

将常规 3.5 μm 或 5 μm 色谱柱的方法转换到安捷伦 Poroshell 120 色谱柱，提高分析速度和分离度

Ron Majors 是安捷伦色谱柱与消耗品部的资深科学家，**Jia Liu**（刘佳）是安捷伦色谱柱研发人员

在现有仪器上，只需稍加改动，即可将常规 5 μm 柱上的方法转换到 **Agilent Poroshell 120** 上，为您节省大量实验时间和经费。

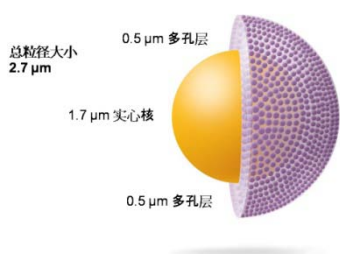
对于等梯度方法，节省的时间和柱长的改变成正比。例如，柱长从 150 mm 缩短到 50 mm，分析时间将节省三分之二。

在这次演示中，我们将使用 **Poroshell 120 EC-C18 – USP L1** 柱。“EC”的意思是填料进行了封端处理，阻断了硅醇基与分析物的相互作用。

由于其柱效很高，用 **Poroshell 120** 很快得到非常窄的色谱峰。

Poroshell 120 是什么？

Poroshell 120 填料采用安捷伦公司专利的制造工艺，在实心核外包上表面多孔层。这与亚 2 微米填料不同。



Poroshell 120 填料总粒径 2.7 μm ，由 1.7 μm 直径的实心核和 0.5 μm 厚的多空外层组成。因此您将获得亚 2 微米色谱柱的性能，但是 2.7 μm 填料色谱柱的压力，通常低于 400 bar。

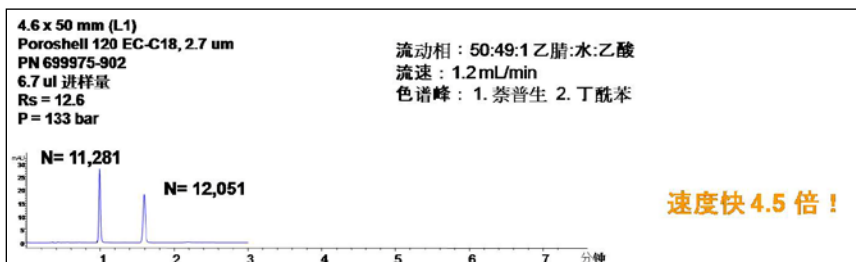
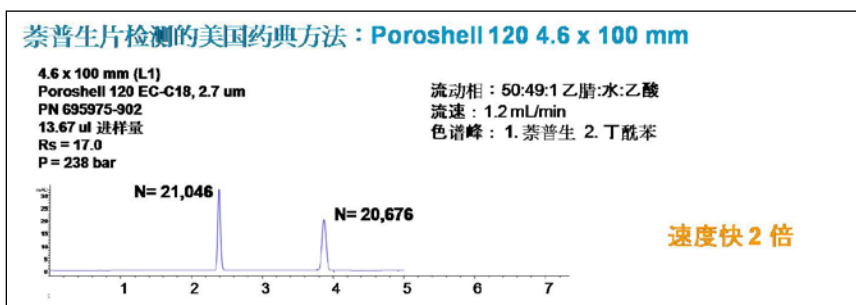
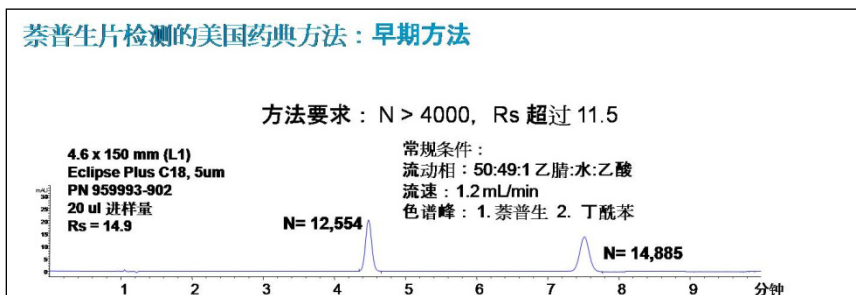
要确保得到最好的分析结果，仪器性能非常重要。

用 **Poroshell 120** 进行性能优化需要确定三个重要仪器参数：

- 检测器的响应时间

- 最大限度地减少管路体积
- 流通池体积

下面是早期的采用常规 5 μm 色谱柱的和两种不同的 Poroshell 120 色谱柱分析萘普生片的色谱图对比示例。采用 Poroshell 120 色谱柱，分析速度最终提高 4.5 倍！同时还减少了 77% 的溶剂用量。



用 Poroshell 120 进行性能优化需要确定以下重要的仪器参数：

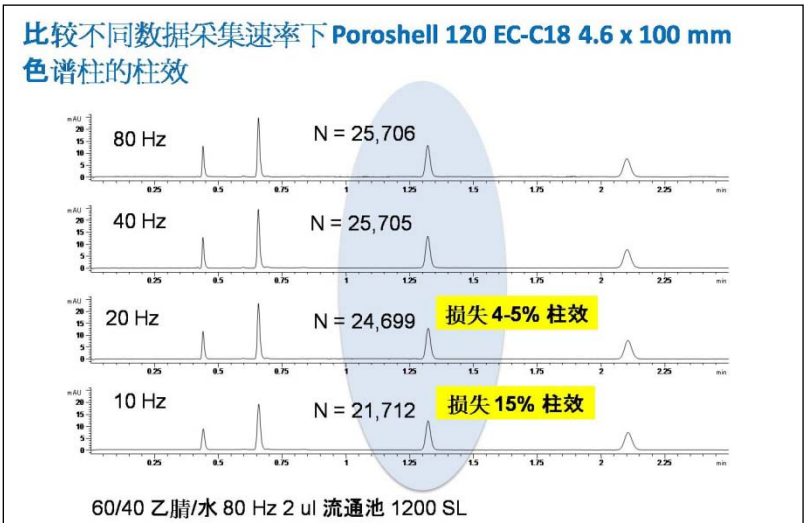
- 1) 检测器响应时间/数据采集速率
- 2) 流通池体积
- 3) 样品流路管线体积
- 4) 流路接头
- 5) 流速

设置恰当的数据采集速率

使用小色谱柱时要得到最好的结果，数据采集速率应设为 40 Hz 或更高。较新的安捷伦检测器采集速率都有 80 Hz 或 160 Hz，也很适合使用 Poroshell 120。

当分析物的保留时间较长时 ($k' > 4$)，可以用较慢的数据采集。

这里是几张色谱图的比较，说明了数据采集速率如何影响分析结果。
如果数据采集速率太慢，色谱峰将变宽。



此对比色谱图说明了数据采集速率对分析结果的影响。如果数据采集速率太慢，则柱效降低，同时可能导致峰形变化。

以另一种方式来看这个谱图，下表表示了相同的数据

比较不同数据采集速率下 Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm 色谱柱的柱效

色谱柱: Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 100mm 仪器: 1200 SL 2ul 流通池
流速: 2.00 ml/min 进样量: 2ul 流动相: 60:40 乙腈:水

响应时间	Hz	尿嘧啶	苯酚	4-硝基氯苯	萘
		峰宽 0.008	峰宽 0.011	峰宽 0.021	峰宽 0.031
0.02	80	16,240	21,641	25,706	25,061
0.1	40	15,414	22,028	25,705	25,080
0.2	20	12,755	18,647	24,699	24,506
0.5	10	6,965	12,658	21,712	23,872

根据Poroshell 120 色谱柱上得到的窄峰，40 Hz 是最适宜的数据采集速率。
这是与前一张的幻灯片中相同的数据结果，只是以表的形式表示。

流通池的选择:

要达到最佳性能，建议使用较小体积的流通池，如半微量（6 mm/5 μ l）或微量（3 mm/2 μ l）流通池。

使用2.1 mm 柱时，最好使用3 mm流通池。

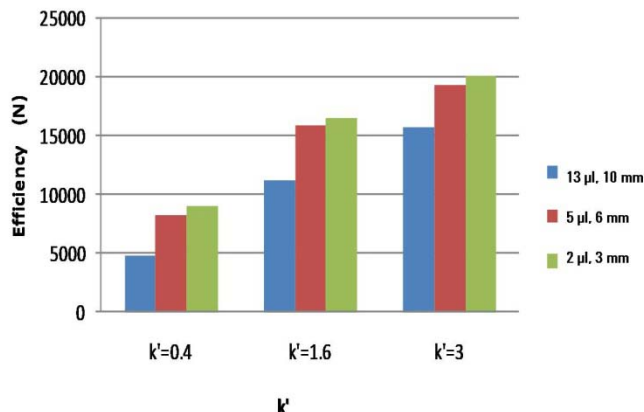
标准流通池（带 RFID 标签）：10 mm，部件号 G1315-60022

半微量流通池（带 RFID 标签）： 6 mm，部件号 G1315-60025

微量流通池（带 RFID 标签）： 3 mm，部件号 G1315-60024

安捷伦提供多种不同的流通池可供选择，您要使用的流通池根据仪器型号是 1100 还是 1200 而不同。参见色谱消耗品手册的 LC 和 LC/MS 部分中的相关内容。如需了解检测器的更多信息，请向与安捷伦技术支持（lc-column-support@agilent.com）寻求帮助。也可以登录 www.agilent.com/chem/getguides 索取手册。

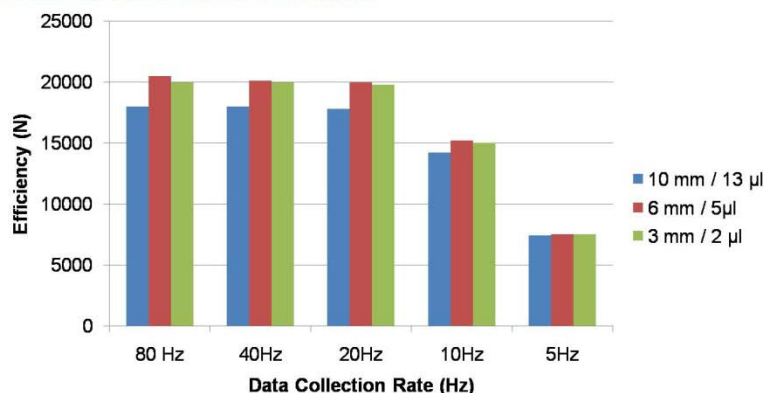
选择与 2.1 x100 mm Poroshell 120 EC-C18 色谱柱匹配的流通池



1 µl QC 混合标样, 尿酸, 苯酚 (k=0.5), 4-硝基苯胺 (k=2), 苯 (k=3.8)
55% 乙腈 45% 水 0.55 ml/min, 微量样品池 (3 mm)。色谱柱部件号: 695775-902

光程为 10 mm (13 µL) 的标准流通池会损失 30% 的柱效。对于 2.1 mm 内径的色谱柱最好使用 3 mm (2 µL) 光程的微量流通池。

较大的流通池，在选择快速数据采集时，可以与较大内径的色谱柱匹配，例如这款 3 x 100 mm Poroshell 120 EC-C18 色谱柱



2 µl QC 混合标样, 尿酸, 苯酚 (k=0.5), 4-硝基苯胺 (k=2), 苯 (k=3.8), 60% 乙腈 40% 水, 0.8 ml/min, 微量流通池; 色谱柱部件号 695975-302

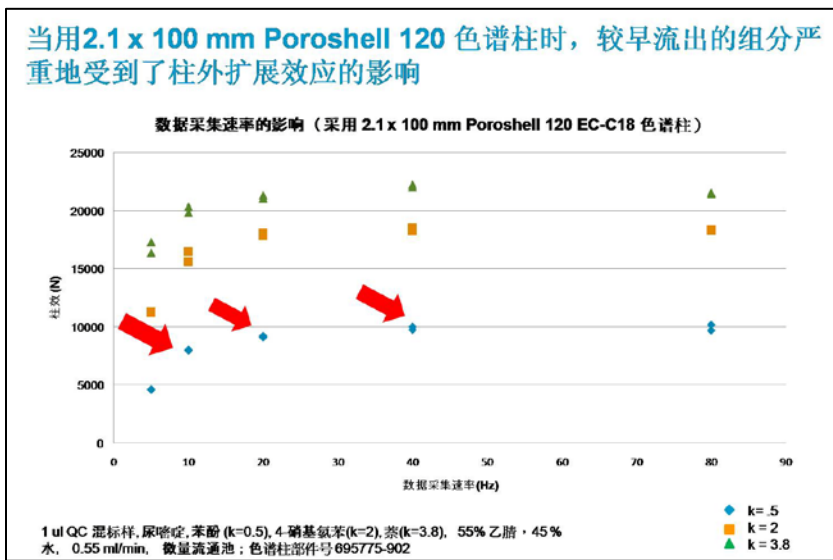
当选择快速数据采集时，较大流通池可以与较大内径的色谱柱配合使用，例如这款 **3 x 100 mm Poroshell 120 EC-C18** 色谱柱。

柱外管路体积最小化

所有管路连接都尽可能使用最短的管线长度。用红色（0.12 mm id）管线代替绿色（0.17 mm id）管线，因为其体积只是绿色管线的一半。

一旦您用较低体积的管线连接了液相色谱系统，在使用较高体积色谱柱时也无需更换回去。

管线的选择请参见**色谱消耗品手册**中的表格，表中显示了哪种管线适用于何种连接——按组件选择管线的补充。



当采用 **2.1 x 100 mm Poroshell 120** 色谱柱时，较早流出的组分 ($k' < 3$) 严重地受到了柱外扩展效应的影响。

您可以自行进行针座更换，步骤如下：

- 1) 如果您正在使用 Lab Advisor，从 opening menu 选择您的仪器并选择“tools”
- 2) 选择自动进样器模块，然后会打开包含针座选项的窗口。跳转至步骤 5
- 3) 对于使用 ChemStation 软件的较早型号的仪器，请进入 Method & Run Control 界面，然后进入“Diagnosis”界面 (使用顶部标签)
- 4) 在 Maintenance 菜单下，向下滚动至 Wellplate Sampler (WPS) 然后至 “WPS Maintenance Positions”
- 5) 选择 “Change needle seat” 下的 “start”，您将看到进样针移开
- 6) 用一支小螺丝刀轻轻启开进样器针座。不要撬开进样器密封垫上的环
- 7) 将毛细管推出更换之，并插入新针座。用一支小改锥轻轻拧紧毛细管接头
- 8) 关上进样器门，并选择 ChemStation 窗口中的 “end”。针头即复位。

安捷伦提供毛细管工具包，预装了您所需要的各种毛细管。进行优化时，寻找以下工具包：

1100，毛细管工具包 #5065-9947

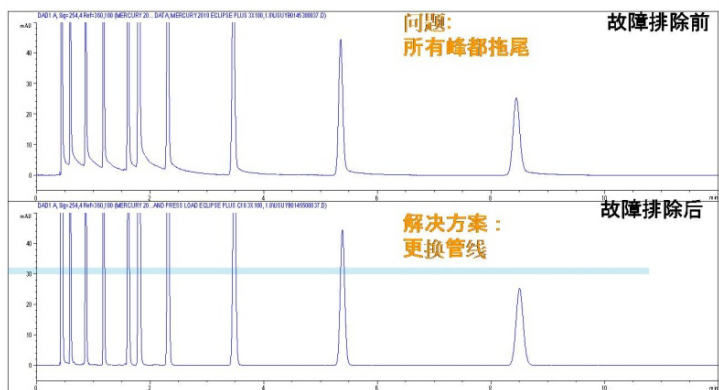
1200，毛细管工具包 #G1316-68716

如需查看工具包，请登录 www.agilent.com/chem/capillarykits

确保管线正确连接:

不恰当的连接： 色谱结果

LC 故障排除：连接管线未正确装配导致峰形较差

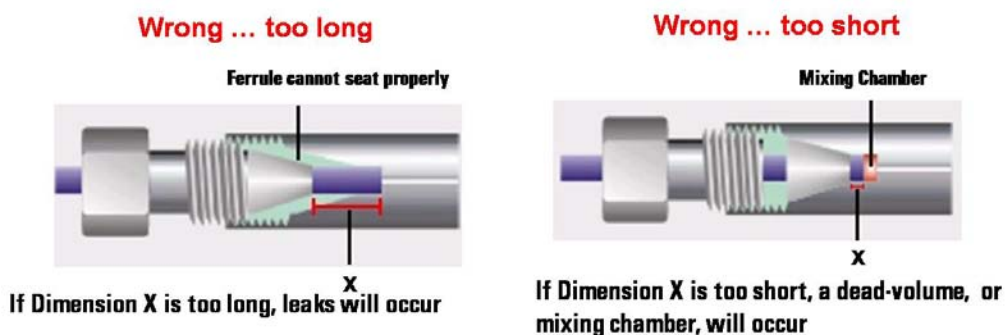


原因：连接自动进样器和色谱柱的毛细管线未正确装配至自动进样器末端（这将产生死体积）。

用聚酮接头连接色谱柱 Poroshell 120 (部件号 5042-8957)



垫圈安装不当将造成色谱峰展宽。要确保插入垫圈中的管线不要太长也不要太短。



优化流速:

优化流速以获得理想的柱效 (N) 或峰容量 (Pc)

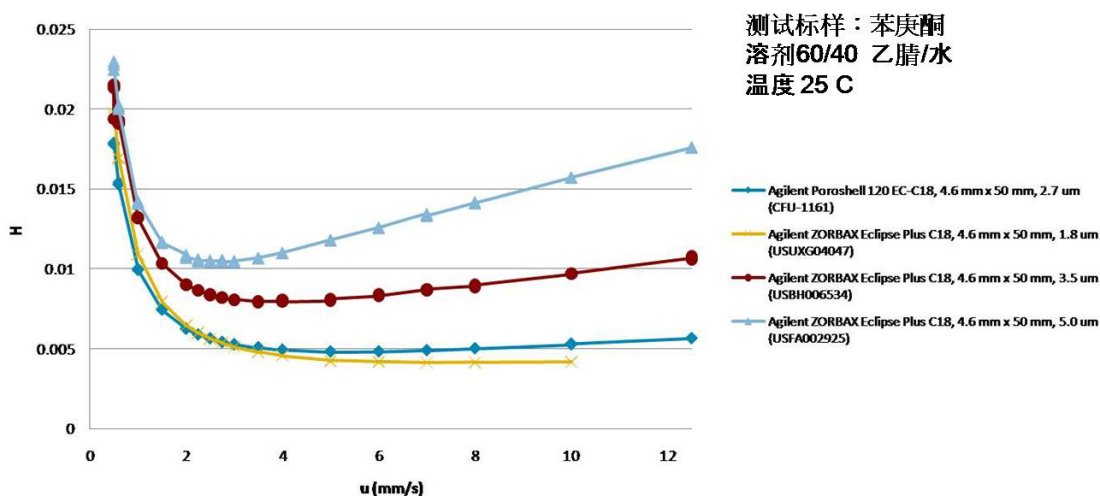
使用 Poroshell 120 推荐的起始流速：

2.1 mm ID: 从 0.42 mL/分钟开始

3.0 mm ID: 从 0.85 mL/分钟开始

4.6 mm ID: 从 2 mL/分钟开始

在 Poroshell 120 上使用更快的流速也是可能的。



正如此 Van Deemter 曲线所示，Poroshell 120 色谱柱的最佳流速比它取代的 5 μm 或 3.5 μm 色谱柱更快。

其它需要考虑的色谱因素：

应适度调整梯度和进样量以快速转换方法，以免过载。

应确保最大限度地减少样品在色谱柱中的扩散：

- 使用比流动相弱的进样溶剂，尤其是在使用等梯度方法时。
- 梯度方法可以最大限度地减少扩散，但要注意可能的影响。

Poroshell 120 柱可以获得与亚2微米柱相似的柱效，但压力大大降低。

用安捷伦1200 RRLC或1290 Infinity 同样可以获得优异的分析结果。

结论：

要得到最佳分离性能，应注意以下几点：

1. 优化数据采集速率（用快速响应时间的40 Hz检测器）
2. 使用您所拥有的最小流通池（当使用小色谱柱时，3 mm 微量流通池最合适）
3. 最大限度地减少柱外体积：流通池和连接管线最为重要，但针座也应换成较小体积的针座。
红色管线体积是绿色管线的一半。
4. 注意正确连接。
5. 优化流速以达到最佳性能。4.6 mm 柱从2 ml/分钟开始，3.0柱从0.85 ml/分钟，2.1 mm柱从0.42 ml/分钟开始。

如果您需要更多帮助，请向当地的安捷伦技术支持(lc-column-support@agilent.com)寻求帮助。