

HILIC 色谱柱的使用注意事项

- a) HILIC 色谱柱的平衡
 - i. 使用 50 倍柱体积的 50/50 的乙腈/水相缓冲溶液（缓冲液的最终浓度为 10mM）平衡新色谱柱
 - ii. 在开始进样前，用 20 倍柱体积的起始流动相平衡色谱柱
 - iii. 进行梯度分析时，进样间隔需要用 10 倍柱体积起始流动相平衡色谱柱
说明：色谱柱平衡不充分将导致保留时间漂移

- b) HILIC 流动相需要注意的问题
 - i. 流动相中总是至少保持 5% 的极性溶剂（如 5% 水相缓冲液，5% 甲醇或 3% 甲醇/2% 水相缓冲液等），这保证 HILIC 硅胶填料始终被水浸润
 - ii. 在流动相或梯度中至少保持有机溶剂（如乙腈）的比例不低于 40%
 - iii. 不要使用磷酸盐缓冲溶液体系，因为磷酸盐缓冲液在 HILIC 色谱模式下会析出；使用磷酸则没有问题
 - iv. 缓冲系统如甲酸铵或乙酸铵水溶液比甲酸或乙酸的水溶液有重现性更好的结果。如果不能使用缓冲液而一定要使用流动相添加剂如甲酸，最好使用 0.2% 的浓度而非 0.1%
 - v. 为得到最好的峰形，在流动相或梯度中总是保持缓冲系统的浓度为 10mM

- c) HILIC 进样溶剂需要注意的问题
 - i. 如果可能，尽量用 100% 乙腈溶解样品进样。避免使用水配制样品溶液，请选择较弱的 HILIC 溶剂如乙腈、甲醇、异丙醇等配制样品溶液。
 - ii. 最常用的进样溶剂为 75/25 乙腈/甲醇，这个体系充分平衡了样品的溶解度和峰形两个因素。
 - iii. 不要用水或 DMSO 做进样溶剂，它们将导致峰形变得很差
 - iv. 使用反相 SPE 技术将水或 DMSO 置换成乙腈再进样。如果不能这样操作，用有机溶剂稀释水或 DMSO。

- d) 其它有关使用 HILIC 的建议
 - i. 开始时可以运行一个 95% 乙腈至 50% 乙腈的梯度，如果样品不保留，使用 95/3/2 乙腈/甲醇/水相缓冲溶液的流动相进行等度分析
 - ii. 将流动相中的水换成甲醇、丙酮或异丙醇也可以增加极性化合物的保留
 - iii. 请确保弱洗针溶剂/冲洗溶剂包含和流动相一样的高比例有机相，否则峰形会受到影响

第四节 色谱柱清洗、再生和保存

A. 清洗和再生

压力骤然升高，保留时间或分离度发生波动往往表明色谱柱被污染了。请根据如下说明清洗色谱柱。

HILIC 硅胶色谱柱：用 50/50 的乙腈/水清洗以去除极性污染物。如果清洗无效，可用 5:95 的乙腈:水清洗色谱柱。

如果系统压力上升至超过设定的压力限或者突然出现色谱峰分叉，通常是需要更换保护柱的信号。

B. 色谱柱的保存

如果四天之内不使用色谱柱，请将柱子保存在 95%乙腈中；不要将色谱柱保存在缓冲盐流动相中，如果流动相中含有缓冲盐，先用 10 倍柱体积的 HPLC 级水清洗色谱柱然后换上 95%乙腈保存。如果中间不用水“过渡”清洗有可能在使用 95%乙腈时造成盐析出。