

常规反相色谱柱安装及使用维护指南

何谓常规反相色谱柱？

那些在硅胶或杂化基质颗粒上键合了如C₁₈、C₈、C₄或苯基等键合相的色谱填料所装填的色谱柱，按反相色谱条件进行操作和分离。反相是液相色谱中最常使用的分离模式，而C₁₈柱是最常使用的反相色谱柱之一。

新色谱柱开启和安装的推荐步骤：

1. 使用新鲜洁净的水与乙腈。冲洗系统，确保系统干净，不含任何缓冲盐和污染物。
2. 取用色谱柱时避免磕碰掉落。
3. 将色谱柱入口端连接到系统上，柱出口端先不要连接，色谱柱身上有箭头标明正确流向。
4. 在0.1 mL/min流速条件下用纯乙腈润洗色谱柱，然后在2分钟内将流速升至0.5 mL/min。
5. 当溶剂均匀的从柱出口端流出，停流速，将色谱柱出口端接到系统检测器上(这样可以避免气泡进入检测系统，并且可快速达到基线平衡)。
6. 重启流速，按照步骤4的方法逐渐提高流速，至常规分析时所使用的流速。
7. 参考柱效测试报告中的方法，使用该流动相条件平衡色谱柱，通常需要使用5-10倍柱体积的流动相，直至压力与基线稳定。
8. 测试柱效。如果没有柱效测试报告中的分析物，请联系沃特世化学消耗品部门寻求支持，使用合适的浓度与进样量。柱效结果略低于柱效测试报告属正常情况。如结果明显偏低、峰形拖尾，提示色谱柱和/或所使用的液相系统处于非理想状态，需要进行故障排查。

当使用2.1 mm内径色谱柱时，建议优化系统以减少谱带展宽，包括：使用检测器微量流通池，减少进样器loop环体积，使用较小内径(如0.005"或0.12 mm)的系统管路。并确保管路与色谱柱连接恰当、无死体积。

当使用小颗粒填料(如2.5 μm)短柱进行高效快速分离时，需要考虑以下因素：

- 确保管路及与色谱柱连接恰当、无死体积，尽量优化系统减少谱带展宽；
- 提高采样频率至10点/秒以上；
- 较小粒径的色谱柱产生的柱压较高，而较小粒径要达到最优色谱效率所需的线速度较高，请根据所用LC系统的实际情况调节流速；
- 可使用较高的柱温来补偿小颗粒造成的压力升高，例如40 °C。使用杂化颗粒反相色谱柱时，可使用45 °C或更高。

进行实际样品分析的推荐步骤：

1. 确保流动相洁净，每隔24-48小时就应新配水相流动相，并同时更换或仔细清洗流动相溶剂瓶，以避免流动相长菌。确保实验室纯水系统工作正常。
2. 确保样品不含颗粒型杂质。如样品过脏，或有微粒存在，需要考虑适合的样品制备方法。在使用样品过滤器时，确保滤膜为0.22 μm，且与样品溶剂完全兼容(不发生溶解)。也可考虑使用高速离心法去除颗粒性杂质，例如8000 rpm转速以上离心20分钟后，移取样品上清液进样。
3. 确保样品溶液与流动相条件兼容，进样后不会发生沉淀、或溶剂不互溶情况。通常使用流动相比比流动相洗脱强度弱的溶液(即有机溶剂比例较低)溶解或稀释样品，这样可以获得最好的峰形和检测灵敏度。

4. 如系统在线混合生成流动相，预先检查流动相各组分的兼容性。例如，当磷酸盐缓冲液与高浓度乙腈(例如≥70%)混用时，可能发生盐析出。
5. 了解色谱柱的操作使用限度。如果所使用的流动相条件、柱温、以及样品溶液条件，不利于色谱柱寿命时，请使用保护柱以延长柱寿命。
6. 在使用流动相进行柱平衡之前，如果流动相中含有可能析出的缓冲盐，先使用5倍柱体积的有机溶剂-水溶液进行过渡。例如，在使用40/60甲醇/磷酸盐缓冲液流动相之前，先使用5倍柱体积的40/60甲醇/纯水溶液冲洗色谱柱。
7. 在常规分析过程中，每针或间隔若干针清洗柱内可能积累的污染物。完成分析后，彻底清洗色谱柱，除去柱内缓冲盐和污染物。
8. 在色谱柱使用过程中，定期进行柱效测试，记录塔板数与压力，从而追踪监控色谱柱的性能变化。柱效测试方法应固定。
9. 反相色谱柱应保存于合适的高比例或100%有机相(如乙腈或甲醇)中。如色谱柱使用于高温或极端PH条件，或停用色谱柱超过72小时，用100%乙腈保存色谱柱。
10. 使用原配的柱堵头，确保堵头拧紧以避免柱内溶剂挥发。取放色谱柱时避免磕碰掉落。

柱清洗与再生的推荐步骤：

压力升高，色谱柱峰形发生变化如出现严重拖尾、肩峰甚至峰分岔，分离度降低，这些都强烈提示色谱柱受到污染。可采用以下步骤处理：

1. 如系统接有在线过滤器和保护柱，首先排查在线过滤器与保护柱，进行更新替换。日常操作中，当压力升高10%或柱效降低10%时，就应考虑更换在线过滤器和/或保护柱。
2. 使用高比例的有机溶剂进行冲洗(请注意避免盐析出，通常可使用梯度升高法，然后维持在高比例甚至100%有机溶剂条件下)。此操作通常可洗去大部分污染物。
3. 如有机溶剂清洗不能解决问题，可采用如下方法进行色谱柱的清洗和再生。根据样品性质以及你所了解的污染物性质选择清洗方法，用20倍柱体积(即，对于4.6x250 mm柱，相当于80 mL)的HPLC级溶剂清洗色谱柱，将流动相温度升至35-55 °C可提高清洗效率。

极性样品	非极性样品	蛋白质类样品
1.水	1.异丙醇*	选择1: 连续进几针DMSO(二甲基亚砜)，以溶解柱头析出样品
2.甲醇	2.THF**	
3.THF**	3.二氯甲烷**	选择2: 10-90%B梯度冲洗，其中A为0.1%TFA水溶液，B为0.1%TFA乙腈。
4.甲醇	4.正己烷**	
5.水	5.异丙醇*	选择3: 使用7M盐酸胍或7M尿素水溶液(配制后膜过滤)冲洗色谱柱，促使柱上吸附蛋白样品变性溶解。
6.流动相	6.流动相	

* 注意防止缓冲盐析出，可调整为适当比例的异丙醇和水的混合溶液

** 除非确保您的系统与四氢呋喃和正己烷完全兼容，否则四氢呋喃或正己烷只有在色谱柱无法用反相有机溶剂如乙腈清洗干净时才考虑使用。降低流速及操作温度，并尽量减少系统在四氢呋喃和正己烷中的暴露时间。

4. 可以考虑对色谱柱进行倒冲，特别是当问题表现为压力急剧升高，提示有颗粒型物质直接堵塞于色谱柱入口端筛板处时。操作时，将色谱柱倒接，并与检测器断开。使用低流速0.2 ml/min，进行过夜冲洗，并封堵检测器入口及出口端以免溶剂挥发产生气泡。甚或，将色谱柱小心的打开，直接更换柱入口端筛板。注意！这类操作需要技巧，仅作问题确实无法得到有效解决时的最后尝试，或供某些经验丰富的分析操作人员参考使用。