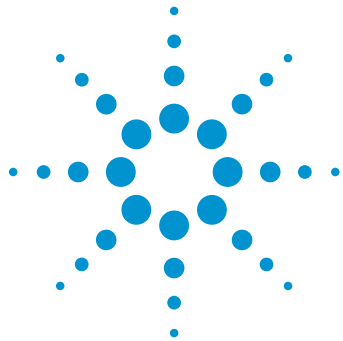




Усовершенствование анализа ароматических кислот: существенная экономия времени, растворителя, пробы и денег с помощью колонок Agilent InfinityLab Poroshell 120 с частицами размером 1,9 мкм

Рекомендации по применению

Сельское хозяйство, анализ пищевых продуктов, низкомолекулярные лекарственные вещества

Автор

Анна Мак (Anne Mack)
Agilent Technologies, Inc.
Уилмингтон, Делавэр, США

Аннотация

Были проанализированы шесть ароматических кислот с применением муравьиной кислоты и градиента ацетонитрила. При выполнении этого разделения оценивалась производительность четырех колонок. Исходный анализ проводился на колонке Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 с полностью пористыми частицами $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм, и осуществлялось сравнение с результатом, полученным при использовании колонок Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 с поверхностно-пористыми частицами размером 1,9, 2,7 и 4 мкм с параметрами $2,1 \times 50$ мм. Все колонки обладали схожей селективностью, не требуя разработки методов между сравнениями колонок. Все колонки обеспечивали успешное разделение ароматических кислот с минимальным разрешением 1,8. По сравнению с длинной колонкой с размером частиц 5 мкм колонка InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 с размером частиц 1,9 мкм позволяла добиться более высокого значения минимального разрешения (2,9 вместо 2,4), увеличивая при этом скорость разделения в 12 раз и в то же время используя на 96% меньше подвижной фазы и на 75% меньше пробы. Последующие модификации метода продемонстрировали, что колонка InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 1,9 мкм может работать еще более эффективно, разделяя эти шесть ароматических кислот за 0,35 минуты с минимальным разрешением 2,3 при скорости, в 103 раза превышающей значение исходного анализа.



Agilent Technologies

Введение

Колонки для ВЭЖХ с пористыми частицами являются популярным инструментом жидкостной хроматографии. Колонки с пористыми частицами обеспечивают высокую эффективность при низком давлении по сравнению с колонками с полностью пористыми частицами.¹ Это преимущественно связано с меньшим расстоянием массопереноса и со значительно меньшей дисперсией размеров частиц в колонке.² В настоящее время имеет место тенденция к уменьшению размера пористых частиц с целью дополнительного повышения эффективности. Более высокая эффективность обеспечивает ускорение анализа или повышение качества результатов за счет увеличения разрешения и чувствительности.

В рамках семейства колонок для ВЭЖХ Agilent была проделана значительная работа для обеспечения простоты переноса методик и масштабируемости. Частицы неподвижной фазы: полностью пористые в колонках Agilent ZORBAX и пористые-поверхностно-пористые в колонках Agilent InfinityLab Poroshell — отличаются сходством, что позволяет легко обновлять методы без их дополнительной разработки.³

В настоящей работе описывается использование меньших частиц Poroshell для повышения качества разделения ароматических кислот по сравнению с традиционным анализом с частицами размером 5 мкм. Демонстрируется существенная экономия времени, растворителя, пробы и денег при использовании колонок Poroshell.

Экспериментальная часть

В этом эксперименте использовалась система ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity. Была выполнена модификация системы по сравнению со стандартной конфигурацией для обеспечения низких значений объема системы и дисперсии. В табл. 1 представлена подробная информация о конфигурации и четыре колонки для ВЭЖХ Agilent, использовавшиеся в этом эксперименте.

В табл. 2 приводятся параметры методов ВЭЖХ для всех анализов. За исключением быстрого анализа на колонках с частицами размером 1,9 мкм, все методы были пропорционально масштабированы в соответствии с объемом колонки для поддержания параметров хроматографического разделения между колонками.

Таблица 1. Конфигурация системы УВЭЖХ

Конфигурация системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity	
Бинарный насос Agilent 1290 Infinity (G4220A)	Смеситель для растворителя на 35 мкл: Agilent Jet Weaver, 35 мкл/100 мкл (G4220-60006)
Высокоэффективный автосамплер Agilent 1290 Infinity High Performance Autosampler (G4226A)	Седло в сборе, сверхнизкая дисперсия для автосамплера Agilent 1290 Infinity (G4226-87030) От автосамплера к нагревателю: капилляры, нержавеющая сталь, 0,075 × 220 мм, SV/SLV (5067-4784) Флакон с отвинчивающейся крышкой, темного стекла, с местом для надписи, сертифицированный, 2 мл, 100 шт/уп (5182-0716) Крышка закручивающаяся, септа PTFE/красный силикон, 100 шт/уп (5182-0717) Вкладыш для флаконов, 250 мкл, стекло, с полимерным основанием, 100 шт/уп (5181-1270)
Термостат отсека для колонок Agilent 1290 Infinity (G1316C)	Теплообменник, низкая дисперсия, 1,6 мкл, двойной (G1316-60005) От нагревателя к колонке: комплект фитингов InfinityLab Quick Connect, 105 мм, 0,075 мм (5067-5961) От колонки к проточной кювете: капилляры, нержавеющая сталь, 0,075 × 220 мм, SV/SLV (5067-4784)
Диодно-матричный детектор Agilent 1290 Infinity (G4212A)	Кассетные кюветы сверхнизкой дисперсии Max-Light Agilent, 10 мм (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS (ChemStation Edition), версия C.01.05 [35]	G4220A: B.06.53 [0013] G4226A: A.06.50 [003] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.53 [0013]
Колонки для ВЭЖХ Agilent	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 250 мм, 5 мкм (959990-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 1,9 мкм (699675-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 2,7 мкм (699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 4 мкм (699770-902)

Таблица 2. Параметры методов УВЭЖХ

Колонка	Подвижная фаза	Скорость потока (мл/мин)	Градиент	Объем образца (мкл)	Проба	Термостатируемый отсек для колонок (°C)	Диодно-матричный детектор
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 250 мм, 5 мкм	А) 0,2%-й водный раствор муравьиной кислоты В) ацетонитрил	1,0	8–35% В в течение 36 минут	20	По 0,01 мг/л водных растворов 25 протокатехоевой кислоты, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), 4-аминобензойной кислоты, ванильной кислоты, сиреневой кислоты.	25	280 нм, 80 Гц
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 1,9 мкм		0,5	8–35% В в течение 3 минут	5			
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 2,7 мкм							
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 4 мкм					Соединения перечислены в порядке элюирования, на рис. 1 представлены их структурные формулы.	60	280 нм, 160 Гц
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 1,9 мкм (скоростная)		2,2	8–26% В в течение 0,3 минуты				

В настоящей работе анализировались шесть ароматических кислот; их структурные формулы представлены на рис. 1. Все эти соединения, а также муравьиная кислота и модификатор подвижной фазы были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Ацетонитрил был приобретен у компании Honeywell (Burdick and Jackson). Фильтрация воды была проведена с помощью системы Milli-Q (Millipore) с фильтрами с размером пор 0,2 мкм и удельным сопротивлением воды на выходе 18 МОм·см.

Результаты и обсуждение

Исходное разделение шести ароматических кислот было продемонстрировано на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 × 250 мм с полностью пористыми частицами размером 5 мкм. Это разделение было выполнено за 36 минут при минимальном разрешении 2,4, что показано на рис. 2. На нем же представлены те же методики ВЭЖХ, перенесенные на колонку InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1 × 50 мм с поверхностно-пористыми частицами размером 1,9 мкм. Колонки ZORBAX Eclipse Plus C18 и Poroshell 120 EC-C18 имеют сходные привитые фазы, обеспечивающие высококоррелированную общую селективность, поэтому отсутствует необходимость во внесении изменений в метод. Однако из-за различий в размерах колонок градиент, скорость потока и объем ввода геометрически масштабируются по меньшему объему колонки. Скорость потока также увеличивается для колонки Poroshell с размером частиц 1,9 мкм с целью выполнения анализа при оптимальной для частиц меньшего размера скорости потока. Полученная в результате хроматограмма позволяет сделать вывод, что анализ проводится в 12 раз быстрее, используется на 96% меньше подвижной фазы, на 75% меньше пробы, при этом поддерживается минимальное разрешение 2,9.

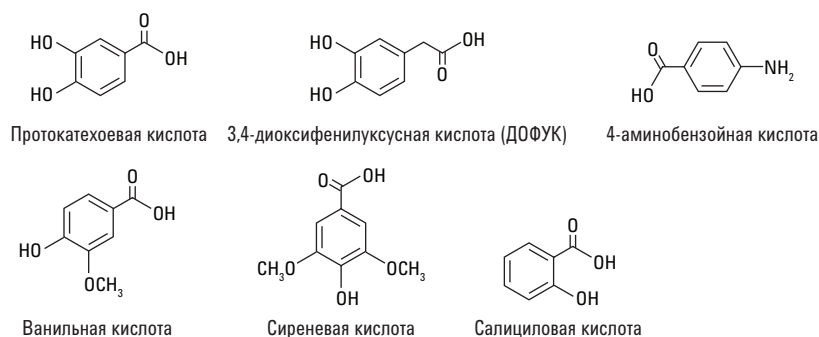


Рис. 1. Исследуемые соединения

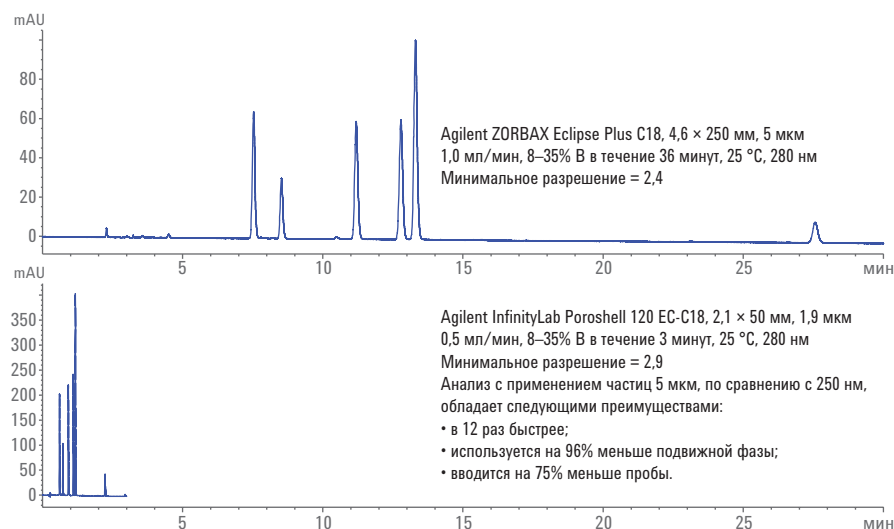


Рис. 2. Повышение качества анализа ароматических кислот на колонке Agilent ZORBAX длиной 250 мм с частицами размером 5 мкм посредством переноса на высокопроизводительную колонку Agilent InfinityLab Poroshell длиной 50 мм с частицами размером 1,9 мкм: увеличилось минимальное разрешение при существенной экономии времени, пробы, растворителя и денег

При анализе на колонке Poroshell с частицами размером 1,9 мкм создается давление 472 бар. Это может оказывать ингибирующее действие в некоторых анализах в зависимости от значений рабочего давления прибора, указанных в спецификациях. В семействе колонок Agilent Poroshell 120 представлены три варианта размеров частиц: 1,9, 2,7 и 4 мкм. При всех размерах частиц используются одинаковые привитые фазы, обеспечивающие простоту переноса методик. На рис. 3 продемонстрирована одинаковая селективность при всех трех размерах частиц при выполнении этого разделения ароматических кислот; все параметры методов идентичны. По мере увеличения размера частиц снижается давление. Однако это происходит за счет пониженного разрешения и пиковой емкости при применении частиц больших размеров. В этой ситуации оператору следует выбрать колонку, наилучшим образом удовлетворяющую требованиям, в зависимости от того, ограничиваются ли они рабочим давлением имеющегося оборудования или требуется максимально возможное разрешение.

Преимуществом использования мелких поверхностно-пористых частиц является высокая эффективность и разрешение. Такая высокая производительность может использоваться для выполнения сверхбыстрого анализа, если это позволяет предельное давление используемой системы ВЭЖХ. Рис. 4 демонстрирует работу колонки Poroshell с частицами размером 1,9 мкм на пределе возможностей. Для снижения вязкости подвижной фазы применялась высокая температура, что позволило увеличить скорость потока до 2,2 мл/мин и обеспечило давление 1150 бар. Также по сравнению с предыдущими методиками был незначительно скорректирован градиент, что обеспечило максимально быстрое разделение из этой колонки при работе с пробой ароматических кислот. В результате все шесть соединений были разделены за 0,35 минуты при минимальном разрешении 2,3. По сравнению с методом, использующим колонку Eclipse Plus длиной 250 мм с частицами размером 5 мкм, этот анализ в 103 раза быстрее, кроме того, применяется на 98% меньше подвижной фазы при поддержании минимального разрешения.

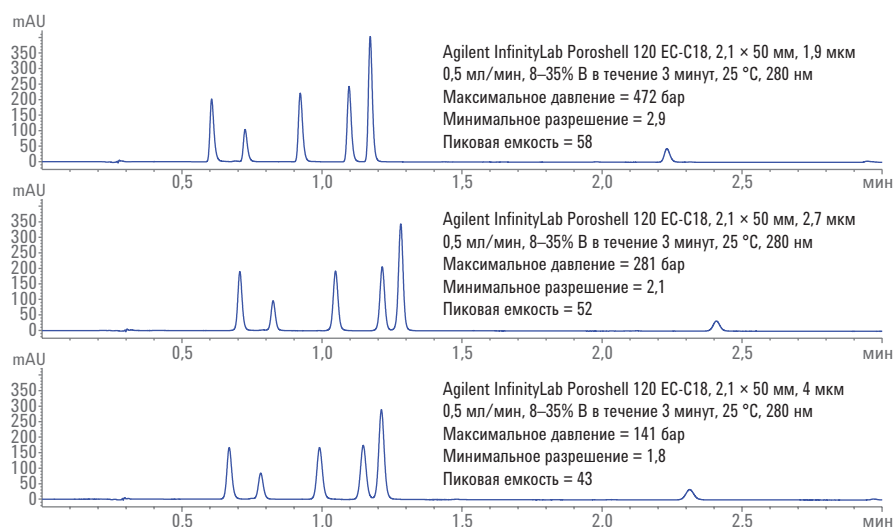


Рис. 3. Схожая селективность колонок Agilent InfinityLab Poroshell с различными размерами частиц позволяет оператору выбирать конфигурацию колонки в зависимости от предельного давления прибора или требований по производительности метода, не прибегая к дополнительной разработке методов

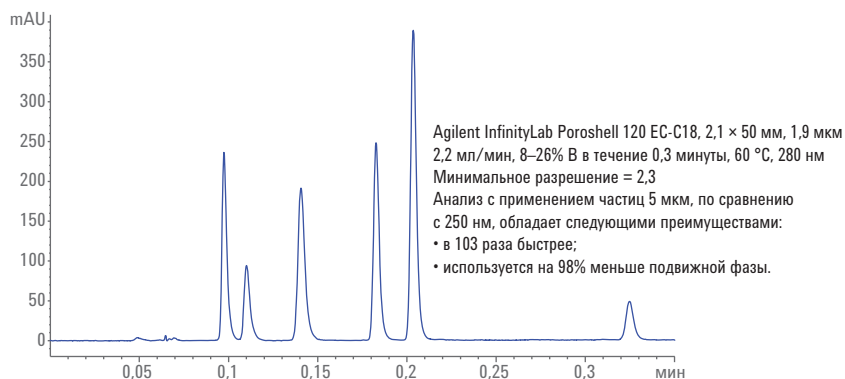


Рис. 4. Применение высокопроизводительной колонки Agilent InfinityLab Poroshell длиной 50 мм с частицами размером 1,9 мкм на границе предельного давления без снижения производительности метода позволяет экономить время, растворитель и деньги

В табл. 3 представлена обобщенная информация и сравнение всех хроматографических результатов.

Таблица 3. Сравнение анализа ароматических кислот при использовании различных колонок для ВЭЖХ

Колонка	Давление (бар)	Минимальное разрешение	Условная пиковая емкость (nC)	Время анализа (мин)	Расход подвижной фазы (мл)
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 250 мм, 5 мкм	193	2,4	88	36	Исходный анализ на колонке с частицами 5 мкм
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 1,9 мкм	472	2,9	58	3,0	Анализ в 12 раз быстрее исходного с частицами 5 мкм
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 2,7 мкм	281	2,1	52		
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 4 мкм	141	1,8	43		
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм, 1,9 мкм (сверхскоростная)	1150	2,3	37	0,35	Анализ в 103 раза быстрее исходного на колонке с частицами 5 мкм
					Используется на 98% меньше подвижной фазы, чем в исходном анализе на колонке с частицами 5 мкм

Выводы

Высокоэффективная колонка Agilent InfinityLab Poroshell 120 с частицами размером 1,9 мкм может применяться для повышения эффективности существующих методов, использующих традиционные колонки, например Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 с частицами размером 5 мкм. Колонки Poroshell и ZORBAX отличаются привитыми фазами схожих составов, что облегчает перенос методик, зачастую не требуя дополнительной разработки методов. Если давление, создаваемое частицами размером 1,9 мкм, слишком высоко для системы ВЭЖХ, то можно воспользоваться колонкой Agilent Poroshell 120 с частицами размером 2,7 или 4 мкм, что обеспечит такую же селективность. Однако, если это позволяет предельное давление системы ВЭЖХ, колонку Poroshell с размером частиц 1,9 мкм можно использовать для выполнения сверхбыстрого разделения, что позволит существенно сэкономить время, растворитель, пробу и деньги по сравнению с традиционными колонками для ВЭЖХ.

Литература

1. Gratzfield-Huguen, A.; Naegele, E.
Maximizing efficiency using
Agilent Poroshell 120 Columns,
Agilent Technologies Application Note,
publication number 5990-5602EN,
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, *Agilent
Technologies Application Note*,
publication number 5990-6588EN,
2011.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена
без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Напечатано в США 1 ноября 2016 г.
5991-7518RU



Agilent Technologies