

HPLC 色 谱 柱 选 择

色谱柱的选择

HPLC 方法开发时首先要：

- ◆ 了解方法的目的（分析？制备？）
- ◆ 了解样品性质（极性？酸碱性？）
- ◆ 选择合适的色谱柱

色谱柱的选择

- 色谱柱和流动相的选择是色谱技术的核心之一
- 色谱柱的选择是方法开发的一个重要环节
- 选择合适的色谱柱可以缩短方法开发所需要的时间、并且使开发的方法更稳定
- 在不合适的色谱柱上进行方法开发通常需要更长的时间、并且成功率较低

色谱柱的参数

色谱柱的参数远比一般认为的要多：

- 柱长， 内径， 例如250*4.6mm.
- 粒径， 3 μ m, 5 μ m, 10 μ m等
- 孔径， 60A, 80A, 100A, 120A等
- 比表面积， 180m²/g-350m²/g

柱的物理性质

- 基质：硅胶， 聚合物等
- 硅胶表面性质
- 载碳量， 10-20%
- 键合试剂， C18, C8, CN等
- 封端

柱的化学性质

样品性质决定柱的化学性质

- 样品结构
- 溶解性（有机溶剂、水）
- pH值
- 极性
- 酸碱性
- 分子量

分离目的决定柱的物理性质

- 分析？ 制备？
- 快速分析？
- 含量分析？ 杂质检验？
- 所有组分分离？

色谱柱的参数

柱长、内径

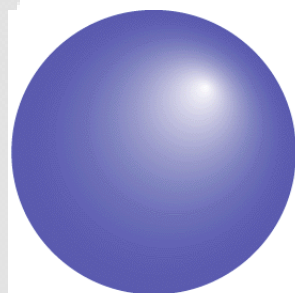
- 一般柱长**2.0-250mm**，柱越长，**分离度**越高，但**柱压**更高，分离所需**时间**更长
- 分离度与理论塔板数的平方根成正比，所以增加柱长并不是最有效的分离手段。一般情况下**15cm, 5um**的填料可以提供足够的塔板数
- 内径：**1-2mm LC-MS柱**，**4.6mm**分析柱，**10mm**以上的半制备和制备色谱柱
- **HPLC**仪器的柱外效应-不同的**仪器设备**配置有相应的最佳流速，因此适用于不同内径的色谱柱

色谱柱的参数

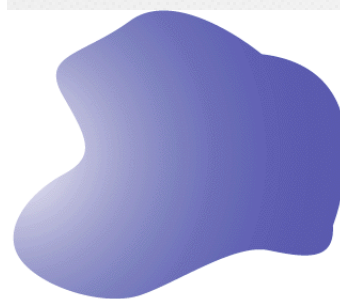
基质

硅胶：最通用的基质，强度大，化学修饰容易，但使用的pH值范围有限（一般为**2-8**，特殊修饰的可以使用到**1-12**）。下面的介绍也主要是基于硅胶基质的色谱柱技术

- 聚合物基质：化学稳定，应用 pH范围宽，但强度不够大，批重复
- 球型：**HPLC** 使用
- 无定型：中压色谱使用



Spherical



Irregular

色谱柱的参数

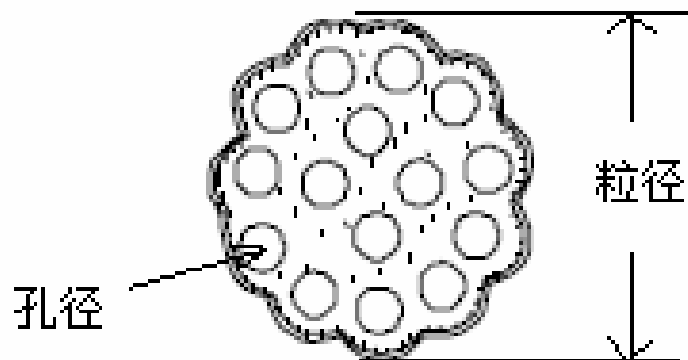
粒径

- 粒径越小，分离越快，柱效越高。但柱压力越高，柱容易被污染，寿命低
- **LC-MS**和常规分析柱通常使用**5 μm** 填料。**3 μm** 填料使用的困难程度大，一般非必要时不使用
- **UPLC** 为**1.7 μm** 填料
- **3cm**以下的制备色谱柱通常使用**5-10 μm** 填料
- 更大内径的制备色谱柱通常使用更大的粒径，如**10 μm** , 或 **20 μm**

色谱柱的参数

孔径

- 孔径小，含孔率高，则比表面积大，载碳量高
- 化合物在孔内分离
- 孔径大小必须和分子大小相匹配，分子必须能进入孔内，一般小分子使用**80-120A**，大分子通常使用**300A**。为了达到最佳分离，一般要求孔径直径是分子直径的**3**倍以上



比表面积

- 每克填料的表面积
- 与粒度、含孔率有关
- 比表面积大，会增加样品与键合相之间的反应，增加保留、分离度和制备时的上样量
- 比表面积小可以缩短分析时间和梯度时的平衡时间
- 并不是比表面积大或者小就更好，选择适合目的的比表面积

色谱柱的参数

载碳量

- 硅胶表面键合相的比例
- 与比表面积，键合覆盖度等有关
- 对**ODS**，载碳量从**7-18%**不等
- **ODS**的载碳量高， 则保留增加，适合分析非极性化合物。制备色谱的上样量也可以增加
- 载碳量通常影响选择性

色谱柱的参数

硅胶表面性质-纯度

- 高纯硅胶表面的重金属含量，一般为ppm级，液相系统的金属部件也会产生重金属
- 待测组分与重金属发生螯合反应会导致色谱峰形不佳，产生前伸或拖尾
- 能与金属形成5或6元环螯合物的待测组分特别容易受重金属影响
- 可以使用EDTA溶液或稀酸冲洗色谱柱消除重金属影响

色谱柱的参数

硅胶表面性质-硅醇基

- 硅醇基的酸性较大,可与碱性化合物牢固的结合,因此含有较多残留硅醇基的填料在分离碱性化合物时容易产生脱尾、变宽、保留延长
 - 加入适当的扫尾剂如三乙胺可以掩蔽残留的硅醇基,使碱性化合物峰形变好
 - 降低流动相pH值小于3,可以减小硅醇基的反应,从而减小拖尾现象

色谱柱的参数

键合相

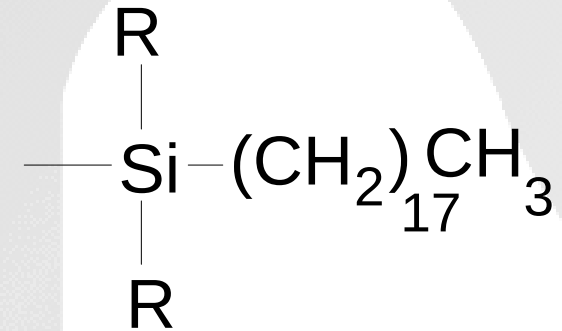
- 超过**80%**的样品可以使用反相色谱分离，一般方法开发也首先使用反相色谱
- **C18, C8, C4**等反相色谱，从**C18**到**C8, C4**，对化合物的保留降低
- **NH2, CN**等可用于正相，也可以用于反相
- 键合试剂不同，对化合物的选择性不同

方法开发时, 长链的烷基键合相(**C18,C8**)比短链的(**C4,C3**) 稳定; 非极性的键合相比极性的键合相(**-NH2**)稳定

色谱柱的参数

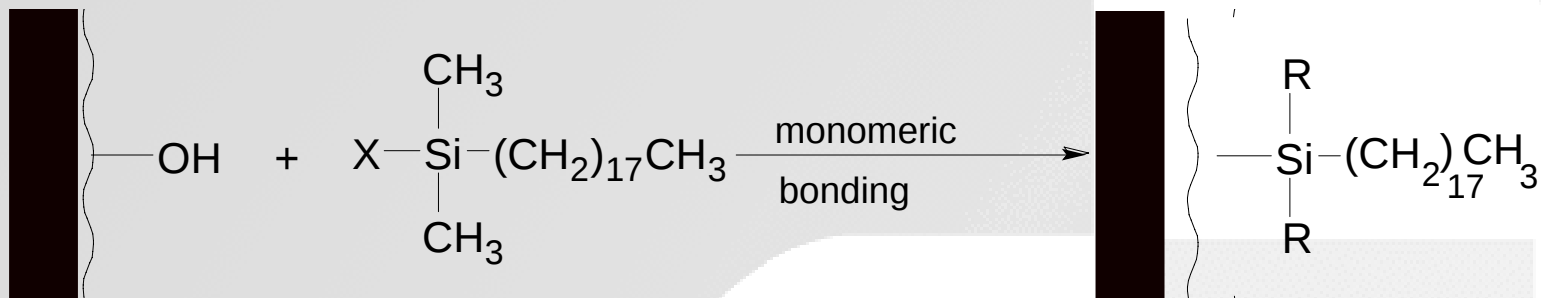
最常用的ODS色谱柱

- ◆ **R**为非极性基团，为通用型色谱柱
- ◆ 如果**R**为强极性基团，为通常说的**AQ**”水性”柱，可以走纯水，用于强极性化合物

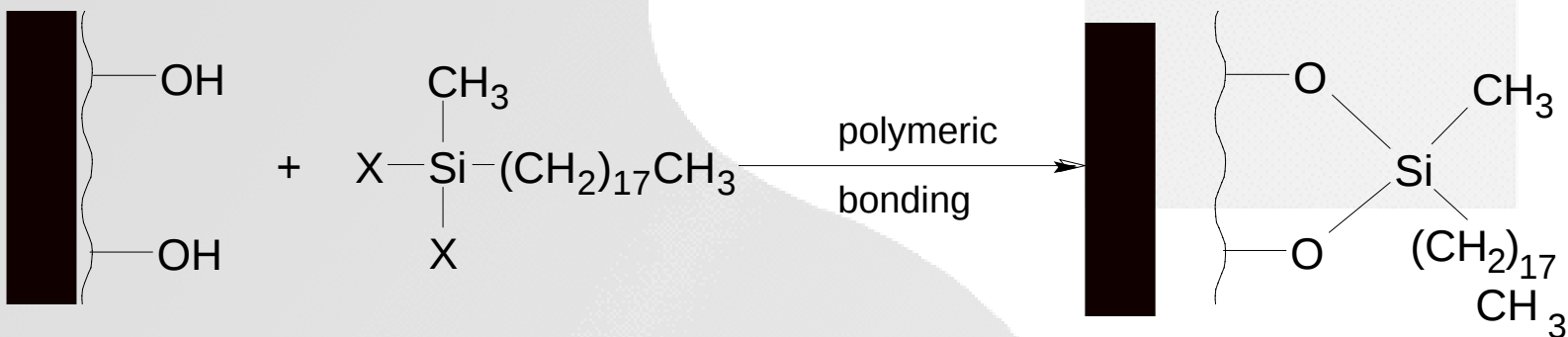


色谱柱的参数

键合方式



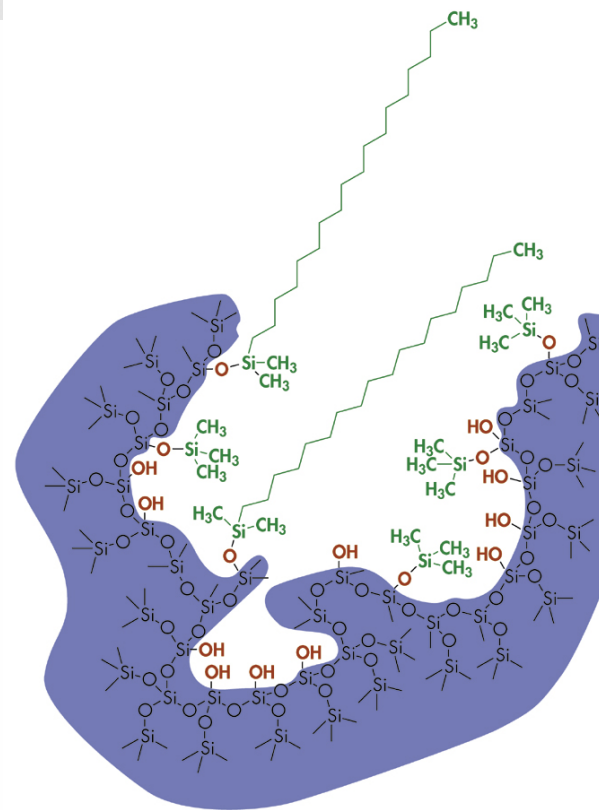
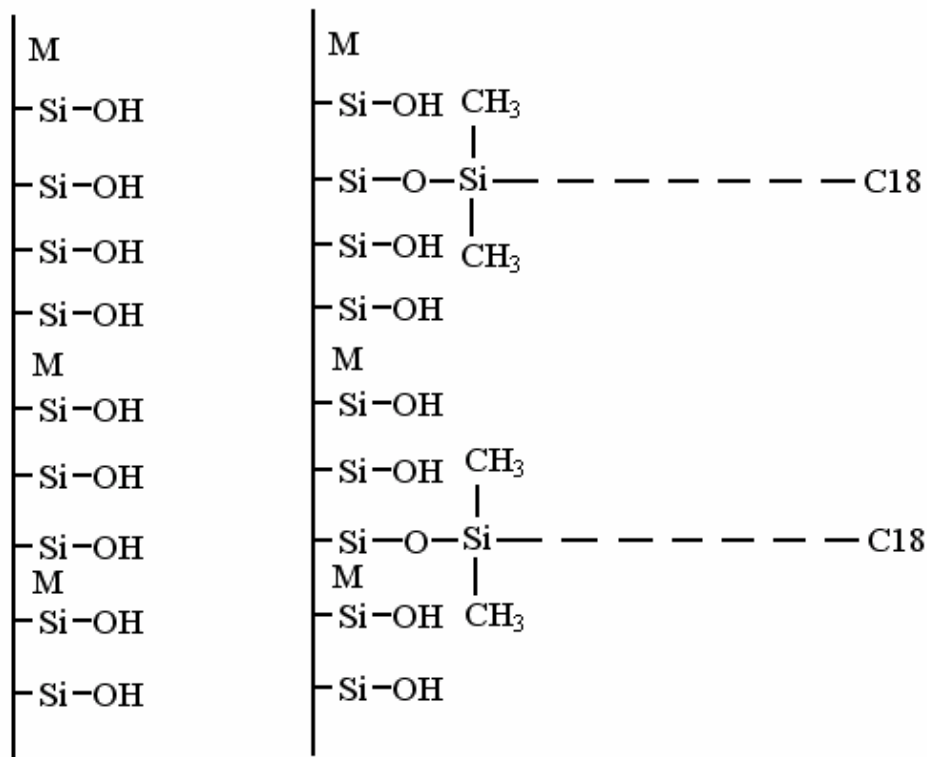
柱效高，平衡快



稳定性好， 制备上样量大

色谱柱的参数

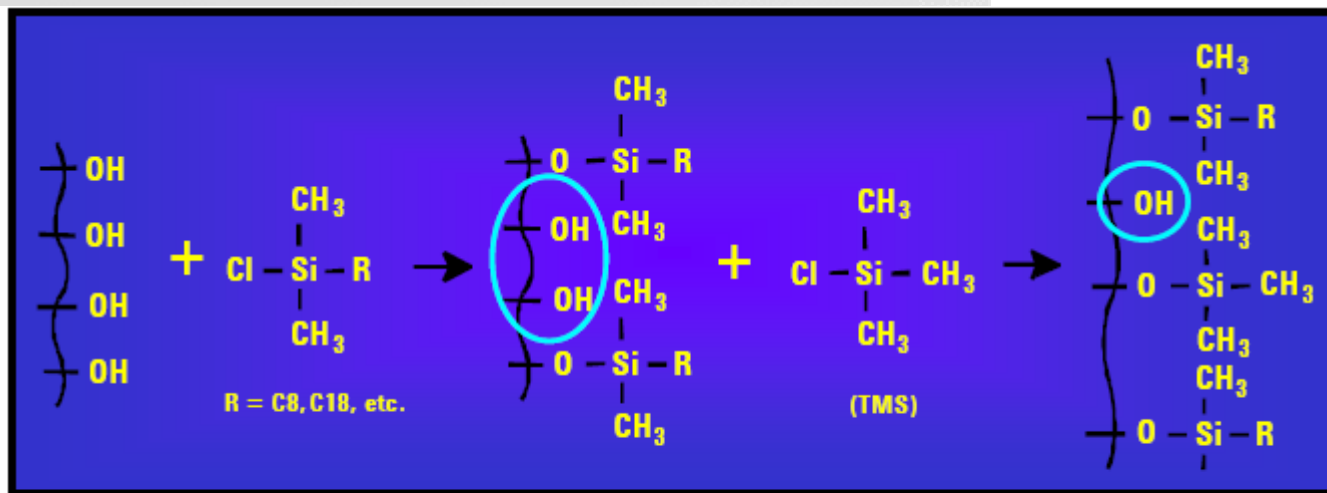
ODS柱的特征结构



色谱柱的参数

封端

目的： 减小残留硅醇基



固定相键合
二甲基硅烷

封端
四甲基硅烷

色谱柱的参数

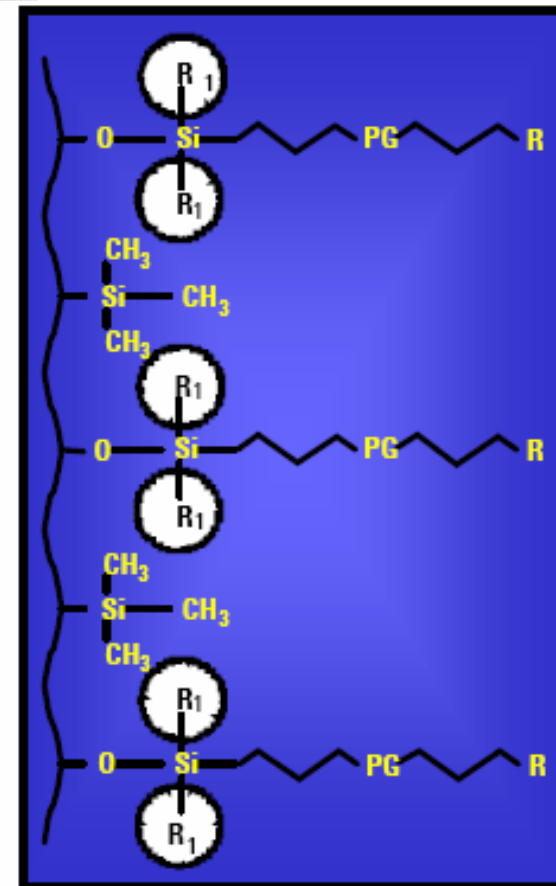
封端

- 未封端的**Si-OH** 基团是碱性化合物拖尾的主要原因
- 酸性条件下，氢离子通过未封端的**Si-OH** 的间隙进攻**-O-Si**键，导致填料水解
- 封端的基团会影响色谱柱的使用**pH**值、对化合物的选择性等

色谱柱的参数

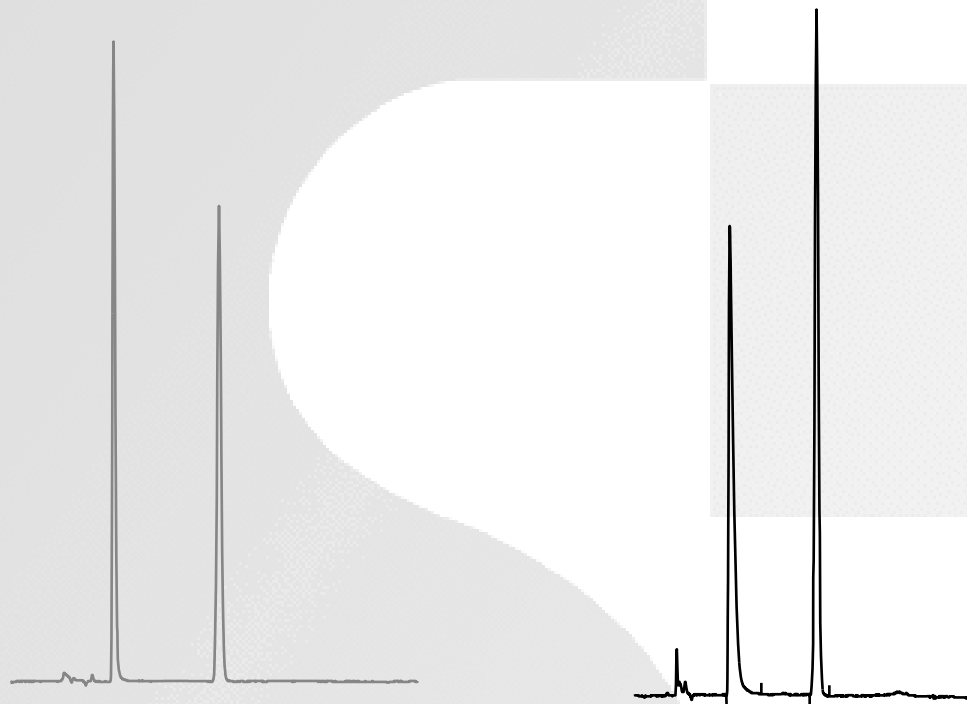
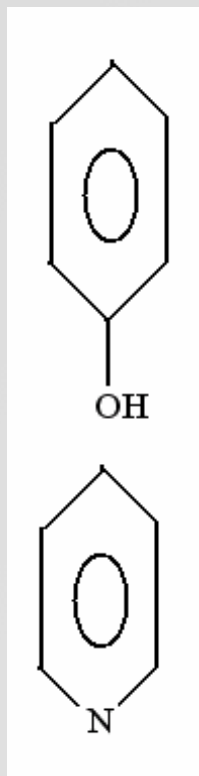
封端技术

- 使用小分子硅烷保护残留Si-OH
- 通过R1基团空间位阻保护残留Si-OH
如使用异丙基代替甲基
- 通过键合相之间的连接保护残留Si-OH
- 多次封端



色谱柱的参数

封端的效果：



色谱柱的参数

封端-高封端的ODS色谱柱

- pH使用范围宽
- 极性基团封端的色谱柱可以在高水相流动相条件下使用，适合分离极性化合物
- 残留的硅醇基影响最小，碱性化合物不拖尾
- 改善选择性
- 一般优先使用高封端的色谱柱

色谱柱的参数

封端-低封端或不封端的ODS色谱柱

- 可用于**100%**的水相（**C18**链疏水，在纯水相中会倒塌导致保留降低，因此**AQ**色谱柱中都有极性的亲水集团或低封端）
- 因为硅醇基的影响，对极性相同的化合物有特殊选择性

如何选择合适的色谱柱

- 选用高纯硅胶基质的色谱柱
- 对碱性化合物，选择高封端的色谱柱
- 高pH值使用时，需要使用特殊封端的色谱柱,以保证柱寿命，改善峰形
- 大分子量的化合物，需要大孔径的色谱柱
- 尽量使用低pH值，以减少硅醇基的作用
- 不同品牌的色谱柱往往有不同的选择性

如何选择合适的色谱柱

- 详细阅读色谱柱的说明，了解各种色谱柱的参数和性质
- 了解化合物性质：极性，酸碱性，杂质的性质等
- 强极性化合物使用AQ色谱柱
- 高比表面积和载碳量可以提高制备色谱的上样量