

# XSelect高强度硅胶颗粒(HSS) HPLC色谱柱

## 目录

- I. 简介
- II. 将色谱柱连接到HPLC系统
  - a. 色谱柱连接
  - b. 色谱柱接头和系统管路注意事项
  - c. 尽可能减小谱带展宽
  - d. 测量系统谱带展宽体积
  - e. 测量梯度延迟体积
- III. 沃特世小粒径(3.5 μm)色谱柱 - 快速色谱分离
- IV. 色谱柱平衡
- V. 色谱柱安装程序
- VI. 色谱柱性能验证
- VII. 初始柱效测定
- VIII. 色谱柱使用
  - a. 保护柱
  - b. 样品制备
  - c. 推荐pH范围
  - d. 溶剂
  - e. 压力
  - f. 温度
  - g. 放大/缩小等度方法
- IX. 色谱柱清洗、再生和储存
  - a. 清洗与再生
  - b. 储存
- X. 故障排除

## I. 简介

感谢您选择XSelect™高强度硅胶颗粒(HSS) HPLC色谱柱。XSelect HSS HPLC色谱柱采用超纯试剂生产，旨在控制最终产品的化学键合相组成和纯度。此外，XSelect HSS HPLC色谱柱由通过cGMP和ISO 9001:2000认证的工厂生产，各生产步骤均符合严格的容差要求。每根色谱柱都经过单独测试，随附COA报告和性能色谱图。

XSelect HSS HPLC色谱柱采用与ACQUITY UPLC™ HSS色谱柱相同的颗粒技术和填料，因此用户可轻松转换HPLC与UPLC™分离方法。



## II. 将色谱柱连接到HPLC系统

### a. 色谱柱连接

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. 色谱柱识别标记上的箭头指示了正确的溶剂流向。
3. 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。

**注意：**在这个过程中，如果将任一扳手放在色谱柱的搭扳手平面上，会导致末端接头松动渗漏。压力螺母未紧固或使用磨损的锥箍会导致溶剂渗漏。请仔细检查所有色谱柱连接是否存在渗漏，避免溶剂暴露危险及与此相关的危险（包括健康风险和电气连接风险）。

4. 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。

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。

### b. 色谱柱接头和系统管路注意事项

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。XSelect HSS HPLC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XSelect HSS HPLC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1：沃特世和Parker锥箍类型

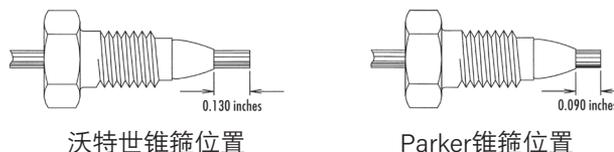
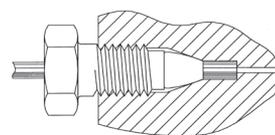


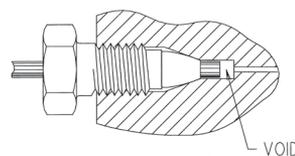
图2：正确的管路/色谱柱连接

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。



**注意：**如果将Parker锥箍连接至沃特世末端接头，可能会出现死体积（图3）。这会大幅降低柱效并导致峰畸变。

图3：Parker锥箍安装在沃特世末端接头上

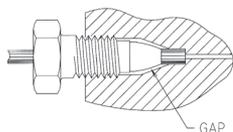


解决方法：切断装有锥箍的管路末端，在管路上安装新的锥箍并重新连接。在拧紧螺钉前，请确保管路接触到色谱柱末端接头的底部。

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）。

**注意：**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SLIPFREE®接头, 从而确保连接正确。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

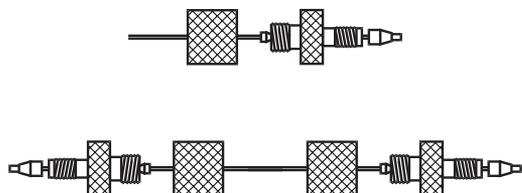


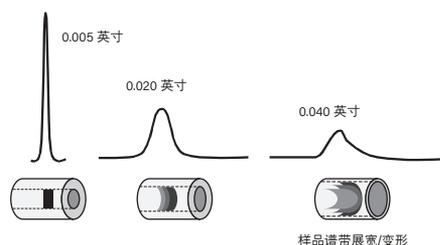
表1.SLIPFREE接头的沃特世P/N

SLIPFREE 类型 和管路内径	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

### c. 尽可能减小谱带展宽

管路内径会影响系统谱带展宽和峰形。管路内径增大会导致峰过宽和灵敏度降低 (图6)。

图6: 连接管路对系统的影响

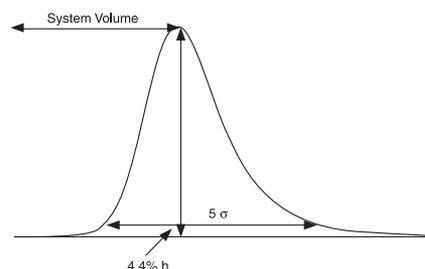


### d. 测量系统谱带展宽体积

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至5 μL。
5. 采用5-Sigma法测量4.4%峰高处的峰宽: 谱带展宽(μL) = 峰宽(min) x 流速(μL/min) = 0.1 min x 1000 μL/min = 100 μL

图7: 采用5-Sigma法测定系统谱带展宽体积

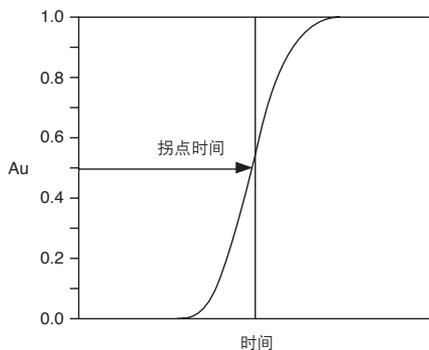


典型HPLC系统的谱带展宽体积应为 $100 \mu\text{L} \pm 30 \mu\text{L}$ 。

#### e. 测量梯度延迟体积

1. 取下色谱柱，换上一个零死体积的两通。
2. 准备洗脱溶液A（纯溶剂，例如甲醇）和洗脱溶液B（溶剂 + 样品，例如5.6 mg/mL对羟基苯甲酸丙酯的甲醇溶液）。
3. 用洗脱溶液A平衡系统，直至基线稳定。
4. 切换为100%洗脱溶液B。
5. 记录该步骤得到的半峰高并测定延迟体积（图8）。

图8: 测定延迟体积



延迟体积应小于1 mL。

### III. 沃特世小粒径(3.5 $\mu\text{m}$ )色谱柱 - 快速色谱分离

填充3.5  $\mu\text{m}$ 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3.5  $\mu\text{m}$ 颗粒的色谱柱进行分离时要考虑的5个参数。

**注：**3.5  $\mu\text{m}$ 颗粒色谱柱出口处筛板的孔径小于入口处，目的是保留色谱填料。请勿反冲此类色谱柱。

1. 流速 - 3.5  $\mu\text{m}$ 颗粒色谱柱的理想流速高于同尺寸的5  $\mu\text{m}$ 色谱柱，因此可用于提高柱效和缩短分析时间。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 - 3.5  $\mu\text{m}$ 颗粒色谱柱的柱压高于同尺寸的5  $\mu\text{m}$ 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。XSelect HSS HPLC色谱柱的推荐温度范围是20 °C-45 °C。有关在高温条件下使用XSelect HSS HPLC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个数据点的采样速率。
5. 检测器时间常数 - 对于快速分析，请使用0.1 s作为时间常数。

### IV. 色谱柱平衡

XSelect HSS HPLC色谱柱出厂时保存于100%乙腈中。改用新溶剂前，务必确保溶剂的兼容性。请用至少10倍柱体积的流动相平衡色谱柱（请参阅表2中的标准色谱柱体积）。

表2.标准色谱柱体积(mL)（乘以10得到平衡流动相体积）

色谱柱长	色谱柱体积(mL)			
	色谱柱内径(mm)			
	2.1	3.0	4.6	10
20 mm	.10	.21	.50	2.4
30 mm	.11	2.4	0.5	-
50 mm	.17	.35	.83	4.0
75 mm	.26	.53	1.3	6.0
100 mm	.35	.71	1.7	8.0
150 mm	.52	1.1	2.5	12
250 mm	.87	1.8	4.2	20

## V. 色谱柱安装程序

注：下述步骤中给出的流速适用于标准的4.6 mm内径色谱柱。用户可根据所安装XSelect HSS HPLC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。

1. 灌注泵系统，然后将色谱柱的入口端连接至进样器出口。
2. 将泵流速设置为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，然后将色谱柱连接至检测器。这能防止空气进入检测器，使系统更快达到基线平衡。

注意：请仔细检查色谱柱连接是否存在渗漏，避免溶剂暴露危险及与此相关的危险（包括健康风险和电气连接风险）。

4. 更换流动相后，请以0.1 mL/min的增量将新流动相的流速从0.0 mL/min逐渐增加至1.0 mL/min。
5. 一旦柱压和基线达到稳定状态，色谱柱即可使用（或已达到平衡）。

注：如果流动相中的添加剂浓度较低（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。

## VI. 色谱柱性能验证

每根XSelect HSS HPLC色谱柱都附带一份批次COA报告和一幅性能测试色谱图。COA报告为每批填料所特有，包括批号、未键合颗粒和键合颗粒分析结果，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、容量因子以及色谱分析结果和条件。这些数据应妥善保存，以备将来参考。

## VII. 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。

注：如果采用第1)条中的分析物进行柱效测试，那么您所在实验室在等度条件下测得的柱效可能低于沃特世“性能测试色谱图”中所示的柱效。这种情况是正常的。沃特世对等度色谱柱测试系统进行了改造，尽可能减小了系统体积。目的是更严格地测试色谱柱填充质量，保证填充柱品质。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。

## VIII. 色谱柱使用

注意：色谱柱的柱压可能会因溶剂、样品或泵密封件导致的颗粒积聚而随时间升高，从而引发系统停机或色谱柱连接处渗漏。“脏”样品中的污染物在色谱柱入口处积聚可能导致分离度降低或质谱仪中发生离子抑制，进而生成错误结果。

为确保XSelect HSS HPLC色谱柱和小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保护柱。为获得理想分析结果，在分离度显著降低或系统背压升高前应更换保护柱。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。

## b. 样品制备

1. 样品中的杂质往往会污染色谱柱。在分析之前，请使用填充适当填料的Waters Oasis™或Sep-Pak™固相萃取小柱/色谱柱净化样品。
2. 优先选用流动相或弱于流动相的溶剂（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，请确保样品和稀释剂可在流动相中混溶，以避免样品和/或稀释剂产生沉淀。
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，可以考虑在8000 rpm下离心样品溶液20 min，然后将上清液小心转移至适当的样品瓶中。

## c. 推荐pH范围

化学键合相	pH范围
XSelect HSS Cyano	2-8
XSelect HSS PFP	2-8
XSelect HSS T3	2-8
XSelect HSS C <sub>18</sub> SB	2-8
XSelect HSS C <sub>18</sub>	1-8

柱寿命将根据温度、使用的缓冲液类型和浓度而有所不同。表3列出了推荐和不推荐使用的缓冲液。开发方法时请参考此表。

**注意：**如果在pH范围上限或下限外加高温条件下运行，会缩短色谱柱使用寿命，并且/或者可能导致高柱压。

表3：在pH 1-7范围内使用HSS HPLC色谱柱时的推荐缓冲液

添加剂或缓冲液	pKa	缓冲液范围 (±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0.01%-0.1%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。
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。
甲酸盐 (NH <sub>4</sub> 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。
醋酸盐 (NH <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> 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	使用pH 7的磷酸盐会大幅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。推荐在缓冲液中加入至少5%的有机溶剂，以阻止细菌滋生。推荐使用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. 压力

XSelect HSS HPLC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，控制系统停机和渗漏风险，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，XSelect HSS HPLC色谱柱的推荐操作温度范围为20 °C-45 °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。应避免在高温外加pH限值条件下运行。

### g. 放大/缩小等度方法

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

$$\text{如果色谱柱内径和长度改变: } F_2 = F_1(r_2/r_1)^2$$

$$\text{或者: 上样量}_2 = \text{上样量}_1(r_2/r_1)^2(L_2/L_1)$$

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

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

## XIII. 色谱柱清洗、再生和储存

### a. 清洗与再生

如果压力突然升高或保留时间/分离度发生变化，说明色谱柱可能已被污染。

请使用纯有机溶剂冲洗色谱柱，去除非极性污染物。如果冲洗不能解决问题，可使用一系列极性递减的溶剂灌注色谱柱。例如，先从水切换为四氢呋喃，再切换为二氯甲烷。反转该灌注溶剂顺序，然后恢复标准流动相条件。

### 对于正相条件

XSelect HSS Cyano色谱柱既可用于反相分离，也可用于正相分离。色谱柱出厂时保存于乙腈中，可直接用于反相条件。如果要将色谱柱用于正相应用，则需要按照以下步骤活化色谱柱：

1. 用至少20倍柱体积的100%甲醇冲洗色谱柱，采用低流速以免LC系统超压。溶剂体积下限请参阅表2。
2. 用至少20倍柱体积的100%异丙醇冲洗色谱柱，采用低流速以免LC系统超压。溶剂体积下限请参阅表2。
3. 用至少20倍柱体积的100%二氯甲烷冲洗色谱柱，采用低流速以免LC系统超压。溶剂体积下限请参阅表2。
4. 采用预定的流动相条件冲洗色谱柱，直至基线稳定。

### b. 储存

如果色谱柱需要存放超过四天，应将其保存于100%乙腈中。切勿使用缓冲液脱液保存色谱柱。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阅表2）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，色谱柱内可能会出现缓冲盐沉淀。

将色谱柱完全密封，防止柱床因溶剂蒸发而变干。

**注：**如果色谱柱运行了含甲酸盐（如甲酸铵、甲酸等）的流动相，并且之后冲洗了色谱柱以去除缓冲液，那么在重新安装色谱柱后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。

### 对于正相应用：

如需在启动后迅速达到平衡，建议将XSelect HSS Cyano色谱柱保存于正相分离时常用的流动相中。将色谱柱完全密封，防止柱床因溶剂蒸发而变干。

## X. 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)或Waters HPLC Troubleshooting Guide（《沃特世HPLC故障排除指南》，文献编号：720000181EN）。



扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、XSelect、ACQUITY UPLC、UPLC、Sentry、Oasis、SepPak和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。SLIPFREE是Thermo Fisher Scientific, Inc的商标。Acrodisc是Pall Corporation的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2011 Waters Corporation. 中国印刷。2011年10月 720003994ZH 修订版B KK-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