

## 缓冲盐使用不当对色谱柱的影响及解决办法

在色谱分析过程中常常需要使用缓冲盐来调节流动相的 pH 值，缓冲盐的不当使用对色谱柱可能造成柱压升高、柱效下降以及使化合物的保留时间发生变化等影响：

**1)柱压升高;**原因：缓冲盐使用不当导致缓冲盐析出，堵塞塞板和键合相颗粒之间的孔隙，阻碍流动相传质，引起柱压升高;**2)相同化合物的保留时间发生变化;**原因：如果没有冲洗干净就进行进样，色谱柱内含有的盐会使化合物的保留时间发生变化;**3)柱效下降;**原因：i)有些缓冲盐会渗入到键合相的深处，损害硅胶基体，导致色谱柱键合相流失，柱床变松，柱效下降;ii)凝结在键合相表面，使 C18 碳链难以舒展，对物质的保留能力下降，导致柱效下降。因此用过缓冲盐后需要对色谱柱进行冲洗，水中缓冲盐浓度较大时应特别引起注意。流动相中缓冲盐的正确使用方法 **1. 使用前的处理:** 在使用缓冲盐作流动相之前需要用不含缓冲盐的流动相冲洗色谱柱，直至基线平稳。原则上，用于冲洗的流动相与分析时所用的流动相含水的比例相同(或含水更多)，不同的只是用于冲洗用的流动相中不含缓冲盐。理由：缓冲盐通常易溶于水，难溶于有机溶剂。用含缓冲盐的(特别是做流动相的水为饱和的缓冲盐溶液时)流动相进行分析时，如果分析前色谱柱中用于保存色谱柱的流动相中含水的比例相对较小，不先冲洗掉，接下来做样品的时候所用的流动相中如果有机溶剂含量大，而其比例中所含的水又不足以溶解该缓冲盐时，缓

冲盐将会在色谱柱柱体上析出，沉积下来，这将可能导致上述对色谱柱的损害。

**2. 使用后的处理：**用与分析时含水比例相同的流动相(与分析用流动相唯一的区别是，用于冲洗的流动相不含缓冲盐)进行冲洗约 30min，直至基线平稳。如果该色谱柱在接下来很长的一段时间内不使用，要长期保存，则需再加上一步，即用纯的有机溶剂冲洗一遍，直至基线平稳。用与分析时含水比例相同的流动相(与分析用流动相唯一的区别是，用于冲洗的流动相不含缓冲盐)进行冲洗约 30min，直至基线平稳。如果该色谱柱在接下来很长的一段时间内不使用，要长期保存，则需再加上一步，即用纯的有机溶剂冲洗一遍，直至基线平稳。缓冲液可以提供离子平衡的反离子，并使流动相保持一定的离子强度和 pH 值，减少拖尾。使用缓冲液要注意几点

- 1：避免使用盐酸盐，盐酸盐对钢质有腐蚀作用。
- 2：缓冲液最好要现配现用，往往缓冲液是良好的菌类培养液，隔天或放置长时间实验时会有很多怪现象发生。
- 3：实验后不可用有机溶剂直接过度，有机溶剂会使盐类析出，造成液路或色谱柱堵塞，可用 95：5 的水甲醇冲洗。
- 4：使用缓冲液要及时掌握 pH 范围，做到胸中有数。
- 5：清洗液路和柱子时，有温控可加热到 30 摄氏度易于冲洗。
- 6：长时间用缓冲溶液要注意观察接头处有无析出，若有白色盐类析出，可考虑一定周期用 10%硝酸冲洗一下液路(拆下柱子，走 30ml, 再用 5 倍水冲洗)可以避免液路的堵塞。
- 7：选择缓冲液要用可靠的试剂，避免不纯的盐类造成不必要的麻烦。如果流动相中有机溶剂

的比例很高是不能用来冲洗缓冲盐的，是洗不出来的。通常 C18 柱先用 5%~10%的甲醇冲洗，是可以把缓冲盐冲洗出来的，然后用纯的有机溶剂来保护柱子。最好的方法是使用与流动相相同浓度不含盐的流动相进行清洗。但就是速度慢一些。用水是为了快速替换，一般在 15 分钟以内最好，且用 0.8 的流速较好。如果用纯水冲，容易造成键合的碳链的流失，最好用 5%~10%甲醇水溶液冲。可以用纯水代替流动相中的缓冲液，有机相不变。这样冲洗柱子比较稳妥。色谱柱异常及解决办法柱压与硅胶基质的形态(如无定形或球形硅胶)、颗粒大小、填料合成条件、装柱条件、所用流动相和分析时的温度有关。不同厂家的色谱柱柱压会有所差别，相同流动相和温度的条件下，不同厂家的新色谱柱有的柱压可能相差 4、5 个 MPa，特别是低端和高端色谱柱之间，这一区别比较明显。这是由色谱柱厂家所选用的硅胶基质及其生产条件决定的，这种差异的存在是正常的。同时需要说明的一点是，柱压与柱效有一定的关系，通常柱效高的色谱柱柱压相对而言会高一点，但柱压高的色谱柱并不一定就具有高柱效。

在色谱柱的使用过程中柱压通常会出现两种升高的形式：

第一种是，随着使用时间的延长色谱柱柱压慢慢上升，这是正常的；

第二种是，使用过程中(流动相和温度没有改变的条件下)色谱柱压力突然升高很多。这种压力突然升高的现象，通常是由工作人员操作不当引起的，

原因：1)样品太脏，使用前没有过滤，导致柱筛板堵塞. 2)样品含有的杂质在流动相中的溶解性不是很好，与流动相混合后析出，导致柱筛板堵塞。 3)使用缓冲盐，处理错误，缓冲盐在色谱柱中析出，堵塞筛板和键合相颗粒之间的孔隙。

解决办法对于第二种，即柱压突然升高的情况，通常有以下几种解决办法：1)将色谱柱反接，用含水比例较大的流动相进行冲洗，冲洗时点。

2)色谱柱进样一端的筛板取下，分别放在水中和甲醇中超声或更换新的柱筛板。如果柱效没变，但柱压仍然较高，则应考虑进样端填料受污染的问题，因此除了取下进样端筛板超声外，还需要挖掉进样端的部分填料，挖去填料之前先检查一下填料的颜色，如果填料的颜色发生了变化，则应该挖掉直到见到白色的填料为止。

挖掉后色谱柱将出现一个缺口，填补缺口的填料可以从另一支相同品牌、相同型号的报废色谱柱的出口端获得，填料用有机溶剂如甲醇等调成糊状装入缺口处，压紧刮平，再装上筛板. 高效液相色谱系统中气泡对检测的影响及其解决方法 在我们进行液相色谱分析时，有时会遇到这样一个问题：系统的流路中存在气泡.

由于气泡的存在，会造成色谱图上出现尖锐的噪声峰，严重时会造成分析灵敏度下降;气泡变大进入流路或色谱柱时会使流动相的流速

变慢或不稳定，使基线起伏。造成上述现象的主要原因有三条：一是流动相溶液中往往因溶解有氧气或混入了空气而形成气泡；二是系统开始工作时未能将流路中的空气驱赶干净；三是在注入样品时不注意混入了空气。为了避免这类问题的出现，液相色谱实际分析过程中必须重视对流动相进行脱气处理。柱子使用经验谈：

色谱柱在使用前，最好进行柱的性能测试，并将结果保存起来，作为今后评价柱性能变化的参考。但要注意：柱性能可能由于所使用的样品、流动相、柱温等条件的差异而有所不同；另外，在做柱性能测试时是按照色谱柱出厂报告中的条件进行(出厂测试所使用的条件是最佳条件)，只有这样，测得的结果才有可比性。**1、样品的前处理：**

**理：**

a、最好使用流动相溶解样品。

b、使用预处理柱除去样品中的强极性或柱填料产生不可逆吸附的杂质。 c、使用 0.45 $\mu\text{m}$  的过滤膜过滤除去微粒杂质。

## **2、流动相的配制：**

液相色谱是样品组分在柱填料与流动相之间质量交换而达到分离的目的，因此要求流动相具备以下的特点：

a、流动相对样品具有一定的溶解能力，保证样品组分不会沉淀在柱中(或长时间保留在柱中)。 b、流动相具有一定惰性，与样品不产生化学反应(特殊情况除外)。 c、流动相的黏度要尽量小，以便在使用较长的分析柱时能得到好的分离效果；同时降低柱压降，延长液体泵的使用寿命(可运用提高温度的方法降低流动相的黏度)。 d、流

动相的物化性质要与使用的检测器相适应。如使用 UV 检测器，最好使用对紫外吸收较低的溶剂配制。e、流动相沸点不要太低，否则容易产生气泡，导致实验无法进行。f、在流动相配制好后，一定要进行脱气。除去溶解在流动相中的微量气体既有利于检测，还可以防止流动相中的微量氧与样品发生作用。

### **3、流动相流速的选择：**

因柱效是柱中流动相线性流速的函数，使用不同的流速可得到不同的柱效。对于一根特定的色谱柱，要追求最佳柱效，最好使用最佳流速。对内径为 4.6mm 的色谱柱，流速一般选择 1ml/min，对于内径为 4.0mm 柱，流速 0.8ml/min 为佳。当选用最佳流速时，分析时间可能延长。可采用改变流动相的洗涤强度的方法以缩短分析时间(如使用反相柱时，可适当增加甲醇或乙腈的含量)。

#### **注意：**

a.由于甲醇廉价，对于反相柱推荐使用甲醇体系(必须使用乙腈的场合除外)。 b.对于正相柱推荐使用沸程为 30-60°C的石油醚或提纯后的己烷作流动相，没有提纯的己烷不得使用。用水最好使用超纯水(电阻率大于 18 兆欧)，去离子水及双蒸水中含有酚类杂质，有可能影响分析结果。

c.含水流动相最\*在实验前配制，尤其是夏天使用缓冲溶液作为流动相不要过夜。最好加入叠氮化钠，防止细菌生长。

d.流动相要求使用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤，除去微粒杂质。

e.使用 HPLC 级溶剂配制流动相，使用合适的流动相可延长色谱柱的使用寿命，提高柱性能。

冲柱子的目的只要是有机溶剂就行,不过黏度不要太大,因为有机溶剂能够防止细菌生长,冲柱子的目的就是为了防止细菌生长堵塞仪器系统和柱子. 一般甲醇和乙腈相互冲洗是没有问题的，但乙腈要比甲醇价格贵的 新柱子:首先要看你买的柱子是否可以把你要的峰和其他的峰分开，也就是分离度要好.其次就是看是否有拖尾或者前延峰。新柱子出现这样的情况也是很正常的，可以通过改变流动相条件来调整，加一些缝形改善剂也会使实验结果比较理想!保留时间变化的原因:

#### 柱头塌陷

在使用过程中，填料下沉，在柱子进口处出现一个小空间，使得分离效果不良。 补救方法:卸开柱头螺丝，找一点同类填料，用甲醇湿润后，添在柱子上，反复几次。然后装上螺丝，用溶剂冲洗 1-2 小时，使之平衡。小结

正确使用缓冲盐很有必要，既可以防止缓冲盐析出，也可以达到提高色谱柱使用寿命的目的。我们不妨用一句话来总结它的使用方法：用前要过滤，用后需冲洗。



医课汇  
公众号  
专业医疗器械资讯平台  
WECHAT OF  
HLONGMED



hlongmed.com  
医疗器械咨询服务  
MEDICAL DEVICE  
CONSULTING  
SERVICES



医课培训平台  
医疗器械任职培训  
WEB TRAINING  
CENTER



医械宝  
医疗器械知识平台  
KNOWLEDG  
ECENTEROF  
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM  
医械云专业平台  
KNOWLEDG  
ECENTEROF MEDICAL  
DEVICE