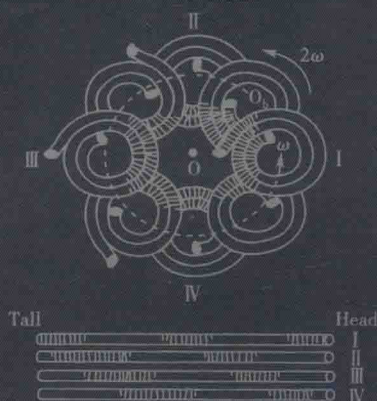
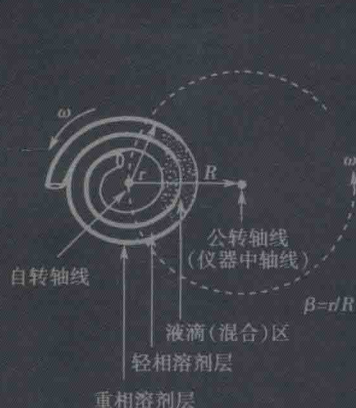


TECHNOLOGY AND APPLICATION OF
pH-ZONE-REFINING CCC

pH 区带逆流色谱 技术与应用

王 晓 张经华 编著



pH 区带逆流色谱技术与应用

王 晓 张经华 编著

 北京科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

pH 区带逆流色谱技术与应用/王晓,张经华编著. —北京:
北京科学技术出版社, 2015. 11

ISBN 978 - 7 - 5304 - 7834 - 9

I. ①p… II. ①王… ②张… III. ①逆流色谱法 - 研究
IV. ①O658. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 142483 号

pH 区带逆流色谱技术与应用

作 者:王 晓 张经华

责任编辑:李 鹏

封面设计:耕者设计工作室

出 版 人:曾庆宇

出版发行:北京科学技术出版社

社 址:北京西直门南大街 16 号

邮政编码:100035

电话传真:0086-10-66135495(总编室)

0086-10-66113227(发行部)

0086-10-66161952(发行部传真)

电子信箱:bjkj@bjkjpress.com

网 址:www. bkydw. cn

经 销:新华书店

印 刷:廊坊市海涛印刷有限公司

开 本:720mm × 1020mm 1/16

字 数:200 千

印 张:11

版 次:2015 年 11 月第 1 版

印 次:2015 年 11 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5304 - 7834 - 9/O · 024

定 价:68. 00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。

京科版图书, 印装差错, 负责退换。

前 言

高速逆流色谱 (high - speed countercurrent chromatography, HSCCC) 是 20 世纪 80 年代发展起来的一种连续高效的液—液分配色谱分离技术,它不用任何固态的支撑物或载体,利用两相溶剂体系在高速旋转的螺旋管内建立起一种特殊的单向性流体动力学平衡,其中一相作为固定相,另一相作为流动相,在连续洗脱的过程中能保留大量固定相。由于不需要固体支撑体,物质的分离依据其在两相中分配系数的不同而实现,因而避免了因不可逆吸附而引起的样品损失、失活、变性等,不仅样品能够全部回收,而且由于被分离物质与液态固定相之间能够充分接触,使得样品的制备量大大提高,是一种理想的制备分离手段,与高效制备液相一起成为分离领域中优势互补的分离工具。由于它与传统的分离纯化方法相比具有明显的优点,因此,已被广泛应用于中药成分分离、天然产物化学、生物工程、保健食品、有机合成、环境分析等领域。

pH 区带逆流色谱 (pH - zone - refining countercurrent chromatography) 是 1994 年 Ito 等在应用 HSCCC 分离纯化溴乙酰三碘甲腺氨酸 (BrAcT_3) 时发现的,它是在普通的高速逆流色谱仪器的基础上,通过对分离样品所用的溶剂系统的组成的调配,采用化学的手段,使样品组分的色谱分离过程增添了按 pH 区带聚集的特征,同时,使组分的洗脱过程表现为类似置换(顶替)色谱 (displacement chromatography) 的洗脱过程,因此,它的色谱图不再是高斯分布的色谱峰形系列,而成为按 pH 值的大小排列的边界陡峭的矩形区带系列,其结果是能把相同容积的逆流色谱仪器的分离制备量提高数倍乃至 10 倍。

与普通高速逆流色谱相比,pH 区带逆流色谱的突出特点是在溶剂系统的固定相中加入保留酸(或碱),同时在流动相中加入洗脱碱(或酸);不同物质洗脱出来时伴随着 pH 值的突变。采用该技术能得到最小重叠的矩形峰色谱结果,同时,杂质会被聚集在目标组分峰的两侧。该技术已被成功地应用于氨基酸衍生物、肽衍生物、氧杂蒽染料、立体异构体、天然产物的生物碱及有机酸化合物的分离中。pH 区带逆流色谱不仅保留了高速逆流色谱技术无固态支持体干扰和分配分离效率高等优点,而且扩充了更大制备量的分

离能力,是普通高速逆流色谱的 10 倍之多。

随着逆流色谱技术在我国生物医药、中药现代化和生命科学等领域的应用越来越广泛,pH 区带逆流色谱技术的优势也越来越被人们认可。既能反映该项技术发展和最新研究成果,又能为使用者提供一些可操作性的指导,让应用者能快速掌握这种分离方法和应用技巧来解决实际问题,是作者编写此书的初衷。

本书是作者在多年从事天然产物分离制备研究和应用实践的基础上编写而成的,详细介绍了 pH 区带逆流色谱的理论、技术与应用。全书共分 7 章,第 1~3 章着重阐述逆流色谱(CCC)基础知识,高速逆流色谱(HSCCC)及 pH 区带逆流色谱的分离机制、工作方法及溶剂系统选择策略;第 4~7 章主要介绍了 pH 区带逆流色谱在天然生物碱、有机酸、氨基酸、肽类、合成色素等多类化合物的分离制备中的应用。希望本书能成为天然产物、中药、药品、食品、化妆品及生物工程等领域的研究人员、工程技术人员、教师和研究生的有价值的参考书。

作者多年从事逆流色谱技术研究及应用,先后得到国家自然科学基金(20872083)、山东省系列科技计划和山东省科学院科技计划项目的资助,在此深表感谢。

在本书的编写过程中,山东省科学院分析测试中心(山东省分析测试中心)天然产物研究室的老师和同学们提供了重要的支持和帮助,在此深表感谢。还要感谢北京科学技术出版社的领导和相关工作人员的支持和大力协助。

由于编者水平有限,编撰过程中难免有不足与疏漏之处,恳请广大读者批评和指正。

目 录

1	逆流色谱的基础	1
1.1	逆流色谱的概念	1
1.2	逆流色谱的发展	1
1.3	逆流色谱的基本理论	2
1.4	逆流色谱的基本色谱理论	5
1.5	逆流色谱的应用研究概况	6
2	高速逆流色谱技术原理及工作方法	8
2.1	引言	8
2.2	单向性流体动力学平衡逆流色谱原理	8
2.3	高速逆流色谱仪器的设计	10
2.4	溶剂系统在运动螺旋管里的流体动力学特征	13
2.5	高速逆流色谱的技术特点	14
2.6	HSCCC 的工作方法	15
3	pH 区带逆流色谱分离原理及工作方法	23
3.1	引言	23
3.2	pH 区带逆流色谱的分离原理	23
3.3	pH 区带逆流色谱的分类	25
3.4	pH 区带逆流色谱分离的准备过程	25
4	pH 区带逆流色谱在生物碱分离中的应用	33
4.1	概述	33
4.2	夏天无生物碱	34
4.3	骆驼蓬生物碱	37
4.4	粉防己生物碱	38

4.5	莲子心生物碱	41
4.6	荷叶生物碱	43
4.7	马钱子生物碱	46
4.8	广西地不容生物碱	49
4.9	青风藤生物碱	52
4.10	苦地丁生物碱	55
4.11	乌头生物碱	57
4.12	紫金龙生物碱	61
4.13	苦木生物碱	64
4.14	关白附生物碱	66
4.15	黄连生物碱	69
4.16	钩吻生物碱	72
4.17	石蒜生物碱	75
4.18	小结	78
5	pH 区带逆流色谱分离制备有机酸类化合物	81
5.1	概述	81
5.2	紫锥菊	82
5.3	丹参	84
5.4	红曲	85
5.5	灵芝	87
5.6	甘草	91
5.7	金银花	94
5.8	大黄	96
5.9	小结	101
6	pH 区带逆流色谱在氨基酸及肽类分离中的应用	104
6.1	概述	104
6.2	氨基酸衍生物的分离	104
6.3	肽类衍生物的分离	108
6.4	高 F 值寡肽的分离	109

6.5	对应异构体的分离	110
6.6	小结	113
7	pH 区带逆流色谱在合成色素分离中的应用	114
7.1	概述	114
7.2	D&C 绿 8 号色素的分离	114
7.3	喹啉黄 10 号色素的分离	115
7.4	酸性红的分离	117
7.5	喹啉黄的分离	120
7.6	D&C 橘红色 5 号色素的分离	123
7.7	D&C 橘红色 22 号色素的分离	124
7.8	D&C 橘红色 28 号色素的分离	125
7.9	D&C 橘红色 3 号色素的分离	126
7.10	小结	127
附录一	国内外商品化的高速逆流色谱仪器简介	130
附录二	HSCCC 分离天然活性成分溶剂体系一览表	134

1 逆流色谱的基础

1.1 逆流色谱的概念

逆流色谱是一种液—液分配技术，它是基于混合物中被分离组分在两相不混溶的溶液中分配系数的不同，经过类似连续的液—液萃取的过程，实现目标组分的分离。它不用固体的支撑体作为固定相，因而可以避免样品的不可逆吸附、失活和沾染等问题。因此，逆流色谱可以被定义为利用两相不混溶的溶液作为溶剂体系，其中一相以一种相对均匀的方式纵向分布于一根空管或者一系列腔体中，同时另一相以一定速度通过该相并与之混合的色谱技术^[1]。但随着逆流色谱技术的快速发展，这个简单的定义已经难以涵盖所有被称为逆流色谱的技术和仪器，由于逆流色谱仪具有多功能性，目前不仅用于物质分离，而且还可用于逆流萃取、逆流泡沫浮选等非色谱分离行为。而逆流色谱工作者倾向于把那些在逆流色谱仪器上实现的色谱行为称为逆流色谱^[2]。

1.2 逆流色谱的发展

现今实验室里常用的分液漏斗就是最早出现的液—液分配装置。如果两种被分离物质在两相溶剂系统中的分配系数差异明显，在分液漏斗里进行一次萃取就能很容易地分离开来。若是性质相近的复杂混合物，就需要进行多次萃取才能实现满意的分离。20 世纪 40 年代，Martin 和 Synge 提出了一种级联链型萃取装置^[3]，通过对逆流（对流）萃取的研究，开创了分配色谱技术^[4]。随后，Craig 发明了非连续式的逆流分溶装置（countercurrent distribution, CCD）^[5]，就是将多个分液漏斗连接在一起，用来进行样品的液—液分配分离。这个装置可以说是现代逆流色谱的鼻祖。

20 世纪 70 年代早期，连续性的逆流色谱法（counter current chromatography, CCC）开始发展。这些分离方法与传统色谱不同，它们的固定相是由液体组成，不含有固态支撑体，因而不会使样品产生不可逆的吸附和变

性等问题。这个时候应用的逆流色谱仪主要有两种类型：一种是环形线圈逆流色谱仪（toroidal coil counter current chromatography）；另一种是液滴逆流色谱仪（droplet counter current chromatography, DCCC）。虽然这两类仪器当时都有应用，但这些早期的逆流色谱仪器因为存在着分离效率较低、分离时间过长、仪器使用过程中容易损坏等诸多问题，所以没有得到有效地推广应用。

后来，Y. Ito 等研究出利用离心力场来提高液态固定相的保留值的逆流色谱方法，大大提高了两相溶剂的混合效率，并且允许较快的速度，因而极大地缩短了分离时间。根据固定相保留方式和柱体设计的不同，这种建立在离心力场作用基础上的逆流色谱大致分为两种：一种称为流体静力学平衡体系（hydrostatic equilibrium system）；另一种称为流体动力学平衡体系（hydrodynamic equilibrium system）。以这两种体系的任一种为基础，都能引出一系列具有自身特点的逆流色谱仪器及其应用方法。

1.3 逆流色谱的基本理论

1.3.1 流体静力学平衡体系^[2]

基于流体静力学平衡体系的逆流色谱仪器，其柱系统通常具有如下两个特征：①它是由一系列管体、腔体或小室组成，并且由管路或通道连接起来，这些腔体通常是直接在转子上面刻槽而成，并由上下两个旋转密封接头与外界连接；②仅存在一个旋转轴，它能产生一个恒定的离心力场。在这种仪器上进行的色谱分离行为，通常被称为离心分配色谱（CPC）。

图 1-1 为液体在 CPC 腔体和通道之间运动的情况。从图中可以看出，在腔体之间的连接通道中只有流动相存在，这些部位属于色谱中的死体积，它对色谱分离是非常不利的。由于这些死体积的存在，降低了 CPC 的分离效率。同时，也正是由于在连接通道中仅有一相溶剂，使得在通道和通道之间存在一定的流体静压力。

流动相的流通方式有上行和下行两种。在运行过程中，轻相总是被推到腔体或小室的上部，而重相则聚集在底部。如果以轻相作为流动相，则应该从最后一个腔体的底部引入，逆着离心力场的方向，上行穿过下相固定相；如果以重相为流动相，则应该从第一个腔体的顶部引入，顺着离心力场的方向，下行穿过上相固定相。

二十多年来，这种 CCC 仪器的商业化生产几乎全部是由日本的 Sanki

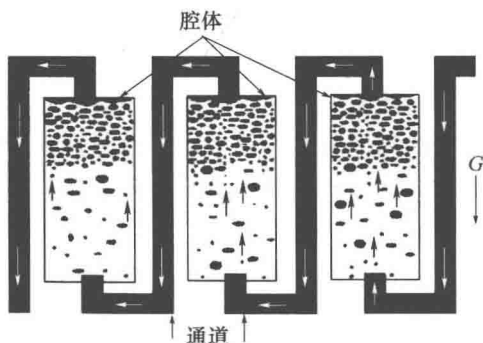


图 1-1 流体静力学 CPC 中液体在腔体和通道之间运动

工程公司完成的。近年来,法国的 Kromaton Technologies 公司也开始研制这类仪器。有关 CPC 仪器及应用,参见 Alian P. Foucault 编著的 *Centrifuge Partition Chromatography* 一书。

1.3.2 流体动力学平衡体系^[2]

基于流体动力学平衡体系的逆流色谱仪器通常具有两个特征:①有一个或多个缠绕有多层聚四氟乙烯管的线轴(鼓);②没有旋转密封接头,有一个安装有两个旋转轴的齿轮传动装置,它能够产生一个可变的离心力场。在这种仪器上进行的色谱分离行为,通常被称为逆流色谱(CCC)。

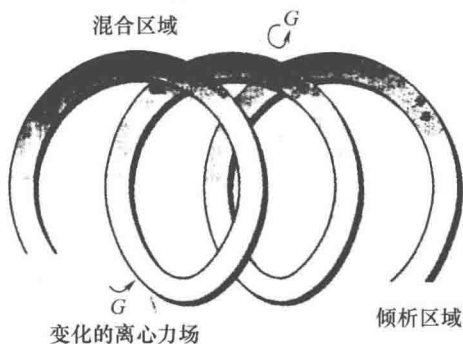


图 1-2 流体动力学 CCC 中的液体行为

图 1-2 显示了两相液体在一个达到流体动力学平衡的鼓里的运动并相互接触的过程。螺旋管柱的行星式运动产生了一个在强度和方向上都不断变化的离心力场。在离心力场较高时,两相之间出现倾析;当离心力的方向发生逆转时,分开的两相液体又混合成乳化状态。倾析和混合区域交替出现在鼓中,且两相液体在螺旋管柱中总是处于相互接触的状态,没有死

体积的存在。这就解释了在流体动力学 CCC 中仅有很小的压力存在且固定相的最高保留值可达到 96% 的原因。

在流体动力学平衡体系中，螺旋管的高速旋转产生的变化力场，使两相溶剂在螺旋管中呈单相性分布。其中轻相总是倾向于占据首端，而重相总是倾向于占据尾端。当以轻相作为流动相时，应该从螺旋管柱的尾端引入，通过重相固定相，最后从首端流出，这是一种叫做尾→头的洗脱方式；当以重相作为流动相时，应该采取头→尾的洗脱方式，从螺旋管柱的首端引入，通过轻相固定相，最后从尾端流出。在这里，首端和尾端与螺旋管的转动方向有关。

目前，市场上商品化的 CCC 仪器基本上都是这种流体动力学的仪器，这些仪器大都是基于 Ito 教授设计的两轴螺旋管行星式离心分离仪。两轴由一个电动机带动，两轴之间通过齿轮或带齿的皮带传动。其中至少有一个含有聚四氟乙烯螺旋管的鼓在沿着自转轴（第一轴）转动的同时，还沿着仪器的公转轴（第二轴）做行星式运动。由于采用特殊的管路设计，这种 CCC 仪器不需要旋转密封接头。

现有的流体动力学 CCC 仪器柱体积小至 5ml，大到 2 ~ 3L。还经常将两根聚四氟乙烯管缠绕在同一个鼓上，通过不同的连接方式，形成不同的柱体积。流体动力学 CCC 仪器的主要问题是有齿轮传动装置产生的噪声。现有的 CCC 仪器都将这些传动装置密封在一个厚厚的箱体里以减少噪声，同时还可以调节温度。目前，市场上的逆流色谱仪，大多数是建立在流体动力学平衡体系基础上的高速逆流色谱仪。

流体静力学平衡体系和流体动力学平衡体系在实现逆流色谱时，各具特点，例如，流体静力学平衡体系能保证固定相的稳定保留，且不易产生乳化；流体动力学平衡体系则能实现两相间广阔的界面和有效混合，从而保证了物质的有效分配分离过程。表 1 - 1 列举了这两种体系的一些技术特点^[6]。

表 1 - 1 两种基本逆流色谱体系的比较

项目	流体静力学平衡体系	流体动力学平衡体系
螺旋管的运动	静止不动	绕自身轴线运动
功能的对称型	对称	不对称，悬浮物由管柱绕向和转动方向决定，向螺旋管首端运动
流动相洗脱方向	流动相可以从螺旋管的任一端引入，效果相同	重相做流动相时应从螺旋管首端引入，轻相做流动相时宜从尾部引入
分配效率	较低	较高

续表

项目	流体静力学平衡体系	流体动力学平衡体系
固定相的保留值	保留值恒定, 接近 50% 固定相一旦流失就不再返回	保留值同转速和两相界面张力有密切关系。溶剂体系易乳化, 保留差
每个螺旋单元相当的分配单元数	等于 1	能够大于 1
两相的界面面积	较小, 特别是对管壁表面有亲和性的一相做流动相的情况	较大, 同流动相的选择无关
两相的混合作用	缓和	极强
有效管柱空间	50%	100%

本书将在附录一中介绍几种国内外已经商业化的逆流色谱仪器。

1.4 逆流色谱的基本色谱理论

逆流色谱作为一种色谱技术, 其一般特征可沿用经典的色谱术语来描述, 如保留时间、分配系数、等分离度等。但由于逆流色谱是一种特殊的液相色谱, 它利用特殊的色谱柱实现了液态固定相的有效保留。作为一种真正的液—液色谱, 它与传统的液相色谱、气相色谱有不同的描述方式, 如逆流色谱柱容积、固定相保留率等。

1.4.1 逆流色谱柱容积

逆流色谱柱容积 (V_c) 为固定相所占的体积 (V_s) 与流动相 (V_m) 所占的体积之和, 即

$$V_c = V_s + V_m$$

1.4.2 固定相保留率

逆流色谱柱中固定相的体积所占柱总体积的比率, 称为固定相保留率 (S_F)。

$$S_F = V_s/V_c$$

固定相保留率的大小取决于溶剂系统的组成以及流速、柱转速、螺旋管的 β 值等因素, 固定相保留率通常用百分率表示, 即

$$S_F = V_s/V_c \times 100\%$$

1.4.3 分配系数

逆流色谱分离是基于被分离组分在固定相和流动相之间的分配与传质,因此,分配系数(K_D)是一个非常重要的参数。通常,分配系数被定义为溶质在固定相中的浓度(C_s)与其在流动相中的浓度(C_m)的比值。

$$K_D = C_s / C_m$$

对逆流色谱来说,理想的分配系数一般为 0.5 ~ 3。如果分配系数太小,溶质的保留时间短,溶质很快被流动相洗脱出来,分离度降低。如果分配系数太大,就会使分离时间延长,增加了溶质的扩散而使得色谱峰变宽。

1.4.4 保留体积

组分经过色谱柱的体积称为保留体积(V_R),即从进样到分离峰的最大值所需的流动相体积。当 $K_D = 1$ 时, $V_R = V_c$; 当 $K_D \neq 1$ 时,保留体积可用下面的方程式表示:

$$V_R = V_c [1 + S_F (K_D - 1)]$$

1.5 逆流色谱的应用研究概况

目前国际上已有包括美国国立健康研究院(National Institute of Health, NIH),英国 Brunel 大学,瑞士 Lausanne 和 Geneva 大学,法国 Lyon 大学等研究机构和大学从事逆流色谱技术的研究及应用工作。我国继美国、日本之后开展逆流色谱研究与应用,在 20 世纪 70 年代末,张天佑教授领导的研究团队在国内先行研制了分析型 HSCCC、制备型 HSCCC 和正交轴 HSC-CC 等一系列仪器,并展开了卓有成效的应用研究工作。目前,我国已有几十个大学及科研单位开展逆流色谱的研发与应用研究工作,成为国际上逆流色谱研究及应用研究最为活跃的国家,尤其在天然产物的分离制备方面,做出了非常有特点的研究成果。

随着逆流色谱技术的发展及其影响力的不断扩大,1999 年国际逆流色谱技术委员会成立,从 2000 年起,每隔 2 年举行一次国际逆流色谱学术会议(International Conference on CCC),迄今已经举行了 8 次,其中 2002 年和 2012 年的国际逆流色谱会议分别在北京和杭州举行。国际上重要的色谱学术期刊 *Journal of Chromatography A* 和 *Journal of Liquid Chromatography and Relative Technology* 曾多次出版过逆流色谱技术的论文专辑。自

1995 年以来, 国外已经出版了 5 本英文专著, 我国目前也已出版过 4 本中文的专著^[2,6-8]。应用高速逆流色谱分离天然产物化学成分的报道始见于 1985 年, 到 2005 年达到一个高潮, 在这期间发表了大量的研究论文, 其中我国学者发表的论文数量所占的比例最大。近十多年来, 随着高速逆流色谱技术的发展, 逆流色谱在生物、医药、植化、化工、农业、环境、海洋科学、无机化学等领域显示出越来越高的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Conway WD, Petroski RJ. Modern Countercurrent Chromatography. ACS Symposium Series Vol. 593. 1995.
- [2] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1.
- [3] Martin AJP, Synge RLM. Separation of the higher monoamino - acids by counter - current liquid - liquid extraction: the amino - acid composition of wool. Biochem. J., 1941, 35 (1 - 2): 91 - 121.
- [4] Martin AJP, Synge RLM. A new form of chromatogram employing two liquid phases. A theory of chromatography. 2. Application to the micro - determination of the higher monoamino - acids in proteins. Biochem. J., 1941, 35 (12): 1358 - 1368.
- [5] Craig LC. J. Biol. Chem., 1944, 55: 519.
- [6] 张天佑. 逆流色谱技术. 北京: 北京科学技术出版社, 1991.
- [7] 柳仁民. 高速逆流色谱及其在天然产物分离中的应用. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.
- [8] 张天佑, 王晓. 高速逆流色谱技术. 北京: 化学工业出版社, 2011.

2 高速逆流色谱技术原理及工作方法

2.1 引言

通过对流体静力学平衡体系的研究,发展了一系列非螺旋管式制备型逆流色谱仪;通过对流体动力学平衡体系的研究,开发出螺旋管式逆流色谱仪,这些螺旋管式逆流色谱仪不用旋转密封接头并具有较好的分离效果。在这些仪器的研究过程中,单向性流体动力平衡体系的发现,直接导致了高速逆流色谱仪的产生,这对于高速逆流色谱技术的发展具有十分重要的意义。

高速逆流色谱的发展是基于一种特殊的流体动力学现象——单向流体动力平衡现象^[1,2],该现象是 Ito 教授在研究旋转螺旋管组合的流体动力学平衡状态时偶然发现的。在这样的流体动力学平衡体系中,两种互不混溶的溶剂相在转动螺旋管里单向分布,即其中一相完全占据螺旋管的首端一侧,另一相完全占据螺旋管的尾端一侧。如果进行流动相的高速逆流洗脱,就会导致固定相的流失,从而降低了分离效率。因此,如果要得到更高的固定相保留值,就必须用强的离心力场来强化固定相的保留作用。

Ito 在系统研究不同行星式运动模式与旋转螺旋管组合的流体动力学平衡时发现,在 IV 型同步行星式运动模式下,只有把管子绕到支持件上做成同轴的螺旋管柱,才会形成单向性的两相分布;此外,把长的管子在支持件上绕成多层的同轴螺旋管,形成结构紧凑的长管柱,也能实现单向性分布。因此,高速逆流色谱仪就是由同轴螺旋管与特定的同步行星式运动的支持件组合而成。

2.2 单向性流体动力学平衡逆流色谱原理^[1-3]

单向性流体动力学平衡体系的原理示意图如图 2-1 所示。在这里,为了直观描绘出两相在螺旋管内空间的总的分布情况,把转动的螺旋管画成一根直管。在基本的流体动力学平衡体系中,螺旋管的慢速转动使两相从

首端到尾端均匀分布，任一相的超量都会存留在螺旋管的尾端，因此，用某一相做流动相从首端向尾端开始洗脱时，另一相在螺旋管里的保留量大约是柱容积的 50%，这一保留量会随流动相流速的增大而减小。可见，固定相的流失会降低分离效率。下面要讨论的单向性流体动力学平衡体系就可以解决上述的问题。

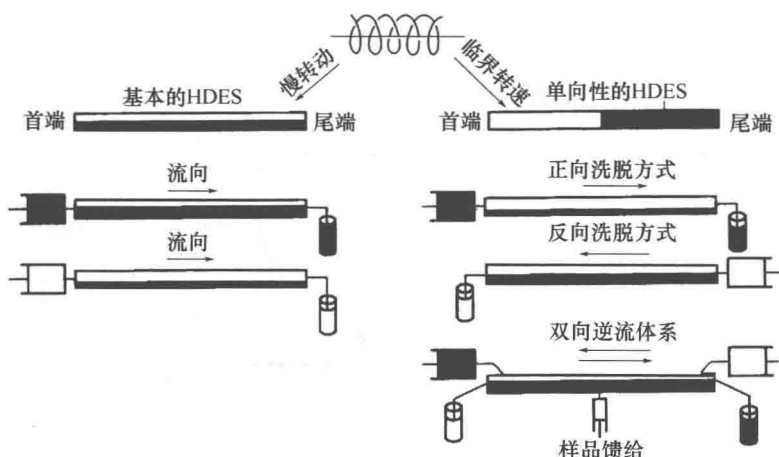


图 2-1 单向性流体动力学平衡体系的原理

当加快螺旋管的转速时，两相的分布状态就会发生变化，这时候，一相将固定地占据螺旋管的首端部分，另一相的超量则占据尾端部分。当转速达到临界范围时，两相就会沿螺旋管长度完全分开，其中一相全都占据首端的一段，通常称之为首相端；另一相全部占据尾端的一段，通常称之为尾相端。这种分布状态如图 2-1 的上部所示。这种两相的单向性分布说明，如果从尾端送入首相相，它会穿过尾端相而移向螺旋管的首端；反之，如果从首端送入尾端相，它会穿过首端相而移向螺旋管的尾端。因此，可以利用这一分布的特性按两种方式实现逆流色谱。其中一种方式是先注满首相相做固定相，然后把尾端相作为流动相从首端泵入。另一种方式是先注满尾端相做固定相，再把首相相作为流动相从尾端泵入。不论采用哪一种方式，都能在流动相高流速的条件下实现固定相的高保留量，使整个体系能在相当短的时间内实现极高的溶质色谱峰分辨率。

如果两相分别从螺旋管相对的两个端头进入，就能实现真正的两相逆向流动，如图 2-1 的右下图所示。在这种情况下，需要在螺旋管的每一个端头增添一条流通管来收集流出物，还要在螺旋管的中部增加一条进样管用来注入样品，这就是双向逆流色谱的基本原理。