浅析反相 HPLC 色谱柱的清洁和再生

李雪慧　丁现帅
(陕西汉江药业集团股份有限公司,陕西　汉中　723000)

摘　要: 本文主要介绍通过不同方法对键合色谱柱的清洗和再生。

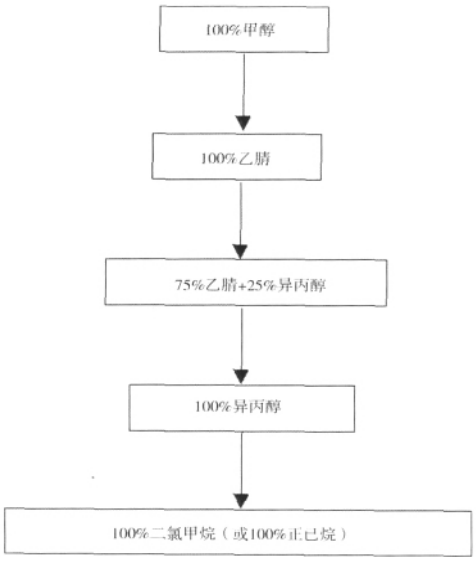
关键词: 键合色谱柱; 清洗; 再生
中图分类号: O657　**文献标识码:** A　**文章编号:** 1003 - 5168(2013) 14 - 0066 - 01

高效液相色谱法具有分离效能高、检测灵敏度高、分析速度快、选择性高等诸多优势,使其在分析领域中的到广泛的应用。反相色谱因其可分析极大多数的非极性物质和很多的可离子化的及离子化合物而成为高效液相色谱中应用最广泛的技术。而反相色谱柱作为反相色谱分析的不可或缺的部分,它的日常维护、清洗与再生就显得尤为重要。

在反相 HPLC 分析时,被分析样品的基体往往会包含多种化合物,如盐、脂质、含脂物质、腐质酸、疏水蛋白质和其它一些生物物质,这些可能在使用时与 HPLC 柱发生相互作用。一般情况下这些物质有比分析者的目标物或少或大的保留值。那些保留值较小的物质如盐类一般来说在空体积时就被冲出色谱柱。这些非目标产物的干扰能被检测器检测到而且能形成色谱峰,气泡,基线上移或者是负峰。如果样品成分在柱子中有很强的滞留,多次进样后,这些吸附在柱子表面的物质通常就会积累在柱头。有着中等保留值的样品可被慢慢洗脱,通常表现为宽峰,基线扰动,或者基线漂移。

有时候这些被吸附的样品成分累积到一定程度时,就会覆盖部分键合固定相表面,形成一种新的固定相。分析物能与这些杂质作用形成一定的分离机理,保留时间会发生漂移并产生拖尾峰。当柱子被污染,它的色谱行为和没被污染的柱子会有所不同。如果色谱柱被严重污染,柱子的反压超过泵所能承受的最大压力,而使分析工作无法进行。被污染的反相柱子必须清洗和再生才能恢复原来的操作条件。

再生被污染 HPLC 色谱柱的关键是知道污染物的性质并且能找到适当的溶剂来去除。如果流动相 pH 值过大,则会破坏溶解硅胶而导致键合相流失,使得色谱柱无法恢复。



当用二元混合溶剂进行等度洗脱时,可用 20 个柱体积的 90 ~ 100% 的强洗脱溶剂冲洗清除污染物,如甲醇、乙腈、四氢呋喃等。如果使用的是缓冲液系统,应该先用高纯水冲洗 5 ~ 10 个柱体积后更换成强溶剂,以防 HPLC 流动体系中的缓冲液沉淀,导致泵泄漏、管道堵塞及柱头堵塞等。值得注意的是,在冲洗色谱柱时,应将色谱柱从系统上取下,反向连接到输液泵上,色谱柱出口不要连接到检测器上,以免污染检测器流动池。

有时候,强溶剂也没法把残留在色谱柱上的污染物洗掉。那么更强的溶剂或者是一系列溶剂就有必要用来清洗柱子了,如果污染物是非生物物质,可以跳过一个或多个另外的有机溶剂去除污染物。对于硅胶键合柱来说(如果没有缓冲液的系统),一般清洗顺序是:

用二氯甲烷或正己烷以后,由于溶剂相溶性柱子必须用异丙醇冲洗后才能用水相溶剂,每种溶剂至少冲洗 10 个柱体积,可以用 1 ~ 2ml/min 的流速来冲洗,要恢复原来的溶剂体系,不需要每一步都冲洗,可以跳过中间步骤。

四氢呋喃对很多物质有很好的溶解性,因此是一种很好的清洗溶剂。如果柱子被严重污染,可以二甲基亚砜(DMSO)或者二甲基甲酰铵和水按 50: 50 的比例混合,用低于 0. 5ml/min 的流速冲洗色谱柱。

对于 C18 键合柱,为去除色谱柱中含有的缓冲盐溶液或水溶性物质时,应使用含 5% 的有机溶剂的水溶液进行冲洗。应避免单独使用水进行冲洗,以免损伤色谱柱。

反相 HPLC 色谱柱的再生除用以上溶剂进行清洗外,还可以根据具体情况用以下方法进行再生:

(1) 如确定是色谱柱头的过滤筛板被污染,可以将色谱柱反方向用甲醇冲洗至正常压力,或者卸下色谱柱头,将其放在 10% 的稀硝酸内超声清洗 10 分钟,后再用纯水超声 10 分钟,重新装入色谱柱。

(2) 如确定色谱柱头的填料被污染,将柱头螺丝卸下,挖出柱内前段被污染的填料,用相同的柱填料重新填入,仔细修复后,重新安装上柱头螺丝。

总之,成功再生反相柱子是一个非常耗时间的过程,在进行分析时,尽可能的做好样品纯化,并在分析工作结束后,及时清洗色谱柱,即使是长期不用的色谱柱也要进行定期清洗维护,以免使色谱柱污染严重而无法使用。

参考文献:

[1]高效液相色谱方法及应用,于世林,化学工业出版社,2004
[2]高效液相色谱仪的管理与维护,张燕婉,汪劭婷

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net