

反相硅胶 RpC18 使用技术规范

反相色谱是指固定相的极性低于流动相的极性，固定相为非极性键合相，非极性基团有十八烷基 (C18)、辛烷基 (C8)、甲基与苯基等，流动相用强极性溶剂，如水、醇、乙腈或无机盐缓冲液。最常用的是不同比例的水和甲醇以及水和乙腈配制的混合溶剂，水不仅起洗脱作用还可掩盖载体表面的硅羟基，防止因吸附而至的拖尾现象。在这种层析过程中，极性大的分子比极性小的分子移动的速度快而先从柱中流出。反相硅胶RpC18 是一种价钱较为昂贵的填料，使用者必须注意使用恰当的方法。

1. 反相硅胶 RpC18 使用方法

(1) 浸泡: 使用前应先用 2 倍于硅胶体积的溶剂 (多用甲醇、丙酮、乙腈等) 浸泡 4—8 小时, 使其充分涨溶, 并尽可能除去漂浮于液面的固体小颗粒。以免堵塞柱床。

(2) 装柱: 湿法装柱 把涨溶好的糊浆状的反相硅胶, 沿层析柱内壁, 徐徐灌入柱中, 同时打开下端活塞, 让溶剂缓缓滴出, 注意在灌浆过程中和灌浆完毕都不能让溶剂流完、干柱, 应让柱面上一直保持有一定高度的液面, 让硅胶自由沉降而填实。一般以纯的有机溶剂浸泡反相硅胶或者高浓度有机溶剂浸泡硅胶装柱为宜, 装实之后, 以 10-20% 的浓度差逐渐转换至起始的洗脱液浓度, 每个浓度一般走 2 个柱体积。

(3) 加样: 样品如果能够溶解在初始的洗脱液中, 则溶解后小心均匀地加到装好柱的吸附剂表面, 注意动作要轻, 不能扰动柱床表面。如果样品不能溶于初始的洗脱液, 则可选用合适的极性大于洗脱剂的有机溶剂溶解样品。要求样品溶液尽量体积小, 浓度高, 才能形成谱带狭窄的原始带, 以利于分离。注意样品如不溶解, 不能上样, 若样品有微量不溶物, 应过滤或者离心后上样。若样品不溶入起始浓度洗脱液, 也可以用有机溶剂溶解, 加入反相硅胶拌入, 待有机溶剂挥发至干时, 然后以起始洗脱浓度溶剂悬浮上样也可, 但这样容易造成柱头吸附较为严重, 就需要损失一点反相填料, 在下次使用之前, 可将柱头部分挖出即可; 上样样品量一般为样品量: 硅胶量=1: 100。

(4) 洗脱: 加样完毕后开始用洗脱剂不断冲洗, 分段定量收集洗脱液, 不断进行薄层色谱(TLC)检测或 HPLC 分析, 合并组分相同的流分。如果采用单一洗脱剂不能得到满意的分离效果, 则可以选择“梯度洗脱”, 逐渐增大洗脱剂的有机溶剂浓度, 让各组分得到更好的分离。注意在梯度洗脱过程中, 极性要缓慢地变化, 一般以 10~20% 的梯度转换, 以避免柱内产生气泡。

(5) 保存: 样品全部洗脱后, 将色谱柱用纯有机溶剂 (甲醇或乙腈) 保存, 注意使溶剂在柱面上留有一定高度, 并保持不干柱。如长期不用可将有机溶剂抽滤去除, 再转入密闭容器中保存。

2. 洗脱剂

反相色谱的洗脱剂常用的有甲醇水、乙腈水等, 如分离碱性物质可加少量碱性溶剂二

乙胺、三乙胺、氨水等。反之分离酸性物质可加少量甲酸、乙酸，或加 pH 缓冲液等。洗脱液的 pH 一般为 3-8。

3.样品回收

一般按一个柱体积分成 3-5 次接馏分，然后先用旋转蒸发仪上浓缩除去容易挥发的有机溶剂，剩下的水溶液，不需要浓缩至干，然后取出置于冰箱冷冻，然后置于冷冻干燥机中干燥，为防止长时间加热处理容易破坏化合物结构，浓缩温度最高不宜超过 60℃，

4.常用溶剂性质

名称	极性参数	沸点/℃
乙腈	6.2	81.6
甲醇	6.6	65
水	9.0	100
四氢呋喃	4.2	66
异丙醇	4.3	82.4
二氯甲烷	3.4	40

修改于二零二零年三月