

HPLC 柱日常维护

色谱技术参考

液相色谱柱的日常维护及应注意事项



液相色谱中对流动相的要求

- (1) 溶剂必须“干净”，在使用前需经过滤板除去颗粒杂质，必要时，在进样口再加一块滤板，以除去可能由泵带来的颗粒
- (2) 必须控制吸附色谱中溶剂的含水量，过量水会使吸附剂活性降低，溶质保留值下降
- (3) 如需在一定 pH 值下操作，须定期测定流动相的 pH 值，大气中的 CO₂ 溶解在流动相内将引起 pH 值的改变，特别是贮液瓶密闭不严时这种影响可能更大
- (4) 软质或半软质填料的溶胀率随溶剂极性的变化而变化，使用新柱时应先用 25—30 倍柱容积的合适流动相平衡；更换流动相时，如果两种流动相不互溶，需采用过渡溶剂使前一种流动相逐步溶解除去(例如，2、2、4—三甲基戊烷换成甲醇时，必须用乙酸乙酯或其他溶剂过渡，直到标准物保留值达到稳定状态)
- (5) 为延长不易装填、价格昂贵的高效柱寿命，可在进样器和色谱柱之间安装预柱(预柱应有足够的杂质容量)，对流动相和样品中的颗粒和杂质进行最后的过滤；在填充和连接预柱时，不应有额外造成谱带变宽、分离度下降的死体积；预柱与色谱柱的体积之比应保持为 1:15 至 1:25，以减少谱带变宽

液相色谱柱的日常维护

- (1) 每次开机时，流速和柱压要逐渐增加，突然迅速增加，会使柱床受到冲击，引起紊乱，产生空隙
- (2) 在进样前使色谱系统充分平衡，是否平衡可由基线加以判断
- (3) 在进样前，检查色谱系统的各个接头，通常由此能发现是否有漏液现象。如有漏液，空气会从漏缝进入系统引起基线漂移，影响峰高和峰面积的重复性
- (4) 不要把柱接头上得太紧，否则易损坏接头螺纹，引起渗漏
- (5) 不要把柱子放在有气流的地方或直接放到阳光下，气流和阳光都会使柱子产生温度梯度造成基线漂移；如果怀疑基线漂移是由温度梯度引起的，可以设法使柱子恒温
- (6) 若仪器用做常规分析，样品种类有限，但分析次数很多，则不妨为每一类常规分析配置一根专用柱，这样有助于延长柱寿命
- (7) 如果怀疑样品会污染色谱柱，可以用合适的溶剂(几百毫升)慢慢冲洗柱子过夜，第二天早晨再用流动相重新平衡柱子(约 3min)
- (8) 在因装卸、更换、贮存等而挪动柱子时，动作要轻，不要使其受到碰撞，以免柱床因震动产生空隙或通道
- (9) 柱要加标签，新旧分开，不要放在温度变化很大的地方
- (10) 柱子不用或贮藏时，应封闭并贮存在惰性溶剂中



柱子的清洗和再生

1. 柱子的清洗

即使样品和流动相已做过前处理，也仍难以完全避免柱子受到污染，因此必须对柱子进行清洗。清洗应定期进行，如果在短期内分析许多样品，则以每日清洗一次为宜，至少也应一周一次，防止有太多的杂质在柱上堆积。

反相柱的常规清洗办法是：分别取甲醇、三氯甲烷、甲醇-水各 20 倍柱体积（即对于一根 4.6mm × 25cm 的柱来说，通常是 50-60ml，而对于 9.4mm 内径 × 50 cm 的柱来说，通常是 500-600ml），使之通过柱子。然后用流动相平衡（通常仍用 20 倍柱体积），柱一般将恢复正常。如果选择性仍和以前不一样，则表明还有其他杂质留在柱子里，这时应考虑更加严格的清洗：先用 20 倍柱体积的水，再用相同体积的 0.05mol/L 硫酸，最后用流动相溶剂。酸洗常能洗下有机溶剂所不能洗下的剩余杂质。在低 pH 值下做长期（一天或更长）清洗是不适宜的，但 50ml 洗液以 2ml/min 的速度清洗 25min，一般对键合相没有损害。注意，强碱不能用来清洗任何微粒硅胶柱（不论是键合相还是非键合相），因为硅胶骨架会溶解。对于严重污染的反相柱，只能采用再生的方法。

2. 柱头空隙的处理

拆下不锈钢烧结过滤器后，检查柱床，常可见柱头塌陷，此时先剔除无规则床层和带色填料，使柱床呈白色并完全水平，再用甲醇作糊状填料匀浆液，将填料匀浆液滴在柱上靠重力从匀浆液中排出甲醇液，重复数次，直到水平，完成了柱的再生。此时，如果柱头孔隙深度小于 1cm，可以采用下述局部重装的办法，否则，柱应当完全重装或更换。

柱入口局部重装时采用的填料可以和原填料一样，也可用玻璃珠。粒径大于 20μm 的可用敲打充填法干装。如果粒径小于 20μm 则要用合适的溶剂配成匀浆，匀浆逐次加入，每次加入前都要使上一次加入的全部沉降。把孔隙填满后，用刮刀将填料刮平，更换柱入口接头，把柱重新接到液相仪器上，慢慢地增加流动相流速和系统压力，直到操作上限为止。让相当于 10-20 倍柱体积的流动相通过柱子，然后逐渐降低流速，并使压力降为零，再把柱子卸下来，并卸下入口接头，观察柱的入口。此时孔隙应当减小，但是由于新加入的填料在系统的操作压力下压入柱头，孔隙不可能一次就被全部充满。重复上述重装过程，直到柱上加不进更多的填料为止。一旦柱子填充完毕，可加进混合样品，测定柱子的性能是否已经改善。



3. 柱再生

色谱柱使用一段时间后，柱效将会下降，必须进行再生处理。再生处理包括活化（自右向左）和净化（自左向右）两种。

◆ 硅胶、氧化铝和极性（正相）键合相色谱柱可以采用以下程序再生：

三甲基戊烷或己烷-三氯乙烷-乙酸乙酯-丙酮-乙醇-水采用上述溶剂依次以 1ml/min 的流速通过色谱柱，洗脱量约为 20 ml。然后反方向重复上述过程。

◆ 反相色谱柱常用甲醇-水作流动相，有时还可能含有控制 pH 值的盐、酸或离子型溶质。对硅胶或以硅胶为基质的键合（或离子交换）填料，为避免硅胶溶解，pH 值不应超过 8.5。再生时将 25ml 纯甲醇及 25ml 甲醇：水（1：1）混合液依次通过色谱柱淋洗，然后用所选的流动相平衡。

◆ 离子交换色谱柱的再生方法有两种：

① 先用 25ml 蒸馏水通过柱子以除去缓冲盐类，再用 25ml 甲醇冲洗，以除去由于分配效应而残存在骨架中的杂质，再用 25ml 蒸馏水除去不溶于甲醇的残存盐类，最后用缓冲液平衡。

② 先用 0.1mol/L 的柠檬酸洗涤，然后用水洗涤（不要用碱性溶液，以防止硅胶基质溶解），最后用缓冲液平衡

