



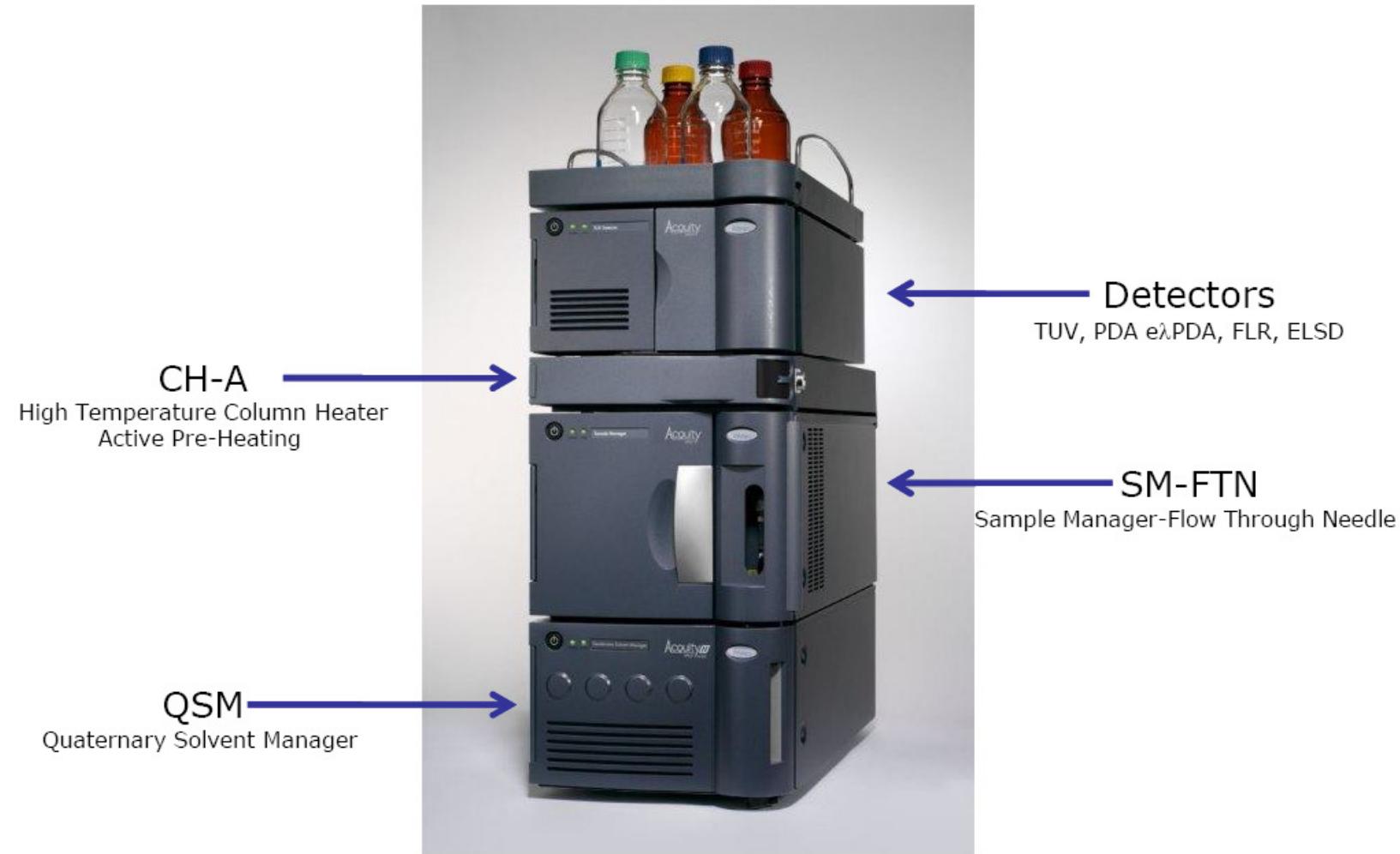
Acquity **H**
UPLC® CLASS

培训教程 H-Class 基础



ACQUITY H-Class

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



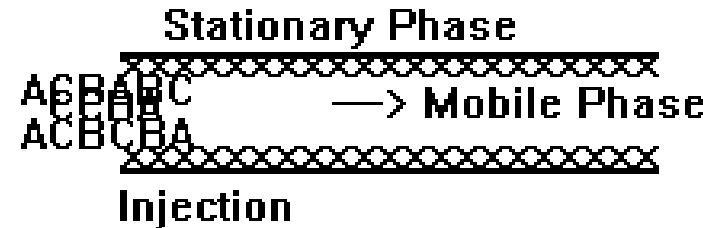
内容提要

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

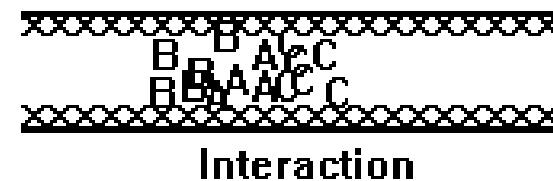
- HPLC 原理回顾
- UPLC 基本原理
- HPLC 与 UPLC 的异同
- H-Class基本原理
- 小结

什么是HPLC?

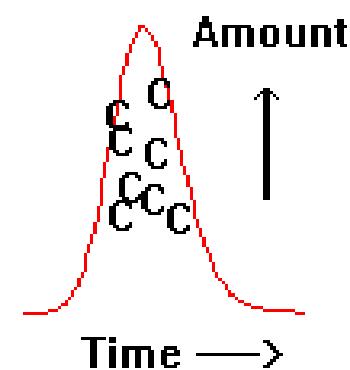
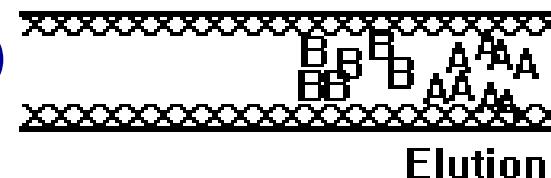
- 高效液相色谱法, HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 是一种区别于经典液相色谱, 基于仪器方法的高效能分离手段:
 - 高性能色谱柱, 高精度输液泵, 高灵敏度检测器.....
- 广泛应用于各个领域:
 - 医药, 环保, 石化, 生命科学, 食品工业, 农业.....
- 无论在技术上、理论上, 还是在应用上仍有较大的发展空间



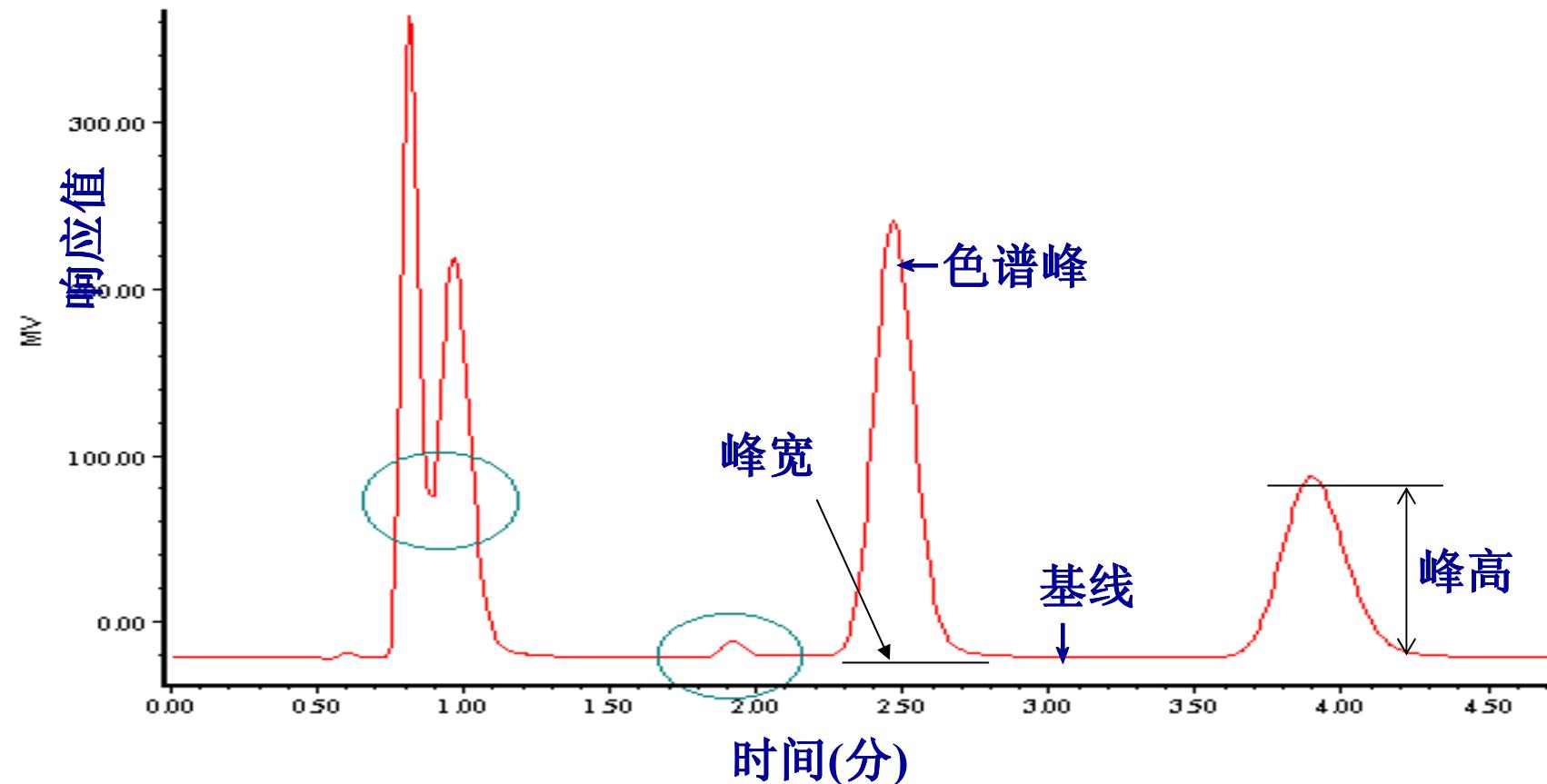
✓ 分离是一个物理过程。



固定相(**Stationary Phase**)
流动相(**Mobile Phase**)
进样 (**Injection**)
洗脱 (**Elution**)
相互作用(**Interaction**)



色谱图(Chromatogram): 色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图，其纵坐标为信号强度，横坐标为时间



- 分离度方程式描述了分离度与分离因子，柱效和保留因子之间的关系
- 它是评价一张色谱图以及决定如何解决、开发和优化分离方法的依据

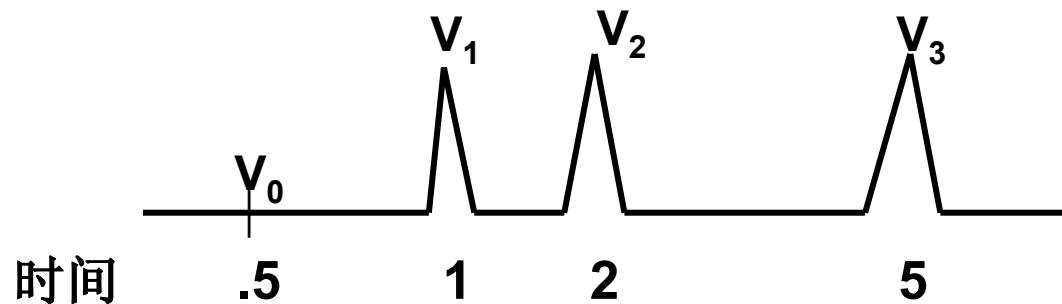
$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (\sqrt{N}) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)$$

↑ ↑ ↑
分离因子 柱效 保留因子

保留因子(k'):保留能力的量度

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

k' 是样品与填料作用强度的直接量度



$$k'_{\text{1}} = \frac{1 - .5}{.5} = 1$$

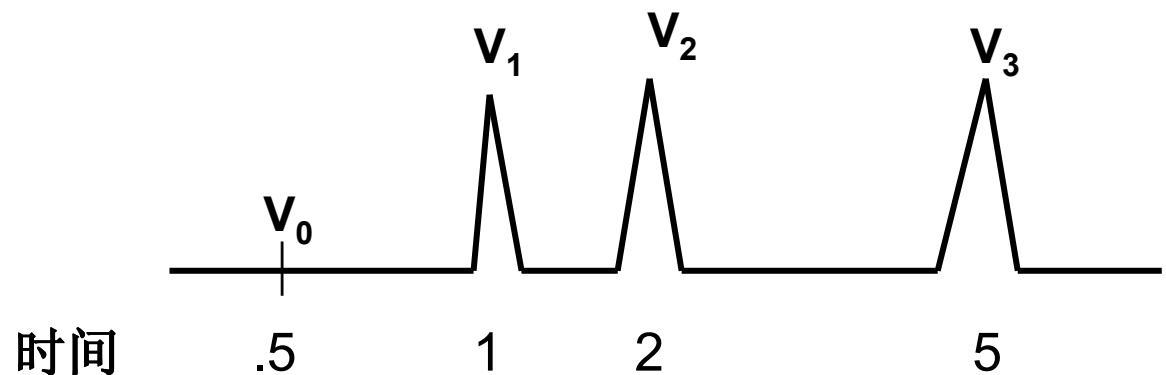
$$k'_{\text{2}} = \frac{2 - .5}{.5} = 3$$

$$k'_{\text{3}} = \frac{5 - .5}{.5} = 9$$

分离因子(α):峰分离程度的量度

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

α 是两个化合物在同一套色谱系统上保留差异的数值表述

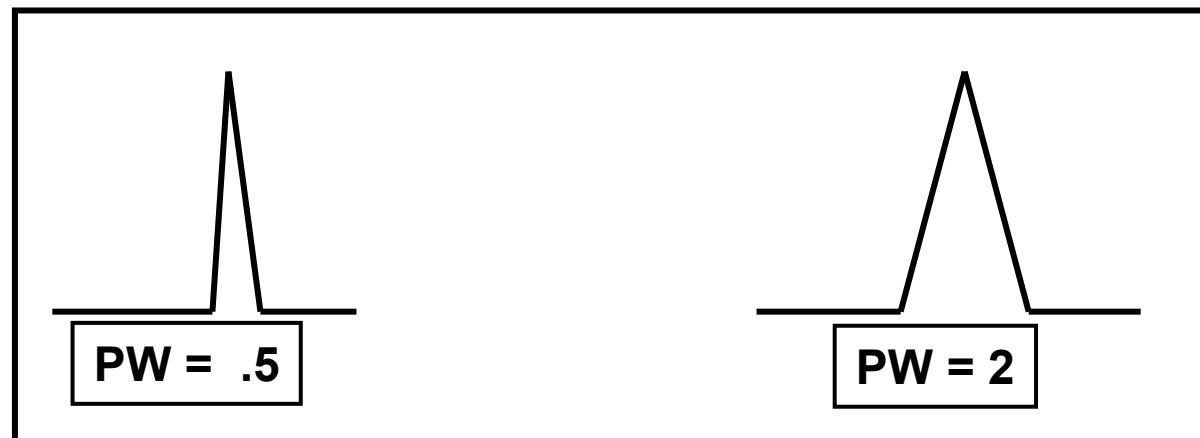


$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{或} \quad \alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

峰2/峰1的 $\alpha = \frac{2 - .5}{1 - .5} = 3$

峰3/峰1的 $\alpha = \frac{5 - .5}{1 - .5} = 9$

理论塔板数或柱效是一个数值,它表示作为保留时间函数的峰展宽的量度



$$N = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2$$

$$N = 16 \left(\frac{5}{.5} \right)^2$$

$$N = 1600$$

$$N = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2$$

$$N = 16 \left(\frac{5}{2} \right)^2$$

$$N = 100$$

关于柱效或塔板数

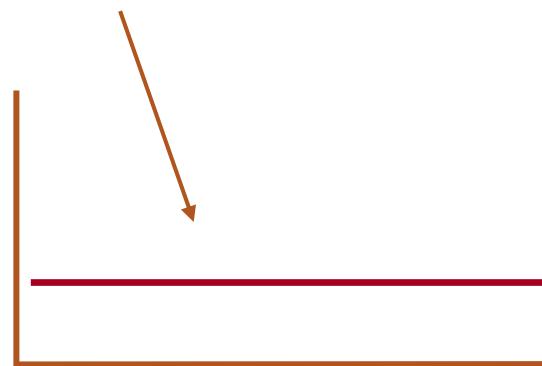
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

- 塔板数是综合反映色谱柱和仪器性能的关键指标
- 取决于下列两个参数：
 - 保留时间
 - 峰宽
- 窄峰 → 高塔板数
- 峰形越均匀 → 塔板数越高
- 分析型HPLC典型的塔板数值(5σ)约为100,000/米
- UPLC典型的塔板数值 (5σ) 高达 200,000 /米

- 塔板数值受下列因素影响：
 - 机械因素
 - 仪器
 - 联接（端口接头，锥箍）
 - 柱装填的好坏
 - 化学因素
 - 色谱因素（溶剂）
 - 填料的生产制造质量

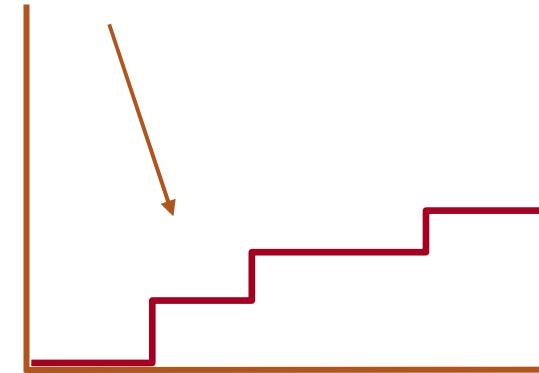
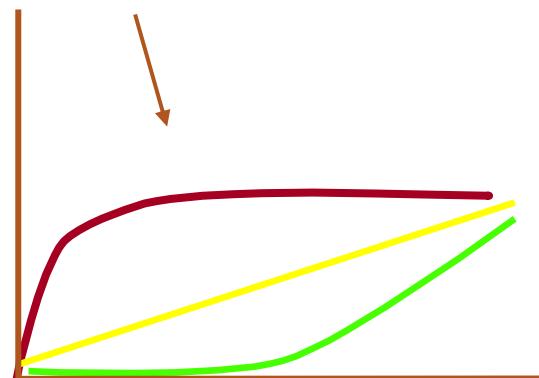
- 等度

- ISO → 相同的
- 在整个运行过程中溶剂组成保持不变
- (60:40 甲醇/水)

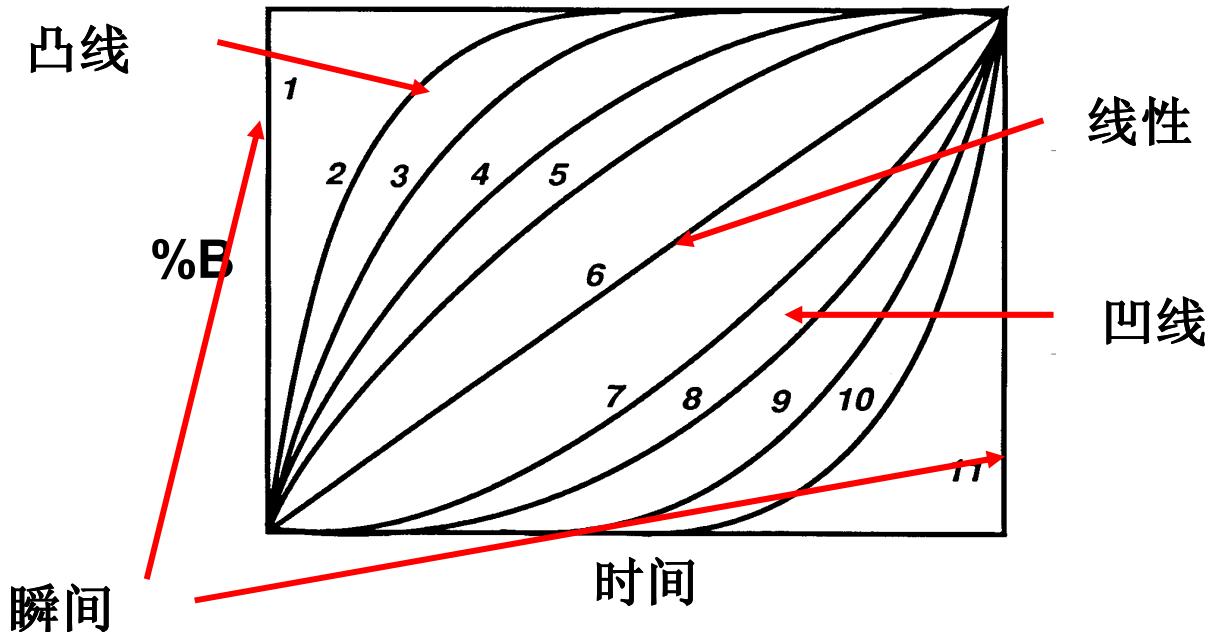


■ 梯度

- 在运行过程中溶剂组成或流速变化
- 渐变或台阶式变化
 - **100% H₂O / 0% MeOH 到 0% H₂O / 100% MeOH**



用于 Waters HPLC 系统



Curve Number

1

2 to 5

6

7 to 10

11

Effect

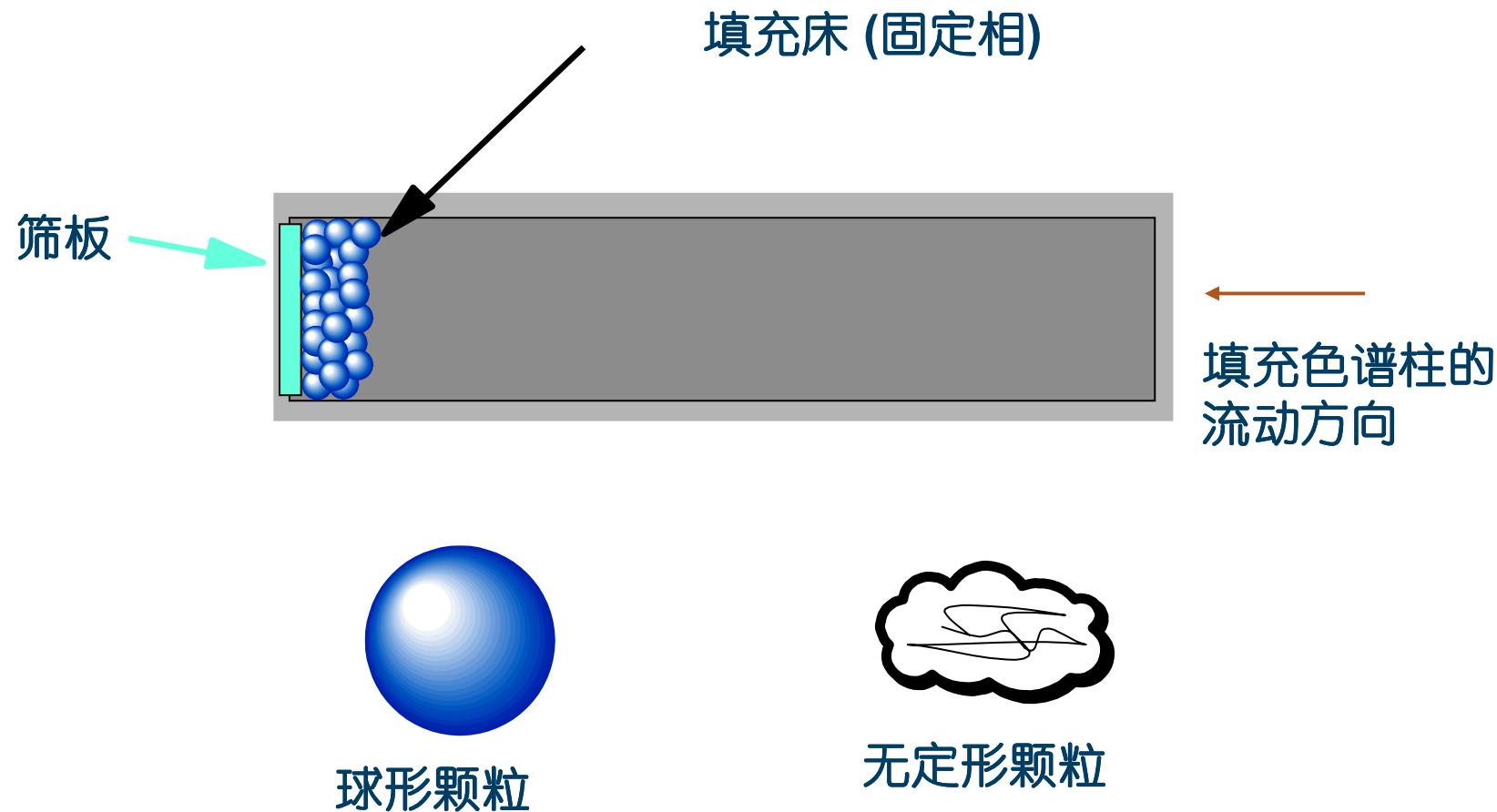
Immediately goes to specified conditions

Convex

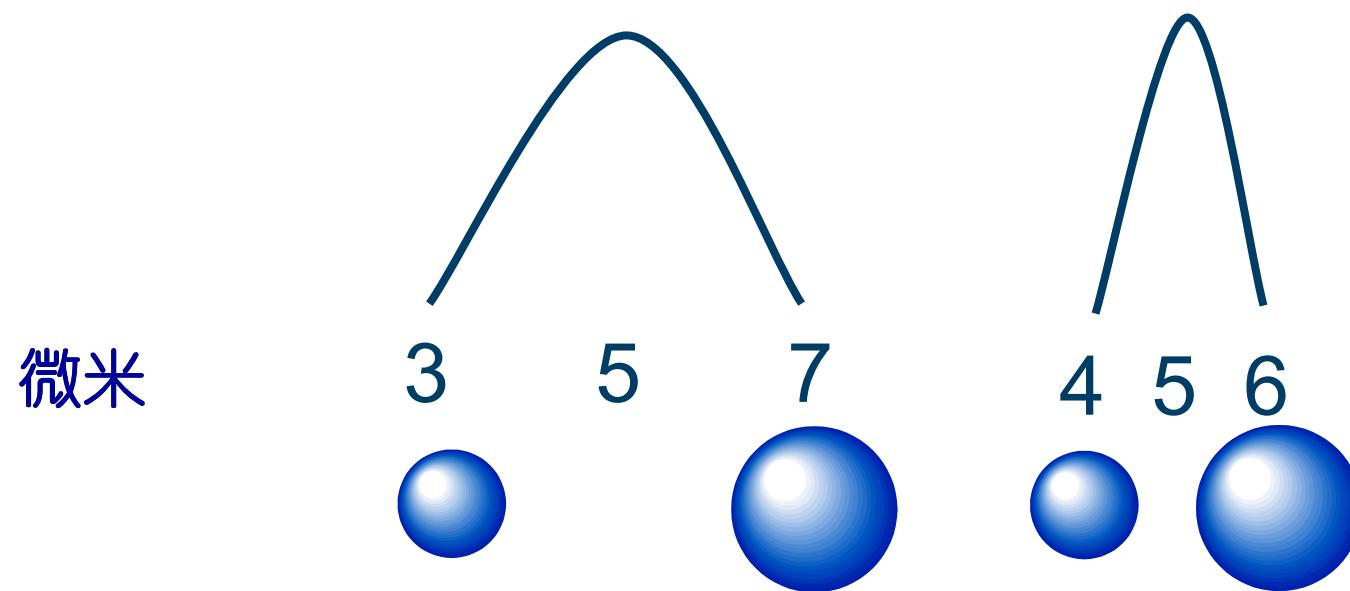
Linear (Default)

Concave

Maintains start condition until next step



- 具名义值的填料有一个颗粒度分布的范围
 - 例如: $4 \mu\text{m}$ ($2 - 10 \mu\text{m}$)
- 窄的分布会给出较高的性能



用于HPLC色谱柱的典型填料

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

- 硅胶
 - 二氧化硅
 - 无规则或球形
- 铝
 - 氧化铝
 - 无规则或球形
- 聚合物
 - 聚苯乙烯二乙烯基苯
 - 球形
- 杂化
 - 硅胶和聚合物的结合
 - 球形

- C18
 - 也叫作 ODS 或 RP18
 - OctaDecyl Silane
 - 超过全部应用的 70%
 - 反相键合在硅胶基质上
 - “Waxed(上蜡的)” 硅胶颗粒
 - 非极性的

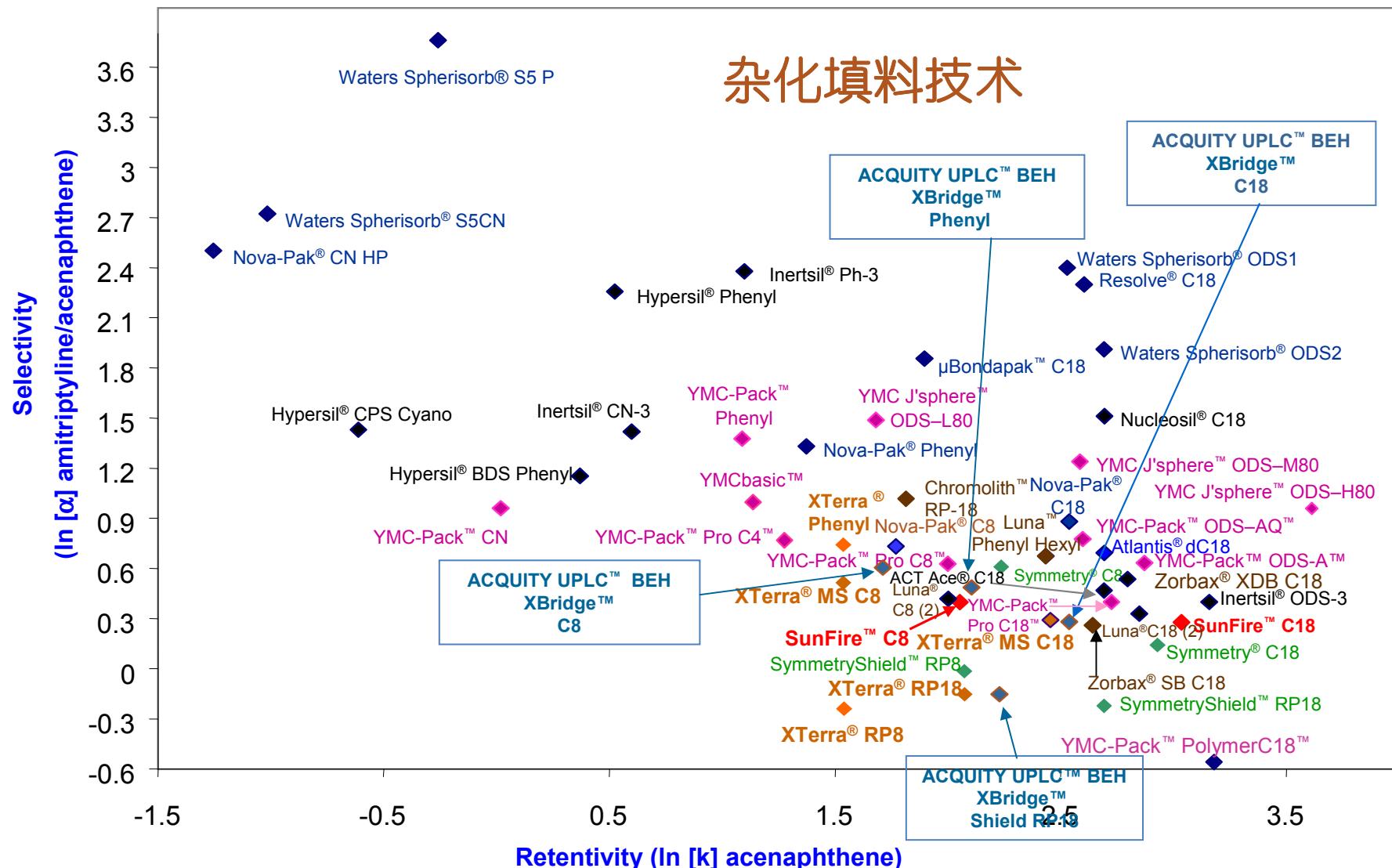
HPLC C18 柱有各种不同品牌

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

- 一个独立的生产厂商能制造出许多不同品牌的C18 柱
 - XBridge, SunFire, Atlantis,
- 每一个品牌被设计成达到不同的色谱目的
 - 高效能
 - 没有拖尾
 - 独特的选择性
 - 高疏水性
 - 高硅醇基活性

反相色谱柱选择性图表

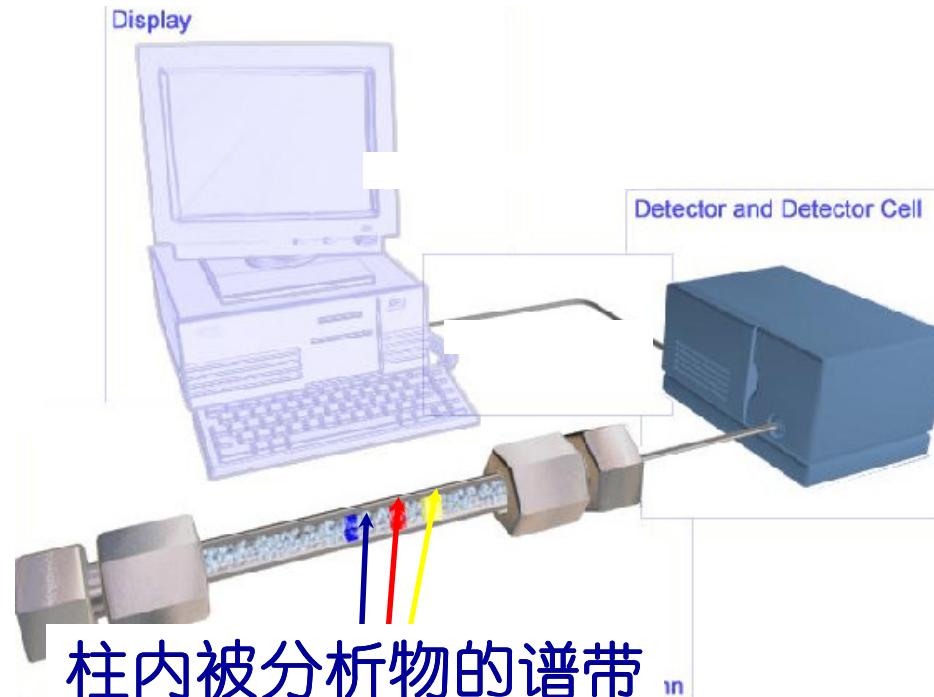
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM



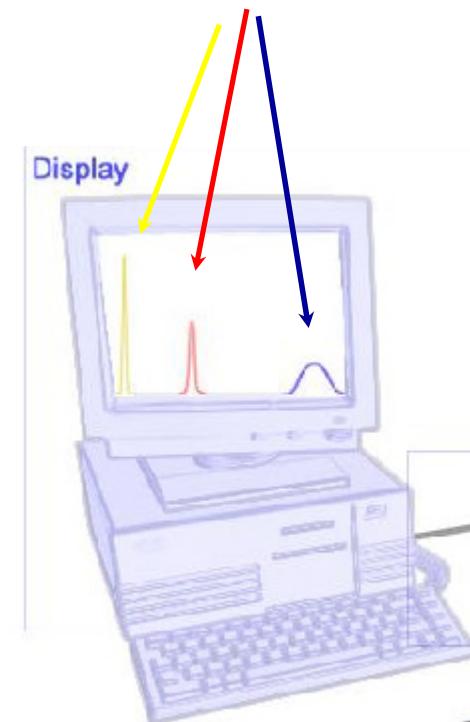
- 直径
 - 较小的直径增加灵敏度
 - 较大的直径增加柱容量
- 长度
 - 较长的柱子具有较高的分离能力和柱容量
 - 较短的柱子具有较快的分离速度和较低的柱容量

如何得到尖锐的色谱峰

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



色谱图上被分析物的峰

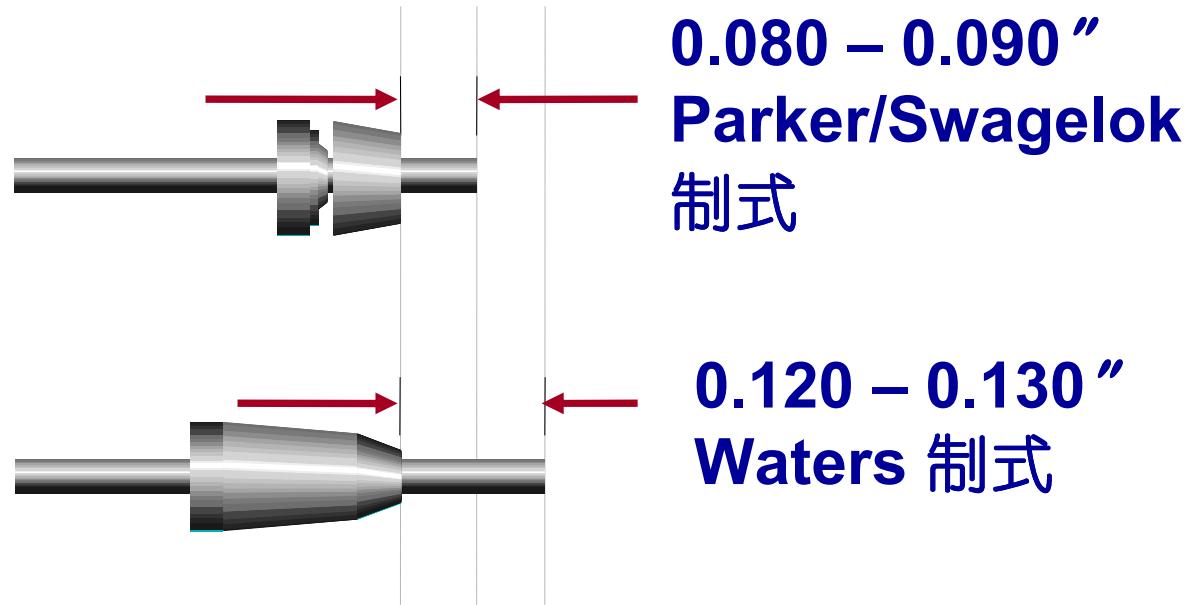


色谱柱接头

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ACQUITY UPLC

其它 Waters® 色谱柱

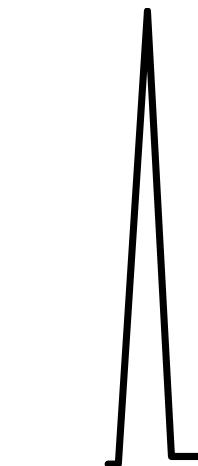
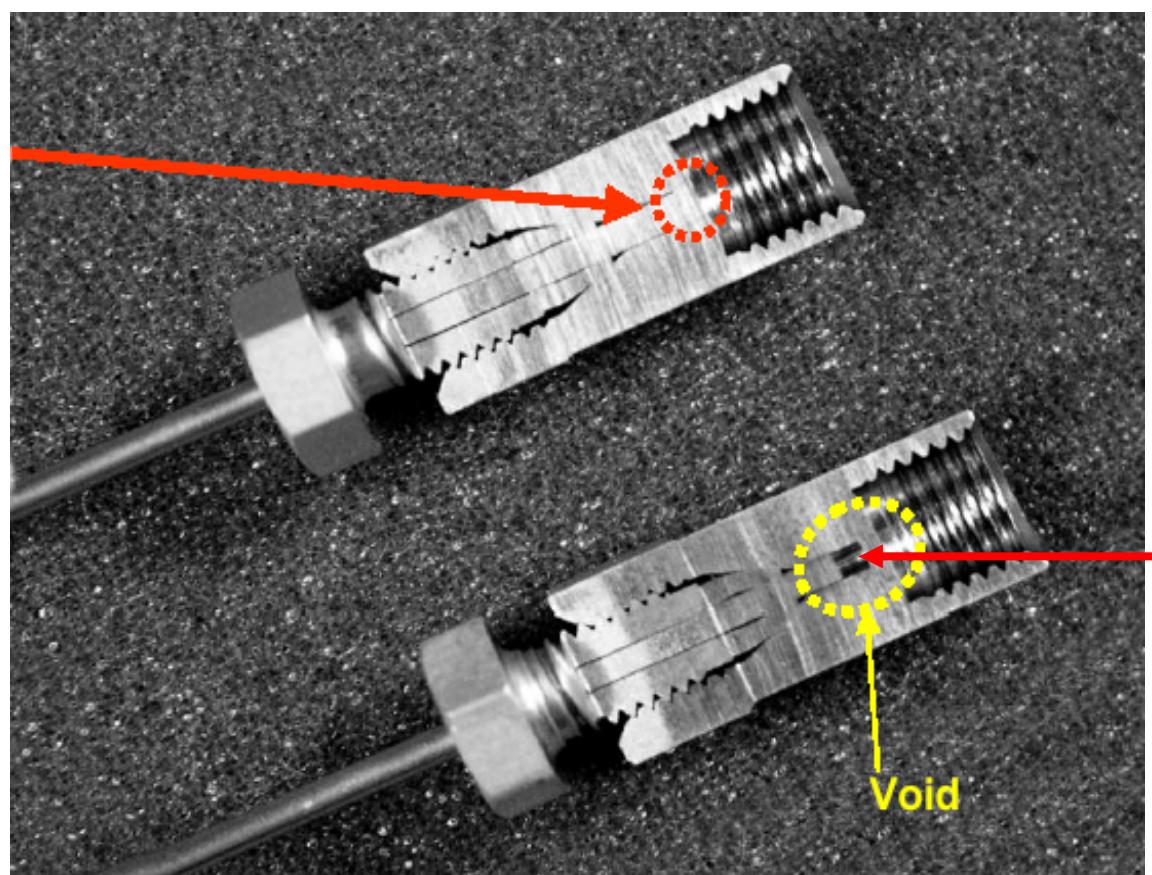


0.080 – 0.090 "
Parker/Swagelok
制式

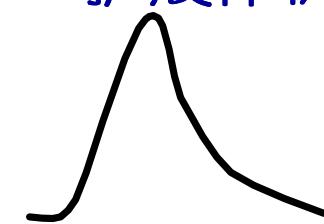
0.120 – 0.130 "
Waters 制式

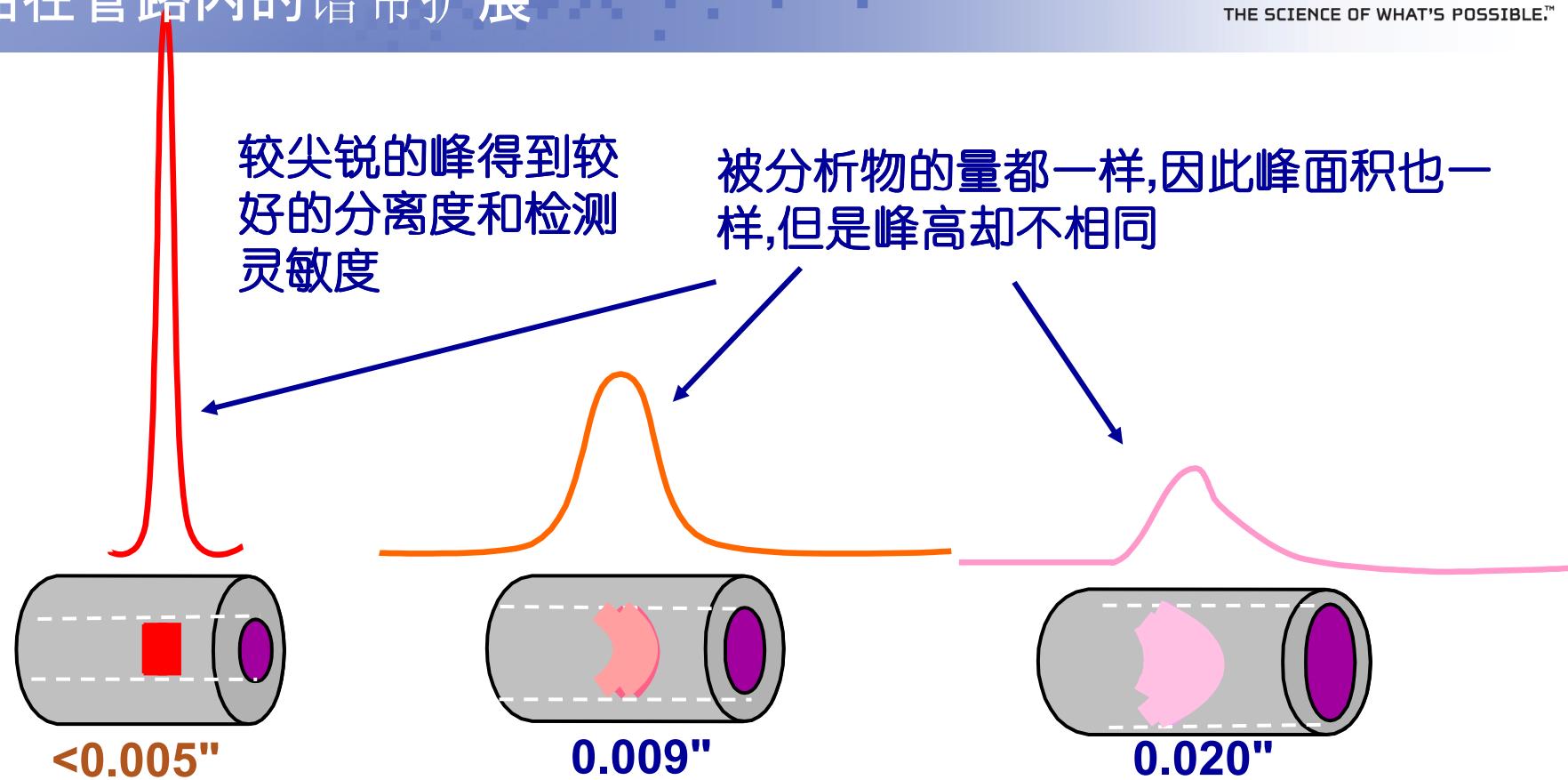
柱外谱带扩展

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

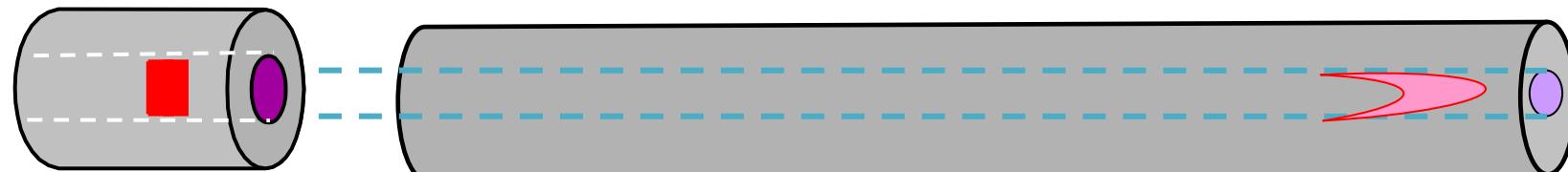


额外的谱带
扩展体积





过长的管路也会造成谱带展宽

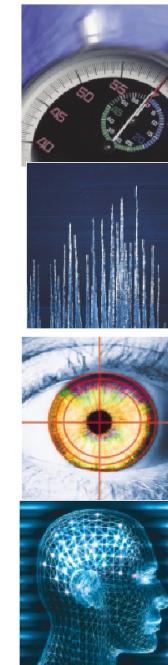


- Ultra Performance LC
 - 分离科学的一个新进展
- UPLC 使用与HPLC同样的理论和原理
- 基于更细的($1.7 \mu\text{m}$) 颗粒化学
 - 更快的分析速度
 - 增加灵敏度
 - 增大组份分离度
 - 增高系统反压

重新定义色谱科学



Acquity一词源自拉丁文“acutus”，意味着有更出色、更细致地解决问题的能力，及快速、敏锐的智能



速度

灵敏度

分离度

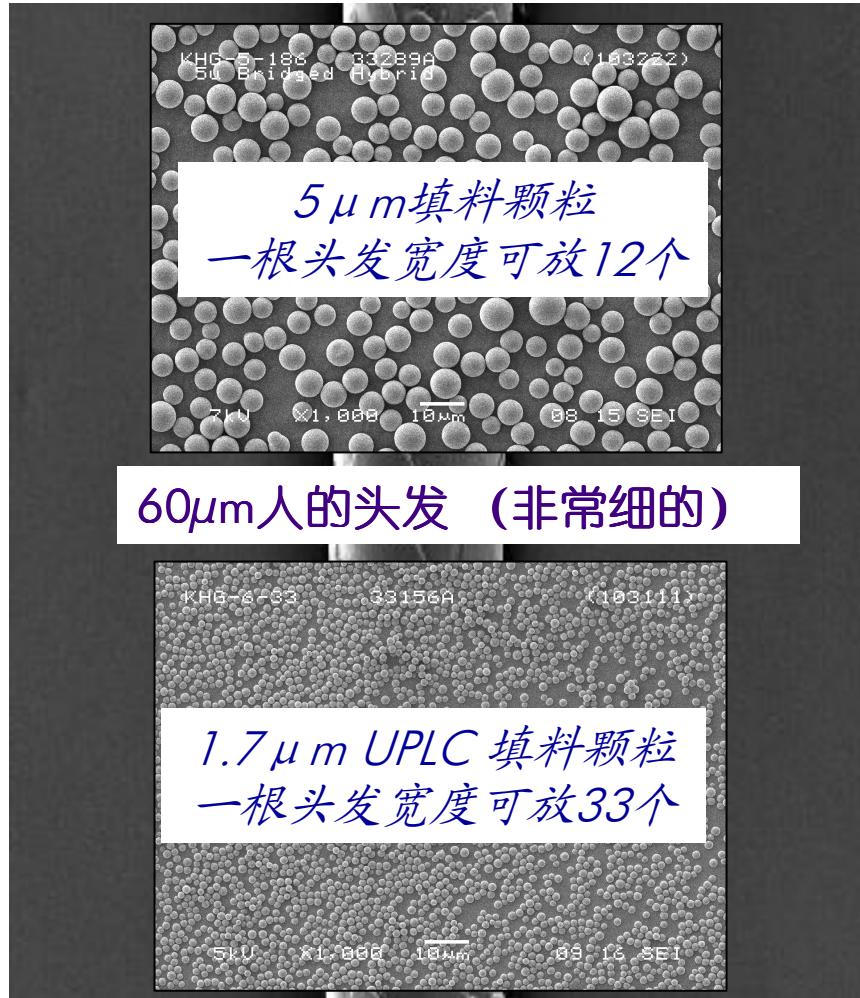
创新

- 超高效液相色谱(Ultra Performance LCTM)
 - 是分离分析科学中的一个全新类别
 - 涵盖了小颗粒填料、非常低系统体积及快速检测手段等全新技术
 - 与HPLC的理论及原理相同
 - 在全面提升HPLC的速度、灵敏度及分离度诸品质的同时，保留其原有的实用性及原理
 - 给实验室带来了新奇而强大的能力

- HPLC的分离质量被色谱柱化学所驱动同时又受其制约
 - 优化的柱化学能够给色谱过程带来增加速度、灵敏度和分离度的诸多好处
- 颗粒度是柱效能的最主要贡献者
- 当前遇到的挑战是 HPLC 仪器不能实现小颗粒填料的诸多利益

更小颗粒度所面临的挑战

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM



- 色谱柱的性能
 - 颗粒耐压及柱结构
 - 颗粒度分布
- 系统的压力限
- 系统体积
- 检测的可行性
 - 流动池的优化
 - 检测的速度
- 系统控制及数据管理

ACQUITY UPLC 分离能力小结

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

- Van Deemter 方程和曲线预言了UPLC 的分离能力
- ACQUITY UPLC
 - 在保持分离度的同时扩展了线速度范围，同时减少了分析时间

- 相同：
 - 相同的色谱原理
 - 同样的色谱理论
- 相异：
 - 填料颗粒度
 - 系统工作压力
 - 色谱分离能力
- 相互关联：
 - UPLC 以HPLC的极限为起点,全面提升液相色谱的性能
 - UPLC 是分离科学的新领域

ACQUITY H-Class 系统

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Acquity **H**
UPLC® CLASS



- ACQUITY 家族新成员
- 便捷的UPLC和HPLC方法无缝转化模式
- ACQUITY H-Class 系统包括：
 - 四元溶剂管理系统 (QSM)
 - 四元低压混合溶剂系统
 - 支持UPLC方法
 - 系统体积小
 - SM-FTN (Sample Manager-Flow Through Needle)
 - 一种进样模式-直接进样
 - 更简便-只需输入进样体积
 - 更卓越的进样精度
 - CH-A
 - 带有与主动预热稳定器的高温柱温箱
 - 兼容HPLC及UPLC的所有的检测器
 - 可加其他选件



Acquity **H**
UPLC® CLASS

培训教程 H-Class 基础



- 有机溶剂要求用色谱纯(进口名牌最好)
- 水或缓冲盐流动相要用超纯水($18.2\text{M}\Omega$),当天制备
- H-Class对洗针液的要求
 - 针内部由流动相清洗, 在运行过程中针是系统的一部分
 - 针外部由Wash Solvent在每次进样前软件控制清洗
- 清洗柱塞密封垫(Seal Wash)的溶液
 - 超纯水含5%-10%甲醇
- 特别提示: 以上溶剂或溶液均需:
 - 用 $0.22\mu\text{m}$ 的膜过滤并脱气
 - 用洁净的玻璃容器盛放,避免污染

- 打开计算机电源,进入Windows操作系统
- (如果有)打开Switch(网络路由器)电源
- 打开ACQUITY H-Class QSM和SM-FTN电源
- 先不要开TUV或PDA 电源
- 光学检测器的电源需待流动池内充满液体后再打开
- 待各仪器设备通过自检后(绿灯长亮),打开Empower软件
- 输入用户名及密码后进入Empower主画面

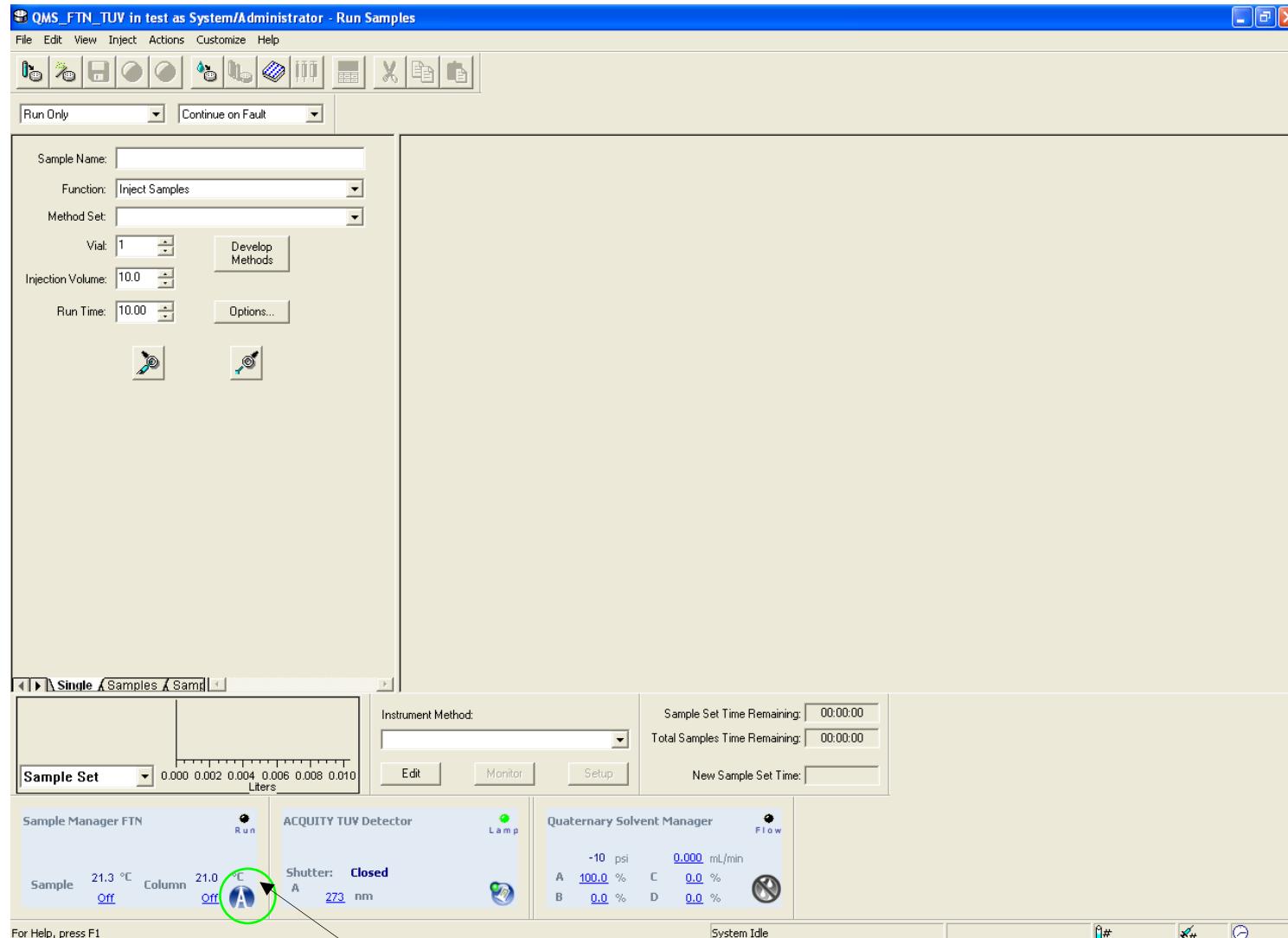
打开样品采集画面

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



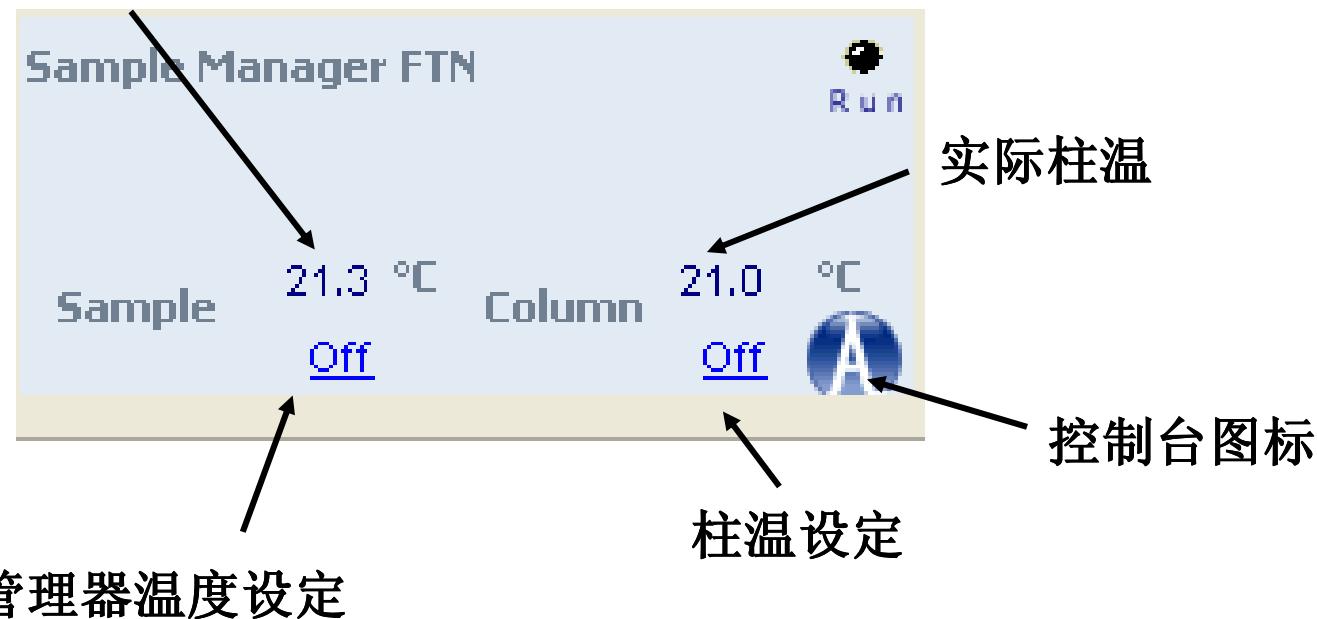
进入样品采集画面

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



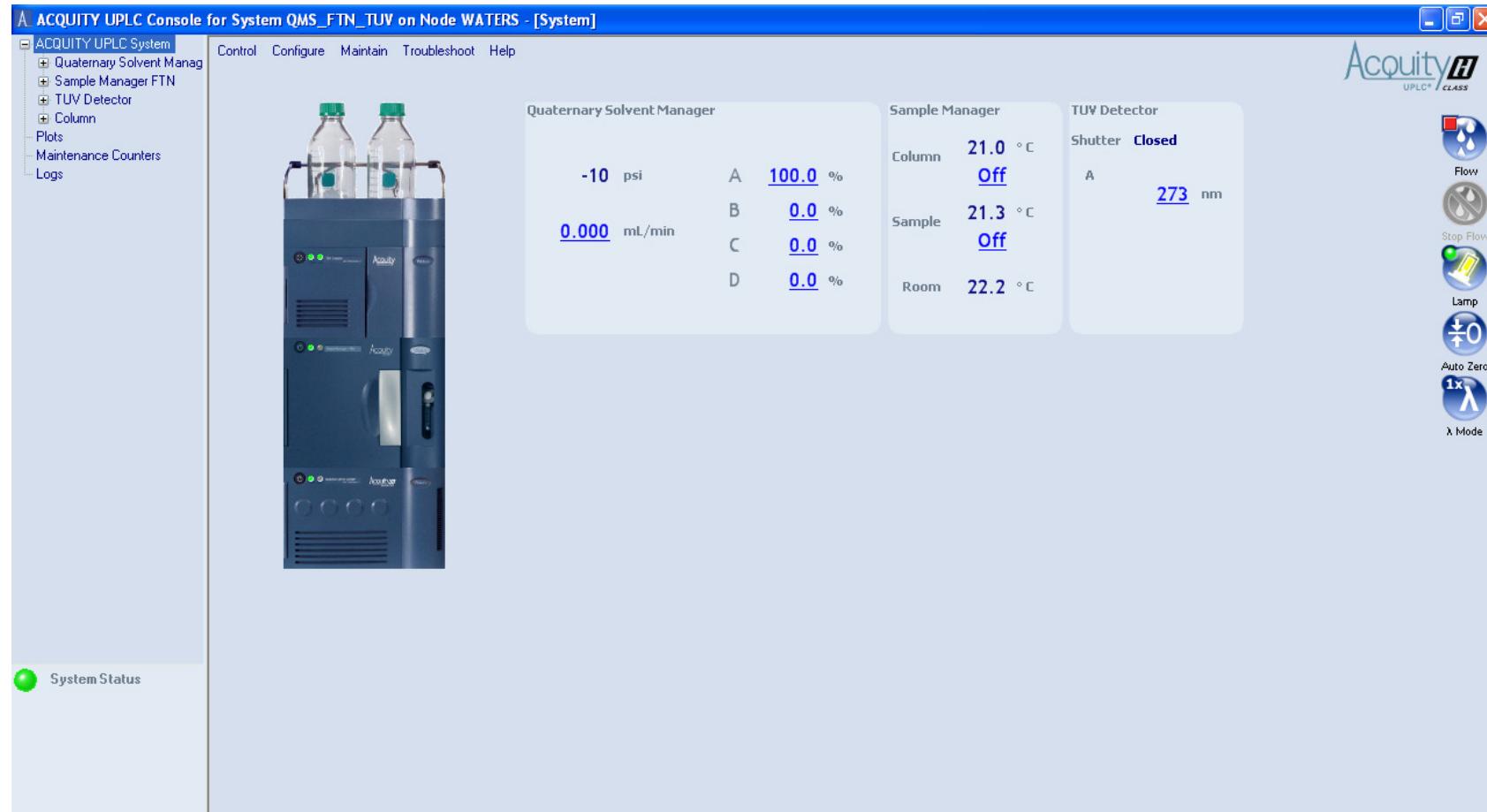
控制台图标

样品管理器实际温度



打开控制台界面

在Sample Manager FTN 控制面板上，单击控制台图标。
打开控制台窗口

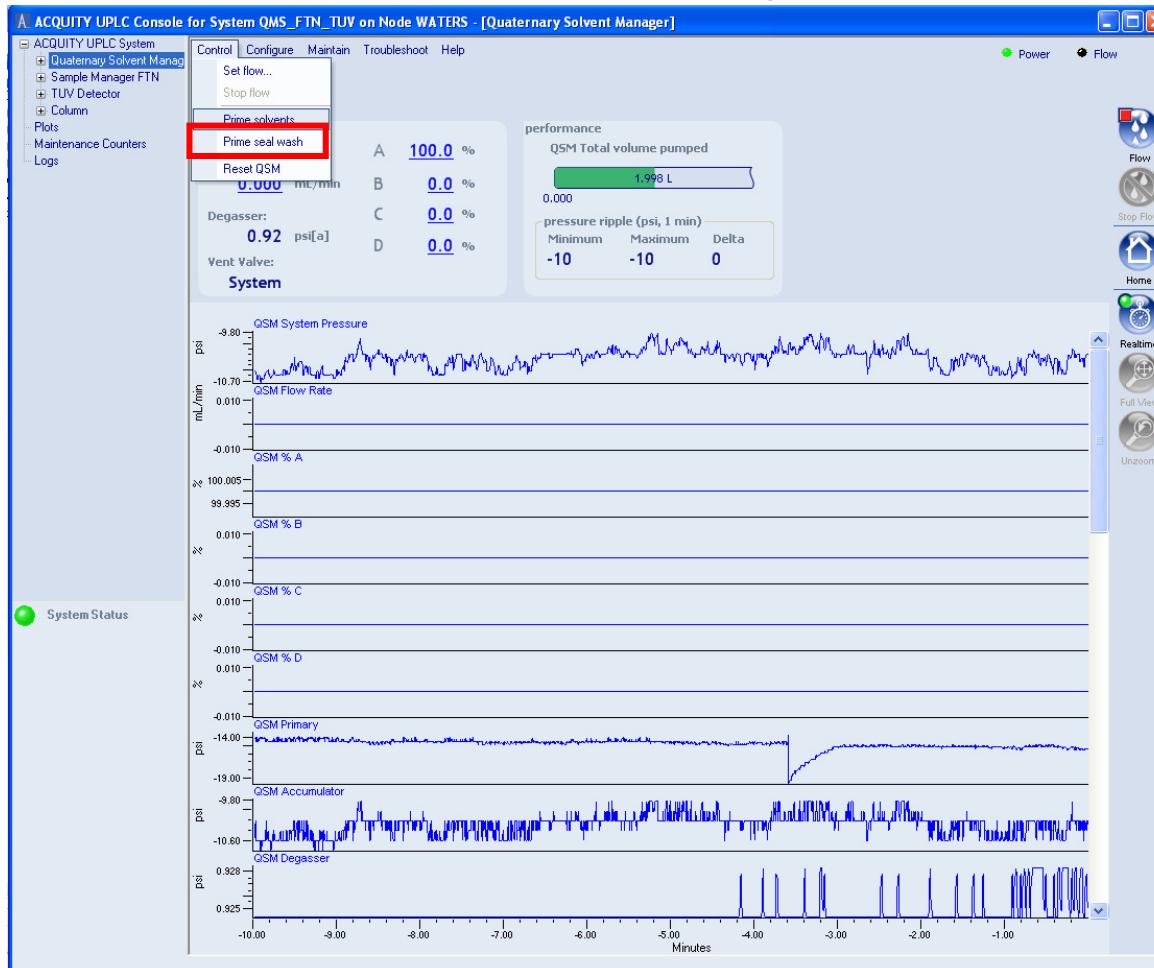


- 灌注柱塞杆清洗液(Prime Seal wash)
 - 以下情况需要做此操作Prime,例如:
 - 新安装仪器或泵流路中溶液走干了
 - 当泵几小时或更长时间未用
 - 用过缓冲液流动相之后
- 注意:
 - 为避免螺线阀座和密封垫的损坏,不要使用非挥发性的缓冲液作为Seal wash的溶剂
 - 为避免污染,请勿循环使用Seal wash溶剂
- 推荐: Seal wash溶剂中有机相比例不要超过10%
- Prime Seal wash前请检查溶剂是否足够

Prime Seal wash的步骤

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

- 将Seal wash出口端从废液盘上摘下,连接到注射器上
- 选择 Control>Prime Sealwash,点击之



Prime Seal wash的步骤

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

- 点击后,可以听到Seal wash 阀的开关声.此时:
- 慢慢抽注射器,直到有液体流出,然后将出口管再接回到废液盘上
- 或者取下吸滤头,用吸满清洗液的注射器,从入口端注入清洗液,直至出口管有液体流出
- 点击 可停止Prime过程

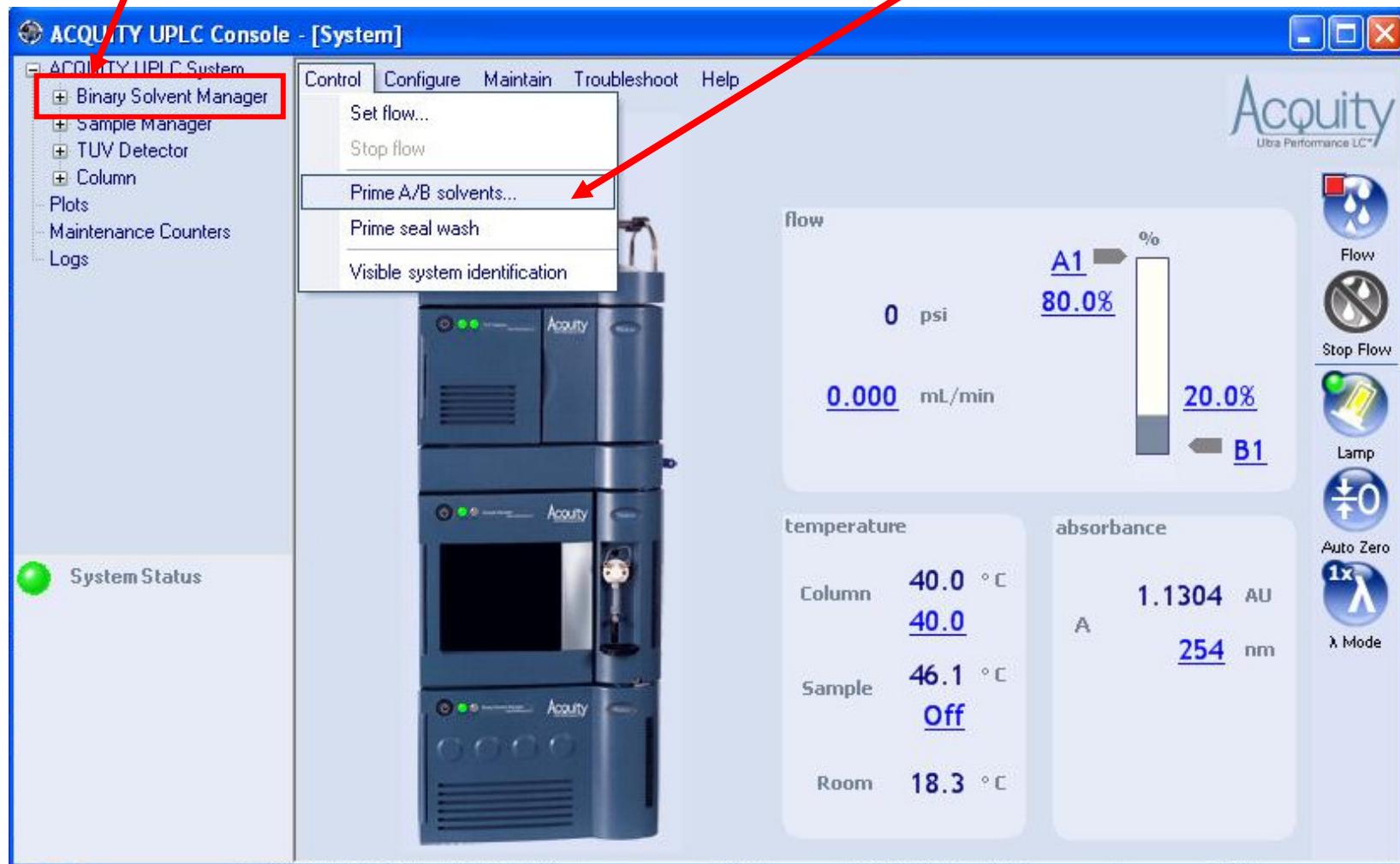


- 灌注四元溶剂管理器
 - 用于排除泵头及管路中的气泡
 - 用于更换从储液瓶到溶剂管理器之间的溶剂
- 在下列情况下需要Prime四元溶剂管理器
 - 启用新的四元溶剂管理器或新的系统
 - 停机4小时后再次开机
 - 更换流动相

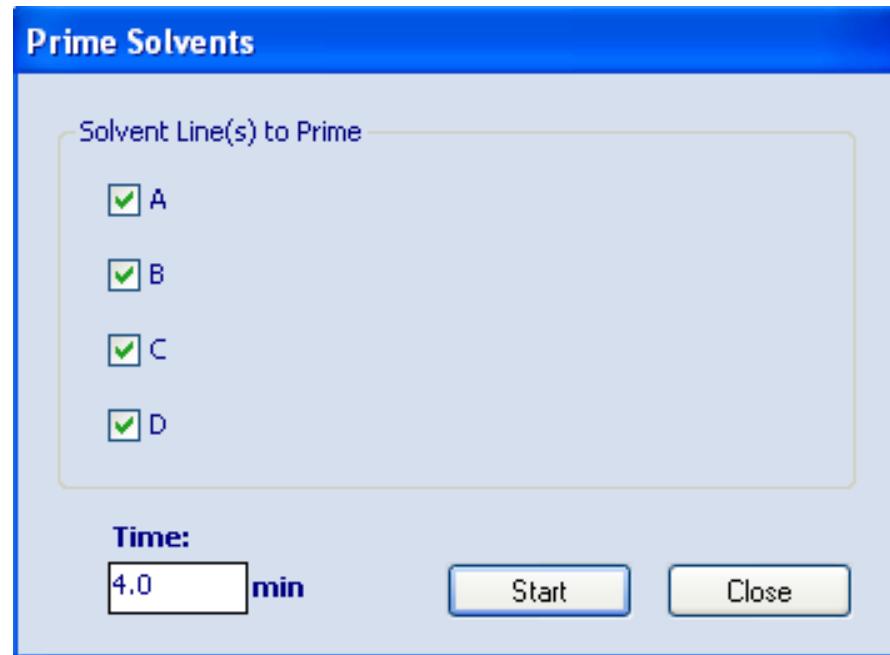
BSM 湿灌注的步骤

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

在此界面下,选择 Control>Prime A/B Solvents.

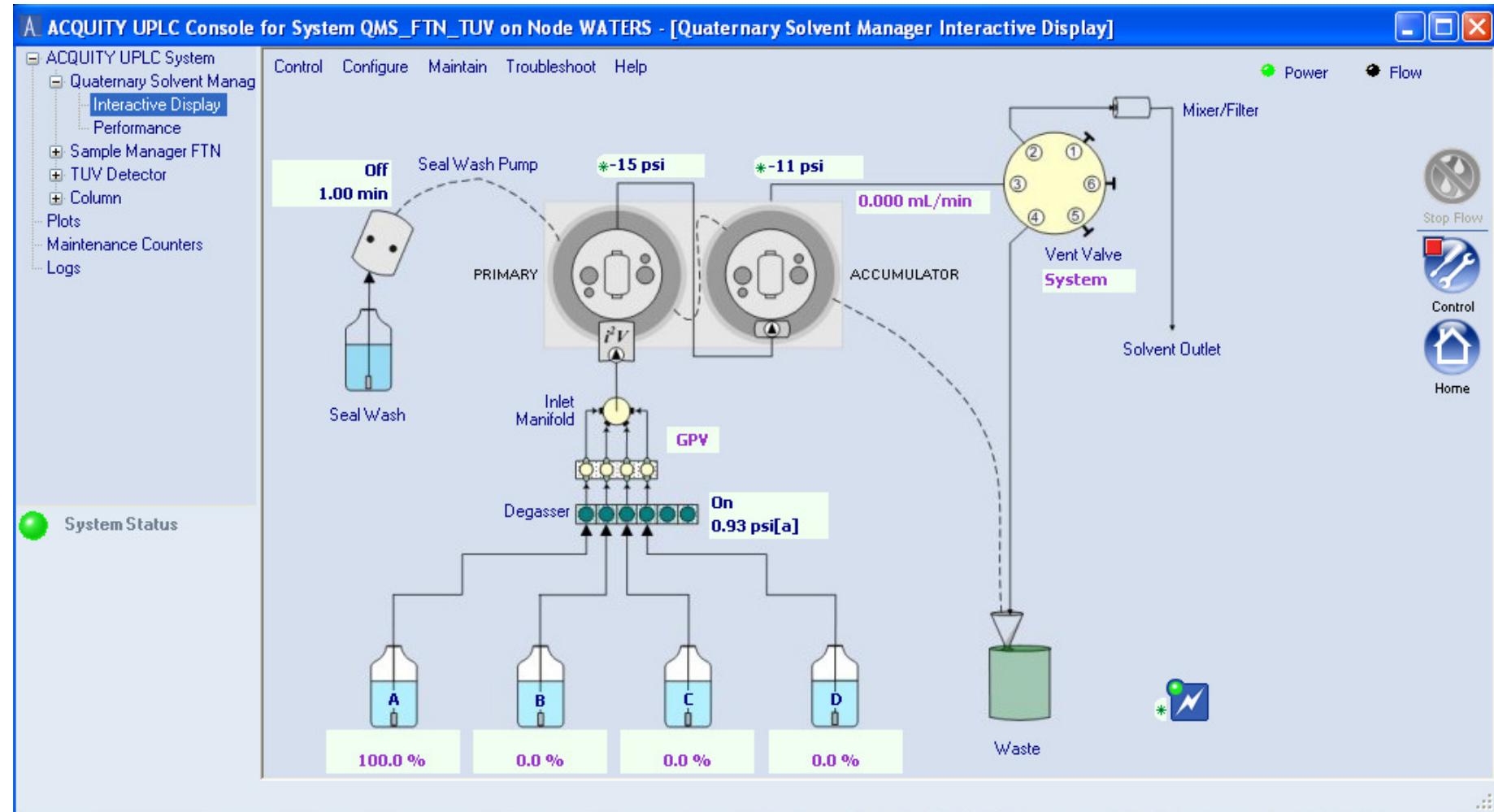


选择 **A、B、C、D**, 时间设定为4分钟, 按 **start** 按钮



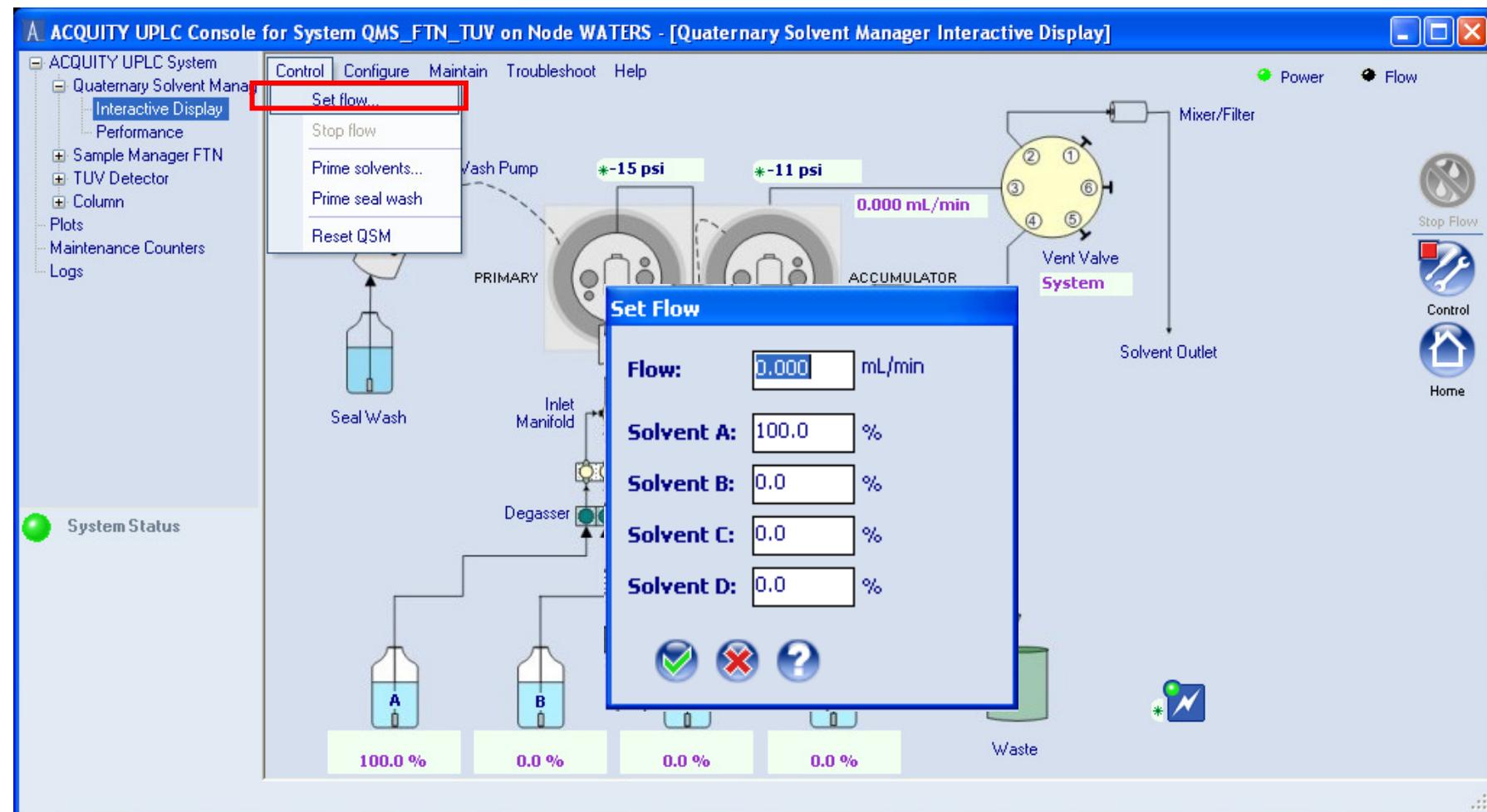
QSM交互式显示

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



QSM交互式显示(2)

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

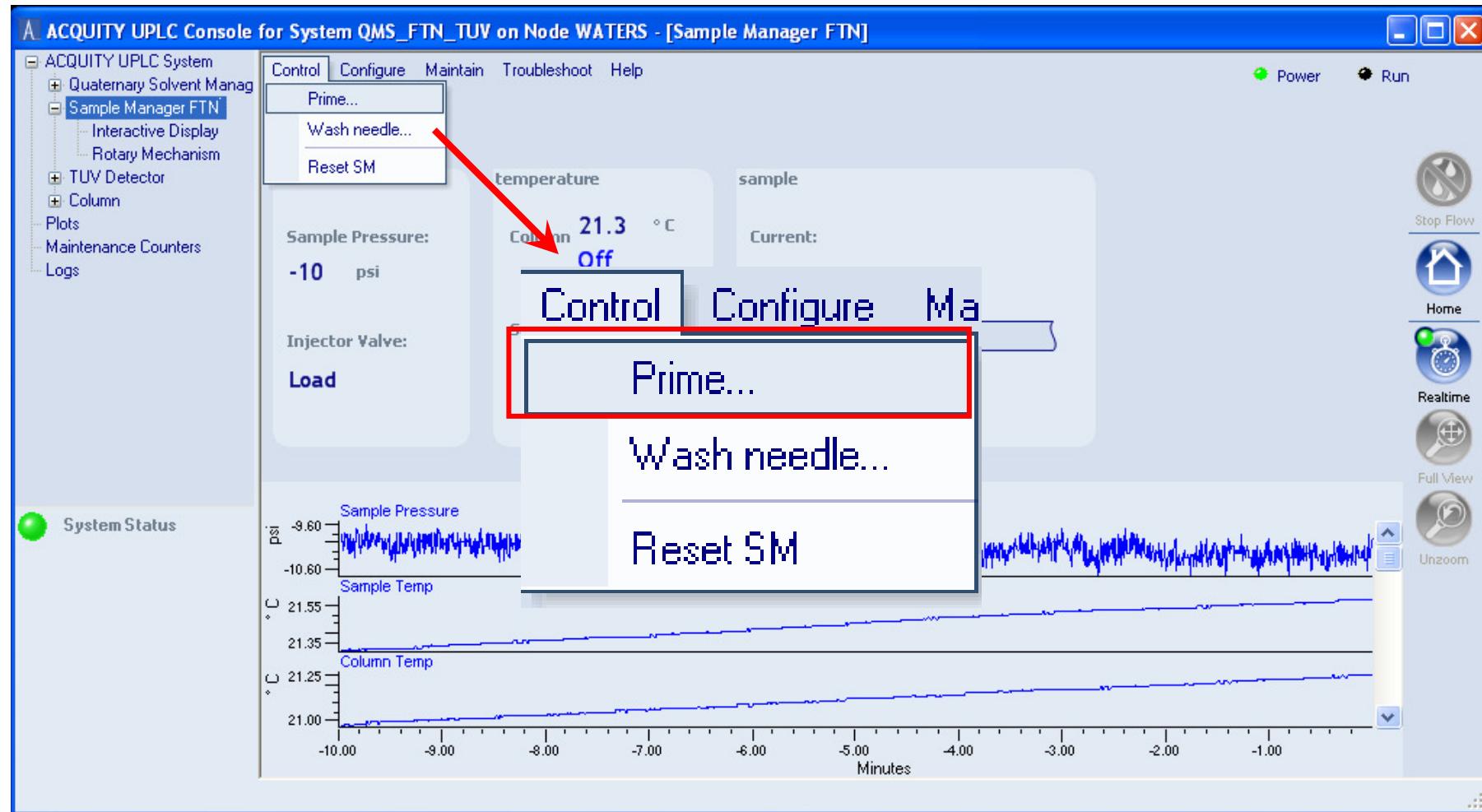


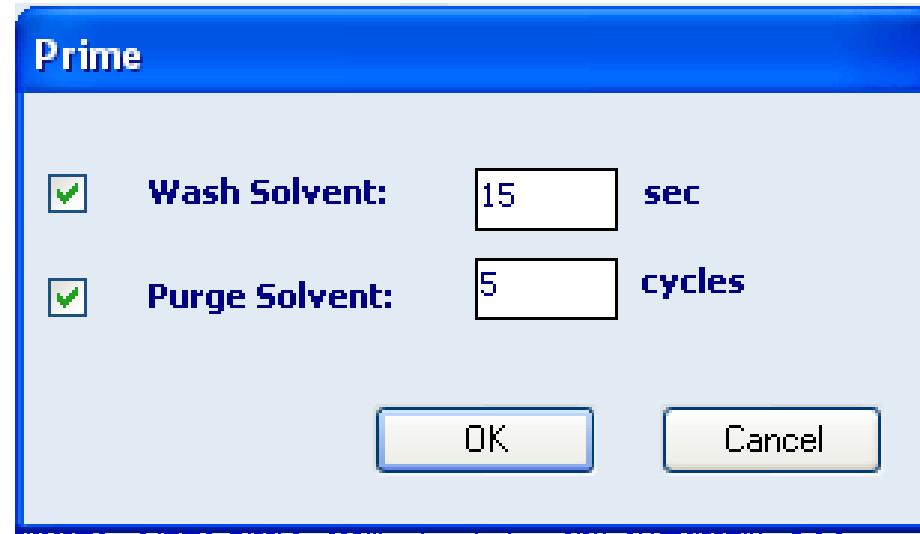
- 做过QSM的wet prime之后, 要准备样品管理器,
- 准备样品管理器包括如下步骤(新安装仪器时):

1. 灌注注射器(Purge Solvent)
2. 检查确认密封 (Characterizing the seal)
3. 检查确认进样针和定量环体积 (Characterizing the needle and sample loop volumes)
4. 加载 (Loading)样品盘

SM FTN样品管理器的准备

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™





- 选择 “Wash Solvent”，设定时间为15秒
- 选择 “Purge Solvent”，设定5-7个循环
- 单击 OK. 当系统状态是 “Idle(待机)”, 就表示灌注已经完成
- 提示：每做一次灌注大约需要2—4分钟

- 灌注进样针和样品注射器的目的是：
 - 准备样品管理器
 - 冲洗里面的进样针
 - 排除管路中的气泡
- 注：在灌注过程中，用溶剂充满进样针，在改变溶剂，或者排除管路中的气泡时，需进行灌注进样针和样品注射器
- 提示：
 - 确保用于灌注的溶剂有合适的组成，它应该是高纯的，并且几种溶剂是互溶的
 - 所有的试剂瓶都要使用滤头，并确保溶剂体积足够用于做灌注，例如，作5次灌注，每种溶剂要用去大约20 mL
- 要求：在检定密封之前必须先完成对样品管理器的灌注

选择清洗进样针的溶剂

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

- 洗针液的选择取决于样品和所使用的流动相，确保流动相和缓冲液是互溶的
- 要想得到好的柱效，**Purge Solvent**液必须等同于
 - 初始梯度的流动相
 - 等度时和流动相比例相同
- 不推荐缓冲盐作为**Purge Solvent**

色谱条件	Purge Solvent	Wash Solvent
反相/缓冲盐溶液	100% H ₂ O 或 0 到 25% 甲醇或乙腈	50 %到100% 甲醇或乙腈

冲洗进样针步骤

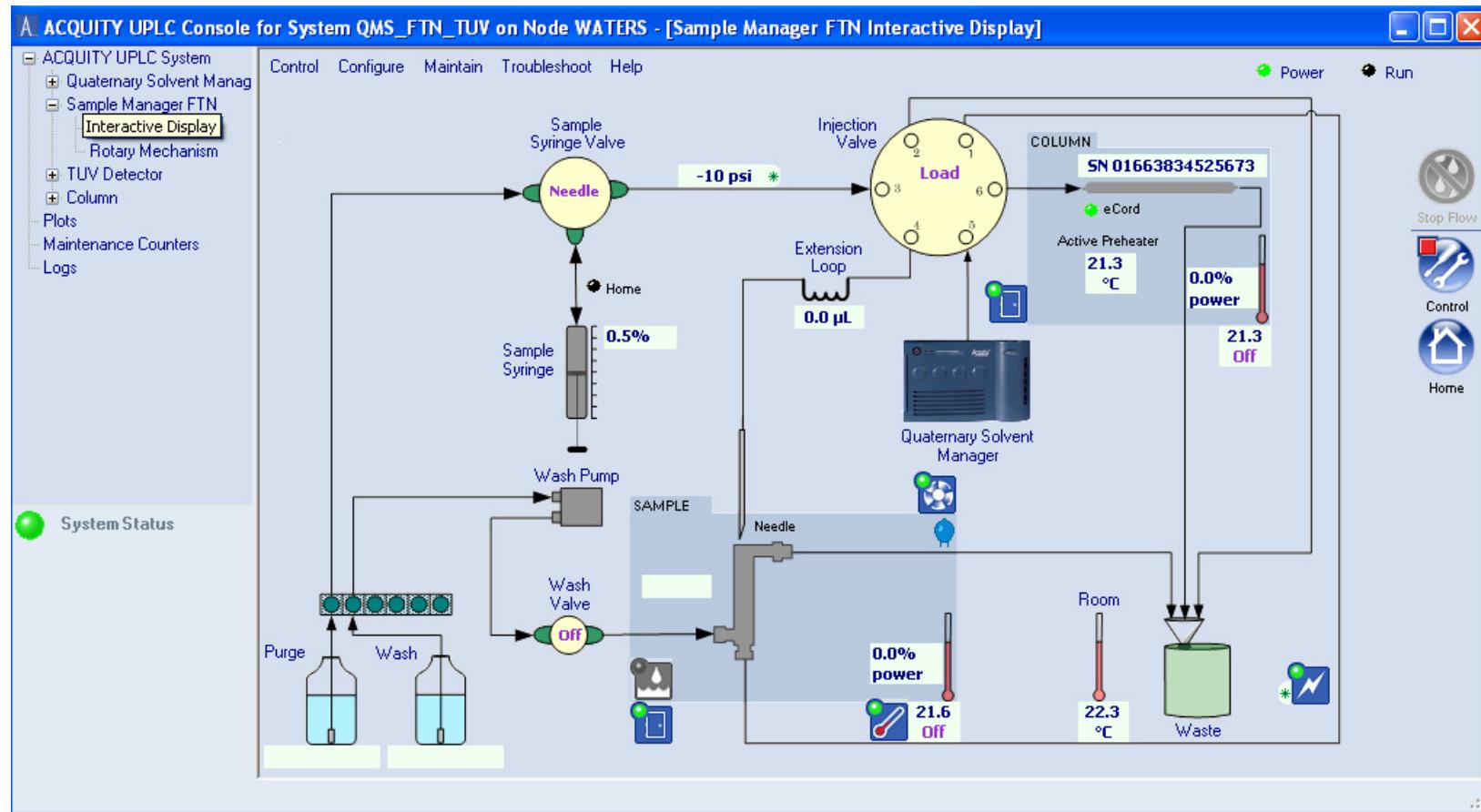
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

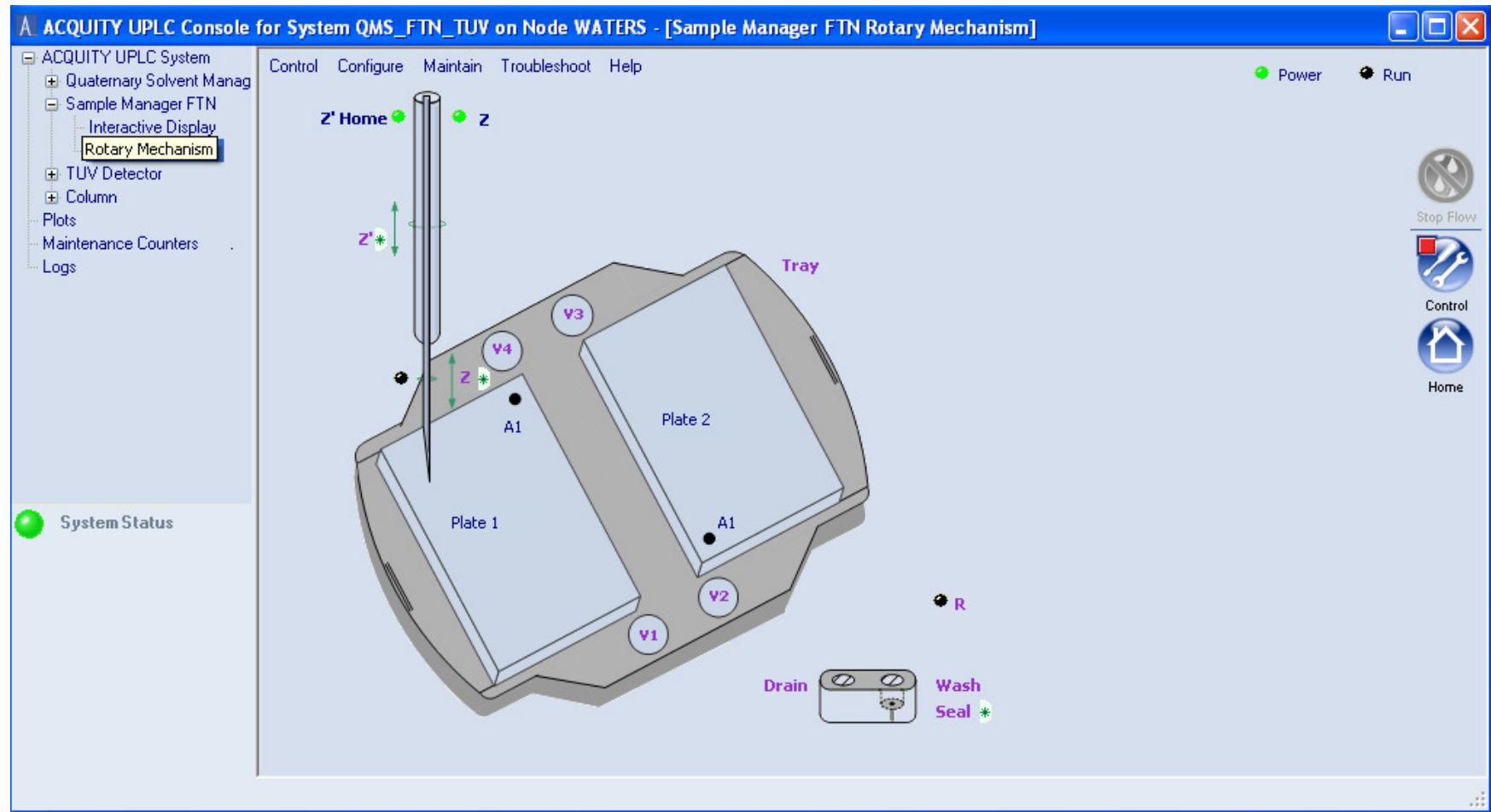
在控制台的Sample Manager窗口,单击Control > Wash Needle



SM FTN交互式显示

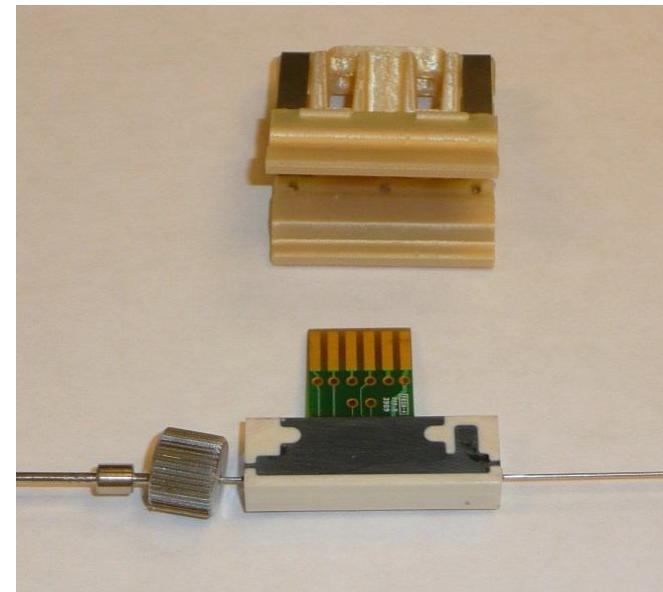
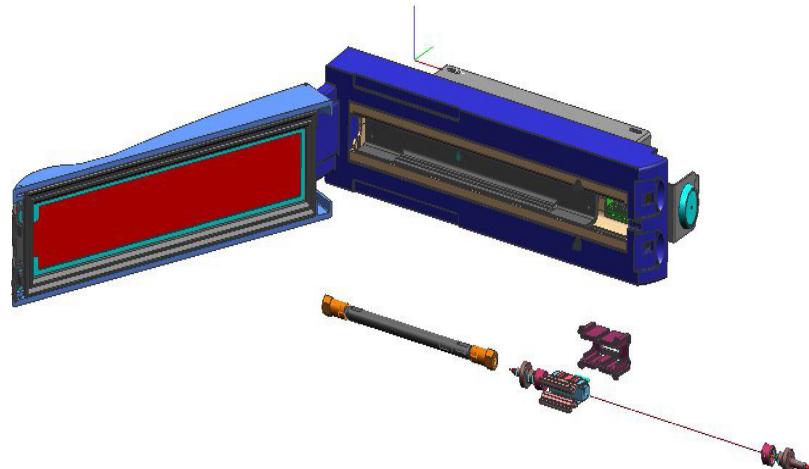
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™





色谱柱前主动预热稳定器

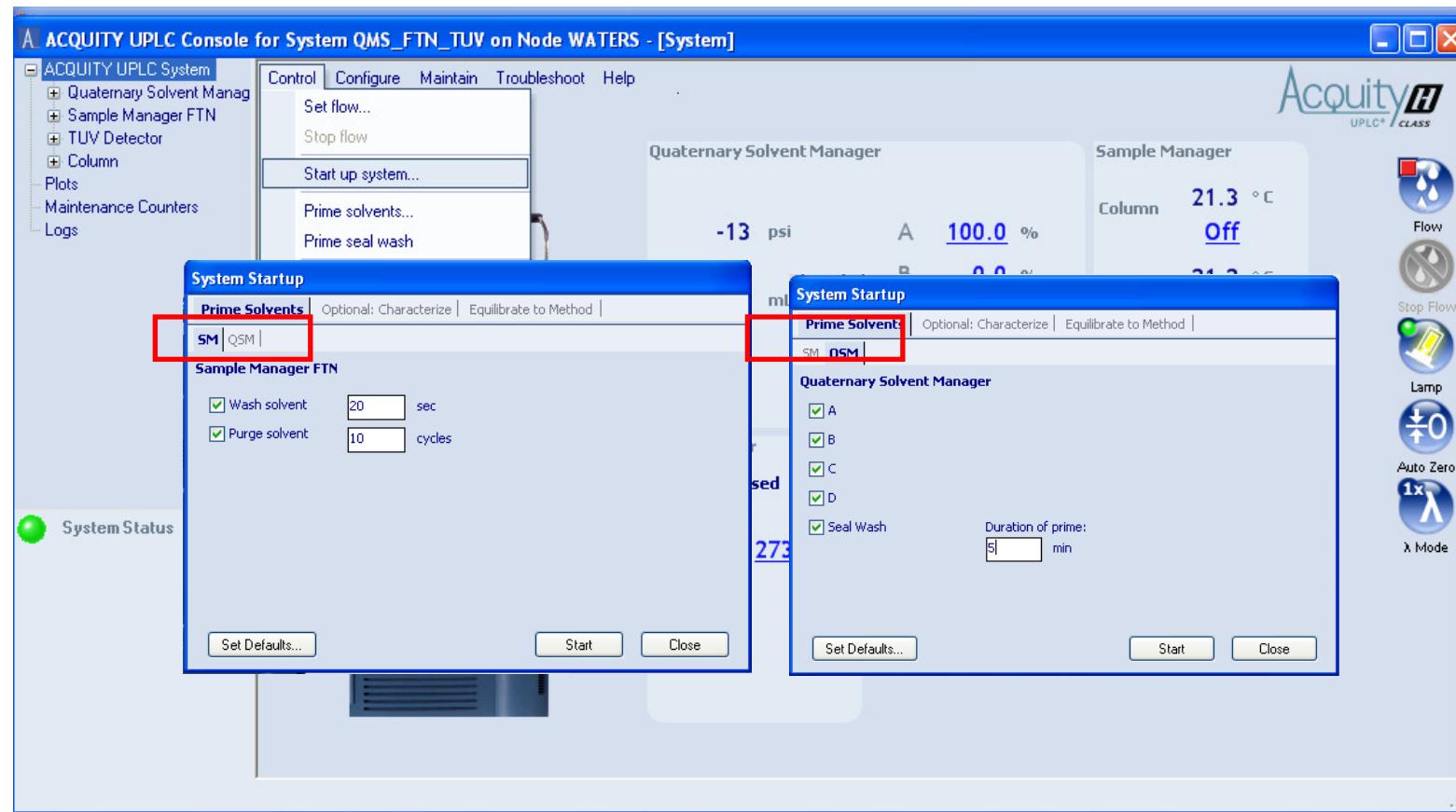
- 主动预热稳定器会减小对环境温度波动的敏感度，并减小/最小化谱带宽



- 确保检测池中充满溶剂并且没有气泡.如果检测池中有气泡,检测器就不能很好的初始化,并有可能损坏检测池
- 打开检测器电源. 检测器会发出滴滴滴三声响, 并进行一系列自检.电源和氘灯的指示灯都会不停地闪烁。初始化大概需要**2分钟**。灯预热大概需要**3分钟**
- 当指示灯常绿不闪烁时,通过监测控制台来测量和观察信号。要得到好的数据, 需要**30分钟**的时间平衡检测器和稳定基线

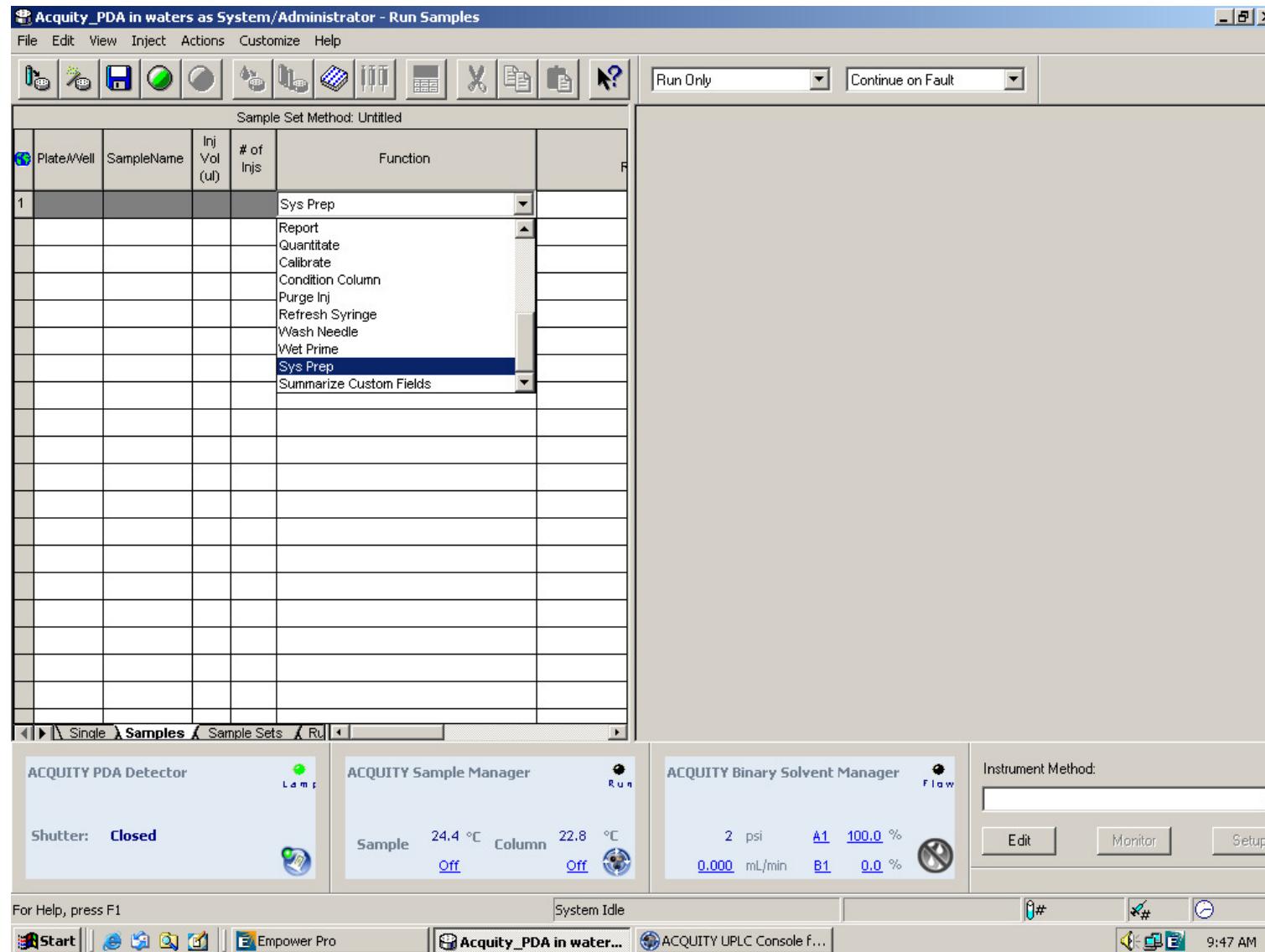
Start up 界面简介

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



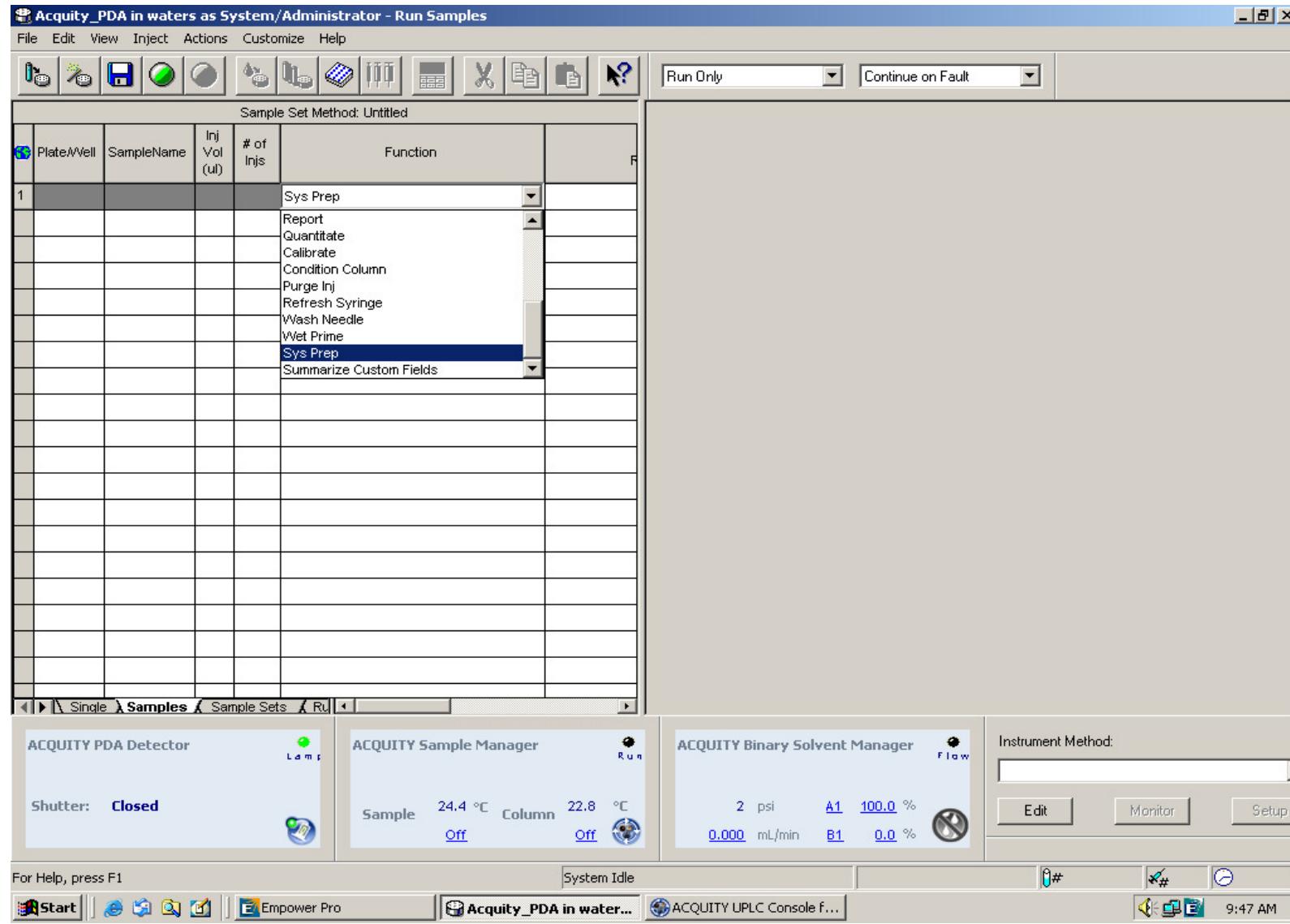
快速更新可编入样品组方法

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



运行样品组方法

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



- 总是使用清洁的玻璃器皿(瓶子, 量筒或溶剂过滤装置), 并在用前冲洗干净
- 尽量保持一组溶剂瓶和玻璃器皿专用于ACQUITY UPLC 系统
- 决不要用其他实验室(例如微生物实验室等)的玻璃器具来冲洗你的玻璃容器
- 溶剂瓶要贴上注明流动相配制日期的标签
- 不要往系统上的流动相瓶中“添加”流动相
- 每24-48小时制备新鲜的水相流动相, 尤其是100% 含水流动相
- 系统上的溶剂瓶要用合适的瓶盖盖好

- 只使用真正的 HPLC 最高级别的有机溶剂,推荐的最佳品牌是Fisher
- 检查溶剂是否已过滤,是否是用0.2um PTFE/GHP 膜过滤的
- 只用经过过滤系统滤过的水,18MΩ-cm 并经 0.2um 滤膜过滤
- 推荐使用由 Milli-Q A10 纯水装置制备的水
- 用高质量的盐或化学品制备缓冲盐流动相并用0.2um 滤膜过滤
- 不建议使用瓶装饮用水

- 用以下方法的一种或几种组合制备样品
 - 固相提取 (例如 Oasis 或 Sep-Pak)
 - 用 0.2um 滤膜过滤, 例如: Acrodic 25mm Polypropylene housing male luer, 0.2um 200pcs/pkg (WAT097965)
 - 沉淀蛋白 (例如 Sirocco)
 - 液液萃取后用 0.2um 膜过滤
 - 离心 (高于8000rpm 离心20分钟并将上清液用0.2um 膜过滤转移至新样品瓶中)

推荐的溶剂/样品稀释剂

- 甲醇
- 超纯水
- 乙腈
- 异丙醇
- 乙醇
- 二甲基亚砜
- N,N-二甲基甲酰胺

不建议使用的溶剂/样品稀释剂

- 二氯甲烷
- 氯仿
- 乙酸乙酯
- 氯化溶剂类(例如三氯苯)
- 甲苯
- >5%的强酸

推荐使用的添加剂/改性剂

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

- 0.2% 甲酸
- 0.1% TEA
- 10mM 磷酸盐缓冲液
- 50mM 铵缓冲盐
- 0.1% EDTA
- 0.1% TFA
- 0.1% 六氟丁酸
- 10mM 碳酸氢铵
- 50mM 乙酸铵

- 样品瓶是UPLC 分析中易被忽视的地方
- 使用不当往往会使SM出现进样针故障
- 是造成定量不准的重要因素
- 是色谱图质量不佳的影响因素
- 提示：
 - 测试样品与样品瓶的兼容性
 - 一些化合物可能会与样品瓶作用, 或者吸附在样品瓶表面

- 透明玻璃
 - Type 1, Class A(33号)硼硅酸盐
 - 最好的化学惰性玻璃
 - Type 1, Class B(51号)硼硅酸盐
 - 比Class A碱性更强
- 棕色玻璃
 - 所有棕色玻璃瓶是Type 1, Class B (51号)
 - 用于对光敏感的样品
- 聚丙烯
 - 非离子型, 惰性的塑料瓶。在玻璃瓶不能用时可使用, 最高使用温度: 135° C

- 所有Waters透明样品瓶是Type I：“33号膨化玻璃”
 - 更少游离离子
- 很多欧洲品牌的样品瓶是 Type I “51号膨化玻璃”

Ions	Type I (33)	Type I (51)
Na	0.3-0.5	0.4-1.4
K	ND	ND-0.02
Ca	ND	ND-0.1
Mg	ND	ND
Al	ND	ND-0.5
Fe	ND	ND
Ba	ND	0.2
Mn	ND	ND
Si	ND	ND-5

Results in ug/ml

选择适合的盖子CAP – 减小污染

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

- 螺纹盖
 - 传统型
 - 盖与垫分离
(装时可能带来污染)
 - LectraBond™
 - 盖垫一体, 不使用化学剂和粘合剂
(电子焊接法)
— 更小的污染可能
 - 有预开口设计



用于 ACQUITY H-Class 系统的样品瓶

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.TM

用于 ACQUITY UPLC[®] 系统的样品瓶

用于 peek 和金属针头



LCMS 检验合格组合包装

样品瓶、瓶盖及预切割硅胶/PTFE隔垫

600000668CV 600000669CV 600000670CV 600000755CV

LCGC 检验合格组合包装

样品瓶、瓶盖及预切割硅胶/PTFE隔垫

186000307C 186000847C 186000327C 186003886C

去活组合包装

186000307DV 186000847DV 186000327DV

组合包装

样品瓶、瓶盖及预切割硅胶/PTFE隔垫

186002636 186002639

可注射体积, Acuity UPLC[®]

最大进样体积

1600 μL 1600 μL 1100 μL 1100 μL 530 μL 210 μL

残留体积

165 μL 165 μL 22 μL 22 μL 70 μL 20 μL

对于氨基酸 ACQUITY UPLC[®] 系统, 建议使用全部回收样品瓶, 但其只适合配用 PEEK 针头。