

## LC色谱柱

# Thermo Scientific Hypercarb色谱柱维护指南和通用方法开发

## 适用于Thermo Scientific™ Hypercarb™多孔石墨碳色谱柱

### 在您开始之前

色谱柱的手册、规格说明书或技术指南可从以下网址下载[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)。在搜索框中输入部件号或产品名称。参考文献位于产品页面底部附近。某些色谱柱在柱盒内包含快速入门指南/或色谱柱盒上标有黄色警告标签。请在使用色谱柱之前阅读这些内容。

从阅读色谱柱随附的分析证书（CoA）或质量保证报告（QAR）开始。该文件包含许多有价值的信息。例如，检查色谱柱运输时所使用的出厂保存溶剂。如果色谱柱运输溶剂中含有与流动相不相容的物质，请使用互溶的中间溶剂将其冲洗干净。一些检测器，例如电雾式检测器和质谱检测器，对色谱柱流失高度敏感。应活化好色谱柱后，再将色谱柱与检测器连接。

当您的实验室接收色谱柱时，请您务必重现CoA或QAR中的色谱图。通过这种方式，您可以确保在启用方法时正确操作色谱柱，如果您定期重复色谱柱的CoA或QAR条件，您可以在早期发现色谱柱的柱效损失，并在需要时采取预防措施。

使用前请务必检查是否存在漏液。

### 操作限制

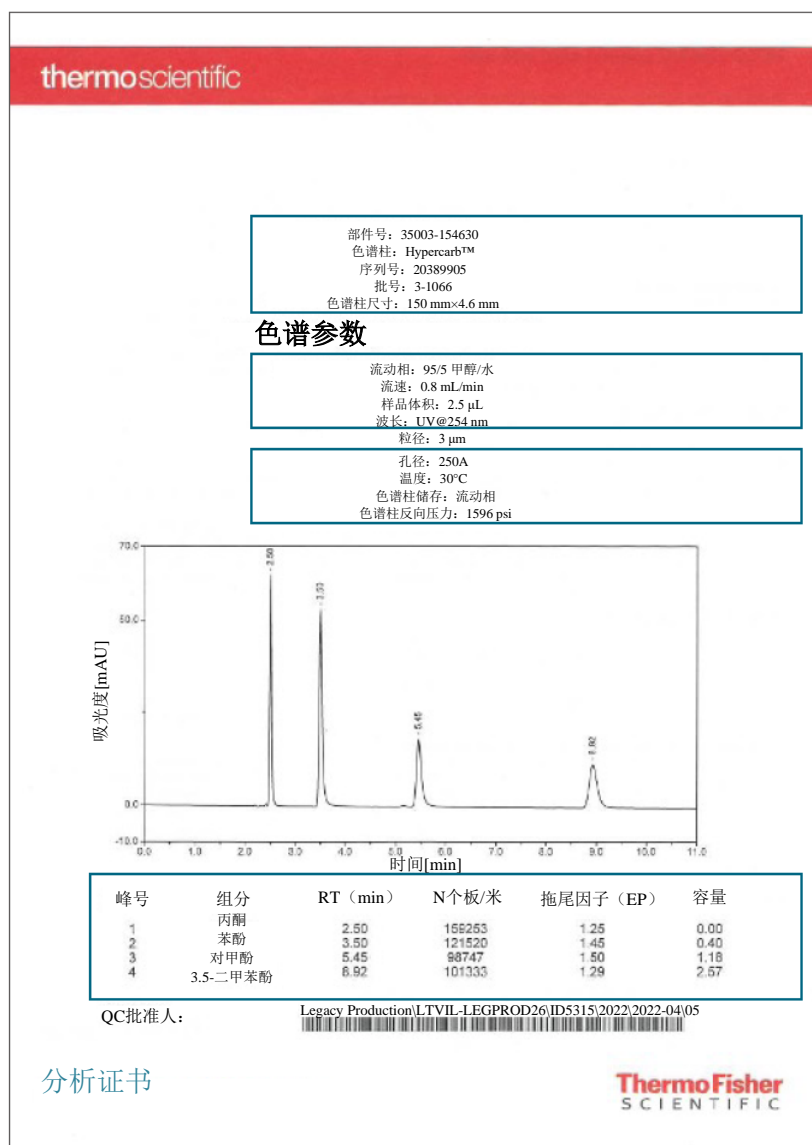
遵守压力、pH值、温度和溶剂相容性的限制。产品手册、规格说明书或技术指南是操作限制的最佳参考。如果没有手册，请访问产品[目录](#)或产品网页[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)



### 最佳操作规范

洁净的样品可提供稳健的方法并延长色谱柱的使用寿命。务必尽可能清洁样品，以确保获得最佳结果。过滤样品至色谱柱粒径的1/10。通常小于2  $\mu\text{m}$ 或接近2  $\mu\text{m}$ 粒径的色谱柱-使用0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器。对于较大的粒径，例如5  $\mu\text{m}$ 或10  $\mu\text{m}$ ，您可以使用0.45  $\mu\text{m}$ 过滤器。或者采用其他样品制备技术，如固相萃取（SPE），以清洁样品中的化学和颗粒污染物。推荐使用保护柱或在线过滤器来延长色谱柱的使用寿命。定期更换保护柱芯或过滤器。

在使用流动相时，请使用恰当或更高级别的溶剂。定期维护您的净水器，以确保最佳质量。始终在干净的瓶子中配置新批次流动相。每天检查缓冲液的微生物生长情况，尤其是使用磷酸盐缓冲液时。使用前请检查pH值。并通过0.2  $\mu\text{m}$ 滤膜（UHPLC为0.1  $\mu\text{m}$ ）过滤缓冲液。



➡ 固定相以及批号和序列号

➡ 测试条件

➡ 保存溶剂:  
95:5 甲醇: 水

➡ 测试结果

上图为如何阅读CoA或QAR的示例

### 初始安装

Thermo Scientific Hypercarb色谱柱柱压限制为350 bar (5000 psi)，因为碳比传统的硅胶材料更脆。安装色谱柱之前，请在LC上设置压力限制。如果使用高于环境温度10°C的温度，建议使用柱前预加热来改进色谱性能。如果使用高于50°C的温度，建议使用柱后冷却来保护检测器元件并降低噪音。

### 储存

对于短期储存，可以使用不含盐的流动相保存。

对于长期储存，使用流动相（不含酸或碱添加剂）进行冲洗。如果您的保存时间超过1个月，我们建议使用95:5 MeOH:H<sub>2</sub>O（初始运输溶剂）。

## 清洗

建议您定期清洗色谱柱。如果您运行梯度程序，这可能包括在梯度运行的前几分钟。对于等度运行，这可能是在样品之间升高有机溶剂比例运行。或者，根据方法和样品清洁度，在序列结束时进行清洗程序。

但是，可能会出现需要更彻底清洁色谱柱的情况。在使用常规流动相之外的任何清洁溶剂之前，请检查其是否与色谱柱和LC系统相容。以下是一系列不同的污染物，以及如何从色谱柱中清除这些污染物。

使用70倍柱体积的THF进行冲洗以去除TFA。在75°C下使用120倍柱体积的MeCN进行冲洗以去除胺。

### 通用清洗

#### 酸碱清洗：

1. 从50% THF和50% H<sub>2</sub>O+1% TFA开始。
2. 在1小时内使梯度回到50% THF和50% H<sub>2</sub>O+1% NaOH。
3. 在1小时内使梯度回到50% THF和50% H<sub>2</sub>O+1% TFA。
4. 重复8-16小时

确保采用流动相进行重新平衡。

该清洗可在反向冲洗中进行。

#### 强有机清洗：

1. 使用100%丙酮冲洗色谱柱1小时。
2. 使用100%二丁醚冲洗色谱柱2小时。
3. 使用100%丙酮冲洗色谱柱1小时。
4. 使用水性流动相重新平衡色谱柱。

请记住检查所有清洗溶剂是否与LC相容。

## 流动相选择

选择正确的流动相与选择正确的固定相同样重要。在进行选择时有许多考虑因素。选择与色谱柱和LC设备相容的流动相。质谱和电雾式检测器要求所有成分均为挥发性。UV检测要求检测波长高于流动相截止波长20nm。注意流动相的粘度，以免超过色谱柱或系统压力限制。

应使用适当级别（HPLC、UHPLC、LC-MS、UHPLC-MS）的溶剂。

典型的流动相是甲醇或乙腈，用作强有机溶剂，而缓冲液或水用作弱溶剂。

Hypercarb易受“记忆”效应影响。已使用色谱柱的性能可能与新色谱柱不同。因此，新方法开发项目应从新的Hypercarb色谱柱开始。氧化剂和还原剂可与碳表面反应，并改变其保留性能。一些方法可能涉及特定的处理步骤以确保方法的重现性。

有关Hypercarb方法开发的更详细说明，请访问[这里](#)。

## 缓冲液选择

通过控制流动相缓冲液的pH值来控制分析物保留并改善峰形。请记住，当在不同pH值引入样品时，真实缓冲液应能够抵抗pH值的变化，且缓冲容量在酸或碱的pK值下仅为100%。在pH值为4时，磷酸盐是一种较差的缓冲液，如果引入酸性或碱性更强的样品，磷酸盐将迅速变为其中一个pKa值。通常应在缓冲液pKa值的±1 pH单位内工作，以便更好控制流动相的pH值。根据样品的大小和性质以及色谱柱填充材料，用于HPLC的适当缓冲液浓度往往在10-100 mM水平。与传统填料相比，基于具有稳健键合的高纯度硅胶固定相（如Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™系列）通常与稀释缓冲液更相容。当需要控制在较低的pH值（2-3）时，通常使用磷酸盐或更强的有机酸，例如TFA或甲酸。当需要将pH值控制在4-5时，应考虑使用有机酸缓冲液（例如乙酸盐或柠檬酸盐）代替磷酸盐。右图显示了为分离选择正确pH值的重要性。即使由于测量误差、泵的混合复杂性或大气中的水吸附到流动相中导致的pH值的微小变化，如果缓冲不当，也可能改变任何方法。选择缓冲液和有机改性剂混合物时应小心，以确保两者中的溶液不会产生可能导致堵塞和系统污染的固体盐。

## 常用缓冲体系

缓冲液		pK <sub>a</sub>	有用的pH值范围	与MS相容
TFA		0.30		是
磷酸盐	pK <sub>1</sub>	2.1	1.1 – 3.1	否
	pK <sub>2</sub>	7.2	6.2 – 8.2	否
	pK <sub>3</sub>	12.3	11.3 – 13.3	否
柠檬酸盐	pK <sub>1</sub>	3.1	2.1 – 4.1	否
	pK <sub>2</sub>	4.7	3.7 – 5.7	否
	pK <sub>3</sub>	5.4	4.4 – 6.4	否
甲酸盐		3.8	2.8 – 4.8	是
乙酸盐		4.8	3.8 – 5.8	是
Tris碱（三羟甲基氨基甲烷，THAM）		8.3	7.3 – 9.3	是
氨		9.2	8.2 – 10.2	是
硼酸盐		9.2	8.2 – 10.2	否
二乙胺		10.5	9.5 – 11.5	是
碳酸盐	pK <sub>1</sub>	6.4	5.4 – 7.4	是
	pK <sub>2</sub>	10.3	9.3 – 11.3	是
三乙醇胺	—	7.80	—	是

使用赛默飞样品制备、色谱柱和样品瓶获得预期重现性结果



不了解您需要什么？我们很乐意讨论您的具体要求。如需定制订单，请联系当地销售代表。

详情请访问 [thermofisher.com/lccolumns](https://thermofisher.com/lccolumns)

仅供研究使用-不用于诊断程序。©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. 所有商标均为 Thermo Fisher Scientific Inc. 及其子公司所有。此信息作为 Thermo Fisher Scientific Inc. 产品功能的示例提供。无意鼓励以任何可能侵犯他人知识产权的方式使用这些产品。规格、条款和价格均有可能更改。并非所有产品在所有国家均有售。详情请咨询当地销售代表。FL000967-NA-EN 0422

thermo scientific