

色谱柱再生

污染填料后对色谱柱的处理过程

(大连依利特仪器分析有限公司)

1 故障现象

用户反映 YWG C18 10 μ (4.6mmX150mm) 色谱柱使用 20 天左右后, 柱压升高约 1Mpa 左右, 分离效果变差, 用蒸馏水清洗色谱柱没有明显改善。

色谱柱分离度不好, 柱效不高, 可能是用户分析发酵液, 简单的过滤后进样分析, 其中的蛋白质等可能没有去除完全, 致使过多的蛋白质沉淀在色谱柱中, 加之对沉淀的蛋白质没有及时冲洗, 长时间后, 破坏 C18 官能团, 而且客户使用纯水长时间冲洗色谱柱, 官能团坍塌的可能性也很大。色谱柱压力增加, 可能是柱头筛板被样品杂质堵塞, 或者填料被污染或被流动相破坏, 导致柱床层堵塞。

2 检测

用 10%乙腈水, 1.0mL/min 的流量冲洗色谱柱, 冲洗大约 30 分钟, 将色谱柱中可能存在的磷酸缓冲盐置换掉。然后用 85%甲醇流动相, 尿嘧啶、硝基苯、萘、芴反相样品评价色谱柱, 结果如下:

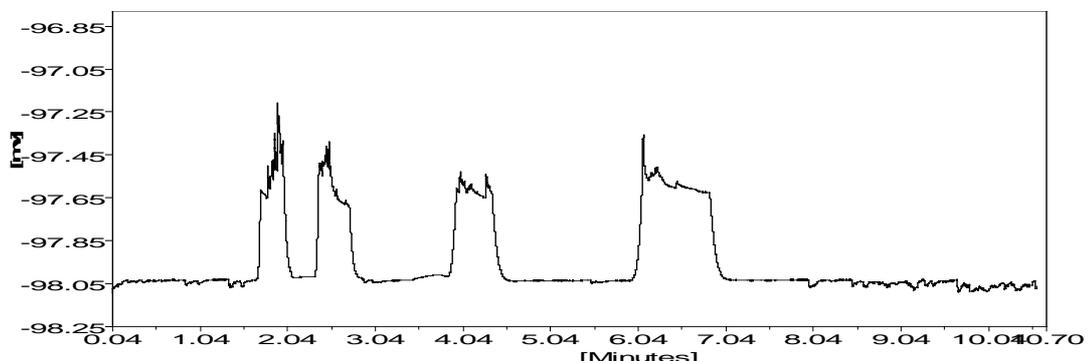


图 1 色谱柱初次测试结果

可见色谱峰形非常差, 可能是柱头污染, 色谱柱中部分填料已经被污染变性, 柱

头打开，发现柱头部分色填料已经变，部分填料板结在筛板和四氟垫圈的周围，属于典型的由于样品杂质引起色谱柱填料污染导致的色谱柱性能下降。

3 修补与再生

将柱头污染填料挖出，用同样规格的新填料进行修补并更换新筛板，然后用 85% 的甲醇流动相。在相同条件下进行评价，结果如下图所示，可见虽然色谱柱性能有所改善，但是还需要进行再生处理。

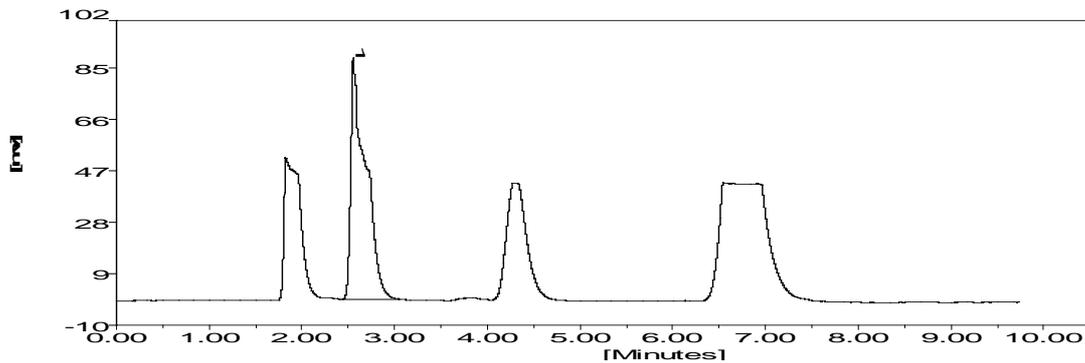


图 2 更换柱头填料和筛板之后色谱柱评价谱图

对于 C18 或相应的反相色谱固定相，一般采用洗脱能力比较强的有机溶剂进行再生，图 3 是用异丙醇溶剂，0.5mL/min 流速下，冲洗色谱柱 4 小时后，换用 85% 甲醇评价谱图，可见色谱柱性能有比较明显的改善。

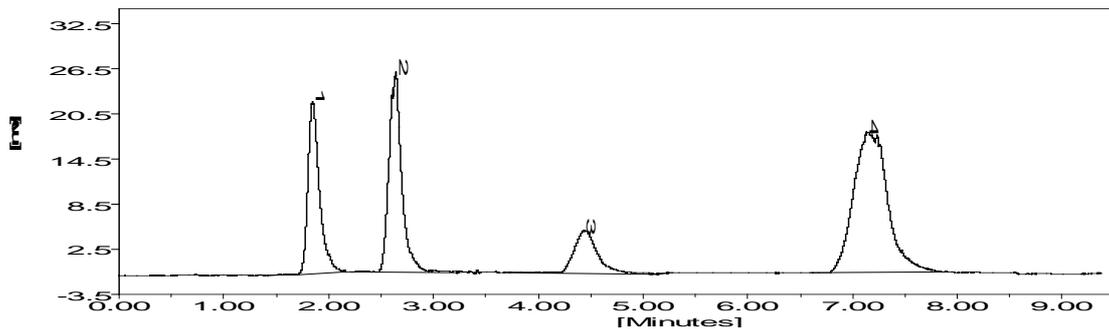


图 3 用异丙醇再生后色谱柱性能评价

图 4 是采用二氯甲烷溶剂，在 0.5mL/min 流速下又冲洗色谱柱 30 分钟，然后换用异丙醇冲洗色谱柱 2 个小时后，换用 85% 甲醇流动相评价结果，与图 3

比较可以看出，色谱柱性能又有进一步改善。虽然与新色谱柱出厂指标有一定差距，但是较再生之前有极大差别。

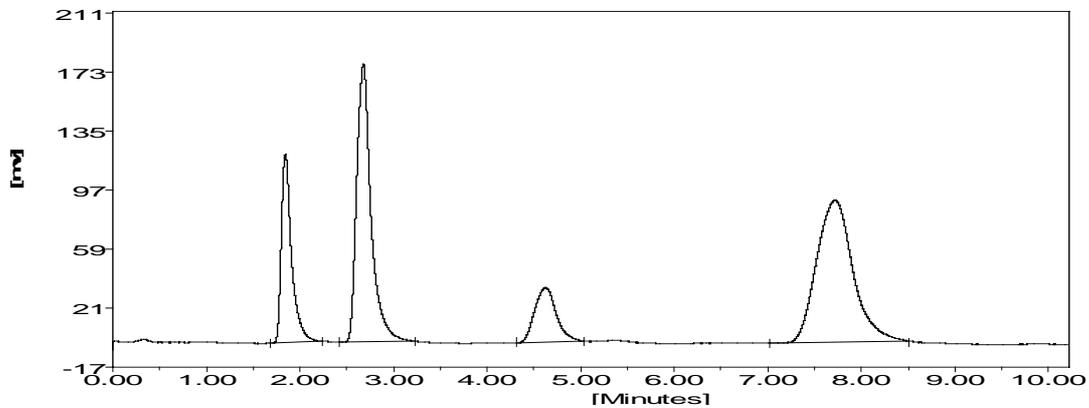


图 4 采用二氯甲烷再生后色谱柱性能评价

不对称度为 1.23，柱效 13000/米

(出厂指标，不对称度 0.9~1.3，柱效 30000/米)

4 结果分析

色谱柱的问题类型非常多，其中许多问题在使用中注意完全能够避免，从而尽可能延长色谱柱使用寿命，保证良好的分离分析结果。

使用中一定要注意经常冲洗色谱柱，使用一定时间后需要对色谱柱进行再生。

在上述用户使用磷酸盐缓冲溶液分离发酵液的情况，可以周期性使用 10% 的乙腈水在 20~30⁰C 之间的温度下冲洗色谱柱，流量建议使用 0.5mL/min，冲洗时，应该将色谱柱反接 HPLC 泵，并且不要接检测池，以免污染系统。建议用户不要反向使用色谱柱，这样色谱柱的两端都有可能污染，出现问题处理起来比较繁琐。

有关不同类型色谱柱的再生方法请参照依利特公司相关资料。