Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

XBridge色谱柱

非常感谢您选择Waters XBridge™色谱柱。XBridge™填料设计精良，能在酸性和碱性流动相条件下获得良好的峰形、达到高柱效并展现出色的稳定性。所有XBridge™填料均由通过cGMP和ISO 9001:2000认证的工厂使用超纯试剂生产。每批XBridge™填料都采用酸性、碱性和中性分析物进行了色谱测试，结果均符合严格的合格标准，可确保色谱柱具有出众的重现性能。每根色谱柱都经过单独测试，并随附性能测试色谱图以及合格证书。

目录

I. 入门指南
- a.色谱柱安装
- b.色谱柱平衡
- c.初始柱效测定

II. 色谱柱使用
- a. 保护柱
- b. 样品制备
- c. pH操作限值
- d. 溶剂
- e. 压力
- f. 温度

III. 放大/缩小等度方法

IV. 故障排除

V. 色谱柱清洗、再生和储存
- a. 清洗与再生
- b. 储存

VI. 将色谱柱连接到HPLC
- a. 色谱柱接头和系统管路注意事项
- b. 测量系统谱带展宽体积和系统方差
- c. 测量梯度延迟（或延迟体积）

VII. 其他信息
- a. 使用窄径（3.0 mm内径）色谱柱
- b. 谱带展宽体积对2.1 mm内径色谱柱性能的影响
- c. 未优化和优化LC/MS/MS系统对比：
  系统配置更改建议
- d. 沃特世小粒径(2.5 µm)色谱柱 - 快速色谱分离
- e. XBridge HILIC色谱柱入门
- f. XBridge Amide色谱柱入门

I. 入门指南

每根XBridge™色谱柱都附带一份COA报告和一幅性能测试色谱图。COA报告为XBridge™色谱柱中所用的填料批次所特有，包括批号、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。性能测试色谱图提供每根色谱柱的以下信息：批号、色谱柱序列号、USP理论塔板数、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。

a. 色谱柱安装

注：下述步骤给出的流速适用于粒径5 µm、内径4.6 mm的典型色谱柱。用户可根据所安装XBridge™色谱柱的内径、柱长、粒径和柱压相应地提高或降低流速。请参阅"放大/缩小等度分离方法"部分，了解色谱柱内径和/或柱长改变时的流速计算方法。有关连接HPLC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。色谱柱识别标记上的箭头指示了正确的溶剂流向。
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。这样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。

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），初始柱平衡时间也可能较长。

b. 色谱柱平衡

XBridge™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。）

对于XBridge HILIC色谱柱，用50倍柱体积的50:50乙腈:水溶液进行冲洗。对于XBridge HILIC Amide色谱柱，用50倍柱体积的60:40乙腈:水溶液进行冲洗。在首次进样之前，用20倍柱体积的流动相（初始条件）平衡色谱柱（请参阅表1中的色谱柱体积）。请参阅"XBridge HILIC色谱柱入门"或"XBridge HILIC Amide色谱柱入门"获取详细信息。

c. 初始柱效测定

1. 在开始使用色谱柱分析样品前先测量色谱柱的柱效，沃特世建议选用合适的待测物测试柱效，如采用色谱柱性能测试报告中的样品和条件(参见柱盒内的报告)。
2. 计算理论塔板数，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，需要定期做同样的测试以便追踪色谱柱的性能变化。由于不同仪器的管线连接、操作环境、系统电路、所使用的溶剂和试剂的质量、色谱柱的条件以及操作者的技术都有可能不同，因此再不同的HPLC系统上测试的结果可能会有一些差别。

表1：空色谱柱体积(mL)（乘以10得到冲洗溶剂体积）

	色谱柱内径(mm)								
色谱柱柱长(mm)	1.0	2.1	3.0	4.6	7.8	10	19	30	50
20	–	0.07	0.14	0.33	–	–	–	–	–
30	–	0.10	0.21	0.50	–	2.4	8.5	–	–
50	0.04	0.17	0.35	0.83	2.4	3.9	14	35	98
100	0.08	0.35	0.71	1.7	4.8	7.8	28	70	–
150	0.12	0.52	1.0	2.5	7.2	12	42	106	294
250	–	0.87	1.8	4.2	–	20	70	176	490

II. 色谱柱使用

为确保XBridge™色谱柱始终保持理想性能，请遵循以下原则：

a. 保护柱

在进样器和分析柱之间使用填料化学和颗粒大小都适合的沃特世保护柱。使用匹配的高性能保护柱，是保护分析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. 样品制备

1. 样品中的杂质往往会污染色谱柱。避免污染的一种方法是在分析之前，使用填充适用填料的Waters Oasis™固相萃取小柱/色谱柱或Sep-Pak™小柱净化样品。
2. 为获得理想峰形和灵敏度，优先选用运行分析时要用的流动相或比它更弱的流动相(有机改性剂含量更低)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。
4. 用0.2 µm过滤器过滤样品，去除颗粒物质。如果用于溶解样品的溶剂中包含有机改性剂（如，乙腈、甲醇等），请确保过滤器材料不溶于该溶剂。请联系过滤器生产商，了解有关过滤器的溶剂相容性问题。或者，可以考虑在8,000 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. 要进行亲水作用色谱(HILIC)分离的样品必须用100%有机溶剂制备（例如乙腈）。请参阅"XBridge HILIC色谱柱入门"或"XBridge Amide色谱柱入门"获取详细信息。

c. pH操作限值

表2列出了XBridge™色谱柱的推荐pH操作限值。表3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。

表2：环境温度下XBridge™色谱柱的推荐pH和柱温限值

色谱柱名称	粒径	孔径	表面积	pH限值	柱温限值		表面	载碳量
					低pH	高pH		
XBridge C_{18}	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m^2/g	1-12	80 °C	60 °C	3.1 µmol/㎡	18%
XBridge C_8	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m^2/g	1-12	60 °C	60 °C	3.1 µmol/㎡	13%
XBridge Phenyl	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m^2/g	1-12	80 °C	60 °C	3.0 µmol/㎡	15%
XBridge Shield RP18	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m^2/g	2-11	50 °C	45 °C	3.2 µmol/㎡	17%
XBridge HILIC	2.5, 3.5, 5 µm	130Å	185 m^2/g	1-9	45 °C	45 °C	-	-
XBridge Amide	3.5 µm	130Å	185 m^2/g	2-11	90 °C	90 °C	7.5 µmol/㎡	12%

表3：在pH 1-12范围内使用XBridge™色谱柱时的推荐缓冲液

添加剂/缓冲液	pKa	缓冲范围（±1个pH单位）	挥发性	能否用于质谱	注释
TFA	0.3		挥发性	是	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	是	与醋酸铵盐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	是	与甲酸铵盐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_4CH_2COOH)	4.76	3.76 – 5.76	挥发性	是	在1-10 mM范围内使用。请注意，其钠盐或钾盐无挥发性。
甲酸盐(NH_4COOH)	3.75	2.75 – 4.75	挥发性	是	在1-10 mM范围内使用。请注意，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	否	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	是	通常在10 mM或更低浓度下使用。
氨水(NH_4OH) 碳酸氢铵	9.2 10.3 (HCO_3^-) 9.2 (NH_4)	8.2 – 10.2 8.2 – 11.3	挥发性 挥发性	是 是	在5-10 mM范围内使用（进行MS分析时，需保持源温度 > 150 ℃）。 用氢氧化铵或醋酸调节pH值。pH=10时具有良好的缓冲容量 注意：请使用碳酸氢铵(NH_4HCO_3)，而不是碳酸铵($(NH_4)_2CO_3$)
(醋酸)铵	9.2	8.2 – 10.2	挥发性	是	在1-10 mM范围内使用。
(甲酸)铵	9.2	8.2 – 10.2	挥发性	是	在1-10 mM范围内使用。
硼酸盐	9.2	8.2 – 10.2	非挥发性	否	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	否	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	否	两性离子缓冲液，相较于硼酸盐缓冲液更有助于延长柱寿命。
1-甲基哌啶	10.2	9.3 – 11.3	挥发性	是	在1-10 mM范围内使用。
CAPS	10.4	9.5 – 11.5	非挥发性	否	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（醋酸盐）	10.7	9.7 – 11.7	挥发性	是	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	是	温和型缓冲液，可延长柱寿命。

注：在pH、温度和/或压力限值下运行会缩短色谱柱使用寿命。

d. 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。所有水性缓冲液使用前都必须过滤。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，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，避免泵和检测器中形成气泡。沃特世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. 柱压

XBridge™色谱柱可承受的压力上限为6,000 psi（400 bar或40 Mpa），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 psi-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，XBridge色谱柱的推荐操作温度范围为20 ˚C-80 ˚C（XBridge Amide色谱柱温度上限为90 ˚C）。但是，任何高于室温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。在HILIC分析中，XBridge 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"XBridge Amide入门"部分的推荐条件）。推荐的pH和温度限值见表2。

III. 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：

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

$$上样量_2 = 上样量_1(r_2/r_1)^2 (L_2/L_1)$$

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

其中：
r = 色谱柱半径
F = 流速
L = 色谱柱长度
1 = 原始或参比色谱
2 = 新色谱柱

IV. 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。请参阅本《维护和使用手册》中的"色谱柱清洗、再生和储存"部分。有关色谱柱故障排除的信息，可参阅HPLC Columns Theory, Technology and Practice（《HPLC色谱柱理论、技术与实践》），U.D.Neue (Wiley-VCH, 1997)；Waters HPLC Troubleshooting Guide（《沃特世HPLC故障排除指南》，文献编号：720000181EN）；或者访问沃特世公司网站(www.waters.com)观看相关研讨会获取信息。

V. 色谱柱清洗、再生和储存

a. 清洗与再生

如果发生峰形改变、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4）。使用表4中列出的各种HPLC级溶剂，以20倍柱体积（例如对于4.6 x 250 mm色谱柱，使用80 mL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不理想，请致电当地沃特世办事处获取更多支持。用50:50乙腈/水冲洗XBridge 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/水灌注色谱柱。

要清洗XBridge Amide色谱柱中的极性污染物，请运行25 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4：清洗与再生的顺序或供选方案

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：运行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(CH3CN)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溶液，以避免缓冲液沉淀。

b. 储存

如果XBridge反相色谱柱和XBridge Amide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。色谱柱在高温和/或pH限值条件下使用后，应立即保存于100%乙腈中，以便尽可能延长色谱柱使用寿命。切勿将色谱柱保存在高水相（有机相 < 20%）流动相中，因为这样会滋生细菌。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阅表1）的HPLC级水冲洗色谱柱，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，色谱柱或系统中可能会出现缓冲盐沉淀。先用100%水梯度冲洗至100%乙腈，冲洗掉XBridge Amide色谱柱中所有的水性溶液，然后用100%乙腈进行储存。将色谱柱完全密封，防止柱床因溶剂蒸发而变干。如果XBridge HILIC色谱柱需要存放四天以上，应将其保存于95:5乙腈/水中。切勿使用缓冲溶液保存色谱柱。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阅表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，并且用高比例水相梯度冲洗至100%乙腈，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稍微有点长。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稍微有点长。

VI. 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。

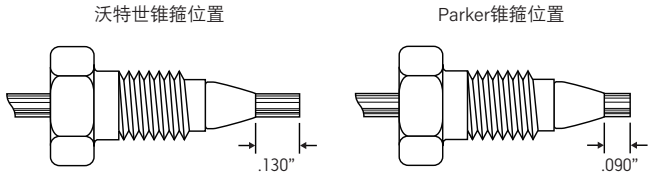
1. 正确连接接入和接出色谱柱的1/16英寸外径不锈钢管路对于获得高质量色谱结果至关重要。
2. 使用标准不锈钢压力螺母接头时，确保其正确匹配1/16英寸外径不锈钢管路非常重要。拧紧或拧松压力螺母时，将5/16英寸扳手置于压力螺母上，并将3/8英寸扳手置于色谱柱末端接头的六角头上。

注：在这个过程中，如果将任一扳手放在色谱柱管路的搭扳手平面上，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，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了正确的溶剂流向。

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。为获得无死体积连接，管路必须接触到色谱柱末端接头的底部。要认识到由死体积造成的色谱柱额外峰展宽可能导致本应成功的分离失败，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。

图1：沃特世和Parker锥箍类型

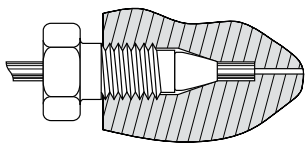


由于缺乏行业标准，不同色谱柱制造商使用了不同类型的色谱柱接头。

如果色谱柱末端接头的类型与现有的管路锥箍设置不匹配，则可能对色谱分离产生负面影响。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。XBridge™色谱柱配备沃特世末端接头，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XBridge™色谱柱前必须重置锥箍深度以获得理想性能。

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。

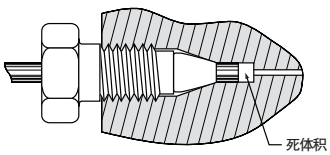
图2：正确的管路/色谱柱连接



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，则可能出现这种情况（图3）。

注：将带有Parker锥箍的管路连接到沃特世色谱柱时，会出现死体积。

图3：Parker锥箍安装在沃特世末端接头上



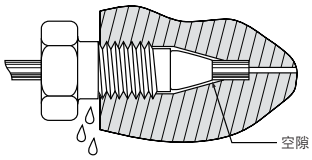
只有一种方法可以解决这个问题：切断装有锥箍的管路末端，在管路上安装新的锥箍并重新连接。

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。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，会导致渗漏。

图4：沃特世锥箍安装在Parker末端接头上

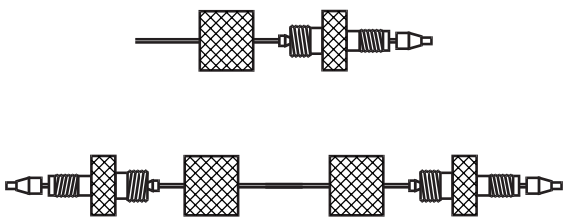


有两种方法可以解决这个问题：

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（沃特世P/N：PSL613315）替换常规压力螺母接头。另一种方法是使用Keystone, Inc. SLIPFREE®接头，从而确保连接始终正确。手紧式SLIPFREE®接头可自动调节以匹配各种压力螺母型接头，无需使用工具（图5）。

图5：单件式和两件式SLIPFREE®接头



SLIPFREE®接头的功能：

- 将管路推进末端接头，确保形成无死体积连接
- 接头安装在管路上
- 多种管路内径和长度可选
- 可用手拧紧至10,000 psi - 无需使用扳手
- 可再调整以适用于所有色谱柱末端接头
- 兼容所有市售末端接头
- 特殊设计可使管路保持功能和密封功能互不影响

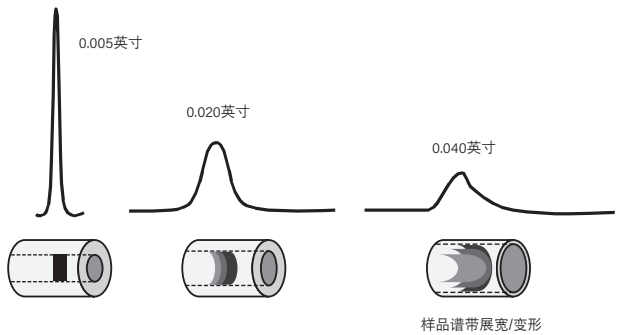
表5：SLIPFREE®接头的沃特世P/N

SLIPFREE®接头类型	管路内径		
管路长度	0.005英寸	0.010英寸	0.020英寸
单件式，6 cm	PSL 618000	PSL 618006	PSL 618012
单件式，10 cm	PSL 618002	PSL 618008	PSL 618014
单件式，20 cm	PSL 618004	PSL 618010	PSL 618016
两件式， 6 cm	PSL 618001	PSL 618007	PSL 618013
两件式，10 cm	PSL 618003	PSL 618009	PSL 618015
两件式，20 cm	PSL 618005	PSL 618001	PSL 618017

尽可能减小谱带展宽

图6显示了管路内径对系统谱带展宽以及峰形的影响。由图可见，管路内径较大会引起峰展宽和灵敏度降低。

图6：连接管路对系统的影响



b. 测量系统谱带展宽体积和系统方差

该测试应在配备单一波长UV检测器（而非光电二极管阵列检测器(PDA)）的HPLC系统上进行。

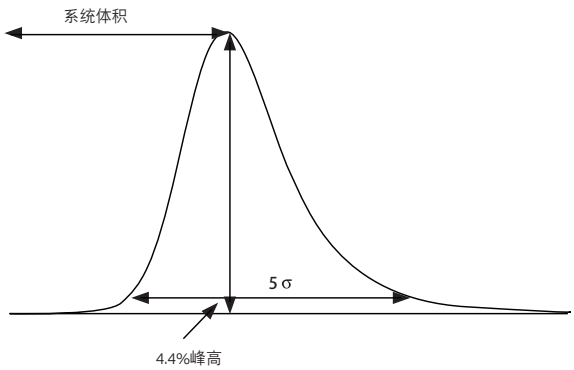
1. 取下色谱柱，换上一个零死体积的两通。
2. 将流速设置为1 mL/min。
3. 以流动相稀释测试混合物（可使用含有尿嘧啶、羟苯乙酯和羟苯丙酯的系统启动测试混合物；沃特世P/N：WAT034544），使其检测灵敏度达到0.5 AUFS-1.0 AUFS。
4. 进样此溶液2-5 µL。

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 μL/1 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



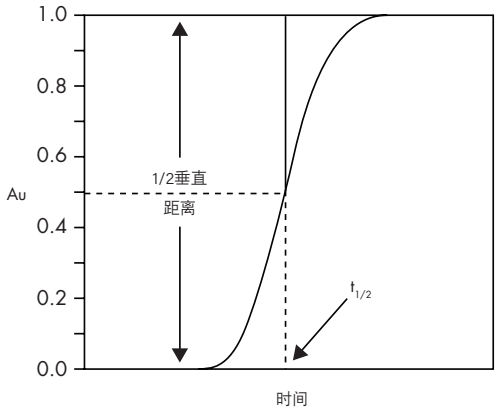
典型HPLC系统的谱带展宽体积不应超过100 μL ± 30 μL（或方差不超过400 μL^2 ± 36 μL^2）。
对于使用微径柱（内径2.1 mm）系统的谱带展宽体积不应超过20-40 μL（或方差不超过16 μL^2-64 μL^2）。

c. 测量梯度延迟（或延迟体积）

要成功转换梯度方法，必须采用相同方法测定两个HPLC系统的梯度延迟体积。下述步骤介绍了一种测定梯度延迟体积的方法。

1. 取下色谱柱，换上一个零死体积的两通。
2. 准备流动相A（纯溶剂，例如甲醇）和流动相B（流动相A + UV吸光样品，例如0.1% (v/v)丙酮的甲醇溶液）。
3. 用流动相A平衡系统，直至基线稳定。
4. 设定检测器波长，以待测物的最大吸收为准（使用丙酮时设为265 nm）。
5. 流速设为2ml/min，编辑一个10分钟内0~100%B的线性梯度（具体的条件可以适当调整，但需要保证梯度体积不低于20ml），然后保持100%B，采集数据。

图8：测定梯度延迟体积



6. 测定驻留时间时，具体方法为：首先找到梯度中点($t_{1/2}$)（初始与最终等度区段之间的垂直距离一半处对应的时间，如图8所示）。
7. 然后从梯度中点($t_{1/2}$)减去梯度时间的一半(1/2 t_g)（在本例中，10 min/2 = 5 min），即可得到驻留时间(t_D)。
8. 用驻留时间(t_D)乘以流速(F)，将其转换为延迟体积(V_D)。

$$\text{延迟体积} V_D = (t_{1/2} - 1/2\ t_g) \times F$$

快速梯度方法的延迟体积应小于1 mL。如果梯度延迟体积大于1 mL，请参阅"系统配置更改建议"部分，了解如何减小系统体积。

VII. 其他信息

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。如果不恰当地更改系统配置，会因系统谱带展宽体积过大而导致峰展宽，随着峰体积减小，这会对峰宽造成严重影响。

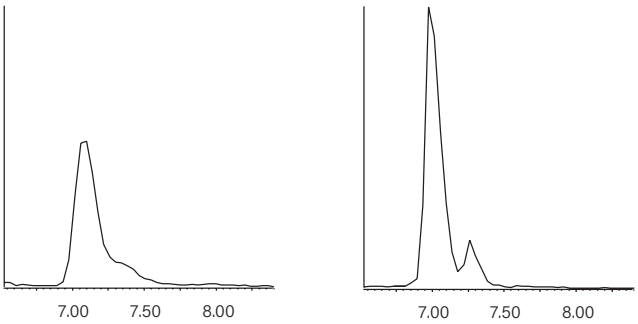
b. 谱带展宽体积对2.1 mm内径色谱柱性能的影响

谱带展宽体积为70 µL的系统： 塔板数10,000
谱带展宽体积为130 µL的系统： 塔板数8,000（相同色谱柱）

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。优化措施包括保证锥箍深度正确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，代谢物测定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



未优化的LC/MS/MS系统　　优化的系统

c. 未优化和优化的LC/MS/MS系统对比：系统配置更改建议

1. 将微内径检测器流通池与2.1 mm内径色谱柱配合使用。

注：为减小谱带展宽体积而缩短流通池光程时，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. 对于标准系统，其余连接请使用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。
4. 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）。
5. 检测器的时间常数应减小到0.2 s以下。

d. 沃特世小粒径(2.5 µm)色谱柱 - 快速色谱分离

填充2.5 µm颗粒的沃特世色谱柱可实现更快速、更高效的分离，而不会缩短色谱柱使用寿命。本节将介绍使用填充2.5 µm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2.5 µm颗粒的色谱柱出口筛板较小。请勿反冲此类色谱柱。

1. 流速 - 2.5 µm色谱柱的理想流速高于5 µm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。

注：请使用适合系统的流速。

2. 柱压 - 2.5 µm颗粒色谱柱的柱压高于同尺寸的5 µm颗粒色谱柱。沃特世建议缩短色谱柱长度，以抵消柱压增量并缩短分析时间。
3. 温度 - 采用较高的柱温可降低因粒径较小而产生的柱压。XBridge™色谱柱的推荐温度范围是20 ˚C-60 ˚C。有关在高温条件下使用XBridge™色谱柱的详细信息，请参阅"色谱柱使用"部分。
4. 采样速率 - 请使用大约每秒10个数据点或更高的采样速率。为达到理想的重现性，较早洗脱的目标峰必需至少采集20个数据点。
5. 检测器时间常数 - 对于快速分析，请使用0.1 s或更短的时间作为时间常数。

e. XBridge HILIC色谱柱入门

1. 由于XBridge HILIC色谱柱无键合相，因此pH操作范围为1-9，操作温度可达45 ˚C。
2. 和其他LC色谱柱一样，在pH、压力和温度限值条件下使用色谱柱会缩短色谱柱使用寿命。

色谱柱平衡

1. 收到色谱柱后首次使用时，请用50倍柱体积的50%:50%乙腈/水溶液冲洗色谱柱。

2. 在首次进样之前，用20倍柱体积的初始流动相条件平衡色谱柱。
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。

关于流动相的注意事项

1. 流动相或梯度中应始终保持至少5%的极性溶剂（例如5%水、5%甲醇或2%水/3%甲醇等）。这样可以确保XBridge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沉淀，但可以使用磷酸盐。
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，流动相/梯度中的缓冲液浓度应保持至少10 mM。

进样溶剂

1. 如果可能，应使用初始流动相条件中的有机溶剂（纯溶剂）作为进样溶剂。必须去除或尽可能减少水含量。请选择弱HILIC溶剂，例如乙腈、异丙醇、甲醇等。
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。如果溶解性仍不理想，可以添加0.2%甲酸。
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. 相较于Atlantis™ HILIC硅基HPLC色谱柱，XBridge 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颗粒表面的硅烷醇残基浓度更低。
2. 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。
3. 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/异丙醇/水性缓冲液的等度条件。
4. 可使用诸如甲醇、乙醇或异丙醇之类的极性溶剂代替水，以增强保留性能。

f. XBridge Amide色谱柱入门

操作范围

1. XBridge 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 ℃。
2. 和其他LC色谱柱一样，在pH、压力和温度限值条件下使用色谱柱会缩短色谱柱使用寿命。

色谱柱平衡

1. 收到色谱柱后首次使用时，请用50倍柱体积的60%:40%乙腈/水溶液（或初始条件）冲洗色谱柱。
2. 在首次进样之前，用20倍柱体积的初始流动相条件平衡色谱柱。
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5%的极性溶剂（例如5%水、5%甲醇或2%水/3%甲醇等）。
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. 水性溶液浓度大于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水性溶液清洗步骤。
4.. 避免在HILIC流动相中使用磷酸盐缓冲液以防止出现沉淀，但可以使用磷酸盐。

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。
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性溶剂。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/水性缓冲液的等度条件。
2. 可用诸如甲醇、丙酮或异丙醇的极性溶剂代替水以增强保留性能。

分离糖类的技巧

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"XBridge Amide色谱柱入门"部分的一般建议。
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（端基异构体）分离，这是一种不良分离。
4. 升高温度和pH值可使端基异构体坍缩成一个峰：
   a. 在35 ℃下使用高pH（0.2%三乙胺(TEA)或0.1%氢氧化铵(NH4OH)）和/或
   b. 在高温下(> 80 ℃)使用0.05% TEA (>80 ℃)
5. 分离还原糖（例如果糖、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（端基异构体分离）：
   a. 请以慢流速运行，促进端基异构体峰坍缩。
   b. 色谱柱较长时，可采用较高的流速。和所有LC分离一样，理想流速应通过实验来确定。
   c. 在水相和有机流动相储液瓶中加入相同浓度的三乙胺(TEA)或氢氧化铵(NH4OH)改性剂。
   d. 使用XBridge Amide色谱柱对单糖和/或双糖进行HPLC分离时，典型的等度条件如下：
      i. 75%乙腈(ACN)，含0.2% TEA，35 ℃
      ii. 77%丙酮，含0.05% TEA，85 ℃
   e. 使用XBridge Amide色谱柱对更复杂的糖类混合物（例如多糖）进行HPLC分离时，典型的梯度条件如下（流动相A和B中都需要添加TEA改性剂）：
      i. 梯度从80% ACN变为50% ACN（含0.2% TEA），35 ℃
      ii. 从80%丙酮变为55%丙酮（含0.05% TEA），85 ℃
   f. 使用XBridge Amide色谱柱对单糖和双糖进行HPLC/MS分离时，典型的等度条件如下：
      i. 75%乙腈 +0.1% NH_4OH，35 ℃

g. 使用XBridge Amide色谱柱对更复杂的糖类混合物（例如多糖）进行HPLC/MS分离时，典型的梯度条件如下（向水性和有机流动相储液瓶中添加NH_4OH改性剂）：

i. 梯度从75% ACN变为45% ACN（含0.1% NH_4OH），35 ℃

6. 分析更复杂的样品混合物可能需要使用梯度条件和/或更长的色谱柱。

8. 含糖样品的典型样品制备建议如下：

a. 液体样品

i. 使用50:50乙腈/水稀释

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乙腈/水，机械混合均匀

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制备步骤（例如固相萃取(SPE)）。

e. 请考虑使用保护柱保护色谱柱。

奥地利和欧洲出口（中南欧、东欧、独联体和中东地区）43 1 877 18 07，澳大利亚61 2 9933 1777，比利时32 2 726 1000，巴西55 11 4134 3788，
加拿大1 800 252 4752，中国86 21 6156 2666，捷克共和国420 2 617 11384，丹麦45 46 59 8080，芬兰358 9 5659 6288，法国33 1 30 48 72 00，
德国49 6196 400 600，中国香港852 2964 1800，匈牙利36 1 350 5086，印度和印度次大陆91 80 2837 1900，爱尔兰353 1 448 1500，意大利39 02 265 0983，
日本81 3 3471 7191，韩国82 2 6300 4800，墨西哥52 55 52 00 1860，荷兰31 76 508 7200，挪威47 6 384 6050，波兰48 22 101 5900，波多黎各1 787 747 8445，
俄罗斯/独联体7 495 727 4490/290 9737，新加坡65 6593 7100，西班牙34 93 600 9300，瑞典46 8 555 115 00，瑞士41 56 676 7000，中国台湾886 2 2501 9928，
英国44 208 238 6100，所有其他国家/地区：美国沃特世公司1 508 478 2000/1 800 252 4752

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、The Science of What's Possible、Oasis、SepPak和XBridge是沃特世公司的商标。
Acrodisc是Pall Life Sciences的商标。SLIPFREE是Keystone, Inc.的商标。

©2012 Waters Corporation. 2012年6月 720001366ZH 修订版7 VW-PDF

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