

色谱耗材

Acclaim[®] Mixed-Mode

WAX-1 色谱柱快速操作和维护保养手册

目 录

第 1 部分 – 引言	4
1.1 Mixed-Mode 色谱和反相、离子交换和离子对色谱的比较	4
1.2 特征	4
1.3 指标和推荐操作条件	4
1.4 物理特征	5
1.5 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 产品	5
第 2 部分 – 安装：分解步骤用户指南	6
第 3 部分- 方法开发	8
3.1 离子强度	8
3.2 有机改性剂	8
3.3 流动相 pH	8
3.4 等度与梯度	8
图 1 可调选择性 - 离子强度效应	8
图 2 可调选择性 - pH 效应	9
图 3 可调选择性 - 有机改性剂效应	9
3.5 HILIC 模式	10
3.6 缓冲液类型	10
第 4 部分- 色谱柱维护	11
4.1.流动相	11
4.2.保护柱	11
4.3.色谱柱存储	11
4.4.色谱柱 pH 范围 — pH 2.5 至 7.0	11
4.5.推荐操作温度限值 <50 °C	11
4.6.流速和压力限值	11
4.7.色谱柱清洗程序	11

第 5 部分- 常见问题..... 12

图 5 单价羧酸的分离.....	14
图 6 乳酸、醋酸盐和抗坏血酸的分离	14
图 7 奎宁酸和酒石酸的分离.....	15
图 8 酸性、中性和碱性分子的等度分离.....	15
图 9 酸性、中性和碱性分子的梯度分离.....	15
图 10 软饮料的快速分析.....	16
图 11 反相色谱柱的正交选择性 – I.....	16
图 12 反相色谱柱的正交选择性 – II.....	17
图 13 Mixed-Mode WAX-1 色谱柱上的三聚氰胺和三聚氰酸.....	17



Acclaim® Mixed-Mode WAX-1 色谱柱基于一种新型的混合模式硅胶填料，兼具疏水性和弱阴离子交换特性。与传统的反相固定相不同，这种新型填料的特征是具有可电离末端的烷基长链，并显示出巨大潜力，可用于分离包含混合物的多种阴离子化合物，包括药物、食品和饮料、化学品等。在美国药典（USP）色谱柱分类中，Acclaim Mixed-Mode WAX-1 归属于 L78。

1.1 Mixed-Mode 色谱和反相、离子交换和离子配对色谱的比较

反相（RP）硅胶柱（例如 C18）是用于各种液相色谱（LC）分离的最广泛使用的固定相。但是，亲水性离子化合物，例如小分子有机酸或无机离子在这些色谱柱上的保留和分离性很差。

离子交换柱用于分离离子或可电离的化合物，例如蛋白质、核酸、无机离子、小分子有机酸等。由于大多数常规离子交换固定相对中性分子的疏水性保留不足，因此它们在小分子分离应用中非常有限。

离子对色谱法是一种在常规反相介质上分离离子或可电离化合物的方法，该方法需要将疏水性离子化合物（通常由具有可电离末端的烷基链组成）添加到流动相中。通常，中性分析物的保留几乎不受影响，而带有与离子对试剂互补电荷的分析物则被保留更长的时间，而与离子对试剂具有相同电荷的分析物则被保留更短的时间。离子对色谱法的局限性包括柱平衡时间长，从柱上洗脱离子对试剂所需的溶剂量和时间。

混合模式色谱法结合了离子交换色谱法和常规反相色谱法的各个方面。Mixed-Mode 固定相兼具疏水性和离子交换性。相与分析物的这两种强烈相互作用允许独立控制可电离和中性分子的保留。因此，在 Mixed-Mode 色谱柱上，可以轻松解决许多 C18 色谱柱难以分离的亲水性可离子化化合物的应用难题。

1.2 特征

1. 可调节的选择性。
2. 与反相色谱柱互补的选择性。
3. 酸性、碱性和中性分子的同时分离。
4. 对阴离子分子的高容量和独特的选择性。
5. 多模式保留机理：反相、阴离子交换和 HILIC 模式。

1.3. 指标和推荐操作条件

运输溶液：60/40 乙腈/100 mM 醋酸铵

储存溶液：60/40 乙腈/100mM 醋酸铵

缓冲 pH 范围：pH 2.5 至 7.5

温度范围 < 50°C

固定相	粒径	柱尺寸	P/N	推荐最高压力	典型流速
Mixed-Mode WAX-1色谱柱	3 μm	2.1x150 mm	070089	5800 psi	0.2 - 0.5 mL/min
		3.0x50 mm	071908	4500 psi	0.4 - 1.0 mL/min
		3.0x150 mm	070088	5800 psi	0.4 - 1.0 mL/min
	5 μm	2.1x150 mm	067084	5800 psi	0.2 - 0.5 mL/min
		4.6x150 mm	064984	5200 psi	0.8 - 2.0 mL/min
		4.6x250 mm	064985	5800 psi	0.8 - 2.0 mL/min

1.4 物理特征

键合化学：专有烷基 硅基质：球形，高纯度 粒径 5 μm 和 3 μm

表面积 300 m^2/g

孔径 120 \AA

1.5 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 产品

货号 描述 尺寸

Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱	粒径	柱尺寸	P/N	
分析柱	3 μm	2.1x150 mm	070089	
		3.0x50 mm	071908	
		3.0x150 mm	070088	
	5 μm	2.1x150 mm	067084	
		4.6x150 mm	064984	
		4.6x250 mm	064985	
保护柱	5 μm	2.1 x 10mm	069686	需要柱套 V-2 p/n 069707
		3.0 x 10mm	071909	需要柱套 V-2 p/n 069707
		4.6 x 10mm	069704	需要柱套 V-2 p/n 069707

安装：分解步骤用户手册



步骤 1 - 验证柱效

建议您在使用前对 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱进行柱效测试。柱效验证的目的是确保在运输过程中色谱柱没有被损坏。使用色谱柱盒内的质量保证 (QA) 报告上所述条件测试色谱柱。周期性重复该测试，以追踪柱效随时间的变化。请注意，由于系统电子系统、管路、操作环境、试剂质量、色谱柱条件和操作员技术的不同，在两个不同的HPLC系统上可能会产生微小的变化。以下步骤概述了准备系统和使用色谱柱的程序。

步骤 2 - 流动相制备

获得可靠、稳定且准确的结果要求流动相不含离子和色谱杂质。用于制备流动相的化学品、溶剂和去离子水，尽可能使用最高纯度。在流动相中保持低痕量杂质和低颗粒水平有助于保护色谱柱和系统组件。当用于制备流动相的化学品、溶剂和水的品质不合格时，赛默飞无法确保正确的色谱柱性能。

去离子水

用于制备流动相的去离子水应该是 1 类试剂级水或者 HPLC 级水。去离子水应不含大于 $0.2 \mu\text{m}$ 的电离杂质、有机物、微生物和颗粒物。许多商用净水器设计用于 HPLC 应用，适用于这些应用。



对流动相的水性组分进行脱气，然后添加溶剂组分。如有可能，请避免对含有溶剂的流动相进行过度吹扫或脱气，因为挥发性溶剂可能会从溶液中“沸腾”。

注释

溶剂

所用溶剂必须不含离子和吸收紫外线的杂质。HPLC 级超高纯溶剂的使用将确保色谱不会受到溶剂杂质的影响。

柱效测试的流动相

根据不同应用，流动相系统包括一种有机改性剂（例如乙腈或甲醇）和缓冲液（例如磷酸缓冲液）。

例 A. 50 mM, pH 磷酸缓冲液的制备

1. 称重 13.6 克磷酸二氢钾和 0.5 克焦磷酸钠*。
2. 将上述两种盐完全溶解在 2000g 的去离子水中。
3. 使用 HCL 或 NaOH 将溶液 pH 值调节为 pH6。

* 焦磷酸盐用于消除不锈钢仪器（泵头、自动进样器、管路等）和色谱柱硬件中的金属干扰。

实例 B. 制备含有 50mM, pH 6 的磷酸盐缓冲液和乙腈 (50:50 v/v) 的流动相。

预混合: 将 500 g 的 50 mM, pH 6 磷酸盐缓冲液和 390 g 乙腈混合。

比例阀生成: 50/50 v/v 50 mM, pH6 磷酸盐缓冲液/乙腈。



注释

这两种流动相的制备方法可能会导致结果略有不同。

步骤 3 - 设定 LC 系统

使用一个标准 LC 系统, 包括 LC 泵、柱温箱、紫外探测器和进样口 (或自动进样器)。在使用之前应该彻底启动该系统。

步骤 4 - 色谱柱老化

采用乙腈-盐溶液运输色谱柱, 因此首次使用新色谱柱时, 应先用流动相彻底清洗 (例如, 以常规流速冲洗至少 45 分钟) , 然后再进样。切换到新的流动相时, 请确保新的流动相与色谱柱中先前流动相兼容, 以避免沉淀造成色谱柱堵塞。在进行任何进样之前, 应对柱进行充分老化 (例如以常规流速冲洗45分钟) 。

步骤 5 - 质控报告中再现色谱图

使用质控报告中所述的条件执行柱效测试, 并与报告结果进行比较。在柱得到完全平衡后, 可进行多次进样直到获得可重复的保留。保留柱效记录以备后续使用。



注释

由于各种原因, 例如不同的 LC 系统、流动相、柱温控制等等, 您可能会发现碘化物峰的保留时间与 报告中的保留时间略有不同。

步骤 6 - 真实样品分析

样品中的颗粒物污染色谱柱是导致色谱柱失效的主要原因。症状可能包括高背压、对称性差、杂质峰或柱效低。

进样前, 使样品通过 0.5 μm 或更小的孔隙率过滤器。由于溶解的蛋白质可能会在初始制备后的某些时间沉淀, 因此生物学样品尤其麻烦。

3.1 离子强度

离子强度对于带电化合物的保留调节很关键。离子强度的增加可导致以下结果：

- a) 对酸性分子的保留能力下降； b) 对碱性分子的保留能力增强； c) 对中性分子的影响最小。

3.2 有机改性剂

流动相中有机改性剂的组成明显影响疏水性。通常，在保持其他条件不变（例如离子强度、pH、温度等）的情况下，当流动相中有机物含量增加时，所有类型的分子（酸、碱和中性分子）保留性能都不同程度的下降。

3.3 流动相 pH

尽管 pH 值对于中性分子的保留影响很小，但是它会显著影响对阴离子的保留。例如，随着 pH 的减少，含有羧基的化合物所带负电荷减少，导致离子交换保留下降。

3.4 等度与梯度

对于许多涉及分析物数量少的应用，通常在 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱上开发等度方法比在反相色谱柱上容易。

对于更复杂的分离，例如涉及具有不同类型和电荷数量以及不同疏水性的分子混合物的分离，梯度方法可能是有利的。在实践中，就再现性和简单性而言，离子强度梯度，有机改性剂梯度或两者的组合已被证明是令人满意的。

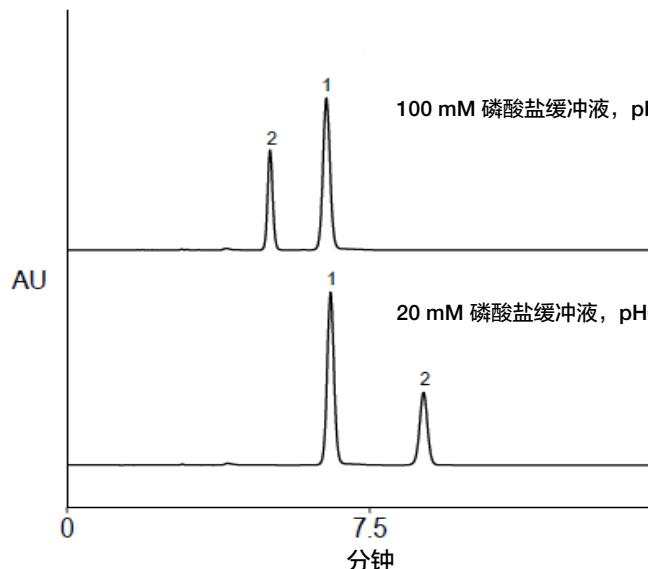
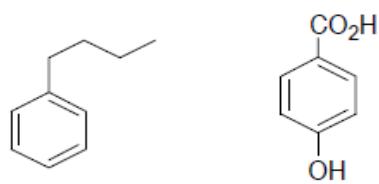


图1. 可调选择性 - 离子强度效应

色谱柱: Acclaim Mixed-Mode WAX, 5 μ m
 尺寸: 4.6x150 mm
 流动相: 50/50 v/v 乙腈/磷酸缓冲液
 温度: 30°C
 流速: 1 mL/min
 进样体积: 2 μ L
 检测: UV @ 210 nm
 峰: 1. 丁基苯 (0.1 mg/mL)
 2. 4-羟基苯甲酸 (0.5 mg/mL)



丁基苯

4-羟基苯甲酸

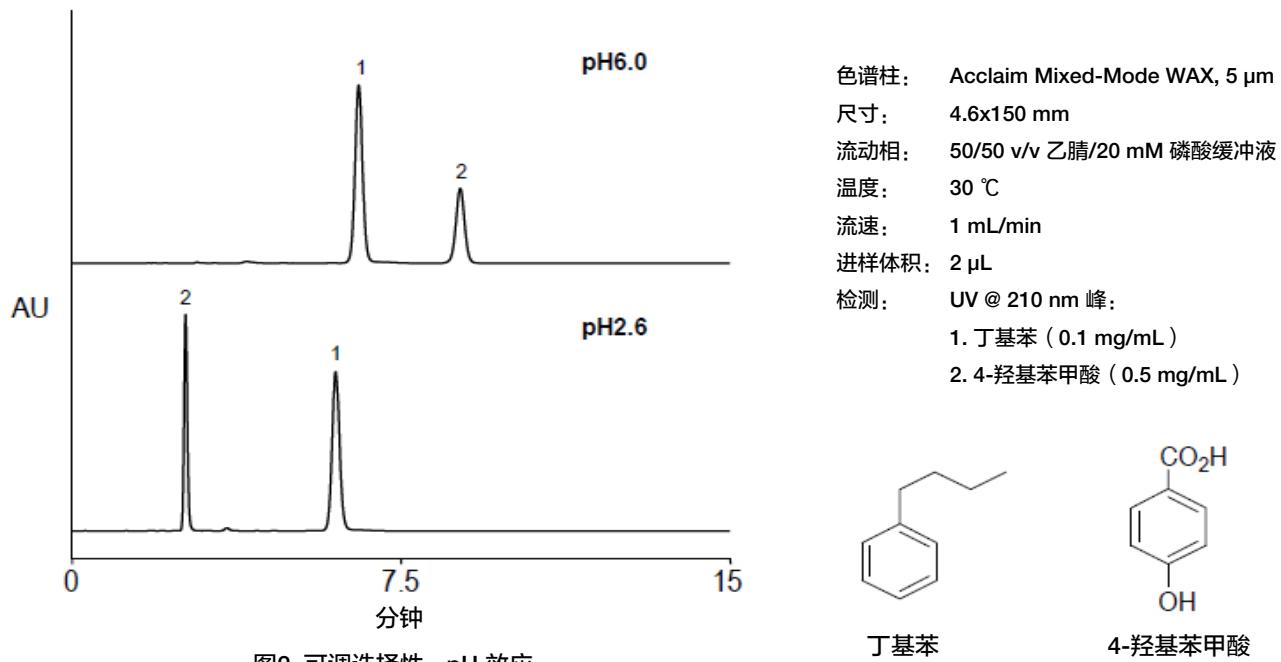


图2. 可调选择性 - pH 效应

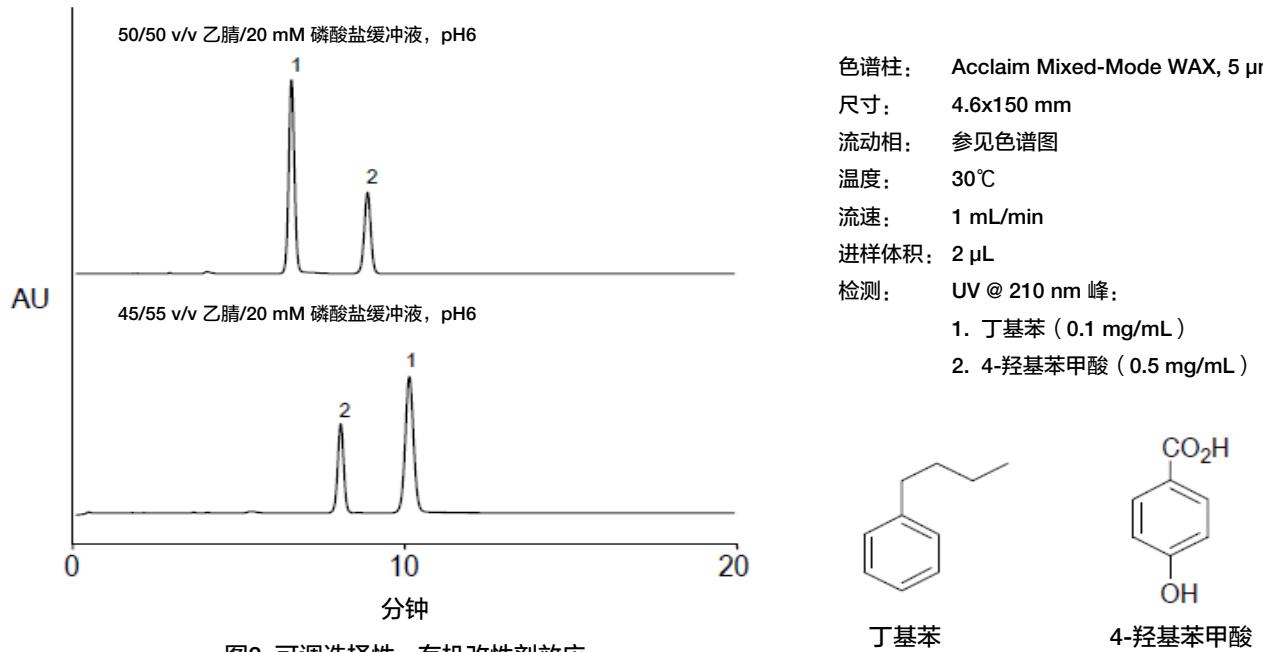


图3. 可调选择性 - 有机改性剂效应

3.5 HILIC 模式

Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱可以在 HILIC 模式下操作。在这种模式下，乙腈（不是甲醇）的使用范围应为 70% 到 100%。通过溶剂极性可以调节洗脱能力，例如水性缓冲液。在 HILIC 模式下使用此色谱柱可提高高极性分子的保留能力。通常，流动相中有机成分越高，对高极性分子的保留能力则越强。

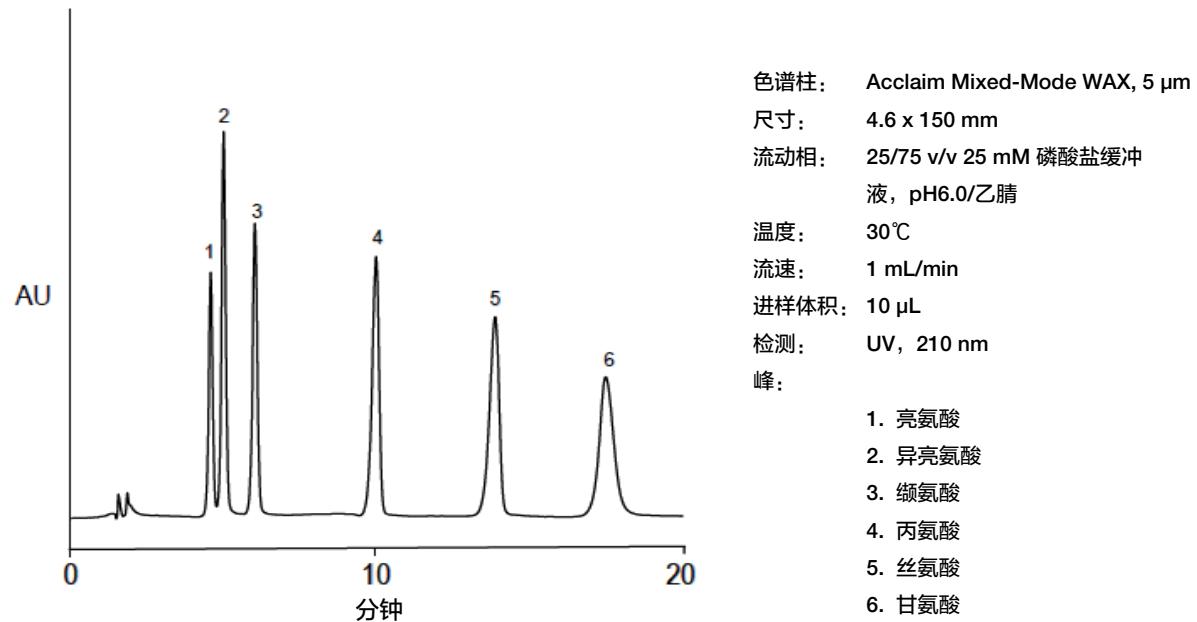


图4. HILIC 模式下氨基酸的分离

3.6 缓冲液类型

Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱不可与不含盐的水性流动相一起使用，无论是单独使用还是与有机改性剂一起使用。对于大部分 HPLC 应用，磷酸盐缓冲液都有效。根据不同应用，乙酸盐或甲酸盐缓冲液也适用。



4.1 流动相

流动相应该现配现用。所有化学品和溶剂都应使用最高品质产品。在使用之前过滤所有流动相。推荐在线过滤器。

4.2 保护柱

强烈建议将保护柱与分析柱一起使用，并根据样品的性质定期更换。否则，将导致色谱柱性能快速下降，色谱柱寿命缩短。

4.3 色谱柱存储

短期可以将色谱柱保存在流动相中。为了长期保存，请使用有机物含量较高的缓冲溶液，例如 pH 在 3 至 6 之间的 70/30 v/v 乙腈（或甲醇）/20 mM 磷酸盐缓冲液或 pH 在 3.8 至 5.8 之间的醋酸铵缓冲液。

4.4 色谱柱

色谱柱 pH 范围 — pH 2.5 至 7.0 为了延长色谱柱寿命，强烈推荐使用“硅胶友好”流动相。当色谱柱的 pH 限值是 2.5 至 7 时，推荐的 pH 操作范围是 2.8 - 6.5。

4.5 推荐操作温度限值 <50 °C

尽管我们的实验结果表明色谱柱可以在 50 °C 下使用，一般通过调节流动相强度、pH 或有机改性剂成分优化分离。不推荐升温，尽量避免。

4.6 流速和压力限值

通常，在不超过压力极限的情况下，以 1 mL/min 的流速获得 4.6mm 内径色谱柱的良好柱效，而更高的流速（2 mL/min）可用于快速分析。内径为 2.1mm 的色谱柱通常以 0.1 至 0.8 mL/min 的流速使用，前提是不超过压力上限。突然增加色谱柱压力是不可取的，这一点非常重要。因此，将流速从 0.5 mL/min 逐渐增加到所需流速。色谱柱的压力限值是 4000 psi。

4.7 色谱柱清洗程序

如果需要进行色谱柱清洗操作，例如色谱柱性能下降和/或背压过高，可以将以下程序用作指导：

1. 用 20 mM 磷酸盐缓冲液，pH 3/乙腈 v/v 50/50，冲洗 3 倍柱体积，流速在 0.5 - 1 mL/min 之间。
2. 用 150 mM 磷酸盐缓冲液，pH 3/乙腈 v/v 50/50，以 0.5 - 1 mL/min 的流速（为了去除强保留的阴离子化合物）冲洗 30 倍柱体积。
3. 用 20 mM 磷酸盐缓冲液，pH 3/乙腈 v/v 50/50，冲洗 3 倍柱体积，流速在 0.5 - 1 mL/min 之间。
4. 用 20 mM 磷酸盐缓冲液，pH 3/乙腈 v/v 75/25，以 0.5 - 1 mL/min 的流速（为了去除强保留的疏水性化合物）冲洗 30 倍柱体积。
5. 以流动相平衡柱。



注释

注释：在任何进样之前，应该以至少 30 倍柱体积的流动相平衡色谱柱。

如果上述处理无法改善柱效，则请更换新柱。

对于 2.1 mm 内径的色谱柱，流速应该降低为 4.6 mm 内径色谱柱的 20%。

如果上述处理无法改善柱效，则请更换新柱。

1. 什么是 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱？

Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱是一种新型的混合模式硅胶色谱柱，兼具疏水性和弱阴离子交换特性。它的表面化学特征是带有弱阴离子交换末端的烷基长链。该色谱柱展示了巨大的潜力，可用于分离多种包含混合物的阴离子化合物，包括制药，食品和饮料，化学等。

2. 为什么需要 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱？

Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱的混合模式分离机制可通过独立或同时更改流动相离子强度、pH 和有机成分，调节可电离和中性分子的保留。因此，在该色谱柱上，可以轻松解决许多 C18 色谱柱难以分离的亲水性可离子化合物的应用难题。

3. 何时需要 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱？以下情况可以考虑使用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱：

- 1) 亲水性有机酸的分离。（图 5 参见页面 15，图 6 参见页面 16，图 7 参见页面 17）
- 2) 酸性、中性和疏水性药物的同时分离。（图 8 参见页面 18，图 9 参见页面 19）
- 3) 软饮料的快速分析。（图 10 参见页面 20）
- 4) 当您需要正交于反相色谱柱的选择性。（图 11 参见页面 2，图 12 参见页面 22）

4. 使用此色谱柱进行方法开发时应考虑哪些因素？

影响柱选择性的三个主要因素是：流动相离子强度、流动相 pH 和流动相有机组成。您可以通过更改一个、两个或所有三个因素来优化分离。参见第 3 部分 - 方法开发，获取详细信息。

5. 适用该色谱柱的流动相有哪些？

在大部分应用中，磷酸盐缓冲液都能提供令人满意的结果。根据不同的应用，常用的缓冲液浓度范围是 10 mM 到 250 mM，pH 范围应该在 2.5 到 7 之间。使用有机改性剂时，请确保与缓冲液混溶。在某些应用中也可以使用甲酸盐或乙酸盐缓冲液。

6. 在开始使用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱之前，我该做些什么？

仔细阅读本产品手册，如果对使用此色谱柱有任何疑问，请联系赛默飞技术支持。

7. 我可以使用该色谱柱分离亲水性有机酸吗？

可以。您可以使用此色谱柱分离在反相色谱柱上难以分离的有机酸。

8. 如何存储色谱柱？

参见“第 4.3 部分色谱柱存储”了解详细信息。

9. 我可以使用该色谱柱分析碱性分子吗？

该色谱柱适合在适当的色谱条件下分析具有中等至高疏水性的碱性分子。该色谱柱一般都可以提供出色的峰形。

10. 我可以使用该色谱柱分析中性分子吗？

可以。该色谱柱具有中等疏水性保留能力，因此可以充分保留具有中等至高疏水性的中性分子。对于高度亲水/极性分子，应考虑使用该色谱柱进行 HILIC 模式分离。

11. 我可以使用该色谱柱分离碱性、酸性和中性分子的混合物吗？

可以。如图 8 和 9 所示，Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱在一次运行中将碱性、中性和酸性分子的混合物分离，具有出色的峰形和分离度。与传统的反相色谱柱和离子交换色谱柱相比，它为应用方法开发提供了更大的灵活性。

12. 我是否需要带有 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 分析柱的保护柱？

可以。强烈建议使用带有 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 分析柱的保护柱。保护柱通过捕获流动相或样品中强保留的组分和微粒，保护了更昂贵的分析柱。

13. 如果色谱柱性能下降，该怎么办？

参见“第 4.7 部分色谱柱清洗程序”了解详细情况。

14. 如果色谱柱背压过高，该怎么办？

首先，请确保流动相在使用前是新鲜制备和过滤的，并且样品中没有颗粒。然后，在监控色谱柱压力变化的同时反冲洗色谱柱一定时间。如果问题持续存在，则更换入口筛板。如上述方法都无效，则购买一根新柱。

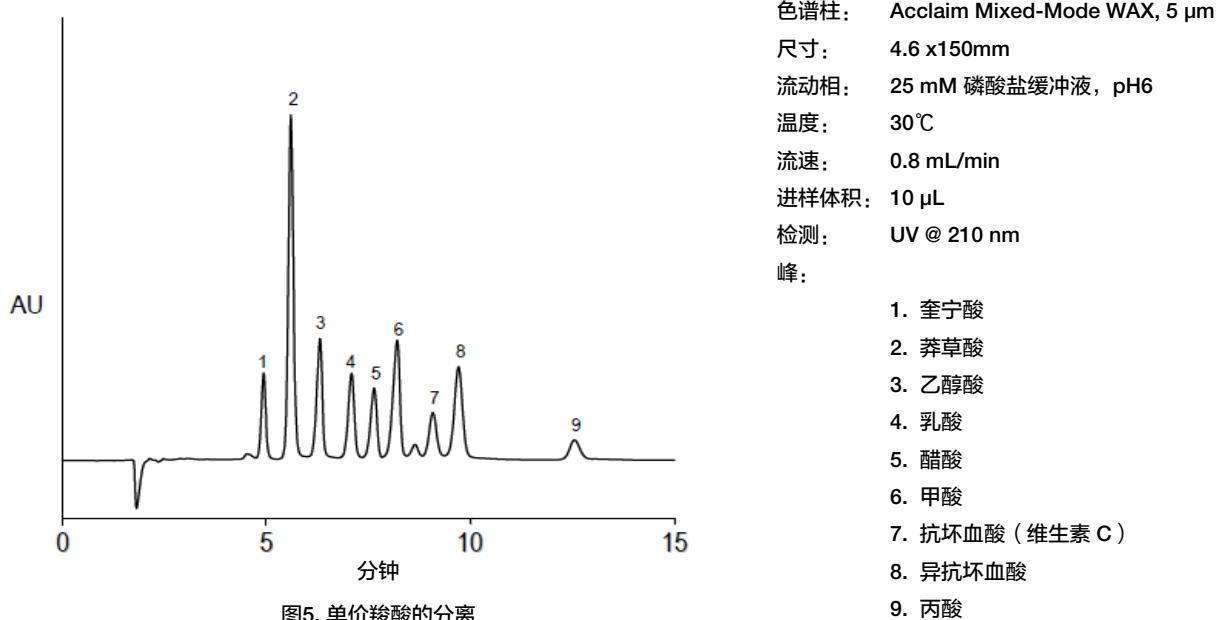


图5. 单价羧酸的分离

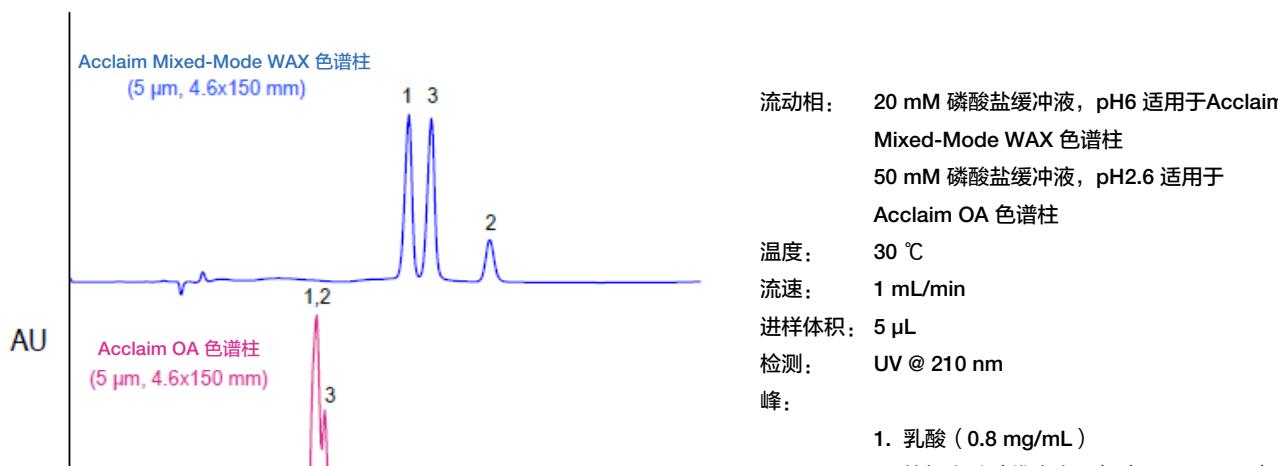
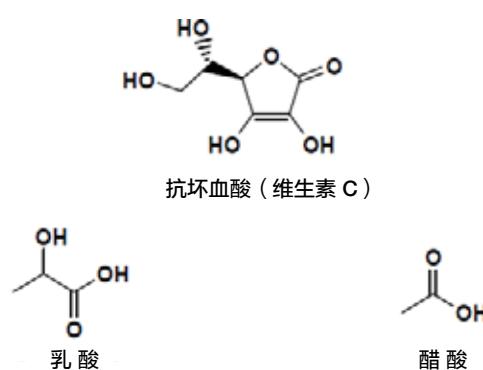


图6. 乳酸、醋酸盐和抗坏血酸的分离



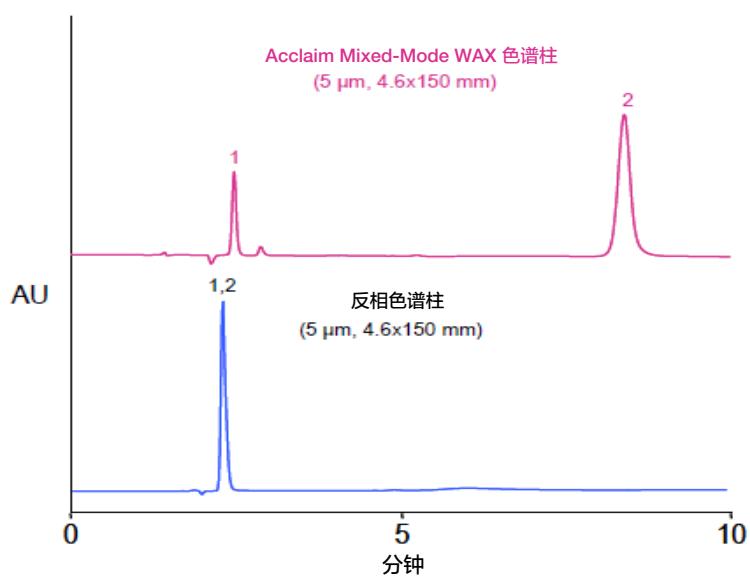


图7. 奎宁酸和酒石酸的分离

流动相: 40/60 v/v 乙腈/50 mM 磷酸盐缓冲液, pH6.0 适用于 Acclaim Mixed-Mode WAX 色谱柱
50 mM 磷酸盐缓冲液, pH2.6 适用于反相色谱柱

温度: 30 °C

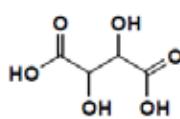
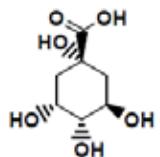
流速: 1 mL/min

进样体积: 5 μ L

检测: UV @ 210 nm

峰:

1. 奎宁酸 (1 mg/mL)
2. 酒石酸 (1 mg/mL)



奎宁酸

酒石酸

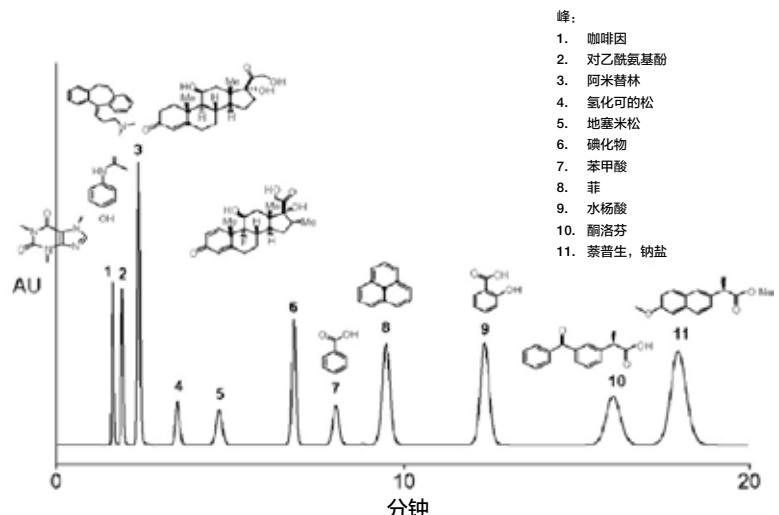


图8. 酸性、中性和碱性分子的等度分离

色谱柱: Acclaim Mixed-Mode WAX, 5 μ m

尺寸: 4.6 x 150 mm

流动相: 50/50 v/v 乙腈/缓冲液 (1000 g 去离子水中的 6.8 g 单磷酸钾和 0.5 g 焦磷酸, 以 NaOH 将 pH 调节至 6.0)

温度: 30°C

流速: 1 mL/min

进样体积: 5 μ L

检测: UV @ 220 nm

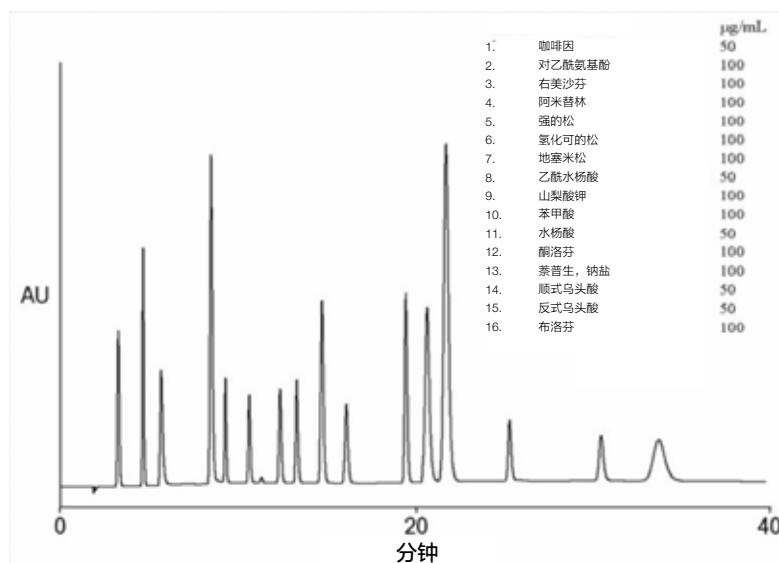


图9. 酸性、中性和碱性分子的梯度分离

色谱柱: Acclaim Mixed-Mode WAX, 5 μ m

尺寸: 4.6 x 150 mm

流动相: A - 乙腈;
B - 去离子水;
C - 150 mM 磷酸盐缓冲液, pH6.0

梯度:

	时间	%A	%B	%C
15	10	80	10	
0	10	80	10	
10	50	40	10	
12	50	40	10	
25	50	0	50	
40	50	0	50	

温度: 30 °C

流速: 1 mL/min

进样体积: 15 μ L

检测: UV @ 220 nm

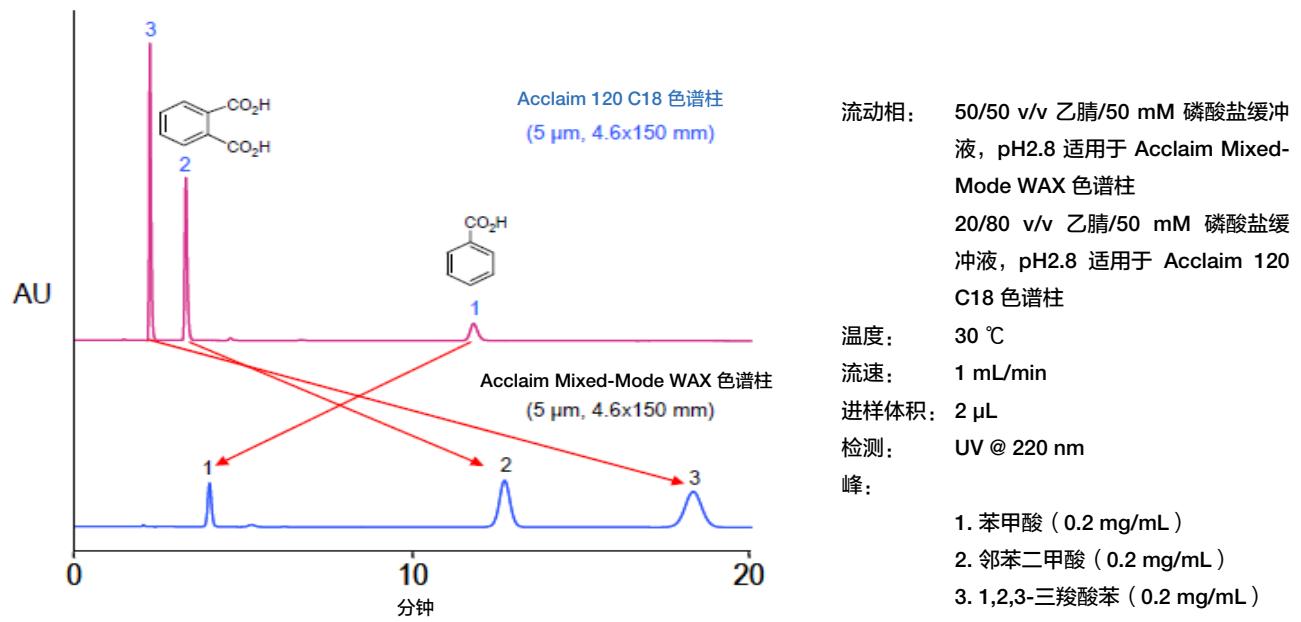
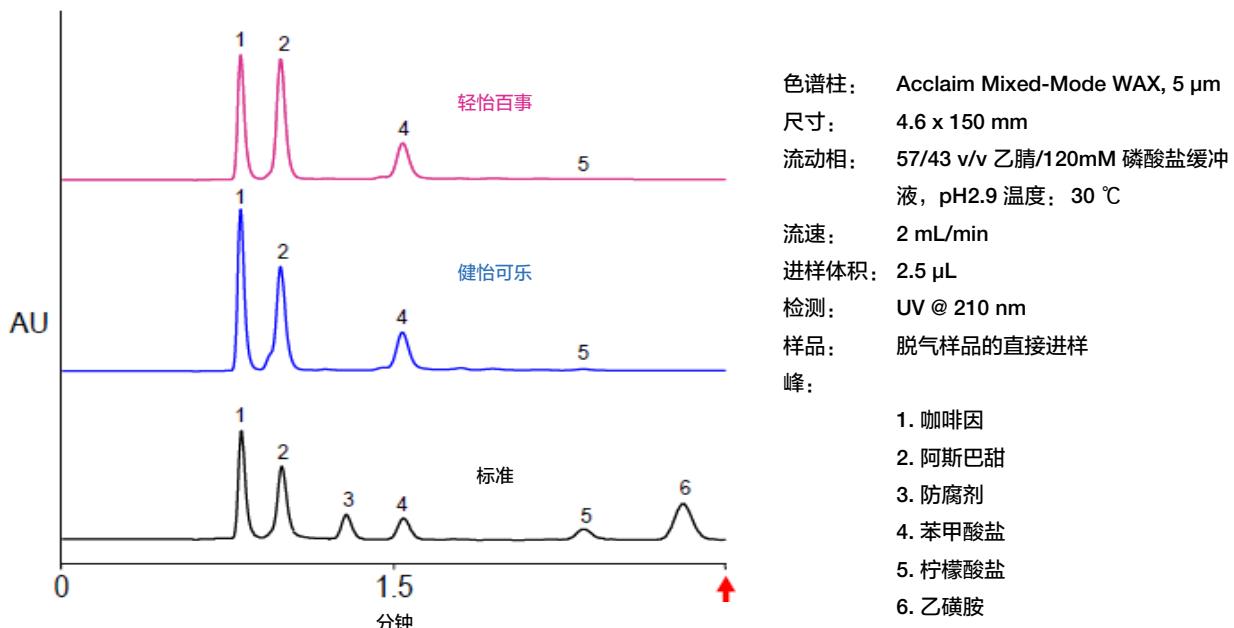


图11. 反相色谱柱的正交选择性 – I

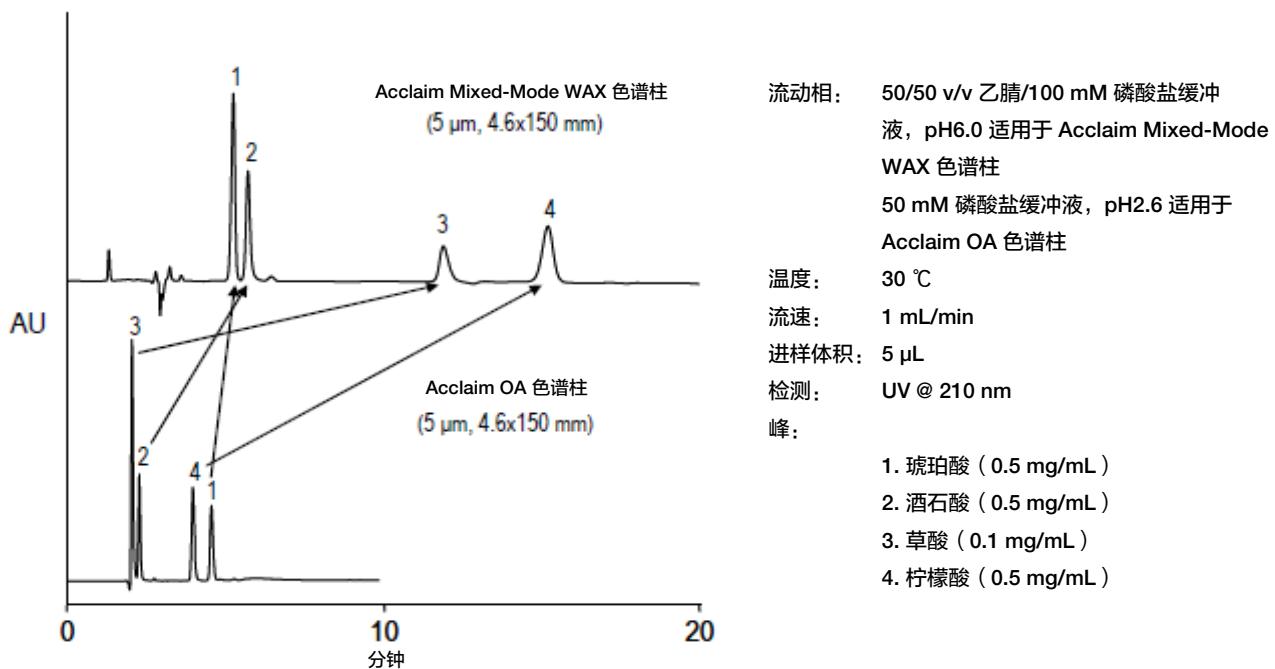


图12. 反相色谱柱的正交选择性 – II

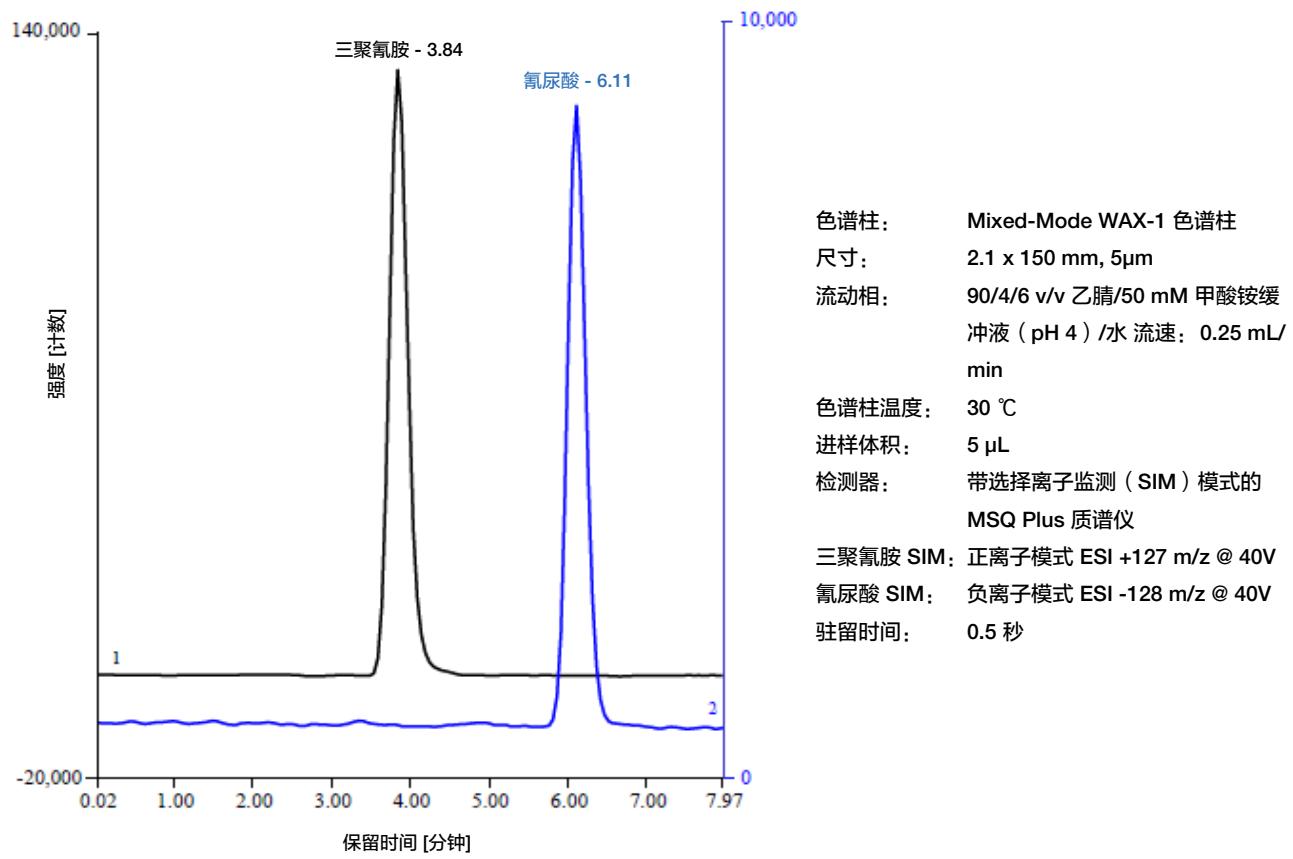


图13. Mixed-Mode WAX-1 色谱柱上的三聚氰胺和三聚氰酸

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588

成都

成都市临江西路1号川投大厦1406 室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

南京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 010-87946888

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206 单元
邮编 510000
电话 020-82401600

武汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2~5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

欲了解更多信息, 请扫描二维码关注我们的微信公众账号与官方网站。



赛默飞
官方微信



赛默飞
官方网站

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

赛默飞世尔科技在全国有共14个商业办公室。本资料中的信息, 说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

ThermoFisher
SCIENTIFIC