

# HPLC 色谱柱性能异常的判别及再生

黄 骏 雄

中国科学院生态环境研究中心

**【摘要】** 本文主要讨论 HPLC 色谱柱性能下降的判别、产生的原因及防止柱性能恶化可采取的措施。对柱失效后的各种再生技术与处理时的注意事项也分别作了介绍。

## 1. 前言

HPLC 色谱柱在使用过程中尽管十分注意,但是由于固定相填料受流动相不断冲刷,加上色谱系统的自然损耗,色谱柱性能仍会逐渐下降。因此,各种色谱柱均有一定的使用寿命。我们的目的在于及早发现柱性能的异常,找出异常的原因,及时采取各种补救的方法,以免柱性能更趋恶化。

## 2. 色谱柱性能异常的判别

色谱柱在正常使用中其峰形、柱压降、保留行为、柱效、选择性、分离度等均应与验收时测得的数据一致。若参数中有微小的变化就是柱性能变异的开始。用标准样品定期测定这些参数,就可尽早发现它们的变化。最常用的标准样品如苯、甲苯、乙苯、二甲苯、丙苯、苯、联苯萘、蒽等。生物大分子分离与测定中常用各种标准蛋白混合物,如细胞色素 C、核糖核酸酶 A、溶菌酶、肌红蛋白、 $\alpha$ -糜蛋白酶原、卵清蛋白等。通过这些标样色谱行为的变化可判断柱性能异常的原因。

### 2.1 峰形不对称(完全对称的峰并不多)

由于样品处理不当、流动相选择不合适、分离系统中有死体积均能造成峰不对称。这些因素的影响均来自柱外,不会在色谱柱使用中发生变化。发现使用中峰不对称加剧,首先要考虑柱头过滤片是否受杂质污染,吸附了样品中组份,造成峰形不对称。验证的办法是更换新的滤片。其次应检查柱入口端是否产生空间。这种多余的死空间也会引起峰形异常。其次要考虑柱内固定相是否变性。由于样品中某些组份强烈吸附在固定相表面

或发生反应,改变了表面特性,可引起峰形不对称;流动相的长期冲刷使固定相表面的官能团脱落流失、活性中心暴露而吸附样品分子也会产生不对称峰。固定相变性引起峰形异常会伴随其他色谱参数的变化。

### 2.2 柱压降变化

除了梯度洗脱中由于流动相组成改变引起的粘度变化使柱压降变动外,通常在恒组成流动相洗脱时,柱压降不会有明显的变化。柱压降变小表示从高压泵到色谱柱入口有漏液,它可能发生在活塞与密封圈之间、单向阀内、进样阀及各种接头等部位。若同时伴随流量减小,需逐一小心检查。柱压升高一般是由于柱头过滤片堵塞,透过滤片的微粒或样品沉积于固定相填料内,以及分离过程中柱内发生反应生成沉淀等引起的,此时流量不一定减小。为了检查引起柱压升高的部位,可把检测器、色谱柱、予柱(若有的话)、进样器按顺序逐一隔离,观察柱压的变化,柱压变化最大(扣除正常的色谱柱压和予柱压)的部件往往是有问题的。

### 2.3 保留值与选择性的变化

这是反映柱性能变化重要的热力学参数。包括死时间  $t_0$  (或相应的死体积  $V_0$ )、保留时间  $t_R$  (或相应的保留体积  $V_R$ )、容量因子  $k'$  及表示柱选择性特征的相对保留值  $\alpha$ 。色谱柱的  $V_0$  是固定的,它的测定方法很多,也可从  $V_0 \approx 0.5Ld^2$  ( $L$  为柱长,  $d$  为柱径) 简单估算。一根填充较好色谱柱的  $V_0$  约为柱空管体积的 65% 左右。流量恒定则  $t_0$  不变。 $t_0$  在柱使用中逐渐增大,一般由固定相流失所致,此时  $t_R$  会减小;若  $t_0$  与  $t_R$  同时减小,则流量变小,需检查校正流速控制器;而  $t_0$  与  $t_R$  同时增加,则流量降低,可能系统中有漏液或存在气泡。容量因子  $k'$  与流量无关,只随流动相组成与固定相特征而变。 $k'$  变小表示流动相强度提高,反

之则降低。在反相 HPLC 中有机溶剂在流动相中的含量变化 10%，可使  $k'$  改变 3 倍之多。固定相表面性质的改变，如长期使用中的老化、官能团流失、不可逆吸附、表面化学反应等对  $k'$  的变化影响很大。此外  $k'$  也受柱温影响，但一般不大。相对保留值  $\alpha$  变化的因素与  $k'$  一样，受流动相与固定相及温度的影响，而且不同样品情况更为复杂，表 1 列出了实验参数对  $t_0$ 、 $t_R$ 、 $k'$  及  $\alpha$  的影响。

表 1 不同参数对  $t_0$ 、 $t_R$ 、 $k'$  和  $\alpha$  的影响

| 实验参数    | $t_0$ | $t_R$ | $k'$ | $\alpha$ |
|---------|-------|-------|------|----------|
| 流 量     | ×     | ×     |      |          |
| 流 动 相   |       | ×     | ×    | ×        |
| 固 定 相   |       | ×     | ×    | ×        |
| 柱 子 大 小 | ×     | ×     |      |          |
| 温 度     |       | ×     | ×    | ×        |

由表 1 容易判断保留值与选择性变化的原因。如  $t_0$  不变而  $t_R$ 、 $k'$  和  $\alpha$  改变，很可能由流动相、固定相、或浊度的变化引起；若  $k'$  与  $\alpha$  不变仅  $t_0$  和  $t_R$  变化，则可能是流量或柱的大小发生了变化。

#### 2.4 柱效与分离度的变化

柱效是反映柱性能的动力学参数，而分离度则包括动力学与热力学在内的柱性能参数。它们在柱使用过程中逐渐下降的原因有：①流动相长期冲刷，表面官能团脱落，Si—OH 吸附中心暴露。②使用高 pH 流动相溶于固定相填料，柱内出现空间。③样品或流动相中痕量组份与填料表面反应或不可逆吸附，改变表面性质。④固定相填料受流动相长期压缩，或颗粒破碎，柱床出现空间及吸附中心。⑤流动相与样品中的微粒堵塞柱头滤片或柱内填充床吸附了样品。⑥高聚物基体的填料在不同溶剂中的溶胀或收缩，挤压填料颗粒变形、破碎、或柱床出现缝隙、空间。上述诸因素对柱效与分离度的影响时而单一，时而多因素协同。

总之，引起柱性能与各项参数异常的原因很多是共同的。它们的变化相互关联。峰形改变时柱效、保留行为、选择性、分离度均受影响，可多方面验证对柱性能下降原因的判断是否正确。

### 3. 色谱柱的再生方法

柱性能下降甚至失效后可用某些再生技术使

之恢复，继续使用。再生技术根据色谱柱的不同部份分别予以讨论。

#### 3.1 柱接头与柱管

柱接头最易受损的是柱头内的过滤片。常用的是孔径为  $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$  的 316 号不锈钢烧结过滤片。受微粒堵塞的滤片可用反冲法再生，但深入滤片内的微粒难以冲出，只能更换。受吸附或污染堵塞的滤片可用相应的高强度溶剂在超声浴内清洗。蛋白质类生物大分子极易吸附在不锈钢上，因而含生物大分子类的样品最好采用 Peek 类材料的滤片及柱管，否则难以保证良好的柱性能。

#### 3.2 固定相填充床

空间与缝隙的出现是固定相填充床通常遇到的问题。情况不严重(空间小于几 mm 深)时，可用同样的固定相填料与填充溶剂制成的匀浆填满空间。填充前先把表层的固定相除去，因为它们最易受污染变性，填满后要除去柱端多余的匀浆并擦净再接柱头，以免颗粒存在影响密封性能。填好的色谱柱受流动相的高压，又可能出同空间，因此填充匀浆须重复 2~3 次，确保柱子空间全部消失。若出现的空间深达几 mm 以上，情况较严重时，柱子固定相需压出后重新装柱。同样，柱入口端几 mm 的填料要除去。回收的固定相需用浮选除去细的粉末，再用三甲基氯硅烷作端基屏蔽，复盖固定相表面在以往使用过程中产生的吸附活性中心，然而加入新的固定相，用匀浆法装柱。柱重装的次数并非无限，它与柱材料、管径、壁厚等因素有关。 $\Phi 4.6\text{mm}$  的分析柱要比  $\Phi 8\text{mm}$  的半制备柱与  $\Phi 22\text{mm}$  的制备柱使用次数多，再生性能也好。

#### 3.3 固定相填料

填料变性的明显标志是  $k'$  与  $\alpha$  值的变化，其再生应视变性原因不同而采取相应的措施，通常有以下三种情况：①填料表面官能团配基断裂后流失。此时可用原位(in situ)重新键合的方法。以反相填料为例，将合适的硅烷化试剂通入失效的色谱柱，在一定温度下使之与表面暴露的 OH 活性基团反应，让硅烷分子中的烷基重新键合在失效的填料颗粒表面。这种方法只能恢复部份柱效，而且对 5nm 的细颗粒填料再生后柱压易偏高。②样品或色谱系统中残留组份吸附在固定相表面引起失效。再生的方法视吸附物的性质而定，通常采

用高强度溶剂冲洗较有效。对疏水性物质如脂类,需用非极性的有机溶剂,像乙腈、异丙醇、四氢呋喃、己烷等;除去金属吸附物可用强酸溶液或磷酸、柠檬酸、EDTA(乙二胺四乙酸)等各种络合剂;吸附了生物大分子的填料,再生较麻烦。因为生物大分子多数同时具有亲水与疏水基团,而且发生多位点同时及吸附。所以常用的有机溶剂对再生蛋白质污染的反相柱很少奏效,而用可溶蛋白质的浓盐溶液,两性试剂,表面活性剂等却可得到较好的效果。表2列出的清洗剂用于再生因蛋白质吸附而失效的各种固定相填料,包括反相、离子交换、凝胶过滤等,有时两种以上溶液配合使用效果更佳。选用时必需注意不同固定相填料对溶剂的适用范围,以免填料性能受损。

此外,我们实验室已采用了生物试剂使失效的 TSK 系列柱再生。目前尚无更合适、方便的方法,因而使用时要尽量避免此类情况产生。

柱再生操作时必须特别注意以下几点:(1)失效柱再生时必须要与检测器脱开,不但便于操作,而且可使检测器免于污染。(2)再生时反应液或冲洗液的流动方向最好与使用方向相反。(3)各种溶液使用的次序要相适,两种极性相差很大的溶剂连续使用时,中间一定要用过渡溶剂。(4)各种溶

剂的使用量以 20~30 倍柱体积为佳,对污染不严重或易于洗去的污染物色谱柱可用 1~2ml 的样品管,从进样器注入各种清洗液进行再生。

表 2 色谱柱填料再生用的清洗剂

|          |   |
|----------|---|
| 60%      | 甲酸溶液  |
| 1%       | 乙酸水溶液   |
| 1%       | 三氟乙酸(TFA)水溶液  |
| 0.1%     | TFA/丙醇 (40/60)  |
|          | 磷酸三乙胺*/丙醇 (40/60)   |
| 5-8 ml/L | 尿素或胍的水溶液  |
| 1-2mol/L | NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 或 La <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 水溶液 |
| 100%     | 二甲基亚  |

\* 0.75mol/L 磷酸溶液加三乙胺调至 pH2.5。

近年来,随着色谱仪功能的完善与改进,固定相填料的性能与柱填充技术的提高,色谱工作者实际经验的丰富与积累;色谱柱的使用寿命也在不断增长。只要我们遵循各项规则与注意事项,柱寿命在半年或到一年左右应该是有保障的,而且多数均可使用一年以上。当然还与使用频次与样品载量有关。

## 智能电路维修测试仪

石介文

### 1. 前言

随着时间的推移,八十年代起引进的仪器设备已有相当数量面临老化坏损等问题,每年以 5% 的速度因故障而停机和报废,同时由于寿命等原因这一速度还在加快。这一情况已引起了许多专家的忧虑,这些集成度很高的电子设备按照常规的换板和传统的维修从时间上和经济上都是力不从心的。因此,国外一些电路维修测试仪器相继涌入国内市场。国内也出现了一些类似的维修仪器。这些电路维修测试仪器,主要分为两大类:一类是价格在几十至上百万元的针床式电路维修测

试仪,其主要特点是整板测试,测试速度快,诊断率高,但前期准备工作复杂,因此适用于品种少、数量多的维修场合,这类测试仪一般用于检修流水线上下来的故障板;再一类是价格在数千元至几万元的电路维修测试仪,其主要特点是逐一的器件测试,测试速度及诊断率略低于针床式,但前期准备工作简单,因此适用于品种多、数量少的维修场合。这类测试仪适用于一般从事专业维修的单位或单位内部的设备及仪器维修。

北京市天龙电子工程公司开发成功的电路维修测试仪系列产品,可帮助维修人员在没有电路图或不了解电路原理的情况下,实现最低成本元