

HPLC仪色谱柱与使用注意事项

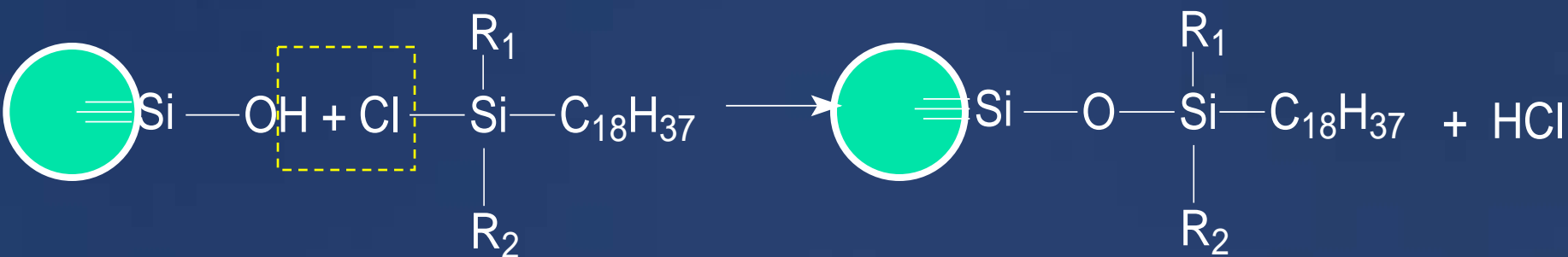
姚彤炜 主讲

- HPLC色谱柱有柱管和固定相组成，柱管用不锈钢制成，常用色谱柱长10~30cm，内径2~6mm，以4.6mm的内径最常用。
- 孔径在15nm以下的填料适合于分析分子量小于2000的化合物，分子量大于2000的化合物则应选择孔径在30nm以上的填料。
- 根据键合基团极性不同，化学键合相可分为非极性、中等极性和极性三类。
- 常用色谱柱有：ODS柱、氰基柱、氨基柱等。



■ 非极性键合相

- 表面基团为非极性烃基，如C₁₈、C₈等，主要用于RP色谱。C₁₈是最常用的非极性键合相，将**十八烷基氯硅烷**与**硅胶**表面的硅醇基经多步反应而成。



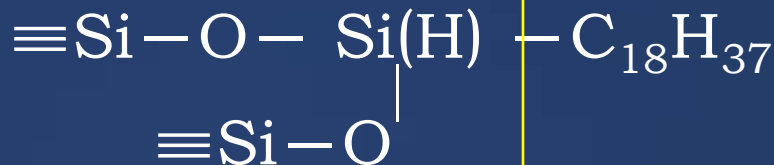
1 (2, 3) : 1

R₁, R₂ = H, Cl, CH₃

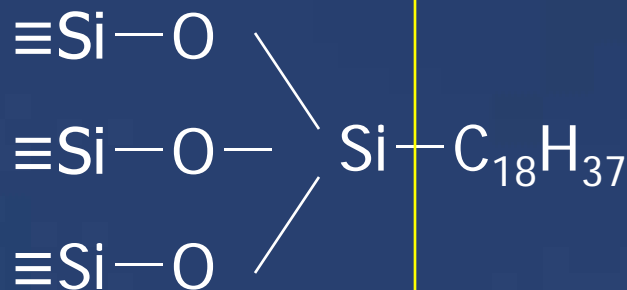
- 根据 R_1 、 R_2 基团，含碳量可分为高碳、中碳、低碳型键合相：

- 高碳 $R_1=R_2 = \text{CH}_3$ 载样量大，吸附性能大；

- 中碳 $R_1 = \text{H}$,
- $R_2 = \text{Cl}$



- 低碳 $R_1=R_2 = \text{Cl}$



- 商品键合相**含碳量**一般为2%~29%。含碳量不同与表面覆盖度，固定相的极性，载样量有关。
- **表面覆盖度**—参加反应的硅醇基数目占硅胶表面硅醇基总数的比例。
- **封尾（封端）**—即用化学反应将键合相的载体硅胶的残存硅醇基去掉的方法。封尾后的ODS吸附性能降低，稳定性增加，这种键合相只具分配作用，具有强疏水性。



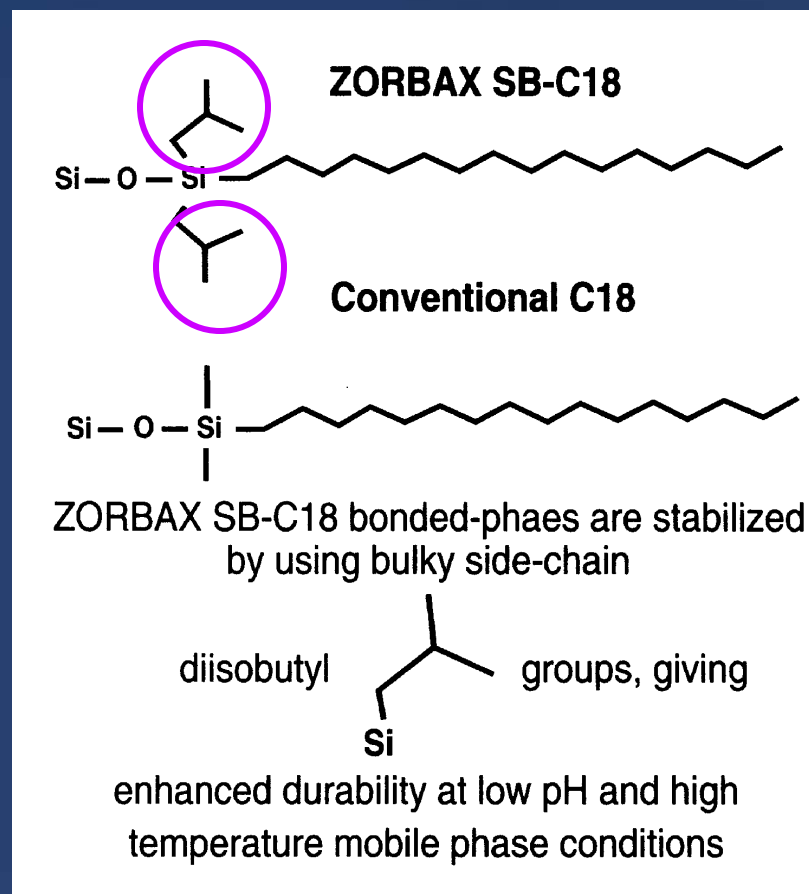
- **中等极性键合相**——常见的有醚基键合相，这类键合相根据流动相的极性，可作为正相或反相色谱的固定相，应用较少。
- **极性键合相**——可作正相或反相色谱使用
 - **氨基键合相：**
硅胶-氨丙硅烷基[$-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$]
 - **氰基键合相：**
硅胶-氰乙硅烷基[$-\text{Si}-(\text{CH}_2)_2\text{CN}$]

键合相色谱pH控制在2-8

新型固定相

ZORBAX SB-C18键合相

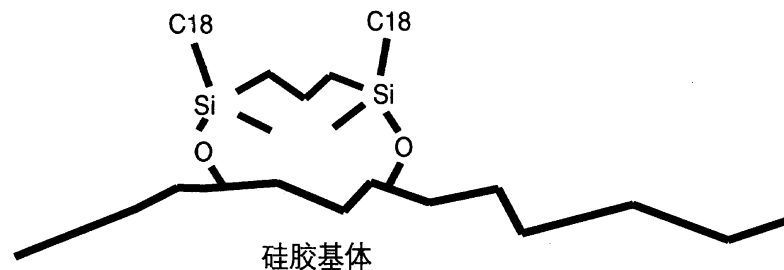
使用独特的键合方式，用特殊的**二异丁基硅烷**对硅氧烷键进行保护，防止了极端pH和高温条件下键合相的水解，这些大侧链阻止了键合相的流失，提高了重现性，延长了柱寿命。



注意： pH范围0.8-8.0，最高操作温度90°C，

缓冲液浓度0.01-0.02M，避免使用磷酸盐与碳酸盐

- ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱——采用C₁₈二齿结构并用特有的步骤进行双基封端。
- 在pH高达11.5的条件下，用于分离碱性、酸性、中性化合物，峰形优良，柱寿命长。
- **注意：** pH范围2-11.5。使用有机缓冲液，浓度以10-50mM为好。在中高pH下避免使用磷酸盐，碳酸盐缓冲液，最高操作温度60°C，最佳温度 < 40°C。

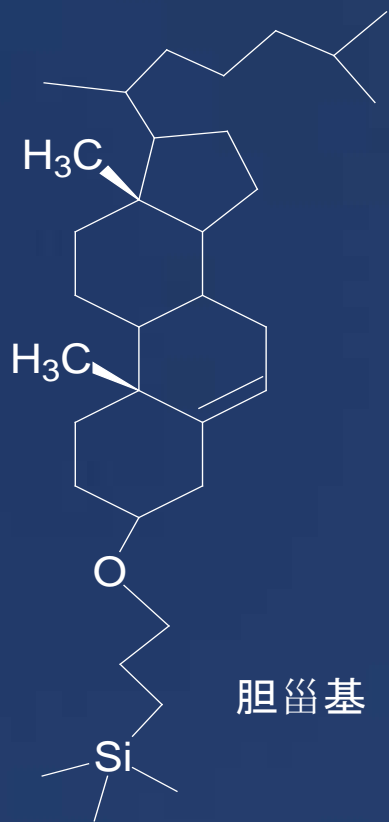


ZORBAX Extend-C18 特殊的二齿结构，使其在高 pH 下非常稳定

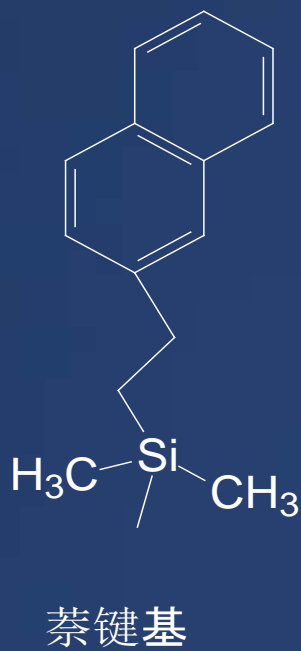
Extend-C18 柱规格

键合相	孔径	表面积	温度 极限	pH 范围	封端	碳 含量
Extend-C18	80Å	180 m ² /g	60°C	2.0-11.5	三基	12.5%

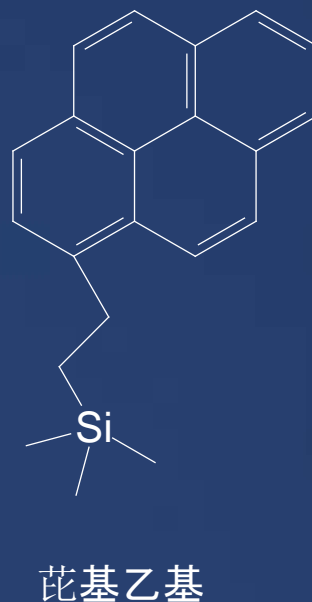
一些新的反相色谱固定相



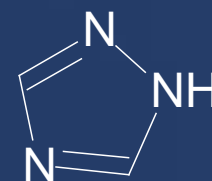
疏水作用
分子识别



疏水作用
 $\pi-\pi$ 作用



疏水作用
强 $\pi-\pi$ 作用
分子识别



三氮唑基

亲水作用

阳离子交换

中药专用柱

- 岛津-GL 公司新推出了专门针对国内中药用户开发的 WondaSil C18柱

岛津-GL
SHIMADZU-GL SCIENCES

【WondaSil C18 中药专用柱】
WondaSil C18 for HERBEL MEDICINE

岛津-GL公司在现有色谱阵列的基础上秉承了其优异的性能及优惠的价格两大传统，又新推出了专门针对中药用户开发的 WondaSil C18 中药专用柱 WondaSil C18 for HERBEL MEDICINE

WondaSil C18 5.0 μm
WondaSil C18 5.0 μm
WondaSil C18 5.0 μm
WondaSil C18 5.0 μm
WondaSil C18 5.0 μm

岛津-GL(上海)商贸有限公司
SHIMADZU-GL SCIENCES (SHANGHAI) LABORATORY SUPPLIES CO., LTD.

分离不同分子量蛋白推荐的色谱柱

样品分子量	推荐柱
$5 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	TSK-GEL G2000SW _{XL} /SW/Super SW2000
$1 \times 10^4 - 5 \times 10^5$	TSK-GEL G3000SW _{XL} /SW/Super SW3000
$2 \times 10^4 - 7 \times 10^6$	TSK-GEL G4000SW _{XL} /SW

Phenomenex (菲罗门) 新型核-壳色谱柱



- Kinetex™ 有亚- $2\mu\text{m}$ 色谱柱的柱效，而操作背压少于 400bar，可在任何 LC 系统上获得 UHPLC 的性能
- 比传统 $3\mu\text{m}$ 色谱柱高两倍柱效
- 用 Kinetex™ $2.6\mu\text{m}$ 核-壳色谱柱来取代传统的 $3\mu\text{m}$ 或 $5\mu\text{m}$ 分析柱能立即改善柱效、速度、分离度和灵敏度等性能

色谱柱的使用与维护

- 所有色谱柱使用缓冲液后必须用柱体积20~30倍的含低有机溶剂（10%）的水冲洗色谱柱

■ 色谱柱	柱体积	冲洗体积
■ 150 × 4.6mm	2.5ml	50ml
■ 200 × 4.6mm	3.3ml	65ml
■ 250 × 4.6mm	4.2ml	80ml

- 保存色谱柱时用100%甲醇，柱两端必须**及时用接头密封**。
- 停用数天后最使用时，应先用**低流速甲醇冲洗1h**左右，然后再换上流动相，否则直接用流动相，柱效会下降，峰形不好。
- **新柱**使用前应用甲醇冲洗（0.5ml/min）
- 如果使用缓冲液、酸、碱，则必须**先用不含酸碱成分的流动相冲洗1h**后再换成分析用流动相。

