

有效UPLC的实现

Mark DAWSON

摘要 本文介绍了超高效液相色谱(UPLC)方法的成功实现。系统中泵、阀、色谱柱和检测器的设计以及如何将其连接成为一个独立的UPLC系统都是至关重要的。

高效液相色谱(HPLC)科学已经发展了很多年,我们见证了HPLC在化学和仪器方面的许多变革。随着色谱柱颗粒直径逐渐由10 μm 、5 μm 降低到3.5 μm 以及色谱柱柱尺寸的减小,分析分辨率得到提高,分析时间也得以缩短。然而,随着前几年直径小于2 μm 填料的推出,HPLC的前景真正地得到了改变。这种填料不仅提高了分辨率,同时提供了非常有效的线性速率范围(流速/柱直径),并显著地改进了分析速率。本文用图1所示的众所周知的van Deemter曲线解释了这一现象。1956年,Jan Josef van Deemter通过线性速率论证了填料粒径和柱效之间的关系,并由此确定最高分辨率所对应的最佳流速。根据这一假定,柱效与粒径大小成反比。图1显示了每种HPLC填料的最佳线性速率。对于粒径为1.7 μm 的填料颗粒,其流速的“最佳点”明显地延长。这正是很多实验室采用这一技术的原因。这意味着经几何尺寸缩放后,HPLC到超高效LC或者说UPLC(Waters Corp., Milford, MA)的发展使得色谱可在线性速率(流速)增加到2倍甚至3倍时做到分辨率几乎不受影响。分辨率、分析速度和灵敏度(较小的柱容量使得样品不用大量稀释)等多方面的改进,提高了分析通量,节省了样品和溶剂(见图2)。

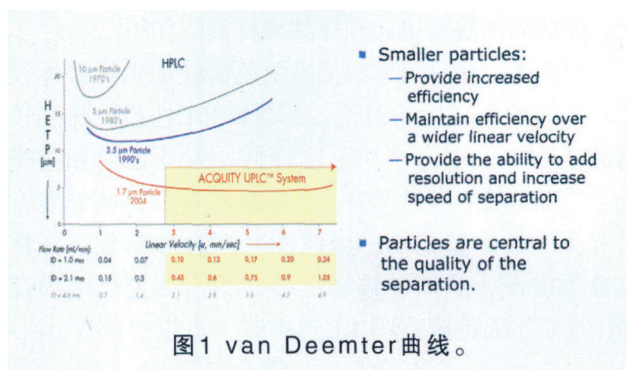


图1 van Deemter曲线。

作者简介

Mr. Dawson is Principal Systems Specialist, Waters Corp., 34 Maple St., Milford, MA 01757, U.S.A.; tel.: 508-478-2000; fax: 508-482-3373; e-mail: mark_j_dawson@waters.com.

该文已获得American Laboratory/Labcompare再版许可。

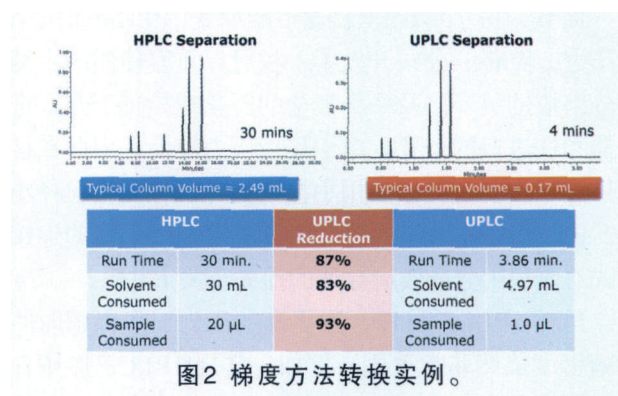


图2 梯度方法转换实例。

在提高流速的同时,为了有效地发挥细柱内小粒径填料的作用,整个系统要求高压、较小的死体积和分散度。本文阐述了由一个溶剂传送系统(泵)、一个样品处理系统(进样器)以及一个专门为UPLC设计的检测器所组成的系统的性能,以及它们对粒径小于2 μm 的填料颗粒分离性能的影响。

这里,最为重要的一个问题是,系统当中无论是由色谱柱还是仪器本身产生的任何柱效损失,都会极大地影响分辨率。基于上述原因,Waters公司为使用粒径小于2 μm 填料柱的系统采用整体分析策略,形成了如今的液相色谱(LC)仪器工业。这一策略始于为内径(i.d.s)在1.0~2.1 mm之间的小容量色谱柱设计小粒径填料。这种规格内径的柱子具有较小的背压,其热效应也更容易控制。与线性速率匹配的流速相对较低,但整个系统的容量相对经典HPLC系统来讲显著减小。最后,也是最困难的,就是必须使分散效应或者由仪器操作和设计导致的分离损失降到最低。系统中柱外因素对分散度的影响会抵消小粒径填料所带来的优良的分离效果。这一影响可以通过频带扩展这一传统方法进行测定。

第一个需要考虑的设计问题是柱管的质量是否

可以耐受UPLC的运行条件。为了减少对UPLC分辨率的影响,柱外效应需要降到最低。仪器模块组装时要缩小部件间的距离,缩小系统体积,使流路的死体积更小。(注:UPLC柱管通常需要按规格进行裁切,绝不可以进行手动切割。事实上,Waters公司将柱管的端部打磨光滑,并在将其上架之前充分清洗以清除一切可能的污染物。UPLC灵敏度非常高,微量的污染物都能被其检测出来。)

而且,由于传统LC装置不能承受UPLC系统的运行压力,Waters公司开发了一种可以重复使用的由两部分组成的压环以及一个镀金的压紧螺栓置于泵、进样器和柱进口的位置。由于柱后压力较低,因此在柱出口和检测器上可以使用手拧的配件。在使用粒径小于 $2\ \mu\text{m}$ 填料进行分析的过程当中,采用正确的连接方式对避免由分散效应导致的损失至关重要。

虽然UPLC泵可以产生更高的压力,但保留时间的精密度依然非常重要。例如,常规HPLC谱图中在50 min内洗脱6个组分,若采用UPLC只需要5 min,而且其峰鉴定与传统的HPLC效果相当,其系统适配性测试依然有待于继续进行。ACQUITY UPLC®系统采用了一种自动并连续压缩性补偿算法,使操作者无需干预即可满足分析精密度的要求。保留时间的重现性非常好。电子控制的止回阀确保阀门可以迅速关闭,改进了分离性能并具有一流的可靠性。

ACQUITY®系统提供了两种类型的泵:二元泵(高压混合)和四元泵(低压混合)。用户可以根据需求选择最适合的泵。在泵系统中溶剂混合是非常重要的,这其中包括了pH值的自动选择以及甚至达到对9种溶剂(相对于二元系统是4种溶剂)的混合。设置比例阀在泵前进行低压混合的代价是死体积有所增加。如果循环时间对于用户来讲非常重要,那么使用二元泵可以获得最小的死体积与最短的再平衡时间。为了优化泵的运行并放空系统压力,这个UPLC泵包含了一个切换废液流路的高压阀。这一设置允许泵在较高流速下进行自动优化,而粒径小于 $2\ \mu\text{m}$ 填料的填充柱在线运行不会带来高背压。

ACQUITY UPLC系统的样品处理器可以达到2个设计目标:1) 将样品引入高压溶剂的流路中,这一压力远高于大气压;2)样品的进样体积比传统的HPLC柱更小。进样体积就像流速一样,需要按照HPLC和UPLC柱体积比例进行确定。在前面所述的柱体积的例子当中,一个 $20\ \mu\text{L}$ 的常规HPLC进样体积转换到UPLC只需 $1.4\ \mu\text{L}$,而一个 $10\ \mu\text{L}$ 的常规

HPLC进样体积转换到UPLC只需 $0.7\ \mu\text{L}$ 。

第一个ACQUITY UPLC的进样器是基于定量环进行设计,即样品从一个小样品瓶当中被吸出后转入一个样品定量环,然后通过样品阀位置的切换开关,将样品注入。这种设计具有两个优势:分散性低和死体积小。而对于应用于很多HPLC系统的直接进样器,进样针是进样环的一部分,这样针和定量环的体积加起来比允许的最大进样体积高2倍。2010年,Waters公司设计了一个低分散、低死体积的自动进样器,而且其管路和进样阀具有更好的耐受能力。直接进样器的死体积比定量环的死体积大,这是由于进样针的全部体积都要计入,延长了一次循环时间。

基于定量环的样品管理器提供了环填充、转移和进样三种模式。这其中包括了常见的部分充满定量环模式和全充满定量环模式。第三种模式特别用于进样体积为 $10\ \mu\text{L}$ 或者更小时,这种模式被称为“不充满定量环针头溢出”模式,或称作“PLUNO”。在PLUNO中,样品体积通过进样器管进行量取,然后通过切换进样阀的位置将样品从后边导入定量环。其空气间隙和超过 $15\ \mu\text{L}$ 的样品稀释液可以保证进样器表面被样品润洗,从而降低被分析物由于在进样针内表面吸附而造成的损失。该方法准确度高,样品损失少,平衡了样品消耗和进样周期时间。

基于定量环的进样器需要2种进样针清洗方式:强清洗去除任何残留的样品组分;接下来进行弱清洗去除强清洗剂并使流路系统恢复到初始或平衡状态。这对得到好的色谱分析结果并排除过载现象非常重要。在部分充满定量环模式当中,也需要注射弱清洗剂,因此弱清洗剂也起到样品稀释剂的作用。

目前有一些关于UPLC系统色谱柱加热器整体设计对性能的重要性的讨论。如果UPLC柱被加热到较高的温度,由于流动相黏度降低,反压也会相应降低。然而,在UPLC当中,在增加流速和升高温度方面有更大的调整范围。温度的升高会影响到选择性或分离度,从而导致峰漂移。当需要把已经存在的HPLC方法转换到UPLC当中时,可以查阅Waters Electronic Column Selectivity Chart (<http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475>),这是一个对于选择一种与HPLC柱对应的UPLC柱非常有帮助的工具。应用于ACQUITY UPLC eCommunity (www.waters.com/myuplc)中的ACQUITY Columns Calculator工

具可以帮助分析者制定需要的几何缩放比例、进样体积、流速以及梯度程序。一个有用的实验是将温度升高10℃，流速增加0.1 mL/min，相应调整梯度与减少运行时间，然后评价实验结果。可以发现，反压只有很小的一些改变。方法的转换必须符合标准化的操作程序(SOPs)和设备特定要求。方法转换的范围可以多样化；研发部门可以比质量控制(QC)部门具有更大的可允许误差。

一些使用者担心所分析的样品对热不稳定，他们发现样品在UPLC柱上的滞留时间通常明显短于在HPLC柱上的滞留时间，因此有必要考虑温度因素。柱温稳定器在这里非常重要，可以保证流动相和样品组分的温度与柱温一致。其基本作用是作为一个热交换器将溶剂从室温升高到所设定的柱温，并具有最小的附加体积。同样，在ACQUITY UPLC系统当中，柱支撑夹可以避免柱上任何部位的温度过高，从而尽可能地使保留时间的精密度得到最优化。由于小粒径填料柱的材料比常规的HPLC部件要小一些，Waters公司提供了柱过滤器和预柱以防柱堵塞。柱加热器可使用eCord™技术，这一技术包含了色谱柱的制造信息并可将其提供给使用者。eCord与样品处理器以及ACQUITY UPLC系统连接，可以储存并增加运行过程中的进样次数、最大压力与最高温度等有用数据。

最后，UPLC方法中所使用的检测器作为整体分析策略中的一部分也需要进行优化。在UPLC分离中，谱峰更高更窄，分析时间通常很短，柱上的样品量也会相应减少。基于以上特征，我们需要优化吸光率、荧光、蒸发光散射以及应用于UPLC的质谱(MS)检测器的条件。对MS检测器的优化提高了混合物中组分的特异性灵敏度。

系统和柱上容量的降低造成的稀释效应的降低是灵敏度得以提高的原因之一，而另一个原因则是较低的流量导致较低的离子化能量以及流动相分子竞争减弱，从而增强了小且浓缩的UPLC峰的离子化。这是当前很多实验室将UPLC与MS检测器进行联用的主要原因。甚至对于样品量受限情况下的应用(例如对于血清斑点的分析)，已经开发了一个更低流速模式下的分析系统——nanoACQUITY UPLC系统——可以在nL/min和μL/min的流速下进行操作。

对于可变紫外(TUV)和光敏二极管阵列(PDA)检测器，设计上的改进包括使用更高强度的检测灯以及使用反射性更强的材料制成的检测流通池。如果

UV检测器是系统当中的最后一个检测器，出口处需要一个250 psi的背压调节器，降低因溶剂压力由UPLC的高压降到大气压的过程中溶液中出现的气泡残留而导致的背景噪声。

由于UPLC的谱峰相对HPLC而言更高更窄，故其信噪比得到了提高。因而UPLC的检测器必须要达到更高的数据采集速率，最高可达到每秒80个点(80 Hz)。通常HPLC的谱峰宽度在20 s，每秒采集1~2个点合适的。而UPLC谱峰宽度只有1~2 s，因此一般UPLC每秒可采集10~20个或者更多的点。一般而言，像Waters Empower®这样的色谱软件需要对每个谱峰至少采集15个数据点以实现重现性积分，每秒采集30个点以进行较好的定量。

下面举个例子进行说明。如图3所示的谱图的一部分展示了由不同的数据采集速率获得的峰形。和一般的UPLC类似，总的x轴刻度在4 s左右。在采集速率为1个点/秒时，两个峰合并为一个，说明这一采集速率太慢了；甚至采集速率达到5个点/秒时仍然不足；40个点/秒时两个峰可以完全分开，且峰形完整，可用于定量。

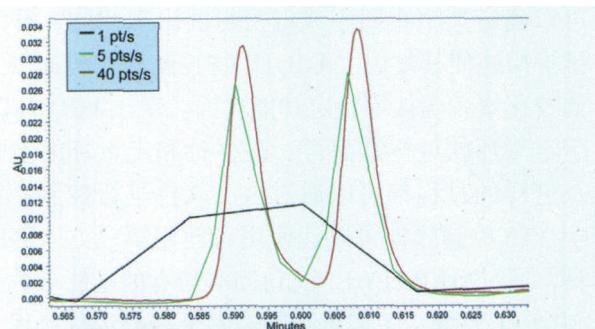


图3 使用不同的数据采集速率得到的色谱图峰形。

虽然狭窄的UPLC谱峰集中在一个很短的时间范围内，但柱上的样品量和实际的峰容量也都比较低。这需要一个相对于常规HPLC设备更小的适用于UPLC的UV、荧光与蒸发光散射(ELS)检测流通池，以及适应更低UPLC流量的优化后的质谱电喷雾装置，以避免UPLC谱峰发生稀释和变形。仅提高数据采集速率对提高UPLC峰的显示效果作用不大，需要同时减小检测池的体积。Waters公司的紫外/可见光(UV/Vis)检测器使用了Teflon® (DuPont, Wilmington, DE) AF技术实现了不降低检测流通池光程的条件下降低了其体积。

作为对样品采集速率的一个补充，数据过滤参数也是需要考虑的。图4显示了当信号过滤参数设置过高时，分辨率明显降低。HPLC系统通常设置过滤

参数为1.0 s，但这一条件在快速色谱分析中无法得到想要的结果。一个解决的方式是不设过滤参数或者根据需要设定。

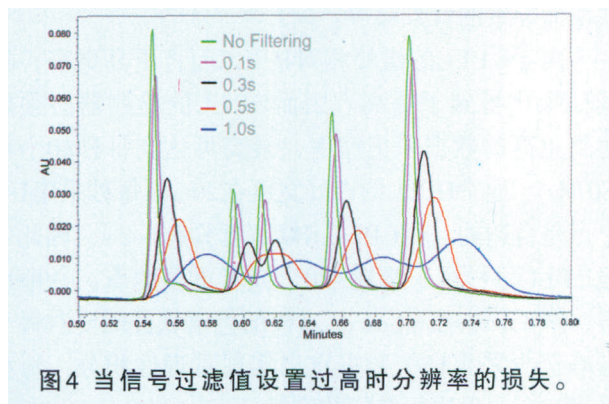


图4 当信号过滤值设置过高时分辨率的损失。

UPLC分析系统还具有一些其他的特点，比如拥有一个可以有效支持ACQUITY UPLC系统性能、维护和问题诊断的CQUITY控制软件，这是一个实时的绘图软件界面。通过这一软件可以进行UPLC系统的运行状况监视、直接控制、维护以及排除故障。例如，其控制功能使操作者可以监控系统的背压，从而评估泵的性能；通过监控每一个泵头，操作者可以确定某个止回阀或者密封圈出现问题，并采取维护措施使其复位。ACQUITY控制软件也提供了诸如校正或者确认等特定功能界面。对于ACQUITY基于定量环的进样器而言，进样针和定量环的参数以及进样的过程都可以通过这一软件进行控制。ACQUITY控制软件可以让使用者使用第三方软件的工具，通过ACQUITY UPLC诊断和所有的功能参数去控制UPLC系统，无需重新制定一个新的运行流程，方便了任何ACQUITY UPLC系统的使用者。

通过AccQ·Tag™ Ultra方法在ACQUITY UPLC系统中进行氨基酸的定量分析的例子说明在UPLC运行当中对准确度和精密度的要求。装配完成后，系统采用50 pmol/μL的样品浓度进行测试。定量环体积为2.0 μL，进样体积为1.0 μL。不包括平衡时间的运

行时间为9.5 min。值得一提的是，在6次重复运行当中，保留时间和峰值的重现性都非常好，相对标准偏差低于1.0%。图5是浓度为10 pmol/μL的细胞培养样品的色谱图，显示有30个峰。

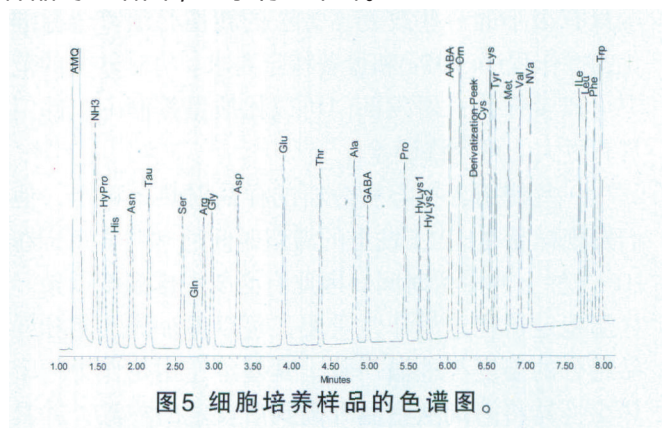


图5 细胞培养样品的色谱图。

Waters组织了题为“UPLC方法的有效实施”的研讨会，讨论了扩散过程对分离质量的影响，并提供了一个有效的和程序化分离的实例，说明了UPLC系统当中一个微小的改变会造成整个分析性能的改变。

再来看看连接到进样器高压阀的定量环的任一端上的配置。如果定量环没有正确地安装，装置没有进行正确地装配，系统体积/分散性就会变得不理想，从而造成谱峰的扭曲变形。诸如图5所示的结果将受到负面影响。一个安装不当的定量环会使峰形扭曲，对系统承载量产生负面影响。从金属环延伸出来的管路长度的微小差异可能会在阀的端口出现液流蓄积，造成色谱峰的进一步变形。为弥补这一缺陷并方便使用，需要在定量环的其中一端进行标记，从而容易辨别与定量环相接的阀端口的1和4位。将每个定量环都固定在UPLC系统/进样阀夹上也是一个很好的实践。这进一步解释了为什么UPLC管路必须按规格裁切以使末端光滑的原因。

综上所述，为实现UPLC的成功运行，UPLC系统中泵、进样器、色谱柱和检测器的设计以及如何将其组装成一个独立的系统，都是至关重要的。

Effective UPLC Implementation

Mark DAWSON

This article demonstrates successful implementation of UPLC®. The design of the system pumps, injectors, columns, and detectors, and how they are integrated together into a single system, are critical components.