

沃特世公司SUGAR-PAK™ I 色谱柱使用说明书

Waters Sugar-Pak I 柱是用来分析糖产品，甜菜、甘蔗、淀粉这些作物在水解过程中的产物，以及用来做糖产品的质量检查，能够将葡萄糖、果糖、麦芽糖、麦芽多糖从典型的玉米糖浆中的高聚物中分离出来。也可用于酒精的发酵过程中跟踪监控发酵糖的减少和酒精的产生。也可以用于药品中的糖或糖醇药效组分的纯度检测，如中国药典2010版新增的“甘露醇”与“甘露醇注射液”中对有关物质和对纯度的检测。

一、使用前注意事项

1. 在将Sugar-Pak I 色谱柱接入HPLC系统之前，确保HPLC系统的洁净，无污染物或颗粒碎屑。可在接柱前用新配制的流动相充分冲洗HPLC系统。（关于流动相，参见第二部分）
2. 将Sugar-pak I 色谱柱连接在HPLC系统上时，注意按柱身上的箭头标识方向，注意与管路接头相接时应相互匹配，避免死体积或者漏液缓慢渗出的问题。（如需管路连接方面的建议，请垂询我们）。
3. Sugar-Pak I 色谱柱的耐受最大压力为2000psig。可将HPLC系统的最大压力预先设置为2000psig或138Bar，避免过压。
4. 开始操作时，打开柱温箱加温，初始设置流速为0.2mL/min，在柱温达到其所需工作温度后继续维持至少二十分钟，再逐步提高流速。我们建议每次按0.1mL/min的幅度来小幅增加流速，并等待压力稳定后再次增加流速，直至达到所需流速。最大流速不能超过0.6mL/min。如柱温低于60°C，最大流速不要超过0.2mL/min，以免柱压过大（温度低时流动相的粘度较大）。
5. 柱温最高不能超过95°C。温度低于70°C时，则对许多糖可能分离效果不佳。如用于乙醇的定量分析时，应使用柱温75°C。

二、流动相要求

1. 流动相中不能使用氯化钙、硝酸钙、或任何其他强酸根钙盐，否则会腐蚀柱和损坏柱填料。

2. 流动相中有机溶剂比例最多不能超过5%v/v。样品中所含少许乙腈、乙醇、甲醇或异丙醇则并不会影响柱性能。

3. 可用含有少许EDTA钙盐的流动相，如含有0.0001M或50mg/L的EDTA钙盐的去离子无菌纯水，来帮助维持柱平衡状态和预防离子置换发生，特别是分析测试物是那些容易导致离子置换的糖如蔗糖。

4. 用于配制流动相的纯水必须经过去离子化，电阻率大于2兆欧。特别重要的是，水中不能含有多价阳离子，尤其是那些过渡金属离子和重金属离子（如铁离子）。

5. 使用前用0.45µm或更小孔径的滤膜过滤流动相以去除细菌和其它颗粒。可使用溶剂过滤器，部件号:WAT085102 (220V)；HAWP04700型滤膜，部件号:WAT085117。

6. 确保流动相进入色谱柱之前已经过脱气处理。保持流动相的容器干净，加盖。流动相应确保新鲜，每24小时需重新配制。

7. 如果被分析的糖样品不易产生置换柱填料中钙离子的问题（如水解产物），则也可使用纯水作为流动相，但同样应该经过过滤、脱气处理。建议定期进行柱再生及柱反向使用，以延长柱寿命。

三、色谱柱平衡

为了保证新色谱柱能在分析使用前已充分平衡了柱上钙离子状态，我们推荐使用以下程序：

1. 将柱子反向安装至HPLC系统，也可用反冲阀；
2. 用至少100ml 的0.001M或约500mg/L的EDTA钙盐溶液在90°C柱温下按0.5mL/min流速反冲柱子；
3. 再将色谱柱按正接方向安装至HPLC系统，使用分析将要使用的流动相冲洗色谱柱直至得到稳定基线。此时，色谱柱就可用于进样分析了。

四、样品制备：用以保护柱性能、延长柱寿命

1. 过滤样品：任何样品在进样前都应过滤以除去不溶性颗粒，延长柱寿命。
2. 进样前过滤：用0.45µm滤膜过滤样品。沃特世水相样品过滤套装(部件号：WAT026865)含有适合的滤膜，沃特世也提供具有更大表面积的抛弃型滤膜(HV过滤部件，部件号 WAT085996)。
3. 在线过滤：如使用了Guard-Pak™保护柱部件，也可用该保护柱套配合抛弃型柱前过滤芯(部件号 WAT032472)使用。如果您并未使用任何保护柱，我们建议您立即使用一个在线柱前过滤器(部件号 WAT084560)来预防任何来自于样品或流动相的颗粒进入色谱柱内。
4. 当样品中含有蛋白质、脂、盐或酸时，都会污染您的色谱柱。应该在进样前或在线去除这些物质，以保护色谱柱。
5. 去除样品中的蛋白质与脂：
蛋白质，脂类如脂肪和油，都会污染色谱柱，而且不能通过使用有机溶剂来清洗柱除去。
当样品中含有大量的脂类物质时，可先通过溶剂萃取如氯仿萃取来除去样品中的大部分的脂。
样品中残留的亲脂性物质可通过固相萃取方法来彻底清除，使用沃特世产品Sep-Pak® C₁₈小柱(部件号 WAT051910)，具体操作步骤请垂询我们。
亦可使用在线过滤保护柱的方式来去除样品中的微量亲脂性物质，产品部件号及使用方法请垂询我们。
6. 去除盐和酸

样品中的盐分和有机酸会与糖分同时流出从而干扰分析。通常来说，强酸盐如氯化钠，在近乎死体积处流出。而弱酸盐，如乳酸盐和醋酸盐，会稍晚流出。

对于一些分子量小的糖样品，可使用沃特世Sep-Pak Alumina A小柱(部件号 WAT051800)来去除盐和酸，具体操作步骤请垂询我们。

五、柱的有效保存，和系统维护(超过72小时以上时)

停止柱温箱加热并停泵停流。当色谱柱冷却下来以后，取出色谱柱，塞上柱堵头。注意在保存的过程中不能让柱发生干燥脱水问题。可使用常规分析的流动相来保持色谱柱。将柱放在5°C下保持(注意不是冷冻室!)可使得长菌问题最小化。

取出色谱柱后，同时也应对仪器进行维护。使用一个两通代替色谱柱，对整个色谱系统进行冲洗，先用水，再用甲醇，HPLC系统可保存在甲醇中。再次使用时，在将柱安装回HPLC系统之前，要用水彻底冲洗系统完全清除管路中的甲醇。

将冷的色谱柱接回系统使用时，启动柱温箱升温，将流速设置于0.2mL/min或更低。当柱温达到设定值以后仍维持此流速至少二十分钟使系统稳定，然后按前所述逐步调节流速至所需要的工作条件下。

六、柱的有效维护、故障排查及再生：

要使柱性能良好、寿命尽可能长，请仔细阅读前面所有信息，并执行。柱的寿命，会因为不恰当的操作和污染，而大大缩短。采用正确的操作方式，配合好的预防保护措施和/或样品处理，则会大大延长柱的有效寿命。

当问题发生时：

Sugar-Pak I色谱柱是当树脂填料在其膨胀状态时紧密装填。如果对样品进行了很好的前处理，那么大多数问题都与填料装填状态有关。当发生泵压脉冲，如单向阀损坏或是出现突然或过大的压力升高，填料就会被挤入柱的出口筛板处。当发生压力升高时，检查在线过滤器或保护柱中是否被微粒堵塞。如果不是此问题，那么就可能是树脂填料堵在了出口端的筛板处，这时，停泵停流，将色谱柱反接到系统上，然后将泵流速开到0.1ml/min，当柱温升高至工作温度时继续维持此流速20分钟，然后再将流速逐步提高至工作流速。

当按此说明书所述使用柱再生方法或其它清除方法后，在重新开始分析工作之前，要记得将柱重新按正确方向接回HPLC系统，并且给予合适的加热时间。

警告：因柱内填料装填的非常紧密，一旦取下柱筛板，

填料可能会溢出柱体。因此，打开色谱柱取出筛板用于超声清洁或更换的操作，只能作为最后一招来使用。

典型的故障及解决方案

故障	故障原因	解决方案
背压增加	在线过滤器堵塞	更换在线过滤器。或者，停泵停流，当进样口压力降至0时，将在线过滤器与色谱柱断开，用流动相按9mL/min流速对在线过滤器进行反冲，直至堵塞颗粒被完全冲洗掉。
压力波动	色谱柱进口端筛板堵塞	应该总是使用在线过滤器或者保护柱来预防这种情况发生。将色谱柱反接，用正常流速冲洗，冲出堵塞于进口筛板处的颗粒。
	出口端筛板被树脂填料堵塞	反冲色谱柱，在反冲之前应先检查泵和系统操作
	流动相中有气泡	检查脱气机是否运行正常。
	错误的泵操作	检查泵单向阀，并执行“Ramp Test”（必要时请咨询仪器供应商）
蔗糖峰拖尾	氢离子或其他重金属离子(如铁离子)在柱上	按照柱再生步骤进行再生
峰展宽	柱内空缺	将柱反接使用。这可能允许柱内填料重新分布，从而改善峰形。
鬼峰，不是糖	洗脱出来的盐和/或酸	检查样品制备过程
漏液	柱接头未连好	将柱接头拧紧，但不能过紧。或者更换接头。
保留时间漂移	流速不稳定，或柱温不稳定	检查系统原因，查看是否漏液，泵流速是否波动。

色谱柱再生步骤：对Sugar-pak I色谱柱进行再生操作的频率取决于您的样品的纯度情况。样品越不纯(尤其是含有那些重金属离子或过渡金属离子或是有机酸的样品)，越需要经常地对色谱柱进行再生，因为这些金属离子或氢离子会与色谱柱填料上的钙离子发生置换。您可以通过蔗糖来测试色谱柱的置换发生状态。如果蔗糖峰有拖尾，那么色谱柱需要按以下步骤进行再生：

配制500ml的再生溶液(500mg EDTA钙/L)。将色谱柱反向接入HPLC系统，在90°C柱温下以0.5ml/min的流速冲洗过夜。注意：在再生完成后，重新使用色谱柱进行分析测试时，应将柱重新按正确方向接入HPLC系统。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

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 6555
香港: 852-2964 1800

免费售后服务热线: 800(400) 820 2676
www.waters.com



©2010沃特世公司
2010年10月