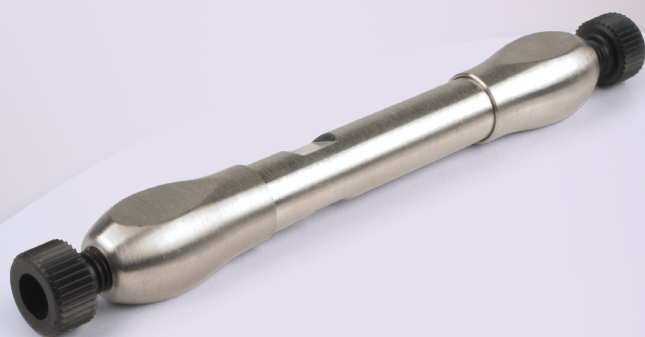


系统优化手册

充分利用您的Kinetex[®]核-壳色谱柱



Kinetex核-壳填料可以在任何HPLC系统上发挥UHPLC性能优势。

在现有常规HPLC系统上实现Kinetex核-壳色谱柱超高性能的关键因素，其优化内容包括：

- | | |
|-------------|------|
| 1. HPLC方法 | 第2页 |
| 2. HPLC系统体积 | 第6页 |
| 3. 检测器设置 | 第12页 |

每个部分对您发挥核-壳填料的[®]最大优势都非常重要。



017

1. HPLC方法

为何重要

下列与方法相关的技术改进将提高所有色谱柱分离的性能。使用Kinetex®核-壳色谱柱时，采用以下建议将大大改善性能。

- HPLC方法应该先设法让样品集中在色谱柱头上，然后尽量减少样品在色谱柱上的扩散。
- 在该方法中结合简单的进样器编程，可以尽可能减少柱外体积，从而改善峰形和柱效，尤其是对于快速的液相色谱分离方法。

问题：所有峰形的展宽

1. 检查：样品量

载样出错会影响Kinetex核-壳颗粒所能达到的性能增益。如果您将样品在等度条件下注入与流动相相同的有机混合物中，色谱柱上的初始带宽将与进样量直接成正比。正因如此，进样体积大的样品都将在色谱柱进样时形成宽带（低柱效）。

解决方案▶ 预先聚集样品。为了减少大体积进样造成的柱效损失，可以使用比流动相弱的稀释剂并将样品预先聚集在色谱柱头上。

2. 检查：样品稀释剂

如果稀释剂的有机强度大于HPLC流动相，那么样品在HPLC色谱柱头上的进样将会形成扩散带。这种情况会在等度或梯度方法中发生，并且影响Kinetex色谱柱所具有的诸多性能优势。

- 将样品注入强度较大的稀释剂的梯度应用会导致化合物的强溶剂效应，从而使峰变宽并分裂。
- 稀释剂强度大于流动相的等度方法会导致过多的样品扩散。

解决方案▶ 注入弱溶剂。最好使用有机强度小于或等于流动相的稀释剂，这样样品会集中在色谱柱头上，从而形成更锐利的峰形（即更高的柱效）。

1. HPLC方法

问题：所有峰形的展宽（续）

3. 检查：进样器程序

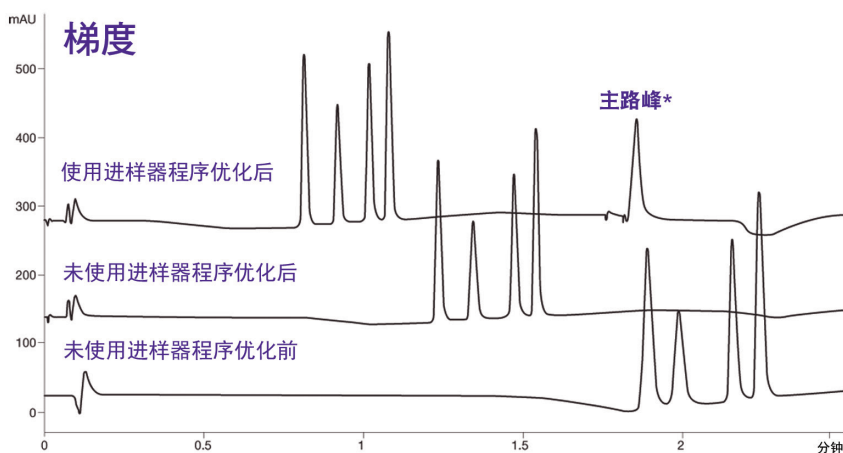
柱前的柱外体积会导致样品在流入色谱柱的通道上造成扩散；进样器回路是产生柱外体积的主要原因。

解决方案▶ 绕过回路。在分析方法中可以使用进样器程序绕过回路（样品离开进样器回路后）。**表1**和**图1**显示的是进样后绕过进样回路减少系统死体积的示例。

表1:

步骤	Commands (指令)	注释
1	DRAW (抽取样品)	从瓶中抽取样品量 (进样量)
2	INJECT (注入样品)	将样品注入流动路径
3	WAIT 0.06 min (等待时间的计算公式见注释)	进样后冲洗样品回路 [等待时间 = $6 \times (\text{进样量} + 5\mu\text{L}) / \text{流速}$]
4	VALVE bypass (绕过进样阀)	直接从泵流入色谱柱, 绕过进样阀以排除延迟体积 (从自动进样器路径约200-500 μL)
5	WAIT 1.5 min (等待时间的计算公式见注释)	阀旁路时间的长度 (等待时间=运行时间-1分钟)
6	VALVE mainpass (回到进样阀)	将阀从旁路切换到进样位置

图1: 使用进样器程序减少死体积



* 主路峰的产生是为了将进样器回路包括在流动中, 而把进样器阀切换回去所产生的假峰 (目的是冲洗进样器以为下次进样作准备)

1. HPLC方法

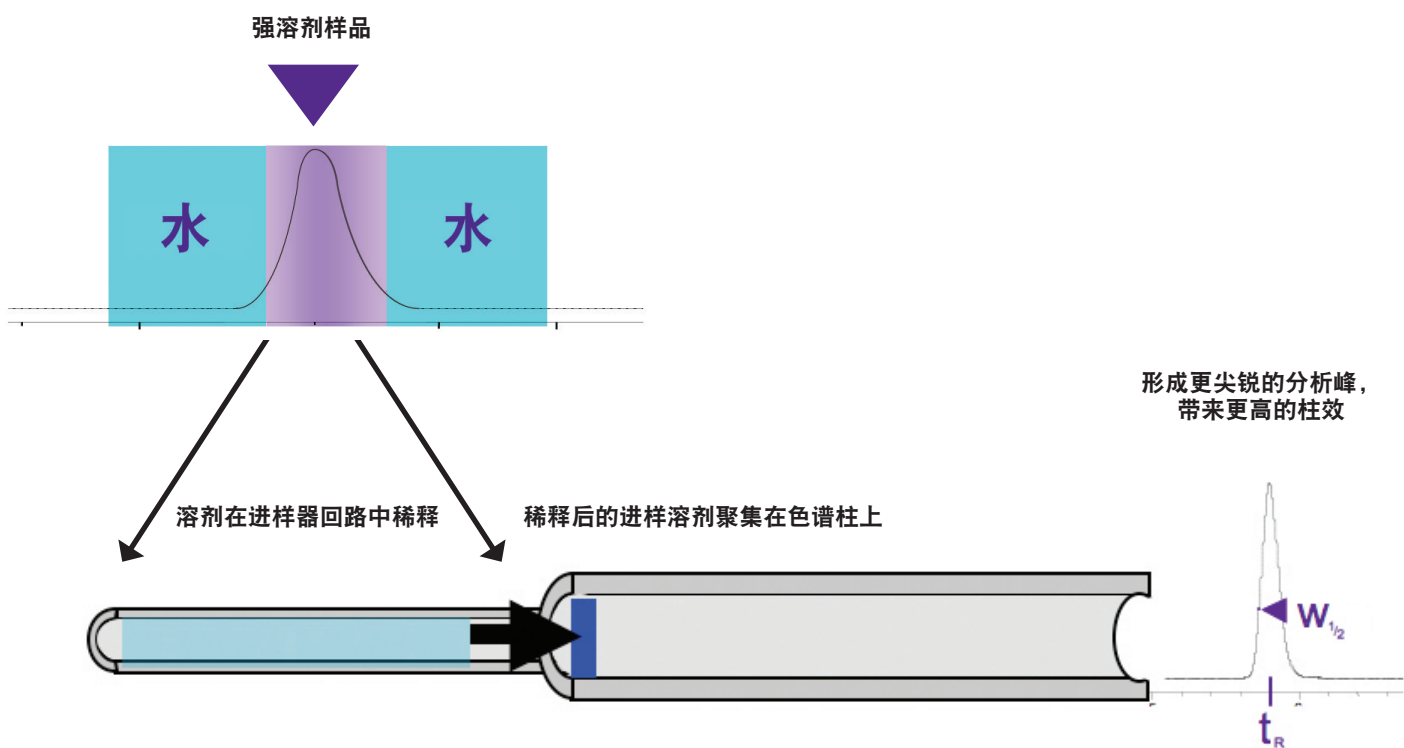
问题：第一个峰的展宽

检查：极性化合物聚集

在反相HPLC中，较早洗脱化合物的峰通常会有最严重的失真。在等度条件下，较早洗脱化合物的峰容量相等于柱外体积，而在梯度条件下，弱保留的化合物在色谱柱进样口端有极少或完全没有重新聚集的现象。

解决方案▶ 聚集样品。在进样后使用进样器程序，注入一定量的水，约为样品进样量的3倍。这样可以将样品集中在色谱柱头上并提高保留度，从而形成更加尖锐、对称的峰形。分离度上的改进在小直径色谱柱中表现尤为明显，因为这些色谱柱的峰容量最小。相关示例请参见图2和3。

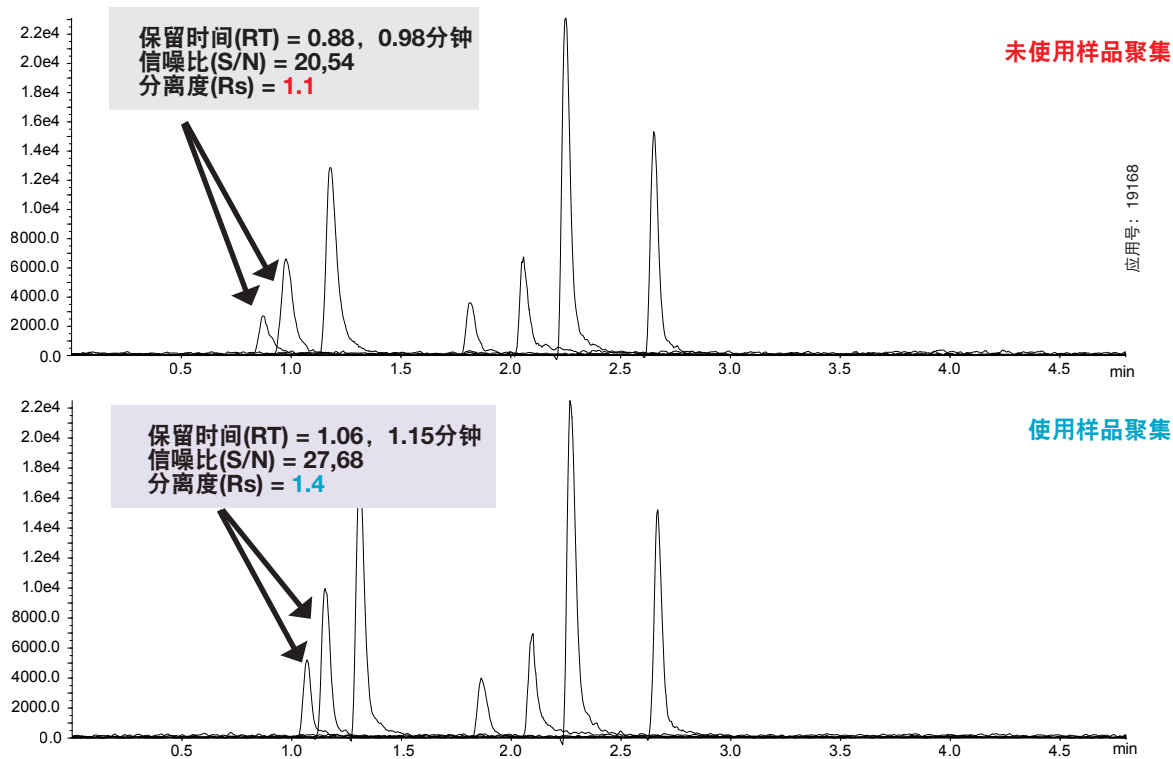
图2：样品聚集的进样器程序



1. HPLC方法

问题：第一个峰的展宽（续）

图3：使用样品聚集改善较早洗脱的峰形



HPLC方法优化：利与弊

优点

- 缩短运行时间
- 提高峰的效率
- 改善相近洗脱峰的分离度
- 改善提早洗脱分析物的峰形

缺点

- 增加平衡时间（进样器程序）
- 限制进样量
- 可能破坏色谱图中的基线（进样器程序）

2. HPLC系统体积

为何重要

作为大多数仪器基础的HPLC如今已成为稳固且高性能的系统，经过制造商的优化，使其能够与标准分析（250 x 4.6mm）色谱柱规格的超高容量、全多孔的5 μ m填料合用。这一设计明显地掩盖了Kinetex®核-壳色谱柱的分离能力。

为了实现Kinetex核-壳色谱柱的性能最大化，应该考虑柱外系统体积和性能之间的关系。

- 运行过程中，分析物在HPLC色谱柱内部所花费的时间是能产生效益的：
在色谱柱内，分析物得到高效的分离。
- 运行过程中，分析物在HPLC色谱柱外部所花费的时间没有价值：
在色谱柱外，分析物在连接管内扩散，降低柱效。
- 降低的柱外相对体积将提高系统总体性能。
 - 在柱前发生样品扩散
 - 在柱后发生峰扩散

? 疑问：我应如何尽量减少样品扩散？

1.检查：柱前体积

HPLC系统的柱前部分通常是在提高总体性能时最容易忽略的地方，因为它对色谱柱总体性能的影响小于柱后体积变化。有很多方法可以减少柱前体积，提高系统性能。

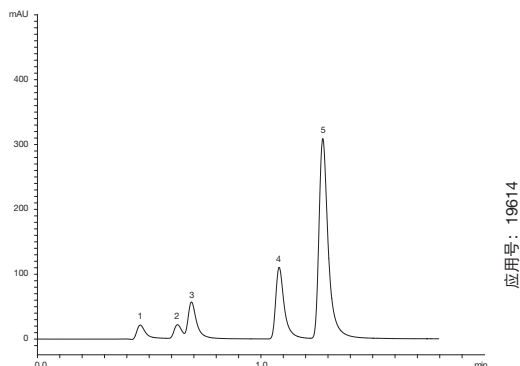
- **针座。**在许多HPLC系统上，进样针和针座是进样回路的组成部分，造成大量的死体积。
 - 对于整合式针和针座系统，标准针座可以轻松更换为小体积针座。Agilent® 1100（0.17 x 100mm，绿色）上的标准针座毛细管，体积为2.5 μ L。

解决方案▶ 使用较小体积的针座。较小体积针座毛细管（0.12 x 100mm；红色）可以减少几乎一半的体积，即减少到1.3 μ L。
图1显示的是Agilent 1100更换上针座毛细管后的示例。

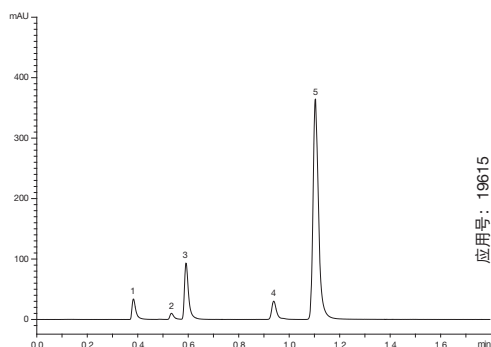
2. HPLC系统体积

图1: 系统优化带来的图谱改善

Kinetex® 100 x 2.1mm未优化的HPLC系统



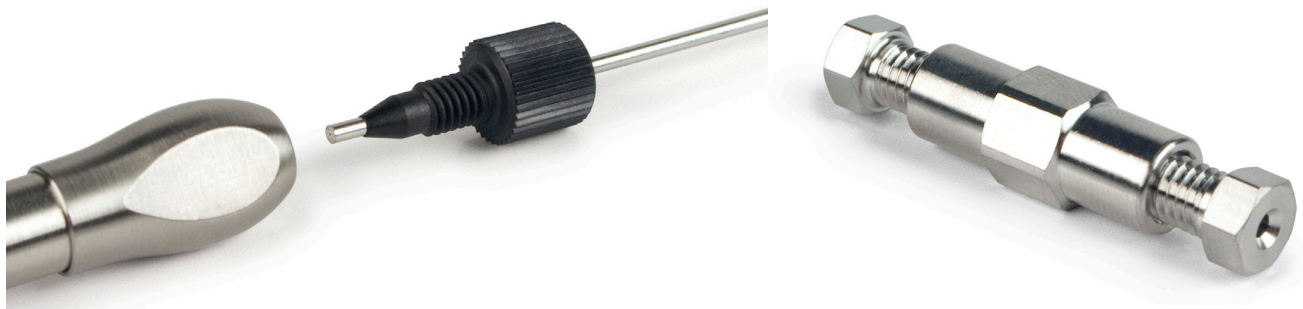
Kinetex 100 x 2.1mm优化后的HPLC系统



- **固定体积回路。**固定体积回路被用作于进样器的一部分，而过大的样品回路可造成大量的系统柱外死体积。
解决方案▶ 更换为较小体积回路。在所有情况下，进样回路体积都可以减少到更加适合具体应用的体积。在某些情况下，比如使用大量的稀释剂，可考虑使用捕获柱 (trap column) 以显著地减少进样回路体积。
- **溶剂热交换器。**至于热交换器，管件体积的增加是为了将流动相的温度调整为更加吻合色谱柱的温度。
解决方案▶ 控制储液器的温度。如果流动相确实必须加热（或冷却），那么应该考虑控制储液器的温度，而不要使用热交换器。
- **色谱柱切换阀。**色谱柱切换阀是一个极好的方法开发工具，但会显著地增加系统的体积。
解决方案▶ 绕过切换阀。或者使用较小体积的色谱柱切换阀。
- **接头和连接件。**如果接头连接不正确，可能大量地增加死体积。较旧的管件连接件也可以增加系统的死体积（图2）。
解决方案▶ 零体积手紧接头。管件连接件应该是零死体积（ZDV）的连接件。手紧接头可以确保来自多家供应商零件的连接性更佳完善。

2. HPLC系统体积

图2: PEEK Sure-Lok™螺母和零死体积连接件

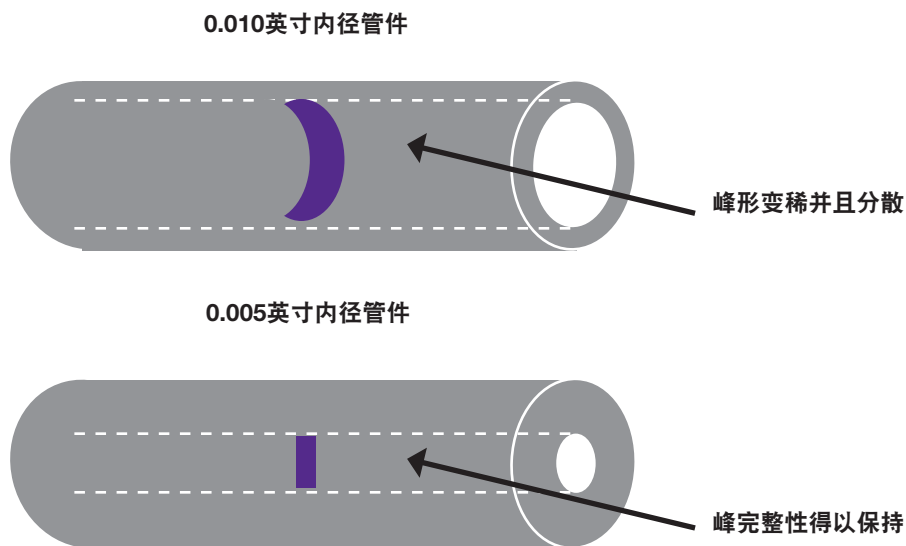


- **管件。**大多数常规HPLC系统在整个系统中都用内径0.010英寸的管件来连接。内径0.010英寸管件的溶剂体积为1.3 μ L/in (0.51 μ L/cm)，增加了HPLC系统的大量死体积。
 - 解决方案▶** 使用0.005英寸管件。0.005英寸管件的内部体积为0.3 μ L/in (0.13 μ L/cm)。这样可以减少约1 μ L/in (0.38 μ L/cm)的柱外死体积，并应从溶剂混合“T”字处一直连接到HPLC色谱柱入口。请参阅表1和图3。
 - 解决方案▶** 正确的管件切口。如果切割粗糙的管件会影响平整连接，那么这类接头可能会增加死体积。可以从许多渠道购买到固定长度的预切管件。

表1: 估计的毛细管体积

内径(in)	内径(mm)	μ L/in	μ L/cm
0.010	0.254	1.287	0.51
0.007	0.178	0.633	0.25
0.005	0.127	0.322	0.13

图3: 大内径管件增加系统体积和样品扩散



2. HPLC系统体积

柱前系统优化：利与弊

优点

- 缩短运行时间
- 提高柱效
- 改善相近洗脱峰的分离度

缺点

- 增加系统背压
- 潜在的方法重现性问题（色谱柱加热器和静态混合器）
- 限制进样量

? 疑问：我应如何尽量降低峰扩散度？

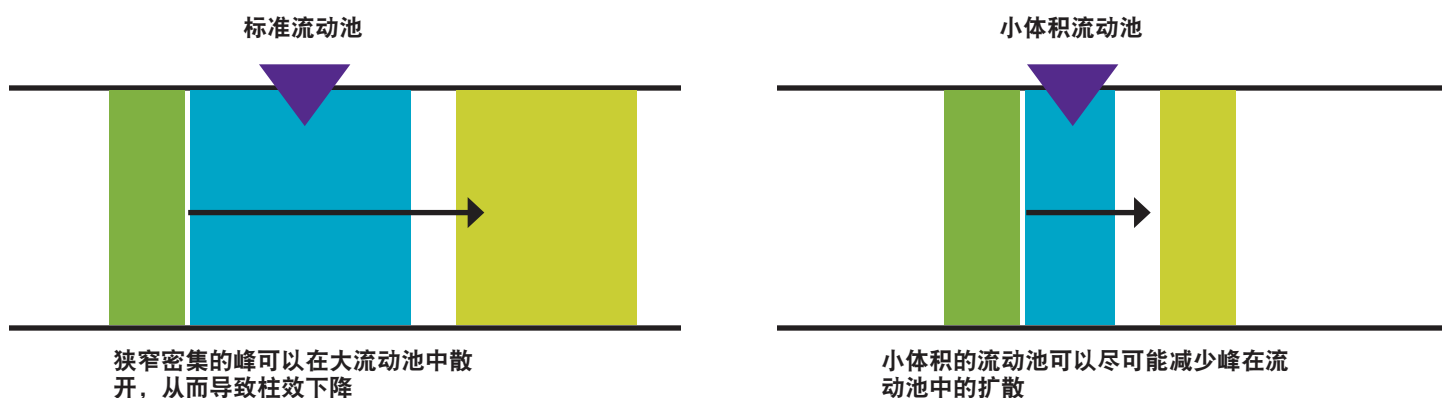
1. 检查：柱后体积

减少柱后体积可以大大降低峰扩散度，并明显地对观察到的色谱柱性能影响最大。系统优化可影响色谱柱性能的柱后体积区域取决于所使用的检测类型。

- **紫外线检测。**紫外线流动池是稍作调整（例如使用小体积流动池等）即可显著提高色谱柱性能的一个重要方面。较大的流动池容易分散窄峰，并降低观察到的色谱柱性能，同时还会导致相近洗脱峰的分离度损失。

解决方案▶ 安装较小体积的流动池。改成体积较小的流动池（ $\leq 3\mu\text{L}$ ）可以形成更尖锐的峰形，同时改善大多数相近洗脱峰的分离度（图4）。

图4：流动池不兼容导致的峰扩散



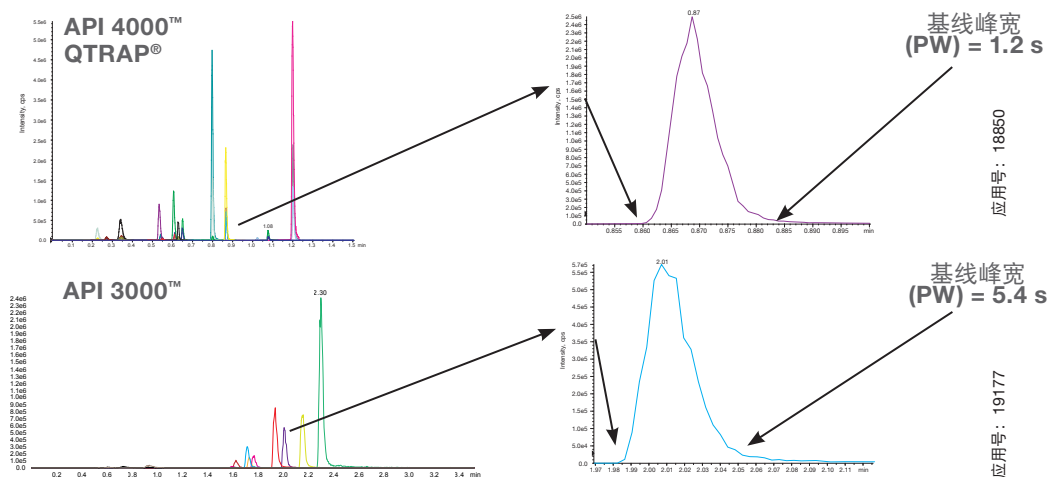
质谱接口。电喷雾接口中的多余体积可以降低类似于紫外线检测器流动池中所看到的性能。您还需要考虑在使用质谱检测器时，色谱柱出口和质谱检测器之间的距离可能比较大。

解决方案▶ 使用体积较小的ESI接口。在接口中使用毛细管线可以像小体积分离使用鞘流那样减少体积。图5的示例显示的是API 3000™和API 4000™接口之间的区别。API 4000™的峰宽得到四倍改善的部分原因是使用了体积较小ESI接口。

2. HPLC系统体积

图5: ESI接口体积影响峰扩散

使用两种不同MS来源的萘替啶峰宽对比



- **接头和连接件。**如果接头切割和连接不正确，会明显地增加死体积。较旧的管件连接件也会增加系统的死体积。

解决方案▶ 零体积手紧接头。管件连接件应该是零死体积（ZDV）的连接件。手紧接头可以确保来自多家供应商零件的连接性更好。

- **管件。**大多数常规HPLC系统在整个系统中都用内径0.010英寸的管件来连接。内径0.010英寸管件的溶剂体积为1.3 μ L/in（0.51 μ L/cm），增加了HPLC系统的大量死体积。

解决方案▶ 使用0.005英寸管件。0.005英寸管件的内部体积为0.3 μ L/in（0.13 μ L/cm）。这样可以减少大概1 μ L/in（0.38 μ L/cm）的柱外体积，并且应该从HPLC色谱柱出口连接到紫外线流动池入口或电喷雾接口（表2和图6）。

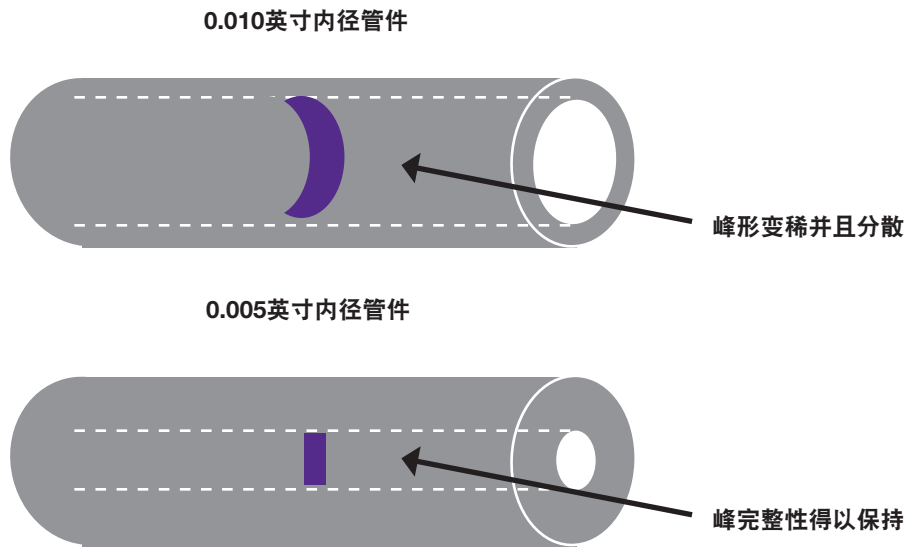
解决方案▶ 正确的管件切口。如果切割粗糙的管件会影响平整联结，那么这类接头可能会增加死体积。可以从许多渠道购买到固定长度的预切管件。

表2: 估计的毛细管体积

内径(in)	内径(mm)	μ L/in	μ L/cm
0.010	0.254	1.287	0.51
0.007	0.178	0.633	0.25
0.005	0.127	0.322	0.13

2. HPLC系统体积

图6: 大内径管件柱后体积增加峰扩散度并降低峰效率



柱后系统优化：利与弊

优点

- 提高峰的效率
- 改善相近洗脱峰的分度度

缺点

- 可能会降低灵敏度（流动池）

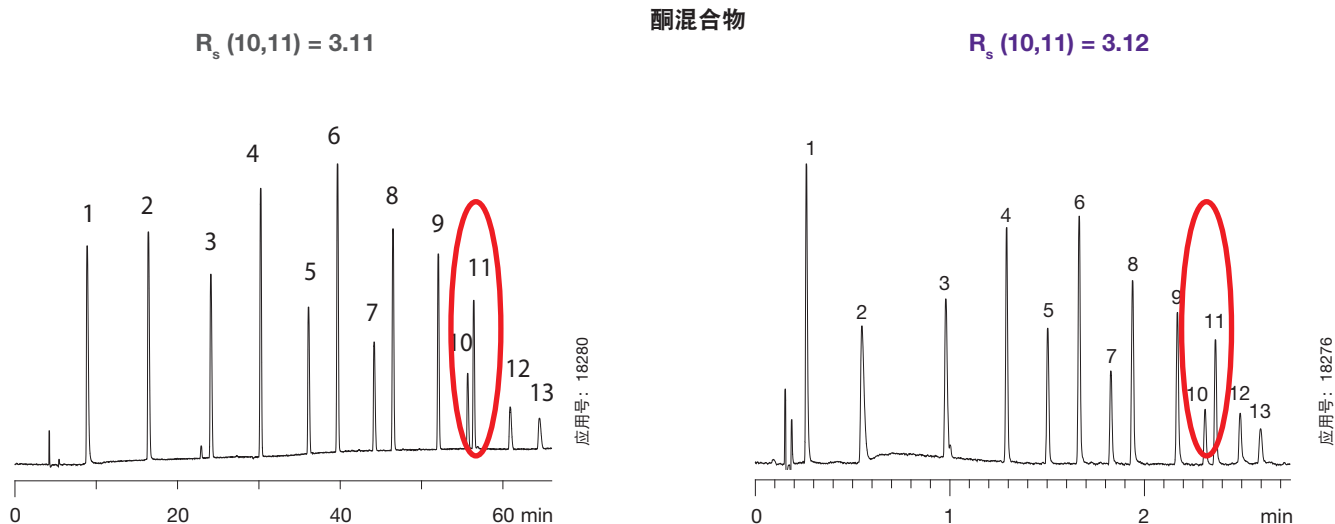
3. 检测器设置

为何重要

大多数HPLC检测器都为高容量峰宽而优化了数据采集功能，这一般在5μm全多孔填料分析中较为常见。

- Kinetex®核-壳色谱柱的超高性能色谱柱会形成狭窄的分析物峰，它具有高度密集、柱脱迅速和小容量的特点（图1）。检测器采样速率可能需要调整。
- 在各种不同的系统上，这可以是采样速率、峰宽或检测器时间常数。

图1: Kinetex快速、小容量峰



全多孔5μm C18

- 250 x 4.6mm
- 0.7mL/min
- Agilent® 1100

60分钟

平均峰宽: 0.37分钟 (22秒)
平均峰容量: 300μL

Kinetex 2.6μm C18

- 50 x 4.6mm
- 3.4mL/min
- Agilent 1100

2.5分钟

平均峰宽: 0.043分钟 (2.5秒)
平均峰容量: 146μL

3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低

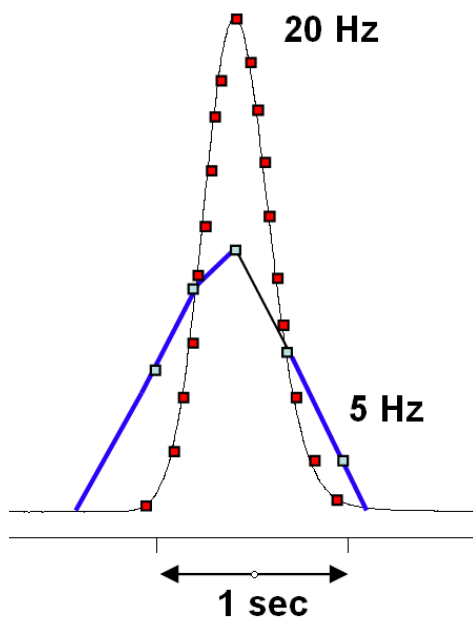
1. 检查：紫外线检测器扫描速率

许多使用全多孔10、5，甚至3 μ m分析级色谱柱的色谱工作人员都不习惯更改检测器的扫描速率。

解决方案▶

在峰中收集20个点。为了正确聚集成一个峰，理想状态下需要至少20个数据点。将采样速率提高到20Hz可以精确确定1秒宽的峰。有关低采样速率所存在的一些局限性的示例，请参见图2。

图2：检测器设置对峰效率和峰形的影响



2. 检查：紫外线检测器时间常数

通常设置较慢的检测器时间常数是為了过滤掉高频噪声。但遗憾的是，这种噪声过滤也会过滤掉Kinetex®核-壳色谱柱所具有的尖锐峰形和高分离度优势。

解决方案▶

增加检测器时间常数。图3和表1显示的是使用ChemStation在Agilent® 1100上优化检测器时间常数后的柱效改善结果。图4和图5分别显示在软件中为Agilent®和Waters®仪器修改检测器采样速率设置的位置。

3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低（续）

2. 检查：紫外线检测器时间常数（续）

图3：更改时间常数对峰效率的影响

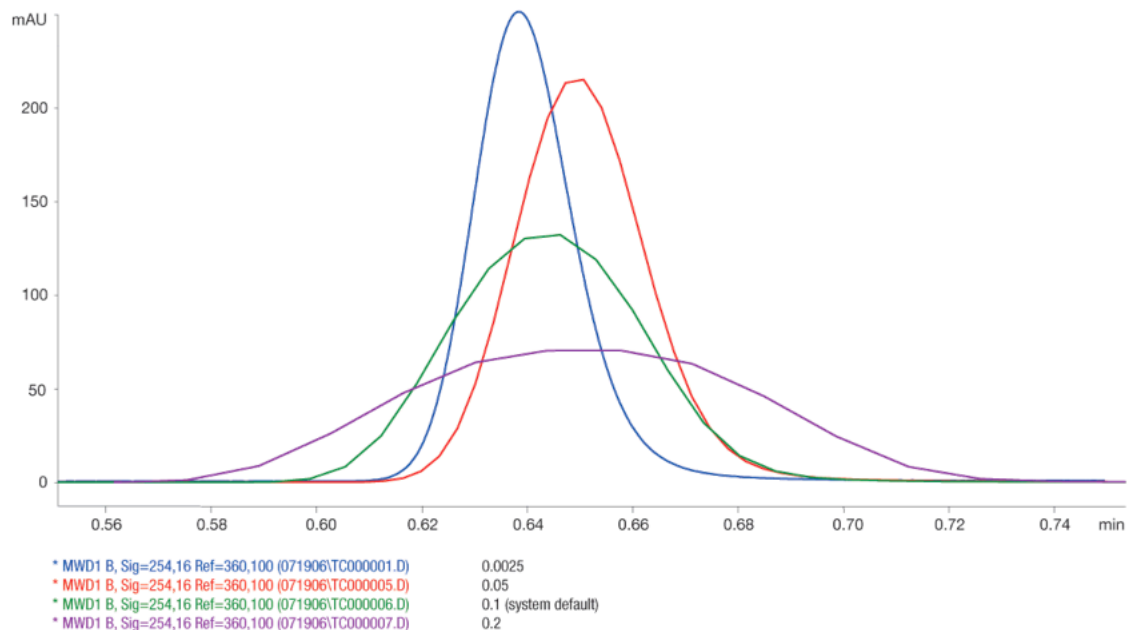


表1：时间常数列表

时间常数（分钟）	柱效（塔板数/色谱柱）
0.0025	8073
0.005	8027
0.01	7955
0.03	7598
0.05	6612
0.1*	3978
0.2	1459

*Agilent® HPLC仪器的系统默认值

3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低（续）

2. 检查：紫外线检测器时间常数（续）

图4: Agilent®系统检测器速率设置

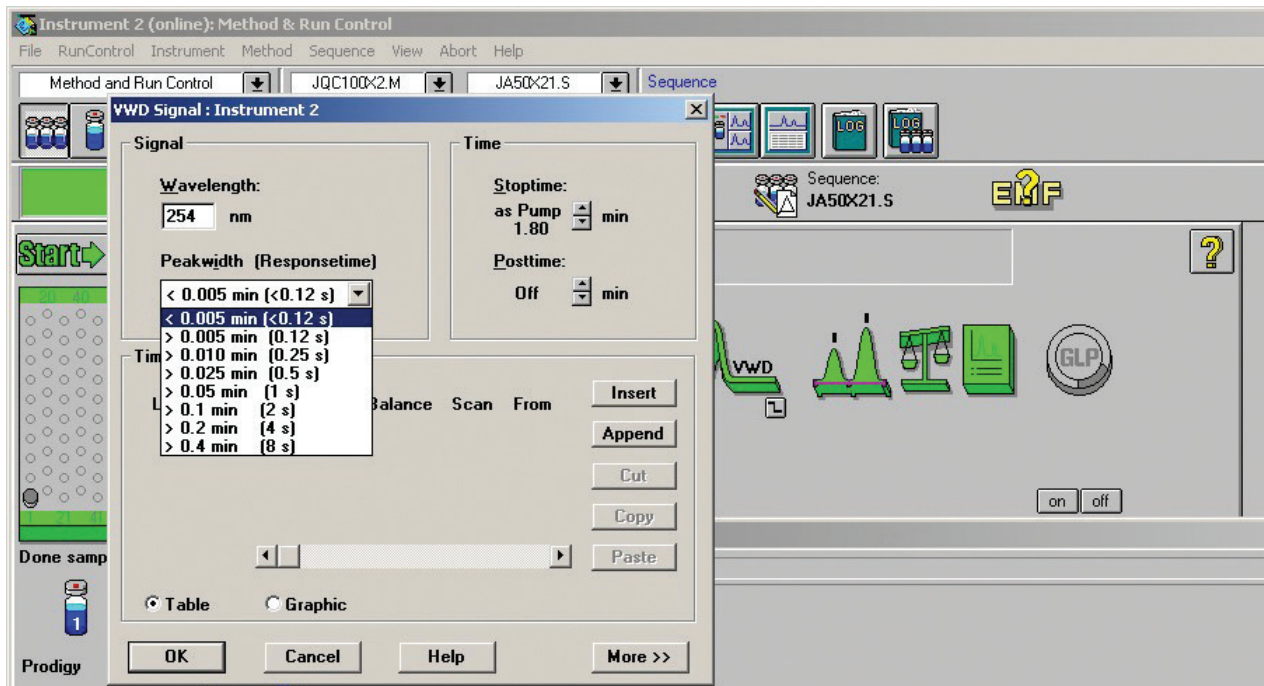
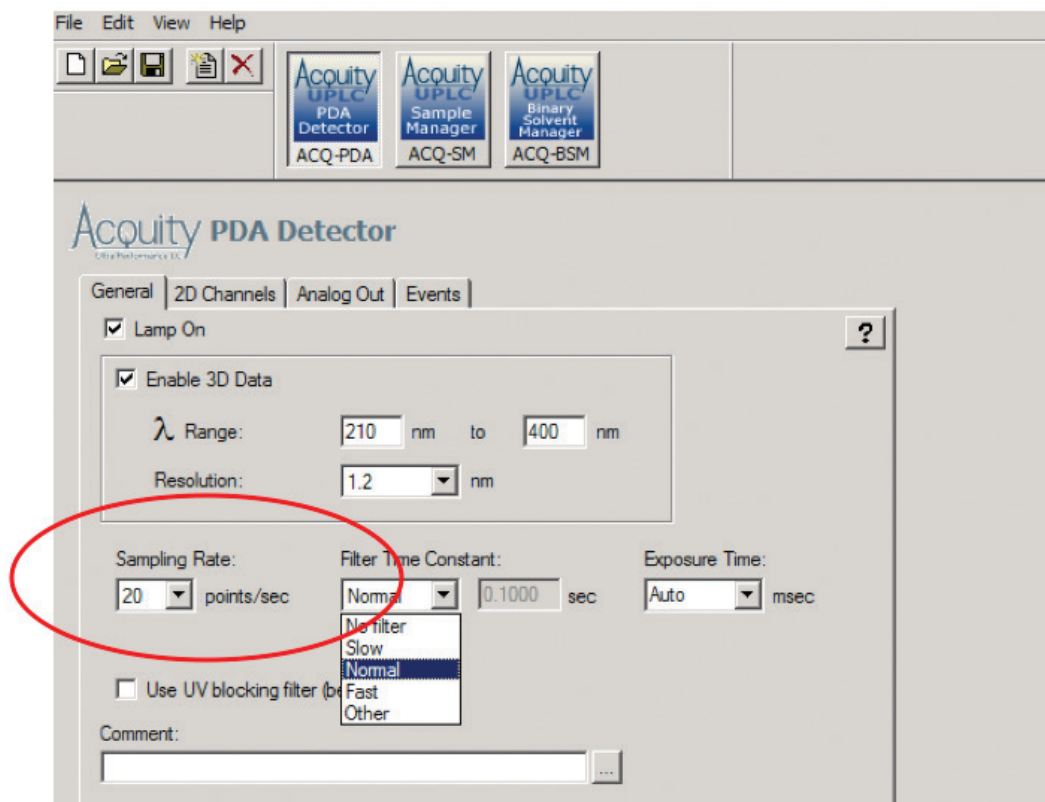


图5: Waters® Empower®采集速率设置



3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低（续）

更改紫外线检测速率：利与弊

优点

- 提高所有分析物的峰效率
- 改善相近洗脱峰的分度度
- 峰高度和面积定量更精确

缺点

- 增加图谱数据文件大小
- 增加基线噪声
- 低位峰的定量精确性差

3. 检查：质谱采样速率

记录的每秒采样点总数 (pts/s)。采样速率取决于驻留时间、稳定时间和质量范围间的暂停时间。

- 驻留时间：一个采样点所需的扫描时间。对MRM监测一个采样点的停留时间所指定的时间长度。
- 质量范围间的暂停时间：扫描单独的质量范围之间暂停的时间长度（毫秒）。
- 稳定时间：允许系统在开始采集数据前在m/z设置暂停的时间长度（毫秒）。
 - 表2显示的是在某个应用中（监测5个MRM转换点）使用的采样速率的计算示例（Phenomenex HPLC 2010年海报）

表2：驻留时间和采样速率之间的关系

每个MRM转换点的驻留时间(ms)	稳定时间(ms)	质量范围间的暂停时间(ms)	5个转换点的总采样时间(ms)	采样速率(pts/s)
10	0.1	3	$(10 \times 5) + (0.1) + (3 \times 4) = 62.1 \text{ ms/pt}$	16

3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低（续）

固定质量方法（MRM、SIM等）

- 固定质量方法优化对实现Kinetex®核-壳色谱柱性能最大化而言，往往效果最为直接。

解决方案▶ 优化对于只有少数分析物方法的驻留时间，以便每秒获取20个或更多的点（表3）。

- 对于需要监测5种或更多分析物的方法而言，质谱仪常常难以在采用高采样速率的同时分析所有的分析物。

解决方案▶ 程序计时采集方法。这类方法可以在分析物洗脱过程中有限的时间内，最大化数据采集速率，同时让监测大量分析物的方法提高性能。

- 信号灵敏度与分析物定量

解决方案▶ 有时需要在以下两种方法之间进行权衡：通过增加驻留时间来最大化分析物灵敏度，或者通过提高采样速度来改善峰形和定量。有关这种灵敏度和分离度之间的权衡示例请参见图6。

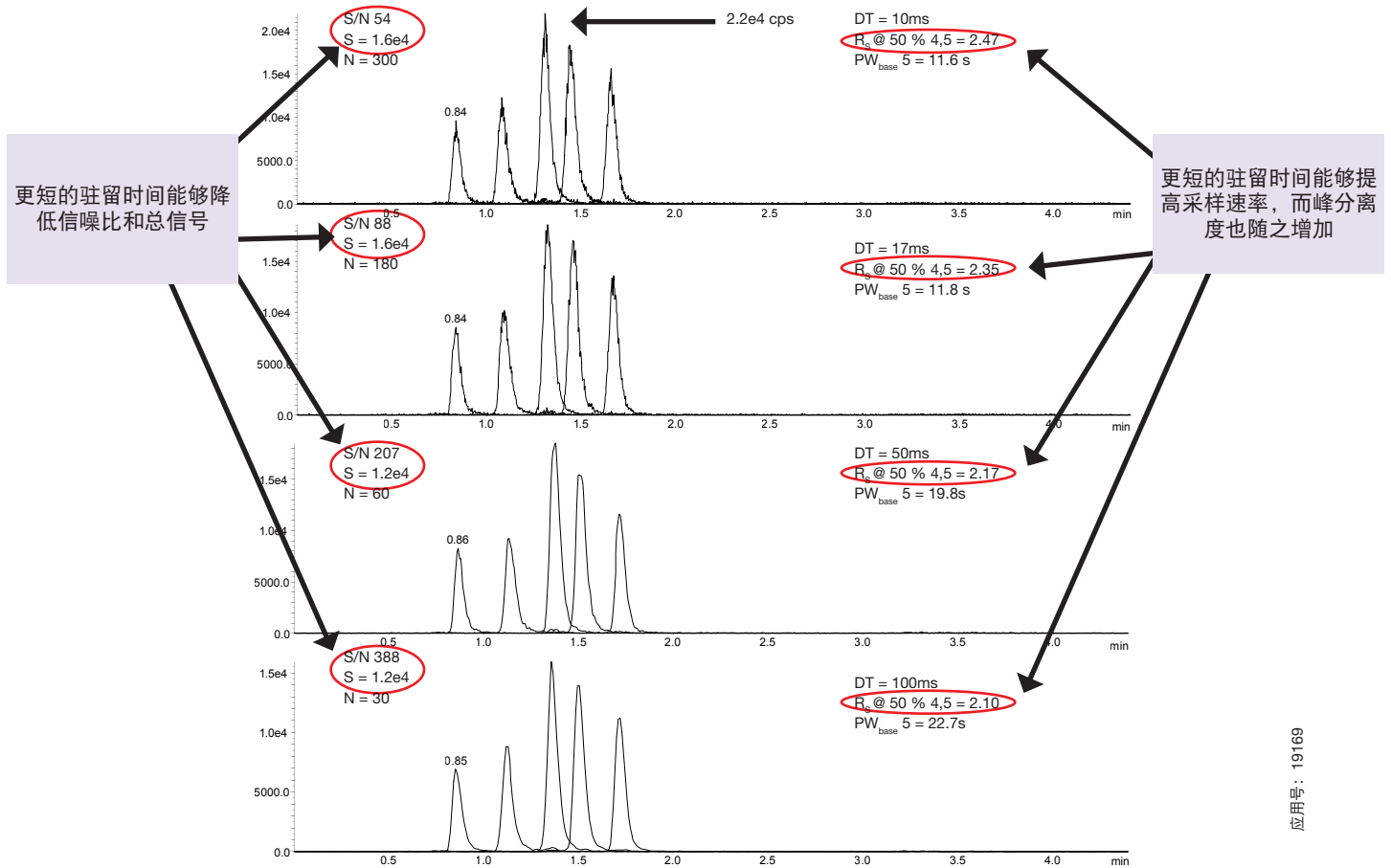
表3: API 3000™和API 4000™ MS的驻留时间与采样速率之间的关系

	驻留时间(ms)	采样速率(SR = pts/s)	峰宽(PW) (5 th Peak @ Base)	总峰点数(PW x SR)
API 3000	10	16	11.6 s	186
	17	10	11.8 s	118
	50	4	19.8 s	79
	100	2	22.7 s	45
API 4000	10	16	7.6 s	122
	17	10	8.8 s	88
	50	4	15.1 s	60
	100	2	19.1 s	38

3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低（续）

图6：通过调整MS驻留时间平衡灵敏度和分离度



应用号：19169

3. 检测器设置

问题：峰宽、响应低（续）

全面扫描质谱或串联质谱（MS/MS）方法

- 根据使用的质谱仪，扫描速率取决于以下几个因素：驻留时间（采集特定m/z的时间）、质量分离度（邻近m/z的质量区别）以及扫描窗口（质量由低到高的m/z质量范围）。

解决方案▶

依据具体待扫描分析物的不同，如下三种参数都可以修改以提高采样速率。在灵敏度不受影响的情况下，则可以缩短驻留时间；如果不需达到同位素分离的精度，则可以适当降低分离度；如果对于待分析物的某些信息已有了解，则可以缩窄扫描范围。

缩短驻留时间和增加MS采样速率：利与弊

优点

- 改善相近洗脱峰的分度
- 增强分析物的定量精确性

缺点

- 降低质谱灵敏度
- 降低信噪比
- 缩窄质谱扫描范围
- 降低同位素分离

Australia 澳大利亚
电话: +61 (0)2-9428-6444
auinfo@phenomenex.com

Austria 奥地利
电话: +43 (0)1-319-1301
anfrage@phenomenex.com

Belgium 比利时
电话: +32 (0)2 503 4015 (法语)
电话: +32 (0)2 511 8666 (荷兰语)
beinfo@phenomenex.com

Canada 加拿大
电话: +1 (800) 543-3681
info@phenomenex.com

China 中国
电话: +86 400-606-8099
cninfo@phenomenex.com

Denmark 丹麦
电话: +45 4824 8048
nordicinfo@phenomenex.com

Finland 芬兰
电话: +358 (0)9 4789 0063
nordicinfo@phenomenex.com

France 法国
电话: +33 (0)1 30 09 21 10
franceinfo@phenomenex.com

Germany 德国
电话: +49 (0)6021-58830-0
anfrage@phenomenex.com

India 印度
电话: +91 (0)40-3012 2400
indiainfo@phenomenex.com

Ireland 爱尔兰
电话: +353 (0)1 247 5405
eireinfo@phenomenex.com

Italy 意大利
电话: +39 051 6327511
italiainfo@phenomenex.com

Luxembourg 卢森堡
电话: +31 (0)30-2418700
nlinfo@phenomenex.com

Mexico 墨西哥
电话: 01-800-844-5226
tecnicomx@phenomenex.com

The Netherlands 荷兰
电话: +31 (0)30-2418700
nlinfo@phenomenex.com

New Zealand 新西兰
电话: +64 (0)9-4780951
nzinfo@phenomenex.com

Norway 挪威
电话: +47 810 02 005
nordicinfo@phenomenex.com

Portugal 葡萄牙
电话: +351 221 450 488
ptinfo@phenomenex.com

Singapore 新加坡
电话: +65 800-852-3944
sginfo@phenomenex.com


Spain 西班牙
电话: +34 91-413-8613
espinfo@phenomenex.com

Sweden 瑞典
电话: +46 (0)8 611 6950
nordicinfo@phenomenex.com

Switzerland 瑞士
电话: +41 (0)61 692 20 20
swissinfo@phenomenex.com

United Kingdom 英国
电话: +44 (0)1625-501367
ukinfo@phenomenex.com

USA 美国
电话: +1 (310) 212-0555
info@phenomenex.com

所有其他国家/地区 
请联系美国总部
电话: +1 (310) 212-0555
info@phenomenex.com



www.phenomenex.com.cn

Phenomenex的产品正在全球发售。如需接洽贵国/地区经销商, 请联系Phenomenex美国总部:
international@phenomenex.com

条款声明

此文件受Phenomenex标准条款声明的约束。欲知详情, 请浏览: www.phenomenex.com/TermsAndConditions。

商标

Kinetex是Phenomenex的注册商标。Sure-Lok是Phenomenex的商标。Agilent是Agilent Technologies, Inc.的注册商标。Waters、ACQUITY和Empower是Waters Corporation的注册商标。QTRAP是AB SCIEX Pte. Ltd的注册商标。API 3000和API 4000是AB SCIEX Pte. Ltd的注册商标。

免责声明

Phenomenex不从属于Agilent Technologies或Waters Corporation。

© 2014 Phenomenex版权所有。