

使用 Agilent Polaris C18-A 色谱柱分离有机酸

作者

Rongjie Fu
安捷伦科技（上海）有限公司

Cuiling Wu
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

采用高含水量流动相等度 HPLC 方法通过 Agilent Polaris C18-A 色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 分析 6 种有机酸。然后将该方法扩展用于小粒径短色谱柱 (Agilent Polaris C18-A, 3.0 × 150 mm, 3 μm)。两款色谱柱均实现了所有有机酸的充分分离。

前言

许多有机酸（例如酒石酸和苹果酸）具有强极性，难以保留在反相色谱柱上。通常需要使用高含水量或缓冲液流动相才能获得所需的分离度。许多反相色谱柱在使用高含水量流动相时保留能力会随时间急剧下降。这种在高含水量流动相中分析物保留量的损失称为“固定相塌陷”^[1]。为防止固定相塌陷，改性的极性反相色谱柱在极性化合物分析中得到普遍应用。Agilent Polaris HPLC 色谱柱提供了多种极性固定相填料，能够可靠地分离极性和非极性分析物的混合物，并获得出色的峰形。极性嵌入式 C8 和 C18 键合相与 100% 水兼容，并提供不同的选择性，同时仍符合 USP L1 和 USP L7。

在本应用简报中，使用 Polaris C18-A (4.6 × 250 mm, 5 μm) 色谱柱，按照中国 GB5009.157-2016 方法^[2] 对有机酸进行了分析。同时使用小粒径 Polaris C18-A 色谱柱 (3.0 × 150 mm, 3 μm) 运行了该方法。

实验部分

试剂与化学品

所有试剂均为 HPLC 级或更高等级。HPLC 级甲醇购自 Merck (Billerica, MA, USA)。水经由 ELGA PURELAB Chorus 系统 (High Wycombe, UK) 纯化。磷酸购自 Sigma-Aldrich。标准品购自安谱实验科技公司（中国上海）。将有机酸溶解于水中制成混标溶液。各化合物的浓度如下：酒石酸，50 μg/mL；苹果酸，100 μg/mL；乳酸，50 μg/mL；柠檬酸，50 μg/mL；琥珀酸，250 μg/mL；富马酸，0.25 μg/mL。

设备与材料

- **色谱柱进样口**：Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接液相色谱接头（部件号 5067-5965）
- **色谱柱出口**：Agilent InfinityLab Quick Turn 液相色谱接头（部件号 5067-5966）
- 安捷伦样品瓶，螺口，棕色，带书写签，经认证，2 mL（部件号 5182-0716）

- 安捷伦固定螺口盖，蓝色，带 PTFE/红色硅胶隔垫（部件号 5190-7024）
- Agilent InfinityLab 溶剂瓶，棕色，1 L（部件号 9301-6526）
- Agilent InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖，GL45，3 口，1 个放空阀（部件号 5043-1219）

仪器

使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统，包括如下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B)
- Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129A)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，安装有 InfinityLab Quick Change 快速更换阀头，4 色谱柱选择阀，800 bar (5067-4279)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G4212B)

表 1. HPLC 条件

色谱柱	流动相组成	流速 (mL/min)	进样量 (μL)	柱温箱 (°C)	二极管阵列检测器
Agilent Polaris C18-A, 4.6 × 250 mm, 5 μm (部件号 A2000250X046)	97.5% 的 0.1% H ₃ PO ₄ 水溶液/2.5% 甲醇溶液， 或 100% 的 0.1% H ₃ PO ₄ 水溶液	1.0	20	40	210 nm, 10 Hz
Agilent Polaris C18-A, 3.0 × 150 mm, 3 μm (部件号 A2001150X030)		0.425	5	40	210 nm, 20 Hz

结果与讨论

图 1 显示了在 Agilent Polaris C18-A 色谱柱上运行简单的高含水量等度方法，对有机酸进行分析。图 1 中的色谱图是按照法规方法在等度流动相（97.5% 的 0.1% 磷酸水溶液/2.5% 甲醇溶液）条件下获得的。6 种化合物均实现了充分保留和分离。使用该方法对一种饮料样品进行了检测。在样品中检测到柠檬酸。

该色谱柱为极性嵌入式 C18 键合相，与 100% 水兼容，无固定相塌陷风险。该分析能够在 100% 的 0.1% 磷酸水溶液中进行，并且如图 2 所示，样品中一些目标分析物（例如苹果酸和柠檬酸）实现了出色分离。在 100% 水性流动相下进行 10 次连续进样，获得了良好的重现性，如图 3 所示。

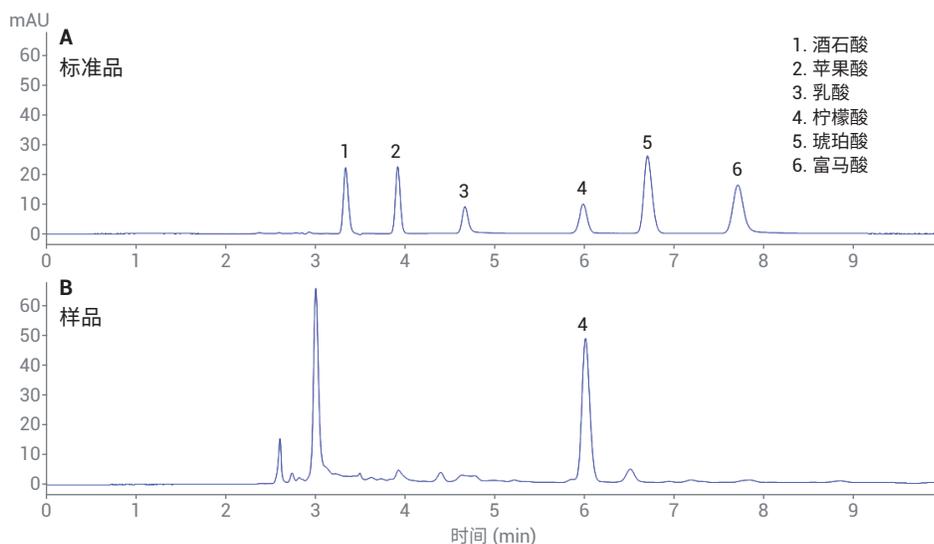


图 1. 使用 Agilent Polaris C18-A 色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 分析标准品和样品，流动相为 97.5% 的 0.1% H₃PO₄ 水溶液/2.5% 甲醇溶液

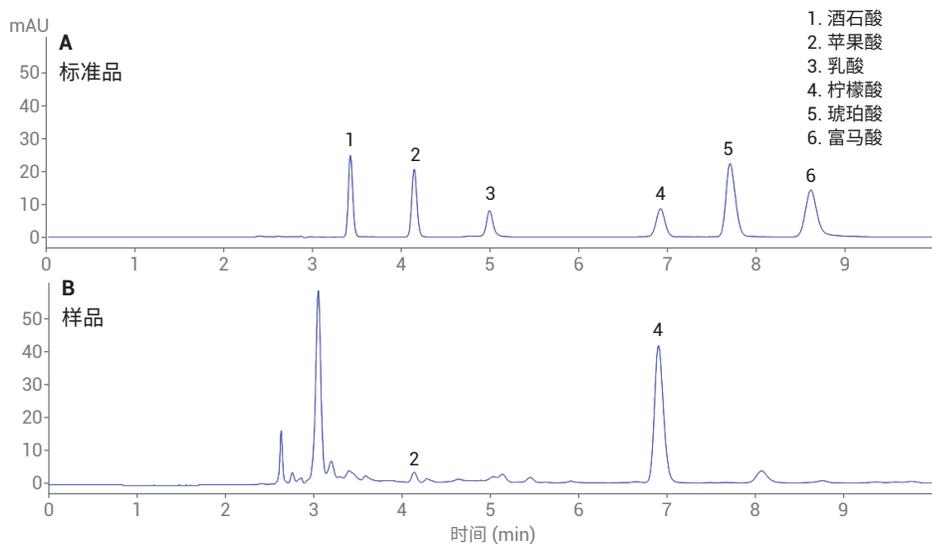


图 2. 使用 Agilent Polaris C18-A 色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 分析标准品和样品，流动相为 100% 的 0.1% H₃PO₄ 水溶液

为了节省分析时间和溶剂消耗，同时保持相同的分离效果，通常会采用小粒径色谱柱进行 HPLC 分析。安捷伦提供了 3 μm 和 5 μm 两种规格的 Polaris C18-A 色谱柱。在本应用简报中，将 5 μm Polaris C18-A 色谱柱方法转移到了 Polaris C18-A, 3.0 \times 150 mm, 3 μm 色谱柱上，如图 4 所示。两款色谱柱均实现了 6 种化合物的基线分离，但 Polaris C18-A, 3.0 \times 150 mm, 3 μm 色谱柱节省了 40% 的分析时间和 74.5% 的溶剂。

结论

使用 Agilent Polaris C18-A 色谱柱对多种食品样品中的 6 种有机酸进行了分析。极性嵌入式 C18 键合相能够很好地保留和分离有机酸等极性化合物，并且不会发生固定相塌陷。小粒径色谱柱 (3 μm) 不仅能够保持与 5 μm 色谱柱相同的分离效果，还能节省时间和溶剂消耗。

参考文献

1. Bidlingmeyer, B. A.; Broske, A. D. The Role of Pore Size and Stationary Phase Composition in Preventing Aqueous-Induced Retention Time Loss in Reversed-Phase HPLC, *Journal of Chromatographic Science* **2004**, 42
2. 食品中有机酸的测定, *食品安全国家标准*, GB5009.157-2016

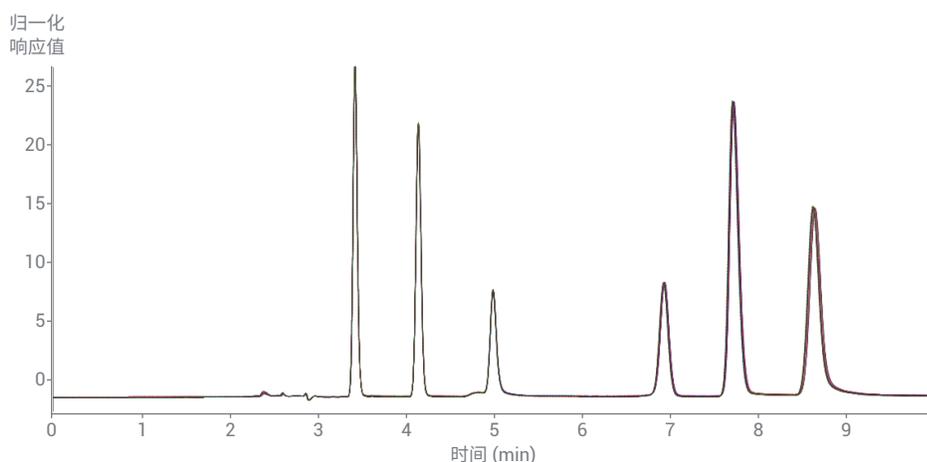


图 3. 连续进样 6 种有机酸的混标得到的色谱叠加图，所用色谱柱为 Agilent Polaris C18-A (4.6 \times 250 mm, 5 μm)，流动相为 100% 的 0.1% H_3PO_4 水溶液

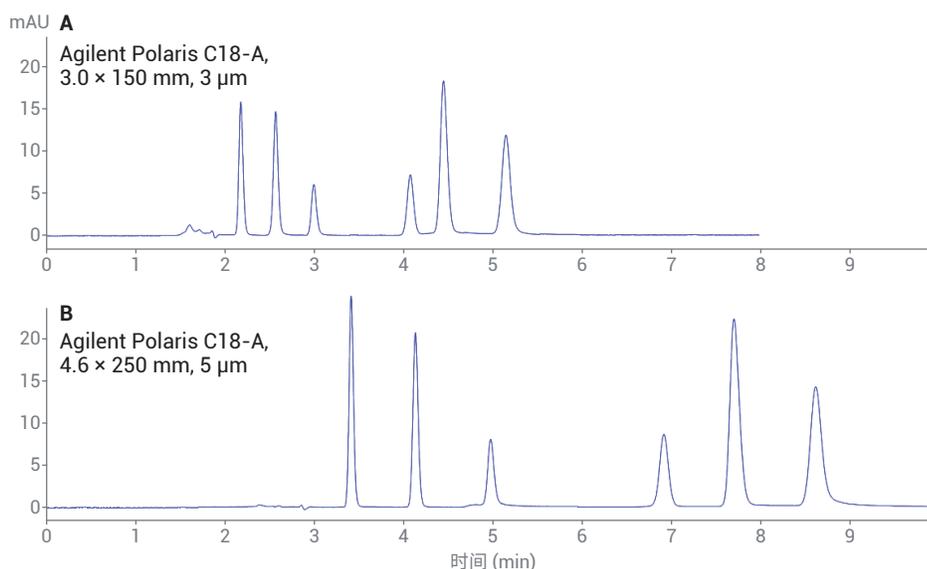


图 4. Agilent Polaris C18-A, 4.6 \times 250 mm, 5 μm 色谱柱与 Polaris C18-A, 3.0 \times 150 mm, 3 μm 色谱柱的分析对比，流动相为 100% 的 0.1% H_3PO_4 水溶液

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

DE.9669675926

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, 2020
2020 年 7 月 30 日, 中国出版
5994-2244ZHCN

 **Agilent**
Trusted Answers