

色谱柱常见问题解答

FAQs for column users

By CSD AEs

1.液相色谱柱柱压升高问题

造成柱压升高的可能原因有很多。一般是由于色谱柱筛板或柱头发生了堵塞，造成流动相阻力加大所引起。当然色谱系统其他部分发生堵塞，也可能表现为柱压（系统压力）升高。所以在发现系统压力升高时，可首先使用两通短接色谱柱观察相同条件下系统本压是否正常，排除压力升高为系统其他部分造成。

- 2 色谱柱筛板堵塞，这往往是由于流动相没有过滤，或虽已过滤但滤膜孔径过大或滤片损坏，使固体杂质滞留在筛板上造成的。可采用反冲的方法去除堵塞物。对于 5 或 3.5 μm 填料的色谱柱，建议采用 0.45 μm 膜厚过滤样品，1.8 μm 填料的色谱柱，请采用 0.2 μm 膜厚过滤样品。
n 同样类似堵塞也会发生于排气阀过滤芯、在线过滤器和保护柱，这时建议更换滤芯，在线过滤器内的筛板或保护柱内的柱芯。
- 2 非特异性吸附 当部分组分在柱子上有较强的非特异性吸附，且当前所用的流动相难以将它们洗脱时，强保留组分的累积则会造成阻力增大和压力升高。可使用适当的溶剂冲洗以除去吸附物质。
- 2 样品的沉淀 当样品所用的溶剂与流动相不一致时，样品进入柱中时有可能因溶解度降低而沉淀出来，造成压力升高。此时建议使用对样品有较高溶解度的溶剂冲洗。
- 2 盐晶体的析出 使用较高浓度的缓冲液或添加有缓冲液的流动相后，如果冲洗不彻底，缓冲液中的无机盐成分可能会残留在体系之中。它们会因在新流动相体系中溶解度降低而析出，造成流动相阻力加大，压力升高。
- 2 更换流动相时置换不彻底 当改换流动相体系时，不彻底的更换使不同性质、互不相溶的流动相存在一个体系中，也会造成压力升高。可使用混溶的溶剂（异丙醇）彻底冲洗。

备注：

安捷伦液相色谱柱冲洗建议

反相色谱柱 用以下溶剂至少各 25mL 冲洗色谱柱(分析柱)

- 不含缓冲盐的流动相
- 100% 甲醇
- 100% 乙腈
- 75% 乙腈+25% 异丙醇
- 100% 异丙醇
- 100% 二氯甲烷 *
- 100% 己烷*

*若使用己烷或二氯甲烷冲洗色谱柱，则在重新使用反相流动相以前，必须用异丙醇冲洗色谱柱 !!!

正相色谱柱 用以下溶剂至少各 50mL 冲洗色谱柱(分析柱)

- 50% 甲醇+50% 三氯甲烷
- 100% 乙酸乙酯

除有特殊说明外，安捷伦的液相色谱柱在柱头发生堵塞时可以反冲。

2.液相色谱柱保留时间变化

保留时间不重现可能由多种因素引起，通常还会影响到峰面积的重现性，建议检查以下几个方面：

- 2 确认流动相是新鲜配制的，比例没有错误。比如一些挥发性的溶液，如乙酸，最好及时更换。
- 2 确认色谱条件在色谱柱使用范围之内，如 pH 范围、温度、压力。
- 2 仔细观察柱前压的变化，如果压力稳定，就可以判断泵的系统没有问题；如果是压力不稳定，一定会影响保留时间，这种状况通常是由于泵头里有气泡造成的。请将流动相仔细脱气，并排出泵内气泡。
- 2 观察色谱峰形、柱效变化情况，确认色谱柱是否被污染，如果确定色谱柱污染，可尝试使用适当溶剂冲洗。
- 2 如果同时伴有色谱柱柱压升高，解决方法请参见“液相色谱柱柱压升高”部份。
- 2 如果使用梯度洗脱方法，请确认平衡时间足够长。流动相中使用离子对试剂（烷基磺酸钠等）或固定相为正相硅胶等，往往需要更长的平衡时间。
- 2 确认样品是否过载，减少进样量（进原进样量的 10% 确认）。
- 2 组分在色谱柱中保留不够。调整色谱条件，使样品在柱上适当保留。

3.气相色谱峰拖尾、响应低甚至不出峰的主要原因

A) 系统污染、惰性下降

系统惰性不好对活性组分峰形及响应的影响尤为明显。建议选用惰性优异的低流失色谱柱和色谱耗材，如去活的衬管。如果系统已经被污染，应及时对进样口和检测器进行维护。

恢复被污染色谱柱的方法主要有：

将进样口端截去 0.5~1 米，根据样品来源做进一步的判断，如果是半挥发污染物，还可以进一步考虑对色谱柱进行老化。

污染严重时可截去更长或用溶剂彻底清洗色谱柱（必需是交联键合固定相）

B) 色谱柱安装不正确或系统其他部位存在死体积

毛细管柱在进样口和检测器的安装位置不当将影响峰形，请严格按照仪器的使用说明正确安装色谱柱。其他与毛细管柱相连接的部位也应注意降低死体积。

C) 系统漏气

需定期检查系统气密性、更换进样口备件。使用非纯石墨密封圈时，注意安装后的几次温度升降之后追加一次拧紧。

D) 方法条件不佳

对于低挥发性样品，需注意提高进样口和/或检测器、色谱柱、传输管线等处的温度，防止冷凝现象。

有些样品在某些检测器的响应确实不高（甚至没有响应），如果样品不出峰，又没有参考响应值，应加大进样量确认出峰位置，并利用标样考查样品的响应值。

E) 其他可能导致峰拖尾的原因：

- 2 不分流模式下，分流放空阀开启过晚（通常应在 0.5~1.0 分钟之间）
- 2 手动进样速度过慢
- 2 检测器尾吹气流量不足
- 2 PLOT 色谱柱样品过载
- 2 组分共流出
- 2 含磷化合物在 NPD 白色铷珠上易拖尾，建议使用黑色铷珠。

4.液相分析样品前处理

进样上柱的样品必须是可重现的均质溶液，样品前处理是为了尽可能除掉对分析有干扰的杂质，保证好的重现性及不损害色谱柱，且能与 HPLC 色谱条件相兼容。

A) 溶剂

溶解样品的溶剂应该能溶于流动相而不影响样品的保留值和分离度，最好使用流动相溶解样品或使用比初始比例流动相洗脱能力更弱的溶剂来溶解样品。当样品所用的溶剂与流动相不一致时，应避免样品进入柱中时因溶解度降低而导致沉淀。

未溶解的或含颗粒物的样品溶液会造成堵塞，进样前一定要使用合适的滤膜过滤。

B) 进样量

在分析级色谱中，加到色谱柱上的样品量一般是 μg 水平，也可以更少。如果样品溶液浓度过大，可通过稀释降低溶液中被测物的浓度，以避免色谱柱超载或检测器超限。进样体积也应该尽量小，避免由于体积超载对分离造成不良影响。

为了适应检测灵敏度的需要，某些痕量分析需要将样品浓缩、富集。

C) 样品纯度

可根据样品性质和分离目的，使用固相萃取（SPE）、溶剂萃取等其他样品前处理手段，最大程度去除干扰物质或色谱柱“杀手”干扰物，达到纯化和富集目标化合物的目的，同时延长色谱柱使用寿命。

组分非常复杂的样品往往需要预分离为简单的片段避免色谱峰过分重叠。

5.气相分析样品前处理

气相色谱所能分析的样品应是可挥发的、且是热稳定的，沸点一般不超过 500°C 。

A) 样品要求

GC 能直接分析的样品必须是气体或液体。固体样品在分析前应当溶解在适当的溶剂中，或是通过特殊的进样技术（如顶空进样和裂解进样）进行间接分析。

直接分析的样品要保证样品中不含不挥发的组分(如无机盐)或可能损坏色谱柱的组分(如无机酸和碱:盐酸、硫酸、硝酸、磷酸、全氟酸、CrO₃、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钠)。除了无机酸和碱外,交联键合的色谱柱对于化学品都有较好的惰性。

B) 溶剂

丙酮、己烷、氯仿等是 GC 常用的溶剂,一般来说,溶剂应具有较低的沸点,从而使其容易与样品分离。溶剂选择还应考虑到所使用的检测器,如 ECD 检测时,不适宜使用卤代溶剂;水不宜进入 MSD、NPD 和 ECD。

C) 进样量与纯度

如果采用毛细管柱分析,应注意样品的浓度不要太高,以免造成柱超载,通常样品的浓度为 mg/ml 级或更低。

如果样品中有不能用 GC 直接分析的组分,或者样品浓度太低,就必须进行必要的预处理,包括采用一些预分离手段,如各种萃取技术(SPE)、浓缩、提纯等方法。

6.气相色谱柱的老化

开管涂壁(WCOT)气相色谱柱的老化

A) 老化目的

烘烤去除色谱柱表面的污染物(随样品或载气进入和冷凝下来的污染物、降解的固定相碎片),以获得干净而平稳的基线。

B) 老化步骤: 老化前接好色谱柱,接通载气并确保系统无漏气。通常来讲,将色谱柱连接在检测器上进行色谱柱老化是安全的,并不会污染检测器。只是对于高灵敏度检测器(如 MSD 和 ECD),最好不将色谱柱连接检测器进行老化。老化时将炉温逐渐升至(升温速率没有具体限制,可以参考将进行的分析条件,建议使用比具体实验条件更快的升温速率)老化温度,然后在老化温度下持续老化。

C) 老化温度:

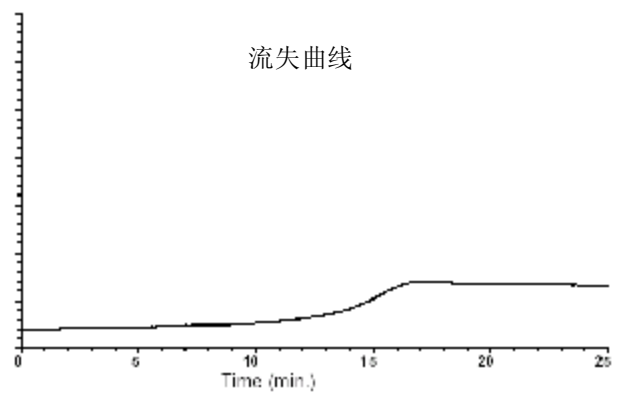
- 2 可以参考将进行的分析条件,可在方法的最高温度基础上加 20 度(但不得超过色谱柱的恒温温度上限)进行老化
- 2 如果尚无分析方法,可在色谱柱的恒温温度上限减 20 度进行老化。

D) 老化时间:

老化时间主要取决于应用分析对灵敏度要求以及操作者可接受的流失程度。对于 WCOT 色谱柱,通常推荐的老化时间为 2~3 个小时。当方法对灵敏度的要求较高、固定相的极性较强或膜厚较厚时,老化时间需要适当延长。

E) 如何判断色谱柱已经老化充分:

色谱柱老化之后,可利用流失曲线来检查是否已老化充分。流失曲线是在不进样情况下运行程序升温所获得的色谱图。正常的流失曲线(如下图)随温度升高平滑上升,且没有明显杂峰。



开管多孔层(PLOT)色谱柱的老化

PLOT柱与WCOT柱的老化方法不尽相同，主要区别在于：

- 2 首先安装PLOT柱于进样口，然后以 2~3psi/min 的速度逐渐增加到建议流速：(内径 0.32 mm: 2 to 4 mL/min; 0.53 mm: 6 to 9 mL/min)
- 2 在接上检测器之前，在室温下用载气吹 3~5 分钟，吹去固定相表面已脱落或不稳固的颗粒。
- 2 在没有超过色谱柱最高使用温度下老化色谱柱，下表为安捷伦推荐的 PLOT 柱老化温度及老化时间：

安捷伦 PLOT 色谱柱的老化温度及时间建议

色谱柱	老化温度 (°C)	老化时间(小时)
HP-PLOT Molesieve	300-350	3-4
HP-PLOT Al ₂ O ₃ "KCl"	200	8
HP-PLOT Al ₂ O ₃ "S"	200	8
HP-PLOT Al ₂ O ₃ "M"	200	8
GS-Alumina®	200	8
HP-PLOT Q	270	3-6
GS-Q®	250	8-10
HP-PLOT U	190	3-6
GS-GasPro	260	3-6
GS-CarbonPLOT	300-350	3-6
GS-OxyPLOT	300	3-8

7. 液相色谱峰拖尾原因

A) 色谱柱污染

如果色谱柱开始使用时峰形正常，使用一段时间后逐渐出现峰拖尾，则色谱柱被污染的可能性很大，这时需要对色谱柱加强冲洗，即使用比方法流动相更强的溶剂冲洗色谱柱。安捷伦

的色谱柱还可以反冲，反冲的冲洗效率比正着冲要更高。

建议做好样品前处理，但如果前处理后依然比较脏，强烈建议配置保护柱。一旦峰形变差，柱效下降，应及时更换保护柱芯。

B) 柱外死体积

较大的柱外死体积会导致峰形扩展和峰拖尾，建议仔细检查样品经过的所有管路及各连接部位，请使用合适的管线和接头。

C) 样品过载

D) 样品溶剂过强

样品溶剂的强度应不高于流动相的洗脱强度。最好使用流动相溶解样品或使用比初始比例流动相洗脱能力更弱的溶剂来溶解样品。

E) 组分共流出

如果一小峰包含在一大峰后面，这一共流出的峰会显现为拖尾峰。需要做好色谱条件的优化，有条件时可利用 D A D 检查峰纯度。

F) 流动相的 pH 在样品 pKa 附近

流动相的 pH 在样品的 pKa 附近时，样品解离平衡不充分，容易出现前伸峰或拖尾峰。所以流动相的 pH 应尽量选在样品 $pK_a \pm 1.5$ 以外

G) 色谱柱填料表面的惰性不够好

键合硅胶型填料表面的残留硅羟基或金属杂质易与待测化合物发生二次作用而导致拖尾。

建议：

- 2 选用高纯硅胶合成填料的色谱柱以及进行了有效硅羟基封端填料色谱柱。安捷伦的液相色谱柱均采用高纯硅胶为原料，在封端技术方面拥有优异的专利技术，而且不断地改进和创新。
- 2 或降低流动相 pH，抑制硅羟基解离
- 2 或流动相中添加减尾剂，如三乙胺
- 2 或使用不同的有机相溶剂

8.液相色谱柱的维护

A) 正确的安装

- 2 请注意不同仪器的接头，尤其是不锈钢接头。如安捷伦的液相色谱，采用的是 Swagelok 接头。保证正确的安装，没有死体积。
- 2 安装时力度适中，确保流动相经过时不会有漏液产生，同时不要太紧，防止出现管线“卡”在色谱柱上的情况发生(尤其是不锈钢接头，一般以用手拧紧后，再用扳手拧上 1/4~1/2 圈为宜)

B) 正确的使用

- 2 使用前认真阅读色谱柱使用说明书
- 2 注意色谱柱的 pH 适用范围、温度及压力上限 (参考下表)
- 2 使用色谱级的有机溶剂
- 2 使用新鲜配置的流动相
- 2 使用经过滤和脱气的流动相
- 2 较“脏”样品使用保护柱或在线过滤器
- 2 定期用强溶剂冲洗色谱柱 (色谱柱内说明书均有相应的建议)
- 2 定期做好色谱柱测试及记录工作 (每个色谱柱包装盒内均有柱效测试报告)

performance report, 可参照此报告进行测试)

- C) 正确的保存
- 2 使用之后认真冲洗色谱柱 (如果流动相使用了缓冲盐体系, 建议在冲洗时将缓冲盐一相换成相同比例的纯水相, 冲洗 10~15 倍柱体积后, 换成纯有机相冲洗)
 - 2 使用之后将色谱柱保存于适合的溶剂中 (参考下表)

备注:

安捷伦常见的色谱柱 pH 适用范围、温度, 保存建议

键合相	pH 适用范围	温度上限	长期保存建议
Zorbax Eclipse XDB-C18	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse XDB-C8	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse XDB-苯基	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse XDB-CN	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse XDB-AAA	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse Plus-C18	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse Plus-C8	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Eclipse Plus-PAH	2~8	60°C(pH<6)	60% 乙腈:40% 水
Zorbax Bonus-RP	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax StableBond C18	1~8	90°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax StableBond C8	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax StableBond C3	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax StableBond CN	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax StableBond Aq	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax 300SB C18	1~8	90°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax 300SB C8	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax 300SB C3	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax 300SB CN	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Poroshell 300SB-C18	1~8	90°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Poroshell 300SB-C8	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Poroshell 300SB-C3	1.8~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Poroshell 300Extend-C18	2~11.5	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax 300Extend C18	2~11.5	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Extend C18	2~11.5	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Rx-SIL	0.8~8	\	100% 乙腈
Zorbax Rx-C18	1.8~8	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Rx-C8	1.0~8	80°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax SIL	0.8~8	\	100% 乙腈
Zorbax NH ₂	2~7.5	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax CN	2~8	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax ODS	2~8	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax C8	2~8	60°C(pH<6)	100% 乙腈

Zorbax TMS	2~7	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax Carbohydrate	2~7.5	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax 300SCX	2~6.5	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Zorbax SAX	2~7	40°C(pH<6)	100% 乙腈
Agilent TC C18	2~8	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Agilent HC-C18	2~9	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Agilent HC-C8	2~8	60°C(pH<6)	100% 乙腈
Agilent Prep-C18	2~10	60°C(pH<6)	100% 乙腈

9.气相色谱柱的维护

A) 正确的安装，好的开始是成功的一半！

- 2 区分进样口端与检测器端，铁标签上的字正对安装者。
- 2 确保进样口的洁净度，如有污染，请更换衬管和分流平板。
- 2 正确切割毛细管柱
- 2 安装之后做好柱配置（EPC 系统，输入色谱柱规格后，请进行柱长校正）
- 2 对新色谱柱进行适度老化

(安捷伦 GC 柱包装及消耗品手册中有详细的色谱柱安装说明)

B) 正确的使用

- 2 请勿划伤色谱柱表面的聚酰亚胺涂层，因此不要将色谱柱与尖锐的表面直接接触。
- 2 注意色谱柱盒包装侧面的温度上下限。
 举例：HP-5MS, 30m×0.25mm×0.25μm，温度限为-60°C 至 325°C/350°C。三个温度从左到右的含义分别是：
 温度下限：低于此温度使用可以导致柱效下降，但对色谱柱没有损害。
 恒温温度上限：恒温使用色谱柱时，此温度为最高上限。
 程序升温温度上限：程序升温使用此色谱柱时，可升至此温度，但不可超过 15 分钟。
- 2 确保密封无漏气 **(使用纯度高的载气，新的进样隔垫，规格合适的密封圈都是必需的)**
- 2 做好样品前处理，防止将不挥发的物质及对色谱柱伤害较大的化合物(如：无机酸和碱)引入色谱柱中，如果无法将这此物质在进样前除去，请在分析柱前接保护柱。

C) 正确的保存

- 2 气相色谱柱不使用时，请从 GC 上卸下，并用旧的密封隔垫将其两端封住。下一次使用时，需要把色谱柱两端修整掉 2-4cm，以确保隔垫碎屑不会堵塞色谱柱。
- 2 如果把色谱柱留在加热的 GC 中，一定要保证始终有载气通过气相色谱柱。

10.室温下气态样品分离的色谱柱选择建议——PLOT 柱选择指南。

