

Symmetry色谱柱

目录

I. 简介

II. 入门指南

- 色谱柱安装
- 色谱柱平衡
- 初始柱效测定

III. 色谱柱使用

- 保护柱
- 样品制备
- pH范围
- 溶剂
- 压力
- 温度

IV. 放大/缩小等度方法

V. 故障排除

VI. 色谱柱清洗、再生和储存

- 清洗与再生
- 储存

VII. 将色谱柱连接到HPLC

- 色谱柱接头和系统管路注意事项
- 尽可能减少谱带展宽
- 安装小柱
- 测量系统谱带展宽体积和系统方差
- 测量系统体积

VIII. 其它信息

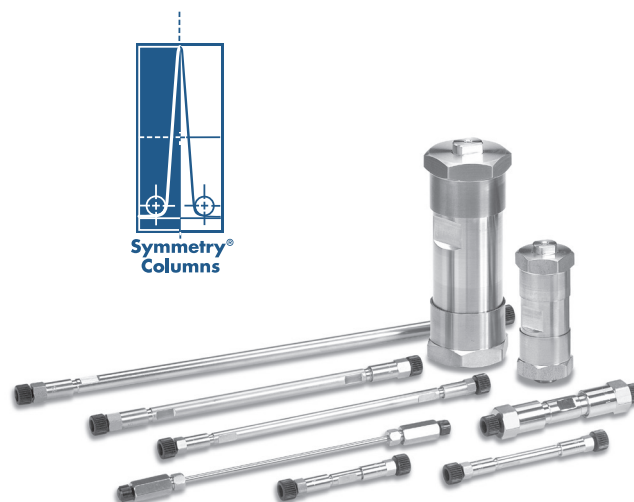
- 使用窄径 (内径 ≤ 3.0 mm) 色谱柱
- 谱带展宽体积对2.1 mm内径色谱柱性能的影响
- 未优化和优化LC-MS/MS系统对比: 系统配置更改建议
- 沃特世小粒径(3.5 μ m)色谱柱 - 快速色谱分离

I. 简介

首先, 非常感谢您选择Symmetry™色谱柱。Symmetry色谱柱一直以来都是色谱柱重现性的标杆。随着当今化学家不断为新型药物和生物制药产品开发出新的分析方法, 选择重现性优良的HPLC色谱柱变得至关重要。选用的色谱柱应能在新型药品的整个生命周期内得到一致的色谱结果。Symmetry、SymmetryShield™和Symmetry300™色谱柱优异的重现性是沃特世在HPLC色谱柱领域不断改进、精益求精的成果。

物理特性

填料	化学键合相	粒径	颗粒	孔径	载碳量	封端
Symmetry	C ₁₈	3.5, 5 μ m	球形	100 Å	19%	是
	C ₈	3.5, 5 μ m	球形	100 Å	12%	是
SymmetryPrep	C ₁₈	7 μ m	球形	100 Å	19%	是
	C ₈	7 μ m	球形	100 Å	12%	是
SymmetryShield	RP18	3.5, 5, 7 μ m	球形	100 Å	17%	是
	RP8	3.5, 5, 7 μ m	球形	100 Å	15%	是
Symmetry300	C ₁₈	3.5, 5 μ m	球形	300 Å	8.5%	是
	C ₄	3.5, 5 μ m	球形	300 Å	2.8%	是



II. 入门指南

每根Symmetry色谱柱都附带一份COA报告(Certificate of Analysis)和一份性能测试色谱图。COA报告为Symmetry色谱柱中所用的填料批次所特有，包括填料批次、未键合颗粒和键合填料分析结果，以及色谱结果和检测条件。性能测试色谱图则会提供每根色谱柱的以下信息：填料批次、色谱柱序列号、USP理论塔板数、USP拖尾因子、容量因子以及色谱条件。这些数据应妥善保存，以备将来参考。

a. 色谱柱安装

注：下述步骤给出的流速适用于典型4.6 mm内径色谱柱。可根据所安装Symmetry色谱柱的柱内径、柱长、粒径和柱压相应地提高或降低流速。色谱柱内径和/或柱长改变时，请参阅“放大/缩小等度分离方法”部分计算流速。有关HPLC连接的详细信息，请参阅“将色谱柱连接到HPLC”部分。

1. 灌注泵系统，排出其中含缓冲液的流动相，然后将色谱柱的入口端连接至进样器出口。
2. 用100%有机流动相（甲醇或乙腈）冲洗色谱柱，泵流速设置为0.1 mL/min，并在5 min内增加至1 mL/min。
3. 当流动相可从色谱柱出口自由流出时，停止液流并将色谱柱出口连接至检测器。这能防止空气进入检测系统，使系统更快达到基线平衡。
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。

b. 色谱柱平衡

Symmetry色谱柱出厂时保存于100%乙腈中。在更换色谱柱的流动相之前，请务必确保流动相的兼容性。请用至少10倍柱体积的流动相平衡色谱柱（请参阅表1中的空色谱柱体积）。为避免流动相缓冲液在色谱柱或系统中发生沉淀，请使用五倍柱体积的水/有机溶剂混合溶液冲洗色谱柱，其中有机溶剂的含量应与所用缓冲流动相相同或更低。（例如，使用60%甲醇水溶液冲洗色谱柱和HPLC系统，然后再引入60%甲醇/40%缓冲液组成的流动相）。

注：如果流动相中含有低浓度添加剂（例如离子对试剂），那么完成平衡可能需要100-200倍柱体积的流动相。此外，当流动相中含有甲酸盐时（如甲酸铵、甲酸等），初始色谱柱平衡时间也可能较长。

c. 初始柱效测定

1. 使用色谱柱之前，需要先进行一次柱效测试。沃特世建议您在收到色谱柱后使用“性能测试色谱图”中所述的混合标准品对色谱柱进行测试。
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。采用两套不同HPLC系统进行测试时，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因素所致。

表 1. 空色谱柱体积(mL)（乘以10得到冲洗溶剂体积）

色谱柱	色谱柱内径(mm)						
柱长	1.0	2.1	3.0	4.6	7.8	19	30
20 mm	-	0.07	0.14	0.33	-	-	-
30 mm	-	0.1	0.2	0.5	-	8	-
50 mm	0.1	0.2	0.3	0.8	2.4	14	35
100 mm	0.1	0.4	0.7	1.7	5	28	70
150 mm	0.1	0.5	1.0	2.5	7	42	-
250 mm	-	0.9	1.8	4	-	70	-

III. 色谱柱使用

为确保Symmetry色谱柱始终保持理想性能，请遵循以下原则：

a. 保护柱

在进样器和主色谱柱之间使用化学键合相及粒径与主色谱柱匹配的沃特世保护柱。使用匹配的高性能保护柱，是保护主色谱柱而不影响或改变分析分离度的重要措施。保护柱需要根据样品污染情况定期更换。当系统背压稳步上升至设定压力限时，通常表明需要更换保护柱。突然出现分叉峰也表明需要更换保护柱。

b. 样品制备

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Oasis™固相萃取小柱/色谱柱或Sep-Pak™小柱净化样品。请访问www.waters.com/sampleprep
2. 为获得理想峰形和灵敏度，建议使用运行分析时要用的流动相或比它更弱的流动相（有机改性剂含量更少）来制备样品。

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/或缓冲液产生沉淀。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改性剂（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相容性。或者，可以考虑将样品溶液在8,000 rpm下离心20 min，然后将上清液转移至适当的样品瓶中。

c. pH范围

Symmetry色谱柱的推荐pH范围为2~8。表2中列出了常用的缓冲液和添加剂。此外，柱寿命将根据运行温度、使用的缓冲液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。

表2：在pH 2~8范围内使用Symmetry色谱柱时的推荐缓冲液

添加剂或缓冲液	pK _a	缓冲液范围 (±1个pH单位)	挥发性	能否用于质谱?	注释
甲酸	3.75		挥发性	是	与甲酸铵盐一起使用时缓冲作用非常强。在0.1%-1.0%范围内使用。
乙酸	4.76		挥发性	是	与醋酸铵盐一起使用时缓冲作用非常强。在0.1%-1.0%范围内使用。
甲酸铵 (NH ₄ COOH)	3.75	2.75 – 4.75	挥发性	是	在1-10 mM范围内使用。 注：其钠盐或钾盐无挥发性。
三氟乙酸 (TFA)	0.3		挥发性	低浓度	用于LC-MS分析时会导致信号抑制，通常建议使用浓度低于0.1%的TFA
醋酸铵 (NH ₄ CH ₃ COOH)	4.76	3.76 – 5.76	挥发性	是	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	否	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	否	pH值大于7，降低温度/浓度并使用保护柱，以便尽可能延长使用寿命。

d. 溶剂

为了保持理想的色谱柱性能，请使用优质的色谱级溶剂。所有水性缓冲液在使用前都必须过滤。推荐使用Acrodisc®过滤膜。含有悬浮颗粒物的溶剂通常会堵塞色谱柱入口分配筛板的外表面，这会导致操作压力增大，性能变差。使用前，请将所有溶剂彻底脱气，避免在泵和检测器中形成气泡。还建议使用在线脱气装置。运行低压梯度时，溶剂脱气尤其重要，因为在梯度运行过程中混合水性溶剂与有机溶剂时可能形成气泡。

e. 压力

Symmetry色谱柱可承受6,000 psi (400 bar或40 Mpa) 的压力上限，但为了尽可能延长色谱柱和系统使用寿命，应避免压力超过4,000-5,000 psi。

f. 温度

为了改善选择性、降低溶剂粘度和提高传质速率，Symmetry色谱柱的推荐操作温度范围为20 °C-45 °C。但是，任何比室温高的温度都会对色谱柱寿命产生不良影响，色谱柱寿命还会根据pH和缓冲液条件而有所不同。

IV. 放大/缩小等度方法

以下公式可在保持线性流速不变的前提下放大或缩小方法，并计算出新方法的上样量：

如果色谱柱内径和长度改变：

$$F_2 = F_1(r_2/r_1)^2$$

或

$$\text{进样体积}_1 = \text{进样体积}_2 (r_2/r_1)^2 (L_2/L_1)$$

其中：
r = 色谱柱半径(mm)
F = 流速(mL/min)
L = 色谱柱长度(mm)
1 = 原始或参比色谱柱
2 = 新色谱柱

V. 故障排除

保留时间、分离度或柱压变化通常是色谱柱污染所致。请参阅“色谱柱清洗、再生和储存”。有关色谱柱故障排除问题的信息，请参阅《沃特世色谱柱和耗材目录》，或者垂询沃特世耗材部门业务专员。

VI. 色谱柱清洗、再生和储存

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（小心避免缓冲液出现沉淀）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灌注色谱柱。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）。用20倍柱体积（例如对于4.6 x 250 mm色谱柱，使用80 mL溶剂）HPLC级溶剂冲洗色谱柱将流动相温度升至35 °C-55 °C可以提高清洁效率。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。

表3：色谱柱清洗溶剂使用顺序和其它选项

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：重复进样等份的二甲基亚砜(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)的乙腈(CH ₃ CN)溶液
3. 四氢呋喃(THF)	3. 二氯甲烷	
4. 甲醇	4. 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7M 盐酸胍或7M 尿素冲洗色谱柱
6. 流动相	6. 流动相	

*使用低有机溶剂含量的混合溶液

保护柱需要根据样品污染情况定期更换。当系统背压稳步上升至设定压力限值时，通常表明需要更换保护柱。突然出现分叉峰也表明需要更换保护柱。

b. 储存

为了尽可能延长色谱柱寿命和提高性能，使用色谱柱之后请将其储存在100%乙腈中。请勿将色谱柱储存在含缓冲液或盐的水性流动相中。如果流动相洗脱液中含有酸/碱性添加剂、缓冲液或盐，请先用至少10倍柱体积（常用色谱柱的柱体积见表1）HPLC级水冲洗色谱柱，再用至少15倍柱体积HPLC级100%乙腈冲洗色谱柱，然后再储存。如果不执行这些步骤，可能导致缓冲盐在色谱柱内沉淀。使用随附的柱堵头完全密封色谱柱，防止溶剂蒸发导致柱床变干。

注：如果色谱柱运行了含甲酸盐（如甲酸盐、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，可能需要花费略长的柱平衡时间。

VII. 将色谱柱连接到HPLC

a. 色谱柱接头和系统管路注意事项

所需工具：

3/8英寸扳手

5/16英寸扳手

小心拿取色谱柱。切勿让色谱柱掉落或撞击到坚硬表面，因为这样会扰乱柱床并且影响色谱柱性能。

1. 正确连接接入和接出色谱柱的1/16英寸外径不锈钢管路对于获得高质量色谱结果至关重要。
2. 使用标准不锈钢压力螺母接头时，确保其正确匹配1/16英寸外径不锈钢管路非常重要。拧紧或拧松压力螺母时，将5/16英寸扳手置于压力螺母上，并将3/8英寸扳手置于色谱柱末端接头的六角头上。

注：如果在这个过程中将任一扳手放在色谱柱管路搭扳手的平面上，会导致末端接头松动渗漏。

3. 如果在不锈钢压力螺母接头和色谱柱末端接头之间出现渗漏，则必须组装新的压力螺母接头、管路和锥箍。
4. 色谱柱识别标记上的箭头指示正确的溶剂流向。

正确连接接入和接出色谱柱的1/16英寸外径不锈钢管路对于获得高质量色谱结果至关重要。管路应接触到色谱柱末端接头的底部，二者之间不应有死体积。本应成功的分离可能因色谱柱发生额外峰展宽而失败，认识到这一点非常重要。下文详细介绍了如何选择合适的色谱柱接头和系统管路。

由于缺乏行业标准，不同色谱柱制造商使用了不同类型的色谱柱接头。如果色谱柱末端接头的类型与现有的管路接头设置不匹配，可能对色谱分离性能产生负面影响。下文将解释沃特世和Parker的锥箍及末端接头之间的差别（图1）。不同类型的末端接头要求管路伸出锥箍的长度不尽相同。Symmetry色谱柱配备的沃特世末端接头要求管路伸出锥箍0.130英寸。如果您目前使用的不是沃特世色谱柱，则在安装Symmetry色谱柱前必须重置锥箍深度以获得理想性能。

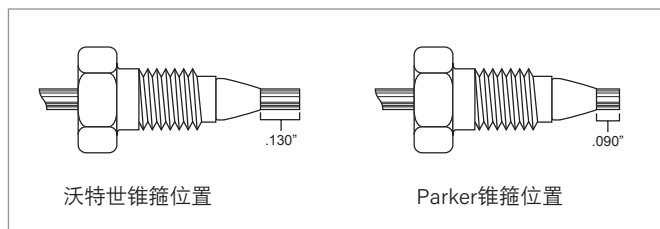


图1. 沃特世和Parker锥箍。

管路/色谱柱连接正确时（图2），管路应接触到色谱柱末端接头的底部，二者之间不应有死体积。

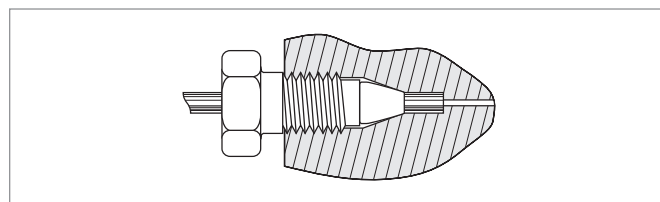


图2. 正确的管路/色谱柱连接。

流路中存在死体积会影响色谱柱性能。如果将Parker锥箍连接至沃特世末端接头，就可能出现这种情况（图3）。

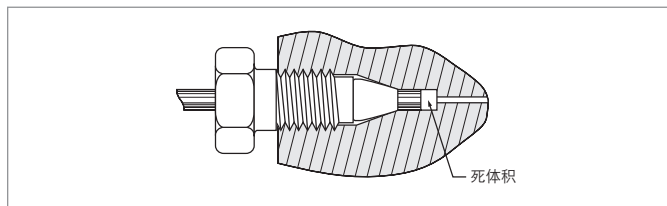


图3. Parker锥箍安装在沃特世末端接头上。

注：如果将装有Parker锥箍的管路连接到沃特世色谱柱上，会出现死体积。

只有一种方法可以解决这个问题：切断装有锥箍的管路末端，在管路上安装新的锥箍并重新连接。在拧紧螺钉前，请确保管路接触到色谱柱末端接头的底部。

相反，如果是将装有沃特世锥箍的管路连接到带Parker末端接头的色谱柱，则管路末端在锥箍到达合适的密封位置之前就会接触到底部。

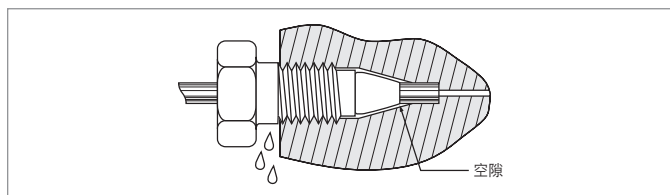


图4. 沃特世锥箍安装在Parker末端接头上。

这会留下空隙并造成渗漏（图4）。

注：如果将沃特世锥箍连接到装有Parker末端接头的色谱柱上，这种连接会导致渗漏。

有两种方法可以解决这个问题：

1. 进一步拧紧螺钉。这样锥箍会向前移动并到达密封表面。切勿过度拧紧，因为这样可能会损坏螺钉。
2. 切断管路，更换锥箍并重新连接。

或者，用可重置锥箍深度的一体化PEEK™接头([186008714](#))替换常规压力螺母接头。

尽可能减少谱带展宽

图5显示了管路内径对系统谱带展宽以及峰形的影响。从图中可以看出，管路内径较大会引起峰展宽和灵敏度降低。

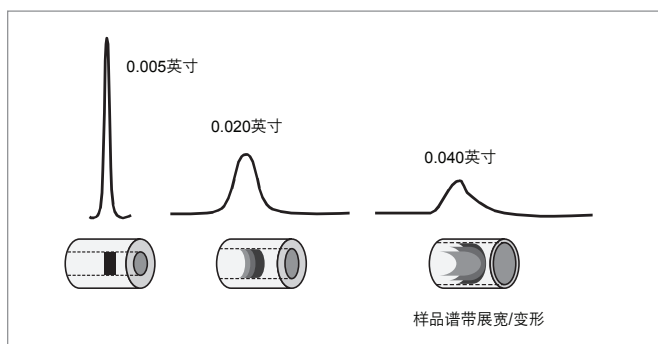


图5. 连接管路对系统的影响。

c. 安装一体式Sentry保护柱

参见图6所示的安装说明。拧松旧小柱上的末端接头，使其与仪器入口和出口管路保持连接。

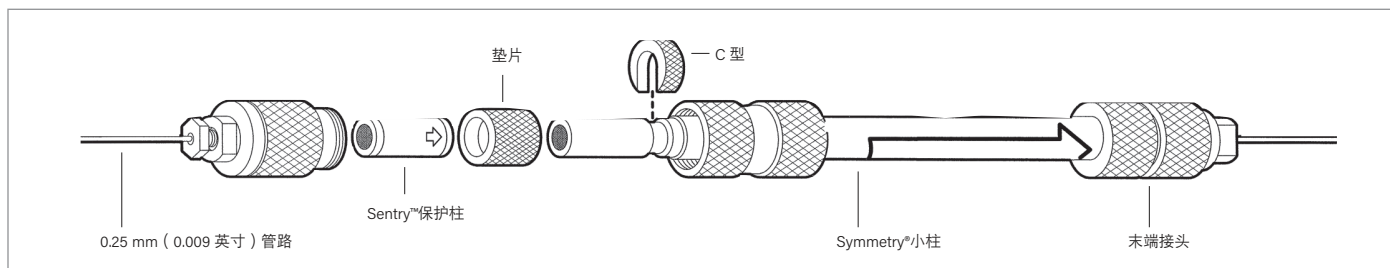


图6. 安装带有Sentry保护柱的Symmetry小柱。

将新小柱连接到接头之间，使标签上的液流流向箭头指向检测器。用手拧紧所有接头。

d. 测量系统谱带展宽体积

该测试应在配备UV检测器的HPLC系统上进行。

1. 断开色谱柱与系统的连接，并替换为零死体积接头。
2. 将流速设置为1 mL/min。
3. 以流动相稀释测试混合物，使检测器的灵敏度达到0.5-1.0 AUFS（可使用含有尿嘧啶、羟苯乙酯和羟苯丙酯的系统启动测试混合物；P/N: [WAT034544](#)）。
4. 进样此溶液2~5 μL 。
5. 测量4.4%峰高处的峰宽（5-sigma法）：
 - 5-sigma谱带展宽(μL) =
峰宽(min) x 流速(mL/min) x (1000 $\mu\text{L}/1\text{ mL}$)
 - 系统方差(μL^2) =
(5-sigma谱带展宽) $^2/25$

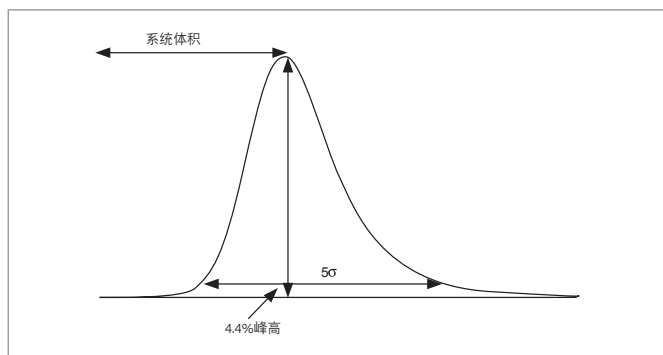


图7. 采用5-Sigma法测定系统谱带展宽体积。

对于典型HPLC系统，谱带展宽体积不应大于 $100\ \mu\text{L} \pm 30\ \mu\text{L}$ （或方差 $400\ \mu\text{L}^2 \pm 36\ \mu\text{L}^2$ ）。

对于微内径（2.1 mm内径）系统，谱带展宽体积不应大于20~40 μL （或方差不应大于 $16\ \mu\text{L}^2 \sim 64\ \mu\text{L}^2$ ）。

e. 测量系统延迟体积

系统体积对于放大分离非常重要，因为它会在每次运行开始时产生一段等度保持。在小规模分离中，这段等度保持通常是数倍色谱柱体积，但对于制备型分离，等度保持可能只占制备色谱柱体积的一部分。设计放大实验时必须考虑补偿该体积，以避免色谱峰失真（图8）。

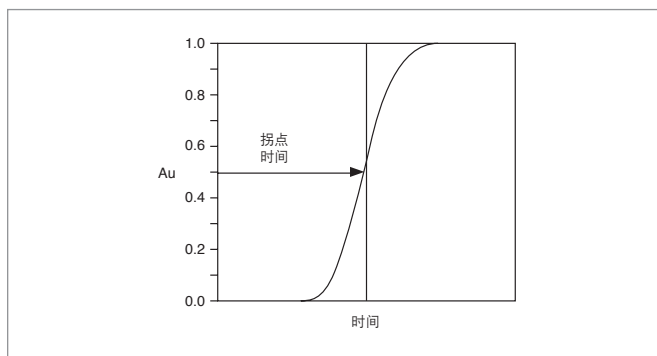


图8. 测定梯度延迟体积。

1. 取下色谱柱。
2. 使用乙腈作为流动相A，含0.05 mg/mL尿嘧啶的乙腈作为流动相B（消除无添加剂混合和粘度问题）。
3. 将UV检测器波长设置为254 nm。
4. 在目标仪器上运行初始方法中的流速和预期流速。
5. 采集运行100%流动相A时的基线5 min。
6. 将梯级设置为5 min后变为100%流动相B，然后继续采集数据5 min。
7. 测量100%流动相A和100%流动相B之间的吸光度差值。
8. 测定该吸光度差值的50%处的时间。
9. 计算梯级起点与50%点之间的时间差值。
10. 将时间差值乘以流速。

III. 其它信息

a. 使用窄径（内径 < 3.0 mm）色谱柱

本节将介绍如何尽量减少柱外效应，并介绍在HPLC系统中尽可能提高窄径色谱柱性能的原则。使用内径3.0 mm的窄径色谱柱时通常无需更改系统配置。但使用内径2.1mm的色谱柱时，需要更改HPLC系统配置才能避免系统谱带展宽体积过大。如果不适当更改系统配置，会因系统谱带展宽体积过大而导致峰展宽，并随着峰体积减小，对峰宽造成严重影响。

b. 谱带展宽体积对2.1 mm内径色谱柱性能的影响

注：在色谱柱后使用分流器会加剧谱带展宽。

系统优化可能对灵敏度和分离度产生巨大影响，对于配置了分流器的系统尤其如此。优化措施包括使用深度正确的锥箍以及尽可能减小管路内径和长度。图9给出了一个示例，通过优化LC-MS/MS系统，测定代谢物的灵敏度和分离度提高了一倍。

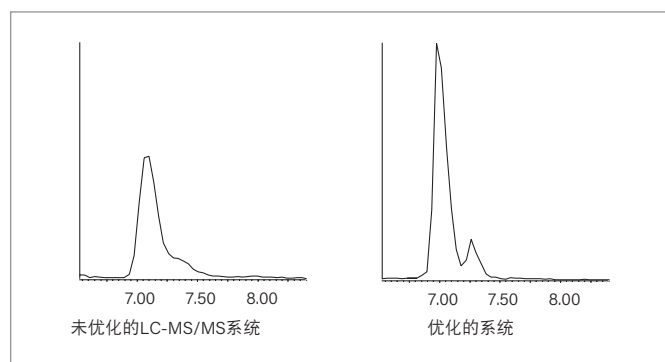


图9. 未优化和优化LC-MS/MS系统对比

c. 优化和优化LC-MS/MS系统对比：系统配置更改建议

1. 将小体积检测器流通池与内径 ≤ 2.1 mm的色谱柱配合使用

注：为减小谱带展宽体积而缩短流通池光程，检测器灵敏度也会随之降低。

2. 尽可能减小样品定量环体积
3. 在泵和进样器之间使用0.009英寸(0.25 mm)的管路。
4. 对于标准系统，其余连接也请使用0.009英寸(0.25 mm)的管路，对于窄径（内径2.1 mm）系统，其余连接请使用0.005英寸(0.12 mm)的管路。
5. 使用完全接合的（预切割）连接（如果使用不同供应商的色谱柱，请使用深度可调的入口）。
6. 检测器的时间常数应缩小至0.2 s以下。

d. 沃特世小粒径(3.5 μ m)色谱柱 - 快速色谱分离

填充3.5 μ m颗粒的沃特世色谱柱可实现更快速、更高效分离，而不会缩短色谱柱使用寿命。本节将介绍使用填充3.5 μ m颗粒的色谱柱进行分离时要考虑的5个参数。

注：为保留填料，填充3.5 μ m颗粒的色谱柱出口筛板较小。请勿反冲此类色谱柱。

1. 流速 - 3.5 μ m色谱柱的理想流速高于5 μ m色谱柱。使用此类色谱柱可以提高效率和缩短分析时间。但是，较高的流速会导致柱压增加。请使用适合系统的流速。
2. 柱压 - 3.5 μ m色谱柱的柱压高于同尺寸的5 μ m色谱柱。缩短色谱柱长度可抵消柱压增量，并缩短分析时间。
3. 温度 - 使用较高的温度可降低因粒径较小而产生的柱压（请参阅色谱柱维护和使用手册第III.f.节中建议的温度）。
4. 采样速率 - 请使用大约每秒10个数据点的采样速率。
5. 检测器时间常数 - 请使用0.1 s作为时间常数，以实现快速分析。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

沃特世公司。Waters、The Science of What's Possible、Symmetry、SymmetryShield、Symmetry300、Oasis和SepPak是沃特世公司的商标。Acrodisc是Pall Corporation的商标。PEEK是安捷伦科技公司的商标。SLIPFREE是Thermo Corporation的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2018 Waters Corporation. 中国印刷。2018年7月 WAT047278 修订版8 IH-PDF



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 - 2964 1800

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