

# 这才是液相色谱柱的正确使用方法！

色谱是一种分离分析手段，分离是核心，因此担负分离作用的色谱柱是色谱系统的核心。对色谱柱的要求是柱效高、选择性好，分析速度快等。关于色谱柱的安装、维护、保存以及由色谱柱导致的这样那样的色谱故障也是一门学问。高效液相色谱柱的正确使用包含：加装保护柱，过滤流动相和样品，净化样品，避免过高的柱压，注意温度和酸碱度，正确及时的冲洗等。

## 01. 加装保护柱

保护柱的作用是过滤掉来自流动相和样品的化学“垃圾”同时也可以有效除去流动相和样品中的不溶物。尽管现在的色谱仪在流动相吸入口、进样阀后部以及在色谱柱的两端都装有  $1$ 、 $2\mu\text{m}$  等不同孔径的滤器,但滤器只能除去不溶性颗粒而不能除去化学污染,因此,加装保护柱是必要的,特别是在分析中药、中成药等复杂混合物和生物样品时更是保护分析柱必不可少的措施。

保护柱填料应与分析柱一致,粒径可较分析柱大。保护柱属消耗品,经过一定次数的样品分析( $50\sim 100$  次)后,出现柱压显著升高或峰形变坏或基线漂移时,应考虑更换保护柱。

## 02. 过滤流动相和样品

流动相通常由水或缓冲溶液与有机溶剂混合而成,原则上,所有经过色谱柱的流动相均应过滤,但在实际操作上应视具体情况而有所区别:当有机溶剂用色谱纯级,水用石英亚沸水或其它超纯水时,在能确保水和有机溶剂的质量且没有受到污染时,过滤并无更多实际意义。

当流动相中含有缓冲盐时,则过滤是必要的,如前所述,当缓冲溶液放置一段时间(视环境温度不同而异,夏季一般不超过  $48\text{ h}$ ,冬季一般不超过一周)后,在使用前还应重新过滤。

所配制的样品试液在注入流路系统前均要经  $0.45\mu\text{m}$  ( $0.22\mu\text{m}$  则更好)孔径滤膜过滤。要注意区分水系和油系,二者不可混用,以防止滤膜溶解而造成污染。

装流动相的容器和色谱系统中的在线滤器要定期清洗和更换,以避免滤器因过载而起不到过滤作用。

### 03. 净化样品

当样品中含有对色谱柱有损害的化学成分,如产生永久性吸附的蛋白质、糖等有机分子和强吸附性物质,以及可能对柱填料产生破坏作用的基团离子。在进样前应尽可能对样品进行分离提纯以除去多余杂质组分。

### 04. 避免过高柱压

虽然高效液相色谱柱能耐受的压力可达  $6000\text{ psi}$  (磅/平方英寸),但过高及过大的压力变化均会缩短色谱柱的寿命,避免的方法是

(1)柱压过高时,尽可能采用较小的流速,以不超过柱最大允许压力的一半为宜。

(2)当流速较大时,应采取流速梯度的办法使流速分步到位。

(3)使用手动进样阀时,进样阀的切换要尽可能的快。否则超过  $20\%$  的压力冲击会很快使柱报废。当使用多柱联用时,柱切换要避免在高压下进行。

### 05. 注意温度和酸碱度

一般以硅胶为基质的色谱柱最高使用温度不超过  $60^{\circ}\text{C}$ ,以低于  $40^{\circ}\text{C}$  为宜,特别是在流动相  $\text{pH}$  接近使用限度时,更应降低使用温度。

温度过高会加快键合相的水解和硅胶的溶解,从而使填料性质改变,柱床塌陷,降低柱效,改变峰形。

目前的键合硅胶色谱柱标示的  $pH$  适用范围可达  $2\sim 10$ ,但在实际使用时应避免极端的  $pH$  条件,特别是在偏碱性的条件( $pH\geq 8$ )下使用 ,如必须要在极端的  $pH$  条件下使用时,可通过以下方法避免柱损害:

- ( 1)在泵和进样阀之间加装预柱(饱和柱)来饱和流动相
- (2)降低使用温度
- (3)检验完毕后立即用与所使用的流动相互相混溶的“温和溶剂”彻底清洗。

## 06. 正确及时的冲洗

开始试验前,应了解柱中当前是何种溶剂。对于新色谱柱,如无特殊说明均为评价报告中所用流动相。柱中当前溶剂一定要与分析样品所用流动相互溶,如不能混溶,要用与二者均能相互混溶的第三种溶剂过渡。