

## 综述与进展

## 超高效液相色谱产生的理论和技术背景

姚碧霞, 翁文\*

(漳州师范学院化学与环境科学系, 福建 漳州 363000)

**摘要:** 阐述了超高效液相色谱产生的理论和技术背景, 指出液相色谱速率理论、色谱保留理论等的研究, 色谱仪器的整体优化、新型色谱填料(球形亚二微米填料、整体化材料、核壳型填料、色谱饼等)的开发大大推进了色谱科学的发展, 共同推进了超高效液相色谱的产生。新型色谱填料的研发仍将是今后研究的重点, 分析在科学人才培养方面则应注意理论研究与技术创新相结合。

**关键词:** 色谱速率理论; 色谱保留理论; 超高效液相色谱; 整体柱; 核壳型固定相; 色谱饼

**中图分类号:** O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-8143(2011)02-0015-06

## Theoretical and Technological Background for the Development of Ultra Performance Liquid Chromatography

Yao Bi-xia, Wen Weng\*

(Department of Chemistry and Environmental Science, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

**Abstract:** Theoretical and technological background for the development of ultra performance liquid chromatography (UPLC) was illustrated. The development of chromatographic science and UPLC was closely related to the studies of chromatographic rate theory and chromatographic retention model, the optimization of chromatographic apparatus and the preparation of novel chromatographic packing materials (sub-2  $\mu$  m particles, monolithic column, core-shell stationary phase, chromatographic cake). Training of the talented people for analytical science must pay attention to the combination of theoretical research and technological innovation.

**Keywords:** chromatographic rate theory; chromatographic retention model; ultra performance liquid chromatography; monolithic column; core-shell stationary phase; chromatographic cake

自从 1903 年俄国植物学家 Tswett 利用柱色谱分离色素起, 已经一百年过去了, 这期间色谱分离法得到了长足的发展。尽管只有一次诺贝尔化学奖直接授予色谱分离领域(1952 年 Martin 和 Synge 因发展分配色谱而获该奖项), 但化学的发展与色谱法的发展是密不可分的。20 世纪 60 年代末把高压泵和化学键合固定相用于液相色谱而出现了高效液相色谱(HPLC), 更是大大推动了化学学科乃至生

物学、医学的发展。科学与技术发展的脚步从未停息过, 超高效液相色谱(UPLC)已逐渐进入人们的视野, 必将成为推动科技发展的又一新动力。

### 1 液相色谱速率理论

1956 年 Van Deemter 等提出了著名的色谱速率理论, 首次定量地描述了柱效与流速的关系(式 1)。

收稿日期: 2010-12-6

基金项目: 国家自然科学基金 20705031 资助

作者简介: 姚碧霞(1976-), 女, 讲师, 主要从事色谱分离分析工作。

\* 通讯作者: 翁文, 教授。E-mail: weng\_wen@126.com

式 1 中  $H$  代表理论塔板高度,  $A$  为涡流扩散项,  $B$  为纵向扩散项,  $C$  为传质阻力项,  $\bar{u}$  为载气的平均流速。这一理论是在气相色谱研究的基础上提出, 后被推广用于高效液相色谱(式 2)<sup>[1]</sup>。式 2 中  $d_p$  为固定相的平均粒径,  $\lambda$  为固定相的不均匀因子,  $\gamma$  为填料间的弯曲因子,  $D_M$  为溶质在液体流动相中的扩散系数,  $t_d$  为样品分子被吸附在固定相表面的平均停留时间,  $k'$  为保留因子,  $\Omega$  为色谱柱的填充因子,  $\Phi$  为孔洞中滞留流动相占总流动相的百分数,  $\gamma_0$  为颗粒内部孔洞的弯曲因子,  $u$  则为流动相的流速。Knox 也提出了相似的方程式。

从式 2 可以看出,  $d_p$ 、 $\lambda$ 、 $\gamma$ 、 $\Omega$  值越小,  $H$  值越小, 可获得更高的柱效。这正是人们追求小粒径球形填料的理论基础。从图 1 也可以看出, 填料粒径越小, 塔板高度越小, 柱效越高。在高效液相色谱的发展历史上, 经历了使用  $37 \sim 55 \mu\text{m}$  的薄壳型固定相,  $5 \sim 10 \mu\text{m}$  无定形或球形全多孔固定相。到上个世纪末期, 则发展了  $3 \mu\text{m}$  或  $3.5 \mu\text{m}$  的球形硅胶, 以满足快速分离的需求。另外, 减小填料的粒度也有利于发挥高流速的优势, 可以在更宽的线速范围内使用。然而人们也认为, 若要进一步降低粒径, 如采用  $2 \mu\text{m}$  或以下的固定相,

从 HPLC 仪器提供的高压 (6000psi/400bar) 能力看, 将对进样技术和检测器等提出极高的要求<sup>[1]</sup>。使用小粒径填料要求仪器在更高的压力下运行, 这也将引起流动相的升温, 使色谱柱的轴向或纵向存在温度和黏度梯度<sup>[2,3]</sup>。

$$H = a + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + 2t_d \frac{k'}{(1+k')^2} u + \Omega \frac{d_p^2}{D_M} u + \frac{(1-\Phi+k')^2}{30(1-\Phi)(1+k')^2} \cdot \frac{d_p^2}{\gamma_0 \cdot D_M} u \quad (2)$$

## 2 超高效液相色谱的诞生

Waters 公司率先在超高效液相色谱方面取得突破性进展<sup>[4,5]</sup>。首先, 利用杂化颗粒技术合成了第二代有机硅填料, 使用二(三乙氧基硅)乙烷与四乙氧基硅烷聚合在硅胶中形成桥式乙基基团, 这种交联结构使硅胶的机械强度得到显著提高, 耐压可超过 20000psi。Waters 公司依靠此技术合成了  $1.7 \mu\text{m}$  填料, 并使用了严格的筛分技术使填料粒径分布很窄, 使用了全新的筛板和其它色谱柱硬件(柱管及连接件等), 在超过 20000psi 的压力下装填。其次,

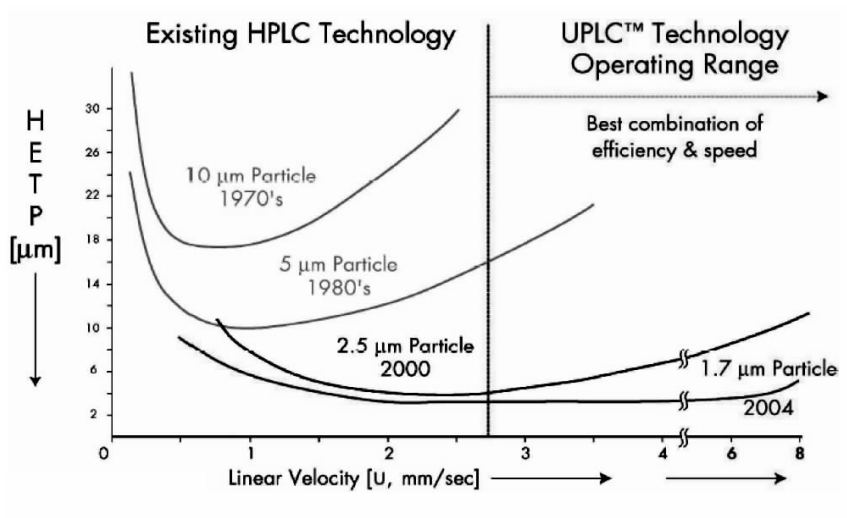


图1 液相色谱塔板高度与填料粒径及流速的关系

采用了具有精确梯度性能的超高压色谱泵,解决了超高压下溶剂的压缩性和绝热升温问题。第三,自动进样器采用新技术,设置“针内针”进样探头,以降低死体积和减少交叉污染(样品的交叉污染基本可忽略)。第四,开发了高速检测器以解决高速检测问题。总之,通过色谱系统的整体优化设计,降低死体积(小于 100  $\mu\text{L}$  的系统体积),解决超高压下仪器的耐压及渗漏问题,解决高压高速下数据的采集(可达 80 点/秒的采样速率)、仪器的控制等问题。2004 年,该公司在匹兹堡会议上推出了 ACQUITY UPLC<sup>[2]</sup>。UPLC 的速度、灵敏度及分离度分别是传统 HPLC 的 9 倍、3 倍及 1.7 倍,如可以在 4.6min 内完成 17 种氨基酸的分离分析,大大缩短了分析时间也大大降低了溶剂消耗。由于分离机制与 HPLC 一致,分析方法也容易从 HPLC 转移至 UPLC<sup>[6]</sup>。

Agilent 公司也开发出了 1.8  $\mu\text{m}$  的小颗粒填料,新近推出了 Agilent 1290 Infinity 系列高分离度快速液相色谱系统,压力可达 1200bar,流速最高可达 5mL/min,设计了带微流控光学波导技术的最大光强卡套式流通池,使得光传输率几乎达 100%,而没有池扩散效应造成的分离度损失,几乎完全消除了差折光和热效应,明显降低了基线漂移,最大采集速率可达 160Hz。采用第二代 ZORBAX 快速分离高通量色谱柱,通过提高流速和温度,大幅缩短分析时间而不损失分离性能。岛津公司则采用均一的、2.2  $\mu\text{m}$  粒径填料,通过对流动相加温(加温有利于降低流动相黏度,并使操作压力下降)、提高流速来缩短分析时间和提高柱效,其中迅速升温的功能是温度升高液相色谱分析过程的关键<sup>[7]</sup>。该公司推出了 Prominence 超快速液相色谱系统,最近则推出了其最新一代的超高效液相色谱系统 Nexera UH-PLC LC 30A,耐压最高可达 130MPa,柱温箱最高温度可达 150℃。2004 年至今,前后已有 10 家公司推

出了基于亚 2  $\mu\text{m}$  填料的 UPLC。

### 3 各种新型色谱填料的发展

色谱填料的发展是色谱分析的关键<sup>[8]</sup>。进入 21 世纪,在亚 2  $\mu\text{m}$  填料得到开发的同时,整体柱材料、核壳型填料、无机有机杂化硅胶颗粒技术等也得到发展,以适应超高效快速分析的要求。

整体柱作为一种新型的色谱柱,有人将其誉为是继多聚糖、交联与涂渍、单分散之后的第 4 代分离介质<sup>[9]</sup>,甚至有人评价其是 Tswett 发明色谱法以来色谱柱设计开发上唯一真正原始性的创新,著名分离科学家 Guiochon 也认为,整体柱将成为未来色谱分离的主要工具<sup>[10]</sup>。其整体介质结构具有通透性高、多孔结构和大比表面积等优点,使分离分析可达到高效快速、高通量、低背压等要求。整体柱可分为无机基质整体柱、有机聚合物整体柱和无机-有机杂化材料整体柱。特别是硅胶整体柱,机械强度高,比表面积大,具有双孔结构,孔隙率大于 80%,其结构接近灌流色谱填料,很适合高通量分析和快速分离。通孔的存在使得硅胶整体柱具有优异的渗透性,而中孔的孔径又决定了分离度和柱效<sup>[11]</sup>。计算机流体动力学模拟表明,整体柱通孔及骨架的均匀性和柱效关系密切<sup>[12]</sup>。

使用整体柱进行快速高效的分离,不需要压力的提高,以及特殊仪器,且具有使用寿命长等特点。Nanaka 和 Nakanishi 在硅胶整体柱方面做了开创性的工作。在此研究基础上,德国 Merck 公司推出了商品名为 Silica ROD 的整体柱,后又推出 Chromolith 系列新型柱。该整体柱采用不含金属的合成硅材料,通过溶胶凝胶技术制得,具有网状的孔径大小为 2  $\mu\text{m}$  的大孔,以及孔径大小为 130  $\text{\AA}$  的小孔,流动相可快速通过大孔,而在小孔中进行吸附

和脱附的色谱分离过程。具有快速平衡(1–3min 可达到平衡),高流速低压力(流速可达 9mL/min,而背压仅为一百多 bar),易实现“流速梯度”改善分离状况,不会发生柱头坍塌、柱床短流断流现象,难以被杂质污染,色谱柱不需要安装筛板仅需 PEEK 接头连接等特点。Phenomenex 公司也推出了商品名为 Onyx 的整体柱。

整体柱较易修饰,环糊精、纤维素衍生物、蛋白质、大环抗体等修饰的高选择性、高效的手性整体柱也已研制出,并有望实现商品化<sup>[13–16]</sup>。整体柱串联在高流速下使用,可取得比短柱更好的分离度<sup>[17]</sup>。由于表面积大,修饰时衍生配体的键合量高,在高效亲和色谱中的应用也受到人们的关注,产生了亲和整体柱色谱法(Affinity monolith chromatography),可应用于药物–蛋白质相互作用的研究<sup>[18]</sup>。

Phenomenex 公司则开发了另一种类型的固定相以提高分离效率——核壳型色谱柱 Kinetex。Kinetex 具有亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱的超高柱效,而典型操作背压不高于 400bar,可以提高分析的速度、分离度和灵敏度,而且方法易在不同的仪器上转移。这种效果是因为核壳技术降低了涡流扩散和提供了更快的传质过程,柱背压低。该核壳颗粒并不完全多孔,应用溶胶–凝胶处理技术与纳米结构技术的结合,在坚实的硅胶核心上生成了一个既坚稳又均匀的多孔外壳,且几乎没有硅醇活性。整体粒径为 2.6  $\mu\text{m}$ ,多孔外壳的厚度为 0.35  $\mu\text{m}$ 。一致的颗粒大小,单分散的特性也使颗粒间有均匀的空隙,降低了涡流扩散影响。因减少了扩散途径,大幅度提高了柱效。由于不完全多孔,分析物穿过色谱柱只需花费少量的时间便能扩散进出颗粒孔中。Advanced Materials Technology 公司也推出了一款核壳型色谱柱——Halo HPLC 色谱柱,整体粒径大小 2.7  $\mu\text{m}$ ,多孔外壳大小为 0.5  $\mu\text{m}$ <sup>[2]</sup>。Agilent 公司等

也研制了这种核壳型填料。这类固定相的抗污染能力较强。

西北大学的耿信笃教授则开发了色谱饼,用于蛋白质的快速分离。在计量置换色谱保留理论研究的基础上,认为蛋白质的分离效果与色谱柱的柱长无关,提出用短柱进行蛋白的分离与复性,发展了“饼型”色谱柱并称之为“色谱饼”<sup>[19]</sup>。该课题组将 3  $\mu\text{m}$  的多孔填料装在直径为 1cm,厚度为 1cm 的色谱饼中,以 10mL/min 的流速,1min 内分离了 7 种整体蛋白,实现了高速度、高分离度、高样品量、高重现性,可应用于临床的快速分析。用这种色谱饼还可对变性蛋白复性并同时纯化,以解决重组蛋白药物工业生产中的关键技术性难题。

## 4 启示与展望

超高效液相色谱具有超强分离能力、超高灵敏度、超高分离度、超快分析速度等特点,而且具有简单方便的方法转换、良好的质谱及磁共振入口、溶剂消耗少等优点。它可能在蛋白组学、多肽组学、基因组学、代谢组学、天然产物分析、药物分析、高通量分析等领域发挥重要作用。国内邹汉法课题组探讨了一疏水性整体柱在“鸟枪法”蛋白组学中的应用<sup>[20]</sup>。Johnson 等对比了小粒径 UPLC 和整体柱在代谢物检测中的应用,认为前者检测限更低,可检测到更多的代谢物<sup>[21]</sup>。更多对比性的研究值得进行,以推动超高效液相色谱的发展<sup>[22]</sup>。存在的问题也应注意,如超高效液相色谱仪价格较贵,小颗粒填料不易制备及种类较少,有些方法不容易放大、不适用于制备分离等。

从以上各种类型的超高效液相色谱法可以看出,理论研究和科技发展共同推进了超高效液相色谱的诞生。理论研究特别是色谱速率理论、溶质保



留理论的研究大大促进了色谱科学的发展。而技术开发特别是色谱仪器的整体优化、新型色谱填料的开发与超高效液相色谱的诞生密不可分。然而我们也要看到,在超高效液相色谱法的发展中,我国具有自主知识产权的贡献还是很少,如何追赶值得深思。既要注重理论研究,也要注重技术创新,精益求精。理论上应重点关注色谱热力学、动力学以及二者的关系问题研究,关注新型填料色谱速率理论的研究,如利用计算机进行流体动力学模拟,优化出高柱效的新型色谱填料。探讨新型填料在微型柱、膜色谱柱、微流控芯片、毛细管电色谱中的应用。Unger 等认为毛细管电色谱方面的潜力还未得到充分认识,相关的理论研究还处于萌芽状态<sup>[23]</sup>。今后仍要在理论研究、仪器研发、填料研发上多下功夫,开发各种类型的小粒径色谱填料,开发选择性填料,继续发展整体柱,甚至研发不同分离机制的新型填料等。留给中国色谱工作者的工作还很多,在人才培养上要注意理论与技术创新相结合。

## 参考文献

- [1] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 183.
- [2] K K Unger, R Skudas, M M Schulte. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography—comparison and critical appraisal [J]. J. Chromatogr. A, 2008, 1184: 393–415.
- [3] U D Neue, M Kele. Performance of idealized column structures under high pressure[J]. J. Chromatogr. A, 2007, 1149: 236–244.
- [4] Nov á kov á L, Matysov á L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis [J]. Talanta, 2006, 68: 908–918.
- [5] D T-T Nguyen, D Guillaume, S Rudaz, J-L Veuthey. Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2  $\mu$  m stationary phases in liquid chromatography [J]. J. Chromatogr. A, 2006, 1128: 105–113.
- [6] 胡海燕, 朱馨乐, 胡昊, 等. 超高效液相色谱简介及应用比较 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(4): 48–50.
- [7] 曾祥林, 曾智. 超高效 / 高分离度快速 / 超快速液相色谱技术在分析领域中的应用[J]. 医药导报, 2010, 29(7): 909–914.
- [8] 马永娇. 色谱分析: 填料发展是关键 [J]. 食品安全导刊, 2009, (6): 34–35.
- [9] 吕志亮, 贾丽. 硅胶整体柱的制备与应用研究进展[J]. 分析实验室, 2008, 27(Suppl.): 204–210.
- [10] G Guiochon. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography [J]. J. Chromatogr. A, 2007, 1168: 101–168.
- [11] R Wu, L Hu, F Wang, et al. Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation[J]. J. Chromatogr. A, 2008, 1184: 369–392.
- [12] T Ikegami, Nobuo Tanaka. Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations [J]. Curr Opin, Chem. Biol., 2004, 8: 527–533.
- [13] D Wistuba. Chiral silica-based monoliths in chromatography and capillary electrochromatography [J]. J. Chromatogr. A, 2010, 1217: 941–952.
- [14] Y C Guillaume, C Andr é . A novel chiral column for the HPLC separation of a series of dansyl amino and arylalkanoic acids[J]. Talanta, 2008, 76: 1261–1264.
- [15] B Chankvetadze, T Ikai, C Yamamoto, Y Okamoto. High-performance liquid chromatographic enantioseparations on monolithic silica columns containing a covalently attached 3,5-dimethylphenylcarbamate derivative of cellulose [J]. J. Chromatogr. A, 2004, 1042: 55–60.
- [16] D Lubda, K Cabrera, K Nakanishi, W Lindner. Monolithic silica columns with chemically bonded  $\beta$ -cyclodextrin as a stationary phase for enantiomer separations of chiral pharmaceuticals[J]. Anal. Bioanal Chem., 2003, 377: 892–901.
- [17] D Lubda, W Lindner. Monolithic silica columns with chemically bonded tert-butylcarbamoylquinine chiral anion-exchanger selector as a stationary phase for enantiomer separa-

- tions[J]. J. Chromatogr. A, 2004, 1036: 135–143.
- [18] R Mallik, H Xuan, D S Hage. Development of an affinity silica monolith containing  $\alpha$ 1-acid glycoprotein for chiral separations[J]. J. Chromatogr. A, 2007, 1149: 294 – 304.
- [19] 耿信笃. 计量置换理论及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 10.
- [20] F Wang, J Dong, M Ye, R Wu, H Zou. Improvement of proteome coverage using hydrophobic monolithic columns in shotgun proteome analysis [J]. J. Chromatogr. A, 2009, 1216: 3887–3894.
- [21] K A Johnson, R Plumb. Investigating the human metabolism of acetaminophen using UPLC and exact mass oa-TOF MS [J]. J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 39: 805 – 810.
- [22] D Guillarme, D T T Nguyen, S Rudaz, J L Veuthey. Recent developments in liquid chromatography—Impact on qualitative and quantitative performance [J]. J. Chromatogr. A, 2007, 1149: 20–29.
- [23] K K Unger, R Skudas, M M Schulte. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography—comparison and critical appraisal [J]. J. Chromatogr. A, 2008, 1184: 393 – 415.