



Sepax Technologies, Inc.

Delaware Technology Park

5 Innovation Way, Suite 100 Newark DE 19711 USA

Phone: (302) 366-1101; Fax: (302) 366-1151

Toll Free: (877) SEPAX-US; www.sepax-tech.com

## HILIC 色谱柱使用说明

### 色谱柱信息

为解决越来越多的强极性药物和小生物分子的分离难题，赛分公司开发了一系列弱酸性、中性和碱性 HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) 固定相来分离具有强极性的碱性、中性和酸性化合物。该类固定相是以高纯度具有良好机械稳定性的硅胶为基质，采用高纯度的键合试剂，可最大限度实现硅胶表面覆盖，从而确保了固定相的稳定性。通过严格控制单分子层形成以及封尾的化学反应条件，可确保柱与柱之间有着可靠的重现性。该填料为均一的球形颗粒，孔径120Å，比表面积300m<sup>2</sup>/g。

图1显示的是HILIC固定相的化学结构，类型包括Polar-100、Polar-Diol、Polar-Silica、Polar-Pyridine 和 Polar-Imidazole。Polar-100和Polar-Diol是中性的极性固定相，后者的极性要高于前者。Polar-Silica是弱酸性固定相。Polar-Pyridine和Polar-Imidazole是碱性固定相，后者的碱性要强于前者。

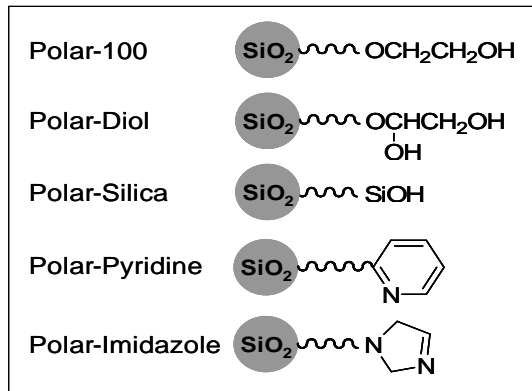


图1 HILIC键合相的化学结构

### 稳定性和性能

通过运用独有的匀浆装填技术装填得到的 HILIC 柱柱床密度均一稳定，可保证具有最高的柱效。从而在极性和亲水化合物如碳水化合物、代谢物、酸与碱、有机与无机离子、金属复合物、氨基酸、多肽和蛋白水解物等的分离过程中，作为改变柱选择性和提高柱分辨率的工具。右图是对于 4.6 x150 mm 的 HILIC 色谱柱的质量控制测试谱图。

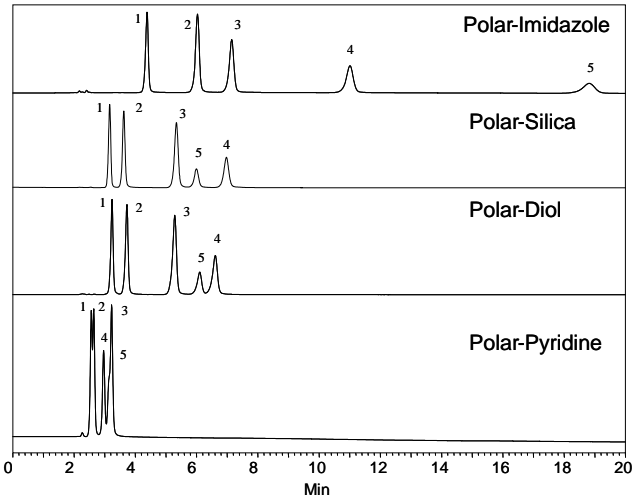


图 2 HILIC 色谱柱的 QC 色谱图

Column: Sepax HILIC, 4.6mm I.D. x150mm, 5 μm  
Mobile Phase: CH<sub>3</sub>CN: 10mM NH<sub>4</sub>Ac =90:10 (v/v)  
Flow rate: 1.0mL/min  
Detection: UV 254nm  
Injection Volume: 1 μL  
Temperature: Ambient  
Sample: 1.Uracil, 2. Adenosine, 3. Uridine, 4.Cytidine, 5.Guanosine

### 特性

- 独特的化学键合技术使 HILIC 固定相的表面具有酸性、中性和碱性的性质
- 采用孔径可控的超纯硅胶
- 有1.8、2.2、3、5和10 μm等可选粒径
- 高的化学稳定性，低固定相流失
- 有各种色谱柱规格：柱径从75 μm到30，长度从1到30 cm
- 有克到千克级的填料
- pH稳定性: 1.5 - 8.0
- 适合分离极性药物、多肽、氨基酸以及其它化合物等。

### 安全注意事项

HILIC 柱通常在高压下运行。如果管路连接不紧，将会导致有机溶剂和注入样品的泄漏，从而对操作人员的健康产生影响。一旦发生泄漏，应佩戴适当的手套进行处理。另外当打开色谱柱时还应采取适当的保护措施，以防止微小的硅胶颗粒进入呼吸道。

### 色谱柱安装与操作

色谱柱在运输过程中或在没有使用时，它的两端总是用堵头进行密封。当将色谱柱接入色谱仪器系统时，首先移去两端的堵头。请注意将流动相流动的方向与柱上标记的方向保

持一致。除非出于特殊考虑，例如为了清除堵在色谱柱入口端的脏污等而需要将色谱柱反接以进行冲洗时，建议用户在接上色谱柱时一定要遵循柱上标记的方向。由于色谱柱的连接是整个色谱操作过程的一部分，如果密封卡套过紧，或安装不合适，或者密封卡套与色谱柱端口不匹配，都有可能造成溶液的泄漏。请按照下面步骤将色谱柱与密封卡套相连接，从而将色谱柱接入 HPLC 系统：

(a) 第一次使用的管线，请依次将管线接头和密封卡套装在外径 1/16” 的管线上。密封卡套的宽口端应朝向管线接头。

(b) 将管线紧紧插入色谱柱的接口，向前滑动密封卡套和管线接头，并使管线接头的螺纹与色谱柱端口的螺纹相互衔接，然后拧紧管线接头。如果管线为高分子材料，请转到步骤 (d)；如果是金属管线，请继续 (c)。

(c) 在用力将管线压入柱端接口之后，用 1/4” 扳手将已拧紧的螺帽再进一步紧固。

(d) 对色谱柱的另一端采用上述方法进行操作。

新的 HILIC 柱中的液相是含 90 % (v/v) 乙腈的醋酸铵 (10mM, pH 6.8) 溶液。在储存和运输过程中，硅胶填料可能会干涸。这时推荐用 10-20 倍柱体积的纯有机溶剂如甲醇、乙腈等进行冲洗以活化色谱柱。接着可用用户自己选择的流动相冲洗色谱柱。流速由 0.1 mL/min 逐渐升至所需的操作条件，直至基线稳定为止。溶剂替换时请使用正常操作流速的一半。注：如果使用了含甲酸盐的流动相（如甲酸铵、甲酸等）并把缓冲盐冲洗掉后，在再次安装色谱柱和使用含甲酸盐流动相运行时需要稍长一些的时间进行平衡。注意溶剂组分的剧烈改变和频繁的溶剂替换可能导致色谱柱寿命的缩短。

### 样品与流动相

为了避免色谱柱的堵塞，所有样品和溶剂，包括缓冲溶液在内，都必须在使用前用 0.45 μm 或 0.2 μm 的滤膜过滤。样品溶剂需要含 60-100% 有机溶剂或为初始洗脱液组成。水的比例应被最小化。最好使用弱亲水作用溶剂如乙腈。推荐使用 5% 的水作为自动进样器的清洗液。用于 HILIC 的相对溶剂强度为：

丙酮 < 乙腈 < 异丙醇 < 乙醇 < 甲醇 < 水

适用于 HILIC 分离的缓冲盐体系为甲酸盐和醋酸盐，因为它们在很多比例的有机溶剂中也有很好的溶解性。避免使用磷酸盐以及其它低溶解性缓冲盐，以防止在柱床产生沉淀。对于大多数分析样品，推荐的缓冲盐浓度为 5-20 mM，根据在洗脱液中溶解度的不同，上限为 200-300 mM。避免使用 TFA 和其它离子对试剂，因为它们会干扰 HILIC 分离机理，并抑制 MS 信号。

在通常的 HILIC 应用中，一般使用含 50-95% 浓度乙腈的水溶性缓冲盐（如甲酸铵、醋酸铵或它们的酸，在有机相中具有很高的溶解性）。

如果对柱子并不熟悉，推荐的起始和平衡程序为从 90% (v/v) 乙腈/10 % (v/v) 缓冲液（如 10 mM 醋酸铵）到 40% (v/v) 乙腈的梯度。一开始请使用相对较低的流速以确保获得最好的分离效率。

流动相在使用前需要脱气。一个简单的脱气方法是将流动相在由水泵形成的真空下超声 5min。

### 色谱柱的保养

**pH** HILIC 色谱柱可在 pH 1.5 ~ 8 范围内操作，避免使用强碱和氢氧化钠进行清洗。为了获得最佳的分离效果和延长柱的使用寿命，请尽量使用 pH 在 2 ~ 7.5 范围内的流动相。

**压力** 尽管 HILIC 柱可在高至 5000psi 的压力下使用，但正常的操作压力应当低于 3000psi。长时间在高压下运行会损

坏色谱柱和输液泵。由于压力来源于流速，因此最大流速将受制于系统所能承受的压力。一般而言，柱压会随着色谱柱使用时间的增加而逐渐增加。

**温度** 最高操作温度为 60 °C。长时间在高温 (>70 °C) 下操作也会损坏色谱柱，这种情形在高的 pH (>8.0) 条件下特别突出。

**储藏** 长期不用时，请将色谱柱保存在乙腈/水 (95:5, v/v) 中。为了防止柱床干涸，请用堵头塞紧色谱柱的两端。

**清洗和再生** 压力突然增加预示色谱柱入口端的筛板发生了堵塞。在这种情况下，建议将色谱柱反接后用适宜的溶剂进行冲洗。如果柱压升高或选择性发生变化，请使用乙腈/水 (50 : 50, v/v) 来清洗去除极性污染物。如果该冲洗程序不能解决问题，则使用乙腈/水 (95:5, v/v) 进行清洗。