

# 高效液相色谱柱清洗与再生方法

刘 翻,熊志超,张凌怡,张维冰

(华东理工大学 化学与分子工程学院,上海 200237)

**摘 要:** 分别对反相、正相、离子交换、体积排阻及亲和等色谱柱的清洗与再生方法加以系统综述. 使用适当的方法对受污染的色谱柱进行清洗与再生,可恢复其部分分离能力,延长使用寿命. 对硅胶基质反相色谱柱,可选择一系列溶剂,按洗脱能力逐渐增强的顺序依次冲洗,或者使用二甲基甲酰胺、乙酰丙酮、SDS 及盐酸胍等强洗脱试剂清洗;硅胶基质正相色谱柱用极性逐渐增强的溶剂系统冲洗;有机聚合物、石墨碳及氧化铝固定相色谱柱,用稀酸、稀碱和有机溶剂结合清洗,可将受污染的色谱柱柱效提高 50% 以上.

**关键词:** 高效液相色谱; 色谱柱; 清洗; 再生

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2010)02-0071-07

色谱作为一种高效的分离手段,自 1906 年 Tswett 创立至今百余年来得到了长足发展. 高效液相色谱(HPLC)是 20 世纪 60 年代后期发展起来的一种色谱方法,已成为现代分离测定的重要手段,广泛运用于石油、化工、食品科学、环境及生物等几乎所有研究领域<sup>[1]</sup>. 色谱柱是色谱分离系统的“心脏”,由于被分析样品种类繁多,加之样品基质复杂,色谱柱极易被污染,是导致柱压升高、分离能力下降的原因之一<sup>[2]</sup>. 通常,样品中含有一些对分析不利的物质,这些非目标物能被检测器检测到而形成色谱峰、气泡、基线漂移或负峰. 其中保留值较弱的物质,一般能快速从色谱柱冲洗出来,对分析不产生干扰. 中等保留强度的杂质能被缓慢冲洗出来,但对分析产生一定的干扰. 强保留杂质通常难以被洗脱,多次上样后,聚集在柱头或色谱柱中. 有的分析物甚至可能在使用时与填料发生相互作用. 这些被吸附的杂质累积到一定程度后会形成新的伪固定相,从而改变色谱柱的性能. 对于基质复杂的样品,一根色谱柱的使用寿命可能只有百余次. 而且每种色谱柱适用的样品有限,一次错误进样甚至可能导致色谱柱失效. 中国市场调查研究中心在中国反相

色谱柱市场调查及投资策略分析报告中估计,中国每年消耗的分析型反相色谱柱达 5 万支<sup>[3]</sup>. 这些被污染的色谱柱有一部分经简单的方法进行清洗后,可恢复部分甚至大分离能力,不仅节省资源,还能大大降低分离分析的成本.

色谱柱的清洗与再生方面的研究具有十分重要的现实意义,也一直是色谱工作者和仪器厂商关注的热点. 很多色谱专著介绍过色谱柱清洗与再生,并提出许多简单有效的方法. 各色谱柱厂商也推荐对应其商品色谱柱的经验性方法. 本文对液相色谱柱清洗和再生方法加以系统综述,并在此基础上对各种色谱柱的清洗和再生提出建议.

## 1 反相色谱柱的清洗和再生

反相色谱法是当今液相色谱法中应用最广泛的一种技术,它能分析非极性、可离子化和离子化样品,应用比例超过 90%. 随着 HPLC 技术的发展,色谱柱的种类也越来越多,除经典的键合硅胶固定相填充柱,还有如聚合物填充柱、聚合物整体柱及以氧化铝基质固定相为代表的其它无机基质固定相色谱柱. 这些色谱柱因其固定相基质差异,具有不同的物

收稿日期: 2010-01-25 修订日期: 2010-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20675083); 国家重点基础研究发展规划(973)资助项目(01CB5m202); 科技部“十一五”国家科技支撑计划重大项目资助(2006BAF07B03).

作者简介: 刘翻(1983-),男,博士研究生,主要从事色谱研究工作.

通讯联系人: 张维冰,教授. E-mail: webingzhang@ecust.edu.cn

理和化学性质及应用范围,其清洗与再生方式也存在一定差别。

### 1.1 硅胶基质反相色谱柱的清洗与再生

在反相色谱中,硅胶基质色谱柱使用比例达 70%,被应用于各种样品的分析。清洗硅胶基质反相色谱柱,关键是弄清楚污染物的性质,并且能找到合适的溶剂将其洗脱。对于被不同样品污染的色谱柱,如常规样品污染、蛋白质污染及金属离子污染的色谱柱,具有对应的清洗和再生方法。

#### 1.1.1 常规样品污染色谱柱清洗与再生方法

被常规样品污染的硅胶基质反相色谱柱,已有各种清洗与再生方法。其中最常用的是用 20 倍柱体积(这里柱体积指色谱柱内空腔体积,表 1 列出了常用规格分析柱柱体积<sup>[4]</sup>)的乙腈 $\rightarrow$ 二氯甲烷 $\rightarrow$ 正己烷 $\rightarrow$ 二氯甲烷 $\rightarrow$ 乙腈冲洗色谱柱<sup>[5]</sup>,或者用强度更弱的溶剂系统清洗,即:水 $\rightarrow$ 乙腈 $\rightarrow$ 氯仿(或异丙醇) $\rightarrow$ 乙腈 $\rightarrow$ 水冲洗,其中水冲洗步骤可以省略<sup>[6]</sup>。艾杰尔公司使用乙腈:水(5:95 V/V) $\rightarrow$ 四氢呋喃 $\rightarrow$ 乙腈:水(5:95 V/V)冲洗 10 倍柱体积,此方法达到较为理想的结果,同时能大大节省时间。强酸和强碱溶液会导致硅胶基质填料溶解,但是在某些条件下使用稀酸可以将有机溶剂不能洗脱的污染物去除,如用甲醇 $\rightarrow$ 氯仿 $\rightarrow$ 甲醇冲洗 20 倍柱体积达不到清洗效果,可依次用 20 倍柱体积水、0.05 mol/L 的硫酸和流动相溶液冲洗色谱柱,可取得良好效果。经过多次进样的色谱柱,用 90%~100% 的溶剂 B(强洗脱溶剂)冲洗 20 倍体积即可清除污染物<sup>[7-9]</sup>。当强洗脱溶剂无法洗脱时,则有必要用更强的一种或一系列溶剂清洗,即:100% 甲醇 $\rightarrow$ 100% 乙腈 $\rightarrow$ 乙腈:异丙醇(75:25 V/V) $\rightarrow$ 100% 异丙醇 $\rightarrow$ 100% 二氯甲烷或 100% 正己烷。根据色谱柱具体使用情况,在清洗过程中可省略一个或多个有机溶剂<sup>[4]</sup>。

表 1 不同柱长的 HPLC 色谱柱柱内死体积

Table 1 Column volumes of analytical columns

柱尺寸 /mm	柱内死体积 /mL	柱尺寸 /mm	柱内死体积 /mL
4.6×250	2.5	4.6×100	1.0
4.6×200	2.0	4.6×50	0.5
4.6×150	1.5		

除了以上这些方法之外,还有一些使用更强溶剂、耗费时间较短的方法,依利特公司用 20 倍柱体

积的二氯甲烷:甲醇(96:4 V/V),加 1% 氢氧化铵冲洗,其中加入的氢氧化铵对聚集在柱头的污染物具有良好的清洗效果。二氯甲砒也被 Thermo 公司用于色谱柱的清洗,具体方法是:在用水冲洗色谱柱同时进 4 等份的 200  $\mu$ L 二氯甲砒,然后依次用甲醇、氯仿和甲醇冲洗。用 N,N-二甲基甲酰胺、丙酮依次冲洗色谱柱,可将色谱柱柱效提高约 50%<sup>[10]</sup>。这些方法耗时短,但使用的特殊溶剂,如氢氧化铵、二氯甲砒、N,N-二甲基甲酰胺等,均对色谱固定相有一定损伤。

当色谱柱被严重污染,可在低于 0.5 mL/min 的流速下用二甲基亚砒(DMSO)或 50% 二甲基甲酰胺-水冲洗色谱柱<sup>[4]</sup>。实验证明在线清洗与再生的方法对非严重污染色谱柱非常有效,对污染特别严重的色谱柱不能达到理想效果,需将固定相从色谱柱内取出,进行清洗再生后重新装填。具体操作是:将色谱固定相从色谱柱内打出后,用甲醇浮选,去除其中细小的破碎颗粒;然后用二甲基甲酰胺、丙酮、甲醇超声清洗;最后 70  $^{\circ}$ C 水浴蒸干固定相,重新装填色谱柱。经该方法处理的色谱柱,性能可得到显著提高<sup>[10]</sup>。

由上述方法可以看出,一般清洗方法所用的溶剂系统,溶剂洗脱强度均逐渐增加,使用强疏水性溶剂(如氯仿和正己烷)溶解非极性物质如类脂和油类,这类物质往往是色谱柱污染的最主要原因。正如正相与反相系统替换时,必须使用过渡溶剂冲洗系统,在色谱柱清洗与再生过程中,也必须保证一系列溶剂中每种溶剂都均与下一个溶剂互混。异丙醇能与正己烷或二氯甲烷互溶,又与水相溶剂互溶,常在清洗过程中用作过渡溶剂。但是异丙醇粘度非常大,需使用较低的流速以免导致泵压过高。而使用过渡溶剂,清洗步骤繁琐,正如 Majors 所说:这是一个繁杂而又非常耗时的过程<sup>[4]</sup>。此时利用梯度系统进行过夜操作是最好的选择,但梯度操作的系统要求更高,对一个复杂的清洗方法往往需要四元甚至五元梯度系统。

#### 1.1.2 金属离子污染色谱柱的清洗

当色谱柱被金属离子污染后,一般的清洗方法无法生效,需使用特殊的清洗方法。磷酸和 0.1 mol/L 柠檬酸对色谱柱上吸附的金属离子具有较好的清洗效果,因此常被人们用来清洗被金属离子污染的色谱柱<sup>[7]</sup>。乙二胺四乙酸(EDTA)能同许多金属离子形成配合物,0.05 mol/L 的 EDTA 水溶

液也可用来去除色谱柱中金属离子污染物<sup>[4]</sup>。这些试剂虽然能去除金属污染物,但也存在一些缺陷,如水溶液对固定相的浸润性较差,清洗效果不太理想;磷酸对固定相上键合相有一定的破坏作用;EDTA 带入钠离子,对固定相性能产生影响。以乙酰丙酮-甲醇冲洗色谱柱,可以有效去除金属离子污染物,同时可避免上述不利影响。该方法操作步骤是:将固定相用乙酰丙酮超声清洗 1~3 min,然后以甲醇萃取出乙酰丙酮<sup>[10]</sup>。

对于键合色谱固定相,如果确认了填料表面官能团配基断裂流失,可将合适的硅烷化试剂通入色谱柱,在一定温度下使之与表面暴露的-OH 活性基团反应,使硅烷分子中的烷基重新键合在失效的填料颗粒表面。这种原位重新键合的再生方法仅能恢复部分柱效,且对 5 μm 填料再生后柱压力容易偏高<sup>[11]</sup>。

### 1.1.3 蛋白质污染色谱柱的清洗

随着蛋白质组学的发展,反相色谱柱也被广泛运用于蛋白质和多肽的分离,蛋白质对反相色谱柱的污染已成为常见问题。蛋白质分子量大,同时具有亲水和疏水特性,对很多物理和化学因素敏感。一般情况下,纯有机溶剂如乙腈或甲醇不能很好溶解多肽和蛋白质,不能有效地清洗色谱柱,因而需要一些特殊的清洗方法。

现常用方法是用不含缓冲盐的流动相 $\rightarrow$ 0.1% TFA(三氟乙酸)水溶液 $\rightarrow$ 乙腈:异丙醇(1:2 V/V,含 0.1% TFA) $\rightarrow$ 流动相冲洗 20 倍柱体积<sup>[12]</sup>。或先用去除缓冲盐的流动相运行一个梯度洗脱程序(A:0.1% 的三氟乙酸水溶液;B:乙腈:异丙醇=1:2 V/V,内含 0.1% 三氟乙酸,30 min 内 B 由 25% 到 100%);然后用 0.1% 稀硝酸:异丙醇(1:4 V/V)冲洗 40 倍柱体积,最后用 10 倍柱体积的水:异丙醇(1:4 V/V)冲洗色谱柱<sup>[13]</sup>。当上述方法无效时,可使用一些苛刻的试剂,如盐酸胍、二甲基甲酰胺及表面活性剂等。如用 50% 异丙醇水溶液冲洗时,将 6 mol/L 盐酸胍水溶液与异丙醇按 1:1 混合,进样 250 μL;或者用 30% 二甲基甲酰胺水溶液清洗,时间不超过 30 min 处理后反复用水、甲醇冲洗。在常规流动相冲洗色谱柱时注射 500 μL 的 1% 十二烷基硫酸钠(SDS),然后用 5%~95% 乙腈/水(含 0.1% TFA)梯度冲洗,去除蛋白污染物效果也较好<sup>[14]</sup>。Waters 公司研究发现,反复注射 200 μL 二甲亚砜可以有效去除蛋白类物质。甚至在一些特殊的情况下,

若已确定蛋白质污染物种类,可将对应蛋白水解酶(如 1% 胰蛋白酶或木瓜蛋白酶)注入色谱柱,将蛋白质水解为肽,再用盐溶液洗脱。

当确定色谱柱被蛋白质污染后,应首先尝试用含高比例强溶剂的流动相进行冲洗(溶剂 B),或重复用三氟乙酸水溶液-三氟乙酸丙醇溶液的上升-下降梯度清洗和注射三氟乙酸清洗。如这些方法不能得到理想结果,可用表 2 中的溶剂从上往下进行冲洗(根据具体情况,可以省略其中几步)。其中尿素和胍是为洗脱非特异性吸附的蛋白<sup>[14]</sup>,使用后至少需用 40-50 倍柱体积的水冲洗色谱柱<sup>[4]</sup>。

表 2 蛋白污染反相色谱柱常用清洗溶剂组成

Table 2 Washing solvents for removing proteinaceous material from HPLC reversed-phase columns

清洗溶剂	溶剂配比
乙酸	1% 水溶液
三氟乙酸(TFA)	1% 水溶液
0.1% TFA: 异丙醇	40:60(V/V) (黏度较大,需调整流速)
三乙胺(TEA): 异丙醇	40:60(V/V)(混合前用磷酸将三乙胺调至 pH=2.5)
尿素或胍水溶液	5~8 mol/L(调节 pH=6~8)
氯化钠、磷酸钠或硫酸钠水溶液	0.5~1.0 mol/L
二甲亚砜(DMSO): 水或二甲基甲酰胺: 水	50:50(V/V)

总之,被污染的硅胶基质色谱柱,应根据污染物类型和污染程度选择合适的清洗与再生方法。被常规样品污染的反相硅胶键合色谱柱,现有常规清洗与再生方式大致相同,从极性溶剂清洗至非极性溶剂,然后恢复至极性溶剂状态。这些方法,一方面耗时长,另一方消耗溶剂量大,同时再生效果不一定好。使用一些特殊的强溶剂清洗,又对色谱柱填料造成损害。因此,清洗与再生色谱柱时应根据实际情况而定,对污染程度较轻的,用甲醇 $\rightarrow$ 二氯甲烷 $\rightarrow$ 甲醇分别冲洗 20 倍柱体积;污染较严重的色谱柱,使用甲醇 $\rightarrow$ 二氯甲烷 $\rightarrow$ 甲醇 $\rightarrow$ 0.05 mol/L 硫酸各冲洗 20 倍柱体积,或者用甲醇 $\rightarrow$ 50% 二甲基甲酰胺水溶液 $\rightarrow$ 丙酮 $\rightarrow$ 甲醇分别冲洗 10 倍柱体积,能取得较好效果同时耗费时间较短。对严重污染的色谱柱,可先依次用二甲基甲酰胺、丙酮、乙酰丙酮、甲醇冲洗 20 倍柱体积,如效果不理想,可将色谱填料从色谱柱中

取出,然后用甲醇浮选,去除填料中细小破碎颗粒;再用二甲基甲酰胺 $\rightarrow$ 丙酮 $\rightarrow$ 乙酰丙酮 $\rightarrow$ 甲醇超声清洗;最后重新装填.同时该方法还可去除金属离子污染物.蛋白质污染色谱柱,不论是用高浓度的磷酸盐溶液,还是用尿素或胍来清洗色谱柱,对色谱柱都会产生较大损伤,同时损害色谱仪器.使用注射 1% SDS法清洗色谱柱,不仅节省时间,还能得到较好的效果,是现有清洗方法中较优的选择.

### 1.2 有机高分子类反相色谱柱的清洗与再生

有机高分子色谱柱,如其中最普通的聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)颗粒或整体材料装填的色谱柱,可在很宽的 pH 范围内使用(通常为 pH = 1~13,有的可达 pH = 0~14),在反相色谱中被广泛应用,特别是生物样品分析<sup>[15]</sup>.对被普通生物样品污染的有机高分子类反相色谱柱,Themq 依利特及艾杰尔等厂商推荐用 1.0 mol/L 的硝酸或氢氧化钠清洗.被难溶性蛋白(如膜蛋白、结构蛋白和病毒膜蛋白)污染的有机高分子色谱柱,需要苛刻的清洗条件,如用含 3 mol/L 盐酸胍的 50% 异丙醇水溶液在 60 °C 下冲洗,或者依次用 3~5 倍柱体积 100% 的异丙醇、二氯甲烷、异丙醇、原始流动相冲洗,可取得良好效果<sup>[4]</sup>.在淋洗液中添加浓度为 6~8 mol/L 的尿素或 0.2%~0.3% 的表面活性剂冲洗色谱柱,可去除其中强保留生物污染物.用 0.5~1.0 mol/L 氢氧化钠水溶液在室温下冲洗 1 h 以上,可使色谱柱中微生物失活或将其洗脱.

根据聚合物上键合的功能团不同,使用不同的清洗方法效果更佳(Shodex 公司):没有键合功能团的有机高分子色谱柱用 50 mL 二氧六环 $\rightarrow$ 乙腈或甲醇冲洗,或用含有 0.1% TFA 的异丙醇 $\rightarrow$ 100% 流动相 B $\rightarrow$ 100% 流动相 A 以一半工作流速冲洗 5~10 倍柱体积;键合磺酸基的有机高分子色谱柱,可用 50 mL 乙腈和 50 mmol/L 氢氧化钠冲洗,或者注射 20~50  $\mu$ L 的 0.5 mol/L 氢氧化钠或 2 mol/L 硝酸清洗;键合苯基的有机高分子疏水性色谱柱,用洗脱溶剂在 0.5 mL/min 流速下反冲,并注射几次 1~2 mL 的 0.1 mol/L 氢氧化钠或 30% 硝酸;含丁基或乙基的甲基丙烯酸酯整体柱,可以在反流向情况下分别用 10 倍柱体积的 1.0 mol/L 氢氧化钠 $\rightarrow$ 水 $\rightarrow$ 20% 乙醇 $\rightarrow$ 工作缓冲液冲洗.

应注意,虽然高交联聚合物具有好的机械稳定性,在水及有机溶剂中只发生极小的溶胀,在某些特殊的溶剂中其会溶解或发生大的收缩或膨胀,在使

用一系列有机溶剂清洗聚合物柱前,最好先查阅说明书或咨询厂家.一般来说,受污染的有机高分子反相色谱柱可用 50 mL 乙腈反冲,并辅以注射几次 20~50  $\mu$ L 1 mol/L 氢氧化钠溶液或硝酸清洗.对强保留的蛋白质污染物,使用 50% 异丙醇并注射少量 SDS 清洗,然后用甲醇冲洗,可得到较好结果.

### 1.3 石墨化碳和金属氧化物基质填料色谱柱清洗与再生

氧化锆较硅胶惰性更强,涂敷了氧化锆的色谱填料,能够经受住苛刻的操作环境,如高的 pH 值和操作温度.由于其特殊的表面特性,碳酸、氟化物、磷酸根等离子会强烈地吸附于氧化锆色谱填料上.为将它们从色谱柱中清除,可以用酸、碱和有机溶剂结合清洗:50 倍柱体积的 20% 乙腈 $\rightarrow$ 0.1 mol/L 氢氧化钠水溶液或 0.1 mol/L 四甲基氢氧化铵水溶液 $\rightarrow$ 10 倍柱体积水 $\rightarrow$ 10 倍柱体积的 20% 乙腈 $\rightarrow$ 0.1 mol/L 硝酸 $\rightarrow$ 10 倍柱体积水 $\rightarrow$ 20 倍柱体积有机溶剂依次冲洗(ZiChrom 公司).

石墨化碳也被用作反相色谱柱填料,这种填料的性质不同于硅胶基质键合相,其表面即是保留的基础,不再需其它表面改性.该类填料一般比烷基键合硅胶及多孔聚合物填料保留能力更强,常用于分析强亲水性物质.对受污染的石墨化碳色谱柱,在聚合物色谱柱清洗溶剂中加入 20% 的四氢呋喃,即可达到清洗与再生目的<sup>[4]</sup>.不同的分析样品中具有不同的污染物,而这些污染在色谱柱上保留行为也不一致,对被分析不同样品的色谱柱,使用对应的清洗与再生方法具有更佳的效果.根据 Thermo 公司介绍,对于分析不同样品的受污染石墨化碳反相色谱柱以下方法分别进行清洗,可显著提高被污染色谱柱的柱效:

(1)离子类分析物:酸碱再生.将色谱柱反接,依次用 50 mL 含 0.1% 三氟乙酸的四氢呋喃:水(1:1, V/V)溶液、含 0.1% 三乙胺或氢氧化钠的四氢呋喃:水(1:1, V/V)溶液、含 0.1% 三氟乙酸的四氢呋喃:水(1:1, V/V)溶液冲洗,然后用 70 倍柱体积的四氢呋喃冲洗,最后用 95% 甲醇水溶液重新平衡.

(2)极性或非离子型分析物:强有机溶剂再生.依次以 50 mL 丙酮、120 mL 二丁醚、50 mL 丙酮冲洗色谱柱,最后用流动相平衡.

(3)三氟乙酸的去除:用 70 倍柱体积四氢呋喃冲洗.

(4) 二乙胺的去除: 用乙腈在 75 °C 下冲洗 120 倍柱体积。

## 2 正相色谱柱的清洗与再生

通常正相色谱柱的清洗与再生方法与反相色谱柱用极性逐渐减弱的溶剂系统冲洗相反, 其用极性逐渐增强的溶剂系统冲洗<sup>[16]</sup>。根据 Thermo 公司研究, 硅胶、氧化铝、极性键合相色谱柱按以下方法冲洗: 3-甲基戊烷或己烷 → 三氯乙烷 → 乙酸乙酯 → 丙酮 → 乙醇 → 水, 然后以这些溶剂逆序冲洗, 最后以流动相平衡。该方法从非极性溶剂缓慢过渡至极性溶剂水, 然后逆序冲洗至非极性溶剂, 对色谱柱损伤小, 且具有良好的再生效果。然而该方法耗时长, 消耗溶剂多, 在很多时候应用较少, 因此在具体应用过程中可省略其中一种或几种溶剂。Agilent 公司使用的方法更简洁, 用甲醇: 氯仿 (50: 50 V/V) → 乙酸乙酯反相色谱柱, 然后再按正方向用流动相平衡。常规硅胶或硅胶基质正相色谱柱, 也可依次以四氢呋喃、甲醇、四氢呋喃、二氯甲烷和无苯正己烷冲洗 40 ~ 60 倍柱体积<sup>[15]</sup>, 或用 5% ~ 95% 乙腈水溶液的 60 mL 梯度清洗, 然后用 30 mL 含 2.5% 二甲氧基丙烷和 2.5% 冰醋酸的无苯正己烷溶液冲洗色谱柱, 除去硅胶上吸附的水 (艾杰尔公司)。

对强惰性的石墨化碳和有机聚合物正相柱, 可以使用一些强酸或强碱清洗。Shodex 及 Thermo 公司用的稀酸和稀碱结合清洗法, 可将有机聚合物正相柱上大部分污染物洗脱: 5 mL 水 → 60 mL 的 0.1 mol/L HClO<sub>4</sub> 水溶液 → 5 mL 水 → 60 mL 的 0.1 mol/L NaOH 水溶液 → 5 mL H<sub>2</sub>O 在 0.5 mL/min 流速下反向冲洗。使用 0.1 mol/L 盐酸与有机溶剂结合清洗石墨化碳柱, 也具有好的再生效果: 二氯甲烷、甲醇、水、0.1 mol/L 盐酸、水、甲醇、二氯甲烷, 最后用流动相冲洗至平衡。

## 3 离子交换色谱柱的清洗与再生

离子交换色谱柱在极端 pH 范围和高盐浓度条件下长时间使用, 或者分析蛋白等生物类样品后, 盐离子及蛋白质会吸附于固定相表面, 导致色谱柱分离能力下降, 柱压升高, 峰形变差。

常用离子交换色谱柱的清洗与再生一般首先用纯水除去柱中盐, 然后以有机溶剂 (如甲醇) 除去基于分配作用吸附在填料上的杂质, 再用纯水冲洗色谱柱; 或者用 0.1 mol/L 柠檬酸洗涤, 然后用水洗去

柠檬酸<sup>[4]</sup>。阴、阳离子交换色谱柱性质存在一定差异, 使用不同清洗方法可能会取得更好效果。如阴离子交换柱用水、3% 的 H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 或 NaOH (非硅胶基质) 冲洗, 阳离子交换柱用水和酸冲洗。依利特及 Thermo 公司均推荐用水 → 甲醇 → 氯仿冲洗阴离子交换色谱柱; 阳离子交换色谱首先以水冲洗, 并在冲洗过程中注射 4 等份 200 μL 二甲基亚砷, 再用四氢呋喃冲洗。硅胶基质离子交换色谱柱, 限于硅胶的性质不能使用强酸或强碱清洗, 树脂离子交换色谱柱则无此限制。对树脂离子交换色谱柱, 高浓度的盐溶液 (1 ~ 2 mol/L 的 NaCl 溶液) 即可恢复其大部分分离能力, 油脂等少数与树脂紧密结合的物质可用低浓度酸或碱溶液 (如 0.1 ~ 0.2 mol/L 的 NaOH 水溶液, 20% ~ 40% 乙酸水溶液) 冲洗除去。硅胶柱可用一定程序的水溶液清洗, 亦可达到再生的目的: 0.5 ~ 1.0 mol/L 的盐缓冲溶液 → pH 为 2 ~ 3 的缓冲溶液 → 添加水溶性有机溶剂 (如 10% ~ 20% 浓度的甲醇、乙腈、乙醇等) 的缓冲溶液 → 添加 8 mol/L 尿素或非离子型表面活性剂的缓冲溶液<sup>[17]</sup>。

对于分析生物样品的离子交换色谱柱, 可以使用一些特殊的方法进行清洗和再生。四氢呋喃 - 乙腈或甲醇冲洗可去除脂类; 乙腈 → 丙醇 → 1% 三氯乙酸进行梯度冲洗可去除蛋白质; 在乙腈或甲醇冲洗同时反复注入四氢呋喃 (100 ~ 200 μL) 可去除某些高疏水性化合物<sup>[18]</sup>。通常吸附在固定相表面的酸性有机物用低 pH 缓冲液冲洗, 碱性有机物用高 pH 缓冲液冲洗, 然后依次用蒸馏水、甲醇、二氯甲烷、甲醇、水冲洗<sup>[16]</sup>。离子交换柱中强吸附的蛋白质可使用蛋白酶去除: 将 2% 的酶溶液 700 ~ 800 μL 用高压泵注入色谱柱中, 37 °C 反应 24 h, 再先后用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.1) 和含 0.5 mol/L NaCl 的 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.1, 流量 0.5 mL/min) 进行充分淋洗。该方法对已知被蛋白质污染十分严重的色谱柱, 能取得非常好的效果, 且重复性良好<sup>[18]</sup>。

对受污染的离子交换色谱柱, 可根据色谱柱性质及具体污染情况, 选择强酸性或强碱性溶液、高盐溶液、含有机溶剂的缓冲溶液、含尿素等溶剂或表面活性剂 (非离子型表面活性剂) 的缓冲溶液、某些蛋白质变性剂 (如盐酸胍和尿素等) 以及蛋白酶中一种或几种组合进行清洗和再生。

## 4 体积排阻色谱柱的清洗与再生

体积排阻色谱是基于分子尺寸大小将物质分离

的一种色谱模式,其使用的色谱固定相包括有机凝胶和无机凝胶固定相两大类。硅胶凝胶色谱柱在酸性条件下官能团会发生脱落,碱性条件下硅胶基质会发生溶解,故清洗时注意清洗液 pH 值,以免损坏色谱柱。有机聚合物凝胶柱耐受 pH 范围宽,可以用较极端 pH 的清洗液进行清洗:用稀氢氧化钠或非离子型去垢剂去除大部分的结合物质,如果污染物是一些难洗脱的蛋白质,则需要使用特殊清洗方法,用 90% 的乙醇、30% 的乙腈或 30% 异丙醇在低流速下冲洗过夜除去疏水蛋白质。对亲水性蛋白质和肽,可用提取液、去污剂或 1 mol/L 乙酸低流速冲洗色谱柱过夜,甚至可将溶于 0.1 mol/L 乙酸和 0.5 mol/L NaCl 中的 1 mg/mL 胃蛋白酶注入色谱柱,在 37 °C 孵育 1 h,再用平衡液冲洗色谱柱除去亲水蛋白质,然后以蛋白水解酶处理分解凝胶中剩余的痕量胃蛋白酶,再用水→甲醇→水冲洗<sup>[17-19]</sup>。

清洗与再生体积排阻色谱柱过程中,流速需低于 50% 最大推荐流速,每种溶液冲洗 10~15 倍柱体积即可,更换清洗溶剂时需用 3~5 倍柱体积去离子水将色谱柱冲洗干净。通常体积排阻色谱柱上离子性吸附的碱性杂质可用高浓度中性盐溶液(如 0.5 mol/L 硫酸钠溶液)去除;含有机溶剂(如 10~20% 的甲醇、乙腈、乙醇等)的缓冲溶液(如 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH = 7.0)可洗脱吸附的疏水性杂质;吸附最强的杂质,可在清洗溶剂中添加尿素、中性表面活性剂(6~8 mol/L 的尿素或 0.2~0.3% 的中性表面活性剂)进行洗脱<sup>[20-21]</sup>。

## 5 其他色谱柱的清洗与再生

高效液相色谱测定糖醇等物质的含量时,使用特殊的糖醇色谱柱,其价格及其昂贵。对受污染的糖醇色谱柱用 0.2 mol/L 硝酸钙溶液作为流动相,在 85 °C 下,流速为 0.2 mL/min 反相冲洗色谱柱 24 h,然后在相同条件下用 10~20 倍柱体积水冲洗,可取得较好的再生效果,延长色谱柱使用寿命,降低分析成本<sup>[22]</sup>。

基于特异性吸附作用将物质分离的亲合色谱柱和手性色谱柱,可依据具体色谱柱的特性,选择合适的强洗脱液,在 0.5 mL/min 流速下反向冲洗色谱柱。其它如亲水作用色谱柱和疏水作用色谱柱,根据其使用条件,参照对应色谱模式选择合适清洗与再生方法<sup>[23-24]</sup>。

## 6 结论

被污染的色谱柱,根据其具体情况,应选择合适的清洗与再生方法进行清洗,一般可将其柱效提高 50% 以上。对硅胶基质反相柱,污染情况较轻时可选择一系列溶剂,按洗脱能力逐渐增强的顺序依次冲洗,如甲醇→二氯甲烷→甲醇→0.05 mol/L 硫酸各冲洗 20 倍柱体积;当其被严重污染时,可依次用二甲基甲酰胺、丙酮、乙酰丙酮、甲醇冲洗 20 倍柱体积,或将色谱固定相从色谱柱中取出,用二甲基甲酰胺→丙酮→乙酰丙酮→甲醇超声清洗;被强吸附蛋白质污染,使用注射 1% SDS 法清洗,能得到较好的效果。硅胶基质正相色谱柱用极性逐渐增强的溶剂系统冲洗;有机聚合物、石墨化碳及氧化锆固定相色谱柱(正相或反相均可),用稀酸、稀碱和有机溶剂结合清洗。离子交换色谱柱和体积排阻色谱柱可用高浓度中性盐溶液、含有机溶剂的缓冲溶液及加有尿素、中性表面活性剂的缓冲液进行洗脱;严重污染时可使用强酸性或强碱性溶液(非硅胶基质色谱柱)、蛋白质变性剂以及蛋白酶进行清洗和再生。

随着 HPLC 的发展,新型色谱柱层出不穷,用于分析特殊样品的专用色谱柱被大量应用与生产生活之中。鉴于现有色谱柱清洗与再生方法的局限性和繁杂性,各种专用色谱柱价格昂贵以及新型色谱柱多样性,预计未来色谱柱的清洗与再生方面研究在以下方面会成为热点:①开发使用溶剂少,较现有方法更简单有效的色谱柱清洗与再生方法;②针对各种专用色谱柱的清洗与再生方法;③适用于新型及 CEC 等其它类型色谱柱的清洗与再生方法。

### 参考文献:

- [1] 孙元社,李彤,张玉奎. 色谱技术的现状及与人们日常生活的关系[J]. 科学仪器仪表, 2007, 9: 69-73.
- [2] Snyder LR, Kirkland J J, Glajch J L. 实用高效液相色谱法的建立[M]. 第 2 版. 张玉奎, 王杰, 张维冰, 译. 北京: 华文出版社, 2001: 237-239.
- [3] 中国市场调查研究中心. 中国反相色谱柱市场发展及投资价值分析报告[EB/OL]. [2009-12-04]. <http://www.cmm.com.cn/yjly/content2-3988.shtml>
- [4] Majors R E. The cleaning and regeneration of reversed-phase HPLC columns[J]. LC-GC Europe, 2003, 16(7): 404-409.
- [5] Majors R E. Washing Reversed-Phase Silica-Based

- Columns [ EB/OL ]. LC - GC North America [ 2010- 02- 09 ]. <http://chromatographyonline.findanalytichen.com/kgc/article/articleDetail.jsp?id=656286>
- [ 6 ] 刘虎威, 张维冰, 施超欧, 等. 实用色谱技术问答 [ M ]. 北京: 化学工业出版社, 2009 100- 101.
- [ 7 ] 张玉奎, 张维冰, 邹汉法. 分析化学手册 [ M ]. 第 6 分册. 液相色谱分析. 北京: 化学工业出版社, 2000 94
- [ 8 ] John W Dolan What's Happening to My Column [ J ]. LC- GC North America 2006 24(9): 986- 992
- [ 9 ] John W Dolan Column Care [ J ]. LC - GC North America 2008 August 1: 692- 696
- [ 10 ] 余盛刚, 唐涛, 李彤, 等. 反相高效液相色谱固定相再生新方法 [ J ]. 现代科学仪器, 2008 2 40- 42
- [ 11 ] 黄骏雄. HPLC 色谱柱性能异常的判别及再生 [ J ]. 现代仪器与维修, 1996 2 16- 18
- [ 12 ] CHROM. Regenerating or Cleaning Your HPLC Columns [ EB/OL ]. [ 2006 ]. <http://4chrom.com/index.asp?PageAction=Custom&ID=26>
- [ 13 ] 刘国诠, 余兆楼. 色谱柱技术 [ M ]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2005 281
- [ 14 ] Ralph A Gohlz, F Vincent Warren Jr, Brian A Billmeyer Analysis of drugs in the presence of serum albumin by liquid chromatography with eluents containing surfactants [ J ]. Anal Chem, 1991, 63(4): 384- 390
- [ 15 ] 张庆合, 张维冰, 杨长龙, 等. 高效液相色谱使用手册 [ M ]. 北京: 化学工业出版社, 2008 49
- [ 16 ] 王新. 高效液相色谱柱的保护 [ J ]. 安庆师范学院学报 (自然科学版), 2001, 7(4): 71- 75.
- [ 17 ] 谢虹, 刘秋朝, 梁建生, 等. 高效液相色谱柱的管理 [ J ]. 实验室研究与探索, 2003, 22(3): 117- 121
- [ 18 ] 徐其进, 黄骏雄. 蛋白质分离与纯化过程中高效离子交换色谱柱的再生 [ J ]. 分析化学, 2001, 28(1): 46- 49.
- [ 19 ] 理查德 J辛普森. 蛋白质组学中的蛋白质纯化手册 [ M ]. 茹炳根, 译. 北京: 化学工业出版社, 2009 160
- [ 20 ] 中国色谱网. 色谱柱的清洗 [ EB/OL ]. [ 2007- 02- 06 ]. <http://www.sepu.net/dvbbs/dispbbs.asp?boardid=176&id=90207>.
- [ 21 ] 赛分科技. 体积排阻色谱柱 (如 SRT SEC) 如何清洗再生 [ EB/OL ]. [ 2009- 12- 10 ]. <http://www.sepa-tech.com/shownews.asp?showid=151&qq=qq>
- [ 22 ] 李俊平, 王成福. 糖醇高效液相色谱柱的再生 [ J ]. 天津化工, 2007, 21(2): 50- 53
- [ 23 ] 刘有芹, 颜芸, 徐莉, 等. 分子印迹聚合物填充色谱柱的研究与发展 [ J ]. 化学研究与应用, 2007 19 (4): 351- 357.
- [ 24 ] 黄淑平, 姚金水, 张希岩, 等. 酰胺类手性固定相的研究进展 [ J ]. 材料报道, 2008, 21(8): 51- 55

## Methods for Cleaning and Regeneration of High Performance Liquid Chromatographic Columns

LIU Fan, XIONG Zhi- chao, ZHANG Ling- yi, ZHANG Wei- bing  
(East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract** Methods for cleaning and regeneration of reversed phase, normal phase, ion exchange, size exclusion chromatographic, affinity chromatographic and other liquid chromatographic columns are summarized in this paper, aiming at the recovery of the separation ability of contaminated columns, and the extension of the lifetime of columns. According to the sequence of the increase of solvent strength, a series of solvents can be used for the cleaning and regeneration of silica- based reversed- phase chromatographic columns, and some strong solvents such as MME, SDS, acetone and hydrochloric acid can also be used. For silica- based normal phase chromatographic columns, a solvent washing system with increased polarity is effective. The recommended column washing solvents for organic polymers, graphite carbon and zirconium oxide stationary phase columns are dilute acid, dilute alkali and organic solvents. After cleaning and regeneration by these methods, the column efficiency of contaminated columns can be increased by 50%.

**Key words** HPLC; column; cleaning; regeneration

**Classifying number** O657. 32