

ACQUITY UPLC BEH色谱柱的维护和使用指南

内容

第一节 启用

- a、色谱柱的连接
- b、色谱柱安装
- c、色谱柱平衡
- d、eCord™安装
- e、测试色谱柱的柱效
- f、VanGuard™保护柱

第二节 色谱柱的使用

- a、样品的准备
- b、pH范围
- c、溶剂
- d、压力
- e、温度

第三节 色谱柱的清洗、再生和保存

- a、清洗和再生
- b、保存

第四节 eCord™智能芯片技术介绍

- a、简介
- b、安装
- c、生产信息
- d、色谱柱使用信息

第五节 其它补充信息

- a、延长ACQUITY UPLC BEH色谱柱使用寿命的秘诀
- b、ACQUITY UPLC BEH反相色谱柱的建议流速和压力
- c、启用ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱注意事项
- d、启用ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱注意事项
- e、分离单糖、二糖、多糖的注意事项

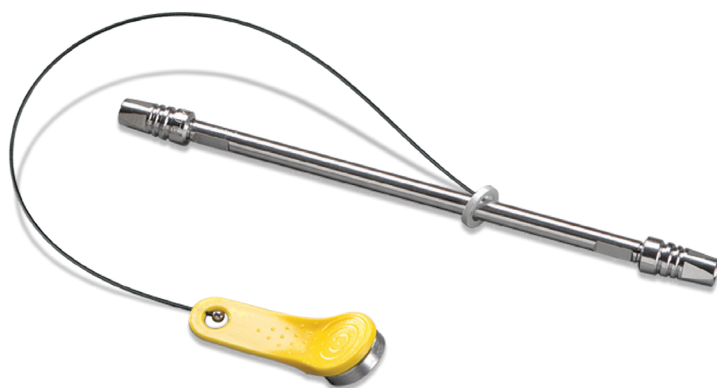
感谢您选择沃特世公司的ACQUITY UPLC® BEH色谱柱，它是专门为了配合使用Waters®的ACQUITY UPLC色谱系统设计的。它采用超纯试剂在满足cGMP要求并获得ISO9001认证的工厂进行生产。ACQUITY UPLC BEH的每批填料都会用酸性、碱性和中性化合物的色谱分离进行检验，并且填料的指标控制非常严苛，以保证色谱柱卓越的重现性。每一根ACQUITY UPLC BEH色谱柱都是单独检测，色谱柱的性能图谱和填料的批次检验证书一起存储在eCord™智能芯片上。

请注意：

ACQUITY UPLC BEH是专门用于ACQUITY UPLC 系统的色谱柱。由于ACQUITY UPLC系统和ACQUITY UPLC色谱柱是一起设计的，只用在ACQUITY UPLC色谱系统，ACQUITY UPLC色谱柱才具有最佳的色谱分析性能。我们不建议将其用于ACQUITY UPLC以外的色谱系统。

相关信息请参考：

www.waters.com/UPLC



Acquity
UltraPerformance LC®

第一节 启用

每一根ACQUITY UPLC BEH色谱柱的eCord™智能芯片上都储存了色谱柱的分析报告和性能测试报告。分析报告是针对填料的批次测试报告，其中包括填料的批号、填料颗粒键合前和键合后的分析数据、测试结果和所用的测试条件；性能测试报告是针对每根色谱柱的测试报告，包括以下信息：填料批号、色谱柱序列号、USP塔板数、拖尾因子、保留因子以及所用的色谱条件。储存这些信息是为将来用作参考。

a、色谱柱的连接

ACQUITY UPLC系统使用专门设计的可耐受高压并且有最小柱外体积的管路和接头。最佳的色谱柱进口管路(订货号430001084)是随ACQUITY UPLC色谱系统配的，进样阀末端的管路清晰地用蓝色标记标示出来，将这根管路的另一端插入UPLC色谱柱的入口端并用5/16英寸的扳手拧紧。关于ACQUITY UPLC色谱柱正确的出口管路，请参考ACQUITY UPLC系统操作手册的相关检测器部分(订货号71500082502)。

b、色谱柱安装

说明：以下的流速适用于50 2.1mm I.D., 1.7µm粒径的色谱柱，对于其它规格的色谱柱需要根据第五部分补充信息的表格B中建议的流速和压力进行调整流速

1. 冲洗含有任何缓冲盐的泵系统，将色谱柱入口端连接到进样器的出口端(先不要接检测器)
2. 在0.1ml/min流速条件下用100%纯甲醇或乙腈冲洗色谱柱，然后用至少5分钟将流速升至0.5ml/min。
3. 当溶液均匀地从柱子出口流出时，停掉流速，将色谱柱出口端接到检测器上(这样操作可以避免气泡进入检测系统，以便快速平衡)
4. 按照步骤2的方法逐渐提高流速
5. 一旦压力达到稳定值并且基线平衡好后，则进入下一步操作

注意：如果流动相中含有低浓度的流动相改性剂如离子对试剂，要达到完全平衡可能需要消耗100倍甚至200倍柱体积的流动相。此外，对于含有甲酸或甲酸铵的流动相也需要较长的时间达到初始平衡。

c、色谱柱平衡

ACQUITY UPLC 色谱柱是用100%乙腈保存的，在使用其它的流动相系统前一定要确保流动相和色谱柱内溶剂的“相容性”：至少用10倍柱体积的流动相平衡色谱柱(见表一中不同规格色谱柱的柱体积数值)，当柱压平稳后即可认为色谱柱基本上达到了热力学平衡。

表一：不同规格ACQUITY UPLC 色谱柱的柱体积(乘以10作为冲洗色谱柱所用的流动相体积)

柱长 (mm)	1.0 mm	2.1 mm	3.0 mm
30	—	0.1	0.2
50	0.04	0.2	0.4
100	0.08	0.4	0.8
150	0.12	0.5	1.0

为了避免流动相中的缓冲盐在色谱柱或系统中析出，在换上缓冲盐流动相之前，需要用5倍柱体积的含水的有机溶剂的混合溶液(要求有机溶剂的含量比流动相中的含量略低或相等，将缓冲盐溶液用水替代：如在使用60/40的甲醇/缓冲盐流动相之前先用5倍柱体积的60/40甲醇/水溶液冲洗色谱柱)。

对于 **ACQUITY UPLC BEH HILIC** 色谱柱，需要用50倍柱体积的含10mM最终流动相缓冲盐乙腈水溶液(50:50)；

对于 **ACQUITY UPLC BEH Amide** 色谱柱，首先需要用50倍柱体积(60:40)乙腈水溶液，在进第一针样品前，先用20倍柱体积的起始流动相进行平衡(参见表一中不同规格色谱柱的柱体积数值)。

更多信息可参见“ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱启用”和“ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱启用”。

d. eCord安装

eCord 按扣应该安在柱温箱侧面的读码器上，eCord™ 按扣是磁化了的，不需要再特殊定位

e. 测试色谱柱的柱效

1、在开始使用色谱柱分析样品前先进行柱效测试，这个测试可能包含以下几个步骤：

a) 测试的样品可以是您实验室中常用的测试物或几种测试物的混合物；

b) 或者使用Waters柱性能测试报告中测试柱效所用的测试物
说明：如用b)中的测试物，在等度条件下测试结果会比waters色谱柱性能报告中的标示值略低，这是正常的。Waters的柱效测试系统是经过改良的已达到最小的系统体积。这主要是为了进行对色谱柱是否装填好的挑战性测试。它可以保证色谱柱被最好地填装。色谱系统为了这一延伸功能作了修改，这个特殊的测试系统与商业的色谱系统相比，方法的灵活性有限。

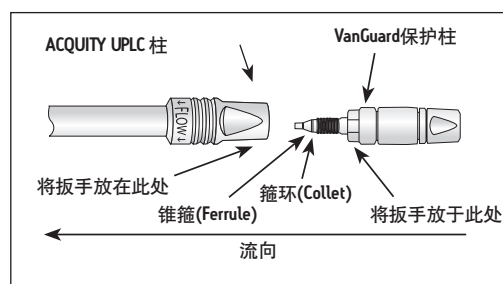
2、计算塔板数，用这个数据作为对照，定期监控色谱柱的柱效

3、随着色谱柱的使用，需要定期作同样的测试以便追踪色谱柱的性能变化，由于不同仪器的管路连接、操作环境、系统电路、所使用的溶剂和试剂的质量、色谱柱条件以及操作者的技术都有可能不同，因此在不同的UPLC仪器上测试的结果可能会有一些差别。

f. VanGuard 保护柱

VanGuard保护柱的直径为2.1mm，长5mm，超小体积设计，可有效保持UPLC柱的柱效。VanGuard保护柱采用了与ACQUITY UPLC柱相同的填料和过滤片。VanGuard保护柱直接与ACQUITY UPLC柱入口相连。

说明：为了确保连接处不会有死体积或漏液，VanGuard保护柱在运输时其锥箍(ferrule)与箍环(collet)并未固定。当取下保护柱头管路上用来保持住锥箍和箍环的O型圈时，请务必小心，避免将小部件不甚遗落丢失。



安装说明：

1. 将VanGuard 保护柱从包装盒中取出，移去塑料塞头。
2. 将VanGuard 保护柱阳式接头朝上，小心的取下保护柱头管路上用来保持住锥箍和箍环的O型圈。(锥箍与箍环并未永久固定)
3. 使ACQUITY UPLC色谱柱垂直于工作台面，并使色谱柱的入口端在底部(出口端在顶端)
4. 接着，将VanGuard保护柱插入ACQUITY UPLC 色谱柱入口端，用手拧紧。(此时锥箍与箍环尚未永久固定)
5. 在VanGuard 保护柱尽量推进色谱柱入口端用手拧紧后，将安装柱和保护柱旋转180度，使得保护柱在上方。
6. 然后用两个5/16英寸扳手放置在ACQUITY UPLC 色谱柱扁平位和VanGuard 保护柱六角螺母(阳式接头端)位置处，如图所示。
7. 用5/16英寸扳手拧紧1/4圈将锥箍与箍环固定
8. 松开柱连接检查锥箍的深度。一个正确设定的锥箍深度能够匹配链接ACQUITY UPLC系统上的其它连接处。
9. 重新连接保护柱，启用流动相，检查是否漏液。

第二节 色谱柱的使用

为确保ACQUITY UPLC BEH色谱柱具有持续稳定的高性能，请遵守以下操作指导：

a、样品的制备

1、样品中的杂质通常会污染色谱柱，建议采用合适的SPE技术(Oasis或Sep-pak)净化样品来避免这个问题，详情请参考

www.waters.com/sampleprep

2、用流动相或比流动相洗脱强度弱的溶液溶解或稀释样品可以获得最好的峰形和检测灵敏度。丙酮不应作为样品溶剂或稀释溶液，除非已经安装了正己烷四氢呋喃溶剂兼容仪器配件包(部件号：PN205000464)。

3、如果样品在流动相中不溶解或者溶解度很差时，要确保样品、样品溶剂和流动相是互溶的，以避免样品和/或缓冲盐析出

4、用0.2μm的滤膜过滤样品以充分去除颗粒杂质，如果样品溶解在含有机溶剂(如乙腈、甲醇)的溶剂中，在选择时要注意膜的材质不会在该溶剂中溶解。联络过滤膜供应商以了解膜对

溶剂的兼容性。或者，也可以考虑在8000rpm转速的条件下离心20分钟后移取上清液进样。

5、对于HILIC色谱的应用，样品必须溶解在100%纯有机溶剂中(如乙腈)详见“ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱启用”或者“ACQUITY UPLC Amide 色谱柱启用”。

b、pH范围

ACQUITY UPLC BEH色谱柱的建议操作pH范围是：对于C18, C8, Phenyl(苯基)固定相 pH1-12, 对于Shield RP18和BEH Amide固定相是 pH 2-11, 对于BEH HILIC固定相是pH 1-9。表二列出了常用的缓冲盐和改性剂。此外，色谱柱的寿命还极大的取决于操作温度、缓冲盐种类及浓度。比如，在高温条件下使用pH 8的磷酸盐缓冲液流动相则会使用色谱柱寿命缩短。

注意：在极端pH、温度和压力条件下使用会缩短色谱柱寿命。

表二、ACQUITY UPLC BEH色谱柱建议使用的缓冲盐体系

缓冲盐/流动相改性剂	pKa	缓冲范围	挥发性? (±1 pH单位)	是否MS兼容?	备注
TFA	0.3		是	是	离子对试剂，能够抑制MS信号.通常使用的浓度范围为0.02-0.1%
乙酸	4.76		是	是	同乙酸铵一起使用具有最大的缓冲能力.通常使用的浓度范围0.1-1.0%
甲酸	3.75		是	是	同甲酸铵一起使用具有最大的缓冲能力.通常使用的浓度范围0.1-1.0%
乙酸盐(铵盐)	4.76	3.76 – 5.76	是	是	通常使用1-10mM浓度.注意钾盐和钠盐是非挥发性的
甲酸盐(铵盐)	3.75	2.75 – 4.75	是	是	通常使用1-10mM浓度.注意钾盐和钠盐是非挥发性的
磷酸盐1	2.15	1.15 – 3.15	否	否	传统的低pH值缓冲体系,UV透光度很好
磷酸盐2	7.2	6.20 – 8.20	否	否	当pH值超过7时,降低操作温度/缓冲盐浓度以及使用保护柱可以将色谱柱寿命最长化
磷酸盐3	12.3	11.3 – 13.3	否	否	当pH值超过7时,降低操作温度/缓冲盐浓度以及使用保护柱可以延长色谱柱寿命
4-甲基吗啡啉	~8.4	7.4 – 9.4	是	是	通常使用浓度为10mM或更少
氨水	9.2	8.2 – 10.2	是	是	通常使用浓度为5-10mM(用于MS工作时保持离子源温度超过150摄氏度)。
碳酸氢铵	10.3 (HCO ₃ ⁻) 9.2 (NH ₄ ⁺)	8.2 – 11.3	是	是	用氨水或乙酸调节pH值。在pH10时具有很好的缓冲能力。 说明:使用碳酸氢铵而非碳酸铵
乙酸铵	9.2	8.2 – 10.2	是	是	通常使用浓度为1-10mM
甲酸铵	9.2	8.2 – 10.2	是	是	通常使用浓度为1-10mM
硼酸	9.2	8.2 – 10.2	否	否	降低温度、减少浓度并使用保护柱来延长柱寿命
CAPS(3-羧己胺基-2-羟基丙磺酸)	9.7	8.7 – 10.7	否	否	两性离子缓冲液.同乙腈互溶.通常使用浓度为1-10mM,气味小
Glycine(甘氨酸)	2.4, 9.8	8.8 – 10.8	否	否	两性离子缓冲液.比使用硼酸盐对柱子的损伤更小些
1-甲基哌啶	10.2	9.3 – 11.3	是	是	通常使用浓度为1-10mM
CAPS	10.4	9.5 – 11.5	否	否	两性离子缓冲液.同乙腈互溶.通常使用浓度为1-10mM,气味小
三乙胺(乙酸盐)	10.7	9.7 – 11.7	是	是	通常使用浓度为0.1-1.0%.当使用乙酸滴定时形成可挥发性的缓冲盐(不可用盐酸或磷酸)。作为离子对试剂用于pH7-9条件下的DNA分析
吡咯烷	11.3	10.3 – 12.3	是	是	温和的高pH缓冲液体系,柱寿命较长

注意：在极限PH条件、温度或者压力下使用色谱柱将会缩短柱寿命。

c、溶剂

为了使色谱柱的性能达到最好，建议使用高品质的色谱级溶剂。所有水相流动相在使用前都必须经过0.2µm滤膜过滤，建议使用Pall Gelman Laboratory Acrodisc过滤器。含有悬浮颗粒的溶剂通常会堵塞色谱柱入口滤片，这将导致柱压升高，降低柱性能。更多信息详见第五章。

d、压力

ACQUITY UPLC BEH 色谱柱能够耐受高15000 psi (1034bar或103MPa) 的压力。

注意：在极端pH、高温或极高压力条件下使用会缩短色谱柱寿命。

e、温度

ACQUITY UPLC BEH色谱柱的建议使用温度是20–90℃，这是为了提高分离选择性、降低流动相粘度并同时提高传质速率。当在高pH条件下使用时，建议使用较低的温度以获得较长的柱寿命。在高温条件下如超过70℃时也会使色谱柱的使用寿命缩短。在HILIC模式下，ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱能在高pH条件和高温下使用而不产生问题。（详见“BEH Amide 章节中推荐的条件”）

注意：在极端pH、高温或极高压力条件下使用会缩短色谱柱寿命。

第三节 色谱柱清洗、再生和保存

a、清洗和再生

色谱柱峰形发生改变、色谱峰分叉、出现肩峰、保留时间漂移、分辨率降低或者压力升高都表明色谱柱被污染了，用有机溶剂冲洗（请注意避免盐的析出）通常可以洗去这些污染物。如果有机溶剂清洗不能解决问题，请采用以下清洗和再生的程序。

根据样品的性质和/或你认为是什么物质污染的色谱柱来选择清洗方法（详见下表三）。用20倍柱体积的溶剂清洗色谱柱。升高柱温会提高清洗的效率。如果您的柱子在清洗后柱效还是没有改变，请与沃特世公司联系。

对于ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱,用50/50乙腈/水清洗以去除极性污染物。如果不能解决问题，用5/95的乙腈/水冲洗。

对于清洗ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱中的极性污染物，可采用10分钟的梯度洗脱从100%有机相到100%水相。值得注意的是当水相比比例升高，压力将快速增加。当水相比比例超过60%时需降低流速。如果有必要可重复清洗。

表三、反相色谱柱清洗程序

极性样品	非极性样品**	蛋白质样品
1. 水	1. 异丙醇(或者适合比例下异丙醇和水的混合溶液*)	选择1: 反复进几针DMSO (二甲基亚砜)
2. 甲醇	2. 四氢呋喃	选择2: 10-90%B的梯度冲洗 (A为0.1%TFA水溶液; B为0.1%TFA的乙腈溶液)
3. 四氢呋喃	3. 二氯甲烷	
4. 甲醇	4. 正己烷	
5. 水	异丙醇(之后用适当比例下的异丙醇和水的混合溶液*)	选择3: 用7M的盐酸胍或7M尿素水溶液清洗
6. 流动相	6. 流动相	

*使用低比例的有机溶剂以防止缓冲盐析出;

**除非已经安装使用了正己烷四氢呋喃兼容配件包(部件号: PN205000464), 否则四氢呋喃或者正己烷只能是在色谱柱不能被纯的反相有机溶剂如乙腈清洗干净时才考虑使用。降低流速及操作温度并且尽量减少系统在四氢呋喃和正己烷中的暴露时间。

b、色谱柱的保存

在室温条件下，如果超过四天不使用反相ACQUITY UPLC色谱柱及ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱，请将柱子保存在100%乙腈中；对于高温条件下的应用，在工作结束后即快速将色谱柱保存在100%乙腈中以延长色谱柱的使用寿命。不要将色谱柱保存在缓冲盐流动相条件下。如果流动相中含有缓冲盐，先用10倍柱体积（参见表1获得常见柱体积）的液相色谱级水冲洗色谱柱然后换上100%乙腈保存。如果没有进行这一中间步骤直接换成100%乙腈将会导致缓冲盐析出。ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱在保存100%乙腈之前先进行梯度洗脱至100%乙腈以将所有水相溶剂从柱中冲洗干净。将柱子两端的堵头拧紧以防止柱床干涸。

如果在室温条件下，超过四天不使用 **ACQUITY UPLC BEH HILIC** 色谱柱，请将色谱柱保存在95/5乙腈/水溶液中。不要将色谱柱保存在缓冲盐流动相条件下，如果所使用的流动相中含有缓冲盐，用10倍柱体积的含95%乙腈水溶液冲洗柱。

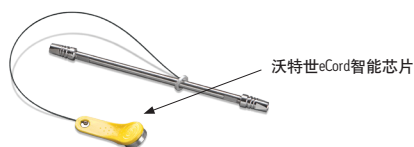
注意：如果色谱柱曾经在使用了含有甲酸盐(甲酸或甲酸铵等)的流动相之后又用100%乙腈冲洗或保存，当该柱再次用甲酸盐体系的流动相时可能需要稍长的时间来达到平衡。

第四节 eCORD™智能芯片技术介绍

a、介绍

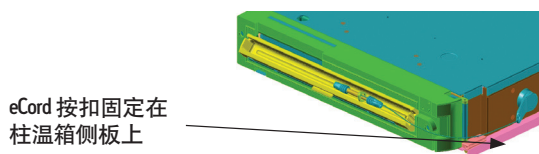
eCord 智能芯片是一项新的技术，能够在色谱柱使用过程中全程记录色谱柱性能的历史。eCord永久地连接在色谱柱上以确保在色谱柱从一个系统转换到另一个系统时，柱的性能历史得到记录。

图1: waters eCord 智能芯片



在生产色谱柱的时候,质量追踪和控制的信息都安装在了eCord当中。在芯片中保存这些信息就不再需要纸面的分析认证。一旦使用者安装了柱子，软件就会自动地载入柱历史的主要参数信息到芯片中。eCord提供了简单的追踪柱使用历史的方法。

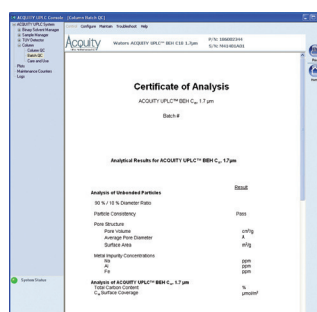
图2: eCord按扣固定在柱温箱侧板上



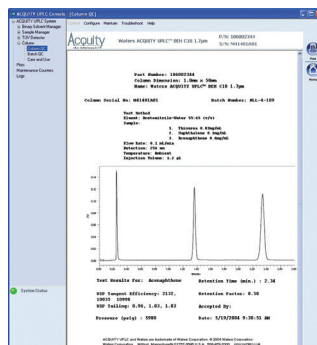
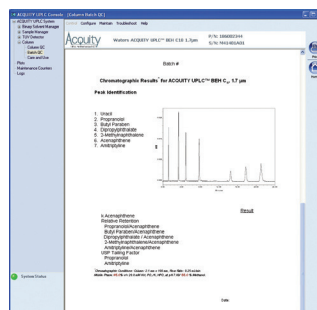
b、安装

将色谱柱安装到柱温箱中，将eCord按扣固定在柱温箱侧板上。只要eCord安装在柱温箱上，则色谱柱将会被Empower或Masslynx软件识别，并且会让使用者获得色谱柱的全部使用信息。

c、生产信息



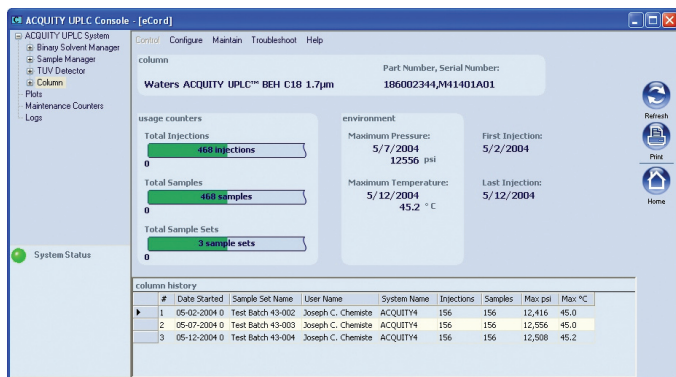
eCord芯片给用户提供了该批次填料的QC检测结果。



eCord芯片给用户提供了生产厂商在色谱柱上进行的QC检测条件和结果，信息包括流动相，测试条件和测试所用的分析物。另外QC结果和验收报告也都放在了色谱柱中。

d、色谱柱使用信息

eCord 芯片会自动捕获色谱柱使用的数据。屏幕上方显示了色谱柱的固定相种类、色谱柱内径和序列号。总体的色谱柱使用信息包括总的样品数、进样针数、总样品组数、第一针的进样日期、最后一针的进样日期以及最大压力和最高温度。信息还包括详细的关于样品组的柱使用历史,包括开始使用的日期、样品组名、用户名称、系统名、样品组进样数、样品组中样品数、样品组中的最高反压和温度以及色谱柱是否符合基本的系统适应性要求。可保存高达50条样品组信息。



第五节 其它补充信息

a、延长ACQUITY UPLC BEH色谱柱寿命的窍门

(1) 延长ACQUITY UPLC 色谱柱寿命, 请务必关注:

- 水的品质; (包括水纯化系统)
- 溶剂的品质;
- 流动相的配制、保存以及流动相随时间发生的变化;
- 样品、缓冲盐和流动相的溶解性以及是否互溶;
- 样品品质及样品制备。

(2) 当出现问题的时候, 通常只需要改变一个不合适的操作习惯。

(3) 请牢记:

- 使用在线过滤器【订货号: 205000343(含过滤器卡套以及6个过滤器), 700002775(过滤器替换装, 5个/包)】, 或者, 最好使用VanGuard 保护柱
- 尽可能避免使用100%纯水相流动相以避免流动相长菌

- 如确实需要使用纯水相, 纯水相流动相每24~48小时内需要重新配制。
- 每隔24-48小时更换一次旧的100%水溶性流动相以避免流动相长菌。
- 梯度条件下, 在流动相A中加入5-10%的有机溶剂可以避免流动相长菌(通过调整梯度表即可得到同样的分离, 请和Waters联系索取具体的梯度表调整方法)。
- 用0.2 µm的滤膜过滤水相流动相。
- 日常维护您的纯水系统以确保其处于好的工作状态。
- 只使用超纯水(电阻率为18兆欧-cm)以及能得到的最高品质溶剂。HPLC级的水并非UPLC级的水。
- 考虑选择使用有效的样品制备技术(如SPE、过滤等)。

(4) 尽可能避免:

- 使用100%水相流动相
- HPLC级的瓶装水
- 将新配的流动相直接倒入没有充分清洗或还存有旧流动相的储液瓶内
- 使用陈旧的水相流动相。记住每24-48小时即应仔细清洗流动相瓶并配制新鲜流动相
- 磷酸盐缓冲液和高浓度乙腈(例如≥70%)混用, 将导致缓冲盐沉淀

(5) 当柱压升高或者色谱峰分叉时, 不要怪罪于色谱柱“不好”, 而是要分析问题的原因:

- 反压
- 流动相是否长菌、沉淀析出或样品的问题
- 峰分叉
- 样品品质, 是否含有颗粒型杂质, 前处理方法是否合适
- 样品溶液的溶剂强度是否过高

(6) 请记住: ACQUITY UPLC的流速比传统LC低得多, 因此, 流动相消耗会慢得多(仅仅按够用量配制流动相或者冷藏多余的流动相)

(7) 与流动相相关的问题如下:

- 我是不是正在使用100%水相流动相? 我可以在流动相A中加入少量的有机溶剂吗?

- 我用0.2 μm的滤膜过滤了我的水相流动相吗？
- 我的流动相使用了多长时间了？我是否在流动相瓶子上贴好了配制日期的标签？
- 我是“倒了旧液装新液”还是每隔24-48小时新配流动相？
- 我用的水的质量如何？最近水的质量有改变吗？纯水系统的工作状况如何？最后一次检修服务的时间是什么时候？
- 我在使用pH 7的磷酸盐缓冲溶液吗？（这是非常容易长菌的流动相）

(8) 与样品有关的问题如下：

- 如果我只是进标样溶液，是否会出现这些问题？
- 如果将标准品溶解在水中并且按样品的操作流程处理 (SPE、过滤等等)，还出现这些问题吗？
- 样品是否随时间发生了变化？

b、ACQUITY UPLC BEH反相色谱柱的建议流速和所得到的柱压

1.0mm i.d. ACQUITY UPLC BEH色谱柱(40 °C)								
UPLC线速度 (mm/sec)	3		4		5		6	
色谱柱规格	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)
1.0 x 50 mm	0.1	4300	0.13	5600	0.17	7400	0.2	8700
1.0 x 100 mm	0.1	8600	0.13	11200	0.17	14600	0.2	17200
1.0 x 150 mm	0.1	12800	0.13	16700	0.17	21800	0.2	25600

2.1mm i.d. ACQUITY UPLC BEH色谱柱(40 °C)								
UPLC线速度 (mm/sec)	3		4		5		6	
色谱柱规格	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)
2.1 x 30 mm	0.45	3000	0.60	4100	0.75	5100	0.9	6100
2.1 x 50 mm	0.45	4800	0.60	6400	0.75	8000	0.9	9500
2.1 x 100 mm	0.45	9100	0.60	12100	0.75	15200	0.9	18200
2.1 x 150 mm	0.45	13400	0.60	17900	0.75	22400	0.9	26900

说明： 1) ACQUITY UPLC BEH 1.7μm反相色谱柱 3) 给出的是总的系统压力的大约值
2) 乙腈/水梯度，最大压力是在30%乙腈时的压力

3.0mm I.D. ACQUITY UPLC BEH色谱柱(40 °C)								
UPLC线速度 (mm/sec)	3		4		5		6	
色谱柱规格	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)	体积流速 (mL/min)	压力 (psi)
3.0 x 30 mm	0.9	3400	1.17	4400	1.53	5800	1.8	6800
3.0 x 50 mm	0.9	5100	1.17	6600	1.53	8700	1.8	10200
3.0 x 100 mm	0.9	9300	1.17	12100	1.53	15900	1.8	18700
3.0 x 150 mm	0.9	13600	1.17	17600	1.53	23100	1.8	27100

c、启用ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱

1. 由于ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱不含有任何键合相，因此其pH使用范围为1-8，其操作温度可高达90℃。
2. 同其它任何色谱柱一样，在极端pH、压力以及高温条件下使用将缩短色谱柱寿命。

色谱柱平衡：

- 初次使用色谱柱，需要用50倍柱体积的50/50乙腈/水平衡，如果分离使用的流动相中含有缓冲盐则需添加10 mmol/L流动相缓冲盐。
- 在开始进样前，用20倍柱体积的起始流动相平衡后再进样。
- 如果使用梯度条件，每次梯度之间用8-10倍柱体积的流动相平衡。
- 没有充分平衡的色谱柱将会出现保留时间的漂移。

流动相要求：

- 总是保持至少5%的极性溶剂在流动相体系中或梯度流动相中(如5%水、5%甲醇或2%水 + 3%甲醇等)，这将保证BEH HILIC色谱填料始终处于水合状态。
- 在流动相体系或梯度中至少需要有机溶剂(如乙腈)40%以上。
- 避免使用磷酸盐体系的流动相以避免磷酸盐缓冲液在HILIC流动相体系中析出。可以使用磷酸。
- 与甲酸或乙酸添加剂相比，甲酸铵或乙酸铵缓冲溶液可以得到重现性更好的结果。如果方法中一定要用甲酸或乙酸，应该用0.2%(v/v)而不是0.1%(v/v)。
- 要得到最好的峰形，使您的流动相/梯度中缓冲液的浓度始终保持为10mM。

样品溶剂要求：

- 如果可能，进样溶剂应该是100%有机溶剂。尽可能的避免使用水、或用最少的水作为样品溶剂。选择洗脱强度

弱的HILIC溶剂如乙腈、异丙醇、甲醇等。

- 通用的进样溶液是75/25乙腈/甲醇，使用此条件较好的兼顾了样品溶解度和色谱峰形。
- 避免使用水和DMSO(二甲基亚砷)作进样溶剂，它们会使色谱峰形很差。
- 如果样品内含有水或DMSO，需要使用反相SPE技术将溶剂体系转换为乙腈。如果确实不能进行此操作，需要用有机溶剂稀释水或DMSO。

其它应用操作窍门：

- ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱设计仅用于保留强极性碱。酸性、中性或非极性化合物没有保留。
- 对于小分子(分子量<200道尔顿)的强极性碱，ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱的最佳流速范围是0.4~0.8ml/min
- 同Atlantis HILIC 硅胶色谱柱相比，ACQUITY UPLC BEH HILIC色谱柱的保留较弱，梯度条件下保留约低20%，等度条件下保留约低35 ~ 65%，这是由于BEH颗粒的表面硅羟基浓度较低的原因。
- 在HILIC的使用中，请注意水是洗脱能力最强的溶剂，因此样品溶液中必须尽可能避免或减少水。
- 最初摸索条件时，建议使用一个梯度条件(从95%乙腈至50%乙腈的梯度)。如果没有保留，则用95:3:2的乙腈:甲醇:水相进行等度分析。
- 将流动相中的水换成其它极性溶剂如甲醇、乙醇或异丙醇能提高保留。
- 请确保进样针清洗的弱清洗溶剂是起始流动相(即高比例有机溶剂)，否则峰形将变差。

d、启用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱

使用范围：

- (1) ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱可以在常规HILIC模式下使用，PH范围2-11，最大耐受温度为90℃。
- (2) 同其它任何色谱柱一样，在极端pH、压力以及高温条件下使用将缩短色谱柱寿命。

色谱柱平衡：

- 初次使用色谱柱，需要用50倍柱体积的60/40乙腈/水(或者是起始的流动相条件)平衡。
- 在开始进样前，用20倍柱体积的起始流动相平衡后再进样。
- 如果使用梯度条件，每次进样前用8-10倍柱体积的流动相平衡。
- 没有充分平衡的色谱柱将可能会出现保留时间的漂移。

流动相要求：

- 总是经常保持至少5%的极性溶剂在流动相或梯度中(如5%水，5%甲醇或2%水+3%甲醇等)，这将保证HILIC色谱填料始终处于水合状态。
- 无论是等度还是梯度至少需要保证含有40%以上的有机溶剂(如乙腈)。
- 当水相比比例超过60%，需要降低流速来减少高的背压。所有水清洗过程都需注意这一点。
- 避免使用磷酸盐缓冲盐来防止盐析出。可以使用磷酸。

样品溶剂的要求：

- 如果可能，进样溶剂比例应该选择与流动相组成相似，梯度条件下则应该与起始梯度相近。丙酮不能用作样品溶剂或稀释溶剂，除非已经安装使用了正己烷四氢呋喃兼容性配件包(PN 205000464)。
- 通用的进样溶液是75/25乙腈/甲醇，使用此条件可以获得较好的样品溶解度和色谱峰形。如果是进行糖分析时，由于糖类在有机溶剂中的溶解度低，可以使用相对高比例的水溶液溶解样品，50/50乙腈/水溶液可以得到令人满意的结果。
- 进样溶剂是否影响峰形需要经过实验确定。在有些情况下，进水样(或者是高比例的水样)并不一定会导致峰形变差。

其它应用操作窍门：

- 初始摸索条件，建议使用一个梯度条件(从95%乙腈至50%乙腈的梯度)。如果没有保留，则用95:3:2的乙腈:甲醇:水相进行等度分析。
- 将流动相中的水换成极性溶剂如甲醇、乙醇或异丙醇能提高保留。
- 请确保进样针清洗的弱清洗溶剂是起始流动相(即高比例有机溶剂)，否则峰形将变差。常用的洗针条件是：800μl强洗溶剂20:80乙腈/水溶液，500μl弱洗溶剂75:25乙腈/水。
- 丙酮不能用作样品溶剂或稀释溶剂，除非使用了正己烷四氢呋喃兼容性配件包(PN 205000464)。

e、分离单糖、二糖、多糖的操作窍门

- 1、如果分离糖或者是含糖化合物，不包含还原糖，可以参考上述“启用ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱”中的具体介绍。
- 2、如果是分离还原糖，请参考以下的信息。
- 3、还原糖在溶液中会发生过渡转换，从而导致并不希望得到分离的 α 构型和 β 构型(差向异构体)。
- 4、通过升高温度和提高PH值，能使差向异构体峰合并为单峰：
 - a、在35℃使用高PH条件如:0.2%三乙胺或者是0.1%氨水溶液，和/或：
 - b、温度80℃以上时使用0.05%三乙胺
- 5、当分离还原糖(如果糖fructose、葡萄糖glucose、麦芽糖maltose、乳糖lactose、树胶醛糖arabinose、甘油醛glyceraldehyde等)，请注意遵循下面的建议，否则会出现峰分岔现象(差向异构体被分离)：
 - a、使用低流速使差向异构体峰合并(如：使用2.1*50mm 色谱柱时建议流速为0.10-0.13ml/min)
 - b、如果是使用较长的色谱柱，可增加流速(如：将流速升至0.3ml/min)。如同所有的液相分离，最佳流速应该经过试验确定。
 - c、对两相流动相溶剂瓶中都添加三乙胺或者是氨水。(如：A2, B2等)
 - d、当用UPLC/ELSD分离单糖和/或二糖时，典型的等度UPLC条件包括：
 - 75%乙腈(含0.2%三乙胺),35℃,0.13ml/min, 2.1x50mm BEH Amide 色谱柱
 - 77%丙酮(含0.05%三乙胺),85℃,0.15ml/min, 2.1x50mm BEH Amide 色谱柱
 - 75%乙腈(含0.2%三乙胺),35℃,0.2ml/min, 2.1x100mm BEH Amide 色谱柱

- e、当用UPLC/ELSD分离更复杂的糖类混合物时(如多糖)，典型的UPLC梯度条件包括(向两相A和B中都添加三乙胺)：
 - 80% 乙腈(含0.2%三乙胺)10min的梯度洗脱至50% 乙腈(含0.2%三乙胺)，35℃,0.13ml/min, 2.1x100mm BEH Amide 色谱柱；或者，如使用2.1x150mm BEH Amide 色谱柱流速可升至0.3ml/min。
 - 80% 丙酮(含0.05%三乙胺)10min的梯度洗脱至55% 丙酮(含0.05%三乙胺),85℃,0.15ml/min, 2.1x100mm BEH Amide 色谱柱。
- f、当用UPLC/MS分离单糖或二糖时，典型的等度UPLC条件：
 - 75%乙腈(含0.1%氨水),35℃,0.13ml/min, 2.1x50mm BEH Amide 色谱柱。
- g、当用UPLC/MS分离更复杂的糖类混合物时(如：多糖)，典型的UPLC梯度条件包括(向两相A和B中都添加氨水)：
 - 75% 乙腈(含0.1%氨水)10min的梯度洗脱至45% 乙腈(含0.1%氨水)，35℃,0.2ml/min, 2.1x100mm BEH Amide 色谱柱。
- 6、更为复杂的样品需要考虑梯度条件和/或使用更长的UPLC 色谱柱。
- 7、如果丙酮被用作流动相的其中一相或多相时，不能用丙酮作为样品稀释溶剂或者是洗针溶液。可参考进样溶液部分推荐使用的样品稀释溶液，以及参考其他应用操作窍门部分中的洗针溶液/清洗溶剂推荐。
- 8、当样品含有糖/多糖/碳水化合物时，典型的样品制备方法：
 - a、液体样品
 - 用50:50乙腈/水溶液稀释
 - 用0.45 μ m或者是0.22 μ m滤膜过滤(如可能的话)

b、固体样品

- 称量约3g的样品,放入50ml离心管中
- 添加25ml 50:50乙腈/水溶液并混匀(机械混匀)
- 3200转/min离心30分钟
- 收集上清液并用0.45µm或0.22µm滤膜过滤

c、根据样品和/或分析物浓度情况,可能还需要进一步的稀释

d、更为复杂的样品和/或更低的分析物检测浓度可能需要增加样品前处理的步骤或流程如SPE等

e、考虑使用VanGuard BEH Amide 保护柱对UPLC色谱柱进行保护。

沃特世科技(上海)有限公司

上海市浦东新区张东路1387号41栋

邮编: 201203

电话: 021-6156 2666

传真: 021-6879 4588

北京分公司

北京市朝阳区铜牛国际大厦

光华路15号院2号楼9层

邮编: 100026

电话: 010-5209 3866

传真: 010-5293 2298

广州分公司

广州市荔湾区中山七路50号

西门口广场1707-08室

邮编: 510170

电话: 020-2829 6555

传真: 020-2829 6556

全国免费售后服务热线:

800 (400) 820 2676



©2009沃特世公司. Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPLC, eCord, UPLC, VanGuard, Oasis, Sep-Pak, Empower, MassLynx和Atlantis是沃特世公司的商标, 所有其他的商标是各自所有人的所有物。

2011年6月 715001371ZH KK-PDF

Waters Corporation

34 Maple Street

Milford, MA 01757 U.S.A.

T: 1 508 478 2000

F: 1 508 872 1990

www.waters.com