
色谱柱的故障诊断与维护

液相色谱柱

介绍提纲

I. 常见问题， 现象及排除方案

- 基线漂移/噪音
- 峰型
- 压力变化
- 保留漂移

II. 日常维护/ 良好的实践

- 在线装置
- 样品制备
- 操作的限制

III. 再生/维修已损坏的色谱柱

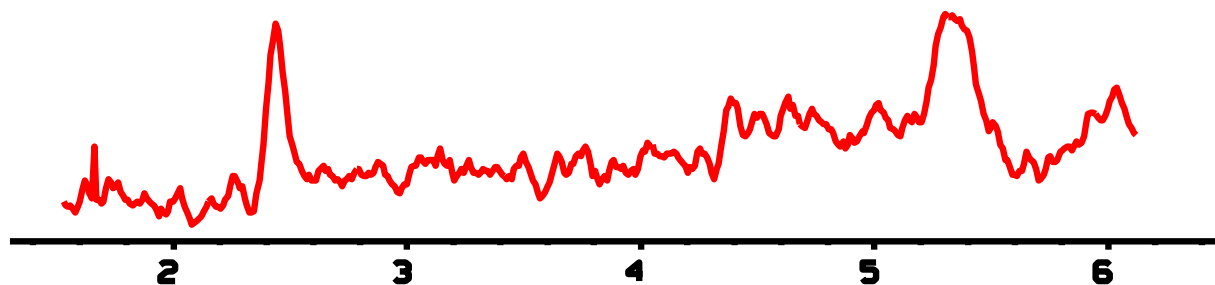
- 物理方法
- 化学方法

I. 常见问题

基线噪音

可能的原因:

- 流动池脏
- 检测器灯有问题
- 如果是周期性的，则起源于泵的脉冲
- 温度对检测器的影响
- 气泡经过检测器

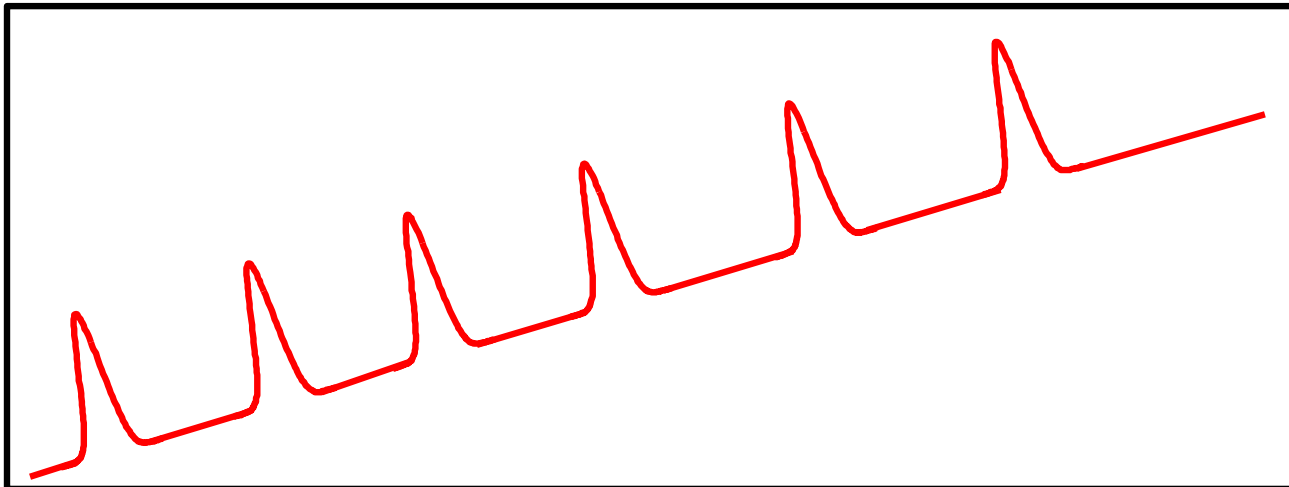


Time (min.)

基线漂移

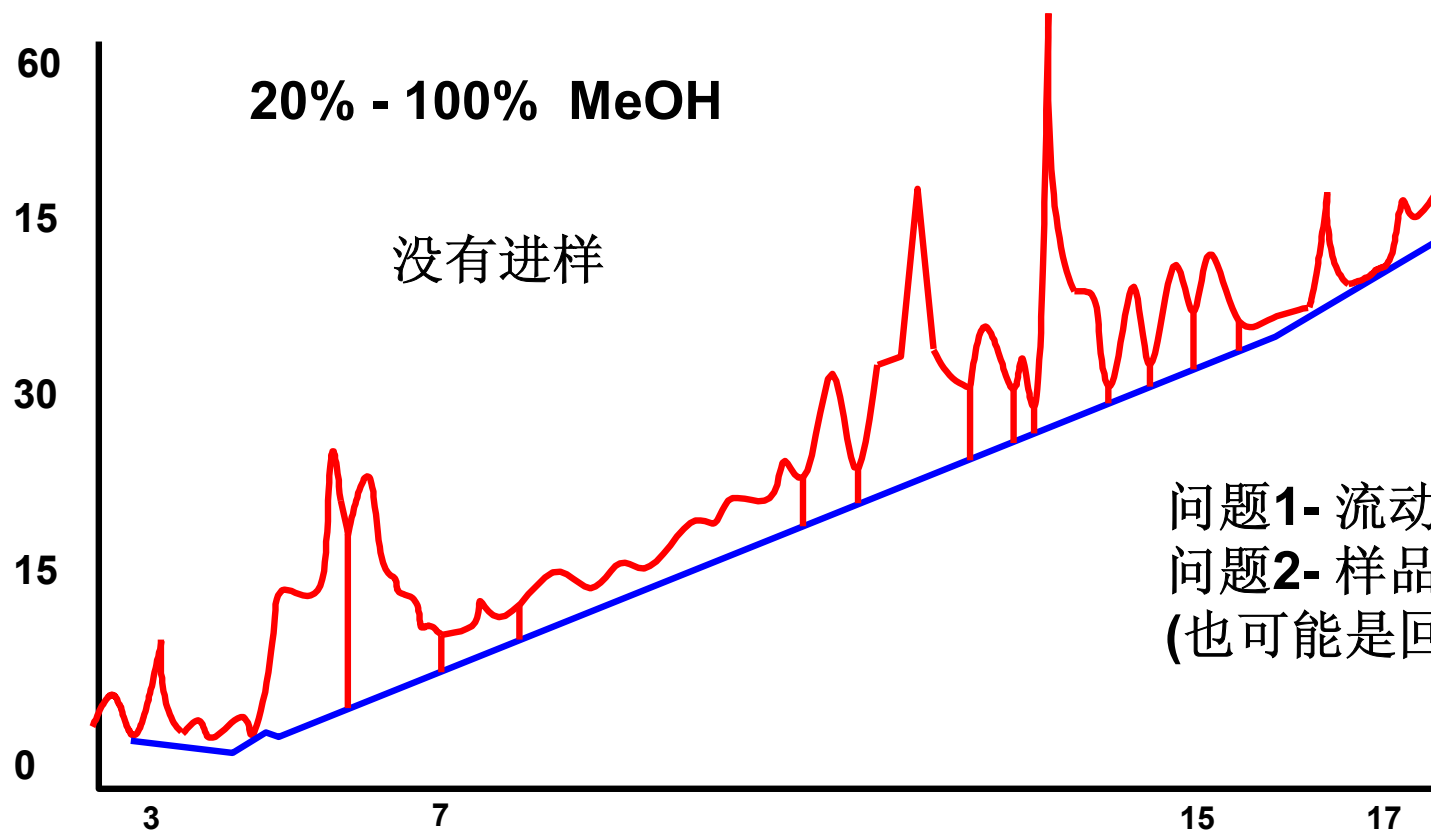
可能的原因：

- 梯度洗脱
- 温度不稳定 (示差检测器)
- 流动相中有污染物
- 柱中的流动相没有平衡
- 体系中有污染物流出



鬼 峰

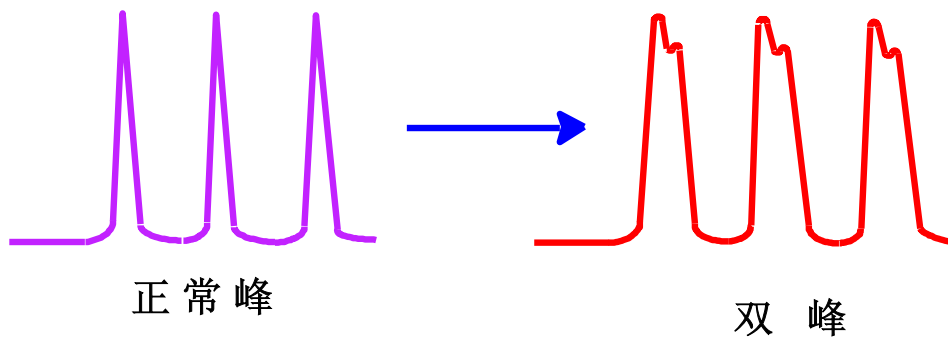
鬼峰——即使不样也会出现的峰



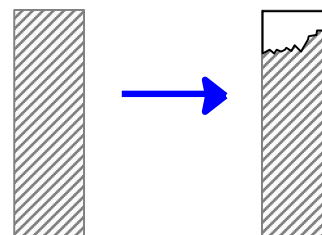
问题1- 流动相脏
问题2- 样品过量
(也可能是回收率太差)

峰型

双峰



柱塌陷

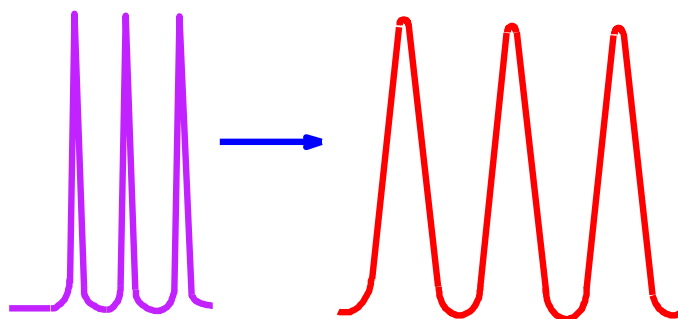


可能原因：

- 柱中有死体积
- 过滤片部分堵塞
- 只有一个双峰——组分的共洗脱
- 样品与溶剂不匹配

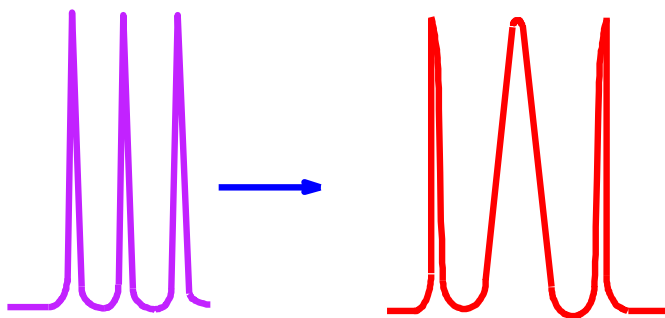
峰型

峰展宽



所有的峰都展宽

- 柱效降低——柱死体积
- 大进样量 / 质量
- 高粘度流动相
- 样品与流动相不匹配

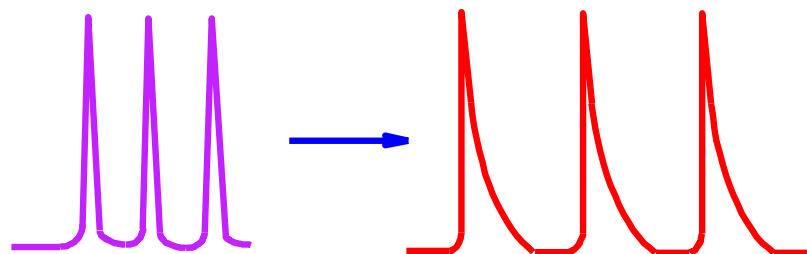
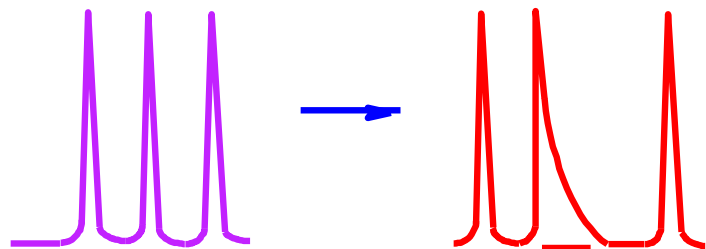


部分峰展宽

- 前次进样后流出的组分
- 大分子量样品——蛋白或聚合物

峰型

拖尾峰
对称性 > 1.2



原因:

部分峰拖尾

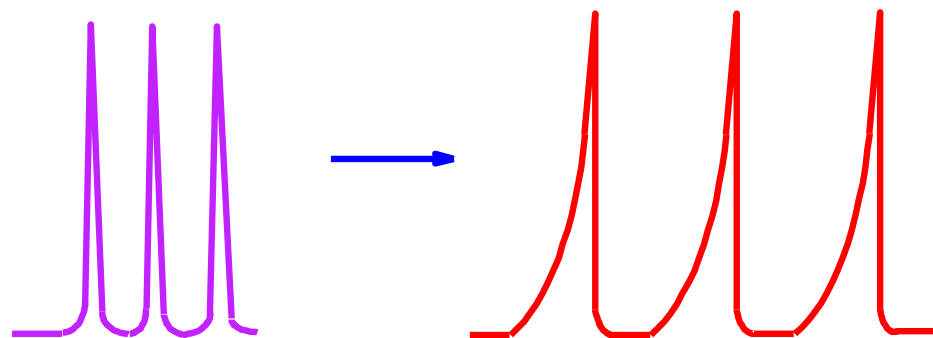
- 二次保留效应——残留硅醇基的反应
- 小峰紧跟在大峰的后面流出

所有峰拖尾

- 额外的柱效应
- 柱损坏
- 柱头有污染
- 金属
- 不适当的样品量/溶剂

峰型

前伸峰
不对称性 < 0.9



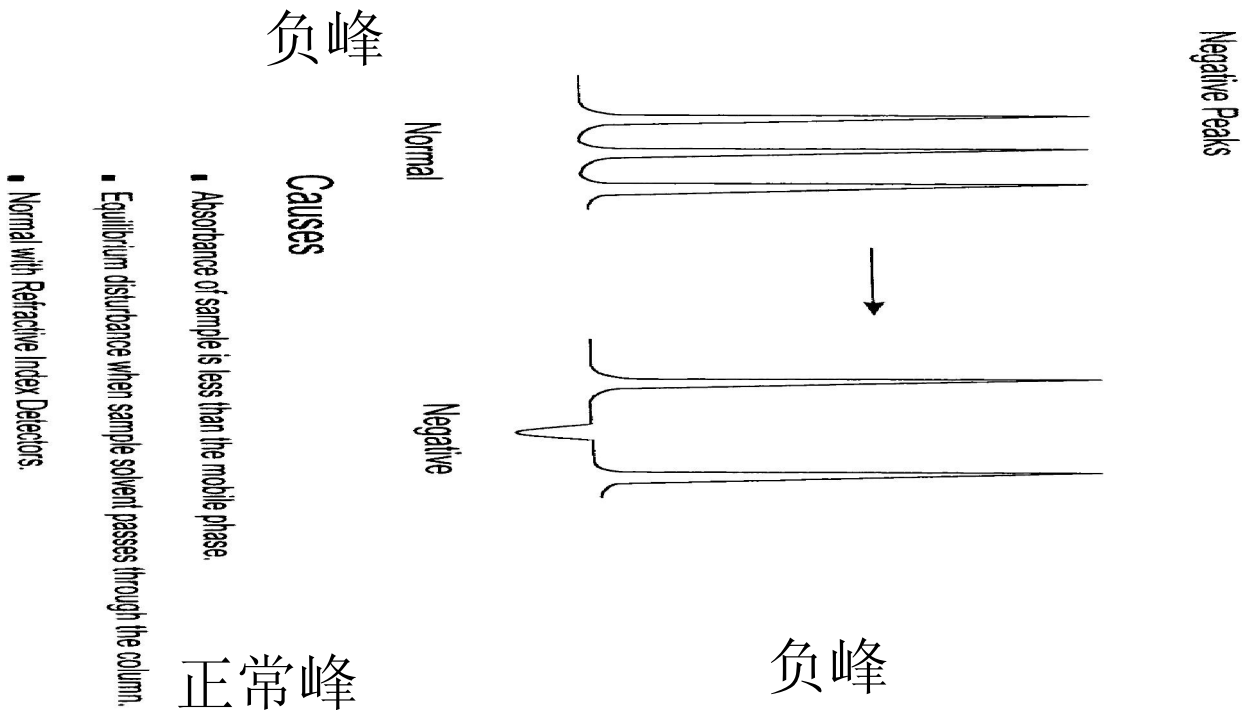
可能的原因

- 在大峰前，有小峰流出
- 柱死体积
- 样品溶剂不适当
- 过滤片部分堵塞
- 柱过载

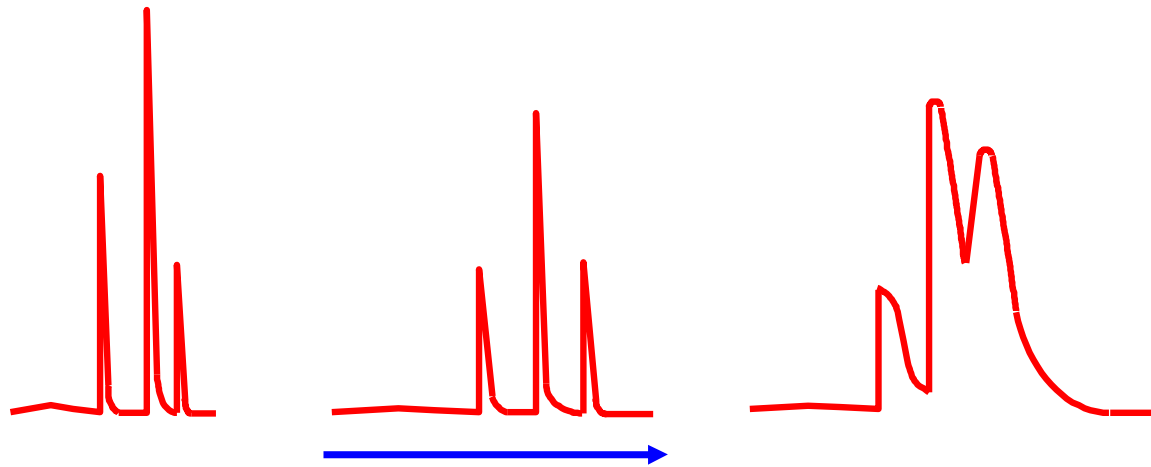
峰 型

原因

- 样品的吸收比流动相的吸收值低
- 当样品组分通过色谱柱时打破了原来的平衡
- 用示差检测器时是正常的



宽峰



柱外体积增加

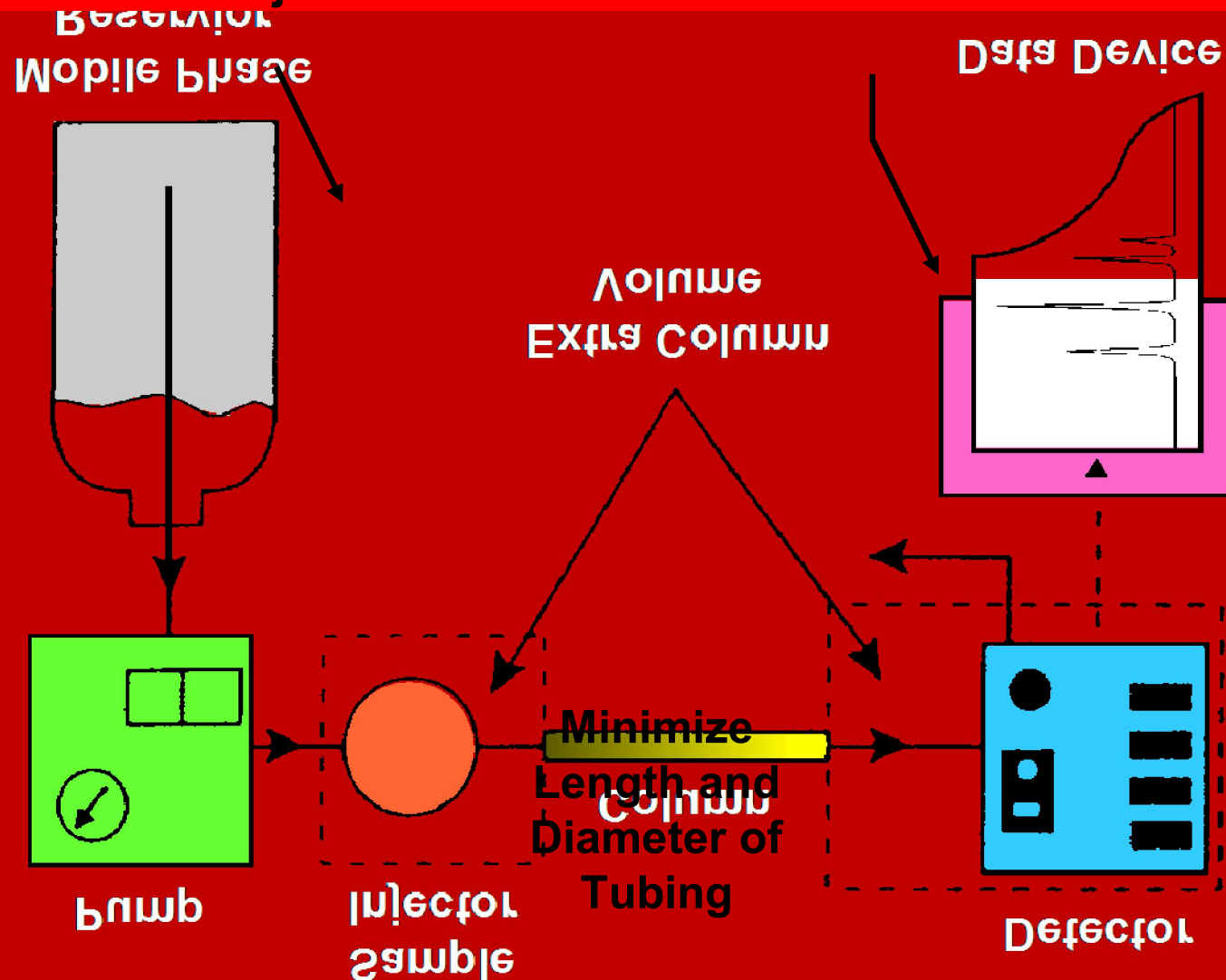
- * 在进样口到柱或柱到检测器之间，使用细的短的连接管
- * 保证所有的管路接头都使用正确
- * 用小体积检测池
- * 减少进样量

柱外体积

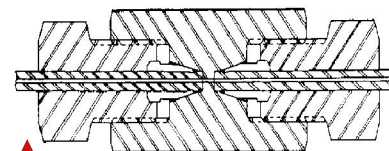
$$E.C.V = V_{inj.} + V_{tubing} + V_{cell}$$

Do Not Volume Overload
Injection

Use Appropriate Volume
Flow Cell



HPLC使用的接头

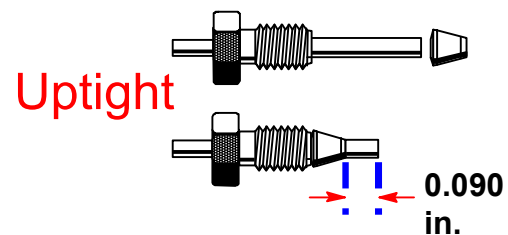
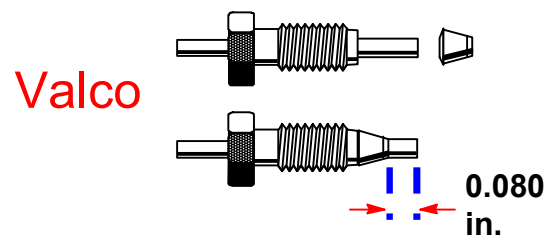
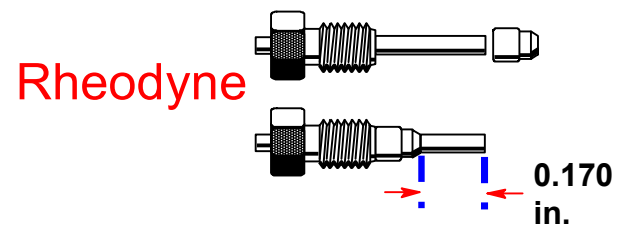
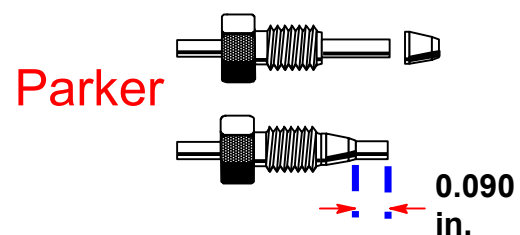
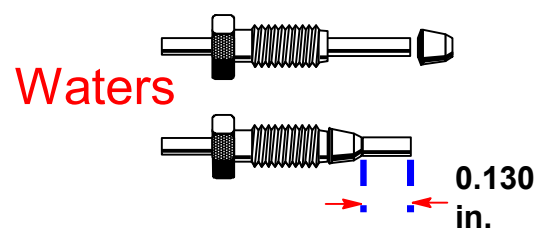
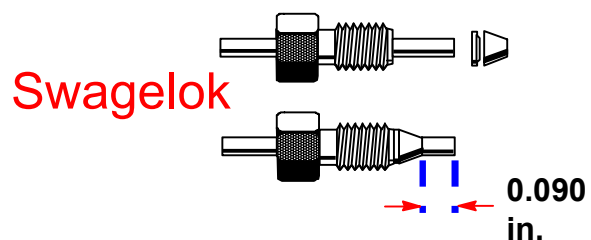


↑
无死体积接头



↓
不适用的接头

HPLC中使用的柱接头



*Troubleshooting
LC Fittings, Part II.*

*J. W. Dolan and
P. Upchurch.*

*LC/GC Magazine
6:788 (1988)*

柱外体积效应的影响

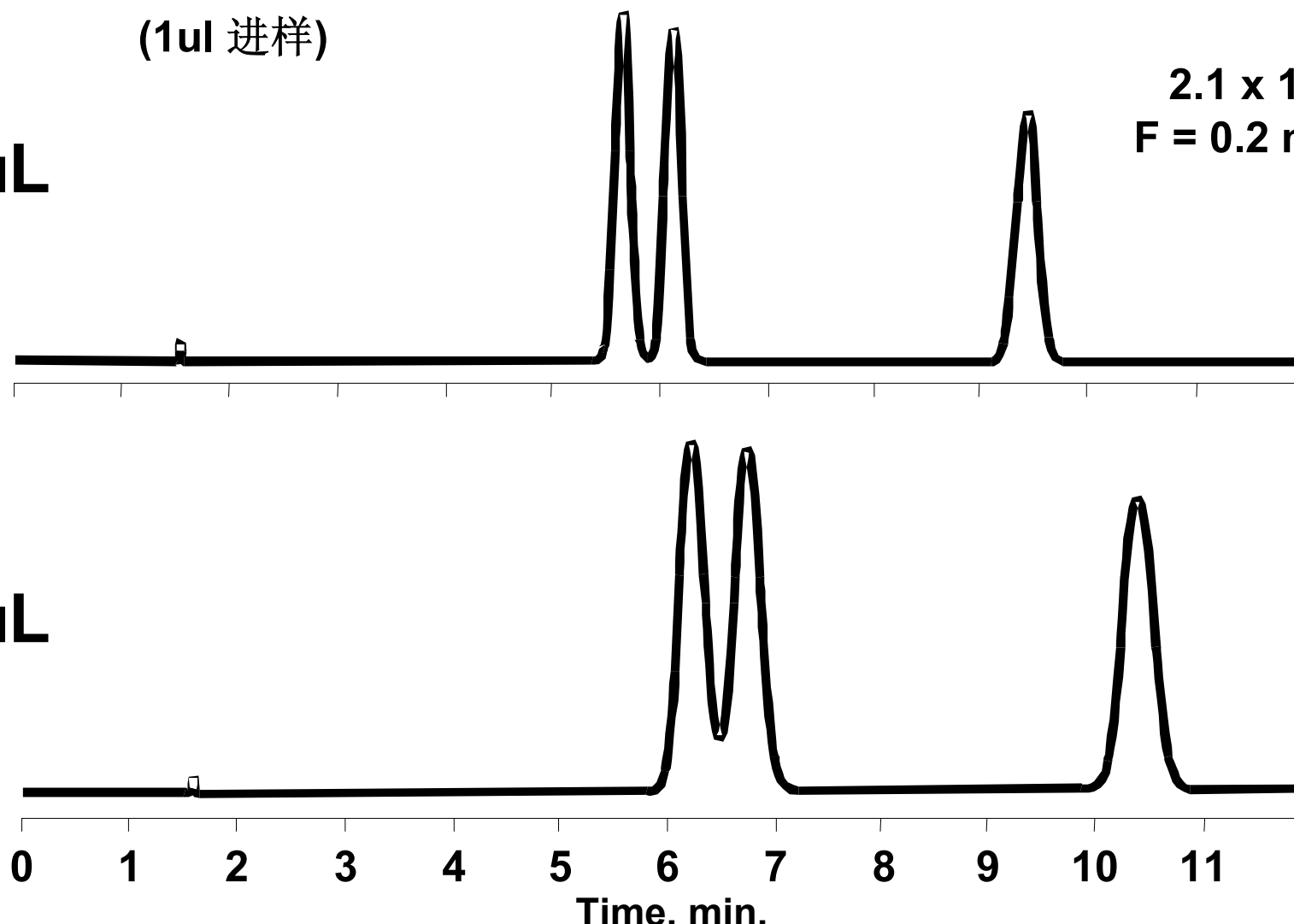
柱外体积

(1 μ L 进样)

10 μ L

2.1 x 150 mm
F = 0.2 mL / min.

20 μ L



压力

I. 不进样时柱压连续升高

- 泵密封垫
- 流动相有颗粒
- 流动相溶解性
- 流动相的不稳定性 (聚合)
- 形成柱死体积 (与使用条件有关)

II. 进样时压力升高

- 样品有颗粒
- 样品在流动相中不溶
- 样品组分与固定相不兼容

保留值漂移

I. 所有峰都向低保留值方向漂移（酸、碱、中性化合物）

- 键合相流失
- 流动相不稳定 (可能性较小)
- 溶剂输送系统 (流速变化)

II. 所有峰都向高保留值方向漂移

- 在水/有机溶剂的混合体系中，有机溶剂含量减少
- 柱改变 (可能性较小)
- 溶剂输送系统 (流速变化)

III. 离子型化合物的色谱峰的保留值漂移

- 流动相中挥发性组分损失 (离子强度, pH 漂移)
- 柱改变 (键合相或污染)

保留值漂移

I. 与流动相有关的问题

- 使用新鲜的流动相

?pH

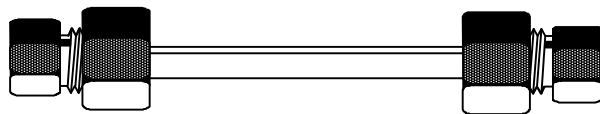
?电导

?色谱性能测试

II. 与色谱柱有关的问题

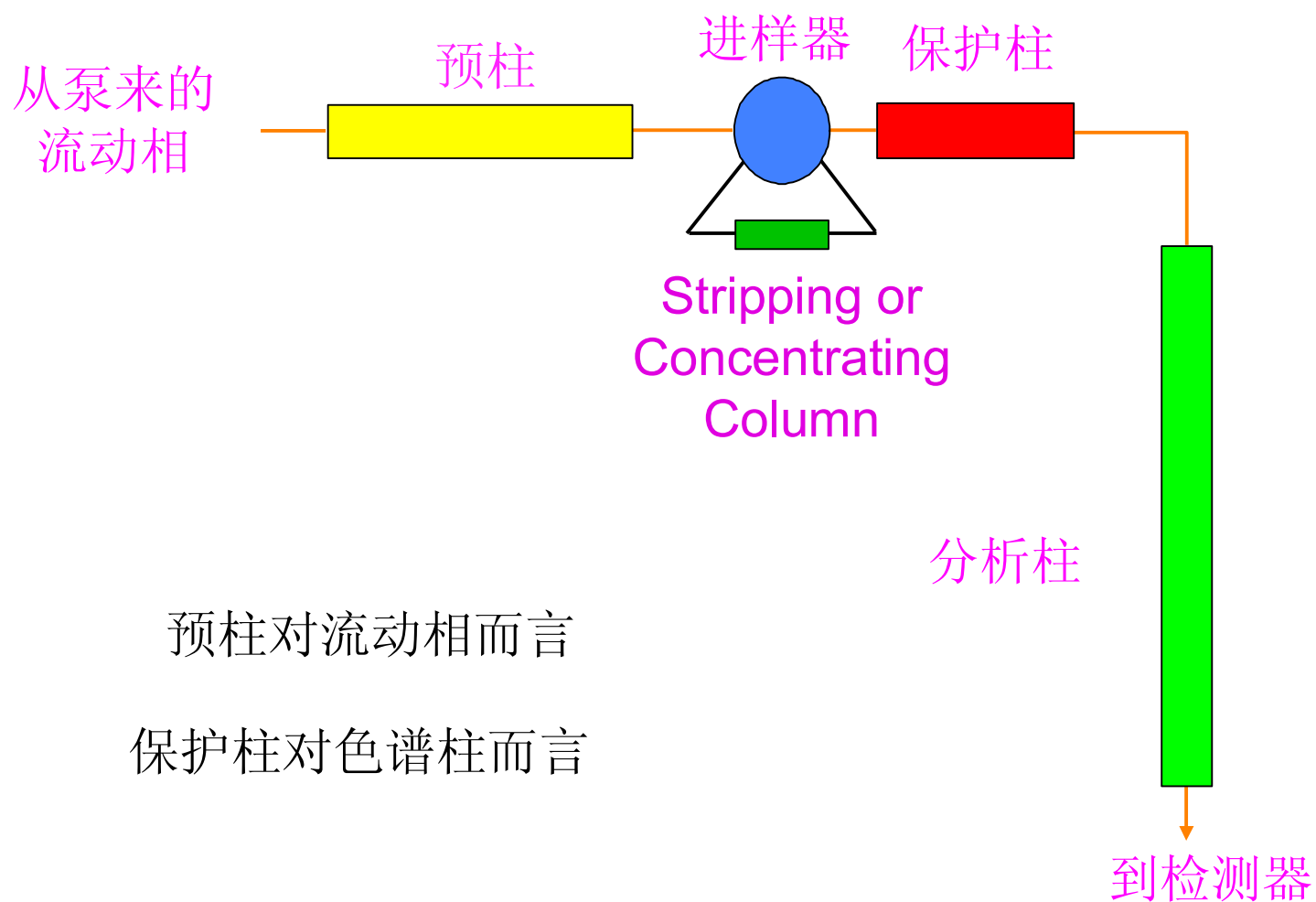
- 测试新柱
- 用标准的测试混合样测试新柱
- “清洗” 色谱柱后再测
- 考虑样品基质与使用条件对柱稳定性的影响

良好的柱使用规范



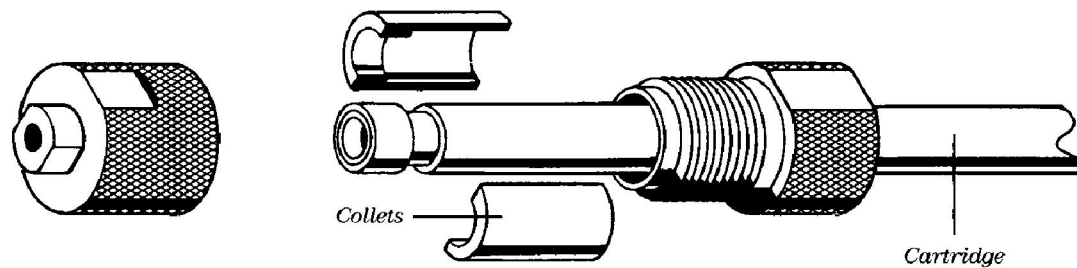
- 在使用前过滤溶剂
- 完全润湿在运输中变干的色谱柱
- 了解溶剂对样品的溶解性及分离的影响
- 对含有保留性较强的杂质组分的样品要进行预处理
- 清除柱填料的局限性
 - pH
 - 温度
 - 化学兼容性
- 使用新鲜的水溶液，并考虑使用生物稳定剂（如叠氮化钠）
- 定期用强极性的溶剂清洗色谱柱
- 储存色谱柱时，应冲净缓冲液，并用有机溶剂饱和色谱柱（乙腈）
- 避免外力损伤色谱柱：弯曲、跌落或将接头拧的过紧

预柱与保护柱



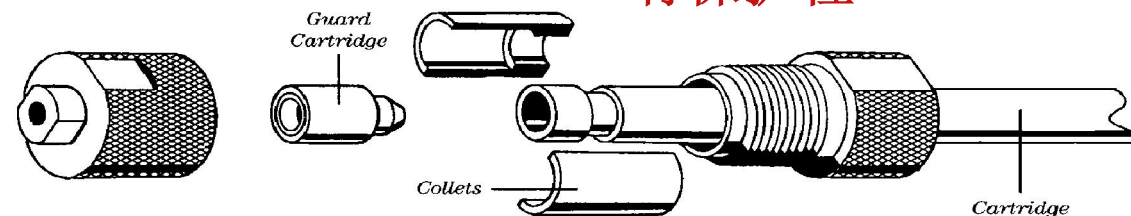
帶可重复使用接头及 完整保护柱的卡套柱

无保护柱

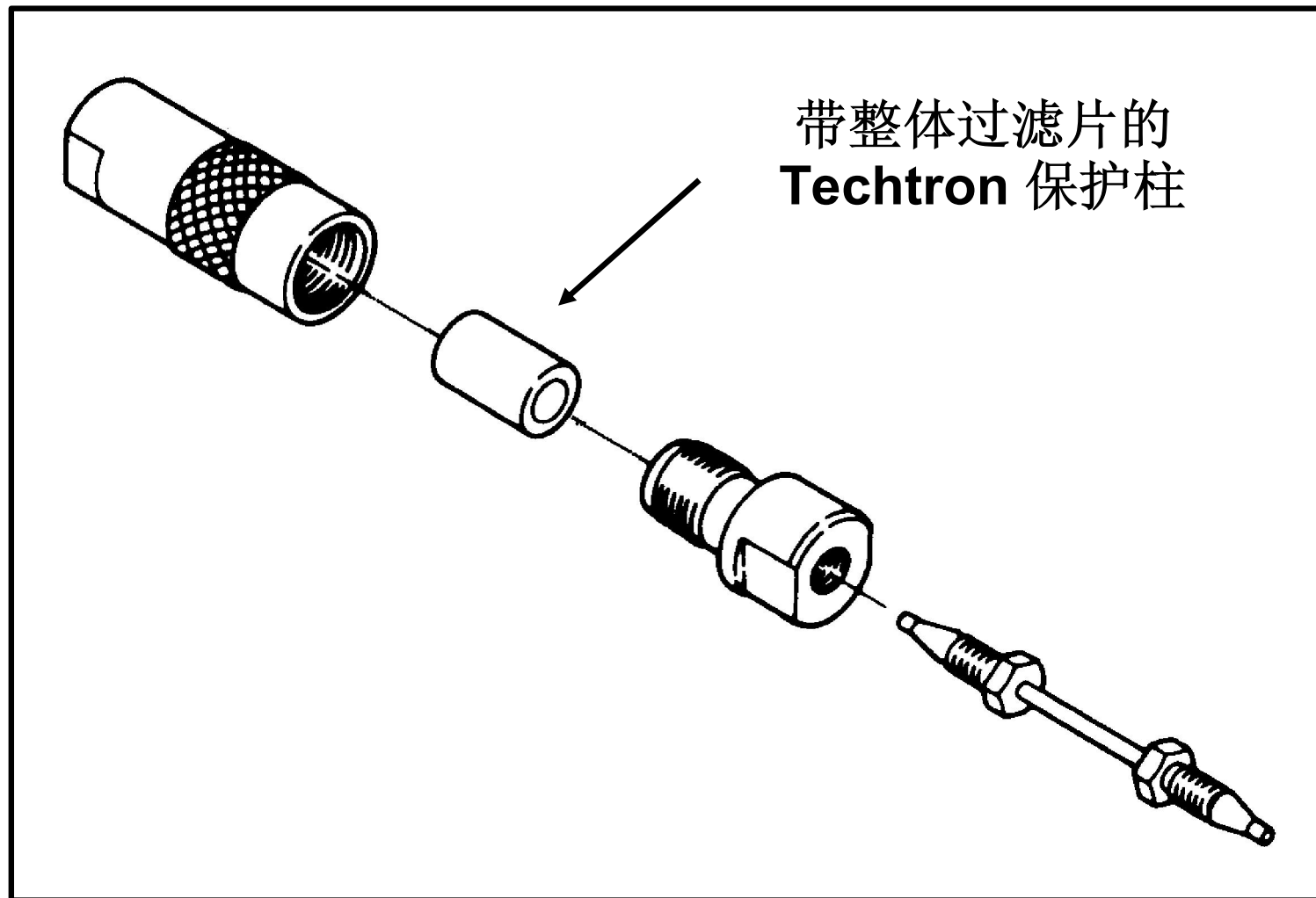


**Cartridge
Columns**

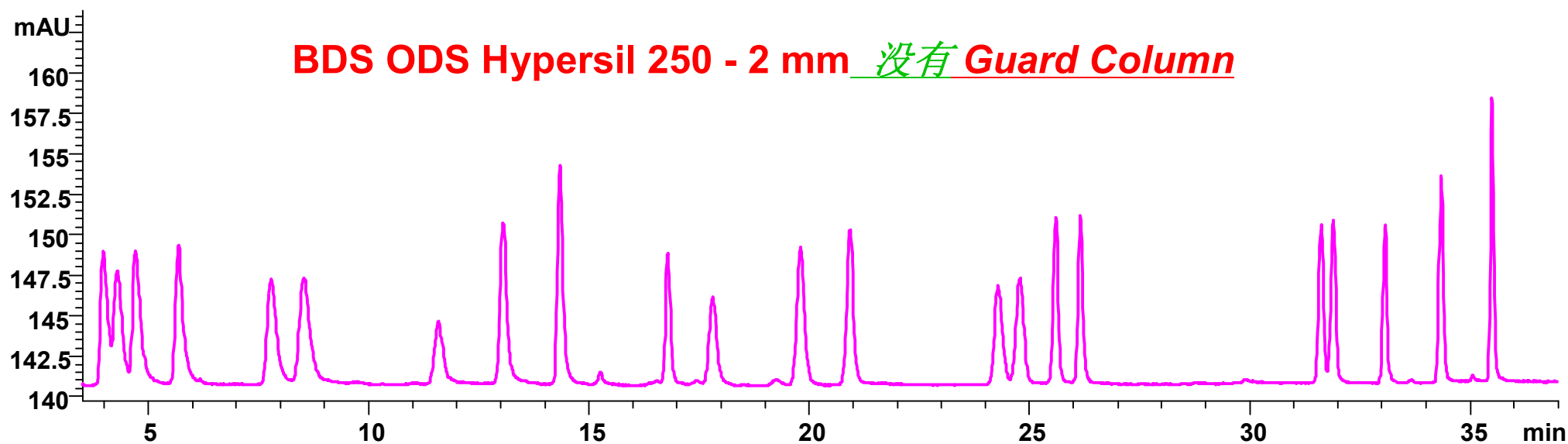
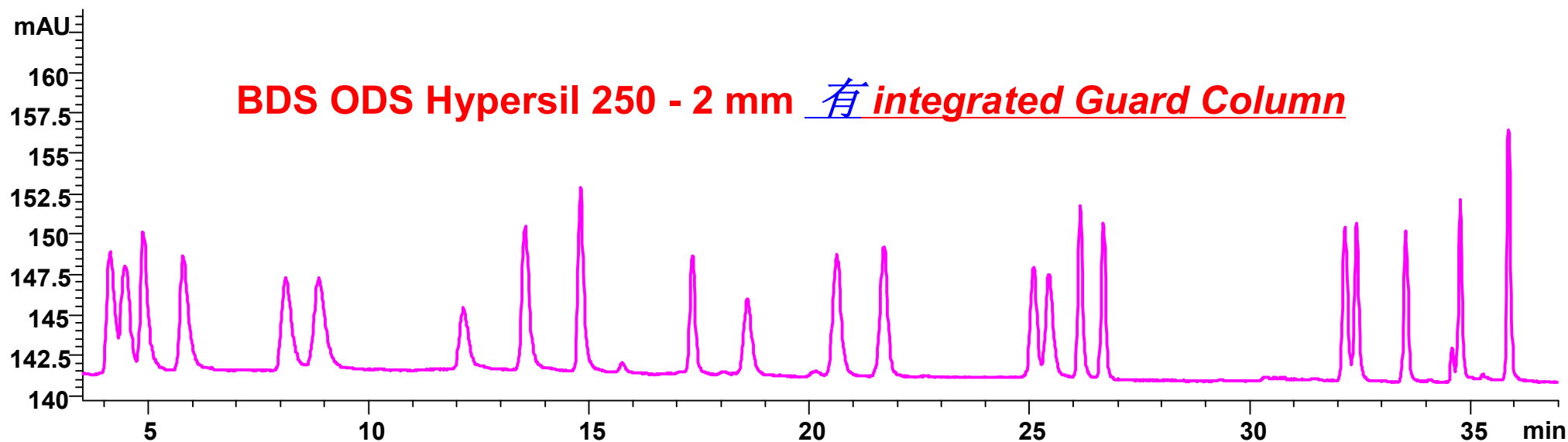
有保护柱



带Techtron保护柱的 Zorbax 卡套柱



2 mm ID 卡套柱有或无保护柱的比较



制备样品: 流动相

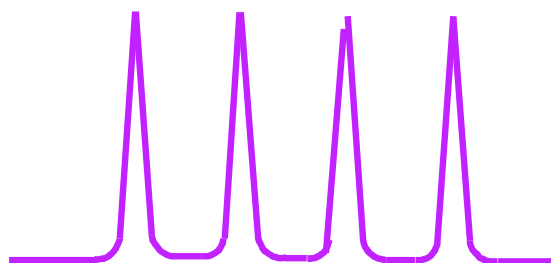
真正的环境样品

- 样品的溶解性
- 溶剂强度
- 体积效应

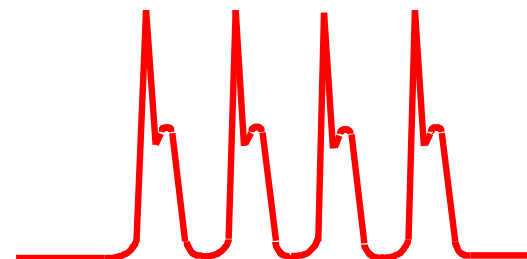
Contaminant

- 微粒
- 强保留的组分

- 过滤样品，以确保其不含有固体微粒
- 用流动相或比流动相极性较弱的溶剂溶解样品
- 进样的样品体积应尽量小



样品溶于流动相



样品不溶于流动相

样品制备方法的进步

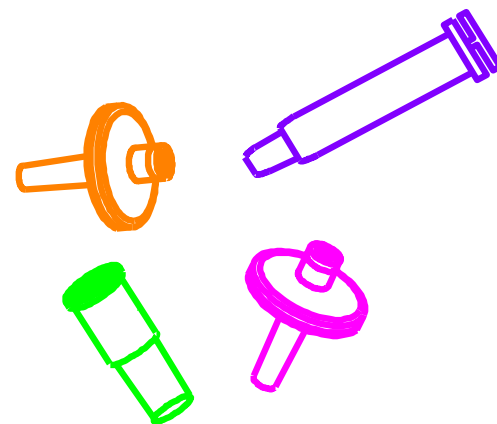
1. 固相萃取（**SPE**）

- 硅胶基键合相品种全
- 可多次使用的聚合物（唯一的选择性）
- 自动化工艺
- 玻璃、**Teflon**基体适合高灵敏度的工作
- 专业化，滥用药物，儿茶酚胺、脱盐、去金属

2. 屏蔽亲水相/内部多孔载体

3. 带不同功能团的过滤膜

4. **SPE**薄膜

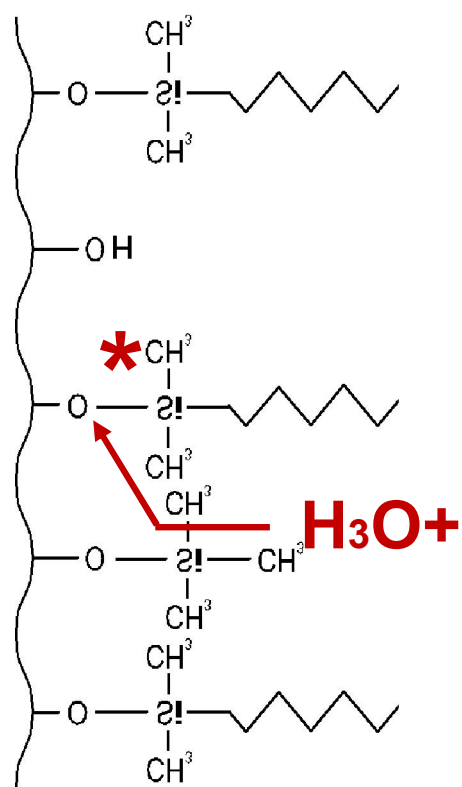


操作条件 --

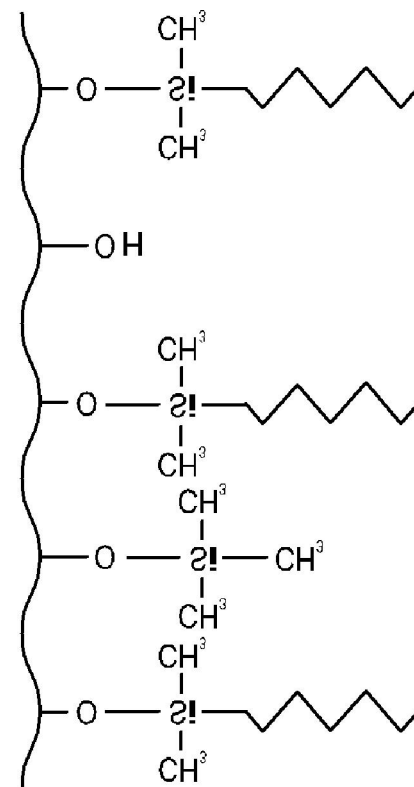
流动相对柱寿命的影响

低pH (1-3) - 酸催化水解，键合相流失

普通柱



稳定键合柱

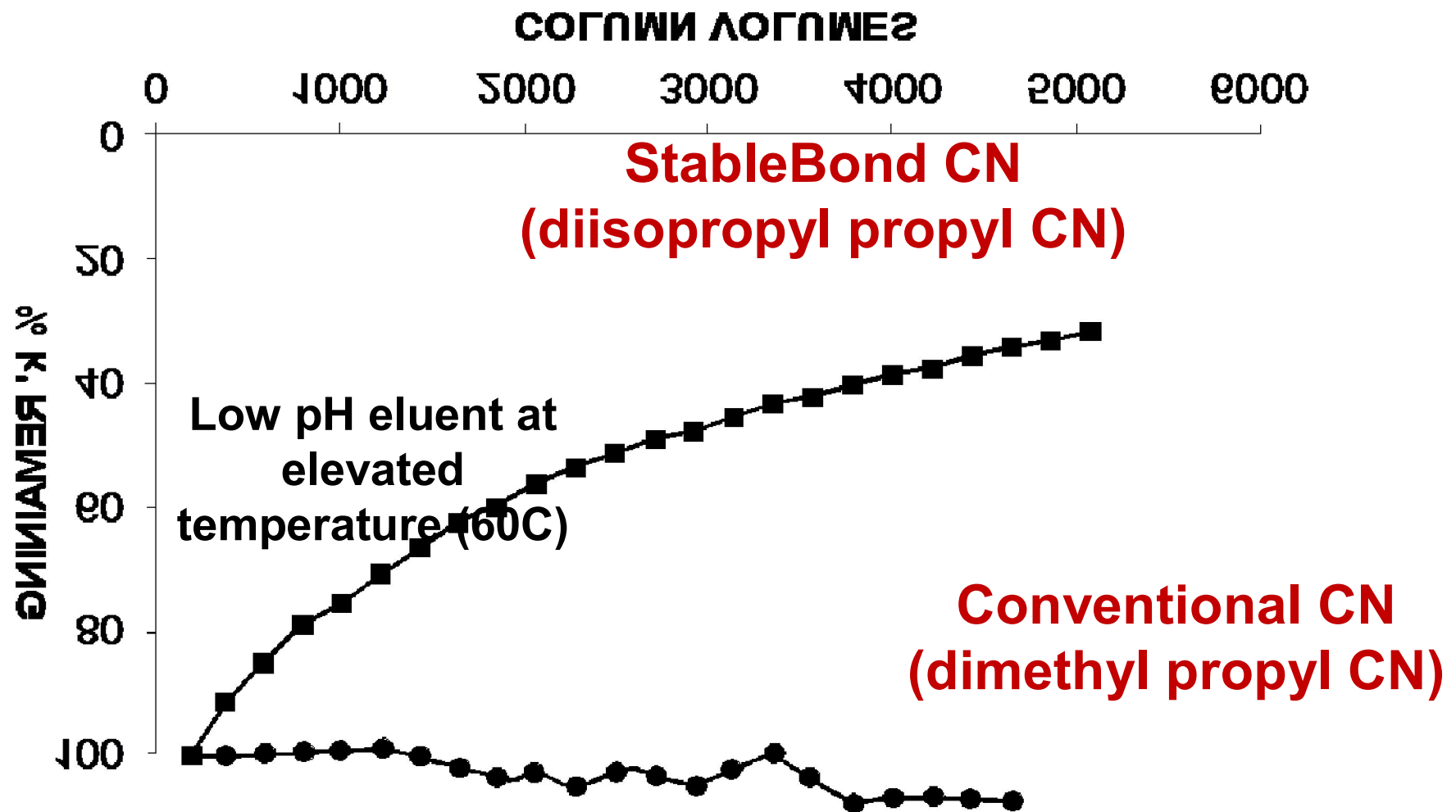


* 易水解的硅氧键

操作条件 --

流动相对色谱柱寿命的影响

键合相水解速度随温度的升高而加大



— 色谱柱的修复与再生 —

物理性阻塞

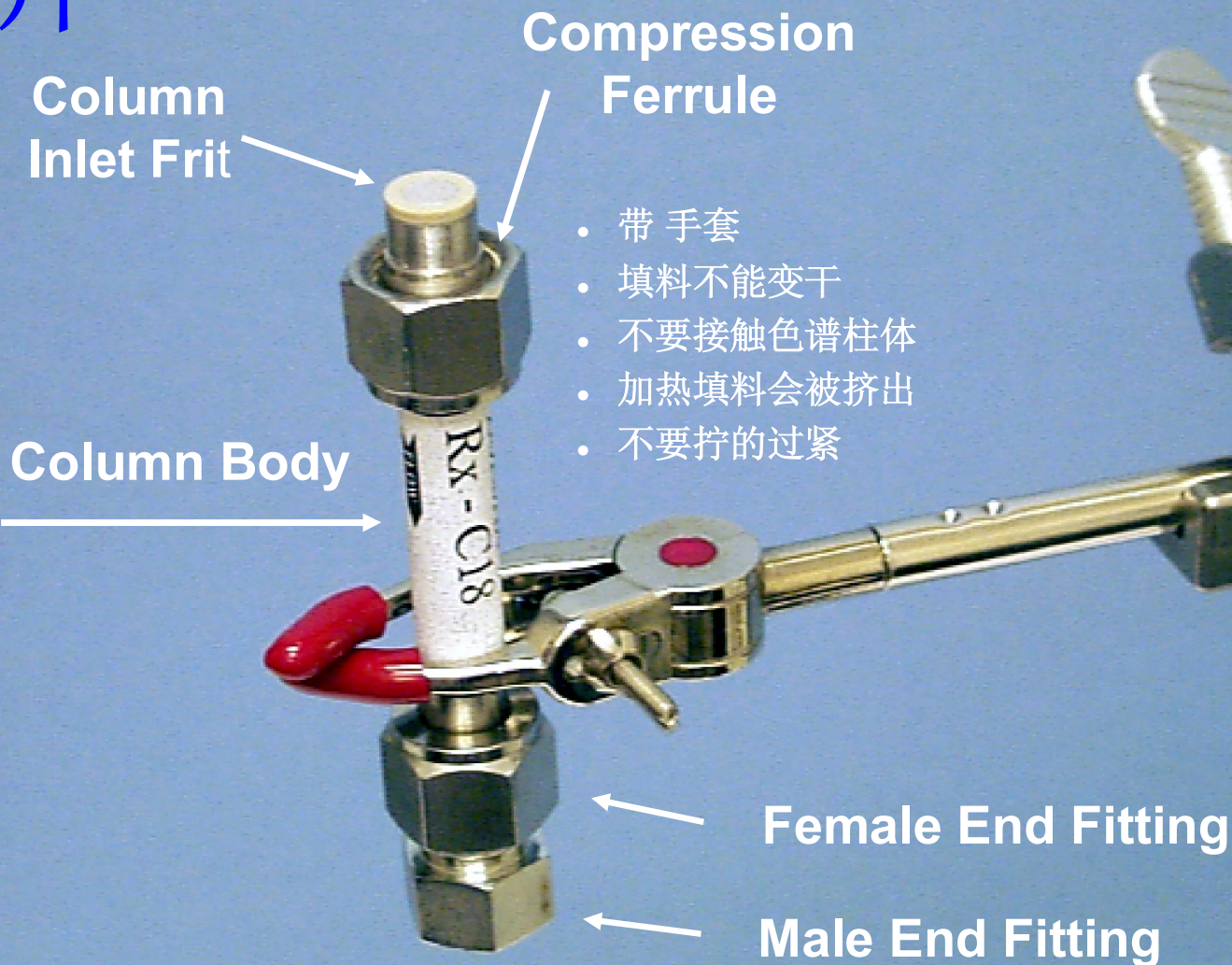
塞

- 在安装柱前后测试压力差
- 如果柱压力太高，反装色谱柱，并用10-20倍柱体积的流动相冲洗色谱柱，监测压力变化
- 若出现沉淀 (如：蛋白凝聚、细胞物、聚合物) 设法用相应的可溶性溶剂，如 0.1% TFA / 80% 乙腈, 6M 盐酸胍, THF, HFIP
- 若仍无效，应考虑更换过滤片

色谱柱故障诊断 --

更换进样口过滤

片



色谱柱修复和再生

化学变化-

由于键合相的水解或硅胶的溶解而造成的色谱柱填料的变化是不可逆的

- 由于污染而产生的色谱柱变化可以通过适当的清洗使之修复
- 梯度洗脱的方式 (水 -> 强有机溶剂) 通常最有效
- 低 pH 流动相, 如 0.1% TFA or 0.01M H₃PO₄, 也是有效的
- 升高温度 (60-80°C)

— 色谱柱的修复和再生 —

化学变化 -II

Example:

4.6 mm ID x 15 cm Zorbax 300SB-C18

Flow rate: 1 mL / min; Temp: ~80°C

A: 0.1% TFA in water B: 0.1% TFA in acetonitrile

100% A for 30 min.; 0-100% B over 30 min.;

Hold 100% B for 30 min., Return to 100% A in 5 min.

Repeat 3 times.

- 6M 盐酸胍、异硫氰酸胍、尿素等溶液可用于清除蛋白质的沉积
- XDB, 有机聚合物等填料可使用高pH 水溶液 / 有机溶液, 如: 0.01M NaOH
50% 异丙醇 / 水溶液, 硅胶基质应尽量减少接触时间 (15-30 min).

总 结

如果使用时加以注意，大部分的液相色谱柱的问题是可以预防的

- 流动相必须是互溶的，无颗粒
- 使用保护柱和在线过滤器，并定期更换
- 使用恰当的样品制备方法
- 使用恰当的色谱柱清洗程序
- 不同类型的色谱柱，请选择不同的操作条件
(如: **SB: pH 1-6, XDB: pH 3-11**)
- 保存柱反压及重要的色谱参数的记录 (如: **R, N, As, k'**)
- 色谱柱需保存在有机溶剂中 (乙腈)