



高效液相色谱柱的选择

一、硅胶基质填料

1、正相色谱

正相色谱用的固定相通常为硅胶 (Silica) 以及其他具有极性官能团, 如胺基团 (NH₂, APS) 和氰基团 (CN, CPS) 的键合相填料。

由于硅胶表面的硅羟基 (SiOH) 或其他极性基团极性较强, 因此, 分离的次序是依据样品中各组分的极性大小, 即极性较弱的组份最先被冲洗出色谱柱。正相色谱使用的流动相极性相对比固定相低, 如正己烷 (Hexane), 氯仿 (Chloroform), 二氯甲烷 (Methylene Chloride) 等。

2、反向色谱

反向色谱用的填料常是以硅胶为基质, 表面键合有极性相对较弱官能团的键合相。反向色谱所使用的流动相极性较强, 通常为水、缓冲液与甲醇、乙腈等的混合物。样品流出色谱柱的顺序是极性较强的组分最先被冲洗出, 而极性弱的组分会在色谱柱上有更强的保留。

常用的反向填料有: C18 (ODS)、C8 (MOS)、C4 (Butyl)、C6H5 (Phenyl) 等。

二、聚合物填料

聚合物填料多为聚苯乙烯—二乙烯基苯或聚甲基丙烯酸酯等, 其重要优点是在PH值为1—14均可使用。相对于硅胶基质的C18填料, 这类填料具有更强的疏水性; 大孔的聚合物对蛋白质等样品的分离非常有效。现有的聚合物填料的缺点是相对硅胶基质填料, 色谱柱柱效较低。

三、其它无机填料

其它HPLC的无机填料色谱柱也已经商品化由于其特殊的性质, 一般仅限于特殊的用途。如, 石墨化碳黑正逐渐成为反向色谱柱填料。这种填料的分离不同于硅胶基质键合相, 石墨化碳的表面即是保留的基础, 不再需其它的表面改性。该柱填料一般比烷基键合相硅胶或多孔聚合物填料的保留能力更强。石墨化碳可用于分离某些几何异构体, 由于在HPLC流动相中不会被溶解, 这类柱可在任何PH与温度下使用。氧化铝也可以用于HPLC。氧化铝微粒刚性较强, 可制成稳定的色谱柱柱床, 其优点是在PH高达12的流动相中使用。但由于氧化铝与碱性化合物的作用也很强, 应用范围受到一定限制, 所以未能广泛应用。新型色谱氧化铝基质填料也可用于HPLC。商品化的只有聚合物涂层的多孔氧化铝微球色谱柱, 应用PH1-14, 温度可达100℃。由于氧化铝填料是最近几年才开始研究, 加之面临的实验难度, 其重要用途与优势尚在进行之中。

四、造成色谱峰 (不对称) 拖尾的原因

1. 色谱柱本身填装问题, 筛板堵塞或填料塌陷;
2. 柱头有污染;
3. 样品超载;
4. 样品溶剂不合适;
5. 柱外效应;
6. 化学或二次保留 (硅羟基) 效应;
7. 缓冲容量不足或不合适;
8. 重金属污染。

五、如何解决峰形拖尾的问题

A. 与化学有关的拖尾问题

1. 流动相中, 加入30mM的三乙胺 (用于碱性化合物) 或醋酸胺 (用于酸性化合物), 未知化合物加醋酸三乙胺;

2. 如仍然拖尾, 将三乙胺换为二甲基辛胺 (或醋酸二甲基辛胺);
3. 降低进样量至<1 μg。

B. 与色谱柱有关的拖尾问题

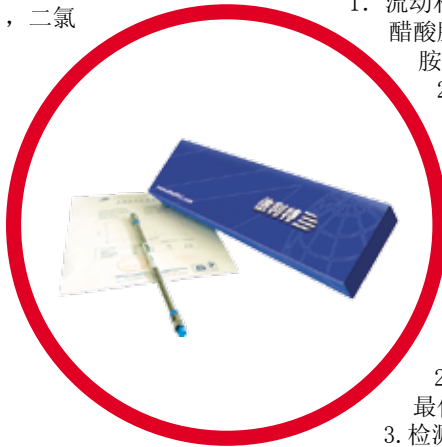
1. 如柱头处有强保留的样品组分积聚, 反相柱可用20倍柱体积的96%的二氯甲烷与4%甲醇, 加1%氢氧化铵混合液冲洗; 正向柱可用甲醇冲洗;
2. 使用保护柱。

C. 与HPLC系统有关的峰拖尾和峰加宽

1. 进样体积过大, (通常≤25 μL);
2. 进样阀与色谱柱及检测器之间的管路体积过大 (最佳连接管应<20cm, 内径为0.007");
3. 检测器流通池的体积过大。

六、如何贮存色谱柱

1. 防止缓冲溶液和水溶液流动相产生微生物, 做到流动相用多少配多少, 或在水流动相中加200ppm的叠氮钠以抑制细菌生长 (一定当心其毒性和潜在的爆炸性); 或在流动相中加20%的有机改性剂, 也可抑制微生物生长, 有机改性剂还有助于流动相脱气。
2. 尽可能将色谱柱贮存于100%有机溶剂 (乙腈最好) 中, 避免在缓冲溶液中保存。
3. 使用缓冲溶液后的色谱柱, 应用15~20倍柱体积的不含缓冲剂的同种水-有机溶剂流动相冲洗色谱柱, 后换成100%有机溶剂贮存。
4. 避免用纯水冲洗键合致密的C18柱。
5. 将色谱柱的两端用堵头拧好, 以免柱床填料干裂。



七、保留值与分离度重现性不好原因分析

问题	原因	表现
不同色谱柱间差异 使用期间柱变化	填料、键合相不同 柱床破坏 键合相丢失 硅胶基质溶解 强保留组分堆积堵塞	保留因子(k), 分离因子(a) 柱效(N) 保留因子(k), 分离因子(a) 柱效(N) 保留因子(k), 柱效(N)
柱外效应	系统差异、进样量大、进样阀与色谱柱之间、色谱柱与检测器之间的管路太长、检测器流通池体积大、接头死体积大等。	柱效(N)
分离效果变差	流动相组分改变 流速改变 温度改变	保留因子(k), 柱效变化很小 保留因子(k), 分离因子(a) 保留因子(k), 柱效变化很小
柱平衡慢	重新平衡时间不够	保留因子(k), 柱效变化很小
柱超载	样品量太大	保留因子(k), 柱效(N)