

## 超高效液相色谱 (UPLC™)：重新定义液相色谱

分离科学的能力随着首次成功地使用小颗粒得到惊人的分离能力而进入了一个新的时空。这个新的色谱领域，所谓超高效液相色谱 (UPLC™)，与传统的 HPLC 技术相比提供了更高的效率，因而具有更强的分离能力。作为世界第一个商品化 UPLC™ 产品的 Waters ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱系统，利用创新技术进行整体设计，大幅度地改善了液相色谱的分离度、样品通量和灵敏度。UPLC™ 的商品化，是分离科学和技术的巨大进步，液相色谱亦由此进入了全新的时代。

基于 1.7 μm 小颗粒技术的 UPLC™，与人们熟知的 HPLC 技术具有相同的分离原理。不同的是：UPLC™ 不仅比传统 HPLC 具有更高的分离能力，而且结束了人们多年不得不在速度和分离度之间取舍的历史。使用 UPLC™ 可以在很宽的线速度、流速和反压下进行高效的分离工作，并获得优异的结果。

### 小颗粒分离的理论与科学基础

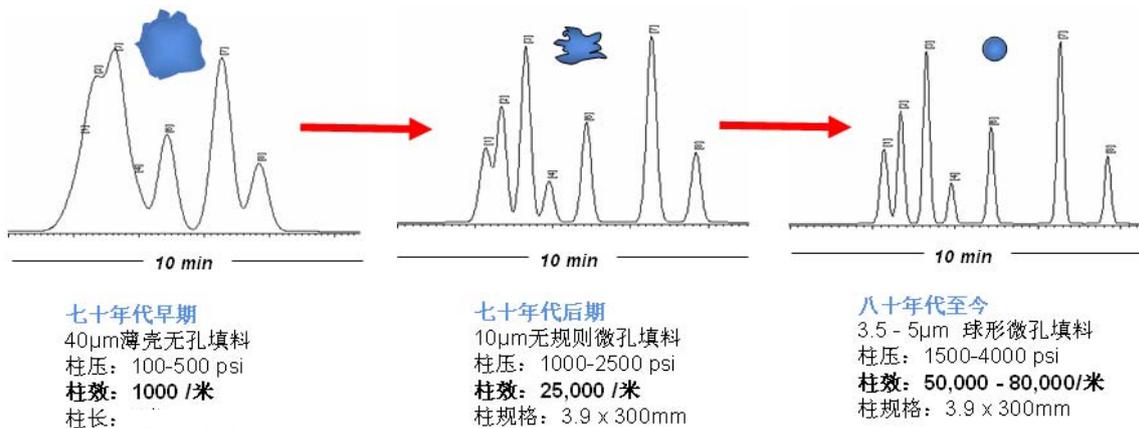


图 1：填料技术的沿革

液相色谱 30 年的发展史是颗粒技术的发展史。颗粒度的改变直接影响到柱效，从而对分离结果产品直接影响。由上图可知：随着颗粒度的不断降低，色谱分离度不断提高。

事实上，上述规律的理论基础是著名的范德米特(van Deemeter)方程——这是全世界所有从事色谱研究的科学家熟知的理论。由此得到的范德米特(van Deemeter)曲线，亦是色谱科学家预测颗粒度变化而引起的色谱变化的根本依据。该曲线预测最佳柱效与相应的流动相流速。由曲线得知：随着颗粒度减小，相应的理论塔板高度 (HETP) 也下降，得到的柱效会更高。还应该注意 1.7 μm 颗粒的 HETP 最小值区域扩大了，这表明可以在比大颗粒更宽的流量范围内得到最高的柱效，结果可以不损失高分离度的同时来优化流速 (分析速度)。

小颗粒为色谱分离带来如此的高柱效和速度优势，使利用小颗粒技术成为色谱科学家梦寐以求的目标。然而 HPLC 系统的设计，一直苦于难于发挥出最小颗粒的优点。小颗粒技术的运用，不但要求仪器在超出目前限度 (6000 psi/ 400 bar) 的压力下工作，同时要求仪器系统体积要更小以便不影响梯度性能，而且还要检测器能高速检测出峰宽只有几秒的色谱峰。

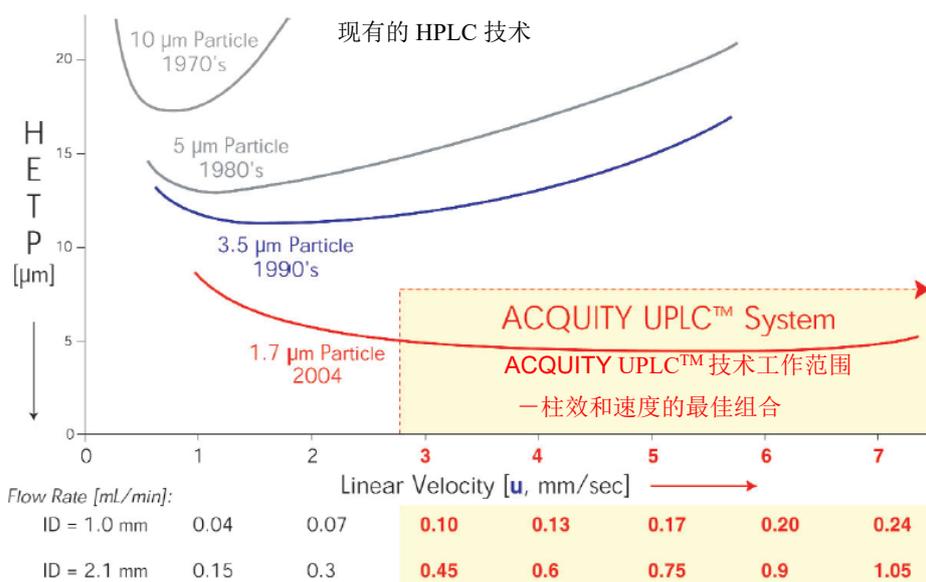


图 2: 范德米特(van Deemter)曲线

Waters ACQUITY UPLC™ 超高效液相色谱系统的设计，充分利用了小颗粒的所有优点，弥补传统 HPLC 系统的不足。由于把全局设计思路用于所有集成的部件，包括从进样到数据采集——Waters UPLC™ 系统展示了一种设计理念，在当今市场上给分离科学赋予了新的含义。

### 超高分离度

色谱工作者正面临分离十分复杂混合物的挑战，如肽的消解产物、杂质及体内代谢物样品等。为了使分离能完全优化就需要一个超高性能的色谱系统。这样一个系统理想地应符合液相色谱的基本原理。

根据等度液相色谱分离的分离度(Rs)方程，分离度(Rs)与柱效(N)的平方根成正比。

$$R_s = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{k + 1} \right) \dots\dots\dots(1)$$

按 Van Deemter 色谱理论，柱效(N)与颗粒度(dp)成反比：

$$N \propto \frac{1}{dp} \dots\dots\dots(2)$$

故：随着 dp 的降低，N 值会增加；而 N 值增加，则 Rs 值增加。HPLC 与 UPLC™ 的基本分离理论，进一步说明了颗粒度大小和分离度密不可分的关系。

ACQUITY UPLC™ 系统发挥了 1.7 μm 颗粒提供柱效增高的全部优越性。尤其是 1.7 μm 颗粒提供的柱效比 5 μm 颗粒提高了 3 倍。因为分离度与粒度的平方根成反比，1.7 μm 颗粒的分离度比 5 μm 颗粒提高了 70%。在梯度分离中也具有同样的优越性，此时分离能力用峰容量衡量。

UPLC™ 用 1.7 μm 颗粒提高了分离能力，可以分离出更多的色谱峰，从而对样品提供的信息达到了一个新的水平。而且又最大地缩短了开发方法所需的时间。

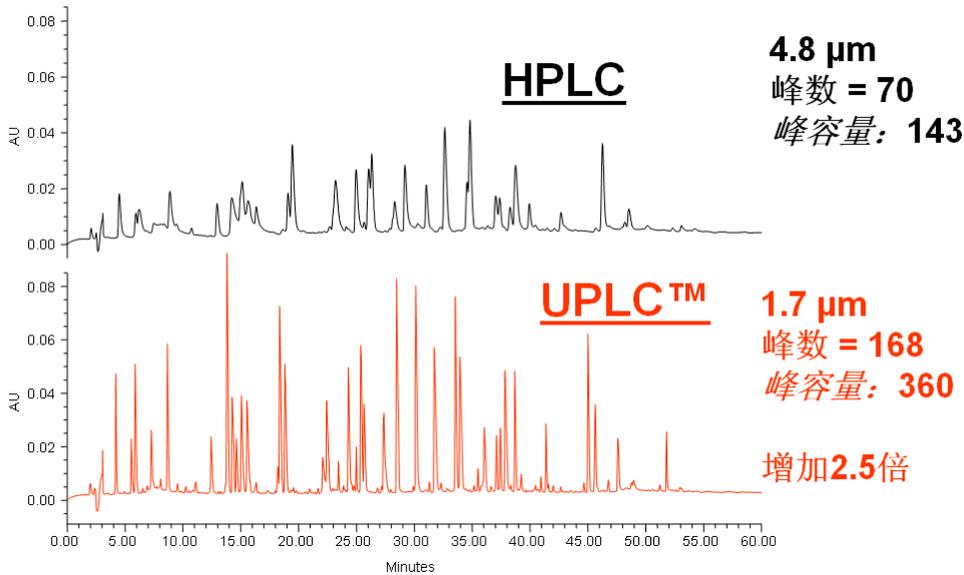


图 3: UPLC™ 与 HPLC: 分离度比较

由上图可见: UPLC™ 可以大大提高分离度, 同时色谱峰强度也得到了提高。

### 超高速

高通量实验室始终要求在单位时间内提供更多的信息和处理更多的样品并保证提供高质量的数据。

较小的颗粒能超乎寻常地提高分析速度而不降低分离度。因为颗粒度减小后, 柱长可以按比例缩短而保持柱效不变(见式 3), 而且 Van Deemter 理论表明最佳流速与粒度成反比(见式 4)。柱长缩短会加快分离速度, 而颗粒度越小, 最佳流速也越大, 进而可以通过提高流速来进一步加快分离速度。

$$N \propto \frac{L}{dp} \dots\dots (3) \quad \text{流量} \propto \frac{1}{dp} \dots\dots (4)$$

由于 ACQUITY UPLC™ 系统用 1.7 μm 颗粒, 柱长可以比用 5 μm 颗粒时缩短 3 倍而保持柱效不变, 而且使分离在高 3 倍的流速下进行, 结果使分离过程快了 9 倍而分离度保持不变。

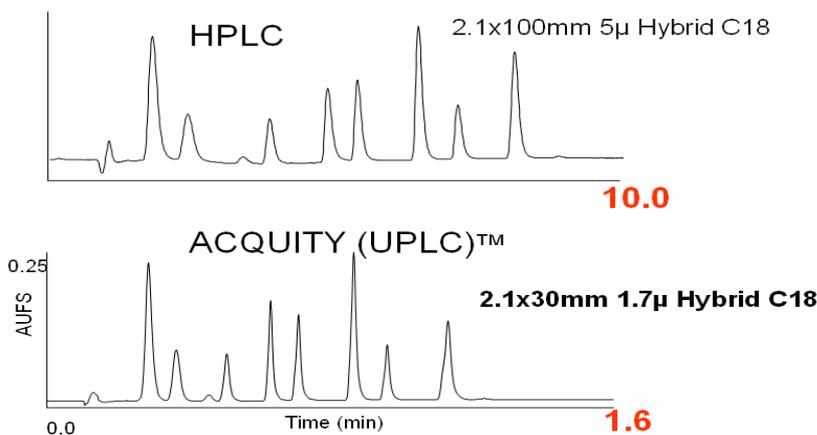


图 4: UPLC™ 与 HPLC: 速度比较

UPLC™ 的快速分析亦节省了以往一向耗时的方法认证的时间，使方法认证的变得简单快速。用户不必担心因 HPLC 转换成 UPLC™ 带来的方法认证负担。

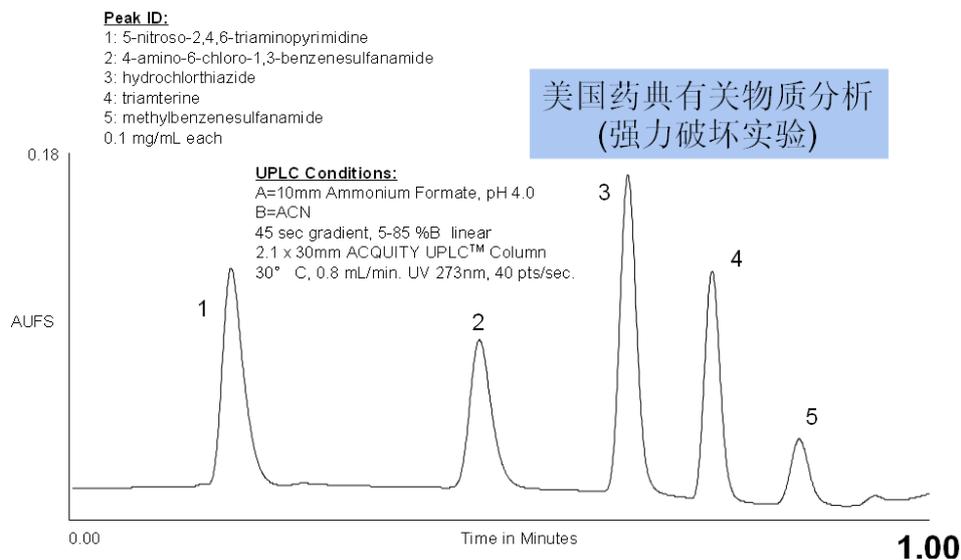


图 5: UPLC™ 美国药典有关物质分析实例

原有 HPLC 分析需要 4 个不同的方法、三根不同的色谱柱，至少需要 65 分钟才能完成；UPLC™ 使用了一根色谱柱、一种简单方法，在 1 分钟内即可完成。

## 超高灵敏度

过去几年中，提高灵敏度的工作集中在检测器上，包括光学检测器和质谱检测器。这种趋势主要是受要求检测化合物的浓度越来越低（如高效药物）的驱动。然而采用超高性能色谱系统就能获得灵敏度的显著提高。

在 UPLC™ 中始终可得到较高的灵敏度。UPLC™ 使用小颗粒技术可以得到更高的柱效（因而改善了分离度）、更窄的色谱峰宽(见式 5)，即更高的灵敏度。

$$N \propto \frac{1}{W^2} \dots\dots(5) \quad \text{峰高} \propto \frac{1}{W} \dots\dots(6) \quad \text{峰高} \propto \frac{1}{L} \dots\dots(7)$$

因为色谱峰变得更窄，峰高也就更高了(见式 6)；同样，当 UPLC™ 用于快速分析、用较短色谱柱而使柱效不变时，色谱峰高会相应增加 (见式 7)。因此，使用 UPLC™ 技术，不仅可以在保持与 HPLC 相同分离度时提高峰高，而且在改善分离度的同时亦可提高峰高即灵敏度。

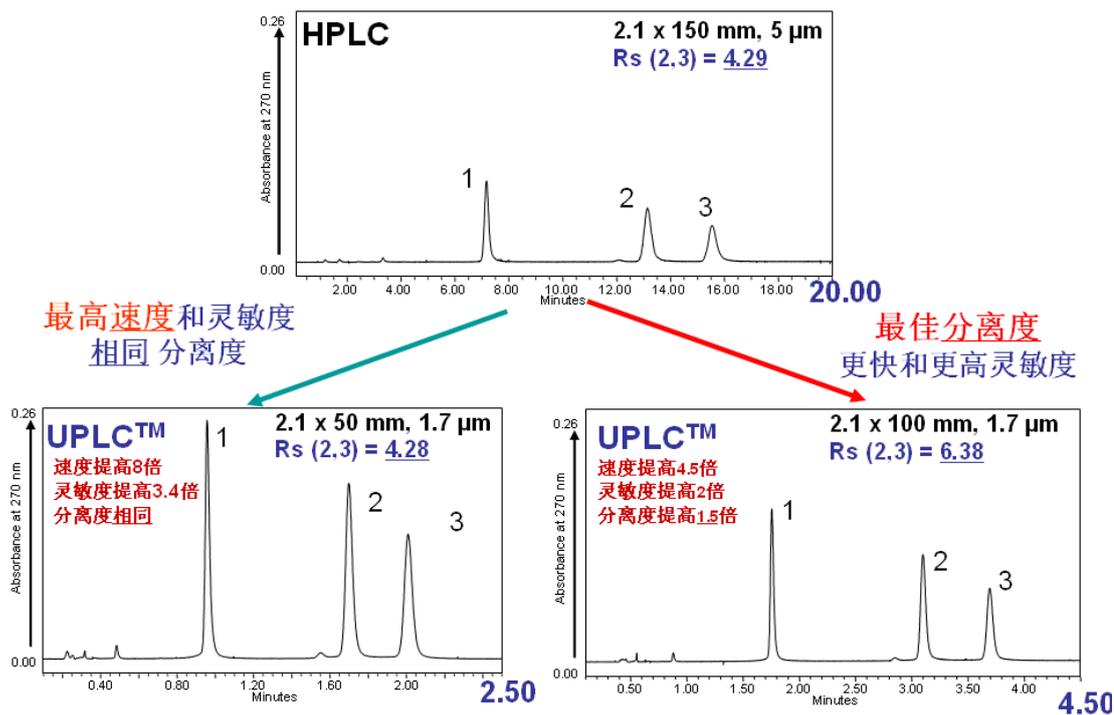


图 6: HPLC 到 UPLC™: 灵敏度的改善无需折衷

### 简单方便的方法转换

UPLC™ 与 HPLC 基于相同的分离机理，故相互之间的方法转换非常容易和方便。现有 HPLC 方法可以按照比例直接转换成 UPLC™ 方法；相反，UPLC™ 方法也很容易可以转换成 HPLC 方法供常规 HPLC 系统使用。您还可以利用 Waters 为方法转换设计的简单易用计算工具来实现参数间的转换。

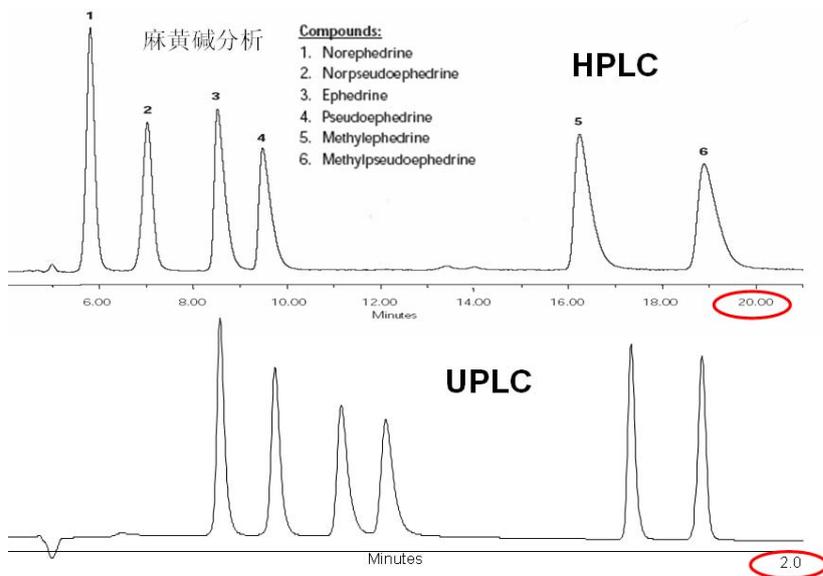


图 7: HPLC 到 UPLC™: 简单方便的方法转换

## UPLC™：最佳的质谱入口

Micromass 质谱技术与 Waters 液相色谱技术的强强结合，使 UPLC™ 的设计能够充分考虑到质谱检测器的诸多特点和需求，成为质谱检测器的最佳液相色谱入口。如此技术与设计上的完美默契，是业界任何仪器供应商难以实现的。UPLC™ 与质谱联用，可以实质性地改善质谱检测结果的质量。UPLC™ 的特殊性能使质谱检测器的性能首次得以充分体现。

由于低流速下色谱峰扩散不大，增加了峰浓度，有利于提高离子源的效率，因而使灵敏度至少提高了 3 倍。除 UPLC™ 技术本身带来的速度、灵敏度和分离度的改善外，UPLC™ 的超强分离能力有助于目标化合物与之竞争电离的杂质的分离，从而可以使质谱检测器的灵敏度因离子抑制现象的减弱或克服而得到进一步的提高。故使用 UPLC™—MS 联用，可以获得灵敏度较 HPLC—MS 联用系统大有改善的分离结果，获得更多、质量更好的信息。

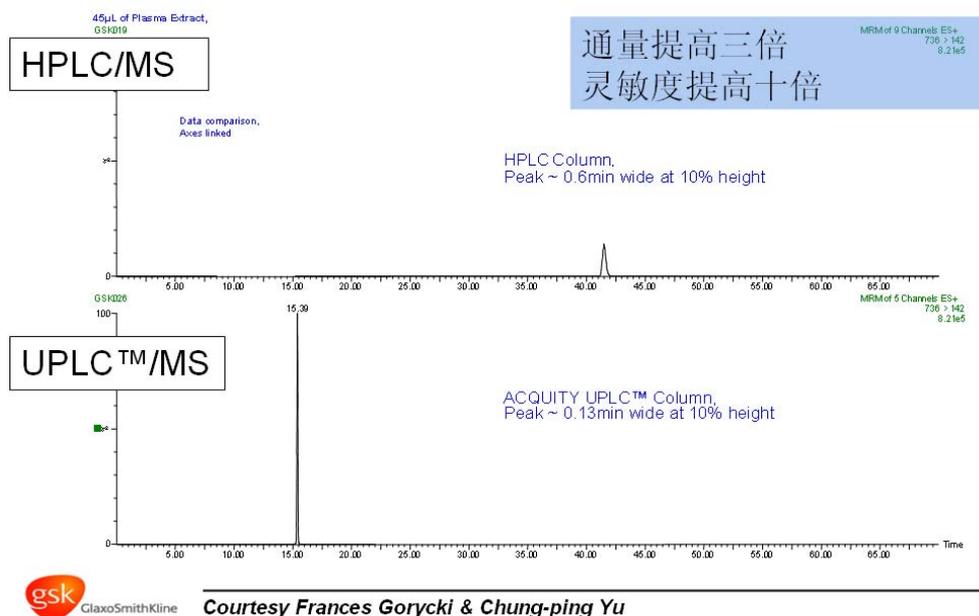


图 8: HPLC-MS 到 UPLC™-MS: 灵敏度的额外提高

## UPLC™：仅仅有小颗粒与高速检测器不能构成 UPLC™

四十年来，Waters 以市场为导向，用户需要为目标，以其对液相色谱科学的深入理解和坚实的技术基础，引领着液相色谱技术的不断发展。从六十年代首推世界上第一台液相色谱(LC)系统，到七十年代高效液相色谱(HPLC)技术的商品化，直至 2004 年超高效液相色谱(UPLC™)系统的推出，Waters 是色谱技术公认的、当之无愧的领导者。

基于小颗粒技术的 UPLC™，并非普通 HPLC 系统改进而成。它不但需要耐压、稳定的小颗粒填料，而且需要耐压的色谱系统(>15,000psi)、最低交叉污染的快速进样器、快速检测器及优化的系统体积等诸多方面的保障，以充分发挥小颗粒技术优势。这就需要系统所有硬件和软件的全方位创新。Waters 作为专业液相色谱的厂商，是业界唯一同时拥有液相色谱所有组件技术—包括液相色谱仪器硬件、填料技术和软件技术的供应商，拥有液相色谱技术最强大的科研和生产机构。Waters 四十



年 HPLC 的成功实践与研究，奠定了 UPLC™ 技术的坚实基础，为 UPLC™ 的成功设计与技术实现提供了强有力的保障。

## **UPLC™：HPLC 的未来**

UPLC™ 可以更快的速度和更高的质量完成以往 HPLC 的工作，为用户节省宝贵的时间和日常溶剂消耗，从而获得最大的投资回报。

UPLC™ 的高分离度可以帮助用户从容面对复杂组份（如天然产物或中草药等）分离的挑战；UPLC™ 的高灵敏度帮助用户检测更加痕量的目标化合物；UPLC™ 快速的分离使用户轻松分析大量样品，实现高通量。

**UPLC™ 是分离科学的巨大成就。**