



# 安捷伦高分离快速液相色谱 (RRLC) 分析孔雀石绿与结晶紫

安蓉 黄炯嘉 李琛琛

本文讨论了 HPLC 方法到 RRLC 方法的转换, 考察了不同延迟体积和温度对孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物梯度分离的影响; 主要考察了标准液相和快速高分离液相色谱技术对于孔雀石绿、隐性孔雀石绿、结晶紫和隐性结晶紫的分析结果; 还考察了延迟体积、自动延迟体积降低功能 (ADVR) 对分析结果的影响。

(一) 背景 孔雀石绿与结晶紫是有效杀菌的染料类药物, 它作为化学消毒剂, 因价廉、易得、高效、用量少, 在水产养殖疾病防治中曾被广泛使用。但是由于其具有高残留、高致癌、高致畸和致突变等副作用, 严重危害人类健康, 故包括我国在内的全世界许多国家已禁止其用于水产养殖业。对于孔雀石绿与结晶紫及其有毒代谢产物的分析, 也成为近年来全世界尤其是亚洲地区备受关注的课题。

目前对于水产品中孔雀石绿与结晶紫的分析, 主要采用液相色谱-柱后氧化-紫外检测法以及液质联用法。因孔雀石绿和结晶紫在水生生物体中会很快代谢生成残留毒性甚至更强于母体的隐性孔雀石绿和隐性结晶紫, 故对于这类样品的分析通常会要求同时检测 4 个相关组分, 即孔雀石绿 (Malachite green, MG)、结晶紫 (crystal violet, CV)、隐性孔雀石绿 (leucomalachite green, LMG) 和隐性结晶紫 (leucocrystal violet, LCV)。

日趋严格的法规压力与公众对食品安全的关注使食品安全分析成为目前最受关注的分析应用。大量样品与液质联用技术的普遍应用对于液相色谱亦提出了更高的要求。在保持或提高分离质量的同时, 用更短的时间完成色谱分析, 可以提高样品通量, 并节省溶剂。本工作的主要目的就是分析上述残留的常规 HPLC 分析方法转换成更快速并适于质谱检测的 RRLC 方法。

MG 与 CV 具有季铵盐结构, 相对极性较强; 而 LMG 和 LCV 则不带电, 极性相对较弱。上述极性差异, 使之在反相柱上保留相差也较大。其中, LMG 与 LCV 的疏水性很强, 需要较高的有机相比例才能将之从色谱柱中洗脱出来。基于上述原因, 对于上述 4 种物质的分离方法需采用梯度方法进行。此外, 结构差异易造成其紫外光谱的不同: MG 与 CV 在可见光区有很强烈的吸收, 而 LCV 和 LMG 则仅在紫外光区有吸收, 故液相色谱的紫外检测需要对这组化合物分别采用不同的检测波长, 或使用灵敏度更高的柱后氧化法将 LCV 和 LMG 氧化成具有可见光吸收的产物。本方法基于我国 GB/T 19857-2005《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》进行, 但仅采用了不同波长检测手段 (未使用氧化柱), 其中, MG 和 CV 采用的吸收波长为 588 nm; LMG 和 LCV 为 267 nm。用 Agilent Zorbax

系列 SB HPLC 色谱柱 (4.6mm × 150 mm, 5 μm) 在 1100 HPLC 系统上进行分析, 经梯度优化后, 获得了良好的分离结果 (见图 1)。

具体分析条件为, 仪器: Agilent 1100 高效液相色谱系统, 包括脱气机 (G1379A)、四元泵 (G1311A)、自动进样器 (G1313A) 和 VWD 检测器 (G1314A)。色谱柱: SB - C18, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm, P/N: 883975 - 902。流动相\*: A - 50 mM 醋酸铵 (用醋酸调 pH4.5); B - 乙腈。梯度: 见表 1。流速: 1~2 mL/min, 见表 1。

表 1 流动相梯度表

时间 (min)	A %	B %	流速 (mL/min)
0	40	60	
2.5	20	80	
7	20	80	
7.01	5	95	
9	5	95	
9.01	40	60	
10	40	60	2
14	40	60	2

检测: VWD, 采用波长切换功能, 0 min 588 nm, 6 min, 267 nm。柱温: 40 °C。样品: 孔雀石绿 (MG)、结晶紫 (CV)、隐性孔雀石绿 (LMG) 和隐性结晶紫 (LCV)。进样量: 5 μL。

(二) 标准延迟体积的 RRLC 系统: 从 HPLC 方法到 RRLC 的方法转换 从 HPLC 方法到 RRLC 方法的转换主要需要考虑系统延迟体积和色谱柱两个因素。其中, 系统延迟体积是

指梯度混合点到达色谱柱头的体积，会影响梯度到达色谱柱的时间，从而

影响梯度分离的结果。不同的液相色谱系统可能具有不同的延迟体积，故

了分离效果与 HPLC 相近的色谱图(见图 2)。

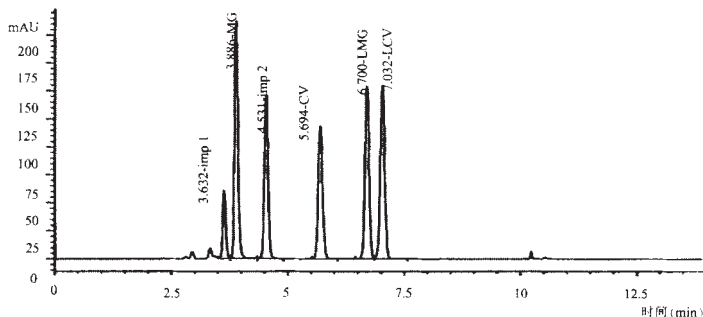


图 1 HPLC 梯度分离结果

注：(1) 因获得的 CV 标准样品不纯，故除 MG、CV、LMG、LCV 外，色谱图上还出现了两个杂质色谱峰。其中，保留时间在 4.531 min 的杂质是 CV 所引入的杂质。(2) 缓冲液浓度(50 mM)对于质谱比较高，时间所限只是完全按照原始法规 HPLC 分析方法的流动相。对于质谱分析，可以采用更低浓度(如 5~10 mM)的缓冲液进行。

对梯度方法的转换会产生直接的影响。此外，延迟体积大小亦影响梯度平衡的时间。色谱柱亦对分离有非常重要的影响：色谱柱填料直接影响分离的选择性，而色谱柱规格则影响方法转换的条件、难易程度和结果，是影响方法能够成功转换的关键因素。

采用具有与 HPLC 相同延迟体积的 RRLC 系统和相同的色谱柱会最大程度地降低方法转换的可变性。如用户在 1100 二元泵系统上开发的方法，可简单方便地直接转换成 RRLC 系统上的快速分离方法。因上述转换没有系统延迟体积与色谱柱(键合相和规格)的变化，故 HPLC 方法参数几乎无需变化。

在系统延迟体积与色谱柱填料相同的情况下，色谱柱规格亦对方法转换难易程度有很大影响。其中，色谱柱内径对梯度方法的转换影响较为复杂，其原因是不同内径的色谱柱会使用不同的最佳流速。即使 RRLC 系统与 HPLC 具有相同的延迟体积，但因内径不同的色谱柱的流速不同，梯度到达柱头的时间亦各不相同。采用与 HPLC 方法相同内径 RRHT 色谱柱，可以减少方法转换中需要调整的参数。RRLC 系统可使用 4.6 mm 内径常规 HPLC 色谱柱，因而可以非常方便

地将 HPLC 方法转换成高分离度快速的 RRLC 方法。

不同的色谱柱键合相具有不同的色谱分离选择性。Agilent Zorbax RRHT 具有非常丰富的键合相种类，使用户可以很容易将原有 HPLC 方法转化成使用 RRHT 填料的 RRLC 分离方法。本工作选用了 Agilent Zorbax SB C18 RRHT 色谱柱，该色谱柱与 HPLC 用 SB C18 色谱柱具有完全相同的选择性，只是填料颗粒不同。采用根据洗脱柱体积相同的原则进行折算(使用 Agilent 公司的 Method Translator 可方便地获得折算后的参数)，将上述 HPLC 方法直接转化到采用 SB 2.1 mm × 50 mm 含 1.8 μm 填料的 RRHT 色谱柱，在 RRLC 系统上获得

具体分析条件为，系统：Agilent 1200 高分离度快速高效液相色谱，包括在线脱气机(G1379B)、SL 型二元泵(G1312B)、SL 型自动进样器(G1367C)、SL 型柱恒温箱(G1316B)和 SL 型二极管阵列检测器(G1315C)。检测池：2 μL。Peakwidth：0.01 min (0.2s)。Slit：4 nm。色谱柱：RRHT SB C18 2.1 mm × 50 mm，1.8 μm。流速：0.5 mL/min。梯度：见表 2。进样量：2 μL。检测：DAD，267 和 588 nm。进样器之后的管线，进样针座毛细管(Seat capillary)，色谱柱前后连接管线：0.17 mm。柱温：室温 25.5。其他条件与图 1 相同。

表 2 流动相梯度表

时间 (min)	A %	B %
0	40	60
0.95	20	80
1.2	20	80
1.21	5	95
2.0	5	95
2.01	40	60
2.33	40	60
3.5	40	60

因色谱柱规格(尤其是内径)有所变化，故方法需要进行进一步优化。调整与简化梯度方法，将色谱柱前后的管线更换成内径更细的 0.12 mm 管线，并提高柱温至 40，最终获得了比较满意的分离结果(见图 3)。与

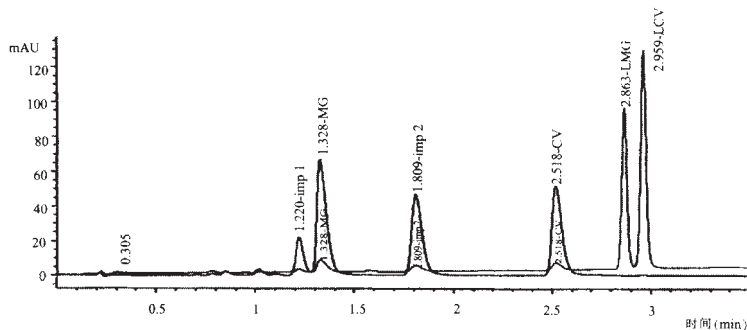


图 2 RRLC：从 HPLC 方法直接线性转换成 RRLC 方法

注：因分离时柱温较 HPLC 低，且进样器之后使用了内径为 0.17 mm 的管线，故色谱峰(尤其是前 3 个色谱峰)展宽比较大。

HPLC 相比, 优化后的 RRLC 方法分离时间 (包括梯度平衡时间) 缩短了 4 倍 (14 ~ 3.5 min), 溶剂节省了 92% (21 ~ 1.75 mL)。与由原始方法直接转换的 RRLC 方法相比 (图 2), 因为柱后体积降低和温度的提高, 色谱峰展宽亦显著降低。

具体分析条件为, 检测: DAD 波长切换, 0 min 588 nm, 2.5 min, 267 nm。梯度: 见表 3。柱温: 40。进样器之后

的管线, 进样针座毛细管 (Seat capillary): 0.17 mm; 色谱柱前后连接管线: 0.12 mm。其他条件与图 2 相同。

表 3 流动相梯度表

时间 (min)	A %	B %
0	42	58
1	10	90
1.2	10	90
1.21	42	58
2.5	42	58

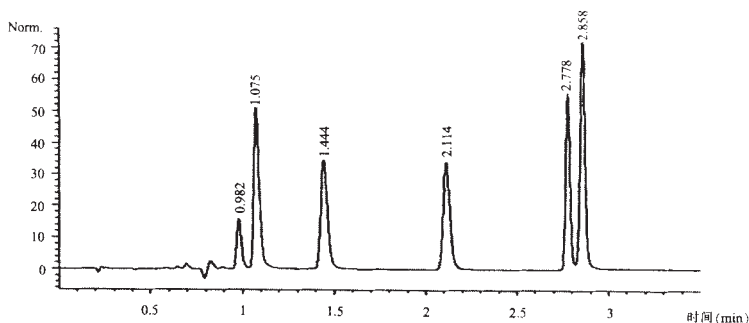


图 3 RRLC 标准延迟体积优化分离结果

(三) 标准延迟体积 RRLC 系统: 使用 ADVR 功能的分离结果 ADVR (Automatic Delay Volume Reduction) 是 Agilent 自动进样器自动降低延迟体积功能, 该功能可以在进样后旁路进样针和定量环等, 从而进一步降低系统的延迟体积, 是 Agilent 公司为用户进行高通量分析提供的另一灵活方式。利用此功能可以降低系统体积, 从而加快分离速度。本工作在标准延迟体积下, 使用与图 3 实验完全相同的色谱条件, 启动 ADVR 功能, 考察了该功能对分离的影响 (见图 4a 与 4b)。从实验结果可知: 前 3 个色谱峰的保留时间基本没有变化, 而从第 4 个色谱峰以后的 3 个色谱峰 (即 CV、LMG 和 LCV 色谱峰) 的保留时间缩短了。因此, 使用 ADVR 功能对此梯度分离可以在保持理想分离度的前提下, 加快分离速度。同时, 色谱峰宽亦有所降低, 如 CV 色谱峰的峰宽由未使用 ADVR 功能前的 0.0401 min, 降低到使用 ADVR 功能后的 0.0297 min。

(四) 低延迟体积 RRLC 系统: 进一步加快分离速度 因本工作采用窄柱 (2.1 mm 内径) 进行分离, 为进一步加快分离速度, 尝试采用低延迟体积的 RRLC 系统。低延迟体积的 RRLC 系统是将混合器与阻尼器旁路, 由此将标准 600 ~ 800  $\mu\text{L}$  的延迟体积降低到 120  $\mu\text{L}$ 。采用相同的梯度方法, 低延迟体积 RRLC 系统所获得的分离结果正如所料: 分析速度进一步加快, 最后一个色谱峰的出峰时间由

原来标准延迟体积系统的 2.86 min (不使用 ADVR 情况下), 提前到 1.93 min (见图 4c)。具体色谱条件同图 3。

(五) 低延迟体积 RRLC 系统: ADVR 功能对分离的影响 本实验在低延迟体积的 RRLC 系统中, 采用 ADVR 方式, 结果是使分离的选择性发生了显著变化: 所有色谱峰在 ADVR 状态下保留时间皆明显缩短。低延迟体积系统中, ADVR 对分离的影响较大, 推测是低延迟体积系统中, 进样器对整个系统的延迟体积贡献较大所致。这一实验结果进一步反映了延迟体积对分离的影响 (见图 5)。具体分析条件同图 3。

通过上述不同方式对延迟体积的调节可以看出: 延迟体积降低不仅可以缩短分离时间, 而且可以影响此梯度分离的色谱峰宽 (见表 4), 甚至影响色谱分离结果。

## (六) 结论

1. 系统延迟体积对 HPLC 方法到 RRLC 方法的转换有非常重要的影响。具有与 HPLC 系统相同延迟体积的 RRLC 标准延迟体积系统会降低方法转换的可变性, 使方法转换简单易行。根据洗脱柱体积相同原则直接获得的 RRLC 梯度方法, 可以作为 RRLC 方法转换的良好起点。

2. RRLC 系统具有可调延迟体积的功能, 可为用户提供方法开发的灵活性: 用户既可以采用标准延迟体积

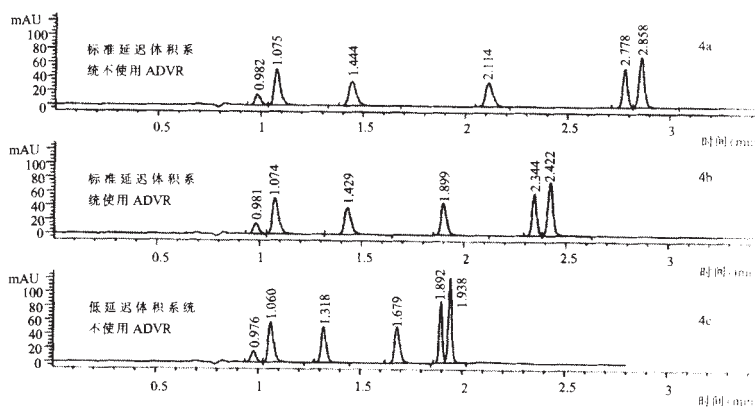


图 4 RRLC: 标准延迟体积 (ADVR 使用前后) 与低延迟体积系统分离比较

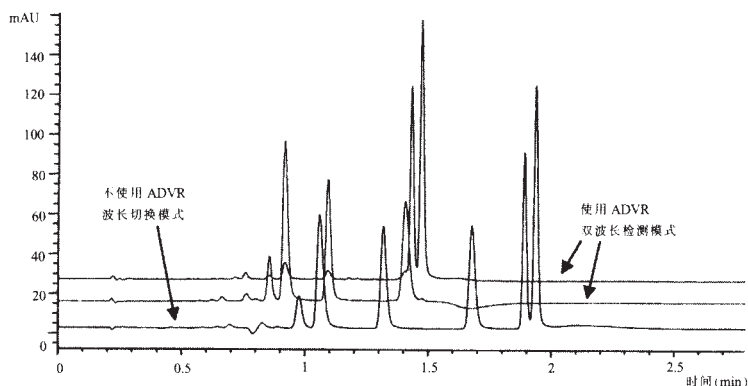


图 5 低延迟体积 RRLC 系统: ADVR 使用前后比较

表 4 不同延迟体积的 RRLC 分析对 CV 峰的峰宽比较<sup>\*</sup>

系统	HPLC	RRLC			
		标准延迟体积 600 ~ 800 $\mu\text{L}$			低延迟体积 120 $\mu\text{L}$
延迟体积	标准延迟体积 600 ~ 900 $\mu\text{L}$	不使用 ADVR	不使用 ADVR	使用 ADVR	不使用 ADVR
温度 / 管线内径	40 / 0.17 mm	25.5 / 0.17 mm	40 / 0.12 mm		
CV 色谱峰峰宽 <sup>**</sup>	0.0983	0.0541 min	0.0401 min	0.0323 min	0.0301 min

<sup>\*</sup> 梯度方法略有不同

<sup>\*\*</sup> 色谱柱前后管线 (Seat capillary 除外)

将 HPLC 方法直接成功转换为相应 RRLC 方法, 又可以采用低延迟体积配合 ADVR 方式进一步加快分离速度, 为方法转换和开发提供灵活性。

3. 色谱柱对方法转换的成功与否有至关重要的影响。Zorbax RRHT 色谱柱具有十分丰富的规格和键合相种类, 是用户进行成功的方法转换的保证。使用与 HPLC 具有相同内径和键合相的色谱柱可以大大简化方法转换的过程。本方法采用与 HPLC 方法具有相同填料的 RRHT 色谱柱, 在加快分离速度的前提下, 可以获得与 HPLC 相同的分离结果。

4. 色谱柱温会影响到色谱分离的保留时间和色谱峰宽。控制柱温有利于保持分离的重现性; 柱温亦可以作为调节色谱分离的选择性与峰形的手段。(作者单位: 安捷伦科技有限公司北京亚太实验室 北京 100085)