

LC columns

混合模式色譜柱：色譜柱保養指南與一般方法開發資訊

適用於 Acclaim Mixed Mode WAX-1、Acclaim Mixed Mode WCX-1、Acclaim Mixed Mode HILIC-1、Acclaim Trinity、Acclaim Surfactant 等色譜柱。

➤ 在開始之前

您可以從 thermofisher.com 下載與您色譜柱相關的操作手冊、規格表或技術指南。在搜尋框輸入料號 (P/N) 或產品名稱即可。實用的參考文件通常位於產品頁面的底部。有些色譜柱在包裝盒中會附上快速入門指南，和／或在色譜柱上掛有黃色警告標籤。請在使用色譜柱之前閱讀這些文件。

請務必先查看隨色譜柱附上的分析證書 (CoA) 或品質保證報告 (QAR)。這些文件包含大量重要資訊。例如，確認色譜柱在出廠時所填充的溶劑。如果該溶劑與您的流動相不相容，請以雙方都相容的中間溶劑進行沖洗。有些偵測器，例如帶電氣溶膠偵測器 (CAD) 和質譜儀 (MS)，對色譜柱流失物 (column bleed) 非常敏感。在將色譜柱連接到偵測器之前，務必先進行柱子調節 (conditioning)。

當您收到色譜柱並將其帶入實驗室時，應盡力再現 CoA 或 QAR 上的色譜圖。這樣可以確保色譜柱在您開始方法操作前運作正常，而如果您定期重複測試 CoA 或 QAR 所示的條件，也能及早發現色譜柱劣化的跡象，並在必要時採取預防措施。

對於在高壓 (>400 bar) 下運行的 UHPLC 色譜柱，即使柱溫箱已達設定溫度，色譜柱仍可能需要額外 20 - 30 分鐘才能達到熱穩定狀態。請持續平衡，直到系統壓力與偵測器基線都趨於穩定。

在使用前務必檢查是否漏液。



➤ 操作限制

請遵守色譜柱在壓力、pH、溫度與溶劑相容性方面的限制。產品手冊、規格表或技術指南是查詢操作限制的最佳參考來源。若沒有手冊，請參閱 thermofisher.com 上的線上型錄或產品頁面。

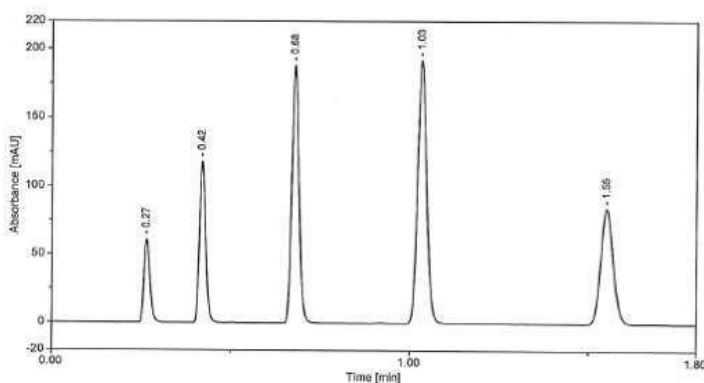
在 pH 或溫度極限附近操作會縮短色譜柱的使用壽命，並增加色譜柱流失物 (column bleed)。

Part Number: 25002-052130
 Column: Hypersil GOLD™
 Serial Number: 20110299
 Lot Number: 17047
 Column Dimensions: 50 mm x 2.1 mm

Chromatographic Parameters

Mobile Phase: 50/50 Acetonitrile/Water
 Flow Rate: 0.5 mL/min
 Sample Volume: 1 µL
 Wavelength: UV @ 254 nm
 Particle Size: 1.9 µm
 Pore Size: 175 Å

Temperature: Ambient
 Column Storage: Mobile Phase
 Column Back Pressure: 3976 psi



Peak No.	Component	RT(min)	N plates/meter	Tailing Factor (EP)	Capacity
1	Theophylline	0.27	24780	1.34	0.00
2	p-Nitroaniline	0.42	59240	1.28	0.58
3	Methyl Benzoate	0.68	113720	1.21	1.56
4	Phenetole	1.03	161840	1.14	2.90
5	o-Xylene	1.55	186940	1.11	4.85

QC Approval: R.S.

Legacy Production: LTVIL-LEGPROD18/ID5024/2020-04/09



➡ 固定相 (stationary phase) ,
以及批號 (lot) 與序號
(serial number)

➡ 測試條件

➡ 出廠溶劑

➡ 測試結果

以下為如何閱讀您的 CoA 或 QAR 的範例。

➤ 操作最佳實務

乾淨的樣品可使方法更加穩健，並延長色譜柱的使用壽命。請務必盡可能清潔樣品，以確保最佳結果。將樣品過濾至色譜柱填料粒徑的 1/10。一般來說，這代表若使用 < 2 µm 或接近 2 µm 粒徑的色譜柱，請使用 0.2 µm 過濾膜；若使用較大粒徑，例如 5 µm 或 10 µm，則可使用 0.45 µm 過濾膜。

另外，也可使用其他樣品前處理技術，例如固相萃取 (SPE)，以去除化學或微粒污染物。使用保護柱或 inline 過濾器可顯著延長色譜柱壽命。請定期更換保護柱匣或濾片。

在使用流動相時，請使用足夠高品質的試劑。理想情況下，請使用工廠預先過濾的 HPLC 等級（或更高）溶劑。定期維護您的純水系統以確保最佳水質。請勿向緩衝液瓶中「補加」溶液，應重新配置一批新的緩衝液並使用乾淨的瓶子。每天檢查緩衝液是否有微生物生長，特別是在使用磷酸鹽緩衝液時。

在可能的情況下，以重量方式配製溶劑與緩衝液。在使用前檢查 pH。請將緩衝液通過 0.2 µm 過濾膜過濾（UHPLC 使用 0.1 µm 過濾膜）。

➤ 初次安裝

1. 請檢查 **QAR** 或 **CoA** 以確認儲存溶液。以相容的緩衝液沖洗色譜柱，例如 **100 mM 醋酸銨 (pH 約 5)**。
2. 以由高鹽至高有機溶劑的重複梯度進行柱子調節 (**conditioning**)，直到基線穩定為止。
3. 以初始流動相平衡色譜柱。
4. 流動相應在色譜柱的 pH 限制範圍內進行緩衝。避免使用無緩衝 (**unbuffered**) 的流動相，特別是對於含胺基官能基的色譜柱。
5. 弱陽離子交換 (**WCX**) 色譜柱不可與酒精類溶劑一起使用。酒精可能使羧酸基發生酯化反應，導致保留時間產生偏移。此情況包含但不限於：**Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1**、**Thermo Scientific™ Trinity™ P2** 和 **Thermo Scientific™ Trinity™ Q1** 色譜柱。

➤ 儲存方式

短期儲存（少於 3 天）：可以將色譜柱保持安裝於 LC 系統上，並以流動相填充，置於室溫即可。

• 長期儲存：

1. 使用 **0.01 M 醋酸銨緩衝液 (pH 約 5)** 沖洗，以去除緩衝液。將梯度提升至 **70% 或更高比例** 的相容有機溶劑。對於含胺基的弱陰離子交換 (**WAX**) 色譜柱（如 **Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ Amino**、**Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1**、**Thermo Scientific™ Acclaim™ Surfactant Plus**），**100% 乙腈 (MeCN)** 是最佳的有機溶劑。
2. 依照 **CoA** 或 **QAR** 調整梯度至最佳儲存條件。將色譜柱自儀器上卸下並裝上實心端帽。於室溫中保存。

➤ 清潔

建議定期清潔您的色譜柱。如果您使用梯度模式操作，可以在梯度最高點延長幾分鐘以進行清潔。對於等度模式操作，可以在樣品之間加入一段高強度溶劑的清洗步驟，以確保色譜柱在下一次進樣前保持乾淨。或者，也可在序列結束時進行一套清潔程序，視您的方法與樣品潔淨程度而定。

然而，有時您可能需要對色譜柱進行更深入的清潔。在使用任何超出原本流動相組成的清潔溶劑之前，請先確認其與色譜柱材料及 LC 系統相容。以下列出幾種常見污染物及其清潔方式。

微粒污染物：如果色譜柱填料粒徑大於 **2 μm**，可倒置色譜柱方向並以正常流速的一半進行反向沖洗 (**backflush**)。沖洗液需直接排入廢液。若使用 **< 2 μm** 色譜柱，請勿進行反向沖洗。

• 一般清潔：

1. 使用 **1 M 醋酸銨 (pH 約 5)** 沖洗，以去除與系統不相容的緩衝液。
2. 以 **5% 到 95%** 的相容有機溶劑進行多次梯度清洗。

離子聚合物或蛋白質污染：使用濃度 **0.02 至 1 M 的 NaCl (pH 6)** 進行多次梯度清洗。

金屬離子污染：

1. 先使用 **pH 約 4 的醋酸銨或甲酸銨** 進行沖洗。
2. 接著將緩衝液緩慢切換成螯合緩衝液（於緩衝液中加入 **20 mM EDTA、焦磷酸鹽或草酸鹽**，**pH 約 4**）。
3. 使用 **UV 偵測器** 監控基線是否穩定。
4. 然後再將螯合緩衝液緩慢切換回一般緩衝液，持續沖洗直到所有螯合劑從色譜柱及 LC 系統中完全排出。
5. 將系統重新平衡回流動相條件。

若 **WCX** 色譜柱因酒精類溶劑造成羧酸基酯化，清潔方式需不同：使用 **10 mM 甲磺酸 (methanesulfonic acid)**，在 **45°C** 下處理 **30 分鐘**。之後測試保留是否恢復正常；若未恢復，可重複進行。

➤ 流動相選擇

選擇適當的流動相與選擇正確的固定相同樣重要。選擇流動相時需要考慮許多因素。請選擇與色譜柱以及 LC 設備相容的流動相。質譜儀與帶電氣溶膠偵測器要求所有成分皆需具揮發性；而 UV 偵測則需要流動相在所關注的波長範圍內具備良好的光學透明度。此外，請注意流動相的黏度，以避免超過色譜柱或系統的壓力上限。請使用適用於應用需求的高品質試劑（如 HPLC、UHPLC、LC-MS、UHPLC-MS 等級）。

典型的流動相通常為有機溶劑，在不同操作模式下作為弱溶劑或強溶劑；而緩衝液則會在不同模式下作為強溶劑或弱溶劑。

選擇合適的流動相與選擇正確的固定相一樣重要。在操作混合模式色譜柱時，尤其是那些可在多種模式中使用（例如反相模式與 HILIC 模式）的混合模式色譜柱，流動相的組成十分重要，因為它會決定化合物的保留行為。使用混合模式色譜柱時，有兩個重要因素會顯著影響保留：pH 與離子強度。混合模式色譜柱傳統上用於那些不容易以傳統以疏水性為基礎的色譜技術分離的化合物，而是用於含有易帶負電或正電之官能基的化合物。這些化合物的保留行為會因流動相的 pH 與離子強度，以及流動相中的有機溶劑比例與所採用的分離模式而改變。

由於混合模式色譜中的互動複雜，因此混合模式方法會比反相色譜方法需要更多細節控制與更高的穩健性。

➤ 緩衝液選擇

藉由控制流動相的 pH，緩衝液能控制分析物的保留並改善峰形。請記住，真正的緩衝液應具有在加入 pH 不同的樣品時抵抗 pH 改變的能力，而緩衝容量只有在酸或鹼的 pKa 附近才達到 100%。在 pH 4 時，磷酸鹽是非常差的緩衝液，如果加入較酸性或較鹼性的樣品，溶液會迅速偏移至其中一個 pKa。一般原則是，為了使流動相具有良好的 pH 控制，應在緩衝液 $pK_a \pm 1$ 的範圍內操作。

適用於 HPLC 的緩衝液濃度通常為 10 – 100 mM，視樣品性質與柱填料而定。當需要在低 pH（2 – 3）條件下操作時，通常使用磷酸鹽或較強的有機酸（如 TFA 或甲酸）。若希望控制在 pH 4 – 5，則應考慮使用有機酸緩衝液（如醋酸鹽或檸檬酸鹽）替代磷酸鹽。

右側的圖說明選擇正確 pH 對分離的重要性。即使是非常輕微的 pH 變化，不論是量測誤差、泵浦混合問題，或是流動相吸收空氣中的水分，都可能在緩衝不充分的情況下影響方法的再現性。在選擇緩衝液與有機修飾劑的混合時，務必注意兩者混合後是否會產生沉澱，以避免堵塞與系統污染。

緩衝液與流動相選擇的最佳參考資料，通常可在產品手冊與應用報告中找到。

Common buffer systems

Buffer		pK _a	Useful pH range	MS-compatible
TFA		0.30		Yes
Phosphate	pK ₁	2.1	1.1–3.1	No
	pK ₂	7.2	6.2–8.2	No
	pK ₃	12.3	11.3–13.3	No
Citrate	pK ₁	3.1	2.1–4.1	No
	pK ₂	4.7	3.7–5.7	No
	pK ₃	5.4	4.4–6.4	No
Formate		3.8	2.8–4.8	Yes
Acetate		4.8	3.8–5.8	Yes
Tris base (Trizma, THAM)		8.3	7.3–9.3	Yes
Ammonia		9.2	8.2–10.2	Yes
Borate		9.2	8.2–10.2	No
Diethylamine		10.5	9.5–11.5	Yes
Carbonate	pK ₁	6.4	5.4–7.4	Yes
	pK ₂	10.3	9.3–11.3	Yes
Triethanolamine		7.80		Yes

在樣品前處理、色譜柱與進樣瓶之間，您可以期待獲得可再現的結果。



若您未找到所需的內容，我們非常樂意與您討論您的特定需求。請聯絡您當地的業務代表以洽詢客製化訂單。

Learn more at thermofisher.com/lccolumns

Research Use Only - Not For Diagnostic Procedures. 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. or its subsidiaries. This information is presented as an example of the capabilities of Thermo Fisher Scientific Inc. products. It is not intended to encourage use of these products in any manner that might infringe the intellectual property rights of others. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details. FL000966-NA-EN 0422

thermoscientific