

ACQUITY UPLC HSS 色谱柱

目录

I. 简介

II. 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

III. 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

IV. 色谱柱的清洗、再生和保存

- a. 清洗和再生
- b. 保存

V. 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

VI. 其它补充信息

- a. 延长 ACQUITY UPLC HSS 色谱柱使用寿命的秘诀
- b. ACQUITY UPLC HSS 反相色谱柱的建议流速和压力

I. 简介

感谢您选择沃特世 (Waters®) 的 ACQUITY UPLC® HSS 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 ISO9001:2000 认证的工厂进行生产。ACQUITY UPLC HSS 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 HSS 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 HSS 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®

II. 启用

每一根ACQUITY UPLC HSS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 2.1 mm I.D., 1.8 μ m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0.1 mL/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0.5 mL/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。

柱长 (mm)	1.0 mm	内径 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

表1. 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)。

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)。

d. eCord安装

eCord 按钮应该安在柱温箱侧面的读码器上，eCord按钮是磁化了的，不需要再特殊定位。

e. 测试色谱柱的柱效

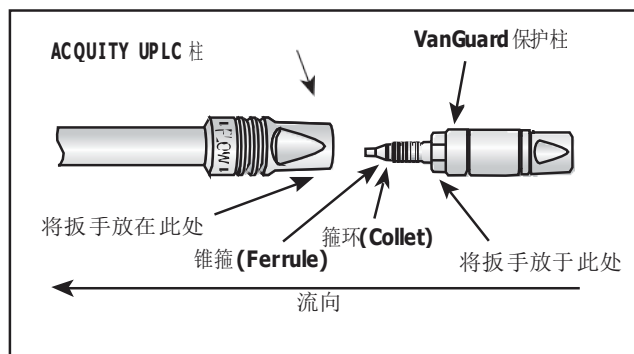
1. 在开始使用色谱柱分析样品前先进行柱效测试，这个测试可能包含以下几个步骤：
 - a) 测试的样品可以是您实验室中常用的测试物或几种测试物的混合物；
 - b) 或者使用Waters柱性能测试报告中测试柱效所用的测试物说明：如用b)中的测试物，在等度条件下测试结果会比Waters 色谱柱性能报告中的标示值略低，这是正常的。Waters的柱效测试系统是经过改良的已达到最小的系统体积。这主要是为了进行对色谱柱是否装填好的挑战性测试。它可以保证色谱柱被最好地填装。色谱系统为了这一延伸功能作了修改，这个特殊的测试系统与商业的色谱系统相比，方法的灵活性有限。

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2.1 mm，长5 mm，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保护柱出口端朝上，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。

III. 色谱柱的使用

为确保ACQUITY UPLC HSS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剂溶解或稀释样品可以获得最好的峰形和灵敏度。丙酮不应作为样品溶剂或稀释溶剂，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0.2 μm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8000 rpm转速的条件下离心20分钟后移取上清液进样。

b. pH范围

ACQUITY UPLC HSS色谱柱的建议操作pH范围是：T3, C₁₈ 氟基和Phenyl(苯基)固定相 pH2-8，对于HSS C₁₈固定相是 pH 1-8。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。

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
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

表2. ACQUITY UPLC HSS色谱柱建议使用的缓冲盐体系。

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0.2 μ m滤膜过滤。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 HSS 色谱柱能够耐受高15000 psi (1034 bar或103 MPa) 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 HSS色谱柱的建议使用温度是20–45°C, 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40°C时也会使色谱柱的使用寿命缩短。

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。

IV. 色谱柱的清洗、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3)。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。

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	

表3. 反相色谱柱清洗程序。

* 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，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。

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。

V. eCord智能芯片技术介绍

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

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。

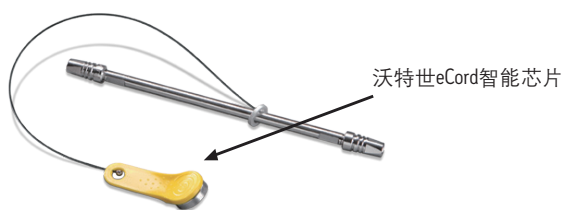


图1. Waters eCord 智能芯片。

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。

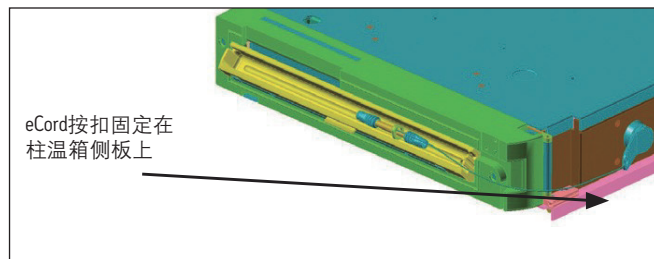
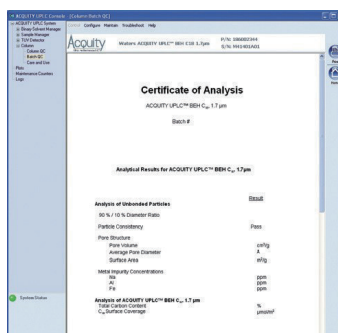


图2. eCord按钮固定在柱温箱侧板上。

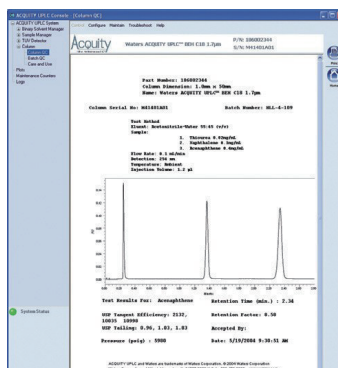
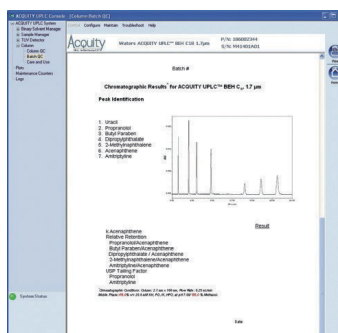
b. 安装

将色谱柱安装到柱温箱中，将eCord按钮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



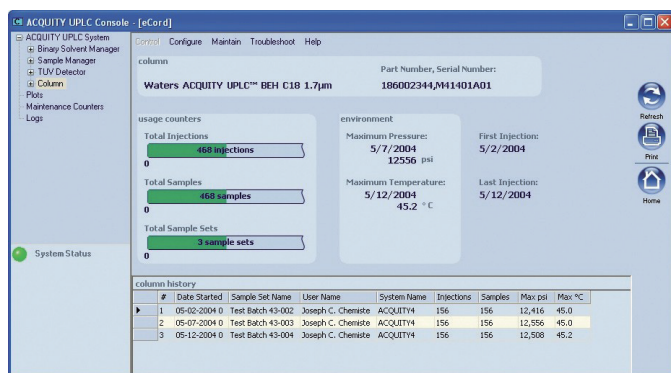
eCord芯片给用户提供了该批次填料的QC检测结果。



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。



VI. 其它补充信息

a. 延长ACQUITY UPLC HSS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保护住。
- 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, 请与 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. 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。

- 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 HSS反相色谱柱的建议流速和所得到的柱压

1.0mm i.d. ACQUITY UPLC HSS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 HSS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 HSS 1.8 μ m反相色谱柱;
 2. 乙腈/水梯度, 最大压力是在30%乙腈时的压力;
 3. 给出的是总的系统压力的大约值。

3.0mm I.D. ACQUITY UPLC HSS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	0.17	4400	1.53	5800	1.8	6800
3.0 x 50 mm	0.9	5100	0.17	6600	1.53	8700	1.8	10200
3.0 x 100 mm	0.9	9300	0.17	12100	1.53	15900	1.8	18700
3.0 x 150 mm	0.9	13600	0.17	17600	1.53	23100	1.8	27100



扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

©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。

©2015年 沃特世公司 印制于中国 2015年2月 715001429ZH TC-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com