

# ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil 色谱柱

## 目录

### I. 简介

### II. 入门指南

- a. 安全注意事项
- b. 色谱柱接头与安装
- c. eCord安装
- d. 色谱柱平衡
- e. 初始柱效测定

### III. 色谱柱使用

- a. 样品制备
- b. 溶剂
- c. 添加剂
- d. 压力
- e. 温度
- f. 峰展宽最小化

### IV. 故障排除

### V. 色谱柱的清洗、添加剂与储存

- a. 清洗
- b. 添加剂的影响
- c. 储存

### VI. 引入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

### VII. ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱系列

### I. 简介

感谢您选择ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil™色谱柱! ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil 色谱柱经过专门设计, 可充分发挥ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统的各种性能优势, 实现快速、稳定的手性分离。ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil 色谱柱专为ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统而设计, 可提高手性分离的选择性和速度, 缩短方法开发的时间。ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil 色谱柱由改良的多糖涂敷型固定相组成, 具有广谱手性选择性。多糖的高级结构具有特定的空间定向, 可通过优化选择的改性剂或手性选择剂影响手性选择性。

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil AMY1、CEL1和CEL2色谱柱填料互为补充, 且每种填料在分离手性化合物时都具有不同的保留特性。也可使用最有利于调整手性识别的共溶剂和添加剂混合物进一步提升选择性。这些色谱柱经设计能够以更高的分离度和更快的速度分离对映体、立体异构体、代谢物、降解产物和杂质。

 Trefoil™ Technology



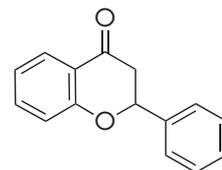
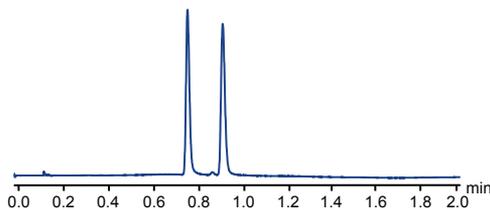
Acquity<sup>®</sup> UPC<sup>2</sup>™

用于手性分离的ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil 色谱柱

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil AMY 1

2.5 μm 色谱柱

直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)

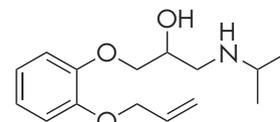
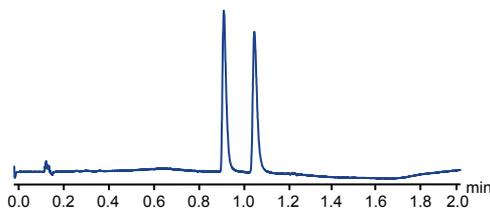


黄烷酮

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil CEL 1

2.5 μm 色谱柱

纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)

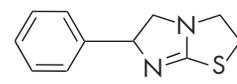
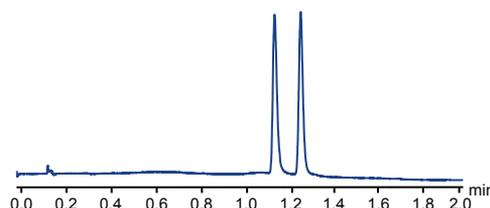


氧烯洛尔

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil CEL 2

2.5 μm 色谱柱

纤维素-三(3-氯-4-甲基苯基氨基甲酸酯)



四咪唑

手性分离均采用2 min筛查方法。

Trefoil色谱柱: 2.1 x 50 mm  
 共溶剂: 1:1 MeOH:IPA (含20 mM NH<sub>4</sub>OH)  
 梯度: 在1.5 min内从3%增加至60%, 达到60%时保持0.5 min  
 流速: 1.2 mL / min  
 温度: 40 °C  
 ABPR: 3,200 psi  
 UV检测波长: 220 nm

ACQUITY UPC<sup>2</sup>填料设计用于ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统, 并且由通过ISO认证的工厂采用超纯试剂制成。每批ACQUITY UPC<sup>2</sup>填料均经过测试并且其结果均在合格范围内, 确保色谱柱具有卓越的重现性能。每根色谱柱都经过单独测试, 并在eCord<sup>®</sup>智能芯片中提供有相应的性能谱图和批次分析证书。

ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱为配合ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统而设计并经过了专门测试。ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱只有在经过整体设计的ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统上运行时才能展现出最佳的色谱柱性能和优势, 这类系统和色谱柱的最初开发和设计目的就是用于共同运行。因此, 沃特世不建议将ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱用于除ACQUITY UPC<sup>2</sup>之外的任何其它系统。

## II. 入门指南

每根ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱均附带一份分析证书和一张性能测试谱图。分析证书给出每批填充材料的测试数据, 其中包含填料批号、物理特征、未键合颗粒和键合颗粒的分析结果, 以及SFC色谱批次检测结果。每根色谱柱的性能测试谱图则会提供以下信息: 填料批号、色谱柱序列号、USP理论塔板数、USP拖尾因子、容量因子以及在正相LC条件下的色谱条件。这些数据应妥善保存, 以备将来参考。

### a. 安全注意事项

SFC色谱柱在使用期间需要承受作为超临界流体的CO<sub>2</sub>及相关改性剂所带来的压力。主要的安全隐患是在常压下, CO<sub>2</sub>从液体减压成气体时因绝热冷却而引起的冻伤。请密切关注色谱柱或系统接头处出现的任何结霜现象。如果结霜, 则说明存在渗漏, 通常温度远低于0°C。

任何微小的渗漏都可能导致达到LEL(暴露下限)的情况。实验室使用二氧化碳(CO<sub>2</sub>)时应配置CO<sub>2</sub>和/或O<sub>2</sub>传感器。

## b. 色谱柱接头与安装

ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统采用经过专门设计可达到严格公差水平的管路和接头,能最大限度减少柱外体积。有关系统管路和接头的详细信息,请参阅《ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统操作员指南》(部件号720004226EN,可访问[www.waters.com/chemcu](http://www.waters.com/chemcu)下载)。

**注:** 可根据所安装ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱的柱内径、柱长、粒径以及背压相应地增加或降低流速。

1. 确保在进样前对共溶剂泵并进行了灌注,而且溶剂/改性剂供应充足。推荐使用纯度为99.97%(食品级)的CO<sub>2</sub>并使用高质量的色谱级溶剂(请参阅IIIb部分)。
2. 将色谱柱的入口和出口连接至UPC<sup>2</sup>系统。
3. 如果色谱柱中充满有溶剂,开始向色谱柱泵送CO<sub>2</sub>和改性剂时请使用低流速和背压(100 bar)设置。
4. 如果您发现色谱柱入口或出口处有结霜现象,请拧紧该侧的手紧接头或压紧螺母。如果仍出现结霜,请关闭CO<sub>2</sub>并排空系统的气体。在断开色谱柱入口或出口以查找并排除渗漏问题之前,应使色谱柱充分减压。

## c. eCord安装

eCord按钮应当安装在柱温箱模块的侧面。eCord按钮经过磁化处理,无需特定的方向。

## d. 色谱柱平衡

ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱发货时为干柱状态。使用前,请用至少10倍柱体积的流动相平衡色谱柱(请参见表2中的空色谱柱体积列表)。热平衡和化学平衡对色谱而言同样重要。为防止出现温度差异,请确保流动相在进入色谱柱之前经过了预加热处理。可启用UPC<sup>2</sup>®仪器上的主动预加热功能实现此目的。

## e. 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,将合适的分析物溶于极性较弱的进样溶剂中,防止进样溶剂强极性效应导致的峰变形(请参阅IIIb部分)。推荐使用沃特世质量控制标准品(QCRM)(部件号186007950),它含有专为ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil和Torus色谱柱精心挑选的混合标准品。更多详细信息,请参阅《ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱手册》(文献编号720004275ZH)。

ACQUITY UPC <sup>2</sup> 质量控制标准品(QCRM)	
目标用途	内容物
为手性和非手性模式提供合相色谱性能信息	1. 0.50 mg/mL (+/-) 反式-二苯乙烯氧化物
	2. 0.50 mg/mL 胸腺嘧啶
	3. 0.50 mg/mL 磺胺甲恶唑
	4. 0.50 mg/mL 磺胺甲二唑
	溶于1 mL 75:25 ACN:MeOH溶液中

2. 测定理论塔板数(N),并将该值作为定期对比的基准值。
3. 以预定的时间间隔进行重复测试,以跟踪色谱柱性能随时间的变化情况(如果是在两台不同的ACQUITY UPC<sup>2</sup>系统上进行性能测试,测试结果可能会有微小差异,这可能是由接头质量、运行环境、系统电子设备、试剂质量以及色谱柱条件等导致)。

空色谱柱体积 (mL)	色谱柱内径 (mm)	
色谱柱柱长	2.1 mm	3.0 mm
50 mm	0.2	0.4
150 mm	0.5	1.0

表1. 空色谱柱体积(mL)(冲洗溶剂体积需乘以10)。

## III. 色谱柱使用

为了确保ACQUITY UPC<sup>2</sup>色谱柱始终保持优良性能，请遵循以下原则：

### a. 样品制备

1. 样品中的杂质通常会污染色谱柱。沃特世提供有固相萃取 (SPE) 和超临界流体萃取 (SFE) 产品。对于SPE，在分析前请使用合适填料填充的Oasis<sup>®</sup>固相萃取小柱/色谱柱或Sep-Pak<sup>®</sup>小柱进行样品净化。有关详细信息，请访问[www.waters.com/sampleprep](http://www.waters.com/sampleprep)。或者，沃特世还可提供MV-10 ASFE超临界流体萃取系统，适用于众多样品基质的高通量萃取。
2. 为了获得最佳峰形和灵敏度，可考虑使用极性较弱的溶剂(例如，庚烷)制备样品。使用弱极性样品稀释剂可避免“强溶剂效应”导致的峰变形。强极性溶剂尤其会影响弱保留性分析物的峰形。
3. 如果样品不溶于流动相改性剂，请确保样品、溶剂和流动相可以混溶，以避免样品产生沉淀。用0.2 μm滤膜过滤样品，去除颗粒物。如果用溶剂溶解样品，请确保滤膜材料不溶于该溶剂。请联系滤膜生产商，了解有关滤膜的溶剂相容性问题。建议使用Acrodisc<sup>®</sup>过滤膜(更多信息请查阅Waters Quality Parts<sup>®</sup>和《沃特世色谱柱和耗材目录》)。请注意，某些分析物会保留在特定的滤膜材料上，导致回收率(或检测器信号)低于预期。或者，可以考虑将样品溶液在8000 rpm下离心20 min，然后将上清液转移至适当的样品瓶中。

### b. 溶剂

为了保持最佳的色谱柱性能，请使用优质的色谱级溶剂。含有悬浮颗粒物的溶剂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、色谱柱寿命缩短、性能变差。

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil色谱柱专为超临界(压缩CO<sub>2</sub>)应用而设计。ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil色谱柱可用于压缩CO<sub>2</sub>以及如下共溶剂(单个溶剂或可混溶的溶剂组合)：醇类(通常为甲醇、乙醇、异丙醇)、乙腈和烷烃(通常为庚烷和己烷)。在SFC条件下，共溶剂的洗脱强度顺序如下：甲醇>乙醇>异丙醇>乙腈>烷烃。溶解分析样品时，请使用极性较弱的进样溶剂，避免发生峰变形。使用甲醇、异丙醇、乙腈和/或庚烷的混合物通常可确保分析物能够溶解，同时能够避免因进样溶剂极性太强而导致的峰变形。

水会对选择性造成不可逆的影响。如果流动相中混有水，虽然不会损坏多糖固定相，但其选择性会受到永久性的影响。

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil色谱柱含有改良的多糖涂层，使用较强的溶剂会损坏该涂层。必须避免使用的溶剂包括：

- 酮类，例如丙酮、甲基乙基酮 (MEK)
- 卤代溶剂，例如氯仿、二氯甲烷
- 乙酸乙酯
- 四氢呋喃 (THF)
- 甲基叔丁基醚 (MTBE)
- 甲苯
- 二甲基甲酰胺
- 二甲基亚砷
- N-甲基甲酰胺

### c. 添加剂

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil色谱柱可以安全地与超临界流体色谱(SFC)中常用的酸性和碱性添加剂一同使用，例如三氟乙酸(TFA)、甲酸、醋酸铵、甲酸铵、氢氧化铵、有机胺类(例如，二乙胺和三乙胺)以及氯化甲醇。在常用的20 mM或0.2%添加剂浓度下可安全耐受。选择合适的添加剂时，请综合考虑添加剂的挥发性、溶解性以及检测器的兼容性。使用适合的添加剂能够改善峰形，并且有助于控制分析物的保留特性，但同时也可能导致选择性发生改变。我们建议您在储存色谱柱之前对其进行冲洗，清除其中残留的添加剂和盐类。

#### d. 压力

ACQUITY UPC<sup>2</sup> 色谱柱硬件和填充材料在填充后经测试可承受高达6,000 psi (414 bar或41 MPa) 的压力。

#### e. 温度

ACQUITY UPC<sup>2</sup> Trefoil 色谱柱的最高推荐运行温度为40 °C。

#### f. 峰展宽最小化

ACQUITY UPC<sup>2</sup> 系统的设计可最大程度减少峰展宽。如果不使用沃特世指定的管路，不合适的管路内径会引起峰展宽，导致色谱性能下降。图1显示了管路内径对系统峰展宽以及峰形的影响。从图中可以看出，管路内径较大而引起色谱峰过宽和灵敏度降低。

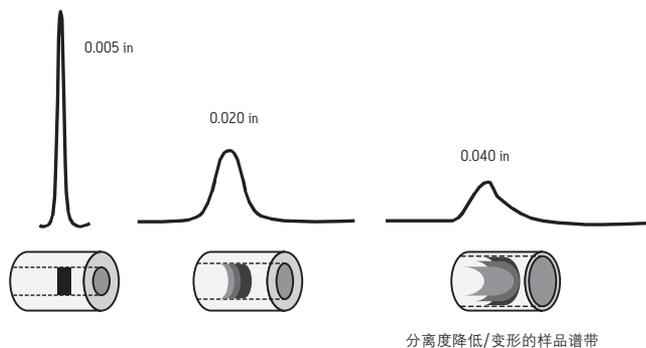


图1. 连接管路对系统的影响。

#### IV. 故障排除

1. 色谱柱最常见的问题之一是共溶剂/改性剂泵的灌注不正确或不充分。如果进样后没有出现色谱峰，或是峰的保留时间较长，请先检查共溶剂/改性剂泵的灌注情况。
2. 如果您发现在色谱柱入口或出口处有结霜现象，请拧紧该侧的压紧螺母。如果拧紧后仍不起作用，请为系统和色谱柱减压，然后更换密封不好的接头。
3. 如果色谱柱仍然存在结霜现象，请关闭CO<sub>2</sub>并排空系统的气体。断开入口或出口前，让色谱柱充分减压。请联系您的沃特世销售代表，获取更多支持。

#### V. 色谱柱的清洗、添加剂和储存

ACQUITY UPC<sup>2</sup> 系统的设计可最大程度减少峰展宽。如果不使用沃特世指定的管路，不合适的管路内径会引起峰展宽，导致色谱性能下降。图1显示了管路内径对系统峰展宽以及峰形的影响。从图中可以看出，管路内径较大而引起色谱峰过宽和灵敏度降低。

##### a. 清洗

使用常规清洗方法，该方法应与样品和/或您认为的色谱柱污染物的性质相匹配(见表4)。将色谱柱安装在ACQUITY UPLC系统(或HPLC系统)上，有利于使用多种溶剂改善清洗效果。请使用10倍柱体积的溶剂冲洗色谱柱。升高柱温可提高清洗效率。如果色谱柱性能在清洗和再生后仍比较差，请致电当地的沃特世办事处获得更多支持。

极性样品	非极性样品
1. 甲醇	1. 异丙醇
2. 异丙醇	2. 庚烷
3. 甲醇	3. 异丙醇
4. 流动相	4. 流动相

表2. 色谱柱清洗顺序。

清洗完成后需重新测试色谱柱，确认问题是否得到解决。如果获得解决，则可以继续使用该色谱柱，避免使用可能堵塞色谱柱入口的样品和溶剂。

## b. 添加剂的影响

助溶剂添加剂(例如, 氨、有机胺、甲酸、三氟乙酸)可顺利用于所有Trefoil色谱柱。选择合适的添加剂时, 请综合考虑添加剂的挥发性以及检测器的兼容性。使用适合的添加剂能够改善峰形, 并且有助于控制分析物的保留特性, 但同时也可能导致选择性发生改变。

## c. 储存

如果使用了添加剂, 请用至少5倍色谱柱体积的50% MeOH/CO<sub>2</sub>冲洗色谱柱。色谱柱应保存在100% CO<sub>2</sub>中。

## VI. 引入eCord智能芯片技术

### a. 简介

eCord智能芯片可记录色谱柱整个使用寿命内的性能历史。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2. eCord智能芯片。

在生产时, 跟踪和质量控制信息将被下载到eCord中。将这些信息存储于芯片中, 就不再需要纸质分析证书。

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。在本手册中, 我们将介绍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。

### b. 安装

将色谱柱安装至ACQUITY®色谱柱管理器中。将eCord插入柱温箱的侧面。当eCord插入柱温箱后, 用户即可通过计算机查看色谱柱相关的识别信息和总体使用信息。

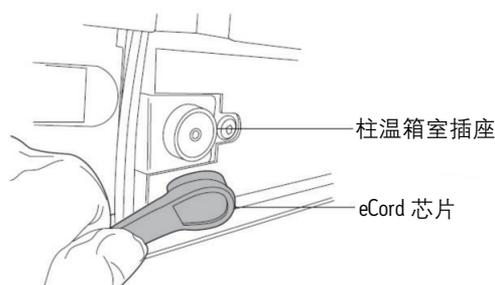


图3. 安装eCord智能芯片。

c. 生产信息

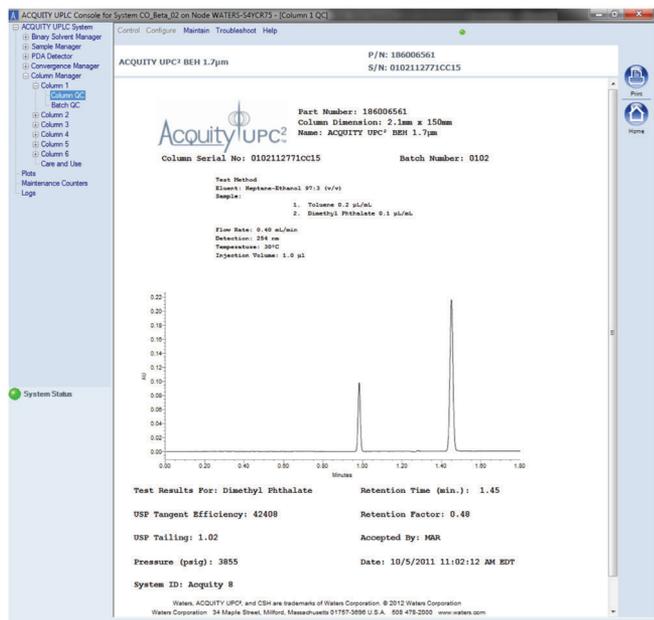
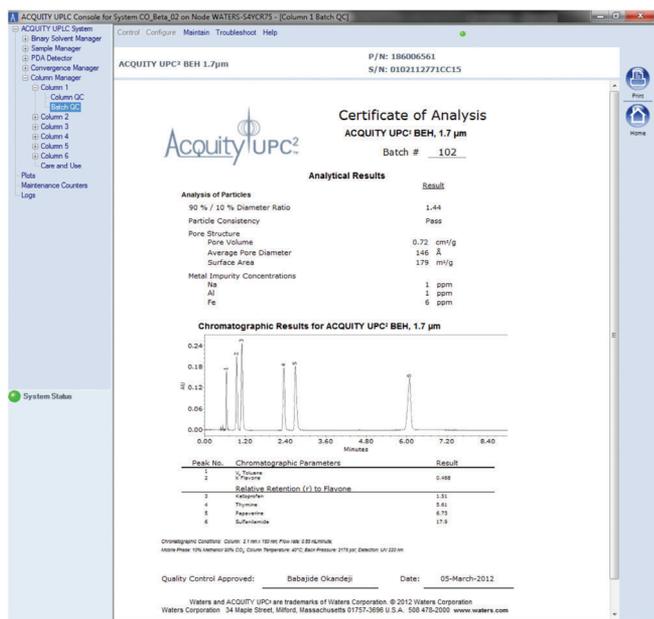


图4. 存储在eCord中的生产信息。

d. 色谱柱使用信息

eCord芯片将为客户提供色谱柱的使用数据、柱规格和序列号。色谱柱总体使用信息包括样品总数、进样总数、样品组总数、首次进样日期、末次进样日期、最大压力和最高温度。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、该样品组的最大压力和最高温度，以及该色谱柱是否满足基本的系统适用性要求。eCord芯片最多可存储50个样品组。此外，eCord可在eCord芯片和Empower®软件之间实现双向通讯。

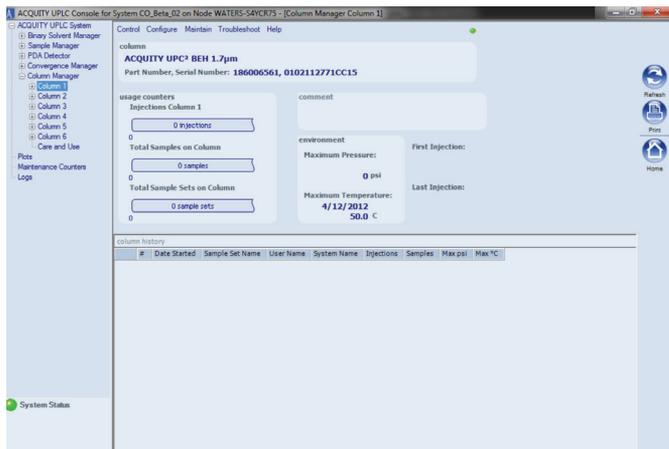


图5. 色谱柱使用信息。

VII. ACQUITY UPC²色谱柱系列

《ACQUITY UPC² Trefoil色谱柱维护和使用手册》是ACQUITY UPC²色谱柱系列三本手册的其中一本。其它两本维护和使用手册可访问[www.waters.com/chemcu](http://www.waters.com/chemcu) 进行下载。

ACQUITY UPC² Torus™色谱柱维护和使用手册  
 - 720005203ZH

ACQUITY UPC² BEH、CSH和HSS色谱柱维护和使用手册  
 - 720004349ZH



Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPC², UPC², Sep-Pak, Oasis, Waters Quality Parts, eCord, ACQUITY and Empower是沃特世公司的注册商标。Trefoil和Torus是沃特世公司的商标。所有其它商标均为其各自所有者的资产。

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](http://www.waters.com)