

色谱柱

装填有固定相用以分离混合组分的柱管。

多为金属或玻璃制作。有直管形、盘管形、U形管等形状。

色谱柱可分为填充柱和开管柱两大类。液相色谱通常均采用填充柱。

色谱柱的分离效果取决于所选择的固定相，以及色谱柱的制备和操作条件。

色谱是一种分离分析手段，分离是核心，因此担负分离作用的色谱柱是色谱系统的核心。对色谱柱的要求是柱效高、选择性好，分析速度快等。市售的用于 HPLC 的各种微粒填料如多孔硅胶以及以硅胶为基质的键合相、氧化铝、有机聚合物微球（包括离子交换树脂）、多孔碳等，其粒度一般为 3,5,7,10 μ m 等，柱效理论值可达 5~16 万/米。对于一般的分析只需 5000 塔板数的柱效；对于同系物分析，只要 500 即可；对于较难分离物质对则可采用高达 2 万的柱子，因此一般 10~30cm 左右的柱长就能满足复杂混合物分析的需要。

柱效受柱内外因素影响，为使色谱柱达到最佳效率，除柱外死体积小外，还要有合理的柱结构（尽可能减少填充床以外的死体积）及装填技术。即使最好的装填技术，在柱中心部位和沿管壁部位的填充情况总是不一样的，靠近管壁的部位比较疏松，易产生沟流，流速较快，影响冲洗剂的流形，使谱带加宽，这就是管壁效应。这种管壁区大约是从管壁向内算起 30 倍粒径的厚度。在一般的液相色谱系统中，柱外效应对柱效的影响远远大于管壁效应。

色谱柱的构造色谱柱由柱管、压帽、卡套（密封环）、筛板（滤片）、接头、螺丝等组成。柱管多用不锈钢制成，压力不高于 70 kg/cm² 时，也可采用厚壁玻璃或石英管，管内壁要求有很高的光洁度。为提高柱效，减小管壁效应，不锈钢柱内壁多经过抛光。也有人在不锈钢柱内壁涂敷氟塑料以提高内壁的光洁度，其效果与抛光相同。还有使用熔融硅或玻璃衬里的，用于细管柱。色谱柱两端的柱接头内装有筛板，是烧结不锈钢或钛合金，孔径 0.2~20 μ m(5~10 μ m)，取决于填料粒度，目的是防止填料漏出。

色谱柱按用途可分为分析型和制备型两类，尺寸规格也不同：①常规分析柱（常量柱），内径 2~5mm（常用 4.6mm，国内有 4mm 和 5mm），柱长 10~30cm；②窄径柱（narrow bore，又称细管径柱、半微柱 semi-microcolumn），内径 1~2mm，柱长 10~20cm；③毛细管柱（又称微柱 microcolumn），内径 0.2~0.5mm；④半制备柱，内径>5mm；⑤实验室制备柱，内径 20~40mm，柱长 10~30cm；⑥生产制备柱内径可达几十厘米。柱内径一般是根据柱长、填料粒径和折合流速来确定，目的是为了减少管壁效应。

编辑本段色谱柱的分类常见的分配柱填料：碳十八柱（ODS/C18）、碳八柱（MOS/C8）、碳六柱（Hexyl/C6）、

碳四柱（Butyl/C4）、碳一柱（Methyl/C1）、阴离子交换柱（SAX）、

阳离子交换柱（SCX）、苯基柱（Phenyl）、氨基柱（Amino/NH₂）、

氰基柱（Cyano/CN/Nitrile）

常见的吸附柱填料：硅胶柱

分类色谱柱的安装

1、首先应确认柱和仪器的接头以及管路是否匹配。为减少死体积，进样阀、柱子、检测器之间的连接管路内径尽可能使用内径较小的管线，同时控制进样器、色谱柱和检测器之间连接管线的长度。安装色谱柱之前，确认流路系统中的溶剂是否正常。对分析较复杂的样品建议安装保护柱。

2、为了使色谱柱与仪器系统达最佳的连接效果，应尽量使用与色谱柱接口相匹配的螺帽和

锥形接头，如原来的接头长期匹配其他类型的色谱柱，建议在连接新色谱柱前应检查匹配情况，避免造成色谱柱的损坏或因色谱柱不匹配造成的漏液。

3、使用 PEEK 材料的通用接头，只需用手拧紧不需要特定扳手，使用压力为 5000psi；使用温度不得超过 100℃。

流动相平衡

1、在进行样品检测前，至少使用 20 倍柱体积流动相使色谱柱充分平衡。流动相一定要使用色谱级别的溶剂。如使用水相的缓冲液应当天配制以保持新鲜避免细菌产生。

2、流动相使用前需用微孔滤膜过滤,消除流动相中颗粒对色谱系统和色谱柱的损坏。缓冲液与其他流动相混合后应重新过滤避免溶解度变化造成产生新的沉淀。不应使用纯水作为流动相冲洗 C18 色谱柱，以免柱性能损坏（添加 5%的有机溶剂冲洗色谱柱，同时可以达到对缓冲盐清洗的作用。还可以使色谱柱更容易平衡）。

3、流动相需脱气后使用，可避免因气泡导致的泵和检测器的工作不正常。如果测试时使用的流动相与色谱柱保存使用的流动相有较大区别，应该使用过度分布的形式进行平衡。避免由于流动相的突然变化造成柱压增加过大或流动相缓冲盐结晶造成对色谱柱和仪器系统的损坏。正相色谱柱比反相色谱柱需要更长的平衡时间。

样品制备与操作

1、样品应当尽可能溶解在能与流动相相互溶的溶剂中。除特殊指明外，如使用强溶剂溶解样品柱子的分辨率将可能降低。

2、样品溶液在进样前应使用针头式过滤器对样品预先过滤。频繁改变流动相组成，会加速降低柱效。

3、色谱柱由高压匀浆法装填，能承受较高压力。为获得最佳分离效果，使用时请不要超过 200kgf，而且避免压力突然上升或变化，否则会造成硅胶填料的破坏，减少色谱柱的使用寿命。除特殊要求外最高操作温度不要超过 60℃。

保存色谱柱

1、如果流动相含有酸或无机盐，应当先用去离子水（20 倍柱体积）冲洗干净。然后用 100% 乙腈或甲醇保存色谱柱。最后用柱子的接头密封，并放在稳定的环境中存放。

2、应避免色谱柱受到直接的机械冲击或摔落，避免造成色谱柱性能的降低。

色谱柱的再生：

用相当于 20 倍柱体积的溶剂按下列顺序冲洗柱子，建议按柱子的箭头方向冲洗，尽可能不反冲。冲洗时使用的参考溶剂顺序是水、甲醇、氯仿、异丙醇。

发展方向因强调分析速度而发展出短柱，柱长 3~10cm，填料粒径 2~3 μm 。为提高分析灵敏度，与质谱(MS)联接，而发展出窄径柱、毛细管柱和内径小于 0.2mm 的微径柱（microbore）。细管径柱的优点是：①节省流动相；②灵敏度增加；③样品量少；④能使用长柱达到高分离度；⑤容易控制柱温；⑥易于实现 LC-MS 联用。

但由于柱体积越来越小，柱外效应的影响就更加显著，需要更小池体积的检测器（甚至采用柱上检测），更小死体积的柱接头和连接部件。配套使用的设备应具备如下性能：输液泵能精密输出 1~100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的低流量，进样阀能准确、重复地进样微小体积的样品。且因上样量小，要求高灵敏度的检测器，电化学检测器和质谱仪在这方面具有突出优点。

填充和性能评价色谱柱的性能除了与固定相性能有关外，还与填充技术有关。在正常条件下，填料粒度 $>20\mu\text{m}$ 时，干法填充制备柱较为合适；颗粒 $<20\mu\text{m}$ 时，湿法填充较为理想。填充方法一般有 4 种：①高压匀浆法，多用于分析柱和小规模制备柱的填充；②径向加压法，Waters 专利；③轴向加压法，主要用于装填大直径柱；④干法。柱填充的技术性很

强，大多数实验室使用已填充好的商品柱。

必须指出，高效液相色谱柱的获得，装填技术是重要环节，但根本问题还在于填料本身性能的优劣，以及配套的色谱仪系统的结构是否合理。

无论是自己装填的还是购买的色谱柱，使用前都要对其性能进行考察，使用期间或放置一段时间后也要重新检查。柱性能指标包括在一定实验条件下（样品、流动相、流速、温度）下的柱压、理论塔板高度和塔板数、对称因子、容量因子和选择性因子的重复性，或分离度。一般说来容量因子和选择性因子的重复性在 $\pm 5\%$ 或 $\pm 10\%$ 以内。进行柱效比较时，还要注意柱外效应是否有变化。

一份合格的色谱柱评价报告应给出柱的基本参数，如柱长、内径、填料的种类、粒度、色谱柱的柱效、不对称度和柱压降等。

编辑本段使用和维护注意事项色谱柱的正确使用和维护十分重要，稍有不慎就会降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏。在色谱操作过程中，需要注意下列问题，以维护色谱柱。

① 避免压力和温度的急剧变化及任何机械震动。温度的突然变化或者使色谱柱从高处掉下都会影响柱内的填充状况；柱压的突然升高或降低也会冲动柱内填料，因此在调节流速时应该缓慢进行，在阀进样时阀的转动不能过缓（如前所述）。

② 应逐渐改变溶剂的组成，特别是反相色谱中，不应直接从有机溶剂改变为全部是水，反之亦然。

③ 一般说来色谱柱不能反冲，只有生产者指明该柱可以反冲时，才可以反冲除去留在柱头的杂质。否则反冲会迅速降低柱效。

④ 选择使用适宜的流动相（尤其是 pH），以避免固定相被破坏。有时可以在进样器前面连接一预柱，分析柱是键合硅胶时，预柱为硅胶，可使流动相在进入分析柱之前预先被硅胶“饱和”，避免分析柱中的硅胶基质被溶解。

⑤ 避免将基质复杂的样品尤其是生物样品直接注入柱内，需要对样品进行预处理或者在进样器和色谱柱之间连接一保护柱。保护柱一般是填有相似固定相的短柱。保护柱可以而且应该经常更换。

⑥ 经常用强溶剂冲洗色谱柱，清除保留在柱内的杂质。在进行清洗时，对流动系统中流动相的置换应以相混溶的溶剂逐渐过渡，每种流动相的体积应是柱体积的 20 倍左右，即常规分析需要 50~75ml。

下面列举一些色谱柱的清洗溶剂及顺序，作为参考：硅胶柱以正己烷（或庚烷）、二氯甲烷和甲醇依次冲洗，然后再以相反顺序依次冲洗，所有溶剂都必须严格脱水。甲醇能洗去残留的强极性杂质，己烷使硅胶表面重新活化。反相柱以水、甲醇、乙腈、一氯甲烷（或氯仿）依次冲洗，再以相反顺序依次冲洗。如果下一步分析用的流动相不含缓冲液，那么可以省略最后用水冲洗这一步。一氯甲烷能洗去残留的非极性杂质，在甲醇（乙腈）冲洗时重复注射 100~200 μ l 四氢呋喃数次有助于除去强疏水性杂质。四氢呋喃与乙腈或甲醇的混合溶液能除去类脂。有时也注射二甲亚砜数次。此外，用乙腈、丙酮和三氟醋酸（0.1%）梯度洗脱能除去蛋白质污染。

阳离子交换柱可用稀酸缓冲液冲洗，阴离子交换柱可用稀碱缓冲液冲洗，除去交换性能强的盐，然后用水、甲醇、二氯甲烷（除去吸附在固定相表面的有机物）、甲醇、水依次冲洗。

⑦ 保存色谱柱时应将柱内充满乙腈或甲醇，柱接头要拧紧，防止溶剂挥发干燥。绝对禁止将缓冲溶液留在柱内静置过夜或更长时间。

⑧ 色谱柱使用过程中，如果压力升高，一种可能是烧结滤片被堵塞，这时应更换滤片或将其取出进行清洗；另一种可能是大分子进入柱内，使柱头被污染；如果柱效降低或色谱峰变形，则可能柱头出现塌陷，死体积增大。

在后两种情况发生时，小心拧开柱接头，用洁净小钢将柱头填料取出 1~2mm 高度（注意把

被污染填料取净)再把柱内填料整平。然后用适当溶剂湿润的固定相(与柱内相同)填满色谱柱,压平,再拧紧柱接头。这样处理后柱效能得到改善,但是很难恢复到新柱的水平。柱子失效通常是柱端部分,在分析柱前装一根与分析柱相同固定相的短柱(5~30mm),可以起到保护、延长柱寿命的作用。采用保护柱会损失一定的柱效,这是值得的。通常色谱柱寿命在正确使用时可达2年以上。以硅胶为基质的填料,只能在pH2~9范围内使用。柱子使用一段时间后,可能有一些吸附作用强的物质保留于柱顶,特别是一些有色物质更易看清被吸着在柱顶的填料上。新的色谱柱在使用一段时间后柱顶填料可能塌陷,使柱效下降,这时也可补加填料使柱效恢复。每次工作完后,最好用洗脱能力强的洗脱液冲洗,例如ODS柱宜用甲醇冲洗至基线平衡。当采用盐缓冲溶液作流动相时,使用完后应用无盐流动相冲洗。含卤族元素(氟、氯、溴)的化合物可能会腐蚀不锈钢管道,不宜长期与之接触。装在HPLC仪上柱子如不经常使用,应每隔4~5天开机冲洗15分钟。

色谱柱技术新进展

一、石墨化碳填料

硅胶的化学稳定性较差,仅能在pH=2~8的环境下工作。但是,在很多场合下,需要使用极端的pH条件。为此,人们曾大力发展高分子微球、氧化铝、氧化锆等化学稳定性更好的基质材料。但是,很难有一种材料能全面地满足液相色谱基质的要求。例如,高分子微球在有机溶剂中会发生一些溶胀,因此难以应用于以含有机溶剂的流动相进行梯度淋洗的场合;氧化铝和氧化锆与硅胶相比,虽然化学稳定性较好,但其表面修饰与键合比较困难。因此,化学稳定性好的碳材料便很自然地考虑作为色谱填料的基质。

碳材料有极好的化学稳定性,可耐受宽达pH=1~14的环境;耐高温,石墨化碳能耐3000℃以上的高温而不受破坏;经适当加工的碳材料可具有很好的机械强度,具有优良的导电性、导热性及电磁屏蔽特性。更为难能可贵的是,多孔性碳材料以其结构的特点而具有很好的吸附性及选择性。正是碳材料的这些特性,使人们期待它在色谱领域中能有特殊的用途。

二、贯流色谱填料

贯流色谱是20世纪80年代末至90年代初发展起来的一种色谱分离新方法。在这种填料上,既有通常的微孔或大孔,例如50~150nm的微孔,又有贯穿整个颗粒的,孔径约600~800nm超大孔存在。这种贯穿的大孔,可以允许流动相直接进入填料颗粒的内部并贯穿而过。这样,就相当于极大地降低了填料颗粒的直径,即以贯穿孔将填料分割成了很多更细小的颗粒,在这种小颗粒上的微孔已经短到不对传质过程构成明显的阻力。因此,在这种贯流色谱填料上,传质阻力已经非常小。同时,贯穿孔内流动相的线速度正比于柱子中流动相的速度,即传质过程已由扩散传质变为对流传质。这就意味着,在一定范围内,及时提高流动相速度,也不会降低柱子的分离效率。由于填料上同时还存在有通常的多孔结构,其比表面积并未随贯穿孔的出现而大幅度降低。

因此,在这种填料上的样品负载量也不随流速的增加而减少。再者,填料上600~800nm的贯穿孔,极大地增加了柱子的通透性,使得这种柱子即使工作于很高的流速下,其操作压力也不需要很高。所以,这种贯流色谱柱可以同时具有高流速、高效率、高样品负载量和低操作压力的特点。

三、整体柱

整体柱又称整体固定相、棒柱、连续床等,是在柱管内原位聚合或固定化了的连续整体多孔结构,可根据需要对整体材料的表面作相应的衍生化,是一种新型的用于分离分析或作为反应器的多孔介质。通过控制聚合条件来得到具有理想孔径分布的整体柱。整体柱中的空间由聚合物颗粒中的孔和颗粒间的缝隙组成,分离在样品流经孔结构时发生。可以减少路径的差

异和纵向扩展。

整体柱的优点包括：可以原位制备，省去制备填料和装柱，也可以同法制成聚合物颗粒后再装柱；聚合物易于制备，柱子的长度和直径在一定程度上不受限制；聚合反应混合物中的单体可以灵活选择以得到适合的基质和性质；易于在柱衍生化，以得到具有合适性质的色谱柱；通过控制聚合反应的条件可以优化孔的性状。