

液相色谱的柱子通常正相柱和反相柱。正相柱以硅胶为柱，或是在硅胶表面键合-CN,-NH₃等官能团的键合相硅胶柱；反相柱填料主要以硅胶为基质，在其表面键合非极性的十八烷基官能团（ODS）称为 C18 柱，其它常用的反相柱还有 C8,C4,C2 和苯基柱等。另外还有离子交换柱，GPC 柱，聚合物填料柱等。本文重点介绍反相色谱柱的选择和使用：

一、反相色谱柱的选择

1. 柱子的 PH 值使用范围

反相柱优点是固定相稳定，应用广泛，可使用多种溶剂。但硅胶为基质的填料，使用时一定要注意流动相的 PH 范围。一般的 C18 柱 PH 值范围都在 2-8，流动相的 PH 值小于 2 时，会导致键合相的水解；当 PH 值大于 7 时硅胶易溶解；经常使用缓冲液固定相要降解。一旦发生上述情况，色谱柱入口处会塌陷。同样填料各种不同牌号的色谱柱不尽相同。如果流动相 PH 较高或经常使用缓冲液时，建议选择 PH 范围大的柱子，例如戴安公司的 Acclaim 柱 PH 2-9 或 Zorbax 的 PH 2-11.5 的柱子。

2. 填料的端基封尾（或称封口）

把填料的残余硅羟基采用封口技术进行端基封尾，可改善对极性化合物的吸附或拖尾；含碳量增高了，有利于不易保留化合物的分离；填料稳定性好了，组分的保留时间重现性就好。如果待分析的样品属酸性或碱性的化合物，最好选用填料经端基封尾的色谱柱。

3. 戴安公司 Acclaim 柱子介绍—极性封尾 C16 固定相柱

戴安公司有 28 种类型的柱子，Acclaim 反相柱填料高纯，金属含量极低，完全封尾。PH 2-9 范围内兼容，低流失，高柱效。尤其是 2003 年推出的 Acclaim 极性封尾 C16 柱，是最先商品化的磺酰氨-O 链接键的色谱柱，具极低的硅羟基活性，能在极性溶剂甚至 100%水的条件下长期使用。对酸性和碱性化合物有极为尖锐的好的色谱峰形，与现有的一流色谱柱相比有好的立体选择性。（下图是 Acclaim 极性封尾 C16 柱和市售极性封尾一流色谱柱分离酸性化合物谱图的比较）

二、液相色谱柱的使用

色谱柱在使用前，最好进行柱的性能测试，并将结果保存起来，作为今后评价柱性能变化的参考。在做柱性能测试时要按照色谱柱出厂报告中的条件进行(出厂测试所使用的条件是最佳条件)，只有样，测得的结果才有可比性。

但要注意：柱性能可能由于所使用的样品、流动相、柱温等条件的差异而有所不同。

1、样品的前处理

a、最好使用流动相溶解样品。

b、使用预处理柱除去样品中的强极性或柱填料产生不可逆吸附的杂质。

c、使用 0.45 μ m 的过滤膜过滤除去微粒杂质。

2、流动相的配制

液相色谱是样品组分在柱填料与流动相之间质量交换而达到分离的目的,因此要求流动相具备以下的特点:

a、流动相对样品具有一定的溶解能力,保证样品组分不会沉淀在柱中(或长时间保留在柱中)。

b、流动相与样品不产生化学反应

c、流动相的黏度要尽量小,以便得到好的分离效果;降低柱压降,延长泵的使用寿命(可运用提高温度的方法降低流动相的黏度)。

d、流动相的物化性质要与使用的检测器相适应。如使用 UV 检测器,最好使用对紫外吸收较低的溶剂配制。

e、流动相沸点不要太低,否则容易产生气泡,导致实验无法进行。

f、在流动相配制好后,一定要进行脱气。除去溶解在流动相中的微量气体既有利于检测,还可以防止流动相中的微量氧与样品发生作用。

3、流动相流速的选择

因柱效是柱中流动相线性流速的函数,使用不同的流速可得到不同的柱效。对于一根特定的色谱柱,要追求最佳柱效,最好使用最佳流速。对内径为 4.6mm 的色谱柱,流速一般选择 1ml / min,对于内径为 4.0mm 柱,流速 0.8ml / min 为佳。

当选用最佳流速时,分析时间可能延长。可采用改变流动相的洗涤强度的方法以缩短分析时间(如使用反相柱时,可适当增加甲醇或乙腈的含量)。

注意:

a. 含水流动相最好在实验前配制,尤其是夏天使用缓冲溶液作为流动相不要过夜。最好加入叠氮化钠,防止细菌生长。

b. 流动相要求使用 0.45 μ m 滤膜过滤,除去微粒杂质。

c. 使用 HPLC 级溶剂配制流动相,使用合适的流动相可延长色谱柱的使用寿命,提高柱性能。

三. 色谱柱的维护

1. 色谱柱的平衡

反相色谱柱由工厂测试后是保存在乙腈/水中的。新柱应先使用 10—20 倍柱体积的甲醇或乙腈冲洗色谱柱。请一定确保您分析样品所使用的流动相和乙腈/水互溶。每天用足够的时间以流动相来平衡色谱柱，您就会在处理问题方面获得最大的"补偿"，而且您的色谱柱的寿命也会变得更长！操作步骤：

a. 平衡开始时将流速缓慢地提高，用流动相平衡色谱柱直到获得稳定的基线（缓冲盐或离子对试剂流速如果较低，则需要较长的时间来平衡）

b. 如果使用的流动相中含有缓冲盐，应注意用纯水"过渡"即每天分析开始前必须先用纯水冲洗 30 分钟以上再用缓冲盐流动相平衡；分析结束后必须先用纯水冲洗 30 分钟以上除去缓冲盐之后再用甲醇冲洗 30 分钟保护柱子。

2. 色谱柱的再生

长期使用的色谱柱，往往柱效会下降（柱子的理论塔板数减低）。可以对色谱柱进行再生，在有条件的实验室应使用一廉价的泵进行柱子的再生。

建议用来冲洗柱子的溶剂体积

色谱柱尺寸	柱体积	所用溶剂的体积
125-4mm	1.6ml	30ml
250-4 mm	3.2ml	60ml
250-10mm	20ml	400ml

选择再生方法：

极性固定相（如 Si, NH₂* , DIOL 基色谱填料）的再生：

正庚烷→氯仿→乙酸乙酯→丙酮→乙醇→水**

非极性固定相（如反相色谱填料 RP-18, RP-8, CN 等）的再生：水→乙腈→氯仿（或异丙醇）→乙腈→水

注意：

a. 在对 NH₂ 改性的色谱柱进行再生时，由于 NH₂ 可能以铵根离子的形式存在，因此应该在水洗后用 0.1M 的氨水冲洗，然后再用水冲洗至碱溶液完全流出。

b. 0.05M 稀硫酸可以用来清洗已污染的色谱柱，如果简单的用有机溶剂/水的处理不能够完全洗去硅胶表面吸附的杂质，在水洗后加用 0.05M 稀硫酸冲洗非常有效。

3. 色谱柱的维护

- a. 使用预柱保护分析柱（硅胶在极性流动相/离子性流动相中有一定的溶解度）
- b. 大多数反相色谱柱的 pH 稳定范围是 2—7.5，尽量不要超过该色谱柱的 pH 范围
- c. 避免流动相组成及极性的剧烈变化
- d. 流动相使用前必须经脱气和过滤处理
- e. 如果使用极性或离子性的缓冲溶液作流动相，应在实验完毕柱子冲洗干净，并保存于甲醇或乙腈中
- f. 氯化物的溶剂对其有一定的腐蚀性，故使用时要注意，柱及连接管内不能长时间存留此类溶剂，以避免腐蚀。

在化学键合相色谱法中，溶剂的洗脱能力直接与它的极性相关。在正相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而增加；在反相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而减小。反相色谱的流动相通常采用烷烃加适量极性调整剂。

反相色谱的流动相通常以水作基础溶剂，再加入一定量的能与水互溶的极性调整剂，如甲醇、乙腈、四氢呋喃等。极性调整剂的性质及其所占比例对溶质的保留值和分离选择性有显著影响。一般情况下，甲醇-水系统已能满足多数样品的分离要求，且流动相粘度小、价格低，是反相色谱最常用的流动相。但 Snyder 则推荐采用乙腈-水系统做初始实验，因为与甲醇相比，乙腈的溶剂强度较高且粘度较小，并可满足在紫外 185~205nm 处检测的要求，因此，综合来看，乙腈-水系统要优于甲醇-水系统。

在分离含极性差别较大的多组分样品时，为了使各组分均有合适的 k 值并分离良好，也需采用梯度洗脱技术。

反相色谱中，如果要在相同的时间内分离同一组样品，甲醇/水作为冲洗剂时其冲洗强度配比与乙腈/水或四氢呋喃/水的冲洗强度配比有如下关系：

$$C_{\text{乙腈}} = 0.32 C_{\text{2 甲醇}} + 0.57 C_{\text{甲醇}}$$

$$C_{\text{四氢呋喃}} = 0.66 C_{\text{甲醇}}$$

C 为不同有机溶剂与水混合的体积百分含量。

100% 甲醇的冲洗强度相当于 89% 的乙腈/水或 66% 的四氢呋喃/水的冲洗强度。