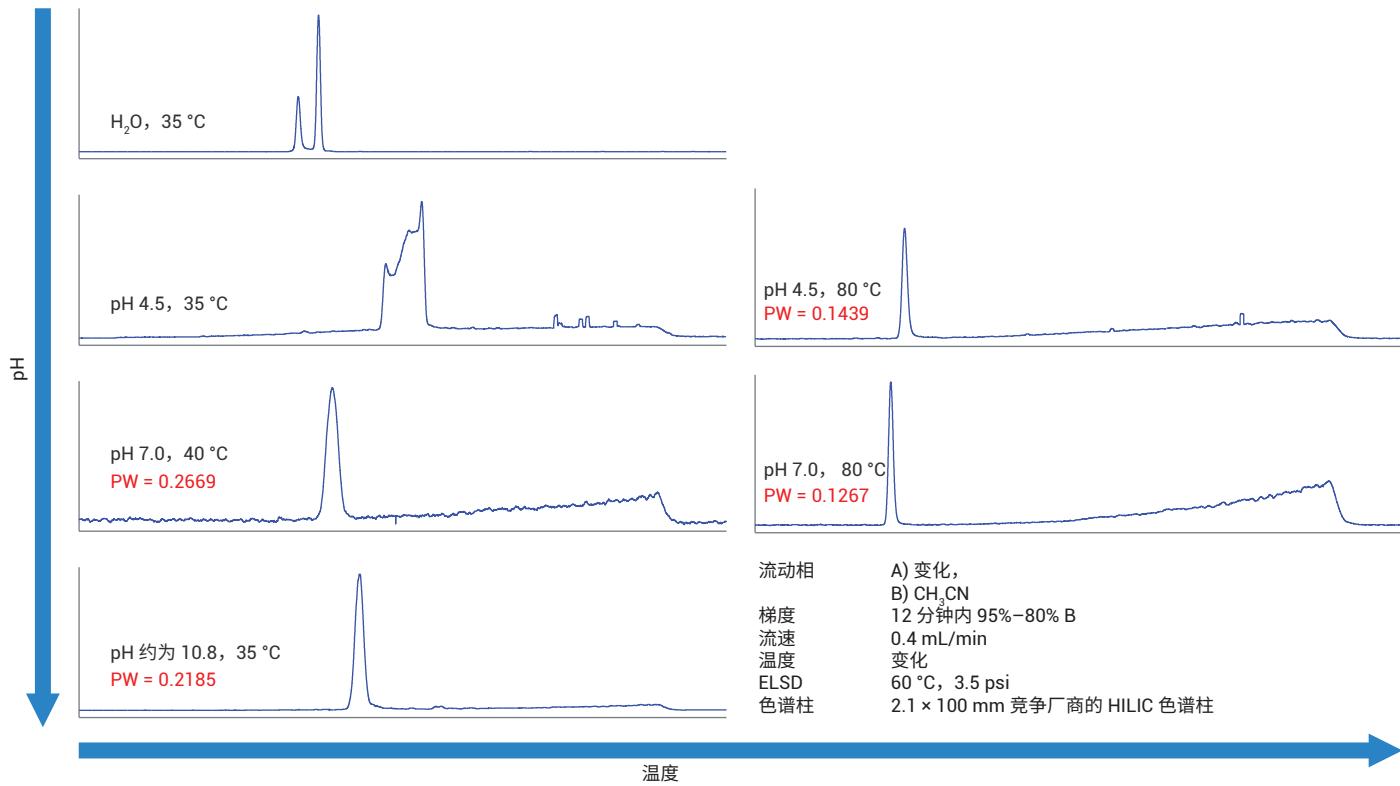


图 1. pH 和温度对葡萄糖端基异构体分离的影响

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱固定相采用将专利化的两性离子键合到杂化颗粒上制备而成，在强碱流动相条件下更加稳定。图 2 显示了在糖类物质分析适用的方法条件下对 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 柱寿命的评估结果。强碱和低温的组合显示在 14000 倍色谱柱体积下不发生性能损失。高温与中性 pH 的组合提供了更窄的峰宽和更低的反压，但是这些条件也加速了色谱柱降解。对于 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱，强碱和低温组合提供了一种更稳定的糖类物质分析方法。

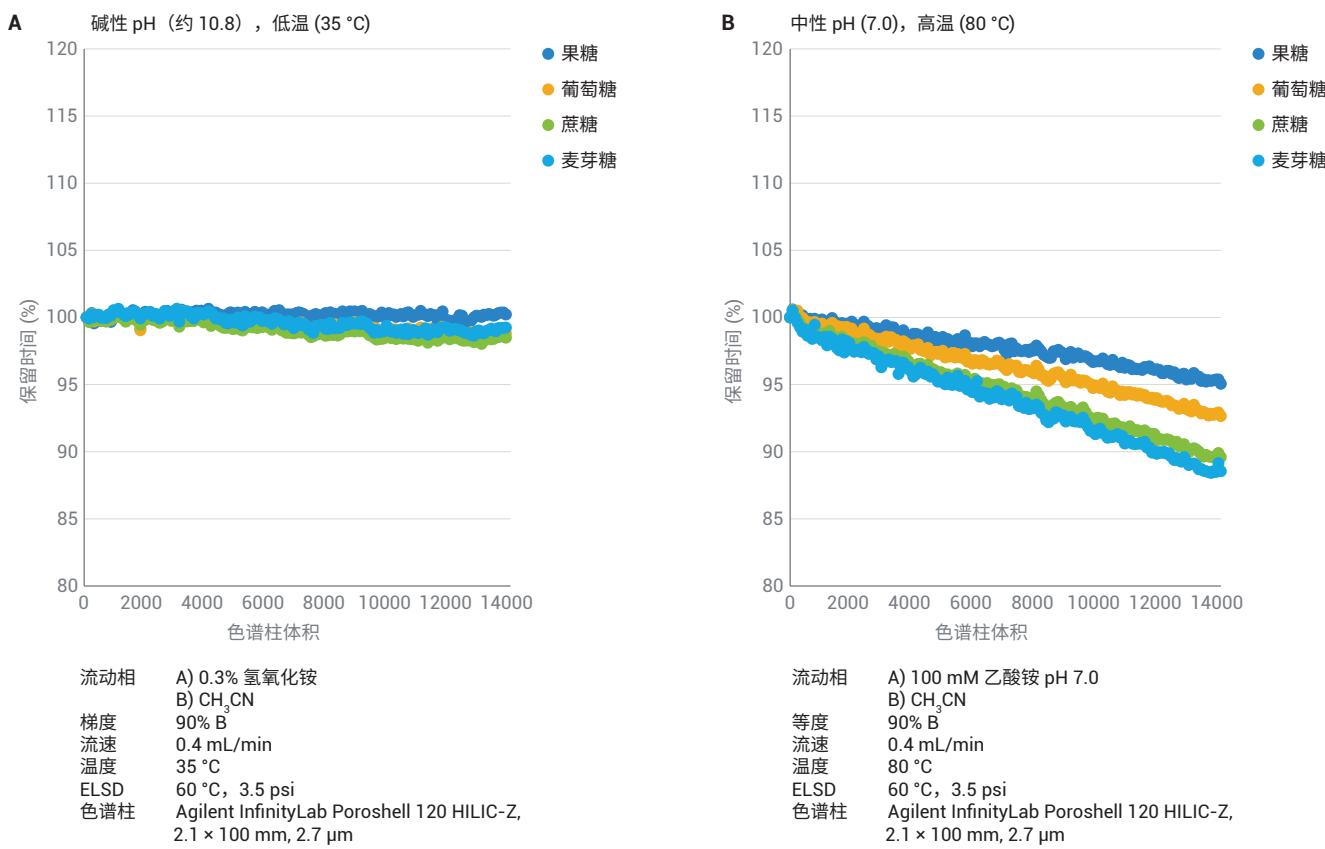


图 2. 2.7 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 液相色谱柱在强碱和高温的糖类物质分析过程中的寿命比较

图 3 显示了强碱流动相和梯度洗脱条件下，11 种糖类物质在 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱上的分离效果。所有化合物的峰形优异，使用氢氧化铵 (pH 约 10.8) 和 35 °C 的柱温能够很好地控制端基异构体的分离。两组关键物质对 (木糖/阿拉伯糖和葡萄糖/半乳糖) 未得到基线分离。可通过更长的色谱柱和更长的分析时间来改善这些关键物质对的分离。

图 4 显示糖类物质也可实现等度分离。图 3 显示等度分离与梯度分析在大致相同的时间内完成。但是，早期洗脱化合物未获得足够高的分离度，而且后洗脱化合物的灵敏度不够高。尽管存在这些小问题，但在某些梯度洗脱无法实现的情况下，等度解决方案用于糖类物质分析能获得非常好的效果。需要注意，RI 检测器流通池与强碱流动相不兼容。如需 RI 检测，请使用中性 pH 和高温的组合。所有其他方法参数应保持恒定，预计将获得相似的选择性。

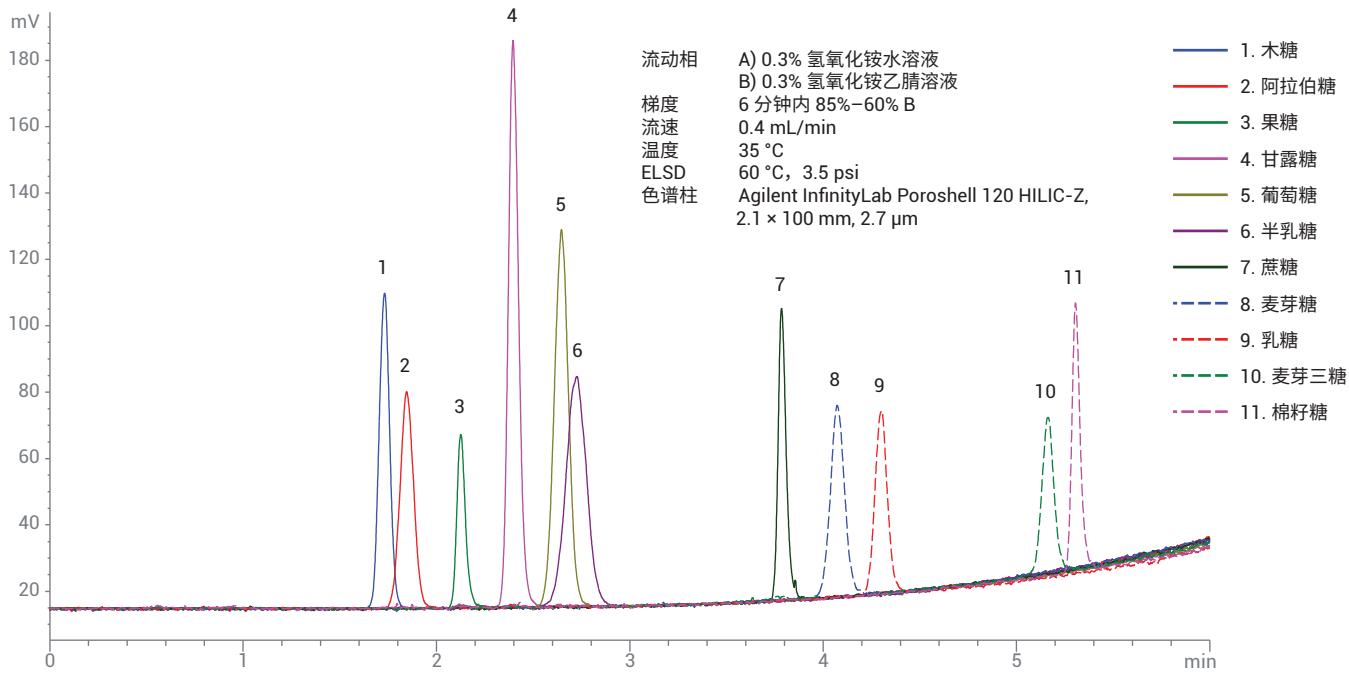


图3. 11种糖化合物在Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z液相色谱柱上的梯度分离结果

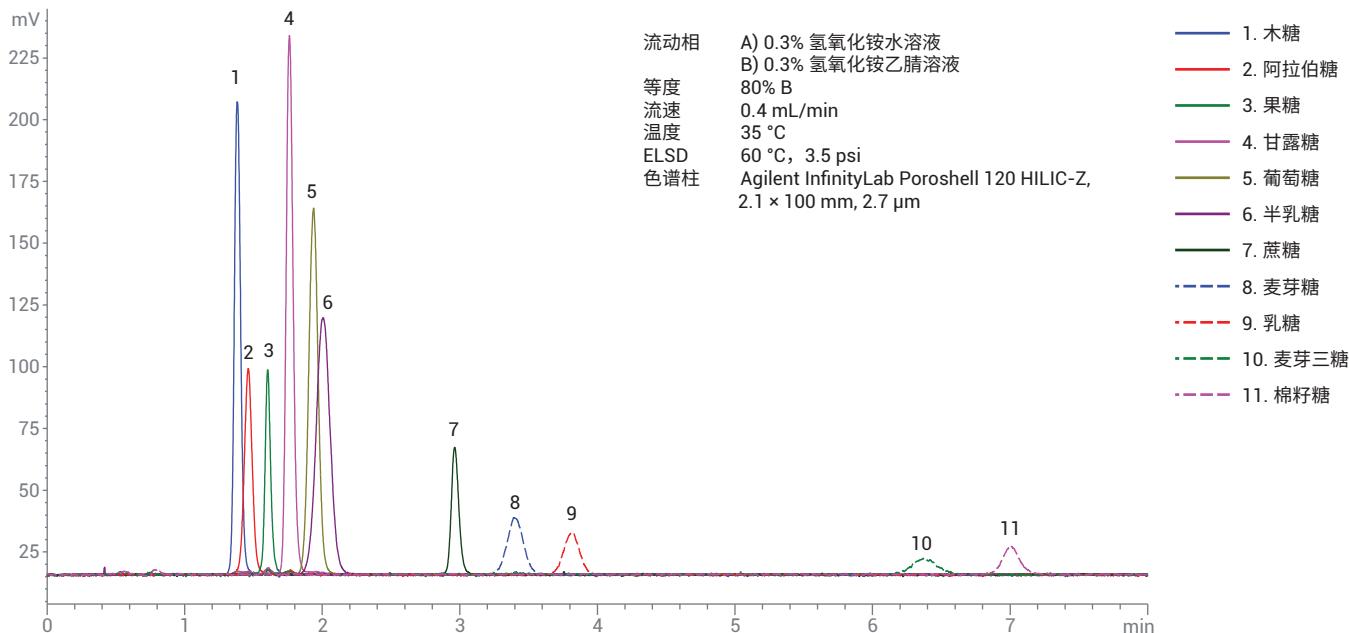


图4. 11种糖化合物在Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z液相色谱柱上的等度分离结果

结论

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱非常适合用于糖类物质的分离。该色谱柱为所有化合物提供了良好的分离度和峰形，且在强碱条件下能保持超高的使用寿命。

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, 2018
2018年1月30日, 中国出版
5991-8984ZHCN