A close-up photograph of a chromatography column. The column is white with a metal ferrule at the top. Inside the column, there are several distinct colored bands: a green band at the top, followed by a red band, and a yellow band at the bottom. The background is blurred, showing other laboratory equipment.

色谱柱使用维护 及故障排查指南

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

目录

一、液相色谱柱使用维护排查常见问题.....	3
二、新柱安装.....	5
a. 管路连接.....	5
b. 启动系统.....	5
三、柱效测试.....	6
a. 柱效测试.....	6
b. 系统谱带展宽体积.....	7
c. 系统延迟体积.....	8
四、色谱柱初始平衡.....	8
五、色谱柱的清洗及保存.....	9
六、小颗粒色谱柱使用秘籍.....	9
a. 为什么要用小颗粒.....	9
b. 如何延长柱寿命(流动相及样品的制备建议).....	10
七、HILIC色谱柱的操作建议(如XBridge Amide/HILIC).....	11
八、SEC色谱柱的操作建议.....	12
九、GPC问题排查常见问题.....	13



液相色谱柱使用维护排查常见问答

新柱柱效测试，为何塔板数明显偏低？

- 确保系统状态正常，如有必要再冲洗一次。
- 柱效受系统死体积扩散影响。沃特世(Waters®)色谱柱出厂测试是在体积最小化的系统上进行，塔板数较高。通常自测如能达到70%以上，就可以接受。
- 色谱柱体积越小，系统死体积(管路、检测器流通池)对柱效的影响就越大。对于小内径色谱柱(2.1和3 mmid)、和/或短的色谱柱(≤ 10 cm)，尽可能减少系统死体积(管路长度/内径、流通池)，并仔细检查管路和色谱柱的连接。检测器采样频率应设置为20 Hz。
- 用什么条件和什么样品测试的？峰保留时间越短，越容易受系统死体积影响。建议调整流动相条件，使峰保留时间在10分钟(常规HPLC系统)或5分钟(UHPLC系统)。
- 样品进样体积越大，样品溶剂会导致峰扩散。HPLC柱可进样1 μ L，UPLC柱可进样0.1 μ L。

新柱上机，基线一直不能平衡，怎么办？

- 首先断开检测器，按照对色谱柱的高洗脱强度溶剂5倍柱体积或者重复5次梯度冲洗色谱柱，然后按照测试柱效的方法测试。
- 无规律的噪音，可考虑是否有气泡进入检测池，沃特世仪器用户请拨打免费售后服务热线800(400) 820 2676，获得冲洗检测池指导。
- 规律性的上下波动基线，可考虑是否泵混合效率不足，在泵后增加mixing loop，具体请咨询仪器维修工程师。
- 实验室内的环境条件是否会干扰到仪器，以及色谱柱柱温情况。
- 如果基线缓慢上飘或下飘，检查流动相是否存在配制不均匀、或者在缓慢挥发的情况。
- 更换同类型的旧柱情况会如何？有时需要对新色谱柱进行一定的老化(可以运行几次梯度方法)。

新柱一进样峰就拖尾，是色谱柱已经坏了吗？

- 检查系统状态正常，检查管路和色谱柱连接无死体积。
- 对新色谱柱进行柱效测试，检查是柱效问题还是应用问题(可向我们索取柱效测试标准品或标准品配方)。
 - 若柱效测试峰塔板数明显偏低，请参考问题1。
 - 若柱效测试结果正常，判断为应用问题。

请考虑：这根色谱柱是否适合这个应用项目？过去那根旧色谱柱在进行这个项目测试时，色谱柱是否已经被离子对条件或其他改性条件用过？

新柱不能重现旧色谱柱谱图，是色谱柱的批次问题吗？

- 新色谱柱是否需要老化或充分的活化平衡？旧色谱柱是否在测试项目以前经历过变性条件(如离子对试剂)？项目之前用过不同批次色谱柱测试并能重现吗？
- 如手头有可用的旧柱，请对同一个样品、同一系统、同一配制流动相进行平行比对(同一天或隔天)，建议每根色谱柱上重复3次平行进样。如果两根色谱柱上的各自3针进样谱图均稳定重现(可完全重叠，没有增减)，而两根色谱柱的谱图有所差异(个别峰的增加/丢失/分离改变)，可确认两柱有差异。可能该项目条件敏感，导致对色谱柱批次敏感(“挑批次”)。
- 如有可能，优化分析方法，并用至少两根以上不同填料批次的色谱柱进行方法重现性检查。

新柱连续进样，保留时间不稳定，一直有漂移，怎么回事？

- 色谱柱的平衡有没有充分，尤其是使用离子对试剂的情况下。
- 流动相配制是否足够均匀，比如磷酸盐与乙腈需要剧烈震荡混合，超声混合不充分。
- 流动相是否存在挥发性组分，导致缓慢变化。
- 是否使用柱温箱，或者色谱柱是否暴露在温度变化较大的环境中(如空调风口等)。
- 亲水作用色谱柱(如XBridge® Amide柱，XBridge/Atlantis®/CORTECS® HILIC柱)，需要活化步骤，以及较长时间的再平衡，请询我们。
- 进行柱效测试，连续进针，看保留时间是否漂移，确认仪器状态是不是稳定的。

新柱上机，其它峰都正常，但增加了杂质峰个数，或者时不时出现“鬼峰”，是色谱柱有“流失”吗？

- 样品不变，连续3针进样，检查“鬼峰”是否稳定存在且大小一致，如是，可能来自样品溶液(样品降解、样品瓶污染)都有可能。
- 连续2 - 3针空针，可以检查“鬼峰”是否来自流动相的污染，或是柱上残留(后者通常峰越来越小)。
- 连续进针时，峰的大小变化规律、以及峰保留/峰形的谱图，可以用于参考判断。
- 最后注意样品过滤器膜材质，是否会造成吸附和/或溶出。

没进几针(或几百针)，峰形就变差了，色谱柱坏得太快怎么办？

- 是全部峰都变差，还是只是个别峰形变差？对于后者，通常提示柱并未坏。
- 清洗过色谱柱吗？什么清洗条件？清洗后，是否有所恢复？如是，提示有样品污染(或流动相污染)，在分析中加强清洗步骤(或者用质量好的流动相)。
- 使用的流动相条件是什么？样品配制方法是什么？如果是对色谱柱有化学腐蚀性，考虑使用更耐用的色谱柱，或者加配保护柱。如果是样品有组分吸附污染，加强样品处理过程，或者加配保护柱。
- 是否伴随柱压升高？如果是，参见问题8。

没进几针(几百针)，柱压就高了，为什么？怎么办？

- 首先是压力突然就升高了还是逐渐升高的。
- 若是突然高了，看下样品是不是不是澄清的，分段排查一下仪器看下哪里堵了。
- 若是逐渐升高，如果不进样压力就不上升，那说明污染来自样品，色谱柱要好好清洗一下，同时加强分析过程中的柱清洗。如果是不进样也能慢慢上升，提示流动相有微粒，特别注意：
 - 1)流动相配制时是否需要加强过滤(注意要用合适且合格的滤膜)；
 - 2)水相流动相是否长期放置，容易长菌(特别是在天气较热时，磷酸盐易长菌，建议当天新鲜配制，且连瓶更换)；
 - 3)检查系统背压、特别是检查水相通道的压力，如果压力明显偏高，提示有长菌污染，需要对系统进行彻底清洗。
- 排查压力升高位置，分段依次检查：系统压力、在线过滤器(如果有)、保护柱(如果有)，如果压力(堵塞点)发生在在线过滤器或保护柱上，通常色谱柱本身仍可使用。可通过柱效测试检查色谱柱性能状态(柱效、压力)。

一直用得好好的色谱柱，过了一个周末(或者几天)，就突然不好了，怎么回事？

- 怎么“不好”？是峰形恶化？压力增加？还是其它问题？对前两者，可参见问题7和8。
- 如涉及峰形或压力，有没有可能是仪器问题？或管路与色谱柱连接不好。
- 上次使用完，是如何清洗和保存的？特别注意，是否充分清除了流动相中的盐分。仪器上的全水相管路是否置换为有机溶剂、或含有至少5%以上有机溶剂，以避免长菌。
- 如峰形相对正常，但保留/峰面积变化：这个应用是否要求充分平衡色谱柱？样品稳定性如何？

这次购买的色谱柱没有之前购买的色谱柱使用时间长，不耐用。

- 寿命缩短的表现是什么？峰形恶化的过程，是否伴随柱压升高？可参见问题8。
- 样品、流动相条件、操作习惯等，是否与以前一致，具有可比性(特别是使用维护习惯)？
- 流动相的水、溶剂、盐的来源是什么？特别注意检查空针时的梯度基线，本底峰提示是否存在流动相污染、存在杂质质量的多少。有些来源不合格的盐，甚至会导致柱寿命的急剧降低。

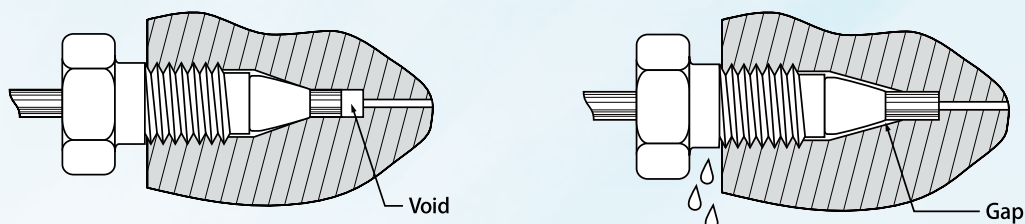
您可以联系我们获得柱效测试条件，第一次我们会提供标准品，之后按照我们的配制方案自行配制即可。

若上述这些Q&A还是不能解决您的问题，沃特世耗材部应用顾问会让您填写“液相色谱柱应用问题及疑似质量问题反馈表”，随后会有资深工程师根据您所填写的反馈表来跟进并解决问题。

新柱安装

a. 管路连接 —— 管路连接问题

由于缺乏行业标准，不同制造商生产的接头和连接管路类型会有所差异。当安装新色谱柱时，必须确保连接管路与新色谱柱匹配。如果色谱柱末端与系统接头匹配不佳，新色谱柱的性能会受到不良影响(诸如：柱效下降、峰形拖尾等)或者发生渗漏。



当管路接头比色谱柱接头深度短时(常见于非沃特世(Waters®)系统管路连接沃特世色谱柱时)，连接死体积的产生，会导致样品扩散，峰形变宽、柱效下降，甚至可能拖尾。色谱柱体积越小，连接不当所导致的柱效下降甚至峰拖尾就会越严重。

当管路接头比色谱柱接头深度还长时，仅靠螺纹并不能密封色谱柱，会导致漏液。如果流速很低、和/或柱温较高，不易发现细微漏液现象，但色谱峰保留时间可能会发生不规则漂移。

b. 启动系统

- 使用100% HPLC级别的纯水冲洗任何含有缓冲盐的泵系统。
- 将泵系统冲洗至100%有机流动相(甲醇或乙腈)。
- 将色谱柱入口端连接至系统。(注意!请确保管路连接良好, 参考“管路连接问题”)。
- 将泵流速设置为0.1 mL/min, 用100%有机流动相(甲醇或乙腈)冲洗色谱柱。在5 min内将流速增至0.5 mL/min。(此处适用4.6 mm内径色谱柱。如柱内径为2.1 mm时, 流速设置为0.05->0.2 mL/min)
- 查看色谱柱出口端。
 - (a)如果在较短时间内就可以看到流动相从色谱柱出口流出, 停止流速, 进行下一步操作。
 - (b)如果等待较长时间才看到流动相流出, 且流出时伴随气泡, 则表明色谱柱存放时未密封紧, 柱内溶剂已挥发。保持有机溶剂流速, 继续冲洗浸润色谱柱1 - 2小时。再进行下一步操作。
- 将色谱柱出口端连接至检测器。等待色谱柱出口有流动相流出(且不带气泡)时, 再连接检测器, 可以防止气泡进入检测器流通池。有利于检测器较快达到平衡。
- 逐渐增加流速至常用流速。
- 当压力和基线达到稳定状态, 即可继续进行下一步操作。

柱效测试

a. 柱效测试

沃特世建议在收到色谱柱后以及在使用过程中定期进行性能测试，以便监控色谱柱性能状态。如下时间点的测试尤为重要：

- **全新色谱柱收到时：**确认色谱柱状态。如有异议，可及时联系供应商。测试后，全新色谱柱的关键性能指标(如：保留时间，峰塔板数，拖尾因子，背压，等)应随柱保存，作为今后柱效监控的初始依据。
- **准备开始某项目、测试项目样品前：**先确认柱效状态，柱效正常，再用于项目测试。柱效测试结果，可作为项目阶段中柱效状态监控的依据。如果柱效测试发现，该柱柱效已大幅下降，甚或拖尾，则应直接废弃该柱，避免今后多次浪费时间。
- **项目阶段节点：**与项目开始前柱效状态予以比较，可以了解该项目的流动相条件以及样品，对于色谱柱性能与柱寿命的影响效果。
- **项目完成后：**充分清洗色谱柱后，测试柱效。柱效测试结果，可供今后项目开始前选柱的参考。如发现色谱柱性能已经大幅下降(例如：柱效极低，或中性化合物峰拖尾)，则应直接废弃该柱。

如何测试柱效？

可以有以下三种方法：

- 参考柱盒内(或联系供应商索取)色谱柱柱效测试报告的测试条件与标准品。测试结果可以与色谱柱出厂报告值加以比对。
- 自行配制柱效测试液500 mL/瓶，供实验室集体使用。反相色谱柱常用柱效测试液配方推荐：二氢萘与丙酮溶于乙腈中，浓度分别为0.5 mg/mL和6 μ L/mL。丙酮用于指示死时间(T_0)，二氢萘用于指示柱效状态。根据色谱柱规格大小，进样0.1 - 2 μ L。流动相：乙腈-水等度洗脱， C_{18} 柱常用7:3； C_8 、苯基柱可使用6:4； C_4 柱可用5:5。流速：1 mL/min。检测条件：UV254 nm。
- 购买沃特世质量控制标准品(中性QCRM，部件号186006360，适用于反相柱；或HILIC QCRM，部件号186007226，适用于HILIC柱)，可以更细致的评估与追踪色谱柱与系统性能状态。如需了解更多性能基准测试信息，请访问：www.waters.com/QCRM

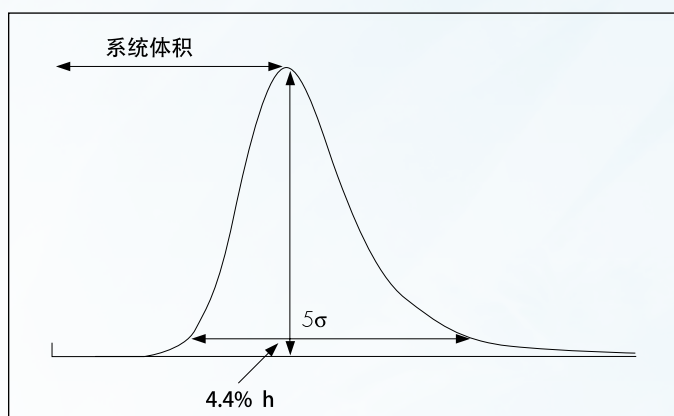
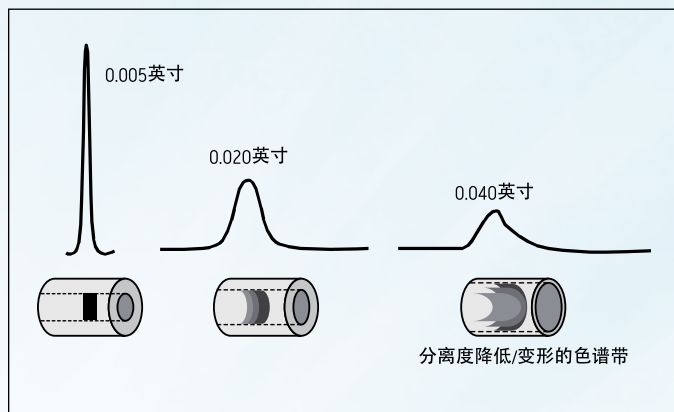
为何全新色谱柱测试结果低于出厂报告值(测试样品与条件完全一致时)？

以下三种情况比较常见：

- 对于沃特世色谱柱，全新色谱柱的实验室柱效测试结果，低于出厂报告值(通常降低幅度在30%以内)，是符合预期的。为了尽可能的反映出色谱柱本身的柱效情况(色谱柱装填优劣程度)，沃特世对用于进行柱效测试的系统做出相应的调整，以获得最小的系统扩散体积。这样经过特殊调整的测试系统，扩散最小，常规系统测试效果无法与之比较，通常柱效降低程度在30%以内都是可以接受的。但是，如果降低幅度过大，例如仅有出厂报告值50%时，请联系我们。
- 色谱柱柱效，会受到系统扩散体积的影响(请参加“系统谱带展宽体积”部分)。如果系统扩散体积较大，就会导致色谱柱柱效测试结果偏低，这也是常见情况之一。值得注意的是，色谱柱体积越小，受到系统扩散体积的影响就越大；此外，如果色谱峰出峰越快，受到系统扩散体积的影响也会越大。所以，小颗粒(<3 μ m)色谱柱，如果柱体积较小，且出峰时间较快，更容易受到系统扩散的影响，我们常常发现沃特世UHPLC色谱柱在非沃特世系统上的柱效测试结果显著偏低。
- 色谱柱装填不理想，或者在运输过程中遭到过严重的震荡磕碰，柱床不稳定发生变化，也会导致测试时柱效迅速下降(可以通过连续进针观测)。对于GPC柱、或早期色谱柱产品(例如，Waters Bondapak，是10 μ m不定形硅胶颗粒)，因为填料自身性质，色谱柱床装填并不十分紧密，在使用过程中需要特别注意避免较高压力、以及柱压力的迅速增加(建议用台阶法设置流速)，对于小颗粒色谱柱，装填非常紧密，通常不应发生此类问题。

b. 系统谱带展宽体积 —— 会影响柱效测试值与色谱性能

谱带展宽是系统扩散的衡量指标，它影响着色谱性能。其含义是，在排除色谱柱的影响下，仅因为系统内体积使样品扩散所导致的色谱峰宽(谱带展宽体积)。管路内径和连接状况可显著影响系统的谱带展宽和色谱性能。管路内径大会导致峰形过宽和灵敏度降低(如下图所示)。此外，不宜使用过长的管路。



系统谱带展宽体积的测定

谱带展宽测定应当在配有UV检测器的液相色谱系统上进行。

- 断开色谱柱与系统的连接，并替换为零死体积两通。
- 将泵系统的流速设置为1 mL/min。
- 使用的测试标准品(在流动相条件下溶解)，其最大峰高响应值应低于0.5 AU。
- 进样此溶液2-5 L。
- 采用5-Sigma法，测量4.4%峰高处的峰宽(分钟)：(见下面谱图)

谱带展宽(L)=峰宽(min) 流速(L/min)

(例如，如果峰宽=0.1 min，流速=1000 L/min，那么谱带展宽=100 L)

色谱柱体积越小，柱外影响(系统谱带展宽体积的影响)就越大。因此，对于谱带展宽体积较大的系统，应配用常规内径的色谱柱。细内径的色谱柱，在分析应用中能够体现溶剂节约效能，但需要使系统谱带展宽体积尽可能的小(系统本身的设计得当，使用更细更短的管路，确保管路连接得当，更换为较小体积的流通池，等等)。

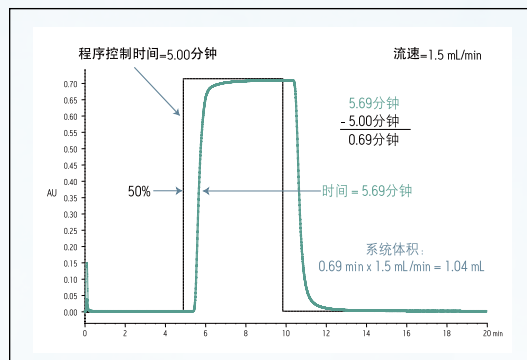
系统	系统谱带展宽	推荐CORTECS/XS 色谱柱内径	
		首选	次选
Alliance 2695 HPLC	29 μ L	4.6 mm	3.0 mm
ACQUITY UPLC	12 μ L	2.1 mm	3.0 mm
ACQUITY UPLC H-Class	9 μ L	2.1 mm	3.0 mm
ACQUITY UPLC I-Class(FTN)	7.5 μ L	2.1 mm	3.0 mm
ACQUITY UPLC I-Class(FL)	5.5 μ L	2.1 mm	1.0 mm
非沃特世UHPLC系统	15 - 25 μ L	3.0 mm	2.1 mm

沃特世LC系统的谱带展宽体积列表

c. 系统延迟体积 —— 会影响梯度方法在系统间的转换效果

系统延迟体积不同于系统谱带展宽体积。系统延迟体积是指在流动相初始梯度条件达到色谱柱柱头前所流过的流动相体积。在不同色谱系统之间进行方法转换时,有必要测定该值,并在方法转换时加以考虑(使用计算软件Waters Column Calculator进行方法转换计算),否则有可能影响到梯度方法下的色谱选择性(即使色谱柱填料甚或色谱柱完全一致)。

- 断开色谱柱与系统的连接,并替换为零死体积接头。
- 使用乙腈作为流动相A,含有0.05 mg/mL尿嘧啶的乙腈溶液作为流动相B。
- 在选定仪器上使用初始方法中的流速和预期流速。
- 使用100%流动相A得到检测器基线,持续5分钟。
- 在5.00分钟时,将梯度设定为100%流动相B,收集接下来5分钟的数据信息。
- 测量100% A和100% B之间的吸光度差值。
- 测定该吸光度差值的50%处的时间。
- 计算梯度起点与50%点之间的时间差值。
- 将时间差值乘以流速,计算出系统延迟体积。(如右图所示)



系统	延迟体积
Alliance 2695 HPLC	900 μ L
ACQUITY UPLC	120 μ L
ACQUITY UPLC H-Class	350 μ L
ACQUITY UPLC I-Class(FTN)	100 μ L
ACQUITY UPLC I-Class(FL)	95 μ L

沃特世系统的延迟体积列表。

色谱柱初始平衡

通常,色谱柱出厂时保存于100%乙腈中。将色谱柱更换至其它流动相体系之前,务必要确保流动相的兼容性。为避免流动相缓冲液在色谱柱或色谱系统中析出,使用五倍柱体积的水/有机溶剂混合溶液冲洗色谱柱,其中有机溶剂含量与所需缓冲液流动相的有机溶剂含量相同或更低(例如,使用60%的甲醇水溶液冲洗色谱柱和系统,然后再更换为60%甲醇/40%缓冲液的流动相)。

对于反相分离来说,完成平衡至少用10倍柱体积的流动相(参见下表中的色谱柱体积)。当反压达到恒定且色谱柱基线稳定时,可认为该柱达到完全平衡。

注意! 如果流动相中的添加剂(如,离子对试剂)浓度较低($<0.2\%$ v/v),那么完成平衡可能需要100-200倍柱体积的流动相。此外,当流动相中含有甲酸盐(如,甲酸铵、甲酸等)时,平衡时间可能会延长。

柱长(mm)	色谱柱内径			
	1.0 mm	2.1 mm	3.0 mm	4.6 mm
30	0.024	0.10	0.21	0.50
50	0.039	0.17	0.35	0.83
75	0.059	0.26	0.53	1.25
100	0.079	0.35	0.71	1.66
150	0.12	0.53	1.07	2.49

色谱柱体积表(mL)

色谱柱的清洗及保存

色谱柱峰形发生改变、色谱峰分叉、出现肩峰、保留时间漂移、分离度变化或背压升高，都表明色谱柱被污染了。用纯有机溶剂进行冲洗以去除非极性污染物，谨慎操作以避免任何缓冲盐的析出。如果冲洗不能解决问题，可采用以下步骤对色谱柱进行清洗和再生。

- 使用与样品性质和固定相类型(反相、正相或HILIC)相匹配的常规清洗方法，这有助于溶解可疑污染物。
- 在柱温45 °C条件下，使用20倍柱体积的溶剂冲洗色谱柱。
- 如果使用的是反相色谱柱，依次以非极性逐渐增强的溶剂(如，水到甲醇到四氢呋喃*到二氯甲烷*)冲洗色谱柱。如果使用的是HILIC色谱柱，依次以极性逐渐增强的有机溶剂(如，乙腈到乙腈/甲醇到乙腈/水到水)冲洗色谱柱。

**注意：对于某些有机溶剂，需要注意其与系统管路及真空脱气包的兼容性。*

- 通过逆向冲洗程序，再返回初始流动相条件。

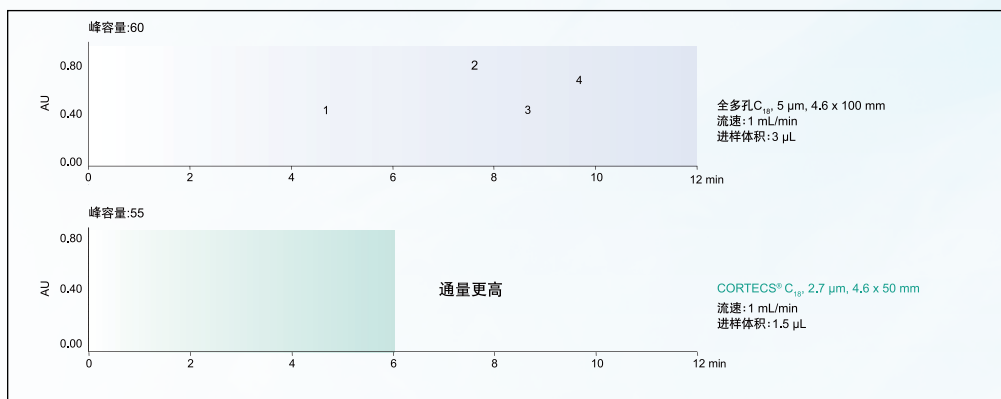
反相与HILIC色谱柱的保存

如需将色谱柱放置超过四天，应将其保存于100%乙腈中。对于高温条件下的分离，应在使用后立即保存于100%乙腈中，切勿将色谱柱保存于缓冲液中。如果流动相中含有缓冲盐，则先用10倍柱体积95%纯水冲洗色谱柱(有关色谱柱体积信息，请参见前表)用以彻底清除柱内的盐成分，再用10倍柱体积的乙腈冲洗柱。将色谱柱完全密封，防止溶剂蒸发而导致柱床变干。

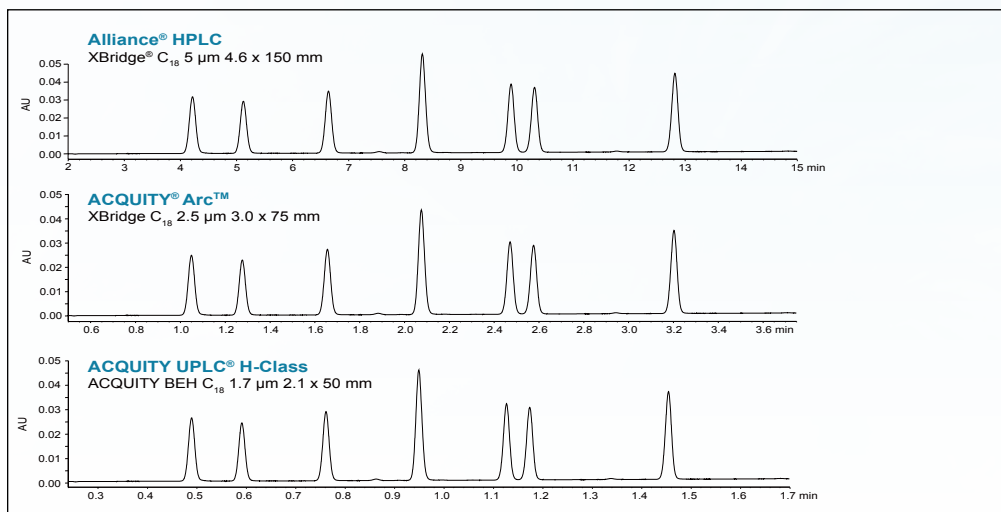
小颗粒色谱柱使用秘籍

a. 为什么要用小颗粒

在现有的HPLC系统上提高当前分析任务的效率和通量。(进样量减小，还能帮助节约昂贵的对照品试剂)



培养良好的操作规范，未来可以更顺畅的升级运用UPLC[®]技术。



b. 如何延长柱寿命(流动相及样品的制备建议)

小颗粒(<3 μm)色谱柱, 因其筛板更细(0.5 μm筛板 vs. 常规HPLC色谱柱筛板2 μm), 更容易发生颗粒性堵塞和柱压上升的问题。来自于流动相或样品溶液的颗粒, 会堵塞色谱柱入口端筛板, 导致柱背压增大和/或峰变形。

- 流动相问题: 通常表现为柱背压持续上升; 即使不进样, 空针运行, 压力也会持续上升。
- 样品问题: 通常表现为压力随进针较为明显和剧烈的上升, 空针运行则柱压变化不大。

如下建议, 可以有效提高小颗粒色谱柱寿命:

- 有机溶剂必须使用HPLC级别以上, 水尽可能使用超纯水(例如经Millipore纯水机制备, 必须确保纯化水系统定期维护具有良好的工作状态)。
- 添加过盐的流动相, 必须经过0.2 μm滤膜过滤。滤膜需确保与流动相的完全兼容, 不会被部分溶解。(Waters推荐GHP滤膜, 完全兼容水/酸/碱/极性有机溶剂/非极性有机溶剂。具体规格与产品, 请垂询我们。)
- 尽量避免长时间使用100%水相流动相, 以防该通道长菌。如果必须使用100%水相流动相, 则每隔24-48小时必须更换一次流动相(溶剂瓶应同时更换)。
- 如分析方法允许, 可以向水相缓冲液中添加5-10%有机溶剂抑制长菌(需重新计算和设置比例或梯度表)。注意: 当大量配制时(如2 - 4 L, 计划供应3-4天使用), 则应确保有效混合均匀, 避免溶剂瓶内流动相浓度分布现象(目视无异样, 但会造成分析保留时间漂移)。
- 避免流动相敞口放置(会落入灰尘/霉菌)。
- 样品: 如样品溶液含有颗粒物, 建议离心后(13000 rpm离心10分钟, 或8000 rpm离心20分钟)取上清, 再使用0.2 μm针式过滤器过滤。应确保滤膜材质与样品稀释剂完全兼容, 既不会被部分溶解释放颗粒或污染物, 也不会吸附被测组分。(Waters推荐GHP针式过滤器, 具体规格与产品, 请垂询我们。)应确保样品溶液稳定, 不会在放置过程中再有所析出。应确保样品与流动相体系的兼容性, 不会在进样后析出。
- 其它:
 - 在系统管路中使用在线过滤器, 筛板规格至少为0.5 μm或最好为0.2 μm。
 - 配合使用适合的保护柱如分体式VanGuard™, 选择填料完全一致的保护柱芯, 配合插入式卡套, 可以最小化连接体积, 避免峰扩散, 且使用方便(如需更多信息, 请垂询我们)。



HILIC色谱柱的操作建议

(色谱柱: CORTECS HILIC、XBridge BEH HILIC、XBridge BEH Amide、Atlantis HILIC, 由于亲水作用色谱柱的使用方法与反相色谱柱有很大的不同, 需要加以注意, 可以参考《HILIC综合指南》715002531ZH)。

1) 样品制备

应尽可能使用较高比例的有机溶剂(如95%乙腈), 以避免溶剂效应。如果存在样品溶解问题, 应至少使用50/50乙腈/水, 并减少进样体积。

2) 柱平衡

初次使用时, 先用50倍柱体积的50/50乙腈/水对柱进行老化;

开始进样前, 用20倍柱体积的起始流动相条件进行平衡;

如果使用梯度条件, 每次梯度之间, 用8-10倍柱体积的起始流动相条件再次平衡。

没有充分老化平衡的色谱柱, 将会出现柱效较低、以及保留时间漂移的问题。

3) 柱清洗再生

对于Atlantis HILIC、XBridge BEH HILIC与CORTECS HILIC色谱柱, 可用梯度洗脱从97/3乙腈/水至50/50乙腈/水清洗以去除极性污染物。如果不能解决问题, 可用梯度洗脱从97/3乙腈/水至5/95的乙腈/水冲洗;

对于XBridge BEH Amide色谱柱, 可用梯度洗脱从100%有机相到100%水相。值得注意的是当水相比例升高, 压力将迅速增加, 当水相比例超过60%时可适当降低流速。如果有必要可重复清洗。

4) 柱保存

先将缓冲盐从色谱柱内冲洗干净, 然后将色谱柱保存在95/5乙腈/水(XBridge BEH HILIC, CORTECS HILIC、Atlantis HILIC)或100%乙腈(XBridge BEH Amide)中。



SEC色谱柱的操作建议

(色谱柱: XBridge BEH 125/200/450 SEC,参考使用及维护: 720005206ZH)

接柱前务必确保系统的洁净度

■ 若出现下面两种情况,提醒要对系统进行彻底的清洗:

1. 若出现接两通,各个流动相通道的压力不一样时
2. 若发现色谱柱柱寿命异常缩短色谱图变差时

请执行系统维护操作:用零死体积(ZDV)的二通连接器代替色谱柱,按以下顺序冲洗系统:H₂O—70% 异丙醇—H₂O—30% 磷酸—H₂O—10% 甲醇

溶液制备

- 请使用HPLC级的缓冲液、水和有机溶剂。
- 使用0.2 μm或更小孔径的滤膜过滤溶液。对能滋生微生物的缓冲液,推荐使用无菌过滤装置。容易滋生微生物的溶液应定期更换。
- 新鲜配制SEC流动相,请使用新的溶剂瓶,不要又倒入旧的流动相瓶中。

安装平衡

- 推荐安装保护柱,保护柱能有效的延长柱寿命。
- 按照柱上箭头指示方向连接安装色谱柱。
- 柱装溶剂为20%的甲醇水溶液,用新鲜配制的SEC流动相,以0.2 mL/min的流速冲洗色谱柱。

注意: 逐渐提高至所需最佳流速,每次步进不超过0.1 mL/min,每次等压力稳定后再继续提高流速。

- 提速或降速操作均要保持1 min以上,以最小化“柱床震荡”。
- 监视系统压力,确保色谱柱处于其压力限度内。

柱效测试:

- 用蛋白标准品测试
对应的蛋白标准品的货号:
BEH 125 SEC P/N:186006519、
BEH 200 SEC P/N:186008476、
BEH 450 SEC P/N: 186008475
- 可以监测色谱柱及仪器的状态,以延长使用期
- 对可能发生的分离问题进行故障排查

储存

若第二天继续使用的,用现有的流动相低流速过夜冲洗色谱柱。若隔1 - 2天使用的,将色谱柱储存在HPLC级的纯水中。长期储存,放在10%的甲醇中。

柱清洗再生

建议低流速清洗,推荐的清洗溶剂:

- 低pH值的高浓度盐溶液(如: 0.5 M Na₂SO₄, pH 2.7)
- 低浓度甲醇(如: 20%)溶于HPLC级的水中
- 如果色谱柱随后要分析天然形态的蛋白质,应避免使用离子型洗涤剂 and 表面活性剂

GPC问题排查常见问答

新买的色谱柱不出峰、峰形不好

- 色谱柱是否满足样品的分子量范围, 流动相是否为色谱柱出厂溶剂。
- 色谱柱的活化平衡是否充分, GPC色谱柱的平衡较反相色谱柱来说较慢, 需从低流速慢慢往高流速平衡, 至压力及基线完全稳定为止。

色谱图为什么会出现倒峰

- 出现倒峰通常有几个原因, 色谱柱或仪器系统有空气进入、色谱柱平衡不够充分, 样品的折射率低于溶剂。注意: 溶剂峰一般均为倒峰。

使用的流动相是溶剂A, 溶解样品也是溶剂A, 为什么会有溶剂峰?

- 溶解样品的溶剂A一旦走过柱子, 和原来的溶剂A已经有了变化。所以在示差检测器上即可体现出差异, 可能把其中一些杂质分开了, 最好解决方案是用平衡色谱柱的溶剂溶解样品, 避免溶剂峰。

如何选择GPC溶剂

- Waters脂溶性GPC有四氢呋喃、甲苯和二甲基甲酰胺(DMF)三种流动相体系, 尽量选择色谱柱的固有溶剂为流动相。如样品无法溶于固有溶剂, 则选择填料的溶胀系数与流动相相似的色谱柱进行置换, 如二氯甲烷通常选用四氢呋喃(THF)的色谱柱进行置换, 二甲基亚砜(DMSO)选择二甲基甲酰胺(DMF)的色谱柱进行置换。溶剂置换不建议循环操作, 对色谱柱的柱效有影响。值得注意的是, 在进行溶剂置换时, 务必注意仪器系统及管道是否耐受新溶剂。

色谱柱出厂溶剂是“A”, 需要使用溶剂“B”, 该如何置换?

- 通常, 如果两种溶剂可混溶, 您可直接以0.1 - 0.2 ml/min的流速从一种溶剂转换为另一种溶剂(参见色谱柱维护使用说明书)。如果两种溶剂不可混溶, 则必须使用一种中间溶剂(两种溶剂均可混溶于该溶剂)。

如何选择GPC色谱柱

- 由于GPC的柱效低, 为一级分离, 通常建议串联3 - 5只使用。
- 先判断样品的溶解性, 常用的色谱柱的溶剂为四氢呋喃(THF)、甲苯和二甲基甲酰胺(DMF)。
- 针对已知分子量的样品, 可选择三只相同分子量范围的色谱柱串联, 尽量选择样品的分子量在色谱柱的线性分离范围内;
- 针对未知分析量的样品, 可选择三只不同分子量范围的色谱柱串联, 以达到最大的分子量覆盖。
- 也可以选择混合柱床的色谱柱, 但是与单一孔径的色谱柱相比, 混合柱床的色谱柱的分辨率会低。

如何消除水溶性GPC的非体积排阻效应

- 水溶性GPC的非体积排阻效应即水相GPC分离过程中存在某些与体积排阻(尺寸排阻)无关的作用, 并对分析结果产生影响建议通过下述方法解决:
 - a.适当提高淋洗液的离子强度。
 - b.调节流动相的pH值使填料和高聚物的极性基团处于电中性状态。
 - c.加入添加剂改善大分子与固定相的相互作用以及固定相的表面性质, 例如: 为防止聚乙烯醇在柱中的吸附可加入氢氧化四甲基季胺盐、甲醇、乙二醇或聚氧化乙烯等; 对蛋白质类试样可加入0.5%十二烷基硫酸钠或6M脲溶液。

沃特世科技(上海)有限公司

地址: 上海市浦东新区金海路1000号
金领之都13栋

邮编: 201206

电话: 021-6156 2666

传真: 021-6156 2777

北京分公司

地址: 北京市朝阳区铜牛国际大厦
光华路15号院2号楼9层

邮编: 100026

电话: 010-5209 3866

传真: 010-5293 2298

广州分公司

地址: 广州市荔湾区中山七路50号
西门口广场1707-08室

邮编: 510170

电话: 020-2829 6555

传真: 020-2829 6556

成都分公司

地址: 成都市高新区科园南路88号
天府生命科技园孵化楼C1栋411室

邮编: 610023

电话: 028-6765 3588

传真: 028-6765 3580

沃特斯中国有限公司

地址: 香港新界沙田科学园
科技大道西16号907-908室

电话: 852-2964 1800

传真: 852-2549 6802



扫一扫, 关注沃特世微信

全国免费售后服务热线:

800(400)820 2676

www.waters.com

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司注册商标。
其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2017 沃特世公司。中国印制 2017 年 1 月