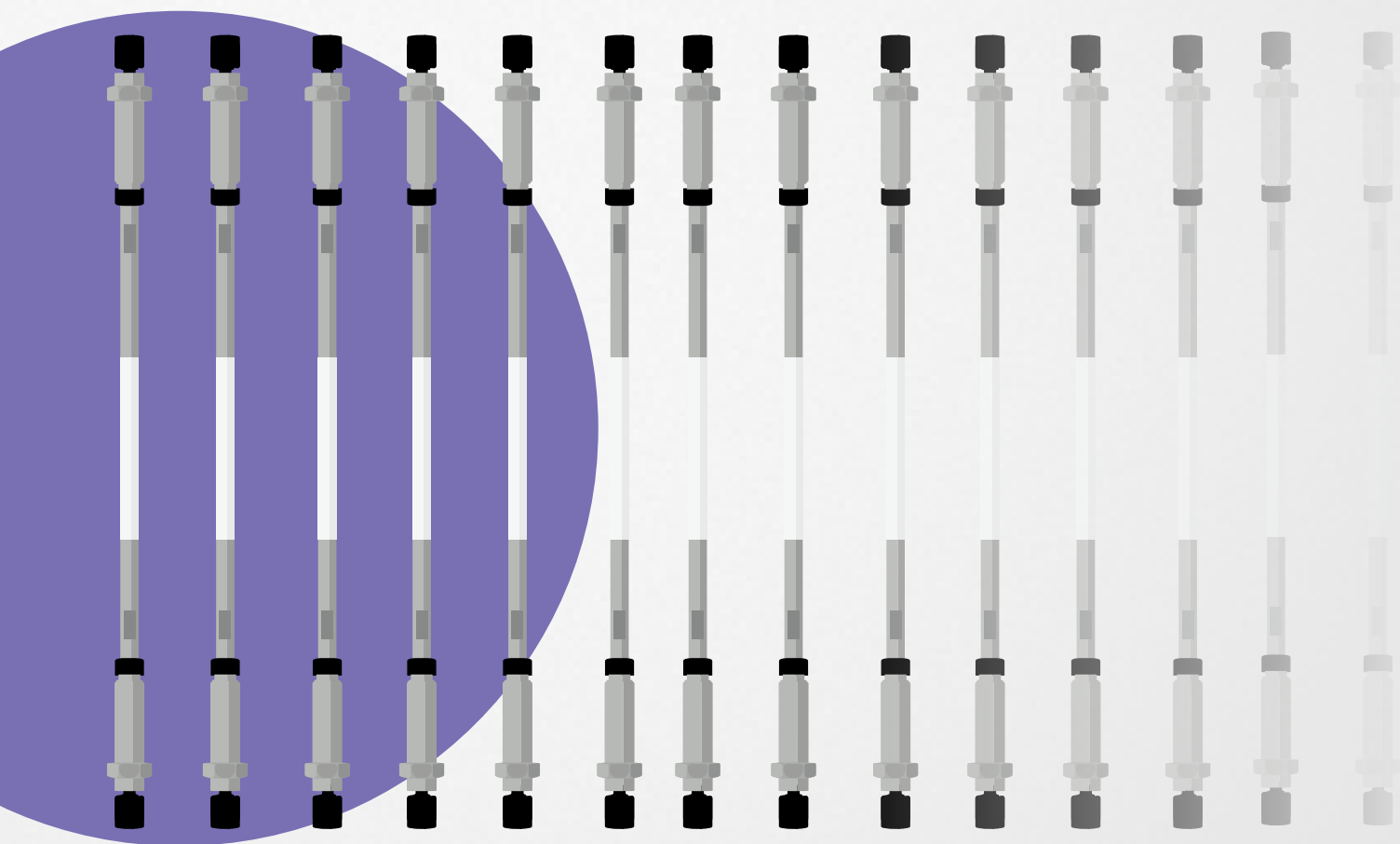


色谱柱

# Acclaim Mixed-Mode WCX-1

## 色谱柱快速操作和维护保养手册



# 目 录

<b>第 1 部分 – 引言 .....</b>	<b>4</b>
1.1 Mixed-Mode 色谱和反相、离子交换和离子配对色谱的比较 .....	4
1.2 特征 .....	5
1.3 指标和操作条件 .....	5
1.4 物理特征 .....	5
1.5 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 产品 .....	5
<b>第 2 部分 –安装： 分解步骤用户手册 .....</b>	<b>6</b>
2.1 步骤 1 - 查看色谱柱 .....	6
2.2 步骤 2 - 流动相制备 .....	6
2.2.1 去离子水 .....	6
2.2.2 溶剂 .....	6
2.2.3 柱效测试的流动相 .....	6
2.3 步骤 3 - 设定 LC 系统 .....	7
2.4 步骤 4 - 色谱柱活化平衡 .....	7
2.5 步骤 5 - QAR 报告中色谱图的重现 .....	7
2.6 步骤 6 - 真实样品分析 .....	7
2.7 QAR 报告示例 .....	8
2.7.1 QAR 示例 1 - 4.6 x 150 mm .....	8
2.7.2 QAR 示例 2 - 4.6 x 250 mm .....	9
<b>第 3 部分– 方法开发 .....</b>	<b>10</b>
3.1 离子强度 .....	10
3.2 有机改性剂 .....	10
3.3 流动相 pH .....	11
3.4 等度与梯度 .....	11
3.5 HILIC 模式 .....	12
3.6 缓冲盐类型 .....	12

<b>第 4 部分– 色谱柱维护 .....</b>	<b>13</b>
4.1 流动相.....	13
4.2 保护柱.....	13
4.3 色谱柱存储 .....	13
4.4 推荐操作 pH 范围 - pH 2.5 至 7.0.....	13
4.5 推荐操作温度限值 ( 40 °C ) .....	13
4.6 流速和压力限值 .....	13
4.7 色谱柱清洗程序 .....	14
<b>第 5 部分– 常见问题.....</b>	<b>15</b>
<b>第 6 部分– 正交选择性实例.....</b>	<b>17</b>
6.1 WCX vs. RP – 正交选择性.....	17
6.2 WCX vs. WAX – 正交选择性.....	17
6.3 WCX vs. WAX – 正交选择性.....	18
<b>第 7 部分 – 应用.....</b>	<b>19</b>
7.1 酸性、中性和碱性药物的同时分离 .....	19
7.2 儿茶酚胺的分离 .....	19
7.3 抗抑郁药的分离.....	20
7.4 季胺分析 .....	20
7.5 分析 Tris Hcl 盐 .....	21
7.6 烷基季磷盐分析 .....	21
7.7 葡萄糖胺片的分析.....	22
7.8 NaCl 的分析 – 离子强度效应.....	22

Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱基于一种新型的 Mixed-Mode 硅胶填料，兼具疏水性和弱阳离子交换特性。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阳离子化合物，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 WCX-1 归属于 L85。

## 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（例如儿茶酚胺），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，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（见图 1）。键合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。

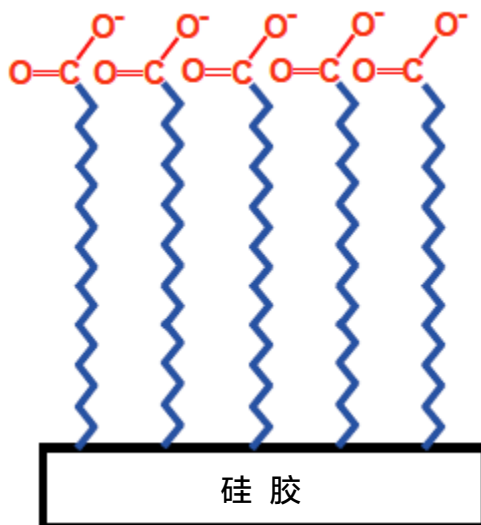


图 1. Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱

## 1.2 特征

可调节选择性（图 2-4） 与反相色谱柱互补的选择性（图 6） 正交选择性（图 7-8） 分离基本分子的理想选择性（图 10-14）

多模式分离机制：反相，阳离子交换，阴离子排斥和 HILIC（图 5、16 和 17）同时分离酸性、中性和碱性化合物（图 9）

## 1.3 指标和操作条件

运输溶液： 50/50 v/v 乙腈/0.1M 醋酸铵，pH5

储存溶液（推荐）： 50/50 至 90/10 v/v 乙腈/10 - 100 mM 醋酸铵，pH 4 至 5

范围： 2.5 - 7.0

推荐操作 pH 范围： 3 至 6.5

温度范围： < 50 °C

推荐操作温度： < 40 °C

推荐操作压力： < 3500 psi

	推荐最高压（psi）	典型流速（mL/min）
3 µm, 3.0 x 50mm	4500	0.2 – 1.2
3 µm, 3.0 x 150mm	5800	0.2 – 1.2
3 µm, 2.1 x 150mm	5800	0.1 – 0.60
5 µm, 2.1 x 150mm	5800	0.1 – 0.60
5 µm, 4.6 x 150mm	5800	0.5 – 3.0
5 µm, 4.6 x 250mm	5800	0.5 – 3.0

## 1.4 物理特征

键合化学： 专有的烷基羧基

硅基质： 球形，多孔，高纯

粒径： 5 µm，3 µm

表面积是： 300 m<sup>2</sup>/g

孔径： 120 Å

## 1.5 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 产品

货号	描述
069707	Acclaim 保护柱套装（柱套和连接器）V-2
069580	Acclaim 保护柱柱套 V-2
074188	Acclaim 保护柱连接器 V-2

Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱				
	粒径	色谱柱格式	货号	所需柱套
分析柱	3 µm	3.0 x 50mm	071910	-
		3.0 x 150mm	070092	-
		2.1 x 150mm	070093	-
	5 µm	2.1 x 150mm	068371	-
		4.6 x 150mm	068353	-
		4.6 x 250mm	068352	-
保护柱	5 µm	2.1 x 10mm	085455	069707
		3.0 x 10mm	071911	
		4.6 x 10mm	069705	

# 安装：分解步骤用户手册

建议您在使用前对 Acclaim Mixed-Mode WCX-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。步骤 1-5 列出了执行该测试的必要步骤。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。

## 2.1. 步骤 1 - 查看色谱柱

向赛默飞公司报告任何观察到的损伤。

## 2.2. 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光学杂质。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。

### 2.2.1 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。



#### 注释

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”。

### 2.2.2. 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。

### 2.2.3. 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）。预混器和比例阀生成的流动相可以提供满意的结果。比例阀的使用为方法优化提供更好的灵活性，同时预混的流动相降低了基线噪音。

### 2.2.3.1 例 A. 50 mM, pH6 磷酸缓冲液的制备

1. 称量 13.6 g 磷酸二氢钾。
2. 将上述盐完全溶解在 2000g 的去离子水中。
3. 使用 HCL 或 NaOH 将溶液调节为 pH6。

\* 有时, 可以使用少量的焦磷酸盐 ( 0.1 g/L ) 消除流动相、仪器和/或色谱柱硬件的金属干扰。

### 2.2.3.2 例 B. 100 mM, pH5 乙酸铵缓冲液的制备w

1. 称量 50g 乙酸铵缓冲液 ( 2M, pH5.4 ) 。
2. 在上述溶液中加入 950g 去离子水。

## 2.3 步骤 3 - 设定 LC 系统

使用一个标准 LC 系统, 包括 LC 泵、柱温箱、紫外检测器和进样器 ( 或自动进样器 ) 。在使用之前应该完全启动系统。

## 2.4 步骤 4 - 色谱柱活化平衡

该柱存放在乙腈乙酸铵混合物中运输。首次使用新色谱柱时, 应先用流动相彻底清洗 ( 例如, 以 1 mL/min 的速度冲洗至少 30 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, 应对柱进行充分活化平衡 ( 例如以 1 mL/min 的速度进行 30 分钟 ) 。

## 2.5 步骤 5 - QAR

报告中色谱图的重现 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。

## 2.6 步骤 6 - 真实样品分析

一旦获得满意结果, 色谱柱即可使用 ( 参阅第 3 和 4 部分 ) 。

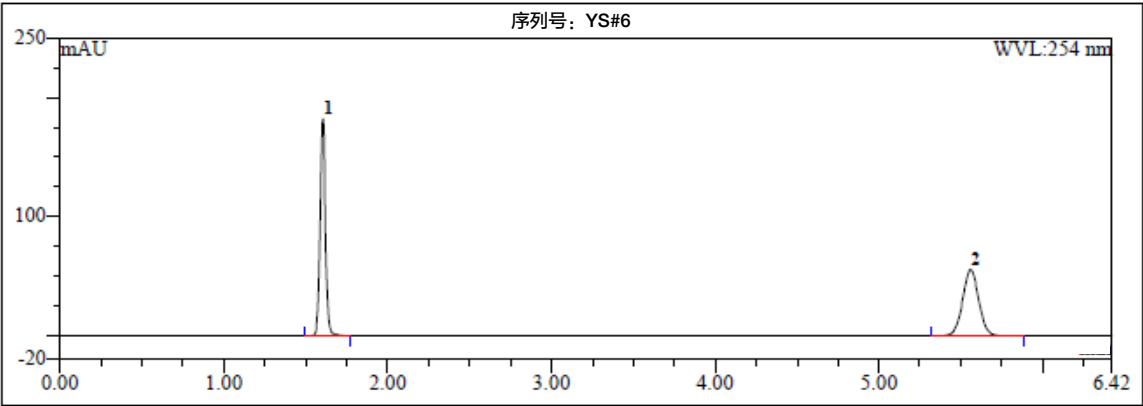
2.7 QAR 报告示例

2.7.1QAR 示例 1 - 4.6 x 150 mm

Acclaim® Mixed-Mode WCX-1 5µm 120Å ( 4.6 x 150 mm )

Part No. 068353

日期: 2008 年 2 月 12 日 15:31  
序列号: YS#6  
批次号: 112  
流动相: 50:50 v/v 乙腈:0.10 M NH4OAc, pH 5.4  
流速: 1.00 mL/min  
温度: 30 °C  
检测: UV, 254 nm  
进样体积: 5.0 µL  
储存溶液: 50:50 v/v 乙腈:0.10 M NH4OAc, pH 5.4



编号	峰名	保留时间 (分钟)	不对称因子 (EP)	柱效 (1) (EP)	浓度 (µg/mL)
1	胞嘧啶	1.6	0.99	12251	100
2	萘	5.6	1.03	15633	100

QA 结果:

待测物	参数	指标	结果
萘	柱效	$\geq 10,800$	通过
萘	不对称因子	0.95-1.32	通过
萘	保留时间	4.8-5.8	通过
萘	压力	$\leq 1320$	通过

产品参考:

数据源: QAR  
路径: Acclaim\Mixed-Mode\_WCX  
序列: 068353\_MMWCX\_46X150MM  
样品号: 1

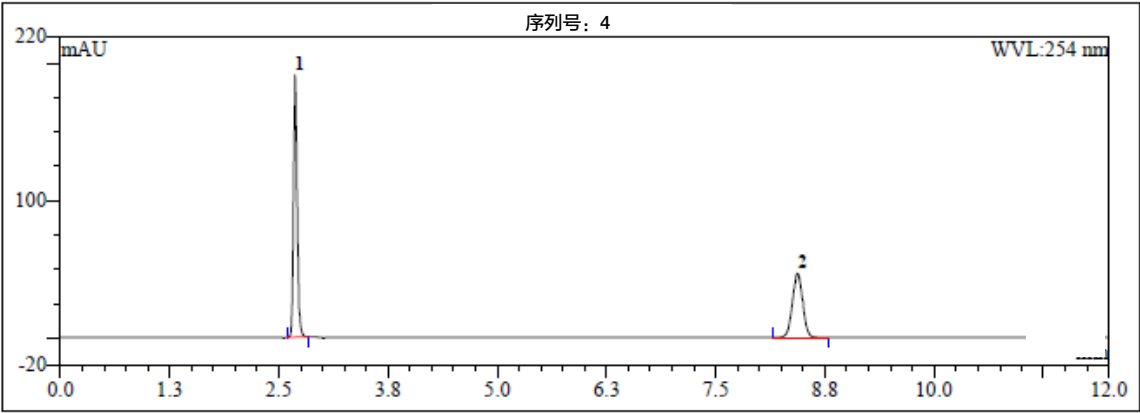


2.72 QAR 示例 2 - 4.6 x 250 mm

Acclaim® Mixed-Mode WCX-1 5µm 120Å ( 4.6 x 250 mm )

Part No. 068352

日期: 2007 年 12 月 18 日 13:00  
序列号: 000004  
批次号: 93  
流动相: 50:50 v/v 乙腈:0.10 M NH<sub>4</sub>OAc, pH 5.4  
流速: 1.00 mL/min  
温度: 30 °C  
检测: UV, 254 nm  
进样体积: 5.0 µL  
储存溶液: 50:50 v/v 乙腈:0.10 M NH<sub>4</sub>OAc, pH 5.4



编号	峰名	保留时间 (分钟)	不对称因子 (EP)	柱效 (1) (EP)	浓度 (µg/mL)
1	胞嘧啶	2.7	1.22	20607	100
2	萘	8.4	1.02	24885	100

QA 结果:

待测物	参数	指标	结果
萘	柱效	>=16,200	通过
萘	不对称因子	0.95-1.32	通过
萘	保留时间	8.0 - 9.6	通过
	压力	<=1980	1377

产品参考:

数据源: QAR  
路径: Acclaim\Mixed-Mode\_WCX  
序列: 068352\_MMWcx\_46X250m m  
样品号: 1

为了优化色谱方法，流动相离子强度、pH和有机改性剂是可独立或同时调节的三个关键变量。

## 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。增加离子强度导致保留减少，极少情况下会使保留增加，实际上几乎对碱性、酸性和中性分子没有影响。

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu$ m  
 尺寸: 4.6 x 150 mm  
 流动相: 50/50 v/v 乙腈/磷酸钠, pH6.5  
 温度: 30°C  
 流速: 1 mL/min  
 进样体积: 5  $\mu$ L  
 检测: UV (215 nm)  
 峰:

峰	物质	保留时间 (min)
1	苯甲酸	200
2	萘	50
3	苄胺	300

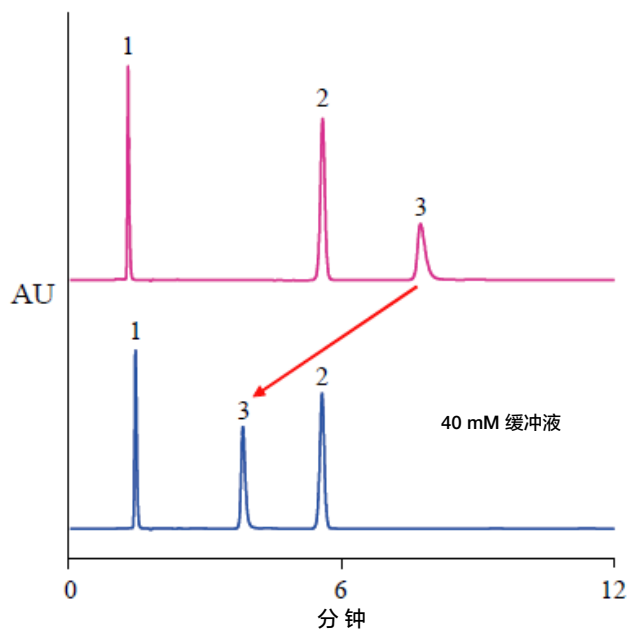


图 2. 可调选择性 - 离子强度效应

## 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。

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu$ m  
 尺寸: 4.6 x 150 mm  
 流动相: 乙腈/30 mM 磷酸钠, pH6.5  
 温度: 30°C  
 流速: 1 mL/min  
 进样体积: 5  $\mu$ L  
 检测: UV (215 nm)  
 峰:

峰	物质	保留时间 (min)
1	苯甲酸	200
2	萘	50
3	苄胺	300

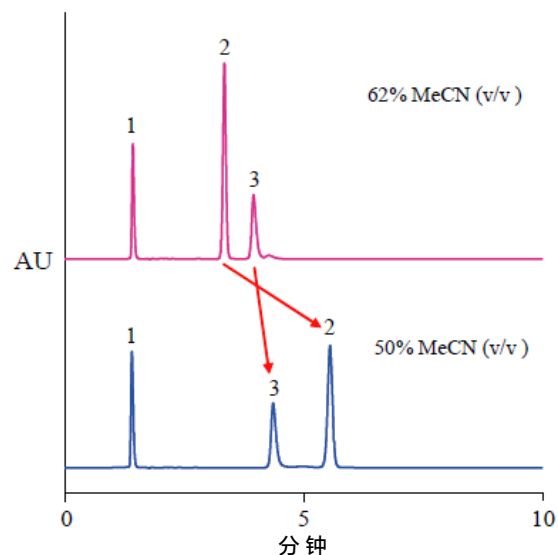


图3. 可调选择性 - 有机改性剂效应

### 3.3 流动相 pH

流动相的 pH 影响固定相的电荷和疏水性。在低于固定相羧基的 pKa 的 pH 值下，阳离子交换功能为“OFF”，因此疏水相互作用是主要的保留机制。在高于固定相羧基的 pKa 的 pH 值下，阳离子交换功能为“ON”，因此阳离子交换和疏水相互作用都会有利于保留，这主要取决于待测物结构。因此，通过调节流动相 pH 可以调节选择性。

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5 µm

尺寸: 4.6 x 150 mm

流动相: 50/50 v/v 乙腈/10 mM 磷酸钠

温度: 30 °C

流速: 1 mL/min

进样体积: 5 µL

检测: UV (215 nm)

峰: µg/mL

1. 苯甲酸	200
2. 萘	50
3. 苄胺	300

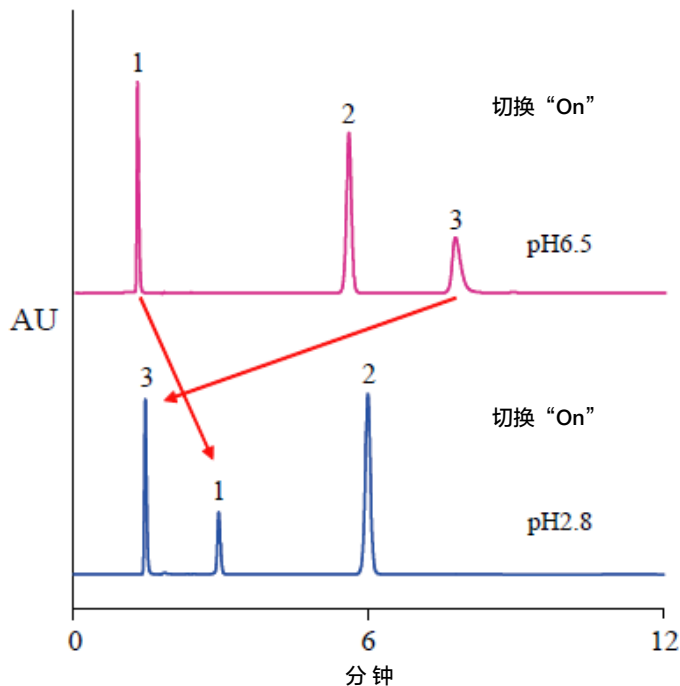


图4. 可调选择性 - pH 效应

### 3.4 等度与梯度

对于许多涉及少于三个分子的应用，通常在 Acclaim Mixed-Mode WCX 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。

### 3.5 HILIC 模式

Acclaim Mixed-Mode WCX 色谱柱可以在 HILIC 模式下操作（参看图 5）。在这种模式下，乙腈（不是甲醇）的使用范围应为 80% 到 95%。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。流动相中有机成分越高，对高极性分子的保留能力则越强。

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu\text{m}$   
尺寸: 4.6x150 mm  
流动相: MeCN/NH<sub>4</sub>OAc, pH5（总体 5 mM）  
v/v 95/5, 用于 HILIC 模式运行  
v/v 50/50, 用于反相模式运行  
温度: 30  $^{\circ}\text{C}$   
流速: 1 mL/min  
进样体积: 5  $\mu\text{L}$   
检测: UV（270 nm）  
峰: 每个 100 ppm  
1. 胞嘧啶  
2. 萘

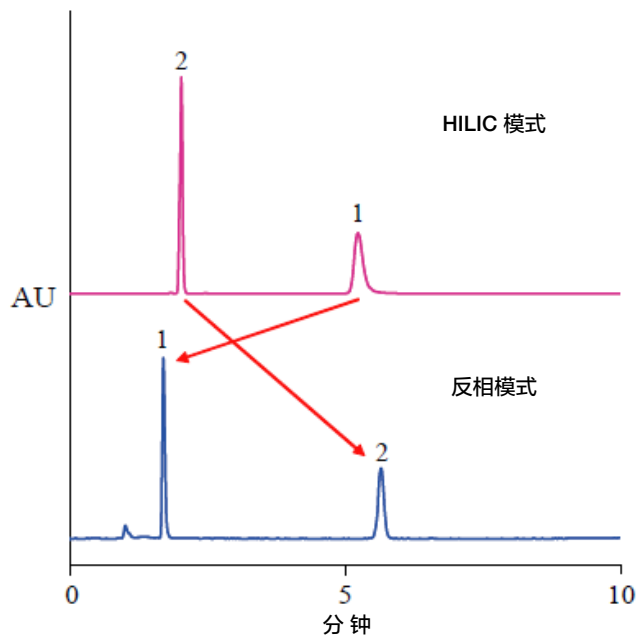


图5. 反相模式 vs. HILIC 模式

### 3.6 缓冲类型

Acclaim Mixed-Mode WCX 色谱柱应在缓冲流动相中使用。在其工作 pH 范围内（pH 2.5 至 7.0），该色谱柱可与各种典型的 HPLC 流动相（例如磷酸盐缓冲液，乙酸盐缓冲液等）兼容。

## 4.1 流动相

流动相应现做现用。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。长期来说，可以使用 pH 在 3 和 6 之间有机成分较高的缓冲液。推荐储存液是 50/50 至 90/10 v/v 乙腈（或甲醇）/10 至 100 mM 醋酸铵，pH 4 至 5

## 4.4 推荐操作

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 3.0 - 6.5。

## 4.5 推荐操作温度限值（40 °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，在推荐的流速下，以 1 mL/min 的流速可获得良好的柱效（请参见第 1.3 部分中的表），而在不超过压力限制的前提下，可以在提供的快速分析中使用较高流速。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 0.2 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 乙酸铵（或钠）乙酸盐缓冲液，pH5/乙腈 v/v 50/50 以建议的流速冲洗 3 倍柱体积（请参见第1.3 部分中的表）。
2. 用 100 mM 乙酸铵（或钠）乙酸盐缓冲液，pH5/乙腈 v/v 50/50 以 0.2 至 1 mL/min 的流速（为了去除强保留的阳离子）冲洗 20 倍柱体积。
3. 用 0.1% 草酸的去离子水溶液，以 0.2 到 1 mL/min 的流速（为了去除金属污染）冲洗 20 倍柱体积。
4. 用 20 mM 乙酸铵（或钠）乙酸盐缓冲液，pH5/乙腈 v/v 50/50 以 0.2 至 1 mL/min 的流速冲洗 3 倍柱体积。
5. 用 20 mM 乙酸铵（或钠）乙酸盐缓冲液，pH5/乙腈 v/v 25/75 以 0.5 至 1 mL/min 的流速（为了去除强保留的疏水化合物）冲洗 20 倍柱体积。
6. 以流动相平衡柱。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。



### 注释

如果打算用于 LC-MS 应用，则可以使用醋酸铵缓冲液代替磷酸盐缓冲液。如果上述处理无法改善柱效，则请更换新柱。

## 5.1 什么是 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱？

这是一种新型的 Mixed-Mode 硅胶色谱柱，兼具疏水性和弱阳离子交换特性。它的表面化学特征是带有羧基末端的烷基长链。该色谱柱在分离包含混合物（包括药品、食品和饮料、化学药品等）的各种阳离子化合物方面具有巨大的潜力。

## 5.2 为什么需要 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱？

Acclaim Mixed-Mode WCX-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。

## 5.3 何时需要 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱？

每当在常规 C18 色谱柱上遇到困难且具有挑战性的碱性分析物分离时，都可以考虑使用 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 色谱柱。

以下情形适用：

- 1) 分离碱性分子，例如抗抑郁药、儿茶酚胺、一些无机阳离子（锂和钠）、季胺等。
- 2) 同时分离酸性药物和对离子
- 3) 您需要正交于反相色谱柱的选择性
- 4) 同时分离碱性、中性和酸性分子的混合物

## 5.4 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。

## 5.5 适用该色谱柱的流动相有哪些？

原则上，该色谱柱可与大多数HPLC流动相兼容。我们的实验数据表明磷酸盐缓冲液和乙酸铵缓冲液均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5到100 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。

## 5.6 在开始使用 Acclaim Mixed-Mode WCX-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。

## 5.7 可以在此色谱柱上分析哪些类型的碱性化合物？

您可以使用此色谱柱分离各种很难在反相色谱柱上分离的碱性化合物，例如抗抑郁药、儿茶酚胺、某些无机阳离子（例如  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$ ）和某些季胺盐。

## 5.8 如何存储色谱柱？

参阅“第 4.3 部分色谱柱存储”了解详细情况。

## 5.9 我可以使用该色谱柱分析酸性分子吗？

可以。根据分析物的性质，具有中等至更高疏水性的酸性分子可以在 2.5 至 4.5 的 pH 范围内保留和分离。

## 5.10 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，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 HILIC 模式分离。

## 5.11 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 9 所示，Acclaim Mixed-Mode WCX-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。

## 5.12 我是否需要带有 Acclaim Mixed-Mode WCX-1 分析柱的保护柱？

可以。强烈建议使用带有 Acclaim Mixed-Mode WCX-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。

## 5.13 如果色谱柱性能下降，该怎么办？

有关详细信息，请参见“第 4.7 部分色谱柱清洗程序”。

## 5.14 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，则更换入口柱床筛板。如上述方法都无效，则购买一根新柱。



# 正交选择性实例

## 6.1 WCX vs. RP – 正交选择性

色谱柱:	5 $\mu$ m
尺寸:	150 x 4.6 mm
流动相:	50/50 v/v MeCN 磷酸钠缓冲液, pH6.5 (总共10 mM)
温度:	30 $^{\circ}$ C
流速:	1 mL/min
进样体积:	5 $\mu$ L
检测:	UV (215 nm)
峰:	$\mu$ g/mL
1. 苯甲酸	200
2. 萘	50
3. 苄胺	300

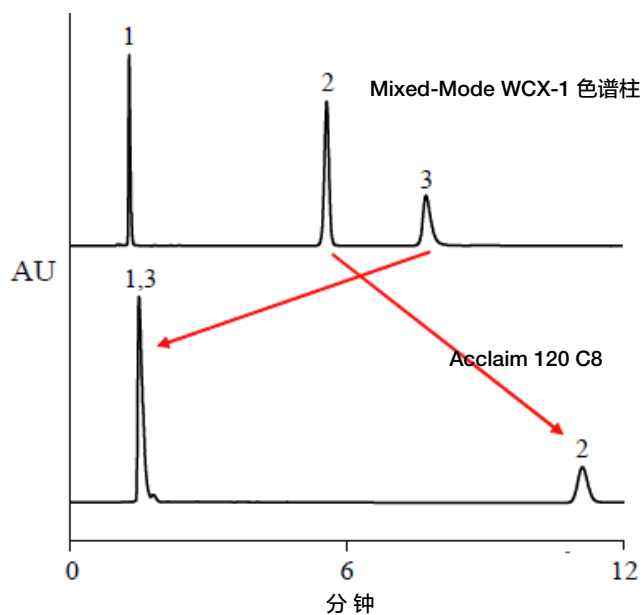


图6. WCX vs. RP – 正交选择性

## 6.2 WCX vs. WAX – 正交选择性

色谱柱:	5 $\mu$ m
尺寸:	150 x 4.6 mm
流动相:	60/40 v/v MeCN/20 mM 磷酸钠缓冲液, pH6.5
温度:	30 $^{\circ}$ C
流速:	1 mL/min
进样体积:	5 $\mu$ L
检测:	UV (215 nm)
峰:	$\mu$ g/mL
1. 苯甲酸	200
2. 萘	50
3. 苄胺	300

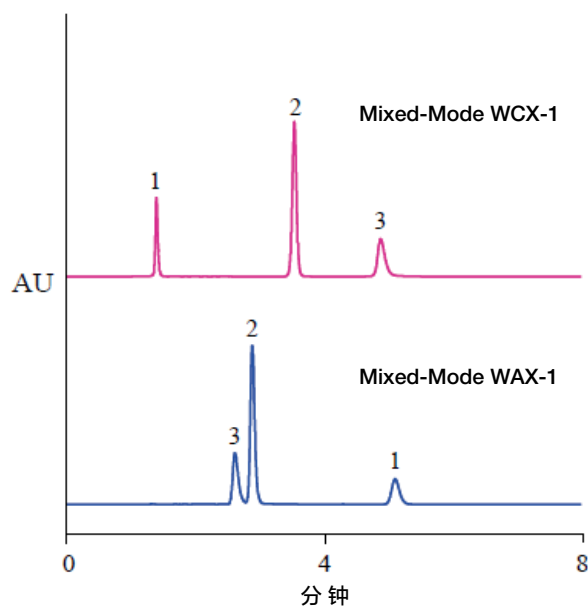


图7. WCX vs. WAX – 正交选择性

### 6.3 WCX vs. WAX – 正交选择性

色谱柱: 5  $\mu\text{m}$   
尺寸: 4.6x150 mm  
流动相: 60/40 v/v MeCN/磷酸钠, pH6.5  
40 mM, 用于 Mixed-Mode WCX-1 色谱柱  
10 mM, 用于 Mixed-Mode WAX-1 色谱柱  
温度: 30°C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 2  $\mu\text{L}$   
检测: UV (215 nm)  
样品: 马来酸曲米帕明 (250 ppm)  
峰:

1. 马来酸盐

2. 曲米帕明

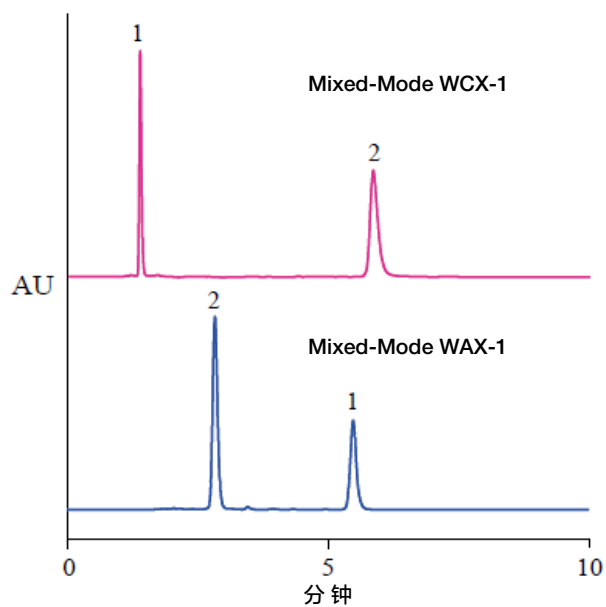
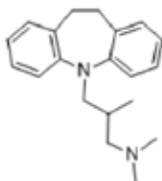
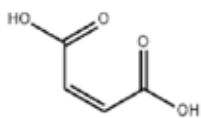


图8. WCX vs. WAX – 正交选择性

## 7.1 酸性、中性和碱性药物的同时分离

色谱柱:	Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5 µm
尺寸:	150 x 4.6 mm
流动相:	40/60 v/v MeCN/NH <sub>4</sub> OAc, pH5.2 (总共20 mM)
温度:	30°C
流速:	1 mL/min
进样体积:	5 µL
检测:	UV (225 nm)
峰:	µg/mL
1. 马来酸盐	50
2. 酮洛芬	30
3. 萘普生	30
4. 氢化可的松	60
5. 地塞米松	60
6. 羟丙诺醇	300
7. 蒂莫洛尔	250

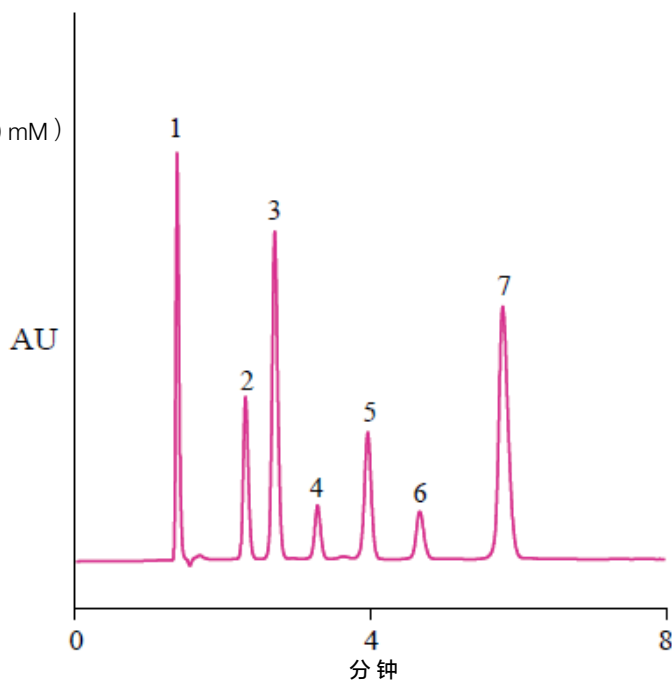


图9. 酸性、中性和碱性药物的同时分离

## 7.2 儿茶酚胺的分离

色谱柱:	Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5 µm
尺寸:	4.6 x 150 mm
流动相:	2/98 v/v MeCN/磷酸钠, pH6.2 (总浓度 10 mM)
温度:	30°C
流速:	1 mL/min
进样体积:	5 µL
检测:	UV (215 nm)
峰:	(每个 0.25 mM)
1. NE	
2. E	
3. DHBA	
4. DA	

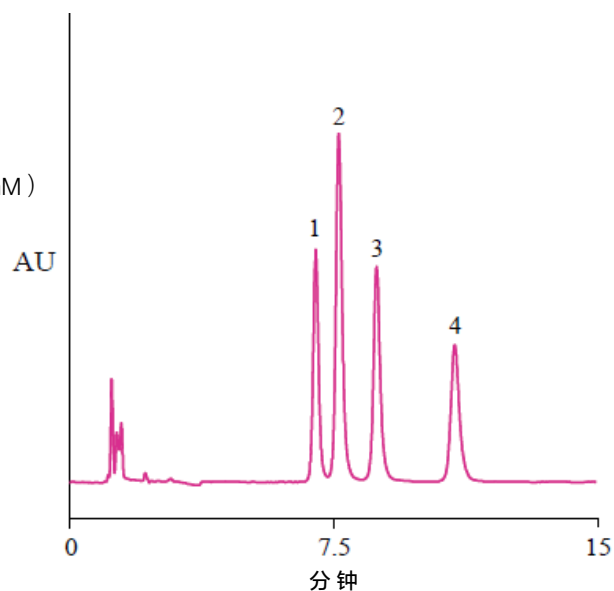


图10. 儿茶酚胺的分离

### 7.3 抗抑郁药的分离

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu$ m  
尺寸: 4.6 x 150 mm  
流动相: 50/50 v/v MeCN/10 mM NH<sub>4</sub>OAc, pH5.2  
温度: 30  $^{\circ}$ C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 5  $\mu$ L  
检测: UV (215 nm)  
峰: 每个 100 ppm  
1. 多塞平 (异构体的混合物)  
2. 丙咪嗪  
3. 曲米帕明  
4. 阿米替林 (As. = 1.08, 11623 板/柱)  
5. 普鲁替林  
6. 去甲替林

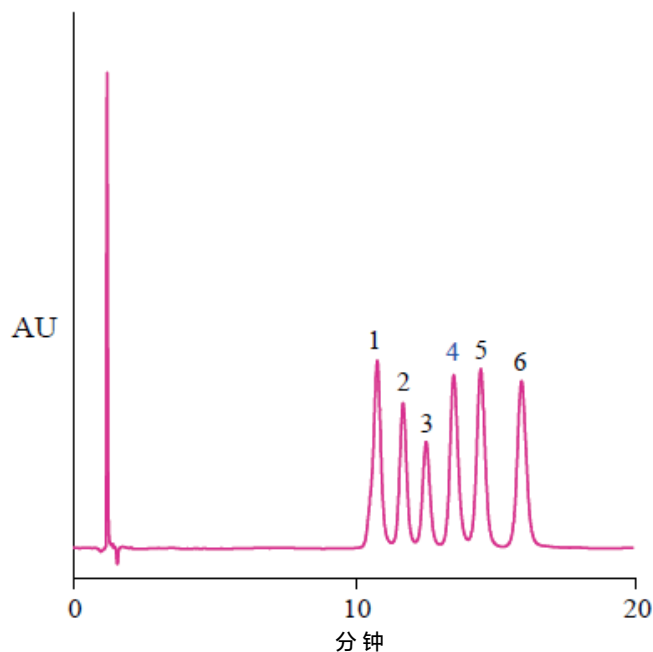


图11. 抗抑郁药的分离

### 7.4 季胺分析

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu$ m  
尺寸: 4.6 x 150 mm  
流动相: 50/50 v/v MeCN/NH<sub>4</sub>OAc, pH5.2  
温度: 30  $^{\circ}$ C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 5  $\mu$ L  
检测: ELS 检测器  
峰: (每个 300 ppm)  
1. (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>  
2. (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>  
3. (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>

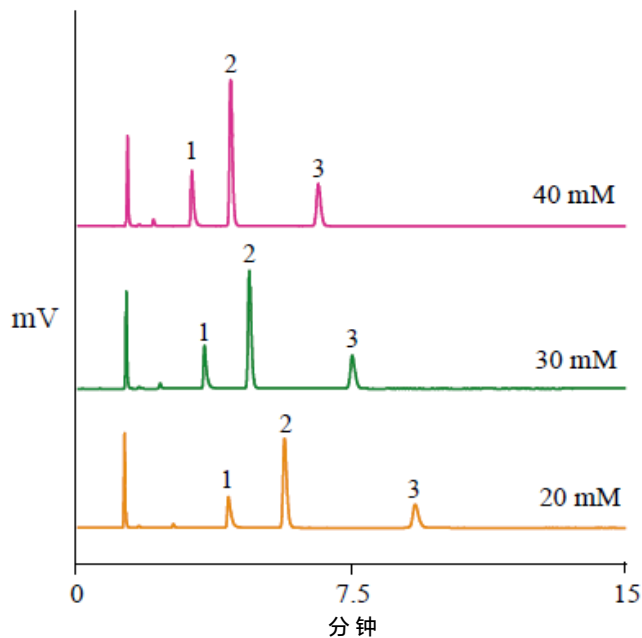


图12. 季胺分析

## 7.5 分析 Tris HCl 盐

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu\text{m}$   
尺寸: 4.6 x 150 mm  
流动相: 50/50 v/v MeCN/ $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH5.2  
温度: 30°C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 5  $\mu\text{L}$   
检测: ELS 检测器  
样品: Tris HCl (1 mg/mL)  
峰:

1.  $\text{Cl}^-$
2.  $\text{TrisH}^+$

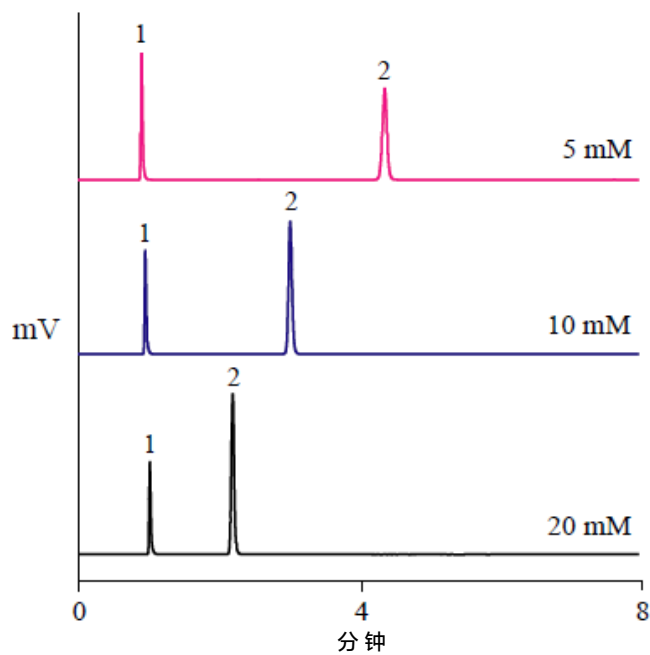


图13. 分析 Tris HCl 盐

## 7.6 烷基季磷盐分析

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu\text{m}$   
尺寸: 150 x 4.6 mm  
流动相: 60/40 v/v MeCN/ $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH5.2  
温度: 30°C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 2  $\mu\text{L}$   
检测: ELS 检测器  
样品: 四丁基溴化磷 (0.1%)  
1.  $\text{Br}^-$   
2.  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{P}^+$

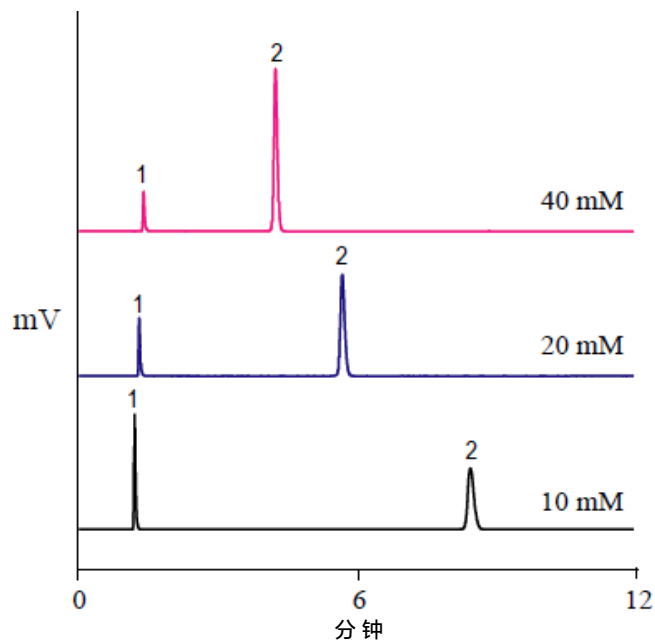


图14. 烷基季磷盐分析

## 7.7 葡萄糖胺片的分析

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu\text{m}$   
尺寸: 150 x 4.6 mm  
流动相: 50/50 v/v MeCN/NH<sub>4</sub>OAc, pH5.2,  
5 mM (总体)  
温度: 30°C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 2  $\mu\text{L}$   
检测: ELS 检测器  
样品: 葡萄糖胺片

### 样品前处理:

1. 仔细研磨 1500 mg 片剂
2. 在 7.5 mL 去离子水和 2.5 mL 甲醇中混合 0.2 g 材料
3. 声波处理 20 分钟
4. 稀释 20 倍
5. 通过 0.1  $\mu\text{m}$  膜滤器过滤

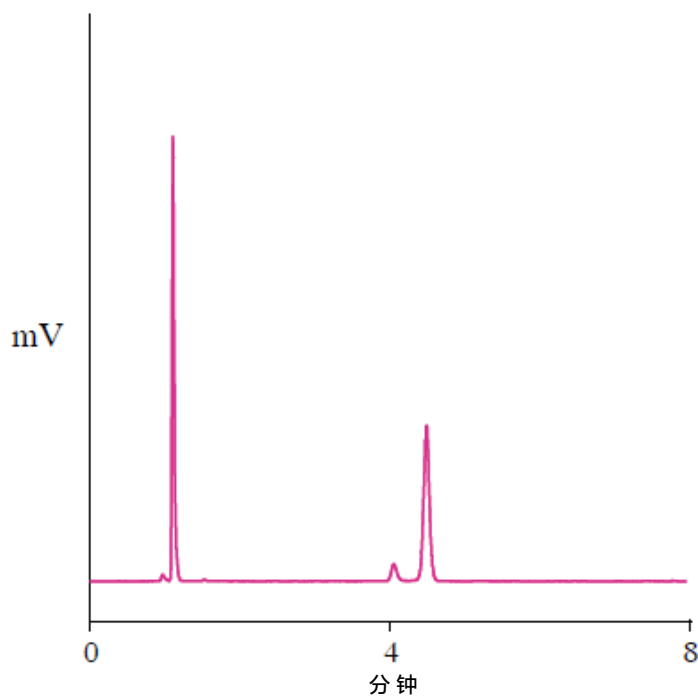


图15. 葡萄糖胺片的分析

## 7.8 NaCl 的分析 – 离子强度效应

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5  $\mu\text{m}$   
尺寸: 4.6x150 mm  
流动相: 50/50 v/v MeCN/NH<sub>4</sub>OAc, pH5  
温度: 30 °C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 2  $\mu\text{L}$   
检测: ELS 检测器  
样品: NaCl (20 mM)  
峰:

1. Cl<sup>-</sup>
2. Na<sup>+</sup>

\* 总浓度

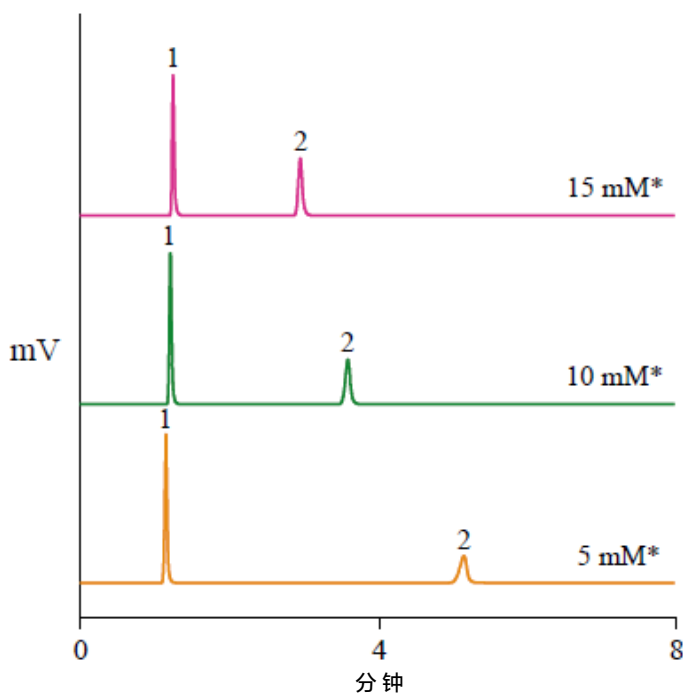


图16. NaCl 的分析 – 离子强度效应

7.9 CaCl<sub>2</sub> 的分析 – pH 效应

色谱柱: Acclaim® Mixed-Mode WCX-1, 5 μm  
尺寸: 4.6 x 150 mm  
流动相: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc 缓冲液  
温度: 30 °C  
流速: 1 mL/min  
进样体积: 2 μL  
检测: ELS 检测器  
样品: CaCl<sub>2</sub> ( 1 mg/mL )  
峰:  
1. Cl<sup>-</sup>  
2. Ca<sup>+</sup>

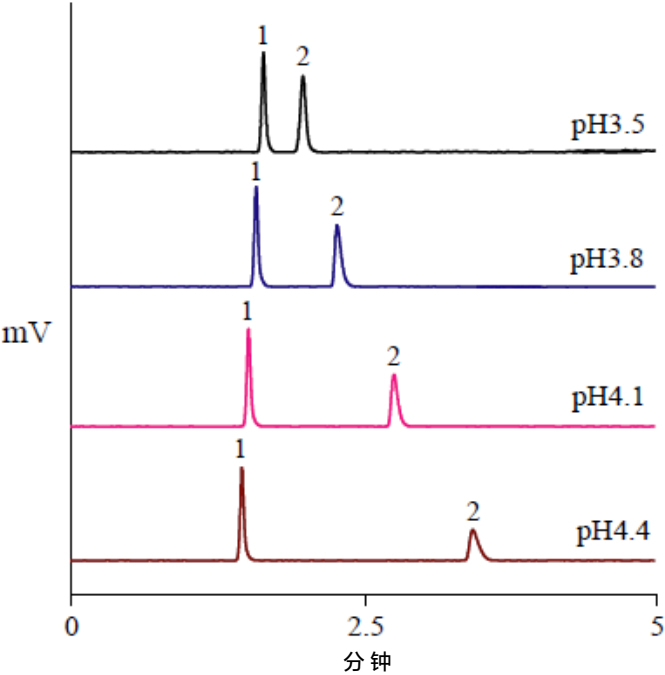


图17. CaCl<sub>2</sub> 的分析 – pH 效应

## 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。



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

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C