

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier BEH色谱柱

目录

I. 简介

II. 入门指南

- a. eCord安装
- b. 色谱柱安装
- c. 色谱柱平衡
- d. 初始柱效测定
- e. 色谱柱QR码
- f. VanGuard保护柱
- g. VanGuard FIT保护柱

III. 色谱柱使用

- a. 样品前处理
- b. pH范围
- c. 溶剂
- d. 压力
- e. 温度

IV. 色谱柱清洗、再生和存放

- a. 清洗与再生
- b. 存放

V. eCord智能芯片技术

- a. 简介
- b. 安装
- c. 生产信息
- d. 色谱柱使用信息

VI. 其他补充信息

- a. 延长ACQUITY BEH色谱柱使用寿命的技巧
- b. 反相ACQUITY BEH色谱柱的推荐流速和背压
- c. BEH HILIC色谱柱入门指南
- d. BEH Amide色谱柱入门指南

VII. 注意事项

I. 简介

非常感谢您选择Waters™ ACQUITY™ UPLC™和/或ACQUITY Premier BEH色谱柱。ACQUITY BEH填料专用于ACQUITY UPLC系统，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。每批ACQUITY BEH填料均采用酸性、碱性和中性分析物进行了色谱分析测试，并且填料的指标控制严苛，以保证色谱柱卓越的重现性。每根色谱柱都经过单独测试，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。

ACQUITY Premier BEH色谱柱提供带或不带VanGuard™完全集成技术(FIT)保护柱两种规格。VanGuard FIT保护柱专为延长分析柱使用寿命而设计，可减少样品基质的污染或颗粒物进入色谱柱，而不会影响分离性能。保护柱可轻松更换，以便恢复分离性能，延长分析柱的使用寿命。

此外，ACQUITY Premier BEH色谱柱采用创新的MaxPeak™高性能表面技术，能够尽量减少分析物/表面相互作用，避免可能因此造成的样品损失，从而提高分析物回收率、分析灵敏度和重现性。



II. 入门指南

每根ACQUITY BEH色谱柱的色谱柱包装盒或eCord智能芯片中都随附COA报告和性能测试报告。COA报告是针对填料的批次测试报告，包括填料批号、填料颗粒键和前和键合后的分析数据、测试结果和所用的测试条件。性能测试色谱图提供每根色谱柱的以下信息：批号、色谱柱序列号、USP塔板数、USP拖尾因子、保留因子以及色谱条件。

这些数据应妥善保存，以备将来参考。如果无法读取eCord智能芯片中的信息，可访问www.waters.com/coa获取COA报告和性能测试报告。

a. eCord安装

（可能并非所有色谱柱配置都适用）

eCord智能芯片按钮专用于ACQUITY UPLC和ACQUITY Arc™系统，需要装在仪器柱温箱模块的侧面。eCord按钮经过磁化处理，不需要专门的安装操作。有关eCord智能芯片功能的更多信息，请参阅本维护和使用手册第IV节。

b. 色谱柱安装

（带或不带VanGuard FIT保护柱）

注：在处理ACQUITY BEH色谱柱和任何化学品之前，请咨询您的安全主管部门和/或参照当地法规，使用适当的防护装备。

ACQUITY BEH色谱柱出厂时保存于100%乙腈中。下述步骤给出的流速适用于内径2.1 mm的色谱柱。

1. 灌注泵系统，排出含缓冲盐的流动相，然后将色谱柱的入口端连接至进样器出口。
2. 通过将泵流速设置为0.1 mL/min，并且在至少5 min增加至0.5 mL/min，用100%有机流动相（甲醇或乙腈）冲洗色谱柱。
3. 当流动相可从色谱柱出口均匀流出时，停流速，并将色谱柱出口连接至检测器。这能防止气泡进入检测系统。
4. 按照步骤2所述逐渐增加流速。
5. 一旦柱压和基线达到稳定状态，即可继续进行下一部分操作。

c. 色谱柱平衡

在更换为其他流动相体系之前，务必确保流动相的兼容性。请使用至少10倍柱体积的流动相平衡色谱柱（色谱柱体积请参见表1）。当色谱柱达到恒定背压时，可认为该柱已达到热力学平衡。

表1.不同规格色谱柱柱体积(mL)（乘以10得到冲洗色谱柱所用的流动相体积）

色谱柱柱长 (mm)	内径		
	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

为了避免流动相缓冲盐在色谱柱或系统中发生析出，请使用5倍柱体积的水/有机溶剂混合溶液冲洗色谱柱，其中有机溶剂比例应与所需缓冲盐流动相中的有机溶剂比例相同或更低。（例如，引入60%甲醇/40%缓冲盐流动相之前，应使用60%甲醇水溶液冲洗色谱柱和系统。）

对于采用BEH HILIC填料的色谱柱，用50倍柱体积的50:50乙腈:水溶液（含最终浓度为10 mM的缓冲盐）进行冲洗。对于采用BEH Amide填料的色谱柱，用50倍柱体积的60:40乙腈:水溶液进行冲洗。进第一针样品前，用20倍柱体积的流动相（初始条件）平衡色谱柱（色谱柱体积请参见表1）。请参阅“BEH HILIC色谱柱入门”或“Amide色谱柱入门”获取详细信息。

d. 初始柱效测定

1. 使用色谱柱之前，需要先进行柱效测试。这项测试可包括：

- a. 您所在实验室常用的混合标准品，和/或
- b. Waters柱性能测试报告中测试柱效所用的标准品。

注：如果采用(b)项的分析物进行柱效测试，在等度条件下测得的柱效可能低于沃特世色谱柱性能报告中所示的柱效。这种情况是正常的。为了尽可能减小系统体积，沃特世的等度色谱柱测试系统进行了相应的改进。这对于色谱柱填充质量的考察相当具有挑战性，可确保色谱柱被最好地装填。

这些经过改造的特殊测试系统不再具有商业可行性，方法的灵活性亦受限，只能用于等度色谱柱测试。

2. 测定理论塔板数(N)，并定期对比该数值。
3. 按预定的时间间隔进行重复测试，跟踪色谱柱性能随时间的变化情况。所得柱效结果可能会有微小差异，这可能是由于连接质量、运行环境、系统电子设备、试剂质量、色谱柱条件和操作员技术等方面存在差异所致。

e. 色谱柱QR码

色谱柱标签上的快速参考卡(QR)码可提供色谱柱专有信息（即色谱柱的唯一标识符 - P/N和序列号），这些信息按照广泛采用的行业标准进行编码。

1. 可使用任何能扫描QR码的设备进行扫描（即使用智能手机和平板电脑的内置摄像头应用程序进行扫描）。
2. QR码直接链接至waters.com的色谱柱信息中心。
3. 获取关于色谱柱的技术信息和专业信息（即COA报告和应用纪要）。

f. VanGuard保护柱

VanGuard保护柱专门用于ACQUITY UPLC色谱柱和ACQUITY UPLC系统。这些2.1 mm（内径）× 5 mm（长）的保护柱设备所使用的UPLC填料和筛板与沃特世内径2.1 mm的UPLC色谱柱相同。VanGuard保护柱可直接连接至ACQUITY UPLC色谱柱的入口端。

注：为了确保VanGuard保护柱的连接无空隙且无渗漏，在出厂时未将保护柱的箍环和锥箍进行永久性固定。取下将这两个部件固定至保护柱管路的O形圈时，必须谨慎操作。

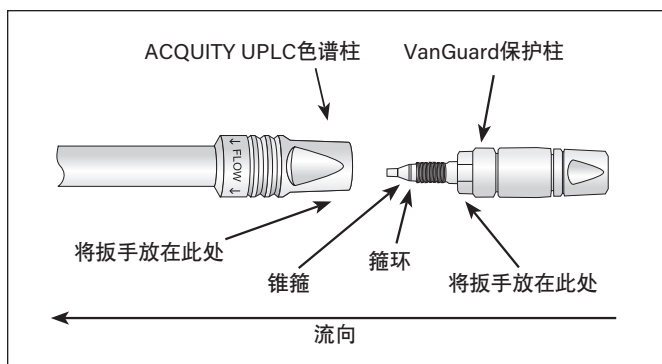


图1. VanGuard保护柱安装示意图。

安装说明

1. 将VanGuard保护柱从包装盒中取出，移去塑料塞头。
2. 调整保护柱方向使其外接头朝上，小心取下在运输期间用于固定箍环和锥箍的橡胶O形圈（箍环和锥箍尚未永久性固定）。
3. 使ACQUITY UPLC色谱柱垂直于工作台表面，且色谱柱入口朝下（色谱柱出口朝上）。
4. 将VanGuard保护柱从下方插入ACQUITY UPLC色谱柱入口，并用手拧紧（箍环和锥箍尚未永久性固定）。
5. 将VanGuard保护柱推入色谱柱入口后，将组装好的色谱柱和保护柱翻转180°，使保护柱位于上方。
6. 如上图所示，将两个5/16英寸扳手分别置于ACQUITY UPLC色谱柱的平坦部分和VanGuard保护柱六角螺母（外接头）处，然后拧紧。
7. 拧紧1/4圈，固定箍环和锥箍。
8. 松开接头并检查锥箍深度，确保锥箍完全固定。经适当固定后，锥箍深度将与ACQUITY UPLC系统中其他连接相似。
9. 重新连接保护柱，使流动相流经保护柱，检查渗漏情况。

g. VanGuard FIT保护柱

VanGuard FIT保护柱专门用于ACQUITY Premier色谱柱。

对于带VanGuard FIT保护柱的ACQUITY Premier色谱柱，可以使用两个3/8英寸扳手更换VanGuard FIT保护柱。只需用扳手咬合住保护柱和色谱柱末端螺母的平坦部分，然后逆时针转动（见图1），即可拆下VanGuard FIT保护柱，然后按照实验室规范合理弃置。

接下来可以使用新的VanGuard FIT保护柱更换弃置的保护柱。沿顺时针方向用手拧紧新的保护柱，再用两个3/8英寸扳手拧紧。正确密封的位置不应超过手拧紧处的1/4圈。

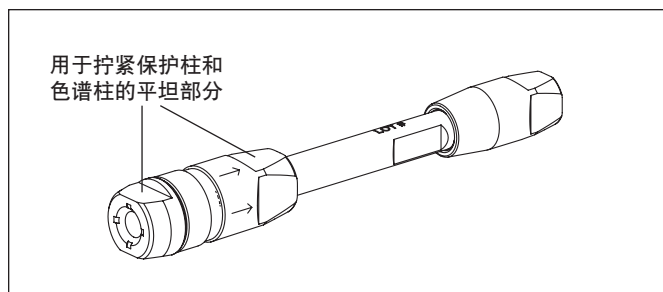


图2.从ACQUITY Premier VanGuard FIT色谱柱上拆下VanGuard FIT保护柱时，放置3/8英寸扳手的推荐位置。

III. 色谱柱使用

为确保ACQUITY BEH色谱柱始终保持理想性能，请遵循以下原则：

a. 样品前处理

1. 样品中的杂质往往会污染色谱柱。避免污染的方法之一是在分析之前使用填充有适合填料的Waters Oasis™固相萃取小柱/色谱柱或Sep-Pak™小柱净化样品。如需了解更多信息，请访问www.waters.com/sampleprep。
2. 为获得理想峰形和灵敏度，优先选用运行分析时拟用的流动相或比它更弱的流动相来制备样品。除非安装了正己烷/四氢呋喃兼容性配件包，否则切勿将丙酮用作样品溶剂/稀释剂。
3. 如果样品不溶于流动相，请确保样品、溶剂和流动相可以混溶，以避免样品和/或缓冲盐析出。
4. 用0.2 μm滤膜过滤样品，去除颗粒物。如果用于溶解样品的溶剂含有机溶剂（如乙腈、甲醇等），请确保滤膜材料不溶于该溶剂。请联系滤膜生产商了解滤膜的溶剂兼容性。或者，可以考虑在8000 rpm下离心样品溶液20 min，然后将上清液转移至适当的样品瓶中。
5. 对于亲水作用色谱(HILIC)分离，样品必须用高百分比的有机溶剂制备（例如95%乙腈）。请参阅“BEH HILIC色谱柱入门”或“Amide色谱柱入门”章节获取详细信息。

b. pH范围

ACQUITY BEH色谱柱的推荐操作pH范围如下：采用BEH C₁₈、BEH C₈和BEH苯基填料为1~12；采用BEH Shield RP18和BEH Amide填料为2~11；采用BEH HILIC填料为1~9。表2列出了常用的缓冲盐和添加剂。此外，柱寿命将根据操作温度、使用的缓冲盐类型和浓度而有所不同。例如，在高温下使用pH值为8的磷酸盐缓冲液会缩短色谱柱寿命。

c. 溶剂

为了保持理想的色谱柱性能，请使用高品质色谱级溶剂。所有水相缓冲盐在使用前都应使用0.2 μm滤膜过滤。推荐使用Pall Gelman Laboratory Acrodisc®过滤器。含有悬浮颗粒物的溶剂通常会堵塞色谱柱入口筛板，这会导致操作压力增大，性能变差。有关详细信息，请参阅第VI节。

d. 压力

ACQUITY BEH色谱柱能够承受高达18000psi（1241 bar或124 MPa）的操作压力。

注：在压力、pH和/或温度的极值下运行会缩短色谱柱使用寿命。

e. 温度

为了改善选择性、降低溶剂粘度和提高传质速率，ACQUITY BEH色谱柱的推荐操作温度范围为20 °C~90 °C。在高pH条件下操作时，建议降低操作温度以延长色谱柱使用寿命。在较高温度下（如70 °C以上）运行也可能缩短色谱柱使用寿命。在HILIC分析中，BEH Amide色谱柱可以在高pH值和高温条件下使用，不会出现问题（请参阅“BEH Amide色谱柱入门”章节的推荐条件）。

表2.使用ACQUITY BEH色谱柱时的推荐缓冲盐

添加剂/缓冲液	pK _a	缓冲液 范围	挥发性 (± 1个pH单位)	能否 用于 质谱	注释
TFA	0.3	—	挥发性	可用	离子对添加剂，能抑制MS信号，在0.02%~0.1%范围内使用。
乙酸	4.76	—	挥发性	可用	与醋酸铵一起使用时缓冲能力非常强。在0.1%~1.0%范围内使用。
甲酸	3.75	—	挥发性	可用	与甲酸铵一起使用时缓冲能力非常强。在0.1%~1.0%范围内使用。
醋酸盐(NH ₄ CH ₃ CO ₂)	4.76	3.76–5.76	挥发性	可用	在1~10 mM范围内使用。 注：其钠盐或钾盐无挥发性。
甲酸盐(NH ₄ HCO ₂)	3.75	2.75–4.75	挥发性	可用	在1~10 mM范围内使用。 注：其钠盐或钾盐无挥发性。
磷酸盐1	2.15	1.15–3.15	非挥发性	不可用	常用的低pH缓冲液，具有良好的UV透光性。
磷酸盐2	7.2	6.20–8.20	非挥发性	不可用	pH值大于7时，需要降低柱温/浓度并使用保护柱，以便尽可能延长使用寿命。
磷酸盐3	12.3	11.3–13.3	非挥发性	不可用	pH值大于7时，需要降低柱温/浓度并使用保护柱，以便尽可能延长使用寿命。
4-甲基吗啡啉	~8.4	7.4–9.4	挥发性	可用	通常在10 mM或更低浓度下使用。
氨水(NH ₄ OH)	9.2	8.2–10.2	挥发性	可用	在5~10 mM范围内使用（进行MS分析时，需保持源温度 > 150 °C）。用氨水或醋酸调节pH值。pH=10时具有良好的缓冲容量。 注：请使用碳酸氢铵(NH ₄ HCO ₃)，而不是碳酸铵((NH ₄) ₂ CO ₃)。
碳酸氢铵	10.3 (HCO ₃ ⁻)	8.2–11.3	挥发性	可用	
	9.2 (NH ₄ ⁺)				
醋酸铵	9.2	8.2–10.2	挥发性	可用	在1~10 mM范围内使用。
甲酸铵	9.2	8.2–10.2	挥发性	可用	在1~10 mM范围内使用。
硼酸盐	9.2	8.2–10.2	非挥发性	不可用	需要降低柱温/浓度并使用保护柱，以便尽可能延长使用寿命。
CAPSO	9.7	8.7–10.7	非挥发性	不可用	两性离子缓冲液，兼容乙腈，在1~10 mM范围内使用。气味小。
甘氨酸	2.4, 9.8	8.8–10.8	非挥发性	不可用	两性离子缓冲液，相较于硼酸盐缓冲液更有助于延长色谱柱寿命。
1-甲基哌啶	10.2	9.3–11.3	挥发性	可用	在1~10 mM范围内使用。
CAPS	10.4	9.5–11.5	非挥发性	不可用	两性离子缓冲液，兼容乙腈，在1~10 mM范围内使用。气味小。
三乙胺 (用作醋酸盐)	10.7	9.7–11.7	挥发性	可用	在0.1%~1.0%范围内使用。仅当使用乙酸滴定时具有挥发性（使用盐酸或磷酸滴定时无挥发性）。在DNA分析(pH 7~9)中用作离子对试剂。
吡咯烷	11.3	10.3–12.3	挥发性	可用	温和型缓冲液，可延长柱寿命。

注：在pH、温度和/或压力的极值下运行会缩短色谱柱使用寿命。

IV. 色谱柱清洗、再生和存放

a. 清洗与再生

如果发生峰形改变、谱峰分叉、出现肩峰、保留时间改变、分离度变化或柱压升高，说明色谱柱可能已被污染。通常情况下，用纯有机溶剂进行冲洗（小心避免缓冲盐出现析出）就足以去除污染物。如果冲洗不能解决问题，可采用以下清洗和再生步骤。

根据样品和/或您认为污染色谱柱的物质的性质，选择与之匹配的常规清洗方法（见表3）。

请使用20倍柱体积的溶剂冲洗色谱柱。升高柱温可提高清洗效率。如果清洗和再生之后色谱柱性能仍然很差，请致电当地的沃特世办事处获得更多支持。

用50:50乙腈/水冲洗BEH HILIC色谱柱，去除极性污染物。如果此冲洗操作不能解决问题，可用5:95乙腈:水冲洗色谱柱。

要清洗BEH Amide色谱柱中的极性污染物，请运行10 min内水从0增加到100%的梯度。请注意，随着水的比例上升，柱压也将迅速增大。在含水量大于60%的条件下运行时，请降低流速。必要时请重复该操作。

表3.ACQUITY BEH色谱柱的推荐pH和温度限值

色谱柱	粒径	孔径	表面积	pH限值	温度限值		配基密度	碳载量%
					低pH	高pH		
BEH C ₁₈	1.7 µm	130 Å	185 m ² /g	1-12	80 °C	60 °C	3.1 µmol/m ²	17.7
BEH C ₈	1.7 µm	130 Å	185 m ² /g	1-12	60 °C	60 °C	3.1 µmol/m ²	12.8
BEH 苯基柱	1.7 µm	130 Å	185 m ² /g	1-12	80 °C	60 °C	3.0 µmol/m ²	14.5
BEH Shield RP18	1.7 µm	130 Å	185 m ² /g	2-11	50 °C	45 °C	3.2 µmol/m ²	16.6
BEH HILIC	1.7 µm	130 Å	185 m ² /g	1-9	60 °C	45 °C	—	—
BEH Amide	1.7 µm	130 Å	185 m ² /g	2-11	90 °C	90 °C	7.5 µmol/m ²	12

表4.反相色谱柱清洗顺序

极性样品	非极性样品*	蛋白质样品
1. 水	1. 异丙醇（或适当比例的异丙醇/水混合溶液**）	选项1：重复进几针二甲基亚砜(DMSO)
2. 甲醇	2. 四氢呋喃(THF)	选项2：使用10%~90% B的梯度，其中：A = 0.1%三氟乙酸(TFA)水溶液，B = 0.1%三氟乙酸(TFA)乙腈(CH ₃ CN)溶液
3. 四氢呋喃(THF)	3. 二氯甲烷	
4. 甲醇	4. 正己烷	
5. 水	5. 异丙醇（然后使用适当比例的异丙醇/水混合溶液**）	选项3：使用7 M盐酸胍或7 M尿素冲洗色谱柱
6. 流动相	6. 流动相	

* 在使用THF或正己烷之前，确保系统与这些溶剂兼容。只有在利用纯反相有机溶剂（如乙腈）无法清洗色谱柱时，方可考虑使用诸如THF或正己烷之类的溶剂。降低流速，使用较低的操作温度并尽量减少系统与THF和/或正己烷的接触。

**使用低有机溶剂含量的溶液，以避免出现缓冲盐析出。

b. 存放

如果反相色谱柱需要在室温下存放超过四天，应将其保存于100%乙腈中。对于高温应用，请在使用后立即使用100%乙腈保存色谱柱，以便尽可能延长色谱柱使用寿命。切勿使用缓冲盐保存色谱柱。如果流动相中含有缓冲盐，则先用10倍柱体积（常规色谱柱体积请参见表1）的HPLC级水冲洗反相ACQUITY BEH色谱柱，再用100%乙腈替换柱内的水，然后储存。如果不执行这个中间步骤，在引入100%乙腈时，色谱柱内可能会出现缓冲盐析出。BEH Amide色谱柱在保存100%乙腈前先进行梯度冲洗至100%乙腈以将所有水相溶剂从柱中冲洗干净。将色谱柱完全密封，防止柱床因溶剂蒸发而变干。

如果BEH HILIC色谱柱需要存放超过四天，应将其保存于95:5乙腈:水中。切勿使用缓冲液保存色谱柱。如果流动相中含有缓冲盐，则用10倍柱体积的95:5乙腈:水冲洗色谱柱（常规色谱柱体积请参见表1）。

注：如果色谱柱运行了含甲酸盐（如甲酸铵、甲酸等）的流动相，并且之后使用100%乙腈进行冲洗，那么在重新安装色谱柱并再次运行含甲酸盐的流动相时，柱平衡花费的时间可能略长。

V. eCord智能芯片技术

a. 简介

eCord智能芯片可记录色谱柱在整个使用寿命期间的性能历史。eCord将永久性地安装在色谱柱上，确保色谱柱在从一台仪器转移到另一台仪器时，其性能记录能够得到完整保存。

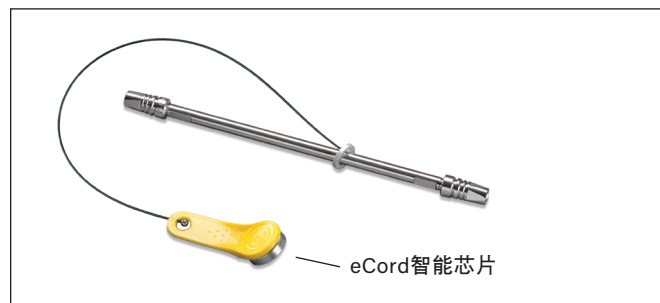


图3. eCord智能芯片。

在生产时，质量追踪和质量控制信息将被下载到eCord中。这些信息存储到芯片中之后，就不再需要纸质COA报告。用户安装色谱柱后，软件会自动将重要参数下载到保存于芯片的色谱柱历史文档中。本手册将介绍eCord如何为以下各方面提供解决方案：轻松追踪色谱柱的历史信息，减少繁琐的文书工作，确保仪器中安装的色谱柱性能良好，从而为用户消除顾虑。

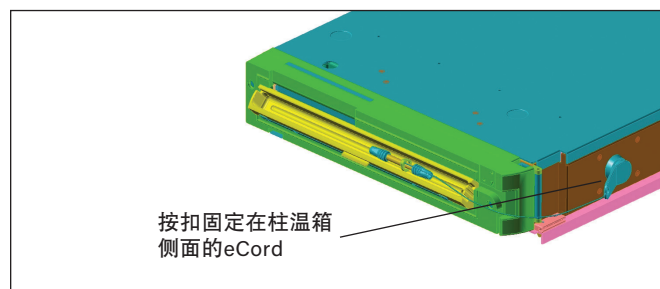


图4. 按扣固定在柱温箱侧面的eCord。

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面。eCord安装在柱温箱后，Empower™和MassLynx™软件将提供色谱柱的识别信息和总体使用信息，用户即可通过计算机查看色谱柱信息。

c. 生产信息

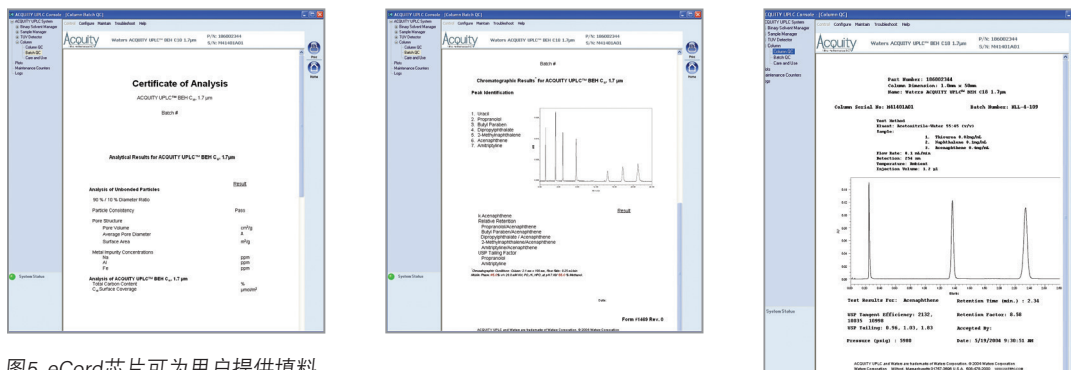


图5. eCord芯片可为用户提供填料批次QC测试结果概览。

图6.eCord芯片可为用户提供生产商进行色谱柱QC测试的条件和结果。具体信息包括色谱柱测试所采用的流动相、运行条件和分析物。此外，色谱柱随附QC结果和合格证。

d. 色谱柱使用信息

eCord芯片可为用户提供色谱柱的使用数据。屏幕顶部标识了色谱柱的填料类型、尺寸和序列号。色谱柱总体使用信息包括样品总数、进样针数、样品组总数、初次进样日期、末次进样日期、最高压力和最高温度。此信息还将按样品组详细记录色谱柱历史，包括开始使用日期、样品组名称、用户名称、系统名称、该样品组的进样次数、该样品组的样品个数、该样品组的最高压力和最高温度，以及该色谱柱是否满足基本的系统适应性要求。eCord芯片至多可存储50个样品组。

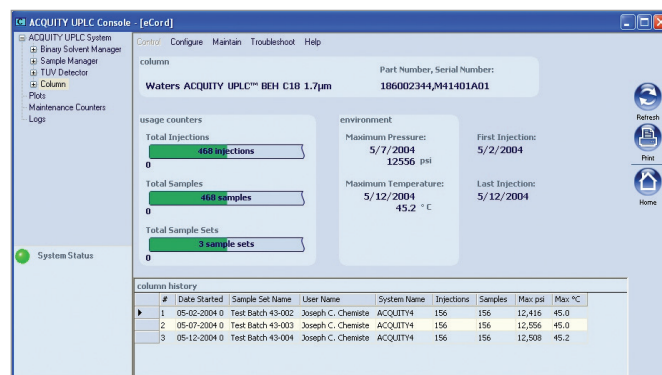


图7. eCord芯片提供的色谱柱使用信息示例。

VI. 其他信息

a. 延长ACQUITY BEH色谱柱使用寿命的技巧

1. 为了尽可能延长ACQUITY BEH色谱柱的使用寿命，请密切关注以下方面：

- 水的品质（包括水纯化系统）
- 溶剂品质
- 流动相的制备、储存和使用期限
- 样品、缓冲盐和流动相的溶解性
- 样品质量及其前处理

2. 建议通过在工作流程中加入质量控制(QC)参比物质来监控系统的运行状况。（请参阅720004535en）

3. 出现问题时，往往只需要纠正一个不当的操作。

4. 请务必记住：

- 使用在线过滤器装置，或者优选VanGuard保护柱。
- 尽可能避免使用100%水相流动相，以阻止细菌滋生。
- 每24~48小时更换一次水相流动相（如果必须使用100%水相流动相）。
- 每24~48小时需将旧的100%水相流动相丢弃以阻止细菌滋生。
- 每次向流动相A添加5%~10%有机溶剂，以调节梯度曲线。
- 用0.2 µm滤膜过滤流动相的水相部分。
- 维护水纯化系统，使其保持良好的工作状态。

- 尽可能只使用超纯水(18 MΩ·cm)和优质溶剂。使用HPLC级水，而不是UPLC级水。
 - 考虑样品前处理（如固相萃取、过滤等）。
5. 避免事项（在可能的情况下）：
- 100%水相流动相（如果可能）
 - HPLC级瓶装水
 - “添加”流动相，将“新”流动相加入到“旧”流动相中
 - 使用旧置的水相流动相。切记每24~48小时彻底冲洗流动相储液瓶，并制备新鲜流动相
 - 磷酸盐缓冲液与高浓度乙腈（如 > 70%）一起使用，可能会出现沉淀
6. 请勿在观察到背压过高或峰分裂时便认定是由于色谱柱失效所引起。请通过检查以下问题调查色谱柱出现故障的原因：
- 柱压
 - 流动相是否长菌、沉淀析出和/或样品的问题
 - 峰分叉
 - 样品质量
 - 进样溶剂的强度
7. 请牢记，通常ACQUITY色谱柱的内径（1.0、2.1和3.0 mm）比传统HPLC色谱柱小，因此流动相消耗会慢很多。为了降低流动相发生污染或降解的可能性，每次请仅制备分析所需的流动相并将多余的流动相保存在冷藏环境下。
8. 流动相相关问题：
- 是否在使用100%水相流动相？能否在流动相A中加入少量有机溶剂？
 - 是否要使用0.2 μm滤膜过滤水相流动相？
 - 流动相配了多久？是否需要在储液瓶上注明制备日期？
 - 每24~48小时需添加流动相还是制备新鲜流动相？
 - 水的质量如何？水的质量最近有变化吗？水纯化系统是如何工作的？上一次维护是什么时候？
 - 是否在使用pH 7的磷酸盐缓冲液（在此条件下非常容易滋生细菌）？
9. 样品相关问题：
- 如果以流动相配制的纯标准品进样，是否会出现这些问题？
 - 如果按照样品前处理方法（如SPE、过滤等）用水制备标准品，是否仍会出现这些问题？
 - 样品是否随时间发生了变化？

b. 反相ACQUITY BEH色谱柱的推荐流速和背压

内径为1.0 mm的色谱柱(40 °C)								
UPLC线速度 (mm/sec)	3		4		5		6	
色谱柱 尺寸	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (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

内径为2.1 mm的色谱柱(40 °C)								
UPLC线速度 (mm/sec)	3		4		5		6	
色谱柱 尺寸	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (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

注: 1) ACQUITY BEH 1.7 μ m粒径反相色谱柱
 2) ACN/水溶液梯度, P_{max} (约30% ACN处)
 3) 接近给定的总系统背压上限

内径为3.0 mm的色谱柱(40 °C)								
UPLC 线速度 (mm/sec)	3		4		5		6	
色谱柱 尺寸	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (psi)	流速 (mL/min)	背压 (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. BEH HILIC色谱柱入门

1. 由于BEH HILIC色谱柱不含有键合相, 因此pH操作范围为1~9, 操作温度上限为45 °C。
2. 与其他液相色谱柱一样, BEH HILIC色谱柱在pH、压力和温度的极值下运行会缩短色谱柱使用寿命。

色谱柱平衡

1. 初次使用本色谱柱时, 用50倍柱体积的50%乙腈: 50%水溶液 (含最终浓度为10 mM的缓冲液) 平衡色谱柱。
2. 初次进样之前, 用20倍柱体积的流动相 (初始条件) 平衡色谱柱。
3. 如果采用梯度条件, 在进样之间用8~10倍柱体积的流动相平衡色谱柱。
4. 色谱柱平衡不当会导致保留时间漂移。

流动相注意事项

1. 流动相或梯度中应始终保持至少3%的极性溶剂 (例如3%水/3%甲醇或2%水/1%甲醇等)。这样可以确保ACQUITY BEH HILIC颗粒始终保持水合状态。
2. 流动相或梯度中应始终保持至少40%的有机溶剂 (例如乙腈)。
3. 避免在HILIC流动相中使用磷酸盐缓冲液以防止出现析出, 但可以使用磷酸。
4. 相较于甲酸或醋酸等添加剂, 使用诸如甲酸铵或醋酸铵的缓冲液可获得重现性更好的结果。如果只能使用添加剂 (例如甲酸等) 而不是缓冲液, 请使用0.2% (v:v) 的浓度, 而不是0.1%。
5. 为了获得理想峰形, 应始终保持流动相/梯度中含有浓度为10 mM的缓冲液。

进样溶剂

1. 如果可能，进样溶剂应使用95%乙腈。极性溶剂（如水、甲醇和异丙醇）应减少到总体积的25%。
2. 通用的进样溶剂为75:25乙腈/甲醇，该溶剂可以很好地平衡分析物溶解性和峰形。
3. 请避免进样溶剂中含水和二甲基亚砜(DMSO)，这些溶剂将导致非常差的峰形。
4. 通过反相固相萃取(SPE)用乙腈置换掉水或DMSO。如果无法实现，则用有机溶剂稀释水或DMSO。

其他技巧

1. BEH HILIC色谱柱专用于保留极性非常强的碱性化合物，而对于酸性、中性和/或非极性化合物的保留性能有限。
2. 分析小分子(< 200 Da)强极性碱性化合物时，理想流速范围为0.4~0.8 mL/min。
3. 相较于Atlantis™ HILIC硅基HPLC色谱柱，BEH HILIC色谱柱在梯度分析中的保留性降低20%，在等度分析中的保留性降低35%~65%。这是因为BEH颗粒表面的硅醇残基浓度更低。
4. 切记水在HILIC分析中是非常强的溶剂。因此，必须去除或尽可能减少进样溶剂中的水。
5. 初步探索色谱条件时，可运行95%乙腈至50%乙腈的梯度。若无保留，可运行95:3:2乙腈:甲醇:水相缓冲液的等度条件。
6. 可使用诸如甲醇、丙酮或异丙醇之类的极性溶剂代替水以增强保留性能。
7. 如果使用ACQUITY UPLC系统，弱洗针液应严格按照初始流动相条件中的有机相百分比配制，否则分析物峰形或保留性能可能会受到影响。
8. 建议通过在工作流程中加入HILIC质量控制(QC)参比物质来监控系统的运行状况。（请参阅[720004535en](#)）。

d. BEH Amide色谱柱入门

操作范围

1. BEH Amide色谱柱可在pH 2~11的HILIC条件下运行常规分析，操作温度可达90 °C。
2. 和其他LC色谱柱一样，在pH、压力和温度的极值下运行会缩短色谱柱使用寿命。

色谱柱平衡

初次使用本色谱柱时，用50倍柱体积的60%乙腈:40%水溶液（或初始条件）平衡色谱柱。

初次进样之前，用20倍柱体积的流动相（初始条件）平衡色谱柱。

如果采用梯度条件，在进样之间用8~10倍柱体积的流动相平衡色谱柱。

色谱柱平衡不当会导致保留时间漂移。

流动相注意事项

1. 流动相或梯度中应始终保持至少3%的极性溶剂（例如3%水、3%甲醇或2%水/1%甲醇等）。
2. 推荐使用含缓冲液的流动相而不是添加剂。为获得理想分析结果，应始终保持缓冲盐浓度至少为10 mM。
3. 如果要使用添加剂，建议始终保持添加剂浓度至少为0.2%。
4. 流动相或梯度中应始终保持至少40%的有机溶剂（例如乙腈）。
5. 水相比比例大于60%时，应使用较低的流速，避免柱压过高。此要求适用于所有的清洗步骤。
6. 避免在HILIC流动相中使用磷酸盐缓冲液以防止出现析出，但可以使用磷酸。

进样溶剂

1. 如果可能，进样溶剂应尽可能接近流动相组分（如果是等度分析）或起始梯度条件。除非安装了正己烷/四氢呋喃兼容性套件，否则切勿将丙酮用作样品溶剂/稀释剂。
2. 通用的进样溶剂为75:25乙腈/甲醇，该溶剂可以很好地平衡分析物溶解性和峰形。分离在有机溶剂中溶解度不高的糖类时，允许样品中含有浓度较高的水相溶剂。使用50:50乙腈/水可获得满意的结果。
3. 进样溶剂对峰形的影响应通过实验确定。在某些情况下，进样水（或高含水量溶液）可能并不会对峰形造成不利影响。

其他技巧

1. 初步探索色谱条件时，可运行95%乙腈至50%乙腈的梯度。若无保留，可运行95:3:2乙腈:甲醇:水相缓冲液的等度条件。
2. 可使用诸如甲醇、丙酮或异丙醇之类的极性溶剂代替水以增强保留性能。
3. 确保弱针清洗溶剂/灌注溶剂采用的是起始流动相（即高比例有机相），否则会对峰形造成不利影响。典型针清洗条件：800 μ L强清洗液20:80 ACN/H₂O中，500 μ L弱清洗液75:25 ACN/H₂O。
4. 除非安装了正己烷/四氢呋喃兼容性套件，否则切勿将丙酮用作样品溶剂/稀释剂。

分离单糖、二糖、多糖的技巧

1. 如果分离不含还原糖（如下文所示）的糖类或含糖化合物，请遵循前文的一般建议。
2. 如果分离还原糖，请查看以下信息。

3. 还原糖可以发生变旋，导致 α 环与 β 环形式的糖（差向异构体）产生，这是一种不良分离。
4. 升高温度和pH值可使差向异构体合并成一个峰：
5. 在35 °C下使用高pH（0.2%三乙胺(TEA)或0.1%氨水(NH₄OH)）和/或
6. 在高温下(> 80 °C)使用0.05% TEA (>80 °C)。
7. 分离还原糖（例如如果糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、甘油醛等）时，请注意遵循以下建议。否则会导致这些分析物出现分裂峰（差向异构体分离）：
 - a. 以低流速运行（例如，在2.1 x 50 mm色谱柱上流速设置为0.10~0.13 mL/min），促进差向异构体峰合并。
 - b. 色谱柱较长时，可采用较高的流速（例如0.3 mL/min）。和所有LC分离一样，理想流速应通过实验来确定。
 - c. 向两个流动相（例如A2、B2等）储液瓶中加入三乙胺(TEA)或氨水(NH₄OH)改性剂。
 - d. 对于单糖和/或二糖的UPLC/ELSD分离，典型的等度UPLC条件包括：
 - i. 含有0.2% TEA的75%乙腈(ACN)，35 °C，0.13 mL/min，2.1 x 50 mm BEH Amide色谱柱；
 - ii. 含有0.05% TEA的77%丙酮，85 °C，0.15 mL/min，2.1 x 50 mm BEH Amide色谱柱；
 - iii. 含有0.2% TEA的75% ACN，35 °C，0.2 mL/min，2.1 x 100 mm BEH Amide色谱柱。
 - e. 对于更复杂的糖类混合物（例如多糖）的UPLC-ELSD分离，典型的梯度UPLC条件包括（流动相A和B中都需要添加TEA）：
 - i. 10 min内梯度从80%变化至50% ACN（含0.2% TEA），35 °C，0.13 mL/min，2.1 x 100 mm BEH Amide色谱柱，或使用2.1 x 150 mm BEH Amide色谱柱（流速升至0.3 mL/min）；
 - ii. 10 min内丙酮从80%变化至55%（含0.05% TEA），85 °C，0.15 mL/min，2.1 x 100 mm BEH Amide色谱柱。

- f. 对于单糖和二糖的UPLC-MS分离，典型的等度UPLC条件包括：
 - i. 75%ACN + 0.1% NH₄OH，35 °C，0.13 mL/min，2.1 x 50 mm BEH Amide色谱柱。
- g. 对于更复杂的糖类混合物（例如多糖）的UPLC-MS分离，典型的梯度UPLC条件包括（流动相A和B中都需要添加NH₄OH）：
 - i. 10 min内梯度从75%变化至45%ACN（含有0.1% NH₄OH），35 °C，0.2 mL/min，2.1 x 100 mm BEH Amide色谱柱。
- 6. 更复杂的样品混合物可能需要使用梯度条件和/或更长的UPLC色谱柱。
- 7. 如果在一种或多种流动相中使用了丙酮，请勿使用丙酮作为样品稀释剂或针清洗溶剂。有关样品稀释剂建议和针清洗溶剂/灌注溶剂建议的其他技巧（# 3），请参阅进样溶剂部分。
- 8. 含糖/多糖/碳水化合物时，典型样品前处理建议如下：
 - a. 液体样品
 - i. 使用50:50 ACN/H₂O稀释。
 - ii. 使用0.45 µm或0.22 µm针式过滤器过滤（如有必要）。
 - b. 固体样品
 - i. 称取约3g样品放入50 mL离心管中。
 - ii. 加入25 mL 50:50 ACN/H₂O，混合均匀（机械混匀）。
 - iii. 在3200 rpm下离心30 min。
 - iv. 收集上清液，使用0.45 µm或0.22 µm针式过滤器过滤（如有必要）。
 - c. 视样品和/或分析物浓度而定，可能需要对样品进行额外稀释。
 - d. 更复杂并且/或者分析物浓度更低的样品可能需要额外的样品前处理步骤（例如固相萃取(SPE)）。
 - e. 考虑使用VanGuard BEH Amide保护柱保护UPLC色谱柱。
 - f. 建议通过在工作流程中加入HILIC质量控制(QC)参比物质来监控系统的运行状况。（请参阅720004535en）。

VII. 注意事项

根据用户应用不同，这些产品可能在使用后被归类为危险品，因此应当由经过培训、有能力处理此类物质的专业实验室人员使用。产品的安全使用与处置由采购方和用户全权负责。如需本产品的安全数据表(SDS)，请访问www.waters.com/sds。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY、UPLC、eCord、VanGuard、MaxPeak、Arc、Oasis、Sep-Pak、Empower和MassLynx是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。



扫一扫，关注沃特世微信

沃特世科技(上海)有限公司

上海办公室：021 - 6156 2666
北京办公室：010 - 5769 0500
广州办公室：020 - 2829 6555

Waters China Limited

香港办公室：852 - 3921 5239

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