

---

# Aminex<sup>®</sup> 树脂基色谱柱

## 说明书



金欧亚

# 目 录

|          |                           |           |
|----------|---------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>树脂基高效液相色谱柱介绍 .....</b> | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>色谱柱设置 .....</b>        | <b>2</b>  |
| 2.1      | 开箱 .....                  | 2         |
| 2.2      | 配置流动相 .....               | 2         |
| <b>3</b> | <b>保护柱 .....</b>          | <b>3</b>  |
| 3.1      | 安装保护柱 .....               | 3         |
| 3.2      | 清洗保护柱 .....               | 4         |
| <b>4</b> | <b>连接色谱柱 .....</b>        | <b>4</b>  |
| <b>5</b> | <b>操作参数 .....</b>         | <b>6</b>  |
| 5.1      | 流速 .....                  | 6         |
| 5.2      | 样品制备 .....                | 6         |
| 5.3      | 压力检验 .....                | 6         |
| 5.4      | 色谱柱测试 .....               | 8         |
| <b>6</b> | <b>再生操作 .....</b>         | <b>14</b> |
| 6.1      | 疏松树脂床 .....               | 14        |
| 6.2      | 清洗被污染的色谱柱 .....           | 14        |
| 6.3      | 恢复色谱柱至最初的离子形式 .....       | 15        |
| 6.4      | 填装色谱柱 .....               | 15        |
| 6.5      | 检测器/连接件问题 .....           | 16        |
| <b>7</b> | <b>高温色谱柱停机 .....</b>      | <b>17</b> |
| <b>8</b> | <b>色谱柱保存 .....</b>        | <b>18</b> |
| 8.1      | 长期保存 .....                | 18        |
| 8.2      | 短期保存 .....                | 18        |
| <b>9</b> | <b>故障排除 .....</b>         | <b>19</b> |

# 1 树脂基高效液相色谱柱介绍

树脂基高效液相色谱柱分离机制包括离子排阻、离子交换、配体交换、分子量排阻，正相和反相分配。这些多重的作用机制使该色谱柱对于化合物的分离具有独特的能力。树脂上的电荷提供了离子排阻的能力，而聚苯乙烯主链则提供了疏水相互作用。根据不同的化合物和选择性的程度，可选择运用一个或多个分离机制。

HPLC 中利用反相和离子对技术进行有效分离，需要复杂的流动相条件。被分析的化合物修饰的性质要和色谱柱一致，这些方法才能发挥作用。而使用树脂基高效液相色谱柱，不用修饰被分析的化合物，色谱柱填料已经被修饰，而且可以根据化合物结构优化色谱条件。因此，树脂基色谱柱通常用于等度 HPLC 系统，可以简化样品制备方法，无需样品衍生化。通过缩短样品制备时间，树脂基色谱柱极大地减少了总分析时间。在绝大多数分离中，样品制备所必须的仅仅是过滤。

色谱柱是高效液相色谱系统的核心。分析的成功或失败往往取决于选择合适的色谱条件和色谱柱的维护。不论 HPLC 系统性能和样品制备如何出色，如果色谱柱选择不合适，也不会对样品进行成功的分离。

填充柱类似于**深度**过滤器，它对于不溶性颗粒是一种极好的收集装置。填料颗粒越小，它的过滤性能越出色。键合的树脂基色谱柱填料不但适合于分离已确定的溶质，而且也可保留样品中其他的不确定的组分。这些被保留的化合物可以显著降低色谱柱的柱效和选择性。如果没有恰当的维护色谱柱，那么时间和金钱都将被浪费，因为一支合格的色谱柱会在短时间内被毁坏。花必要的时间在色谱柱维护上是极其重要的，可以保持色谱柱尽量不出问题。拥有合适的设置，恰当的维护，良

好的实验室技术，色谱柱就不会失效。这本树脂基色谱柱维护的说明将有助于提供更高的分离度，更长的色谱柱寿命，和更好的重现性。

## 2 色谱柱设置

### 2.1 开箱

当开箱取出色谱柱时，请仔细检查色谱柱包装是否有运输损伤、野蛮装卸或溶剂渗漏的现象。保存好装运色谱柱的外包装盒。如果有包装盒损坏的现象，请立即通知承运商并与伯乐公司的售后服务部门联系，或致电当地经销商

### 2.2 配置流动相

只有新配制的去离子蒸馏水、色谱级试剂和高纯的有机溶剂可以用于流动相的制备。配置好的流动相在使用前应该用孔径为 0.45 $\mu$ m 的微孔滤膜过滤以清除不溶颗粒物，这些不溶颗粒会阻塞系统进口过滤器。基线稳定性差通常是由于使用受污染的流动相所致。准备好的流动相在使用前要充分的脱气。

溶剂脱气的最好的方法是同时使用真空脱气与超声波脱气。可以单独使用真空脱气，但需要较长时间。在真空瓶中使用磁性搅拌可以有助于气体从溶剂中释放。单独进行过滤不能完全脱气。用于流动相脱气的瓶子也可用于流动相的贮存。1L 真空吸滤瓶比较合适。把已脱气的溶剂倒入另外一个容器中，会使溶剂重新产生气体。尤其是在水相和有机相之间的切换很可能会产生气泡。要保证两种溶剂都要充分脱气。

## 3 保护柱

由于保护柱在保护分析柱与 HPLC 系统中所起的作用，多年来保护柱已成为高效液相色谱技术的常规配件。Micro-Guard® 保护柱芯不仅能够延长分析柱的使用寿命，而且为在线样品制备提供便利方法。干扰分析分离的污染物与堵塞分析柱的混合物都可以通过使用保护柱芯来避免。使用 Micro-Guard® 保护柱芯可以减少或消除由于阴离子，阳离子，有机物，盐，不溶物所产生的干扰。强烈推荐 Micro-Guard® 保护柱芯与伯乐的高效液相色谱柱共同使用。

Micro-Guard HPLC 色谱柱保护系统包括用完即可丢弃的保护柱芯，用于标准柱芯的保护柱卡套，或一个阴离子和一个阳离子柱芯用于 Deashing 卡套。Deashing 卡套用于 Aminex HPX-42A 银型色谱柱。Deashing 也可用于其他使用水做流动相的色谱柱。

保护柱必须在分析柱被污染前更换。更换频率不能标准化，要根据实际使用情况而定。一般而言，色谱柱应当定期用标准样品检验。当实测的测量数据发生变化时，要立即更换保护柱。

### 3.1 安装保护柱

安装保护柱芯要旋开保护柱卡套尾部的末端螺母。在进样器和 Micro-Guard 保护柱卡套间连接管路，使用 Micro-Guard 保护柱中自带的派克式螺母和金属密封圈。保护柱芯在首次使用时可选择任意方向，使用后的保护柱芯若改变方向可能导致不溶性颗粒从保护柱芯脱离从而污染分析柱。用一根短管路连接保护柱卡套和分析柱，类似于进液管

路（参考保护柱卡套说明书）。将保护柱置入卡套中，将末端螺母用手指拧紧。没有必要拧得过紧，如果拧的过紧有可能损坏密封圈和卡套。不要使用工具过度拧紧密封圈。

使用前请将保护柱芯与保护柱卡套单独保存，以防止污染和碰伤。将保护柱芯保存在带有拉链的密封袋中，用被推荐的溶剂封存以防止柱芯干燥。

## 3.2 清洗保护柱

用大约 10-15mL 流动相，流速为 0.2-0.3mL/min，清洗新的保护柱。在清洗树脂基色谱柱保护柱芯时，在开始的一段时间内，会发现黄色洗脱液流出。这些物质是聚砷类，在色谱柱中起保存作用。每一次新保护柱在安装前都要进行这步操作。现在分析柱可以连接在保护柱上。

## 4 连接色谱柱

将流速降至 0.2mL/min。旋开分析柱封端螺母，将保护柱的出口用管路连接至分析柱的入口。在泵运行在低流速下连接分析柱，以排除色谱柱入口的气体。用大约 20mL 已脱气溶液通过色谱柱。当新购买的色谱柱首次使用时，应当首先进行色谱柱清洗与测试。只有色谱柱进样口与系统连接，色谱柱出口不与检测器连接。这样可以防止填料的颗粒（可能在运输过程中受撞击所致）和气泡（如果色谱柱在储存中干燥）从色谱柱进入检测器的流通池。当色谱柱清洗完毕后，这时色谱柱可以连接至检测器上。

色谱柱和检测器间的管路要尽量短。应用小内径管路（0.010 英寸内径）连接进样器和色谱柱以及色谱柱和检测器。务必要为收集作准备，适当去除废弃液。在检查保护柱和分析柱连接是否漏液后，色谱柱置于柱温箱内。启动柱温箱并调节温度。在没有流速时切勿加热色谱柱。只有在色谱柱达到预设温度后才可增加流速。用流动相平衡色谱柱。梯度系统，用初始流动相平衡。

切勿使气体进入色谱柱。如果已确定有气体进入色谱柱，降低色谱柱温度，反转色谱柱方向，使洗脱液慢慢流过色谱柱，直到气体排出。务必要除去系统中所有管路内的气体。然后再正确连接色谱柱。

所有金属管的连接都要使用加压螺钉。金属密封圈永久性箍在管路上。为确保最小死体积，要拧紧管路，密封圈和手紧接头。将管路插入底部。用 1/4" 扳手紧 1/4 圈。这个接头仅仅是用来加紧到足够密封，过紧会影响到它的寿命。

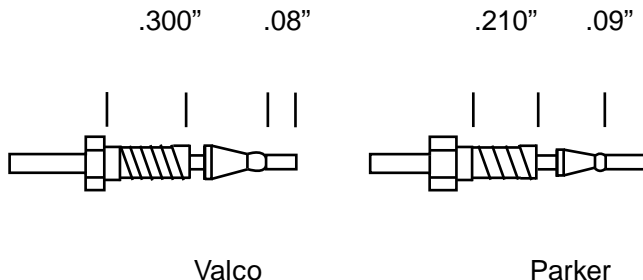


图 1. 伯乐树脂基色谱柱用 Parker 型接头配件。

## 5 操作参数

这时 HPLC 系统应该已经用合适的流动相清洗完毕，保护柱也已被平衡，分析柱应该被连接好。流速应该在 0.2mL/min。

### 5.1 流速

将流速缓慢升高。只有在色谱柱达到操作温度后，才可增加流速。切勿在常温下将流速提高至 0.3mL/min 以上。首先，在低流速下用柱温箱加热色谱柱；然后，在色谱柱达到推荐操作温度后增加流速。切勿使流速超过色谱柱说明中的最高流速，但即便如此，色谱柱也不应该长期使用最高流速。最佳流速在公开的方法中详细说明，并且可以根据分离度的质量选择流速。通常情况下，300mm 长 Aminex 色谱柱最佳流速是 0.5-0.7mL/min，色谱柱背压在最高水平之下。背压随着色谱柱使用时间而增加，所以背压是流速的主要决定因素。AminexHPX-87C, Aminex HPX-87H, 和其他 Aminex HPX-87 系列色谱柱的标准流速是 0.6mL/min。

### 5.2 样品制备

样品中的某些成分可能不溶于溶剂。为了预防此类问题，通常要将样品溶解于流动相中。样品溶液要通过 0.45 $\mu$ m 的滤膜除颗粒。

### 5.3 压力检验



要调整 HPLC 的泵压限制，以便于压力增加（高于标准操作压力 10-20%）可以使泵自动停机。这样可以保护系统意外超压。有一些 HPLC 泵，在低压条件下，其压力传感器不可调节至停机。在这种情况下，要格外小心压力上限不要超出。

要缓慢提升至标准流速（1-2 分钟）。这个温和操作方法对色谱柱来说，可以提供最佳的使用寿命、分离度和柱效。直接对色谱柱使用全流速可能会使色谱柱头塌陷，从而在色谱柱进口造成空隙，这样会降低色谱柱性能。

当首次将色谱柱连接至 HPLC 系统时，在缓慢增加至标准流速后，检验在标准流速下的操作压力。系统的总背压应该大概在 700-1000psi。（注意：一部分 HPLC 泵在低压是不能给出精确读数；有必要在进样器上游放置一个 0-1000psi 的压力计。）为了确定色谱柱的背压，先测定系统总操作压力，断开保护柱和分析柱之间的管路，记录压降。减少量大约是 100-200psi。（注意：在重新连接色谱柱前要记得降低流速，然后在 1-2 分钟内缓慢恢复至原流速。）

如果系统的总背压在使用过程中增加（洗脱液中含有较高浓度溶剂导致压力正常升高除外），重复上述操作来确定原因。如果背压增加很小，并且是保护柱的原因，系统可以正常操作。如果保护柱压力超过新柱的 150%，则要更换保护柱。

如果色谱柱导致系统压力增加，色谱柱可能局部阻塞，降低流速保持压力在操作范围内。有时色谱柱背压的升高是由于在一段时期多次进样，非极性化合物在基质上吸附造成。无论如何，接下来的清洗操作还有反转色谱柱流向可能对降低背压有所帮助。如果保护系统安装到位，

并且依照说明更换保护柱芯，那么在色谱柱的整个使用寿命中就会延迟少量污染物在基质上吸附和较高的色谱柱背压。切勿打开色谱柱来消除背压问题。打开的色谱柱中的填料可能会在打开时流失，从而毁坏色谱柱。

当使用有机溶剂时，用 5% 的浓度在 0.1 mL/min 的流速下过柱，直到基线稳定，然后在增加至需要的有机浓度。注意每种色谱柱有机浓度的最高限。第一步使用 5% 的溶液是用来减少色谱柱填料的立即溶胀和有可能引起的超压。

要避免色谱柱的压力瞬间波动。填料有可能受挤压，导致拖尾并降低柱效。

## 5.4 色谱柱测试

所有的新色谱柱在用于分析前都应该被测试以核实其本身的性能。色谱柱性能在长期使用后会发生改变，重新测试有助于评价这些改变。要获得成功的分析，效率（理论塔板数）和选择性（分离度）都必须满足的最低要求。

应在不连接色谱柱的情况下检测 HPLC 系统的性能。由于每一支色谱柱在发出前都经过检测，反复出现失效的色谱图可能反映出 HPLC 硬件或流动相配制的问题。务必保持柱外体积的最小化。柱效的下降往往是由于管路或进样器的问题所致。如果峰分离明显区别于给定的色谱图，则应该重新配制流动相并注意每一种成分的浓度。

如果色谱峰的洗脱顺序和峰形类似于检测色谱图，但是标准品没有

完全分离，微调流动相和其他色谱变量可能达到最佳分离或改进分离度。当标准品的所有组分被完全分离时，就可以进行样品分析。

伯乐色谱柱利用最优化的参数为特殊应用而特制的，这些参数包括树脂的离子形式和色谱柱规格。下面的表格对比了不同的树脂基分析色谱柱并给出操作说明。表 1 提供了色谱柱规格和通常的操作参数。表 2 提供了用于树脂修饰的数据，还有清洗、再生和保存的信息。

表 1. Aminex 色谱柱的规格和操作参数

|            | <b>Aminex HPX-87C</b><br><b>300×7.8mm</b> | <b>Aminex HPX-87C</b><br><b>250×4.6mm</b> | <b>Aminex HPX-42C</b><br><b>300×7.8mm</b> |
|------------|---|---|---|
| 货号         | 125-0095                                  | 125-0094                                  | 125-0096                                  |
| 树脂离子形式     | 钙   | 钙   | 钙   |
| 载体         | 磺酸化聚苯乙烯二<br>烯苯                            | 磺酸化聚苯乙烯二<br>烯苯                            | 磺酸化聚苯乙烯二<br>烯苯                            |
| 粒径         | 9µm                                       | 9µm                                       | 25µm                                      |
| 最大压力       | 1500psi                                   | 1500psi                                   | 800psi                                    |
| 最大流速(最高温度) | 1.0mL/min                                 | 1.0mL/min                                 | 0.7mL/min                                 |
| 最高温度       | 85℃                                       | 65℃                                       | 85℃                                       |
| 常用流动相      | 水   | 0.005M 硫酸溶液                               | 水   |
| pH 范围      | 5-9                                       | 5-9                                       | 5-9                                       |
| 保护柱芯       | 125-0128                                  | 125-0128                                  | 125-0128                                  |

|            | <b>发酵监测柱</b><br><b>150×7.8mm</b> | <b>Aminex HPX-87H</b><br><b>300×7.8mm</b> | <b>快速酸分析柱</b><br><b>100×7.8mm</b> |
|------------|----------------------------------|---|-----------------------------------|
| 货号         | 125-0115                         | 125-0140                                  | 125-0100                          |
| 树脂离子形式     | 氢                                | 氢   | 氢                                 |
| 载体         | 磺酸化聚苯乙烯二<br>烯苯                   | 磺酸化聚苯乙烯二<br>烯苯                            | 磺酸化聚苯乙烯二<br>烯苯                    |
| 粒径         | 9µm                              | 9µm                                       | 9µm                               |
| 最大压力       | 1500psi                          | 1500psi                                   | 1500psi                           |
| 最大流速(最高温度) | 1.0mL/min                        | 0.6 mL/min                                | 1.0mL/min                         |
| 最高温度       | 65℃                              | 65℃                                       | 65℃                               |
| 常用流动相      | 水                                | 0.005M 硫酸溶液                               | 0.005M 硫酸溶液                       |
| pH 范围      | 1-3                              | 1-3                                       | 1-3                               |
| 保护柱芯       | 125-0129                         | 125-0129                                  | 125-0129                          |

|            | <b>快速糖分析柱<br/>100×7.8mm</b> | <b>Aminex HPX-87P<br/>300×7.8mm</b> | <b>Aminex HPX-87K<br/>300×7.8mm</b> |
|------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 货号         | 125-0105                    | 125-0098                            | 125-0142                            |
| 树脂离子形式     | 铅                           | 铅                                   | 钾                                   |
| 载体         | 磺酸化聚苯乙烯二乙<br>烯苯             | 磺酸化聚苯乙烯二乙<br>烯苯                     | 磺酸化聚苯乙烯二乙<br>烯苯                     |
| 粒径         | 9µm                         | 9µm                                 | 9µm                                 |
| 最大压力       | 1500psi                     | 1500psi                             | 1500psi                             |
| 最大流速(最高温度) | 1.0mL/min                   | 1.0mL/min                           | 1.0mL/min                           |
| 最高温度       | 85℃                         | 85℃                                 | 65℃                                 |
| 常用流动相      | 水                           | 水                                   | 水                                   |
| pH 范围      | 5-9                         | 5-9                                 | 5-9                                 |
| 保护柱芯       | 125-0119                    | 125-0119                            | 125-0507                            |

|            | <b>Aminex HPX-87N<br/>300×7.8mm</b> | <b>Aminex HPX-42A<br/>300×7.8mm</b> |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 货号         | 125-0143                            | 125-0097                            |
| 树脂离子形式     | 钠                                   | 银                                   |
| 载体         | 磺酸化聚苯乙烯二乙<br>烯苯                     | 磺酸化聚苯乙烯二乙<br>烯苯                     |
| 粒径         | 9µm                                 | 25µm                                |
| 最大压力       | 1500psi                             | 800psi                              |
| 最大流速(最高温度) | 1.0mL/min                           | 0.7mL/min                           |
| 最高温度       | 85℃                                 | 85℃                                 |
| 常用流动相      | 水                                   | 水                                   |
| pH 范围      | 5-9                                 | 6-8                                 |
| 保护柱芯       | 125-0508                            | 125-0118                            |

表 2. 清洗, 再生, 保存说明

|                 | <b>Aminex HPX-87C<br/>300×7.8mm</b>                 | <b>Aminex HPX-42C<br/>300×7.8mm</b>                           | <b>Aminex HPX-87C<br/>250×4.6mm</b>                           |
|-----------------|---|---|---|
| <b>有机浓度(最大)</b> | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%                               | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%   | 乙腈 40%<br>乙醇, 异丙醇, 5%   |
| <b>无机物</b>      | 硫酸钙或硝酸钙   | 钙盐  | 硫酸钙或硝酸钙   |
| <b>禁止添加</b>     | 甲醇, 酸, 碱, 其他<br>盐                                   | 甲醇, 酸, 碱, 其他<br>盐   | 甲醇, 酸, 碱  |
| <b>清洗溶液</b>     | 30%乙腈溶液   | 30%乙腈溶液   | 30%乙腈溶液   |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   |
| <b>温度</b>       | 25℃   | 25℃   | 25℃   |
| <b>持续时间</b>     | 4 小时  | 4 小时  | 4 小时  |
| <b>再生溶液</b>     | 0.1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>             | 0.1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                       | 0.1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                       |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   |
| <b>温度</b>       | 85℃   | 85℃   | 85℃   |
| <b>持续时间</b>     | 4-16 小时   | 4-16 小时   | 4-16 小时   |
| <b>保存液体</b>     | 水   | 水   | 水   |
|                 | <b>Aminex HPX-87K<br/>300×7.8mm</b>                 | <b>Aminex HPX-87P<br/>300×7.8mm</b>                           | <b>快速糖分析柱<br/>100×7.8mm</b>                                   |
| <b>有机浓度(最大)</b> | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%                               | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%   | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%   |
| <b>无机物</b>      | 硫酸钾   | 硝酸铅   | 硝酸铅   |
| <b>禁止添加</b>     | 甲醇, 酸, 碱  | 甲醇, 酸, 其他盐,<br>导致铅不溶的阴离子                                      | 甲醇, 酸, 碱, 其他<br>盐   |
| <b>清洗溶液</b>     | 30%乙腈溶于 0.01M<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 溶液 | 30%乙腈溶液   | 30%乙腈溶液   |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   |
| <b>温度</b>       | 25℃   | 25℃   | 25℃   |
| <b>持续时间</b>     | 4 小时  | 4 小时  | 4 小时  |
| <b>再生溶液</b>     | 0.020M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 30%乙腈溶液; 0.1 M<br>Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , pH 4.0* | 30%乙腈溶液; 0.1 M<br>Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , pH 4.0* |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   | 0.2mL/min   |
| <b>温度</b>       | 85℃   | 60℃   | 60℃   |
| <b>持续时间</b>     | 4-16 小时   | 16 小时   | 16 小时   |
| <b>保存液体</b>     | 0.01M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               | 水   | 水   |

|                 | <b>Aminex HPX-87N<br/>300×7.8mm</b>                    | <b>Aminex HPX-42A<br/>300×7.8mm</b> |
|-----------------|--|-------------------------------------|
| <b>有机浓度(最大)</b> | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%                                  | 乙腈 30%<br>乙醇, 异丙醇, 5%               |
| <b>无机物</b>      | 硫酸钠  | 无                                   |
| <b>禁止添加</b>     | 甲醇, 酸, 碱   | 甲醇, 酸, 碱, 盐                         |
| <b>清洗溶液</b>     | 30% 乙腈 溶于 0.01M<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 溶液 | 30%乙腈溶液                             |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min  | 0.2mL/min                           |
| <b>温度</b>       | 25℃  | 25℃                                 |
| <b>持续时间</b>     | 4 小时   | 4 小时                                |
| <b>再生溶液</b>     | 0.020M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH9          | 无                                   |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min  | -                                   |
| <b>温度</b>       | 85℃  | -                                   |
| <b>持续时间</b>     | 4-16 小时  | -                                   |
| <b>保存液体</b>     | 0.01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 水                                   |

|                 | <b>快速酸分析柱<br/>100×7.8mm</b>                            | <b>发酵监测柱<br/>150×7.8mm</b>                             | <b>Aminex HPX-87H<br/>300×7.8mm</b>                    |
|-----------------|--|--|--|
| <b>有机浓度(最大)</b> | 乙腈 40%<br>乙醇, 异丙醇, 5%                                  | 乙腈 40%<br>乙醇, 异丙醇, 5%                                  | 乙腈 40%<br>乙醇, 异丙醇, 5%                                  |
| <b>无机物</b>      | 磷酸, 硝酸(<5%),<br>HCl                                    | 磷酸, 硝酸(5%)   | 磷酸, 硝酸(<5%),<br>HCl                                    |
| <b>禁止添加</b>     | 甲醇, 盐, 碱、金属<br>离子、胺类, 其他有<br>机溶剂, 水>pH3                | 甲醇, 盐, 碱、金属<br>离子、胺类, 其他有<br>机溶剂, 水>pH3                | 甲醇, 盐, 碱、金属<br>离子、胺类, 其他有<br>机溶剂, 水>pH3                |
| <b>清洗溶液</b>     | (1)5% 乙腈 溶于<br>0.005M 硫酸;(2)30%<br>乙腈溶于 0.005M 硫<br>酸; | (1)5% 乙腈 溶于<br>0.005M 硫酸;(2)30%<br>乙腈溶于 0.005M 硫<br>酸; | (1)5% 乙腈 溶于<br>0.005M 硫酸;(2)30%<br>乙腈溶于 0.005M 硫<br>酸; |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min  | 0.2mL/min  | 0.2mL/min  |
| <b>温度</b>       | 65℃  | 65℃  | 65℃  |
| <b>持续时间</b>     | (1)4 小时;(2)12 小<br>时;(3)直到基线稳定                         | (1)4 小时;(2)12 小<br>时;(3)直到基线稳定                         | (1)4 小时;(2)12 小<br>时;(3)直到基线稳定                         |
| <b>再生溶液</b>     | 0.025M 硫酸  | 0.025M 硫酸  | 0.025M 硫酸  |
| <b>流速</b>       | 0.2mL/min  | 0.2mL/min  | 0.2mL/min  |
| <b>温度</b>       | 65℃  | 65℃  | 65℃  |
| <b>持续时间</b>     | 4-16 小时  | 4-16 小时  | 4-16 小时  |
| <b>保存液体</b>     | 0.005M 硫酸  | 0.005M 硫酸  | 0.005M 硫酸  |

## 6 再生操作

### 6.1 疏松树脂床

离子交换树脂是有弹性的。温和地反冲色谱柱能够将已塌陷的柱床疏松，恢复至初始的结构，或使产生的气泡再溶解。如果柱床严重塌陷，色谱柱则不能恢复至初始的性能。

1. 泵停机，让色谱柱床松弛大约 15 分钟。
2. 反转流向，以 0.1mL/min 流速反冲至少 4 小时。如果有必要，运行过夜。
3. 恢复色谱柱至初始状态
4. 在规定的最大流速下检测色谱柱

### 6.2 清洗被污染的色谱柱

来自流动相、泵、进样器或样品中的大多数颗粒污染物都集中在色谱柱进口筛板处，通过短时间地反冲能够轻易洗出。这一操作对微生物污染有时也可以有效的清除。

1. 反转流向，用适当的清洗溶液在 0.1mL/min 的流速下反冲色谱柱至少 4 小时。
2. 再用适当的再生溶液继续反冲 4 小时。
3. 恢复色谱柱至初始状态



如有必要，更换末端接头。非常小的不溶性颗粒，以及样品和色谱柱离子相互作用产生的离子沉淀（例如碳酸钙），还有强吸附在柱床上化学物质可以通过进一步的清洗从出口过滤器上清除。应该按照 6.4 中的操作步骤，一次一个的拆开进口和出口的末端接头。将 6.4 中操作的第 4 步替换为在纯水中超声清洗末端接头。注意，这些操作是最后的手段，如果其他的所有尝试都无法修复色谱柱并且任何方法也不能使色谱柱复原时，才可进行这部操作。

为了防止在清洗和再生色谱柱时污染检测器的流通池，清洗时要断开色谱柱与检测器之间的管路。

### 6.3 恢复色谱柱至最初的离子形式

离子交换树脂会随着离子形式的改变发生收缩和膨胀。如果使用一种新制的带有错误的平衡离子的缓冲溶液，则色谱柱可能会转为一种新的型式，由此带来分离度和背压的问题。在大多数情况下，但不是所有情况，色谱柱可以通过以下操作恢复为初始离子形式。

1. 用适当的再生溶液以 0.1mL/min 的流速反冲色谱柱至少 4 小时。
2. 恢复色谱柱至初始状态

### 6.4 填装色谱柱

极少数情况下，在使用过程成中会发生柱床沉降现象。更频繁的严重的超压会导致不可逆的柱床塌陷。在色谱柱头出现的空间可以用另一

支旧色谱柱中的填料装满。为了确定色谱柱的问题是由于色谱柱进口处的气泡导致的，用无保留化合物（标准品）进样，观察色谱峰的拖尾。如果不能确定，请联系伯乐技术部。

1. 从 HPLC 系统上断开色谱柱。
2. 在 4°C 下保存色谱柱 3 小时，切勿冷冻。
3. 松开色谱柱进口接头的螺母，位于色谱柱的末端，与流向相反。
4. 用干净的刮铲，将同类型的树脂（旧色谱柱中）小心地填入所有能看到的空隙中。树脂应被填成一个高过末端 1mm 的浅锥形。
5. 更换末端接头，上紧螺母。
6. 恢复色谱柱至初始状态

## 6.5 检测器/连接件问题

许多分离度差的情况并不是由于色谱柱问题导致的，而是由系统中的某些硬件问题导致的。下面的列表可以有助于指出可能发生问题的部位，及其解决方法。

1. 进样器
  - 进样量 最大 100uL
  - 进样环 最大 500uL
2. 连接管
  - 接头没有变质
  - 管路末端切平
  - 管路插入接头底部
  - 管路直径 最大 0.013 英寸
  - 管路长度 最大 10 英寸

### 3. 检测器

清洁流动池

流动池入口管路最大 0.013 英寸

色谱柱连接至样品检测流通池，而不是空白流通池

温度稳定

## 7 高温色谱柱停机

在高温分离结束后，将流速降低至 0.2mL/min，关掉柱温箱。继续使溶液流过色谱柱，直到色谱柱恢复为室温。将高温色谱柱从系统上直接卸下会导致溶液遇冷收缩，从而色谱柱吸入空气。

如果必须要快速更换色谱柱，则高温色谱柱可以浸没于经过过滤的新制无离子蒸馏水中快速降温。记得要上紧末端接头，以防止树脂脱水。

## 8 色谱柱保存

在上紧色谱柱末端接头时，始终注意防止气体进入。长期保存时，色谱柱可以通过冷藏来防止脱水。但是，切勿冷冻色谱柱。如果色谱柱仅仅几天暂停使用，则色谱柱应该按照规定保存。

### 8.1 长期保存

1. 按照表 2 中给出的恰当的保存溶液来替换流动相。更换流动相的流速始终低于标准流速。
2. 保持色谱柱末端接头拧紧。使用色谱柱自带的螺母。这可使溶液蒸发降到最小并保持树脂完全含水。检测流通池也应该被清洗。
3. 当不使用时，将色谱柱保存在最初的外包装盒中。为了防止溶液蒸发和微生物滋生，树脂色谱柱要保存在 4°C（不可冷冻）。

### 8.2 短期保存

如果色谱柱要天天使用，流动相可以留在色谱柱中过液。保持较低的流速，以防止缓冲盐沉淀，并可以在次日快速平衡。如果流动相中有卤盐，则要用新制的无离子蒸馏水或先前提到的合适的溶液缓慢清洗，再保存。

## 9 故障排除

表 3 是故障排除指南，也涉及到再生操作，表中列出的 6.1-6.5 步骤。在第 6 章中详细说明了这些操作。按照表 1 和表 2 中给出的方法来使用色谱柱，有助于维持色谱柱的使用寿命。任何与说明不符的操作都会降低柱效和缩短色谱柱寿命。

表 3 故障排除指南

| 问题: 高背压         |                         |                        |      |
|-----------------|-------------------------|------------------------|------|
| 原因              | 现象                      | 解决方法                   | 再生操作 |
| 1.流速过快导致柱床塌陷    | 在流速高于推荐的最高流速下，压力瞬间灾难性增大 | 泵关机。松弛 15 分钟，在合适的流速下操作 | 6.1  |
| 2.化学污染          | 使用过程中压力逐渐增大             | 反转流向，反洗                | 6.2  |
| 3.气泡            | 保存后重新使用时发生              | -                      | 6.1  |
| 4.微生物污染         | 保存后重新使用时发生              | 反转流向，反洗                | 6.2  |
| 5.改变离子形式        | 在更换缓冲液后，压力快速升高          | -                      | 6.3  |
| 6.在错误的有机溶剂中发生降解 | 在更换溶剂后，压力瞬间灾难性增大        | -                      | 6.1  |

| <b>问题：分离度差</b>  |                       |                        |             |
|-----------------|-----------------------|------------------------|-------------|
| <b>原因</b>       | <b>现象</b>             | <b>解决方法</b>            | <b>再生操作</b> |
| 1.微粒污染          | 柱效逐渐降低或保留时间逐渐发生改变     | -                      | 6.2         |
| 2.改变离子形式        | 保留时间变化，有时伴随着柱效变差      | -                      | 6.3         |
| 3.高流速下柱床塌陷      | 保留时间不变，柱效极差，峰形变斜，基线突跃 | 泵关机。松弛 15 分钟，在合适的流速下操作 | 6.1, 6.4    |
| 4.柱床压缩          | 保留时间不变，柱效降低，斜峰拖尾，逐渐发生 | -                      | 6.1, 6.4    |
| 5.在错误的有机溶剂中发生降解 | 保留时间变化伴随着柱效变差         | -                      | 6.2         |
| 6.过度死体积         | 与检测色谱图不符              | 检测所有的仪器接头              | 6.5         |