目　　录

译者的话……(1)
作者序言……(3)
色谱常用符号与术语表……(7)

第 1 章　绪论 ……(1)

1.1　引言……(1)
1.2　开始前应知道……(2)
1.2.1　样品的性质……(2)
1.2.2　分离的目的……(4)
1.3　样品的预处理与检测 ……(5)
1.4 建立分离……(6)
1.4.1　选择 HPLC 分离模式与起始条件 ……(6)
1.4.2　开始方法建立……(9)
1.4.3　改善分离 ……(12)
1.4.4　可重现的分离 ……(14)
1.5　完善 HPLC 方法 ……(15)
1.5.1　定量与方法论证 ……(15)
1.5.2　解决出现的问题 ……(16)
1.5.3　方法的普适性 ……(17)

第 2 章　分离的基础 ……(21)

2.1　引言 ……(21)
2.2　分离度: 总论……(21)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2.2.1 分离度的测量 …… (23)
2.2.2 最小的分离度 …… (25)
2.3 分离度与各种条件的关系 …… (28)
2.3.1 溶剂强度的影响 …… (30)
2.3.2 选择性的影响 …… (33)
2.3.2.1 改变流动相 …… (33)
2.3.2.2 更换色谱柱 …… (38)
2.3.2.3 改变温度 …… (38)
2.3.3 色谱柱理论板数的影响 …… (39)
2.3.3.1 色谱柱的条件与分离 …… (42)
2.3.3.2 理论板数与各种条件的关系 …… (45)
2.3.3.3 柱外效应 …… (48)
2.4 进样量的影响 …… (50)
2.4.1 体积超载:样品体积对分离的影响 …… (50)
2.4.2 质量超载:样品重量对分离的影响 …… (53)
2.4.3 避免由于样品量太大引起的问题 …… (54)
2.4.3.1 样品浓度太大 …… (54)
2.4.3.2 痕量分析 …… (55)

第3章 检测灵敏度与选择性 …… (59)

3.1 引言 …… (59)
3.2 UV 检测 …… (60)
3.2.1 总论 …… (60)
3.2.2 波长的选择 …… (62)
3.2.2.1 样品吸收值与其分结构的关系 …… (64)
3.2.2.2 流动相吸收值与其组分的关系 …… (68)
3.2.3 信号、噪音与检测精度 …… (71)
3.2.4 提高信噪比,以获得更好的检测精度 …… (74)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

3.2.5 检测器的线性范围 …… (76)
3.2.6 二极管阵列 UV 检测器 …… (77)
3.3 其它 HPLC 检测器 …… (81)
3.3.1 通用型检测器 …… (81)
3.3.2 荧光检测器 …… (83)
3.3.3 电化学检测器 …… (86)
3.3.4 质谱检测器(LC－MS) …… (91)
3.3.5 选择质谱检测器 …… (98)
3.3.6 不常用类型检测器 …… (100)

第 4 章 样品的制备 …… (105)

4.1 引言 …… (105)
4.2 样品的类型 …… (107)
4.3 固体与半固体样品的预处理 …… (113)
4.3.1 降低样品颗粒粒度 …… (113)
4.3.2 干燥样品 …… (113)
4.3.3 滤过 …… (115)
4.4 液体样品的预处理 …… (115)
4.4.1 液－液萃取(Liquid－Liquid Extraction, LLE) (117)
4.4.1.1 理论 …… (119)
4.4.1.2 实践 …… (120)
4.4.1.3 问题 …… (123)
4.4.2 固相萃取(Solid－Phase Extraction, SPE) …… (125)
4.4.2.1 SPE 与 LLE …… (125)
4.4.2.2 SPE 与 HPLC …… (126)
4.4.2.3 SPE 的应用 …… (126)
4.4.2.4 SPE 装置 …… (127)
4.4.2.5 SPE 仪器 …… (131)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

4.4.2.6 SPE 方法建立 …… (132)
4.4.2.7 用柱色谱预处理样品 …… (146)
4.4.3 膜分离(Membrane Separations, MS) …… (148)
4.5 固体样品的预处理 …… (152)
4.5.1 传统的萃取方法 …… (152)
4.5.2 新型的萃取方法 …… (154)
4.5.2.1 超临界流体萃取法(Supercritical Fluid Extraction, SFE) …… (154)
4.5.2.2 微波辅助溶剂萃取法(Microwave - Assisted Solvent Extraction, MASE) …… (159)
4.5.2.3 加速溶剂萃取法(Accelerated Solvent Extraction, ASE) …… (162)
4.5.3 固体萃取的方法比较 …… (163)
4.6 柱切换 …… (163)
4.6.1 操作原理 …… (166)
4.6.2 建立一种柱切换方法: 总的考虑 …… (169)
4.6.3 以柱切换清除样品中杂质的示例 …… (169)
4.7 衍生化 …… (170)
4.7.1 可检测性 …… (172)
4.7.1.1 UV 检测 …… (174)
4.7.1.2 荧光检测 …… (174)
4.7.2 柱前与柱后衍生化 …… (175)
4.7.2.1 柱前衍生 …… (175)
4.7.2.2 柱后衍生 …… (177)
4.7.2.3 用衍生化进行手性分析 …… (177)

第 5 章 色谱柱 …… (185)

5.1 引言 …… (185)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

5.2 色谱柱与柱填料的特性 …… (186)
5.2.1 柱填料……(186)
5.2.1.1 硅胶填充微粒 …… (188)
5.2.1.2 多孔聚合物 …… (193)
5.2.1.3 其它无机填料 …… (195)
5.2.2 色谱柱的构型 …… (197)
5.2.3 固定相……(200)
5.2.3.1 键合硅胶 …… (200)
5.2.3.2 其它固定相 …… (204)
5.2.3.3 RPC 中键合相的保留行为 …… (204)
5.2.4 保留值与选择性变化的原因 …… (216)
5.3 色谱柱的性能指标 …… (218)
5.3.1 理论塔板数……(218)
5.3.2 不对称与拖尾峰 …… (222)
5.3.3 色谱柱失效:色谱柱寿命应有多长? ……(223)
5.3.4 保留值的重现性 …… (224)
5.3.5 压力降……(224)
5.3.6 键合相浓度(覆盖率) ……(225)
5.4 色谱柱问题与解决方案 …… (226)
5.4.1 保留值与分离度重现性不好 …… (226)
5.4.2 谱峰拖尾……(232)
5.4.3 色谱柱寿命……(237)
5.4.3.1 色谱柱滤板问题 …… (238)
5.4.3.2 强保留的样品组分 …… (239)
5.4.3.3 填充不良的色谱柱 …… (239)
5.4.3.4 压力影响 …… (240)
5.4.3.5 化学影响 …… (240)
5.4.3.6 其他因素 …… (240)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

5.4.4 方法建立推荐的色谱柱 …… (243)

第6章 中性样品:反相与正相 HPLC(235) …… (247)

6.1 引言……(247)
第一部分 反相色谱……(247)
6.2 反相色谱的保留……(248)
6.2.1 流动相的影响 …… (249)
6.2.1.1 %B 的选择……(250)
6.2.1.2 流动相强度 …… (253)
6.2.2 色谱柱和柱温的影响 …… (254)
6.3 反相色谱的选择性 …… (256)
6.3.1 溶剂强度的选择性 …… (256)
6.3.2 溶剂类型的选择性 …… (259)
6.3.3 柱类型的选择性 …… (262)
6.3.4 温度的选择性 …… (264)
6.4 反相色谱中非离子样品分离条件的优化 …… (266)
6.4.1 开始……(266)
6.4.2 优化选择性……(267)
6.4.2.1 溶济强度(%B)的影响……(268)
6.4.2.2 溶济类型与%B 的影响 …… (268)
6.4.2.3 混合有机溶剂的使用 …… (269)
6.4.2.4 柱类型与%B 的影响 …… (273)
6.4.2.5 不同溶剂与柱类型的结合使用 …… (274)
6.5 非水反相 HPLC …… (278)
第二部分 正相色谱……(280)
6.6 正相色谱的保留……(283)
6.6.1 一般情况……(283)
6.6.1.1 样品和溶剂的定位 …… (283)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

6.6.2 流动相的影响 …… (285)
6.6.2.1 溶剂强度 …… (285)
6.6.2.2 流动相的选择性 …… (288)
6.6.3 柱类型的影响 …… (290)
6.6.4 温度的影响……(292)
6.6.5 亲水样品的分离中水溶液流动相的应用 …… (293)
6.7 正相色谱中非离子样品分离条件的优化 …… (295)
6.7.1 初始条件……(295)
6.7.1.1 色谱柱的选择 …… (297)
6.7.1.2 流动相溶剂 …… (297)
6.7.2 调整保留值……(298)
6.7.3 优化选择性……(300)
6.7.4 其它考虑……(302)
6.7.4.1 缓缓柱平衡和溶剂分层 …… (302)
6.7.4.2 固定相中水含量的变化 …… (303)

第7章 离子样品:反相,离子对和离子交换HPLC

……(309)
7.1 引言……(309)
7.2 酸性和碱性样品……(309)
7.2.1 酸碱平衡与反相保留 …… (310)
7.2.2 缓冲液的选择 …… (313)
7.2.2.1 缓冲容量 …… (314)
7.2.2.2 缓冲液的紫外吸收 …… (316)
7.2.2.3 缓冲液的其它性质 …… (316)
7.2.2.4 合适的缓冲液 …… (317)
7.2.3 pKa与化合物结构的关系 …… (318)
7.2.3.1 合适的流动相pH ……(319)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

7.2.4 对于离子样品适宜的 HPLC 分离模式 …… (320)
7.3 离子样品反相分离的优化 …… (320)
7.3.1 初始实验……(320)
7.3.2 选择性的控制 …… (321)
7.3.2.1 pH ……(321)
7.3.2.2 溶剂强度(%B) …… (324)
7.3.2.3 溶剂类型 …… (324)
7.3.2.4 柱温……(325)
7.3.2.5 缓冲浓度 …… (326)
7.2.2.6 胺改性剂 …… (326)
7.3.2.7 柱型……(328)
7.3.3 特殊问题……(328)
7.3.3.1 pH 敏感度 ……(328)
7.3.3.2 硅羟基效应 …… (329)
7.3.3.3 温度选择性 …… (331)
7.3.4 总结……(331)
7.4 离子对色谱……(334)
7.4.1 保留机制……(334)
7.4.1.1 pH 和离子对 ……(337)
7.4.1.2 离子对试剂的浓度 …… (337)
7.4.1.3 离子对试剂的类型 …… (340)
7.4.2 初始实验……(342)
7.4.3 控制保留值范围和选择性: 改变%B、pH 和离子对试剂浓度……(343)
7.4.3.1 保留值范围 …… (345)
7.4.3.2 选择性……(346)
7.4.4 其它因素对选择性变化的影响 …… (350)
7.4.4.1 溶剂强度(%B) …… (350)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

7.4.4.2 温度……(351)
7.4.4.3 缓冲液浓度 ……(351)
7.4.4.4 溶剂的类型 ……(351)
7.4.4.5 缓冲液或添加盐的类型 ……(353)
7.4.4.6 胺改性剂 ……(353)
7.4.5 特殊问题……(355)
7.4.5.1 人工峰……(356)
7.4.5.2 柱平衡缓慢 ……(356)
7.4.5.3 峰形较差 ……(357)
7.4.6 总结……(357)
7.5 离子交换色谱……(359)
7.5.1 保留机制……(360)
7.5.1.1 pH 影响……(361)
7.5.1.2 盐或缓冲液的类型 ……(361)
7.5.1.3 有机溶剂 ……(362)
7.5.1.4 柱型……(362)
7.5.2 方法建立……(362)
7.5.3 混合模式分离(mixed－mode separation) ……(363)
7.5.4 硅胶柱……(363)

第8章 梯度洗脱 ……(369)

8.1 引言……(369)
8.2 梯度洗脱的应用……(370)
8.2.1 梯度洗脱用于常规分析 ……(372)
8.2.1.1 样品的保留值范围 ……(372)
8.2.1.2 大分子样品组分 ……(374)
8.2.1.3 晚流出组分 ……(374)
8.2.1.4 增强检测灵敏度 ……(374)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

8.2.1.5 稀样品溶液 …… (374)
8.2.1.6 梯度洗脱的替代法 …… (376)
8.2.2 梯度洗脱用于方法建立 …… (377)
8.2.2.1 用等度还是梯度分离 …… (377)
8.2.2.2 估计最佳等度条件 …… (380)
8.2.2.3 估计最佳梯度条件 …… (381)
8.3 梯度洗脱的原理……(381)
8.3.1 梯度与等度洗脱 …… (383)
8.3.2 梯度变化速率的影响 …… (385)
8.3.3 梯度范围的影响 …… (387)
8.3.4 梯度形状的影响 …… (389)
8.3.4.1 同系物或低聚样品 …… (389)
8.3.4.2 含组峰的色谱图 …… (391)
8.4 建立梯度分离……(392)
8.4.1 选择梯度条件 …… (393)
8.4.1.1 梯度变化速率 …… (393)
8.4.1.2 梯度范围 …… (394)
8.4.1.3 梯度形状 …… (394)
8.4.2 改变峰间距……(394)
8.4.2.1 梯度变化速率 …… (395)
8.4.2.2 溶剂类型 …… (398)
8.4.2.3 其它条件 …… (398)
8.4.3 调整色谱柱条件 …… (400)
8.5 实验问题……(403)
8.5.1 设备对分离的影响:系统的滞留体积……(404)
8.5.1.1 设备差异 …… (404)
8.5.1.2 不同 HPLC 系统分离效果的差异 …… (405)
8.5.1.3 减小设备滞留体积的影响 …… (408)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

8.5.1.4 滞留体积的测定 …… (409)
8.5.2 可重现的分离 …… (411)
8.5.2.1 柱再生……(411)
8.5.2.2 柱平衡……(411)
8.5.2.3 不准确的梯度 …… (412)
8.5.3 基线问题……(413)
8.5.3.1 漂移……(413)
8.5.3.2 人工峰……(414)
8.6 梯度洗脱方法建立的总结 …… (414)
8.6.1 系统方法……(415)
8.6.2 计算机模拟……(416)

第9章 常规样品反相分离的系统方法 ……(421)

9.1 概论……(421)
9.1.1 一些指导原则 …… (424)
9.1.1.1 样品分类 …… (424)
9.1.1.2 初始分离条件:色谱柱和流速……(425)
9.1.1.3 初始分离条件:流动相……(426)
9.1.1.4 其它初始分离条件 …… (427)
9.1.1.5 确保准确的保留数据 …… (427)
9.1.1.6 确保好的柱性能 …… (428)
9.1.1.7 峰跟踪……(429)
9.2 开始……(429)
9.2.1 初始条件……(429)
9.2.2 调整保留值范围 …… (430)
9.2.2.1 等度分离 …… (431)
9.2.2.2 梯度分离 …… (433)
9.2.2.3 弱或强保留组分 …… (435)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

9.2.2.4 强疏水性阳离子 …… (435)
9.2.2.5 复杂样品 …… (436)
9.2.2.6 无样品峰 …… (437)
9.2.3 评价峰型和柱效 …… (438)
9.3 完成等度方法建立 …… (438)
9.3.1 优化保留值和选择性 …… (440)
9.3.1.1 样品 A:简单分离 …… (440)
9.3.1.2 样品 B:典型的分离 …… (442)
9.3.1.3 样品 C:难分离的情况 …… (442)
9.3.1.4 进一步改善分离 …… (448)
9.3.1.5 以后样品方法的改变 …… (448)
9.3.2 优化柱条件 …… (449)
9.4 等度方法建立的另一途径 …… (451)
9.5 完成梯度方法建立 …… (452)

第 10 章 计算机辅助方法建立 …… (457)

10.1 引言 …… (457)
10.1.1 商品化方法建立的软件概述 …… (458)
10.2 计算机模拟软件 …… (459)
10.2.1 改变%B 和柱条件的等度分离 …… (459)
10.2.1.1 利用其它变量改变选择性 …… (464)
10.2.2 其它应用 …… (469)
10.2.2.1 分段梯度 …… (472)
10.2.3 其它应用 …… (472)
10.3 溶剂类型优化软件 …… (473)
10.4 网格—搜索软件(PESOS) …… (477)
10.5 基于分子结构的预测软件 …… (478)
10.5.1 ELUEX …… (480)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

10.5.2 CHROMDREAM ……(482)
10.5.3 特殊目的的程序 ……(482)
10.6 方法的普适性 ……(482)
10.7 峰跟踪 ……(484)
10.7.1 标准品进样 ……(487)
10.7.2 保留值与峰面积的比较 ……(489)
10.7.3 保留值趋势 ……(490)
10.7.4 光谱辨别 ……(490)
10.8 缺陷 ……(492)

第11章 生化样品:蛋白质,核酸,糖类及其有关化合物 …(497)

11.1 引言 ……(496)
11.1.1 一级结构 ……(499)
11.1.1.1 肽和蛋白质 ……(499)
11.1.1.2 低聚核苷酸与核酸 ……(503)
11.1.1.3 改性低聚核苷酸 ……(505)
11.1.2 生化 HPLC 的特殊要求 ……(505)
11.1.2.1 色谱柱 ……(505)
11.1.2.2 样品分子的构象 ……(511)
11.1.2.3 样品回收:质量和生物活性 ……(512)
11.1.2.4 样品预处理 ……(512)
11.1.2.5 样品检测 ……(514)
11.2 肽与蛋白质样品的分离 ……(515)
11.2.1 反相分离 HPLC ……(515)
11.2.1.1 初始分离的较好条件 ……(516)
11.2.1.2 用于改变选择性的参数 ……(520)
11.2.1.3 常见问题与解决方案 ……(525)
11.2.2 离子交换 HPLC ……(527)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

11.2.2.1 初始分离的优先条件 ……(530)
11.2.2.2 改变选择性的参数 ……(534)
11.2.2.3 常见问题与解决方案 ……(535)
11.2.3 疏水作用色谱 ……(535)
11.2.3.1 HIC 分离的优选条件 ……(535)
11.3 低聚核苷酸的分离 ……(537)
11.3.1 离子对 HPLC ……(539)
11.3.2 离子交换 HPLC ……(539)
11.4 尺寸排阻色谱法 ……(542)
11.4.1 SEC 保留的基础 ……(542)
11.4.2 应用 ……(545)
11.4.3 SEC 分离的优先条件 ……(548)
11.4.4 常见问题与解决方案 ……(549)
11.4.5 蛋白折叠 ……(550)

第 12 章 手性分离 ……(557)

12.1 引言 ……(557)
12.1.1 手性衍生化 ……(558)
12.1.2 手性流动相添加剂 ……(560)
12.1.3 手性固定相(CSP) ……(561)
12.1.4 手性识别原理 ……(562)
12.1.5 手性 HPLC 方法建立概论 ……(563)
12.1.5.1 样品信息 ……(563)
12.1.5.2 制备分离 ……(564)
12.1.6 手性柱的选择 ……(565)
12.2 固载化蛋白手性固定相 ……(566)
12.2.1 引言 ……(566)
12.2.2 本底 ……(567)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

12.2.3 手性作用机理 ……(567)
12.2.4 蛋白质手性柱的性质 ……(568)
12.2.5 由流动相调整保留值和选择性 ……(570)
12.2.5.1 流动相有机调节剂 ……(571)
12.2.5.2 pH,离子强度,离子对效应 ……(573)
12.2.6 实验参数 ……(576)
12.2.6.1 流动相的影响 ……(576)
12.2.6.2 样品荷载及进样 ……(577)
12.2.6.3 柱温 ……(578)
12.2.6.4 柱型 ……(578)
12.2.6.5 柱维护及稳定性 ……(578)
12.2.7 应用及特殊技术 ……(580)
12.2.8 系统方法的建立 ……(584)
12.3 多聚糖(碳水化合物)柱 ……(586)
12.3.1 引言 ……(586)
12.3.2 商品化多聚糖固定相的性质 ……(586)
12.3.2.1 一般性质 ……(587)
12.3.2.2 效用 ……(588)
12.3.3 手性分离机理 ……(590)
12.3.4 实验参数 ……(592)
12.3.4.1 流动相的选择 ……(592)
12.3.4.2 柱温和压力的影响 ……(599)
12.3.4.3 柱型和操作 ……(599)
12.3.4.4 进样量 ……(599)
12.3.5 应用 ……(600)
12.3.6 方法建立策略 ……(600)
12.4 给体-受体柱(Pirkle) ……(602)
12.4.1 引言 ……(602)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

12.4.2 商品化的给体－受体 CSP 的性质……(602)
12.4.3 流动相条件……(606)
12.4.3.1 溶剂……(607)
12.4.4 Pirkle CSP 的方法建立……(607)
12.4.4.1 柱……(607)
12.4.4.2 流动相……(607)
12.4.4.3 衍生化……(610)
12.4.4.4 温度和流速的影响……(610)
12.5 空穴型柱……(614)
12.5.1 引言……(614)
12.5.2 使用未衍生化的 CD 柱分离方法的建立……(618)
12.5.2.1 分离模式……(618)
12.5.2.2 反相模式……(618)
12.5.2.3 极性－有机模式和正相模式……(622)
12.5.3 使用未衍生化的环糊精的方法建立……(622)

第 13 章 制备 HPLC 的分离……(631)

13.1 引言……(631)
13.2 建立制备 HPLC 分离法……(633)
13.2.1 一般考虑……(633)
13.2.2 进样量的影响、切触谱带分离……(635)
13.2.3 优化制备 HPLC 条件……(637)
13.2.4 梯度分离……(640)
13.2.5 痕量回收……(640)
13.3 制备 HPLC 的实际方面……(642)
13.3.1 样品溶解度……(642)
13.3.2 设备要求……643)
13.4 制备 HPLC 分离的定量预测……(643)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

13.4.1 一般关系式 …… (643)
13.4.2 色谱柱的饱和容量 …… (645)
13.4.3 梯度洗脱分离 …… (645)
13.4.4 严重超载条件下的分离 …… (646)
13.4.5 异常等温线行为 …… (648)
13.5 制备 HPLC 方法建立的总结和示例 …… (650)
13.5.1 批量制备 HPLC 分离[22] …… (654)

第 14 章 定量(包括痕量分析) …… (659)

14.1 引言 …… (659)
14.1.1 准确度、精密度和线性范围 …… (659)
14.1.2 检测限和定量限 …… (660)
14.2 信号的测量 …… (662)
14.2.1 噪音 …… (662)
14.2.2 峰高 …… (664)
14.2.3 峰面积 …… (664)
14.2.4 峰高与峰面积定量 …… (666)
14.3 定量方法 …… (668)
14.3.1 归一化法 …… (668)
14.3.2 外标校正 …… (669)
14.3.3 内标校正 …… (671)
14.3.4 标准加入法 …… (673)
14.4 定量误差的来源 …… (674)
14.4.1 样品和样品处理 …… (675)
14.4.2 色谱过程的影响 …… (677)
14.4.3 数据系统的影响 …… (678)
14.5 痕量分析 …… (679)
14.5.1 样品制备 …… (680)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

14.5.2 柱分离度 …… (681)
14.5.3 进样 …… (686)
14.5.4 检测 …… (688)
14.5.5 校正 …… (691)
14.5.6 总体策略 …… (692)

第15章 完善方法:论证和移植 …… (699)

15.1 引言 …… (699)
15.1.1 方法论证的一般方案 …… (700)
15.2 准确度(Accuracy) …… (701)
15.2.1 与标准品比较 …… (701)
15.2.2 被测物的回收率测定 …… (702)
15.2.3 标准品加入法 …… (703)
15.3 精密度(Precision) …… (703)
15.4 线性(Linearity) …… (705)
15.5 范围(Range) …… (707)
15.6 检测限和定量限(Limit of Detection & Limit of Quantitation) …… (708)
15.7 专属性(Specificity) …… (710)
15.7.1 掺入潜在干扰物 …… (711)
15.7.2 样品降解研究 …… (711)
15.7.3 峰收集与分析 …… (712)
15.7.4 附加在线检测 …… (713)
15.7.5 色谱交叉检测 …… (713)
15.7.6 改变HPLC条件 …… (715)
15.8 普适性(ruggedness) …… (716)
15.9 强健性(Robustness) …… (716)
15.10 稳定性(Stability) …… (717)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

15.11　系统适用性(SystemSuitability) ……(718)
15.12　论证结果和最终方法的文件形成 ……(719)
15.13　实验室间的交叉研究(可移植性) ……(721)
15.13.1　测定等同性 ……(721)
15.14　方法论证方案……(722)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第1章 绪 论

1.1 引言

随着 HPLC 这一新型分离分析技术的广泛应用，现在每天都有许多色谱工作者在研究使用 HPLC。特定样品的最佳分离条件，只有通过实验才能得到。若从比较好的初始条件开始，往往可在较短时间内得到满意的结果，相反，若随意实验，则只能是事倍功半。尽管各种方法本身有很大差异，但图 1－1 给出的流程图概括了方法建立中所遵循的一般步骤。本章将对这些步骤中的每一步加以详细讨论，为后面章节中更加深入地探讨具体问题做好准备。

今天，人们对色谱分离已有了非常深入的认识，知道随着样品与实验条件的不同分离会如何改变。对 HPLC 方法建立的任何系统研究都应基于这些色谱过程的知识。在大多数情况下，经几次试验即可轻松获得理想的分离结果。只有在极特殊的情况下，才可能需做大量的实验工作。良好的方法建立模式的关键是仅用必要的几次实验，即可得到理想的最终结果。

我们希望不做无用功，即每次实验对最终结果都有帮助。通常，对每一次色谱实验的结果需进行评价，然后再往下进行。无论是否已知样品组分的化学结构，本书中提供的方法建立模式都适用。最后，方法建立应尽可能简单，如有可能，采用计算机模拟的方法也是可行的（见第 10 章）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

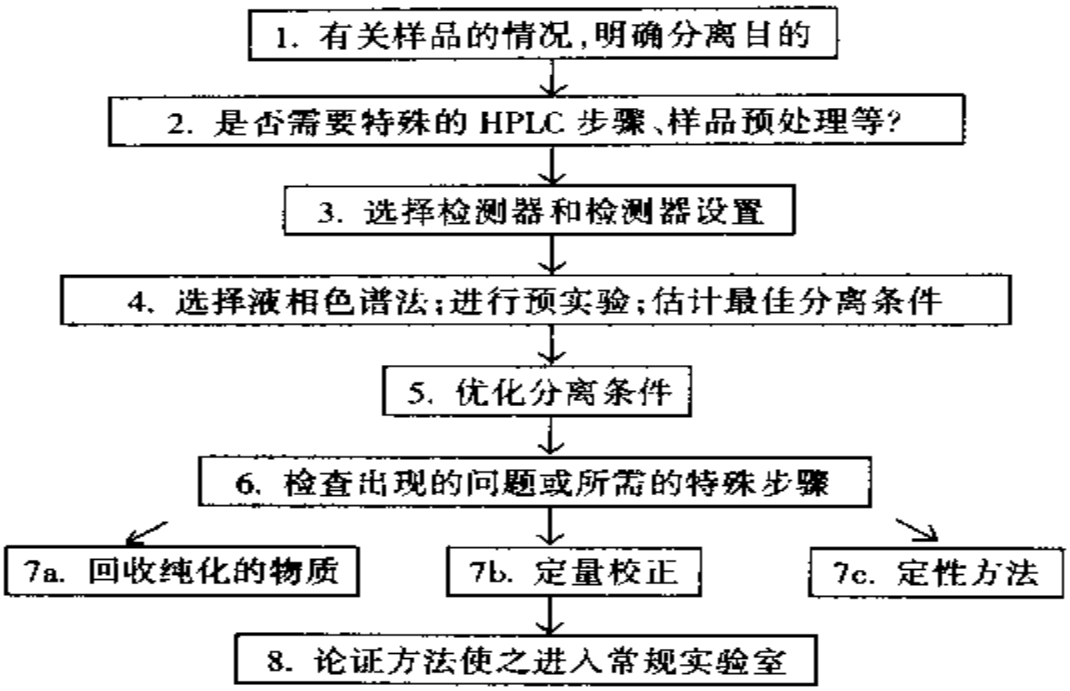


图 1－1　HPLC 方法建立的步骤

1.2 开始前应知道

1.2.1 样品的性质

在开始方法建立之前，我们应检查自己对样品的了解程度，并明确分离目的。表 1－1 中概括了有关样品的重要信息。最好能知晓样品的全部情况，例如某一抗组胺片含有活性成分及多种水溶性赋性剂。在这种情况下，HPLC 分离的目的可能是测定抗组胺药的含量，所以主要应关心会影响其 HPLC 分离的性质。另一种情况可能需分析其原料药的主要成分与杂质。图 1－2 为药用帕非洛尔（化合物 6）原料样品中存在的成分。此时，可能杂质的化学结构可参考制备该种化合物的合成路线，利用已知的副反应推测出其副产物。在帕非洛尔中，总共可能存在 6 种化合物（化合物 3 由于不稳定可以排除）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 1－1　有关样品组分和性质的重要信息

所含化合物的数目
化合物的化学结构(官能团)
化合物的分子量
化合物的 pK_a 值
化合物的 UV 光谱图
化合物在样品中的浓度范围
样品的溶解度

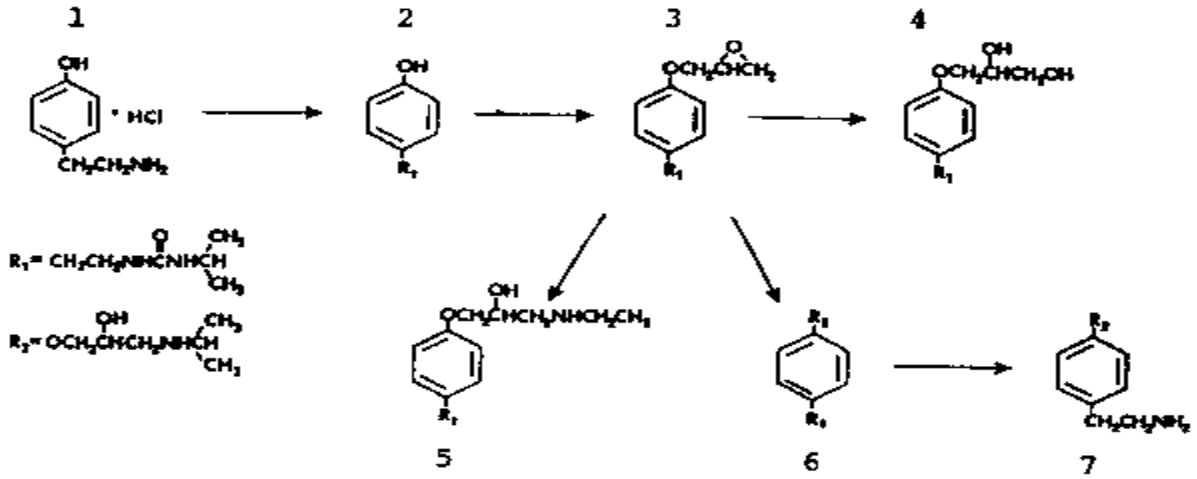


图 1－2 帕非洛尔原料药中存在的化合物[1]。

样品的化学成分能够为选择 HPLC 分离的最佳初始条件提供有价值的线索。根据已知的样品信息，HPLC 方法建立有两种不甚相同的模式。一种模式依据样品的“化学性质”选择最佳初始条件，色谱工作者需很大程度依赖于过去的经验(如类似结构化合物的分离)和/或用文献资料补充现有信息。而另一种模式则直接开始色谱分离，而对样品的性质不大注意。这两种 HPLC 的方法建立模式可分别称为理论型与经验型。初始分离一旦开始，可以根据类似的思路(理论的与经验的)选择进一步的实验。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

HPLC 方法建立用理论法与经验法均能成功，而“最佳”策略则往往是这两种方法的有机结合。本书中所强调的是经验方法，结合最少实验数目技术进行方法建立。不过，我们并不忽视理论及样品的化学组成信息的作用。值得注意的是：在 HPLC 方法建立之初，许多样品的成分不会完全清楚（例如，含有杂质、降解产物、代谢物等的样品），经验法可能是这种情况下的唯一选择。

1.2.2 分离的目的

HPLC 分离的目的必须十分明确，为此，下面的问题在建立方法之初就应确定。

1. 主要目的是定量分析？一种（不希望有的）物质的检出？未知样品组分的确认？还是纯化物质的分离？用 HPLC 分离纯化样品组分进行光谱鉴别或其它目的在第 13 章中讨论。

2. 是否有必要解析出样品的所有成分？譬如可能有必要分离出产品中的所有降解物或杂质，以使含量测定结果更加可靠，但却没必要将它们彼此完全分开。当证明仅用一种 HPLC 方法将样品完全分开有困难时，将样品组分成组分离通常会更容易些。

3. 如要求定量分析，准确度与精密度需多大？样品的主要成分的精密度通常能达到 ±1～2%，特别是不需样品预处理的情况。改善定量精度的手段将在第 14 章中讨论。

4. 该方法应设计多少种不同的样品基质？特殊化合物可能会以不同的样品形式出现（如：原料药，一种或多种形态，环保样品等）。是否需要一种以上的 HPLC 方法？单一（或类似）方法分离不同形态样品是否理想？

5. 一次将分析多少样品？当必须同时处理大量样品时，运行时间将变得非常重要。有时甚至为了缩短运行时间而以牺牲样品分离度作代价，如缩短柱长或加快流速（见第 2.3.3.1 节）。当一次分析的样品数目超过 10 个，运行时间一般应控制在 20min 以

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

内。

6. 即将使用该方法的实验室中，有哪些 HPLC 设备？实验人员操作技能如何？色谱柱能否恒温？HPLC 系统能否做梯度洗脱？该方法是否可在不同设计与生产的设备上运行，尤其是在那些易造成柱外谱峰展宽的老型号仪器上运行（见 2.3.3.3 节）？操作者具有什么 HPLC 经历和培训？

方法建立实验开始之前，应明确对方法的这些要求。

1.3 样品的预处理与检测

样品来源形式不同，可能以如下形式出现：

1. 可直接进样的溶液。
2. 需稀释、pH 缓冲、加入内标或其它定容操作的溶液
3. 必须首先溶解或提取处理的固体。
4. 样品需预处理以除去干扰物和/或保护色谱柱或仪器不受损害。

可直接进样的样品有操作方便、精密度好的优点，然而大多数 HPLC 分析的样品需称重和/或稀释定容后才能进样。当样品溶剂成分接近于流动相时，一般不会产生基线波动等问题，通常能够得到较好的结果。

有些样品在注入 HPLC 前需进行部分分离（预处理），以除去干扰物、浓缩样品或消除“柱杀手”，因此了解样品基质和各种被测物的浓度范围非常重要。许多情况下，建立满足要求的样品预处理方法甚至比完成一次良好的 HPLC 分离更具挑战性。样品预处理在第 4 章中将作详细讨论。

HPLC 方法建立期间，在第一次进样前，我们必须有把握所选择的检测器能检测到所有的被测样品组分。通常首选可变波长紫外（UV）检测器，因这种检测器使用方便，且可用于大多数样品。UV 光谱信息对方法建立具有举足轻重的地位，UV 光谱数据可从

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

文献中查找，也可通过所测样品成分的化学结构估算；直接测得（如果可拿到化合物纯品）或在 HPLC 分离期间用二极管阵列检测器（PDA）得到。样品对 UV 检测响应不足时，可考虑使用其它类型检测器（荧光，电化学等），或衍生化样品使检测信号增强。在第 3 章中，将详细讨论与样品检测有关的问题。

1.4 建立分离方法

1.4.1 选择 HPLC 分离模式与起始条件

首次分离实验条件的选择可采用图 1－3 推荐的策略要点。知道了样品组成与分离目的，下面首要的问题是：哪种色谱模式用于该样品最有希望得到理想的结果？本书中，我们假设已选定了 HPLC 分离模式，但对具体样品，应在对多种分离模式进行考察后再作决定，可参阅文献 2～8 的讨论。

如果选定了 HPLC 分离模式，下一步（图 1－3）可将样品分为一般样品或特殊样品。一般样品为小分子（< 2000Da）典型混合物，用近乎标准化的起始条件即可分开。否则（或样品特殊时）需用特殊的色谱柱和特定的条件才能很好地分离，见表 1－2 中的评述。无机离子样品和合成聚合物样品的分离在本书中不作讨论，可参见文献 8 和 9。

一般样品可进一步分为中性或离子样品。离子样品包括酸、碱、两性化合物和有机盐类（电离的强酸或强碱）。表 1－3 总结了适合一般样品首次（反相）分离的实验条件。如样品为中性，一般不需在流动相中加缓冲液或添加剂，但对于酸或碱性样品，通常需在流动相中加入缓冲剂。碱性或阳离子样品，推荐用“弱酸性”的反相色谱柱（见 5－2 节），流动相中加入胺添加剂可能对分离有利。首次实验完成后，再按照下述讨论系统地加以进一步完善。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

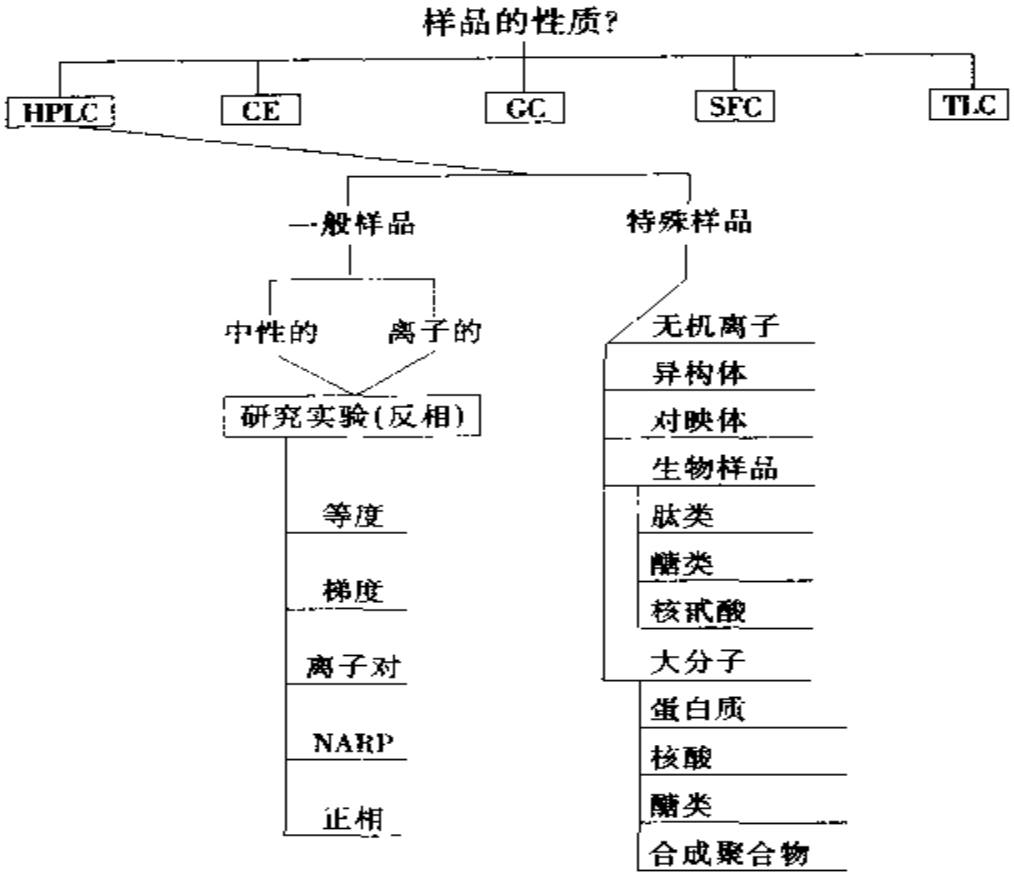


图 1－3 利用样品的有关信息,选择初始实验分离条件

表 1－2 特殊样品的处理

样 品	要 求
无机离子	检测为主要问题;使用离子色谱[9]。
异构体	有些异构体能用反相 HPLC 分开,可分为一般样品类中;用(1)正相 HPLC 或(2)环糊精－硅胶色谱柱的反相分离能较好地分离异构体(见第 6 章)。
对映体	分离这些化合物需要"手性"条件;见第 12 章。
生物样品	多种因素如分子构象,极性官能团和宽范围的疏水性使这种样品很"特殊",见第 11 章
大分子	"大"分子需要大孔径的色谱柱填料(≫10nm 孔径);另外,生物分子(第 11 章)也需这种特殊条件。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 1－3　首次 HPLC 分离的较好实验条件

分离条件	较好的首要选择
色谱柱	
尺寸(长度,内径 ID)	15×0.46cm
粒度	5μm[a]
固定相	C_8 或 C_{18}
流动相	
溶剂 A 和 B	缓冲液－乙腈
%B	80～100%[b]
缓冲液(化合物、pH、浓度)	25mM 磷酸钾,2.0＜pH＜3.0[c]
添加剂(如胺改性剂、离子对试剂)	开始时不用[d]
流速	1.5～2.0mL/min
温度	35～45℃
样品大小	
体积[e]	＜25μL
重量[e]	＜100μg

[a] 3.5μm 微粒为另一选择(见第 5 章),用 7.5cm 色谱柱。
[b] 用于初始等度分离;初始用梯度实验较好(见 8.2.2 节)。
[c] 中性样品不需缓冲液;如 pH＜2.5,建议用 pH 稳定的色谱柱(见 5.4.3.5)。
[d] 见 9.1.1.3。
[e] 小体积色谱柱(如 7.5×0.46cm,3.5μm)需要的量更小。

在图 1－3 首次实验的基础上,等度或梯度洗脱均可作为合适的方法(见 8.2.2 节)。这时,也可能明显地看到典型的反相条件不能使样品足够保留,说明应用离子对 HPLC(见 7.4 节)或正相 HPLC(见第 6 章第 II 部分)。当样品以乙腈为流动相时被强保留,可试用非水反相色谱(NARP)或正相 HPLC(见 6.6～6.8 节)。表 1－4 总结了反相与其它 HPLC 方法的一些特性,更深入的讨论见第 6、7 与 11 章。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 1－4　主要 HPLC 方法的特性

方法/特点/色谱柱[a]	何时应该使用该方法?
反相 HPLC 流动相:水－有机溶剂 色谱柱:C_{18}(ODS)、C_8、苯基、三甲基硅烷(TMS)、氰基	能溶于水－有机混合液的大多数样品,尤其是中性或非离子化合物的首选
离子对 HPLC 流动相:水－有机溶剂,控制 pH 的缓冲液和离子对试剂 色谱柱:C_{18}、C_8、氰基	离子或可电离的化合物,尤其是碱或阳离子样品的良好选择
正相 HPLC 流动相:有机溶剂混合液 色谱柱:氰基、二醇基、氨基、硅胶	当反相或离子对 HPLC 无效时的第二个良好选择;不溶于水－有机混合液的亲脂样品的首选;异构体混合物和制备规模 HPLC 的首选(最好用硅胶)

[a] 此处推荐的所有色谱柱(除了未键合硅胶)均用键合相硅胶微粒装填(见第 5 章)。本表为典型代表,但并非详尽无遗。

当分离目的是为了分离制备纯样品时,优化的最终 HPLC 方法将不同于用于常规定量分析的方法。然而,方法建立开始时对两种情况的操作完全一致,如用标准直径(0.4～0.5cm ID)的色谱柱和表1－3 的其它条件。这种分离模式将在第 13 章中作详细讨论。

1.4.2 开始方法建立

本书中除非另有说明,我们都假设样品为一般样品(不是表 1－2 中的特殊样品)。尽管特殊样品所需的起始与最终条件与表 1－3 中列出的用于一般样品的实验条件有所不同,但一般样品与特殊样品方法建立的总策略是相似的。因此,我们对分离一般样品的讨论在特殊样品方法建立的许多方面也是可行的。

用表 1－3 的起始条件,在首次进样之前,唯一需做的选择是流动相中的有机调节剂比例(%B)。选用平均溶剂强度的等度流动相(例如 50%B)可能会存在一些问题,如图 1－4a 中三嗪除莠

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

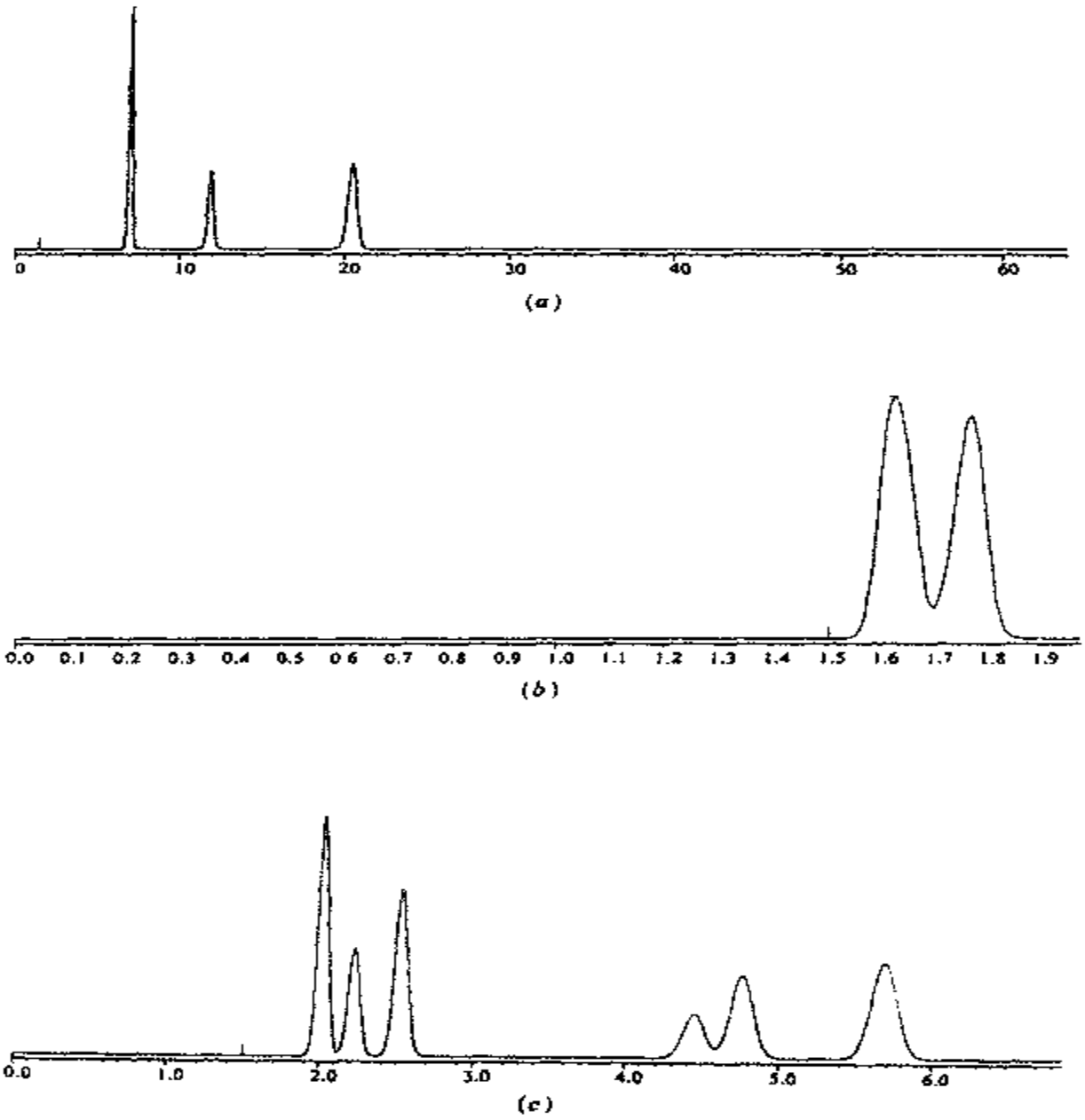


图 1－4 流动相条件对三嗪除莠剂混合物分离的影响[11,12]

条件：25×0.46cm C_{18}柱；甲醇－水流动相；室温；1.7mL/min。(*a*)50% B；(*b*)100% B；(*c*)80% B；(*d*)60% B；(*e*)20min 梯度，5 →100% B；(*f*)70% B (等度)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

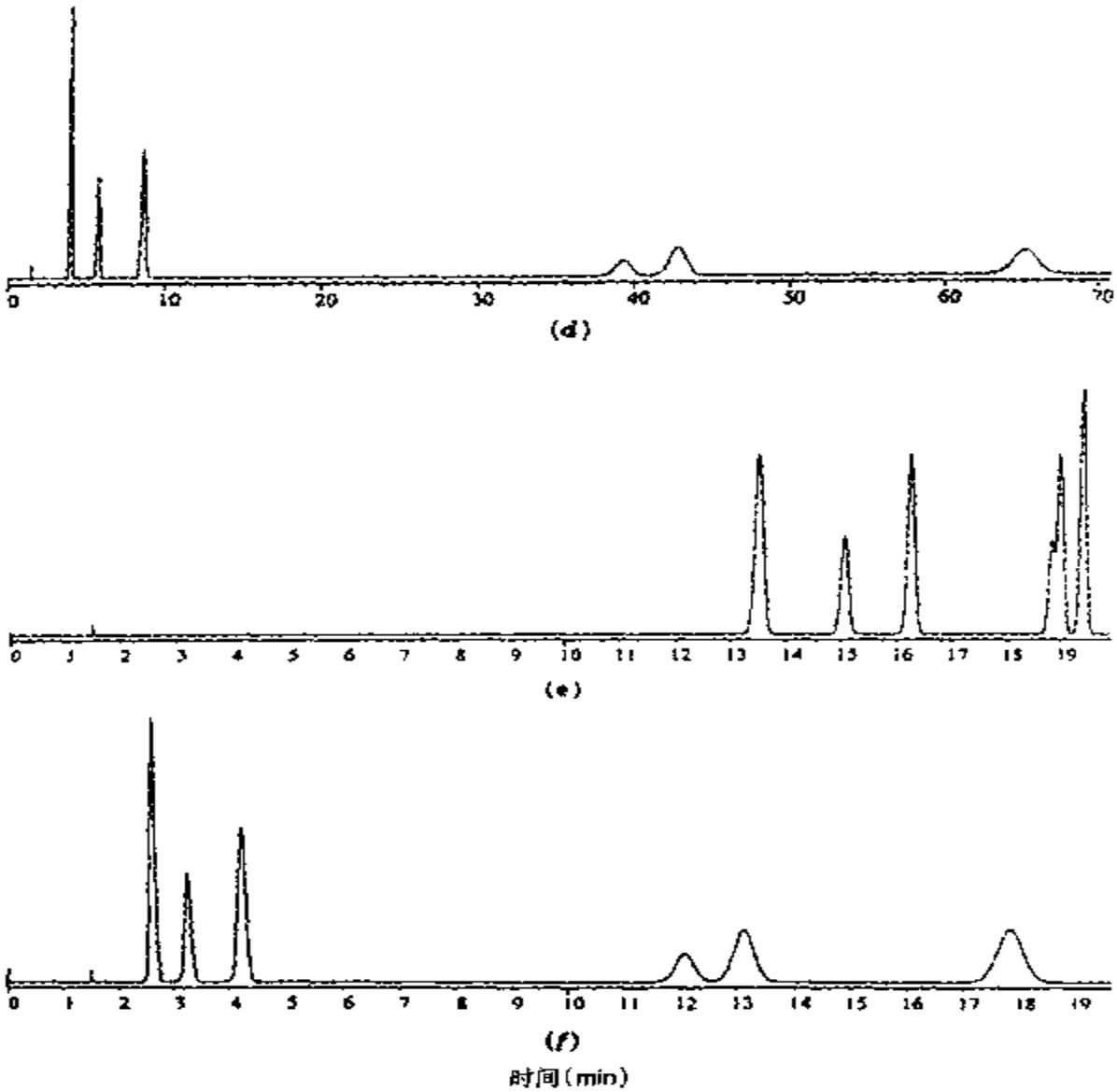


图 1－4(续)

剂混合物的分离(图 1－4 的分离为基于实验 HPLC 数据的计算机模拟结果[11,12])。图 11－4*a* 中有 3 个分离良好的谱峰。然而,该样品共含有 6 种组分;用这种流动相,最后的三个谱峰在 2～4 小时流出,其中有的已展宽得几乎看不到。所以由该实验会很容易(错误地)得出这样的结论:图 1－4*a* 中的样品仅有 3 种组分或者这 6

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

种化合物中有些没有分开。

针对图 1－4*a* 所示的问题，通常不推荐用中等强度的流动相开始方法建立（如图 1－4*a*）。更好的选择是先用非常强的流动相（如 80%～100% B），然后按需要降低% B，见图 1－4*b*～*d*。用 100% B 的起始分离（图 1－4*b*）导致全部样品快速流出，但仅分出两组谱峰。降低溶剂强度至 80% B（图 1－4*c*），所有 6 个谱峰快速分离。再降低至 60% B（图 1－4*d*）会使分离度得到改善，但运行时间也显著增加，最末峰变宽，检测灵敏度降低。

另一种有别于起始等度分离的方法是梯度洗脱，见图 1－4e 的分离。在 8.2.2 节中将说明起始用梯度分离的许多优点。比如，可能会（1）确定最好的方法是用等度还是梯度洗脱，（2）估计出下一次实验（等度）的最佳溶剂强度。开始时使用梯度分离对方法建立也有利，与采用强溶剂的等度分离相比，梯度分离一般使样品分离得更好（请参阅图 1－4*b* 与图 1－4*e*）。

1.4.3 改善分离

通常，第 1 或第 2 次实验不能够使组分得到充分分离。再经过数次实验，尤其是看不到进一步的改善时，可能会接受勉强合格的分离。然而，有经验的色谱工作者懂得：一个良好的分离，特别是将用于日常分析去检测众多样品时，各组分谱峰仅达到最起码的分离是不够的，必须综合考虑分离的几个方面（详见表 1－5）。

在 HPLC 定量分析中，分离开（见 2.2 节）是首要要求。基线分离是提供精确结果的有效保障，含有 5 个组分或更少的样品，使谱峰之间达到基线分离（$R_s > 1.5$）一般较为容易。分离度会随色谱柱的使用时间逐步降低，也会由于分离条件的微小波动而在不同时间有所变化，因此在建立简单混合物的分离方法时，最好使 $R_s \geq 2$。这样的分离度将有利于改善测试精度和方法的普适性。含 10 种或 10 种以上组分的样品，分离一般会很困难，目标分离度往往必须降低至 $R_s > 1.0 \sim 1.5$。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 1－5　HPLC 方法建立的目标

目　　标[a]	评　　论
分离度	精密和普适性好的定量分析要求 $R_s > 1.5$
分离时间	＜5～10min 时日常工作较理想
定量	含量测定：≤2%（1SD）；要求不高的分析：≤5%；痕量分析：≤15%
压力	（如果为新柱）＜150bar 最好，＜200bar 通常是基本的要求
峰高	大信噪比的窄峰最好
溶剂消耗	每次运行少用流动相最好

[a]大约按重要性递减排列，但因分析要求不同而异。

有些 HPLC 测定不必使全部被测组分达到基线分离，这种情况最常见于所测样品中可能存在数种化合物但仅需检测其中的一种时。比如在普查水或土壤样品中的某污染物（如定性分析不同的除莠剂）时，仅需要分离出个别除莠剂，确定其特征保留时间进行峰鉴别即可。另一示例为蛋白质测序提供的乙内酰苯硫脲（PTH）－氨基酸样品。每一样品对应的蛋白质分子中去除的单个氨基酸，需要鉴别出该氨基酸（为其 PTH 衍生物）。由于鉴别特征化合物所需要的只是保留时间上的足够差异，因此没必要使每个 PTH－氨基酸彼此间达到基线分离，见图 1－5*a*。色谱图中有数个峰对未基线分开，但并不影响准确鉴别每种 PTH－氨基酸。

分离所用时间（运行时间 ≈ 最末谱峰的保留时间）应尽量缩短。假设表 1－5 中的其它目标已基本达到，方法建立所需的总时间应较为合理。典型的 HPLC 步骤所需工作时间 2 小时左右（即配制流动相、安装与平衡色谱柱、稳定基线、重复注入标准品以确证精密度、可重现的保留值、以及可接受的分离），如果一次仅测定 2～3 个样品，运行时间在 20～30min 之间较为合理，但如一次需测定 10 个或更多的样品，运行时间最好在 5～10min 之间。尽管极快的分离一般不会有害，但没有理由寻求 1min 或更短的运行

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

时间。过程控制的在线监测可能对 1min 或更短的运行时间有兴趣，但只是一个例外。

尽管大多数 HPLC 设备能在更高的压力下工作，使用新色谱柱的工作压力不应超过 170bar(2500psi、17MPa)，压力上限最好在 2000psi 以下。限制该压力基于两点原因：第一 随着色谱柱的使用，微粒杂质会逐步堵塞柱头，使柱压成倍升高；第二 较低的压力(< 170bar)适于泵、进样阀、尤其是自动进样装置的稳定工作，密封垫的寿命更长，色谱柱堵塞的情况减少，系统的耐久性明显提高。因此，最好以小于泵的最大允许压力的 50% 作为目标压力。

当以表 1－3 的优选条件开始方法建立时，许多样品仅需调节流动相的强度(% B)即可使分离达到要求。图 1－4*f* 所示除莠剂样品的分离中以 70% 甲醇－水流动相得到了良好的分离度(R_s > 1.8)，合理的运行时间(18min)，最末峰易于检测，定量精确。其它样品可能需进一步的实验工作，包括改变选择性或改善色谱柱条件(柱尺寸、粒度和流速)；见第 2 章的讨论。

当遇到挑战性更强的样品，或分离目的特别苛刻时，可能需大量的方法建立实验才可获得满意的分离。有些情况下，由于工时与费用的限制，用严格的实验方法进行方法建立已不现实。在过去的十年中，计算机模拟[11,12]在 HPLC 方法建立中作为公认的工具出现。通过少数实验得到的信息，经计算机模拟或“优化”，可预测大量其它条件的分离结果。譬如，仅进行两次图 1－4 所示的梯度分离，便可以预测不同% B 条件下的等度和梯度分离结果。计算机模拟在第 10 章中将作详细讨论。

1.4.4 可重现的分离

按如上所述方法进行实验时，能够重现每次实验色谱图是非常重要的。在方法建立过程中改变实验条件（流动相、色谱柱、温度）时，必须经过足够长的时间使色谱柱在新流动相和温度下达到平衡。通常以 10 ～ 20 倍柱体积的新流动相冲洗色谱柱后，色

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

谱柱可达到平衡。然而，应在同一条件下经过重复实验才能得到证实。当前后两次重复实验的保留时间恒定后（±0.5%或更好），可认为已经达到柱平衡，实验可以重现。对反相分离来说，当更换的两种流动相中有一种含有的有机调节剂< 10%时，则需较长的平衡时间[13]。

不能确保色谱柱平衡和色谱图重现，是 HPLC 方法建立中的一大障碍。基于这种实验结果，用计算机预测保留值和分离时（第 10 章），将会得出错误的结论。某些反相 HPLC 条件：如流动相中添加碱性修饰剂或离子对试剂，用四氢呋喃作溶剂或用不含有机溶剂的流动相时，达到柱平衡常需较长时间。

1.5 完善 HPLC 方法

最后的实验方案应达到方法建立开始时所设定的所有目标。方法本身在日常工作中应经受住考验，应适用于所有的相关实验室以及人员。

1.5.1 定量与方法论证

许多 HPLC 步骤将用于日常的定量分析。如第 14 章中所讨论，准确的结果需要使用标准品和校正步骤。一旦完成了 HPLC 方法建立，应对其进行论证，见表 1－6 和第 15 章的讨论。进行全面论证通常需通过简略核查方法的专属性、线性、准确性、精密度、回收率、灵敏度等而实施。在最终论证方法之前，应准备和检查书面分析方案，使之清晰、严密。实际的论证程序按方法的重要性不同，需时为 1 天～2 周不等。理想的情况是，通过方法论证能找出可能因仪器和操作者的不同而导致的潜在问题。

在日常 HPLC 分析中，柱间重现性可能是主要问题之一。实验不同批号的色谱柱，以证实方法的重现性。任何意外的结果都应进行研究，以找出其原因，避免在日后的工作中出现同类错误。最后，不同实验条件对分离的影响应该设定为保证方法普适性的一个组

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 1－6　完善方法[a]

1.应预备数据表明所需方法的性能。
2.应有为其它操作者使用的书面分析步骤。
3.以一个以上的系统或操作者,用包括期望组分和期望被测物浓度的样品系统地论证方法的性能;比较不同时间和不同实验室之间的实验数据。
4.应得到色谱柱的期望寿命以及柱间重现性的数据。
5.研究不正常的结果,以纠正潜在的问题。
6.研究所有影响分离的条件(温度、流动相组成、pH 等);规定这些条件的限度;对可能发生的问题(关键谱峰对分离不足;随运行时间延长,最末谱峰保留值增加等)提出建议措施。

[a] 主要用于日常工作或质量监控方法

成部分(见 1.5.3 节)。

表 1－6 的要求适用于满足精密准确、稳定可靠并可移植转让的严格 HPLC 标准方法。在其它情况下，可能只要求一次成功的分离或能快速、“粗略”地答复某一特定问题，此时可免掉表 1－5 和表 1－6 中的许多建议，图 1－1 中一些步骤也可能是不必要的，仅明白并知道一个方法建立方案的真实目标就足够了。

1.5.2 解决出现的问题

随着方法建立的进行，会出现各种问题，其中有些已在表 1－7 中列出，其它的问题包括：开始时色谱图中有的谱峰可能比所期望的要宽(塔板数低),或谱峰严重拖尾;在方法应用中还会发现用同一(或不同)厂家的“规格相同”色谱柱替代原柱后,分离情况会变得难以接受,常规实验室无法用(规格相同的)另柱重复此方法；色谱柱寿命也可能很短（如进样不足 100 次即不能再用)；(同一色谱柱)重复进样的色谱图不一样,定量精度较差,保留时间从一系列运行的开始直至结束一直漂移；在后面样品的色谱图中可能出现了其它峰,干扰被测物测定等等。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 1－7　方法建立和论证期间可能出现的问题

问　　题	评　　论
塔板数低	色谱柱选择不对，二次保留、峰形不好的影响（见第 5 章）。
色谱柱易变性	色谱柱选择不对，二次保留的影响（见第 5 章）。
色谱柱寿命短	色谱柱选择不对（见第 5 章），样品需预处理（见第 4 章），pH＜3 或 pH＞7。
保留值变化	色谱柱平衡不够（见 6～8 章），样品需预处理（见第 4 章），键合相流失（见第 5 章）。
定量精度差	需更好地校正，找出误差的来源（见第 14 章）。
出现新的干扰峰	初始分离不够或初始样品无代表性。

对于将长期使用的常规方法，最好在正式应用之前，对这些问题进行预测并加以改善。进入日常应用后才发现方法性能不好是不愿看到的情况，方法重现性差会影响质量控制或生产实验室的工作。本书将通篇讨论这些问题。另外有关诊断与修正 HPLC 方法的问题，请参阅文献 14。

1.5.3 方法的普适性

普适性好的方法指能容忍实验条件的微小变化、一般色谱工作者容易掌握、应用时也不必使用同一 HPLC 系统的方法，可移交他人使用。在论证期间，方法的普适性可通过深入细致地试验该方法加以确证；也可将其设计成一种程式，研究不同条件对分离的影响。该程式说明见图 1－5 中 20 种 PTH－氨基酸的分离。图 1－5*a* 所示为全样品的分离；图 1－5*b* ～ *d* 所示为改变操作条件对分离各种关键谱峰对的影响。比如，图 1－5*d* 中，pH 仅改变 0.2 单位，D 峰即发生了变化，与 T 或 G 峰重叠在一起。

图 1－5 中的数据可用于说明多方面问题。首先，这些色谱图明确了受不同条件的影响时，需分离的关键谱峰对；同时也明确

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

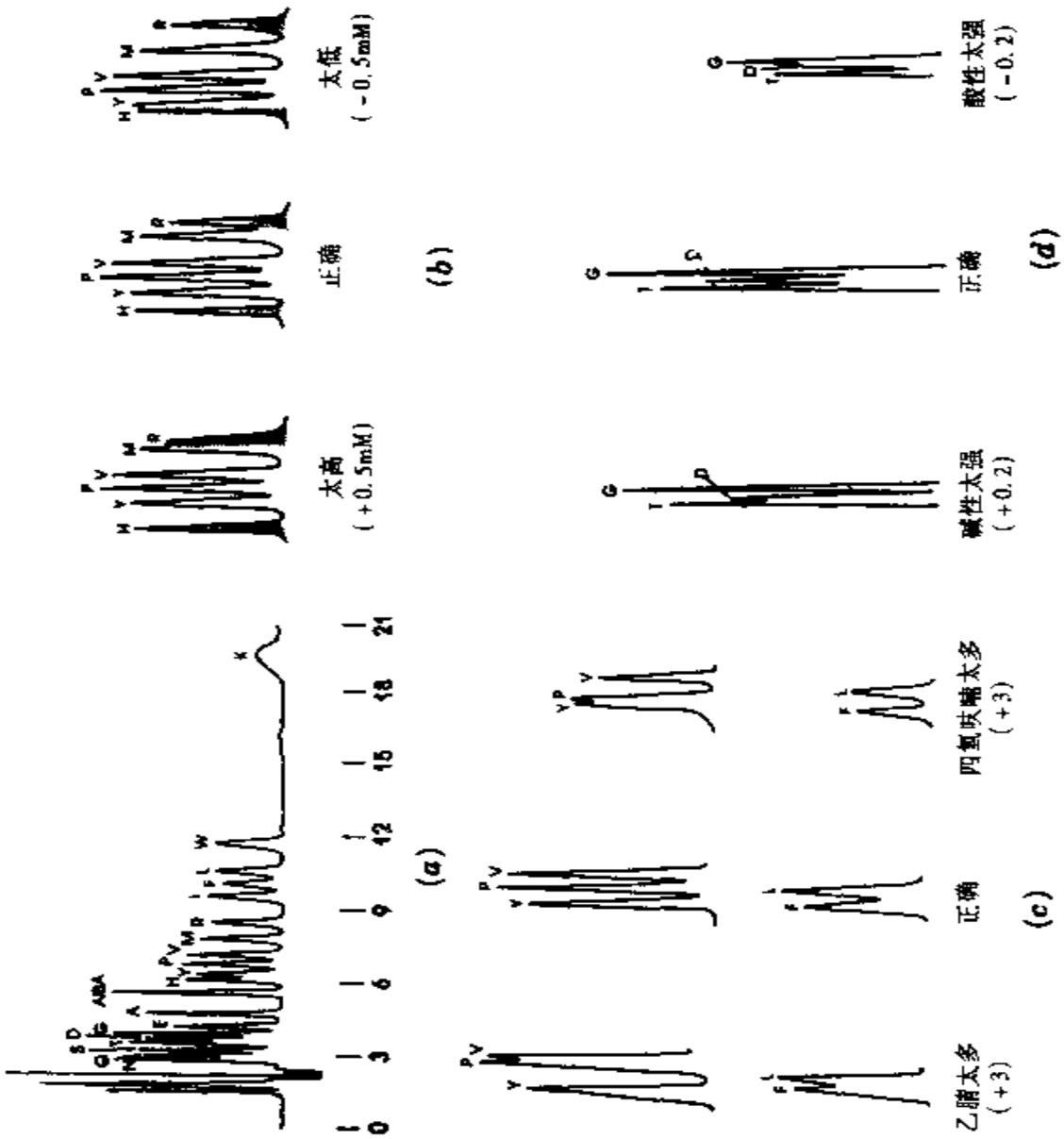


图 1－5 通过对分离作图，观察不同色谱条件与提高方法普适性的关系。

样品：PTH 氨基酸。条件：25×0.46cm Zorbax PTH 色谱柱；流动相为 34% B，A 为 6mM 的磷酸盐缓冲液，pH 3.15，B 为 53% 乙腈－THF；35℃；1.4mL/min。谱峰鉴别（W，L，F，...）为氨基酸的通用术语（见图 11－2）。（*a*）全样品的分离；（*b*）缓冲液浓度对分离 H/Y 和 M/R 谱峰对的影响；（*c*）乙腈－THF 比例对分离 Y/P/V 和 F/L 谱峰对的影响；（*d*）pH 对分离 T/D/G 谱峰对的影响。（摘自杜邦 Zorbax PTH 色谱柱使用者指南。）

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

了流动相组成的允许误差。图 1－5d 表明必须控制 pH 在 ±0.1 单位，组分的分离才合格。第二，图 1－5*a* 的分离不足时找出其原因。例如 如果 T 峰和 D 峰分离得不好，结论是 pH 值有可能过高（图 1－5*d*）。也可用图 1－5*d* 估计必须变化多大的 pH 才能使这两谱峰重新分开。最后，如是新色谱柱引起的分离变化，新柱的保留性质与原柱的不一样，用图 1－5 的数据作指导，能调整条件以改善分离。研究分离与条件的关系对那些难以驾驭的参数特别重要（如色谱柱不能恒温的 HPLC 方法的温度变化）。同样，精确至 ±0.05 或以下的 pH 难以测定；许多分离在 pH 发生如此小的变化时，保留值的变化已难以接受了，10.6 节将讨论如何用计算机模拟提高普适性。在后面的章节中，我们将更详细地讨论 HPLC 的方法建立，并展现与该题目有关的其它背景材料。

参考资料

1. S. O. Jansson and S. Johansson, *J. Chromatogr.*, 242 (1982) 41.
2. E. Heftmann, ed., *Chromatography*, 5th. ed., Elsevier, Amsterdam, 1992.
3. C. F. Poole and S. K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1991.
4. R. L. Grob, ed., *Modern Practice of Gas Chromatography*, 3rd ed., Wiley－Interscience, New York, 1995.
5. R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, San Diego, CA, 1993.
6. J. G. Kirchner, *Thin－Layer Chromatography*, 2nd ed., Wiley－inter－science, New York, 1978.
7. M. L. Lee and K. E, Markides, eds., *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*, Chromatography Conferences, Inc., Provo, UT, 1990.
8. H. Small, *Ion Chromatography*, Plenum, New York, 1989.
9. W. W. Yau, J. J. Kirkland, and D. D. Bly, *Modern Size－Exclusion Liquid Chromatography*, Wiley－interscience, New York, 1979.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

10. T. Braumann, G. Weber, and L. H. Grimme, *J. Chromatogr.*, 261 (1983) 329.
11. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 65.
12. J. W. Dolan, D. C. Lommen, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 91.
13. Z. Li, S. C. Rutan, and S. Dong, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 124.
14. J. W. Dolan and L. R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Humana Press, Totowa, NJ, 1989.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第2章　分离的基础

2.1 引言

大多数色谱工作者都知道改变实验条件对 HPLC 色谱图会有何种影响。在反相分离中(见 6.2 节),增加流动相中的有机溶剂比例(%B)会缩短分析时间,但通常也会使谱峰重叠加剧。如果降低流速,则会增加分析时间,但分离结果一般会更好。有时(但并非总是)更换色谱柱会改善分离。对分离条件影响色谱图规律的认识取决于色谱工作者所受培训及其实践经验,但这种关于 HPLC 规律的知识往往只在特定情况下才发挥作用,也就是说,我们的知识对实际工作可能有较大帮助,也可能帮助甚少。在本章中,我们讨论 HPLC 分离的一些基础知识:有助于保证开始方法建立时方向的正确性。同时还会介绍许多后面章节中采用的重要术语与定义。

2.2 分离度:总论

图 2-1*a* 所示为 6 种组分部分分离的色谱图。其中谱峰 1 和 4 与其它组分分离很好,但谱峰 2、3 及 5、6 有部分重叠。色谱工作者用相邻谱峰的分离度 R_s 来衡量如图 2-1*a* 中组分的分离质量。重叠严重的谱峰,其 R_s 很小:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \tag{2.1}$$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

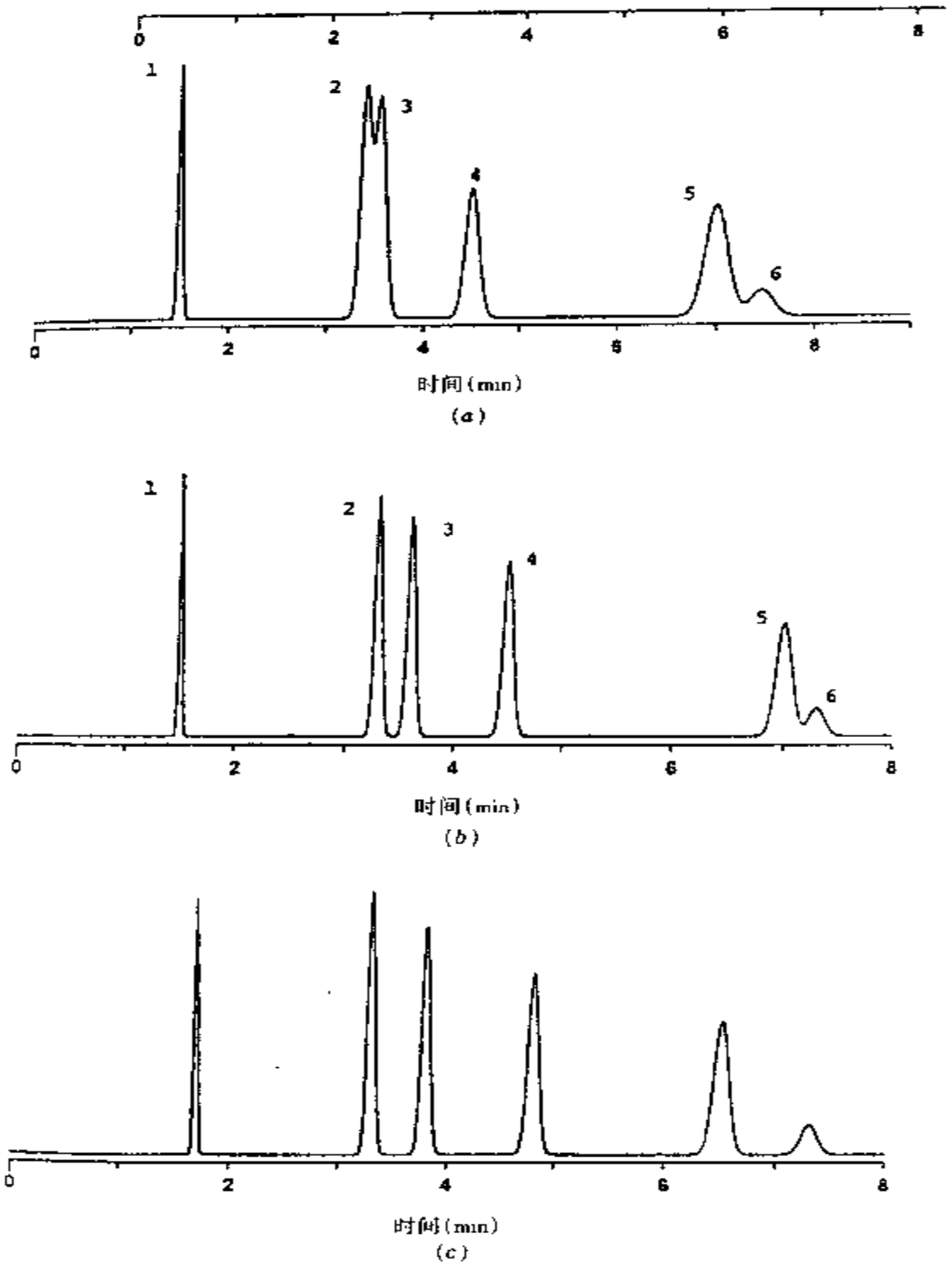


图 2－1　假想样品的 HPLC 分离

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

式中 t_1 与 t_2 分别为两相邻谱峰的保留时间，W_1 与 W_2 为它们的基线峰宽。图 2－2 所示为两相邻谱峰分离度 $R_s=1$ 时的情况。分离度 R_s 等于两峰中心之间的距离除以平均峰宽。为增加分离度，必须使两相邻峰分离更远，或者减小谱峰的宽度。

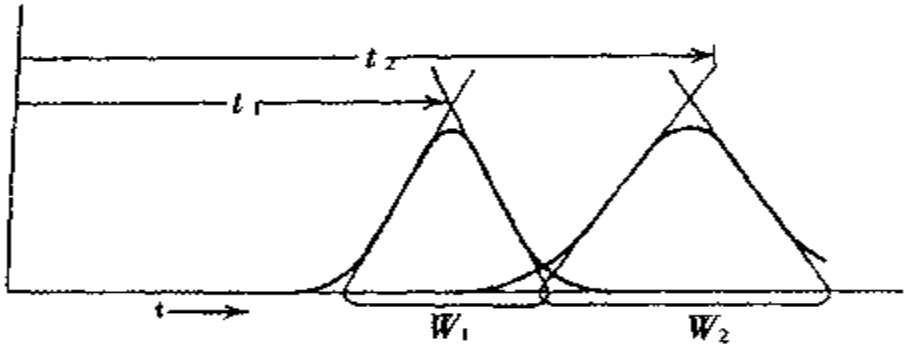


图 2－2　两相邻谱峰 1 与 2 分离度的计算

2.2.1 分离度的测量

估计或测量分离度的方法有三种：

1. 按式 2.1 计算
2. 与标准分离度曲线相比较
3. 按两谱峰之间的峰谷计算

当谱峰分离良好时，能准确测得保留时间与峰宽，可用式 2－1 计算分离度。基线宽度 W 的人工测量包括(1)对每一个谱峰的两条边作切线，(2)测量这些切线与基线交点间的距离(图 2－2)。该测量开始有些难以掌握，可能使 R_s 的测定不精确。另一种方法所得的 R_s 值较可靠：在半峰高处测定谱峰 1 和 2 的峰宽 $(W_{1/2})_1$ 和 $(W_{1/2})_2$（$W_{1/2}$，见附录 Ⅰ中图 Ⅰ－1，）。那么：

$$R_s=\frac{1.18(t_2-t_1)}{(W_{1/2})_1+(W_{1/2})_2} \tag{2.2}$$

当 R_s 小于 1 时，用式 2.1 或 2.2 计算 R_s 都可能不准。

也可将两个相邻谱峰与标准分离度曲线比较，以测定 R_s 值。该方法不需任何计算，相当方便，并能用于重叠峰($0.4<R_s<1.3$)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

标准分离度曲线的应用见图 2－3 的说明。两重叠谱峰的“理想”形式可以根据谱峰的相对大小和分离度的关系进行计算(假设为高斯峰形;附录 Ⅰ)。图 2－3 中,从左至右的相对峰大小(峰高或峰面积)分别为 1/1、4/1、16/1 不等。分离度从上到下的变化为 0.6 至 1.25。可将实际重叠的谱峰对与图 2－3 的理想曲线相比较,“实际峰”与“理想峰”的匹配应尽可能接近。大谱峰流出的先后无关紧要;只需调换两峰的位置处理即可。

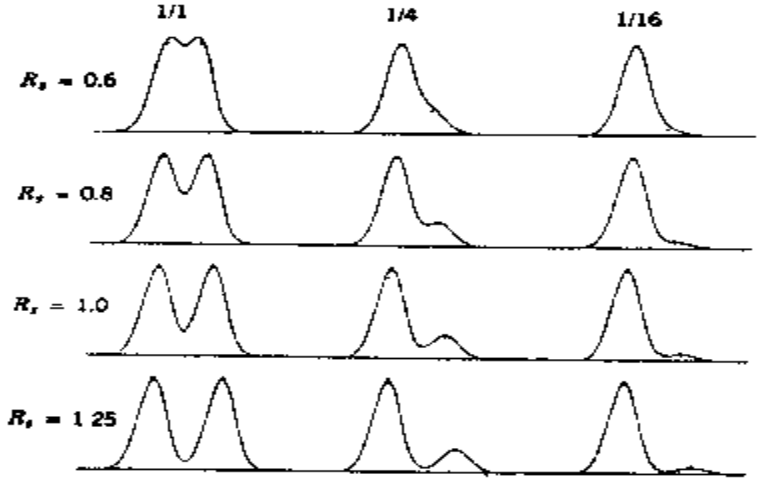


图 2－3　描述分离度及谱峰相对大小(面积)与两谱峰的分离关系的标准分离度曲线

一旦达到了匹配,图 2－3 中最接近的响应 R_s 值即为实际谱峰对的分离度。对该 R_s 估算法的说明见图 2－1 *a* 中的谱峰对 5/6。本例中,两谱峰的峰高和面积比大约为 4/1。将谱峰对 5/6 与图 2－3 的示例(4/1 情况)比较,对应的 $R_s \approx 1.0$。同样,图 2－1 *a* 中谱峰对 2/3 的分离度为 $R_s \approx 0.7$(谱峰大小比值为 1/1)。图 Ⅰ－2～Ⅱ－7(附录 Ⅰ)为此方式估计 R_s 提供了一套更详细的标准分离度曲线。

第三种估计 R_s 的方法基于两相邻谱峰的峰谷高度,能用于 $0.8<R_s<1.5$ 的情况。可以提供更为精密的 R_s 值,但比标准分离度曲线法稍麻烦。见图 Ⅰ－8(附录 Ⅰ)和有关的讨论。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2.2.2 最小分离度

具有两个谱峰以上的色谱图(如图 2－1 *a*),各谱峰对之间的 R_s 值有所不同。图 2－1 *a* 中有五个相邻的谱峰对,有五个相应的 R_s 值。HPLC 分离的一般目的是以基本的分离度分离所有组分。如果 HPLC 方法建立的目的是准确地定量样品中各组分,基线分离所有谱峰是最理想的。当后面谱峰开始离开色谱柱前,前面谱峰的响应值即回到基线位置,则已达到了基线分离。图 2－1 *b* 中除谱峰 5/6 以外,其它峰对均达到了基线分离。如所有谱峰均为基线分离(如图 2－1 *c*),HPLC 数据系统则能在各峰下准确地画出基线,因而提高峰面积或峰高测定的准确性(以及得到准确的样品浓度计算值)。基线分离相当于大小类似的两谱峰的 $R_s>1.5$。但在以下两种情况时,(1)相邻谱峰大小相差较大;(2)长时间使用,HPLC 方法通常会性能下降;$R_s=2.0$ 或更大应为方法建立的理想目标。

明确标出方法建立期间得到的每个色谱图中关键的谱峰对很实用。"关键谱峰对"为 R_s 值最小的两个谱峰。在图2－1 *a* 中,峰2与峰3为关键谱峰对($R_s=0.7$)。在方法建立中,系统地改变分离条件,以改善关键峰对的分离。如图2－1所示,继续该过程直至全部样品均达到满意的分离度。开始分离时(图2－1 *a*),峰2与峰3为关键峰,必须改善其分离度。改变图2－1 *a* 的分离条件,得到图2－1 *b* 的色谱图。现在峰2与峰3已足够分开了,但峰5与峰6的改善不大。因此,峰5与峰6现在又成为分离中的关键。继续改变条件以使全部样品足够分开,如图2－1 *c* 所示,所有谱峰 $R_s>2.0$。整个色谱图的分离度通常以分离中的关键峰对的 R_s 值表示(如,图2－1 *a* 色谱图的 $R_s=0.7$,由于关键峰对2/3的 $R_s=0.7$)。

单纯通过观察实验谱图,可能会误导对关键峰对的分离度的估算。如果两个谱峰发生重叠,$R_s<0.5$,该二谱峰在谱图上将如一单峰(见图 Ⅰ－2～Ⅰ－7 示例)。色谱工作者可能(错误地)认为已将样品完全分离开。如果已知样品中有几种组分,则可避免这种差

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

错；谱峰数应与组分数对应。对开始时组分数未知的样品，在特定实验条件下，总有谱峰可能分不开（犹如一单峰）。改变分离条件和/或用一定的检测器[如二极管阵列检测器（见 3.2.6 节）]，能帮助确定和解决这类问题。利用峰轨迹（见 10.7 节）也有助于发现未分开的峰对。实验分离过程中样品成分发生变化时，即可能出现方法建立中不存在的化合物。如能预测到色谱图中可能出现的新谱峰，最好在色谱图中尽可能多地预留空间[即，试图获得大于所需的分离度（$R_s \gg 2$）]。不过应切记，过度分离总意味着运行时间比所必需的要长（见 2.3.3.1 节）。

大多数情况下，HPLC 分离质量用关键峰分离度和运行时间描述已足够。已提出各种数学函数定量地估算分离[1,2]，这些色谱响应函数的优化标准考虑了方法建立的各种目标，按照 HPLC 方法的需要权衡每一目标（分离度、运行时间、选择性等）。色谱响应函数已用于计算机辅助方法建立（见第 10 章），为最终方法自动选择"最佳"分离条件。我们认为这些色谱响应函数多数情况下价值有限。如果所有相关峰的 R_s 大于 2，运行时间适宜，一般已足够。

为改善分离度，需改变某些实验条件（如梯度时间 t_G），将关键分离度与改变的条件（t_G）作图将很实用。这便是分离度图，见图 2－4 的示例。图 2－4*a* 所示为肽样品 120 分钟梯度时间的色谱图。谱峰 9～15 用箭头标出，这组谱峰为最难分开峰。梯度时间与分离度的关系见图 2－4*b*。图中标出了每一梯度时间的关键峰对与其分离度。也标出了三不同梯度时间（52min、93min 与 185min）对谱峰 9～15 的分离：关键峰对为实心峰。在 52min 的梯度时间，谱峰 9/10 完全重叠，其 $R_s=0$。同样，185min 梯度时间的峰对 11/12 完全重叠，$R_s=0$。而在居中的（93min 梯度）分离，可得到最大 R_s 值（$R_s=1.2$），该结果为 220min 梯度时间以内样品的最佳分离。用分离度图能快速估算分离度与分离条件之间的关系。亦见 10.2 节中另外的示例和有关讨论。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

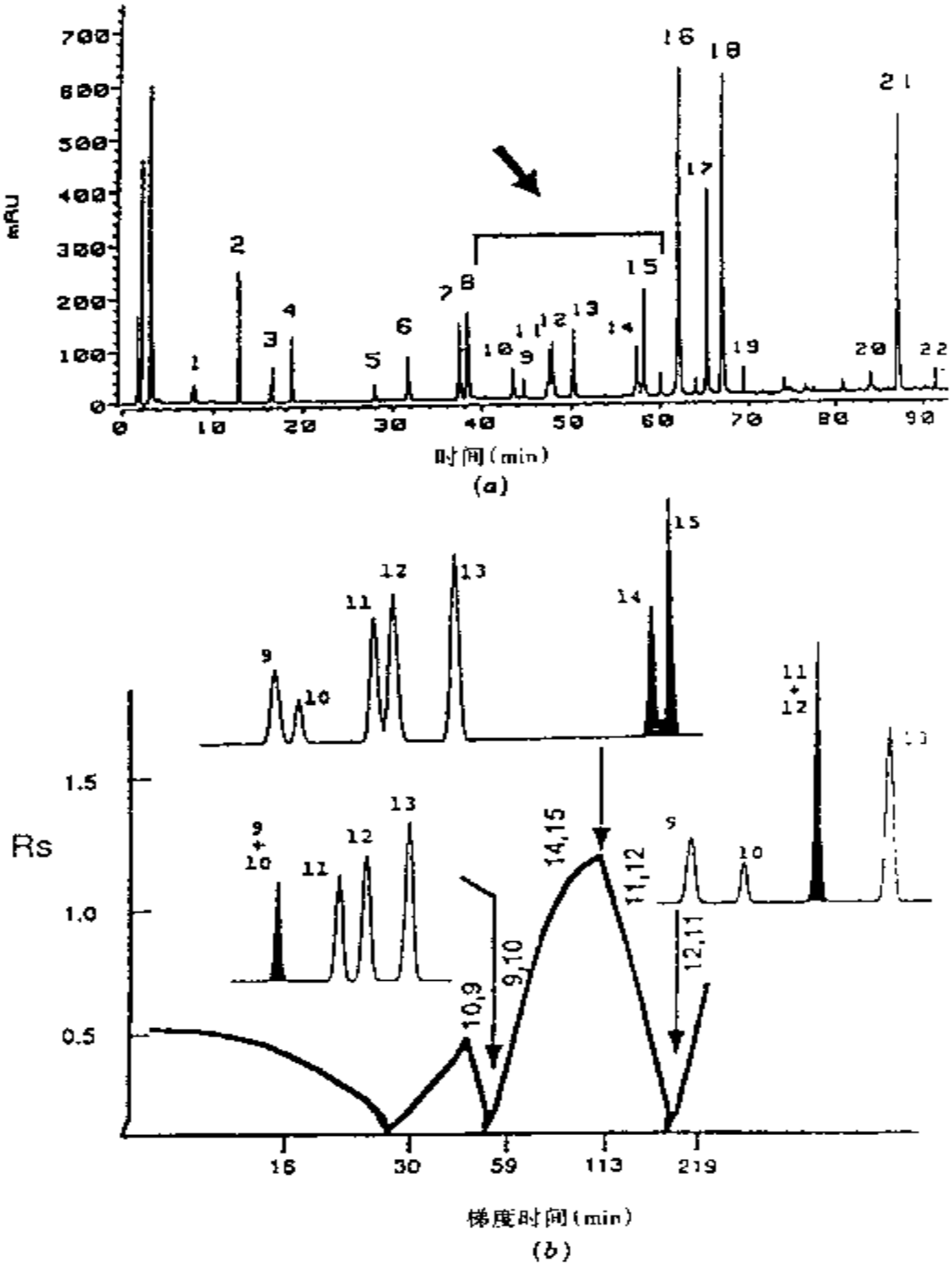


图 2－4　梯度洗脱分离肽混合物的分离度图[3]

（a）120min 梯度色谱图；（b）52.93 与 185min 梯度时间叠加，分离谱峰 9～15 的分离度图。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2.3 分离度与分离条件的关系

通过改变实验条件，能系统地改变色谱图中任何两谱峰的分离。分离度 R_s 可以用三个参数（k、α 与 N）加以描述，它们之间的关系为：

$$R_s = 1/4(\alpha - 1) \quad N^{1/2} \quad \frac{k}{1+k} \tag{2.3}$$

（选择性）（柱效）（保留值）

式中，k 为两谱峰的平均保留因子（以前称为容量因子，k'），N 为色谱柱的塔板数，α 为分离因子；$\alpha = k_2/k_1$，k_1 和 k_2 分别为相邻谱峰 1 和 2 的 k 值。式 2.3 在方法建立中很有用，因为它将十几种实验参数分为三类：保留值（k），柱效（N）与选择性（α）。为达到较理想的分离，简化了系统改变条件的方案。将 k、N 和 α 看作相互独立的参数很实用，这样可改变每一种条件而不影响另外两种。然而，这仅仅是粗略的估算，尤其是关于 k 和 α。

保留因子 k 的计算公式如下：

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \tag{2.4}$$

式中，t_R 为谱峰的保留时间（见图 2－2），t_0 为色谱柱的死时间。柱死时间与其死体积 V_m（色谱柱内部的流动相体积）和流速 F 有关：

$$t_0 = \frac{V_m}{F} \tag{2.5}$$

可以采用 2.3.1 节中所述方法进行测定。式 2.3 假设两谱峰的保留时间接近，谱峰重叠（R_s <1.5），且已达到 HPLC 方法要求的一般塔板数（N> 2000）。另有许多与式 2.3 类似的分离度公式已被推算出[4]。对重叠峰，R_s 的各种计算公式结果大致相等。

图 2－5*a* 说明了 k、α 和 N 对分离度的影响。当改变条件使 k 变小（流出快）时，分离度通常下降。使 k 变大，分离度通常可以得

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

到改善。如果增大 α，两谱峰分开也加大，因而 R_s 值提高显著。增加柱效 N，谱峰变窄，分离更好，但在色谱图中的相对位置不变。图 2－5 b 说明了对于必须提高其分离度的重叠关键峰对来说，哪种办法最好。当两谱峰的保留时间接近 t_0[k 小，图 2－5 b(i)]，最好的方法是增加 k。两谱峰有部分重叠，且 $t_R \gg t_0$ [图 2－5 b(ii)]，必须增加它们的 α 或 N。不过，除非仅需少许增加 R_s(<30%)，通常以努力增加 α 为好。当两谱峰严重重叠时，$t_R \gg t_0$，[(图 2－5 b (iii)]，一般需增加 α。

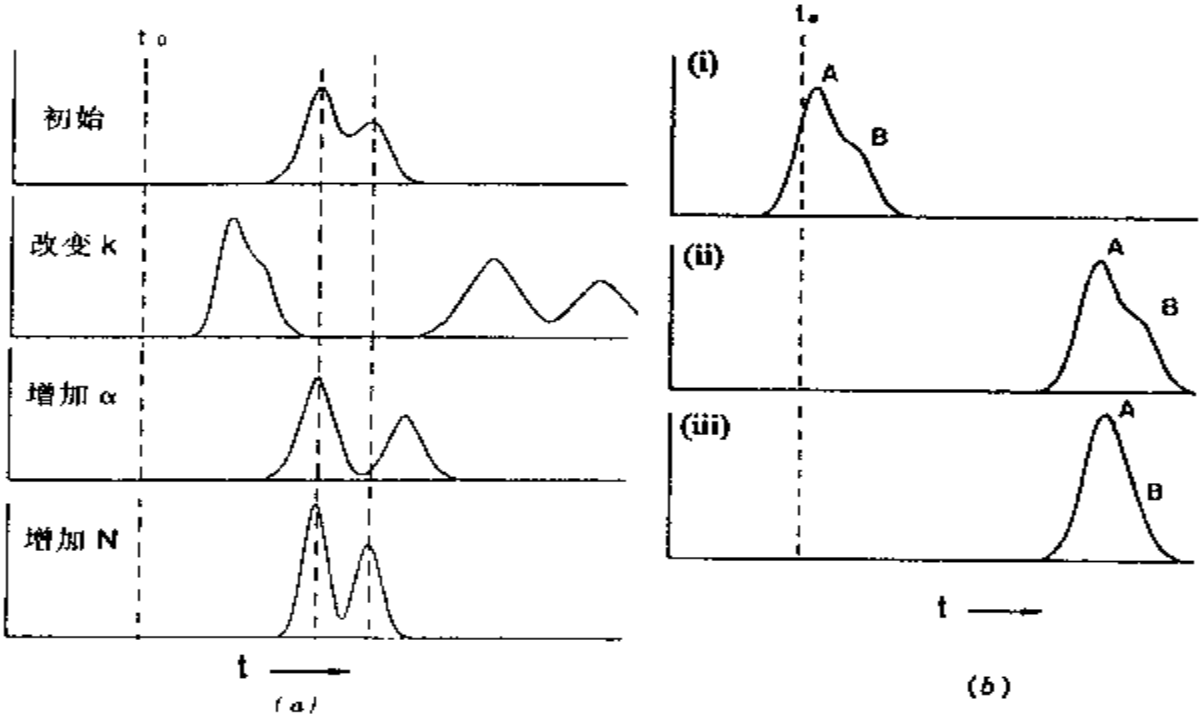


图 2－5　k、α 和 N 对分离的影响

决定参数 k 和 α 的因素包括能影响样品保留值或样品在流动相与柱填料之间平衡分配的各种条件：

1. 流动相的组成
2. 固定相(色谱柱)的特征
3. 温度

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

改变流动相或固定相一般会影响 k 和 α，但对 N 的影响不大。塔板数 N 主要取决于柱质量，改变柱条件：流速、柱长或载体粒度会影响柱效。但只要流动相与固定相类型不变，改变这些条件就不会对 k 和 α 产生太大影响。

在方法建立中，最好先改变那些能优化 k 和 α 值的条件，然后（可选择地）改变色谱柱条件。以此方式，能用起始实验获得好的 k 和 α 值，如果再变化色谱柱条件，这两个值则不变。

2.3.1 溶剂强度的影响

按式 2－3，当增加样品保留值 k 时，分离度增加；如两样品组分靠近 t_0 流出（$k\approx0$），那么 $R_s\approx0$。改变流动相的溶剂强度，能控制样品保留值。强溶剂减小保留，弱溶剂增加保留。表 2－1 总结了不同 HPLC 模式改变溶剂强度的主要手段。除非另有说明，在本章中均假设为反相 HPLC 模式。

表 2－1　通过改变溶剂强度控制样品的保留值

HPLC 方法	通常如何改变溶剂强度[a]
反相	水（A）加有机溶剂（B）（如水－乙腈）；增加%B，k 减小。
正相	非极性有机溶剂（A）加极性有机溶剂（B）（如己烷－异丙醇）；增加%B，k 减小。
离子对	与反相的相同。
离子交换	水缓冲液加盐（如 5mM 醋酸钠加 50mM 氯化钠）；增加离子强度（NaCl 浓度），k 减小。

[a] 首先列出流动相组成。

图2－6中，对5组分样品重复进样，每次进样采用不同流动相组成（改变甲醇的比例），以说明溶剂强度对反相分离的影响。起始分离用70%甲醇（图2－6a），运行时间短，样品分离度较差；说明流动相太强，k 值太小。应采用较弱的流动相强度。图2－6b 用60%甲醇，分离度有所改善，但流动相仍然太强。图2－6c 中，50%

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

甲醇使所有谱峰均达到基线分离。然而谱峰1接近 t_0流出(在进样后约2min 时,有基线波动的迹象),因而峰1下的基线难以明确标出,使峰1的定量不准。进一步减小甲醇比例至40%(*d*)和30%(*e*)时,所有谱峰的基线均能明确标出,并使分离得到改善,但运行时间相对加长了。(*e*)用30% 甲醇作流动相,后期谱峰展宽严重,谱峰5难以检测或准确定量,运行时间太长(120min)。

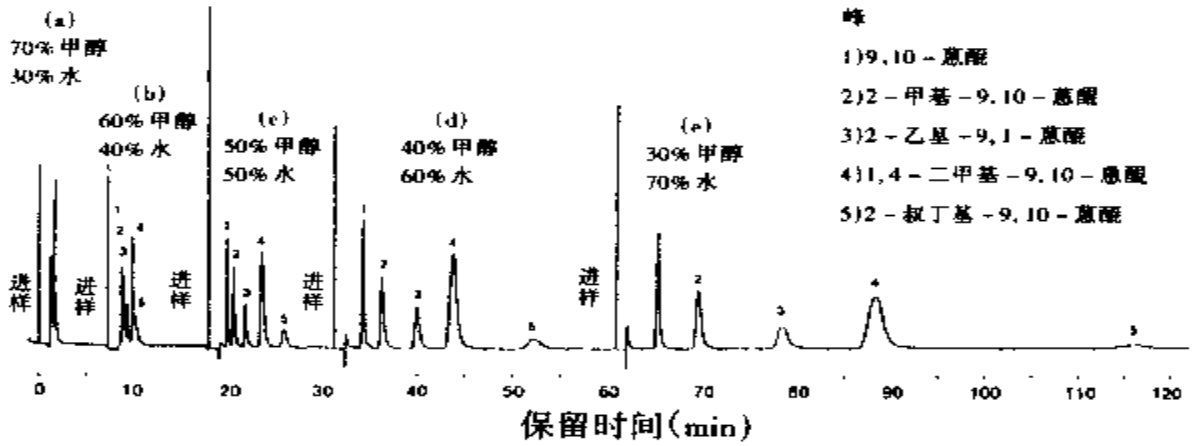


图 2-6　用不同的流动相反相 HPLC 分离蒽醌混合物[5]

条件:Permaphase ODS 色谱柱,50℃,1.0mL/min,254nm UV 检测。(a)~(e)的流动相见正文。

40% ~45% 甲醇的流动相对图 2-6 中的样品分离最好。所有组分谱峰均达到基线分离,运行时间较合理(15 ~ 20min),最末峰展宽也不至于影响检测和定量,且首峰离开了 t_0 的起始基线波动部分。大多数情况下,中等溶剂强度较好,可以使所有组分均在 $0.5<k<20$ 范围内出峰。%B 的最佳值(A 为弱溶剂,B 为强溶剂;见表 2-1)可以采用系统的试-凑实验法得到,如图 2-6。开始也可以用梯度洗脱分离,能更容易地决定等度分离的最佳溶剂强度(见 8.2.2.2 节)。

如图 2-6,在估计成功的方法建立实验时,知道该 HPLC 系统的近似 t_0 值非常重要。t_0 值能以不同的方式进行估算:

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

1. 第一个显著的基线波动
2. 用极强的溶剂作为流动相
3. 通过柱尺寸计算
4. 注入不保留的样品

在图 2－6 $c \sim e$ 中，在进样后约 2 min 处，可见到基线的特征波动。由于样品溶液和流动相组成在 t_0 处不同，峰轨迹有一个基线上下的快速偏移。当看到这种形状的起始基线偏移时，便可以肯定地认为该点即为 t_0。偶而也有组分不能进入柱填料的孔径中的情况，因而在 t_0 之前离开色谱柱（往往在 0.5 倍 t_0 处），这就会使仅依靠基线的起始波动来决定 t_0 时得出错误的结果。

用强流动相能更可靠地估计 t_0 位置，如图 2－6 a 所示（70% 甲醇－水）。在本例中，样品象一只未分开的塞子离开色谱柱，在 2min 处检测轨迹开始上升处即为 t_0。t_0 值也可从式 2.5，由柱长 L（cm）和内径 d_c（cm）对 V_m 的估计值推算：

$$V_m \approx 0.5\, L\, d_c^2 \qquad (2.6)$$

由式 2.5 和 2.6 估计的 t_0 可能有 10～20% 的误差，但这对方法建立而言是可以接受的。式 2.5 和 2.6 尤其适于 HPLC 中最常用的 0.46cm 内径色谱柱。

$$V_m \approx 0.1\, L\text{（仅适于内径 0.46cm 的色谱柱）} \qquad (2.7)$$

这样，25 × 0.46cm 的色谱柱，$V_m = 0.1 \times 25 = 2.5$mL。如果流速为 1.5mL/min，$t_0 = 2.5/1.5 = 1.67$min（式 2.5）。最后，可注入不保留的、即其保留时间等于 t_0 的化合物。反相 HPLC 常用尿嘧啶或硝酸钠的浓溶液（在 210nm 检测）进行测试。

待测得了 t_0 后，便可用式 2.4 估算出 k 值。也可以目视估测 k 值（不经计算）简单地以 t_0 为单位画时间坐标轴，即 1 个 t_0 单位的 $k = 0$，2 个 t_0 单位的 $k = 1$；等等。k 标尺见图 2－1 a 的说明（见上部标有“k ＝”的标尺），其 $t_0 = 1.0$min。谱峰 1 的 $k = 0.4$（t_R ＝ 1.4min），谱峰 6 的 k ＝ 6.3。当调整溶剂强度时，重要的是应大致

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

估计色谱图中首峰和末峰的 k 值。调整溶剂强度的目的是将所有谱峰定位于约 0.5～20($0.5<k<20$)的 k 范围内。该 k 范围一般(并非总是!)可避免起始的基线波动与首峰重叠,当 $k>0.5$ 时,早期流出的杂质峰与被测物峰重叠的可能性也会减小。当 $k<20$ 时,可避免最末峰过度展宽,以及运行时间太长。

2.3.2 选择性的影响

调整溶剂强度(%B)至保留值适宜后,许多样品能充分分离开。图 2－6*d* 中,以 40% 甲醇作流动相的情况即如此。不过,尽管所有谱峰均在 $0.5<k<20$ 之内,可能还有个别组分分离不完全。图 2－1*a* 和 *b* 的分离即如此。方法建立的下一步(即将%B 调整至 $0.5<k<20$ 以后)将改变那些能使峰间距或选择性(α 值)发生变化的条件。改变流动相、更换色谱柱填料的类型、或改变温度均能改变 α。通常,最好是以改变流动相为开始。

2.3.2.1 改变流动相 如表 2－1 所概括,选择流动相依赖于 HPLC 模式。表 2－2 总结了一些能改变反相条件选择性的流动相

表 2－2 反相 HPLC 中,能用于改变选择性(α)的流动相(从实验 1 改为实验 2)变化

条件[a]	示例[b]	
	实验 1	实验 2
改变%B(所有)	40% ACN	45% ACN
改变有机溶剂(所有)	40% ACN	50% MeOH
混合有机溶剂(所有)	40% ACN	20%ACN＋25%MeOH
改变 pH(离子)	pH 2.5	pH 3.5
改变离子对试剂浓度(离子)	无试剂	25m*M* 辛烷磺酸盐
改变缓冲液或缓冲液浓度(离子)	25m*M* 枸橼酸缓冲液	50m*M* 醋酸缓冲液
改变添加剂浓度(离子)	无添加剂	10m*M* TEA
加络合试剂(特殊)	无试剂	10m*M* 硝酸银

[a] "所有"指该条件中性与离子样品均可用;"离子"指该条件仅对含有离子或可电离的样品有效;"特殊"指可与络合试剂相作用的样品。

[b] ACN:乙腈;MeOH:甲醇;TEA:三乙胺

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

变化。一般来说，最好从第一个变量（改变%B）开始，按表依次向下进行。第6～7章中将详细讨论这些选择性的影响。

溶剂强度的选择性 %B值的范围变化通常可使$0.5<k<20$，所以选择%B值较实用（如图2－6的35 ～ 45%）。当%B改变5 ～ 10%时，许多样品（但并非图2－6的示例）的谱峰间距会发生明显改变，使样品分离得更好。这样，在为获得良好保留值范围而调整%B的过程中，也可选用特定的%B值，以获得最佳峰间距和分离度。

溶剂类型的选择性 改变有机溶剂类型，对反相与正相HPLC来说，均是改变峰间距的有效手段。通常改变其中的强溶剂组分（B溶剂）。有许多种溶剂可供选用，因而不容易选择到能改变峰间距的好溶剂。图2－7所示的溶剂选择性三角形[6]对选择不同的溶剂、有效地改变峰间距很有帮助。溶剂通过偶极与氢键键合作用，

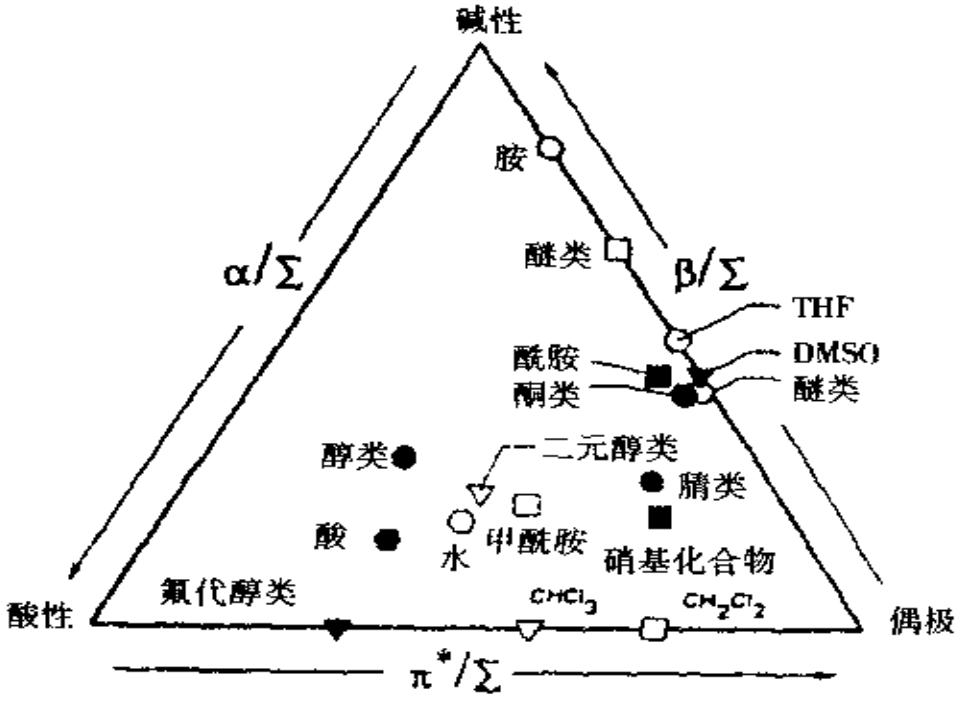


图2－7 溶剂选择性三角形[6]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

在流动相中的样品分子表面形成溶剂化层。因而，溶剂选择性与溶剂分子的偶极矩及酸碱性有关。在图 2－7 中，酸性溶剂靠近三角形的酸性角，碱性溶剂位于碱性角的附近，而那些偶极起主要作用的溶剂，则在偶极角附近。

为通过改变 B 溶剂，有效地改变选择性，应选用与溶剂选择性三角形中原溶剂位置不同的新溶剂。比如，乙醚靠近碱性角，CH_2Cl_2（二氯甲烷）靠近图 2－7 的偶极角。因此，这两种溶剂在其选择性上应显著不同。如果首次实验（正相 HPLC）选用乙醚，需要改变峰间距，改用二氯甲烷进行实验，选择性应有较大变化。正相和反相 HPLC 溶剂类型的优化，包括改善峰间距较好溶剂的选择详见第 6 章。

优化溶剂类型的选择性　更换强溶剂（B 溶剂）往往能使谱峰间距发生较大的变化，比如将原先重叠的峰分开或使原来分开的峰又重叠在一起。所以，两种强溶剂的混合往往能使峰间距适中，分离度满意。这类说明见图 2－8 的假想分离。前二次实验的设计

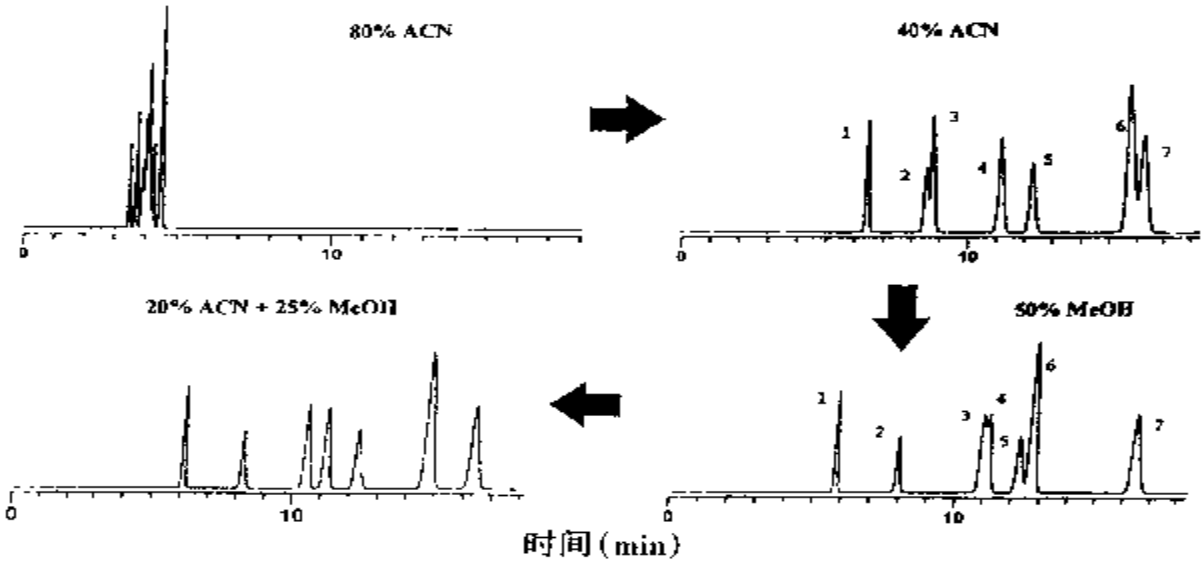


图 2－8　方法建立系列实验

以强流动相，80% 乙腈－水（80% ACN）开始。MeOH 为甲醇。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

为调整溶剂强度和 k 范围。最好以相对较强流动相开始，本例中为 80% 乙腈 - 水。样品保留较弱（如所预期的），很快流出色谱柱，样品分离度不佳。第二次实验（40% ACN）的保留值足够，分离度提高。然而，由于峰间距不好，有些峰仍发生重叠（峰 2/3 和 6/7）。然后将有机溶剂乙腈（ACN）改为甲醇（50% MeOH），进行第三次实验。谱峰间距发生变化，但又有新的峰重叠（3/4 和 5/6）出现。通过混合该两种流动相（等体积的 40% ACN 和 50% MeOH），得到的最终分离介于第二和第三次实验之间（20% ACN + 25% MeOH），所有谱峰的分离度都可满意。当改变其它条件时（如 pH、温度、离子对试剂浓度、缓冲液或其它流动相添加剂），也能用图 2 - 8 的程式。在第 6 ~ 9 章中，我们将详细介绍图 2 - 8 的总程式，并列举出许多实例。

其它溶剂的性质 HPLC 方法建立中使用的不同溶剂应具有一定的实用性质。低粘度、蒸汽压不能太高（沸点> 40℃）、在短波长紫外光的透光率好（见 3.2.2.2 节），毒性低也很重要，其高纯度溶剂可以在市面上以适宜的价格购买到。附录 II 提供了更多的有关 HPLC 中溶剂性质的信息（亦见文献 7 和 8）。

离子化合物的选择性 对于含有离子或可电离组分的离子样品，进一步改变流动相性质，如改变 pH、用离子对试剂或胺添加剂、改变缓冲液或缓冲液的浓度等，可作为改变其选择性的另一种办法。这些影响见第 7 章的讨论。

选择性络合 有些情况下，在流动相中加入络合试剂，有可能使其选择性地与一种或多种样品组分发生作用：银离子与顺烯烃和胺类络合，汞与烷基硫化物、硼酸盐与顺二醇、不同的金属离子与螯合物络合等等，可以改善分离。络合试剂也可用于手性分离（见 12.1.2 节），但样品化合物与络合剂之间的平衡必须是快速可逆的；否则，会使谱峰展宽与色谱图变坏。HPLC 中的络合示例见图 2 - 9，用冠醚选择性地与伯胺络合。无络合试剂时，该 11 种伯

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

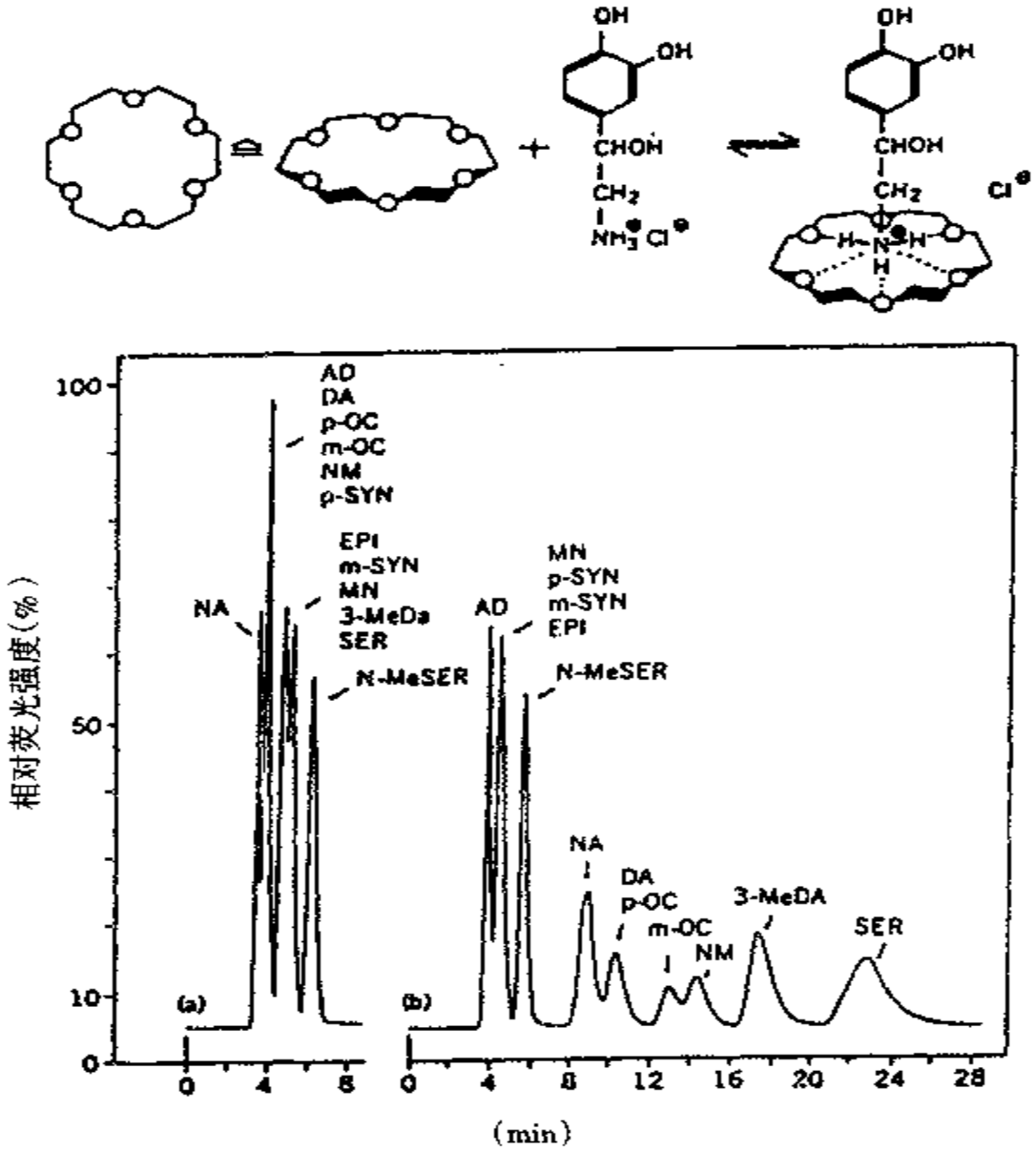


图 2－9　冠醚络合剂对反相 HPLC 分离的伯胺和仲胺谱峰间距的影响[9]

NA、DA、p－OC、NM、3MeDA、和 SER 为伯胺。

(*a*)0.01M HCl 流动相;(*b*)相同,另加 5 g/mL 的 18－冠醚－6。

胺与仲胺组分混合物分离得不好［色谱图(*a*)］,但在流动相中加入络合试剂［色谱图(*b*)］,则选择性地保留了伯胺(峰 NA ~ SER),使其分离得到了改善。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

2.3.2.2 更换色谱柱 色谱柱填料的性质可能对峰间距有重大影响，尽管有依次连接不同类型柱的多维色谱模式[10]，大多数情况下，将不同填料合装于一支柱中的情况并不现实。因此，与改变流动相组成可能带来选择性的连续变化不同，更换色谱柱必然使选择性发生突变。这就限制了色谱柱（本身）对那些含组分相对较多的样品峰间距的微调能力。优化峰间距时，一般更换色谱柱都与改变流动相结合起来使用。只有已试用改变流动相之后，才可考虑更换色谱柱。

大多数色谱柱填料通过将有机层键合到多孔硅胶微粒的内表面上制得（见 5.2.3 节）。有许多因素可能影响色谱柱填料的选择性，包括：

1. 键合相的化学性质或官能团［如 C_{18}、苯基或氰基（反相 HPLC）］

2. 单位面积硅胶微粒上的键合相量（如 2 或 4 $\mu mol/m^2$）

3. 键合相与硅胶表面的键合方式［如单官能团或多官能团硅烷反应（见 5.2.3.1 节）］

4. 硅胶表面的性质，由于硅胶来源不同，硅胶表面性质也有差别（见 5.2 节）

通过更换色谱柱的官能团（如将反相色谱的 C_{18} 柱更换为氰基或苯基柱），能有效而系统地改变选择性，重现性好。由于生产过程或所用起始硅胶的差异，通过更换色谱柱的来源（供应商），也能改变选择性。然面，象色谱柱来源这样的改变（如：不同的 C_{18} 柱），一般不用于“普适”方法的建立，见第 5 章的讨论。

2.3.2.3 改变温度 柱温增加 1℃，保留值（k）通常能减小 1～2%。k 改变也可引起 α 的变化，所以温度是改变峰间距和改善分离的有效参数。用温度优化选择性的优点是使用方便，既不需更换色谱柱，也不需配制新的流动相；然而，如温度升高太多，可能需要降低%B，以保持 $0.5<k<20$。用 HPLC 的系统控制器能调节温

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

度，这可方便手工方法的建立和基于温度变化的自动方法建立。

通过改变温度产生峰间距适宜变化的示例已有许多报道。在分离可电离的样品时，温度选择性效应更加明显，但有些中性样品的 α 也会随温度发生明显的变化。对于特殊样品和深入的讨论，请参见 6.3.4、6.6.4、7.3.2.4、7.4.4.2 与 9.4 节以及第 11 和 12章。

直至最近，温度仍未广泛地用于控制峰间距，其原因可能为：

1. HPLC 设备往往不配备柱温相

2. 许多 HPLC 色谱柱在高温时不稳定，尤其在 pH 3 以下、6 以上的流动相中。

3. 溶剂粘度与其蒸汽压对温度的依赖很大，从而限制了温度能够变化的实际范围

4. 改变温度通常被认为对 α 值的改变效果不大

这些理由正在经受进一步的检验[11]，预期将来温度的应用还会增加，以控制谱峰间距，有助于 HPLC 的方法建立。由于改变温度能影响 k，以及 α，在日常 HPLC 分离中为保持恒定的保留时间与分离度，最好配有柱温箱［特别是离子样品（见 7.3.3.3 节）］。方法建立中选择最佳温度，同样能用到控温箱。目前已经有了能在低 pH、高温操作的稳定的柱填料，并已测定了在高温与高 pH 下能延长柱寿命的条件（见 5.2.3.4 与 5.2.3.5 节）。

2.3.3 色谱柱理论板数的影响

在调整保留值与峰间距的实验中，将会在某一步得到有希望的色谱图。该色谱图很可能已达到了 1.2.2 节中讨论的那些基本目标。还有的情况下，需要进一步改善分离。式 2.3 表明当提高 N 时，只要 k 和 α 值不变，所有谱峰的分离度都将会增大。所以，调整 k 和 α 以后，如果需要改善分离度，提高 N 值将是一种选择。相反，如果分离的程度大于所必须的分离度（$R_s \geqslant 2$），可以以此分离度换取更短的运行时间（减小柱长和/或增加流速）。增加柱长

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

和/或降低流速一定能提高 N 值(但随之也使运行时间增加)。因此,改变影响 N 的仪器条件可视为以分离度换取运行时间的一种方式。

提高色谱柱理论板数的因素包括:

1. 色谱柱填充良好(用"优质"柱)
2. 色谱柱较长
3. 流速较低(但并非太低)
4. 柱填料的微粒较小
5. 流动相的粘度低,温度高
6. 样品分子小
7. 柱外效应小

色谱柱的质量或性能在第 5 章中讨论。柱性能可用 N 值和谱峰的不对称性(峰形)来表示,可采用测试物质在"适宜"的条件下试验得到(见下面)。色谱柱塔板数 N 的定义为:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \tag{2.8}$$

如前所述,手工测定基线宽度 W 可能有误。因此,N 值的较实用公式为:

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 \tag{2.8a}$$

式中 t_R 为谱峰的保留时间,$W_{1/2}$ 为半高处的峰宽(图 I-1)。测定 N 的另一关系式为:

$$N = 2\pi\left(\frac{t_R h'}{A}\right)^2 \tag{2.8b}$$

式中 h' 为峰高,A 为峰面积。式 2.8b 常用于 HPLC 数据系统测定 N 值。

如 5.3.2 节中所述(图 5-17),描述峰形用不对称因子或拖尾因子。对于"良好的"(对称)色谱峰,其拖尾因子接近于 1.0。峰形与塔板数可合并为单一的色谱柱评价指标:校正塔板数。常用

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

Dorseyfoley 公式[12]定义：

$$N = \frac{41.7(t_R/W_{0.1})^2}{(B/A)+1.25} \qquad (2.8c)$$

式中 $W_{0.1}$ 为基线 10% 峰高处的峰宽，A 与 B 的定义如图 5－17（见有关峰形的讨论）。当峰呈现拖尾时，式 2.8b 中的 N 值将比以式2－8a 的计算结果小。式2－8c 也可用于前伸峰，即将 B/A 以其倒数 A/B 替代[13]。

甚至一些看起来对称的谱峰，通常也会稍有拖尾。因此，如果两个相邻谱峰（R_s< 2）的大小差别很大，首先测定小峰，再测定大峰是适宜的。否则，大峰的拖尾可能会覆盖掉小峰，使其难以定量。

以 N 值评价色谱柱质量时，最好用标准的测试体系测定，而不可用正在研究的实验样品与条件。反相 HPLC 的柱性能标准测试条件包括以下几点：

1. 以小的中性化合物作为测试样品（如甲苯或萘）。

2. 如色谱柱为0.4<ID<0.5cm，流速用1mL/min；直径较小或较大的色谱柱，所采用的流速应与（色谱柱直径）^{2}成正比。

3. 用粘度（η）小于1cP 的流动相（如温度>20℃，可用0～100% 乙腈－水）。

4. 温度<40℃（取决于 HPLC 设备，高温操作可能得出错误的结果）。

5. 用连接良好的设备[使柱外谱峰展宽效应最小（见2.3.3.3节）。]

表5－9为柱长与粒度不同的色谱柱的理想 N 值。如果新色谱柱的 N 值小于该理想值的2/3，则应更换更好的色谱柱。理想值一般比正在研究方法的 N 值大。

柱长、流速与粒度对 N 值的影响将在下面章节中讨论。改变这些条件可进一步改善分离（提高分离度或缩短运行时间）。k 与α 值优化以后，分离条件限定了流动相粘度、温度与样品分子量。因

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

此，进一步改变这些条件不可再作为优化 N 值的手段。

2.3.3.1 色谱柱条件与分离 改变色谱柱条件（柱长、流速、粒度）会引起 N 值的变化，但不影响 k 和 α 值。即一旦为改善分离已调整好保留值与选择性，便可提高（或降低）N 值而不对 k 与 α 产生影响。柱条件改变时，柱压力也会改变。柱两端的压力降可表示为：

$$P \approx \frac{250L\eta F}{d_p^2 d_c^2} \tag{2.9}$$

式中 P 为压力（psi），L 为柱长（cm），η 为流动相的粘度（cP；见附录Ⅱ中表Ⅱ－3），F 为流量（mL/min），d_p 为微粒的直径（μm），d_c 为柱内径（cm）。P 也会因柱的装填情况而不同。

改变柱条件与 N 时，首要关心的通常是分离度、运行时间与柱压力，而在痕量分析中关心的是加大选择性（减小峰宽）。通过改变 N 与柱条件，系统地改善分离的说明见表2－3与图2－10。这些 HPLC 色谱图[15－18]基于实际实验与可靠的谱峰展宽模型得到的计算机模拟结果（见10.2.1节）。请参阅表2－3，如第1条（25cm 的色谱柱，1mL/min）优化 k 与 α 值的分离结果。此时，分离度很好（R_s = 2.9），压力也可满意（990psi），但运行时间稍嫌长（21min）。这种情况下，可以降低 N 值（只要 R_s>2）以换取运行时间的缩短。假如柱压不超过预期的压力限度（比如2000 *psi*），改变柱条件最简单且方便的方法是加大流速。表2－3中第2条表明流速2.0 *mL/min* 的运行时间为11 *min*，分离度（R_s = 2.3）与压力（1980psi）均可满意。对这二次实验的说明见图2－10 *a* 与 *b*。

如欲进一步缩短运行时间，可选择采用更短的色谱柱。如15cm 柱，1.0mL/min。表 2－3 的第 3 条表明分离度（R_s = 2.2）与压力（590psi）均可满意，运行时间为 13min。用该柱时，在分离度降至可接受的最低值（R_s = 2.0）之前，可增加流速至 1.4mL/min（第 4 条）。压力可接受（830psi），且运行时间仅需 9min。这是目前的最

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 2－3　色谱柱条件对杀虫剂样品分离的影响[a]

	色谱柱条件[b]				运行时间	压力
	L(cm)	F(mL/min)	d_p(μm)	R_s	(min)	(psi)
1	25[c]	1.0	5	2.9	21	990
2	25	2.0	5	2.3	11	1980
3	15	1.0	5	2.2	13	594
4	15	1.4	5	2.0	9	830
5	10	2.0	3	2.2	4	2200
6	10	1.8	3	2.2	5	1980
7	8	2.0	3	1.9	3	1756
8	8	1.7	3	2.0	4	1490
9	25[d]	2.0	5	1.3	11	1980
10	8[d]	1.7	3	1.3	4	1490

[a] 详情见图 2－10。
[b] L 为柱长，F 为流量，d_p 为微粒的大小。
[c] 为优化 k 与 α 值，调整后的结果。
[d] 柱外峰展宽较大的旧 HPLC 系统的数据；$\sigma_\infty = 0.02$，而其它示例中为 0.005ml。

佳分离（见图 2－10c）。

通常，降低粒度能进一步缩短运行时间。表 2－3 为几种 3μm 色谱柱和改变柱长与流速的实验结果（第 5～8 条）。所得的最佳条件为 8cm 柱，流速 1.7mL/min（第 8 条，图 2－10d）。分离度（$R_s = 2.0$）与压力（1490psi）均可满意，而运行时间仅为 4min。表 2－3 的实验程式为该分离提供了一个找到可能最佳柱条件的逻辑方案。

更换（不同柱长或粒度的）色谱柱时，应慎重考虑。不同色谱柱（类型相同）之间的填料（尤其产于不同厂家的）可能有很大不同，致使 α 发生变化（见 5.4.1 节）。对某些（重现性不好的）柱填料，可能需重新优化流动相条件，以获得最佳的峰间距。小粒径（3μm）柱还易发生柱堵塞，主要由于为使固定担体在柱内不流失

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

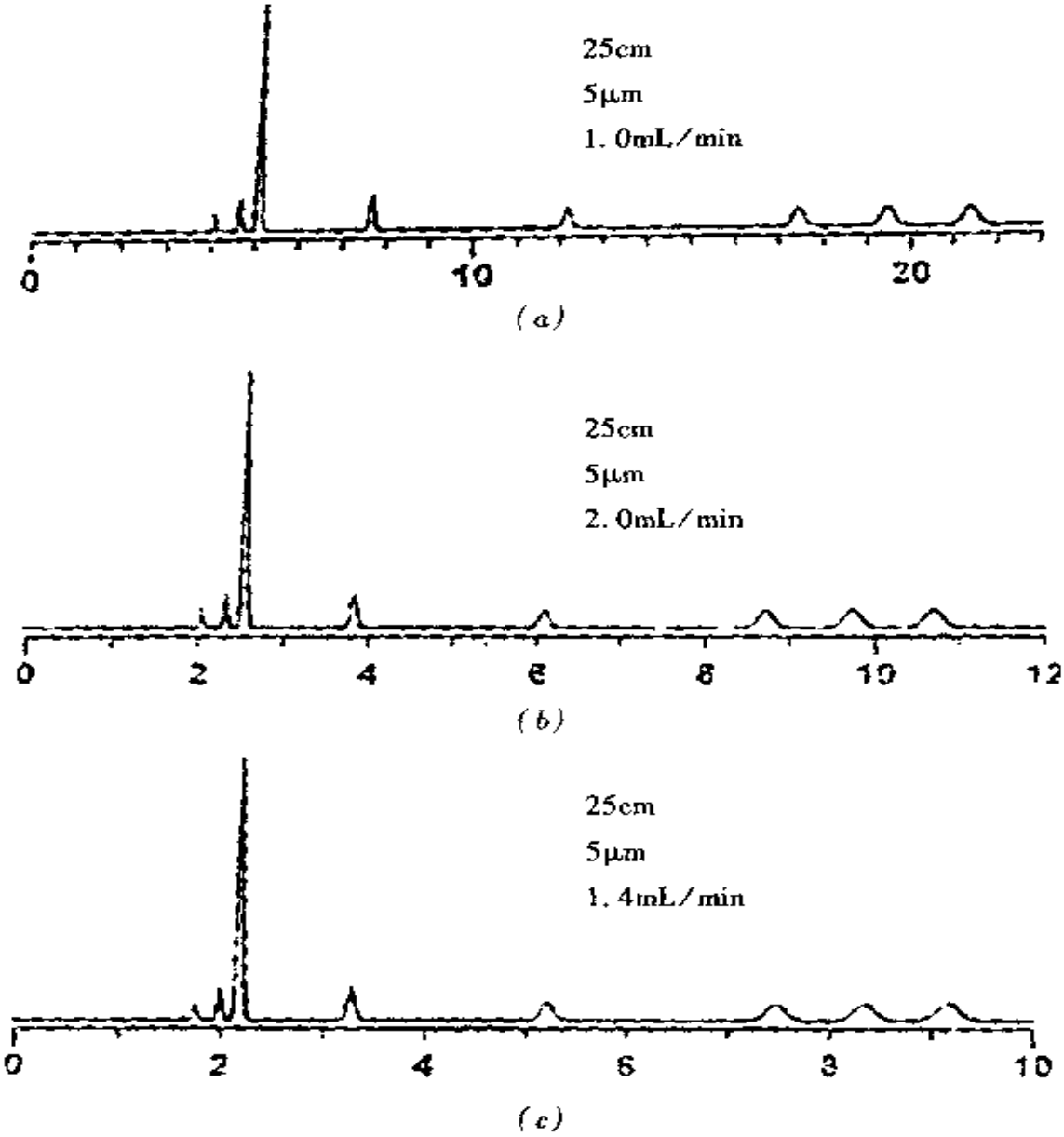


图 2－10　色谱柱条件对杀虫剂样品分离的影响[14]

条件：a）25×0.46cm Zorbax SB－C8 柱；40% 乙腈－水；30℃；1.0mL/min。条件 b）－ e）如图所示。样品：1. 阿特拉津代谢物；2. 塞克津代谢物；3. 亚砜；4. 砜；5. 敌草隆；6. 敌稗；7. 拿草特；8. 灭草灵

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

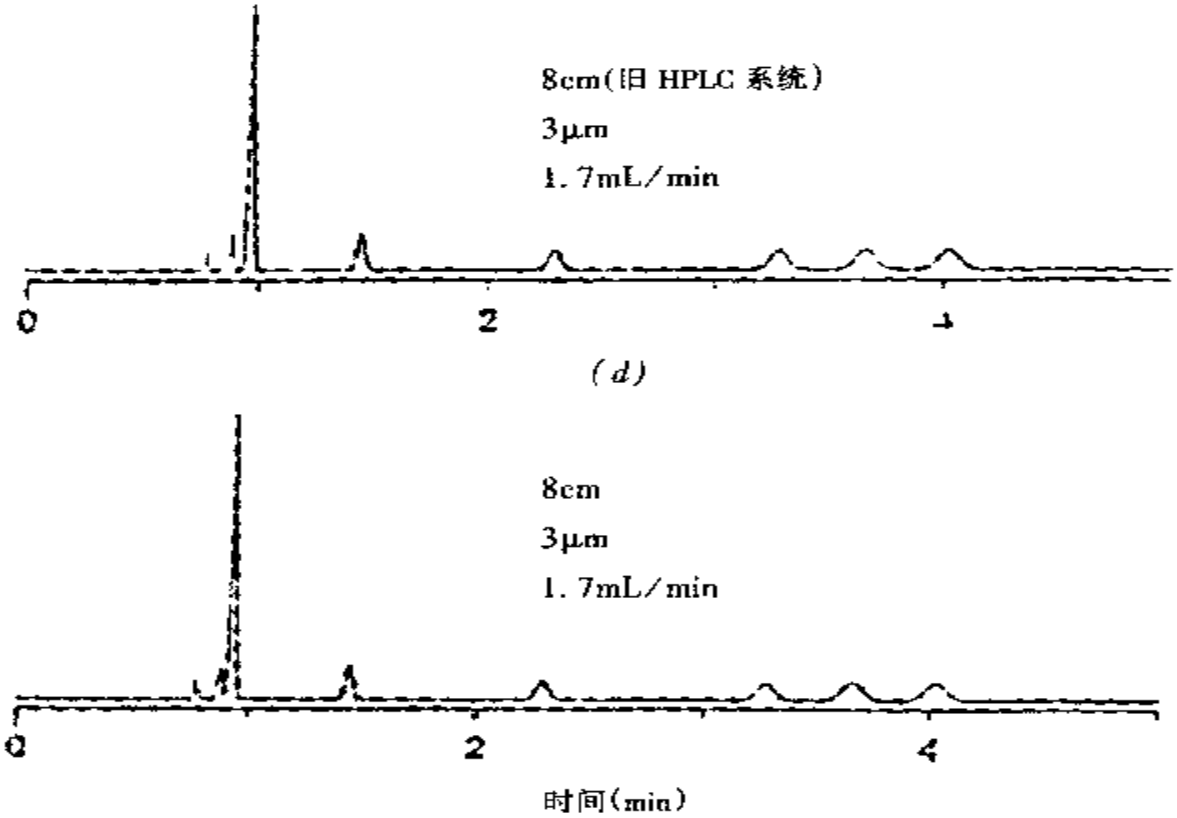


图 2－10(续)

而在柱头采用的微孔筛板所致(见 5.4.3.1 节)。然而,采用 2.0μm 筛板的 3.5μm 填料柱可提供小微粒的优点,似乎并无其不足(见 5.2.2 节)。

2.3.3.2 塔板数与条件的关系 色谱柱的塔板数与所有实验条件的关系已有非常完备的理论加以说明[18]。如果定义板高 $H = N/L$(L 为柱长),则 H 随流动相通过色谱柱的速度 μ 而变化($\mu = L/t_0$)。可通过两种不同表达式描述这种关系:

$$H = A' + \frac{B'}{u} + C'u \text{(van Deemter 等[19])} \tag{2.10}$$

$$H = A''u^{1/3} + \frac{B''}{u} + C''u \text{(Kennedy 与 Knox[20])} \tag{2.10a}$$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

式中 A'、B'、C'、A''、B''与 C''对特定样品化合物及实验条件为常数。一般情况下，式 2.10 与 2.10a 类似，可互换地用于描述塔板数随流量或速度 μ 的变化。有一最佳流速值，使 H 最小、N 最大。图 2－11 中脂肪酸酯的分离与流速和温度的关系图说明了这种关系。该样品的最佳流速在 0.4～0.6μL/min 之间（注意这是毛细管柱，ID = 0.2mm）。随温度的升高，最佳板高 H 不变（H = 17μm），但在高温下 H 随流速增加而降低。

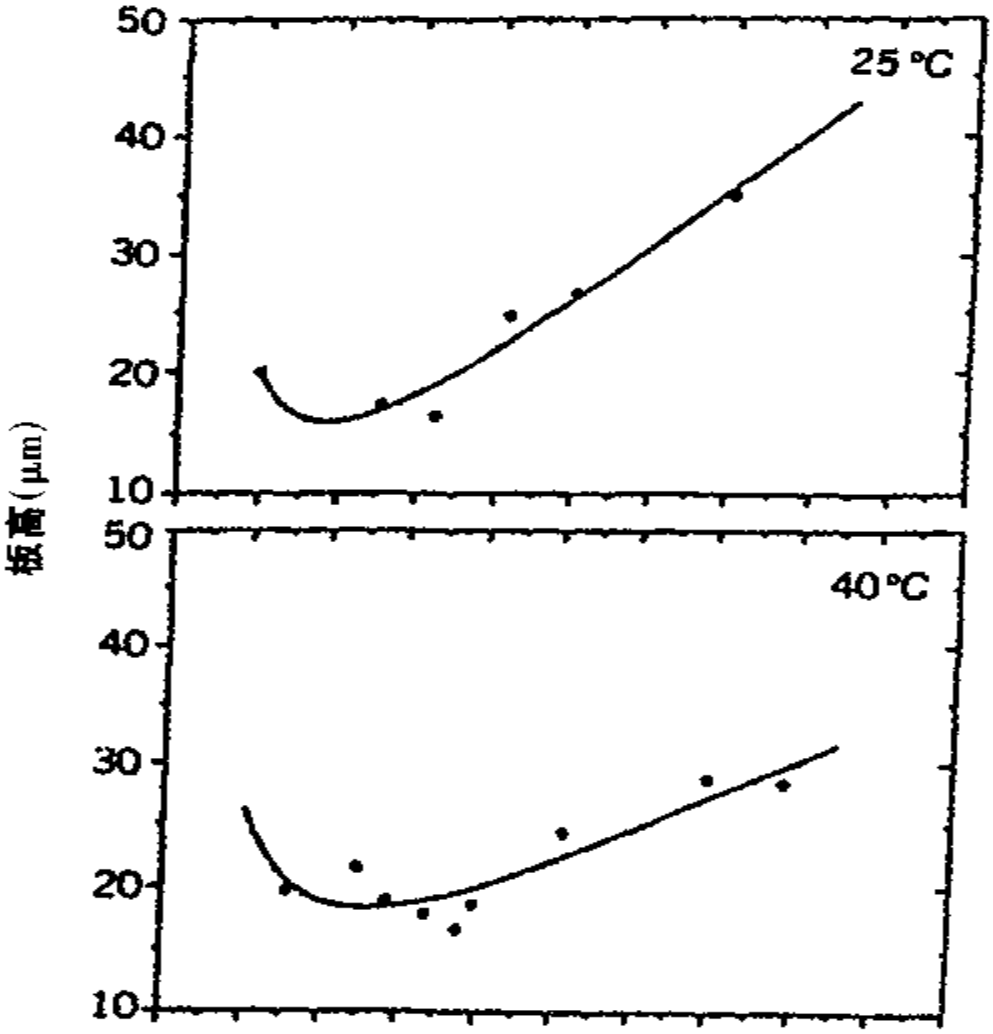


图 2－11　板高 H 对流动相流速的依赖关系[33]

C_{18} 脂肪酸甲酯；40×0.02cm 5μm C_{18} 柱；85% 乙腈－水流动相。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

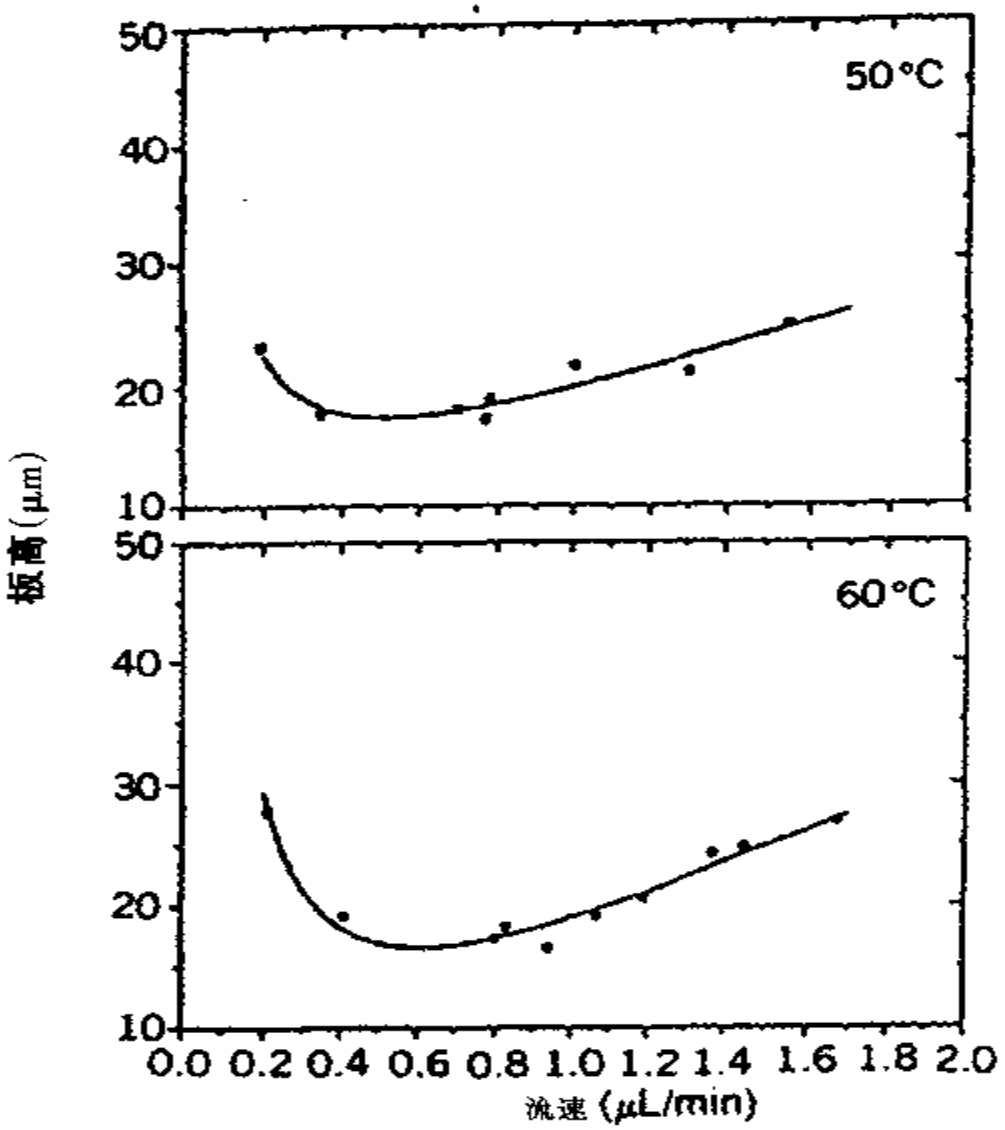


图 2－11(续)

板高 H 与流速 μ 的关系可以表示为无量纲形式:定义折合参数, $h = H/d_p$, $v = ud_p/D_m$。于是 Knox 公式(2－10a)可改写成[20]:

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv \tag{2.11}$$

式 2.11 已用于比较柱效和解释分离条件对塔板数的影响。对于填充良好的色谱柱,粒度不同、条件不同,系数 A、B、和 C 可近似

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

为常数(如多孔微粒，$A = 1$，$B = 2$，$C = 0.05$)。然而，B 和 C 值会随 k 值有少许变化[15]。对折合参数，Knox 式得到的理论关系(结果)见图 2－12 的多孔与薄壳(无孔)色谱柱。

HPLC 色谱柱通常在高于最佳流速的条件下操作（图 2－11 的 0.2mmID 柱为 0.4～0.6μL/min），因为高流速可缩短运行时间，而分离度的损失不大。在高流速条件下(一般 0.46cm ID 的色谱柱，> 0.5mL/min)，小微粒、小样品分子、低粘度流动相与高温能获得较高的塔板数。温度的影响见图 2－11。

2.3.3.3 柱外效应 前面的讨论忽视了 HPLC 仪器对分离的可能影响。峰扩展可在系统的多个部位发生，并对峰宽 W 产生影响：

- 在色谱柱中，如前节所讨论(W_c)
- 在进样器或自动进样器中(W_s)
- 在色谱柱与自动进样器或检测器之间的连接管与接头中(W_{1c})
- 在检测器的流动池中(W_{fc})

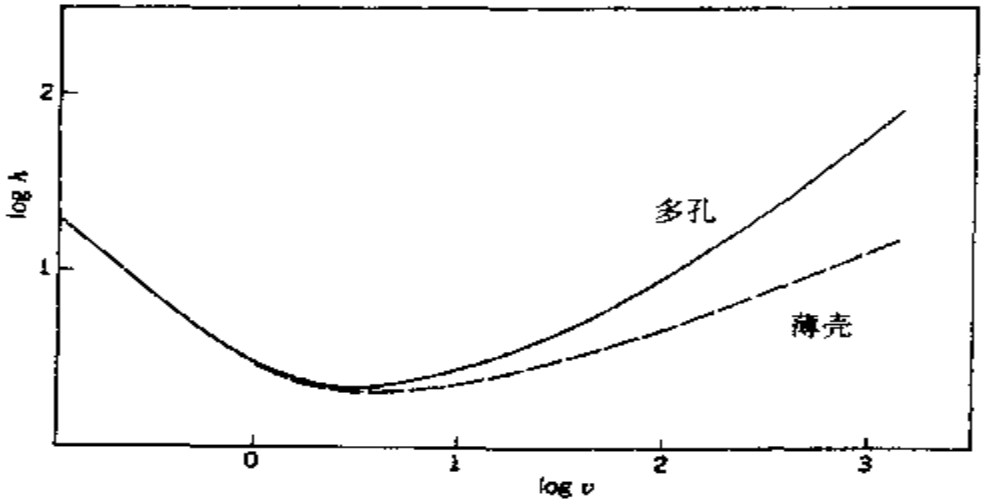


图 2－12 理论上色谱柱柱效对流速的依赖关系

多孔与无孔微粒色谱柱的 Knox 公式(减化的参数曲线)。多孔柱用式 2.10a 时，$A=1$，$B=2$，$C=0.05$。无孔柱用式2.10a 时，$A=1$，$B=2$，$C=0.003$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

在色谱图中得到的峰宽 W 为这些贡献的加和：

$$W^2 = W^2_c + W^2_S + W^2_{1c} + W^2_{fc} \tag{2.12}$$

只要峰宽贡献 W_S、W_{1c} 或 W_{fc} 小于 1/3 W，它们对 W 的影响可忽略不计。柱内贡献 W_c 可由式 2.8 计算，以体积单位 V 表示（基线谱峰体积）为：

$$V = \frac{4V_R}{\sqrt{N}} \tag{2.13}$$

由于：

$$V_R = V_m(1 + k) \tag{2.14}$$

因此：

$$V = \frac{4V_m(1 + k)}{\sqrt{N}} \tag{2.15}$$

式中 V_m 为柱死体积（式 2.5），它与色谱柱内体积成正比。这样，对于用小微粒（单位长度的 N 较大）填充的短、细色谱柱（V_m 小），峰宽 V 较小。而对于保留值较小的样品，V 也较小。当 V 小时，柱外效应的影响相对变大，这对于设计良好的 HPLC 仪器将更为重要。

自动进样器对峰展宽的贡献 W_S 通常主要由进样体积引起（见 2.4.1节）。可通过减小连接管的直径与长度，确保所有连接件制作合适，与零死体积匹配，降低柱外效应的贡献 W_{1c}。最后，用设计良好的小体积（如0.5～2μL）的流动池也可将 W_{fc} 的贡献降至最小。对实际的 HPLC 系统中柱外效应及其控制的深入讨论，详见文献22。

为避免高压，小粒径柱一般较短，所以分离结果更易受柱外效应的影响。表 2－3 的前 8 次实验假设在设计良好的 HPLC 系统（如 HP 1090 型）中完成。方法建立实验室一般拥有高质量的仪器，柱外效应的影响极小。然而，对日常 HPLC 分析的实验室而言可能并非如此。表 2－3 的第 9 和第 10 条的实验说明，采用老式的、设计不好的 HPLC 仪器分离时的方法性能。如用 25cm、5μm（2.0mL/min）柱（表 2－3），分离度受所用系统的影响不大：R_s = 2.3（新系

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

统)与 $R_s=2.2$(旧系统)。然而,如用 8cm、3μm(1.7mL/min)柱,分离度在旧系统上降低很大:$R_s=1.3$,而新系统为 2.0(比较图 2-10 *d* 与 *e*)。采用有较大柱外效应的仪器进行实验时,5μm 的微粒柱通常较受欢迎(如在许多生产与质量控制的实验室中)。

2.4 进样量的影响

除在第 13 章与本节中,本书中均假设进样量足够小,不会影响色谱图中各峰的保留值、塔板数或分离度。对于一般的进样量范围(如用 0.4~0.5cm ID 的色谱柱,<25μL 与 <10μg),通常会如此。如果减小柱长与直径,允许的样品体积和/或重量也相应减小。同样,用高效柱(*N* 大,其他因素相同),将需用小的样品体积与重量。碱性化合物在硅胶基质的反相柱填料上的分离,有时需将样品量减小 10 倍或更多(<1μg),以避免谱峰的过度展宽和拖尾(由于硅羟基的作用[231])。

由于失误或故意增加进样量至超出这些限度,将导致可预期的分离变化,这是本节所要讨论的主题。随着进样量的增加,最终会使谱峰展宽,塔板数 *N* 下降,样品分离度变差。我们将这种情况称作柱超载。

了解进样量对 HPLC 分离的影响,可以使我们:

1. 避免由于进样量太大,使分离发生不理想的变化
2. 加大进样量(见 14.5.4 节),以提高痕量分析的检测灵敏度
3. 在制备 HPLC 中,提高纯化产品的回收量(见第 13 章)

由于进样的样品体积或质量太大,将引起分离度和/或保留值的变化,分别称为体积超载或质量超载。

2.4.1 体积超载:进样体积对分离的影响

对分析型分离而言,通常最好将样品溶解在流动相中。这样,样品溶剂与流动相的溶剂强度(*k* 值)相同。如果小体积样品峰的基线(4σ)体积为 V_c,体积为 V_s 的样品以塞状注入色谱柱的峰体

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

积 V 则为[124]：

$$V = \left(\frac{3}{4}V_s^2 + V_c^2\right)^{1/2}$$

$$\approx (V_s^2 + V_c^2)^{1/2} \qquad (2.16)$$

增加进样体积 V_s 对峰宽和峰形的影响见图 2－13 和表 2－4 的说明。当样品体积与峰体积的比值（V_s/V_c）小于 0.1 时，样品体积对峰宽或分离无显著影响。然而，随进样量进一步增加，样品峰则开始展宽，而且最终（如 $V_s/V_c>5$，如图 2－13 中的样品 4）使峰顶变成平台。

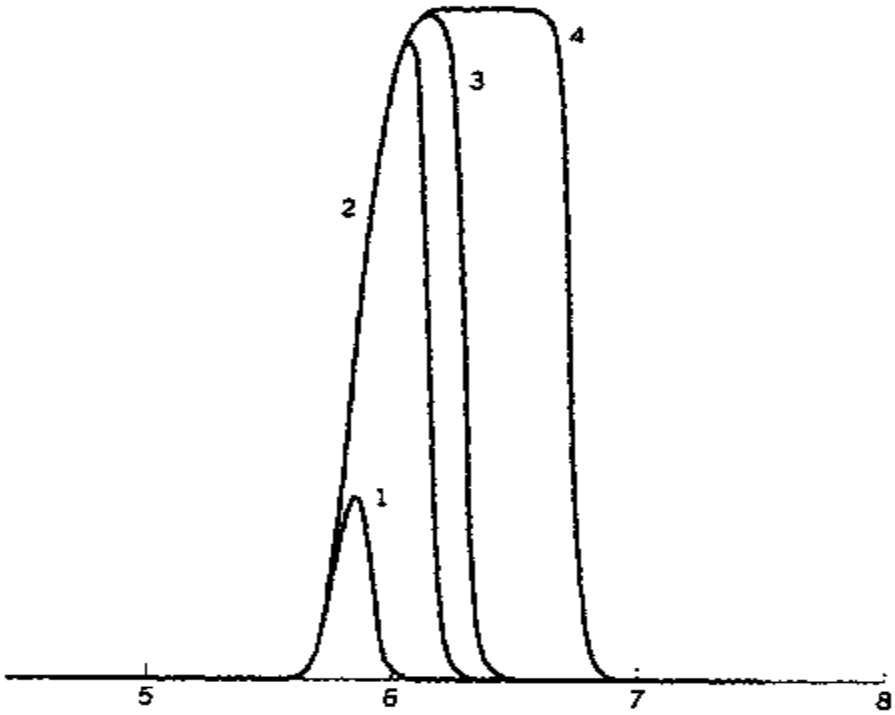


图 2－13　进样体积 V_S 对峰宽与峰形的影响

$V_S/V_C=0.3(1);3(2);5(3);\ 15(4)$。

只要进样体积 V_s 小于小样品峰体积 V_c 的 0.4 倍，峰宽的增加与样品分离度的损失将会 < 10%；这通常是可以接受的。这一标准（$V_s<0.4V_c$）应适用于难分离物质对。例如，若采用 15×0.46cm 的色谱柱，$0.5<k<20$。塔板数 $N=10,000$，V_c 值将在 90～

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 2－4　进样体积(定量环进样)对峰宽与峰高的影响(式 2.13)

V_S/V_c^a	V^b	相对峰高
<0.05	(1.00)	—
0.1	1.01	0.10
0.2	1.03	0.19
0.3	1.06	0.28
0.4	1.10	0.36
0.6	1.22	0.49
1.0	1.53	0.65
1.5	2.00	0.75
2.0	2.52	0.79
5.0	5.86	0.85
10.0	11.6	0.86(最大)

[a] V_S 为样品体积；V_C 为小体积样品的基线峰体积。
[b] V 为观测的峰体积

1300μL 的范围，因此最大进样体积将在 35～500μL 的范围[即 V_c 的最大体积将很大程度取决于被测物(s)的 k 值]。当不限制分离度或样品被溶于比流动相弱的溶剂中时，可以使用大的进样体积。

用定量环进样时，样品在进入色谱柱之前(由于层流)已与流动相混合，因此样品进入色谱柱时体积一般增加(约 50%)；即样品体积对峰展宽的影响通常比式 2.16 预测的要大。表 2－4 基于式 2.16 总结了样品体积对峰宽的影响。注意样品体积给峰宽的影响对宽峰(大 V_c)不很重要，因为所用的样品体积 V_s、比值 V_s/V_c 很小，这说明色谱图中谱峰流出越早(峰较窄)受大体积进样的影响越大，这也类似于其它柱外峰展宽效应的影响(见 2.3.3.3 节)。

样品是用非流动相溶剂溶解的溶液时，如果样品溶剂比流动相弱，可适当加大进样体积，对峰宽与分离无不良影响。相反，如

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

样品溶剂比流动相强，大进样量往往会导致峰展宽和/或色谱图中早流出峰的变形[26-28]，应尽可能加以避免。如果改变样品溶剂不方便，有时可以减小溶于强溶剂（如 100% B）中的样品量。若先用弱的 A 溶剂稀释样品（如反相 HPLC 中，用水），然后再适量加大样品的进样量，也可有效地减少样品溶剂引起的问题。见 5.4.2 节中的进一步讨论。

2.4.2 质量超载：样品重量对分离的影响

尽管进样体积很小，样品质量也可能会使柱超载，致使样品峰展宽，峰形改变。这是因为色谱柱对保留样品有一容量限度（即固定相被样品所饱和）。色谱柱吸收的化合物量 X 可用兰格缪尔（Langmuir）等温线估算[29]，其说明见图 2－14 *a* 中以固定相吸收的 X 对流动相中的 X 浓度（平衡时）所作的对数曲线图。X 在流动相中的浓度[X]很小时，（例如图 2－14 *a* 中的 [X] < 3），色谱柱吸收的 X 与流动相中的 X 浓度成正比（线性等温行为）。在线性等温条件下（样品量小于某最大值），当进样量改变，样品的保留值、峰宽 W 或分离度几乎不变。加大流动相中 X 的浓度（如图 2－12 *a* 中的 >10），线性等温行为消失，进样量将对分离产生影响（见

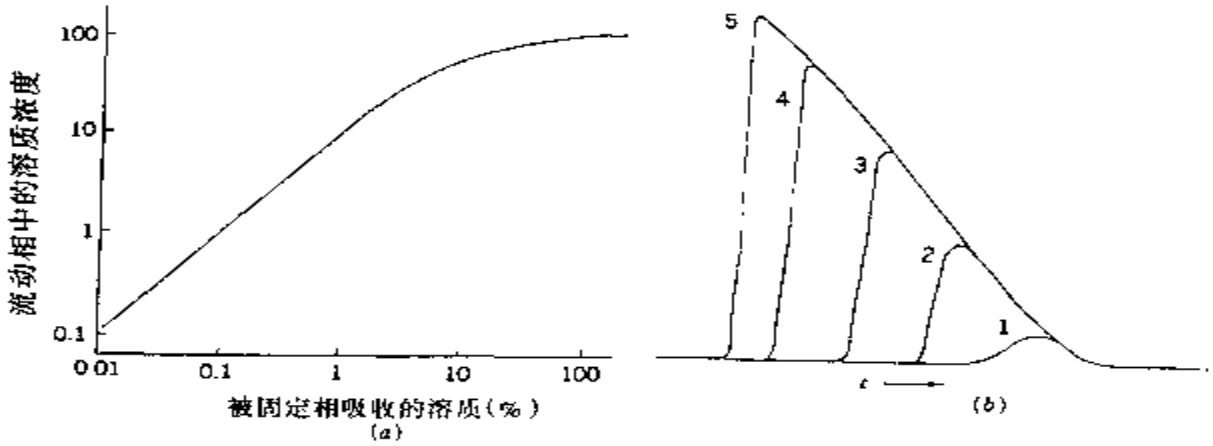


图 2－14　样品重量对峰宽与峰形的影响[30]

（*a*）色谱柱吸收的溶质（以饱和容量的百分比表示）对流动相中溶质浓度的曲线图；（*b*）进样质量不同的叠加溶质峰（1－5）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

图 2－14 b)。在此，重复进样，仅改变样品重量，将得到的色谱图重叠起来，结果如图 2－14 b。溶液 1 含有的样品量小，所以峰未发生变形。然而，继续加大进样量(2～5)，会产生形状象直角三角形的谱峰。而且样品量越大，得到的峰就越宽。

只要注入的样品中单个样品组分的质量不太大(一般 0.46cm ID 柱小于1～2mg)，各谱峰能彼此不受干扰地通过色谱柱。在图 2－15 a 中，反相分离两种黄嘌呤(15×0.46cm 柱)，样品量均为 1mg。两种化合物分别进样1mg(——)，与其混合物(－－－)，所得三份色谱图完全重叠。无论单独进样还是彼此混合进样，这种中度超载分离所得的谱峰差异很小。类似的情况见图2－15 b 的分离，每种化合物进样2.5mg。图2－15 a 和 b 中，直角三角形峰形是样品量超过线性等温行为所允许的最大样品量(各化合物10μg)约100～250倍的结果。对进样量影响的详细讨论，请参见13.2节。

2.4.3 避免由于进样量太大引起的问题

以分析为目的的 HPLC 分离，最好是用同一程序测定不同样品，并保持 k、N 和 R_s 不变。这种条件可以简化以保留时间为基础的定量分析与峰识别。k 与 N 值的恒定本身又要求进样量足够小，不致于影响分离。在 HPLC 分析中进样体积一般保持恒定，这种情况下大体积进样将不会引起样品分离性能的改变。

2.4.3.1 样品浓度过大 如果各样品中被测物浓度不同，高浓度样品则有可能造成质量超载，导致分离度降低、保留时间变化等。对最终的 HPLC 程序，应测试被测物浓度或质量对分离的影响(方法建立之后)，确定最大被测物浓度或质量 w_{max}。样品浓度高于此浓度应加以稀释并重新实验。反相或正相分离的最大值 w_{max} 可用下式进行估算(见 13.4 节)：

$$w_{max} \approx 50\left(\frac{1+k}{k}\right)^2 d^2 \qquad (2.17)$$

式中 w_{max} 的单位为 mg，d_c 为色谱柱内径(cm)。最大进样量对短柱

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

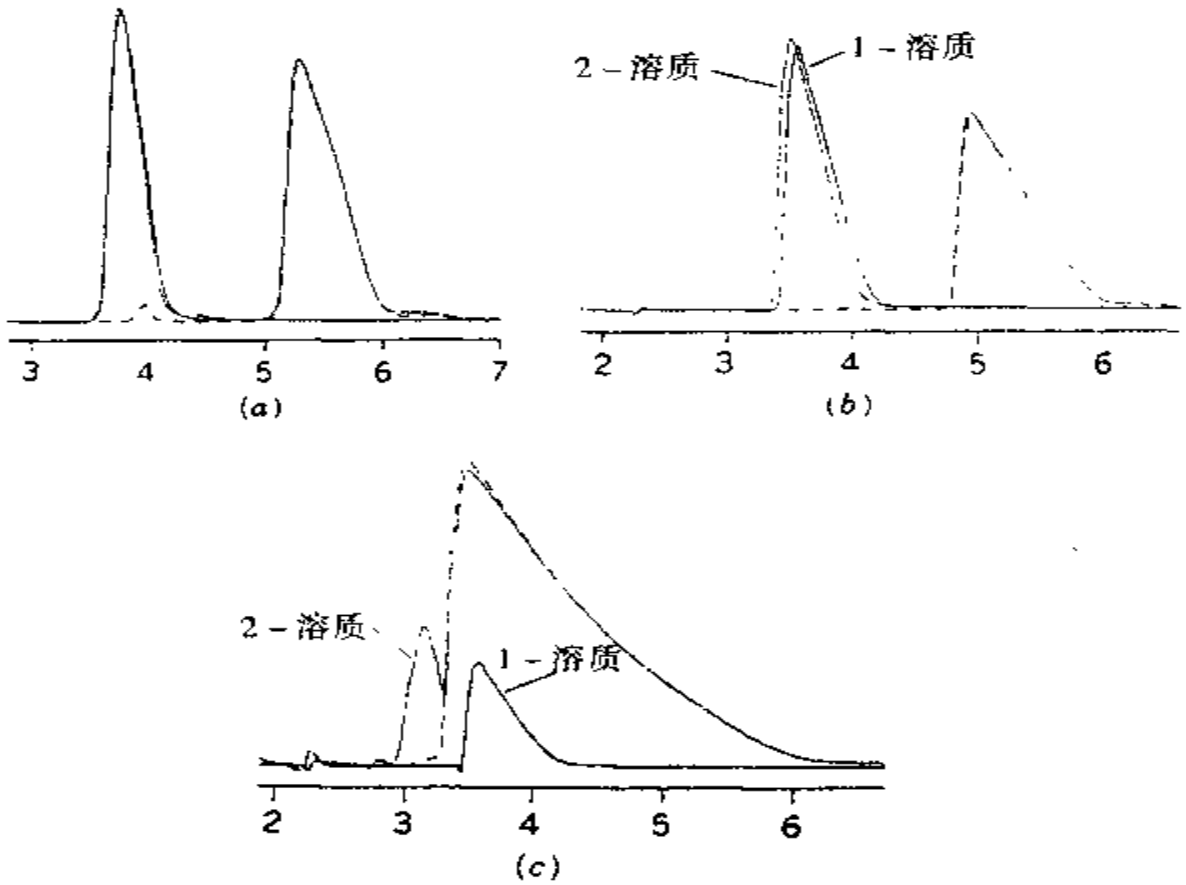


图 2－15　黄嘌呤样品的分离与进样量的关系[31]

进样单个化合物与混合物的重叠色谱图　化合物为羟乙基茶碱(HET)与羟丙基茶碱(HPT)；色谱柱为 15×0.46cm Zorbax C_8；流动相为甲醇－乙腈－缓冲液(20:5:75)。(a)各化合物 1.0mg；(b)各化合物 2.5mg；(c)HET 2.5mg、HPT 25mg

与长柱相同[32]。注意 w_{max} 值是对样品中的各化合物而言，并非样品的总重量。比如，假如样品中组分均不超过样品总重量的 10%，最大样品量将比 w_{max} 大 10 倍。其柱填料的孔直径≫10nm，粒度 <5μm，样品中含有可电离的酸，或(尤其是)碱性样品受硅羟基的作用时(见 7.3.3.2 节)，以式 2.1 估算的 w_{max} 将过高。

2.4.3.2 痕量分析　痕量分析或被测物不易检测时，最好增大流动池中被测物的信号或浓度 C(式 3.5)。通常，痕量分析注入

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

被测物的量很少，不会使柱超载，但样品中的其他组分却可能使柱超载，对被测物的分离产生不利影响。当一种化合物的进样量足够大，可能会影响到对第二个邻近谱峰的分离。如图 2－15*c* 所示。在图 2－15*b* 中，各化合物进样 2.5mg，样品中的第一化合物不影响第二化合物的分离。而在图 2－15*c* 中，第二化合物的进样量增加了 10 倍(25mg)，此时第一峰的分离明显受到影响。对于注入的第一化合物本身，保留时间为 3.6min；而该化合物在已有 25mg 第二化合物的情况下再进样，其保留时间则变为 3.1min，而且谱峰也变窄了。一些与痕量分析关系密切的类似示例见图 13－5。

当样品含有过量的干扰化合物，最好的方法是纯化样品，以除去这些干扰化合物(见第 4 章)。在痕量分析中，尽量加大进样体积较好。表 2－4 建议 V_s / V_c 值通常不应超过 0.4；否则，会导致显著的峰展宽与分离度下降。然而，如果相关谱峰与相邻谱峰分离得很好，样品足够多，大体积样品能增加峰高 2 倍以上(表 2－4)。如果样品溶解在比流动相弱得多的溶剂中，注入大体积样品，峰面积会相应增加，且不会产生额外的峰展宽现象。

参考文献

1. J. C. Berridge, *Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations*, Wiley, New York, 1985, pp. 19－27.
2. P. J. Schoenmakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986, Chapter 4.
3. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, and L. R. Snyder. *J. Chromatogr.*, 594 (1992) 65.
4. J. P. Foley, *Analyst*, 116 (1991) 1275.
5. DuPont application sheet. Instrument Products Division, DuPont Co., Wilmington, DE.
6. L. R. Snyder, P. W. Carr, and S. C. Rutan, *J. Chromatogr.* A, 656 (1993) 537.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

7. *High Purity Solvent Guide*, Burdick & Jackson Laboratories, Muskegon, MI.
8. *HPLC Solvent Reference Manual*, J. T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ.
9. M. Weichmann, *J. Chromatogr.*, 235 (1982) 129.
10. J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and J. J. DeStefano, *Amer. Lab.*, 26 (1994) 36.
11. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, B. A. S. Marchylo, J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* A, 686 (1994) 45.
12. J. P. Foley and J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 730.
13. M. S. Jeansonne and J. P. Foley, *J. Chromatogr.*, 594 (1992) 1.
14. Unpublished data from laboratory of LC Resources Inc., McMinnville, OR, 1992.
15. R. W. Stout, J. J. DeStefano, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 282 (1983) 263.
16. L. R. Snyder and J. W. Dolan, *Amer. Lab.*, August 1986, p. 37.
17. L. R. Snyder and M. A. Stadalius, in *High – Performance Liquid Chromatography. Advances in Perspectives*, Vol. 4, C. Horvath, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1986, p. 195.
18. S. G. Weber and P. W. Carr, in *High Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds., Wiley – interscience, New York, 1989, p. 1.
19. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, 5(1956) 271.
20. G. J. Kennedy and J. H. Knox, *J. Chromatogr.* Sci., 10 (1972) 549.
21. J. S. Yoo, J. T. Watson, and V. L. McGuffin, *J. Microcol. Sep.*, 4 (1992) 349.
22. J. W. Dolan and L. R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Humana Press, Totowa, NJ, 1989, pp. 98 – 103.
23. M. A. Stadalius, J. S. Berus, and L. R. Snyder, *LC/GC*, 6 (1988) 494.
24. J. C. Sternberg, *Adv. Chromatogr.*, 2 (1966) 231.
25. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and G. B. Cox, *J. Chromatogr.*, 483 (1989)63.
26. M. Tsimidou and R. Macrae, *J. Chromatogr.*, 285 (1984) 178.
27. N. E. Hoffman, S. – L. Pan, and A. M. Rustum, *J. Chromatogr.*, 465

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

(1989) 189.
28. N. E. Hoffman and A. Rahman, *J. Chromatogr.*, 473 (1989) 260.
29. J. H. Knox and H. M. Pyper, *J. Chromatogr.*, 363 (1986) 1.
30. B. L. Karger, L. R. Snyder, and C. Horvath, *An Introduction to Separation Science*, Wiley – interscience, New York, 1973, p. 134.
31. J. E. Eble, R. L. Grob, P. E. Antle, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 405 (1987) 31.
32. H. Poppe and J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 395.
33. Y. S. Yoo, J. T. Watson, and V. L. McGuffin, *J. Microcol. Sep.*, 4 (1992) 349.

参考书目

1. C. F. Poole and S. K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1991. (a general review of the principles of chromatography)
2. L. R. Snyder, in *Chromatography*, 5th ed., E. Heftmann, ed., Elsevier, Amsterdam, 1992, Chapter 1. (a general review of the principles of chromatography)
3. G. Guiochon, in *High – Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol. 2, C. Horvath, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1980. (a discussion of optimization in liquid chromatography, including detailed discussions of column efficiency and extracolumn effects)
4. S. G. Weber and P. W. Carr, in *High Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds., Wiley – interscience, New York, 1989. (the most recent in – depth discussion of the factors that determine column efficiency)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第3章　检测灵敏度与选择性

3.1 引言

大多数情况下，HPLC 方法建立使用紫外(UV)检测器；可变紫外检测器，也可使用二极管阵列检测器(DAD)。因此，本章大部分讨论 UV 检测，这种检测器对大多数样品有足够的响应值。对下列情况，可以考虑选用其它种类的检测器：

1 样品的 UV 吸收值很小或无吸收。

2 被测物的浓度太低，无法进行紫外检测。

3 样品干扰严重

4 需要结构定性的信息

检测器种类与操作在灵敏度、选择性与基线噪音三个方面影响样品组分与潜在干扰的相对响应值。检测灵敏度的重要性见图 3－1*a* 中经长时间放置的正丁醇样品的分离。在 200nm 用 UV 检测，色谱图中未有峰检出。如果选择 184nm 检测(图 3－1*b*)，则可清晰地看到八个不同的峰。对检测选择性的说明见图 3－2，在图 3－2*a* 中的有关被测物峰(核黄素，箭头所指)几乎完全被先流出的干扰峰覆盖掉。这种情况下，将 UV 检测(图 3－2*a*)改为荧光检测(图 3－2*b*)后，检测灵敏度有了很大提高，可以满足定量测定核黄素含量的的需要。图 3－3 表明基线噪音在限制检测和定量方面的重要性。图 3－3*a* 的信噪比(S/N')仅为 4，妨碍了峰高或面积的精密测定。在检测器设置不同的相同分离中(图 3－3*b* 和 *c*)，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

基线噪音大大降低，图 3－3c 中 S/N'比值增加到 19。

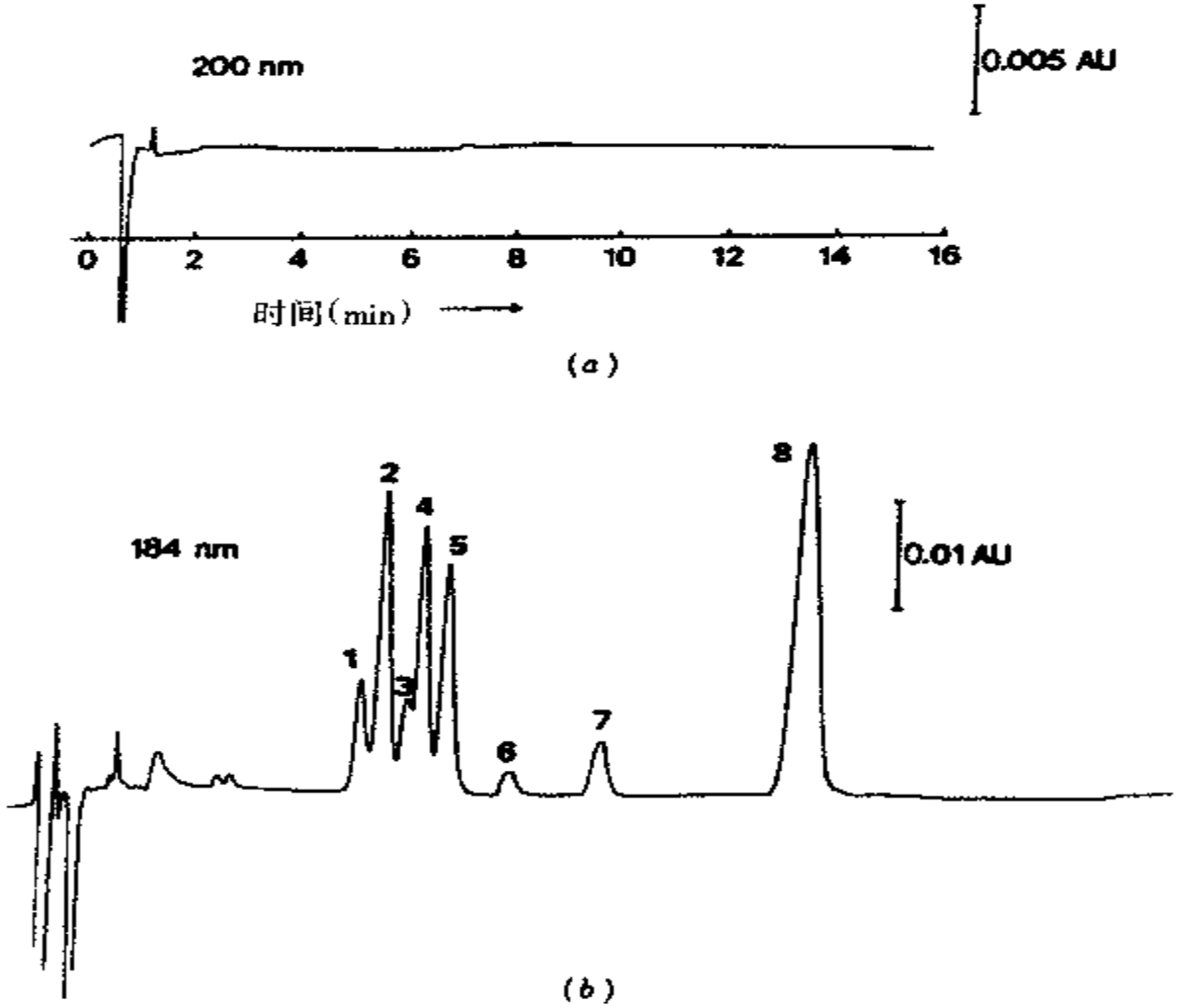


图 3－1　反相色谱中检测条件与检测灵敏度的关系[1]

样品：经长时间放置的正丁醇

条件：15×0.46cm，7μm C_8 柱；流动相：25% 乙腈－1mM 磷酸；2.0mL/min；室温；UV 检测。（a）在 200nm 检测；（b）在 184nm 检测。

3.2 UV 检测

3.2.1 总论

图 3－4 所示为通常 UV 检测器的结构示意图。典型光源为氘

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

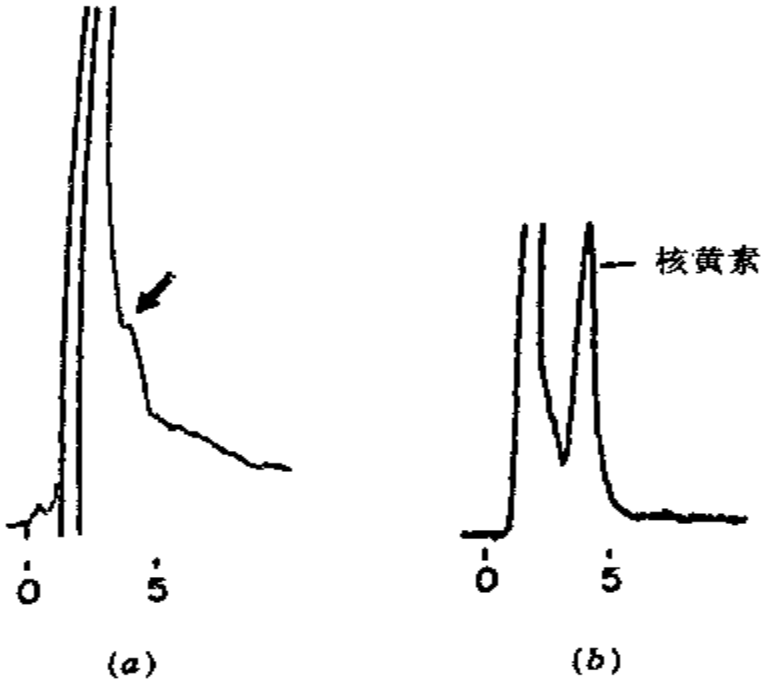


图 3－2　阳离子交换 HPLC 中检测条件与检测选择性的关系

样品：狗食品提取物中的核黄素

条件：100×0.21cm Zipax SCX 柱；流动相：水；1.0mL/min；室温。(a)在 365nm 紫外检测；(b)荧光检测，激发光波长在 365nm，发射光波长在 530nm。

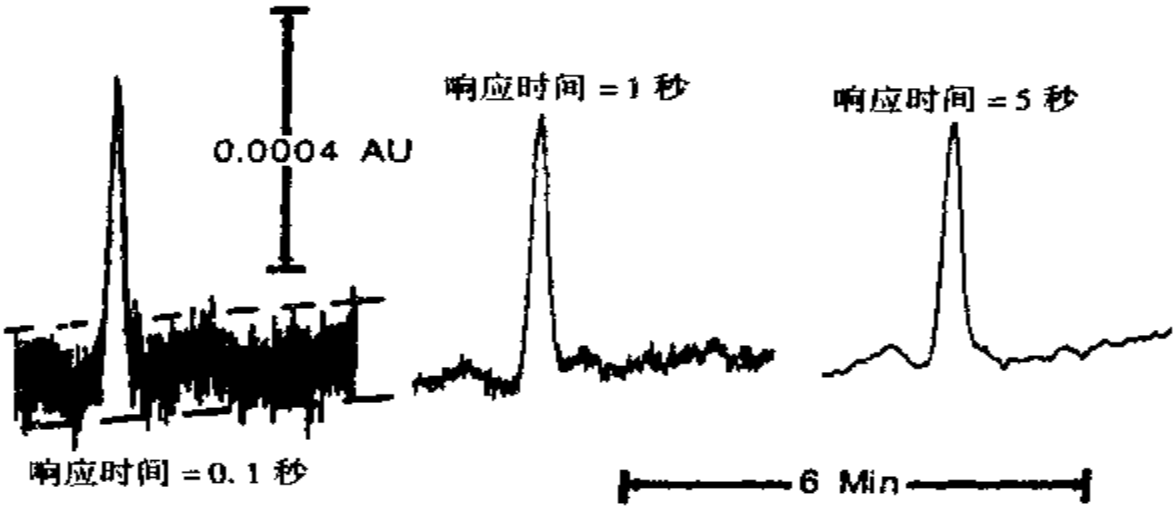


图 3－3　信/噪(S/N')比：噪音与检测条件的关系[2]

响应时间 0.1～5s。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

灯，它发出的光在 190～400nm 的波长范围内有适宜的光强度。当需在可见波长（400～700nm）检测时，常用高能卤钨灯（尽管氘灯在 400nm 以上仍可用）。不过，大多数 HPLC 在 400nm 以下的波长处进行检测。氘灯发出的光穿过可透过 UV 光并与色谱柱连接的流动池，照射到光二极管上（老型号仪器为光电管），测定光强度 I。通常，灯光也同时照射到参比二极管上，以测定光线的初始强度 I_0。检测器电子系统将两只二极管上的信号转变成吸收值 A，再传送至数据处理系统：

$$A = \log\frac{I_0}{I} \tag{3.1}$$

吸收值 A 与流动池中被测物的浓度 C、被测物摩尔吸收系数 ε 和流动池长度 L_{fc} 的关系符合 Beer 定律：

$$A = C^{\varepsilon} L_{fc} \tag{3.2}$$

选择影响检测的实验条件是为了尽量增大有关样品组分的响应信号 S（等于峰极大处的 A）。

可变波长检测器具有选择不同检测波长的功能（如 220nm）。选择波长借助于如图 3－4*b* 所示的衍射光栅来实现。灯发出的光线通过一入口狭缝进入光栅组件，被透镜 *A* 聚焦于光栅上。可变换光栅的角度，使所选波长的单色光照射到第二只透镜 *B* 上，再转射出出口狭缝。可变波长检测器的光栅组件位于灯与流动池之间。二极管阵列检测器（DADs）（见 3.2.6 节）的光栅组件则置于流动池后面，以使不同波长的光能同时被光敏二极管阵列检测到（并将结果储存）。

3.2.2 波长的选择

对许多样品来说，只有仔细选择检测波长，才能得到良好的分析结果。而选择波长时需了解各样品组分的 UV 光谱。如果可得到被测物的标准品，即可在 HPLC 方法建立之前测出其 UV 光谱。另外，用 DAD（见 3.2.6 节）也可在方法建立期间获得各样品组分的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

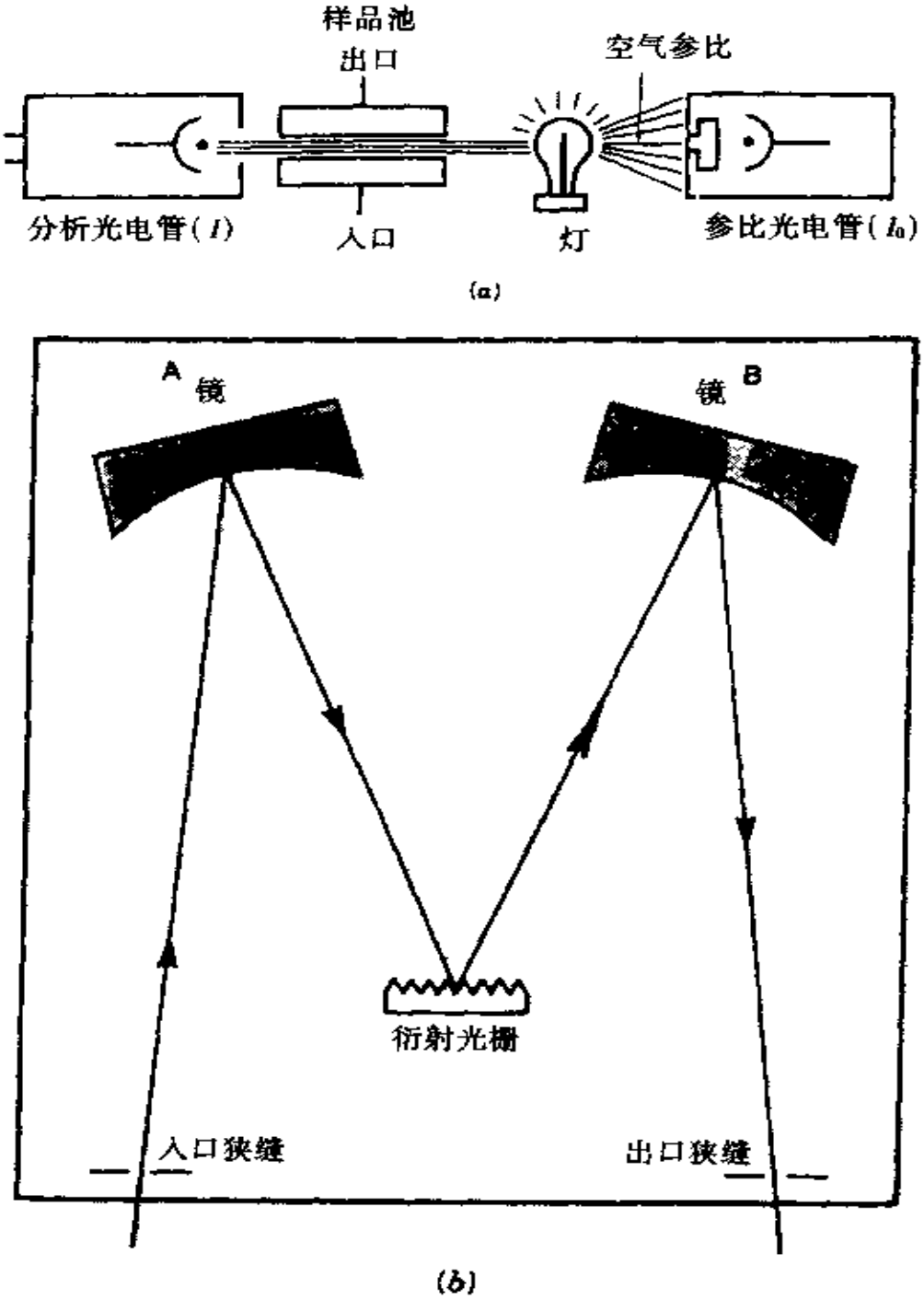


图 3－4　UV 检测器[3]
(a)结构示意图;(b)光栅组件。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

UV 图谱。通过将 DAD 应用于 HPLC，还可获得大量的其它信息。

3.2.2.1 样品吸收值与其分子结构的关系 样品中各被测物在所选 UV 检测波长处必须有合格的吸收值，流动相也必须有合格的透光率。对某些样品来说，选择样品干扰物吸收值最小处的波长可能有意义。图 3－5 所示为两种抗抑郁药成分[阿米替林(AMI)与丙咪嗪(IMI)] 稀溶液的 UV 吸收光谱，可说明选择测定波长时应考虑的某些因素。如果两化合物均需测定，选 210nm 可能最好，此处各化合物的吸收值接近最大，有数种溶剂与流动相添加剂可在此波长处使用(见 3.2.2.2 节)。如果有样品干扰(例如近 t_0 处)，给两种化合物的分离与定量造成麻烦，更好的选择可能在 240～250nm 的波长处。大多数干扰物在 240nm 以上的吸收值与 210nm 相比会低很多。假如 IMI 为被测物，而 AMI 为干扰物

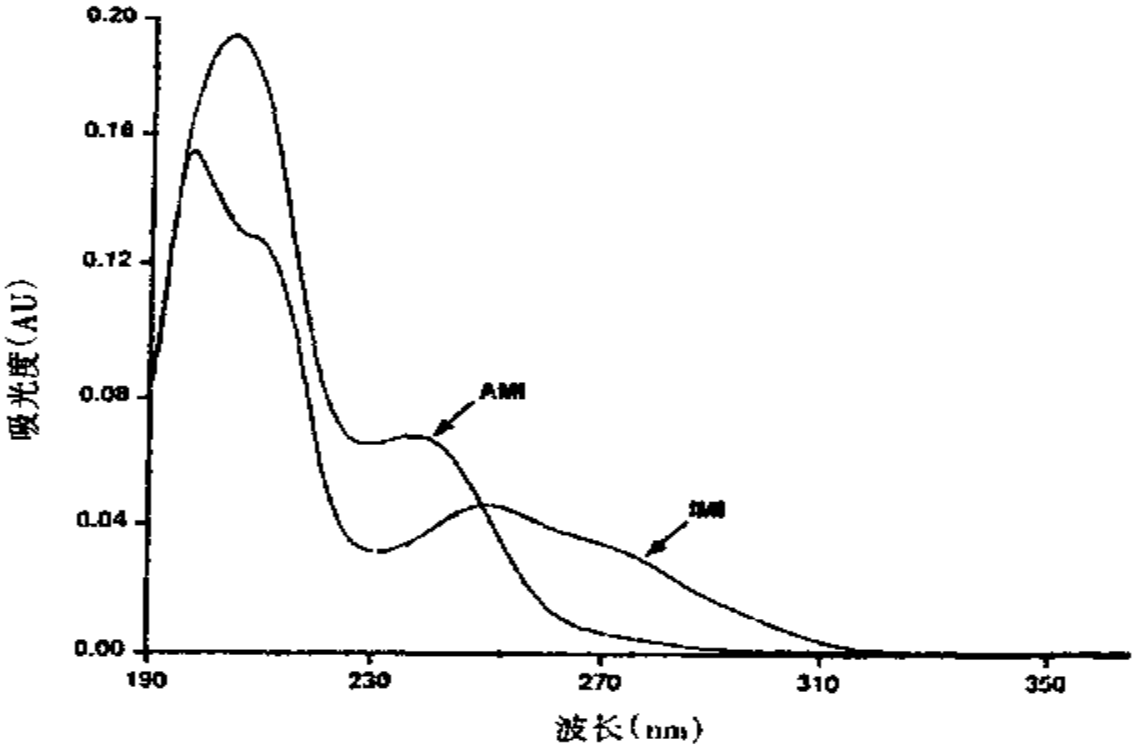


图 3－5 两种三环抗抑郁药物阿米替林(AMI)与丙米嗪(IMI)的 UV 光谱图[2]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的话(不包括痕量分析),则在 290～300nm 处检测可能更好,因为在此波长范围内只有 IMI 的吸收值可检测到。

检测器信号 A 与被测化合物的摩尔吸收系数 ε 成正比(式 3.2)。UV 检测对于大多数样品组分的分析都有足够的灵敏度,在 185nm 以上的某波长处,其 ε 值必须大于 10,大多数化合物皆能满足这一要求。另一方面,痕量分析通常要求 ε 值大于 1000。用 UV 检测进行化合物的痕量分析,一般 ε 值不可低于 100。饱和烃

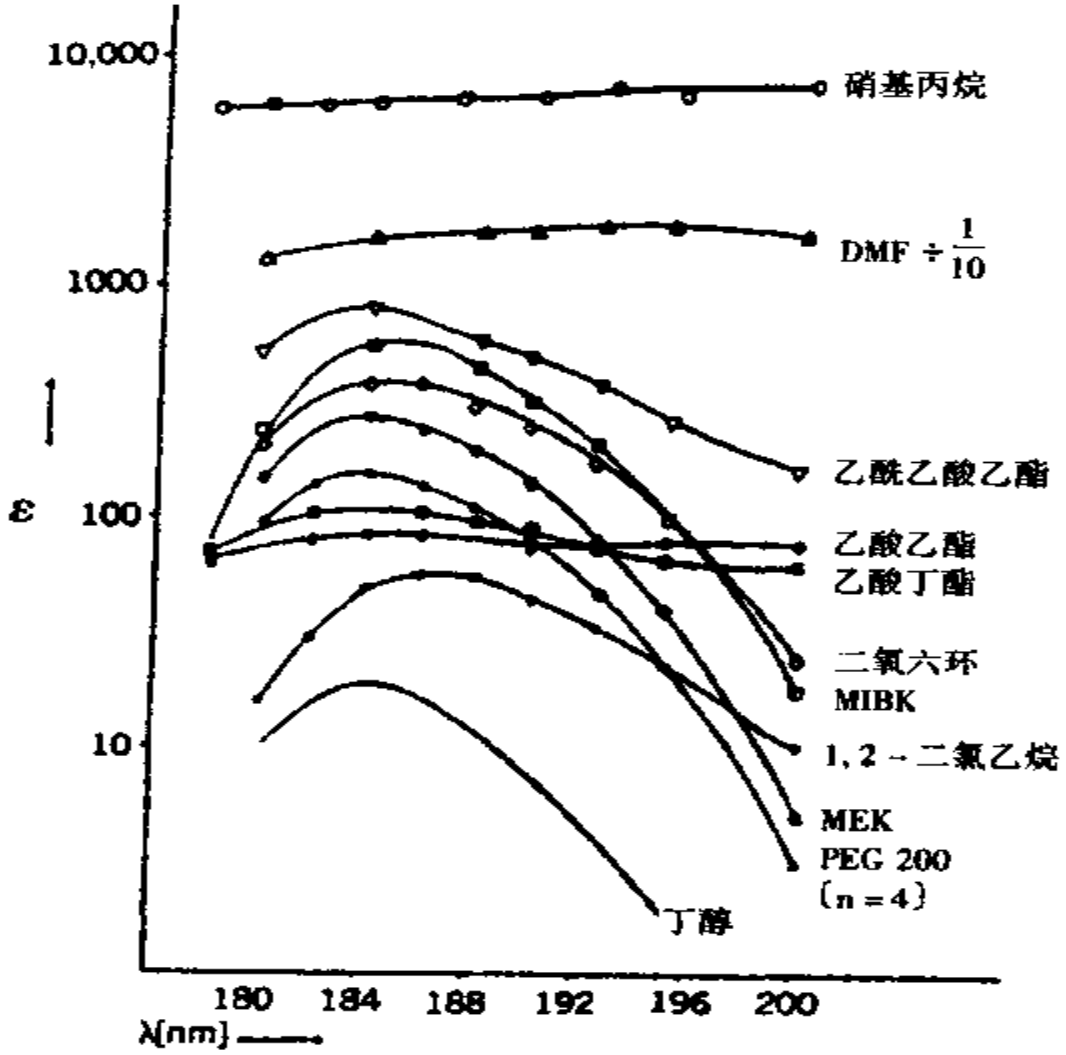


图 3－6　仅在短波长有吸收的化合物的 UV 光谱[1]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

类以及其氨基或氰基衍生物是仅有的一类完全不适合 UV 检测的有机化合物。被醚基(-O-)、羟基(-OH)、氯(-Cl)、羧基(-COOH)或酯基(-COOR)取代的饱和烃类具有临界吸收值(ε<100),可能需在短波长处(185~210nm)检测。图 3-6 表明这类化合物中一些代表化合物的 ε 值随波长的变化情况。当检测波长小于 210nm 时,样品干扰物一般有强吸收,选择流动相溶剂与添加剂有些受限。许多 UV 检测器可用于< 200nm 的波长,但在此处的检测不稳定,也不方便[1]。

除上述这几类化合物外,一般化合物都具有较大的 ε 值,能在较长波长(>210nm)检测。表 3-1 列出了各种官能团的最大波长与摩尔吸收系数 ε。芳香族化合物的 ε 值在 210nm 以上通常大于 1000。

表 3-1 一些常用官能团的代表摩尔吸收系数值

化合物类型	发色团	波长(nm)	摩尔吸光系数
胺	$-NH_2$	195	--
苯	C_6H_6	184	46700
		202	6900
		255	170
不饱和共轭	$-(C=C)_3-$	260	35000
	$-(C=C)_4-$	300	52000
	$-(C=C)_5-$	330	118000
不饱和脂肪族	$-C=C-$	190	8000
	$-(C=C)_2-$	210~230	21000
不饱和脂环族	$-(C=C)_2-$	230~260	3000~8000
碘化物	$-I-$	260	400
叠氮	$C=N$	190	5000
二硫化物	$-S-S$	194	5500
		255	400

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

化合物类型	发色团	波长(nm)	摩尔吸光系数
砜	$-SO_2$	180	— —
复杂化合物	C=C-C≡C	291	6500
	C=C-C=N	220	23000
	C=C=C=O	210~250	1000~2000
		300~350	弱
	$C=C-NO_2$	229	9500
腈	-C≡N	160	— —
联苯	$C_{12}H_{10}$	246	20000
硫醇(巯基)	-SH	195	1400
硫醚	-S-O	194	4600
		215	1600
硫酮	C=S	205	强
醚	-O-	185	1000
偶氮	-N=N	285~400	3~25
醛类	-CHO	210	1500
		280~300	11~18
羧基	-COOH	200~210	50~70
酮类	C=O	195	1000
		270~285	15~30
硝基	$-NO_2$	210	强
硝酸盐	$-ONO_2$	270	12
溴化物	-Br	280	300
肟	-NOH	190	5000
亚砜	S=O	210	1500
亚硝基	-N=O	302	100
亚硝酸盐	-ONO	220~230	1000~2000
		300~400	10
乙炔	-C≡C-	175~180	6000
酯	-COOR	205	50

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3.2.2.2 流动相吸收值与其组分的关系 流动相(不含样品时)在测定波长处的透光率必须足够大。当到达检测器光电管(图3-4)的光强度下降时,基线噪音增加,检测灵敏度降低。有研究表明,当流动相的 $A>0.7$ 时,基线噪音会显著增加[5]。该结果意指在所用检测波长处,流动相的吸收值通常应小于0.5。当流动相的吸收值 A 超过1.0时,检测器状态可能已不适用。

表3-2中列出了反相HPLC用到的多种溶剂和添加剂的吸收值与波长。水在180nm以上实际无吸收,所以可忽略该流动相组分的影响。再者考虑在200nm处($A<0.5$)可用于检测的溶剂和添加剂,表3-3所示为在200nm或以上能用UV检测的溶剂与水的典型溶液(无添加剂)。乙腈-水混合液以及其中含有表3-3中列出的限定浓度的添加剂时可在200nm或以上检测。在185~200nm区域检测受限更大。在190nm,HPLC级乙腈的 $A\approx1.0$,所以乙腈在该流动相中的最大浓度为50%。能在200nm以下使用的、浓度在1mM以上的添加剂只有磷酸与脂肪胺。

正相色谱(第6章,第Ⅱ部分)所用溶剂的吸收度通常更强,所以一般需在长波长检测。表3-4列出一些溶剂在不同波长处的吸收值数据。注意表3-2~3-4的溶剂和添加剂可能含有UV吸收杂质,或暴露在光线下和空气中时,由于降解而产生吸收。因此,表3-2~3-4中的吸收值可能代表HPLC级溶剂的最大吸收值。如果溶剂的吸收值明显比表3-2~3-4中的数据高,说明该物质可能已被污染。注意,表3-2中三乙胺的吸收值不是纯样品的;不过,即使某些脂肪胺的纯样品在220nm或以下也会有强UV吸收。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 3-2 反相流动相组分的 UV 吸收值与波长的关系[5]

	在规定波长处(nm)的吸收度(AU)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
溶剂										
乙腈	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01	<0.01				
甲醇	2.06	1.00	0.53	0.37	0.24	0.11	0.05	0.02	<0.01	
除气后	1.91	0.76	0.35	0.21	0.15	0.06	0.02	<0.01		
异丙醇	1.80	0.68	0.34	0.24	0.19	0.08	0.04	0.03	0.02	0.02
四氢呋喃										
新鲜的	2.44	2.57	2.31	1.80	1.54	0.94	0.42	0.21	0.09	0.05
陈旧的	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	2.5	1.45
酸和碱										
醋酸 1%	2.61	2.63	2.61	2.43	2.17	0.87	0.14	0.01	<0.01	
盐酸 6mM(0.02%)	0.11	0.02	<0.01							
磷酸,0.1%	<0.01									
三氟醋酸										
0.1%水溶液	1.20	0.78	0.54	0.34	0.20	0.06	0.02	<0.01		
0.1%乙腈溶液	0.29	0.33	0.37	0.38	0.37	0.25	0.12	0.04	0.01	<0.01
磷酸铵										
氧二铵,50mM	1.85	0.67	0.15	0.02	<0.01					
三乙胺,1%	2.33	2.42	2.50	2.45	2.37	1.96	0.50	0.12	0.04	<0.01
缓冲液与盐										
醋酸铵,10mM	1.88	0.94	0.53	0.29	0.15	0.02	<0.01			
碳酸氢铵,10mM	0.41	0.10	0.01	<0.01						
EDTA										
(乙二胺四乙酸),二钠,1mM	0.11	0.07	0.06	0.04						

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

	在规定波长处(nm)的吸收度(A.U.)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
HEPES[N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸],10mM pH7.6	2.45	2.50	2.37	2.08	1.50	0.29	0.03	<0.01		
MES[2-(N-吗啉代)乙基磺酸],10mM,pH 6.0	2.42	2.38	1.89	0.90	0.45	0.06	<0.01			
磷酸钾,										
一氢盐,10mM	0.03	<0.01								
二氢盐,10mM	0.53	0.16	0.05	0.01	<0.01					
醋酸钠,10mM	1.85	0.96	0.52	0.30	0.15	0.03	<0.01			
氯化钠,1M	2.00	1.67	0.40	0.10	<0.01					
柠檬酸钠,10mM	2.48	2.84	2.31	2.02	1.49	0.54	0.12	0.03	0.02	0.01
甲酸钠,10 mM	1.00	0.73	0.53	0.33	0.20	0.03	<0.01			
磷酸钠,100mM,pH 6.8	1.99	0.75	0.19	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	<0.01
Tris-盐酸,20mM										
pH 7.0	1.40	0.77	0.28	0.10	0.04	<0.01				
pH 8.0	1.80	1.90	1.11	0.43	0.13	<0.01				
表面活性剂										
Brij 35(23月桂醚),1%	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	<0.01			
CHAPS(3-[3-胆酸内基]二甲基氨溶)-1-丙烷磺酸盐),0.1%	2.40	2.32	1.48	0.80	0.40	0.08	0.04	0.02	0.02	0.01
SDS(十二烷基硫酸钠),0.1%	0.02	0.01	<0.01							
Triton X-100(辛醇),0.1%	2.48	2.50	2.43	2.42	2.37	2.37	0.50	0.25	0.67	1.42
吐温20,0.1%	0.21	0.14	0.11	0.10	0.09	0.06	0.05	0.04	0.04	0.03

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 3－3　在≥220nm 时，低背景吸收（<0.5AU）的溶剂混合物

水性流动相混合物
- 0～26%甲醇－水
- 0～28%异丙醇
- 0～20%THF
- 0～100%乙腈－水

乙腈－水以及添加剂
- 0.2%醋酸
- 0.4%三氟醋酸
- 250mM NaCl
- >25mM 磷酸钾（或钠）（pH<5）
- 25mM 磷酸钠（或钾）（pH 6.8）

表 3－4　正相溶剂的 UV 吸收值与波长的关系

溶　剂	所示波长处（nm）的吸收值						
	200	210	220	230	240	250	260
乙酸乙酯	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0	0.10
乙醚	>1.0	>1.0	0.46	0.27	1.08	0.10	0.05
乙烷	0.54	0.20	0.07	0.03	0.02	0.01	0.00
二氯甲烷	>1.0	>1.0	>1.0	1.4	0.09	0.11	0.05
甲基－叔－丁醚	>1.0	0.69	0.54	0.45	0.26	0.11	0.05
乙丙醇	>1.0	0.65	0.35	0.15	0.07	0.03	0.01
异丙醇	>1.0	0.44	0.20	0.11	0.05	0.03	0.02
四氯呋喃	>1.0	>1.0	0.70	0.50	0.30	0.16	0.09

3.2.3 信号、噪音与测定精度

采用 HPLC 进行定量分析时（第 14 章），精密的结果最为重要。检测通过信噪比（S/N'）影响检测精度。响应信号（S）为被测物峰的基线校正吸收值，而噪音（N'）为基线的上下宽度，见图 3－

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3 的说明。通常基线噪音有二种：由散射光和检测器电子系统引起的短期噪音（高频），和由温度波动、泵“噪音”、和/或被污染色谱柱引起的长期噪音。图 3－3 中，高频噪音对于 0.1s 的响应时间（检测器时间常数）较重要，而长期噪音对于 5s 的响应时间更重要。

有可能大致估算出测定精度与 S/N' 的关系。基线宽度 N' 能用一宽度为 4σ 的高斯分布加以描述。因此，峰每边上基线吸收值的单点测定有一不确定度或标准偏差 $\sigma_i = N'/4$，那么峰高有三个测定结果（峰每边一个，另加峰最大值），所以测得峰高值的不确定度（1 SD）近似为 $(3^{1/2})\sigma_i \approx N'/2$。于是，由 S/N' 的值所得的变异系数（CV）就为：

$$CV \approx 100\frac{N'/2}{S}$$

$$\approx \frac{50}{S/N'} \tag{3.3}$$

例如，在图 3－3 的示例中（响应时间 = 0.1s），$S/N' = 4.2$，峰高测定值的最大估算精度是 $50/4.2 = \pm 12\%$。

如果检测精度受噪音影响（S/N'值小），较小峰吸收值（S）或低浓度被测物的不确定度（CV）将增大，这种影响经常能见到，如图 3－7 的数据所示。图 3－7 为血清中七种不同的三环抗抑郁药的定量分析，并以检测精度（CV）对峰吸收值（不同的被测物浓度）作图。样品浓度高时（吸收值高，N'恒定时，则 S/N'变大），精度不受 S/N'影响，恒定不变（$CV \approx 6\%$）。在低浓度时，CV 随被测物浓度降低而增大。因此，可利用 CV 与被测物浓度的关系确定是否增加 S/N'对提高精度有利。如果 CV 不随浓度而变化，增加 S/N'比值对精度无影响。反之，如果 CV 随样品浓度降低而增大，增加 S/N'比值将会使检测精度提高。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

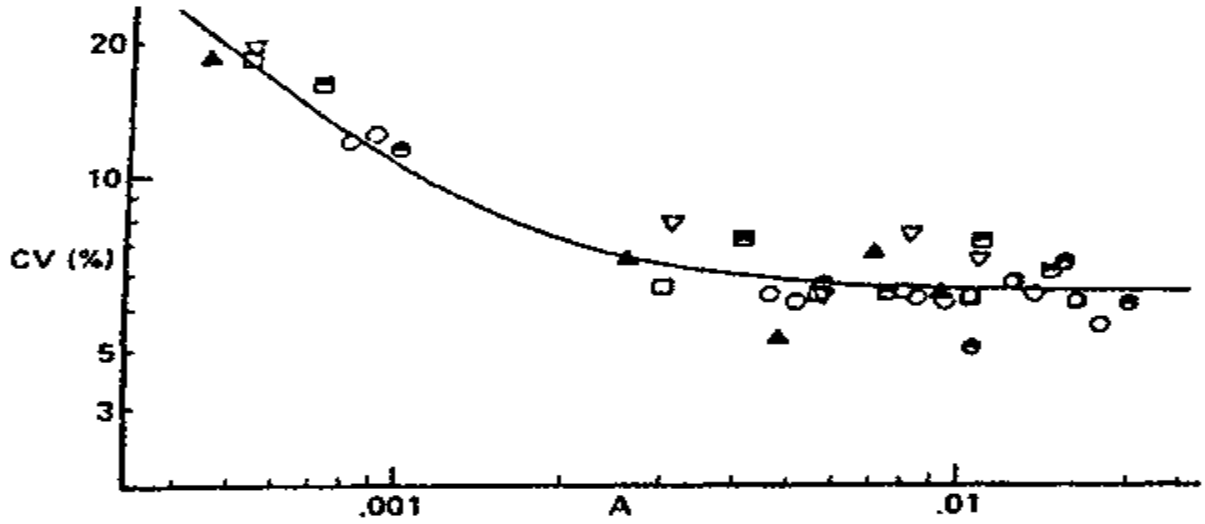


图 3－7　检测精度与被测物浓度及 S/N' 的关系[7]

数据点为以相同 HPLC 步骤分离的不同浓度（6～360 ng/mL）的七种三环抗抑郁剂样品。变异系数（CV）对峰高（吸收度）作图。

多数情况下，借助于式 3.3 估算含量测定的不精密性可能过于保守，因为数据系统常用均值与平滑技术以尽量减小噪音对检测精度的影响。不过，可以采用式 3.3 粗略估算噪音对测定精度的最大影响。进一步结合式 3.2、3.3 与 3.6，也可以得到最小检知质量或浓度与实验条件的关系：

$$\text{最小质量}(\mu g) = \frac{1.25 \times 10^5 M V_m (1+k) N'}{(CV) N^{1/2} L_{tc} \varepsilon} \quad (3.4)$$

其中 M 为被测物的分子量［道尔顿（Da）］，V_m 为色谱柱死体积（mL），N' 为基线噪音（量纲同吸收度 A），CV 为理想精度（%），N 为理论板数，L_{tc} 为流动池的光程长度（cm），ε 为被测物的摩尔吸收系数。这样，最小被测物浓度（μg/mL）为：

$$\text{最小被测物浓度}(\mu g/ml) = \frac{\text{最小质量}(\mu g)}{\text{样品体积}(mL)} \quad (3.5)$$

由于数据系统的平滑处理，实际的最小检知浓度与该式得出的结果相比，可能稍小。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

3.2.4 提高信噪比，以获得更好的检测精度

当检测精度随被测物浓度变化时，增大 S/N' 能得到更好的精密度。增大信号 S 或降低噪音 N' 都可以使信噪比增加。选择最大吸收值处的波长（如图 3－5 中 AMI 的 $\lambda_{max}=210nm$）能得到最大信号。由于噪音在 200nm 以上随波长变化不大，所以波长最大值也就是 S/N' 比值的最大值。而在 200nm 以下的波长处，噪音增加很快（尤其用旧氘灯），于是波长最大值可能与最大 S/N' 比值处的波长不一致。

增加流动池中被测物浓度或增加流动池光路（假设不显著增加峰体积以引起柱外效应，见 2.3.3.3 节），也能增大信号 S（见式 3.2）。流动池中组分浓度 C 按下式得出[8]：

$$C=\frac{0.4C_0V_sN^{0.5}}{V_m(1+k)} \qquad (3.6)$$

能增大信号 S 的方式包括：

- 增加被测物的浓度 C_0
- 增加进样体积 V_s
- 提高柱效 N
- 减小色谱柱体积 V_m
- 减小被测物的保留值 k

然而，一些增大 C 和 S 的方法如果用过头，其效果会适得其反。比如，样品体积如太大，可能会使谱峰展宽，损失分离度以及所出峰的灵敏度，使灵敏度接近极限值（见表 2－4）。同样，如色谱柱体积非常小（柱短而径细）或粒度小（<5μm）也会使峰变窄，以致柱外效应导致灵敏度和样品分离度下降（见 2.3.3.3，5.2.2 节）。还有，当 $k<1$ 时，靠近 t_0 的基线波动或样品干扰可能会大大抵销式 3.6 预测的 C 和 S 的增加。

减小噪音可能有几种方式，这取决于高频噪音还是长期噪音为主。两种噪音对精度的影响也取决于数据处理与为特殊测定所

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

选的积分参数。高频噪音通过增加检测器时间常数 τ 或响应时间(响应时间 $\approx 2\tau$)可以除去,如图 3－3 所示。同时,增加 τ 的最终结果将使峰展宽和拖尾,也使信号减小,由如图 3－3 中的数据得到的信息很有启发性。如表 3－5 所示,当 τ 从 0.1s 增加至 1.0s 时,噪音减小接近四倍,峰高未变。即高频噪音减小很大而峰宽未受影响。τ 增大至 4s 时,噪音从 3×10^{-5} 进一步减小至 2×10^{-5}A。由于增大时间常数使峰得以展宽,信号(峰高或面积)也减小 6%。然而,S/N' 比也进一步增加至 $\tau=2.0$s 时的最大值 21.5。继续增大 τ 将导致信号降低,但噪音不再降,所以,S/N'比值降低(如样品分离度一样)。

上述示例的最佳 τ 值为 2.0s。其它情况下,响应时间的最佳值将取决于初始峰宽和高频与长期噪音的相对重要性。最佳响应时间或时间常数也取决于是否用峰高或面积定量。痕量分析应首选用峰高定量(见 14.5.4 节)。

因为光强度下降使噪音增加,所以检测器氘灯长期使用后会使高频噪音增加。有研究表明,当灯能量下降至初始值的 15% 时,噪音会增加一倍[5]。噪音随灯的使用时间而增加,而检测精度会由于检测器噪音而显著下降。因此,方法的精度会随不同时间使用同一检测器或应用不同检测器而有所不同。

表 3－5　响应时间对检测灵敏度的影响[a]

响应时间 τ(s)	信号(峰高)(10^{-5}A)	噪音(10^{-5}A)	S/N'比值
0.1	46	11.0	4.2
1.0	46	3.0	15.3
2.0	43	2.0	21.5
4.0	39	2.0	19.5
5.0	38	2.0	19.0

[a]与图 2－3 中系统相同

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

泵脉动能产生长期噪音。这种噪音的特点是基线有规律地升高和下降，并平行于泵的循环时间。有些泵比其它泵产生脉动噪音的倾向大得多，但使用脉动阻尼器可显著降低泵脉动的影响。当在线混合配制流动相时，两种（或以上）混合溶剂的吸收值不同，由泵流出的流动相会使吸收值发生波动。其结果为基线周期性地上下波动，与泵脉动引起的现象类似，但与泵循环周期不同。消除这种与吸收值有关的噪音，可向在线混合的两溶剂之一中加入不保留的 UV 吸收化合物，以使它们的吸收值相等。见 8.5.3 节中对梯度洗脱中基线飘移的相关讨论。

另一种长期噪音由进样前色谱柱的污染造成。有些样品中可能含有强保留化合物；几种这样的流出物（来源于以前不同的样品，甚至经数次运行才能流出）重叠在一起，产生不规则基线。见图 3－8 血浆中药物分析的结果。图 3.8*a* 所示为初始进样的色谱图。该图中，运行时间（即目标化合物 EP 的流出时间）约为 15 分钟。然而，其它强保留杂质不断从色谱柱中流出，在后面色谱图中呈现为基线噪音。这种基线噪音在分析“脏”样品（例如生物样品、环保样品如水或土壤提取物、有机反应混合物等）时常能见到。减少这种噪音有几种方式：HPLC 分析前将样品处理干净（见第 4 章）；用强溶剂清洗色谱柱（见第 5 章）；用保护柱（见第 5 章）；用梯度洗脱（见第 8 章），或采用柱切换技术（见 4.6 节）。图 3－8*b* 表明柱切换可消除图 3－8*a* 分离中 25 分钟后流出的谱峰。通过除去样品干扰物和/或将被测物浓缩的样品预处理也能提高检测精度（见 4.5 和 4.6 节）。表 3－6 概括了提高检测灵敏度（S/N' 比值）的系统方法。

3.2.5 检测器的线性范围

理想条件下，式 3.2 可适用于较宽的吸收值范围，典型的 A 值上限至少为 1.0。假设最小噪音为 $2\times10^{-5}A$（$CV = 20\%$，$S/N' = 2.5$，由式 3.3 可得最小可检知信号），因此可得到动力学范

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

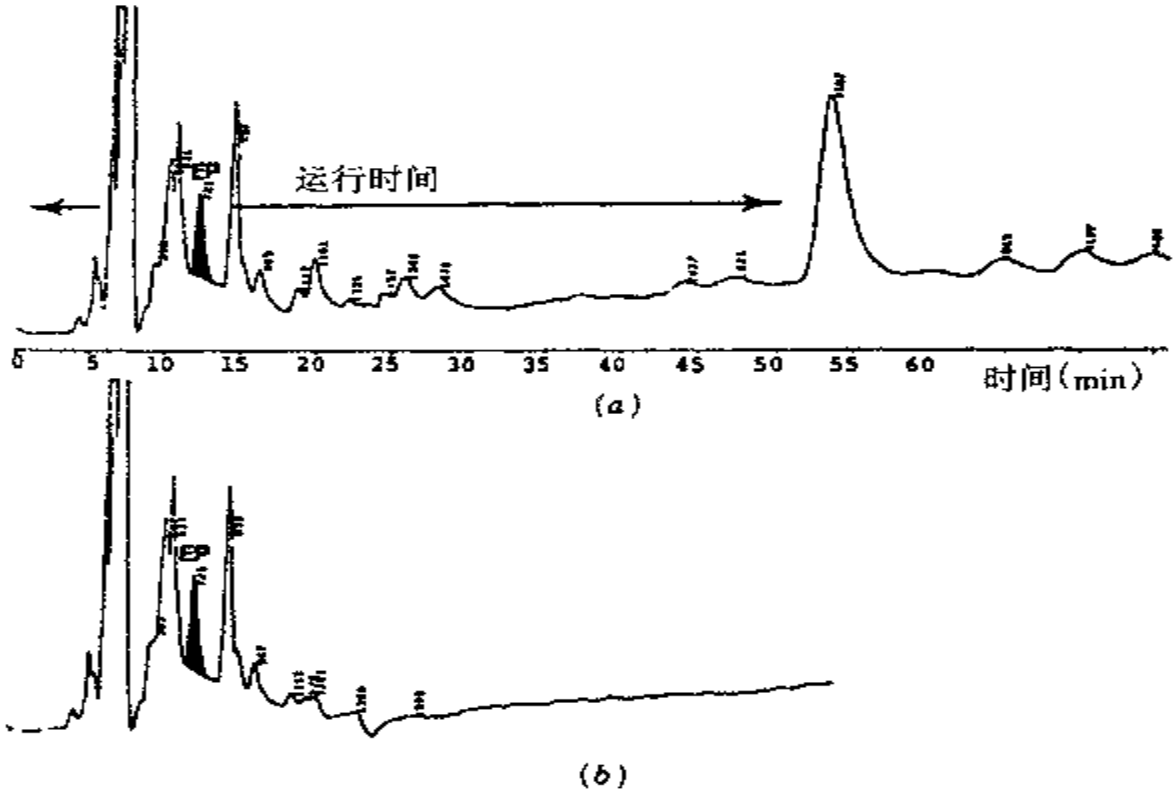


图 3－8　强保留杂质对长期基线噪音的影响[9]
样品：药物 EP 的血浆提取物；条件：等度反相分离
(a)未用柱切换分离；(b)用柱切换分离。

围约为 2×10^4。动力学范围宽为 UV 检测器广泛应用的诸多原因之一。

如果在吸收谱线陡坡上进行测定（如图 3－5 中在 220nm 测 AMI），检测器线性范围会有所受损。当一样品中有数种 UV 图谱不同的被测物时，不可能在最大波长处检测每一化合物。不过实际上这并非是常见的问题，由于 $A<0.1$ 时，甚至在吸收谱带陡坡上进行检测，通常也符合线性关系。

3.2.6 二极管阵列 UV 检测器

如图 3－4 所示，二极管阵列检测器（DAD）可以在一次运行中同时采集不同波长的色谱图。运行结束后，能显示任一所需波长的（通常为 190～400nm 之间）色谱图。因此，DAD 能够比单一

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 3－6　加强 UV 检测灵敏度(S/N')的系统方法[a]

1. 选择 ε 值最大处的波长(S)
2. 进样体积尽可能大(S)
3. 浓缩样品，加大进样质量(S)
4. 尽可能减小 k 值(但不能有基线波动或干扰峰)(S)
5. 如果式 3.4 表明用 UV 检测不适宜时，考虑选用其它检测器(S)
6. 增大检测器时间常数(N')
7. 确保用新灯替换旧灯(S、N')
8. 如必要，用脉动阻尼器消除泵噪音(N')
9. 如用在线混合，匹配 A、B 溶剂的 UV 吸收值(N')
10. 用样品清除，梯度洗脱或柱切换，尽量减少晚期流出物(N')

[a](S)与(N')分别表示每项对信号或噪音的影响。

波长操作提供更多的样品组成信息。而且每个峰的 UV 光谱图可作为最终 HPLC 方法选择最佳波长的重要工具。最后，通过比较一个峰中不同位置的 UV 光谱，可以估计峰的纯度。如果峰中仅有一种组分，色谱峰中不同位置的 UV 光谱应能叠加在一起(不过，这还不能证明峰是一种物质；见下面的说明)。

方法建立经过初始阶段的探索，色谱图中大多数峰至少已被部分分开(R_s>1.0)，用 DAD 采集各峰的 UV 光谱数据。可如图 3－5 的讨论那样，进行最佳波长的选择(假如开始不知道被测物标准品或其 UV 光谱图)。在方法建立的这一阶段，也可进行峰识别和峰纯度的测定。图 3－9a 所示为通过比较标准品与同一保留时间流出的样品峰的 UV 光谱进行的峰识别。重叠比较对应的光谱图，很明显两者完全相同，因此这二峰可认为含有相同化合物。如图 3－9b 所示，同时比较在峰开始、中间与峰末尾处得到的光谱图，可以估计峰纯度。此例中，在 8.11 分钟采集的光谱图与后面 8.21 和 8.31 分钟的有明显的差异，似乎峰前部有一杂质重叠其中。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

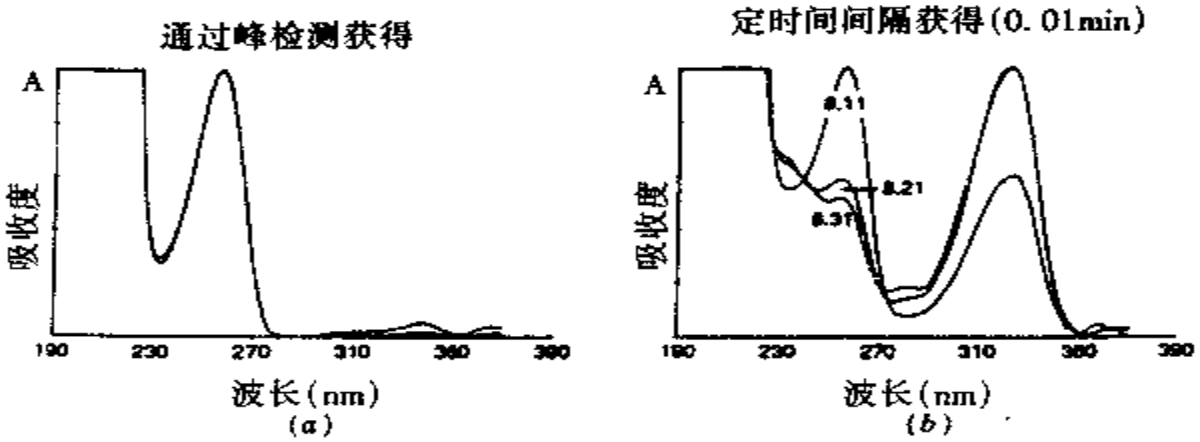


图 3－9　将二极管阵列检测光谱图用于(a)峰识别或(b)峰纯度测试[2]

峰纯度能按比例图进一步估计，如图 3－10 所示。比例图以二不同波长处采集的吸收值的比例对时间作图。本样品中的纯峰为萘，它在 280nm 的吸收值比 254nm 的大。其比例图(见下面色谱图)为一长方形，因为纯峰的各吸收值比值(小于 1)恒定。而带肩峰的谱峰由萘另加 8% 联苯杂质组成。联苯在 254nm 的吸收值比 280nm 的大(比例图为正，与萘的相反)，所以第二个比例图由纯萘转为以联苯为主时，由负变为正。因为样品组分常有相似的化学结构，具有相同或相似的 UV 光谱(例如：杂质、降解产物、同系物和低聚体或代谢物)，图 3－9 和 3－10 试验的峰纯度尚不能肯定。如果 DAD 确证重叠峰的存在，两峰的 UV 光谱必然显著不同，其中一峰的相对浓度应在另一峰浓度的 5～95% 之间，两峰的分离度也必大于 0.3。必须强调的是仅使用 DAD 绝不可确证峰纯度。采集色谱峰后，再辅以其它定性分析技术，如红外(IR)、核磁共振(NMR)、质谱(MS)等，常以此增加确证峰纯度的可信程度。测试峰纯度的另一种方法是换一种模式分离样品，例如反相 HPLC 之后再用正相 HPLC。

一旦根据不同样品峰的 UV 光谱，选定了较好波长，可用

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

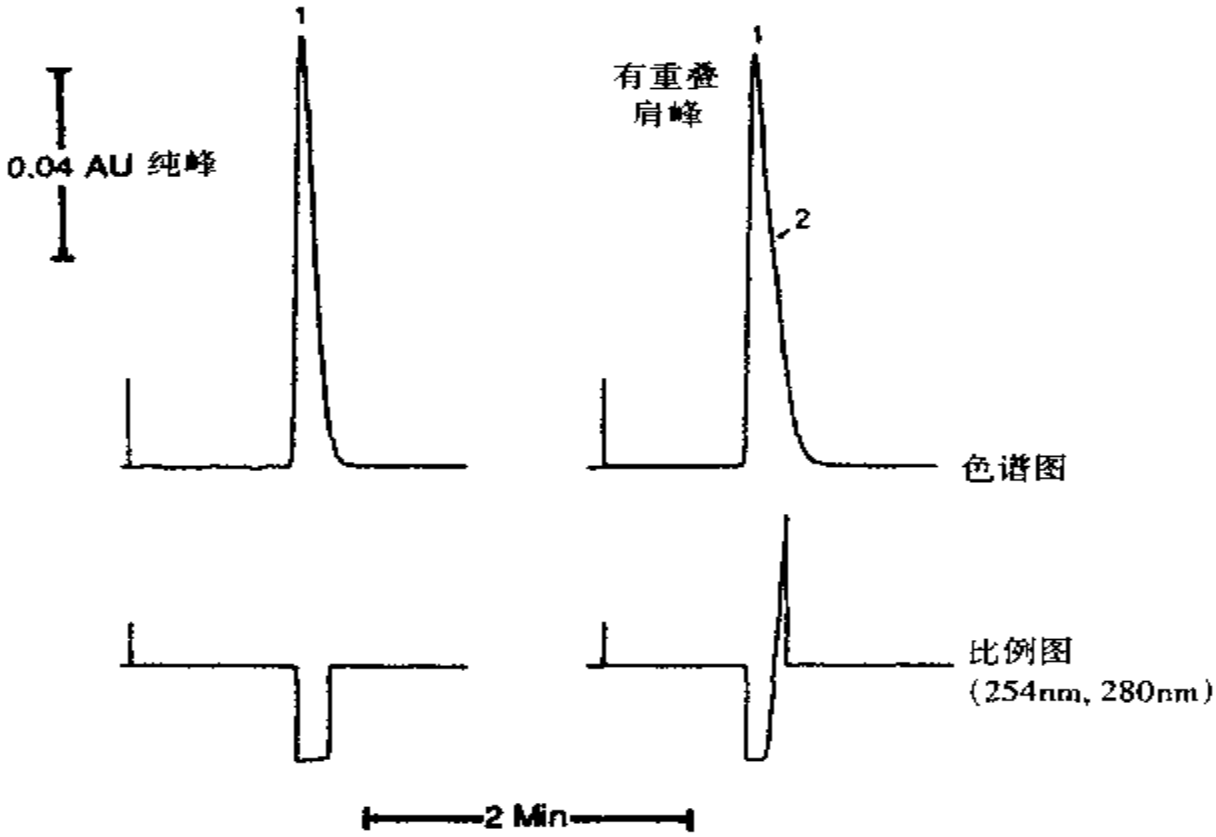


图 3－10　用二极管阵列比例图测定峰纯度[2]

比例图位于各自色谱图下

峰识别：1. 萘(440ng)；2. 联苯(40ng)

条件：10×0.32cm RP－18 色谱柱；95% 乙腈－水；1.0mL/min；254nm。

DAD 检查不同波长的色谱图，以确证所选波长的优势所在。对这种方法的说明见图 3－11 中肽样品在 215 和 280nm 处的分离。该示例中，215nm 明显更适于检测样品中的所有肽。我们已知含芳香族氨基酸肽在 280nm 有明显吸收，而其它肽无此特征。这意味着在 280nm 处，可对芳香氨基酸肽进行初步鉴定。

在方法建立期间，DAD 的应用对不同实验之间含相同化合物的峰轨迹或峰匹配也很重要。进一步的讨论详见 10.7 节。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

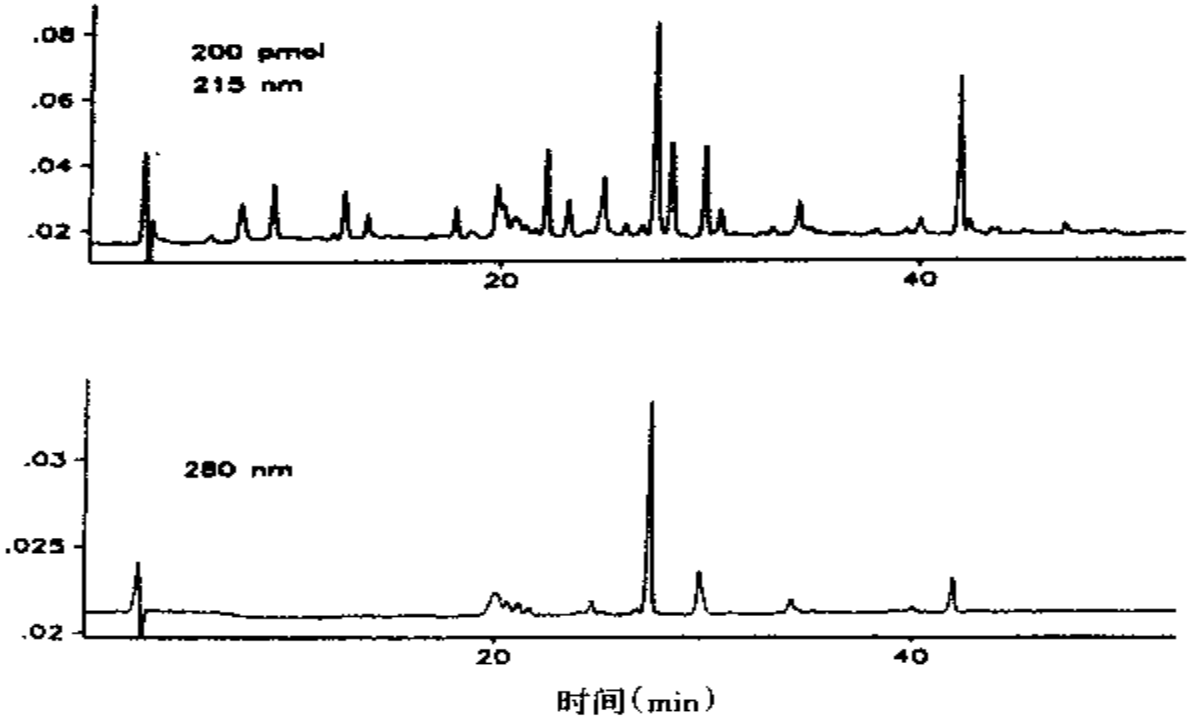


图 3－11　用二极管阵列检测不同波长处的单一色谱图[2]
样品：肽；条件：乙腈－水梯度洗脱

3.3 其它 HPLC 检测器

UV 检测器有时不适用，因为有关被测物没有 UV 吸收。更多的情况是被测物仅有很小的吸收值（$\varepsilon<100$），而流动相又不允许在短波长进行 UV 测定。此外被测物浓度较低，以至信噪比太低无法用 UV 检测。在放弃使用 UV 检测器之前，应采用式 3.4 确证 UV 检测确实不能使用。只有在使用 UV 检测器无希望的情况下，才可以考虑使用其它类型检测器。

3.3.1 通用型检测器

UV 检测器除了有些化合物的灵敏度太低外，还会因不同样品组分的 ε 值相差巨大（100～1000 倍）而可能对结果产生影响。在样品组分未知的情况下（无校正用标准品，至少开始时不知），

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

峰大小不能确切代表组分的相对浓度。如，制定规章的机构可能需找出产品原材料中含量超过 0.1% w/w 的所有杂质。然而，因为各峰 ε 值的不确定性，不能用初始 UV 检测的色谱图识别出哪种组分的浓度超过 0.1%。有些杂质的 ε 值非常低，甚至可能检测不到，而其它低浓度的杂质则显示不成比例的大峰。

"通用型检测器"对几乎所有样品组分都有响应，包括那些 UV 灵敏度很低的组分。而且，检测器响应信号对不同样品组分的差异比 UV 检测器小得多。通用型检测器用途主要有两个：(1) ε 值极低的样品；(2) 用面积归一化方法，能为未知样品提供更有代表性的分析。当无被测物标准品作校正时，可近似地将面积百分比值看作 *W*/*W* 百分比值。通用型检测器还能使用在紫外区有强吸收的流动相。

该类检测器中最先使用且用途最广泛的是示差折光(RI)检测器。由于折射率是所有化合物的一个物理性质，(理论上)任一化合物至少可在中等浓度范围进行检测。因为流动相成分，包括溶剂和添加剂会显示明显的折光响应，因此不能使用 RI 检测器做梯度洗脱。另外，其它因素如需严格控制温度，流动相溶入气体的影响，痕量分析灵敏度不够等也限制了 RI 检测器的许多日常应用。

第二类通用型检测器为蒸发光散射(ELS)检测器。ELS 检测器的示意图见图 3－12。色谱柱流出物经过漂移管时，被喷雾和蒸发，被测物微粒在其通过光散射池时被检测。因此，ELS 检测器的应用有被测物不挥发、和流动相挥发的限制。然而，因为 ELS 可用于梯度洗脱，在有些方法中，尤其是杂质分析中使用较多。

这两种检测器都对典型样品有类似的灵敏度，能够分析浓度在 0.1μg/mL 以上的组分(该检测灵敏度比 UV 检测发色团良好的化合物低约两个数量级)。表 3－7 总结了这两种检测器的一些特征。对 RI 检测器的深入讨论见文献 11，而 ELS 检测器的综述可见文献 10。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

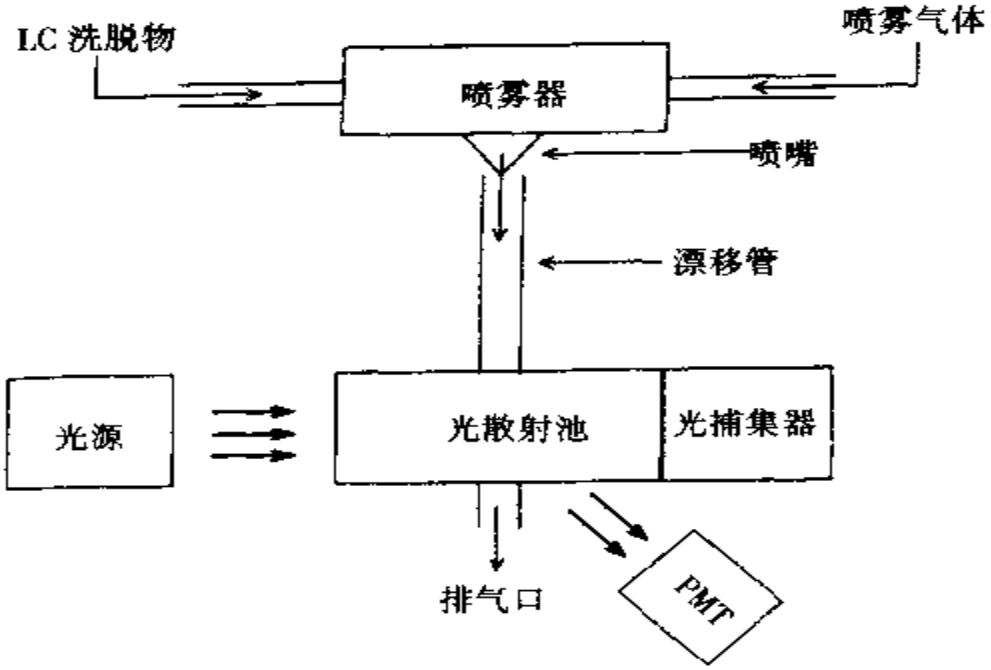


图 3－12　蒸发光散射(ELS)检测器结构示意图[10]

3.3.2　荧光检测器

基于被测物荧光(FL)的检测具有犀利的灵敏度与选择性，荧光检测器对痕量分析与复杂样品基质都很理想。FL 检测器的灵敏度一般比 UV 的高三个数量级。配有 FL 检测的 HPLC 分析可日常用于低至 ng/mL 级的定量分析，甚至可测定低至 pg/mL 级的样品浓度。这些检测器的线性范围与 UV 检测器的相似(例如 10^3～10^4)。

FL 检测与 UV 检测的共同优点在于具有从干扰或背景峰中分辨出被测物的能力。图 3－2 中给出了用 UV [(*a*)部分] 与 FL [(*b*)部分] 分析复杂样品基质中核黄素的示例。由于具有天然荧光的样品很少，通常必须用带荧光团(见 4.7 节)的试剂衍生化后，才可进行检测。羧酸、醇类、醛类、胺类、肽类、酮类、苯酚类和硫醇等可采用这种衍生化方法。文献 12 和 13 中给出了这类试剂和应用的示例，4.7 节有进一步讨论。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 3－7　通用型检测器的特性

特　性	RI 检测器	ELS 检测器
使用梯度洗脱	不可以	可以
等度分离可用在线混合	不可以	可以
使用挥发性样品	可以	不可以
使用非挥发性缓冲液或添加剂	可以	不可以
流动相污染的影响	严重	很小
改变流动相温度的负面影响	有	无
被测物可能出现负峰	可能	不可能
t_0 处基线波动的程度	较大	较小
检测器线性	是	否
需特殊排风口	否	是
操作方便	否	是

图 3－13 所示为典型 FL 检测器的结构示意图。由灯光穿过激发光滤光片，该滤片为激发样品分子提供所需波长的必不可少的单色光。激发光穿过流动池中的色谱柱流出液，使样品分子发出大于激发光波长的荧光（发射光）。第二只（发射光）滤光片与原激发光位置成 90°处。这样只有样品产生的荧光能通过此滤光片，被送达光电倍增管，对发射信号进行定量。

普通检测器的设计有三种：滤光片－滤光片型（如图 3－13），光栅－滤光片型和光栅－光栅型，均与图 3－13 的原理类似。使用光栅可选择不同波长，而用滤光片则被限制在某一固定波长（除非更换滤光片）。光栅－光栅型荧光检测器可选择任意激发光或发射光波长；因此，对方法建立非常方便。另一方面，滤光片－滤光片型仪器简单、易用、价格低廉、选择性好，更适于不同的实验室之间 HPLC 方法的传递。因此，滤光片－滤光片型检测器更适于常规应用。除光栅与滤光片仪器的这些差别外，每种 FL 检测器之间的主要性能也有许多不同：包括流动池的设计和采集激发光的方式，激

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

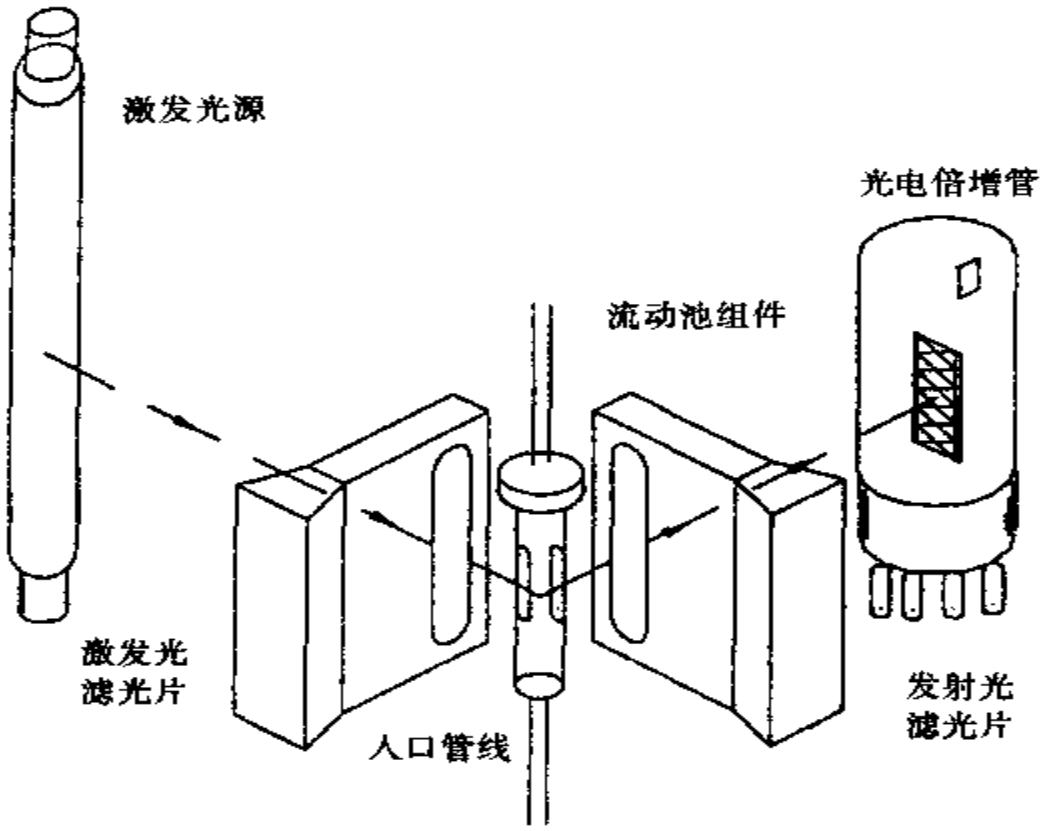


图 3－13　滤光片－滤光片型荧光检测器结构示意图[12]

发光源的配置(氘灯、氙灯、氙－汞灯等),单或双光束设计等。这些繁多的特性差别使不同型号的 FL 检测器的性能(如灵敏度、线性)也有很大差异,以使建立的方法难以在不同仪器之间传递使用。

检测器设计的差异对实验室之间传递 HPLC 方法产生不利影响。使用 FL 检测器,尤其在方法建立中,由于 FL 信号和激发与发射的最佳波长与温度、溶剂的极性和粘度、pH 等分离条件关系很大,因此最终的分离条件需在良好的分离与良好的检测之间做出妥协,也给 HPLC－FL 方法建立增添了更多困难。文献 12 对这类问题作了较详细的论述。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3.3.3 电化学检测器

常用于 HPLC 的电化学(EC)检测器按其操作可分为:(1)直流电流(DCA)或(2)电导率检测器。电导率检测器主要用于离子色谱[14],在此不作深入讨论。DCA 检测器在灵敏度与选择性方面,很象 FL。通常,FL 检测器选择性更强,而 DCA 灵敏度则更高,图 3－14 所示为用二种检测器得到的对应色谱图。

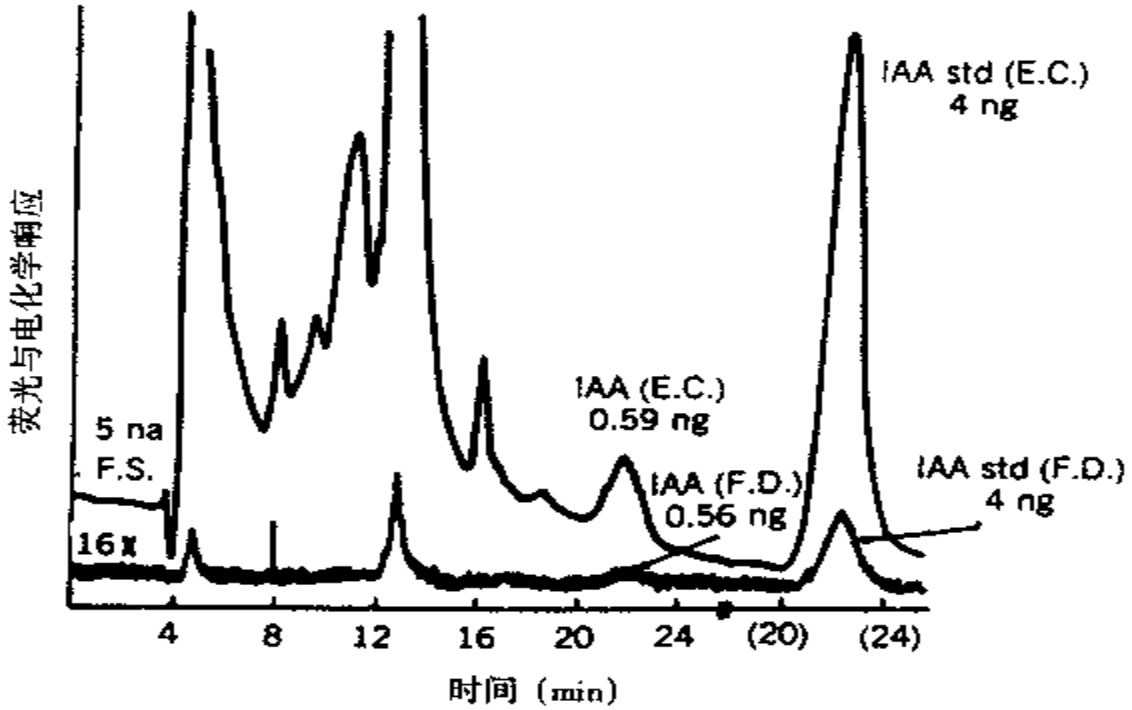


图 3－14　电化学(EC)及荧光(FD)检测阴离子交换 HPLC 分析棉花中的吲哚醋酸(IAA)[15]

具有 EC 活性的化合物比具荧光的化合物更为常见。荧光检测器往往在样品与荧光试剂衍生反应以后使用,EC 检测一般不用衍生化。然而,有大量经系统研究的衍生化试剂和方法可用于将无 EC 活性的被测物转变成有活性的可检测化合物[16－21]。这些方法包括柱前和柱后衍生化法,也可采用其它方法,如柱后固化酶处理法、柱后光解反应法和采用改善下游检测无 EC 活性被测

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

物的双电极法(上游－下游;发生器－收集器)[20－24]。

当 UV 的检测能力不能胜任所需选择性时，通常选择 FL 或 EC 检测器。如果被测物有 EC 活性,一般选 DCA 检测器较好,因为通常可不用样品衍生化并免去一些相关的问题。甚至有可能使用化学修饰电极,以检测无 EC 活性的被测物,如蛋白质和其他生物聚合物[16,24]。

在各种 LC－EC 中，实际上被检测的是工作电极上产生的电流;这样,LC 中的 EC 检测就是对电量的测定。通常,工作电极保持在一固定电位上。电极置于流动相的液流中时,由于流动相或污染物的氧化或还原,将产生背景电流。如果有 EC 被测物经过工作电极,则被工作电极氧化(或还原),背景电流增加。EC 检测的选择性经选择适宜的工作电极电势可进行调节，如只可检测到相关的被测物,而对其它杂质不响应。某些情况下,工作电极采用脉冲电势较好(三脉冲波形,脉冲电流检测,示差脉冲伏安检测等),当氧化或还原的被测物可污染电极表面时,尤其如此。此时,只在规定的外加电压下测定电流,这种技术称为脉冲电流检测[23－26]。

EC 检测在氧化或还原方式中均可进行,主要取决于被测物的性质。氧化型 EC 检测比较常用,因为一般较易于(1)操作和试验常规样品,(2)保持工作电极表面的活性,和(3)免去某些常规还原型 EC 检测所需的制备步骤。还原 EC 法还会由于溶液中溶解氧的还原作用,降低信噪比。尽管有这些缺点,用双电极技术,尤其是如果将溶解氧仔细地从流动相和样品液中驱除，还原 EC 检测还能用。氧化与还原型 EC 检测的最终选择很大程度取决于被测物的类型(见表 3－8)。

检测器对被测物的响应，受其分子结构和浓度以及检测池所加电压的控制。表 3－8 列出了一些适合 DCA 检测的化合物类型。在不同电压下重复样品的分离－检测(或流动注射分析－EC)可以优化 DCA 检测所用的电势,如图 3－15 所示。儿茶酚胺混合物

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepriint.cn

表 3－8　可采用电化学检测器进行检测的化合物类型[a]

氧　化	还　原
酚	酮
肟	醛
二羟基化合物	肟
硫醇	共轭酸
过氧化物	共轭酯
过氧乙酰类化合物	共轭腈
芳香胺、二胺	共轭不饱合物
噻吟	活性卤化物
杂环化合物[b]	卤化芳烃
	硝基化合物
	杂环化合物[b]

[a] 醚类、脂肪烃类、醇和羧酸一般不灵敏
[b] 取决于化合物结构

可在 0.6～0.8V 之间电压下分离检测。电压小于 0.6V 时，被测物发生氧化很少，检测器响应很小。在 0.6～0.8V 之间，检测器响应上升很快，并在高电压达到平衡。同时，检测器噪音增加，干扰随电压增加逐步明显。这种情况下，最佳操作电压约为 0.8V。最佳操作电压与被测物结构有关，与工作电极材料也有关[24]。流体动力学伏安轨迹图(hydrodynamic voltammogram plot)(类似于 UV 吸收值对波长所作图)可由图 3－15 中的数据作出，电流与应用电势关系图可以给出分离－检测条件匹配的最佳情况[22]。

改善灵敏度和选择性(与UV 检测相比)方面，DCA 检测有很多优点，但也存在一些不足。除了样品必须具 EC 活性外，DCA 检测器的抗干扰能力也不强。工作电极易被污染，需经常清洗。检测器响应易受温度、流速(泵脉动)和实验室的外来电信号影响。某些情况下，可能需特殊纯度的溶剂并需经常校正。此外，流动相必须满足离子强度和含水量等要求(随电极不同而异)。这些要求限定了 EC 检

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

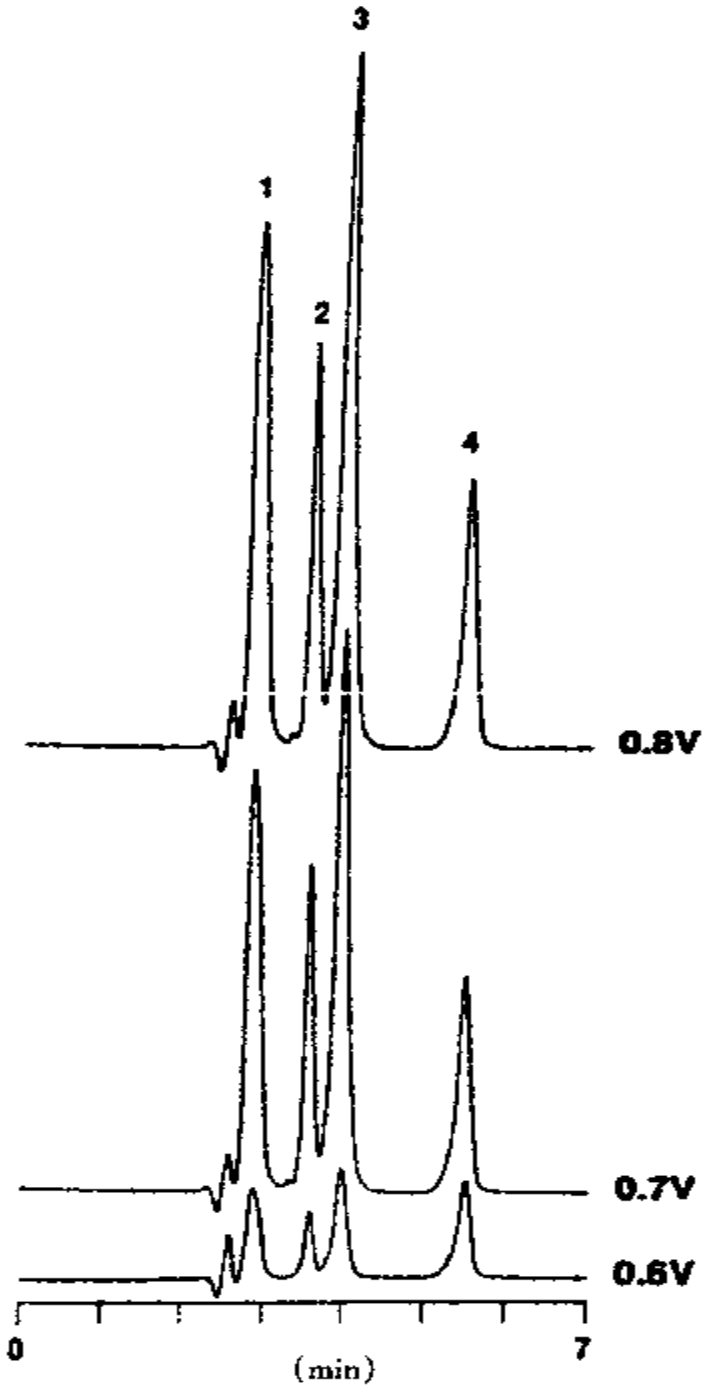


图 3－15　用电化学(DCA)检测儿茶酚胺时，电压对检测器响应的影响[27]

条件：25×0.46cm 10μm Zorbax C_{18} 柱；2% 甲醇－缓冲液（25mM 磷酸盐，pH 2，加 5mM 三乙胺）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

测器一般不能用于大多数正相分离。不过，也有示例成功地说明用适宜的流动相添加剂（盐类），便能进行非水 LC－EC[23]。

EC 检测液相色谱的最常见流动池设计为薄层池。将辅助电极直接置于工作电极的对面，有助于减少两电极之间的 iR 降。由于较高的被测物进样浓度不会使工作电极电势发生明显的变化，所以可达到较宽的线性动力学范围。在这种检测池中，流出液中仅有少许被测物参与 EC 反应，通常认为其为伏安检测器。

库仑 EC 检测器采用多孔石墨工作电极，使所有的流动相与被测物均与电极相接触。LC 库仑电化学检测器的被测物转化率一般能达到 100%[24]。直观地看，库仑检测器似乎比电流检测器的灵敏度高，由于转化的被测物更多。然而，决定灵敏度的是信噪比，多数情况下，电流检测器相对更灵敏[24,28]。

大多数工作电极由玻璃化炭黑制成，这种材料对有机流动相的承受力强。Ag/AgCl 参比电极和不锈钢辅助电极使用最多。将两支工作电极并联或串联使用能增加其选择性[23,24,27]。并联情况下，两电极直接对面置于流动的液流中，保持略微不同的电势（0.1～0.2V）。可将两工作电极上产生的电流比值与确证工作用的纯标准品进行比较，因为该比值对大多数化合物都是特异的。作为示例，表 3－9 所示为用在 1.0 ～ 0.9V 电压平衡的玻璃化炭黑工作电极与 Ag/AgCl，对源于蛋白质胰蛋白酶水解液（cyt C）的已知标准肽系列进行测定的（并联）双电极响应比值[29]。

双工作电极技术类似于 UV 分析的双波长检测[24]。通过比较色谱峰全部的双电极响应比值（类似于双波长吸收度比值，3.2.6 节中讨论），有可能检验峰纯度。也有人介绍过在电流系统与库仑系统中，采用多通道的 EC 阵列检测，可以使一 HPLC 流出峰在极短的时间内得到大量的电势与电流数据[30－33]。LC－EC 中这种多电极的阵列检测器能提供与 DAD 类似的信息内容，区别仅在于用电化学，而非光学分光检测器进行化合物识别与纯度测定。许多化

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 3－9　肽的双电极响应比值[a－c][29]

肽数目	响应比例
1	1.33±0.02
2	2.00±0.05
3	1.35±0.02
4	1.64±0.04
5	1.51±0.03
6	1.38±0.01
7	3.3±0.08
8	2.67±0.02
9	2.0±0.04
10	3.0±0.02
11	1.54±0.05

[a]来自牛细胞色素 C 的酪氨酸肽
[b]应用电压为 1.0 与 0.9V
[c] N＝3;数目代表均值±标准偏差

合物不与典型的工作电极材料如玻璃化炭黑发生 EC 反应。使得对化学修饰电极的研究十分活跃[24,34,35]。经化学修饰的电极可以使原先不能转化的化合物发生氧化或还原，而且非电活性被测物与带电活性残基的衍生化反应也已取得成功[19－24,36]。

3.3.4 质谱检测器(LC－MS)

尽管质谱检测器价格昂贵、且需配有经验丰富的操作者，但目前 HPLC 使用这种检测器已较为常见[37,38]。质谱检测器能使 HPLC 的方法建立更加方便，可避免一些常见的问题：

1 跟踪并鉴别不同实验色谱图中的每个峰(见 10.7 节)

2 从痕量化合物或干扰物中找出目标化合物

3 辨认意外鬼峰与重叠干扰峰，以避免建立的方法有误

图 3－16 所示为用 LC－MS 分离与鉴别 6 种杀虫剂[39]。全部

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

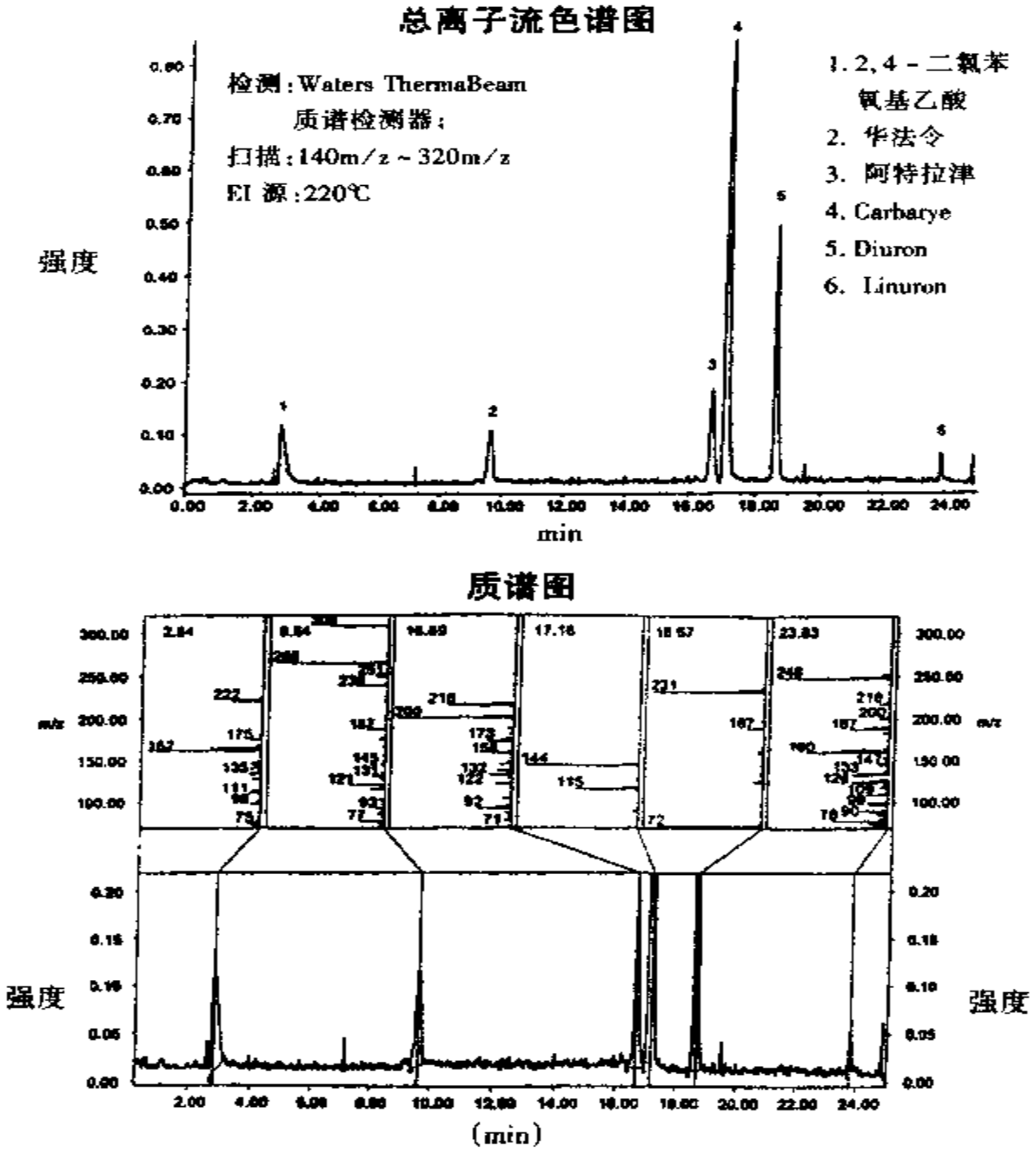


图 3 - 16 反相 HPLC 分离,质谱检测鉴定六种杀虫剂[39]

条件:15×0.20cm Nova - Pak C_{18} 柱;流动相:(A) 10mM 醋酸铵;(B) 100% ACN;梯度:15% B 保持 2 min,然后 15min 内至 35% B,保持 3min,再在2min 内至 100% B,保持 3min,最后返回 15% B;0.35mL/min;各化合物进样 300ng。以 Waters ThermaBeam 质谱检测器扫描 140 ~ 320 m/z;220℃ 离子源。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

6 种化合物的反相分离见图 3－16*a*，用质谱仪的总离子流色谱图表示。每个峰的质谱图见图 3－16*b*，通过碎片对个峰进行鉴别。

质谱仪由三部分组成：(1) 离子源，(2) 质量分析仪，(3) 检测器。这三部分决定了与 HPLC 联用的 MS 技术类型。所有 MS 技术中，由于 MS 仅能检测带电粒子，所以被测物首先应在离子源中离子化。然后，具有不同质／荷比（m/z）的离子被分离并在质量分析仪中聚焦；最终的聚焦束冲击检测器，以测定粒子束的强度。因此质量分析仪与分光光度技术的棱镜或单色器技术一样，只是分离并聚焦的是具有不同 m/z 比的离子，而不是不同波长的光子。能量检测器的原理也类似，只是它通常利用电子倍增管，而不是光电倍增管。

离子源可用来区分 HPLC 应用中不同的 MS 技术。也就是说，不同的质谱技术通常是指采用的离子源不同。样品用电子轰击电离（EI）、化学电离（CI）、快原子轰击（FAB）、电喷雾离子化（ESI）、热喷雾（TSP）、激光解吸（LD）等方法离子化。当用飞行时间质谱法（TOFMS）时，情况例外：因为飞行时间质谱指的是质量分析仪，而不是离子源。因为 ESI－TOFMS 与基体辅助激光解吸电离（MALDI）在 TOFMS 仪器中已不罕见，所以两技术用不同的命名加以区分。

3.3.4.1 质量分析仪 质谱（MS）中有许多类型的质量分析仪，包括磁电式、四极、离子肼（ITP）、飞行时间（TOF）与傅里叶变换离子回旋共振（ICR）等质量分析仪。最常用的与 HPLC 联用的质量分析仪是三元四极式。有种仪器（菲尼根公司的 LCQ）在离子肼质量分析仪之前使用电喷雾离子源（ESI）以及八极（双四极）离子滤质器（聚焦）。该系统不仅可作为 HPLC 与 MS 联用的接口，也可作为毛细管电泳与 MS 联用的接口[40]。目前已有许多可常规应用的 LC－MS 分析的商品化仪器。

四极质谱利用四个并列对称放置的杆，呈对角线对置的杆与

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

射频源和直流电源之间有电连接，离子在四极区向检测器漂移的过程中受直流电场和振荡射频场的共同作用，增加交流和直流电场，使其对应于稳定电路内的峰值，离子按照质荷比顺序通过四极并到达检测器，这样质谱图就产生了。

在三元四极系统中，两端的四极用于分辨不同质荷比的离子，中间的四极作为碰撞诱导解离（CID）源。首先选择有关被测物离子（通常为母离子），再通过碰撞使该母离子破碎，然后再通过分离和收集该组离子碎片可以对在第一个四极中产生母离子的样品进行定性，这就产生了单一化合物的 MS/MS 质谱图。

LCQ 型离子质谱可以代替 MS/MS 联用，在离子井中进行多级质谱 MS^n（$n>1$）分析，产生多套离子碎片，人们可以获得 MS/MS/MS（或 MS^3）三级和更多级质谱的质谱碎片图。这一方面能够提高峰/被测物的选择性，增加质谱信息，以确定化合物的结构，离子井与三元四极质谱的原理完全不同，虽然这种质量分析仪问世较晚，但正在获得越来越普遍的应用。LCQ 是第一台将离子肼用于 LC－MS 联用系统的商品化仪器。

3.3.4.2 电离方法 电子轰击质谱法（EI－MS）是当今最常见且常用的 MS 形式，是所有环保实验室的常用仪器。EI－MS 可以提供定量与定性的信息。但它不适用于大分子（如生物聚合物）的分析。（EI 过程要求将挥发性化合物引入 MS。）因为 HPLC 中许多被测物为极性与非挥发性的，所以这一技术不适子与 LC 在线联用。幸运的是，已有其它的电离方法可以使非挥发性与热不稳定化合物直接从溶液或固体表面解吸。

目前解吸电离方法有热喷雾（TSP）[41]、^{252}Cf（锎）等离子体解吸（PD）[42]、场解吸（FD）[43]、快速原子轰击（FAB）[44]、液相二级离子质谱（LSIMS）[45]、激光解吸（LD）[46-51]、电喷雾离子化（ESI）[52]、基体辅助激光解吸电离（MALDI）[46-51]。这些方法均可与 LC 联用，成功几率不等。其中最常用的商用接口为电喷雾（ESI）、离子喷雾

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

(ISP)、热喷雾(TSP)与大气压电离接口(API)。

电喷雾(*Electrospray*)。自90年代初以来,电喷雾已获广泛应用,并带来了MS领域的巨大变革。在常压下发生喷雾,在洗脱溶剂上加高电压。与LC联用的电喷雾与最初的电喷雾(ESP)技术有所不同,最值得注意的是鞘气或载气的应用,常被称为离子喷雾。当洗脱液在常压下喷雾时,一种有机屏蔽液通常与流出的水溶性溶剂混合,以降低表面张力,增强带电小液滴的挥发能力。通过电喷雾使被测物分子变成不同荷电状态的离子(不等量的加合钠离子或质子)。

带有多重电荷的离子产生近似高斯分布的一系列峰(常称作包络),对应于多电荷离子的不同 m/z 比。只有那些在多电荷状态下可以稳定存在的被测物,如蛋白质、肽、核酸,才能用电喷雾或离子喷雾质谱分析。由于带多重电荷,因此分子量非常大的物质(如蛋白质)的质荷比能够在商品化四极质谱的仪器检测限度之内,甚至可以在低质量范围质谱仪器的检测限度之内。这一特性再加上明显的无反常峰,0.01%或更好的质量准确度,亚皮摩尔检测限与大于100000Da的质量检测范围等特点,将ESP MS推向MS的最前列。

离子喷雾(*Ion Spray*)。离子喷雾与电喷雾之间的区别为前者用气动雾化辅助小液滴的蒸发。这一特性使其只能分析不含有机改性剂的混合物,以前用有机改性剂降低液滴的表面张力,增强溶剂的蒸发。无有机改性剂简化了ESI源与常规LC的偶联问题,并增加了混合物中极性分子的溶解度。ESP与离子喷雾(ISP)都是LC-MS联用中最重要、最常用的样品引入方法。两者都与多种LC与CE联用,并已有商品化仪器。该技术产生多电荷或单电荷离子,不需再进一步离子化,因此不包括电子撞击或化学电离(CI)。

热喷雾(*Thermospray*)。热喷雾(TSP)利用热及喷雾作用,除去被测物离子的溶剂,留下完整的气体离子。该技术也不需进一步的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

电离步骤，从 LC 流出的洗脱液进入热喷雾源，在接口处被加热。外加热量与射流膨胀合力形成部分真空，产生细雾状的小液滴，保留住非挥发性分子。溶剂最终通过蒸发从每一液滴中除去，仅留下质子化的被测物分子。这些分子通过在溶液中加入醋酸铵，或气相离子分子之间的相互作用而带上电荷。产生的离子用质量分析仪检测。这种去溶剂过程与电喷雾源的极为相似。

用真空泵将汽化室抽真空，可达到质量分析仪内部低压的技术要求。以此方式可使洗脱液以 2mL/min 的流速直接引入 MS。这种离子源的一个缺陷是分析大分子(MW>10000)时，单电荷粒子超出大多数商品化四极质谱的质量检测范围。因此，ESP 与 ISP 用作大多数商品化仪器的离子源和样品引入系统。图 3－17 所示为 ESP 用作离子源产生系列蛋白及其多电荷离子的示例[37]。显然，LC－ESP－MS 方法在肽图中显示更强大的分析能力，每个肽在三元四极质谱中得到分离，碰撞诱导产生碎片可判断其氨基酸序列。每一个在 HPLC 中分离的肽都可以通过这一方法得到其氨基酸的序列[37,38]。

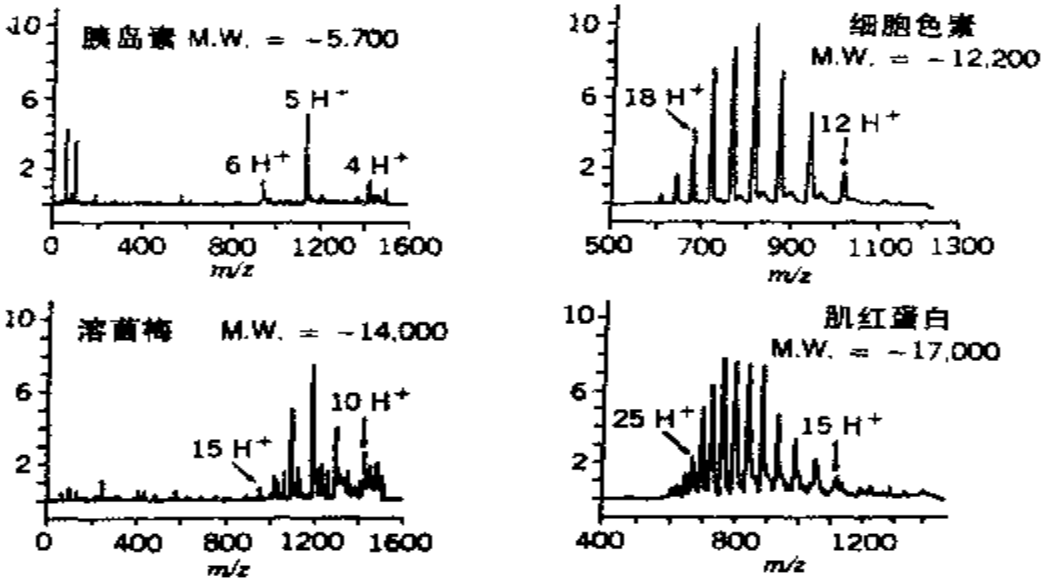


图 3－17 ESP 中多电荷肽与蛋白离子典型的离子迹[37]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

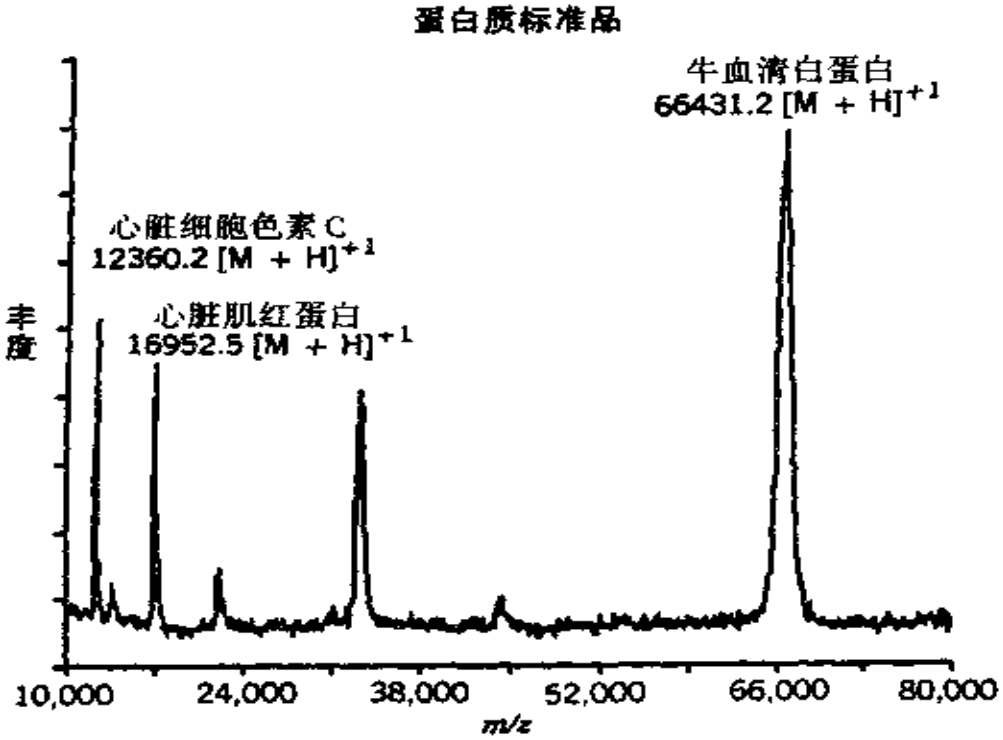
基体辅助激光解吸电离（*Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization*）。由于引入基体辅助激光解吸电离（MALDI）作为离子源，飞行时间质谱（TOFMS）已成为近几年最重要的 MS 仪器之一。于是，几乎所有 TOFMS 生产厂家均用 MALDI 作常规离子源。在 TOFMS 中，带电粒子在加速电场的作用下加速通过漂移管。离子根据其质/荷比不同，到达检测器区域的时间不同。分辨率受漂移时间差异的影响，与漂移时间相关的几个参数为：(1)漂移管的长度，(2)加速电压及其装置，(3)离子化样品中的不同离子。

借助于反射装置，连续梯度（曲线）反射及类似装置，使现在 TOFMS 的分辨率与大多数其它 MS 技术相差不大；分辨率现在常可达到 0.1 ~ 1.0 Da。因此，TOFMS 的可能分辨率现在与三元四极质谱或离子井质谱相近。然而，TOFMS 的质量检测范围要大得多，甚至在没有多电荷离子生成的情况下。

TOFMS 的另一重要优点是其结构、样品引入与常规操作均较简单。它与直接引入样品比较，仪器可旋钮控制、置工作台上，易于保养和维修。也可以多样品引入。用 MALDI 作离子源，通过改变激光能量，产生不同程度离子化的离子和碎片离子。光束的扫描能使样品快速分析，在离子源中的同一靶盘上往往有数百个不同的样品。静态方式扫描单个样品仅需数秒钟，那么几分钟内可分析数百个样品。采用其它样品引入和离子源的质谱仪很难做到这一水平。目前大多数 MALDI – TOFMS 的工作是静态的（离线操作），不能与诸如 LC 这种流动系统连用。然而，这一领域已出现了众多关于 LC – MALDI – TOFMS 的论文，恰如 LC – ESP – TOFMS[37,46-51]。

图 3 – 18 所示为一典型的 MALDI – TOFMS 分析结果，样品为大分子量的蛋白标准品混合物，采用典型的 MALDI 基体，芥子酸作为基体[35]。该 TOFMS 装置的分辨率使每种蛋白分子量的测定精度在 ±1Da 范围内。MALDI – TOFMS 的另一个优点是鉴别校正需样品量极少，甚至对总肽图和个别肽成分的氨基酸序列分析也

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn



组　　分	分子量	浓　　度
雌马心脏细胞色素 C	12359.2Da	0.20μM
雌马心脏肌红蛋白	16951.5Da	0.40μM
牛血清白蛋白	66430.2Da	2.85μM

图 3－18　蛋白标准混合物的 MALDI－TOFMS 谱图[53]

仪器：HP G2025A 系统；操作条件：质量范围 100000Da；滤质器：8000Da；极性：正极或负极；激光能量（337nm，氮激光），4～7μJ。

是如此。

3.3.5 选择质谱检测器

在选择 MS 离子源时，必须确保仪器的质量范围与分辨率与期望的被测物分子量相匹配。如果 MS 仪的检测范围仅为几千个道尔顿，那么 ESP、ISP 或 TSP 可能最适于蛋白质，以产生多电荷离子。对于低分子量的被测物，任何接口或离子源都可以，如电子

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

轰击、化学电离、激光解吸或快原子轰击。用高分辨率 LC 方法分离各样品组分，由于进入 MS 中的组分不会发生重叠，因此可降低 MS 中极高的分辨率的要求。然而，为正确鉴别这些物质，最好还是用高分辨率的仪器。

理想的系统是高分辨率分离步骤通过一个接口或离子源与高分辨率 MS 结合使用，所用离子源应能提供每一被测物的单电荷离子和/或多电荷离子。商品化仪器正致力于提供 LC－ESP/ISP/TSP 与 MS 系统相联用。

表 3－10　不常用的 HPLC 检测器

检测器	评　　述
化学反应检测器 (Reaction detectors)	在色谱柱与 UV 或 FL 检测器之间装有化学反应组件，以将被测物转化成易于检测的形式。主要用于痕量分析。 大多数情况下，这些系统较复杂，普适性欠缺，应用受限制。 分离使方法建立复杂化，流动相与反应介质的匹配往往有问题。
放射活性检测器 (Radioactivity)	对放射标记的样品非常灵敏，专属性强，如环保研究包括农用化学品，药物痕量研究。 其它领域应用有限。
红外检测器 (IR)	可适用的有机溶剂范围有限。 主要用于分析合成聚合物。 尚未建立其它应用，如检测前除溶剂。
小角度激光散射仪 (Low－angle light scattering, LALLS)	可用于测定被测物分子量，尤其适用于合成与生物聚合物[54]。
旋光检测器	用于检测对映异构体(见第 12 章)
粘度仪	用于在线测定流动相，被测物＋流动相粘度的变化。 非常适合于合成与生物聚合物分子量的测定[55,56]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3.3.6 不常用的检测器

目前，有许多其它的 HPLC 检测器在使用，但它们的应用尚不广泛，本书中不作详细的讨论。表 3－10 总结了它们的一些有关特性。请参见文献 57 与 58 中的深入讨论。

参考文献

1. S. van der Wal and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 225 (1983) 463.
2. D. Wickarn, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. 67.
3. R. Blain, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott ed Academic Press, San Diego, CA, 1993 p. 39.
4. C. F. Poole and S. A. Schuette, *Contemporary Practice of Chromatography*, Else vier, Amsterdam, 1984, p. 375.
5. J. B. Li, *LC/GC*, 10 (1992) 856.
6. *High Purity Solvent Guide*, Burdick & Jackson Laboratories, Muskegon, MI, 1980
7. S. van der Wal and L. R. Snyder, *Clin. Chem.*, 27 (1981) 1233.
8. B. L. Karger, M. Martin, and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 1640.
9. F. Erni, H. P. Keller, C. Morin, and M. Schmitt, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 65.
10. C. Parriott, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed? Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. 256.
11. M. Munk, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. 5.
12. B. O. Flaherty, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed.. Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. III.
13. *Chromatography Catalog/Guide*, Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL, 1993, pp. 58－61.
14. I. S. Krull, in *Chromatography and Separation Chemistry: Advances and Developments*, S. Ahuja, ed., ACS Symposium Series 297, American Chemical Society, Washington, DC, 1986, p. 137.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

15. P. B. Sweetser and D. G. Schwartzfager, *Plant Physiol.*, 61 (1978) 254.
16. L. Dou, J. Mazzeo, and I. S. Krull, *BioChromatography*, 5(2) (1990) 74.
17. I. S. Krull, C. M. Selavka, M. Lookabaugh, and W. R. Childress, *LC/GC*, 7(9) (1989) 758.
18. I. S. Krull, M. E. Szulc, and S. -L. Wu, *LC/GC*, 11(5) (1993) 350.
19. I. S. Krull, C. M. Selavka, W. Jacobs, and C. Duda, *J. Liq. Chromatogr.*, 8(15) (1985) 2845.
20. C. Lavrich and P. T. Kissinger, in *Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology by Liquid Chromatography*, S. H. Y. Wong, ed.. Marcel Dekker, New York, 1985, Chapter 8.
21. G. Li, M. E. Szulc, D. H. Fisher, and I. S. Krull, in *Electrochemical Detection in Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, P. T. Kissinger, ed Chromatographic Science Series, Marcel Dekker, New York, in preparation (1997).
22. W. R. LaCourse, C. M. Selavka, and I. S. Krull, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1366.
23. D. C. Johnson, S. G. Weber, A. M. Bond, R. M. Wightman, R. E. Shoup, and I. S. Krull, *Anal. Chim. Acta*, 180 (1986) 187.
24. P. T. Kissinger and W. R. Heineman, eds.. *Laboratory Techniques in Electroanalyti cal Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1984, Chapter 20.
25. L. D. Libera, *J. Chromatogr.*, 536 (1991) 283.
26. W. R. LaCourse and D. C. Johnson, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 50.
27. R. D. Rocklin, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed.. Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. 145.
28. R. G. Elkin and J. E. Griffith, *J. Assoc. Off. / Anal. Chem.*, 68 (1985) 1028.
29. L. Chen and I. S. Krull, *Electroanalysis*, 6 (1994) 1.
30. J. C. Hoogvliet, J. M. Reijn, and W. P. van Bennekorn, *Anal. Chem.*, 63 (1991)2418.
31. W. R. Matson, P. H. Gamache, M. F. Beal, and E. D. Bird, *Life Sci.*, 41 (7) (1987) 905.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

32. C. N. Svendsen, *Analyst*, 118(2) (1993) 123.
33. W. R. Matson, P. Langlais, L. Volicer, P. H. Gamache, E. Bird, and K. A. Mark, *Clin. Chem.*, 30 (1984) 1477.
34. T. Hayashi, H. Tsuchiya, and H. J. Naruse, *J. Chromatogr.*, 274 (1985) 318.
35. J. Wang, *Electroanalysis*, 3 (1991) 255.
36. B. N. Jones and J. P. Gilligan, *J. Chromatogr.*, 266 (1988) 471.
37. W. M. A. Niessen and J, van der Greef, *Liquid Chromatography – Mass Spectromery*, Chromatographic Science Series 58, Marcel Dekker, New York, 1992.
38. *Techniques in Protein Chemistry*, Vols. I – VIII, Academic Press, San Diego CA, 1985 – 1995
39. Private communication, G. Fallick, Waters Corp., Milford, MA, 1996.
40. Technical literature on LCQ, *Analytical Newsletter*, Summer 1995, Finnigan/MAT Instruments, San Jose, CA.
41. C. R. Blakely and M. L. Vestal, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 750.
42. B. Sundqvist and R. D. Macfarlane, *Mass Spectrom.* Rev., 4 (1985) 421.
43. L. Prokai, *Field Desorption Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, New York, 1990.
44. M. Barber, R, S. Bordoli, G. J. Elliott, R. D. Sedgwick, and A. N. Tyier, *Anal. Chem.* 54 (1982) 645A.
45. P. A. Lyon, ed., *Desorption Mass Spectrometry: Are SIMS and FAB the Same?* American Chemical Society, Washington, DC, 1985.
46. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2299.
47. K. K. Murray and D. H. Russell, *Amer. Lab.*, 38 (June 1994).
48. E. R. Williams, G. C. Jones, Jr., L. L. Fang, T. Nagata, and R. N. Zare, *SPIE Appl. Spectrosc. Mater.* Sci. II, 1636 (1992) 172.
49. A. P. L. Wang, X. Guo, and L. Li, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3664.
50. R. M. Whittal and L. Li, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1950.
51. I. S. Krull, R. Mhatre, and J. Cunniff. *LC/GC*, 12(12) (1994) 914.
52. R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, and H. R.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

Udseth, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 882.

53. *MALDI – TOFMS System*, Technical literature, HP G2025A, Hewlett – Packard, Burlington, MA and San Jose, CA, 1994.

54. I. S. Krull, R. Mhatre, and J. Cunniff, *LC/GC*, 13 (1995) 30.

55. P. K. Dutta, D. Gillespie, K. Hammons, and M. A. Haney, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 865.

56. P. K. Dutta, K. Hammons, B. Willibey, and M. A. Haney, *J. Chromatogr.*, 536(1991) 113.

57. J. R. Chapman, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed.. Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. 173.

58. E. J. Woolf, in *A Practical Guide to HPLC Detection*, D. Parriott, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1993, p. 211.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第4章　样品的制备

4.1引言

样品制备是HPLC分析中必不可少的一部分，由此制成适于进样上柱的可重现的均质溶液。样品制备的目的是为了使试样中的干扰物质相对除净、不损害色谱柱，且能与将使用的HPLC方法相兼容；即样品溶剂能溶于流动相而不影响样品的保留值与分离度。将被测物浓缩或衍生化，以改善检测或使分离更好也是理想的。样品制备开始于样品的采集，一直到样品注入HPLC、上柱，其中包括多步操作，见表4－1中所总结。选项1～4包括样品的采集、运输、储存、初加工、实验室取样以及随后的称重/稀释，所有这些构成了样品预处理的重要环节，这些步骤能对最终方法的准确度、精密性和方便程度产生重大影响。此处仅讨论选项3(样品的初加工)。选项1、2和4的讨论见文献(1～4)。本章中主要讨论表4－1的选项5～8，即通常所指的样品预处理步骤。

HPLC的自动化程度较突出，而样品预处理却经常靠手工方式进行。因而，在方法建立和常规分析上，样品预处理要比HPLC分离与数据分析花费更多的时间。样品预处理常涉及到诸多方法，可能需许多步操作才能完成，因此可能是HPLC方法建立中最具挑战性的一个环节。最后，所建立方法的精密性与准确度往往决定于样品的预处理步骤[5,6]，其中包括象称重与稀释这样的简单操作。可见，必须认真对待、仔细设计样品的预处理步骤。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 4－1　样品预处理的选择

选　　择	评　　述
1.样品的收集	用符合统计学的程序获得有代表性的样品。
2.样品的贮藏与保存	用适宜的惰性、密封容器；特别小心易挥发、不稳定或活性物质；如必要，稳定样品；生物样品可能需要冷冻。
3.样品的初加工	样品形式必须适于有效的样品预处理（如干燥、过筛、碾细等）；细小的离散样品易于溶解或提取。
4.称重或定容稀释	有必要注意活性、不稳定或生物组分；稀释时，用经校正的容量器皿。
5.其它的样品加工方法	溶剂替换、除盐、蒸发、冷冻干燥等。
6.除去微粒杂质	滤过、固相萃取，离心。
7.样品的提取	液体样品方法（见表 4－2），固体样品方法（见表 4－3 和 4－4）
8.衍生化	主要用于提高被测物的检测灵敏度；有时也用于改善分离；（见 12.1 节中对映体的分离）。

样品的预处理步骤应使被测物能定量回收，包含最少的步骤，并（如可能的话）易于自动化。对每种被测物的定量回收（99%以上）能提高灵敏度与定量精度，尽管这并不意味着原样品中的所有被测物必须包含在最终进样的样品中。例如，方法中一系列样品预处理步骤的中间部分试样可能用来作样品再处理或作中间体进样。如果回收率低于 100%，样品预处理必须能够重现。样品预处理步骤较少，自动化程度高，可降低所需的全部时间，省力，并能减少因操作者可能产生的偶然误差。

许多样品制备技术已能自动化，适宜的仪器也已面市。自动化的方法多种多样，有用自动装置代替体力劳动的，也有优化的专用仪器履行特殊样品的制备技术。尽管好的自动化设备造价昂贵、结构复

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

杂，但当必须分析大量样品且分析每个样品较费力、耗时，自动化处理是理想的选择。样品预处理步骤的自动化程度常常取决于分析成本。在某种情况下，从操作者的安全考虑，也必须使用自动处理装置（即最低限度暴露于有毒物质或其他可能危害健康的环境中）。

4.2 样品类型

样品基质可分为有机基质（包括生物的）或无机基质，也可进一步再分为固体、半固体（包括乳膏剂、胶剂、混悬剂、胶体剂）、液体和气体。气体样品通常用气相色谱分析，不用 HPLC。然而，对活泼的、热不稳定的或易吸附于金属表面的气体样品，有时用 HPLC 处理会更好。用 HPLC 分析气体样品需采用捕集系统。气体样品（1）穿过固体载体，随之用溶解液体洗脱出，或（2）以泡状穿过能捕集住该被测物的液体。HPLC 分析气体样品的示例见美国环境保护局（EPA）对挥发性醛和酮[7]的监测方法 TO－11[7]。将一气体样品通过涂有吸附剂2、4－二硝基苯肼的捕集器，可将醛和酮定量转化成2、4－二硝基苯腙。然后用乙腈将产物腙洗脱出，并用反相 HPLC 分离。表4－2总结对气体、液体或固体样品初始制备的一般方法。本章其余部分将讨论最为关心的各种基质中半挥发性和非挥发性被测物的样品预处理：其中包括多步操作，见表4－1中所总结。选项1～4包括样品的采集、运输、储存、初加工、实验室取样以及随后的称重/稀释，所有这些构成了样品预处理的重要环节，这些步骤能对最终方法的准确度、精密性和方便程度产生重大影响。

与气体或固体相比，制备进行 HPLC 分析的液体样品要容易得多。许多 HPLC 分析就是基于“稀释即进样”的步骤，此处稀释即降低溶液中被测物的浓度，以避免色谱柱超载或检测器超限。固体样品的制备要求更高一些。有些情况下，样品易于溶解，随后即可进样或进一步预处理。而有时，样品基质在常规溶剂中不溶，必须将被测物从固体基质中提取出来。此外，由于包合与吸附作用所致，被测物

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

表 4-2 气体、液体与混悬液体样品预处理的一般方法

样品类型	样品预处理的方法	技术原理	评 述
挥发性有机物、气体	固相捕集	气体样品通过装有吸附剂(如硅胶、活性炭)的管道;捕集的被测物用强溶剂洗脱出。	气体流速对捕集效率很重要;注意形成气溶胶、吸附剂阻塞和活性被测物的不可逆吸附;可用化学络合剂提高捕集效率;清洗与捕集技术。
	液体捕集	气体样品通过溶液,被测物被易溶于该溶液而被留于溶液中;气体溶剂通过溶液通常不被吸附。	流速应足够慢,不至于产生泡沫和气溶胶;可在溶剂中加入络合剂辅助捕集;对挥发性强的被测物,可降低温度。
液 体	固相萃取	液体流过能选择性地捕集被测物(或干扰物)的固定相;捕集的被测物可用适溶剂洗脱出;有时,保留干扰物而允许被测物通过固定相,不被保留;机制同 HPLC	所有选择性捕集所需无机、有机和生物被测物的固定相有很多种;也有用于强阳药物、烃类、儿茶酚胺和许多其它种类的化合物、聚合水凝胶的特殊固定相
	液-液萃取	样品在两种不混溶的液相中分配,应选溶解性差异较大的液相。	注意勿形成乳液——加热、加盐可破坏之(见 4.4.1.3 节);用不同溶剂或影响化学平衡的添加剂(如缓冲剂调节 pH、盐改变离子强度、络合试剂、离子对试剂等)改变 K_D 值;有许多连续提取低 K_D 或大体积样品的方法报道。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

样品类型	样品预处理的方法	技术原理	评　述
	稀　释	用与HPLC流动相相容的溶剂稀释样品，避免色谱柱超载，或使其浓度在检测器线性范围内。	为避免谱峰扩展，溶剂对于HPLC流动相不应太强且应与其混溶；"稀释即可进样"是简单的液体样品如药物制剂的一般样品制备方法。
	蒸　发	在大气压下缓缓加热除去溶剂，可通过气流、惰性气体或真空辅助进行。	蒸发勿过快；蒸馏会损失样品；注意样品在容器壁上的损失；勿过热蒸干；在惰性气体下蒸发较好，如N_2；最好使用旋转蒸发器；已有自动系统（如Turbovap）可用。
	蒸　馏	加热样品至溶剂的沸点，挥发性被测物在蒸气相中浓缩、冷凝和收集。	主要用于易挥发的样品；如加热温度太高，样品会分解；低蒸气压化合物可用真空蒸馏；蒸汽蒸馏最高温度为100℃，相当温和。
	微渗析	在两种水溶液之间置一半透膜，样品溶质依其浓度差，从一溶液转移至另一溶液中。	渗析物需用富集技术浓缩，如SPE；微渗析用于检测活体动植物组织和发酵液中的细胞外化学物质；已与微LC柱在线联用；由于大蛋白不能通过滤膜，用分子量截止膜的渗析也能在线用于HPLC之前样品的脱蛋白；同样可用超滤与反渗析法。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

样品类型	样品预处理的方法	技术原理	评　述
	冷冻干燥	冷冻水溶液样品，真空下水分被升华除去。	有利于非挥发性有机物；可处理大体积样品；可能损失挥发性痕测物；能浓缩无机物。
悬浮液	过　滤	液体通过滤纸或滤膜，滤除悬浮颗粒。	极力推荐该法以排除反压问题，延长色谱柱寿命；滤膜必须与溶剂匹配，使其在操作中不致溶解；大孔径（> 2μm）滤器可提高流速，小孔径滤器（< 0.2μm）可除去细菌。
	离　心	样品放于锥形离心管中，置离心机中高速旋转；倾出上清液。	有时从离心管中定量取出固体样品较难；超速离心一般不用于去除微粒。
	沉　降	在沉降容器中静止放置，使样品沉淀；沉降速率取决于 Stoke 半径。	为一极慢过程；依照沉淀速率，可在不同水平人工回收不同大小的微粒。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

不易从不溶的基质中分离出，这就可能有必要使用更剧烈的手段，如索氏提取、超临界流体萃取(SFE)、超声或固－液萃取。表4－3列举了一些从固体样品中回收被测物的传统方法。表4－4提供了一些较新的方法。一旦被测物从固体样品中定量提取出，所得液体部分则能直接注入 HPLC 仪器中或者进行进一步的预处理。

图 4－3　固体样品的传统萃取方法

样品预处理的方法	技术原理	评　　述
固－液萃取	样品置具塞容器内，加入溶剂溶解有关被测物；从固体中滤出溶液(有时亦称"振摇/过滤"法)。	有时可煮沸或回馏溶剂以提高溶解度；细小分散状态的样品易于浸出；样品可用人工或自动振摇；经滤过、倾析或离心从不溶性固体中分离出样品。
索氏提取	样品置于活动的多孔容器(套管)中；回馏溶剂不断流过该套管，溶解被测物，连续收集到蒸馏瓶中。	以纯溶剂提取；样品在溶剂的沸点处必须稳定；缓慢，但提取直至完成不需有人照看；价低；对自由流动粉末最好；回收率很好(用作其它固相萃取法的参照标准)。
强制流动浸出	样品置于流通管中，并使溶剂从中流过。加热流通管至溶剂的沸点附近。	适于颗粒性样品；溶剂能用高压 N_2 注入或推过；溶剂体积小于索氏提取；结果相似，速度更快。
均匀化	样品置混合器中，加入溶剂，使样品均一化成细小离散状态；除去溶剂，进一步混匀。	用于动植物组织、食品、环保样品；可用有机与水溶剂；可加干冰或硅藻土使样品流动性增大；对小分散样品的萃取效率高。
超声	细小的分散样品浸没于装有溶剂的超声容器中，进行超声辐射。也可用超声探头或杯型超声破碎器。	用超声作用辅助溶解；可加热提高萃取速率；安全、快速；最适于粗糙、颗粒状物质；可同时处理多份样品；与溶剂的接触效率高。
溶解	用强溶剂直接溶解试样，使被测物溶入溶液，发生或不发生化学变化。	无机固体可能需加酸或碱达到完全溶解；有机样品往往能直接溶于溶剂中；溶解后，可能需要滤过。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 4-4 固体样品的现代萃取方法

样品预处理的方法	技术原理	评 述
加速溶剂萃取(ASE)	样品置于密封容器中,加热至沸点以上,使容器中的压力上升;自动取出萃取的样品,并转移至小瓶中作进一步处理。	可大大加快液-固萃取过程;自动化;容器必须能耐高压;萃取的样品较稀,需进一步浓缩;由于使用高压、高温溶剂,需有安全措施。
自动索氏提取	热溶剂浸出与索氏提取的结合;套管中的样品先浸没在热溶剂中,然后沉高,进行常规索氏提取/用回馏溶剂淋洗,最后浓缩。	人工与自动操作均可;所用溶剂少于传统索氏法;溶剂重新回收利用;由于二步操作,可减少提取时间。
超临界流体提取	样品置于流通容器中,超临界流体(如 CO_2)穿过样品;降低压力后,提取的样品收集在溶剂中或捕集到吸附剂上,然后再以溶剂淋洗解吸附。	人工与自动操作均可;改变影响 SF 流体的极性,可改变其密度和加溶剂改性剂;收集的样品通常较纯,相对无污染,因为 CO_2 提取结束即除去;基质影响提取过程;方法建立时间可能比其它现代方法长。
微波辅助提取	样品置于开口或密闭的容器中,以微波能量加热,使被测物被提取到溶剂中。	提取溶剂可分为吸收微波溶剂(MA)和不吸收微波溶剂(NMA)两种;采用 MA,样品置于高压容器中,如加速溶剂萃取(ASE),充分加热至沸点以上;采用 NMA 中,容器可开口,无压力升高现象;微波箱中用有机溶剂(MA 或 NMA)与 MA 的高压操作时,需有安全操作规程。
热提取	动力学顶空进样形式,加热样品至很高(控制)的温度,可高达 350℃。	系统必须由熔融石英或熔融硅胶制造,使提取的被测物不会与热金属表面发生反应;应避免系统局部过冷;用于蒸气压低的样品。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4.3 固体与半固体样品的预处理

4.3.1 降低样品颗粒粒度

最好降低固体样品的颗粒粒度，细粒度样品的优点在于（1）均质好，取样的代表性好，精密性与准确度较高，（2）因其表面积大，溶解迅速，易于提取。降低固体样品颗粒粒度的方法见表 4－5 概述。

许多固体样品最好用研钵和碾杵研磨，大多数样品能承受碾磨产生的高热。如样品中含有热不稳定或挥发性化合物，在研磨中尽量减少生热很重要。如样品非常坚硬，可能会需用硬化钢圆柱筒制成的金刚石研钵。这种装置有一根密合的钢棒装配于柱筒内，经锤击钢棒，样品被研成粉末。如样品为软材料，最好用球磨机。将样品置入装有瓷球、不锈钢球或硬燧石球的瓷圆筒内。密封好后，转动、振荡或摆动该圆筒，直至里面样品被粉碎成细小的离散状态，然后过筛可得到均匀的样品。

韧性或弹性样品，比如橡胶或塑料，必须先冷却使其变脆，再进行碾磨。对这种样品，也可直接将干冰加进研钵或球磨机中（制备干冰的二氧化碳不应含有可能污染样品的杂质）。当需更低温度硬化样品时，可在冷冻碾磨机或深冷粉碎系统中通过液氮冷却粉碎样品。

4.3.2 干燥样品

供分析用的固体样品经常呈潮湿状态。驱除水分或干燥样品至恒重对分析结果的可靠性通常是十分必要的。无机样品，如土壤，应加热至 100～110℃，以保证完全除去水分。疏水性有机样品由于吸附水分很少，一般不需加热。然而，固体有机样品能吸收有机蒸汽，加热步骤能除去这些污染物。对易吸湿或活性样品（如酸酐），建议用真空干燥器干燥。对于有空气存在加热时能发生氧化的样品，应该在真空或氮气保护下进行干燥。生物样品加热一般

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 4-5 降低样品粒度的方法

样品粒度降低方法	原　　理
混　合	机械混合将半软性物质砍斩成较小颗粒；也可将不均匀的样品混合成较均一的形式。
砍　斩	将样品机械切割成小块。
破　碎	炭化钨(硬质合金)可变齿板破碎机可将大、硬的样品粉碎成 1～15mm 直径的颗粒。
切　割	切碎机可用旋转或固定切刀，将软至中等硬度的样品切碎(<100mm 直径)；切碎颗粒的大小取决于与机器联用的筛网。
碾　碎	研体与研杵最常用；机动研体粉碎机自动与标准化粉碎至人工用研体与研杵粉碎的粒度；湿法与干法粉碎均可用；可达到直径约 10μm 的粒度。
均　化	将样品破碎成小部分并搅匀，使样品的构造与紧密性更加一致。
浸　渍	经断、砍、切、割等手段，将一软物质破碎成更小。
研　磨	圆盘研磨机将直径<20μm 的硬样品磨成粉末，在其可变间隙装置上的固定与转动圆盘之间缓送样品；一般可磨成直径 100μm。转动加速研磨机可以完成冲击与剪切两种操作，将软与中等硬度的样品以及纤维状样品磨成 80μm；球磨机用玛瑙、金属钨卡套或涂有 PTFE 的不锈钢球，通过离心或行星式作用，产生很大的碾磨能量，将样品磨成亚微级细粒；工具研磨机则经旋转压龙刷，将样品甩至箱壁上，将干燥的土壤、淤泥、粘土以及类似物磨成粉末。
绞　碎	通过断、砍、切、割等手段，将动植物样品破碎成小颗粒。
压　榨	一般为从半固体物质(如植物、水果、肉)挤榨出液体，以便进一步分析。
粉　磨	用电动驱动杆或颤动基座，将颗粒机动破碎成小部分；干或湿状态均可采用；能用加液 N_2 的冷冻磨机处理软切性样品。
过　筛	使样品通过一金属或塑料筛，筛孔横截面积均一(3μm～125mm 方目)，将样品颗粒的粒度分级；湿、干筛均可使用。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

不应超过 100℃，往往也应避免温度高于室温，以免样品分解变性。活性生物样品(如酶类)的制备经常在 4℃以下进行，以尽可能减少失活。而且这类样品在 HPLC 分析前，应在低温处保存。冷冻干燥(冻干)常用于热稳定性差样品的制备(尤其是生物制品)。进行冷冻干燥需先快速冷冻样品，然后再在真空下升华除去(冰态)水分。

4.3.3 过滤

进样前应先除去颗粒性杂质，因为这种微粒将影响色谱柱的使用寿命（见 5.4.3.1）。过滤、离心或沉淀是去除样品中微粒的最常用方法。表 4－6 列出了几种滤过方法。滤纸过滤技术相对简单易做。滤材的孔径越小，滤过的溶液越洁净，滤过时间也越长，真空滤过可加速这一过程。市面上可购到滤膜以及相应的滤器。然而，许多 HPLC 用户更喜欢使用带 Luer 接口的一次性滤头。样品抽入针管中，接上这种滤头，轻推压滤液即可经膜滤出。

现可买到具不同孔径和尺寸的各种过滤用膜材，生产商的广告印刷品可提供所需的规格。对于 HPLC 中遇到的大多数样品，最好用孔径范围 0.25～2μm 的滤材。所提供的孔径只为近似值，膜的种类对滤过效果有一定的影响，孔径 0.25μm 的滤膜能滤去最小的微粒(和大分子)。如果样品中含有胶体物质或大量的细小微粒，可能需要相当的压力促使液体样品通过滤材。滤膜生产商一般会提供详细的溶剂相容性说明。采用的溶剂不合适，滤膜可能会被溶解(或软化)，污染样品。一些更昂贵的专业滤膜、SPE 圆盘滤头和萃取管不仅用于过滤，且能除去微粒(见 4.4.2 节)。

4.4 液体样品的预处理

表4－2介绍了液体样品的制备方法，但大多数实验室仅需这些步骤中的几个。例如，蒸馏仅限于挥发性的化合物，尽管对高沸

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

图4-6 HPLC中的过滤方法

滤过介质	典型产品	推荐的应用	评　论
滤　纸	纤维素	去除大颗粒(>40μm)	小心勿使滤纸纤维进入样品中;保证溶剂与滤纸相容。
滤　膜	尼龙、PTFE、聚丙烯、聚酯、聚醚砜、聚偏氟乙烯、聚乙烯吡咯烷酮	去除小颗粒(<10μm)	易被"脏"样品堵塞;可能需预滤过;0.25~2μm孔径最常用;超滤膜见4.4.3节。
功能膜	离子交换膜、亲和膜	能除去颗粒与基质干扰物质	能被脏样品堵塞;可能需预滤过;溶剂相容性可能是问题。
SPE萃取管	硅胶和聚合物	能除去颗粒与基质干扰物质	硅胶键合相的微粒能进入滤液;增塑剂可能从注射针管和塑料筛板中浸出;金属离子可能从金属筛板中浸出;小心堵塞并注意批次之间的不重现。
SPE滤片	PTFE-与玻璃纤维	能除去颗粒与基质干扰物质	有可需滤膜夹;PTFE膜较脆;可高流速通过大体积样品、小心堵塞并注意批次之间存在差异。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

点的环保样品的真空蒸馏能扩展这项技术的应用[8]。冻干通常限于生物样品的纯化与处理(见第11章)。下面我们将讨论大多数HPLC实验室中经常使用的液-液萃取和液-固(固相)萃取方法。

4.4.1 液-液萃取(Liquid-Liquid Extraction,LLE)

用液-液萃取(LLE)可从干扰物中分离出被测物,通过被测物在两种不混溶的液体(或相)中的分配系数不同达到分离的目的。LLE中一相通常为水相,而另一相为有机溶剂。亲水性强的化合物进入极性的水相多,而疏水化合物将主要溶于有机溶剂中。萃取进有机相的被测物经溶剂挥发容易回收,而提取进入水相中的被测物经常能够直接注入反相HPLC色谱柱中进行分析。下面主要讨论被测物由水溶液萃取进有机相中的情况,被测物被萃取入水相时,使用的方法也类似。

图4-1概括了LLE分离所包含的步骤。由于萃取为一平衡过程,效率有限,两相中仍存在数量可观的被测物。因此可利用包括改变pH、离子对、络合作用等的化学平衡,以提高被测物的回收率和/或消除干扰。LLE中采用的有机溶剂有下列特点:

1 在水中溶解度低(<10%)

2 具有挥发性,萃取后易于除去与浓缩

3 与用于被测物的HPLC检测技术相容(避免使用UV吸收强的溶剂)

4 极性并可形成氢键,提高有机相中被测物的回收率(见2.3.2.1节与附录Ⅱ中的讨论)

5 纯度高,尽量减少样品污染

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

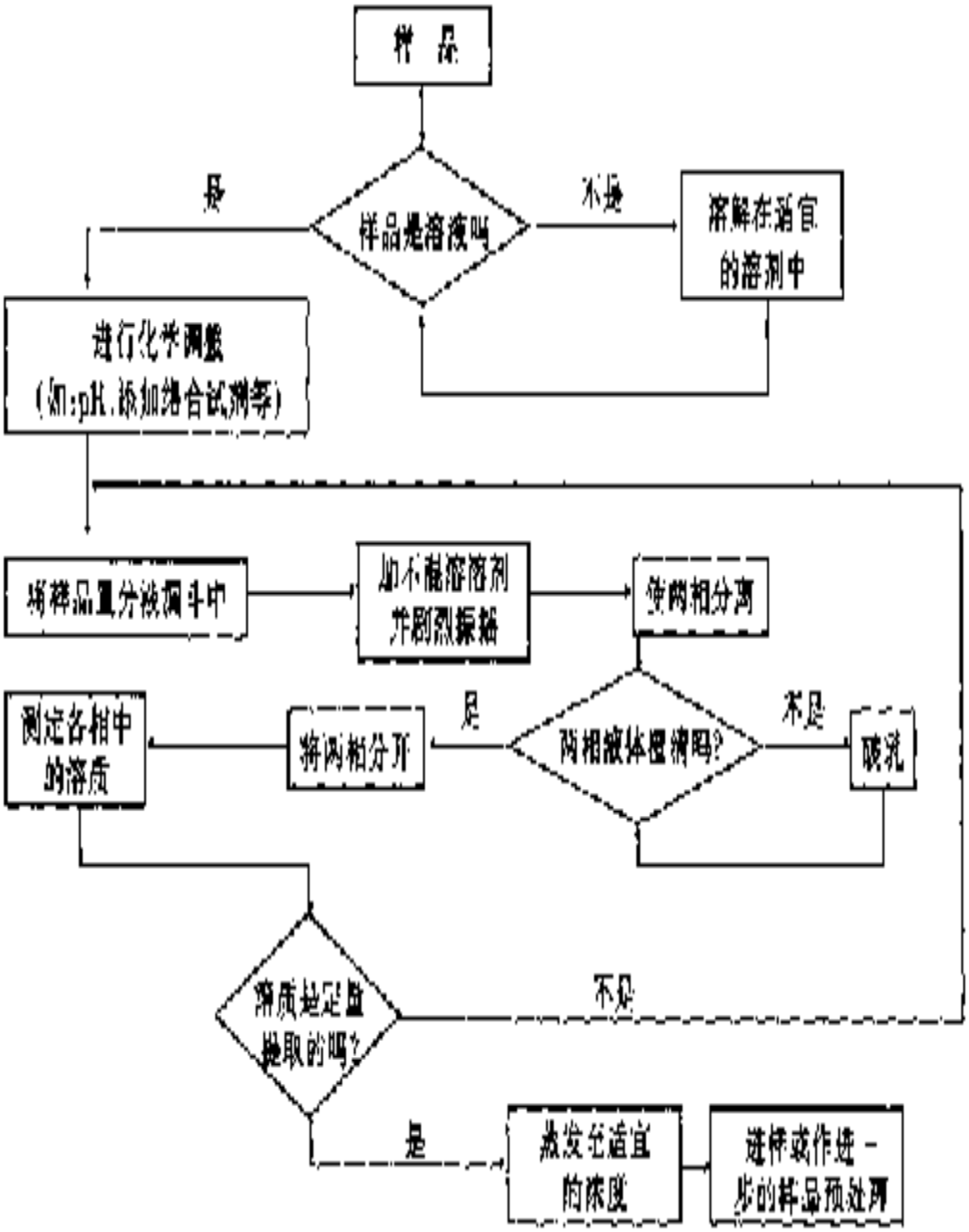


图4-1 LLE步骤框图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4.4.1.1 理论 能斯特(Nernst)分配定律说明任何种类溶质在两不互溶的溶剂中都有分配,而且其在两相中的浓度比例维持恒定:

$$K_D = \frac{C_O}{C_{aq}} \tag{4.1}$$

其中 K_D 为分配常数,C_O 为被测物在有机相中的浓度,C_{aq} 为被测物在水相中的浓度。这样被测物被萃取进有机相的分数为:

$$E = \frac{C_O V_O}{C_O V_O + C_{aq} V_{aq}} = \frac{K_D V}{1 + K_D V} \tag{4.2}$$

其中 V_o 为有机相的体积,V_{aq} 为水相的体积,V 为两相体积的比值 V_o / V_{aq}。

许多 LLE 操作在分液漏斗中进行,每一相的体积一般都需几十或几百毫升。采用一步提取,由于相比值 V 必须保持在一实际范围内[如 $0.1<V<10$(见式 4.2)],K_D 对于定量回收两相之一中的被测物必须足够大(例如>10)。在大多数分液漏斗 LLE 操作中,定量回收率(>99%)需要两步或多步萃取。对于多步萃取,合并每步萃取得到的被测物,萃取被测物的总分数 E 为:

$$E = 1 - \left(\frac{1}{1 + K_D V}\right)^n \tag{4.3}$$

其中 n 为萃取次数。例如某被测物的 $K_D = 5$,两相的体积相等($V = 1$),被测物回收率>99%,则需要分三步萃取。增大 K_D 可以采用以下几种方法:

1 改换有机溶剂,以使 K_D 增大

2 如被测物是离子或可电离,通过抑制其离子化,使其在有机相中的溶解度加大,即增大 K_D(见 4.4.1.2 节中讨论)。假如被测物可电离,也可在有机相中添加离子对试剂,使被测物与其结合形成离子对被萃取进有机相(见 7.4 节)。

3 可在水相中加入一种惰性中性盐(例如硫酸钠),用盐析法降低被测物在水相中的浓度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4.4.1.2 实践 表 4－7 提供了一些典型的萃取溶剂以及不适于用作萃取(与水混溶的)溶剂的示例。除考虑互溶因素外，溶剂极性 P' 以及与被测物极性的关系是主要的选择标准(见附录Ⅱ中的表Ⅱ－1)。当萃取溶剂的极性与被测物匹配时，其 K_D 值最大。例如从水溶液中提取极性被测物，采用极性大的(P'大)有机溶剂较好。混合两种极性不同的溶剂(如己烷和氯仿)并测定 K_D 与有机相组成的关系，能方便地找到最佳极性的有机溶剂配比[9]。可将 K_D 值最大的溶剂混合液用于 LLE 操作。通过改变有机溶剂的选择性，可进一步改变 K_D 值，进而改善干扰物与被测物的分离。溶剂选择性三角形中不同区域的溶剂(见图 2－7、2.3.2.1 节)可提供选择性差异，亦见文献 10 的讨论。

表 4－7 LLE 的提取溶剂[a]

水溶剂	与水不混溶的有机溶剂	与水混溶的有机溶剂(不适于 LLE)
纯　　水	脂肪烃类(己烷、异辛烷、石油醚等)	醇类(低分子量)
酸溶液	二乙基醚或其它醚	酮类(低分子量)
碱溶液	二氯甲烷	醛类(低分子量)
浓盐(盐析作用)	氯仿	羧酸类(低分子量)
络合剂(离子交换，螯合，手性等)	乙酸乙酯和其它酯	乙腈
以上两种或多种混合	脂肪酮类(C_6 及以上酮) 脂肪醇类(C_6 及以上醇) 甲醛、二甲苯(有 UV 吸收!) 以上两种或多种混合	二甲基亚砜 二氧六环

[a] 第一栏中的溶剂可与第二栏的任一溶剂相匹配；与水混溶的有机溶剂不可与水一起用于 LLE。

在溶剂萃取中，离子型被测物按所选用条件的不同，其在两相中的分配系数也会不同。例如，考虑从水溶液中萃取有机酸。假如缓冲水相的 pH，使其高于被测物 pK_a 值至少 1.5pH 单位，该被测物将电离，在水相中占优势；极性较弱的干扰物将被萃取进有机

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

相。如果降低水溶液 pH($\ll pK_a$),以至该被测物不再电离,将被萃取进有机相,同时将极性强的干扰物留在水相中。与 pH 有关的平衡在 7.2 节中有进一步讨论。酸碱萃取与 pH 关系的原理与 LLE 和 HPLC 相同。

如果被测物的 K_D 不适宜,可能需另外的萃取方法提高回收率(见式 4.3)。这种情况下,在原样品中重新加入不混溶的溶剂,提取剩余的溶质,最后合并所有的提取液。一般来说,最终提取溶剂的体积一定时,多次萃取比单次萃取的溶质回收率高。也可以用反提法进一步减少干扰物。例如,还是考虑上述有机酸被测物的提取。假如被测物首先在低 pH 条件下萃取进入有机相,极性干扰物(如亲水中性物、质子化碱)被留在水相中。如果用高 pH 的新的水缓冲液反提有机相,离子化有机酸重新转移到水相中,而将非极性的干扰物留于有机相中。于是分两步提取不仅能除去碱性干扰物也能够除去中性干扰物,而一步提取仅能除去这两种干扰物中的一种,不能把两种全除去。

如果 K_D 非常低或所需样品的体积很大,用多步提取定量回收被测物将不实用。萃取的次数太多,萃取液的总体积可能过大(见式4.3)。而且,萃取率低,达到平衡所需时间较长。此时可采用连续液 - 液萃取方法,新溶剂连续不断地循环通过样品水溶液。已有用比水重或比水轻的溶剂进行连续萃取的报道[11];其示例见图 4 - 2。储液器中的提取溶剂均被连续回流,溶剂蒸汽被冷凝后,以泡状通过不混溶的样品水溶液,与提取的被测物一起被收集,返回原溶剂储液器中。以该方式,被测物连续从样品液中提出,累积于储液器中,直至所有的被测物都从样品中提取干净。这些提取过程可长时间地运行(12 ~ 24小时);甚至 K_D 很小时,也能达到定量萃取要求(回收率>99%)。

对于效率更高的 LLE,如逆流分配装置能提供上千次的平衡分配(但需更多的时间和气力)。可对 K_D 值极小的被测物进行抽

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

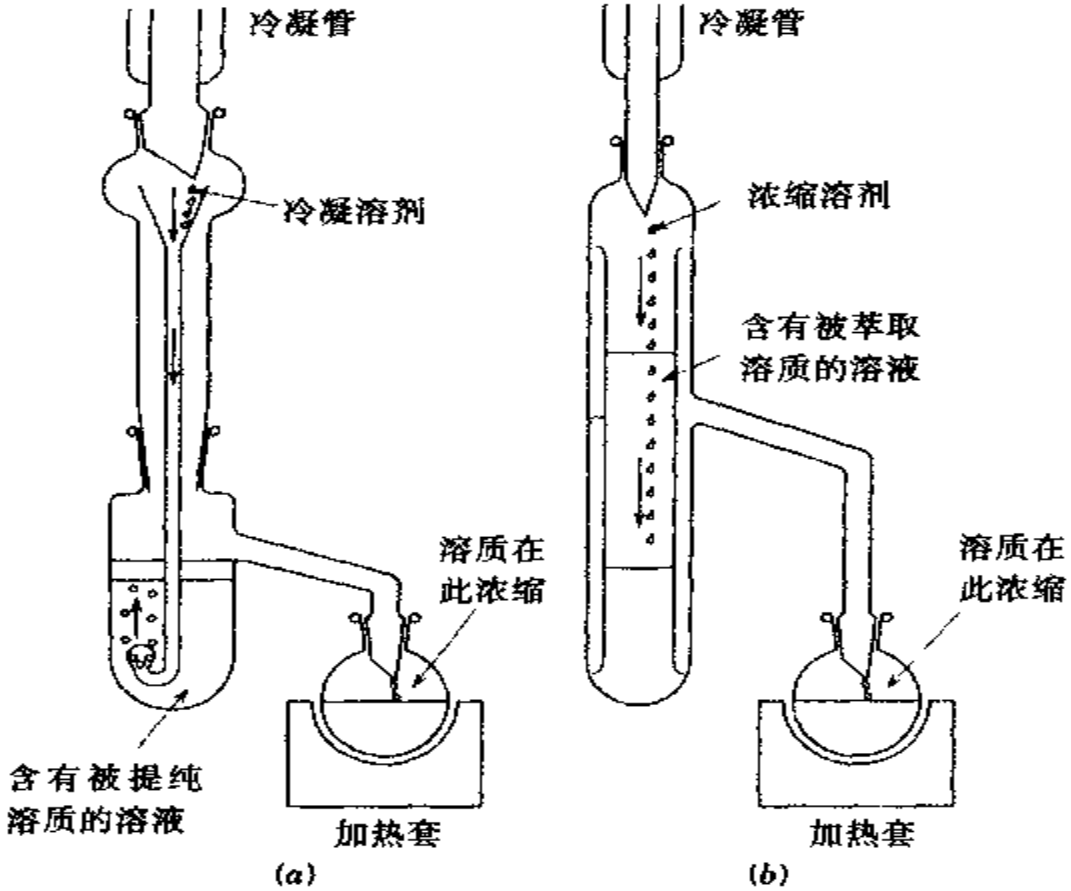


图 4－2 连续萃取装置

(a)萃取溶剂密度小于含有被萃取溶质的溶液；
(b)萃取溶剂密度大于含有被萃取溶质的溶液。

提；逆流分配也可使被测物与干扰物更好地分离。小规模的试验装置已经问世。逆流分配过程的详细讨论见文献 12。

在某些情况下，LLE 能使提取液中的被测物浓度大于原样品中的浓度。由式4.2，通过选择小体积的有机溶剂，即被测物浓度随有机与水相的体积比而增加（假设完全萃取进有机溶剂）。例如，水样100mL，有机溶剂10mL，高 K_D 值（如 K_D>1000）。有机相中的被测物浓度将增加10倍。对于水相比例大大高于有机溶剂的情况，可能部分有机溶剂会溶于水相中（见4.4.1.3节）。使回收有机

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

溶剂体积减少，计算被测物回收率失准。为避免这类问题，可预先用有机溶剂饱和水溶液。注意当有机溶剂比例很小时，两相分离会更加困难。微萃取为 LLE 的另一种模式，其提取在有机/水比例为 0.001～0.01范围内进行。与常规的 LLE 相比，回收被测物会受妨碍，但被测物浓度在有机相中有很大提高，所用溶剂也大大减少。这种萃取可以很方便地在容量瓶中进行。选择密度小于水的有机提取溶剂，以便使小体积的有机溶剂聚集在瓶颈处，方便倾出。对定量分析来说，应该使用内标，以对提取结果加以校正。现代自动进样器能够在2mL 的小瓶中对小体积的水样进行自动微萃取[13]。

4.4.1.3 **问题**。与 LLE 有关的实际问题包括：

1 发生乳化

2 被测物牢固地吸附于微粒上

3 被测物与大分子量的化合物结合（如：药物与蛋白质）

4 两相彼此互溶

如图 4－3 所示，乳化问题能在某些样品（如脂肪基质）和溶剂条件下发生。如果不破乳，以使水相与有机相之间出现清晰的界面，被测物回收率会受到很大影响。破乳可采取下列措施：

5 在水相中加盐

6 加热或冷却萃取容器

7 用玻璃棉塞过滤

8 用相分离滤纸过滤

9 加少量不同的有机溶剂

10 离心

如样品中有微粒存在，被测物吸附在微粒上可导致回收率降低。这种情况下，过滤之后用强溶剂洗涤微粒以回收被吸附的被测物，并将洗液合并入 LLE 的被测物相中。回收吸附被测物的强溶剂可能包括改变 pH，增加离子强度，或用极性更强的有机溶剂。

处理血浆样品时，在 LLE 中能正常定量回收的化合物可能会

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

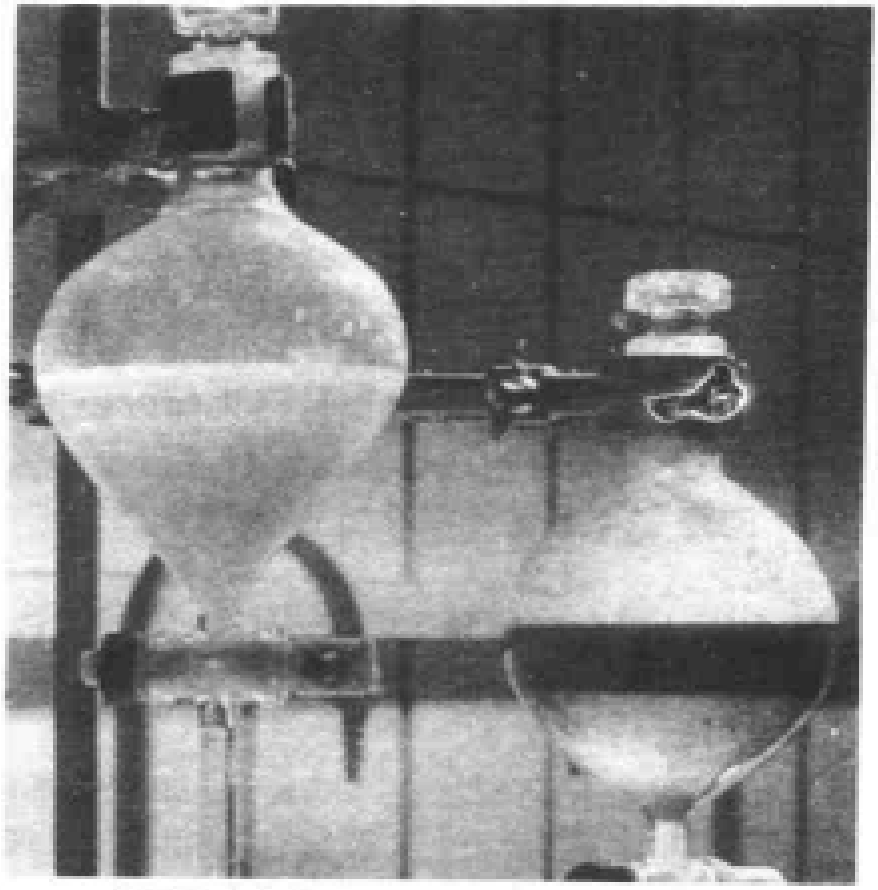


图 4－3　分液漏斗中的乳化与正常两相不混溶情况的比较。

与蛋白质结合，使回收率下降。蛋白结合在测定体液中的药物与药物代谢物时尤其棘手。破坏血浆样品中蛋白与被测物结合的手段包括：

1 加入表面活性剂

2 加入有机溶剂、离液序列高的试剂或强酸

3 加水稀释

4 以结合更强的竞争试剂替代

不互溶的溶剂之间溶解度很小，其中互溶的部分可改变两相的相对体积，因此应将各相用另一相预先饱和，以便了解含有被测物相的真实体积，准确、优化地测定被测物的回收率。最简单的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

饱和手段是在分液漏斗中先不加入样品，使两相达到平衡，此时两相相互饱和，均可用于 LLE。

4.4.2 固相萃取(Solid－Phase Extraction，SPE)

4.4.2.1 SPE 与 LLE。固相萃取为 HPLC 样品预处理中最重要的技术。SPE 的使用方式类似于 LLE。LLE 为一步分离过程，而 SPE 为一种类似于 HPLC 的色谱过程。与 LLE 相比较，SPE 有许多优点：

1 萃取被测物更彻底

2 分离被测物与干扰物的效率更高

3 降低有机溶剂消耗

4 易于收集全部被测物

5 手工操作更方便

6 能除去微粒

7 易于自动化

SPE 是一种比 LLE 效率更高的分离方法，更容易获得高回收率的被测物。需数次连续萃取才能回收 99% 以上被测物的 LLE 步骤，往往能被一步 SPE 方法取代之。SPE 也可以更彻底地除去被测物中的杂质干扰。反相 SPE 技术用得最多，洗脱仅需用少量有机溶剂，可保持被测物高浓度(见 4.4.2.6 节)。此外，SPE 中无须进行(如 LLE 中的)相分离，容易收集到全部被测物，从而消除了提取体积变化及提取体积测定不准造成的误差。最后，SPE 萃取管还能挡住大颗粒穿过，使其与被测物样品分离。

与 LLE 相比，SPE 也有一些缺点：

1 SPE 萃取管的易变性

2 有些被测物会不可逆地吸附于 SPE 萃取管上

用于 LLE 的溶剂通常是纯净而严格限定的，所以 LLE 分离的重现性很好。相反，用于 SPE 的固相萃取管各批次之间会有所不同，所以 SPE 方法的重现性有时很差。与 SPE 萃取管相比，LLE 装

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

置的表面积(如分液漏斗)相当小。鉴于此(也有其它原因),在被测物不可逆地吸附(降低回收率)方面,LLE 比 SPE 的可能性要小。

4.4.2.2 SPE 与 HPLC。 SPE 的最简单方法是用一次性小塑料色谱柱或称萃取管,这种萃取管一般是将 0.1 ~ 0.5g 的吸附剂装入医用注射器针筒中制成。吸附剂即常见的反相填料(例如 C_{18} - 硅胶),反相 SPE(RP - SPE)的分离特性很象 LLE 和反相 HPLC。在下述讨论中,除另有注明外,均假设为 RP - SPE。如 HPLC 色谱柱中的一样,填料被筛板固定于针管中。SPE 吸附剂的粒度(> 40μm)一般都比 HPLC(3 ~ 10μm)的大。因为柱床长度短,颗粒大,床填充不紧,SPE 萃取管比 HPLC 色谱柱的柱效低很多(N <100)。由于价格关系,SPE 一般使用无定形(非球形)填料。不过,有些 SPE 圆盘滤头却用价格较贵的 7μm 球形 SPE 填料。总的说来,SPE 的分离原理、固定相的选择和方法建立都与 HPLC 的相类似(见第 6 ~ 7 章)。SPE 与 HPLC 之间的主要差别是 SPE 萃取管一般只一次即废弃掉,因为可能有潜在干扰物留于萃取管上。

在 SPE 中,将液体样品加在萃取管上,选择适宜的洗脱液冲洗,使被测物或者牢固保留($k \gg 1$),或者不保留($k = 0$)。当被测物牢固保留时,干扰物则应流出或被从萃取管中"洗出",尽量减少最终被测物部分中的干扰物。被测物用小体积强溶剂洗脱出,经收集,(1)直接进样或(2)蒸干后,再溶解到 HPLC 流动相中备用。相反,如被测物保留很弱,而干扰物却很强地保留在萃取管上,可收集流出的被测物进一步再处理。用任一种方法,干扰物均可从被测物中除去。完整的 SPE 操作详见 4.4.2.6 节。

4.4.2.3 SPE 的应用。 在样品制备中,使用 SPE 的主要目的有六个:

1 除去干扰物和色谱柱"杀手"

2 浓缩或痕量富集被测物

3 除盐

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

4 更换溶剂

5 现场衍生化

6 样品储存与运输

在 HPLC 分离中，如被测物谱峰与干扰物重叠，可使方法建立复杂化，并对定量结果有不良影响。有些情况下，原样品中有众多的干扰物，仅用单一的 HPLC 分离不可能从一个或多个被测物谱峰中将它们分出。用 SPE 能减少甚至消除这些干扰。用 RP－SPE 往往能除去那些堵塞 HPLC 色谱柱或使其失活的色谱柱“杀手”，如疏水物质（如脂肪、油类、酯类）、聚合物或微粒，。

用 SPE 可以提高痕量组分的浓度。如果能选择一支 SPE 萃取管，使被测物的 $k \gg 1$，在被测物饱和萃取管并开始从柱中流出之前，可加载相当大体积的样品。再用强溶剂（$k<1$）洗脱，可以使被测物浓度提高很大，这意味着使检测灵敏度提高（亦称痕量富集）。痕量富集的一个示例是用反相 SPE 萃取管浓缩环保水样中的亚－ppb 级（十亿分之一）浓度的多环芳烃[14]或杀虫剂[15]。用小体积的强溶剂（例如 ACN 或 MeOH）从萃取管上洗脱下这些被测物，能节省挥干时间。随后，样品可重新溶解在一种与 HPLC 分离兼容的溶剂中。也可在 SPE 洗脱液中加入一种可互溶的弱溶剂，稀释原强溶剂，使所得样品液能直接进样。

RP－SPE 能用于样品除盐，尤其在离子交换 HPLC 之前。先选择适宜的 pH 和有机溶剂浓度，保留住被测物，并将有机盐洗脱出萃取管。然后，再用有机溶剂洗脱出（无盐的）被测物[16]。

SPE 的其它应用（溶剂交换、现场衍生化与样品储存/运输）不是用的极少就是与本书的预期读者相关不多。详情可参阅文献 16～18。

4.4.2.4 SPE 装置 用于 SPE 的装置有多种：（1）萃取管，（2）圆盘滤头，（3）涂布纤维。SPE 装置中最普遍采用的是萃取管。图 4－4*a* 所示为典型的一次性 SPE 萃取管（注射器针筒规格）。注

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

射器针筒材料通常为医用高纯度聚丙烯。如果用作萃取管的塑料中含有微量杂质，如增塑剂、稳定剂或脱模剂，SPE 期间可能会被提取出，对样品造成污染。注射器针筒的出口为 Luer 氏尖头接口，可接针头，将流出液直接引入小容器或小瓶中。萃取管中支撑微粒床的筛板材料为聚四氟乙烯（PTFE）、聚丙烯或不锈钢，孔径为 10～20μm，对液流的阻力不大。有不同的 SPE 萃取管与自动化仪器或机器人系统匹配。如标准塑料针筒产生的浸出干扰物浓度过大时，可用玻璃或新 PTFE 针筒进行超微量分析（亚 ppb 级）。SPE 萃取管价格比较便宜，一般用一次即弃掉，这样可排除可能的交叉污染。

为使 SPE 应用面加宽，可用大萃取管（见图 4－4*a*），储液体积 0.5～10mL，填料量 35mg～2g。对特大量样品，萃取管可装填多达 10g 的填料，储液 60mL。样品杂质较多可使容量低的萃取管超载，所以应采用装有较大量填料的萃取管，装有 100mg 或以下填料的萃取管较适合于相对干净的液体样品，因萃取管容量足够。大多数情况下，收集被测物的体积越小越好（如用于痕量分析），这意味着采用的 SPE 萃取管一般应尽量小些。

第二种最常用的类型为 SPE 圆片滤头（见图 4－4*b*），它综合了膜（见下述与表 4－8）和固相提取的优点。圆片滤头外形上很象膜滤器：平整，通常厚度 1mm 以下，直径范围 4 ～ 96mm。SPE 滤头中的填料占总膜重的 60 ～ 90%。滤膜有的可单卖，但必须装在可重复使用的滤膜夹中使用。有的已预装在一次性膜夹中或 Luer 式尖头萃取管内出售，Luer 式尖头易于与注射针头连接。SPE 滤头的外形与膜滤器有所不同。SPE 滤头可采用以下材料：

1 填有硅胶基质或树脂填料的韧性或膨胀 PTFE 筛网

2 包有填充材料的硬质玻璃纤维片

3 嵌有填料的聚氯乙烯

4 衍生化膜

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

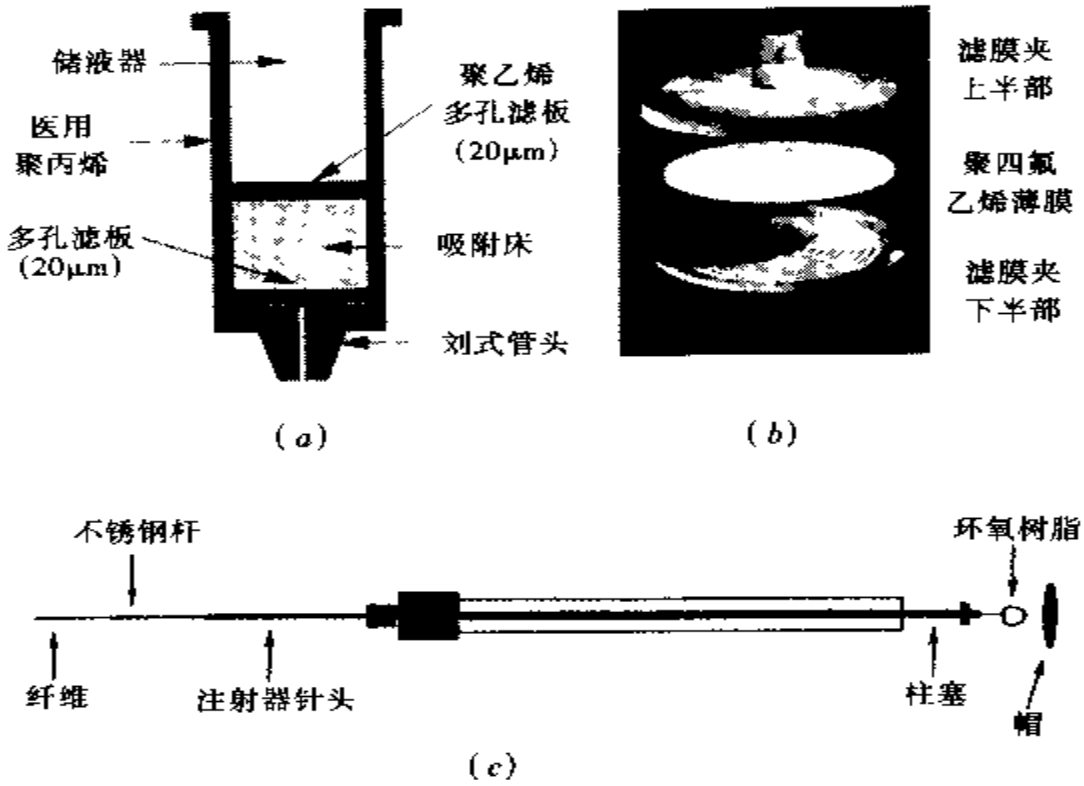


图 4－4　SPE 装置图示

(a)一次性萃取管(注射器针管规格);(b)滤片与滤膜夹;(c)置于注射器柱塞上的 SPME 熔融硅胶纤维

表 4－8　一般的 SPE 萃取管与圆片滤头的比较

参　　数	萃取管	滤　　片
尺寸	1.1×1.1cm	0.05×4.7cm
横截面积(顶部)	0.95cm^2	11.34cm^2
填料重量	500mg	500mg
在 85kPa 的流速[a]	30mL/min	100mL/min
线性粘度[b]	0.525cm/s	0.15cm/s

[a] 为典型流速
[b] 以规定流速

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

SPE 圆片滤头和萃取管的不同，主要表现在它们的高度/直径(L/d)比值不同:滤头的 $L/d<1$,而萃取管的 $L/d\geq1$。与 SPE 萃取管相比,滤头具有高流速和快速萃取的优点(见表 4－8)。例如，1 L 较干净的水通过一个直径 45mm 的滤头一般不超过 15 ～ 20min,而如用 15×8mm 的萃取管则需 2 小时。脏水或含微粒杂质的水,如废水,也能堵塞多孔滤头,与萃取管相同。如果样品含有微粒较多,无论哪种情况,都应先预滤后,再用 SPE 处理。某些萃取管会发生沟流，降低被测物的回收率。因为填充材料浸渍于基质中,滤头则不存在沟流问题。然而,低 k 值化合物穿透滤头(较薄,一般 0.5 ～ 2mm)的体积要低于 SPE 萃取管。

SPE 滤头适用于环保分析,如分析地表水中的痕量有机物,为提高其灵敏度经常需大体积的样品。美国环境保护局已经批准以 SPE 技术替代 LLE 制备水样,进行 HPLC 分析[19]。所批准方法的示例包括苯酚[20]、杀虫剂和多氯联苯(PCBs),饮用水中的卤代醋酸[21]和固体垃圾中的有机氯杀虫剂[22]的分析规程。与常规的 LLE 相比,SPE 的主要优点是降低了有机溶剂的消耗。SPE 滤头及萃取管每次分析仅需数毫升的溶剂，而效果差不多的多步 LLE 分离却要用数百毫升溶剂。

装有 1.5 ～ 30mg 填料的低柱床量、刚性玻璃纤维圆盘滤头可用于临床小样品的预处理(例如血浆或血清[23])。其较小的解吸质量和截面积使溶剂消耗降低。这种滤头的优点是提取液更加洁净，由于洗脱溶剂的体积小，弱保留化合物的干扰较少；无筛板，也就避免了可能由此而带来的污染。

装有填料的聚氯乙烯（PVC）滤片与滤板的容量与上述的 PTFE 滤片类似[24]。这些膜具有 1μm 的穿透孔,能进行快速分离。尽管设计为纯化蛋白之用，但只要所用溶剂与 PVC 相容，这些滤片也能作其他 SPE 应用。遗憾的是，PVC 中可用的固定相不如萃取管和 PTFE 滤片的种类多。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

衍生膜与浸入吸附滤片不同，这种膜通过化学反应而起作用。膜经某些基团衍生化的纤维素制成，比如二乙氨基乙基(DEAE)，季铵(QAE)和磺酰丙基(SP)，因此可用于离子交换方式。

涂层纤维可用于微量固相萃取(SPME)。其设计见图4－4*c*，在一细小的固体熔融硅胶纤维上涂布聚合物固定相，如聚二甲基硅氧烷或聚丙烯酸酯[25, 26]。将此纤维浸入被测液中，被测物按其分配系数的大小在涂层中扩散、分配。从溶液中取出纤维，置入HPLC进样阀的进样口中，再用强溶剂取代被测物，类似于萃取管与滤片SPE中的洗脱过程。

为叙述简洁，4.4节中其它部分讨论的SPE装置均认为是一般SPE萃取管。大多数情况SPE装置以类似的方式进行工作。

4.4.2.5 SPE仪器 进行SPE操作的仪器非常简单(见图4－5)。如以重力为驱动力，溶液通过萃取管的流速极慢，不适合于一般应用。最有用的基本系统(图4－5*a*)是用一注射器给溶剂或样品人工加压强制其通过萃取管。如果样品较粘稠或含有颗粒，该法可能也有困难。此时，可采用真空抽滤替代，每次处理一支萃取管(图4－5*b*)。当必须同时处理多个样品时，最好使用能一次处理多支萃取管的多管真空系统(见图4－5*c*)。在多管真空器内放一活动支架固定试管，收集流出液。有些装置上装有真空减压阀，流量控制阀和真空表，以更好地控制流速。更高档的装置，可对每一支萃取管实行专控，保证所有萃取管分布的流速均匀一致。最后，在真空支管和真空泵源之间装有一收集瓶，用以收集冲洗溶剂。

无论用加压法使样品溶液通过SPE萃取管还是其它SPE装置，流速都不可太快，否则，样品与固定相接触的时间不足，难以萃取完全。对一般SPE应用，建议流速控制在10mL/min以下[27]，90mm的滤片可为50mL/min[28]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

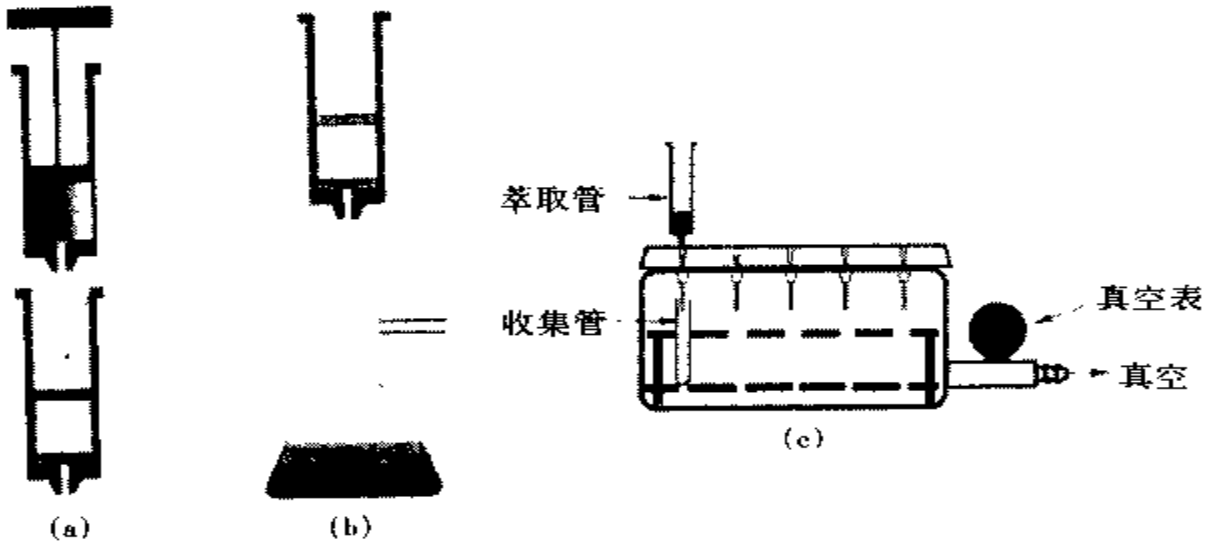


图4－5 SPE 装置示意图

(*a*)用注射针管加压(单萃取管);(*b*)抽滤(单萃取管);(*c*)多管真空复式系统。

当样品数量较多，用这种 SPE 方式制备样品将难以承受，整个过程则可用自动装置完成。SPE 自动化有三个基本方法:(1)专用 SPE 设备;(2)改良的液体处理系统;(3)自动控制工作站。最简单、价格最低廉的设备为专用 SPE 装置，它可进行润湿活化、冲洗和洗脱操作。这种装置系统可用标准注射器针管作萃取管，也可用为仪器专门配置的特殊萃取管或 SPE 滤片。改良的液体处理系统的主要功能是进行液体处理，如稀释、混合以及加内标。现有已数种商用装置可自动进行 SPE 操作。

自动控制工作站系统在执行和协助样品制备功能方面最为全面。尽管机器人能与所有执行 SPE 实验步骤的装置连用，但与专用 SPE 工作站连用时耗时多且费用高。机器人可将样品容器送 SPE 工作站以及实验室中工作台上的其它样品制备装置上（如天平、混合器、稀释器、自动取样装置等）或从其上移走。

4.4.2.6 SPE 方法建立 SPE 分离的总体设计。SPE 的应用一般包括四个步骤(图 4－6a～d):

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

1. 润湿活化填料
2. 加样
3. 冲洗填料(除去干扰物质)
4. 回收被测物

本讨论中，假设操作者使用 RP－SPE，开始保留的是被测物。第 1 步(图 4－6*a*)，在加入样品之前，先使几倍柱床体积的 C 溶剂通过填料，进行润湿活化。活化步骤有双重作用：(1)除去因萃取管暴露于实验室环境时可能聚集的杂质，净化固定相，(2)用溶剂润湿吸附剂，建立一个合适的固定相环境。溶剂润湿很重要，因为放置干燥了的反相填料（尤其是 C_{18}、C_8 或苯基）常会降低样品的保留值。另外，如 SPE 固定相的干燥程度不一致，也会使被测物的回收率重现性不好。甲醇为常用的活化溶剂，可用于 RP－SPE 填料或极性键合相填料如氰基、氨基和二醇基的润湿活化。然而，甲醇会使硅胶失活，不可用于硅胶填料；建议未改性硅胶使用中等极性溶剂，如二氯甲烷。

SPE 填料活化好以后，应除去多余的甲醇（或其它强溶剂），可向萃取管中加压通空气，直至萃取管出口不再下滴溶剂为止(步骤 1*a*；图 4－6 中未描述)。迅速停止通气，否则气流会影响分析的重现性(尤其用 SPE 滤片时)。如果 SPE 填料在加载样品之前已干涸，重新进行润湿活化步骤后，再往下进行。RP－SPE 分离时，也可用与润湿活化溶剂和样品可互溶的其它溶剂（如水或缓冲液）冲洗萃取管而除去多余的甲醇。装入水溶液样品时，也可用水预先润湿活化 SPE 萃取管(见图 4－6*b*，步骤 2)。

SPE 实验中的步骤 2(图 4－6*b*)为加载样品，即将溶于弱溶剂中的样品加到萃取管中。弱溶剂使被测物保留值增强。RP－SPE 操作的弱溶剂为水或缓冲液，有机相最多占 10%。离子交换可用类似溶剂，但样品溶液的离子强度应尽量小。装载溶剂的详细情况见表 4－9。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

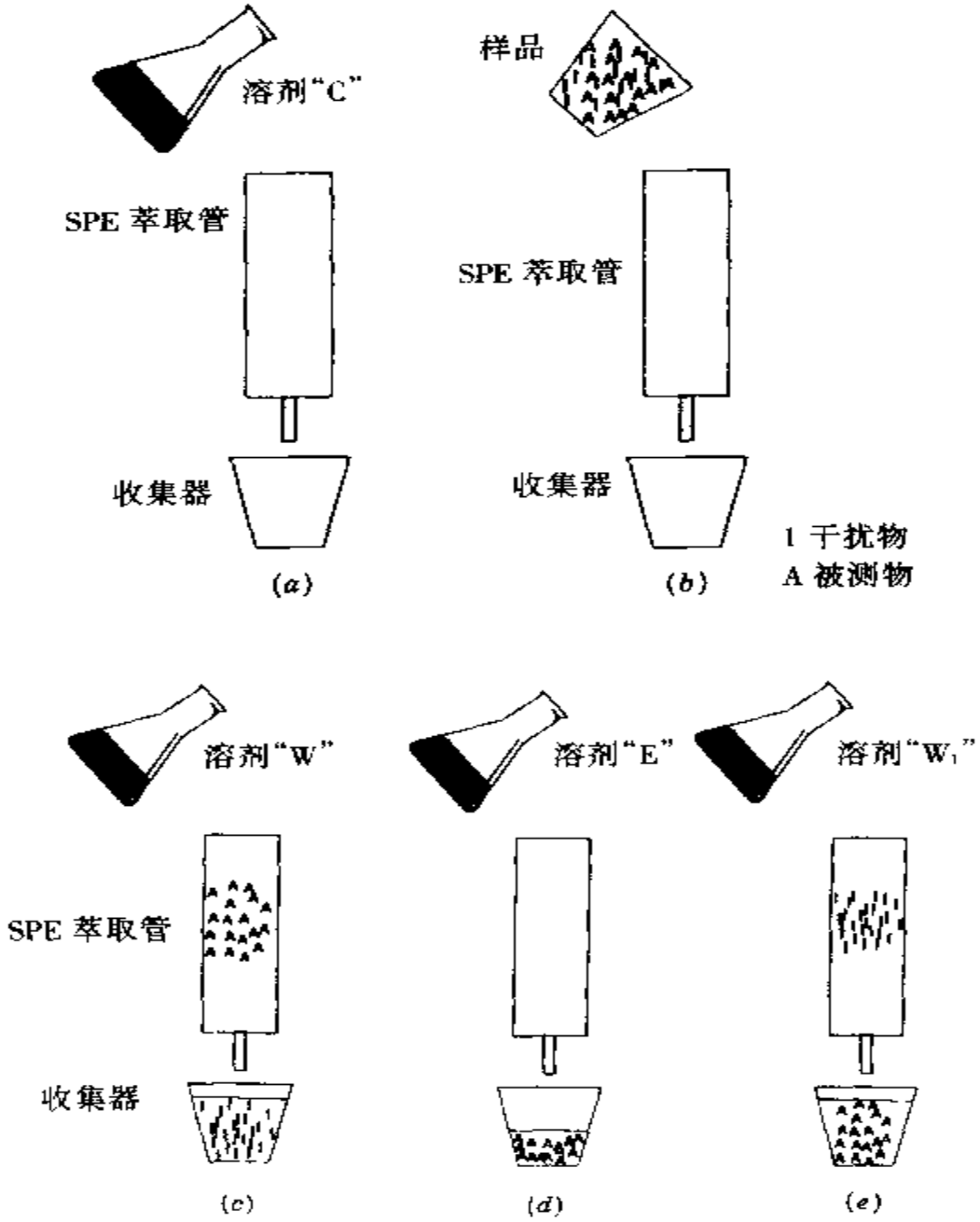


图 4－6 SPE 的实验方案

(a)第一步：活化吸附剂；(b)第二步：装载样品；(c)第三步：被测物保留，干扰物不保留；用溶剂 W 冲洗萃取管；(d)第四步：用强溶剂 E 洗脱被测物；(e)干扰物保留，被测物不保留；用溶剂 W_1 冲洗萃取管

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表4-9 各种SPE固定相与条件

分离机制	典型固定相	结构	被测物类型	装载溶剂	洗脱溶剂
手相吸附	硅胶，氧化铝，硅酸镁	$-SiOH$，$AlOH$，Mg_2SiO_3	弱至中等极性	低 P'(己烷、$CHCl_3$)	高 P'(如甲醇，乙醇)
极性键合相	氰机、氨基、二醇基	$-CN$，$-NH_2$，$-CH(OH)-CH(OH)-$	中等至强极性	低 P'(己烷、$CHCl_3$)	高 P'(如甲醇，乙醇)
反相 非极性键合相，疏水强	十八烷基硅氧烷，八烷基硅氧烷	$(-CH_2-)_{17}CH_3$ $(-CH_2-)_7CH_3$	疏水性强(强非极性)	高 P'(如 H_2O CH_3OH/H_2O CH_3CN/H_2O	低 P'(己烷、$CHCl_3$)
非极性键合相	环己基，苯基，联苯基		中等非极性	高 P'(如 H_2O CH_3OH/H_2O CH_3CN/H_2O	中等(如二氯甲烷，醋酸乙酯)
疏水中等					高 P'(如乙腈，甲醇)
非极性键合相 疏水弱	丁基、乙基，甲基	$(-CH_2-)_3CH_3$，$-C_2H_5$，CH_3	弱基性至中等非极性	高 P'(如 H_2O)至中等 P'(如酯酸乙酯)	

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

（续）

表 4-9 各种 SPE 固定相与条件

分离机制	典型固定相	结构	被测物类型	载液溶剂	洗脱溶剂
阴离子交换剂	氨基，1°，2°-氨基	$(-CH_2-)_nNH_2$ $(CH_2-)_nNHCH_2CH_2NH_2$	离子（可电离），酸性	水或缓冲液（pH = pK$_a$ + 2）	A.缓冲液（pH = pK$_a$ - 2） B.使吸附剂与被测物 C.高离子强度的缓冲液
强	季胺	$(-CH_2-)_3N^+(CH_3)_3$	离子（可电离），酸性	水或缓冲液（pH = pK$_a$ + 2）	A.缓冲液（pH = pK$_a$ - 2） B.使被测物为中性 pH 值 C.高离子强度的缓冲液
阳离子交换剂	羧酸	$(-CH_2-)_2COOH$	离子（可电离），碱性	水或缓冲液（pH = pK$_a$ - 2）	A.缓冲液（pH = pK$_a$ - 2） B.吸附剂与被测物为中性的 pH 值 C.高离子强度的缓冲液
强	烷基磺酸，苯磺酸	$(-CH_2-)_3SO_3H$ SO_3H	离子（可电离），碱性	水或缓冲液（pH = pK$_a$ - 2）	A.缓冲液（pH = pK$_a$ + 2） B.使被测物为中性 pH 值 C.高离子强度的缓冲液

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

SPE 样品可用加液器、注射针管或者泵装入萃取管中。采用泵装样对大体积样品(> 50mL)较方便,如环保水溶液样品。样品量与萃取管的尺寸必须匹配,勿超过萃取管的容量。样品溶液流过萃取管后,在进行下一次实验前,不能使柱床干涸。SPE 的流速不必太精确,不过流速可经改变真空度或针管加样的速度加以调节。2 ~ 4mL/min 的流速通常是可行的。

步骤 3(图 4 – 6*c*)用中等强度的溶剂 W 冲洗萃取管,除去杂质干扰物。最好在被测物刚开始流出萃取管时,即刻停止冲洗步骤(步骤 3)。以此方式,将保留值比被测物弱的干扰物质冲出萃取管,而不流失被测物。水或缓冲液常用作 RP – SPE 的冲洗溶剂,但这不能最大限度地从步骤 4(图 4 – 6*d*)收集的被测物试样中除去干扰物质。还可在冲洗液中加入少许有机溶剂以除去疏水性强的物质;但必须小心勿同时连同有关的被测物一同洗出。因为不同 SPE 萃取管之间的差异,从萃取管中除去干扰物质所用的溶剂体积有一定的安全界限,极限目标是步骤 4(图 4 – 6*d*)中使被测物 100% 回收;否则,回收率较低且不稳定。

步骤 4(图 4 – 6*d*)为被测物试样的洗脱与收集。如检测灵敏度是主要问题,被测物的收集体积应尽量小。可用强洗脱溶剂 E,使洗脱期间被测物谱峰的 $k = 0$。也可以使用较弱但仍可洗脱下被测物的溶剂 E(例如 $k \approx 1$),以减少强保留干扰的流出。当有大量的强保留干扰物存在时,由于这些化合物将增加所需 HPLC 分离的运行时间(见图 8 – 4 示例),选用 E 洗脱较好。使用中等强度的洗脱溶剂 E,得到的被测物试样体积会很大,将其蒸干,再以 HPLC 流动相重新溶解被测物,可减小被测物试样的体积。由于 SPE 的洗脱溶剂 E 作为后续 HPLC 分离的样品溶剂可能太强,蒸干是常用的手段。

被测物试样的洗脱溶剂最好为以后的 HPLC 分离中属于较弱的流动相。这样,大体积的被测物试样也能方便地进样分析,其检

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

测灵敏度会较高。实现这一目的有两种方式。首先，如果被测物为酸或碱时，可调节样品液的 pH，抑制样品的离子化，以增强步骤2和3(图 4－6 *b*～*c*)中的 RP－SPE 保留。然后再改变 pH，使样品离子化，降低其保留，在步骤 4(图 4－6 *d*)中洗脱出被测物。收集到被测物试样后，可再调节其 pH，使其在 HPLC 分离中的保留达到最佳。第二种方法是用"较弱的"SPE 柱填料(氰基或短链烷基)，即可不用很强的洗脱溶剂，并采用"强"HPLC 色谱柱(如 C_{18})分析 SPE 馏分。

也能用 SPE 来保留杂质，使被测物通过萃取管而不被保留(图 4－6 *a*、*b* 和 *c*)。这种方法的 SPE 馏分中被测物浓度为零。由于不可能从弱保留的干扰物中分离出被测物。所以用该 SPE 方式得到的被测物部分纯度不够，采用图 4－6 *c* 和 *d* 步骤可使被测物与弱与强保留的样品组分分离。图 4－6 *e* 的步骤用于样品预处理，极少，不再作深入讨论。

SPE 相。 因为 SPE 实际上为一种低效率 HPLC 方法，许多用于 HPLC 的固定相在 SPE 中可以应用。表 4－9 列出了一些较为常用的 SPE 相以及能保留的分析物类型。键合硅胶用得较多，但其它无机和聚合填料也已面市。除表 4－9 中所列出的之外，还有用于提取空气中的醛和酮[7]、分离尿中的滥用药品[29]和血浆中的儿茶酚胺[30]的专用固定相。硅酸镁(活性硅酸镁)和氧化铝在 SPE 中使用多于 HPLC；用硅酸镁填料分离农药的方法有许多报道[31]。

SPE 萃取管填料的质量与价格均低于相应的 HPLC 填料，其原因可能归咎于不同批次的保留值重现性较差。较好的反相 HPLC 碱性柱填料硅羟基作用极小(见 5.2.1 节)，而 RP－SPE 的填料则一般酸性较大，硅羟基作用明显，批次之间的差异也较大。然而，因为 SPE 通常用开－关技术进行操作，较小的保留值差异就不象 HPLC 的那么重要了。

应选用在加样期间(图 4－6 *c*)能强保留被测物的 SPE 填料

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

（表 4－9）。离子的或可电离的样品最好用离子交换填料，尤其是那些当改变 pH 或增加离子强度后能用水溶液洗脱的样品。调节 pH，使被测物离子化程度降至最低，并优化其反相保留后，被测物试样则可直接注入反相 HPLC 色谱柱中进行分析。中性被测物在反相或正相 SPE 填料上均能被分离。正相填料最好用于极性强的被测物，RP－SPE 填料最好用于极性较弱、疏水性较强的被测物。

导则 开始建立 SPE 方法之前，应先了解下述问题：

1 关于样品已知道些什么？样品的基质和被测物的性质如何（极性还是非极性、溶解度、酸还是碱）？被测物是否含有影响样品清洗步骤的官能团？被测物与基质有差异否？

2 样品中所期望的被测物浓度或浓度范围是多少？

3 基质由什么组成？是否含有影响分离的官能团？基质的性质是否与某些 SPE 填料不相容？基质的一般 pH 和离子强度是多少？不同样品间的基质是否有差异？

4 预处理样品的目的是什么？是除去干扰物质？还是提高检测灵敏度？或是除去色谱柱“杀手”？

5 SPE 能实现主要目的吗？这是最好的选择吗？

回答上述问题能有助于 SPE 的方法建立。

图 4－7 概括了 SPE 的方法建立程式。给出了基于已知的被测物特性（水溶性或有机溶性，离子还是非离子）优先方法选择的粗略方案。图 4－7 中将所有被测物分为八个不同的种类（见图 4－7 下部的方框），并为每种推荐了数种不同的 SPE 填料和洗脱溶剂。然而，图 4－7 充其量只能作为选择最终 SPE 条件的粗略参考。除了被测物的性质以外，其它因素也是重要的：

1 有何种干扰物存在？

2 样品溶剂的性质？

3 是否可选择样品的溶剂？

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

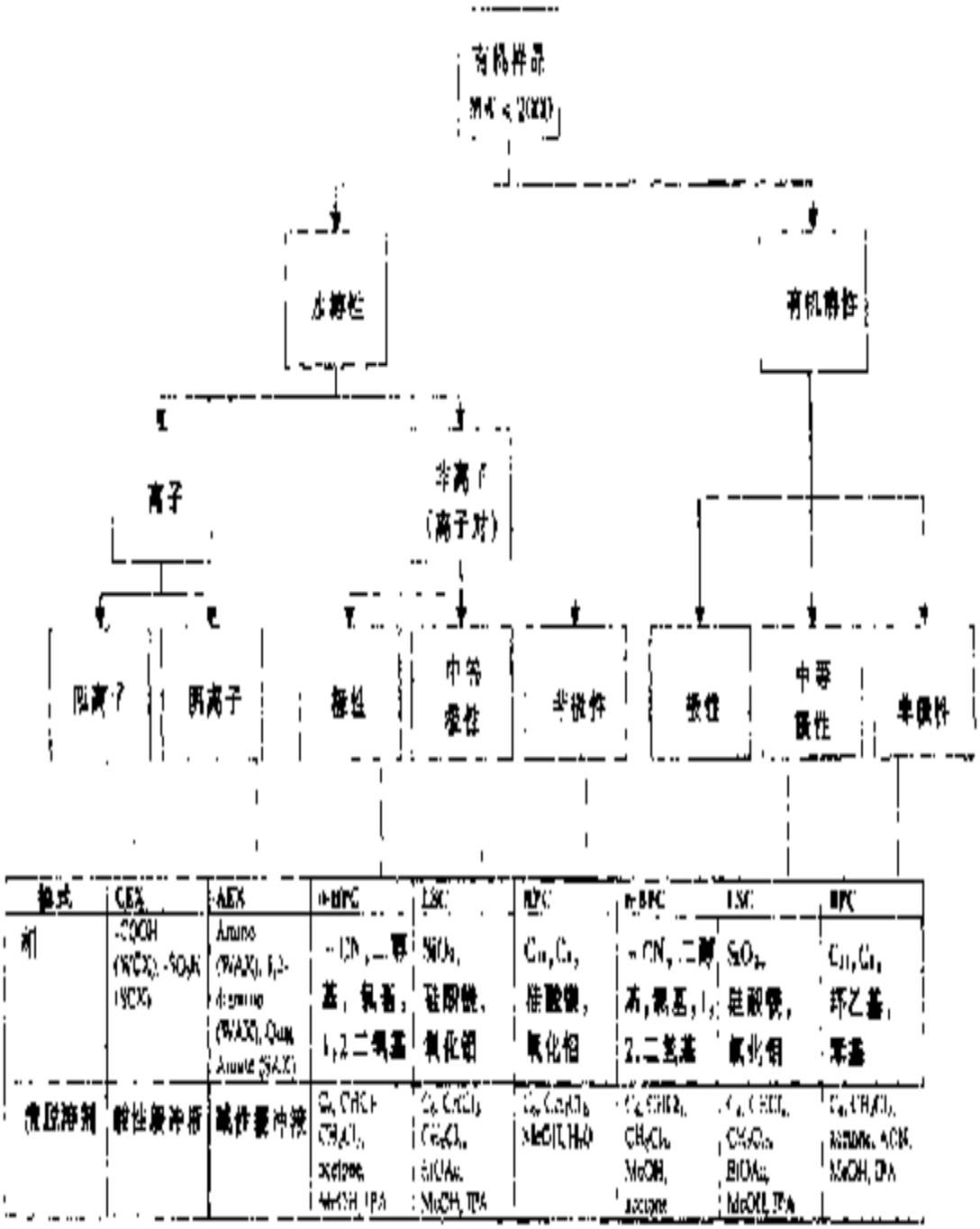


图 4-7　SPE 固定相和溶剂的选择

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4 SPE 分离该样品的主要目的是什么？

因此，经常需凭经验进行探索。例如，基于已知的被测物特性，可以选择多种 SPE 填料时，试验每一种对被测物和干扰物的保留值，最后筛选出最佳条件。在本节后面，我们将列举这种方法的示例。有些生产厂家将 SPE 方法建立组合成套，以便于用该方式进行试验，选择固定相。为便于固定相和溶剂的选择，已出现了自动系统[13,32~35]，这些系统能编程、对多种 SPE 相和洗脱溶剂进行评价。

固相萃取和 HPLC 分离较相似，同一种考虑在两种方法中都对流动相与固定相的最佳选择有影响。因此，第2、6与7章中的内容均能提供直接用于 SPE 方法建立的信息。关于对类似被测物－基质对的 SPE 方法的文献检索很有帮助。SPE 萃取管生产商印有广泛的文献目录（有些为可检索的电子数据库），能帮助查到有关的出版物[16,36,37]或提供初始条件。而且，有些生产商能提供一些相同或相似化合物的应用报告，也可对 SPE 方法建立提供咨询参考。表4－10列出部分能提供 SPE 填料与用品的厂商。

在为步骤 1～4（图 4－6 *a*～*d*）选择条件之前，必须选择 SPE 填料和样品溶剂。填料的选择在本节后面举例讨论，图 4－7 和表 4－9 中提供了更多的可能信息。填料的主要要求为采用溶解样品的溶剂时，被测物应强保留。样品中含有可电离的被测物，如有机酸或胺，通过改变 pH（而不是更换溶剂）可将被测物保留或从 RP－SPE 萃取管中除去。

离子交换填料有强和弱两种类型（见 7.5.1.4 节）。如果主要目的为强保留被测物，用强离子交换剂一般较好。用弱离子交换剂保留则更多地依赖于 pH；当保证离子被测物仍为离子状态，又要保持固定相的离子特性时，则要靠调节 pH 来达到。譬如，用羧酸弱阳离子交换剂分离质子化胺，必须选择 pH 以确保当羧基带负电荷时，胺仍是质子状态。这样，在优化保留值或从弱阳离子交换剂上洗脱被保留的被测物时，pH 将起到重要

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 4－10　SPE 萃取管与滤片的供应商

产　品	供应商	产品类型	专业产品
Backerbond	J. T. Baker	宽范围的硅胶基质萃取管；3M SPE 滤片	药物滥用；用于痕量分析的玻璃萃取管
Bond Elut	Varian 样品制备产品	产品基质为硅胶和聚合物；3MSPE 滤片	药物滥用；SPE 匹配 HPLC 色谱柱，环保专用固定相
Maxi－Clean	Alltech 联合公司	OEM 或普通产品；SPE 滤片，聚合物萃取管	用于处理离子色谱样品的萃取管；配自动装置的萃取管
Sep Pak	Waters 色谱	萃取管范围广，聚合物萃取管	用于环保和气体取样的大体积萃取管；EPA 方法专用萃取管
SupelcoClean	Supelco	通用萃取管	药物滥用；微型固相萃取
HEMA	Lida	聚合物基质 SPE 萃取管	用于痕量分析的 PTFE 萃取管；离子色谱处理萃取管
SPEC	Ansys	玻璃棉滤片及萃取管	药物滥用；
Isolute	国际吸附剂技术	通用萃取管	用于痕量分析的萃取管
Clean Screen	联合化学技术	滥用药物	薄膜吸附萃取管
Empore	3M 公司	内装吸附剂的 PTFE 滤片	环保滤片用于特殊 EPA 方法

的作用。

为尽量增大步骤 2 中被测物的保留，样品溶剂强度应较弱，以使被测物－填料的结合力增大。对于反相填料，用水或含有机溶剂尽可能少的水溶液作样品溶剂较好。如果被测物为酸或碱，应调节 pH 以减小被测物的离子化。如用正相填料，用己烷或其它饱和烃作溶剂较好；总之，样品溶剂的极性越小越好。对离子交换填料，水为较好的样品溶剂（少量的有机溶剂不算问题），离子强度应尽可能低。

进行空白 SPE 试验很重要，可除去由萃取管本身、筛板与填料材料中那些可浸出物的潜在污染。如认为有污染，应用有机溶剂（如甲醇、乙腈）或稀酸（如 0.01M 的硝酸）冲洗萃取管后再用。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

步骤 1(润湿活化填料)。该步骤前面已讨论过。

步骤 2(加载样品)。在有些情况下,样品本身为溶液,问题是保持原状还是用新溶剂更换掉原溶剂。使用方便通常是重要的,如可能,最好用原样品溶剂。对于水溶液样品,RP－SPE 是较好的选择。如样品溶解在烃溶剂或非极性有机溶剂中,可用正相 SPE。离子的或可电离的被测物通常溶于水或缓冲液中,RP－SPE 或离子交换均可以使用。

能用于 SPE 萃取管的样品体积取决于(1)萃取管的大小和类型(填料量),(2)样品溶剂中被测物的保留值,(3)样品中被测物与干扰物的浓度。通常,样品体积越大越好,尽量增大分离后 SPE 馏分中被测物的浓度,以使后面 HPLC 分离时,检测灵敏度较高。尽管大萃取管采用大体积样品,由于 SPE 馏分中被测物的最大浓度决定于样品体积/填料重量的比值,因此并不影响检测灵敏度。当可用样品量很小,应用尽可能小而又不使样品超载的 SPE 萃取管。萃取管对被测物与干扰物容量的总和大约为每克填料可容 10～20mg。

一旦选定了萃取管尺寸,最大样品体积则决定于加载大体积样品并收集小试样馏分。可用 HPLC 测定馏分中的被测物,以决定在被测物漏出之前的最大样品体积。进行该实验时,选择的被测物浓度应为样品中期望的最大值,(如果样品基质的组成有差异,允许的样品体积也应变化)。选择的最后样品体积应略小于本方法的测得值,以便除去步骤 3 中的杂质,而不流失被测物。

步骤 3(冲洗萃取管)。该步骤为尽可能多地除去早期流出的干扰物。达到这一点应选择一种可使被测物有中等强度保留的冲洗溶剂 W,[例如:在分离条件下(有样品基质存在),$3 < k < 10$]。应用尽可能大体积的冲洗液,除去早期流出杂质,而让萃取管保留住被测物。该优选的样品体积决定于收集的馏分和对被测物的分析。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

有两种方法能决定冲洗溶剂的最佳组成。第一，SPE 方法建立一般在 HPLC 测定被测物标准品之后，因而可参照之。如果 SPE 和 HPLC 用同一种填料（如反相），HPLC 的保留值数据能为冲洗溶剂的组成提供初步估计。如果 HPLC 的流动相为30% ACN－缓冲液，被测物的冲洗液也应以30% ACN 开始。如果被测物在收集和分析了5 ～ 10倍萃取管体积[1萃取管体积（μL）= 1mg 填料]的冲洗液之前开始流出柱子，说明冲洗液太强，应降低%B，再重复实验。

第二种方法是加载样品，然后用 5～10 倍柱床体积的序列强溶剂（例如 25、50、75、100%B）冲洗萃取管。监测各浓度的萃取流出液，能决定样品的洗脱轮廓。

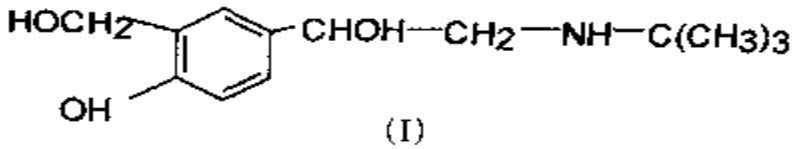
步骤 4（洗脱被测物）。该步骤的目的是以尽可能小的体积收集到所有的被测物，并排除强保留干扰物与可能的损柱杂质。深一层的目的是收集到的被测物试样能够直接注入 HPLC 色谱柱分析。如前所述，这些目的之间可能相互矛盾。用非常强的洗脱溶剂（使被测物的 $k=0$），样品体积小，但将大体积的被测物馏分注入 HPLC 色谱柱分析的可能性也小。洗脱溶剂强度恰能以某保留值洗脱下被测物（如 $k\approx2$），可减少强保留污染物对被测物馏分的污染，但却增加了试样体积，不可能直接注入全部的被测物馏分。用极性小的 RP－SPE 填料（如氰基）能减小这类问题。有强保留污染物存在时，最好的办法是使被测物以 $1<k<5$ 流出。如果检测灵敏度苛刻，以至必须将所有被测物注入 HPLC，可能需要蒸干后，再重新溶解被测物馏分。蒸发水溶液样品不甚方便，冷冻干燥是一种选择。如用正相 SPE，被测物馏分溶解在有机溶剂中，很容易被蒸发除去，但正相 SPE 分离保留那些在反相 HPLC 中强保留的弱极性组分的可能性较小。

如果被测物为酸或碱，在 RP－SPE 冲洗或洗脱步骤中的溶剂强度可通过改变 pH 进行调节。该方法使直接注入不含强保留污染的全部被测物馏分的条件选择较容易，污染物会增加 HPLC

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的分离时间。用离子交换填料的 SPE 更有可能得到理想的方便后续 HPLC 分析的被测物馏分。尽管使用硅胶基质的 HPLC 色谱柱因为填料的溶解和降解，一般不能超出 2<pH<8 的大致范围（见 5.2.3.4 节），但一次性 SPE 萃取管可用较宽的 pH。少量的溶解硅胶或水解键合相的存在不会干扰后续的 HPLC 分析。如果被测物馏分中的溶解硅胶对 HPLC 分析产生影响，由于聚合物 SPE 萃取管在 1<pH<14 稳定，它可能是较好的选择。

SPE 方法建立的示例：从人血浆中分离沙丁胺醇。这里用沙丁胺醇(I)的分离说明典型的 SPE 方法建立过程[38]。该药品作为一种支气管扩张药广泛地用于哮喘的治疗。(I)在人血浆中的期望治疗浓度相当低(服用一片 8mg 的样品后，最高< 20ng/mL)。沙丁胺醇(MW 239)为极性、亲水化合物，有两个基团可电离：酚羟基(pK_a = 9.4)和仲胺基(pK_a = 10.0)。在水溶液中任意 pH 下，主要以离子形态存在，所以，沙丁胺醇由水溶液分配进有机溶剂中很少，开始试用基于 LLE 的离子对分离。在 pH≪10 的 LLE 系统中加入阴离子对试剂，使其与(I)形成离子对，有助于将其萃取进有机相。用二乙基己基磷酸进行离子对萃取，被测物在有机相中的回收率提高。然而，萃取液被血浆内物质严重污染，使得后续 HPLC 色谱图中的背景干扰不可接受。



(I)

下一步试验 SPE。(I)中有数个极性和非极性的官能团，可用于 SPE 的保留。保留该药物的方式可能有五种：非极性、阳离子交换、阴离子交换、极性、亲和。以该五种方式进行试－凑法试验，试图找出一种能从萃取管中除去干扰物最彻底又不影响被测物的 SPE 冲洗溶剂。从这 5 种方式中，共用 23 种溶剂系统，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

找出能回收最好的 17 种不同的 SPE 固定相系列。在正常人血浆中加入氯化沙丁胺醇，以试验其保留和洗脱特性。通过收集馏分和放射性检测，用放射化学方法分析测定柱流出物和冲洗液中（I）的含量。发现（I）由不同 SPE 固定相流出的难易程度相差很大，与所用固定相与洗脱液均有很大关系。找出不能从某种 SPE 萃取管中洗脱出沙丁胺醇的洗脱液，作为步骤 2 的冲洗溶剂。

筛选试验以后，为进一步试验经选择得出的 4 种 SPE 萃取管（表 4－11）。这些固定相的提取液中含血浆内干扰物不多，且与 HPLC 系统兼容性较好，(I)从血浆中的回收率也比较合理。有两种 SPE 固定相(氰基、硅胶)证明可以使用，最终方法见图 4－8。许多其它 SPE 方法建立的示例可参阅文献 39 ～ 42，以及可提供实用样品制备技术的商用文献指南[16,36,37]。

表 4－11　SPE 血浆中沙丁胺醇的回收结果

SPE 萃取管类型	洗脱溶剂	回收率%	方法的评述
氰基	10% 1M NH_4Ac + 90% MeOH	89	提取液干净，可得到小体积试样
硅胶	同　上	94	同　上
苯基硼酸酯相	0.1M H_2SO_4	90	提取液干净，可得到小体积试样，但洗脱溶剂不能用于 HPLC 系统
C_{18}	异丙醇	92	提取液不够干净，痕量富集不可靠，不可接受

4.4.2.7 用柱色谱预处理样品 在 SPE 广泛用于样品预处理之前，使用的是与其分离类似的低压或开管液相柱色谱(LC)。LC 现今仍用作一种样品预处理技术，尤其常用于农药残留、生物体液中的药物或内源化合物的样品预处理，以及在多聚葡聚糖凝胶如交联葡聚糖（瑞典 Uppsala 制药公司）上分级生物分子。LC 与 SPE 极为相似，都用一次性萃取管，其主要不同在于(1)LC 色谱柱通常明显比 SPE 萃取管大，(2) LC 色谱柱通常由使用者自己装

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

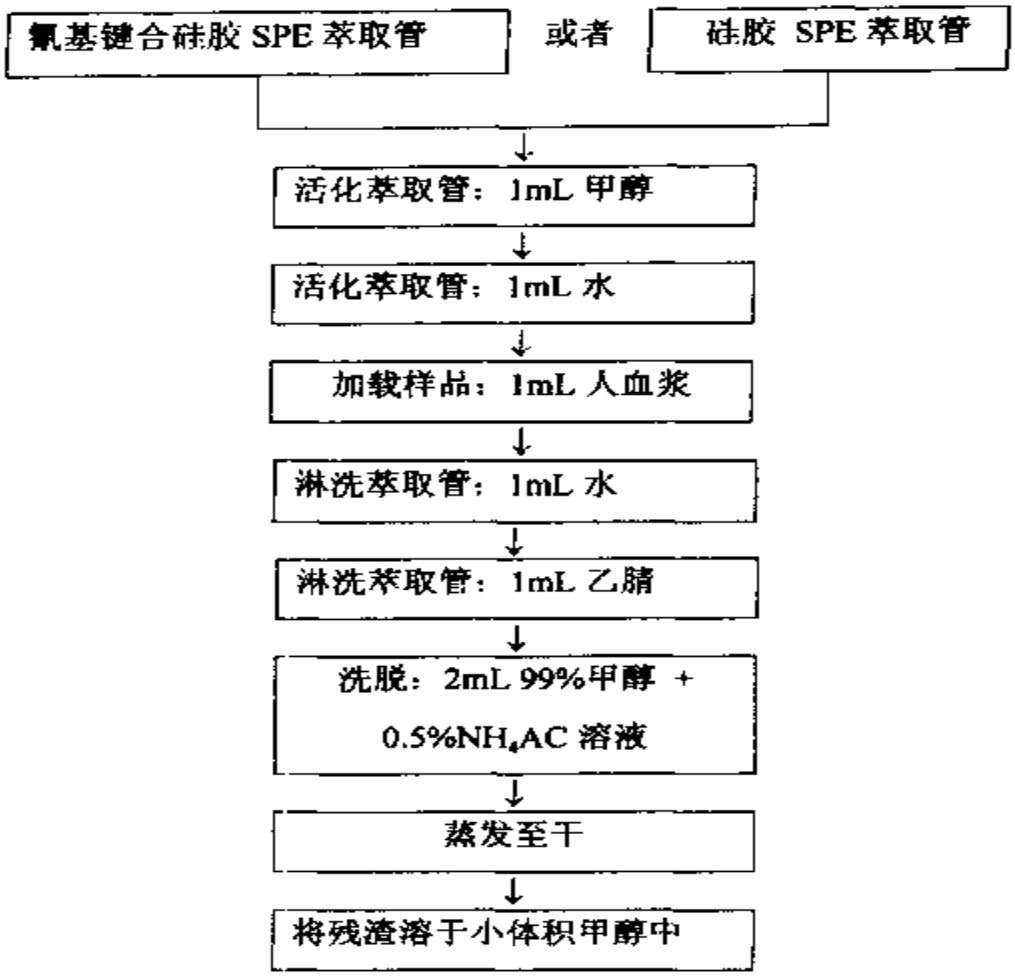


图 4－8 从人血浆中分离沙丁胺醇的方法[97]

填，(3) LC 主要使用的是如硅胶、氧化铝和硅酸镁载体等无机填料，表 4－12 概括了 LC 方法的一些特性。

表 4－12 与 SPE 比较，柱液相色谱在样品预处理方面的特点

优　点	缺　点
易于收集柱的流出物，	难于自动化；麻烦、不方便
能从大体积样品中浓缩痕量溶质	较易丢失样品（如吸附、降解、氧化、蒸发）
能在两种用不相容溶剂的 LC 模式下工作（如 LSC 用己烷→RPC 用水）	费时较多
	难于定量，重现性不好

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4.4.3 膜分离(Membrane Separations)

膜通常由合成的有机聚合物(如 PTFE,尼龙或聚氯乙烯)、纤维素或玻璃纤维制作而成。滤膜在样品制备方面的主要应用为滤过(见 4.3.3. 节)和固相萃取。被测物也可在化学或电化学梯度作用下,借助扩散作用通过滤膜。超滤、反渗透、渗析、微渗析和电渗析为以滤膜进行浓缩、纯化和分离被测物的技术示例。

滤膜形状有许多种:板、卷、片、囊、筒、螺旋缠绕和空心丝。图 4-9 所示为典型的平板半透膜流动渗析系统。半透膜只允许一定的化合物通过,而不许其它的物质透过。微孔半透膜据其微孔的大小和性质容许分子有选择地通过。例如,分子量截止膜允许小分子(比如药物)通过,而不让大分子(如蛋白质)通过。多孔荷电或离子交换膜具有固定正或负电荷的孔壁。离子化的分子通过滤膜通道受控于孔径大小以及膜电荷。图 4-9 中的样品溶液(给液)被放置在滤膜的一边;另一种液体(受液)被放在另一边。有些情况下,干扰物质扩散通过滤膜,离开纯化给液。更经常的是,被测物通过滤膜进入受液中,将干扰物留在给液中。采用滤膜分离技术对 RP-HPLC 分析的优点是给液和受液通常都是水或缓冲液。滤膜分离能在静止系统中进行,也能在流动系统中进行,而后者更易于实现自动化。

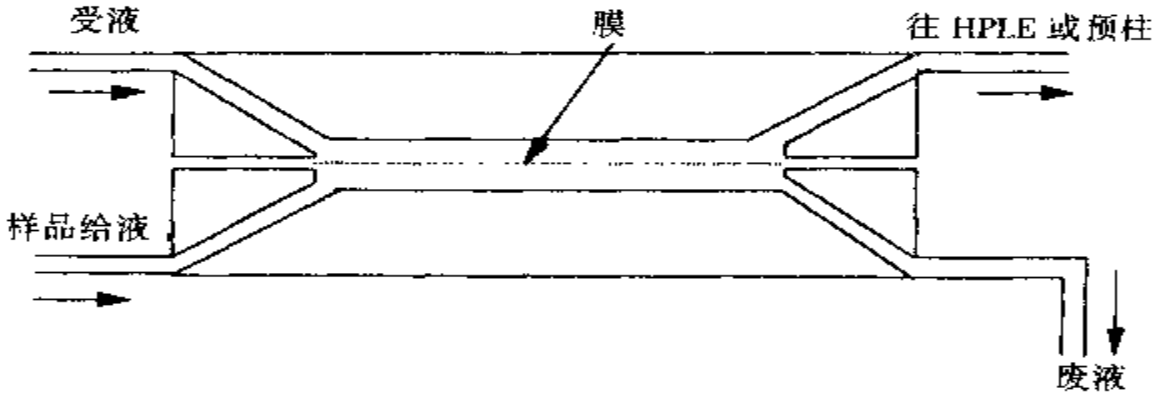


图 4-9 典型的半透膜渗析应用示意图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

膜分离技术除了用于过滤和 SPE 膜外，尚未广泛用于 HPLC 样品的制备。不过，在从小分子（如药物或药物代谢物）中分离像蛋白质这样的大分子时，用分子量截止膜[43]进行流动渗析能获得满意的结果。与其它样品制备技术相比较，膜分离较缓慢，效率不高。与 SPE 或 LLE 相比较，膜浓缩被测物的能力有限。中性小分子迁移过半透膜是由于膜两边存在被测物浓度梯度的结果。浓度一旦达到了平衡，迁移则停止。因此，膜技术的成功利用有赖于下述要点：

1. 取出被测物以保持浓度梯度（取出被测物最好的办法是在给液一边用静止系统，而在受液一边用流动系统，并用有关的方法捕集或浓缩被测物）

2. 改变被测物的化学形态（比如，由不带电变为带电形态）

3. 能够利用被测物回收率 ≪100%（见下述示例）

样品制备中，应用滤膜最成功的示例之一是利用流动渗析进行痕量富集[44]。流动渗析膜分离过程中，给液（含有被测物）和受液流过被半透膜隔开的通道，这种半透膜多数情况下为一分子量截止膜（如图 4－9 中）。小分子能自由通过滤膜，但比分子量截止值大的分子不能通过。对于易产生乳化的系统（如蛋类或象牛奶这样的含脂产品的提取），流动渗析为一有效的分离技术。只用很少甚至不用有机溶剂，能长期（如数周）处理含组分浓度高的溶液，象蛋白质、腐殖质、脂类大分子或胶体微粒，而不损坏滤膜。

与蛋白结合的或被细胞器捕集的被测物不能穿过膜界面。因此，渗析可能是测定药物的游离浓度与结合浓度的有效技术。由亲水强的醋酸纤维素至疏水的合成聚合物（如聚砜），有多种物质能提供独特选择性的膜分离过程。

载液膜富集（膜基溶剂萃取）技术[45]与流动渗析类似，只是多孔 PTFE 滤膜分开的是两种水溶液。该技术是渗析与液－液萃取的结合产物。最初，滤膜以与水不能混溶的有机溶剂（如正十一烷）

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

浸渍，置于安装座中。化合物按其在载液中的溶解度，被从给液一边萃取进入滤膜中，再从滤膜上被萃取进受液一边。该技术应用的简单示例是从水给液中富集羧酸。通过将给液的 pH 调至该酸的 pK_a 值以下，抑制羧酸的电离，并将非电离形式的酸萃取进膜上的固定液中。经扩散通过膜进入 pH 为碱性的受液一边，又以其离子形式被萃取。由于不能再重新被萃取入膜，羧酸阴离子被浓缩。富集效率（受液一边的样品浓度除以给液一边的浓度）可达几百倍。在膜设备与 HPLC 仪器之间加装一个吸附捕集器或预柱，能进一步浓缩被测物。阀切换（见第 4.6 节）能使操作者将浓缩的被测物反冲进 HPLC 进样器。膜基溶剂萃取技术已应用于分析尿中脂肪胺和芳胺[46]、野外取样并测定天然水中的酸性除莠剂[47]和水中氯酚[48]。

微渗析进样是渗析的一种专用技术。这种方法使用一端有膜的熔融硅胶管小探针[49]。探针可置入活体组织中（如鼠大脑），小有机分子能够扩散通过膜，用微注射泵将样品抽入环形进样器，进行 HPLC 在线检测，且不影响受试动物或植物的正常生长。插入活体组织中的小型微渗析探针，所研究的被测物样品是用其它样品预处理方法所做不到的。多数情况下，不需进一步处理样品，渗析液能直接注入 HPLC 色谱柱。微渗析在体内研究实验室大鼠中的脑儿茶酚胺神经化学中[50]，在皮下组织中的乙酰氨基酚的动力学研究[51]以及在为测定发酵液中的肌醇三磷酸酯的生物加工中[52]已得到应用。微渗析的缺点是缺乏实验条件下准确测定样品浓度的校正方法。

超滤（UF）进样与微渗析相似，只是透过膜的驱动力是膜两边的压力差（10 ~ 100psi）。与渗析中的情况一样，小分子在受液一边聚集。UF 探针略大于微渗析探针，所以不能很好地被容纳在许多活体组织之中。UF 膜的截止分子量可以为 300 ~ 300000 不等。使用 UF 样品制备的示例有链佐星糖尿病小鼠（streptozocin

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

diabetic mice)体液中葡萄糖的测定[53]和皮下组织中乙酰氨基酚的活体内监测[51]。

UF 膜也可自制成一次性装置使用，可用于水溶性生物样品的手工处理。首先将样品倾入滤杯中，加盖，然后经顶盖压入空气或其它气体进行分离。浓缩蛋白和其它比截止值大的分子保留在滤杯中，而水、盐、小分子可溶性组分被收集于滤液收集杯中。UF 膜的应用示例为对小氨基酸和键合肽的分离，用 10000 分子量截止限度（NMWL）再生纤维素膜和 NMWL 为 10 *K*，30 *K*，100 *K* 和 300 *K* 对蛋白有高结合容量的聚砜膜皆可以实现；这两种膜 Millipore 公司均有售(美国麻省，Bedford)。

在流动系统中的渗析作为一种在线样品制备技术，可以在 HPLC 分析之前有效地脱出生物样品中的大分子蛋白。将受液泵入痕量富集柱中，以后再将其反冲入 HPLC 中。这些技术已实现自动化，而且在许多实验室中已作为常规应用[54]。

膜技术的应用与其它样品制备技术比较，优点在于：

1 样品或基质成分超载的危险性可以忽略

2 大多数膜过程在密封流动系统中进行，能降低污染，避免接触有毒或危险的样品

3 使用有机溶剂量少

4 流动系统易于实行自动化

另一方面，与其它样品制备方法比较，滤膜也有缺点。例如，多孔膜易于被微粒或大分子污染；孔一旦被堵塞，流量将降低，膜效率也降低。有些情况下，样品在渗析前必须先经过预处理，或用其它膜技术清除污染。比如，在原奶渗析前必须先“脱脂”，肉羹必须除去颗粒物[55]。渗析的效率（受液相中被测物量除以给液相中被测物量）一般仅为 5 ~ 10%。若用停流技术，效率能增加至 30 ~ 50%[56]，但代价是时间延长。然而，给液中样品浓度的快速改变（在加工环境中取样时，情况可能会如此），在实际应用中响应时间

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

较慢，难于反映即时系统状态。

4.5 固体样品的预处理

样品必须制成液态才能进行 HPLC 分析。有些不溶固体中含有可溶性被测物，比如固体聚合物中的添加剂，食品中的脂肪，土壤中的多环芳烃。使样品与溶剂相接触，萃取出被测物，随后经倾倒、滤过或离心将溶剂从固体残渣中分出。如必要，进一步处理滤液，再进行 HPLC 分析。表4－3和4－4总结了一些用于从不溶性固体基质中提取（"浸出"）可溶性被测物的技术。

4.5.1 传统的萃取方法

没有一种溶剂萃取技术能用于一切样品。表4－3列出了几种预处理固体样品的传统方法。这些方法中的大多数（索氏提取与浸出）已应用了100多年，被大多数科学家所接受。法规机构，如美国的环境保护局（EPA），食品药品管理局（FDA）以及其它一些国家的相应机构很愿意接受这些经典方法作为固体样品的萃取方法。然而，这些方法往往使用大量的有机溶剂，因而已有鼓励微型化的倾向。

溶剂萃取能采取多种形式。瓶振摇法，向样品中加入溶剂并振摇，当被测物在提取溶剂中的溶解度很大且样品孔多时，这一工作会很容易。对于快速萃取来说，应将样品研细分散（见4.3.1节）。加热或回流样品能加速萃取。如需萃取更快、更彻底，超声搅拌（利用超声波）往往能有效地增加固－液之间的接触。微热也有助于萃取。超声法是许多固体环保样品预处理的推荐方法，如美国 EPA 的第3550条法案，从土壤、淤泥和废物类固体中提取非挥发性和半挥发性的有机化合物。此方法中，建议根据固体基质中污染物的类型及其浓度，使用不同的提取溶剂和超声条件。

在强制流动浸提中，固体样品被填充进一支短（如20×0.4cm）不锈钢柱中，在加压条件下（40psi），将甲醇泵入通过加热至100 ～

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

110℃的样品柱。其结果可以与索氏提取(见后面)相媲美,但提取时间明显缩短(如24→0.5小时)。采用此技术可以由煤灰样品中很好地将多环芳烃抽提出来[57]。强制流动浸提的优点是新的热溶剂不断流过样品,易于收集由柱流出的液体,进行再处理。

索氏提取法(Soxhlet Extraction)一直是固体提取中应用最广泛的一种方法。固体样品置于索氏套筒中(一种由硬滤纸制成的一次性多孔容器),套筒置索氏提取器中。回流提取的冷凝溶剂流入套筒中,萃取可溶性的被测物(图4-10)。仪器设计为每次当固定套筒的槽中充满溶液时,即将其中的提取液虹吸出去。含有被测物的虹吸液再返回蒸馏瓶,此过程周而复始直至被测物从固体样品

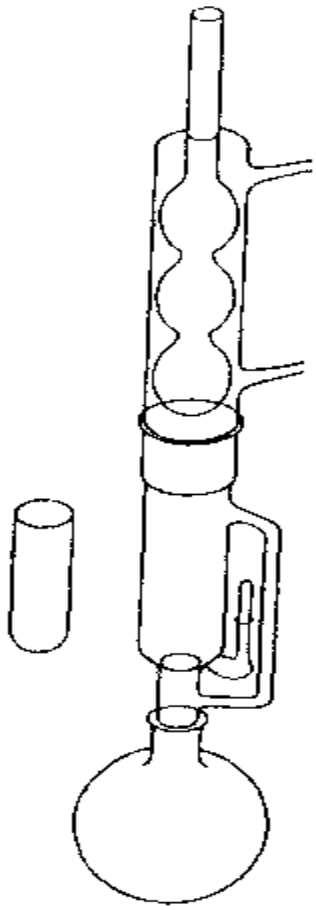


图4-10 从固体中连续提取溶质的索式提取装置(置一边的是萃取套筒)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

中被全部抽提出，浓缩在蒸馏瓶中。索氏提取通常进行较慢（12 ~ 24 小时或更长），但该工作可无人照看进行。最普通的提取器用数百毫升纯溶剂（昂贵），但也有小体积的提取器和套筒用于毫克级的样品。

索氏提取中，流入样品中的总是新的热萃取溶剂，使被测物溶解度最大。由于盛有沸腾溶剂的烧瓶不断积蓄提取出的被测物，被测物在提取溶剂沸点温度下必须稳定。方法建立包括寻找合适的挥发性溶剂（如沸点<100℃），这种溶剂必须对被测物有足够大的溶解度，而对固体样品基质溶解度要小。作为有效萃取最古老的方式，索氏提取已成为公认的标准，以与新型的萃取技术作比较，象 SFE，加速溶剂萃取和微波辅助萃取。现代索氏提取器（表4－4）结合液－固萃取和传统的索氏提取，将萃取过程加快8 ~ 10倍。开始时，套筒中的样品先降低浸入沸腾的溶剂中，然后再将其抬高至溶剂液面以上以传统的索氏方式，用新溶剂提取剩余的痕量被测物。

4.5.2 新型萃取方法

多年来，表4－3的溶剂萃取法对大多数实验室证明已足够。表4－4开发的新方法强调了日益增长的高生产率、快速分析和先进的自动化程序的需要。这些方法中有些为表4－3中方法的自动化、更方便的方式。根据新原理，也已开发出了一些新的萃取技术。这些方法中的多数装置售价较高，但最终却可以降低每一样品的分析成本。

4.5.2.1 超临界流体萃取法。相图能描述一种物质的物理状态，它画出了固体、液体和气体状态的相应区域。沿图中的曲线点可定义出两相之间平衡点的位置。在二氧化碳的相图中（CO_2；图4－11），液体和气体之间的隔线有一终点（临界点），不象固体和液体之间的隔线。该临界点被临界温度 T_c 和临界压力 P_c 所限定；超出该临界点（超临界区域）的气体不管压力有多大，都无法转化成为液态。超临界流体（SF）具有气体质量传递的性质和液体

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

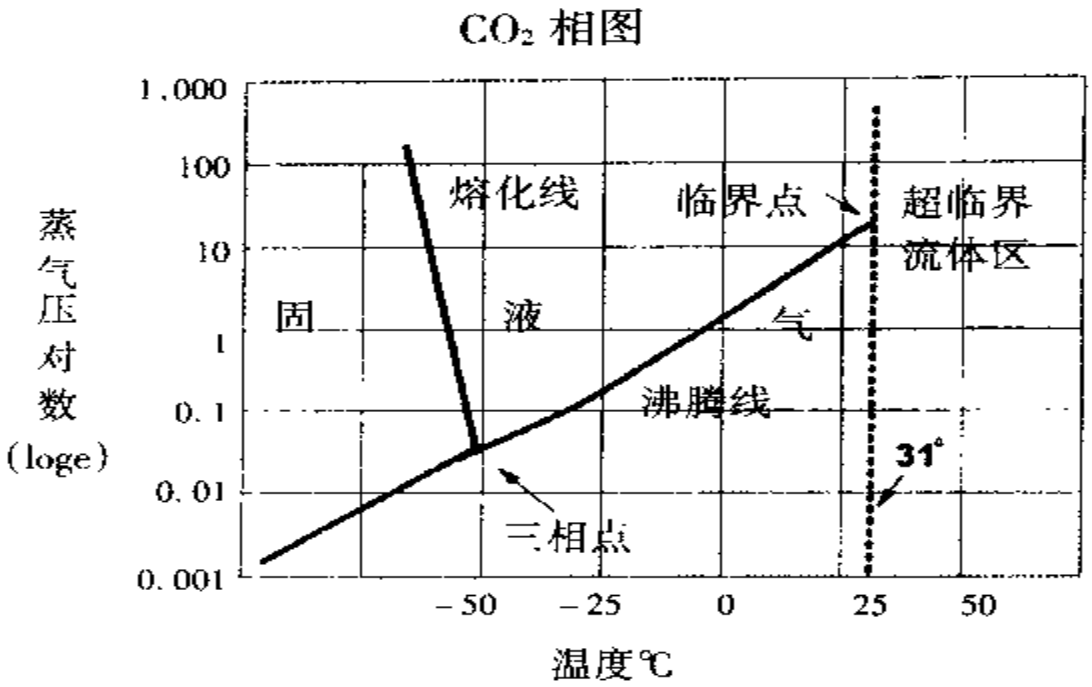


图 4－11 CO_2 的(压力－温度)相图

溶解度的性质，且有比液态溶剂高得多的溶剂萃取效率和速度。今天，超临界流体萃取(SFE)已被广泛用于提取固体基质中的非极性和中等极性被测物。有许多文献[158-60]描述 SFE 仪器使用、方法建立和应用，可供参考。

能用于 SFE 的流体包括 CO_2、NH_3、N_2O 和戊烷。N_2O 和戊烷易燃，NH_3 具有化学活性和腐蚀性。因此，CO_2 用于 SFE 最多；CO_2 安全、化学惰性、无毒、无腐蚀、以适宜的价格即能得到高纯度的商用产品。CO_2 易于从收集的被测物中除去，不会引起后处理问题。低密度的超临界 CO_2 有己烷的极性（即非极性）。然而，SF 的极性随密度而增加，尤其在接近于临界点时；所以在其最大密度时，SF－CO_2 又有类似于甲苯、苯、乙醚溶剂的极性。

纯 CO_2 能够提取多种非极性和中等极性的被测物，但对极性化合物的效果较差。CO_2 不能取代牢固吸附于固体基质上的被测

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

物，可在 CO_2 中加少量（体积比可达 10%）的极性有机溶剂（甲醇、二氯甲烷、乙腈等），加强其溶解极性被测物的能力。极性溶剂在样品基质中与被测物进行竞争吸附，可以将后者置换到溶剂中。在 CO_2 中加入有机溶剂，对 T_c 和 P_c 值有轻微的影响，所以，可能需要改变用于纯 CO_2 时的温度和压力。

对于环保分析，美国 EPA 已批准了数个 SFE 方法[如，土壤和淤泥中总石油烃、多环芳烃（PAH）、有机氯农药]。SF－CO_2 对脂肪也是极好的溶剂，可用于食品工业中的提取。当高脂肪溶剂萃取液用于反相 HPLC 时，脂肪能沉淀出或强吸附于疏水的固定相上，导致色谱柱很快失效。因此，SFE 可用作一种选择性的样品制备技术，以除去某些可损坏色谱柱的物质。

通过改变溶剂强度（即密度梯度或密度程序），SFE 也可用于被测物族的分离。用密度梯度 SFE 程序对啤酒花分级提取为一示例[61]。在聚合物领域中，SF－CO_2 的渗透力使其在不到 1 小时提取聚合物抗氧剂和增塑剂等添加剂。这样的提取以前采用索氏提取或超声提取方法需要数小时。制药化学家已采用 SFE 方法从药片制剂和组织样品中提取药物。

SFE 设备 图 4－12 为超临界流体提取器的示意图。其基本组件包括：二氧化碳气源、泵（柱塞式或冷却头往复式）、放置样品的提取室（或套筒）、流量阻尼器、收集被测物的装置（一般为一只器皿）。应对泵头、提取室、流量阻尼器和收集装置的温度分别加以控制。CO_2 象液体一样用泵抽出，并保持液态直至到达提取室，在那里的温度和压力条件下，CO_2 变成 SF。SF 通过套筒中的样品，其时间周期的长短应满足提取被测物的要求。SF 流过套筒后再通过流量阻尼器减压，回复到非 SF 状态。

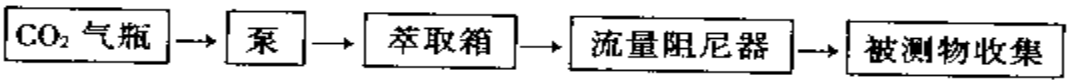


图 4－12 超临界流体萃取流程示意图。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

流量阻尼器的选择很关键。主要使用的有两种：由一根毛细管构成的固定流量阻尼器，或由操作者控制的可变流量阻尼器。流量阻尼器的作用是控制套筒中的超临界条件和当 SF 在大气压力下变成为气体时，被测物的沉淀。SF 在此处急速膨胀引发焦耳－汤姆逊(Joule－Thompson)冷却效应，必须加热流量阻尼器以补偿这种温降。否则，大量提取出的被测物和/或基质能堵塞流量阻尼器。

被测物以气溶胶(雾状)形态在流量阻尼器出口处(冲击表面)被收集。收集(捕集)方法有三种：(1)用空容器；(2)用填充截留器，内装惰性物质如玻璃或不锈钢珠，SPE 填料(20～40μm)，或 GC 固定相填料物；或者(3)使其溶入溶剂中。被测物的挥发性决定了收集温度和最有利的收集方法。例如，空容器不适合收集某些气溶胶或挥发性强的化合物，由于它们可能会随 CO_2气体一起被吹扫出。溶剂提取方法也可能受到气溶胶形成的干扰，当 CO_2气体高速穿过液体时可能会形成气溶胶。应选择一种形成气溶胶的可能性小，被测物的溶解度又较大的溶剂，使捕集效果更佳，冷却溶剂也有助于收集。用填充截留器收集需要一台小型储备泵，将被测物引入小瓶中。收集被测物的能力至关重要，往往是 SFE 中最为困难的环节。

SFE 的方法建立 在 SFE 中，不同基质中提取出的被测物有所不同。例如，需用不同的 SFE 萃取条件从土壤、飘尘、淤泥和沙子中获得同样的多环芳烃(PAH)。从陈旧土壤样品中捕集已知的被测物比从新“加样”的样品中提取更困难[62]。SFE 从固体基质中提取被测物的难易程度受以下因素的制约[63]：

1. 被测物与基质相互吸引的强度
2. 被测物由基质向萃取溶剂中运动的速率
3. 被测物在 SF 中的溶解度

温度对这三种因素都有影响，而且是 SFE 方法建立中的一个重要参数。当高密度的 SF－CO_2不能从基质中有效地提取有关被测物时，加入有机改性剂能改善提取效果，通过(1)助溶被测物，(2)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

与被测物竞争基质表面，和/或(3)改性基质使其释放出被测物。在第三种情况下，改性剂可能“溶胀”或增溶基质，以利于 SF－CO_2 的渗透。在极端情况下，可在 SF 中加入化学试剂(如提取土壤中苯酚时加醋酐[64])以使被测物转化成为更易提取的形式。

极性与非极性溶剂都可用作 SF－CO_2 的改性剂(助溶剂)。选择非 SF 溶剂提取(见 4.4.1 节)的溶剂混合液的规则同样适用于 SFE。即溶剂的极性(P')和选择性(见 2.3.2 节)对影响被测物从干扰物中的回收率和分离都很重要，可参见文献 58 中的充分讨论。当选择初始条件进行 SFE 时，知道被测物性质非常重要，这些性质包括：分子量、官能团、极性、溶解性、挥发性、pK_a、热稳定性和浓度。对基质特性的了解也同等重要，包括粒度、均一性、多孔性、组成、溶解度、密度等。基质本身也可能含有“改性剂”，像水分、脂肪和/或油。如被测物为极性，基质水分能有助于提取；样品中的脂肪与油的作用则可能相反。

基质的物理形态对 SFE 也很重要。大宗物料(固体块、硬质土壤、植物等)通常需要初步样品处理：碾磨、过筛、干燥、混合或润湿(见4.3节)。对于无孔或半孔状样品，降低粒度可使提取速度加快很多。在某些情况下，调节 pH 或向提取容器中添加溶剂也有助于 SFE 过程。湿性基质，如淤泥，可能需除去水分，才能获得良好的回收率及重现性结果。在其中加入无水硫酸钠或硅藻土能使其流动性增加[65]。

影响 CO_2－SFE 的主要参数包括压力、温度、流速、助溶剂和提取时间。压力与温度联合作用控制 SF 的密度。随压力和密度的增加，SF 的助溶能力也增加。温度与压力的任意结合能使提取用 SF－CO_2 的密度(g/mL)相等。对于热敏感被测物，低温较适宜，而键合牢固的被测物则需较高温度。为从提取套筒中提取出所有被测物，可能有必要提高流速或延长提取时间。当提取过程的动力学速率缓慢时，适宜用低流速。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

随着 SFE 技术的日臻成熟，将会有更多的“基质－被测物”的成熟方法可供参考。分析工作者往往用试－凑法优化提取－收集条件。为方便方法建立，图 4－13 提供了一般的方法建立规则[66]；然而，不是每一样品均需注意所有这些步骤。方法建立规则假设分析者以标准样品开始，并以下列程式进行研究：

1 被测物存在于惰性基质中（例如硅藻土、Cilite 或滤纸）；这种情况要求测定 SF 对被测物的溶解性。

2 模拟样品在空白基质中（有些空白基质由商家以标准品提供）；或应制造一种典型的“洁净”基质（尽可能接近于实际样品）

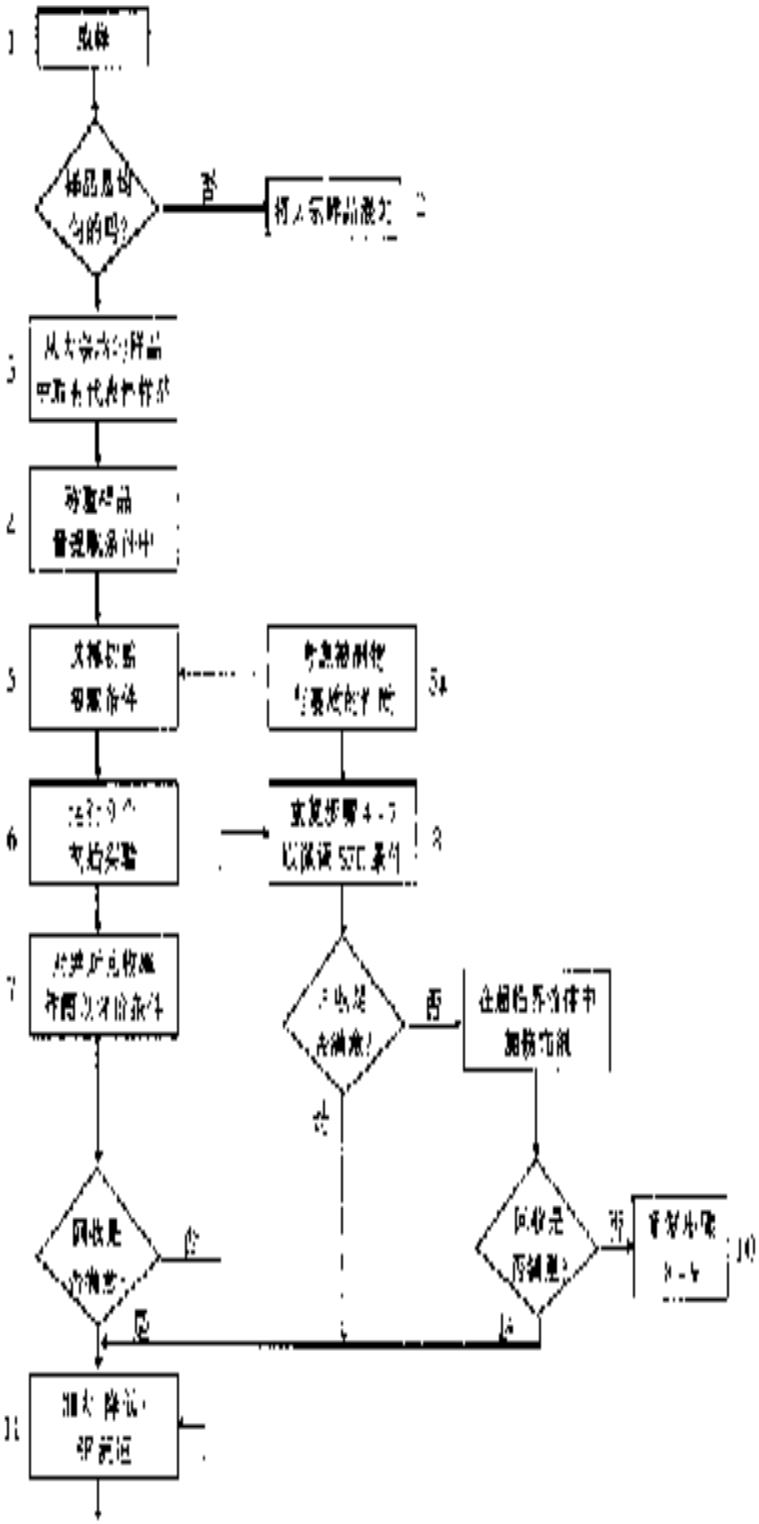
3 模拟样品在真正基质中的形态；建立 SFE 方法时，习惯上将结果与可接受的其它制备方法进行比较，如索氏提取或液－液萃取。

如读者对 SFE 方法建立的详细情况感兴趣，请参阅文献59和60。

4.5.2.2 微波辅助溶剂萃取法（Microwave－Assistant Solvent Extraction） 用微波源直接加热样品与提取溶剂，这与提取容器常规的加热方式不同。应用微波辅助溶剂萃取（MASE）有两个限制形式：（1）吸收微波（介电常数高）的提取溶剂，或（2）不吸收微波（介电常数低）的溶剂。在吸收微波的溶剂提取中，样品与溶剂置于密封的不吸收微波的容器中。微波辐射将溶剂加热至其沸点温度以上，该热溶剂在适度的压力下（通常几百 psi），能快速提取被测物。高压提取方法所用的容器由 PTFE、石英或先进的复合材料制成，机械性能良好，并有非常好的耐化学腐蚀和高温的能力。该方法在提取聚合物中的添加剂、食品中的维生素和土壤与沉积物中的主要污染物（多环芳烃、农药、多氯联苯）中已有应用[67－69]。

在不吸收微波的溶剂提取中[70]，样品和溶剂置开口或密闭的容器中均可。由于这类溶剂吸收微波辐射很少，所以不会变热。通常含有水分或其它高介电组分的样品吸收微波辐射，将加热的被

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

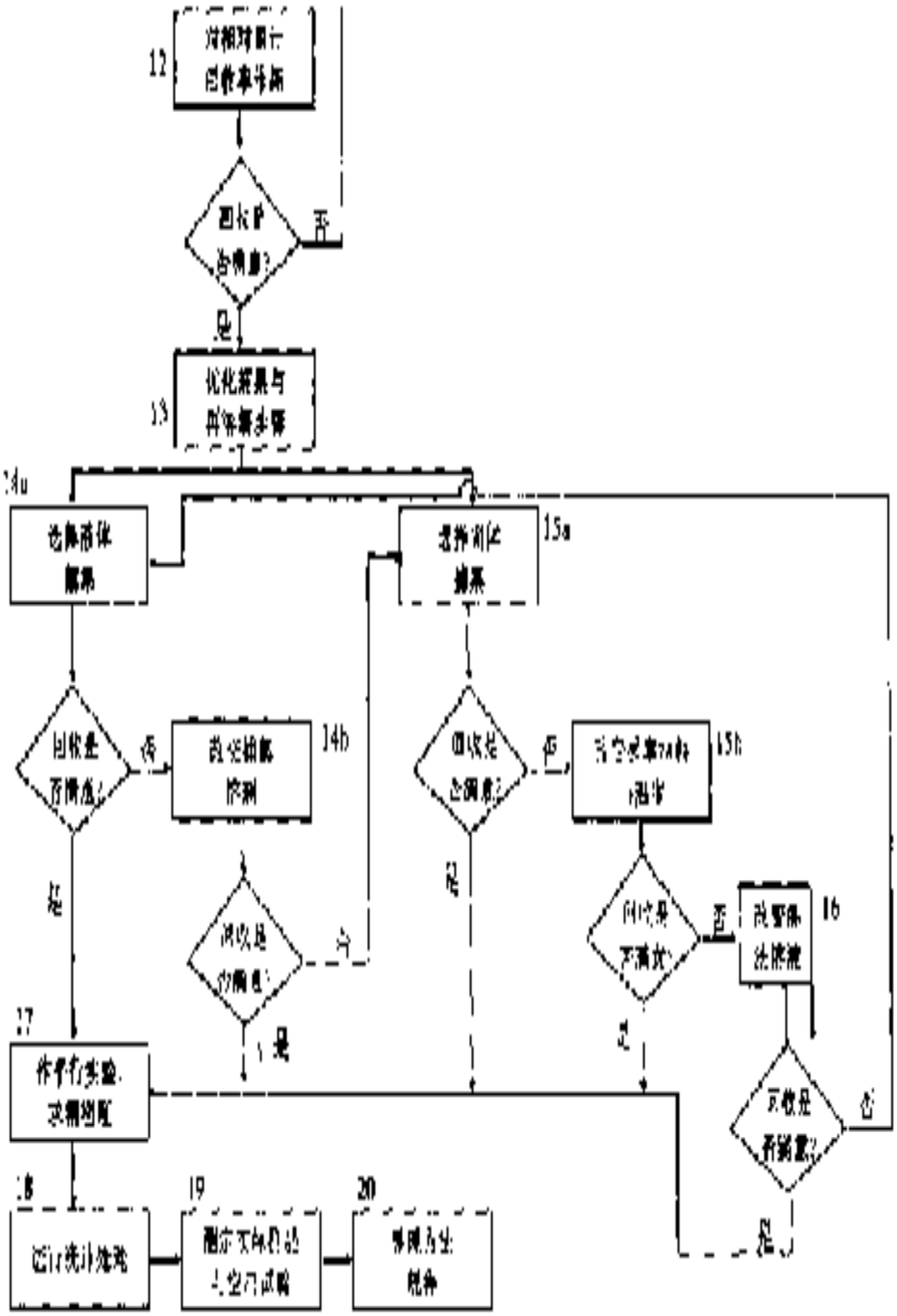


图4－13　SPE方法建立流程图[16]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

测物释放入周围的溶剂中，所选溶剂应能良好地溶解被测物。与溶剂吸收微波的情况相比，这种方法比较温和，操作在大气压下或低压条件下进行，能用于热不稳定的被测物。不吸收微波的溶剂应用示例包括鱼中的类脂物[70]和沉积物样品中的有机氯杀虫剂的提取[71]。

可用于 MASE 的溶剂种类少于常规的索氏提取或液－液萃取。提取操作可通过多种条件进行控制：提取溶剂的选择，加热时间，脉冲加热或连续加热，搅拌或不搅拌，密封容器或开口容器（大气压），容器外部加冷却或不加冷却。一般的微波灶能同时提取多个样品，以提高工作效率。MASE 使用者不接触（往往有毒的）提取溶剂；不过，当处理微波辐射与密封加压容器时，应多加注意安全。

4.5.2.3 加速溶剂提取法（Accelarated Solvent Extraction） 提取容器可在常规烘箱中加热，而不用微波辐射。加速溶剂提取（ASE）（美国加州 Dionex 公司），亦称增强溶剂提取，在密闭提取容器中进行，以常用的有机溶剂在高温（50 ～ 200℃）和高压（150 ～ 2000psi）下，从固体样品中提取可溶性被测物[72,73]。因为热溶剂的溶质容量高，溶剂体积用量少，高温可提高被测物的回收率。用于 ASE 的实验仪器与 SFE 的类似，包括一只输送溶剂进、出提取容器的自动密封泵，耐高压的提取容器，加热样品室的烘箱，与采集提取液的收集瓶。ASE 由下列步骤组成：(1)给样品室中装样（一般样品量为 5 ～ 20g）；(2)加溶剂并加压密封；(3)加热样品室（在恒定压力下）；(4)静置提取；(5)将提取液移入密封小瓶中，用新溶剂洗涤固体样品；(6)用氮气吹扫样品室；(7)装载样品。样品一旦装入提取室后，全部过程将自动按时间程序进行。ASE 可连续无人制备多达 24 个样品。ASE 一般的环保应用包括从固体废料中提取碱、中性物质、酸（BNA），多环芳烃（PAHs），有机磷与氯杀虫剂，和多氯联苯（PCBs）。其它应用还包括食品中的游离脂

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

肪；动物组织中的 PCBs 等。

4.5.3 固体萃取的方法比较

表 4－13 为固体提取常用方法的比较。除了开口容器的微波辅助提取法和用超临界 CO_2 的 SFE 外，这些技术中使用的提取溶剂都相同。它们的方法建立时间、回收率和重现性也大致相当。其主要差异在于提取速度、有机溶剂的应用、自动化程度和价格。因为可能的基质影响和助溶剂对被测物提取的影响不明，SFE 方法建立一般需时较长。然而，优化的 SFE 方法，其回收率与重现性与这些较常规的提取技术相当。ASE，现代索氏提取和 SFE 比 MASE 的自动化程度高。MASE、超声与一些 SFE 仪器在同时处理多种提取工作方面比 ASE 有优势。所有这些新颖的方法均比旧提取法节省时间、气力和溶剂。

4.6 柱切换

色谱柱切换（亦称多维柱色谱或耦联柱色谱）是分离和清除复杂的多组分样品杂质的有效技术。这种方法中，初始色谱柱（1柱）的一部分色谱图被有选择地转送至第二支色谱柱（2 柱），再次分离（见图 4－14*a*）。柱切换（CS）用于：

1 在 2 柱之前除去可能损坏色谱柱的物质

2 在 2 柱之前除去强保留杂质

3 除去在 2 柱中会覆盖被测物谱峰的干扰物

4 梯度洗脱的一种替代方法

5 痕量富集

与单柱操作比较，达到上述的一个或多个目标，往往即可提高样品分析效率。CS 的基本目的是尽量增大注入 2 柱的被测物量，并尽可能地减少同时注入的干扰化合物（与 SPE 样品制备的目的相同）。

在 HPLC 中，通过一只高压切换阀使 1 柱与 2 柱相连进行 CS

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表4-13 固体样品预处理提取方法的比较

参数	超声	索氏(传统)	索氏(现代)	SFE	ASE(ESE)	微波助溶(CC)[a]	微波助溶(OC)[b]
样品量(g)	20~50	10~20	10~20	5~10	5~15	2~5	2~10
样品体积(mL)	100~300	200~500	50~100	10~20	10~15	50	20~30
温度(℃)	室温~40	40~100	40~100	50~150	50~200	100~200	室温
压力	大气压	大气压	大气压	2000~4000psi	1500~2000psi	1500~2000psi	大气压
时间(hr)	0.5~1.0	12~24	1~4	0.5~1	0.2~0.3	0.2~0.3	0.1~0.2
自动化程度[c]	0	0	++	+++	+++	--	++
样品数[d]	高	1	6	44	24	12	12
费用[e]	低	极低	中等	高	高	中等	中等

[a] 密封容器

[b] 开口容器

[c] 对于成套的商用仪器:0,无自动化;-,有些自动化;++,多数自动化;+++完全自动化

[d] 在商用仪器上能处理的最多样品数目

[e] 极低,<$1000;低,<$10000;中等,$10000~20000;高,>$20000

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

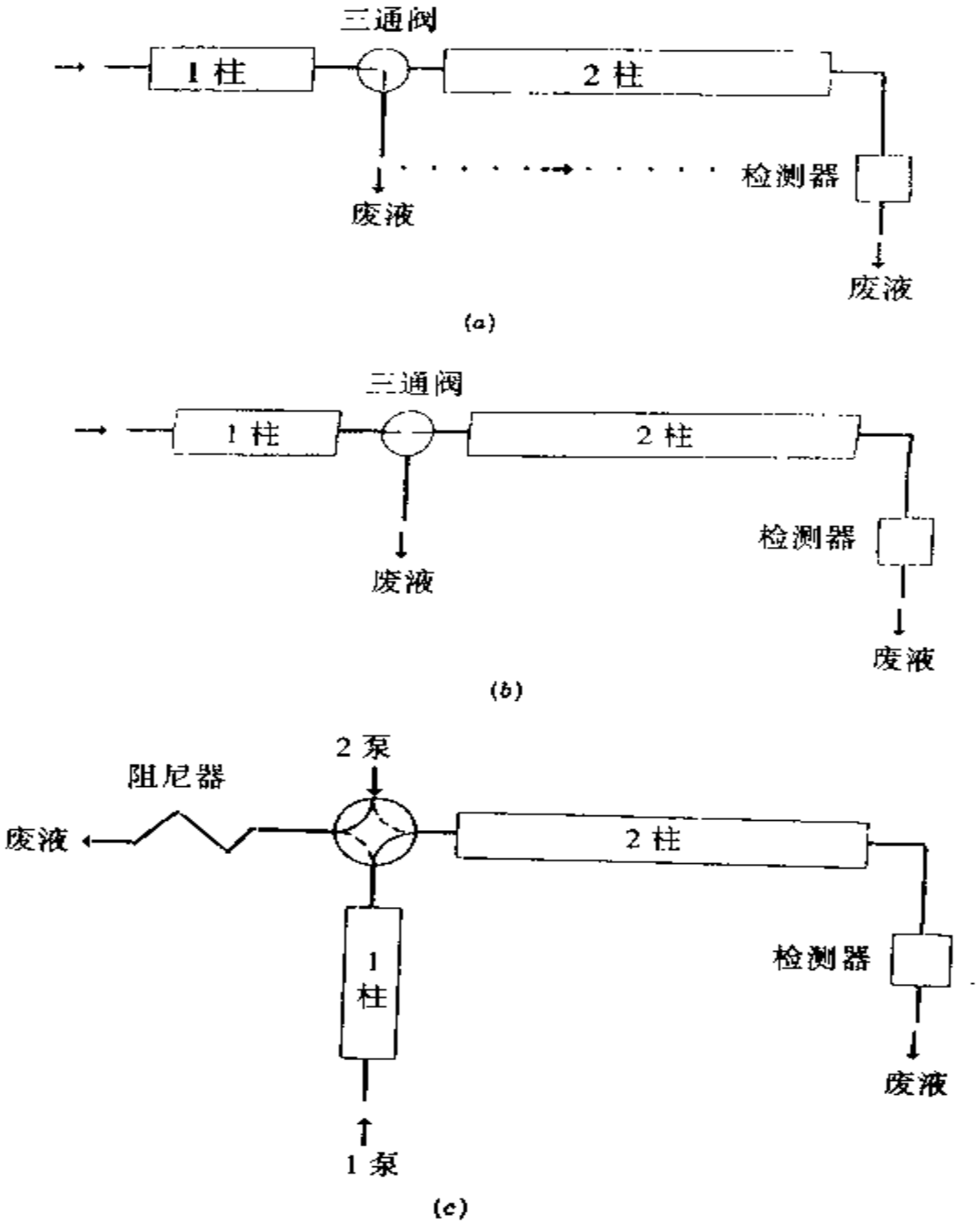


图 4－14　样品柱切换系统示意图

(a)单泵系统,三通阀连接 1 柱至废液或检测器

(b)同(a),但将阀切换至连接 1 柱与 2 柱

(c)(a)的双泵形式

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

操作。以此方式，样品在 1 柱上被部分分离，含有被测物的部分被引入 2 柱，进行最终分离。CS 可以做到 LC、GC、TLC、SFC 和 CE 联用作业。本节中仅讨论 LC－LC 方式。CS 与用 SPE 提供馏分的 HPLC 分析相似（见 4.4.2 节），其主要差别为：

1. SPE 萃取管仅用一次即弃掉；而 CS 中的 1 柱可反复使用，尽管比正常的 HPLC 色谱柱进样的次数要少（如 50 ～ 100 次）。因此，CS 需用另外的冲洗步骤保证除去 1 柱中的干扰物。否则，这些杂质会损害 1 柱的柱效或在以后的分析中影响 2 柱的分离。

2. 1 柱（d_p 在 5 ～10μm 范围中）比 SPE 萃取管（d_p 在 40μm 范围中）柱效高。1 柱的被测物峰宽较窄，分离度优于 SPE 萃取管，样品更干净，易于最终的 HPLC 分离。

表 4－14 总结了一些 CS 的其它优、缺点。在决定是否用 CS 之前，应先将这些特性与用 SPE 或其它样品预处理进行的脱机分离加以比较（表 4－12）。

表 4－14　柱切换与 SPE＋HPLC 的特性

优　点	缺　点
易于自动化，特别是用现代色谱仪	需要更复杂的液压系统（或气动装置），切换阀，费用高
由于实验在密封系统中进行，样品丢失可能性不大	由于浓度稀，体积大，难于处理痕量化合物；能用柱浓缩（痕量富集）方法
能配置适合需要的切换系统（如：反冲、中切、柱上浓缩）	主、辅方式溶剂的混溶性与强度要求必须相容。
减少总分析时间	
重现性较高	
样品生产率高	

4.6.1 操作原理

柱切换既可人工操作，也可自动化进行，但多数应用是完全自动化的。用小死体积的切换阀，由定时器或带微处理机的色谱仪的时间程序转换器自动启动。对 CS 的一个重要的实验要求是应将被测物从 1 柱完全转移至 2 柱。这需要准确地控制切换时

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

间。2 孔至 10 孔(或更多)的高压切换阀可以买到。CS 可用单泵进行,但通常最好用多泵操作。

最简单的 CS 系统(见图 4－14*a*)仅用一只泵,在 1 柱和 2 柱之间置一只 3 孔或 4 孔阀。图 4－14*a* 中,阀位置可使 1 柱的流动相绕过 2 柱,直接流向废液口或检测器。图 4－14*b* 中,改变阀位置,使流动相从 1 柱流向 2 柱。对操作和应用的进一步说明见图 4－15*a* ～ *c*。假想样品含有色谱图中 4.9min 流出的被测物。然而,后期流出物需要 60min 的运行时间,流出时间太长,欠佳。这些后期流出物能用图 4－14*a* 的 CS 系统除去。1 柱和 2 柱的柱填料一样(如 5μm C_8),但 1 柱长 3cm,2 柱长 15cm。由于 1 柱较短,样品通过大约需 12min(图 4－15*b*)。不过,用此短柱(*N* 值较小)被测物不能与相邻的谱峰分开,如图 4－15*b* 中箭头所示。如果 1 柱的前 0.5min 排入废液瓶,然后与 2 柱连接 1min,最后再排入废液瓶 10min,含有被测物的(0.5 ～ 1.5min)部分则被输入并保存在 2 柱中,而将样品中其它部分弃掉。该被测物(箭头)部分进一步在 2 柱上进行分离[将阀扳回至(*b*)中位置],得到图 4－15*c* 的色谱图。现在被测物在约 9min 之内达到基线分离,可准确定量。总测定时间为图 4－15*b* 和 *c* 运行时间的总和,或约 20min。这大大短于不用 CS 的图 4－15*a* 的 60min 运行时间。

如果 CS 用一只四通阀配合第二只 HPLC 泵(图 4－14*c*),能够进一步缩短图 4－15*c* 的运行时间。以此方式,样品分离可在 1 柱和 2 柱上同时进行,总运行时间约 12min。用两只泵并用,同时流过各柱的另一个重要优点是可尽量降低由于突然改变液流造成的压力波动,这样可避免色谱柱形成凹陷引起柱效下降(见 5.4.3.4 节),压力波动还会扰乱检测器基线。图 4－14c 中应用流量阻尼器或"平衡柱"平衡四通阀两个位置时的压力降。由于通过改变柱和阀的连接方式,能进行诸多不同的柱切换操作,所以多数实际应用的 CS 系统用两只泵。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

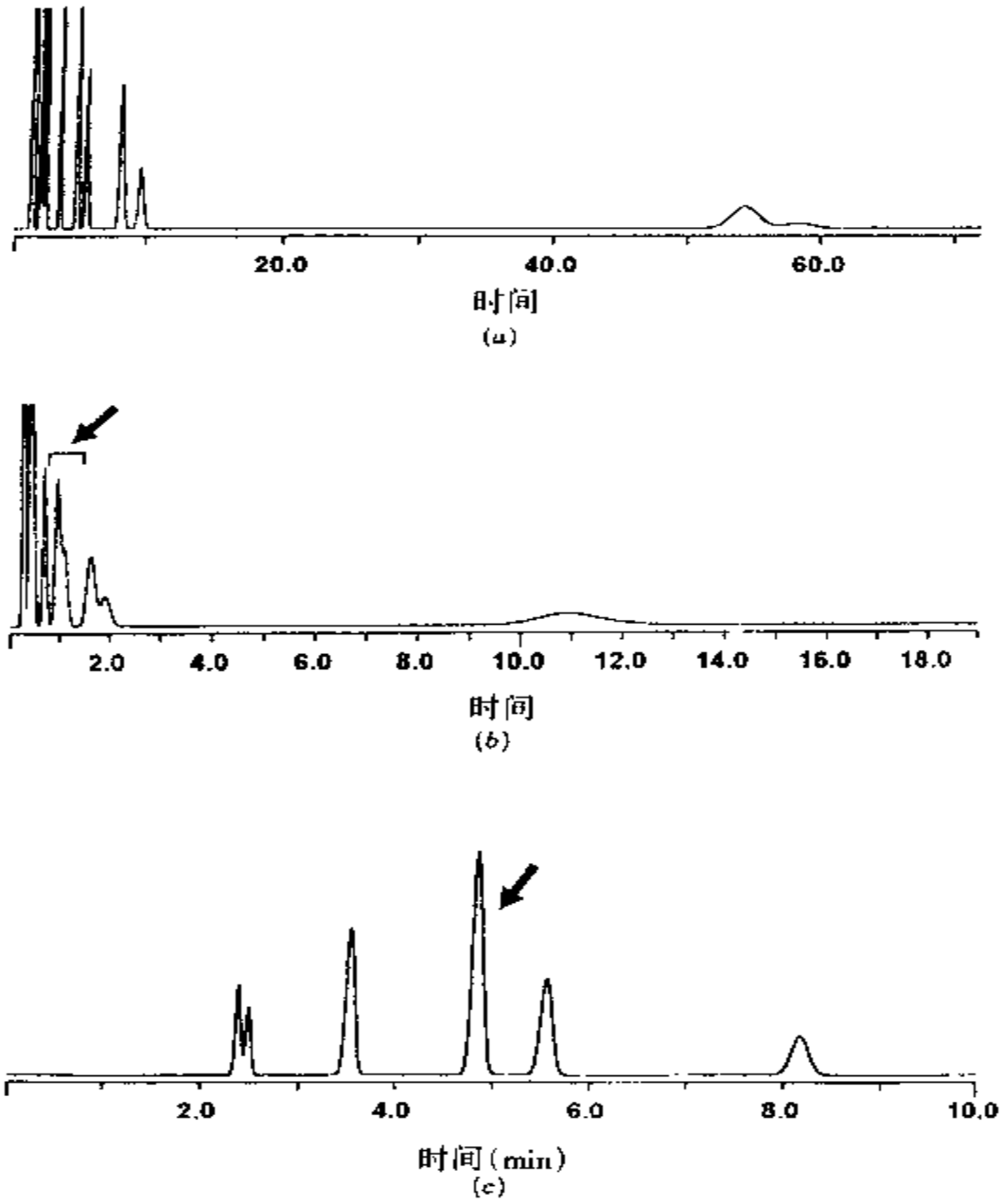


图 4－15　样品的柱切换色谱图

(a)1 柱与 2 柱串联的样品色谱图

(b)1 柱与检测器连接的样品色谱图;箭头所指的色谱图部分由柱切换导向 2 柱

(c)用 1 柱与 2 柱进行柱切换的样品色谱图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4.6.2 建立柱切换方法:总的考虑

当每一色谱柱中采用相同的流动相系统时，如图 4－15 所示，柱切换的应用最简单容易。这种 CS 形式，如已知每一支色谱柱柱长，分离的关键则是选择适宜的阀切换时间，以使所有被测物转向 2 柱，而将早期和晚期流出的干扰物输送至废液流路。如图 4－14*a* 中的虚线所示，1 柱与检测器连接能反馈决定切换时间，得到相应的色谱图(如图 4－15*b*)。对于方法建立，最好注入被测物标准品，而非实际样品，以免发生谱峰重叠或错认的问题。图 4－15*b* 的示例中，被测物谱峰在 0.9 ～ 1.1min 之间离开 1 柱。因为随着方法的应用以及其它样品组分对保留的影响，色谱柱会发生变化，不可能总能准确地控制被测物在 1 柱上的保留时间。因此，通常需扩大检测窗口（本例中为 0.5 ～1.5min），以保证被测物能完全转移至 2 柱中。

图 4－14 的步骤能扩展至其它应用，不同的柱填料和/或不同的流动相都能用于 1 柱和 2 柱。于是，主要要求是送入 2 柱的样品部分的溶剂应与 2 柱所用的流动相兼容。比如：如果 1 柱的流动相是水缓冲液，1 柱可用离子交换填料，2 柱可用反相(RP)填料。这种情况下，水溶液样品被送至 2 柱，该样品溶剂比 2 柱的有机－水流动相弱。同样，1 柱能用 RP 氰基填料，2 柱能用 C_8 或 C_{18} 填料，因为氰基柱的流动相比 C_8 或 C_{18} 柱的流动相弱（见 6.2.2 节）。1 柱与 2 柱中应用不同填料也使两柱间的选择性不同，可利用其从大量的干扰物中分离被测物，如在极为复杂的样品中见到的那样。图 6－26 所示为该方法用于 CS 分析绿燕麦样品中千亿分之一(PPT，10^{12})级农药的示例。

4.6.3 以柱切换清除样品中杂质的示例

如注入未经处理的样品，有些样品含有损害色谱柱的成分。药物分析中常见的示例有两例：(1) 定量测定血液或血浆中的药物，(2)定量测定乳剂或洗剂基质中的药物。血浆样品中含有蛋白

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

质，能在反相色谱柱上积聚，使柱效迅速丧失。乳剂和洗剂含有疏水性极强的油或蜡，在 RP 色谱柱上保留极强。图 4－16 所示为 CS 示意图，分别设计处理这类样品。

图 4－16*a* 的 CS 系统用于血浆样品[76]。两柱均用 C_8 或 C_{18} 填料，图（*a*）阀位置表明样品离开样品阀（Ⅱ），用水缓冲液冲洗至 Ⅰ 阀与 1 柱。在该条件下，被测物被保留在 1 柱的入口处，但蛋白质被洗入废液中。尽管蛋白通过 1 柱，使其柱效下降，但无实际影响，因为 1 柱仅用于捕集被测物之用。当阀转至另一位置（图 4－16*a* 中的虚线），2 泵的流动相转向 Ⅰ 阀，所以将 1 柱中的被测物反冲进 2 柱，进行分离。在进一步分离 2 柱上的被测物期间，Ⅰ阀又回到原位置，新样品又被引入 1 柱。

在图 4－16*b* 系统中，样品为乳剂[77]。1 柱与 2 柱填料的键合相类型相同（C_{18}）。然而，1 柱的填料保留较弱，属无孔或大孔，表面积小的材料。切换阀定位于将 1 柱的流动相流向 2 柱，使被测物通过 2 柱，而强保留的乳剂成分被保留在 1 柱上。当被测物离开 1 柱时，改变阀的位置，使 1 泵直接将流动相送至 2 柱，再进一步分离被测物。同时，2 泵反冲 1 柱，除去乳剂成分，为 1 柱的下一次进样做准备。

4.7 衍生化

衍生化方法使被测物与相应的试剂之间发生化学反应，以改变被测物的化学和物理性质。HPLC 中的衍生化有四种主要用途：

1. 改善被测物的检测
2. 改变被测物的分子结构或极性，以利于色谱分析
3. 改变基质，以利于色谱分析
4. 改善被测物的不稳定性

理想的衍生化反应应该快速、定量、产生副产物少。多余的试剂应不干扰被测物或易于从反应基质中除去[78－81]。建立方法时，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

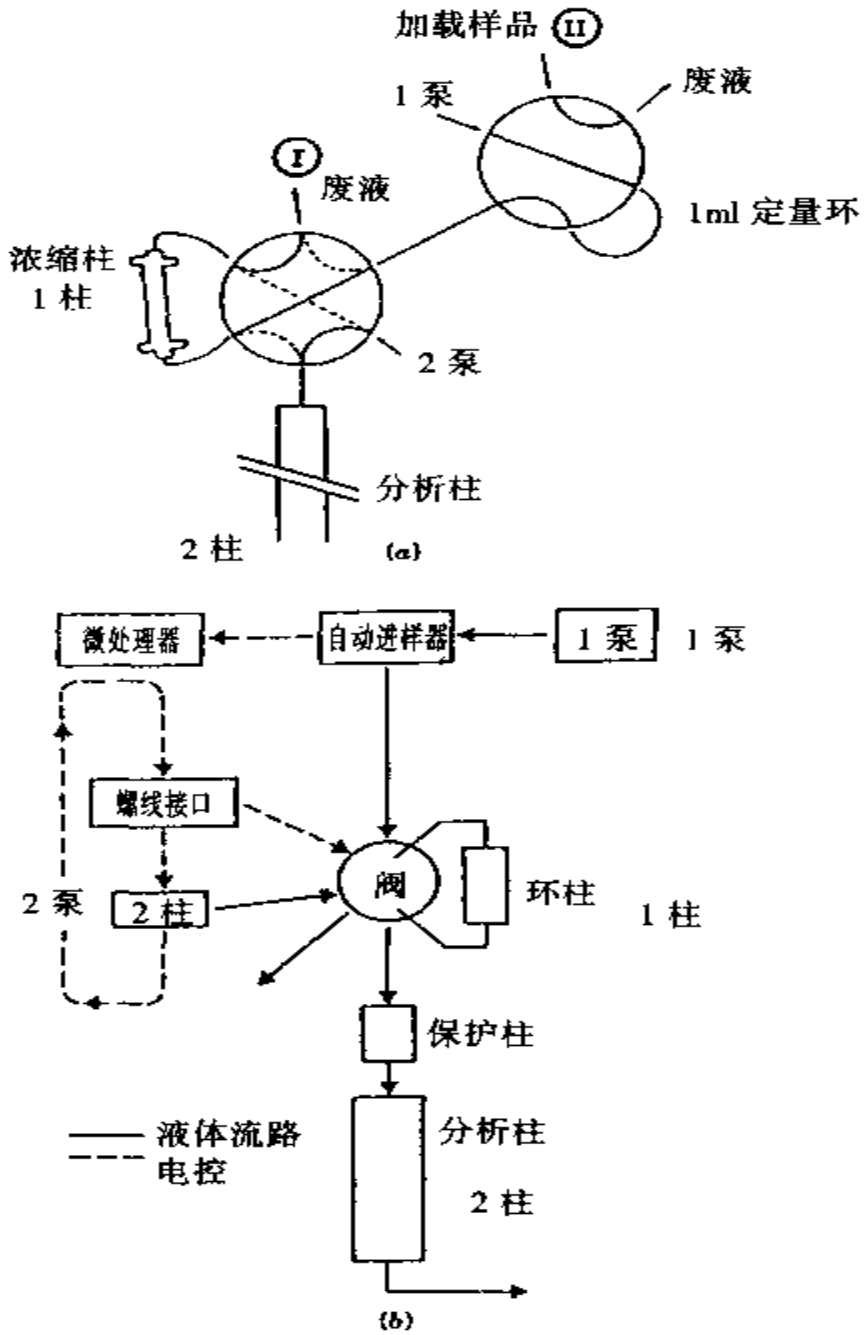


图 4－16　柱切换系统示意图

(a)从血浆中除去蛋白[76]

(b)从乳膏制剂中除去疏水性强保留组分[77]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

衍生化往往是最后才选择的手段。柱前或柱后反应的引入增加了分析的复杂性以及误差来源，也增加了分析的总时间。尽管这些步骤可自动进行，操作者必须确保衍生步骤定量（如需要的话），无其它杂质带入分析中。尽管衍生化有许多缺陷，但仍可用来解决特定的分离或检测问题。

4.7.1 可检测性

与 GC 不同，GC 一般用衍生化来改善被测物的挥发性或改变其极性，HPLC 衍生化（除了 4.7.3 节中的手性分析）主要用来提高被测物的可检测性。HPLC 有多种分离模式（即正相、反相、手性、离子色谱），和多种固定相与流动相改性剂，可利用这些手段使化学吸附、解吸附和拖尾问题降至最低。

选择 HPLC 衍生化方法，提高检测能力的首要考虑是决定哪一种检测方法最好。另外，需要选择柱前还是柱后衍生（见 4.7.2 节）。许多种类的化合物能进行衍生化反应（见表 4－15），包括酸类、生物碱类、胺类、抗生素类、巴比妥类以及有关的化合物，羟基和甾类化合物[79、82]。

最常用的衍生化类型有两种—加入发色团或荧光团—使正常形式不能被检测的被测物能够进行检测，或提高其灵敏度。而且，有几种衍生试剂可用电化学检测[78]。选择衍生试剂时总的考虑是[80]：

1. 衍生试剂必须稳定
2. 衍生化中，衍生试剂与生成的付产物应检测不到，否则必须可与被测物分离开
3. 被测物与衍生试剂发生反应的条件不能太苛刻
4. 如有可能，试剂应无毒
5. 步骤应适于自动化

许多有机反应能用于被测物的衍生化。然而，在日常应用中，最好的方法是选择合适的衍生试剂，用制备好的衍生化试剂盒，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 4－15　官能团与衍生试剂[83]

官能团	发色试剂[a]	荧光试剂[b]
羧酸、脂肪酸、磷酸	PNBDI	BrMaC
	DNBDI	BrMmC
	PBPB	
醇类	DNBC	
	Dabsyl－Cl	
	NIC－1	
酚类、酮类	PNBA	Dansyl hydrazine
	DNBA	
胺类		Fluorescamine
1°		OPA
1°与 2°	DNBC	DBD－Cl
	SNPA	NBD－F
	SDNPA	
	Dabsyl－Cl	
氨基酸(肽)	SBOA	Fluorescamine
	SDOBA	OPA
	Dansyl－Cl	NBD－Cl
		NBD－F
		Dansyl－Cl
异氰酸酯	PNBPA	
	DNBPA	
苯酚	NDBC	NBD－Cl
	Dabsy－Cl	NBD－F
	NIC－1	Dansyl－Cl
硫醇类	Dabsy－Cl	NBD－Cl
		NBD－F
		OPA

发色试剂的缩写：Dabsyl－Cl，4－二甲基胺偶氮苯－4－亚磺酰基；DNBA，3，5－二硝基苄基羟胺盐酸盐；NIC－1，1－萘异氰酸酯；PBPB，溴化对－溴苯甲酰甲基；PNBA，对－硝基苄基羟胺盐酸盐；PNBDI，对－硝基苄基－*N*，*N'*－二异丙基异脲；DNBDI，3，5－二硝基苄基－*N*，*N'*－二异丙基异脲；PNBPA，对硝基苄基－*N*－正丙酸盐酸盐；DNBPA，3，5－二硝基苄基－*N*－正丙酸盐酸盐；SAPA，*N*－琥珀酰亚胺基－对－硝基苯醋酸酯；SDNPA，*N*－琥珀酰亚胺基－3，5－二硝基苯醋酸酯；DNBC，3，5－二硝基氯苄。

荧光试剂的缩写：NBD－Cl，7－氯－4－硝基苯并－2－氧杂－1，3－二唑；NBD－F，7－氟－4－硝基苯并－2－氧杂－1，3－二唑；fluorescamine，4－苯基〔呋喃－2(3H)〕，1'－邻羟甲基苯甲酸－3，3－二酯；OPA，α－邻苯二醛；Dansyl－Cl，5－二甲氨基萘－1－磺酰氯；BrMmC，4－溴甲基－7－甲氧基香豆素；BrMaC，4－溴甲基－7－乙氧基香豆素。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

按照说明书逐步进行，已有数种商用试剂与衍生方法可供选择(如美国伊利诺斯州 Morton Grove 的 Regis 技术公司和宾西法尼亚州的 Supelco Bellefont 公司)。

4.7.1.1 UV 检测 一般来说，用于 UV－可见检测的试剂有两种重要的官能团。第一种用于控制试剂与被测物反应，第二种用于 UV 检测。发色团应具有较大的摩尔吸收值，其吸收谱带能用于尽量提高检测，使背景噪音变小。表 4－16 列出了一些常用于 UV 检测的发色团，以及它们的最大吸收波长和在 254nm 处的摩尔吸收系数[80]。摩尔吸收系数达到 10000 以上的试剂能够在纳克(ng)级范围内检测[78]。表 4－15 列出了一些已上市的用于 UV 检测的衍生试剂。能衍生化的被测物官能团也在表中列出。

表 4－16 能提高 UV 检测的有关发色团[81]

发色团	最大吸收波长(nm)	254nm 处的摩尔吸收系数
苯甲基(苄基)	254	200
4－硝基苄基	265	620
3,5－二硝基苄基	—	> 10000
苯甲酸酯(或盐)	230	低
4－氯苯甲酸酯	236	6300
4－硝基苯甲酸酯	254	> 10000
2,4－二硝基苄基	—	> 10000
甲苯酰基	236	5400
甲氧苯(苄)基	262	16000
苯甲酰甲基	250	10000
4－溴苯甲酰甲基	260	18000
2－萘	248	12000

4.7.1.2 荧光检测 荧光衍生化试剂除了衍生试剂的以上考虑外，还需要具有强吸收谱带和量子效率大的荧光团[79]。由于需有强荧光相应的特殊性质，可用的荧光衍生试剂类型较检测衍生试剂要少[78](见表 4－16)。荧光检测选择性的一个示例为生物样品中儿茶酚胺的衍生化。常用于氨基化合物的衍生试剂不能

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

为儿茶酚胺提供足够的反应选择性。研究发现三羟基吲哚(THI)，乙烯二胺(ED)和1，2－二苯乙烯二胺(DPE)与儿茶酚胺反应有高度的选择性(见图4－17)。THI的选择性最大，但不能与多巴胺产生荧光。从实际应用看，选用DPE较好，由于它是所有儿茶酚胺检测最灵敏的方法。已用于测定人血浆胺(图4－18)[84]。分离可在反相柱上进行，并需用阳离子交换固定相萃取管进行简单的预处理清洗步骤[85]。

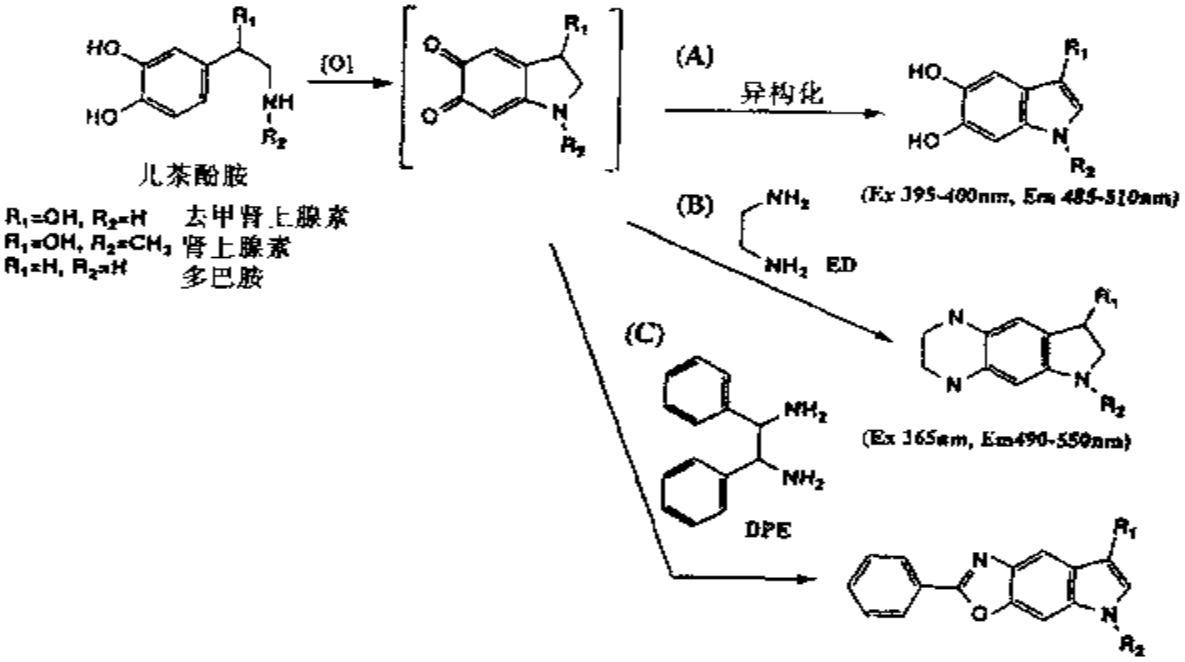


图4－17　儿茶酚胺的荧光反应[80]

(A)THI的生成；(B)乙二胺；(C)DPE试剂

4.7.2 柱前与柱后衍生化

4.7.2.1 柱前衍生。柱前衍生与柱后衍生相比较，有受仪器和反应化学限制较少的优点；被测物可先衍生化，然后再对样品进行分析。柱前衍生既可人工操作也能自动进行。已有几家分析仪器或机器人的生产厂家可提供自动的柱前衍生化装置。假如所有试剂、被测物及衍生化的产物均稳定，则对衍生反应时间没有

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

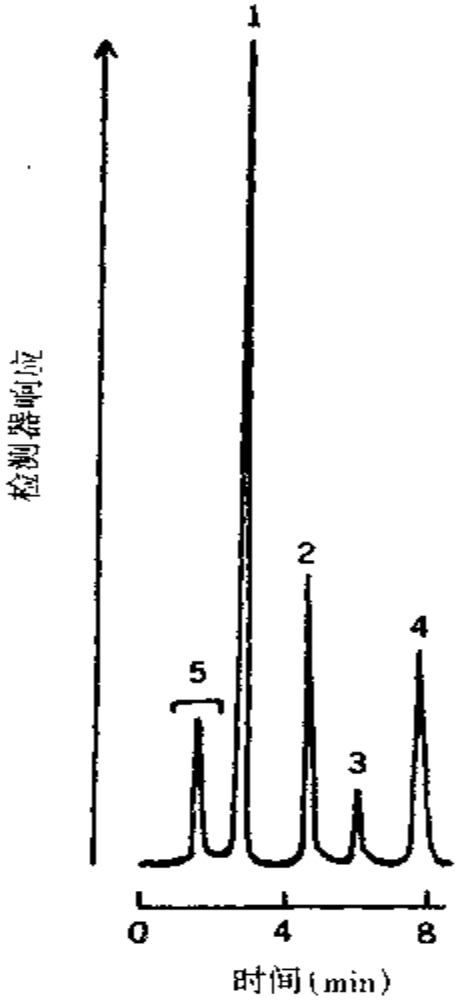


图 4－18　人血浆中儿茶酚胺 DPE 衍生物的色谱图[84]

色谱柱：TSK 凝胶 ODS－120T(5μm；150×4.6mm ID)；流动相：ACN－MeOH－50mM tris－盐酸缓冲液(pH 7.0)(5:1:4 v/v/v)。

峰号为(括号中为浓度:pmol/mL 血浆):1,去甲肾上腺素(1.72);2,肾上腺素(0.56);3,多巴胺(0.21);4,异丙肾上腺素(内标,0.5)

动力学方面的限制。可用本章所描述的样品制备步骤除去不需要的副产物及样品干扰物，如有必要，也可改变样品溶剂使之与 HPLC 的流动相兼容[79,80]。

柱前衍生的缺点是通过吸附、不希望的副反应、可能的样品降解、样品转移步骤和反应的不完全等带入污染物，使被测物受影

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

响。而且，衍生化需要时间，增加了方法的复杂性并导致方法精度降低。

4.7.2.2 柱后衍生。柱后衍生化一般在被测物分离后，送入反应检测器中完成。反应检测器的设计需考虑样品在反应系统中的扩散[79]。三种最常见的模式是毛细管、填充床和空气流化床，分别用于快速（<1min）、慢速（1 ~ 5min）和极慢速（5 ~ 20min）的衍生化反应。柱后衍生的主要优点是人为因素少；只要重现性好，不影响被测物的色谱行为，完全反应与否不很重要。

柱后衍生化的缺点是所有谱峰（除了反应极快的）都发生扩散、展宽，使方法建立和日常应用复杂化。应考虑动力学限制（反应完全的最长时间为 30min）及流动相和衍生试剂之间的相容性问题。确保试剂与流动相兼容也为 HPLC 方法的建立增加了难度，因为考虑衍生化要求的同时，还要考虑分离，而分离最好的流动相可能与最佳的衍生反应不相容[78]。

4.7.3 用衍生化进行手性分析

与非手性分离的衍生化不同，手性衍生的主要应用不是改善检测，而是增强分离。手性化合物用非衍生手段分离在第12章中详加讨论。最早的手性分离方法是采用衍生化方法[86]。因此有丰富的信息资料可供参考，表4－17所示为能衍生化的几个官能团。手性分析的关键是光学活性的目标分子与光学活性试剂之间的反应能力。目前，手性衍生化已应用于反相和正相 HPLC。

衍生化手性分析的优点和限制因素见表 4－18。

表 4－17　手性分析的官能团及其衍生物[79]

官能团	衍生试剂
氨基	胺、氨基甲酸酯、脲、硫脲、硫酰胺
羟基	酯、羧酸、碳酸酯、氨基甲酸酯
羧基	酯、胺
环氧化物	异硫氰酸酯、烯烃（手性铂络合物）
硫醇	硫酯

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 4－18　衍生化手性分析的特性

优　　点	缺　　点
该技术已被广泛研究，有丰富的信息，技术简便、快捷	对非对映异构体，有关化合物必须分离后，再衍生化，自动化困难
该方法可用标准 HPLC 担体和流动相	衍生试剂的纯度是关键，由于存在对映体污染，可能产生错误的测定结果
如检测存在问题，检测与分离衍生化可一步完成	不同反应速率和/或平衡常数得出的结果不能提供真实的对映体比率
	样品处理期间，有可能使样品发生外消旋

除了手性化合物的衍生化，应用手性试剂也能增加手性固定相（CSP）对手性被测物的选择性。一些化合物没有足够明显的在 CSP 上获得足够的分离结合点，与手性试剂衍生化可使它们分离开[83]。表 4－19 列出了用于分离的 CSP 可选择的官能团和对应试剂。直接手性分离的深入讨论见第 12 章。

表 4－19　官能团与手性试剂[a][83]

官能团	电子受体 CSP	电子给体 CSP
羧酸	NMA－1	DNA
醇类	NIC－1	ICDNA
		DNBC
胺类	NIC－1	ICDNA
	NIC－2	DNBC
氨基酸	NC－2	DNBC
硫醇类	NIC－1	ICDNA
		DNBC

[a] 缩写见表 4－15

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

参考文献

1. P. M. Gy, *Sampling of Heterogeneous and Dynamic Material Systems*, Elsevier. Amsterdam, 1992.
2. R. Smith and G. V. James, *The Sampling of Bulk Materials*, Royal Society of Chemistry, London, 1981.
3. L. H. Keith, ed.. *Principles of Environmental Sampling*, American Chemical Society, Washington, DC, 1988.
4. D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 4th ed., W. H. Freeman, New York, 1994.
5. R. E. Majors, *LC/GC*, 9(1) (1991) 16.
6. L. R. Snyder and S. Van der Wal, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 877.
7. C. M. Druzik, D. Grosjean, A. Van Neste, and S. Parmar, Int. J. Environ. *Anal. Chem.*, 38 (1990) 495.
8. M. Hiatt, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4044.
9. L. R. Snyder, *Chemtech*, 9 (1979) 750.
10. L. R. Snyder, *Chemtech*, 10 (1980) 188.
11. T. S. Ma and V. Horak, *Microscale Manipulations in Chemistry*, Wiley, New York, 1976.
12. N. B. Mandava and Y. Ito, eds., *Countercurrent Chromatography: Theory and Practice*, Marcel Dekker, New York, 1988.
13. R. E. Majors and K. D. Fogelman, *Amer. Lab.*, 25(2) (1993) 40W.
14. W. F. Lane and R. C. Loehr, *Environ. Sci. Technol.*, 256(5) (1992) 983.
15. D. Barcelo, *Analyst*. 116(7) (1991) 681.
16. P. D. MacDonald and E. S. P. Bouvier, eds., *Solid Phase Extraction Applications Guide and Bibliography*, Waters Corp., Milford, MA, 1995.
17. F. X. Zhou, J. M. Thorne, and 1. S. Krull, *Trends Anal. Chem.*, II (1992) 80. 18. D. R. Green and D. Le Pape, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 699.
19. A. Alfred – Stevens and J. W. Eichelberger, in *Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water (Supplement 1)*, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of R&D, U. S. EPA, Cincinnati, OH, 1990, pp. 33 – 63.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

20. *3M Empore Extraction Disks Method Summary*: Phenols, Publication 78 – 6900 – 3714 – 4 (113.05) Rl. 3M Corporation, St. Paul, MN, 1994.
21. *3M Empore Extraction Disks Method Summary*, EPA Method 552.1: Haloacetic Acids and Dalapon in Drinking Water, Publication 78 – 6900 – 373 – 4 (113.05) Rl. 3M Corporation, St. Paul, MN, 1994.
22. *3M Empore Extraction Disks Method Summary: Pesticides and Polychlorinated Biphenyls*, Publication 78 – 6900 – 3715 – 1 (113.05) Rl, 3M Corporation, St. Paul, MN, 1994.
23. C. M. Hearne and D. O. Hall, *Amer. Lab.*, 25(1) (1993) 28H.
24. C. Markell, D. F. Hagen, and V. A. Bunnelle, *LC/GC*, 9 (1991) 332.
25. *Application Note/Information Package 413087*, Supeico Inc., Bellefonte, PA, 1996.
26. R. Shirey, *Advances and Applications of Solid Phase Microextractions (SPME)*, paper 23602 at Analytica, Munich, Germany, 1996, pp. 23 – 26.
27. B. A. Bidlingmeyer, *Liq. Chromatogr.*, 2 (1984) 578.
28. T. A. Dirksen, S. M. Price, and S. J. St. Mary, *Amer. Lab.*, 25(18) (1993) 24.
29. G. E. Platoff and J. A. Gere, *Forens. Sci. Rev.*, 3 (1991) 117.
30. V. Dixit and V. M. Dixit, *J. Liq. Chromatogr.*, 14(14) (1991) 2779.
31. R. – C. Hsu, I. Biggs, and N. K. Saini, *J. Agric. Food Chem.*, 39 (1991) 1658.
32. X. – H. Chen, J. – P. Franke, K. Ensing, J. Wijsbeek, and R. A. De Zeeuw, *J. Chromatogr.*, 613 (1993) 289.
33. R. E. Majors, *LC/GC*, 7 (1989) 92.
34. M. F. W. Nielen, A. J. Falk, R. W. Frei, U. A. T. Brinkman, P. Mussche, R. De Nijs, B. Ooms, and W. Smink, *J. Chromatogr.*, 393 (1987) 69.
35. R. E. Majors, *LC/GC*, 11(5) (1993) 336.
36. *Applications Bibliography*, Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, 1992.
37. *BakerBond SPE Bibliography*, J. T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, 1994.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

38. R. Bland, *Proceedings of the 3rd Annual International Symposium on Sample Preparation and Isolation Using Bonded Silicas*, Analytichem International, Harbor City, CA, 1986, pp. 93 – 116.
39. K. C. Van Home, ed., *Sorbent Extraction Technology*, Analytichem International, Harbor City, CA, 1985, p. 125.
40. M. Zief and R. Kiser, *Amer. Lab.*, 22(1) (1990) 70.
41. L. Jordan, *LC/GC*, 11(9) (1993) 634.
42. E. S. P. Bouvier, *LC/GC*, 13(11) (1995) 852.
43. G. M. Greenway, N. Kometa, and R. Macrae, *Food Chem.*, 43 (1992) 137.
44. D. C. Turnell, J. D. H. Cooper, B. Green, G. Hughes, and D. J. Wright, *Clin. Chem.*, 34 (1988) 1816.
45. J. A. Jonsson and L. Mathiasson, *Trends Anal. Chem.*, 11(3) (1992) 106.
46. G. Audunsson, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2714.
47. L. Mathiasson, G. Nilve, and B. Ulen, Int. J. Environ. *Anal. Chem.*, 45 (1991) 117.
48. M. Knutsson, *Sampling and Sample Preparation of Polar Pollutants in Complex Matrices Especially Using Supported Liquid Membranes*, Ph. D. thesis, Analytical Chemistry, Univ. of Lund, Sweden, 1995.
49. M. C. Linhares and P. T. Kissinger, *Trends Anal. Chem.*, 11(5)(1992)171
50. B. H. C. Westerink, *Trends Anal. Chem.*, 11(5) (1992) 176.
51. M. C. Linhares and P. T. Kissinger, *Pharm. Res.*, 10(4) (1993) 598.
52. T. Buttler, H. Jarskog, L. Gorton, G. Marko – Varga, and L. Rannemark, *Amer. Lab.*, 26(12) (1994) 281.
53. E. M. Janie and P. T. Kissinger, *AACC TDM/ToxicoL*, 14(7) (1993) 159.
54. D. C. Turnell, J. D. H. Cooper, B. Green, G. Hughes, and D. W. Wright, *Clin. Chem.*, 34 (1988) 1816.
55. M. M. L. Aerts, W. M. J. Beek, and U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 435(1988) 97.
56. D. C. Turnell and J. D. H. Cooper, *J. Chromatogr.*, 395 (1987) 613.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

57. F. Mangani, A. Cappiello, G. Crescentini, F. Bruner, and L. Bonfanti, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2066.

58. L. G. Randall, W. S. Miles, F. Rowland, and C. R. Knipe, *Designing a Sample Preparation Method Which Employs Supercritical Fluid Extraction (SFE)*, Publication 43 5091 – 2120E, Hewlett – Packard, Wilmington, DE, 1994.

59. M. McHugh and V. Krukonis, *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworth, Stoneham, MA, 1987.

60. S. B. Hawthorne, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 633A.

61. M. Verschueere, P. Sandra, and F. David, *J. Chromatogr.* Sci., 30 (1992) 388.

62. M. D. Buford. S. B. Hawthorne, and D. J. Miller, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1497.

63. S. B. Hawthorne, "Factors Controlling Supercritical Fluid Extraction of Organic Pollutants," paper presented at the 7th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Lund, Sweden, May 7 – 10, 1995.

64. H. – B. Lee, T. E. Peart, and R. L. Hong – You, *J. Chromatogr.*, 605(1) (1992) 109.

65. D. R. Gere and E. M. Derrico, *LC/GC*, 12 (1994) 352.

66. D. R. Gere and E. M. Derrico, *LC/GC*, 12 (1994) 432.

67. B. W. Renoe, *Amer. Lab.*, 26 (1994) 34.

68. E. Hasty and R. Revesz, *Amer. Lab.*, 27(4) (1995) 66.

69. V. Lopez – Avila, R. Young, and W. F. Beckert, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1097.

70. J. R. J. Pare, J. M. R. Belanger, and S. Stafford, *Trends Anal. Chem.*, 13 (4)(1994) 176.

71. F. I. Onuska and K. A. Terry, *Chromatographia*, 36 (1993) 191.

72. B. E. Richter, J. L. Ezzell, W. D. Felix, K. A. Roberts, and D. W. Later, *Amer. Lab.*, 27(4) (1995) 24.

73. J. L. Ezzell, B. E. Richter, W. D. Felix, S. R. Black, and J. E. Meikie,

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

LC/GC, 13(5) (1995) 390.
74. *ASE Application Note 321*, Dionex, Salt Lake City, UT, 1996.
75. *ASE Application Note 322*, Dionex, Salt Lake City, UT, 1996.
76. J. Lankelma and H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 587.
77. D. L. Conley and E. J. Benjamin, *J. Chromatogr.*, 257 (1983) 337.
78. C. F. Poole and S. K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
79. S. Ahuja, *Selectivity and Detectability Optimization in HPLC*, Wiley, New York, 1989.
80. I. W. Wainer, *Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development*, Astel Publishing, Springfield, OR, 1985.
81. B. King, and G. S. Graham, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden Philadelphia, 1979.
82. S. Ahuja, *J. Chromatogr.* Sci., 17 (1979) 168.
83. *Regis Chromatography Catalog/Guide*, Regis Technology, Inc., Morton Grove IL, 1993.
84. A. Mitsui, H. Nohta, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, 344 (1985) 61.
85. Y. Ohkura, M. Kai, and H. Nohta, *J. Chromatogr.* B. 659 (1994) 85.
86. J. Gal, *LC/GC*, S (1987) 106.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第5章　色谱柱

5.1 引言

色谱柱是 HPLC 分离过程的核心。一支稳定、高效的色谱柱对建立普适性强、重现性好的方法是必不可少的。不同供应商的色谱柱，甚至来源相同、认为完全一样的色谱柱之间，可能也会存在很大差异，尤其是不同的色谱柱在塔板数、谱峰的对称性、保留值、峰间距以及使用寿命方面会有所不同，而这些不同对建立理想的 HPLC 方法会产生很大影响。本章中，我们将提供一些有关色谱柱担体、固定相及柱填料的信息供读者参考；讨论色谱柱应用中的问题，以及适宜的解决方案，以确保方法普适性强、重现性好，同时也讨论了在常规 HPLC 分析中，为获得最佳结果，一支“好”色谱柱的重要意义。

选择 HPLC 柱时，大多数使用者都认为柱间的重现性是方法建立中极为重要的因素[1]。色谱工作者不愿在校准了一具体系统后，又不得不为一新色谱柱再重新建立 HPLC 方法。一些生产厂能在一定程度上保证柱性能指标的重现性，如色谱柱塔板数（N），特定样品与条件下的选择性，反压（压力降），特定测试溶质的保留值（k）。因此，对许多使用者来说，生产优质产品的厂家的信誉很重要。价格对一些用户是重要的因素，但上述讨论的其他因素在建立一个普适性强、令人满意的方法时往往更加重要。色谱柱价格在建立和应用普适性强、可靠的 HPLC 方法的整个费用中，仅占

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

一小部分(见 5.3 节)。

5.2 色谱柱与柱填料的特性

5.2.1 柱填料

大多数用于 HPLC 分离的柱填料使用硅胶微粒(作担体)。基于多孔聚合物担体或其它材料的色谱柱也已商品化，这些非硅胶填料由于有其特殊的应用，以后再作讨论。由于硅胶担体与键合的有机表层(如 C_{18} 或 C_8),应用范围广[1],我们将作重点讨论。

图 5－1 所示为 HPLC 中常用的几种微粒类型。由于全多孔微球很好地兼顾了众多理想的性质：效能、样品荷载量、耐久性、方便性以及有效利用率等,所以最为常用。这些微粒有不同的粒径、孔径和表面积供选择,所以用这些物质能建立各类 HPLC 方法。

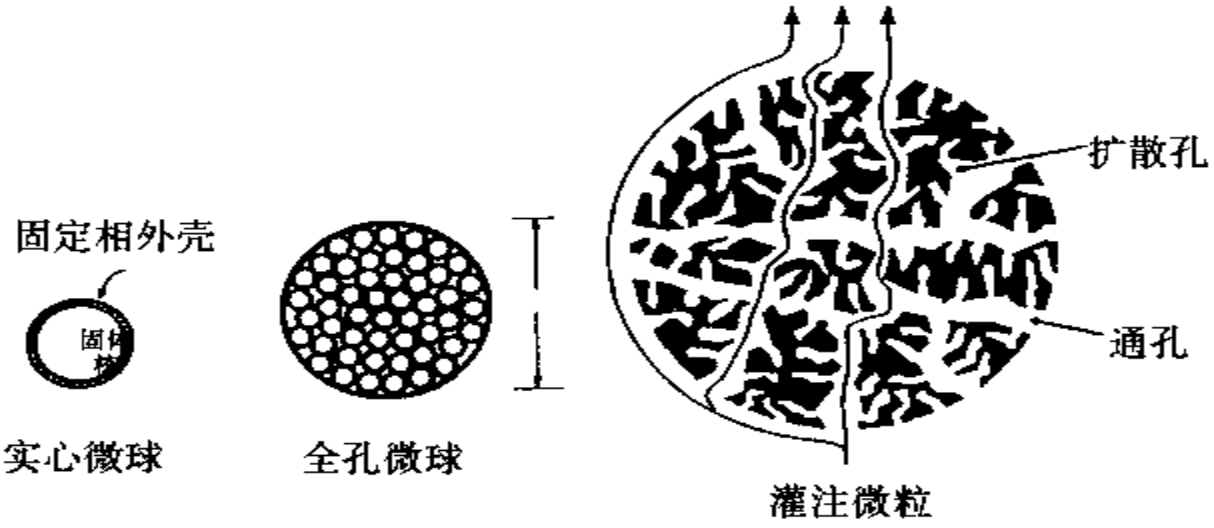


图 5－1 HPLC 的微粒类型(图示大致为所用微粒的相对大小)。

实心微球型微粒固定相有一实芯核，起作用的是其表面很薄的外壳。这些硅胶或聚合物基质的微粒,通常为 1.5～2.5μm,因为其快速传质的动力学过程,对大分子有突出的分离效能[2,3]。因为这些实心超小微粒的表面积较小，样品容量有限，所以仅适于

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

分析型 HPLC。这种超小微粒的色谱柱能产生极为尖锐（小体积）的峰，因此要求所用 HPLC 仪器的柱外峰展宽因素极小，以避免峰展宽。

灌注色谱填料包含孔径达 4000～8000Å 的贯穿孔，而且在这些贯穿孔网络中还有较小的内联孔（如 300～1000Å）。在高流速时，溶质可通过对流和扩散的共同作用，进入（并离开）该孔结构[4]。其效果减少了峰展宽，所以大的多孔微粒在柱效方面与小微粒相当，但压力降却小得多。目前这种类型填料的使用还较少，因此，其实用性还有待于进一步探讨。不过，这种填料似乎非常适于大分子如蛋白质的制备分离，用于小分子的日常分析分离则较少。

颗粒大小（粒度）在 HPLC 中极为重要。约 5μm 的微粒直径很好地兼顾了分析柱的柱效、反压和寿命。更小的多孔微粒（如 3μm）对快速分离很有用。小至 1.5μm 的薄壳微粒对极快速地分离蛋白质等大分子较有用[2, 3]。较窄的粒度分布（ <±50% 均值）能保证填充床的稳定、高效和压力降最小。总的说来，3 或 5μm 全多孔微球填充 HPLC 色谱柱，能满足大多数分离的需要，我们推荐大多数的方法建立用这些粒度的色谱柱。

表 5－1 总结了 HPLC 分析用微粒的理想的物理特性，以及它们的重要性。一般使用 7～12nm（70～120Å）孔径的全多孔微粒。表面积 150～400m^2/g 的全多孔微粒分离小分子较有利。表 5－2 列出一些小 C_{18} 商品柱的典型物理性质。对于分子量大于 10000Da 分子的分离，需用孔径大于 15nm 的微粒，使这些溶质容易进入到微孔结构内部的活性表面。各种情况下，都应保证溶质在微孔里能迅速扩散与柱效良好。孔径至少是溶质流体动力学直径的四倍，才能确保溶质的有限扩散不至于使柱效下降[6]。大孔微粒的比表面积有 10～150m^2/g 不等，取决于微孔直径的大小；孔径越大表面积越小。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 5－1　HPLC 分析柱的理想的微粒特性

特　　性	用　　途
5μm 全多孔微粒	大多数分离
3μm 全多孔微粒	快速分离
1.5μm 薄壳微粒	极快速分离(尤其是大分子)
±50%(均值的)粒度分布	稳定、重现、高柱效，柱压低
7～12nm 孔径，150～400m^2/g(小孔)	小分子分离
15～100nm 孔径，10～150m^2/g(大孔)	大分子分离

表 5－2　一些 C_{18} 色谱柱硅胶担体的物理性质[5]

色谱柱	孔直径(nm)	表面积(m^2/g)	体积孔隙率%(mL/mL)
Hypersil ODS	12	170	57
LiChrosorb C_{18}	10	355	71
Novapak C_{18}	6	——	——
Nucleosil C_{18}	10	350	69
Symmetry C_{18}	10	335	66
Zorbax ODS	6	300	5
Zorbax Rx，SB，XDB	8	180	50

5.2.1.1 硅胶填充微粒　如前所述，硅胶基质是目前最为常用的 HPLC 柱填料。这主要是基于硅胶担体良好的物理特性。通过控制全多孔硅胶微粒的制作工艺，能够得到平均孔径变化范围宽（如 8、30、100μm）、孔径分布范围窄和粒度选择性较大（如 10、5、3μm）的填料。能满足大、小分子的分析及制备。大多数硅胶微粒的突出优点是它们的机械强度很高，这一点可保证填充床长时间在很高的操作压力下工作，柱效保持稳定。刚性、高强度的微粒还使柱的反压较低，寿命较长[7]。在用于制作 HPLC 填料的材料中，硅胶基质色谱柱的柱效最高，这也是其重要优点之一。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

球形与不规则形硅胶微粒在色谱中均有使用，但球形微粒具有一些特有的优点。球形微粒强度高，更易装填成高效柱，重现性好。不规则形微粒填充柱开始时与相同粒度的球形柱的柱效相当，但使用中往往会产生较高的反压（由于不规则形微粒的破碎，产生“细粉”）。因为价格低与其它的考虑，不规则形大微粒广泛应用于制备与处理（见第 13 章）。

硅胶担体的表面性质极为理想，在于其表面能通过化学改性（修饰）引入种类繁多的、具有不同官能团的键合相。硅胶基质填料与水及所有有机溶剂兼容，在更换溶剂时，填料的大小不会变化（如溶胀）。这种特性使填充床在用各种类型溶剂时以及使用梯度洗脱期间，仍能保持稳定。

作为 HPLC 色谱柱的担体，硅胶并非完美无缺。在高 pH 时硅胶能够溶解[8]。要获得满意的使用寿命，不应在 pH 8 以上使用某些硅胶基质的色谱柱（即通常用可溶性硅酸盐沉淀制成的所谓“Sol－gel”氧化硅胶或干凝胶类型）。然而，基于聚集硅溶胶制得硅胶微粒的色谱柱（称为溶胶凝胶型），至少可在 pH 9 条件下操作[5]。pH> 9 时，硅胶担体能迅速溶于某些流动相中，最终造成填充柱床塌陷，伴随柱效的骤然下降，峰不对称性加剧。（有时，在特定流动相条件下，一些溶胶－凝胶型硅胶基质填充色谱柱能在 pH 11 下工作，结果良好；见 5.2.3.4 节。）硅胶基质的另一个缺点是其表面的酸性，不适宜分离碱性化合物。幸运的是，如下所讨论，新型的高纯硅胶担体的酸性较弱，能最大限度地减小分离碱性溶质时存在的问题。

HPLC 球形多孔硅胶的合成，可采用一些不同方法[9]。图 5－2 所示为一些商品硅胶微粒的外观比较（表面形貌，形状和粒度分布）。由于其表面积、纯度、孔径分布和表面化学的不同，会表现出不同的色谱性能。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

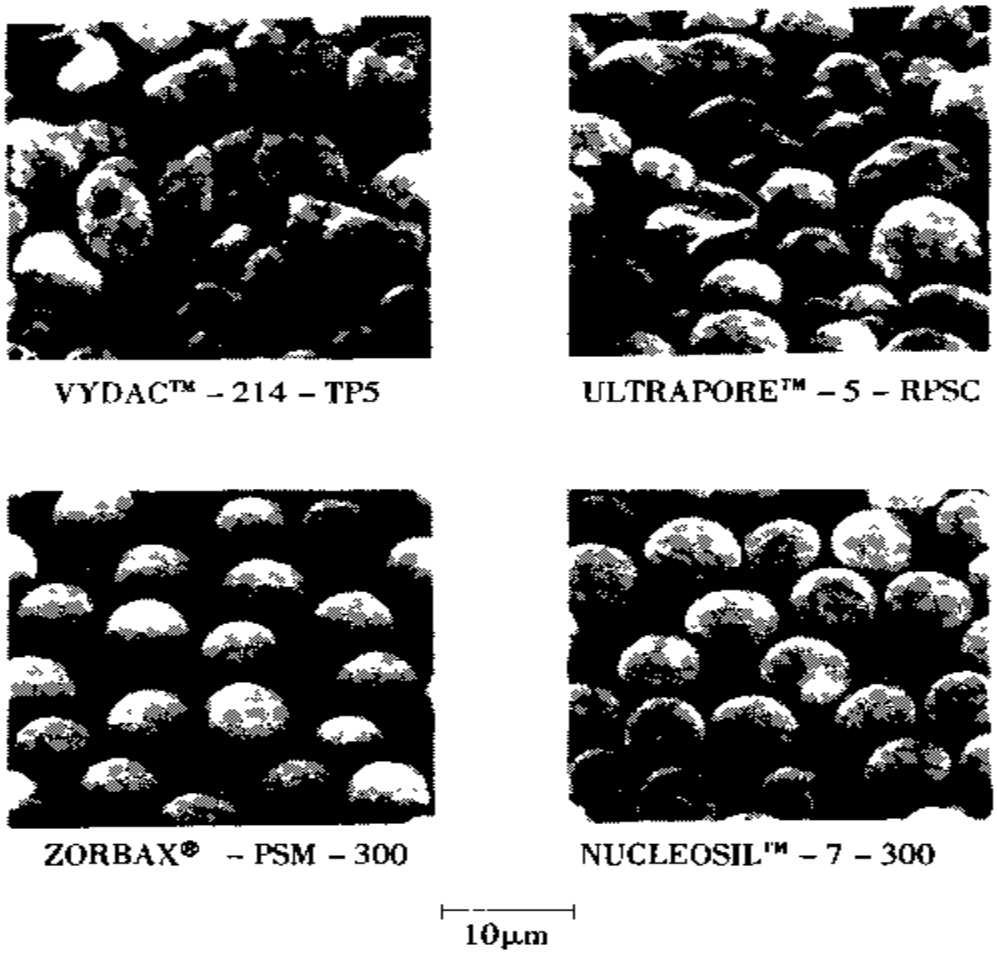


图 5-2 一些多孔硅胶微粒的透射电镜照片。[10]

未改性硅胶表面化学性质随制备条件而变化，文献中已有讨论[11-14]。水合硅胶含有硅羟基表层（-SiOH）。加热高于 800℃时，这些硅羟基大部分会被脱掉，在 HPLC 中已无使用价值。用于 HPLC 的硅胶应完全羟基化，水合硅胶表面的硅羟基最大浓度约为 8μmol/m²，这时使用效果最佳。

如图5-3所示，水合硅胶的表面含有不同种类的硅羟基。如图5-3上图所示，硅羟基一般有三种存在类型[11,13,15]。这些不同类型的硅羟基可用幻角自旋（MAS）的^{29}Si NMR 法[16]与付里叶变换的漫反射红外光谱法（DRIFT）[11]进行鉴别并测定。自由或孤立（无氢键

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

键合)的硅羟基一般产生于低浓度中,这些自由硅羟基由于其酸性很强,能与碱性溶质产生强烈无益的结合。因此,含自由、酸性硅羟基浓度高的硅胶往往使碱性样品的保留值增加,峰变宽、拖尾。

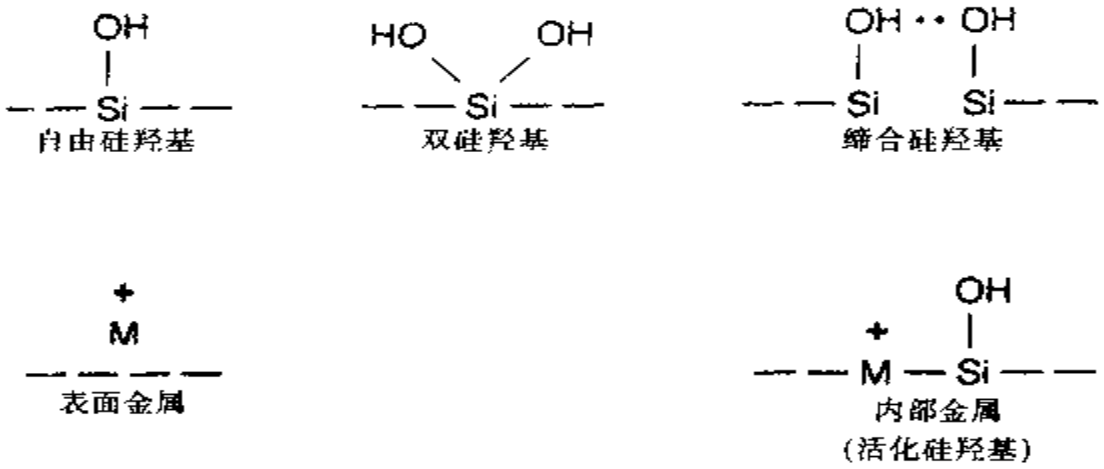


图 5－3 HPLC 硅胶担体的表面

完全羟基化的硅胶基质填料，具有最高浓度成对的与缔合的硅羟基(见图 5－3),最有利于碱性化合物的色谱分离。这些硅胶表面的成对硅羟基浓度往往很大（见图 5－3），有时可达总数的 25～30%。成对的硅羟基的酸性比自由硅羟基的弱，一般分离碱性溶质较“顺利”。完全羟基化的 HPLC 硅胶缔合的或氢键键合的硅羟基浓度最高，所以最理想。硅羟基酸性小，分离碱性溶质较“顺利”。一些商品硅胶填料为部分羟基化状态[11],填料通常酸性较强,不适于分离碱性化合物。

硅胶担体的纯度对许多极性化合物的分离也极为重要。如图 5－3 下图所示,某些硅胶被一定金属污染(Fe、Al、Ni、Zn 等)。这些金属杂质能与螯合溶质络合，引起不对称或拖尾峰，甚至化合物完全被保留,不能洗脱出。硅胶晶格中的其他金属(尤其是铝)能使表面硅羟基活性增强,酸性增强[17]。因此,许多 HPLC 分离,尤其是碱性与强极性化合物需用高纯硅胶。有些硅胶的纯度极高,如表 5－3 中分析的一种类型所示[5]。用色谱试验来说明硅胶表面

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 5－3　用 ICP－AES/MS 法分析 Zorbax Rx－SIL 硅胶的典型微量元素[18]

元　　素	含量[a](ppm)
Na	10
Ca	2
K	<3
Al	1.5
Fe	3
Mg	4
Zn	1

[a]　总量：<35ppm(未检出其它元素，<1ppm)；99.995%。

酸性与螯合或络合效应已有报道[15,18]。

有些色谱用硅胶，按它们作为色谱柱担体分离碱或酸性化合物的理想程度，被评定分级。过去的纯度不高的酸性硅胶（称 A 型硅胶），能用于分离中性和非电离的化合物。新型的高纯度的弱酸性硅胶（称 B 型），一般对离子或可电离的化合物，尤其是碱性物质分离较好。表 5－4 列出了一些可用于分离碱性化合物的新型硅胶名单(以字母顺序排列)。随着使用者与生产商对这些高纯度硅胶制成的色谱柱优点的认识，表 5－4 还会继续快速增长。图 5－4 比较了用 C_{18} 柱分离碱性药物的一些情况，有的为 A 型硅胶，有的为 B 型硅胶作基质。以弱酸性硅胶为担体的色谱柱（B 型）表现出优良的谱峰形状与柱效。用不同的硅胶担体往往会使化合物的保留值、峰间距与峰拖尾有很大的差异。减小这些差异的技术将在 7.3.3 节中进行讨论。基于 B 型硅胶所表现出的特殊优势（见表 5－4），将来有可能需要在大多数的 HPLC 方法建立中使用（包括碱性与非碱性样品）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

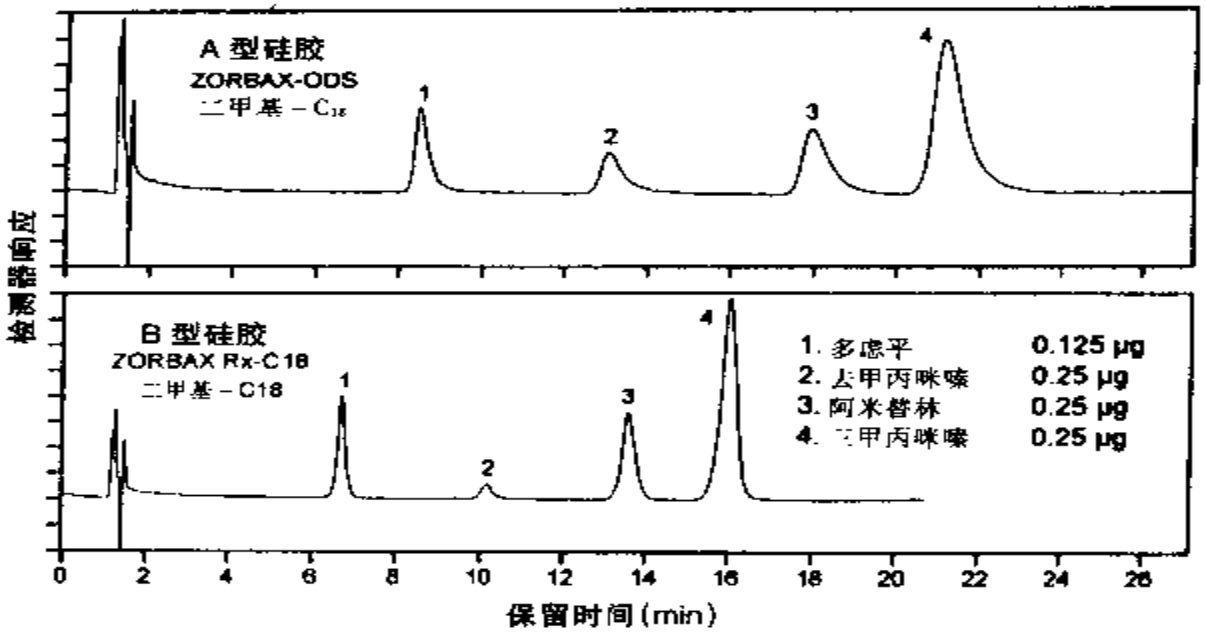


图 5－4 以 A 型与 B 型硅胶担体的色谱柱分离三环抗抑郁药的比较[19]。色谱柱：15×0.46cm；流动相：乙腈－0.025M 磷酸钠缓冲液(30:70)，pH 2.5 ＋三乙胺与三氟醋酸各0.2%；流速：1.0mL/min；40℃；254nm 检测；进样 5μL。

表 5－4 推荐用于分离碱性化合物的一些硅胶基质担体与色谱柱[20-23]

Altima	RSIL
Betasil	Supelcosil ABZ＋
DeltaBond	Supersphere RP
Encapharm RP	Symmetry
Hypersil－DBS	Synchropak RP－SCD
Inertsil	Techsphere－BDS
Kromasil	Vydac
LiChrospher Select B	YMC－Basic
Nucleosil AB	Zorbax Rx，SB，XDB

5.2.1.2 多孔聚合物 用多孔聚合微粒填充的色谱柱也可用于 HPLC。这些聚合微粒中有些(如聚苯乙烯)是疏水性的，可直接用于反相分离，而不需添加表面涂层。用于反相 HPLC 的大多数聚合微粒由二乙烯基苯交联的聚苯乙烯制成，类似于那些用作离

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

子交换剂的树脂。其它聚合物微粒，如取代异丁烯酸与聚乙烯醇，也已经商品化，但用得还不多。全多孔与薄壳型微粒均有。与硅胶担体一样，孔径较小的多孔聚合微粒用于小分子溶质，孔径较大的用于大分子的分离。多孔聚合物的主要优点是在 pH 1～13均可用。这些色谱柱能在高 pH 下分离强碱性溶质，这时化合物以自由态或非电离态存在，色谱峰形较好。见图5－5的应用示例。该方法分离这类化合物，可替代离子对色谱法（见7.4节的离子对分离碱性化合物），而且流动相中不必添加离子对试剂。多孔聚合物的另一潜在优点是有很强的疏水保留性（相对于硅胶基质的 C_{18}柱），对亲水性较强的化合物也有足够的保留。大孔的多孔聚合物对蛋白样品的分离非常有用（见11.2节）。因为多孔聚合物在高 pH 时很稳定，强保留物质可用0.1M 的氢氧化钠从柱中洗脱。

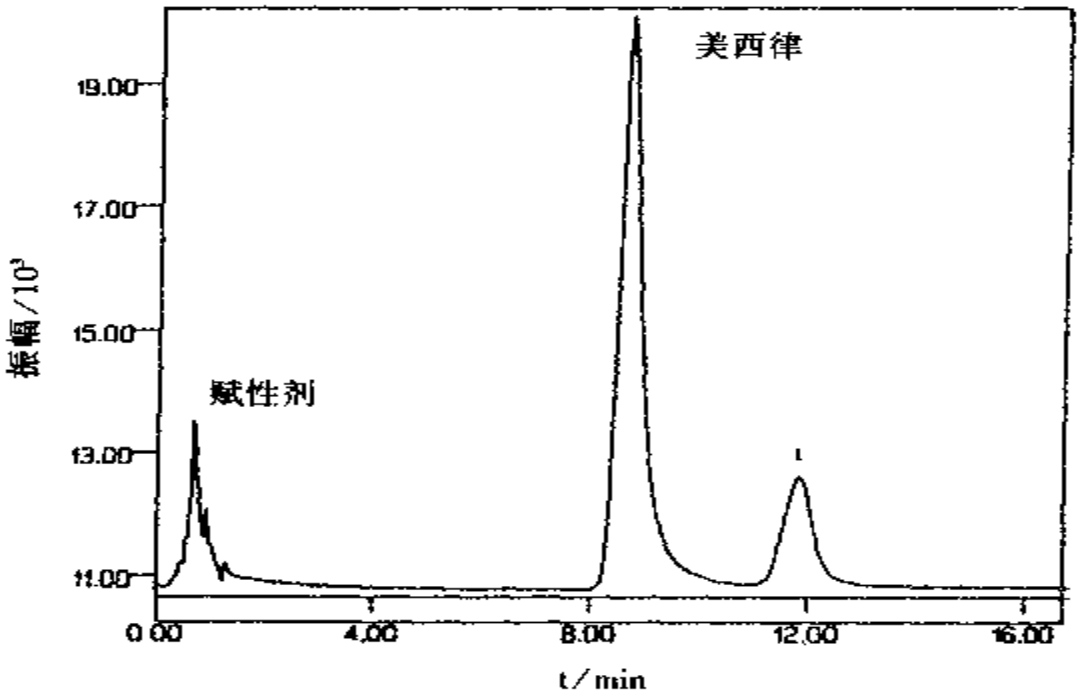


图5－5 pH 11 时多孔聚合物柱的色谱图：美西律及其片剂基质，添加 1% 的杂质（I）。色谱柱：12.5×0.4cm Ashipak ODP－50；流动相：28:72（v/v）乙腈－水，用二乙胺调 pH 至 11；流速：0.9mL/min；264nm 检测；进样 20μL。注意杂质的吸收系数比较大。[24]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

与相同粒度的硅胶基质色谱柱比较，多孔聚合物柱的缺点是柱效低。已有的应用文献表明，它的塔板数一般不到类似的硅胶基质色谱柱的一半。聚合物柱还有一个特殊问题，这种担体在不同有机改性剂中溶胀程度不同。因此填充床会因微粒溶胀不同而变化，该性质可能是聚合物柱效率低的原因。在梯度洗脱中更明显，因为分离过程中有机溶剂浓度是变化的。为尽量减小可能的问题，一些色谱工作者只在单一有机改性剂的等度分离中才用聚合物基质柱。

通过改变色谱柱硅胶基质的官能团，可以变其反相分离的选择性（见 6.3.3 节）。以其它官能团改性的多孔聚合微粒，如 C_{18}、NH_2 和 CN，也可改变固定相的选择性。不过，目前用于聚合物色谱柱的功能团仅有几种。

改性聚合物柱填料应用于某些离子交换有明显优势。多孔聚合物（例如：二乙烯基苯交联的聚苯乙烯）加可电离的官能团，如 $-COOH$、$-SO_3H$、NH_2 和 NR_3^+，为分离众多的酸性与碱性化合物提供了可能，这些柱填料物质用于生物样品的分离、提纯最多。这些分离常需要在高 pH 下操作，如清除内毒素和其他生物污染物。在这类应用中，与硅胶基质柱相比，多孔聚合物的优点是稳定性更好。但与硅胶基质的离子交换剂比较，聚合物基质离子交换剂通常与其它聚合物基质柱填料存在同样的缺点：柱效低、分离慢。

5.2.1.3 其它无机填料 其他用于 HPLC 的无机担体填料色谱柱也已经商品化。由于其特殊的性质，它们一般用于特殊的应用，然而，这些无机填料的使用经验比已广泛应用的硅胶基质柱的和多孔聚合物柱的少得多。未衍生化的石墨碳正逐步被接纳为反相色谱柱的填料，已经制得具各种粒度的多孔小球。用这种填料的分离略不同于硅胶基质烷基键合相。石墨碳的表面即是保留的基础——不再需其它固定相。该柱填料一般比烷基键合硅胶或多孔聚合物的保留强。石墨碳已证明可用于分离某些几何异构

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

体，如图 5－6 所示（亦见文献 26）。石墨碳柱也用于保留与分离那些因亲水性太强、在 C_{18} 键合相柱上保留较小的化合物。如已分离了药物等一些极性化合物。由于在 HPLC 流动相中不会被溶解，这类柱可在任何 pH 与温度下使用。

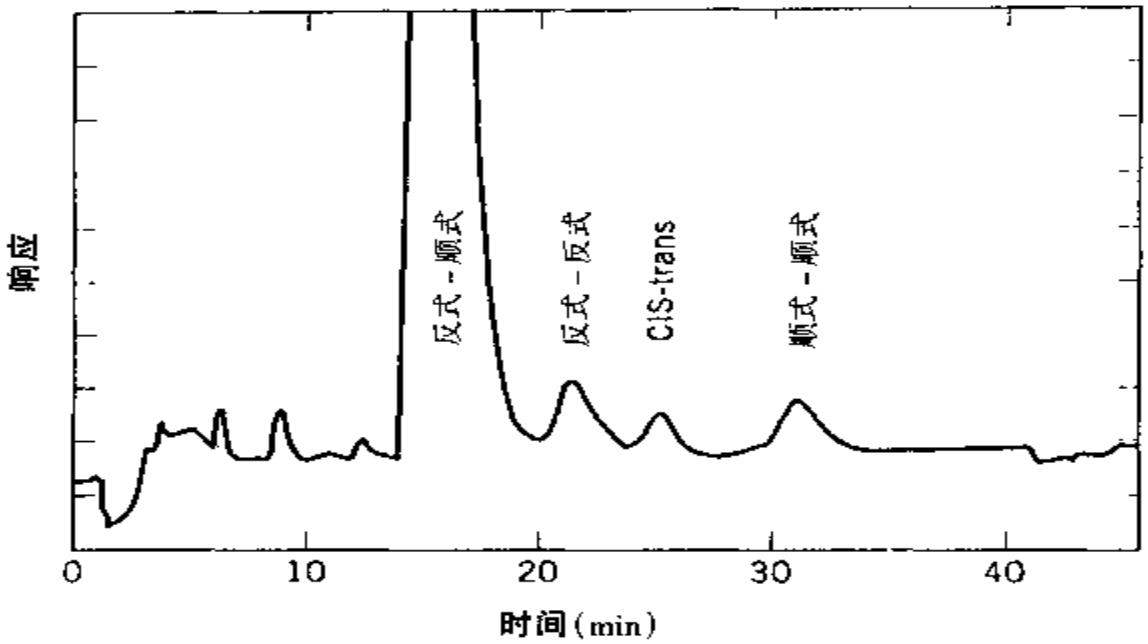


图 5－6　在石墨柱上分离顺－反异构体[25]。样品：平喘药（LY170680）；色谱柱：10×0.46cm Hypercarb；流动相：630mL 甲醇与 320mL 二氯甲烷，加 6.8mL 三氟醋酸；1.0mL/min；UV 检测器，238nm。

石墨碳色谱柱与硅较微粒相比，其缺点是柱效低、极易碎裂。用一些流动相/溶质系统，尤其是大 k 值的组分，不易获得好峰形。杂质往往会聚集于柱床上，最终以背景干扰流出。因此，石墨碳柱要求用高纯流动相，被吸附的杂质会不可逆地改变色谱柱的性能，所以样品清除步骤对延长色谱柱寿命很有用。这种材料的色谱柱仅有短柱，而且比较贵。目前可供选择的孔径还不多。

小孔与大孔的氧化铝也可用于 HPLC。氧化铝被制成不同的粒度，但不像色谱用硅胶的品种那么多。氧化铝微粒刚性强，可制成稳定的柱床。未经改性的氧化铝能在正相条件下分离弱极性溶

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

质(见 6.6 节)。氧化铝担体用聚合相进行涂层后,如聚丁二烯,可进行反相分离[27]。通过烯烃与硅氢改性氧化铝担体的作用,也可制得烷基改性固定相[28],但商品固定相官能团种类的范围非常有限。

氧化铝基质填料的一个优点是可在 pH 高达 12 的流动相中使用。强碱性化合物用高 pH 的流动相,不加离子对试剂即能被分离。氧化铝基质的填料不能用于羧酸样品,因为这些化合物与氧化铝不可逆地结合。有些商品氧化铝对碱性化合物也很活泼。除了流动相 pH 值可高于 10,氧化铝基质填料的应用与硅胶的相当类似,无明显的优势。因而,氧化铝柱尚未达到广泛应用的硅胶基质柱的认可程度。

氧化锆基质的填料也可用于 HPLC。多孔微球[29]与无孔超微球[30]的制备与应用均有报道。然而,目前商品化的仅有聚合物涂层的多孔氧化锆微球柱。这些坚固的填料可用于所有已知的 HPLC 洗脱剂,pH 范围1 ~ 14,温度高达100℃。氧化锆基质柱在高 pH 下的操作能力使其能用于分离未电离的强碱性化合物。这种方法可替代通常硅胶基质柱在低 pH 或用离子对色谱法分离该类化合物。由于氧化锆填料是最近几年才开始研究,不同粒度、孔隙度的固定相目前尚没有。因此,目前氧化锆柱填料比硅胶与聚合物基质的材料有什么重要用途与优势尚无定论。

用氧化锆柱的一个实验难题是必须严格除去二氧化碳。否则,氧化锆表面与二氧化碳牢固键合,会改变其色谱性质[31]。另一个考虑是氧化锆也会牢固地与氟化物、磷酸盐以及其它路易斯酸键合。该性质说明必须用含有这些阴离子的流动相仔细地预处理该担体的表面,以保证分离的重现性。氧化锆表面还与羧酸及磺酸牢固地键合,或许也不可能分离含有这些化合物的混合物[31]。

5.2.2 色谱柱的构型

大多数用于 HPLC 的色谱柱是用一节内壁经高度抛光处理的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

直不锈钢管，用收缩接头将其与 HPLC 仪器连接。不锈钢可用于所有有机溶剂与大多数水性缓冲液。然而，含氯的流动相会缓慢地“卤素腐蚀”不锈钢材质（尤其在低 pH 时），所以使用该流动相时应倍加小心。综合考虑的话，大多数 HPLC 用不锈钢色谱柱最好。也有用玻璃、玻璃衬里不锈钢与塑料制作的商品柱，用于可能与不锈钢发生有害作用的特殊样品。然而，资料中能证明不锈钢柱发生这类问题的很少。那些与不锈钢成分（铁、铬、镍）牢固络合的样品最有可能产生这类问题。色谱柱内壁的表面积很小，所以发生不良反应的机会不大。

多孔烧结物（滤片）封闭色谱柱的两头，固定住填料微粒。一般来说，5μm 与 3μm 的微粒分别用 2μm 与 0.5μm 孔径的不锈钢滤片。不锈钢柱发生的问题，通常要追溯到入口不锈钢滤片，它的表面积比可能与样品发生不良反应的色谱柱内壁要大得多。峰形不好与样品回收率低，可能预示滤片出现问题。多孔钛与聚合物滤片的活性弱，可用于对付这类偶尔问题。

有人建议对生物样品用玻璃柱，由于受压力的限制（如 <1000psi），其应用受到限制。玻璃衬里的不锈钢柱可用常规的 HPLC 压力，但这些组件较易碎裂，需小心使用。经验表明，玻璃柱分离生物样品的需求并不多，（方便的）不锈钢柱足以应付大多数的应用。在用其它材料不合适时，可用带有聚合物接头的刚性聚合物（PEEK）柱。这些色谱柱具有铝外壳，能承受较高的操作压力。

也有弹性聚合物外壳的色谱柱。径向加压柱（美国 Waters 公司）借助液体对柱半径的压力，可随时对填料物质加压。这种类型柱的优点是价格较低，而且是非金属结构。然而，由于形成最佳填充柱床可能有困难，用该法时柱效以及柱间的重现性可能不好，这类柱的控温也有困难，如需连接加长柱时，需另外的液压装置。

对收缩接头柱，不同填料均可应用。如果制作良好的话，这类色谱柱的柱效与重现性水平最高。另外，价格低的不锈钢卡套柱也

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

有各种尺寸与不同填料类型。卡套柱实际上是装有填料的空管坯(两端未装接头)。用可重复使用的柱架与接头将这些填充管连接于 HPLC 仪器上。这些价廉的卡套柱对常规测定,尤其不需极高柱效时,极其诱人。为降低费用,生产厂商一般不对每支卡套柱效进行测定。而是随机从每批中选择测之。不过,通常都标有最小柱效,而且有时能为每个组件进行担保。

表 5－5 总结了商品色谱柱构型。建立分析方法通常用内径 0.46 或 0.3cm 、粒度 3～10μm 的色谱柱最好。5μm 微粒的色谱柱通常可兼顾理想柱效、重现性与可靠性。3μm 微粒的色谱柱能快速分离或柱效较高,如 2.3.3.1 节中所讨论。然而,3μm 柱的常见问题是它们可能更易发生堵塞,大大降低了色谱柱的寿命。带有压缩接头的色谱柱适于大多数应用,尤其是那些操作压力高的长柱。通过改变分析柱长度几乎能对所有的应用进行优化。

表 5－5 色谱柱构型(不锈钢)[a]

类　　型	内径(cm)	长度(cm)	粒度(μm)
分析型			
加压接头	0.3－0.46	3－25	3－10
卡套	0.3－0.46	7.5,10	3－10
微球	0.1, 0.21	15,25	3－8
半制备型	0.8－1.0	10－25	5－20
制备型	2.0－5.0	10－25	5－20

[a] 在某些构型中,也可采用玻璃、玻璃衬里、塑料与 PEEK 材质。

3.5μm 微粒填充的色谱柱似乎能很好地兼顾高效与柱寿命[32]。与 5μm 微粒柱比较,柱效有明显改善;在柱长度相同时,用一半分离时间能获得与其相当的分离度[33]。而且在使用高流速时,柱效损失并不大,所以,如需要,可进行快速分离(见图 5－18)。由于 3.5μm 微粒柱使用 2μm 孔径的入口滤片,比传统的 3μm 微粒柱使用的 0.5μm 滤片的堵塞倾向要小得多。3.5μm 微粒柱要求

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

粒度分布窄，无“细粉”，使色谱柱的反压适中。

0.3cm ID 色谱柱的溶剂消耗只是广泛使用的 0.46cm 柱的一半，当用 0.21cm 细径柱时，可比 0.46cm ID 柱减少 4 倍，而 0.1cm ID 的细径柱可用的分析溶剂更少，这些组件有的长度可达 25cm，粒度范围在 3～8μm 之间。细径柱的主要优点是单位质量样品的检测灵敏度较高。这些构型最适于受质量限制（非体积限制）样品的应用。当 HPLC 仪器与质谱仪及其它需输入小体积溶剂的仪器联用时，细内径色谱柱特别有用（并往往是必须的）。由于用这些细径柱不易得到均一的填充床，有时塔板数会低于同类的 0.46cm ID 柱，而且，柱外效应往往极为明显，尤其是柱内径小于 0.3cm 时，可能需特殊的仪器组件才可获得满意结果，。

如表 5－5 所示，带收缩接头的半制备和制备型不锈钢柱，常用的内径范围为 0.8～5.0cm。（尽管更大的内径也已商品化，但通常更适于中试装置与处理操作。）这些半制备与制备色谱柱中填充的往往是柱效低的大微粒（如 10～15μm）。当分离的样品量很大时，色谱柱效就不那么重要了。

表 5－5 中未列出内径细达 50μm 的熔融石英毛填充细管柱。有几家供应商可提供这些色谱柱，主要用于与质谱仪连接，对大多数的常规应用不大适合。这类柱的一般应用尺寸为 25 或 50cm×380μm ID。用于该构型的微粒一般为 3～5μm，但更小的也有报道。当用这些柱时，必定需要特殊仪器，因为峰体积极小，极易引起柱外峰展宽。

5.2.3 固定相

5.2.3.1 键合硅胶 硅胶基质的反相填料一般通过在担体表面上共价键合有机硅烷或沉积聚合物有机涂层。图 5－7 所示为使用最广泛的有机硅烷填料的表面反应式。许多键合相填料用单官能团试剂制得，如图 5－7*a* 所示，也有些商品填料是用三官能团（有时也用双官能团）硅烷与硅胶表面反应的交联型聚合表层（图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

5－7*b* 与 *c*)。图 5－7*c* 中的方法一般用于引入能与氯硅烷反应的 R 基团（如氨基或二醇基相），这些反应通常用三官能团硅烷［如 $(EtO)_3-Si-(CH_2)_3-NH_2$］，重现性往往不好。

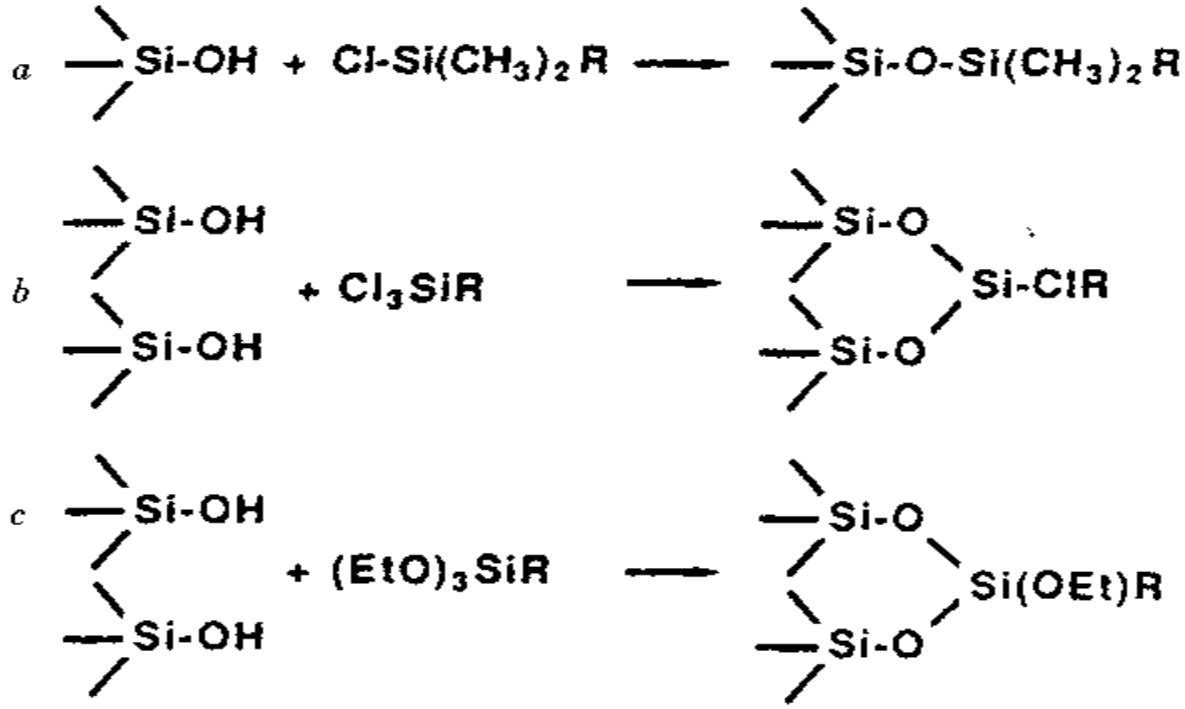


图 5－7　键合相填料的化学反应。（*a*）表面硅羟基与氯二甲基硅烷的反应；（*b*）表面硅羟基与三官能团硅烷的反应；（*c*）表面硅羟基与三官能团烷基硅烷的反应。

图 5－8 所示为与硅胶担体共价键合硅烷的各种类型。图 5－8a 所示为用双或三官能团硅烷反应的轻度纵向交联相。由这些反应得到的聚合键合相，在低 pH 时，可能比单体相的非交联固定相更稳定，但与用单官能键合相比较，用此方式制得的填料的保留值与选择性却更不稳定。图 5－8*b* 所示为另一类型的键合硅烷的表面，称作横向交联。有报道[35]表明这些物质在低 pH 与高 pH 环境中均非常稳定，但没有有关保留值、稳定性与重现性特性的应用数据。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

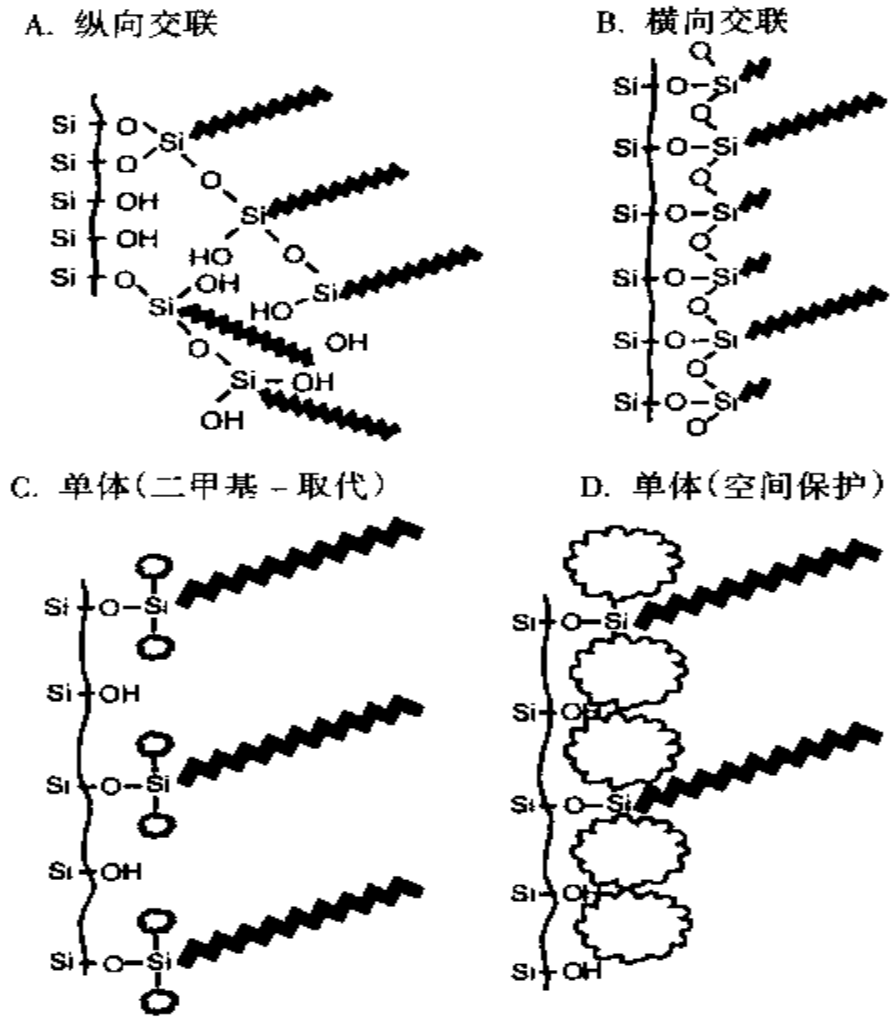


图 5-8　C_{18} 硅烷键合相的种类[34]

如图 5-8 *c* 和 *d* 所示，不同非交联型柱填料也已商品化。通常通过单官能团二甲基氯硅烷与表面硅羟基反应(见图 5-7 *a*)得到各种烷基与取代烷基改性硅胶，如：正-十八烷基硅烷(ODS 或 C_{18})键合相材料。如图 5-7 *a* 所示，单官能团硅烷反应的优点是重现性好，一个硅羟基与一个硅烷分子反应，产生可预测的结构。该反应路线制得的填料往往柱效最高，由于溶质分子在薄固定相层内的扩散迅速。存在的二甲基取代及位阻保护结构两种，讨论见下文。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

许多生产厂家试图使硅胶表面与硅烷致密地（“完全地”）进行反应，然而，由于键合相配位体的空间位阻效应，表面的硅羟基不能完全参加反应。如表 5－6 所示，随着链长或硅烷体积的增大，参加反应的硅羟基比例相应减小。即使最小的硅烷（三甲基或 C_1），其表面上也有近 50% 的硅羟基未被反应。这些硅羟基位于有机硅烷配位体的“保护伞”下，但仍可与适宜的溶质发生静电作用。如何尽量减少不良的残余硅羟基的影响，建立重现性好、普适性强的方法，将在第 7 章中重点讨论。

表 5－6　硅烷键合相链长与体积对硅胶表面覆盖率的影响[36]

键合相	表面覆盖率（$\mu mol/m^2$）	反应的硅羟基[a]（%）
三甲基	4.1	51
二甲基－3－氰丙基	3.6	45
二甲基－正－丁基	3.5	44
二甲基－正－辛基	3.2	40
二甲基－正－十八烷基	2.7	34
三异丙基	2.2	28
二异丙基－3－氰丙基	2.1	26
二异丙基－正－辛基	2.0	25
二异丙基－正－十八烷基	1.9	25

[a] 按完全羟基化、未改性的硅胶为 $8\mu mol/m^2$。

有些硅烷键合相（如 C_8、C_{18}）的生产厂家用被称为“封尾”（endcapping）的工艺，使硅胶担体表面完全反应（硅烷化）。封尾包括键合填料与小硅烷进行的后续反应，如三甲基氯硅烷、二甲基二氯硅烷或（不经常的）六甲基二硅氮烷。这种方法通过反应掉一些残余硅羟基，增加担体的覆盖率，以尽量减少与溶质发生不良的作用。然而，封尾并不能完全克服酸性硅胶担体的缺点，并且这些小分子的封尾基团在低 pH 反相分离的中，极易从填料上水解下来，使该方法在 pH<3时，普适性好、耐用的优点不强[36]。研究表

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

明被封尾的色谱柱在中等与高 pH(6～9)时，可能更稳定，因为较好地保护了硅胶担体不被溶解[37]。

5.2.3.2 其它固定相 其它通过共价键引入有机固定相的方法已有报道[38,39]，但还没有基于这些方法的商品柱。如前提及，通过在担体表面聚合各种单体制得的固定相，如以聚丁二烯改性的氧化铝和氧化锆柱填料与其它聚合物固定相已商品化[40,41]。不过，可能是因为这些类型的聚合物固定相色谱柱并不比常规的键合相柱填料的优势明显，它们尚未受到高度欢迎。

5.2.3.3 RPC 中键合相的保留行为 键合相填料的有机物含量(如百分含碳量)大致能说明一特定色谱柱的保留能力。键合相担体的表面积是一主要因素；表面积越大，保留值(k)就越大。对于仅为疏水作用的分离，只要其有机配位体能完全接近溶质，保留值随含碳量的增加而增加。有时溶质的保留是有机固定相的疏水作用以及硅胶担体上硅羟基的正相作用的混合保留机制的结果(见图 6－27c 与有关的讨论)，这种情况下，含碳量作为色谱柱保留的标志则不甚显著。

样品保留值一般随键合碳链长度而增加 (C_{18}> C_8> C_3> C_1)，但长链之间的差别并不大(即 $C_8 \approx C_{18}$)。通过选择键合相，可将样品保留值控制在一定范围内，但保留值的变化也会随色谱柱填料的表面积与所用硅胶担体类型的改变而变化。图 5－9 是不同生产厂家的多种 C_{18} 与 C_8 键合相柱上，几种中性、碱性与酸性化合物的 k 值。也列出了这些色谱柱的死体积 (用不保留的尿嘧啶标记测定)，以及用该流动相测试化合物是否产生拖尾峰。本图中的色谱柱以中性溶质甲苯的保留值递减排列，它的保留值仅与疏水作用有关。吡啶、苯酚与 4－丁基苯甲酸的保留次序标志了不同柱的选择性。峰拖尾因子大于 2.0 作拖尾峰列出。由于这些柱的流动相未经优化，拖尾峰并不说明色谱柱不好。选择上述检测溶质的目的是测试色谱柱的性能，反映柱间的差异。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

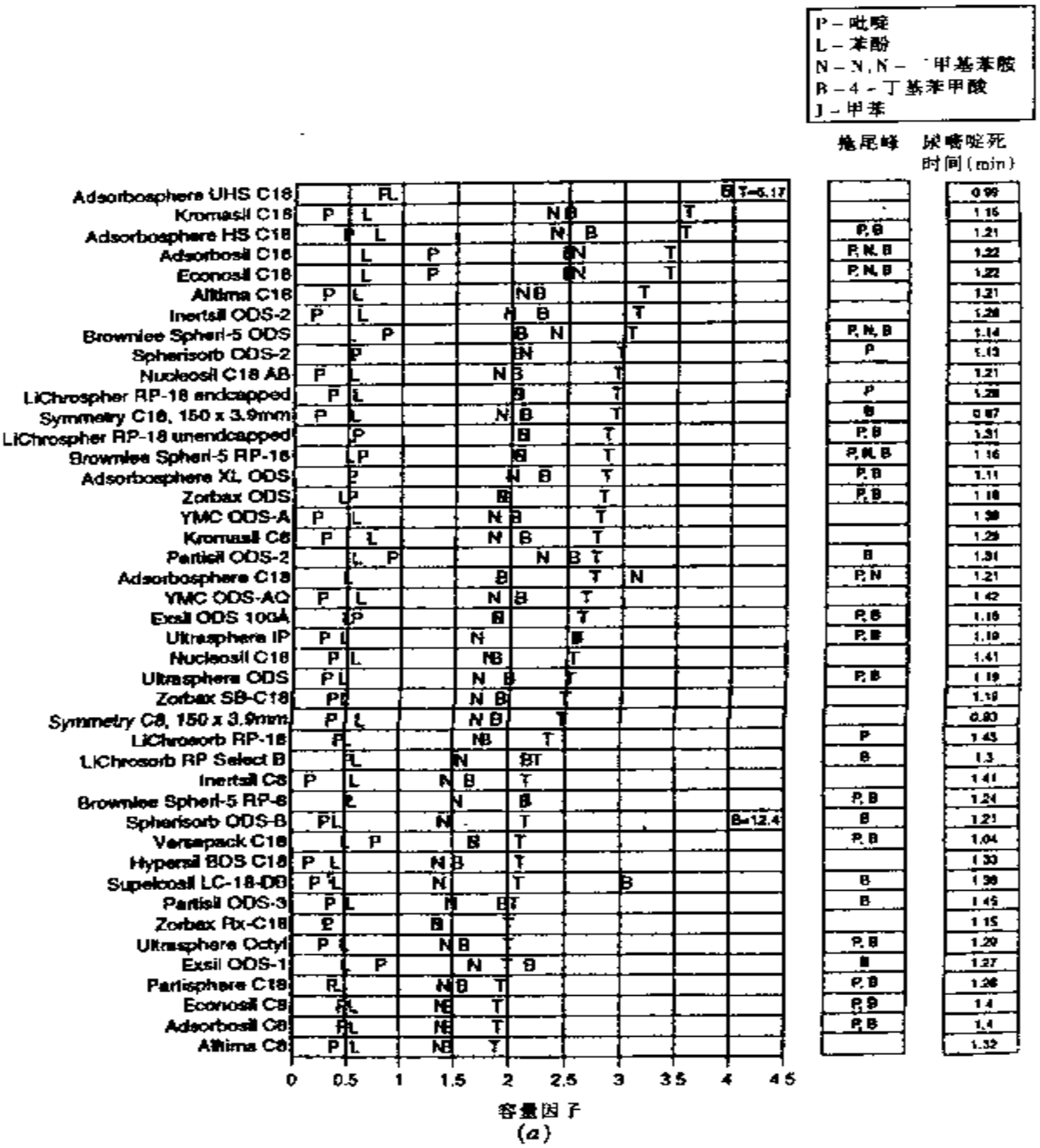
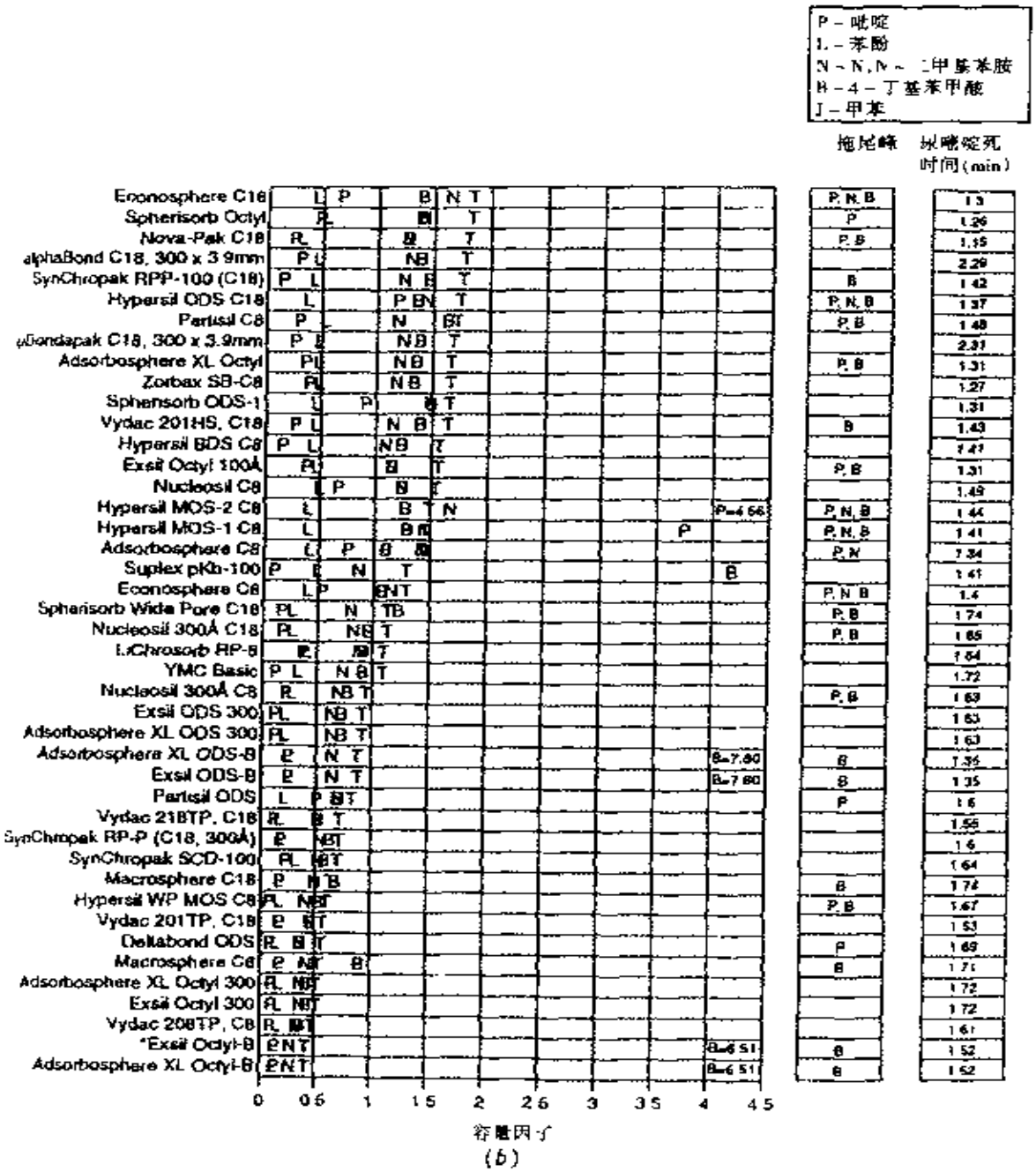


图 5－9　C_{18} 与 C_8 色谱柱的保留值、选择性与峰形。色谱柱：15×0.46cm，除了 AlphaBond C_{18} 与 μBondapak C_{18} 为 30×0.39cm，Symmetry C_{18} 与 C_8 为 15×0.39cm 以外；流动相：乙腈－0.05M 磷酸钾缓冲液，pH 3.2(65:35)；流速：1.0mL/min；UV 检测器，254nm；1. 尿嘧啶；2. 吡啶；3. 苯酚；4. N, N－二甲基苯胺；5. 4－丁基苯甲酸；6. 甲苯。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepriint.cn



(b)

图 5－9(续)

5.2.3.4 键合相色谱柱的稳定性 键合相填料的稳定性在方法建立中尤为重要。一旦获得了理想的分离，色谱柱特性应尽可能长时间保持不变，稳定性好的色谱柱可减少重新调整分离条

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

件或更换色谱柱的麻烦。在相同条件下应用时，长链的烷基键合相填料（如 C_{18} 与 C_8）一般比短链的键合相更稳定。图 5－10 中的数据也表明了这一点。图中一系列非交联型二甲硅烷改性的固定相，在 50℃ 连续用侵蚀性的 0.1% 三氟醋酸－乙腈（pH≈2）的梯度进行考察。每一次梯度后，用的 0.1% 三氟醋酸－乙腈（1:1）混合液等度测定中性溶质 1－苯庚烷的 k 值。图 5－10 以各有机固定相的% k（k 值除以试验开始时的 k 值）对通过色谱柱的流动相柱体积的函数作图。（注意：15×0.46cm 色谱柱的 3000 柱体积约相当于 4500mL 流动相或 8 小时工作日运行 2 周。）该图中的% k 值与固定相上官能团碳数相关。在本试验中长链的 C_{18} 与 C_8 配位体明显更稳定（由于键合相流失引起的保留值变化不大），这是许多用户喜欢用它们的原因之一。随链长度减小，固定相的稳定性也降低，C_1（三甲基）相最不稳定。

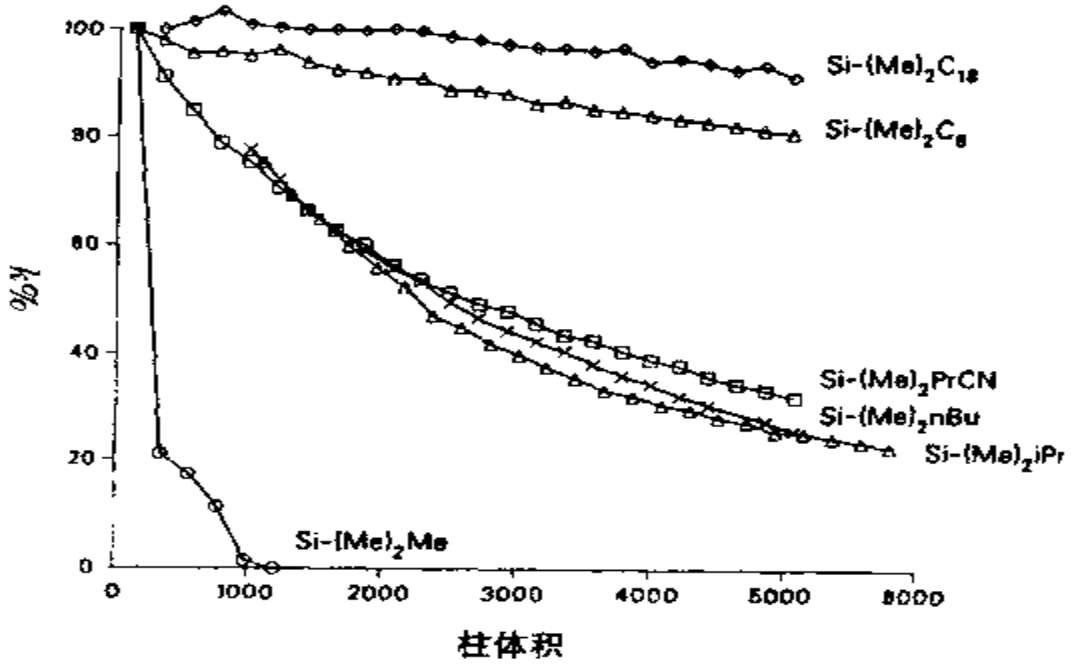


图5－10　pH₂时，硅烷链长度对键合相稳定性的影响50℃。色谱柱：15×0.46cm；试验：0.1% 三氟醋酸——乙腈梯度，80min 梯度，0→100%，流速：1.0mL/min；测定：50% 乙腈－水含1% 三氟醋酸[36]，1－苯基庚烷的 k。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

硅胶基质键合相柱的稳定性(与寿命)与硅胶担体与键合相的类型有直接关系。色谱柱稳定性也很大程度上取决于流动相的 pH、所用缓冲液与有机改性剂的种类。硅烷键合相的损失(如图5－10)归咎于将硅烷键合于担体上的 Si－O－Si 键的水解,在高温、低 pH 及水比例高的流动相中,离解加剧,而这些又是对许多样品分离较好的条件(见7－3节)。如前提及,交联型键合硅烷固定相可改善低 pH 时键合相的稳定性;但色谱柱的重现性可能不理想。

改善硅烷固定相在低 pH 时稳定性的另一种方法是使用空间保护官能团[36,42,43]。如图5－11所示,大体积的硅烷单体能减少通过共价结合于硅胶担体上硅烷的水解。由于连接于硅烷 Si 原子上的两个异丁基基团的体积较大,每一个 Si－O－Si 键都被个别保

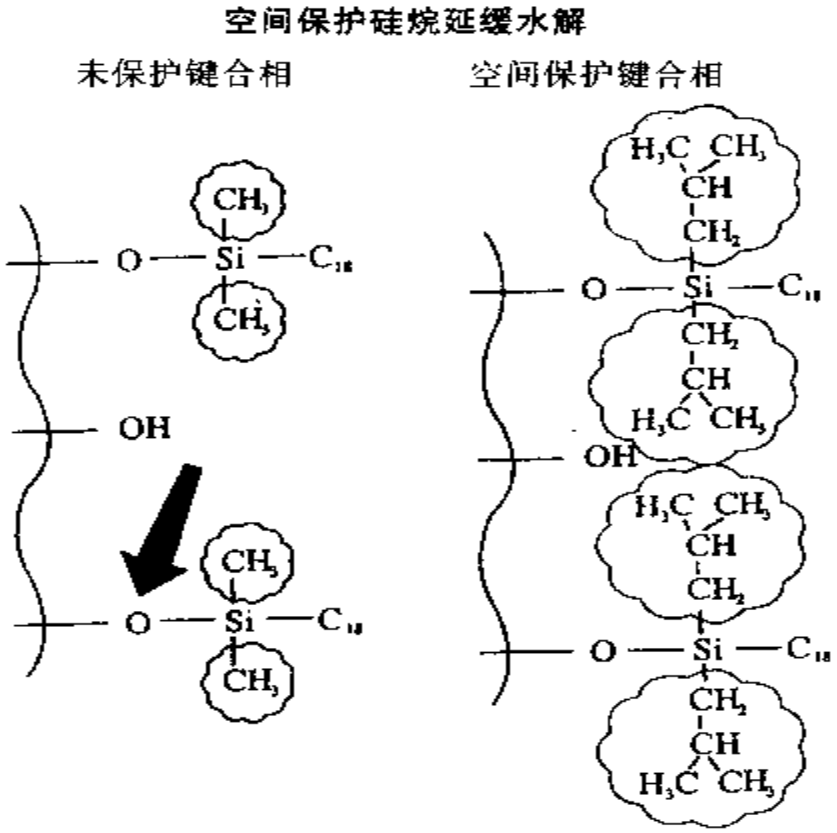


图 5－11　硅烷键合相的 Si－O－Si 键的水解[44]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

护。在溶液化学中广泛应用的空间保护官能团概念已扩展至色谱填料的表面。如表 5－6 的数据所示，因为空间保护硅烷基团的立体容积（如二异丙基、二异丁基），以此方法制得的填料比常规的二甲基取代的键合相的含碳量少（表面覆盖率低），保留值小。

有空间保护的硅胶基质固定相稳定性很高，其说明见图 5－12。图中比较了在强侵蚀条件下测试的不同 C_{18} 商品柱填料。用 8 和 30nm 孔径硅胶担体制得的二异丁基 C_{18} 柱，在用 27000 倍以上柱体积的甲醇－1% 三氟醋酸（pH≈0.9）的流动相于 90℃ 冲洗后，甲苯的相对保留值基本上无变化。空间保护的固定相对短碳链硅烷特别有用，过去的稳定性则较差（见图 5－10），易水解。图 5－13 比较了（二甲基－与二异丙基－）取代的 3－氰丙基硅烷（CN）键合硅烷的稳定性（pH 2.0，50℃）。空间保护键合相的高度稳定使其非常适用于肽与蛋白质等生物制品的稳定与重现分离（见 11.2 节）。对于这些分离，流动相通常保持低 pH（一般 pH ≈ 2），在高温下进行这类试验往往最好（见文献 45 与 11.2 节）。

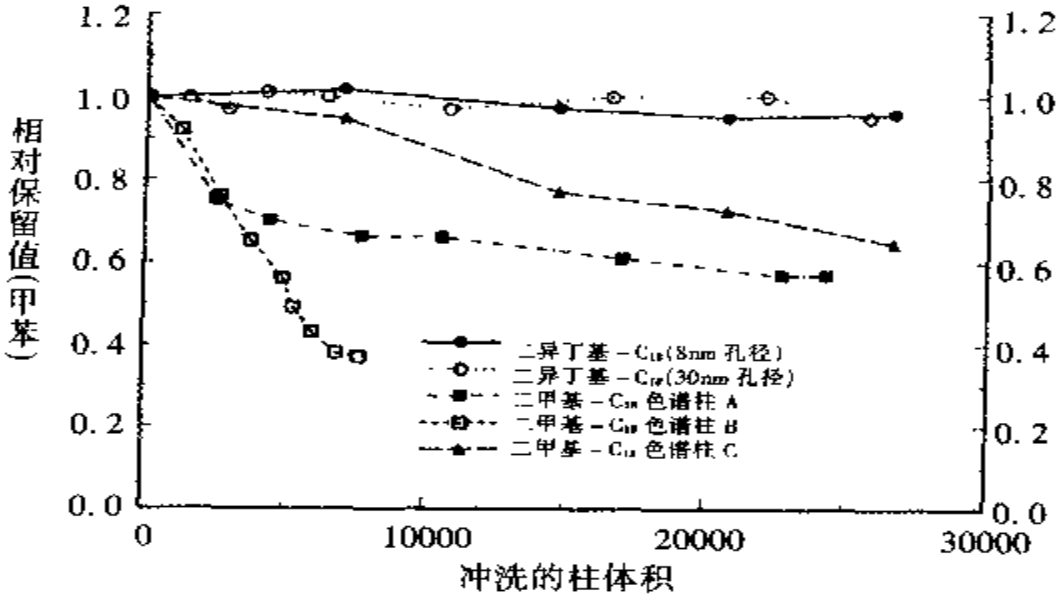


图 5－12　低 pH、高温时，硅烷键合相降解[34]

色谱柱：15×0.46cm；流动相：50% 甲醇－水＋1.0% 三氟醋酸（pH≈0.9）；流速：1.0mL/min；90℃；用如图 5－10 中的甲苯进行试验。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

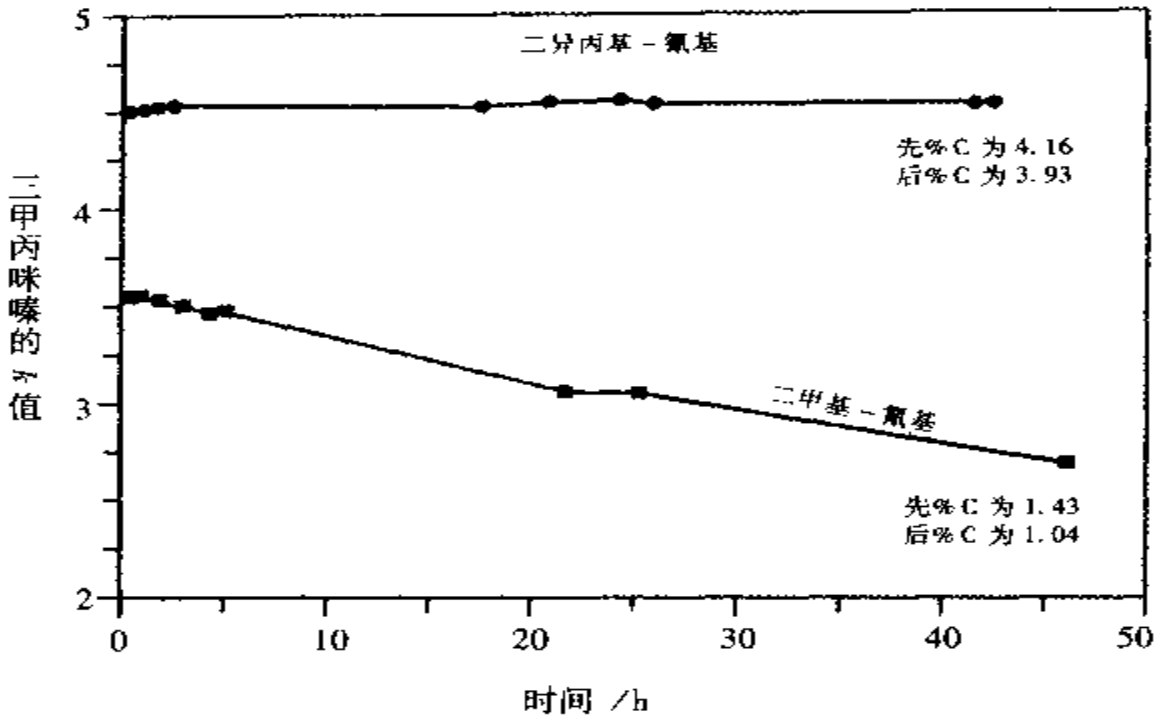


图 5－13　短链氰基键合相的稳定性比较

色谱柱：15×0.46cm；流动相：乙腈－0.1% 三氟醋酸（28：72），以三乙胺调节 pH 至 2.0；流速：1.0mL/min；50℃。

尽管大多数分离在低 pH 下进行最好（pH ≤3；见第 6 章），但也有些分离在高 pH 进行，因为：

1. 有关化合物在低 pH 时不稳定。

2. 在低 pH 时，达不到所需选择性（而且必须使用 pH 的变化）。

3. 质子化的（亲水的）碱性化合物在低 pH 时，保留太小。

如前提及，由于硅胶担体的快速溶解和由此产生的色谱柱床塌陷，有些硅胶基质的色谱柱不应在 pH > 8 时使用。用高 pH 流动相的研究表明，在硅胶担体上连接有硅烷的 Si－O－Si 基团受破坏较慢[5,34]。确切地说，硅烷键合相在高 pH 流动相的流失显然是由硅胶担体的溶解而引起。这样，键合的硅烷被破坏是从基质

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

开始的，最终从其表面剥离下来。

其它研究认为，色谱柱在高 pH 降解很大程度上取决于硅胶担体的类型与硅烷固定相的性质[5,37,46]。比如，图 5－14 的数据表明致密键合到某些高纯度硅胶上的二甲基－C_{18} 相（图中空心符号），在 pH 9 显示异常的稳定，以柱效的变化（塔板高度）作指标。（由于在高 pH 时键合相上的 k 值随使用仅很慢地减小，用保留值衡量柱稳定性欠准确，而塔板高度与峰对称性是较好的指标。）图 5－14 与其它报告中的数据表明，经溶胶－凝胶工艺制得的硅胶担体（即硅溶胶交联），可用于某些高达 pH 9 的流动相。假如用有机缓冲液并维持在<40℃操作时，溶胶凝胶硅胶上的完全反应的、封尾的烷基键合相柱日常应用 pH 至少可高达 11[46,46a]。然而，用凝胶硅酸盐工艺（凝胶化的可溶性硅酸盐－图 5－14 中的实心符号）制得的硅胶填料降解很快[5]。

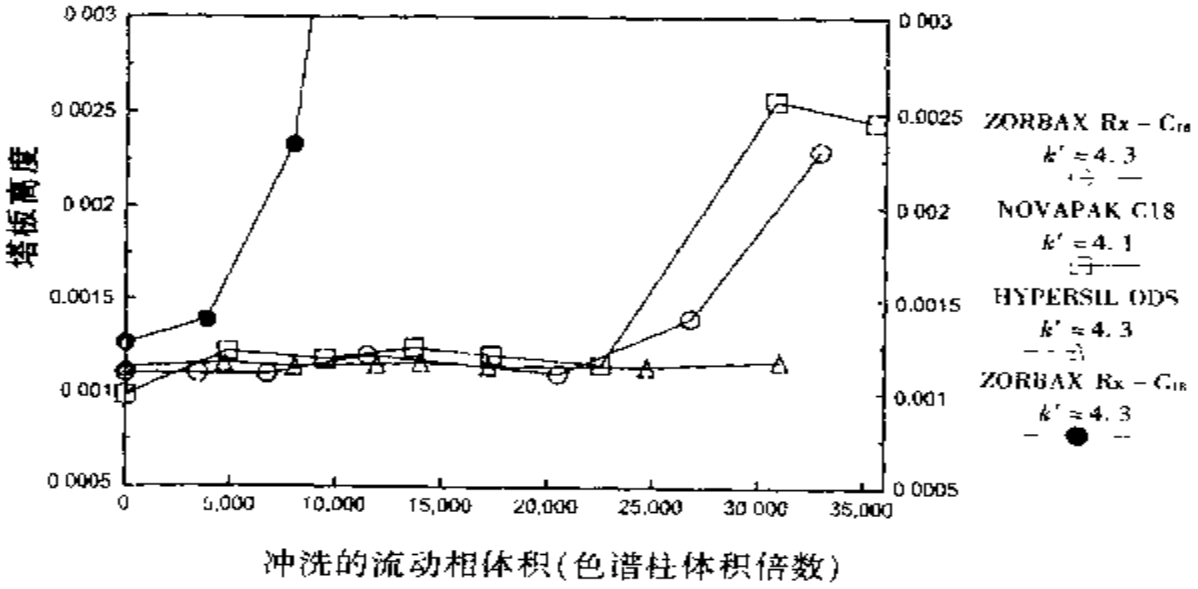


图5－14　pH 9时，C_{18}柱的稳定性[34]

色谱柱：15×0.46cm；流动相：乙腈－0.01M 磷酸盐 pH 9.0，(1:1)；溶质：*N*, *N′*－二甲基苯胺；流速：1.0mL/min；22℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

柱填料封尾可减少硅胶基质色谱柱在中等与高 pH 下的降解[37, 46a]。很明显，用小分子封尾硅烷与硅羟基加成反应产生了疏水隔层，能有效延缓硅胶担体的溶解。图 5－15 表明一种强碱性药物曲米帕明的 k 值增加情况，封尾的 C_8 柱与类似的未封尾的 C_8 柱均用强侵蚀性 pH 7 的磷酸盐流动相在 60℃ 冲洗时，前者 k 值的增加慢得多。这些结果表明硅胶担体表面由于被该流动相溶解而露出的酸性硅羟基可使碱性药物保留增加。封尾色谱柱上的封尾基团抑制了这种不良效果。

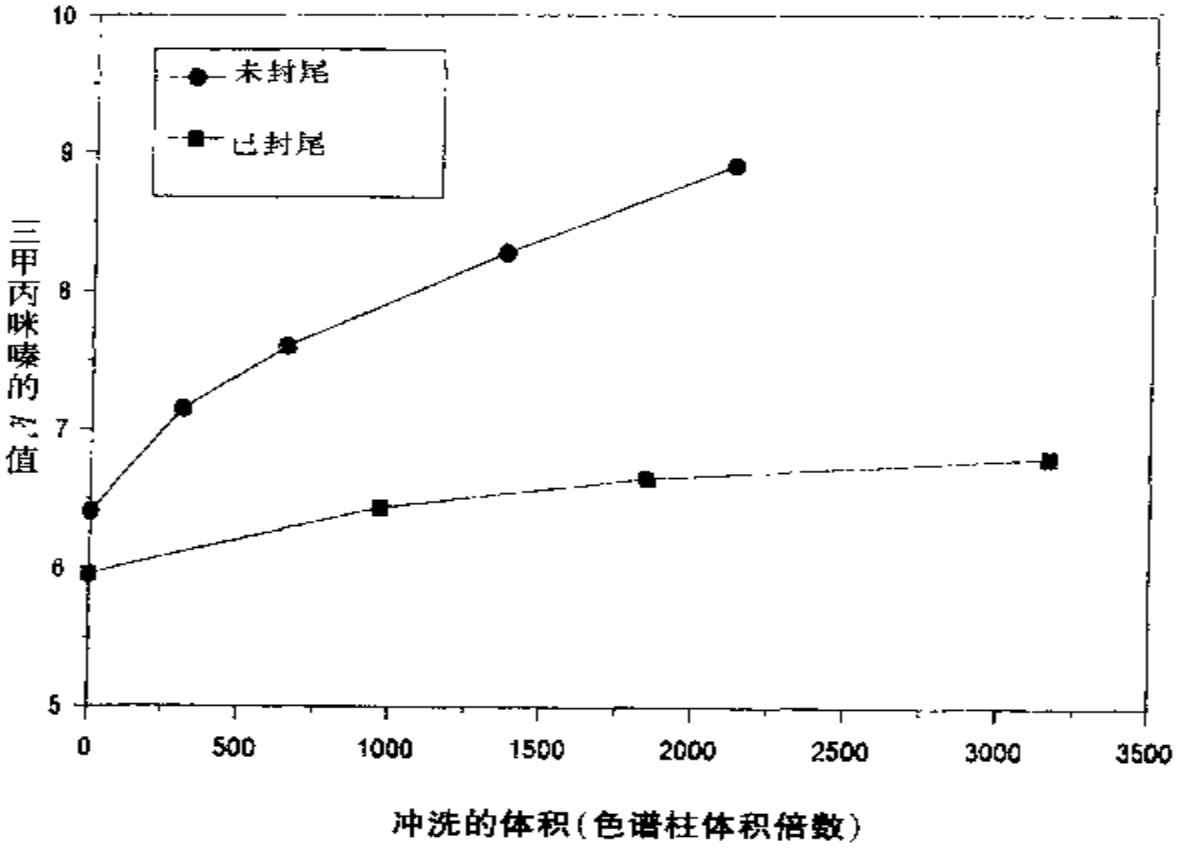


图 5－15　未封尾与封尾 C_8 柱的稳定性比较[37]

色谱柱：15×0.46cm，二甲基－C_8 与双封尾的二甲基 C_8(Zorbax XDB－C_8)；冲洗：甲醇－0.25M 磷酸钠缓冲液 pH 7.0，(20:80)；60℃；1.0mL/min；试验：乙腈－0.01M 磷酸钠缓冲液 pH 7.0，(60:40)；流速：1.0mL/min；40℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

硅胶基质的色谱柱在中等与高 pH 下的降解速率，受所用流动相与操作温度的影响也很大[46,46b]。因此，应采取措施降低键合相柱的硅胶担体的溶解速率。对硅胶担体在中等与高 pH 时的溶解与色谱柱稳定性的系统研究表明，建立 pH 7 或以上的普适性好的 HPLC 方法，应遵循表 5－7 中的原则[5,46]。

表 5－7　在 pH 7 以上，建立普适性方法的策略

用键合致密（完全反应）的长链烷基固定相（C_{18}、C_8 等）
用以硅溶胶工艺制得的硅胶担体（Hypersil、Kromasil、Spherisorb、Zorbax），以减少硅胶担体的降解。
用有机的、枸橼酸与硼酸缓冲液，以减少硅胶担体的溶解（如可能，避免用磷酸盐、胺盐与碳酸盐）。
保持 0.01～0.05M 的缓冲液浓度。
设定柱温≤40℃。
为使色谱柱稳定，用缓冲阳离子 $Li^+ > Na^+ > K^+ > NH^+_4$。
为使色谱柱稳定，用经封尾的色谱柱。
加碱性流动相改性剂（如三乙胺），以保持良好的长期分离重现性。

尽管需进一步深入研究更好地限定硅胶基质色谱柱在高 pH 下的操作条件和限度，现在已明确（利用以上所列条件）某些硅胶基质的色谱柱日常能用于 pH 9，甚至更高。图 5－16 表明硅胶基质的 C_{18} 键合相柱，用硼酸盐或甘氨酸（氨基乙酸）缓冲液（或其它有机基质的缓冲液），而不是常用的碳酸盐与磷酸盐缓冲液时，溶解度会有所降低（且寿命增加）。通过硅溶胶交联制得的硅胶担体柱（Zorbax，Hypersil，Spherisorb，Kromasil），在中等与高 pH 时，比那些采用于凝胶类型的（硅酸盐凝胶）传统色谱硅胶柱的要稳定得多[37,46]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

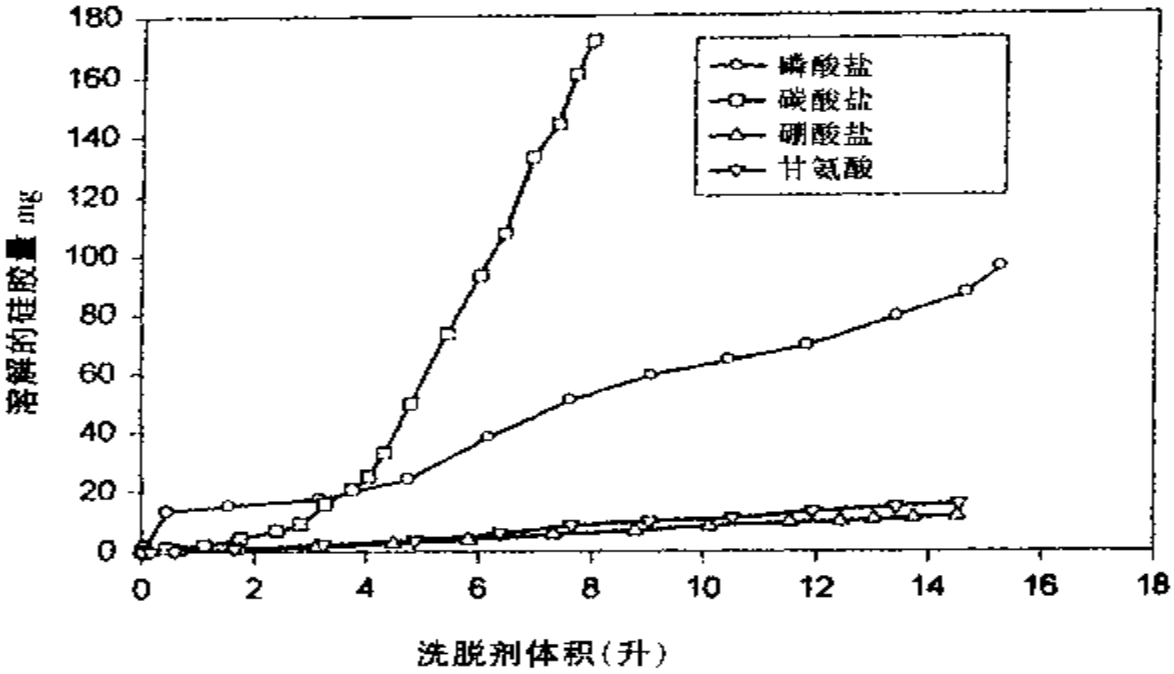


图 5－16　pH 10 阴离子缓冲液对硅胶担体溶解度的影响[46]

色谱柱：Zorbax Rx－C_{18}，15×0.46cm；连续非循环冲洗：甲醇－0.1M 缓冲液 pH 10，(50:50)；流速：1.0mL/min；25℃　溶解的硅胶用硅钼酸盐的颜色反应指示。

假如使用适宜的操作条件，在溶胶型硅胶基质上通过致密键合的与仔细封尾制得的烷基键合柱，通常可在至少 pH 11 时使用[37,46a]。高 pH 条件有利于分离碱性化合物，是由于它们为游离与非离子状态。而且，在高 pH 时硅胶基质表面未反应的硅羟基完全电离，表面作用很弱，而在中等 pH 值时，表面硅羟基仅能部分离子化。但在高 pH 条件下使用硅胶基质柱时，必须用适当的操作条件，以尽量减少硅胶担体的溶解：

1 用溶胶－凝胶法制备的低溶解度担体

2 用致密键合、完全封尾的长链烷基配位体的填料

3 用有机或硼酸盐缓冲液(而不用磷酸盐或碳酸盐！)

4 操作温度≤40℃

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

图 5－17*a* 所示为强碱性药物 β－阻滞剂（pK_a＝9.5～9.7）的混合物的初始分离，用致密键合与封尾的 C_8 柱以及上述的条件。图 5－17*b* 表明用相同色谱柱，经约 31000 倍柱体积的 pH 11 流动相的情况（每天 8 小时计，约运行三个月）。甚至在高 pH 条件下，该硅胶基质色谱柱对常规操作也显示出极好的峰形、高柱效、以及足够的稳定性。然而，应注意在 pH 值 8 以上操作时，硅胶基质色谱柱的寿命一般较短。

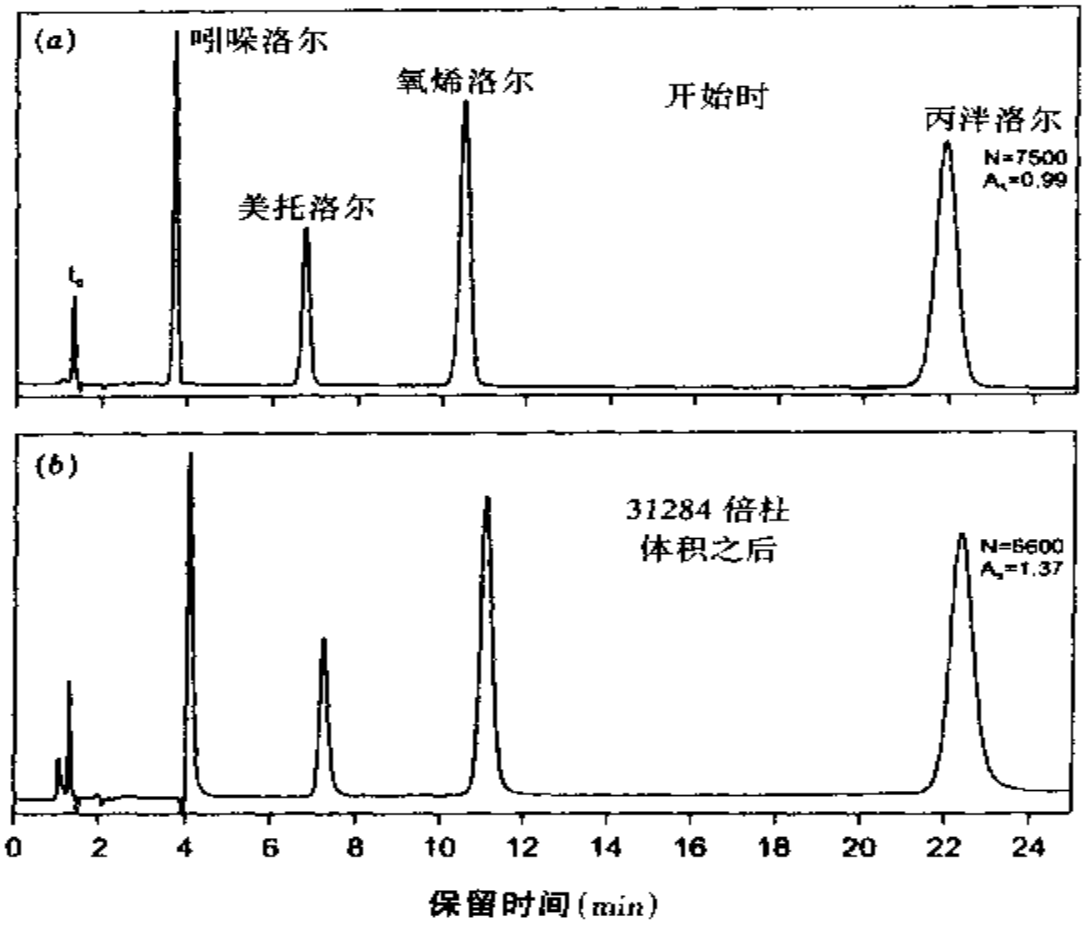


图 5－17　硅胶基质键合相柱在 pH 11 时的稳定性[46a]

色谱柱：15×0.46cm，双封尾的二甲基－C_8（Zorbax XDB－C_8）；流动相：甲醇－0.05M 盐酸 1－甲基哌啶 pH 11.0，（55:45）；流速：1.0mL/min；24℃；UV 检测器，215nm；样品：吲哚洛尔，美托洛尔，氧烯洛尔与丙泮洛尔，pK_a＝9.5～9.7（浓度分别为 0.165，0.413，0.413 与 0.083mg/mL）；进样 5μL。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

5.2.4 保留值与选择性变化的原因

官能团相同(如 C_{18}、C_8 等),由键合相色谱柱的不同引起保留值与选择性变化的原因有:

1 硅胶担体不同

2 硅烷的选择:单官能团或多官能团

3 键合的彻底性:部分或完全反应

4 是否封尾

5 键合化学

6 担体表面积

这些因素中每一个都能使最终的 HPLC 方法变得重现性不好。由于硅胶担体不同,引起的保留值与选择性变化在本章的前部分中已作讨论。例如,表面积不同能引起保留值的变化,担体表面积增加,有机固定相的量与保留值提高。硅胶担体表面上硅羟基类型及浓度的差异,能引起保留值,尤其是选择性的不同。用由酸性弱、纯度高(B 型)的硅胶担体制得的色谱柱分离碱性化合物,批次之间的变化并不大,甚至用不同生产厂家的色谱柱时,情况也是如此。任何情况下,在规定的色谱柱上建立的方法,都应该用至少两个其它批次柱进行证实(论证)后,才可采用(见 15.9 节)。不同厂家的同种色谱柱(如 C_{18})很少得到相同的分离[47]。

用单官能团硅烷制得的色谱柱的分离,批次之间的重现性好于由多官能团硅烷制得的柱。完全反应的(致密键合)填料比部分反应(低硅烷浓度)表面的填料的重现性好,更稳定。(部分反应的担体,当覆盖率明显低于表 5-6 中的数值时,通常能加以鉴别)。完全与部分反应的同一键合相(如 C_{18})填料,也会发生明显的选择性差异。已封尾的填料之间,由于被分离的样品特殊,可见到选择性与峰形状的差异。最后,硅烷化反应条件的不同能引起不同生产厂家键合相相似的填料之间,保留值不同。对于方法建立,许多使用者更喜欢使用反应完全的、单官能团硅烷键合相填料。具有

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

不同官能团的柱填料在表 5－8 中加以概述，另有可用于方法建立的说明。

表 5－8　HPLC 中有用的柱填料[a]

方　　法	评　　论
反相(与离子对)方法	
C_{18}(十八烷基或 ODS)	普适性好；保留性强；用途广
C_8(辛基)	与 C_{18}相似，但保留值稍小
C_3，C_4	保留值小；大多用于肽类与蛋白质
C_1[三甲基硅烷，(TMS)]	保留值最小；最不稳定
苯基，苯乙基	保留值适中；选择性有所不同
CN(氰基)	保留值适中；正相与反相均可使用
NH_2(氨基)	保留性弱；用于烃类；欠稳定
聚苯乙烯基[b]	在 $1 < pH < 13$ 的流动相中稳定；对某些分离峰形好，柱寿命长
正相方法	
CN(氰基)	普适性好；极性适中；用途广
OH(二醇基)	极性大于 CN
NH_2(氨基)	极性大，欠稳定
硅胶[b]	普适性极好；价廉；操作欠方便；用于制备 LC
尺寸排阻方法	
硅胶[b]	普适性极好；作吸附剂用
硅烷化硅胶	吸附性弱，溶剂兼容性好；适用于有机溶剂
OH(二醇基)	欠稳定；在水 SEC 中使用(凝胶过滤)
聚苯乙烯基[b]	广泛用于有机 SEC(凝胶渗透)；一般与水和极性大的有机溶剂不相容
离子交换方法	
键合相	稳定性与重现性均不好
聚苯乙烯基[b]	柱效不高；稳定；重现性好

[a] 除另有说明，均为硅胶基质键合相

[b] 此类填料为非键合相

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

5.3 色谱柱的性能指标

使用色谱柱的类型和构型(粒度、长度、内径等)通常由分离的要求决定。在2.3.3节中,我们讨论了不同长度与粒度的色谱柱的价值。对一指定类型的色谱柱,可能E有许多供应商;然而,这些色谱柱的性能会相差很大。因此,方法建立与以后的日常分离中,需用有关色谱柱规格与性能的某些信息,色谱柱的有关要求包括:

- 某指定 k 值的塔板数 N
- 峰不对称因子(A_s)
- 两种不同溶质的选择性(α)
- 色谱柱的反压
- 保留值(k)的重现性
- 键合相浓度(是否合适)
- 色谱柱的稳定性

如可能,在购买色谱柱之前,应从柱生产厂家获悉这些资料。许多生产厂可为每支柱提供上述前4项数据,包括每支柱的测试色谱图。有的生产厂还提供有关保留值重现性的数据。键合相浓度与柱稳定性的数据一般没有,但在科学刊物中可能会看到某些色谱柱的数据。有些供应商对它们的色谱柱提供担保(如60天),以使用户确信其性能与寿命水平。

5.3.1 理论塔板数

塔板数(N)是色谱柱的一个重要特性。N 定义为产生尖锐、窄谱峰,以及小 α 值时色谱峰达到良好分离度的能力。色谱柱塔板数在2.3.3节中已作讨论。表5-9表明了填充良好的各种长度与粒度的 HPLC 色谱柱的典型塔板数(小分子中性样品,MW ≈ 200)。注意,这些值是在最佳条件下——低粘度流动相与0.5~2.0mL/min 的流速下获得的。下式能用于估计在这些优化条件

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

下，小分子的柱塔板数：

$$N \approx \frac{3500L(\mathrm{cm})}{d_p(\mu\mathrm{m})} \tag{5.1}$$

式中 L 为柱长，d_p 为微粒直径，

表 5－9　在最佳测试条件下，填充良好的 HPLC 色谱柱的塔板数

微粒直径(μm)	柱长(cm)	塔板数 N
10	15	6000－7000
10	25	8000－10000
5	10	7000－9000
5	15	10000－12000
5	25	17000－20000
3	5	6000－7000
3	7.5	9000－11000
3	10	12000－14000
3	15	17000－20000

大多数生产厂家表明他们测定 N 的条件。色谱柱出现问题时，可重复该试验。如果一支新柱的塔板数就很低（N ＜80%声明值），一旦排除仪器问题的可能后，应将柱退回生产厂家，要求退换或退款。仪器与有关的柱外问题，一般极短柱或细径柱较常见，会使柱塔板数低于期望值。

对于现有 HPLC 方法，新柱的塔板数常用特定的样品化合物，用标准（规定的）分离条件进行测定。由于色谱柱塔板数取决于具体的实验条件，所以具体测定化合物的塔板数可能会小于在优化条件下测定的中性小分子溶质的最佳值。当溶质分子较大或流动相粘度较高时，N 值可能仅为最佳值的一半或三分之一。有些溶质的二次保留（由于硅羟基作用）也能引起峰展宽与塔板数小于期望值。应预先考虑可能出现的问题，相应地选择适宜的色谱柱与流动相。如果在方法建立之中，能发现硅羟基所致的副作用，应

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

尽早采取改进措施。如 7.3 节中所讨论，应用一定的色谱柱另加一定的流动相改性剂，往往能纠正这类问题。

有些用户保存 N 值对时间或所测化合物进样次数的系统纪录，使能随时了解柱效的情况。该纪录有助于操作者监测柱性能与预测何时需维修(或更换)色谱柱。N 值使用过程测量值的记录对判断特定生产厂家的色谱柱的整体性能也很有用。

如 9.1.1.2 节所讨论，方法建立之初用 15 或 25cm、5μm 微粒的色谱柱较好。该构型对大多数分离有足够大的 N 值，而且这类柱相当可靠。开始阶段时用大 N 值色谱柱的突出优点是易于辨认出紧密重叠的峰。如果特殊的分离需要大 N 值，可用小体积的接头连接其它柱，以增加柱的长度。

3μm 微粒的短柱对于快速分离很有用(如< 5min)。然而，微粒小于3μm 的色谱柱往往不适于日常应用，由于它们(1)易受样品的

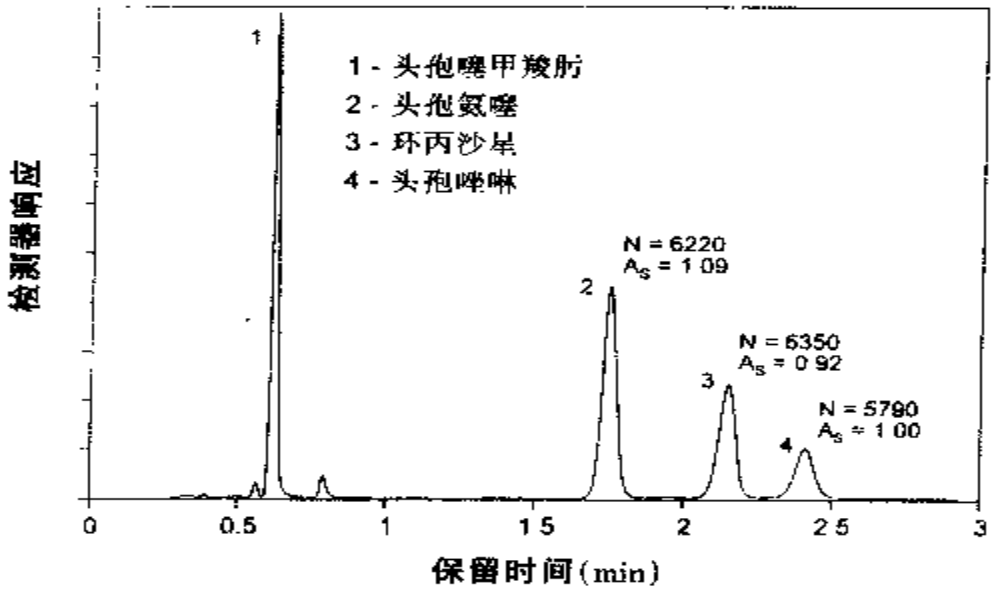


图 5－18　抗生素的快速分离[33]

色谱柱：8.0×0.46cm Zorbax SB－C_8 (3.5μm)；流动相：乙腈－0.1% 三氟醋酸 (8: 92)；流速：3.0mL/min；样品：1μL 中含有 1～4 分别为 0.4、0.36、0.10、0.35μg；60℃；260nm 检测。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

影响，(2)对操作者的依赖性大，(3)更易受仪器谱峰展宽的影响。但如前提及(5.2.2节)，有研究表明，使用大小均一、3.5μm的微粒对减少这类问题，是一个实用的选择[32]。图5－18所示为用3.5μm微粒柱的快速分离的一个示例。用这种分离系统，以高流动相流速，快速分离大分子酸性抗生素时，可得到很好的塔板数与对称谱峰。

5.3.2 峰不对称与拖尾

柱塔板数对衡量色谱柱的质量极为有用，峰形在方法建立中也同等重要。色谱柱与实验条件如能给出对称峰，总是受青睐的。峰不对称能导致：

1 塔板数与分离度测定不准

2 定量不准确

3 分离度降低与峰尾中的小峰检不出

4 保留值的重现性不好

实际工作中用峰不对称因子，A_s，表示峰形，计算如图5－19[48]。峰不对称性在整个峰高的10%处进行测定。理想柱的峰 A_{s} 值为0.95～1.1(绝对的对称峰为 $A_s=1.0$)。为准确测定对称性，谱峰应用放大的时间刻度测定。在压缩(长时间刻度)色谱图中观察不对称谱峰时，往往显得对称。

图5－20所示为不同 A_s 值谱峰的形状与宽度结果。生产厂家有时规定新柱的 A_{s} 值为0.95～1.3。被测样品 A_{s} 值一般应 <1.5。图5－18是峰 A_s 值约为1.0的抗生素药的分离图。另一个定义峰形的有用方式是用峰拖尾因子（PTF），其计算如图5－19所示。有些机构，象美国药典，用此方式规定峰的对称性。此方法在全峰高的5%处计算。峰不对称因子与峰拖尾因子的相互换算很容易，如表5－10所示。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

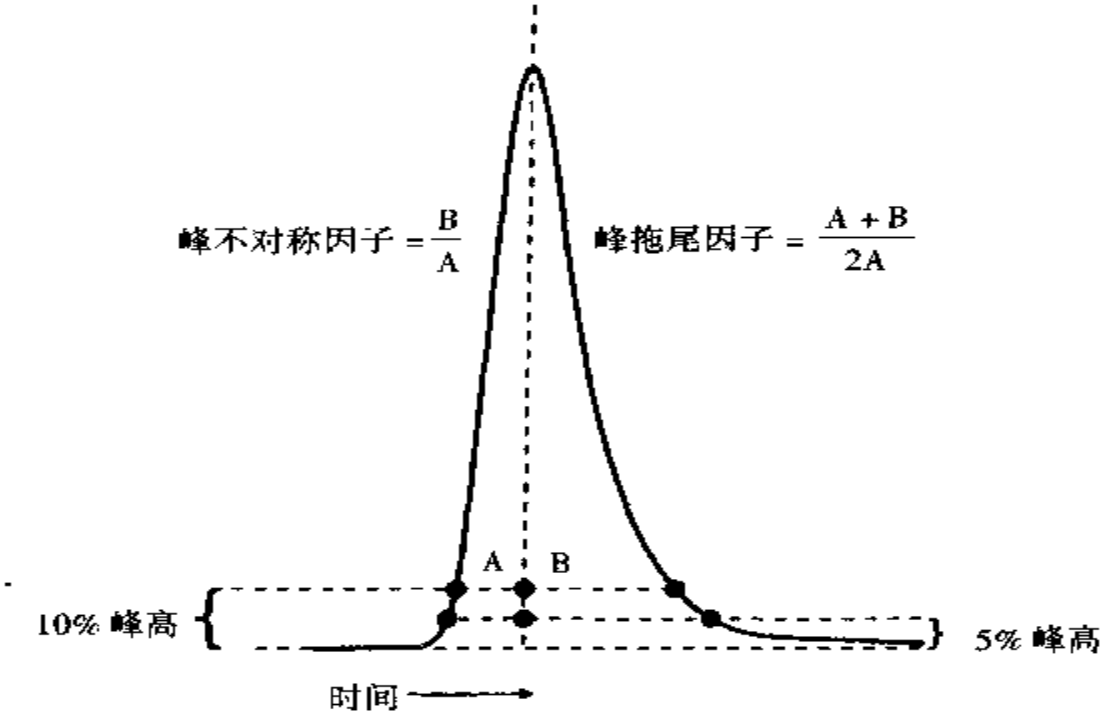


图 5－19　测定峰不对称因子与峰拖尾因子[48]

表 5－10　峰不对称因子与峰拖尾因子的关系

峰不对称因子(10%峰高)	峰拖尾因子(5%峰高)
1.0	1.0
1.3	1.2
1.6	1.4
1.9	1.6
2.2	1.8
2.5	2.0

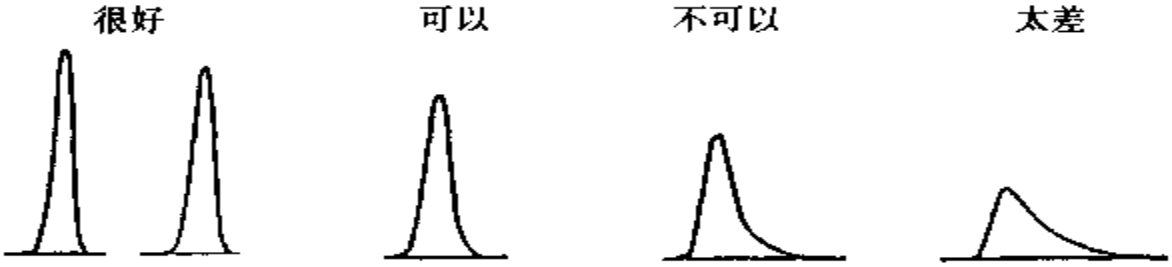


图 5－20　不同不对称因子值的峰形状

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

5.3.3 色谱柱失效：色谱柱寿命应有多长？

制作良好的色谱柱的稳定性与使用寿命，取决于操作者对色谱柱的使用与处理。所有色谱柱最终必然“失效”。当柱不再能保证特殊样品所需的性能时，则应更换新柱。如果塔板数下降 50%，或分离度约降至原值的四分之三（如从 2.0 降至 1.5），可能需更换新柱。一支性能有所降低的色谱柱，对某种分析可能仍然有用。峰不对称值 A_s 增大至> 1.5，也可能是应更换新柱的信号。尽管本章后面描述的技术可用于性能下降色谱柱的复原，但许多实验室却不愿试图再生处理低性能的色谱柱。如急需得到分离结果，往往必须更换新柱，以便尽可能快地恢复日常分析。

色谱柱使用多长时间应更换，与注入样品的类型关系很大。一般干净样品，每支色谱柱正常分析次数为 1000～2000 次。干净样品即为匀质溶液，其成分在每次样品进样之间应能完全流出色谱柱（如按配方配制的样品、药品或反应中间体）。然而，前几节讨论的注意事项必须严格遵循。对于干净样品，一次分析的柱价格大约为$0.20，仅相当于总价格的 1%。对更复杂和脏样品，或那些临界分析条件的样品，每柱的正常分析次数为 200～500。这样，一次分析的柱价格约为$ 1，约相当于总价格的 4%。而对来自生物或极为复杂的物质（如肝脏提取物、富含有机物的土壤等），一般每柱的分析次数为 50～200。这种情况，一次分析的柱价格约为$3，约相当于总价格的 10%。由于一次分析的柱价格较低，在使用建立的方法时，一般总应储存一支高效、性能好的色谱柱，以能适时地提供高质量的结果。

注意一次分析的色谱柱低价格，结合样品预处理的高价格（滤过、提取等；见第 4 章），可能使某些样品的预处理步骤显得过于浪费。在那些情况下，减少样品的预处理，接受色谱柱的短寿命可能更合算。预处理步骤还会降低分析精度，有时不适于日常的实验室工作。当然，在其它分离目的中，不应仅因为柱价格而使分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离受到损害。许多实验室由于柱价格与不易知道何时该更换保护柱以及它们的价格，也不使用保护柱。为延长色谱柱的寿命，有些实验室在色谱柱进口处加装特殊设计的小体积预柱滤器，以滤去颗粒。然而，这些装置必须定期地更换，以防堵塞。因此是否应对样品预处理，取决于样品自身以及分析的目的。第 4 章可帮助决定在分析分离之前是否需进行样品预处理，对具体样品哪种方法最好。

5.3.4 保留值的重现性

不同色谱柱之间的保留时间或 k 值的重现性，可通过测定一系列的标准品来决定，最好极性与非极性的分子都包括。色谱柱厂家往往通过一个试验，评价原色谱柱的性能。在用户实验室中可定期地重复该试验，以确定不同色谱柱之间的保留性能或应用期间每支柱的性能。有时，用户以一个有关化合物（如药物）进行鉴别则更实际，用该化合物以及典型的操作条件观察保留的重现性。当用标准条件操作时，测试化合物的保留时间（或 k 值）应极为接近。如果分离设计得合适，数据记录得恰当，应用系统适用性试验（15.11 节），可为日常分析提供这些数据。

同一生产厂的色谱柱的长期重现性对建立一个普适性强、重现性好的方法是一个重要因素。多个生产厂现在声明它们的键合相柱能长期稳定。比如，图5－21所示为某商品 C_{18}柱四年期间的生产重现性。用甲苯（中性）与 N, N－二甲基苯胺（碱性）k 值的恒定与微小变化说明在此期间硅胶担体表面积的变化。在这段生产期间，这两种溶质的选择性（α）保持恒定是重要的要求。能提供这种信息的生产厂家不多，所以，如需要，用户必须自己进行这类试验。

5.3.5 压力降

当使用的操作条件、色谱柱尺寸和微粒粒度相同时，填充良好的色谱柱的渗透性或反压力也应该相似。用球状微粒填充的色谱柱的压力降可用下式估算：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

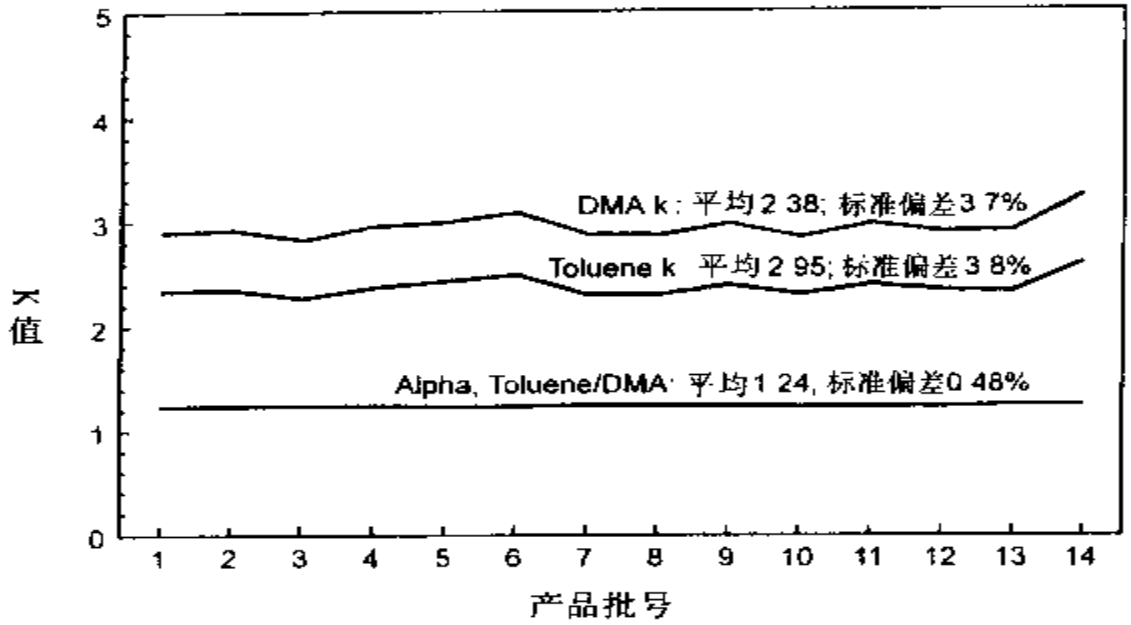


图 5－21　1990～1994 生产的单体硅烷键合相柱 Zorbax Rx－C18 四年间的重现性[44]

色谱柱：15×0.46cm；流动相：乙腈－0.1mM NaH_2PO_4(50：50)；流速：1.6mL/min；试验溶液：N，N－二甲基苯胺与甲苯；22℃。

$$P=\frac{3000\,L\eta}{t_0\,d^2_p} \tag{5.2}$$

式中 P 为压力(psi)，L 为柱长(cm)，η 为流动相粘度(cP)，t_0 为色谱柱的死时间，d_p 为微粒的直径(μm)。新的球状微粒柱的压力降不得超过式 5.2 预测结果的 30%。用不规则微粒填充的色谱柱压力可能会高些。供应商报告的反压力一般是在特定操作条件下测试的结果。

5.3.6 键合相浓度(覆盖率)

制作良好的硅胶键合相是在硅胶担体表面致密覆盖有机基团。实际覆盖率取决于有机配位体的大小：由于空间阻碍，硅烷基团如果较大，则难以达到较高的表面浓度。完全(致密)键合填料的表面浓度（每平方米填料表面键合相的微摩尔数）随烷基基团面不同，相当于表 5－6 中的数值。反应致密、有空间保护基团的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

填料，由于大体积保护基团的空间位阻，其硅烷基团的浓度较低（1.9～2.2μmol/m²）[136]。如表 5－6 中所示，用表面完全反应的色谱柱填料，可能会得到较好的柱间保留重现性和柱寿命。

5.4 色谱柱问题与解决方案

色谱柱在使用中往往出现一些问题。本节中，我们考虑如何辨认这些问题，并着手解决它们，以使方法建立卓有成效。现在讨论 HPLC 方法建立中的三种最重要的问题：(1)保留值与分离度发生变化，(2)谱峰拖尾，(3)色谱柱的寿命短。也可参考文献 49 中有关色谱柱与仪器的预防性保养与维修的常规步骤。

5.4.1 保留值与分离度重现性不好

当建立常规方法时，色谱图中峰的保留值与分离度的重现性极为重要。如果每次分析的样品保留值不能重现，则不能肯定改变条件会使分离改善。因此，方法建立期间每天应至少用与此目的有关的特别条件，检查一次色谱柱保留值，这很重要。整个过程中，k 与 α 值的变化不应超过 2～3%。分离度的变化（由 k、N 或 α 变化引起的）与下面变化有关：(1)色谱柱与其操作条件，(2)仪器影响，(3)分离条件。表 5－11 总结了在 HPLC 中可能发生的保留值与分离度变化的类型，以及每种变化的原因。

色谱柱在使用中必须保持恒定的保留值与可接受的分离度，否则，不能保证方法的准确度与精密度，需经常换新色谱柱。有时新柱会给出不同的分离结果（不能令人满意）。这意味着该方法的操作条件必须加以改进，以恢复所需分离。建立的方法往往需传递至其它的实验室，在那里需用面值相当的色谱柱，以获得可接受的结果。因此，操作者应当留心色谱柱重现性不好的原因。处理这一问题的实用办法讨论如下。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 5－11　HPLC 中保留值与分离度的变化

结果	原　　因	主要变化
柱间差异	担体、键合的不同	k，α
使用期间柱变化	柱床扰乱	N
	键合相丢失	k，α
	硅胶担体溶解	N
	非流出物质堆积堵塞	k、N
柱外效应	系统间：进样量大；进样阀与色谱柱之间和/或色谱柱与检测器之间的管线体积大；检测器体积大；接头体积大	N
分离控制不好	流动相组分改变	k，α
	流速改变	N α
	温度改变	k，α，N^a
柱平衡慢	再平衡时间不足	k，α
柱超载	样品质量太大	k，N

[a]　N 值的变化通常很小。

保留值的重现性可能是建立良好 HPLC 方法的主要问题。解决有关重现性不好的问题，通常有以下几点：

1. 开始时选一支好色谱柱，其担体（如为硅胶基质）酸性弱、纯度高，整个应用中都使用同一固定相、粒度及柱尺寸。

2. 用良好的流动相条件（pH、缓冲液种类及浓度、添加剂等），尽量减小硅胶基质柱的“化学”或“硅羟基效应”。

3. 确保用流动相充分地平衡色谱柱（见 9.1.1.5 节）。

4. 用适宜的实验室技术，确保日间操作的稳定性。

5. 如需要，用保留值图能进行正确的修正（见 10.6 节）。

6. 预存色谱柱，或联系能连续提供同种柱的地方。或者，测试多批色谱柱，以保证所选的特别柱能用于最终方法。

如前所述，不同生产厂的同类型柱（如 C_{18}），往往在保留值与分离度方面有显著差异，这些差异是由硅胶基质和键合化

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

学的不同而引起。所以，不同厂家的色谱柱一般不能通用（见文献50）。图5－22所示为两支不同厂家的 C_{18} 柱对一植物激素混合物截然不同的分离。用 X 公司的 C_{18} 柱的分离结果往往显著不同于 Y 公司的 C_{18} 柱。这一般由于所用硅胶担体的不同而造成。

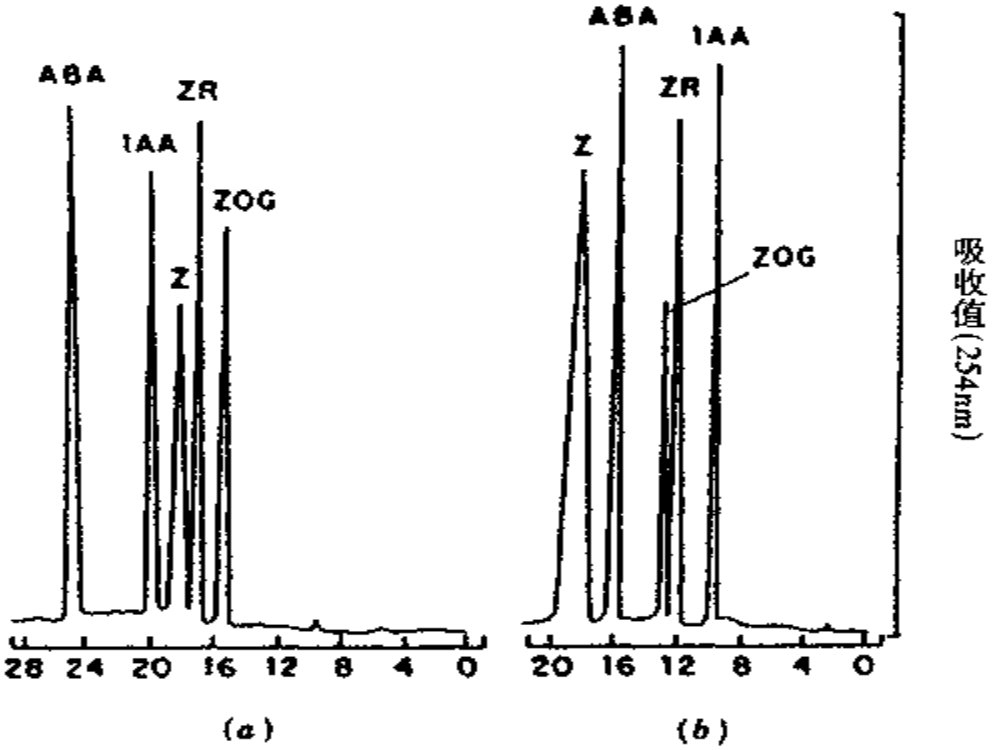


图 5－22　不同 C_{18} 键合相柱的选择性差异：反相梯度洗脱分离植物激素[51]
色谱柱：(a)Hypersil ODS，(b)Spherisorb ODS；流动相梯度：0→50% 甲醇－水(pH 3.3)。化合物：IAA，吲哚－3－醋酸；Z，玉米素；ZR，玉米素核苷；ABA，脱落酸；ZOG，玉米素－o－糖苷。

如 5.1 节中所讨论与图 5－9 与 5－22 的说明，由于不同的化学（硅羟基与其它）作用，柱间的保留值会出现差异。对碱性样品，可用一些分离参数尽量减小这些差异，它们包括：

1 用酸性弱、纯度高的硅胶担体（表 5－4）

2 用 pH≤3 的流动相（反相）

3 缓冲液浓度≥20mM（K^+ 较好，因为其溶解度好，抑制不良硅羟基作用的能力强）

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

开始时，应使流动相尽量简单，以使重现性好、柱平衡快。如峰拖尾或峰形不好，那么操作者可有以下选择：

1 在流动相中，加入 30mM 的三乙胺（用于碱性化合物）或醋酸胺（用于酸性化合物），未知化合物加醋酸三乙胺。

2 如仍然拖尾，将三乙胺换为二甲基辛胺（或醋酸二甲基辛胺）

3 降低进样量至 <1μg

实际上，以上步骤提供了一支“通用柱”的条件，它可减小不同厂家生产的键合相柱分离碱性化合物的差异。有研究表明[20]，用非酸性色谱柱，在低 pH 流动相条件下，碱性化合物在不同批次的色谱柱上有不同的保留值，但这种差异通过在流动相中加三乙胺，可减小到可接受的程度。7.3.3.2 节详细讨论了分离离子或可电离化合物的最佳条件，请参阅。

在缓冲不正确的流动相中，往往发生保留值重现性不好与峰拖尾的现象，也就是说，缓冲液选择不对（7.2.2 节）、缓冲液浓度太低或已超出有效的 pH 缓冲范围（不应超出可电离缓冲液成分的 pk_a1 个 pH 单位！）。增大缓冲液浓度（或减小进样量），通常能改善这种情况。文献 52 采用这些方法研究了 150 多种药物的保留值行为。应用流动相改性剂降低硅羟基作用的讨论见 7.3.3.2 节。

在实验条件控制不好的情况下，保留值与分离度往往发生变化。改变流动相能引起日内或日间色谱图的变化。人工配制流动相时应在同一温度下，用溶剂仔细混合（称重最为准确）。在线混合溶剂的仪器常可减少出错成分。然而，结果出乎意外时，应人工核查仪器混合的准确度。一些低压混合装置的比例阀易出故障，特别当使用高浓度缓冲液时。而且，当任一种输入溶剂低于 10% 时，在线混合的准确度则不如人工配制的流动相。如怀疑流动相组成有误，应仔细新配一次流动相，并重复该分离。应该用人工配

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

制的溶剂核对可疑的在线混合溶剂。

由于所选溶剂的蒸发损失，保留值也可发生变化。该现象在流动相除气或放置期间都可发生。注意，不过该问题对反相 HPLC 不甚重要[53]，除非缓冲剂为挥发性的，如氨和碳酸氢盐。溶剂除气，无论用真空法还是更好的氦驱气法（≈用气体喷散管剧烈搅动 5min），每次都应用相同步骤进行，即使溶剂发生了选择性的挥发，这种方法仍可保证重现性。吸收二氧化碳能使流动相的 pH 改变，在应用中将氦气缓慢、连续地通过流动相储液器，使其覆盖于储液器液体之上，可使进入的二氧化碳减至最低限度。商品在线溶剂脱气机一般很有效，不过，用这些装置，在用新溶剂平衡系统之前，应充分清洗掉过去残留于管线中的溶剂。

由于仪器故障引起的流速变化会使所有谱峰的保留值发生突变，不同实验中会有随机的峰波动。如果流速发生了变化，检测器基线可能漂移，出现高于正常值的基线噪音。而且，柱进口的反压力波动也比平常值大。由于传感阀问题造成的流速变化也能引起压力波动，对色谱柱性能与寿命均有害。通过测定具体一段时间色谱柱流出液的体积，能够测定流速的准确性（约 1% 以内），计算出 mL/min（例如充满 2 或 5mL 容量瓶的时间）。注意，由于该流速测定是一段时间累计的总和，该方法不可能检测出短期的流速变化。文献 49 提供了如何检测和解决这类问题的其它看法，

样品质量过大能引起柱超载峰的保留时间和/或 N 值下降。解决这一问题的通常办法是，凭经验找到使保留时间、塔板数最大的进样量。一般说来，内径约 0.46cm 色谱柱的最大样品量为 10～50μg；当硅羟基作用为保留过程的主要因素时，不足 1μg 的碱性样品也可能造成柱超载。有种可用方法是以大样品量开始试验（10～50μg，除非造成了检测器超载），然后逐渐减小样品量，直至保留时间恒定为止。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

柱温变化是保留值变化的常见原因(见图 7－6 和 11－9)。当分离离子或可电离的化合物时，情况尤其如此，因 α 会随温度发生显著变化。如需高精密度，应将色谱柱保温在 ±0.2℃。如没有恒温装置，绝缘包裹的色谱柱也可减少实验室温度变化的影响。用离子对 HPLC 与 RPC 分离离子或可电离的化合物时，务必使用能恒温的色谱柱。

尽量减少实验室温度变化，可减少未恒温色谱柱的保留值变化。当用自动进样与自动化操作时，恒温环境对减少柱温变化非常重要。这时，柱温变化会造成保留时间的漂移，以至超出某些自动数据处理系统所需要的窄范围“检测窗”。

在方法应用期间内，如果保留值变化是由色谱柱的变化而引起，可利用对操作条件可预测的改变(溶剂强度、溶剂混合等)恢复至可接受的分离。如果能知道不同操作条件的影响，就能达到这一目的，而不必重新再建立新方法。有关化合物的保留值“图”有助于该项目的实现；见 10.3 节与图 1－5 的讨论。在方法建立期间，记录下操作条件微小变化的影响，对分离度下降时作适宜的调整特有价值。

如前提及，同一厂家同类型柱批次间的保留值与选择性也会有显著差异。用一色谱柱建立的特别分离，当再用另一新批号的同类型柱时，分离情况可能不一样。测试一个方法是否运行可靠，最好办法是评价几支不同批次(三支或更多)的色谱柱。所有批次的保留值与选择性的重现性都可接受时，才可认为该方法用于日常应用时有足够的普适性(抗干扰能力)。相关峰的分离至少应达到理想测定所需的最小分离度，应考虑到使用中合理的分离度下降。使用能提供(并担保)高质量，重现性好产品的生产商的色谱柱，可减少重现性问题。当优化流动相不能避免批次间的变化时，一些生产厂可以在数年期间提供相同(大)批号的色谱柱。同一批号的色谱柱应在保留值与色谱性能方面极为相似。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

5.4.2 谱峰拖尾

应避免使用导致峰拖尾或峰不对称的条件。谱峰拖尾使分离质量和精密度下降（尤其当用自动数据系统时）；柱间重现性不佳也可能与峰拖尾有关（硅羟基作用）。本节中，讨论方法建立中的谱峰拖尾与色谱柱及其使用期限的关系。文献 49 包含有关谱峰拖尾的问题与解决办法的全面讨论（亦见 7.3.3.2），请参阅。

当出现拖尾峰时，估算柱塔板数与谱峰分离度时将偏高。拖尾峰可以拖至紧接流出的下一峰中，使每个峰的定量准确度下降。对于不对称因子为 1.2 的峰（峰拖尾因子≈1.15），用半高峰宽方法（式 2.8 a）计算能使塔板数偏高达 30%，导致计算分离度的误差高达 15%[48]。因此，开始建立需高度精密与长期重现的方法时，人们总是希望得到对称性好的峰。

导致峰不对称或谱峰拖尾的原因有很多，见表 5－12 中所概括。生产商的初始柱不好（由于填充不好）是不对称峰的一个偶然原因。用中性化合物测试新柱，如显示峰严重不对称，不可用于方法建立。在排除了是系统问题的可能后，这样的色谱柱应退回生产厂家，要求更换。

表 5－12　不对称（拖尾）峰的原因

色谱柱不好；堵塞筛板或有凹陷
“污物”在柱进口处积聚
样品超载
样品的溶剂不对
柱外效应
化学或二次保留（硅羟基）效应
缓冲不足或不合适
重金属污染

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

拖尾峰常见于使用过度的色谱柱。使用期间，色谱柱可产生严重的峰拖尾(图5－23 *a*)或甚至每个组分出现双峰(图5－23 *b*)。这种结果通常由柱进口处出现了塌陷和/或脏物，部分堵塞进口滤板而造成。有关堵塞进口滤板的问题可仔细更换色谱柱进口滤板(勿搅动填料！)，加以解决。由于柱进口产生塌陷引起的问题，有时可再用同一种填料填补进柱塌陷处而解决。然而，用此法不易恢复或保持色谱柱的初始性能，尽管反向冲洗色谱柱也有效[54]。填补柱塌陷对价格高的色谱柱最实用(如手性柱或制备柱)。其它情况，该法应该仅在紧急情况时用或作为最后的手段。

应用期间，出现宽的拖尾峰(如图5－23)也说明在柱进口处有强保留的样品组分("垃圾")积聚。消除这种情况，有时能用强溶剂彻底冲洗色谱柱。用20倍柱体积(15×0.46cm 的色谱柱，约30mL)的96%二氯甲烷与4%甲醇，加1%氢氧化铵混合液冲洗，对反相柱往往有效；正相柱可用甲醇。在困难情况下，可能有必要用强溶剂以小流速反向冲洗色谱柱。在建立常规方法时，用保护柱是减少强保留样品组分积聚可能性的有效方法，如5.4.3.2节中所讨论。有些方法也需要有效的预处理步骤(见第4章)。

如图5－24所示，注入的样品溶剂强度大于流动相时，往往会造成早流出的谱峰变形和拖尾。本图例中，注入纯乙腈为溶剂的样品与以适宜的18%乙腈－水流动相作溶剂的样品进行分离比

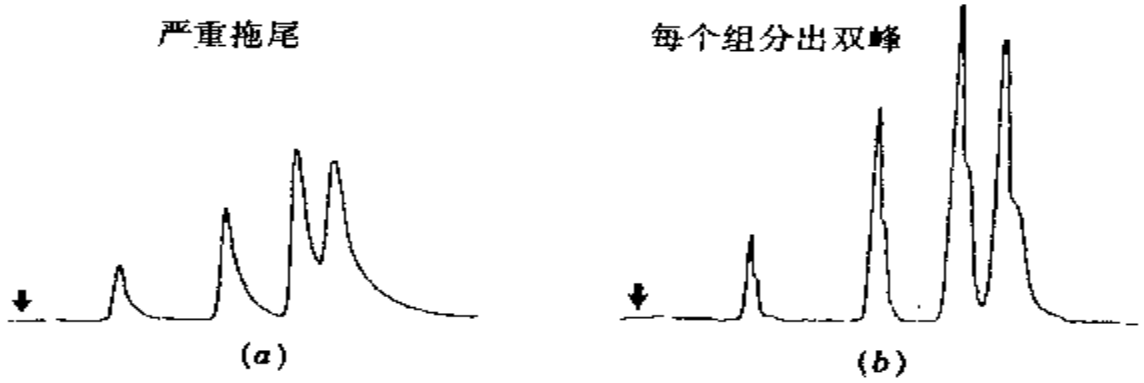


图5－23　色谱柱问题的一些症状

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

较，前者为不对称宽谱峰。当样品难溶于流动相时（或弱溶剂），可取小体积的强溶剂进样（如0.46cm ID 色谱柱，< 25μL）。不过，有可能发生峰形差、样品沉淀、柱堵塞和定量不准确。对难溶的物质，用强溶剂溶解样品后，再用等体积的流动相稀释，往往能成功地进样。

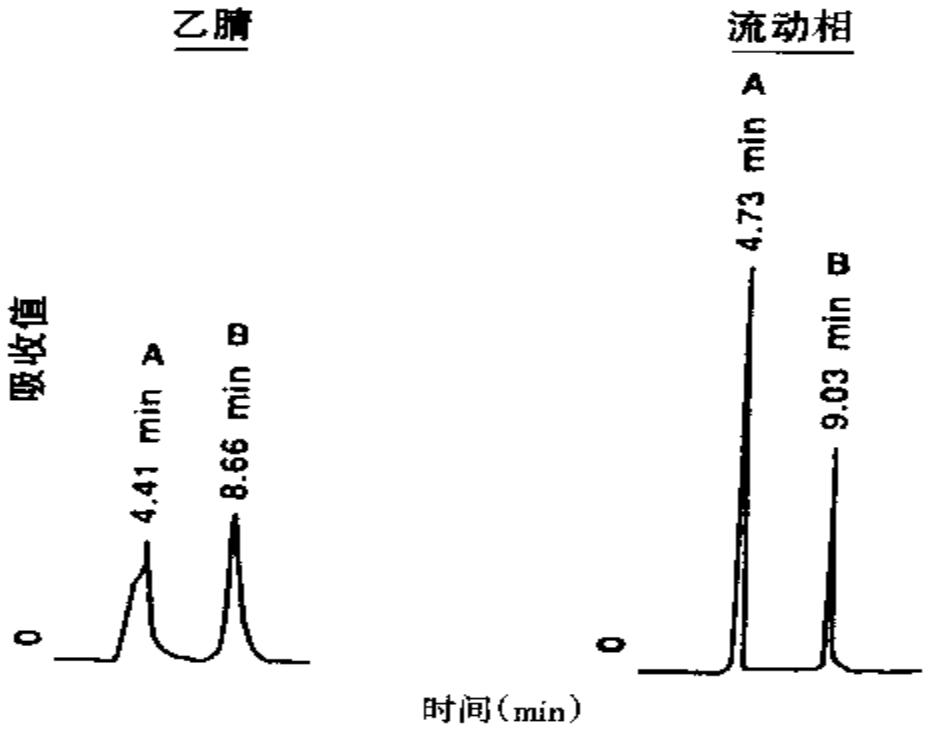


图 5－24　样品溶剂进样的影响[55]

样品体积：30μL；流动相：18% 乙腈－水；以纯乙腈与 18% 乙腈－水流动相注入的咖啡因（A 峰）与水扬酰胺（B 峰）。

与 HPLC 设备有关的柱外效应可引起峰拖尾与谱峰展宽。这些与谱峰扩散效应有关的因素有：（1）进样的体积过大，（2）进样阀、色谱柱及检测器之间的管线体积过大；（3）检测器流通池的体积过大。如 2.3.3.3 节所讨论，所有这些效应的叠加，加剧了峰拖尾，并降低了表观柱效。这种拖尾对那些先流出的峰最明显，因为它们的体积最小（峰最窄）。图 5－25*a* 说明了该效应。其中从3μm细径柱中先流出的较窄峰有明显的拖尾，就是因为与本“标

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

准"HPLC 系统有关的柱外谱峰展宽的作用。而体积渐大的后期流出峰的拖尾现象却逐渐变弱。这种现象(先出峰拖尾最甚)是仪器存在柱外效应的最好佐证。在图 5－25 *b* 中,由于使用了死体积小的"细内径"HPLC 仪器,峰拖尾便不明显了,而且保留时间也变短了。特别要注意,图 5－25 *b* 中细径柱峰的塔板数显著大于图 5－25 *a* 中的标准柱的峰。

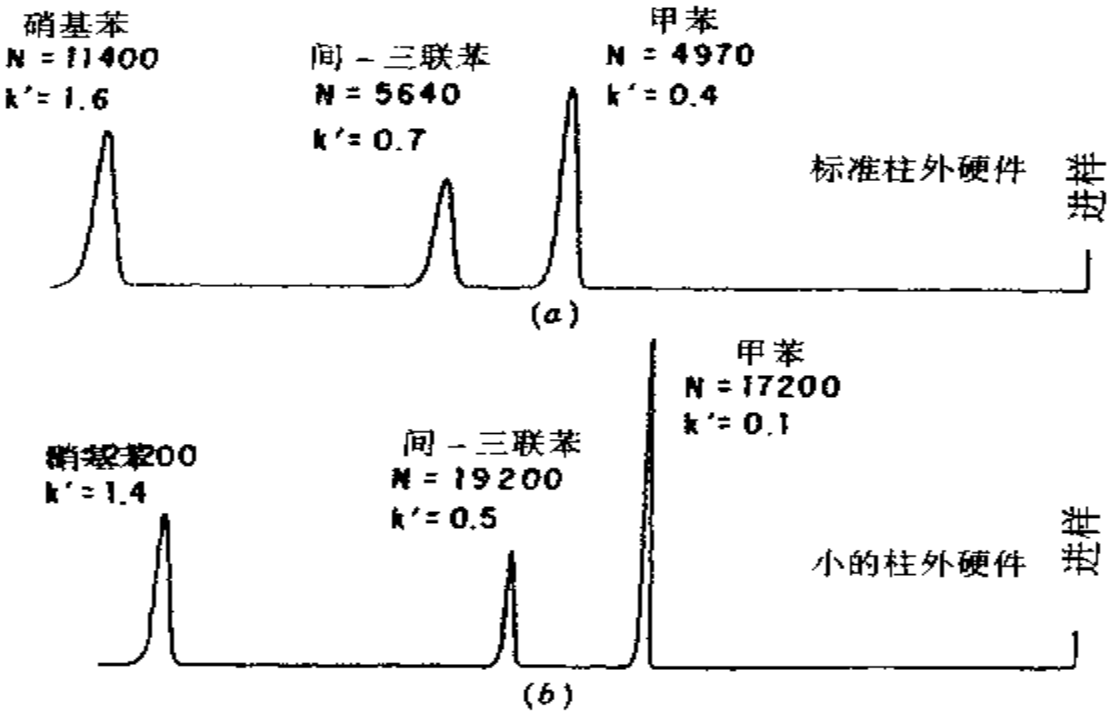


图 5－25　柱外效应造成的谱峰拖尾[56]

色谱柱:15×0.45cm,3μm Spherisorb 硅胶;流动相:己烷－乙腈(99:1 v/v);流速:2.0mL/min。(*a*)10μL 进样阀与 8μL 检测器流通池的商品色谱仪;(*b*)0.5μL 进样阀与 1μL 检测器流通池的低体积系统。

在试图建立分离之前,应消除由于柱外效应引起的峰展宽与拖尾,或使之减至最小:

1 进样体积要小(一般≤25μL)

2 在进样阀与色谱柱,色谱柱与检测器之间用细内径的短连接管线(例如,<20cm,内径为 0.07 吋)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3 确保所有管线用匹配的接头正确连接

4 使用易清洗、体积小的检测器流通池（ $<8\mu L$）（另请参见文献 9 与 56 中柱外效应的讨论）

拖尾或不对称峰的出现也可由各种化学作用而引起，包括流动相/固定相组合与样品之间的不匹配。用含有醋酸盐另加三乙胺的流动相往往能消除这种不良影响（形成 5.4.1 节中的“通用柱”）。有时，只有更换完全不同流动相/固定相组合（例如由反相换为正相），才能解决峰拖尾的问题。

色谱柱中的金属污染（Al、Fe、Ni 等）可使某些化合物的谱峰拖尾。污染金属可由填料本身带进，也可由侵蚀性流动相缓慢溶解柱进口的金属滤片，再沉淀到柱填料中。图 5－26 所示为由于

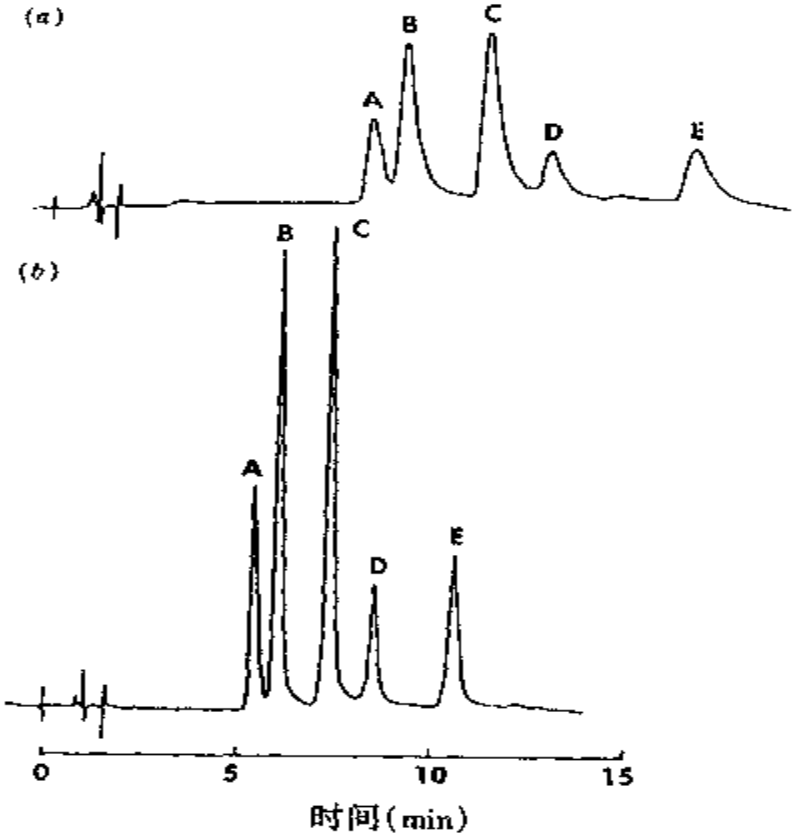


图 5－26　金属污染 C_{18} 硅胶造成的碱性药物的拖尾[57]

（a）初始的硅胶担体；（b）酸洗后的硅胶担体；流动相，20mM 三甲胺。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

C_{18} 填料被金属污染，造成碱性药物的拖尾情况。用高纯度的硅胶担体一般可消除可能的重金属络合问题。

5.4.3 色谱柱寿命

用于正相分离的色谱柱常比其它 HPLC 方法的柱子更稳定。如用来分析“干净”样品，一些正相柱（如硅胶，氰丙基）的使用寿命高达一年以上。聚合型的离子交换（树脂）柱也具备类似的稳定性。而另一方面，以硅胶为基质，用于反相、离子对和离子交换色谱的柱，在这些分离所需的水环境中欠稳定。尽管如此，如果应用条件合适，制作良好的色谱柱在反相条件下，仍能连续稳定地使用数月（成百上千份样品）（见 5.2.3 节）。在下面几节中，我们简要讨论色谱柱中的主要问题与减少和纠正这些问题的技术。

色谱柱降解（或“失效”）有几个原因：

1 进口滤片或柱床部分堵塞

2 吸附有样品杂质（“污物”）

3 柱填充不良

4 机械及热冲击造成空洞

5 担体或固定相遭化学侵蚀

色谱柱将失效的一些“症状”：

1 色谱柱反压增高

2 谱峰拖尾

3 塔板数下降

4 选择性下降

5 保留值减小（或碱性化合物在硅胶基质柱上增大）

表 5－13 概括了色谱柱问题的常见原因以及辨认这些问题的实验参数。比如，滤片与柱床的堵塞，通常会增加色谱柱的反压（×），一般会严重影响谱峰形状（拖尾）与柱塔板数（××）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 5－13　排除色谱柱的问题

原因	压力	拖尾	塔板数	选择性	保留值
堵塞	X	XX	XX		
空洞		XX	XX		
吸附样品	?		X	X	XX
化学冲击		X	X	XX	XX

5.4.3.1 色谱柱滤板问题　专业人员遇到的最常见的色谱柱问题，都与柱进口滤片的堵塞有关。堵塞的滤片往往与保护柱（如果使用的话）的进口有关（见 5.4.3.2 节）。如上所讨论，造成异常峰形的原因，往往是部分堵塞滤片或色谱柱进口处的凹陷。如果怀疑是滤片堵塞，用已知的操作条件，运行一次标准品即可证实。当更换滤片时（不要试图清洗！），应检查柱进口是否有凹陷。如果填料不与色谱柱的顶端齐平，则说明填充床已凹陷了。如上所讨论，柱进口的凹陷问题，有时可再用填料填平进口处解决。如不能更换滤片，应以强溶剂反向冲洗色谱柱，看是否能将进口滤片的堵塞物冲洗出去。（注意：当试图冲洗滤片时，应先将色谱柱与检测器断开，以防可能堵塞检测池。）

注入含有颗粒的样品迟早会堵塞色谱柱进口，降低色谱柱的正常寿命。颗粒也会因进样器与泵密封垫的磨损而带入。在进样阀与色谱柱之间使用 0.25 或 0.5μm 的在线滤器，通常可排除这类问题。这些小体积滤器设计得尽可能减小柱外效应，但经一系列进样后必须更换。色谱柱反压的不断增加通常说明进口滤器需要更换。在线滤器不能代替滤除样品中明显颗粒的步骤，需要注入样品前，先经滤过或离心。乳浊或混浊样品应以 0.25μm 滤膜处理。用装于注射器上的小滤头操作较方便。最后，由于密封与转子磨损造成的微粒是堵塞滤片的主要来源，更换泵密封垫与进样阀转子一般能减少滤片堵塞的问题。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

5.4.3.2 强保留的样品组分 强吸附性的样品组分聚集在柱进口的填料上，能严重地缩短色谱柱的寿命。分析复杂样品时，像生物组织或体液（如血浆）的提取物，含油剂等这种滞留成分的聚集尤成问题；但相对较纯的样品，如合成药品，一般问题不大。色谱柱应用中，严重拖尾峰的出现（如图 5－23）往往是强保留污染物在柱进口处聚集的信号。在进样阀与分析柱之间加接一支保护柱，能够减少这些“污物”的聚集。保护柱通常为一支填充良好的短柱（如 1～2cm），内装有与分析柱相当（或相似）的填料。它能捕获强保留的样品组分，防止进入分析柱。这种保护柱用过之后，可与分析柱分开，以强溶剂反向冲洗，除去其中的污物。或在强保留组分流入分析柱之前，必须定期更换保护柱。有些用户由于额外的费用与不易确定何时该更换新柱，不喜欢用保护柱，有些保护柱的质量问题也限制了它们的应用，尤其是小体积的高效柱，它们的性能特别易受柱外谱峰展宽效应的影响。

至少每日用强溶剂冲洗色谱柱（先卸下保护柱！）能延长色谱柱等度分离时的寿命。这种预防性保养方法能除去在柱进口处缓慢聚集的强保留成分（亦见 5.3.2 节）。（甲醇或乙腈用于反相，甲醇用于正相。）在极端的情况下，可用强溶剂反向冲洗色谱柱。在梯度分离中，用强溶剂清洗色谱柱实施较方便，每次梯度结束时，以 100% 强（B）溶剂冲洗色谱柱至少 20～30 倍柱体积。“脏”样品应进行预处理，除去强保留组分（晚流出物）以及微粒。第 4 章中，我们已讨论了样品预处理方法。另一方面，适宜地应用保护柱是有效的，日常应用中最好使用。

5.4.3.3 填充不良的色谱柱 填充柱的初始状况与其使用的方式对其本身的寿命有重要的影响。较短时间应用后，填充床的压缩通常使柱进口处产生凹陷，柱塔板数突然降低。色谱柱填充不良时，会出现凹陷。遗憾的是，色谱柱的初始状况（即塔板数、不对称因子等）往往不能很好地说明柱床是否稳定。它只能在实

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

际应用中受力时来确定。此问题的实用答案是使用一贯生产稳定产品厂家的色谱柱。

5.4.3.4 压力影响 应避免突然的压力波动与任何的机械与热力冲击，这会有助于尽量减少峰形和 N 值的变化，而这些变化将决定是否更换色谱柱。各种机械与热力冲击（如色谱柱掉在实验台上或骤然改变柱温）也应尽量减少。进样过程中，转动进样阀太慢引起压力波动，会使色谱柱产生裂隙，这是某些自动进样器的专属问题。压力波动也是柱切换方法的一个专属问题（见4.6节）。阀切换时无压力波动的特殊阀已经问世（如 Rheodyne MBB）。使用填充良好的色谱柱，在低柱压下操作，可大大减少由于压力波动造成的分离度损失。由于制作良好的色谱柱普适性能好，有关压力的注意事项对延长硅胶基质色谱柱的柱寿命不太重要。然而，其他类型微粒的色谱柱有时太脆弱，不能抵御显著的流速、压力和温度的变化。

5.4.3.5 化学影响 在分离中，固定相的流失会显著地降低色谱柱的使用寿命。应避免使用能导致固定相迅速流失的固定相/流动相组合（采纳色谱柱生产厂家的建议。）短链硅烷基团的反相柱最不稳定，在强侵蚀性的流动相中（如 pH< 2.0），这类柱中有些在几小时之内可流失掉大多数的有机相[36]。长链烷基反相柱（C_8或 C_{18}）一般认为较稳定。然而，即使这些色谱柱在极低或极高 pH 应用时，键合相也会流失。用空间保护的硅烷固定相，能在侵蚀力强的低 pH 环境中显示较强的稳定性（图5－12）。实际上，假如遵守适宜的操作步骤（$2.5 \leq pH \leq 8.0$），许多 C_8和 C_{18}色谱柱往往具有长期的稳定性。

5.4.3.6 其他因素 反相色谱柱上键合的有机配位体的稳定性取决于用作担体的硅胶类型与酸度[5,11,46]。用经完全羟基化的硅胶制得的填料，其表面的硅羟基分布均匀单一，具有上乘的稳定性。有研究表明，反相填料的稳定性与硅胶表面的 pH 密切相关[12]。用表面酸性低、纯度高的硅胶担体制得的色谱柱，键合相稳定

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

性显然较高(见表5－4)。

在高温时,硅胶基质色谱柱上的固定相流失加速。图5－27为致密键合的二甲基－C_{18}柱,当温度由40增加到60℃,并用 pH 7的磷酸盐缓冲液时,硅胶担体溶解性的巨大差异。当用磷酸盐缓冲液,以中等或高 pH 操作时,应小心使用超过40℃的温度[46]。用有机缓冲液(如 TRIS、HEPES、枸橼酸盐等)与在中等 pH(6～9)使用磷酸盐缓冲液相比,可显著延长色谱柱的寿命[46,46a];亦见图5－16。在 pH 4～6操作的色谱柱,高温时也较稳定,因为在该 pH 下常用的缓冲液(醋酸盐、枸橼酸盐)对硅胶的溶解度较低。在 pH≤3时,高温操作能很快使键合固定相离解,导致长期保留值的重现性问题。有空间保护固定相的色谱柱例外(见5.2.3节)。二异丙基－C_{18}填料的硅胶基质色谱柱在90℃和 pH 0.9下能长期操作,未发现退化现象(见图5－12和文献45)。

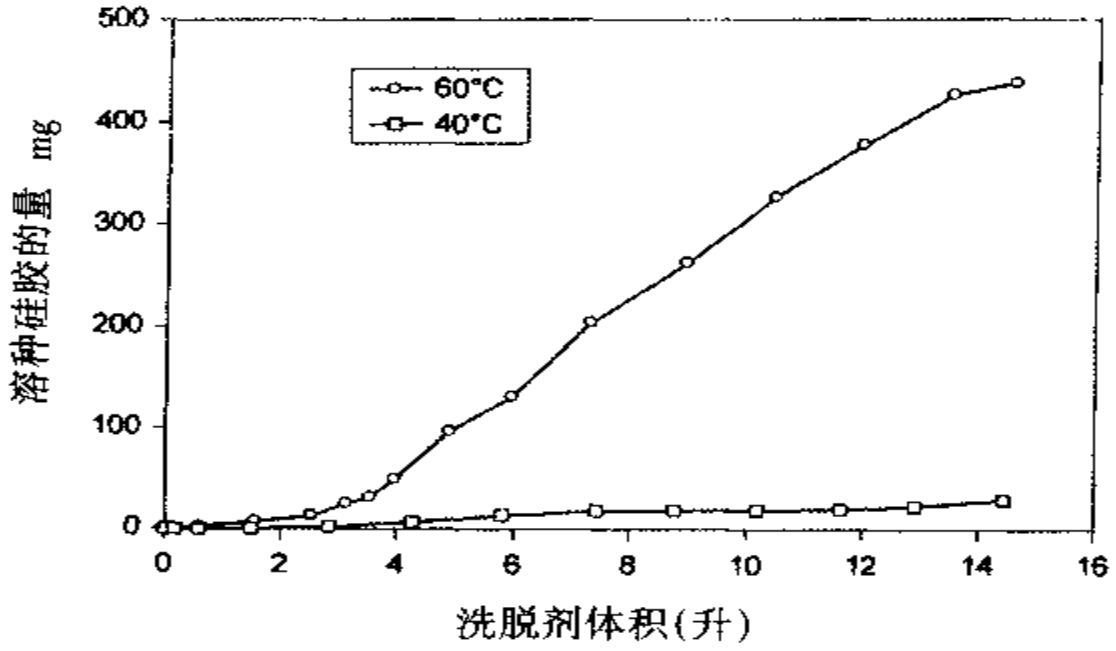


图 5－27　用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液时,温度对硅胶担体溶出的影响[46]
色谱柱:Zorbax Rx－C_{18}, 15×0.46cm;连续非循环的乙腈－0.25M 磷酸钠缓冲液 pH 7.0,(20:80);1.0mL/min。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

在进样阀前加上一支填有硅胶的预柱（饱和柱），有时能增加在极端操作条件下使用的硅胶基质色谱柱的稳定性，尤其在 pH>8.0[58]。显然此预柱（可用稍粗的微粒装填）以溶解的硅胶饱和了流经的流动相，于是延缓了分析柱中硅胶的溶出。（应在此预柱后面再接一支 0.2μm 的滤器，以滤除进样器引入的微粒）。然而，用预柱也有以下缺点：

1 使色谱柱总反压升高

2 不能监测分析柱的压力

3 减慢了色谱柱的换相与平衡

4 不适用于梯度洗脱

结论是我们不推荐全面使用预柱，用更稳定的色谱柱或侵蚀性不强的流动相是较好的办法。

那些在室温配制并贮存一天以上的缓冲液和水溶液流动相常会产生微生物。由此产生的微粒会阻塞柱进口，显著地缩短柱寿命。因此，每天结束工作时应弃掉不含有机溶剂的水溶液流动相，或者在水性流动相中加 200ppm 的叠氮钠以抑制细菌生长。必须小心处理含叠氮钠的水流动相，因毒性并有潜在的爆炸性。在流动相中加 20% 的有机改性剂，也能抑制微生物的生长。有机改性剂还有助于流动相的脱气。

尽可能将色谱柱贮存于 100% 有机溶剂（乙腈最好）中，这是保存键合相柱性能与寿命的最好方法。应避免在缓冲液中保存（尤其那些含高浓度水和醇类的）。使用缓冲液时，应用 15～20 倍柱体积的不含缓冲剂的同种水－有机流动相冲洗色谱柱，然后再换成 100% 有机溶剂贮存。应避免用纯水冲洗键合致密的 C_{18} 柱。贮存中，应将色谱柱两头塞紧，以防填充床干涸。

表 5－14 概括了能确保良好柱寿命以及稳定性能的工作步骤。文献 49 评述了色谱柱的问题以及如何排除、减少并解决这些困难的方法，请参阅。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 5－14　保证良好柱寿命与性能的步骤

1.用填充良好的色谱柱。
2.尽量减小压力波动;避免机械及热冲击。
3.用保护柱及在线滤器。
4.经常以强溶剂冲洗色谱柱。
5.预处理脏样品,以尽量减少无用的微粒与强保留成分。
6.用稳定的固定相(C_{18}最好)。
7.当在中等 pH 操作时(6～8),用有机缓冲液。
8.用 < 40℃的柱温(除非低 pH 时作空间保护)。
9.大多数硅胶基质的色谱柱,应保持流动相的 pH 在 3.0～8.0。
10.在水流动相与缓冲液中加 200ppm 的叠氮钠。
11.过夜与贮存时,冲洗掉盐和缓冲液,以纯流动相保存(乙腈最好)。

5.4.4　方法建立的推荐色谱柱

大多数 HPLC 方法用硅胶基质的键合相柱作为分离介质。对于那些不需要其他类型的柱填料的分离情况,我们推荐下述色谱柱规格,作为大多数方法建立研究的新起点:

1 色谱柱规格:25或15×0.46cm ID

2 担体微粒:5μm 多孔硅胶微球

3 孔径:80～100Å(大分子除外)

4 键合相:C_8或 C_{18}(用于反相);CN 或二醇基(正相)

具备上述条件的色谱柱,性能好,来源广。随方法建立的进行,也可能需要其它规格、微粒的色谱柱。

参考文献

1. R. E. Majors, *LC/GC*, 9 (1991) 686.
2. K. Kalghatgi and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 443 (1988) 343.
3. K. K. Unger and H. Giesche, Ger. Pat. DE－3543 143.2 (1985).
4. N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yang, and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 519 (1990) 1.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

5. J. J. Kirkland, M. A. van Straten, and H. A. Claessens, *J. Chromatogr. A*. 691(1995) 3.
6. L. R. Snyder and M. A. Stadalius, in *High – Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol. 4, C. Horvath, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1986, pp. 294 – 295.
7. T. D. Wilson and D. M. Simmons, *Chromatographia*, 35 (1993) 295.
8. R. K. Her, *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, 1979, p. 639.
9. K. K. Unger, *Porous Silica*, Elsevier, Amsterdam, 1979.
10. J. L. Glajch, J. J. Kirkland, and J. Kohler, J. Chromatogr., 384 (1986) 81.
11. J. Kohler, D. B. Chase, R. D. Farlee, A. J. Vega, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*,352 (1986) 275.
12. J. Kohler and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, 385 (1987) 125.
13. J. Nawrocki, *Chromatographia*, 31 (1991) 177.
14. J. Nawrocki, *Chromatographia*, 31 (1991) 193.
15. H. Engelhardt, H. Low, and W. Gotzinger, *J. Chromatogr.*, 544 (1991) 371.
16. D. W. Sindorf and G. E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 1487.
17. K. K. Unger, J. N. Kinkel, B. Anspach, and H. Giesche, *J. Chromatogr.*, 296 (1984)3.
18. J. J. Kirkland, C. H. Dilks, Jr., and J. J. DeStefano, *J. Chromatogr.*, 635 (1993) 19.
19. J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and J. J. DeStefano, *Amer. Lab.*, 26 (1994) 36.
20. M. A. Stadalius, J. S. Berus, and L. R. Snyder, *LC/GC*, 6 (1988) 494.
21. P. C. Sadek and P. W. Carr, *J. Chromatogr. Sci.*, 21 (1983) 314.
22. I. Wouters, S. Hendrickx, E. Roets, J. Hoogmartens, and H. Vanderhaehge, *J. Chromatogr.*, 291 (1984) 59.
23. H. A. Claessens, L. A. Vermer, and C. A. Cramers, *LC/GC* Int., 6 (1993) 692.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

24. E. Lamparter, *J. Chromatogr.*, 635 (1993) 155.
25. B. J. Fish, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, II (1993) 517.
26. J. H. Knox, B. Kaus, and G. R. Millard, *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 3.
27. H. Figge, A. Deege, J. Kohler, and G. Schomburg, *J. Chromatogr.*, 351 (1986) 393.
28. J. J. Pesek, J. E. Sandoval, and M. Su, *J. Chromatogr.*, 630 (1993) 95.
29. L. Sun, M. J. Annen, F. Lorenzano – Porras, P. W. Carr, and A. V. McCormick, *J. Colloid interface Sci.*, 163(2) (1994) 464.
30. J. Yu and Z. – E. Rassi, *J. Chromatogr.*, 631 (1993) 91.
31. J. Nawrocki, P. W. Carr, M. P. Rigney, and A. McCormick, *J. Chromatogr. A.* 657(1993) 229.
32. J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 31 (1993) 493.
33. K. M. Kirkland, D. A. McCombs, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. A*, 660(1994) 327.
34. J. J. Kirkland, and J. W. Henderson, *J. Chromatogr. Sci.*, 32 (1994) 473.
35. M. J. Wirth and H. O. Fatunmbi, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 822.
36. J. J. Kirkland, J. L. Glajch, and R. D. Farlee, *Anal. Chem.*, 61 (1988) 2.
37. J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, and H. A. Claessens, *J. Chromatogr.*, in print.
38. J. E. Sandoval and J. J. Pesek, U. S. Pat. 5,017,540, 1991.
39. C. – H. Chu, E. Jonsson, M. Auvinen, J. J. Pesek, and J. E. Sandoval, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 808.
40. U. Bien – Vogelsang, A. Deege, H. Figge, J. Kohler, and G. Schomburg, *Chromatographia B*, 19 (1984) 265.
41, M. Hanson and K. K. Unger, Trends *Anal. Chem.*, 11 (1992) 368.
42. J. L. Glajch and J. J. Kirkland, U. S. Pat. 4,705,725, 1987.
43. J. L. Glajch and J. J. Kirkland, U. S. Pat. 4,847,159, 1989.
44. J. J. Kirkland, *Amer. Lab.*, 26 (1994) 28K.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

45. B. E. Boyes and J. J. Kirkland, *Peptide Res.* 6 (1993) 249.
46. H. A. Claessens, M. A. van Straten, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* A, 728(1996) 259.
46a. J. J. Kirkland and J. J. DeStefano, *GIT Verlag*, GIT Special, Chromatography International, June 1996, p. 62
46b. J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* Sci., 34 (1996) 309.
47. J. P. Scholl, *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 3369.
48. J. J. Kirkland, W. W. Yau, H. J. Stoklosa, and C. H. Dilks, Jr., J. *Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 303.
49. J. W. Dolan and L. R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Humana Press, Totowa, NJ, 1989.
50. P. E. Antle, A. J. Goldberg, and L. R. Snyder, J. Chromatogr., 321 (1985) 1.
51. V. Sjut and M. V. Palmer, *J. Chromatogr.*, 270 (1983) 309.
52. R. W. Roos and C. A. Lau – Cam, *J. Chromatogr.*, 370 (1986) 403.
53. L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* Sci., 21 (1983) 65.
54. J. Vendrell and F. X. Aviles, *J. Chromatogr.*, 356 (1986) 420.
55. J. W. Dolan, *LC/GC*, 4 (1986) 1086.
56. K. W. Freebairn and J. H. Knox, *Chromatographia*, 19 (1984) 37.
57. M. Versele, *Liq. Chromatogr.*, 1 (1983) 217.
58. M. W. Done, J. R. Gant, and P. A. Perrone, *LC/GC*, 3 (1985) 786.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第 6 章　中性样品：反相与正相 HPLC

6.1 引言

如 1.4 节中所论述，HPLC 方法建立的最佳途径由样品的性质决定。本书中所推荐的 HPLC 方法建立策略按一般样品或特殊样品进行分类，见图 1－3。一般样品又分为中性样品和离子样品，离子样品包括含有一种或多种离子的或可电离的化合物（如酸、碱、有机盐）。本章讨论仅含有不可电离化合物的中性样品。而离子化合物的 HPLC 方法建立将在第 7 章中讨论；不过这里所讨论的许多中性化合物的分离办法也同样适用于离子样品。对于同时含有中性和离子样品的 HPLC 方法建立在第 9 章中讨论。

第一部分　反相色谱

反相色谱（RPC）是分离大多数常规样品的首选分离模式，该模式一般比其它液相色谱模式的普适性更好，更方便，获得令人满意的最佳分离效果的可能性更大。RPC 色谱柱柱效高、稳定、重现性好（见 5.3 节）。所采用溶剂的性质决定了这种模式往往更易于检测（尤其是 UV 检测器），因此大多数色谱工作者采用 RPC 分离模式多于其它 HPLC 模式。

尽管许多有机化合物在（水溶液）流动相中溶解度有限，但由于 RPC 的进样量很少（纳克或微克）（见 2.4 节），实际上并不会影响其应用。当样品在 RPC 流动相中溶解度太小时，正相色谱

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

(NPC)则是较好的选择。同样,那些在水溶液中不稳定的样品也可用非水溶剂以 NPC 模式进行分离。

有些样品用 RPC 分离较困难,必须采用其它模式进行分离。含下述化合物之一的样品为特殊样品(见图 1 – 3):强亲水或强疏水化合物、非手性异构体、手性异构体(即对映体,见第 12 章)、生物大分子(见第 11 章)。无机离子或合成聚合物也很"特殊",但本书中不作讨论。强疏水样品由于在 RPC 中被强保留,可能需采用非水条件(非水反相色谱或 NARP,见 6.5 节),正相色谱(NPC)也可进行这类分离(见本章第二部分)。强疏水的生物大分子则可采用疏水作用色谱(HIC)分离,将在第 11 章中讨论。强亲水样品在 RPC 中往往保留不足,亲水离子样品的分离详见第 7 章讨论。由于中性亲水化合物在 NPC 柱上保留很强,用 NPC 分离很好(见 6.6 与 6.7 节)。某些亲水化合物也可以采用亲水作用色谱(HILIC)进行分离(详见 6.6.5 节与第 11 章的讨论)。

非手性异构体(包括立体异构体、非对映异构体、位置异构体等)可以采用某些 RPC 条件分离。但异构体混合物通常采用 NPC(见 6.7 节)或以环糊精键合固定相的 RPC(见 6.3.3 节)进行分离,手性对映体的分离需用特殊条件,详见第 12 章的讨论。

6.2 反相色谱的保留

RPC 的保留机理如图 6 – 1 所示。RPC 分离类似于从水中萃取不同化合物至有机溶剂(如辛醇),疏水(非极性)化合物更易于萃取至非极性的辛醇相中。色谱柱(一般用 C_8 或 C_{18} 键合相修饰的硅胶担体)的极性弱于(水 – 有机)流动相。样品分子在极性流动相和非极性固定相间进行分配,疏水强的(非极性)化合物保留较强。因此,对于一定组成的流动相,样品依其疏水性,保留值不同,所得色谱图如图 6 – 1 所示。亲水(极性)组分保留较弱,先从柱上流出;疏水(非极性)组分后流出;中等极性组分居中流出。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

化合物的 RPC 保留值由其极性和实验条件（包括流动相、色谱柱和柱温）决定。如表 6－1 所示，有数种方式可改变 RPC 中大多数组分的保留值。虽然仍不清楚反相保留的详细机理[1-3]，但保留值可以通过分配过程近似估算出。不考虑保留机理，人们对改变实验条件（流动相、色谱柱、柱温）产生的影响已作了深入的研究，因此可以系统地研究 RPC 的方法建立（如本章和第 9 章所述）。

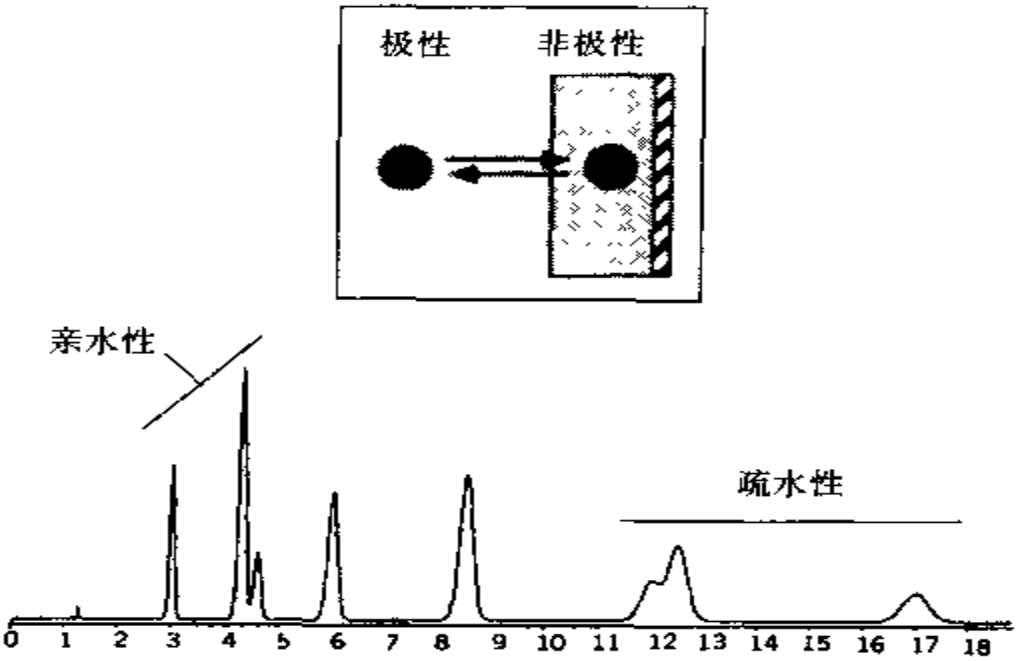


图 6－1　非离子样品的反相分离过程示意图
黑点表示在极性流动相和非极性固定相间分配的样品分子

6.2.1 流动相的影响

通过改变流动相组成或溶剂强度调整保留值（k 值）较好。在 RPC 中，采用弱极性的强流动相时溶质保留值较小。溶剂的极性可由极性指数 P' 表示（见附录Ⅱ中表Ⅱ－2）。溶剂强度取决于所选用的有机溶剂和其在流动相中的浓度：% B，一般 A 代表水，B 代表有机溶剂，% 为体积百分比。方法建立的初始目的是使所有

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

样品化合物有适宜的保留值。如第 2 章所述，用等度条件分离样品时，容许的保留值范围为 $0.5 < k < 20$，不过 $1 < k < 10$ 一般更好

表 6－1　RPC 中改变保留值的办法

减小保留	增大保留
提高柱极性（氰基、C_4）	降低柱极性（C_8、C_{18}）
降低流动相极性	提高流动相极性
（提高%B－增加有机溶剂）	（降低%B－增加水）
（减少极性有机溶剂）	（增加极性有机溶剂）
提高温度	降低温度

6.2.1.1　%B 的选择　方法建立的有效步骤是先以极强的流动相开始试验（如图 6－2 中的 100% ACN）。使用强流动相有可能使首次的运行时间很短，强保留化合物可全部流出。（注意：若采用 100% ACN，在 30～40min 后仍不出峰，应考虑采用其它办法；见第 9 章）。用 100% ACN 时，全部组分接近于 t_0 流出（$k<0.2$），所以需减弱流动相。当 ACN 浓度以 20% 的步长递减到 80% 和 60% 时，分离效果如图 6－2，但两次运行首峰（$t_0=1.0$min，$k<0.5$）的保留结果都不能令人满意。50% 和 40% ACN（都可达到 $0.5<k<20$）均有足够的保留。若流动相非常弱（<30% ACN），则化合物 D 的保留值会太长（$k>20$，如图 6－3 中 D 线所示）。注意用 50% 与 40% ACN 时，4 种化合物均已达到分离，40% ACN 的分离度略好一些（化合物 B 与 C 的 $R_s=2.0$），其代价是运行时间更长。很多样品可以采用溶剂强度调整保留值的办法充分分离。

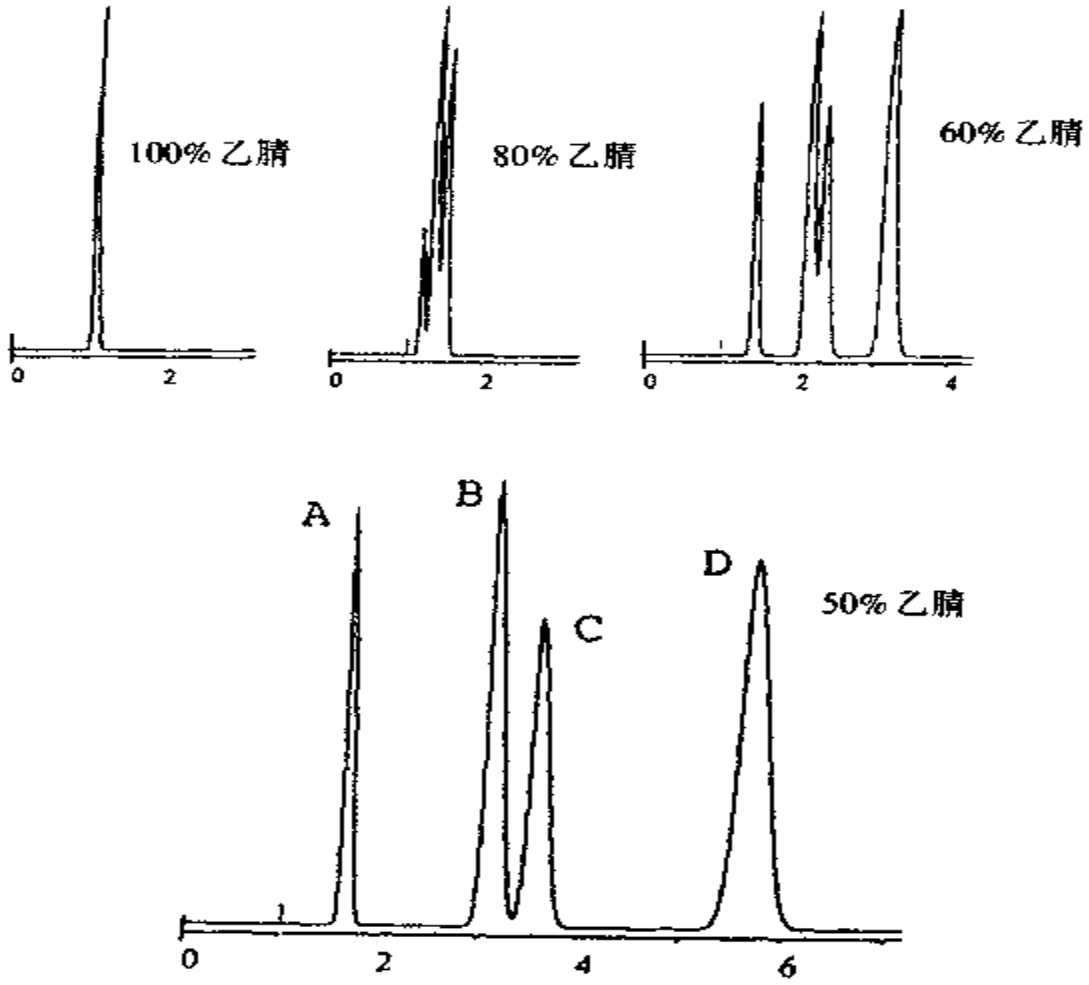
图 6－3 用图 6－2 的保留数据，以 log k 对%B 作图得到。$k=0.5$ 和 $k=20$ 的横虚线规定了保留值可接受时的最小和最大%B 值：30%～56%B（竖虚线）。RPC 保留值与%B 依赖关系的研究已很详尽，见文献[4]的综述。log k 与%B 之间基本呈线性关系（见图 6－3）：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

$$\log k = \log k_w - S\varphi \qquad (6.1)$$

其中 k_w 是仅以水为流动相(0% B)的理论 k 值，S 对特定组分为常数，φ 是有机溶剂在流动相中的体积分数[φ = (% B/100)]。大多数小分子量(<500Da)化合物的 $S \approx 4$。

式 6.1 和 $S \approx 4$ 的结果说明每减少 10% 的 B 相，k 值约增大 2～3 倍，如图 6－2 所示。例如当流动相由 40% B 减少到 30% B，化合物 D 的 k 值则由 9 增至 23(见图 6－3)。3 倍规则(每降低 10% B，k 值增加大约三倍)对于快速估算所有样品组分的保留值均可接受时的最佳% B 值非常有用。



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

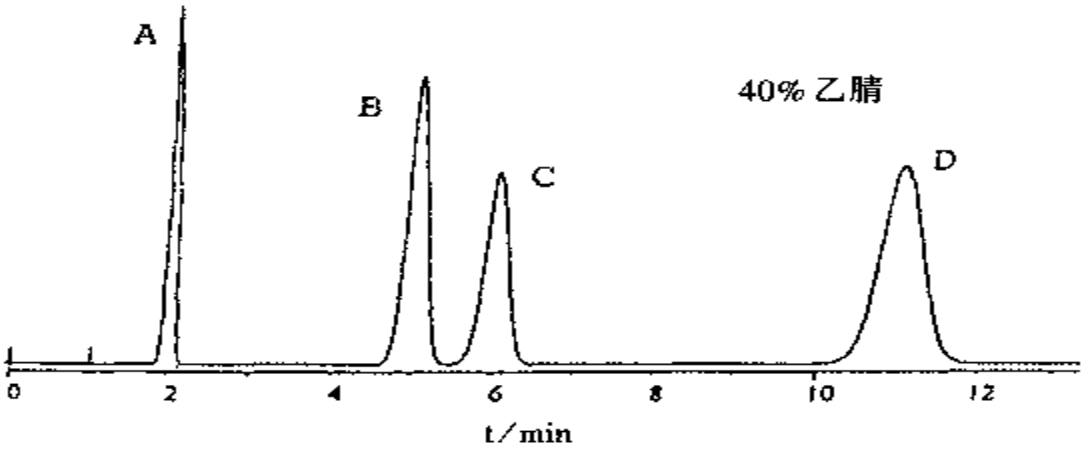


图 6－2　改变有机溶剂浓度对样品 RPC 分离的影响

条件：15×0.46cm　C_{18} 柱，流速 1.5mL/min（t_0 = 1.0min）。

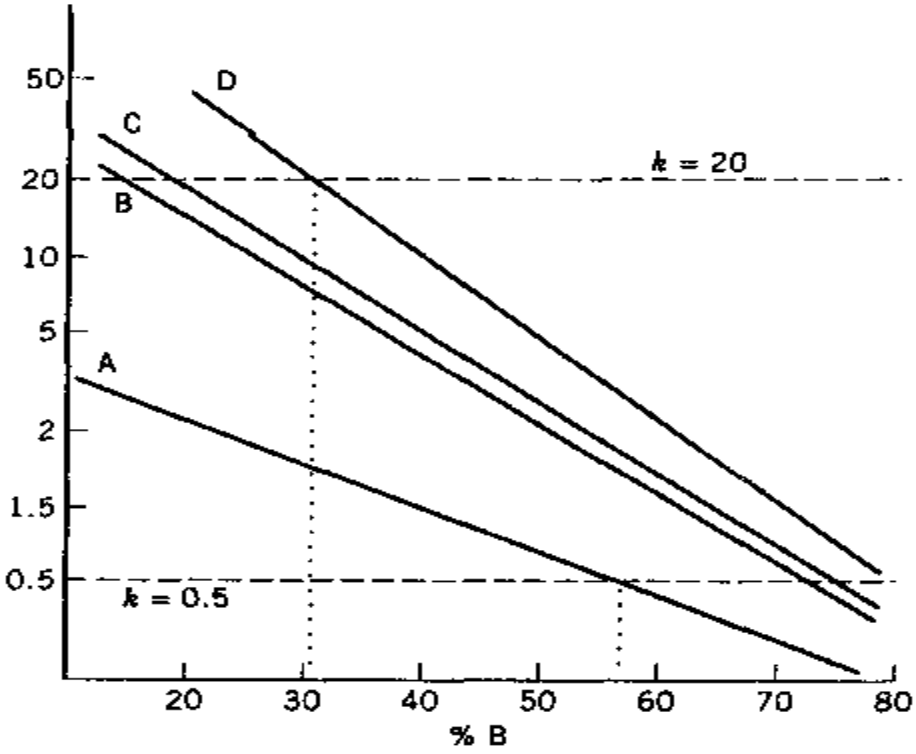


图6－3　图6－2中样品化合物保留值(log k)与流动相强度(%B)的关系图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

通过系统地降低%B 值(如图 6－2)来研究样品保留值,对选择特定样品的最佳流动相组成是一种非常简便的办法。用梯度洗脱则是另一种更快捷的方案(见 8.2.2 节)。

6.2.1.2 流动相强度 RPC 中的流动相强度由%B 和有机溶剂种类共同决定。这些影响见图 6－4 中三种常用 RPC 溶剂:乙腈(ACN),甲醇(MeOH)与四氢呋喃(THF)的溶剂强度计算图。图中的竖线对应位置为具相同流动相强度(k 值)的%B 值。例如:40% ACN 应具有与 50% MeOH 和 30% THF 相似的 k 值和运行时间。标度略不同的流动相强度图也有报道[7,8]。这些不同的标度图非常近似,只能在样品分离时作为粗略参考(准确度 ±5% B)。图 6－4 在 RPC 方法建立中的应用将在 6.3.2 和 6.4.2.2 节中作深入讨论。

图 6－4 及其它文献数据认为 RPC 中溶剂强度顺序为:水(最弱)<甲醇<乙腈<乙醇<四氢呋喃<丙醇<二氯甲烷(最强)。可见溶剂强度随着溶剂极性的降低而增加。附录Ⅱ中收录了一些常用溶剂的极性指数 P'。

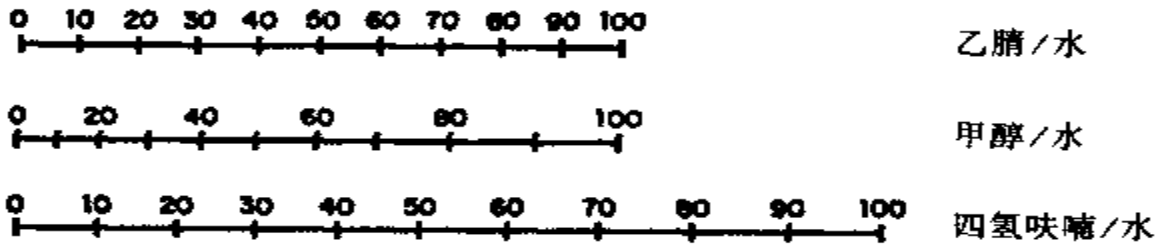


图 6－4 反相 HPLC 的溶剂强度计算图[5,6]

除了二氯甲烷与水不混溶外,上述溶剂都可在 RPC 中与水共用。由于二氯甲烷很强,可用于清洗被强保留样品组分污染的 RPC 柱(见 5.4.3.2 节)。乙腈(ACN)是流动相中有机溶剂的最佳首选,ACN－水流动相可用于低波长(185～210nm) UV 检测,这对于许多样品是非常必要的(见3.2.2 节)。另外,

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

ACN－水流动相的粘度非常低，塔板数较高而柱压较低（二者均为理想性质）。有机溶剂的第二首选是甲醇（MeOH），再者则是四氢呋喃（THF）。这三种溶剂广泛用于 RPC 中，控制选择性与分离（见 6.3.2 节）。THF 有：UV 吸收高，遇氧会发生反应，更换流动相后色谱柱平衡较慢等缺点。但据报道 THF 有独特的选择性。

用 100% ACN 无法将样品洗脱出色谱柱的情况时有发生，这些强疏水样品需用更强的流动相（如高浓度 THF－水或 THF－ACN）。流动相不含水的 HPLC 模式称为非水反相液相色谱（NARP），详见 6.5 节中的讨论。

6.2.2 色谱柱和柱温的影响

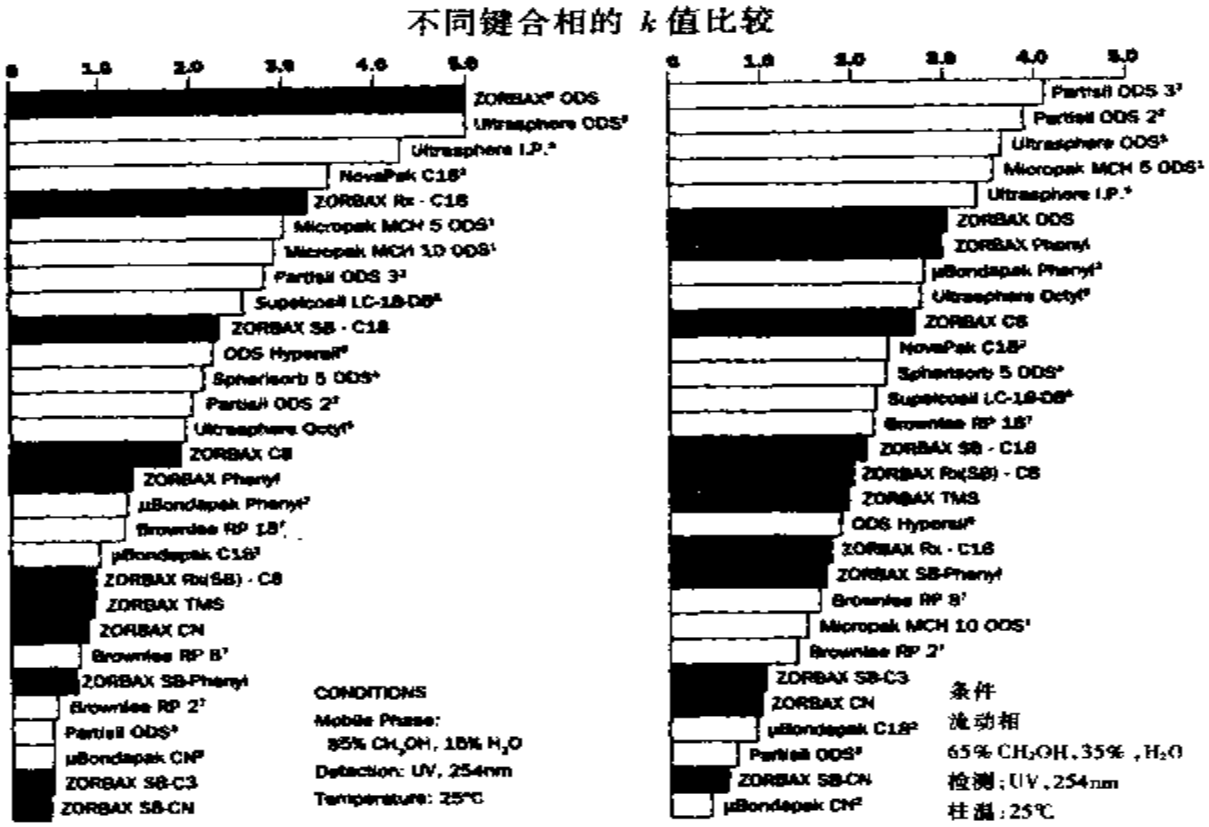
RPC 分离通常使用硅胶基质的键合相柱（见 5.2.3 节）。样品保留值由色谱柱的三个特性决定：柱类型、键合相浓度和柱表面积。保留值随键合相的性质而有所不同[9－10]，通常随链长的增加或键合相基团疏水性的增强而增大。例如，C_{18} 柱的保留值通常略大于 C_8 柱（包括键合相密度等其它条件相同）。非极性、非离子化合物的 RPC 保留值通常遵循以下规则[9－12]：

$$（弱）未键合硅胶 \ll 氰基 < C_1(TMS) < C_3 < C_4 < 苯基 < C_8 \approx C_{18}（强） \tag{6.2}$$

图 6－5 所示为非极性（蒽）与极性（二乙基邻苯二甲酸盐）化合物在不同商品柱上的保留值关系图。当其它条件等同时，聚苯乙烯与多孔石墨碳柱（见 5.2.3.2 节）比 C_{18} 柱的保留更强[13]。柱强度可由键合相判定，如氰基柱较弱，而 C_{18} 柱较强。

另外，k 值与柱表面积成正比。普通柱填料（8nm 孔隙）的表面积大约 $250m^2/g$，而 30nm 孔隙颗粒的表面积大约 $60\ m^2/g$。当其它条件相同时，30nm 孔隙（低表面积）色谱柱的 k 值大约为 8nm 孔隙色谱柱 k 值的 1/4（60:250）。因此，大孔隙（表面积低）的氰基柱很弱，其保留值大大低于小孔隙（表面积大）的 C_{18} 柱。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn



1. 蒽—非极性　　2. 二乙基邻苯二甲酸盐—极性

图 6－5　蒽与二乙基邻苯二甲酸盐在不同商品柱上的保留[12]

改变色谱柱强度可以控制样品的保留值（k 范围），而大多数情况下，改变溶剂强度（%B）更为有效和方便。但有两种例外应注意：疏水性强的组分保留也强，有时即使采用 NARP 条件（见 6.5 节）也不可能从强色谱柱（如小孔隙 C_{18} 柱）上洗脱出来。这种情况下用较弱的色谱柱（如大孔隙氰基柱）可能会使样品较快洗脱出来。同样，用小孔隙、强保留的 C_{18} 柱或（尤其是）石墨碳柱，则利于强亲水样品的洗脱。

对于非离子样品，通常柱温增加 1℃，k 会减少 1～2%，因此可通过改变温度来控制样品保留值（k 范围），这与改变%B 类似。但这种方法在 RPC 中并不常用，因为改变溶剂强度更加有效。对于疏水性极强的样品，在较高温度下采用极强流动相（NARP 见

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

6.5 节)和极弱色谱柱效果更好。

6.3 反相色谱的选择性

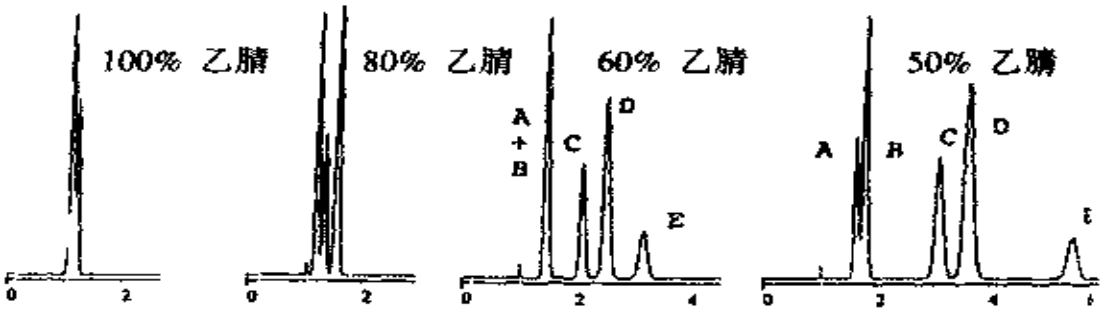
调整样品保留值 k 的范围仅是获得充分分离的第一步。当整体保留值令人满意时(即 $0.5<k<20$),可能有必要改善不同谱峰的峰间距或选择性(α)。RPC 中用来改变中性样品选择性的主要参数有三个:流动相组成、柱类型和柱温,其中改变流动相组成通常最为有效且方便,故应首先考虑。改变温度虽然非常方便,但对 α 值的改变通常较小,不过 α 的很小改变有时可足以分离许多样品。

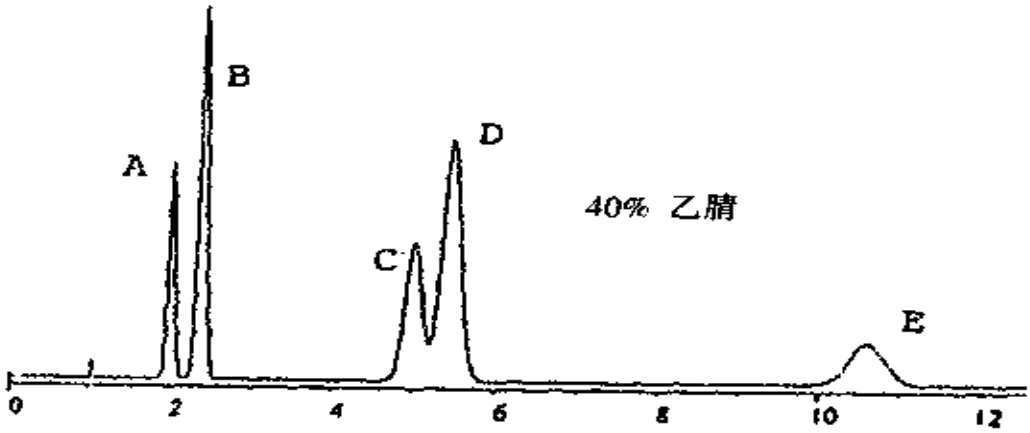
6.3.1 溶剂强度的选择性

降低%B 的主要影响是导致各样品组分的 k 值增加。如图 6-2 所示,%B 的改变使化合物 A~D 的 k 值发生了类似的改变。当%B 从 30% 增加到 56% 时($0.5<k<20$ 范围内),相邻峰对(如化合物 B/C)的选择性(α)变化不大,虽然%B 的降低使分离度不断增加。但其它情况下,相邻峰间距会随%B 显著变化。这种溶剂强度选择性的说明见图 6-6 的示例。采用 60% 与 50% ACN 分离时,A/B 是关键峰对(即采用>50% ACN 的流动相时,化合物 A 与 B 的分离度较差)。由于降低%ACN 能改善 A 与 B 的分离,所以当溶剂强度进一步降低至 40% ACN 时,这两个峰的分离将更好,如图 6-6 所示。当溶剂强度再降低时,峰对 C/D 的分离效果变差,所以当采用 40% ACN 时,化合物 C 与 D 又成为关键峰对。

当%B 的改变使某峰对的分离度增加而另一峰对的分离度降低时(如图 6-6),关键峰对的归属也将发生变化。最佳样品分离度的理想%B 值是两峰对的分离度相同(此时两者都为关键峰对)。在图 6-6 的示例中,采用中间溶剂强度(45% ACN),可获得最佳分离。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn





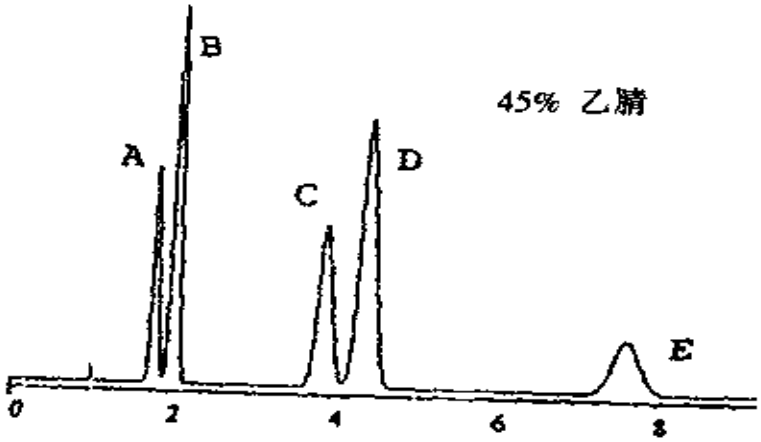


图 6.6　溶剂强度选择性：改变有机溶剂百分比对样品 RPC 分离的影响

条件：15 × 0.46cm　C_{18} 柱，流速 1.5mL/min

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

一般来说，%B 值有一个合适的范围，使样品中各组分均获得可接受的 k 值。在此范围中，特定的流动相组分(%B)能使整体样品分离度最佳(如图 6－6 的 45% ACN)。最佳溶剂强度(%B)的选择可通过试－凑试验获得。40% 和 50% ACN 的运行结果表明，中间浓度的% ACN 可使 2 个峰对(A/B 和 C/D)都较好地分离。如 10.2 节中所述，也可用计算机程序通过最少的运行次数、更精确的获得最佳%B 值。

很多研究表明，通过改变溶剂强度来改变选择性在 RPC 中往往是非常重要的[14－19]，这种方法在调整峰间距方面的一大优点是可以通过不同%B 值找出样品的最佳保留值范围($0.5<k<20$)。这样在为获得充分分离而调整选择性时，需要进行的试验次数一般不多。例如图6－7中所示

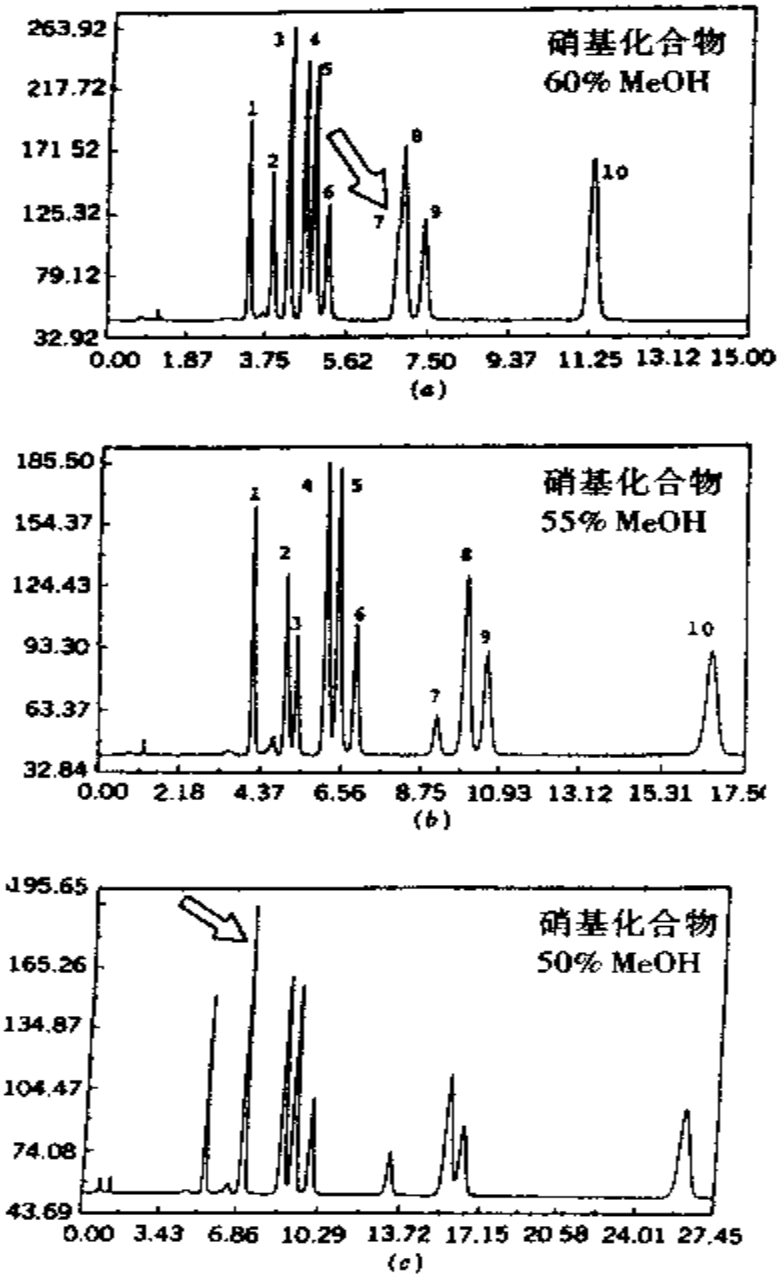


图 6－7　硝基取代苯分离效果与溶剂强度(甲醇百分含量)的关系[16]
箭头所指为关键峰对。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

为硝基取代苯衍生混合物分离的溶剂强度选择性实验[16]。以60% MeOH 作为流动相(见图6－7a),峰7/8(箭头所指)为关键峰对;而采用50% MeOH(图6－7c),峰2/3(箭头所指)为关键峰对。本例中的最佳分离是二者中间的流动相组成:55% MeOH(见图6－7b)。

溶剂强度选择性的应用主要受样品保留值范围的限制 [色谱图中首峰(a)和末峰(z)的保留值之比 k_z/k_a],若保持 $0.5<k<20$,该比值最大可达 40,如该比值较大(如>20),可允许的% B 变化范围将很小,以改变% B 而使选择性发生变化的可能性也很小。当采用梯度洗脱时,这种限制将不太重要(见 8.4.2 节)。

6.3.2 溶剂类型选择性

改变有机溶剂类型来改变峰间距与改善分离度[5,20-25]是一种常用的方法。按照溶质会影响选择性的那些特征(包括酸性、碱性、偶极性等)选用不同的 RPC 溶剂。不同的有机溶剂可根据这些特性进行分类[26](如图 2－6 和 6－8 所示)。这种选择性表示法(溶剂选择性三角形)在 2.3.2 节中已有详述。溶剂分类对实际方法建立的意义在于一般只需选用三种溶剂,即可能将选择性达到要求

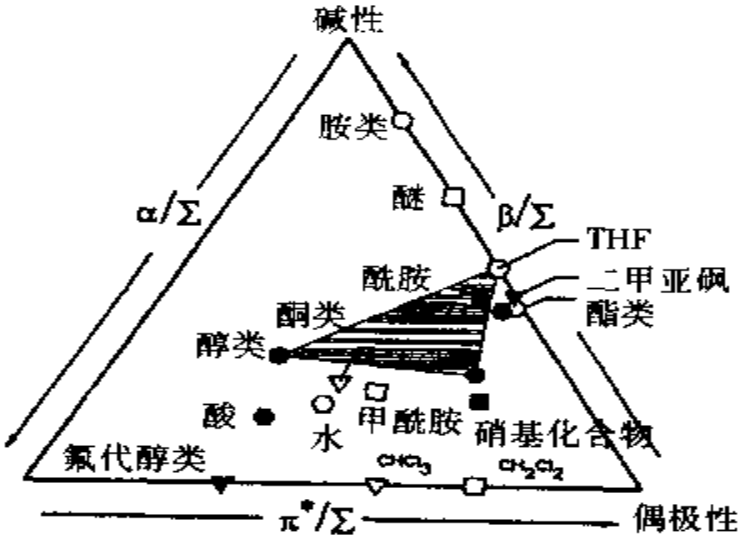


图 6－8 改良的溶剂选择性三角形[26]
阴影区域为 MeOH、ACN、THF 的选择性

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

的结果。图 6－8 中的三种水溶性溶剂 ACN、MeOH、THF 的选择性（阴影部分）有很大差别，其紫外吸收和粘度也较适宜，因此推荐这三种溶剂在 RPC 中作溶剂类型选择性试验。通过适当地混合这三种溶剂可获得理想的选择性（如果特定样品需要的话）。

图 6－9 所示为一溶剂类型选择性的典型示例。50% MeOH 改为 25% THF 使四种化合物的流出顺序完全逆转，但应注意即使流出顺序未发生逆转，选择性的这种变化仍是非常有用的。对于关键峰对，通过改变一些实验条件，即使选择性（或 α 值）有微小增加（2～5%），对获得较好的分离也可能是非常必要的。

图 6－10 所示为一个更复杂的溶剂类型选择示例，采用 50% MeOH（如图 6－10*a*）分离取代苯的混合物，重叠峰 1/2 为关键峰对。用 THF 代替 MeOH，改变%B 保持相同的溶剂强度（见图 6－4）。采用 32% THF（如 6－10*b*）时 1/2 的分离很好，但此时 2/3 又成为关键峰对。因此，这两种流动相的某种混合应能更好地分离该样品，以 50% MeOH 和 32% THF 按 1:4 比例混合可得到如图 6－10*c* 的结果。还应注意，本例中当由 50% MeOH 改为 32% THF 时，谱峰 4～6 的相对保留发生了逆转。

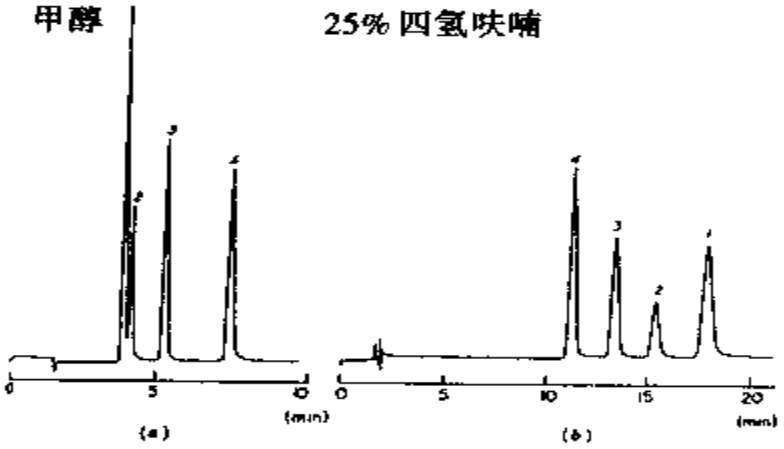


图 6－9　RPC 中溶剂类型的选择性[22]

（*a*）50% MeOH－水；（*b*）25% THF－水

色谱峰：1 对－硝基苯酚；2 对－二硝基苯；3 硝基苯；4 苯甲酸甲酯

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

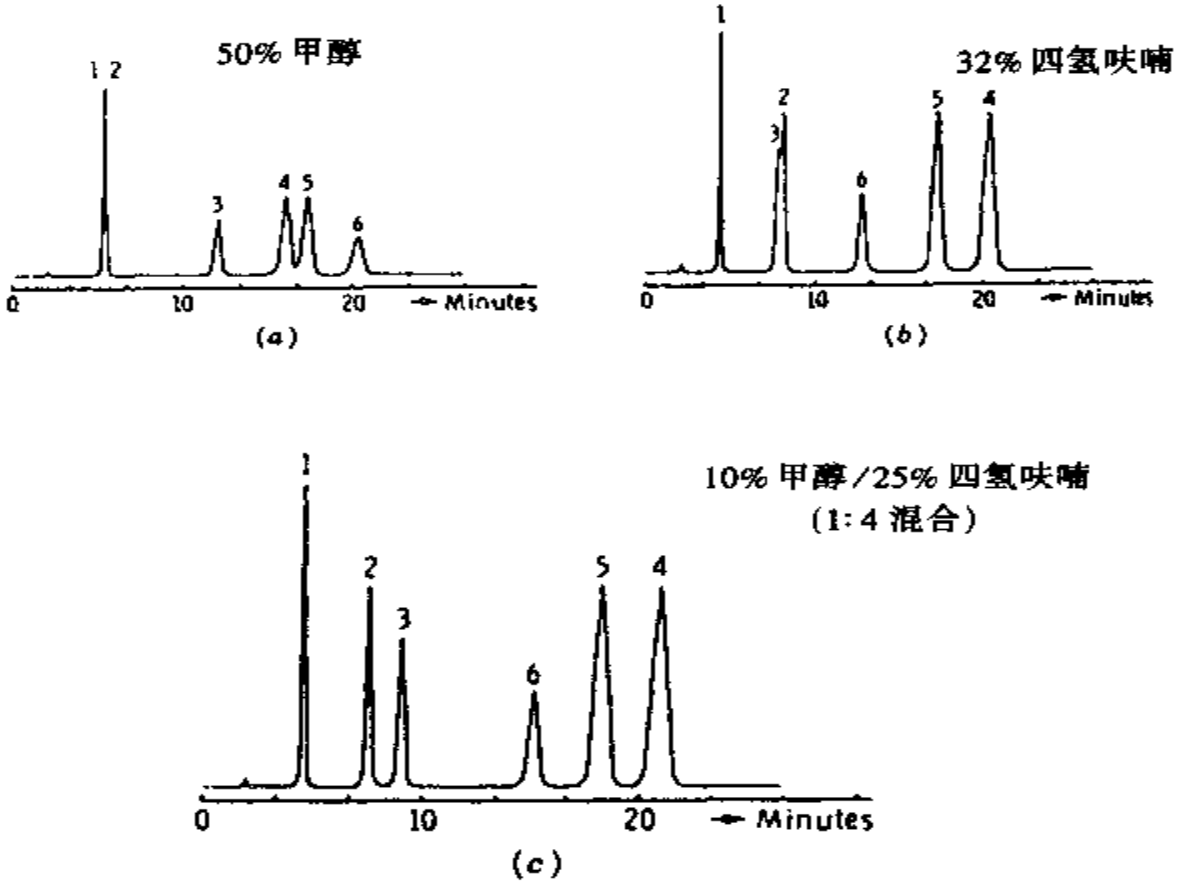


图 6－10　RPC 中溶剂类型的选择性[6]

(a)50% MeOH—水；(b)32% THF—水；(c)10% MeOH—25% THF—水。
色谱峰：1 苯乙醇；2 苯酚；3 3—苯丙醇；4 2,4—二甲基苯酚；5 苯；6 二乙基邻苯二甲酸酯。

优化选择性时，除 ACN、MeOH 和 THF 外，有时也使用二氧六环、丙醇、二甲亚砜、2－甲氧乙醇等[27]。对于某些样品，用这些替代溶剂可能提供有益的选择性差别，但也必须考虑到它们的一些弊端：UV 吸收高、柱压高、以及纯度与稳定性问题。在 RPC 中，改变溶剂类型通常是改变选择性、分离多组分中性样品最有效的措施。因此，在建立复杂样品的反相分离方法时，调节流动相中有机溶剂种类和浓度应作为一种主要手段。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

6.3.3 柱类型对选择性的影响

改变类柱型可改变选择性[9-12,28,29]。在图 6-11 三种不同柱类型的色谱图中，峰间距确有较大变化。例如峰 6 和 7 在苯基和 C_8 柱上的分离效果好于氰基柱。相反，峰 5 和 6 在氰基柱上的分离效果好于 C_8 柱。该样品在这种特定的流动相中，苯基柱的分离最好。改变% B 或溶剂类型有可能进一步改变各柱的选择性，所以对图 6-11 的样品来说，苯基柱可能并非唯一的（或最好的）色谱柱。

如 6.2.2 节中所述，改变柱类型也会改变整体样品组分的保留值。几种除莠剂在键合官能团不同的三种色谱柱上，采用 35% ACN-水进行的分离见图 6-11。溶质在"较强的"C_8 与苯基柱上保留值较大（且运行时间较长），在"较弱的"氰基柱上则较小。改变色谱柱通常不如改变流动相类型效果明显，因此，只有在调整溶剂强度或溶剂类型改变选择性不成功时，才尝试改变柱类型来改善选择性与分离。如果改变色谱柱，必须针对新柱重新优化流动相。也有研究[9,10,29]表明，氰基、苯基与 C_8 或 C_{18} 柱的选择性差异很大。通常应先试验 C_8 或 C_{18} 柱，然后再试氰基柱、苯基柱。

如果只有一种有机溶剂可以采用，这时通过改变柱型来改变选择性可能有利。例如，样品需要在 UV 短波长检测（<210nm）时只有 ACN 和水可用。如某些样品组分或全部样品不稳定或可能与流动相发生反应时，可能需用特殊的有机溶剂。类型相同、来源不同的色谱柱，也可能会影响 RPC 峰间距。如 X 牌号的 C_{18} 柱被替换成 Y 牌号 C_{18} 柱，尽管柱长和直径相同，选择性可能发生改变（尤其是离子样品），但我们不推荐这种方法。这种选择性差别由很多原因引起，包括：所采用硅胶的类型、键合化学的技术和类型，是否经过封尾处理及其它因素（见第 5 章中详述）。不同批次的柱填料之间的差别通常难以控制，导致超过一段时间时柱重现性不好，RPC 方法的普适性变差。该问题的讨论详见 7.3.3 节。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

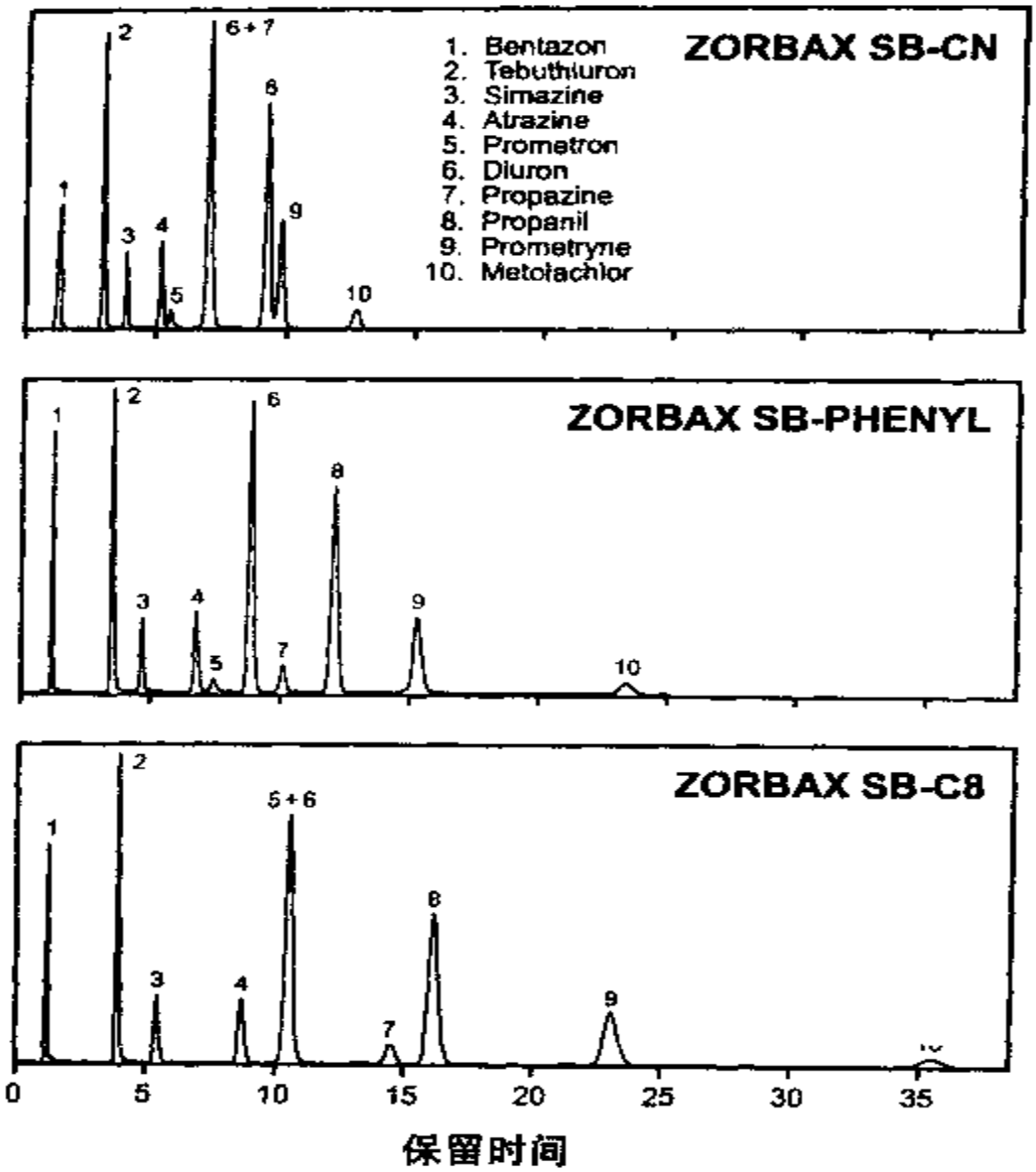


图 6－11　柱类型对选择性的影响[28]

色谱柱：Zorbax SB－CN，SB－苯基，SB－C_8，15×0.46cm；
流动相：ACN－水(35:65)；1.0mL/min；22℃；254nm UV 检测

上述建议的一个重要例外是不要用来源不同的色谱柱作为改变选择性的手段。用多官能团(聚合物)硅烷制备的大孔隙 RPC C_{18} 柱对形状不同的(由于分子内的群集[301])多环芳烃(PAH)似乎

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

有独特的选择性[30]。因此，这种由多官能团硅烷制得的大孔隙柱，适用于PAH 样品混合物的分离。采用 PAH 测试混合物有可能说明 C_{18} 键合情况与相应柱的选择性差异，如文献 30 中所述，也见附录 V。选择性相似的 RPC 柱在一些 HPLC 法中可以相互替换，可由附录 V 中表 V－2 色谱柱的分类中推断(亦见图 5－9)。

环糊精(CD)键合的柱填料也可用于 RPC，尤其是用于分离对映异构体(见 12.5 节)。这些 CD 柱在分离其他(非手性)异构体中也很有效[31－33]。在这方面，CD 键合柱分离异构体可与正相 HPLC 相媲美。见 6.6.1 节与图 6－12 中的示例。

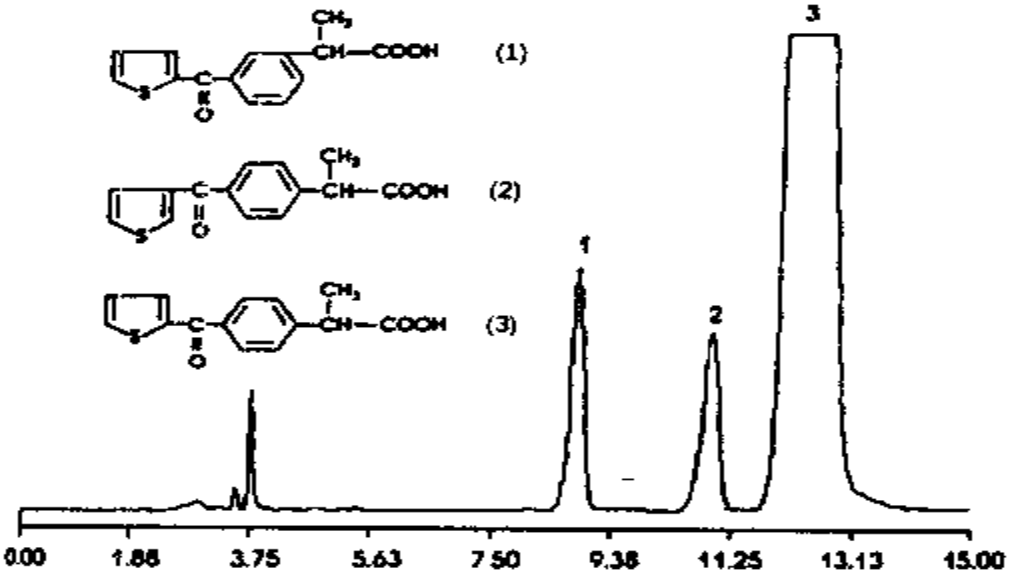


图 6－12　采用环糊精键合柱对异构体的分离[32]
条件：25×0.46cm Cyclobond I 色谱柱
30% ACN－缓冲液(pH4.5)；2.0mL/min；35℃

6.3.4 温度对选择性的影响

采用 RPC 分离中性化合物时，k 值通常随着柱温升高而降低(见 6.2.2 节)。然而，非离子溶质的选择性随温度变化很大的情况不多。因此，大多数情况下，改变柱温对改变非离子化合物的选择性，进面改变分离的效果不大。但图 6－13 中的情况也可能发生，化合物 2 与 4 是两种卷曲分子(邻－三联苯和间－三联苯)，而

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

其余四种化合物是平面稠环多环芳烃。当柱温升高时，平面化合物相对保留值的降低比非平面化合物快。于是关键峰 2～4 在温度变化时峰间距发生了变化；峰 3 在 36℃时重叠入峰 4 中，当温度升高时向峰 2 迁移，48℃时与峰 2 重叠。而在 42℃时达到该流动相/固定相系统的最佳峰间距。

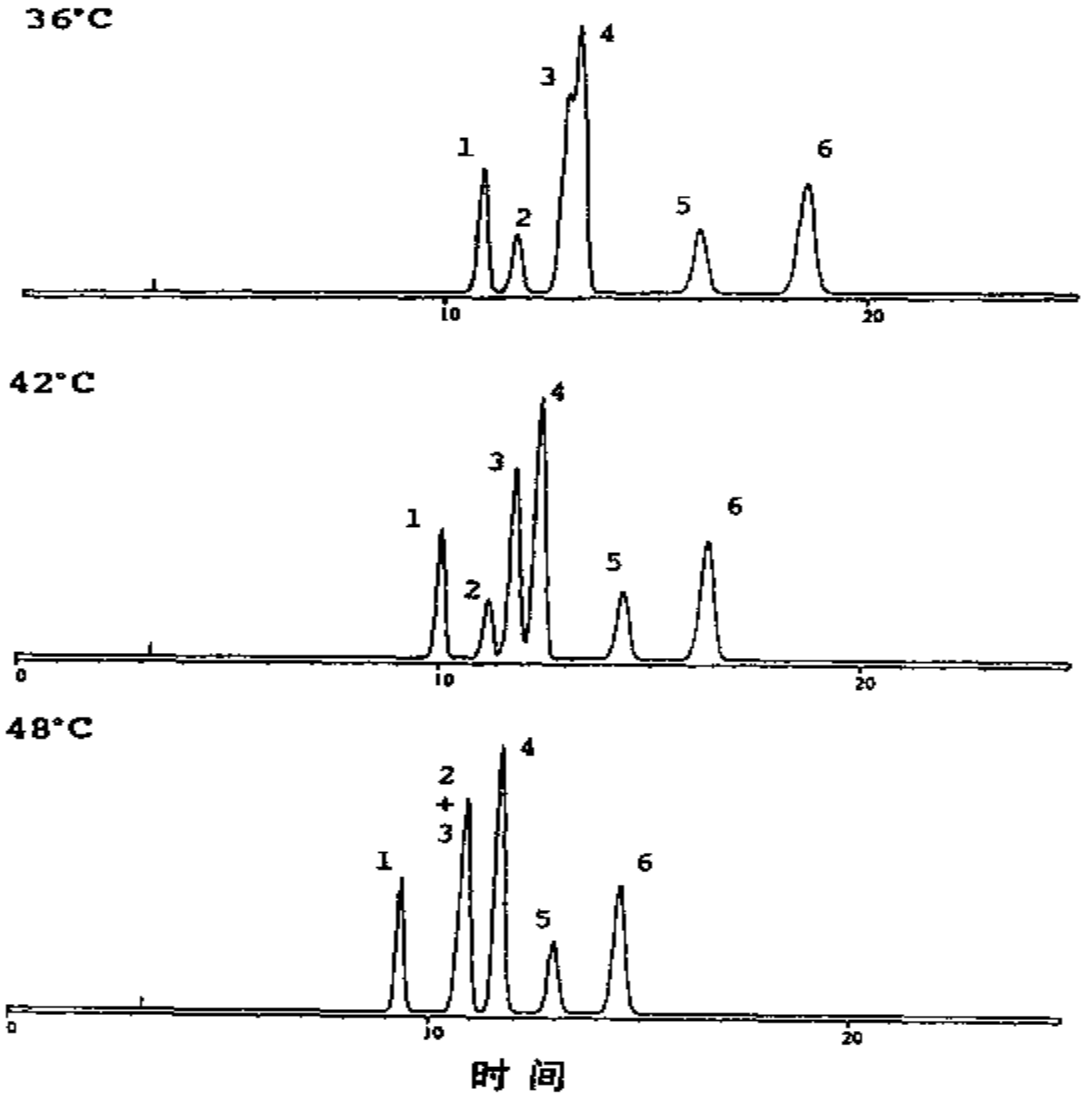


图 6－13　改变柱温对多环芳烃混合物选择性的影响[34]

样品：1. 蒽；2. 邻－三联苯；3. 荧蒽；4. 间－三联苯；5. 苯并[9,10]菲；6. 芘

条件：31.4×0.46cm C_{18} 柱，80% ACN－水 1.0mL/min，柱温如图示

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

6.4 反相色谱中非离子样品分离条件的优化

第 9 章中总结的 RPC 方法建立的初始运行方案适用于各种常规样品(离子的或中性的)。用此方法可以使大多数中性样品达到理想的分离。也可以通过其它方式更有效地进行方法建立,尤其那些需另外方法建立实验、改变选择性的样品。本节中对这样一些技术加以阐述,它们包括:

溶剂类型和%B 的使用(见 6.4.2.2 节)

1 有机溶剂混合使用(见 6.4.2.3 节)

2 柱类型及%B 的改变(见 6.4.2.4 节)

3 不同溶剂和不同柱型的结合使用(6.4.2.5)

6.4.1 开始

为非离子化合物建立 RPC 方法的初始推荐条件见表 1-3 的总结。选取这些参数必须兼顾分离度、运行时间和柱压[35]。15 或 25cm、5μm C_8 或 C_{18} 柱为首选,以未经缓冲 pH 的 ACN-水为流动相。流速 1~2mL/min。为了避免由于室温变化可能引起的保留值和选择性变化,柱温应控制在 35~45℃之间,但温度控制对于分离非离子样品不很重要。如果开始不知道 UV 检测的最佳波长,在 210nm 检测可能是最佳首选(见 3.2.2 节)。

中性样品等度分离的 RPC 方法建立的推荐方法归纳如表 6-2。首次实验采用等度或梯度方法均可。此处假设采用等度;如首次应用梯度实验(这样更好)见 8.2.2 与 9.2.1 节的讨论。图 6-2 与 6-6 所示为采用初始等度分离(100% ACN)与下面进行的试一凑法实验,使样品保留值达到满意($0.5<k<20$)。保留太强或太弱的样品需要特殊处理(见 9.2.2 节)。另外,若峰拖尾、柱塔板数(N)较低或峰形不理想,则应在继续进行方法建立实验前解决。这往往需要采用第 7 章中所讨论的解决方案。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 6－2　反相方法建立的推荐步骤

1 调整%B，使 $0.5 < k < 20$（$1 < k < 10$ 更好）

2 检查峰拖尾或塔板数低的现象

3 如必要，调整选择性

a 微调%B

b 改变有机溶剂

c 混合有机溶剂

d 改变柱类型

e 改变温度

4 优化柱条件（柱长，颗粒尺寸，流速）

6.4.2 优化选择性

使样品保留值范围合适的%ACN 确定之后，可能有必要调整选择性以改善分离（即：使运行时间更短或分离度更佳）。如本章前面所述，有许多方法可改变选择性：表 6－3 中以改变选择性的优先顺序列出了一些可能的方法。

表 6－3　改善选择性的方法[a]

改变溶剂强度	优点：简单方便，在 $0.5 < k < 20$ 范围内通过改变%B 寻找合适的 α 缺点：控制 k 时不如改变溶剂有效，尤其对于等度洗脱时 k（末峰）$\gg k$（首峰）的样品
改变溶剂类型（ACN，MeOH，THF）	优点：当仅改变%B 不足时，改变 α 值的有效办法（α 值的变化可能比仅改变 %B 要大） 缺点：由于需要更多的实验，故不如改变%B 方便
混合不同溶剂	优点：分离一对以上的关键峰对时，可提供中间选择性；扩展了改变溶剂类型的应用范围 缺点：需大量实验——不方便

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

改变柱类型	优点：在改变选择性方面与改变%B的效果相当。当仅有一种溶剂类型（如ACN）可用时，改变柱型则非常有用 缺点：不方便，因为必须安装新柱，并需重新平衡。将不同类型色谱柱串联起来使用，以获得中间选择性的实用价值不大（而混合溶剂则较好）
改变柱温	优点：如柱温可控制，则非常方便 缺点：α 随柱温的变化通常小于其它条件

[a] 大致以重要性优先排序。可结合使用两种或两种以上方法（如改变柱类型时，同时也可改变溶剂强度和/或溶剂类型）。

6.4.2.1 溶剂强度（%B）的影响 改变溶剂强度（%B）方法简便，是分离重叠峰的首选。如图6－6与6－7中所示，调整%B使保留值范围合适时（$0.5<k<20$），溶剂强度对选择性的影响通常很显著。最终选择%B时应综合考虑保留值范围（$0.5<k<20$）、分离度和运行时间。若%ACN值不能得到适宜的选择性（峰重叠），则必须进一步改变实验条件。当研究用另一方式改变选择性时，最好重新优化%B使$0.5<k<20$。

6.4.2.2 溶剂类型与%B的影响 对于大多数中性样品来说，当有机溶剂由ACN替换为MeOH或THF时，那些以ACN作溶剂时重叠的峰对的峰间距和分离度有可能发生很大变化。见图6－14所示的甾体样品的分离。图6－14左侧三张色谱图的流动相分别为24% ACN、45% MeOH与19% THF为流动相，各图末峰的 $k=20$（即溶剂强度相同）。其中24% ACN的峰1和3未分开，而用45% MeOH和19% THF时，该二峰可达基线分离。另外，MeOH和THF的峰4和峰6相对位置发生了改变。

图6－14也说明改变溶剂时，优化%B对选择性及保留值范围（$0.5<k<20$）的重要性。在以ACN作溶剂的情况下，24% ACN（末峰 $k=20$）及42% ACN（首峰 $k=0.5$）均未能将峰1和3分开。这种情况下，即使再进一步调节%B（修饰剂不变）以改变选择性，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

也不可能成功分离该混合物。用 MeOH 作溶剂，当浓度为 45% 时（末峰 $k=20$），4/5 为关键峰对，但浓度为 65% 时（首峰 $k=0.5$），1/2 则为关键峰对。改变% B 关键峰对也改变时，% B 有一中间值可使分离效果最好，48% MeOH 可达到最佳分离（$R_s=1.5$）。以 THF 为溶剂时，浓度在 19% <% B<37% 范围内保留值可达到 $0.5<k<20$。19% THF 时峰 1/2 为关键峰对，而 37% THF 时峰 4/6 为关键峰对。中间浓度值 24% THF 分离最好（$R_s=1.9$）。

图 6－14 的分离列举了简捷的方法建立策略，该策略适于 10 种或 10 种以下组分的样品分离[16,36]。第一组实验的目的为了解% ACN 与分离（R_s 及运行时间）的关系。通常经四或五次运行试验，即可找到最佳% ACN，如图 6－2 和 6－6 所示。如果分离结果可以接受，则不需进一步实验。但对于图 6－14 的甾体样品，仅改变% ACN 不能成功地进行分离，因此应试验其它溶剂。采用溶剂强度计算图（图 6－4）可以很快通过少数几次试验估算出最佳% MeOH。在图 6－14 中，48% MeOH 在 12min 内分离可以达到 $R_s=1.5$。

如用 ACN 或 MeOH 作溶剂，分离度或保留时间均不能满意，应再做几次附加实验，以找出 THF 浓度的最佳值。在本例中，24% THF 可在 9min 内达到 $R_s=1.9$。尽管这是图 6－14 中所示的最佳分离效果，但事先并不能预测哪一种溶剂（ACN，MEOH，THF）最好。如果溶剂类型和% B 的某种结合可以成功的话，图 6－14 的逐步试验步骤则可确保用最少的实验次数获得成功的分离。

6.4.2.3 混合有机溶剂的使用 图 6－15 中列出了另一种优化溶剂类型选择性的有效方法。该方法在保持溶剂强度恒定的同时，按各种可能的比例混合 ACN，MeOH 和 THF。图 6－15 中实验 1 先调节% ACN，使达到 $0.5<k<20$ 的分离结果。若分离不充分，进一步实验（实验 2，3...）直到分离结果满意。基于实验 1 的最佳% ACN，从溶剂强度计算图中（图 6－4）选出实验 2（MeOH）和

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

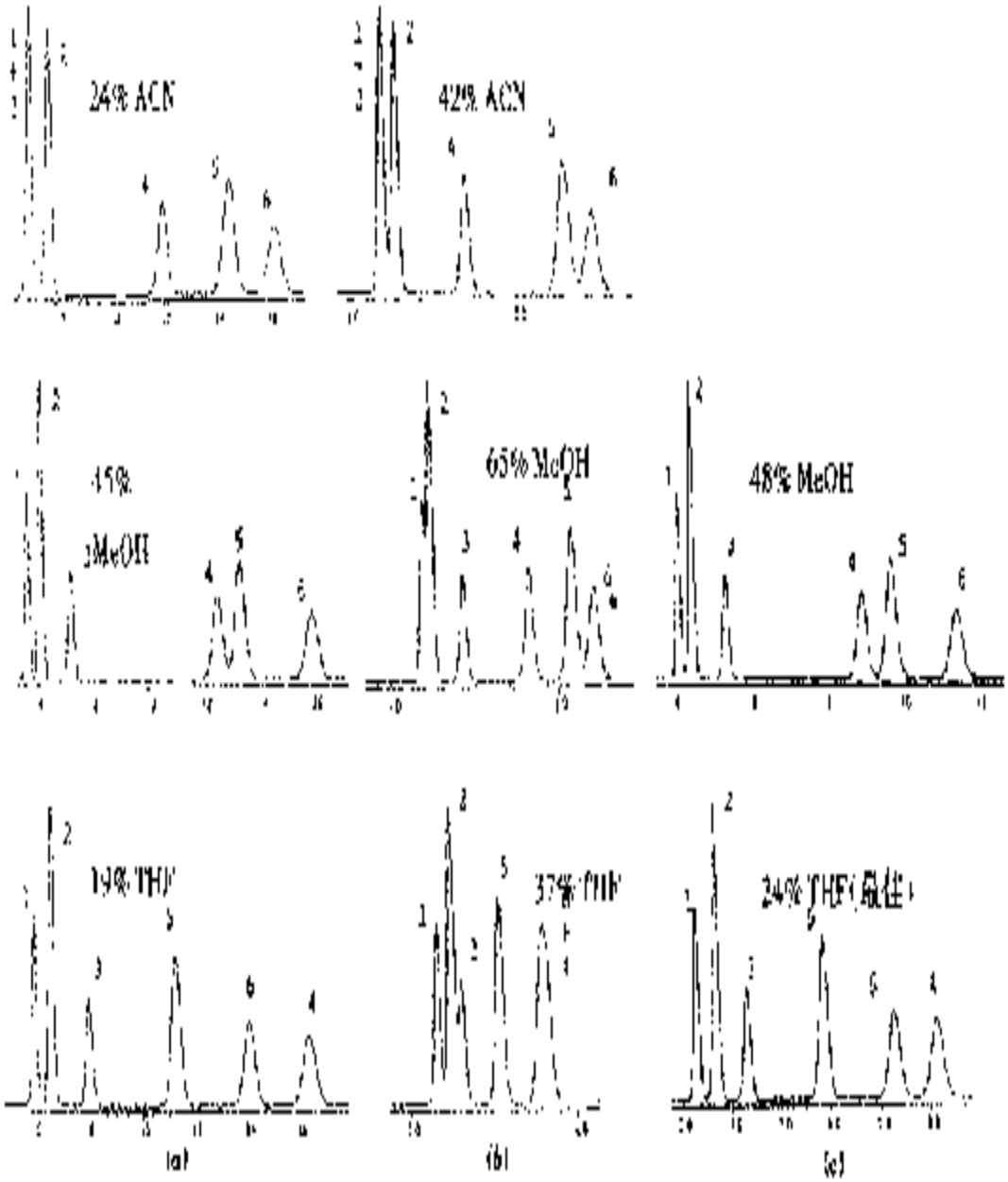


图 6-14　溶剂强度和溶剂类型的优化[16]

样品:1 强的松 2 可的松 3 氢化可的松 4 地塞米松 5 皮质酮 6 11-脱氧皮质

条件:15×0.46cm Zorbax C_8 柱;2.0mL/min;35℃

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

流动相	混合流动相的体积		
	实验 1	实验 2	实验 3
实验 4	1	1	
实验 5	1		1
实验 6		1	1
实验 7	1	1	1

3(THF)的流动相。实验 4 ~ 7 的流动相由实验 1 ~ 3 的流动相按不同比例混合配制。例如，运行 4 中流动相由等体积的实验 1 和 2 的流动相混合制得。

经过图 6 – 15 中的七次实验，即可得到使样品获得最佳分离度的流动相组成。如前所述[23]，该步骤可借助计算机，实现方法建立自动化(见 10.3 节)。不过，图 6 – 16 说明仍不采用计算机进行逐步方法建立，可能不必用图 6 – 15 的全部七次实验。

图 6 – 16 中的九组分样品为取代萘的混合物。开始用改变% ACN 的方法进行实验，结果 52% ACN 可得到 $0.7<k<8$(保留值可接受)：图 6 – 16 的实验 1。该浓度 52% ACN 有两组峰对重叠(2/

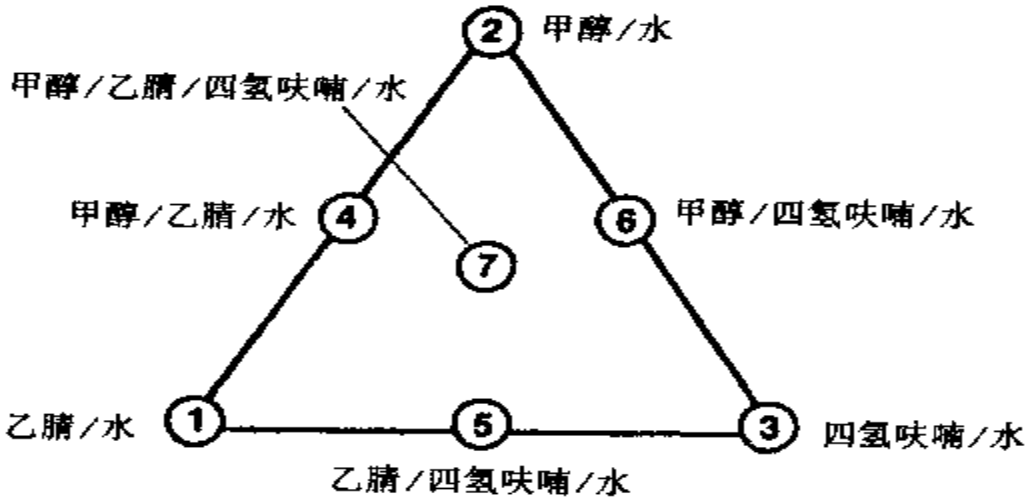


图 6 – 15　基于乙腈、甲醇与四氢呋喃混合液的 RPC 选择性优化方案。所有流动相强度相等(见图 6 – 4)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3,6/7)，所以需改变选择性以改善分离。根据溶剂强度计算图(图6－4)，下一次实行(运行2)需采用63% MeOH。峰对2/3和6/7在此实行仍重叠。由于峰对6/7在运行1和2中均未分开，所以MeOH和ACN的混合液不可能成功分离该样品的所有组分。(这一结论由图6－16中实行4的色谱图证实，但实际工作中无需进行该次实行)

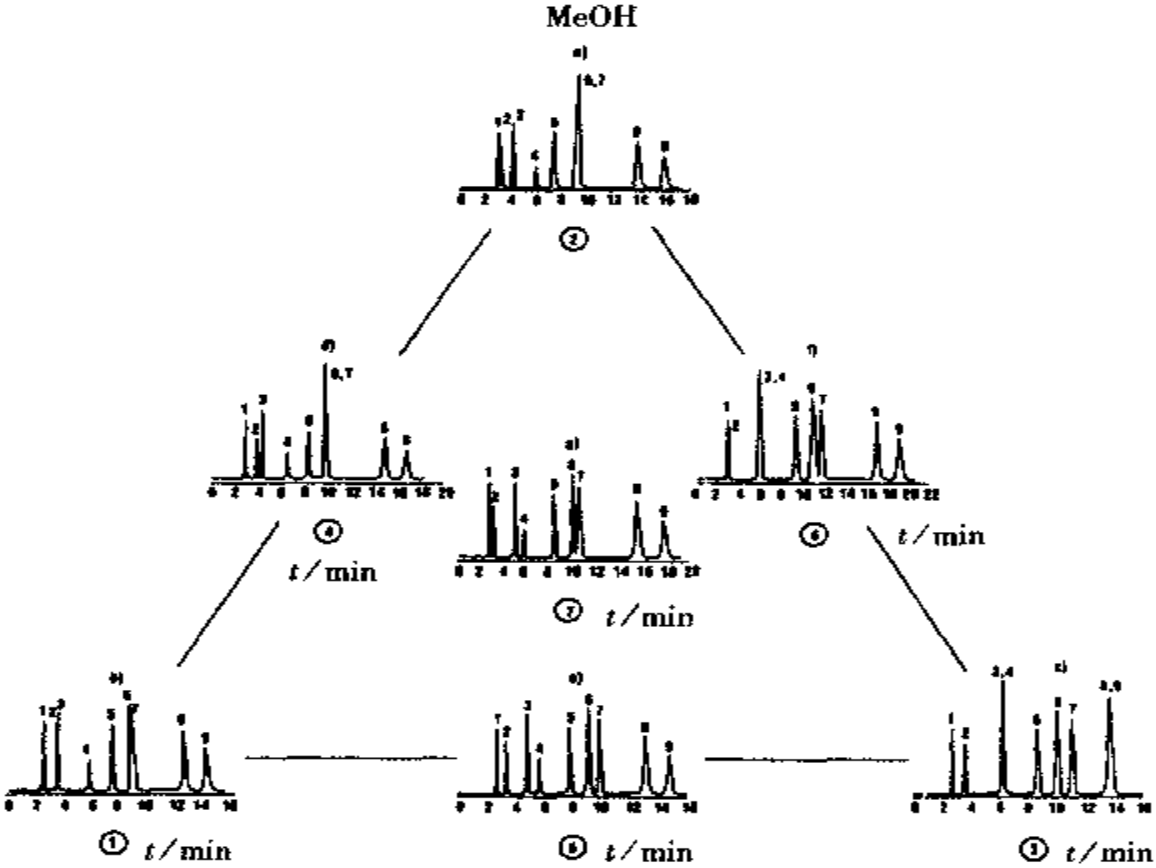


图6－16　取代萘的溶剂选择性实验的七份色谱图[23]。
色谱柱 15×0.46cm　Zorbax－C_8；流速　2.0mL/min；温度　40℃

由于ACN和MeOH的混合液不能分离该样品，采用THF进行下一实验(实验3)。所需%B(39% THF)的估计值可从溶剂强度计算图中得到。注意对于某些样品，图6－4给出的近似值可能需经一次或二次附加运行，以获得与用ACN的实验1相似运行时间

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的% MeOH 或% THF。在实验 3 中，峰对 3/4 和 8/9 发生重叠，但这些关键峰对与在实验 1(2/3,6/7)或实验 2(1/2,6/7)中不同。因此将运行 3 的流动相与运行 1 或 2 的流动相进行混合，分离效果将有所改善。

如将实验 2 和 3 的流动相混合(实验 6，MeOH－THF)，峰对 3/4 发生重叠，峰对 1/2 则勉强分离；再将实验 6 和 3 的流动相混合，峰对 3/4 仍未分离；而混合实验 6 与 2 的流动相可使峰对 1/2 勉强分离。因此，接下来应试验混合实验 1 和 3 的流动相。该试验(5)结果表明色谱图中所有九个峰均达到了基线分离。由于运行 5 的关键峰对(6/7)在实验 3 中分离更好，故可将少量实验 3 的流动相与大量实验 2 的流动相混合，或许能有进一步的改善。对于含 1 对以上关键峰对的分离，最佳流动相组成应是使两对关键峰对的分离度相等(本例中为 6/7 与 3/4 或 8/9)。

多项研究表明有机溶剂(ACN、MeOH、THF)的最佳混合一般不会都用到所有三种溶剂，然而对于困难的分离，实验 7 可提供关键峰对相对移动的其它选择性信息。因此，为更有效地进行 RPC 方法建立，应首先考虑图 6－15 中三角形边缘上的条件(仅为实验 1～6)。四种溶剂的实验 7 应最后、且只有需要时才进行实验。

图 6－14 中所示的方法建立过程可作为图 6－15 运行的开始。这样，用图 6－14 实验找出图 6－15 中运行 1，2 和 3 的最佳% B 值。而对于需要复合条件(改变溶剂强度和类型，见图 6－14 与 6－15)的困难样品，% ACN、% MeOH 与% THF 的最佳值在最终运行中得到。这样，图 6－14 与 6－15 的两种分离方式高度互补，非常有效。更重要的是，那些不需要严格控制选择性的样品，仅通过几次实验即可分离，如图 6－6(改变% B)或图 6－14(利用不同溶剂类型)所示。

6.4.2.4 柱类型与% B 的影响 柱类型(C_8、C_{18}、苯基、氰基)也可用于改变选择性，与改变% B 结合使用时尤其有效。不同类型

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的色谱柱有特定的选择性，调整%B 可以进一步微调其选择性，改变保留时间范围，也可能缩短分离时间，如图 6－17 所示的取代苯甲酸样品的分离。尽管该样品并不适于我们对“中性”样品的定义，但在低 pH 值条件下分离，样品中的所有化合物实际上皆为中性。

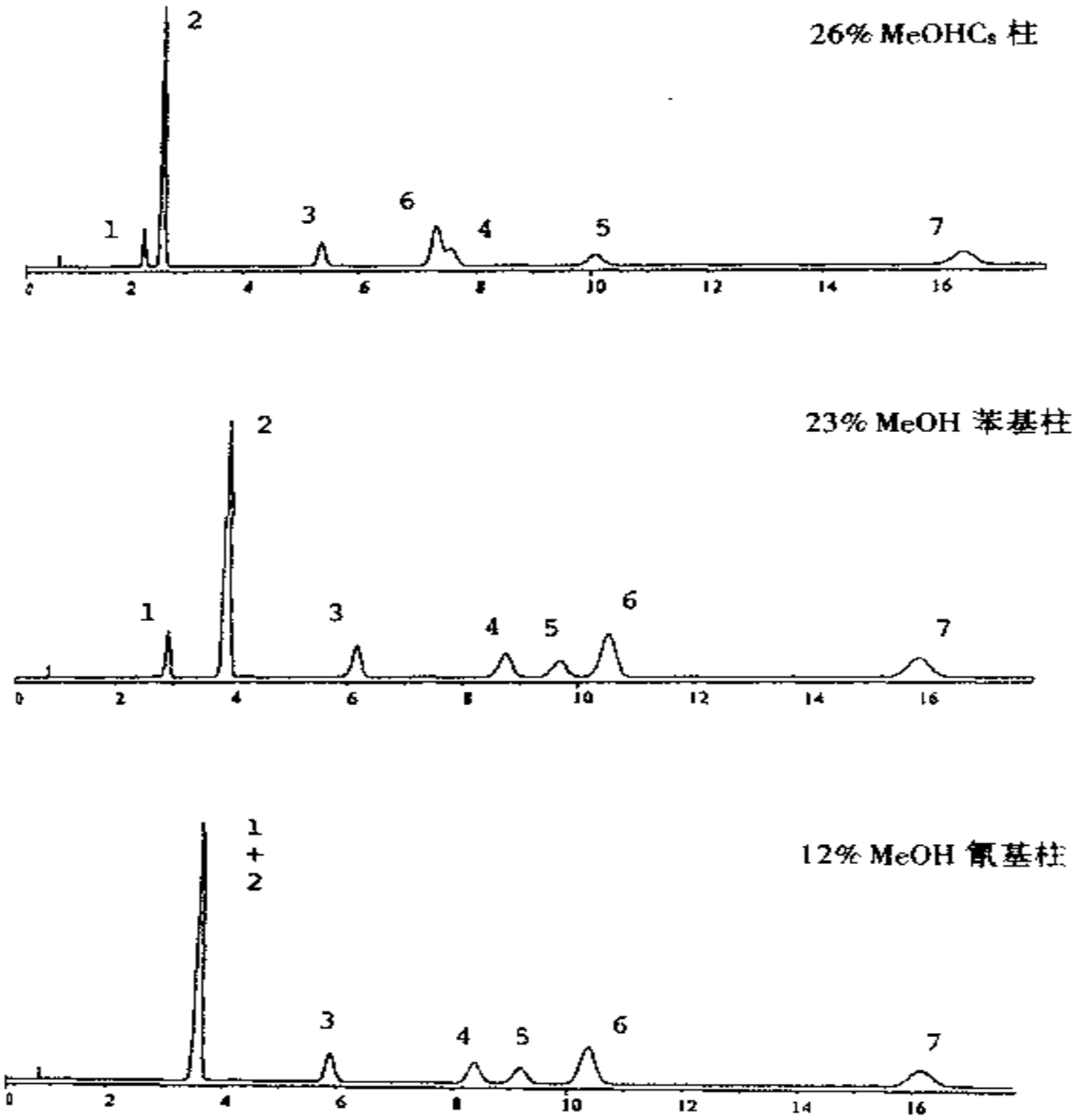
6－17*a* 所示为用三支不同色谱柱（C_8，苯基与氰基）、使样品保留最大（末峰 $k=20$）的% MeOH 分离该样品的色谱图。此时苯基柱的分离效果最佳，在 C_8 柱上峰 4/6 部分重叠，而氰基柱上 1/2 重叠。然而，由于该样品组成简单及保留范围有限，可以用更强的流动相，如图 6－17*b* 所示调节有机溶剂浓度可使首峰 $k=0.5$，[如 C_8 柱可用 52% MeOH（*b*）替代 26% MeOH]。

相同色谱柱用不同% MeOH（如图 6－17*a* 与 *b*），峰间距（即溶剂强度选择性）有显著变化。在每支柱上的通过两次运行可以系统地调整% MeOH 获得最佳分离度，见图 6－17*c*。苯甲酸样品在氰基柱上选用最佳值 32% MeOH 时，可分离更好，相当于苯基柱上的分离效果（$R_s=2.0$），但运行时间更短（5min 替代 13min）。

6.4.2.5 不同溶剂与柱类型的结合使用　溶剂种类和柱类型选择性的结合使用对于分离极困难的样品可能有效。图 6－18 概述了这种方法。用图 6－15 方法，首先在 C_8 或 C_{18} 柱上研究溶剂种类的选择性。若分离结果满意，无需再进一步改善选择性。若分离不充分，用氰基柱重复图 6－15 方法（注意：一支色谱柱的最佳流动相会与另一柱的不同）。若这些实验结果仍不能满意，以苯基柱重复图 6－15 试验。

图 6－18 的步骤已用来分离 20 种 PTH 氨基酸混合物[29]。图 6－19 所示为各柱型的最佳分离效果，及采用苄基柱（与苯基柱相似）时以 5% ACN，15% MeOH 与 13% THF 作流动相获得的最佳整体分离度（$R_s=1.2$）。注意：该分离效果只是比 C_8（$R_s=0.9$）或氰基柱（$R_s=1.0$）略好一些。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



(a)

图 6－17　取代苯甲酸的混合物在三种类型柱上的分离[11]

条件：15×0.46cm 5μm 柱；流动相见图示。

缓冲液 25mM 枸橼酸(pH2.5)；2.0mL/min；35℃。

(a)% MeOH 调整至末峰 $k=20$；(b)% MeOH 调整至首峰 $k=0.5$；(c)% MeOH 调整至最大分离度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

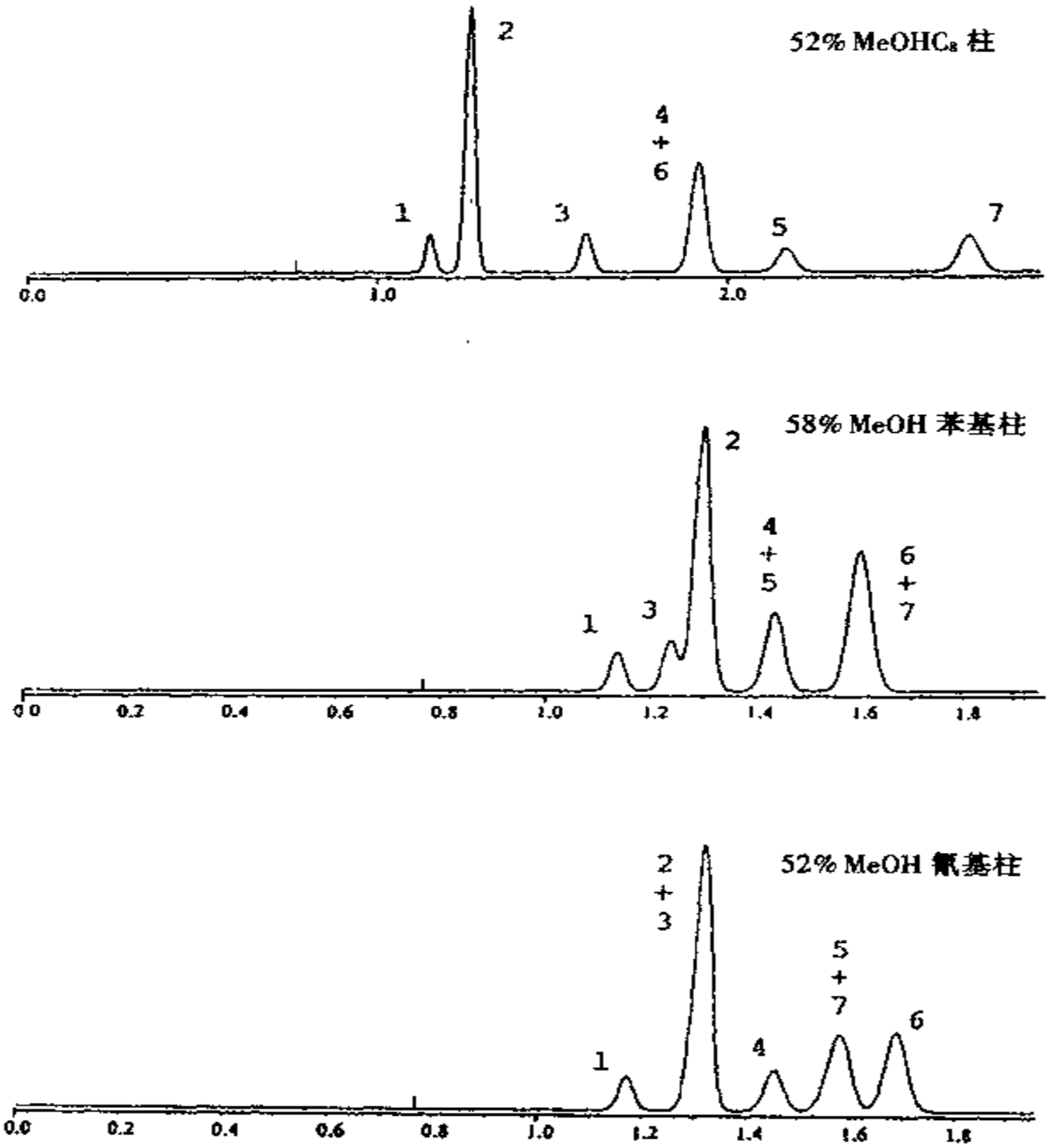


图 6－17(续)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

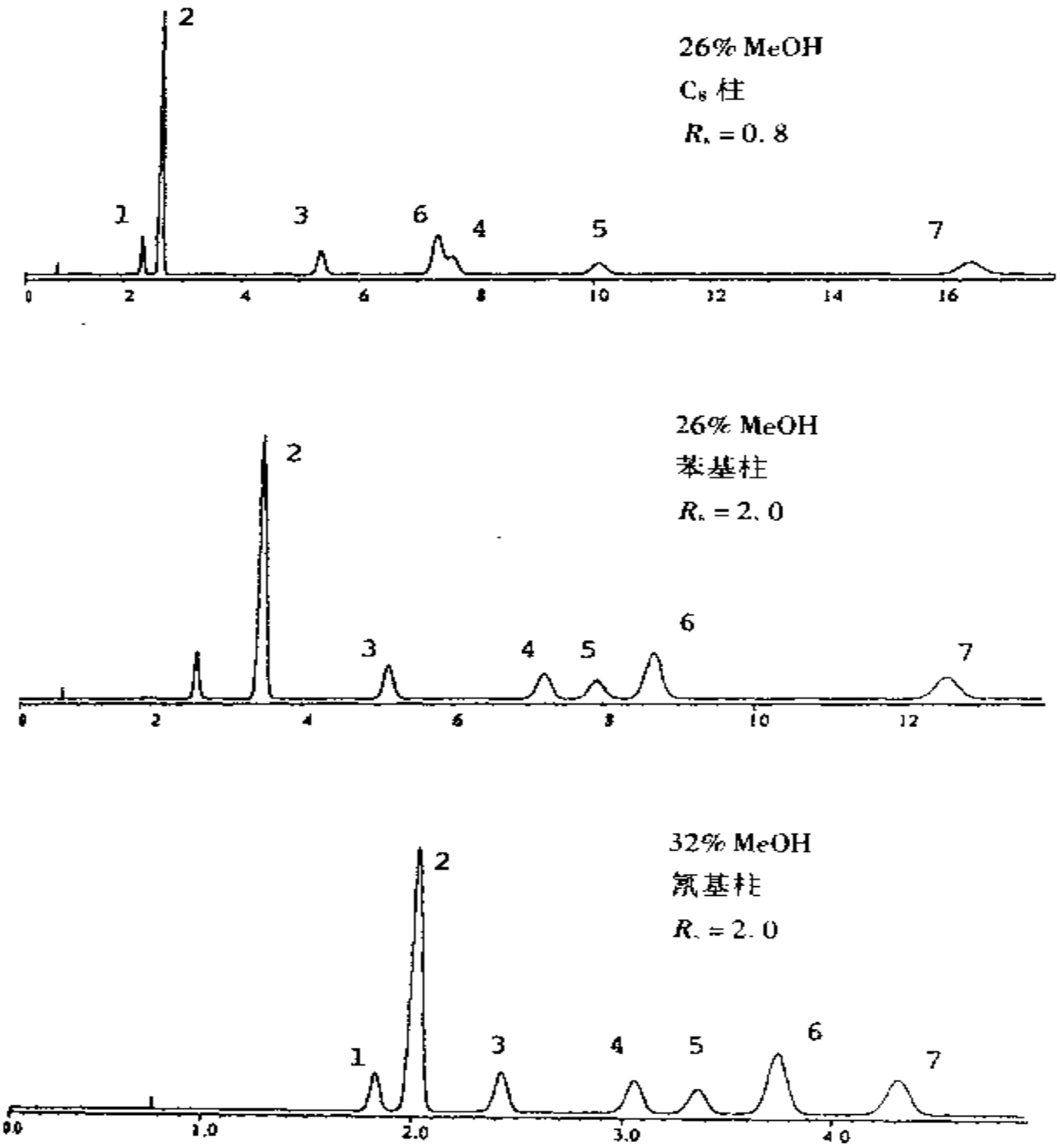


图 6－17(续)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

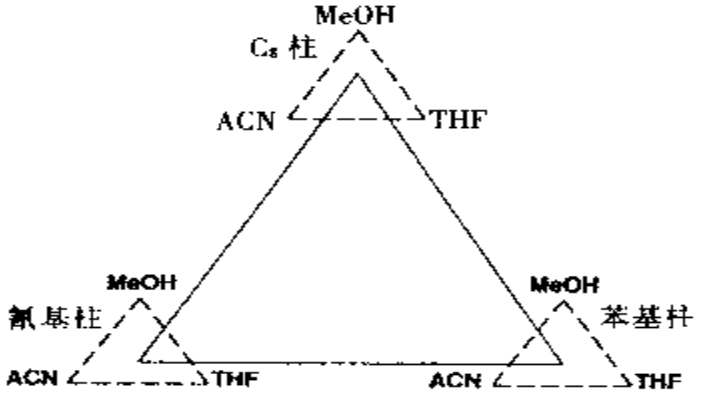


图 6－18　溶剂种类与柱类型选择性结合的方法建立[29]

用 C_8、氰基和苯基柱，含 ACN、MeOH、THF 的流动相实验的示意图。溶剂强度和运行时间保持恒定。

6.5 非水反相 HPLC

非水反相色谱法（NARP）主要用于强疏水性样品的分离，这种样品通常在色谱柱上保留极强或即使采用 100% 乙腈作为流动相时仍然无法洗脱出（如脂类或合成聚合物）[37－40]。NARP 分离的流动相通常为高极性（A）和低极性（B）有机溶剂的混合。一般来说，A 溶剂为 ACN 或 MeOH，B 溶剂为 THF、氯仿、二氯甲烷、丙酮、甲基－叔－丁基醚（MTBE）或这些溶剂的不同混合液。改变%B 与强溶剂 B 的种类可控制样品的保留值。改变温度也可用于优化分离。

图 6－20 所示为 NARP 分离标准品（*b*）与蕃茄提取液（*c*）混合液中各种胡萝卜素（*a*）的结果。蕃茄红素（峰 1）是图 6－20c 样品中含有的主要胡萝卜素。强疏水样品一般不溶于水溶剂，这也是采用 NARP 分离该类样品的另一个原因。将 NARP 用于这类样品的进一步说明可见文献[40]。

NARP 的方法建立类似于使用通常的水－有机溶剂流动相的 RPC 法。一般首选采用 ACN（A）和 THF（B）的混合液作为初始流动相。若用 100% THF，样品保留仍太强，可以用极性较弱（更强）

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

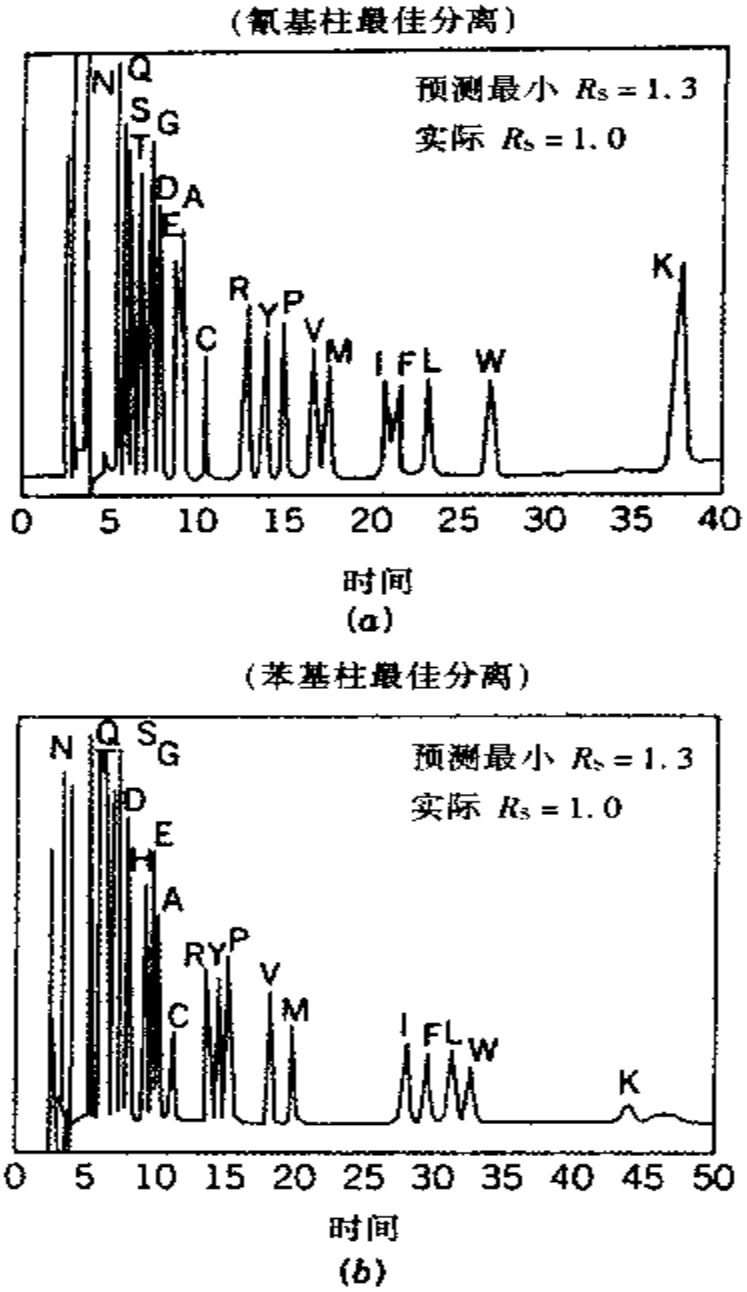
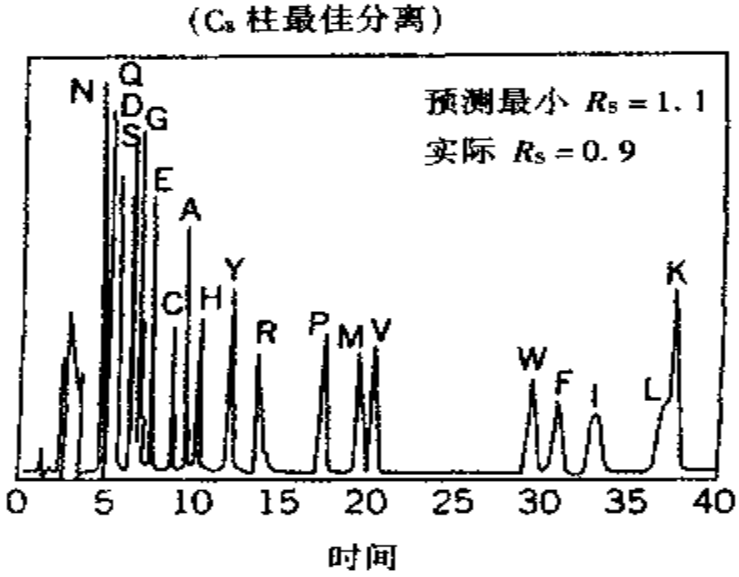


图 6－19　图 6－18 中方法在分离 20 种 PTH 氨基酸中的应用[29]

色谱柱：25×0.46cm 6μm 微粒；(a)CN，(b)苯甲基，(c)C_8；流速2.0mL/min，柱温50℃，各色谱柱上每次分离均采用最佳流动相。A/B/C/D：甲醇/乙腈/四氢呋喃/pH2.1磷酸。(a)A＝9.2 /B＝1.3 /C＝21.0 /D＝67.6；(b)A＝15.2/B＝5.4/C＝13.4/D＝66.0；(c)：A＝0.8/B＝26.5 /C＝4.5 /D ＝ 68.2.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



(c)

图 6－19(续)

的 B 溶剂(如二氯甲烷或氯仿)替换,但应用二氯甲烷或氯仿时分别要求 UV 检测波长不得小于 236nm 与 250nm。

目前 NARP 的使用不多,这可能是因为通常采用二氯甲烷作为 B－溶剂限制了低波长 UV 检测;很多经 NARP 分离的样品可采用正相色谱方便地分离。

第二部分　正相色谱

正相色谱(NPC)与 RPC 相反,固定相的极性大于流动相。样品的保留值随流动相的极性降低而增加(亦与 RPC 相反)。一般来说,流动相采用不含水的有机溶剂混合液(如异丙醇与己烷),柱填料为无机吸附剂(硅胶,有时也用氧化铝)或硅胶担体的极性键合相(氰基、二醇基或氨基)。

NPC 可用于分离中性和离子(或可电离的)样品,但以中性样品为主。NPC 分离离子样品时可以在流动相中使用水[41－45],保留机理较为复杂[45]。用 NPC 分离离子样品时,通常最好在流动相中加入

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

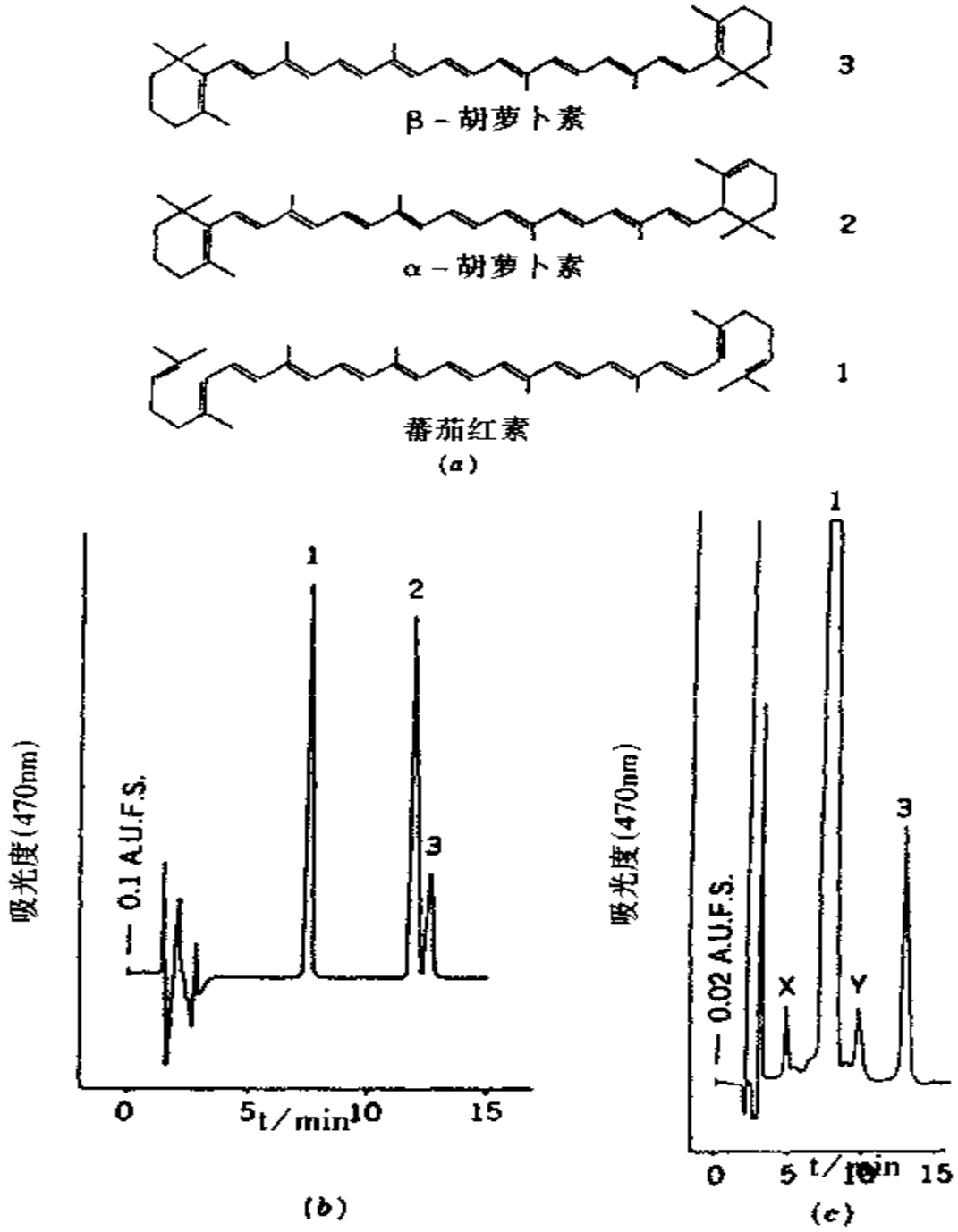


图 6－20　胡萝卜素的非水反相(NARP)分离[39]

条件：25×0.46cm C_{18} 柱；8% 氯仿－ACN 流动相，2.0mL/min，室温，UV470nm.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

三乙胺分离碱性化合物；而加入乙酸或甲酸分离酸性化合物。中性样品采用 RPC 或 NPC 分离的效果一般相近，其主要差异在于两种 HPLC 方法的洗脱顺序相反。在 NPC 中，弱极性（疏水的）化合物先流出，强极性（亲水的）化合物后流出；该性质与图6－1的 RPC 行为恰恰相反。应用 NPC 的原因前面已述，见表6－4中的总结。

NPC 的优缺点见表6－5中总结。通常，应首先试验 RPC 分离模式，但由于表6－4中的原因，有些情况首先用 NPC 分离可能更好。当初始 RPC 实验表明不同溶剂与/或色谱柱的对样品分离不充分或选择性达不到预期效果时，则需要将 RPC 更换为 NPC，见表6－6。

表 6－4　使用正相色谱（NPC）的理由

1 样品在 RPC 中不保留（亲水性太强）
2 样品在 RPC 中保留太强（疏水性太强）
3 采用 RPC 分离不能获得足够的峰间距（$\alpha \approx 1$）
4 样品含有空间异构体，立体异构体或非对映异构体
5 期望回收到大量疏水性样品组分（制备 HPLC，见第 13 章）
6 样品溶于非极性溶剂（若采用 RPC 柱，会对直接进样造成问题）

表 6－5　正相色谱的特征

优　点	缺　点
1 通过改变流动相或柱填料（尤其是无机填料，如硅胶），分离选择性可改变很大。 2. 用非水流动相时，色谱柱非常稳定。 3. 许多有机化合物在正相溶剂中易溶（制备 HPLC 中的突出优点）。 4. 溶剂粘度低，柱压降较低。 5. 适用于在水溶液中可能分解的样品。	1. 离子样品用 RPC 分离更容易。 2. 溶剂强度的控制比 RPC 中难预测且更冗长。 3. NPC 柱的塔板数有时低于 RPC 柱。 4. 低沸点溶剂更易蒸发或产生气泡，尤其在室温较高时（不方便）。 5. 对于原硅胶： a. 柱填料吸收水后，会导致保留值飘忽不定。 b. 由于溶剂分层及硅胶柱易吸水，不能进行梯度洗脱 6. 有机溶剂的成本和处理费用较高

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 6－6　NPC 和 RPC 的选择性比较

具有不同官能团的化合物：
硅胶柱比 C_{18}柱的 α 值大；NPC 极性键合相柱与 RPC C_{18}的 α 值非常相似．
同系物或含碳数目不同的化合物：
RPC 比 NPC 的 α 值大．
异构体：
硅胶柱比 C_{18}柱的 α 值大得多；极性键合相柱比 C_{18}的 α 值大

6.6 正相色谱的保留

6.6.1 一般原理

RPC 的保留机理类似于分配过程（如图 6－1），而 NPC 的保留机理类似于吸附过程。图 6－21*a* 所示为一个样品分子 S 在含极性溶剂分子 E 的流动相 NPC 中的保留过程。在保留之前，柱填料（吸附剂）的表面首先覆盖有一层溶剂分子 E。样品分子 S 在发生保留时必须将溶剂分子 E 置换下来，以吸附空间。

6.6.1.1 样品和溶剂的定位　极性样品和溶剂分子（如图 6－21 中的 S 与 E）被牢固地吸附于柱填料表面上的极性基团（吸附位点）上。硅胶的吸附位点为硅羟基（－SiOH）。对于 NPC 中常用的氰基、氨基或二醇基柱，吸附位点可以为键合相配体或硅羟基。极性样品分子可在残余烃基（如已烷或苯）上吸附一个或多个极性官能团，与吸附的极性基团相反，非极性烃类样品仅微弱地吸附于吸附位点上。见图 6－21*b* 中极性基团 X 和 Y 取代的苯衍生物的吸附示意图。

对于单取代基化合物 X－苯和 Y－苯（见图 6－21*b*），极性基团 X 或 Y 吸附于吸附位点 A 上。若基团 X 或 Y 的极性很大，则这种吸附也非常强，基团 X 或 Y 将吸附于或定位于吸附位点上。当同一个分子中存在两个或更多极性基团时，这些基团不可能同时进行定位（如图 6－21*b* 所示）。而极性非常强的溶剂分子也可以

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

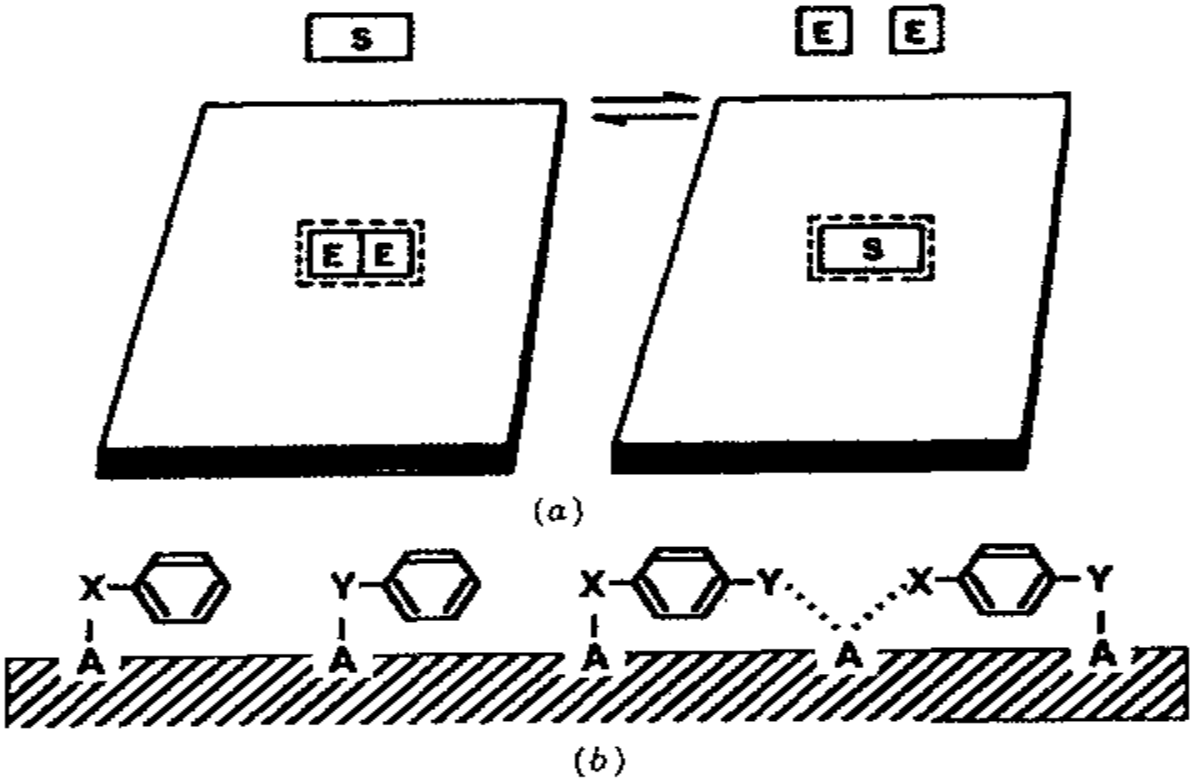


图 6－21　正相保留示意图。S 为样品分子；E 为强溶剂(B)分子；X 和 Y 是极性官能团。

参与定位，这对于加强选择性的控制具有重要的实际意义。

极性样品和溶剂分子与 NPC 固定相的作用较强烈。因此，NPC 通过改变强溶剂(B)或色谱柱，通常能够比 RPC 更强地控制选择性。表 6－7 所示为二种化合物在氧化铝柱上以用两种不同流动相的 NPC 分离结果。当以 ACN－苯－戊烷(ABP)(5: 10: 85)作流动相时，1, 3, 5－三硝基苯(TNB)和 *N*, *N*－二甲基－1－萘胺(DMN)的保留值相似($\alpha = 1.2$)。流动相换为苯时，选择性发生巨大变化($\alpha = 290!$)。这种选择性的改变是由两种溶质和两种强溶剂在固定相表面的作用位点不同而引起的：苯不定位，而 ACN 定位牢固；溶剂 ACN 的定位竞争削弱了 DMN 的强定位，因此其保留值降低。而由于 TNB 定位并不强(无极性很强的取代基)，故

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

ACN 的定位对 TNB 的保留影响较小。这些重要的溶剂选择性定位效应在 6.6.2 节中再作进一步讨论。

表 6－7　NPC 分离的选择性：改变流动相的影响[a][46]

化合物	不同流动相的 k 值	
	ABP[b](5/10/85)	苯
1,3,5－三硝基苯	5.9	0.3
N，N－二甲基－1－萘胺	7.1	88
	$\alpha=1.2$	290

[a]色谱柱：25×0.38cm 以水钝化的碱性氧化铝装填
[b] A 乙腈，B 苯，P 戊烷

关于 NPC 分离基本性质的深入讨论，见文献[47－53]。溶剂和溶质与 NPC 固定相作用强烈，在溶剂分类与方法建立方面（见 6.7 节与文献 47～49），需采用与 RPC 略微不同的方法（见图 6－15）。

6.6.2 流动相的影响

NPC 流动相的选择方式与 RPC 相同。也是先选择一种弱（非极性）溶剂 A 和一种强（极性）溶剂 B，然后混合以获得使样品达到 $0.5<k<20$ 的中等极性的流动相。为使保留值足够大，调整%B 的过程中，应注意选择性随%B 的变化，以便能对关键峰对的分离进行优化（溶剂强度的选择性；比较图 6－6 与 6－7 中对 RPC 的讨论）。若分离仍不充分，可选用另一种不同强度的溶剂，使选择性发生另外变化（见图 6－16）。如需进一步改善分离，可如图 6－16 中 RPC 方法那样，试用几种强溶剂的混合。

6.6.2.1 溶剂强度　NPC 中不同溶剂或溶剂混合液的强度可由参数 ε°（可由实验测得）表示[47, 50]。表6－8列出了 HPLC 中一些常用溶剂的 ε° 值，以硅胶为柱填料（硅胶与氧化铝的 ε° 值见文献47）。其它 NPC 柱填料（氧化铝、极性键合相）的相对溶剂强度与表6－8中的变化规律相同（溶剂极性越强，ε° 值越大）。这种相似的变化趋势有助于按 NPC 需要选用更强（或更弱）的 B 溶剂。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 6－8　NPC 的溶剂强度(ε^o)和选择性[a][47,48]

溶　　剂	ε^o	定位	碱性	UV[b]
己烷、庚烷、辛烷	0.00	否	[c]	201
1,1,2－三氟三氯乙烷 (Freon FC－113)	0.02	否	[c]	235
氯仿	0.26	否	[c]	247
1－或 2－氯丙烷	0.28	否	[c]	225
二氯甲烷	0.30	否	[c]	234
2－丙醚	0.32	少	[c]	217
1,2－二氯乙烷	0.34	否	[c]	234
乙醚	0.38	是	是	219
MTBE[d]	0.48	是	是	225
乙酸乙酯	0.48	是	否	256
二氧六环	0.51	是	是	215
乙腈	0.52	是	否	192
THF	0.53	是	是	230
1－或 2－丙醇	0.60	是	[e]	214
甲醇	0.70	是	[e]	210

[a] 硅胶作为吸附剂

[b] 最小 UV 波长;假设最大基线吸收度(100% B)为 0.5AU

[c] 溶剂碱性与非定位溶剂无关

[d] 甲基－叔－丁醚

[e] 质子给体基团导致的不同选择性

选定了弱溶剂和强溶剂之后,可以将其混合以获得适宜的保留值,见图 6－22 所示的两组分样品在氰基柱上,以 MTBE(极性)和己烷(非极性)混合作流动相进行的分离。随% MTBE 从 3% 增至 12%,运行时间由 8min 缩短到 4min。以硅胶作为吸附剂的很多实验表明保留值符合 Soczewinski 方程[54]:

$$\log k = c - n\log X_B \tag{6.3}$$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

其中 c 和 n 对于特定溶质、溶剂和色谱柱为常数，X_B 为 B 溶剂在流动相中的摩尔分数。n 的大小表示溶质分子中极性定位基团的近似数目。式 6.3 较可靠的简化式为：

$$\log k = c' - n'\log(\%B) \qquad (6.3a)$$

同样，c' 和 n' 对于特定的溶质、溶剂和色谱柱也为常数。

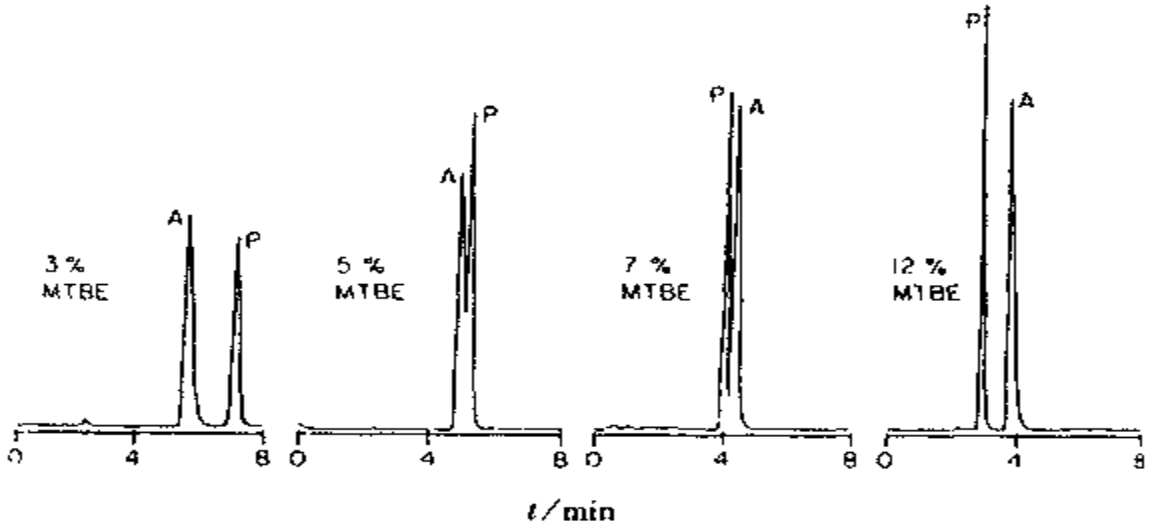


图 6－22　正相色谱中溶剂强度的影响[51]

苯胺(A)与苯酚(P)的分离；25×0.46cm 氰基柱，MTBE－己烷作流动相，1.0mL/min

大量的 NPC 实验结果与式 6.3 和 6.3a(以硅胶作为填料)相符一致[55,56]，实验数据点在很宽的%B 范围内落在 $\log k$ 对 log%B 作图的直线上(式 6.3 与 6.3a)，直线的斜率一般在 1～2 之间，因此 NPC 保留值随%B 的改变满足“三倍规则”，即%B 增加两倍导致 k 值减小大约三倍。式 6.3 和 6.3a 在 NPC 极性键合相柱中的应用尚未进行很详细的研究，但有人报道式 6.1(用于 RPC)也适于 NPC 极性键合相[57]。三倍规则广泛用于实际工作中 NPC 保留值的调整。

通过改变强－溶剂种类来改变选择性时，若能够通过调整%B 得到近似的保留值，将非常方便(如图 6－4 中的 RPC 溶剂强度

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

计算图)。图 6－23 为硅胶固定相的 NPC 分离溶剂强度计算图，而图 6－24 为极性键合相柱 NPC 分离的相应计算图。图 6－23 和 6－24 中所述溶剂包括了 NPC 中的常用溶剂。由于 NPC 中溶剂的选择性效应大于 RPC(例如表 6－7 所示)，图 6－23 和 6－24 中所示的关系图与图 6－4 中的 RPC 溶剂相比，NPC 的更为接近。当强度相同(等 ε°)的 NPC 流动相混合后，所得混合液的强度往往会改变(通常 ε° 更高，强度更大)。因此，与 RPC 相比，调整 NPC 中流动相强度需要的试一凑试验一般会更多。

6.6.2.2 流动相的选择性 与 RPC 分离的情况相同，NPC 的选择性可以通过改变% B 或 B 溶剂种类来调整。图 6－2 中两峰的顺序随% MTBE 由 3% 变至 12% 时发生的反转。因此，在 NPC 中为保证 $0.5<k<20$ 调整% B 时，应注意选取的% B 使关键峰对获得最大分离度。

通过适当改变 B 溶剂类型，能使 NPC 的选择性发生较大变化。尽管溶剂的碱性、酸性或偶极性影响 RPC 的选择性，而 NPC 中溶剂的定位性质相对更为重要[47,48,60]。因此，由非定位溶剂如二氯甲烷，变化至定位溶剂如 ACN(见表 6－8)可使选择性有较大改变。以硅胶柱用 3% ACN－己烷作强溶剂(定位)不能分离 1,5－二硝基萘(DNN)和 2－丙酮萘(AN)($\alpha=1.0$)，而采用 58% CH_2Cl_2－己烷(非定位)则可以将它们分开，$\alpha=3.1$[60]；亦见表 6－7 的示例。

碱性定位溶剂如胺和醚(见图 6－8)与非碱性定位溶剂如酯、腈和硝基化合物的选择性不同。表 6－8 总结了一些常用 HPLC 溶剂与选择性有关的性质：非定位性、碱定位性和非碱定位性。化合物 DNN 和 AN 可作为溶剂碱性重要性的示例，在硅胶柱上的分离如用 3% ACN 作为 B－溶剂(非碱性定位)时，$\alpha=1.0$，如用 4% MTBE 作为 B－溶剂(碱性定位)时，$\alpha=1.3$[60]。α 值的这种改变在 HPLC 方法建立中非常有用。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

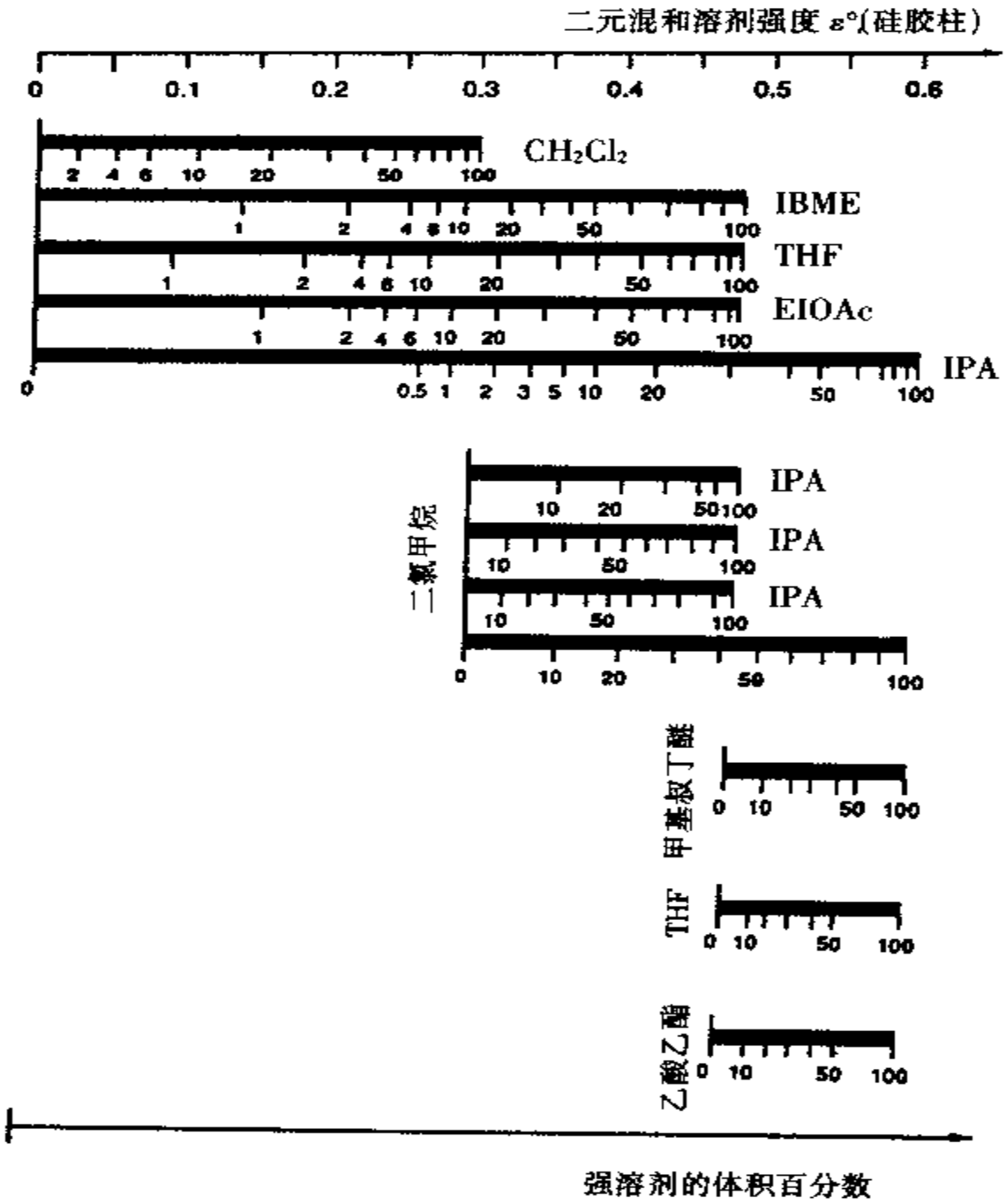


图 6－23 硅胶作柱填料正相 HPLC 的溶剂强度计算图[58]

溶剂为甲基－叔－丁基醚(tBME)、乙酸乙酯(EtOAc)与 2－丙醇(IPA)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

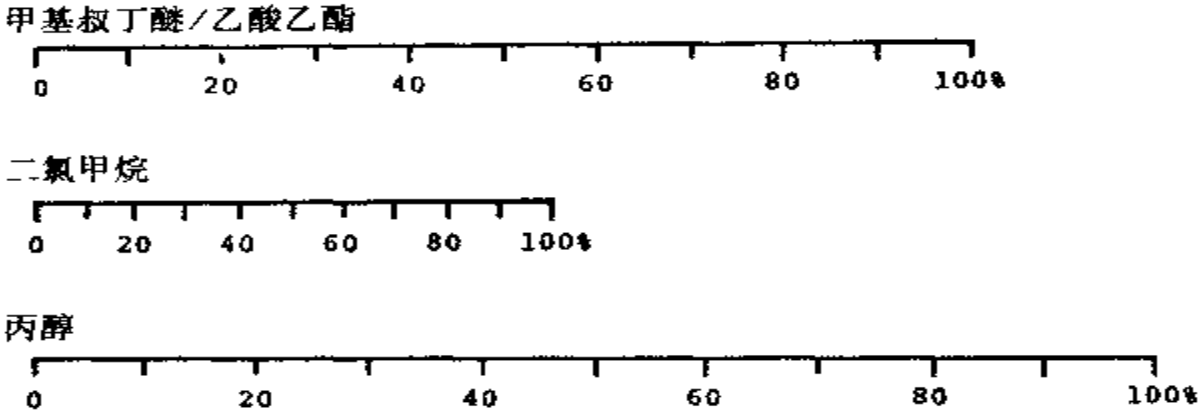


图 6－24 正相 HPLC 与氰基或二醇柱的溶剂强度计算图[59]

溶剂类型选择性的应用在 NPC 和 RPC 中同样有效。图 6－25 的优化 NPC 选择性方案与图 6－15 RPC 的类似。采用三种 B 溶剂：非定位、碱性定位、非碱性定位，按适当比例混合这三种溶剂以控制选择性变化，使分离度变化加大。

6.6.3 柱类型的影响

常用的 NPC 色谱柱有氰基柱、硅胶柱、二醇基柱和氨基柱（大致按分析型分离用途递减顺序排列）。柱强度的定义与 RPC 分离情况类似[52]：硅胶（强）≈氧化铝≫氨基>二醇基>氰基。采用原硅胶柱（与极性键合相比）的 NPC 具有表 6－9 中的特点。分析型应用一般用硅胶柱不方便。异构体分离以及制备分离宜采用原硅胶柱。

正如改变强溶剂可对 NPC 选择性有重大影响一样，改变柱类型也会产生类似效应[47,51－53]。（与氰基柱比）碱性化合物（胺类、醚类、酯类、酮类等，见图 6－8）在氨基和二醇基柱上保留较大，而偶极化合物（氯代、硝基、腈基取代物）（与氨基或二醇基柱比）在氰基柱上保留更强，这三种色谱柱的选择性彼此差异很大[53]。

图 6－26 所示为 NPC 中柱类型选择性对燕麦样品中除莠剂分离与分析影响的示例。燕麦样品先经过萃取、回收被测物，但是

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

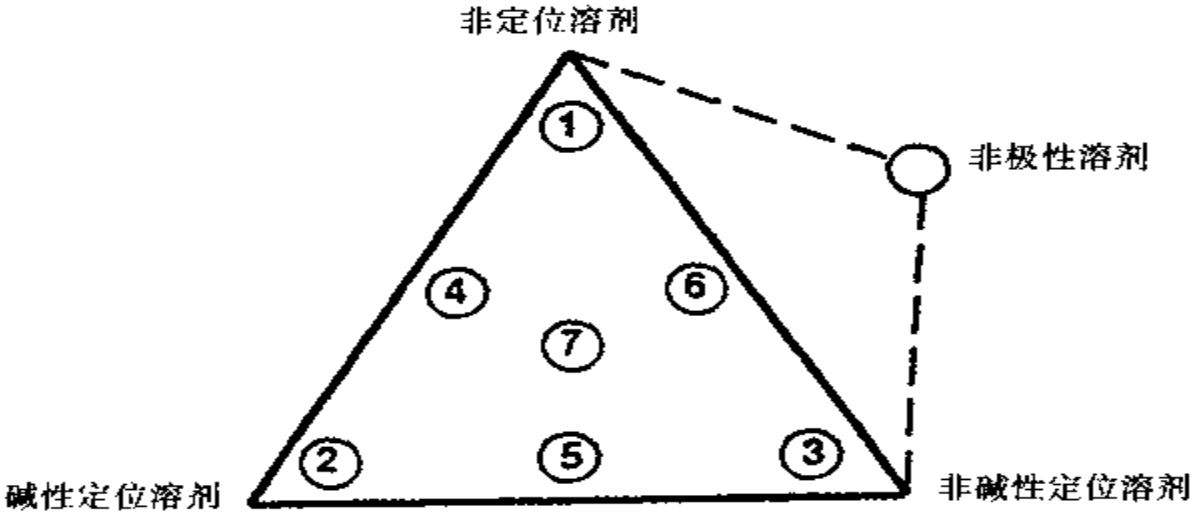


图 6－25　NPC 选择性优化方案[60]

基于非定位溶剂(CH_2Cl_2)、碱性定位溶剂(MTBE)、非碱性定位溶剂(ACN 或 EtAc)与己烷的混合，所有流动相的强度相等(图 6－23 或 6－24)。

由于这种天然产物的复杂性，且除莠剂的含量极低(100ppb)，使其无法实现一步 HPLC 分离。样品首先在氰基柱上预分离(如图 6－26 *a*)，但除莠剂与许多样品干扰峰发生重叠。故先收集含有除莠剂及这些干扰物的组分(用柱切换)，如图6－26 *a* 中箭头所示。再将这些组分在二醇柱上用相同流动相进一步分离(图6－

表 6－9　NPC 分离中，硅胶与极性键合相(PBP)分离的比较

特　　点	说　　明
方便性与重现性	PBP(氰基、二醇基、氨基)柱较好；硅胶柱则需要控制流动相中水的含量。
改变流动相后的柱平衡	硅胶柱可能需要的平衡时间较长
柱稳定性	硅胶柱与 PBP 柱都很稳定，但硅胶柱的使用寿命更长。
异构体的选择性	硅胶柱较好
梯度洗脱	不推荐用硅胶柱
制备分离	由于成本低、稳定性好、柱容量高、且不易污染样品组分，通常硅胶柱较好

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

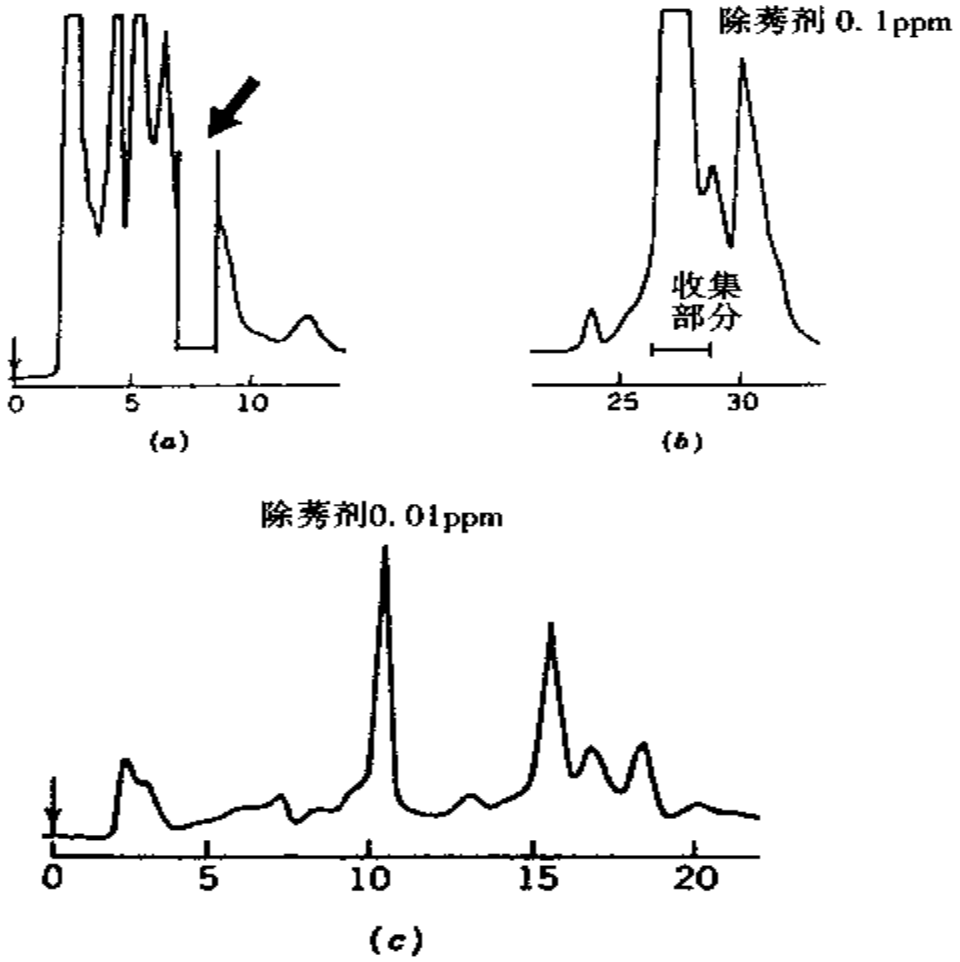


图 6－26　绿燕麦提取物中所含除莠剂在氰基，二醇和硅胶柱上的连续分离[61]
（a）氰基柱，（b）二醇柱，（c）硅胶柱的色谱图。

26b）。该色谱图表明除莠剂峰可与氰基柱中的多种干扰分开。然而，除莠剂与干扰峰共流出仍很可观。再收集图 6－26b 中所示除莠剂组分并在硅胶柱上重新进行分离（如图 6－26c）。这时除莠剂峰与其它干扰峰完全分离。本例很好地说明了这三种 NPC 柱选择性的显著差异，从一支色谱柱中共流出的化合物可在另一支柱上得到分离。

6.6.4　温度的影响

改变温度通常仅对 NPC 的峰间距有极小影响[62]。因此很少采

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

用改变温度来调节 NPC 的选择性，但是含有定位溶剂（如乙腈）的流动相，其 α 值的变化与温度有一定关系。因为在较高温度下定位溶剂的解吸，以及定位样品化合物的相对保留值的相应增大都可能会导致 α 值的变化。然而这种随温度改变产生的峰间距变化可以通过改变流动相更有效地实现（即由定位 B－溶剂换成非定位溶剂）。应该注意虽然在 NPC 中用温度改变选择性不多，但是温度的变化却可以明显地改变样品中所有化合物的整体保留值。因此，控制分离温度仍非常重要。

6.6.5 亲水样品的分离中水溶液流动相的应用

强亲水样品在 RPC 中可能不保留，而在 NPC 条件下这些样品却保留很严重。强亲水样品在常用于 NPC 的非水流动相中可能不溶解。一种解决办法是采用可以使用水流动相的特殊 NPC 柱；糖一般可以采用 60～80% ACN－水流动相在氨基柱上进行分离。由于碳水化合物的亲水性较强，且氨基柱近于极性，所以采用 RPC 分离效果较差。这类化合物以 RPC 保留不太可能。再者，% ACN 增大，碳水化合物的保留增大，这也对 RPC 分离不利。

图 6－27 *a* 和 *b* 所示为几种糖在氨基柱上的分离，流动相分别为65% 和75% ACN。葡萄糖（G）和甘露糖（M）用65% ACN 时保留时间分别为4min 和5min，短于用75% ACN（6min 和10min）。这种流动相极性增加（65% ACN）保留值减小的现象表明了该系统的 NPC 特征。在 C_8和 C_{18}硅胶柱上也可以观察到 NPC 保留行为，图6－27 *c* 为中性冠醚 DB18C6在两种 ODS 柱和两种聚合物柱（Styragel 和 Amberlite）上的保留值（log *k*）对% MeOH－水的变化曲线（见图顶部的刻度）。C_{18}柱上的保留值大约在80% MeOH 时达到最低，而在两种聚合物柱上，保留值随着% MeOH 的增加继续减小。

图 6－27 *c* 中的行为可解释为：在聚合物柱上，所有% MeOH 都表现为 RPC 行为（% MeOH 增大 *k* 减小）。而在硅胶基质的 C_{18} 柱上，当% MeOH 较低时表现为类似的 RPC 行为，当 % MeOH 较

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

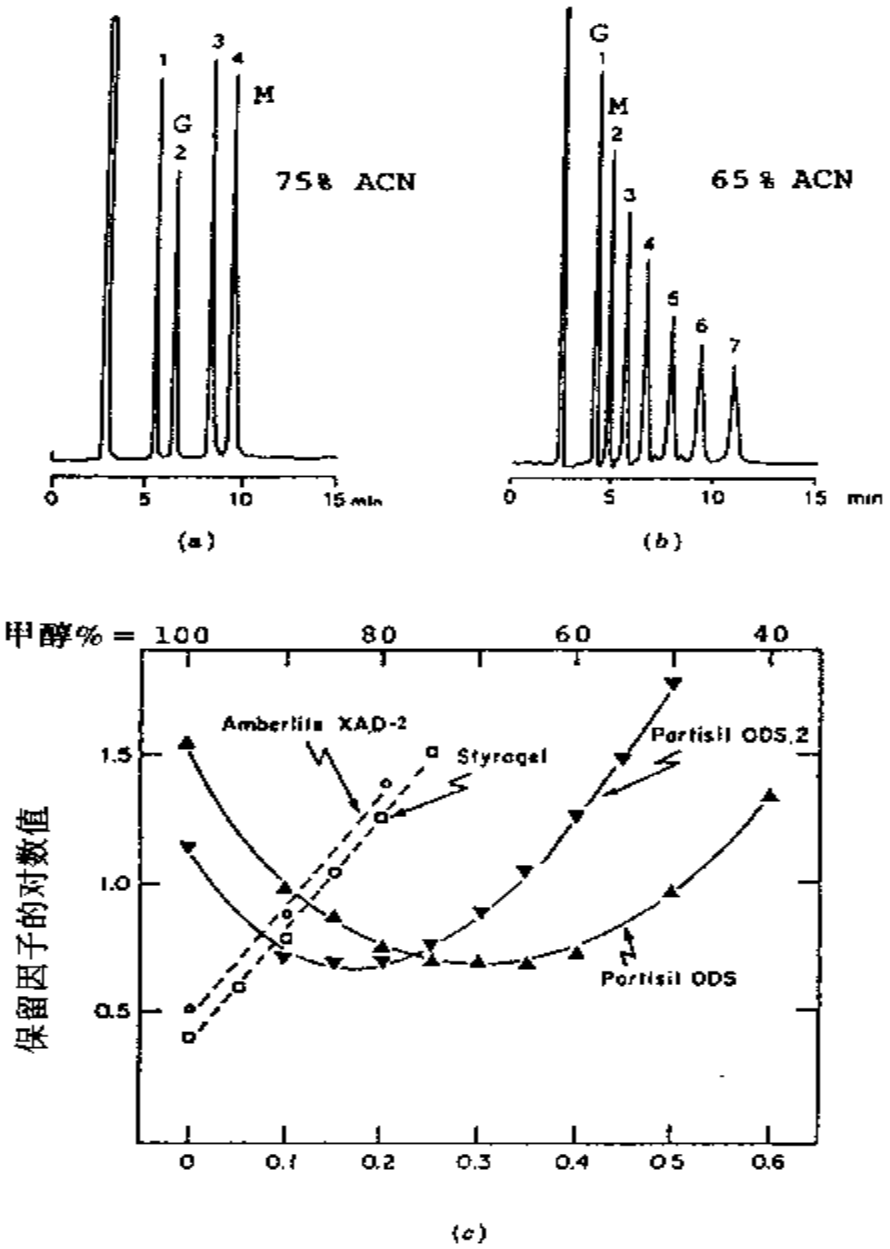


图 6－27　水－有机流动相的正相分离[63,64]

（a）25×0.46cm 氨基柱，75% ACN－水流动相，1.0mL/min，40℃；化合物：1 果糖，2 葡萄糖，3 蔗糖，4 麦芽糖；（b）条件同（a），但 65% ACN－水；化合物：不同聚合数的低聚糖；各色谱图中所指的 G 为葡萄糖、M 为麦芽糖[63]；（c）冠醚样品（DB18C6）在不同 RPC 柱上的 $\log k$ 与% MeOH 的关系图[64]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

高时则表现为 NPC 行为(% MeOH 增大保留值增加)。这种 NPC 行为被认为是由于该样品与柱填料上的残余极性硅羟基发生作用所致。类似的 NPC 行为(保留值在中间浓度的有机溶剂时最低)在 RPC 条件下分离肽时可见到,同样属于硅羟基作用[65]。

采用水溶液流动相进行的 NPC 分离一般称之为亲水作用色谱(HILIC),针对这种分离的特殊 HILIC 柱已设计出[66](如聚-2-羟乙基天冬酰胺)。这类柱通常采用递减的有机梯度洗脱或递增的盐梯度洗脱,也可以采用挥发性流动相,其洗脱顺序从极性最小至极性最大。图 6-28 所示为在 HILIC 柱上采用不同的% ACN-水流动相对衍生寡糖混合物的分离结果。由于% ACN 减少时保留值降低,属于 NPC 保留行为。虽然全部样品化合物的分离需用梯度洗脱,但也应当注意到这种分离模式出色的分离效果。HILIC 已被用来分离众多的生物样品(如肽、氨基酸、糖[66-68];亦见第 11 章)

以水-有机流动相结合氨基或特殊 HILIC 柱可以很方便地分离中性和亲水性样品。若开始方法建立时首先采用梯度洗脱试验,梯度运行应由有机溶剂(弱)至水(强)进行。当首先采用等度洗脱时,可以先以水为流动相,然后逐渐增大有机百分比,以获得与图 6-2 中 RPC 分离相似的渐进分离效果。然而,图 6-27*c* 中所示的双模式(RPC/NPC)保留行为对这类实验中的某些柱型可能存在其它潜在的麻烦。

6.7 正相色谱中非离子样品分离条件的优化

6.7.1 初始条件

一般来说,NPC 方法建立的一般模式与 RPC(见表6-2)类似,见表6-10*a* 中的总结。对于 RPC,其最佳柱型和初始流动相溶剂的选择有限(通常为 C_8或 C_{18}柱,ACN-水);而 NPC 的选择范围较宽。表6-11对初始 NPC 分离条件的选择方案作了系统总结。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

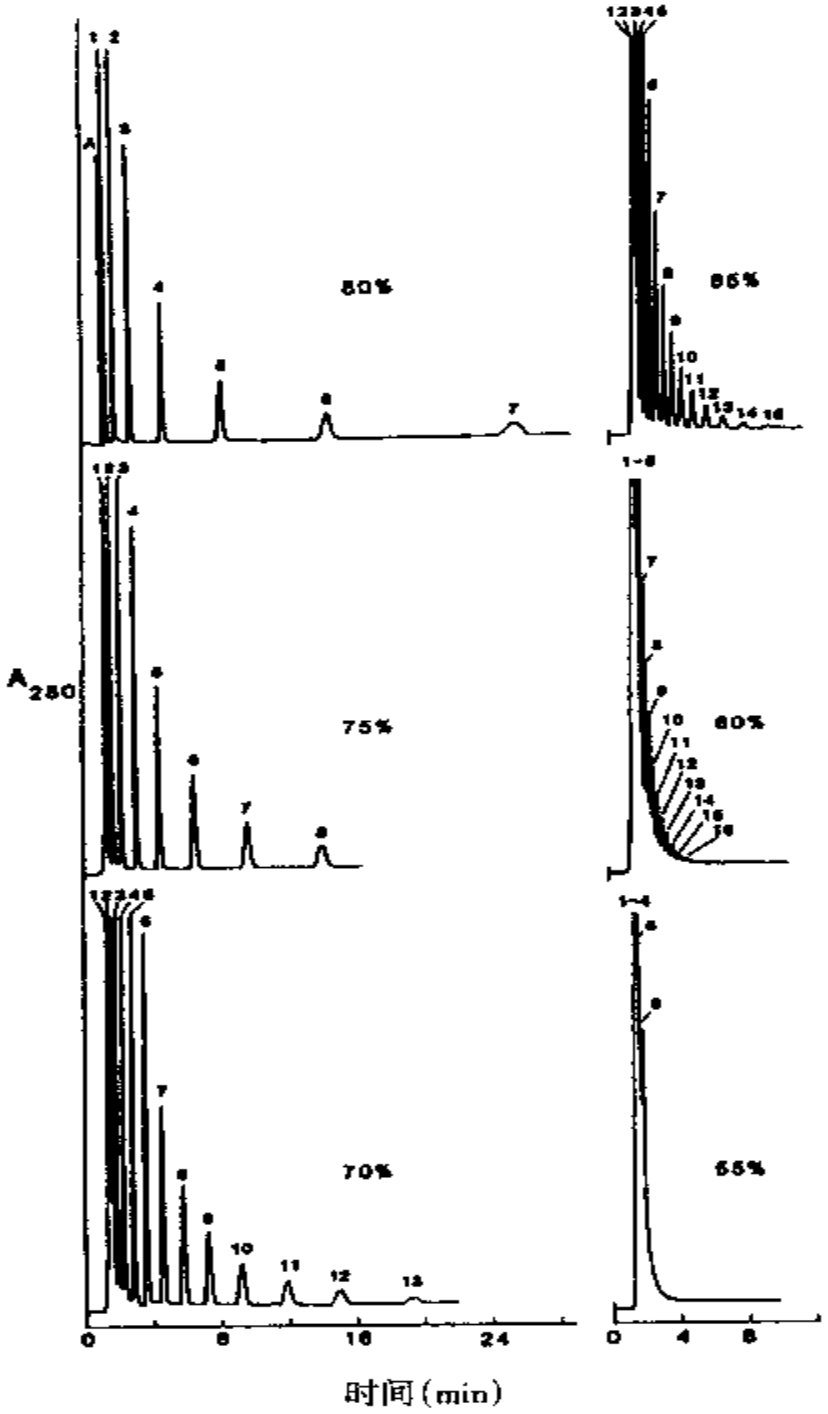


图 6－28　衍生低聚糖混合物在 HILIC 柱上的正相分离[86]

色谱图中数字代表各化合物的聚合数。条件：20×0.46cm PolyHydroxyethyl A 柱（PolyLC 公司），流动相：乙腈－水（% ACN 见图示）；2mL/min；室温。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 6－10　正相方法建立的推荐方法

1 调整%B，使 $0.5 < k < 20$（氰基柱，己烷－丙醇作流动相）
2 检查峰拖尾情况
3 如必要，调节选择性
a 微调%B
b 改变有机溶剂种类（MC、MTBE、ACN）；微调%B
c 混合有机溶剂
d 改变柱类型（二醇、氨基、硅胶）；微调%B
4 优化色谱柱条件（柱长，微粒大小，流速）

6.7.1.1　色谱柱的选择　氰基柱通常是 NPC 分离的最佳首选；硅胶柱可能更适合于异构体分离或疏水组分的制备。与氰基柱相比，硅胶柱的优点是：α 值较大；二醇柱和氨基柱欠稳定，在用氰基柱分离重叠谱峰不成功时才采用（见6.7.3节）。开始以25×0.46cm 尺寸柱较好。

如果采用硅胶（或氧化铝）柱进行分析型分离，各运行之间的保留值会发生变化，需要采取特殊的预防措施（6.7.4.2 节）。采用新制备的、弱酸性 B－型硅胶（见 5.2.1.1 节）对有些样品的分离很有利。酸性较强的 A 型硅胶和酸性较弱 B 型硅胶潜在的性能差异见图 6－29。采用 A 型硅胶柱时，苯胺（峰 2）在苯酚（峰 3）之后流出，峰拖尾严重。相反，采用高纯度的 B 型硅胶柱时，苯胺在苯酚之前流出，并且峰形对称。

6.7.1.2　流动相溶剂　表 6－11 中总结了 A－溶剂和 B－溶剂的可能选择。如果需在 <225nm 波长检测，最佳选择为己烷（A）和丙醇（B）。己烷－丙醇流动相还可以提供较大范围的溶剂强度，尤其采用氰基或其它极性键合相柱时。因此，该系统可有效地分离极性差异较大的样品。

1，1，2－三氟三氯乙烷（FC 113）也已用作 NPC 中的 A－溶剂[79]。在低波长的吸收比己烷强，所以 UV 检测限于 235nm 以

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

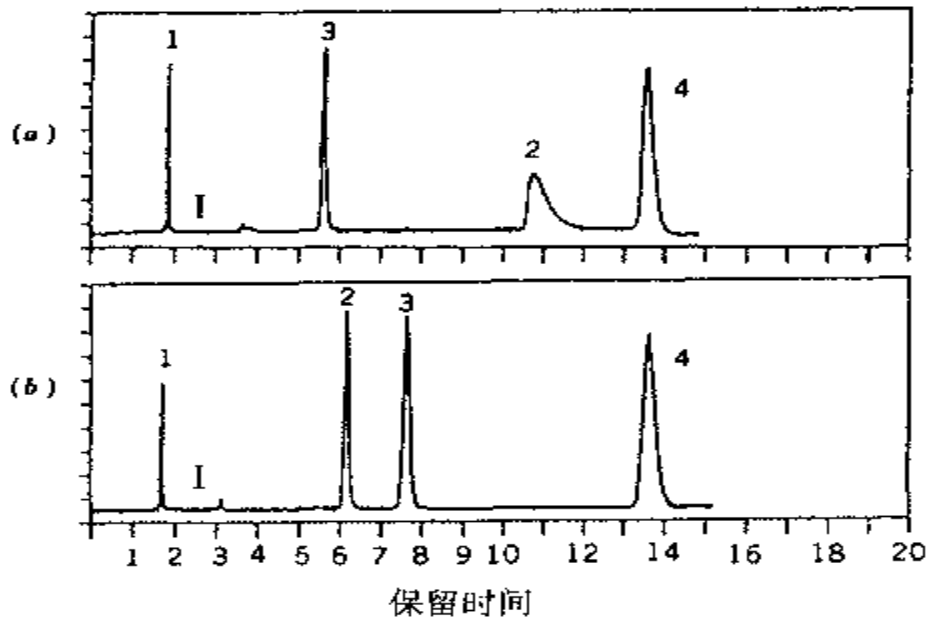


图 6－29　NPC 分离中硅胶柱的差异[89]

(a)酸性 A 型硅胶；(b)弱酸性 B 型硅胶。
条件：15×0.46cm 硅胶柱，0.05% 甲醇－二氯甲烷，1.0mL/min。
样品：1 甲苯；2 苯胺；3 苯酚；4 苯乙醇；I 杂质。

上。与己烷相比，FC－113 溶解样品更好，且可以与表 6－11 中所有 B 溶剂混溶；从而大大方便实验。但是，FC 113 属破坏臭氧的化合物，将会逐渐被限用。所以 FC 113 仅在其对于某一特定分离具有明显的优势时才会考虑，尤其是制备分离。

6.7.2 调整保留值

对于等度分离，下一步是调整丙醇浓度使在氰基柱上达到 $0.5<k<20$。先采用100%丙醇，然后按照2倍步长降低丙醇含量(%B)：50%，25%，12%，6%，3%，以此类推。若 α 随%B 变化(如图 6－22所示)，可以进一步调整%B 值以获得理想的 k 值范围、最大 α 值和分离度。对于硅胶柱，丙醇作为 B 溶剂可能太强，这时可以采用极性较弱的溶剂如二氯甲烷（MC）（见表 6－8）。与 RPC 分离类似，可以采用 0→100% 丙醇－己烷的初始梯度来代替递减%B 的等度过程（见 8.2.2 节）。通过初始的梯度洗脱

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 6－11　正相 HPLC 方法建立：初始分离条件

参　　数	说　　明
柱尺寸与流速	25×0.46cm，5μm 柱较好；2～4mL/min
柱类型	
氰基	分析方法的最佳选择，柱稳定性好，操作方便。
硅胶	制备分离的最佳选择，尤其对有机溶性样品，可获得最大 α，但分析应用时需控制流动相中水含量（不方便）。
二醇	可替代氰基柱以改变 α 值，但不够稳定。
氨基	可替代氰基柱用来调整 α 值，但很不稳定。
氧化铝	目前 HPLC 中很少用，选择性独特，但潜在问题较多（塔板数低，保留值不定，样品回收率低）。
A－溶剂	
己烷	适于低 UV 检测（＞200nm）和弱极性样品；以 ACN 或 MeOH 作 B 溶剂时需要加一种共溶剂（如二氯甲烷）。
FC113	在 235nm 以上可用于 UV 检测，溶解性极好（制备分离）；可与所有 B－溶剂混溶（方便），不易燃，但由于其破坏臭氧层的性质，应用可能受限制。
二氯甲烷	可用于 235nm 以上检测的强极性样品
B－溶剂	
1－或 2－丙醇	适于低 UV 检测（＞215nm）和强极性样品；采用极性键合柱测定样品保留值的初始梯度实验的良好选择
二氯甲烷	235nm 以上检测的首选；但对于洗脱硅胶柱上极性极强的样品可能强度不够。
MTBE	改变 α 值的良好备选，225nm 以上检测。
乙酸乙酯	改变 α 值的良好备选，255nm 以上检测。
ACN	改变 α 值相当于乙酸乙酯，但与己烷混合时需要共溶剂；可在 195nm 以上检测。
流动相添加剂	（峰拖尾时）三乙胺用于碱性样品，醋酸用于酸性样品。
柱温	室温，35 或 40℃
进样量（0.46cm ID 柱）	＜50μL，＜50μg

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

实验，可以决定等度与梯度哪一种更好，并且可以估计出等度分离的最佳%B。

6.7.3 优化选择性

在 NPC 中，溶剂类型对 α 值的变化影响最大。当选定 $0.5<k<20$ 的丙醇浓度，可以改变 B 溶剂[见图 6－23(硅胶)或图 6－24(极性键合相)]。对于氰基柱，建议用图 6－25 中方法，这里以 MC 作为非定位溶剂(运行 1)，以 MTBE 作碱性定位溶剂(运行 2)，以 ACN 或乙酸乙酯作为非碱性定位溶剂(运行 3)。用乙酸乙酯代替 ACN 更为方便，因为 ACN－己烷混合时需要加 MC 作为共溶剂。但是，乙酸乙酯检测波长必须>256nm。而以 ACN 作为 B－溶剂(运行 3 中加 MC 作为共溶剂)时，可在 234nm 以上检测。

以图 6－25 步骤，用图 6－30 以硅胶为吸附剂的 11 种取代萘的分离加以说明。这些分离的流动相组成总结如表 6－12。图 6－30 中运行 1 采用 58% MC－己烷作为流动相，但峰 8 和 9 发生重叠，故需要改变 B－溶剂类型。运行 2 采用 4% MTBE，%B 选自图 6－23。这时关键峰对为 4/12。建议混合两种流动相，但发现混合

表 6－12 图 6－25 分离的总结

实验	流动相(Vol%)[a]			关键峰对[b]		
	己烷	MC	MTBE	ACN	No.	R_S
1	42	58	0	0	8/9	0.3
2	96	0	4	0	4/12	0.3
3	87	10[c]	0	3	11/4	0.7
4	77	22	1	0	3/2	0.8
5	92	5	2	2	11/4	1.6
6	69	30	0	1	2/3	0.1
7	89	9	1	1	4/11	0.4

[a] 流动相组成：二氯甲烷：MC，甲基叔丁醚：MTBE，乙腈：ACN；
[b] 关键峰对及其分离度；
[c] 加入二氯甲烷作为共溶剂，使己烷与 ACN 能互溶。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的流动相(运行 4)太强。这种情况在以硅胶作为柱填料,当定位和非定位溶剂混合(此例中 MC 为非定位,MTBE 为定位)时经常发生。因此,在图 6－30 中所示的实际运行 4 中增加了已烷浓度,以使与运行 1 和运行 2 的运行时间相近。运行 4 中的关键峰对为 3/2,峰对 4/8 和 9/12 的分离也不好。

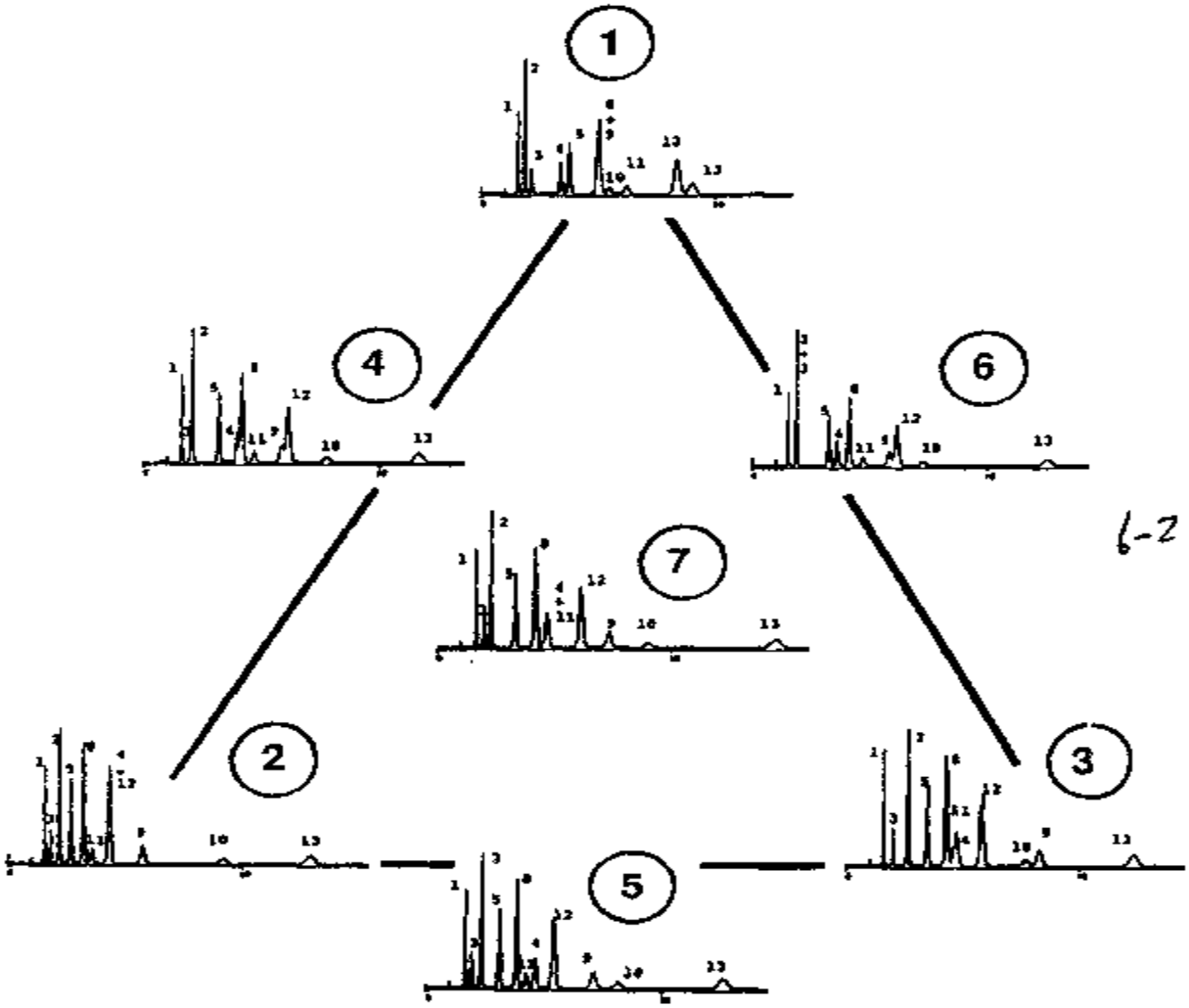


图 6－30　图 6－25 和表 6－12 溶剂选择性实验的对应色谱图[80]

15×0.46cm 硅胶柱,流动相如表 6.12,2.0mL/min,35℃。

样品为取代萘混合物,取代基:1　2－OCH_3,2　1－NO_2,3　1,2－$(OCH_3)_2$,4　1,5－$(NO_2)_2$;5　1－CHO,8　2－CHO,9　1－CH_2CN,10　1－OH,11　1－$COCH_3$,12　2－$COCH_3$,13　2－OH。(化合物 6 与 7 略)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

图 6－30 中的运行 1、4 和 2 表明对几对峰的 α 改变非常大，但这些运行并不能说明对分离样品是最佳流动相。建议进一步改变 B 溶剂，即运行 3 用 ACN。该实验的分离度最佳；，11/4 的峰对分离度最差，仍达到 $R_s = 0.77$。因此下一步应考虑混合运行 3 与运行 1 或 2 的流动相。

混合运行 1 和 3 的流动相（运行 6），使峰 2 和 3 完全重叠，峰 9 与 12 勉强分离。所以，下一步应试验混合运行 2 与 3 的流动相。所得分离（运行 5）达到最佳基线分离（$R_s = 1.6$）。假使情况不是这样，混合实验 1，2，3 的流动相得运行 7（峰对 4/11 发生重叠）。如 RPC 一样，混合所有 3 种 B 溶剂（MC，NTBE，ACN）将很难获得最佳流动相。因此，改变流动相通常应限制在 3 溶剂（三元）混合：一般为二种 B 溶剂加上已烷。

已有报道[49]类似图 6－30 用氰基柱的程序，不过，改变 B 溶剂引起的选择性变化比图 6－30 的硅胶柱的变化小。

6.7.4 其它考虑

6.7.4.1 缓慢柱平衡和溶剂分层 极性溶剂与 NPC 柱表面相互作用很强，尤其采用原硅胶柱（或氧化铝柱）。当含有强极性、定位 B 溶剂的流动相被一较弱流动相替换时，用新流动相的柱平衡时间（样品保留值恒定）可能比在 RPC 中长得多（≫20 倍柱体积），因此应重复进样检查新流动相的柱平衡性。直到保留时间恒定后（即柱已平衡）才能使用。

采用原硅胶与氧化铝柱应尽可能避免梯度洗脱，尤其当 A 与 B 溶剂强度差别很大时，其原因是溶剂的分层问题。当采用一个较弱 A－溶剂和较强（定位）B 进行 NPC 梯度洗脱时，色谱柱可能会吸附 B 溶剂，直到柱表面完全饱和为止，例如在硅胶柱上进行从 0 到 100% 丙醇－己烷的梯度洗脱。由于丙醇被硅胶填料吸收，最初离开柱的流动相是纯己烷。柱子达到饱和时，流出的流动相中% B（丙醇）会骤然增加，并且这种溶剂强度的突然改变可以使 k' 很

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

小、分离效果很差[71]。

6.7.4.2 固定相中水含量的变化 水是一种常用的强极性溶剂，并且与原硅胶柱（或氧化铝）键合相当牢固，由于室内的湿度影响，非水 NPC 流动相会从周围大气中吸取一定量的水分。这些溶解的水会被柱从流动相中萃取出。柱中含水量增加，样品保留时间与干燥柱相比将大大减少。图 6－31 所示为苯丙醇的保留值 k 与二氯甲烷流动相所加水百分含量的关系图（用 0.15% 水饱和的二氯甲烷）。当水含量从 0 增加到 0.15%（0～100% 饱和）时，水平衡柱的 k 值从 18 下降到 4。

室内空气湿度很难保持恒定，由于色谱柱与流动相中的水平衡非常慢，因此柱内的水含量在每次实验过程中会发生变化。这种影响将导致样品保留值变化不定，常见于原硅胶柱。一种解决办法是用一定量（适中的）的水平衡流动相，如 50% 水饱和度（或图 6－31 中 0.075% 水），进一步讨论详见附录 VI。另外在流动相中加入 0.1～0.5% 丙醇与甲醇，有时可得到与加水相似的效果，且更易于操作[69]。

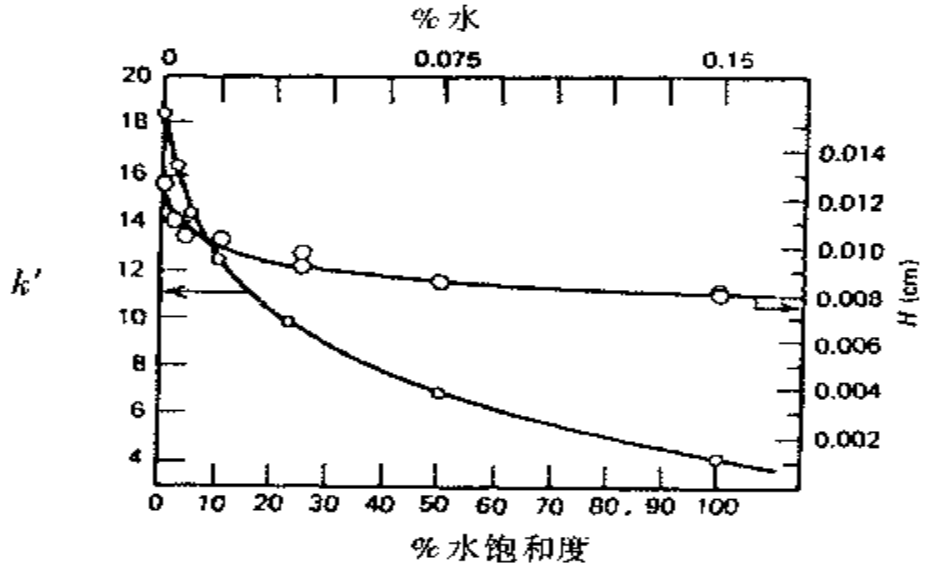


图 6－31 苯丙醇在硅胶柱上的保留值与流动相（二氯甲烷）中的水含量的关系[62]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第7章　离子样品:反相、离子对和离子交换HPLC

7.1　引言

图1-3中的讨论将常规样品分为两类:中性样品或离子样品。离子样品是任何含有一种或一种以上离子的或可电解离的有机化合物的混合物。中性样品的分离已在第6章讨论;本章讨论离子样品的反相、离子对或离子交换HPLC的分离。一些离子样品也包含在图1-3中特殊样品范畴中:生物样品(见第11章)、手性样品(见第12章)和无机离子。无机离子的分离在本书中不作讨论。

离子样品的HPLC分离往往更复杂且难于理解。而且,往往有一些中性化合物碰不到的问题。另一方面,离子样品的谱峰间距比中性样品更易于控制,这一点使最终分离成功的可能性大为增加。

7.2　酸性和碱性样品

为方便本章的讨论,我们定义"离子溶质"为在通常pH范围内(大多数硅胶基质色谱柱:2<pH<8,以及pH稳定柱:1<pH<14),含有一个或一个以上酸性或碱性官能团的有机分子。强酸强强酸碱是在所研究pH范围内完全解离的化合物[如链烷磺酸(pH>2、四烷基铵盐(pH<13)或大多数pH<8的烷基胺]。在HPLC分离条

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

件下，离子电荷随 pH 发生变化的化合物简单地称作酸或碱。如流动相 pH 被限制在较窄范围内，某特定酸（如醋酸）的保留行为可能与强酸（pH>7，完全解离），酸（3<pH<7，解离度随 pH 变化）或中性化合物（pH<3，不解离）的类似。同理，碱的分类方式也类似。

7.2.1 酸碱平衡与反相保留

在反相色谱（RPC）中，疏水化合物样品的保留值较大（见 6.2.1 节）。当某种酸（HA）或碱（B）发生解离（即从不带电形式转化），其疏水性将会大大减弱（亲水性增强）。因此，在 RPC 中的保留值 k 可能下降 10～20 倍。

$$HA \Leftrightarrow A^- + H^+ \quad (7.1)$$

$$B + H^+ \Leftrightarrow BH^+ \quad (7.2)$$

疏水　　亲水

（PRC 中保留较强）　（PRC 中保留较弱）

当 pH 增加，酸失去质子（发生解离）；而当 pH 降低时，碱获得质子（也发生解离）。因此随 pH 增加，酸的 RPC 保留值减小，而碱的则增大。该保留值行为的说明见图 7－1 所示 5 种不同化合物的 RPC 保留值随流动相 pH 值变化的关系图。在 3<pH<9 的范围内，化合物 1 与 2 呈酸性，化合物 4 与 5 呈碱性，3 为中性。

图 7－2*a* 进一步阐述了这种酸碱行为，一种碱性化合物（理想的）保留与 pH 的关系。当 pH 值在一足够大的范围内发生变化，样品的解离和保留值如图呈特有的 S 形曲线（亦见图 7－1 中的化合物 4）。在该保留值－pH 曲线的中点（见图 7－2*a* 中虚线），pH 值等于该化合物（就碱来说为 BH^+）的 p*Ka* 值。文献中的不同酸或碱的 p*Ka* 值通常指在水缓冲剂中的测得值。如果 HPLC 流动相中含有有机溶剂，其 p*Ka* 值可随%B 有所改变（见 7.2.3 节）。

当一种化合物的 p*Ka* = pH 时，其有一半解离（即流动相中 B 与 BH^+ 的浓度相等）。几乎所有与 pH 相关的保留值变化均发生于 p*Ka* 值 ±1.5 单位的 pH 值范围内（见图 7－2*a* 的 B 区域）。超出

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

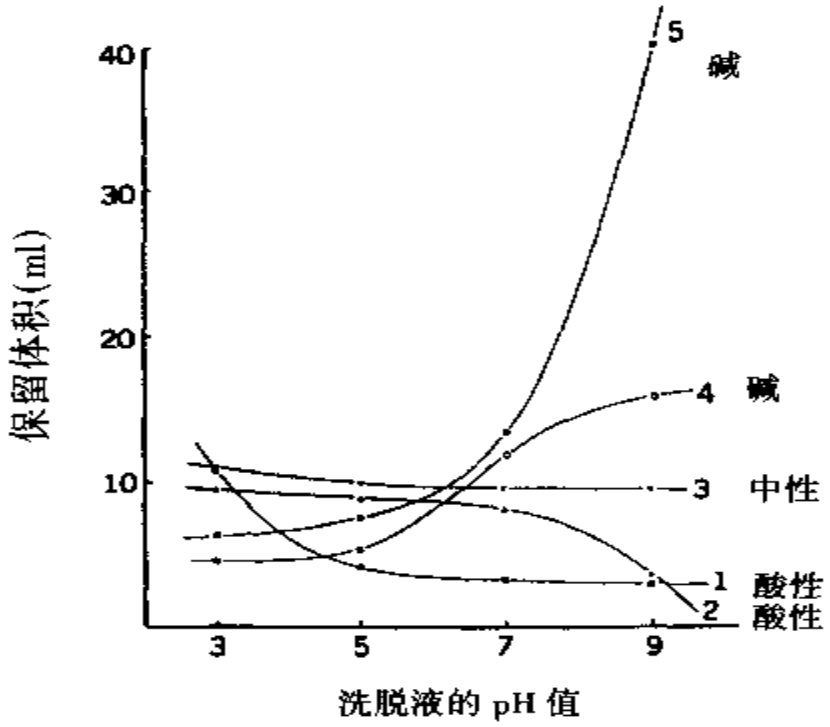
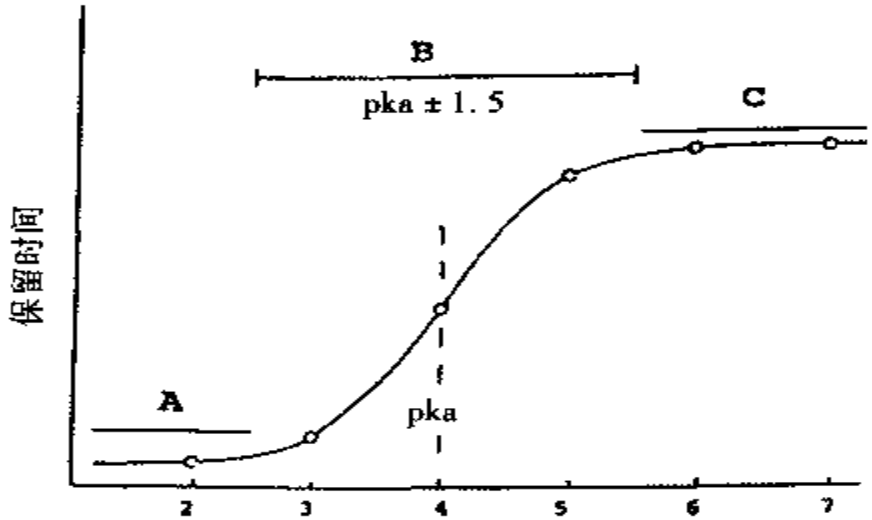


图 7－1　流动相 pH 对反相保留的影响与样品类型(酸、碱、中性)的关系[1]
色谱柱:30×0.4cm μBondapak C_{18},流动相 0.025 *M* 磷酸盐、40% 甲醇;
化合物:1. 水杨酸;2. 苯巴比妥;3. 非那西丁;4. 尼古丁;5. 甲基苯丙胺。

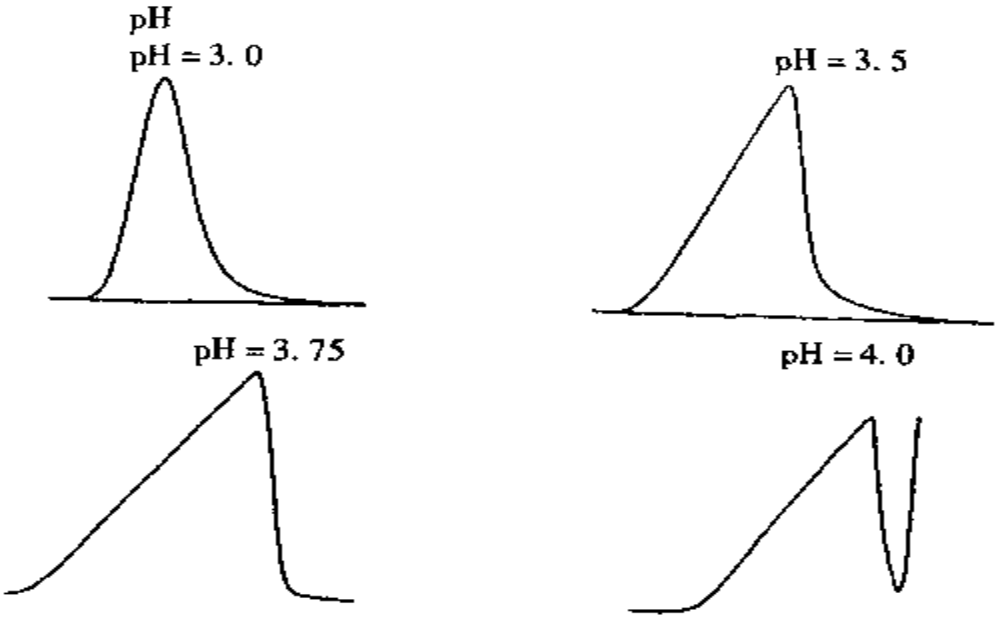
该范围(图 7－2*a* 中为 pH<2.5 或 pH>5.5),该化合物或者完全解离或者完全未解离,其保留值随 pH 变化不大(即保留行为与中性化合物相似)。该情况见图 7－1 所示,当 pH>6 时的化合物 1,与 pH<7 时的化合物 2 的情况。酸与碱的 RPC 保留值与 pH 的关系的详细理论分析,见文献 2－4。

如化合物含有多个酸和/或碱基,其 RPC 保留值与流动相 pH 的关系则更为复杂[5]。当这些基团相同时(酸性或碱性),其保留值与 pH 的关系基本相似,如图 7－3*a* 中所示的一系列含有一、三、五、与七个可解离的酸性基团(－COOH)的化合物[(蝶酰基低聚)谷氨酸]。而当一个分子中同时存在一个酸性和一个碱性基团时,(两性)保留行为更复杂,见图 7－3b 所示的几种氨基酸的 RPC 分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



(a)



(b)

图 7－2　保留值和缓冲容量与 pka 和 pH 的关系[3]

(a)对于 pka = 4.0 碱性化合物，保留值对 pH 的理想的依赖关系，(b)当流动相缓冲容量减小时峰形变差的情况。3,5－二甲基苯胺作为溶质(p*Ka* = 3.8)；25×0.46cm 氰基柱，25% MeOH－缓冲溶液(25mM 磷酸钾)，1ml/min，35℃

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离。中间 pH 值处保留值最小，因为 4<pH<8 时，羧基与氨基都发生解离；这时分子解离程度最大，亲水性最强(尽管静电荷为零)。

7.2.2 缓冲液的选择

当分离酸性或碱性样品时，加入缓冲剂控制流动相的 pH 是非常可取的。(用 pH 计)很难精确测定含有有机溶剂的流动相的 pH，因为电极响应易发生漂移。因而，如使用 pH 计，最好先调节缓冲剂的 pH，再加入有机溶剂。这就使最终流动相的实际 pH 值难以确定(因为加入有机溶剂会改变 pH)，但该问题比流动相

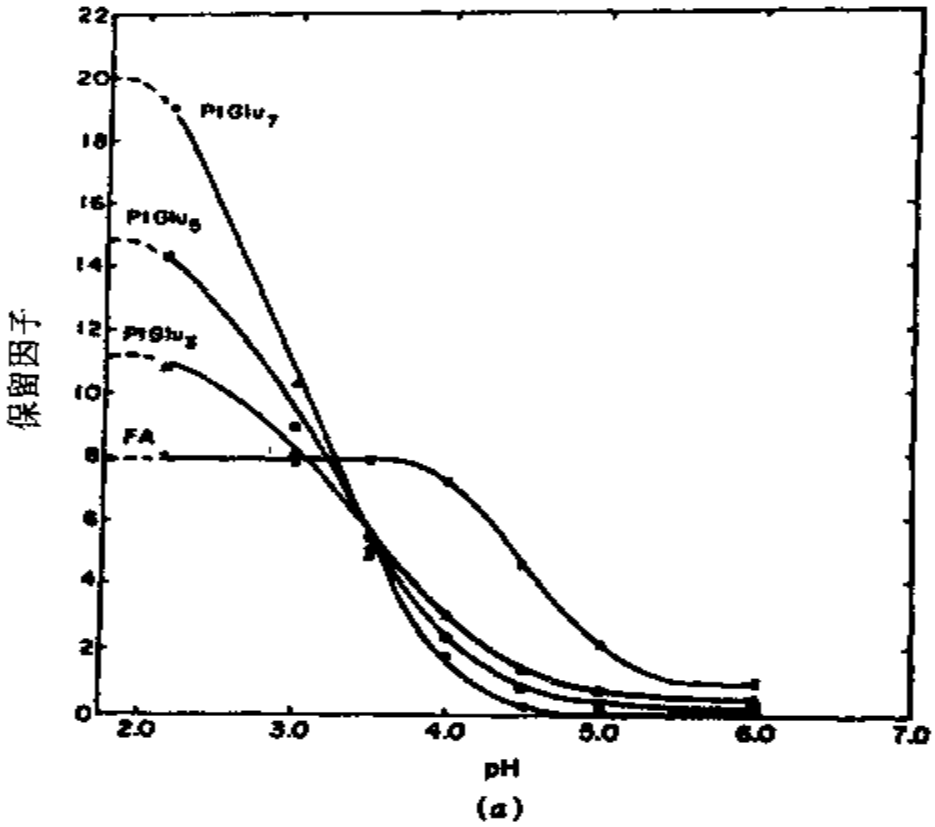
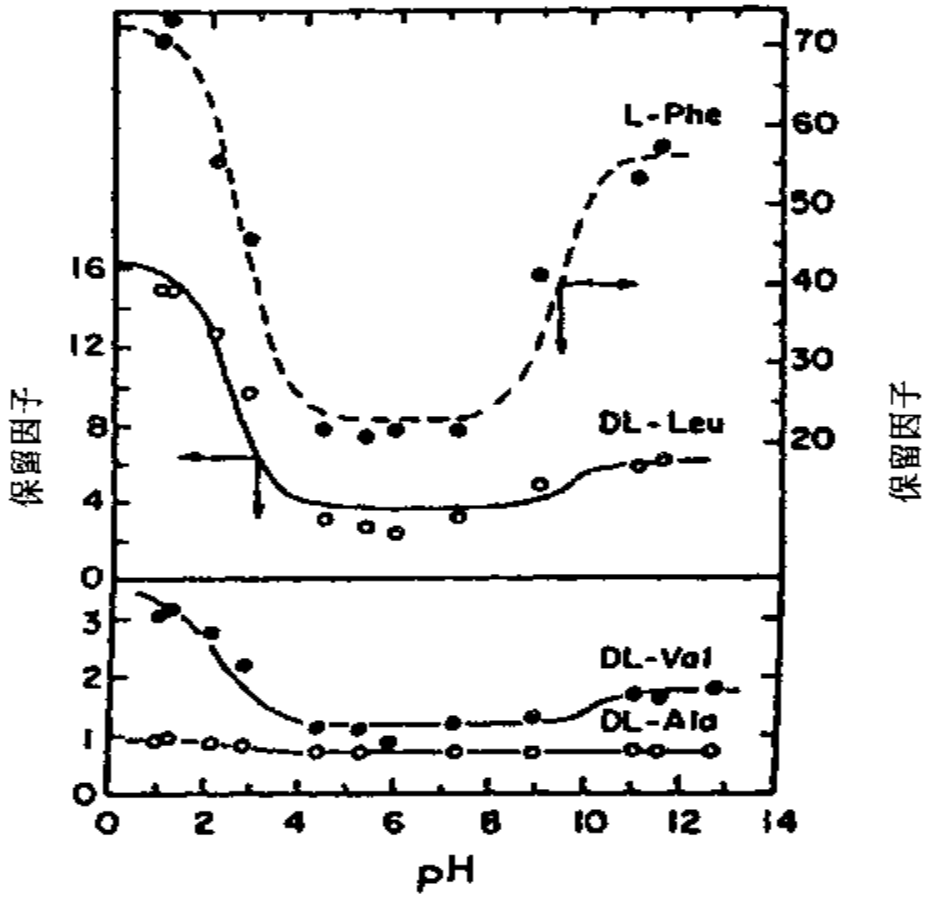


图 7-3 一个以上的酸或碱基取代的样品分子的保留值对 pH 值的依赖关系[6]

(a)样品：蝶酰基-低聚-γ-L-谷氨酸[-(=FA，叶酸)、三、五、七个羧基]与 pH 的关系；Partisil ODS-2 色谱柱；流动相：6% 乙腈-缓冲剂(0.1M 磷酸盐)；45℃[5]

(b)样品：氨基酸(苯丙氨酸，亮氨酸，缬氨酸，丙氨酸)；XAD-4 柱填料；40mM 磷酸盐缓冲液[6]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn



(b)

图 7-3(续)

pH 重现性不好要大得多(即当加入有机溶剂后，再测 pH 值)。

选择具体缓冲剂时，应切记的几种考试因素：

· 缓冲容量

· UV 吸收度

· 其它性质：溶解度、稳定性、与样品和/或色谱柱的相互作用、挥发性、对 HPLC 系统的腐蚀等。

7.2.2.1 缓冲容量 缓冲容量由 pH、缓冲剂 p*Ka* 及其浓度决定。与样品化合物的情况类似，缓冲剂发生解离的 pH 范围为 p*Ka* ± 1.5。只有在此 pH 范围内缓冲剂才能有效地控制 pH 值。因

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

此，为了保险起见，为某具体分离所选择的缓冲剂应控制的 pH 范围 ≈ pKa ± 1.0（见图 7－2b 下的讨论）。假定进样体积较小和/或样品对流动相 pH 的影响不很大，10～50mM 浓度的缓冲剂对 RPC 分离一般足够。较高的缓冲剂浓度（>50mM）可以提供较大的缓冲容量，但在高%B 的流动相中可能不溶。高浓度的缓冲剂也可能对不锈钢材质的 HPLC 系统操作不利。25mM 的缓冲剂浓度通常是较好的折衷方案。表 7－1 中总结了 HPLC 中几种常用缓冲剂的可用 pH 范围数据。

表 7－1　HPLC 中常用缓冲剂

缓冲剂	pKa	缓冲范围[a]	UV 截止波长[b]
三氟乙酸	≫2	1.5～2.5	210nm(0.1%)
磷酸/磷酸二氢钾或	2.1	<3.1	<200nm(0.1%)
磷酸氢二钾	7.2	6.2～8.2	
	12.3	11.3～13.3	<200nm(10mM)
柠檬酸/柠檬酸三钾	3.1		
	4.7	2.1～6.4	230nm(10mM)
	5.4		
甲酸/甲酸钾	3.8	2.8～4.8	210nm(10mM)
乙酸/乙酸钾	4.8	3.8～5.8	210nm(10mM)
碳酸氢钾/碳酸钾	6.4	5.4～7.4[c]	<200nm(10mM)
	10.3	9.3～11.3	<200nm(10mM)
Bis－Tris[e] HCl/Bis－	6.8	5.8～7.8	215nm(10mM)
Tris	9.0	8.0～10.0	225nm(10mM)
Tris[d] HCl/Tris	8.3	7.3～9.3	205nm(10mM)
氯化铵/氨	9.2	8.2～10.2	200nm(10mM)
1－甲基哌啶 HCl/1－甲基哌啶	10.1	9.1～11.1	215nm(10mM)
三乙胺 HCl/三乙胺	11.0	10.0～12.0	<200nm(10mM)

[a] 缓冲剂所允许的 pH 值范围（保守的估计）
[b] 吸光度 <0.5A；文献 7
[c] 需要加入酸（如醋酸或磷酸）
[d] Tris：三（羟甲基）氨基甲烷
[e] Bis：1,3－二[三（羟甲基）氨基甲烷]丙烷

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

用具有临界缓冲容量的流动相，难以保证那些在流动相 pH 值下部分解离的化合物的分离重现性。这种情况下，每次运行的保留值都可能发生变化，产生畸峰。如图 7－2*b* 所示，用 25mM 磷酸盐缓冲剂在 pH 值介于 3 与 4 时，3，5－二甲基苯胺（DMA）的 RPC 分离。缓冲剂的 p*Ka* 值为 2.1，所以当流动相 pH>3.1 时，其缓冲容量将显著降低。在这些实验条件（25% MeOH－缓冲剂）下，溶质（DMA）的 p*Ka* 为 3.8（即 2.8<PH<4.8，将部分解离）。从图 7.2*b* 中可以看出，随 pH 值增加到 3 以上（降低缓冲容量），溶质的峰形逐渐变差，而且，当 pH>3.5 时（缓冲容量非常小，见 7.2.2.4 节的进一步讨论），峰变形已相当严重。

7.2.2.2 缓冲剂的 UV 吸收 理想状态下，缓冲剂应在或者低于 220nm 处透光性良好，以便于在低 UV 波长处检测。表 7－1 中的所有缓冲剂（除枸橼酸盐外），都满足该标准。有时，有必要在 200nm 或以下进行 UV 检测。表 7－1 中的几种缓冲剂（磷酸盐、碳酸盐、铵盐）能在非常低的 UV 波长检测。然而缓冲剂由于含有杂质，在低 UV 波长的吸收度可大大提高。表 7－1 中的 UV 截止波长所指是纯试剂的。

7.2.2.3 缓冲剂的其它性质 缓冲剂的溶解度、挥发性和稳定性（可能与设备、样品和/或色谱柱发生作用）对某些分离也很重要。无机缓冲剂，如磷酸盐，在含有高浓度有机物的溶液中的溶解度不大。甲醇－水流动相比乙腈－水或 THF－水溶液的溶解度大，因此甲醇可能是有机溶剂的首选。无机缓冲剂通常比较稳定，不过挥发性缓冲剂可能维持恒定的 pH（尤其充氮气时）。例如，碳酸盐缓冲剂放置后，由于长时间 CO_2 会逸出，流动相 pH 可能增大。pH<2.5 时，三氟醋酸（TFA）高度解离，几乎不挥发（该缓冲剂经常用于肽和蛋白质的分离；见 11.2.1 节）。一些缓冲剂放置即降解，贮存或长期使用后，其 UV 吸收也会增加（如：TFA、三乙胺）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

有报道，枸橼酸缓冲剂对不锈钢有腐蚀作用，但也有报道[8]称每天结束工作时清洗系统、除去枸橼酸盐，HPLC 系统即可用该缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的主要缺点是 UV 吸收较高，使其 UV 检测限于 230nm 以上。一些缓冲剂能通过形成离子对，与样品发生作用(如三氟醋酸缓冲剂与阳离子样品[9]；三乙胺与阴离子样品等)。虽然这种离子对作用并非总不好，但当分离条件偶然改变时，会使色谱图解析变得复杂(见 7.3 节)。

挥发性缓冲剂对两种情况有作用。如需回收纯化的样品组分(制备 HPLC，见第 13 章)，通过蒸发或冷冻干燥能方便地除去缓冲剂。碳酸铵、甲酸铵、醋酸铵和三氟醋酸等缓冲剂可作这类应用。某些检测器[如蒸发光散射(见 3.3.1 节)或质谱(见 3.3.4 节)]可能需用挥发性缓冲剂。

7.2.2.4 较好的缓冲剂 反相 HPLC 分离一般采用 C_8 或 C_{18} 键合相硅胶－基质色谱柱，pH 范围超出 2～8 时，这种色谱柱不稳定。因此，缓冲剂应能将 pH 控制在 2～8 之间。如缓冲剂可在 210nm 或以下波长检测，则很理想。表 7－1 表明，磷酸盐缓冲剂可控制的 pH 范围在 2.1～3.1 或 6.2～8.2。醋酸盐的缓冲范围是 3.8<pH<5.8，与磷酸盐结合使用时，则能较好地控制整个 2<pH<8 范围内的 pH(注意：用磷酸盐缓冲剂的 pH6.2～8.2)和 11.3～13.3 的缓冲范围时，硅胶基质柱不稳定；见 5.2.3.4 和 5.4.3.6 节)。

枸橼酸盐的优点是能用单一缓冲剂控制宽范围的 pH: 2.1<pH<6.4。该缓冲液有另一优点，如将枸橼酸(A，pH2.5)和枸橼酸三钠(B，pH6.5)两缓冲剂等浓度混合，在该 pH 范围内，pH 值随% B 的变化几乎呈线性(详见附录Ⅳ)。在方法建立过程中，利用该特点简单地混合 pH2.5 和 ph6.5 的缓冲剂，即可方便、快速地得到预期的 pH 改变。一旦确定了最佳 pH 后，即可用醋酸盐或(尤其是 0 磷酸盐取代枸橼酸盐，以利于理想的低波长检测。然后应注

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

意，改变缓冲剂可能导致选择性的变化[10,11]。附录Ⅳ提供了配制理想pH 的缓冲剂的详细信息。

7.2.3 p*Ka* 与化合物结构的关系

优化流动相 pH 值时，了解各样品组分的近似 p*Ka* 值是非常重要的。利用该信息可以将流动相的 pH 值规定于一适用的范围中(例如，p*Ka* ± 1.5 时，谱峰间距的变化受 pH 影响；或者，如果要尽量减小 pH 对保留值的影响，使方法稳定，则可用超出此范围的(pH)。若不知样品组分的 p*Ka* 值，可以通过样品的分子结构估计出。表 7－2 总结了一些典型样品分子中常见的酸或碱取代基在水中的 p*Ka* 值。文献 12 通过分子结构对不同药物化合物的 p*Ka* 值进行估测，得到了非常理想的结果，也可以通过计算机程序进行估算[例如采用 CompuDrug(布达佩斯)公司的 pKalc 软件][13]。

由于几种原因，应小心使用表 7－2 的数据。首先，取代基(如－COOH)的 p*Ka* 值可能受相邻取代基的电负性影响而变化很大。例如，醋酸的 p*Ka* 为 4.8，而三氯醋酸的 p*Ka* 却为 0.7。其次，如在流动相中加入有机溶剂，pH 与 p*Ka* 值还会进一步发生变化[14]。当按照以上推荐调节流动相的 pH(加入有机物以前)，一项研究数据显示[3]酸性样品(苯甲酸衍生物)在水中和水－甲醇混合液中所测得 p*Ka* 值差异很小。同时也表明碱性样品(苯胺衍生物)中甲醇浓度每增加 10% 时，其表现 p*Ka* 降低约 0.3 个单位。其它研究[14,15]也表明吡啶衍生物中甲醇、乙腈或 THF 浓度很增加 10%，其 p*Ka* 降低 0.1～0.3 个单位。

如图 7－2*a* 所示，有可能通过分离效果随 pH 的变化来推断化合物的酸或碱性以及近似的 p*Ka* 值(即，保留值在极端 pH 时，显示的极大值和极小值的中间 pH = p*Ka*)。例如，图 7－1 中化合物 4(一种碱)的 p*Ka* 值大约为 7。同样，化合物 1 是一种酸，其 p*Ka*<4。据报道[3]有计算机软件可通过三次改变 pH 的 RPC 实验，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 7－2　酸性与碱性官能团的 p*Ka* 值[13]

官能团	酸性 p*Ka*		碱性 p*Ka*	
	脂肪[a]	芳香[b]	脂肪[a]	芳香[b]
磺酸 $-SO_3H$	1	1		
氨基酸 $-C(NH_2)-COOH$	2－4		9－12	
羧基 $-COOH$	4－5	4－5		
巯基 $-SH$	10－11	6－7		
嘌呤		2－4		9
酚 $-OH$		10－12		
吡嗪			1	
亚砜 $-SO$			1－2	
噻唑			1－3	
胺，$-NH_2$，$-NR_2$，吡啶			8－11	5
咪唑				7
哌啶			10	

[a] 指脂肪取代基(如乙酸)
[b] 指芳香取代基(如苯甲酸)

估计其 p*Ka* 值(作为方法建立的一部分，见 10.2.1.1 节)。另有研究[16]通过改变 pH 和离子对试剂浓度的等度 HPLC 实验，可以将所有的样品组分按酸性、碱性、中性、强酸性或强碱性分类。该程序已被扩大用于梯度洗脱[17]。

7.2.3.1 较好的流动相 pH　样品分子中最常见的酸或碱取代基为胺[$-NH_2$、$-N(CH_3)_2$ 等]、碱性杂环和羧酸($-COOH$)基团。芳香胺、吡啶与芳香及脂肪羧酸在水溶液中的 p*Ka* 范围为 4～5，而脂肪胺的 p*Ka* 为 8～11。RPC 色谱柱一般使用的 pH 范围为 2～8，这将很大程度排除对脂肪胺解离和保留的控制。因此，与 pH 有关的保留值变化最可能发生于 pH3～6 的范围内，这不包括烷基胺化合物。

HPLC 方法建中选择最佳起始 pH 受多种因素的影响。优化

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

峰间距和分离时，希望样品保留值随 pH 发生变化。这时，选择 pH 在 $\approx pKa \pm 1$ 范围内改变。其他情况下，对于 pH 的微小变化，我们可能需要保持不变的分离效果；这就要求 $pH<(pKa-2)$ 或 $>(pKa+2)$。无论处理已知样品（在分离前可估计 pKa 值）还是未知样品（pKa 由实验近似得出），开始 RPC 方法建立时最好选用 pH 微小改变不影响分离的流动相（pH<3 见 7.3.1 节）。

7.2.4 哪种 HPLC 法对于离子样品最合适？

对于常规离子样品，我们可以选择反相、离子对、离子交换色谱法这三种 HPLC 分离模式。RPC 具有简单、应用范围广和较好的柱性能等特点，通常是首选的分离模式。若 RPC 分离不够理想，可以考虑在流动相中加入离子对试剂。通过对离子对试剂浓度的控制来拓宽 RPC 的范围；因此，在离子对试剂浓度由零变至最大值时，会有 RPC－IPC 保留值的连续变化。所以起初的 RPC 实验有助于后面 IPC 分离（若需要的话）条件的优化选择。对于特殊的分离目的，可以考虑从离子对或离子交换色谱开始，见 7.4 与 7.5 节中的讨论。

7.3 优化离子样品的反相分离

7.3.1 初始实验

离子样品反相分离的方法建立与中性样品有些相似（6.4 节）。初始分离实验条件的选择，可参照表 1－3 中的推荐值。离子样品与中性样品初始实验的主要差异为需用（1）经 pH 缓冲的流动相；（2）硅羟基效 最小的反相柱（即：碱性 RPC 柱，见 5.2.1 节）。也可用非硅胶基质柱（例如聚苯乙烯、石墨化碳等，见 5.2.1 节）。不过，最佳结果往往是用表 5－4 中的低酸性硅胶基质色谱柱获得。

硅羟基效应（见 7.3.3.2 节）可导致碱性样品的峰形变差，柱效降低。对于这些样品，用低 pH 的流动相通常可以得到较高的柱

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

效(见 7.3.3.2 节)。而且低 pH 方法一般抗干扰性较好,因为大部分样品的保留值不易受 pH 微小改变的影响。最后,当首次开始 HPLC 方法建立时,并不知道获得合适的分离是否需要改变 pH;所以初始实验的流动相 pH<3 最好。

下一步实验是通过调节流动相强度(%B),以使样品具有合适的保留值范围 $0.5<k<20$。离子样品不大可能被强保留,故很可能获得较宽的 k 值范围。因此,方法建立的最佳方案是初始运行用梯度洗脱。梯度选用宽范围(例如 5→100%B),必须注意避免高%B 时析出缓冲盐。这需使用低缓冲盐浓度(如 5~10m*M*)或较易溶的缓冲剂(如 0.1% 三氟醋酸)。初始梯度洗脱完成后,可估计最佳等度保留的%B($0.5<k<20$,见 8.2.2 节)。用初始梯度也可提供关于样品 k 值范围的信息(如:可以采用等度分离吗?)。若最初选择的 pH 值在等度分离时不行,可改变 pH 或加入 离子对试剂,以降低样品的保留值范围,并再进行等度分离(见下文讨论)。另外,若 k 值范围太宽,样品可用梯度洗脱进行分离(见第 8 章)。

当选择的流动相强度(%B)得到合适保留值后,可能还需调整峰间距,即尽量扩大样品的分离度或降低保留值范围,以便进行等度分离。最后,能改变柱条件以最好地兼顾分离度、运行时间和柱压(见 2.3.3 节)。

7.3.2 选择性的控制

与中性样品的方法建立相比,离子样品反相分离中的峰间距控制可选择其它的分离条件。如已知样品的酸性或碱性(p*Ka* 值),能更好地预测选择性的变化。改变 pH 往往是改变分离选择性的最有效方式。其它可有效地改变峰间距的条件是%B、溶剂类型(甲醇、乙腈、THF)、温度、柱类型(C_8 与 C_{18} 苯基、氰基)与缓冲剂浓度。注意用高温度的缓冲剂流动相对柱寿命会有不利影响,尤其 pH<3 或 pH>7。

7.3.2.1 pH 如图 7-1 中所示,pH 变化可导致离子化合物

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的 k 值发生 10 倍或更大的变化。因此，在改变 pH 的同时有必要对%B 进行调整。另一方面，如果样品中含有中性化合物且取后流出，改变 pH 对总运行时间就不会有太大影响。这种情况下，改变 pH 而不必调整%B。

基于初始梯度的运行结果(甲醇－缓冲剂，pH 2.5)和表 8－2，进行图 7－4a 中的等度分离。保留值范围足够($2<k<10$)，但峰 6/7 未分开。这时，如需研究 pH 的影响，最好进行另外一或两次 pH 改变 1 个单位的实验。图 7－4b 和 c 表示 pH 分别为 3.5 和 4.5 时的分离结果。pH3.5 的保留值范围仍可以($0.8<k<6$)，但峰 5/6 未分开，且峰 8/9 重叠在一起。因为关键峰对由 6/7(pH2.5)变成了 5/6(pH3.5)，则有可能在中间 pH 获得更好分离。pH4.5 分离时(见图 7－4c)，样品保留值($0.4<k<1.8$)和分离度均不足。如需进一步研究该 pH 的分离，首先必须降低图 7－4 中所用的(35%B)甲醇浓度。

检查图 7－4a～c 的三次分离情况，下一实验 pH 的逻辑选择应介于 2.5～3.5 之间(如 pH3.0)。其分离见图 7－4d 所示，所有谱峰都获得了较好的分离(关键峰对 3/4 的 $R_s=1.8$)。通过移动峰 4 使其与峰 3 与 5 等距时，还能获得少许改善。增加 pH 至 3.1，可获得这种效果(未画出，但参见图 7－4a 与 b)，其 $R_s=1.9$(关键峰对 3/4 和 4/5)。

图 7－4 说明在分离一组酸－碱官能团相似的化合物时(本例中为苯甲酸类混合物)，通过改变 pH 有可能很好地控制谱峰间距。当样品中同时含有酸、碱和/或中性混合物时，峰间距甚至能期望得到更显著的改变，如图 7－1 中数据所示。然而优化 pH 以控制峰间距和分离时，必须权衡方法的抗干扰性[即当制备新的流动相时，流动相微小的不可避免的 pH 变化对于保留值和分离效果的影响(见 7.3.3.1 节)]。

即使象图 7－4 中所示的简单 pH－依赖型分离，也很难在不

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

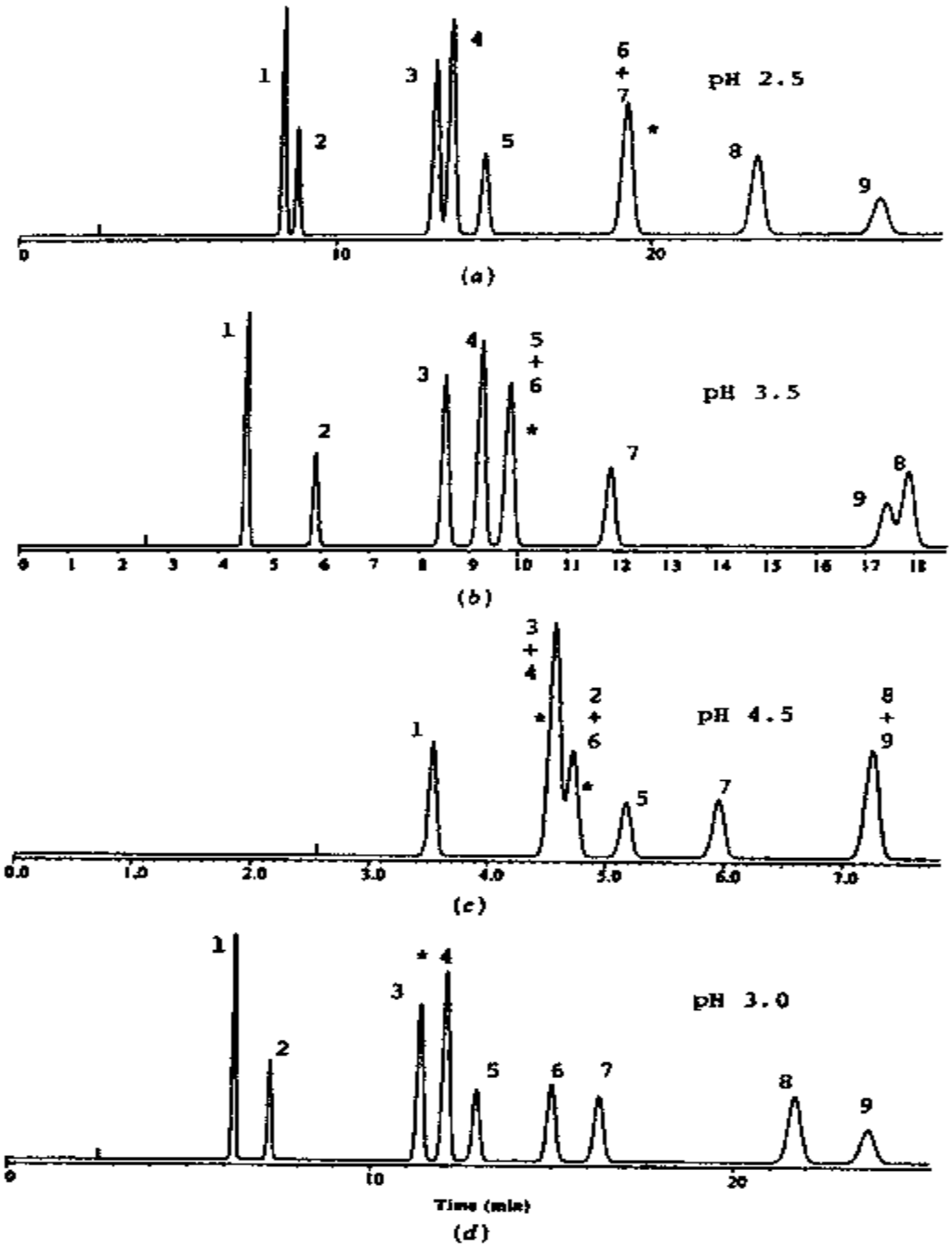


图 7－4　取代苯甲酸的分离与 pH 值的关系[18]

样品：1：2－硝基；2：邻苯二甲酸；3：杂质；4：2－氟；5：3－氰基；6：2－氯；7：3－硝基；8：3－氟；9：2,6－二甲基。条件：25cm Zorbax C_8 柱；35% 甲醇－缓冲剂(25mM 醋酸钠)；35℃；1.0ml/min。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

同的色谱图之间对峰跟踪识别。当 pH 改变时，有些酸性或碱性样品的吸光度会发生改变，故在不同 pH 值时运行的已知化合物无法保持其峰大小不变。由于这些及其它原因，有时有必要进行数次 pH 微小改变的实验（如 0.2～0.5 单位）。为了合理地优化 pH，也可能需要在所有运行中注入标准品来进行峰确认，见 10.7 节中峰跟踪识别的讨论。

7.3.2.2 溶剂的强度（%B） 当改变 pH 以改变峰间距时，可能有必要同时改变%B 以维持良好的 k 范围。这种调整会引起选择性的其它变化。因此希望峰间距如中性样品那样随%B 而改变（见 6.3.1 节）。图 7－5 中所示为取代苯胺类混合物在 pH3.5、以甲醇－缓冲剂为流动相的分离。甲醇浓度由 20% 变为 40%，后四个峰的分离顺序从 5<6<7<8 变为 6<5≈8<7。与中性样品相比，由于离子样品反相分离中样品与固定相之间存在其它的相互作用，当改变%B 时引起的选择性改变对离子样品往往较大，因此，也应永远记住溶剂强度的重要性，也是优化选择性的一个因素。

上段的讨论可能说明同时改变 pH 与%B 往往是有利的，它们可独立地对 α 进行优化。这对酸性样品（苯甲酸衍生物[19]）似乎是正确的，但对于碱性样品（苯胺衍生物[20]则不尽然。当为 $0.5<k<20$ 调节了%B，为 α 和分离度选择了最佳 pH 后，进一步调节%B 却无法再改善样品（苯胺）的分离度。相反，为改善选择性，如 pH 不变而优化%B，进一步改变 pH 也不会改善分离效果。这一有趣的结果似乎说明酸性样品的 pH 和 pKa 随%B 变化不大，而碱性样品的 pH 与 pKa 却确实随%B 而变化[3,14]。因此，由于碱性样品的 pH 和/或 pKa 随%B 发生变化，有些情况下为改善选择性而改变%B 与改变 pH 的效果相当。即改变 pH 或%B 均可，它们对选择性的改变类似，但这两种条件的结合使用却并不能再进一步改善分离效果。

7.3.2.3 溶剂的类型 一般认为溶剂类型（乙腈、甲醇、

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

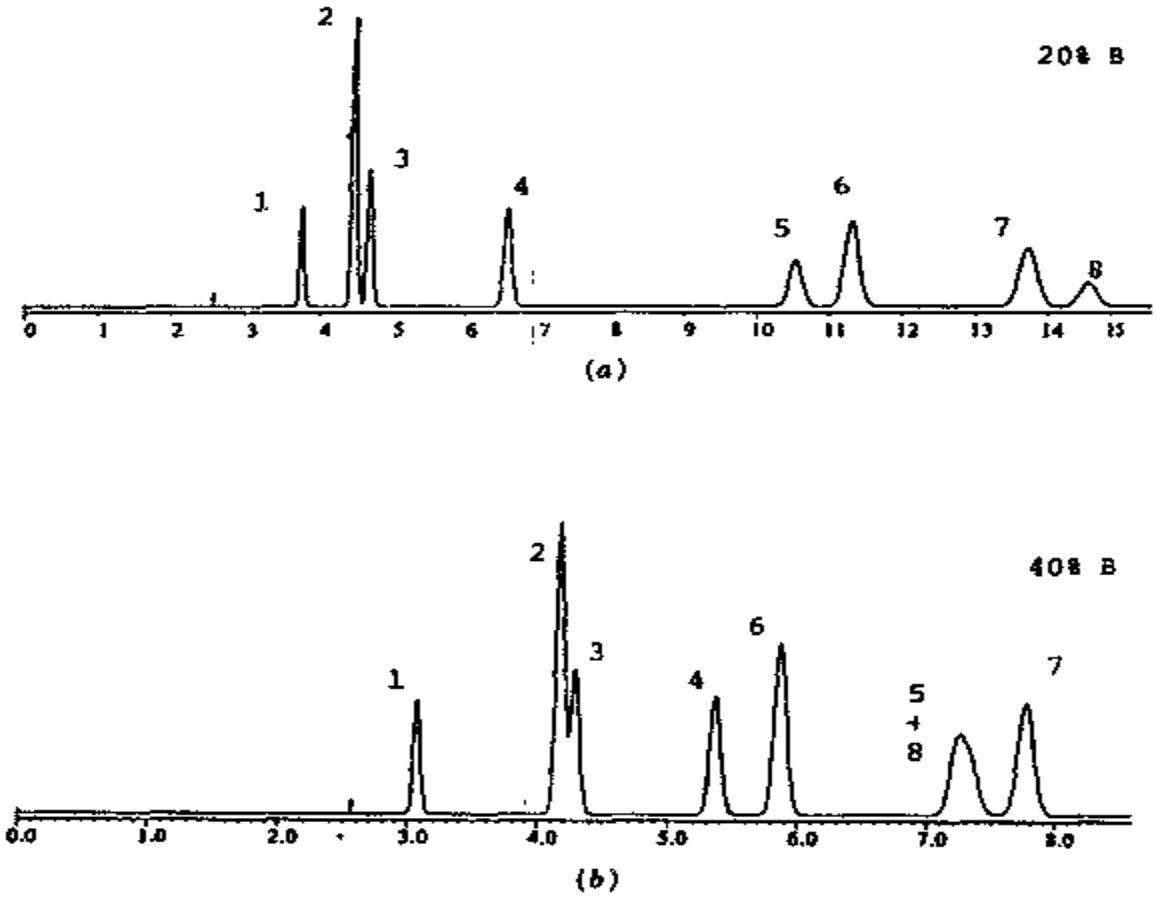


图 7.6　取代苯胺的分离与甲醇百分比(%B)的关系[3]

样品:1:4－甲氧基,2:N－乙基,3:3－甲基,4:3,5－二甲基,5:4－氯,6:3－氰基,7:3－氯,8:2－氯。条件:25cm Zorbax SB－C_8 柱;流动相:甲醇－缓冲剂(25m*M* 枸橼酸钠 PH3.5)。35℃;1.0ml/min,(*a*)20% 甲醇,(*b*)40% 甲醇。

THF)对于离子样品选择性的影响方式与对中性样品的极为类似。因此,改变溶剂类型对优化分离是一有用途径。对分离某些离子样品(需用大%B 的强疏水性样品),甲醇可能优于乙腈,与含乙腈或 THF 的流动相比较,大多数缓冲剂在甲醇－水混合液中溶解得更好。

7.3.2.4 温度　如 6.3.4 节中所述,温度对 RPC 分离中性样品的峰间距影响一般很小。而对离子样品则不同,因为这类分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离中包含多种不同的保留过程，而每一种对温度的改变都有不同的响应[21]（如：样品化合物解离度的变化；同一化合物解离和未解离分子的疏水保留；包括解离种类的硅羟基效应；pH 和 p*Ka* 随温度的变化等）。可以预料选择性随温度改变的最大点将出现在使有关化合物部分解离时的 pH 值（即 pH 的中间值）。该效果见图 7－6 中所示的图 7－4 中苯甲酸样品的分离与温度的关系。pH3.2 时，等于该样品的平均 p*Ka* 值（所以，所有化合物均部分解离），在中间的温度（40℃，图 7－6*b*）可获得最佳分离效果。注意，低 pH 或高 pH 与较高温度的结合使用都会导致大多数 RPC 柱键合相的迅速流失（见 5.4.3.6 节）。

7.3.2.5 缓冲剂的浓度 缓冲剂浓度对离子样品 RPC 保留值的影响一般较小，如文献 18 中取代苯甲酸的分离数据所示。然而，由于碱性样品与其硅羟基显著解离的硅胶基质色谱柱的结合，则会有所不同。对于酸性（A 型）RPC 柱的任何 pH，pH>6 时的任何硅胶基质柱，硅羟基解离均可发生（见式 7.3*a*），这些解离的硅羟基能通过离子交换过程，很强地保留质子化碱或其它阳离子（见 7.3.3.2 节与式 7.3）。于是增加缓冲剂的浓度，会选择性地降低所有样品阳离子的保留值，因增加了缓冲剂阳离子的竞争力。这种影响用于以 ZorboxC_8 柱分离 PTH－氨基酸样品的示例已有报道（见文献[22]与图 1－5*b*）。不过，一般不推荐改变缓冲浓度作为改善选择性的手段，因为硅羟基解离的柱间重现性一般不好，导致样品保留值和分离飘忽不定。

7.2.2.6 氨改性剂 在流动相中加入胺改性剂会影响碱性样品的分离，一般使峰形有较大改善（见 7.3.3.2 节）。由于胺对解离的硅羟基有掩蔽作用，随胺改性剂浓度的增加，碱性化合物的保留值往往会降低。这将有利于改变选择性。有研究[23]描述了同时优化%B、pH、甲胺浓度，分离含有 13 种代谢物的药物，胺改性剂影响选择性的应用也取决于解离的硅羟基（见 7.3.2.5 节），而且同

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

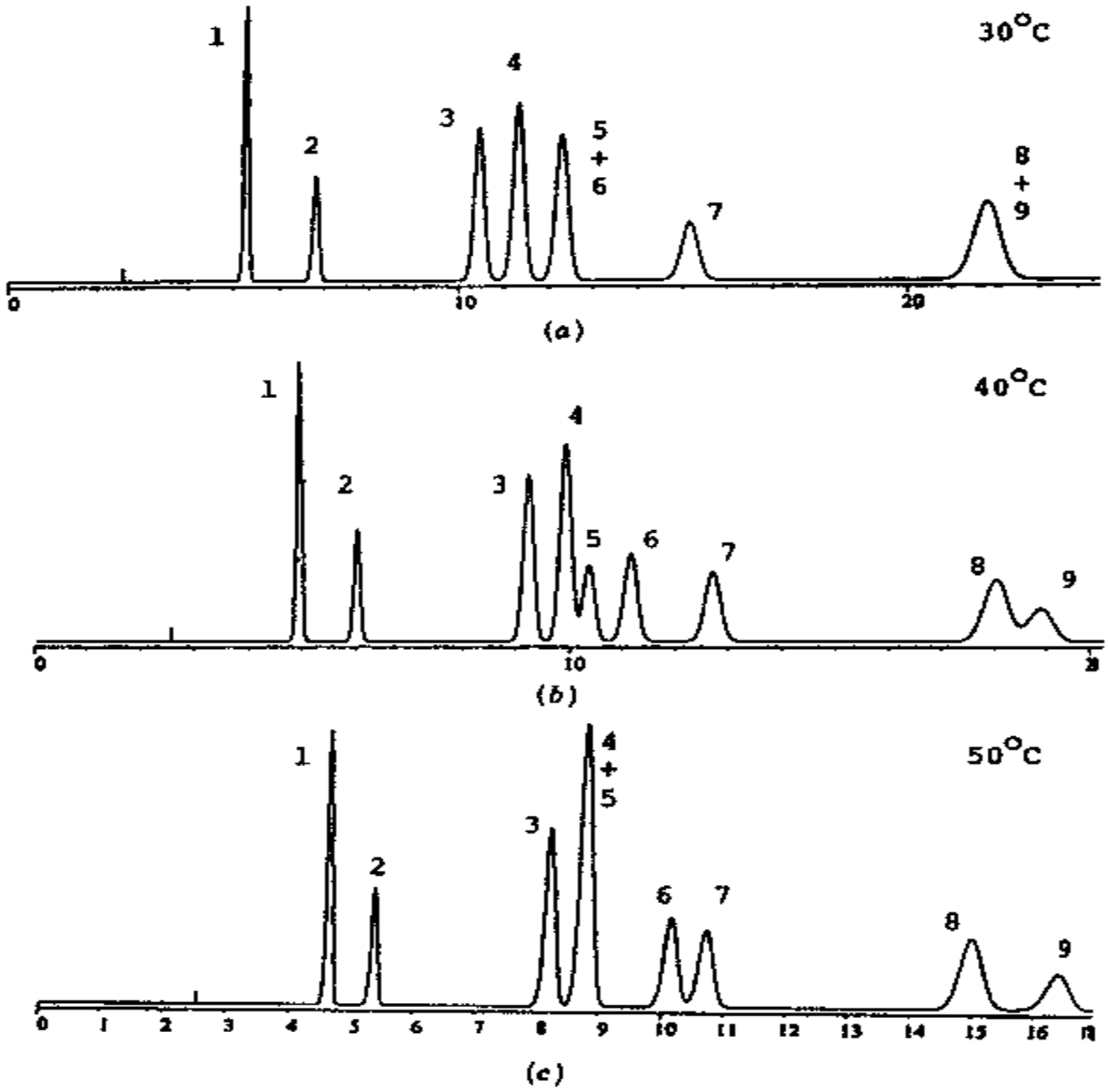


图 7－6　取代苯甲酸的分离与温度的[18]

样品与条件同图 7－4，但 pH 为 3.2。(a)30℃；(b)40℃；(c)50℃。

类型的色谱柱之间也会有不同。因此，改变胺浓度并非控制选择性的首选。再者，如在流动相中加入胺改性剂，其浓度则应足够大，以尽可能大地抑制硅羟基效应。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

7.3.2.7 色谱柱类型 由 6.3.3 节的示例可知，改变色谱柱在型（C_8、苯基、氰基）可使中性样品的谱峰间距发生变化。用不同类型的色谱柱会使离子样品发生相似的选择性改变[24]。在离子样品的方法建立中，改变峰间距有许多其它参数，而且极为方便，所以一般改变柱型只用于那些优化了其它条件后谱峰间距仍不能满意的样品。

碱性样品的分离曾采用"原"硅胶色谱柱和有机－缓冲剂流动相进行[25]。其保留似乎是通过离子交换过程实现，其中包括质子化碱和解离的硅羟基（见式 7.3）。只有在键合相柱的常规 RPC 不能成功时，才推荐使用硅胶色谱柱。

7.3.3 特殊问题

离子样品的 RPC 方法存在诸多问题，这些问题对中性样品不是问题或对于离子样品则相当突出。

7.3.3.1 pH 敏感度 当流动相 pH 接近于一种或多种样品组分的 p*Ka* 值时，pH 值的微小变化（小至 0.1 单位）会对谱峰间距和样品分离度产生较大影响。这种 pH 敏感度由不能精确调节缓冲剂 pH 值造成；许多实验室测定缓冲剂 pH 值的准确度仅达 ±0.05－0.1 单位。因此，在离子样品的方法建立过程中，pH 对最终方法的影响大小应是主要问题。

可以采用几种方式将 pH 的敏感度问题降至最小。首先，测定方法的 pH 敏感度。若流动相 pH 必须控制在较窄范围内（±0.1 单位或更小），可通过准确量取缓冲剂组成（重量或体积），以精密控制 pH 值，而不是用 pH 计将缓冲剂滴定至理想的 pH。其次，如果这种方法不能保证精密调节 pH，采用比目标 pH 值高或低 0.2 单位的流动相进行分离，并将这些色谱图附于方法步骤中。这样，当由于 pH 不对，样品分离不足时，使用者能利用这些分离调节流动相 pH，见图 1－5d 的示例。最后，对于 pH 敏感方法的最好办法是设计或重做该方法，使其能更好地抗干扰。有利于最大分离度的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

那些条件(尤其是 pH 值)往往不利于方法的抗干扰性。对于抗干扰好的方法,分离条件的微小变化有时带来的分离度损失很小。见文献 19,26 和 10.6 节中的讨化。

7.3.3.2 硅羟基的影响 离子样品,尤其碱性样品,能与硅胶基质质色谱柱的硅羟基发生反应(见 5.2.1.1 节)。能导致保留值增加,谱峰拖尾,和柱间重现性差。选择适宜的实验条件以尽可能减小这些硅羟基效应,一般是较理想的。通常,最主要的硅羟基-样品间的相互作用是由离子交换引起的。样品中的质子化碱(BH^+)与钠、钾或其它阳离子发生交换反应,它们连在柱填料中的解离的硅羟基上;例如:

$$BH^+ + SiO^-K^+ \Leftrightarrow K^+ + SiO^-BH^+ \qquad (7.3)$$

据式 7.3,由于色谱柱保留碱性样品化合物的容量可能非常有限(如<1μg),正常的进样量 (>1μg)就会使柱超载,产生拖尾谱峰(见 2.4 节)。为解决这一问题,应选择合适的实验条件,以尽量减小式 7.3 的离子交换过程所引起的样品保留。

选用适于碱性样品的色谱柱可降低硅羟基效应(见表 5-4)。用于这类柱填料的硅胶,制作时通常尽量减少极酸性的硅羟基数目,因硅羟基有利于式 7.3 中的保留过程。所有硅胶基质的色谱柱都含有易受影响的硅羟基,但用低 pH(2.0<pH<3.5)的流动相可降低解离硅羟基的浓度,减少其对样品保留值的影响:

$$\underset{\text{高 pH}}{H^+ + SiO^-K^+} \Leftrightarrow \underset{\text{低 pH}}{K^+ + SiOH} \qquad (7.3a)$$

用高浓度的缓冲剂(>10m*M*),选用被硅羟基牢固保留的缓冲剂阳离子($Na^+<K^+<NH_4^+<$三乙胺$^+<$二甲基辛胺$^+$),可阻止解离的硅羟基对样品的保留,因此能进一步降低硅羟基的影响[27]。浓度 25mM 的磷酸钾对于大多数碱性样品一般足够。钾盐缓冲剂在有机-水流动相中比钠盐缓冲剂的溶解度大,这表明配制缓冲剂的流动相会更方便。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

如用钾缓冲剂时，碱性样品仍拖尾，以三乙胺(TEA)或己胺代替钾缓冲剂可能会解决问题。据报道二甲辛胺(DMOA)更有效，但它作为流动相改性剂会带来其它问题。用 TEA、己胺尤其是 DMOA 时，改变流动相后柱平衡会较缓慢，因此应先试用其它方法后，再使用这些胺改性剂。

少于 1μg 的进样率(对有问题的碱性化合物而言)会进一步减少峰拖尾，而在某种情况下，增加进样量也有该效果。在极端情况下，有必要试用另一不同柱，由于某化合物的拖尾情况可能在不同的碱性 RPC 柱上会有所不同[27a]。另外，如分离对塔板数的要求不高，用聚合物(非硅胶)RPC 柱则可以消除硅羟基的问题(聚合物柱一般比硅胶基质柱的柱效低)。

有人建议分离碱性样品时用较高 pH(如>7)[15]。弱碱(如苯胺、吡啶)在较高 pH 值下可能不解离，所以能消除式 7.3 的保留及其有关问题。一些色谱柱在高 pH 也显示拖尾较小，可能由于硅羟基已充分解离，以至柱容量不再受限制。对于高 pH 分离，也有报道[15]乙腈比甲醇或 THF 的拖尾更大，详见文献 27～32。硅胶基质柱在 pH6 以上时欠稳定，而在 pH 大于 8 时往往无法使用。然而溶胶－凝胶载体制成的密集键合的烷基、端基封尾色谱柱在有机缓冲剂及温度≤40℃条件下，可以日常应用的 pH 至少高达 11[32a,32b](亦见 5.2.3.4 和 5.4.3.5 节)。

最近报道了抑制硅羟基与碱性化合物相互作用的另一种办法[33]。用中等酸度的色谱柱(SpHerisorb C_8)，在流动相加入 0.02－0.05% 的己腈可使几种苯胺衍生物的峰形有很大改善。这种办法对(与硅羟基的作用更强的)脂肪胺是否也有效尚待进一步研究。也有人提出以“动力学改性”硅胶改善碱性样品的 RPC 分离[34,35]。采用原硅胶作柱填料，在流动相中加入 0～220mM 的四级长链烷基三甲铵离子。很明显，这种添加剂以类似于 C_{18} 填料的烷基涂层覆盖于填料的表面上，以封闭硅羟基。重现性和峰形都声称超过了

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

碱性 RPC 柱[34]。

RPC 分离酸性化合物时偶尔会有拖尾或峰过度展宽现象，已经证明，在流动相中加醋酸或醋酸盐有利于解决这类问题。

7.3.3.3 温度敏感度 如图 7－6 所示，对于离子样品的分离，温度的微小改变会对样品分离度产生明显影响。因此，柱恒温对分离离子样品比分离中性样品更重要。若色谱柱在室温下使用，应研究温度变化对分离的影响。应注意预防不加控制的室温波动可能带来的问题。

7.3.4 总结

反相分离离子样品的方法建立方式与非离子样品的近似(见 6.4 节)，但也有一些差异。见图 7－7 的总结。如在一系列研究中的任何一步得到了可接受的分离，下一步工作则可省略，或照第 8 步继续进行实验(改变柱条件)。

第 1 步 以 25mM 磷酸钾缓冲剂(PH2.5)，15×0.46cm 低酸性 C_8 与 C_{18} 柱，流速 2ml/min 与表 1－3 中的其它条件，进行 60min 的初始梯度，5→100% 甲醇。或者，用 60% 甲醇(其它条件相同)进行初始等度分离。因为离子样品往往保留较弱，起始% B 值可以较低(60% B)，而中性样品一般用 80～100% B，(见 6.2.2.1 节)。

第 2 步 由初始梯度谱图决定是否可用等度洗脱(见图 8－6 及有关讨论)。如等度洗脱可行，估计等度分离的最佳% B(见表 8－2)；若等度洗脱不行，照第 2a 步继续进行。

另外，由初始等度分离，估计末峰($k\approx10$ 的% B 值，% B 减少 10%(如由 60%→50% B)，k 值会增加 3 倍("3 倍规则"，见 6.2.1.1 节)。

第 2a 步 若基于初始梯度的运行结果，等度洗脱不合适，或等度运行结果超出样品的保留值范围($0.5<k<20$)，不能满意，则有三种选择：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

· 同时调整 pH 和% B，以得到合适的保留值范围($0.5<k<20$)

· 建立梯度洗脱方法(见第 8 章)

· 采用离子对 HPLC，以得到合适的保留值范围(见 7.4.3.1 节)

改变 pH 或使用离子对能否改善保留范围，能通过色谱图中的第 1 峰和最末峰的 p*Ka* 值(若知道的话)推断出。例如对于 PH = 2.5 的流动相，若第 1 峰是吡啶衍生物，其 $k<0.5$，而末峰为中性，且 $k>20$，提高 pH 至 6 或 7 应导致吡啶衍生物的解离降低并增加其保留值，而不影响末峰的保留值。然后，能再增加% B 将所有峰的保留值调整进 $0.5<k<20$ 之间的范围。见 7.2.1 和 7.4.1 节中的其它讨论，及图 7－8 的示例。

第 3 步　用由初始实验得出的% B 值进行等度分离(若以梯度洗脱进一步进行方法建立，其方法也相似，见第 8 章的讨论)。如必要，调整% B 以使 k 范围达到 0.5～20。如需改善选择性，可进一步改变流动相强度(±5～10% B)，以测定% B 对谱峰间距和分离的影响。通过选择能提供适宜的保留值和良好分离度的% B 值，可得到满意的分离。若未得到可接受的保留值范围，则返回第 2a 步。

第 4～5 步　若由于峰间距较差，在第 3 步未获得足够的分离，(用图 6－4)改为乙腈作溶剂，按需要调整% B 以得到良好的保留值和分离效果。另外，如图 7－4 中的示例改变 pH，以测定分离的最佳 pH。对大多数样品来说，推荐的 pH 改变如图 7－4 所示：2.5、3.5、4.5。如果已知样品的 p*Ka*>5，试验 pH 则应为 4、5、6。pH 改变过程中，可能有必要改变% B 以维持 $0.5<k<20$。同时，应仔细调节% B，以研究进一步控制整体的谱峰间距。

第 5a 步　若酸性样品的 p*Ka*<2 或碱性样品的 p*Ka*>8，可能有必要使用离子对 HPLC(或用对 pH 稳定的聚合物柱)进一步控制谱峰间距(见 7.4 节)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第 6～7 步　通过改变柱类型、温度或(不常用的)缓冲剂浓度,进一步改变峰间距。

第 8 步　峰间距优化完成后,考虑改变柱长、流速或微粒粒度以进一步改善分离效果。见 2.3.3.1 节中的有关讨论。

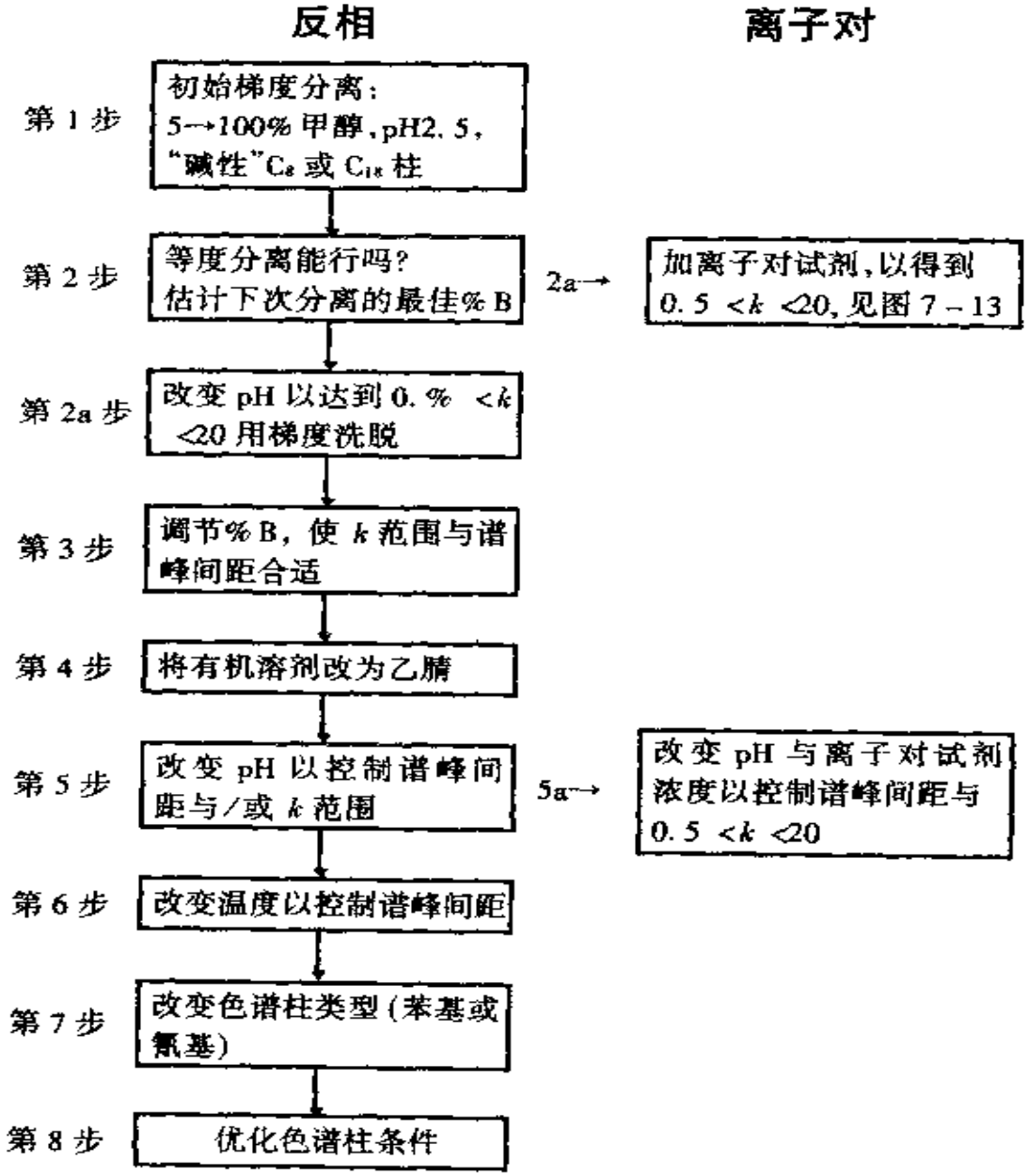


图 7－7　反相分离离子样品的方法建立概略图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

7.4 离子对色谱

离子对和反相 HPLC 共享有多种特征。这两种分离使用的色谱柱和流动相大致相似，主要区别是离子对色谱(IPC)的流动相中加入了离子对试剂。对于含有离子样品的大多数分离，应先试用 7.3 节的 RPC 分离，然后再考虑 IPC。IPC 分离在方法建立和使用方面都更复杂，并且易受其它实验问题的影响(见 7.4.5 节)。若 RPC 方法建立(见图 7－7)由于峰间距较差，不能充分分离，此时应考虑选择 2PC。因此，逻辑上，IPC 是需进一步改善的 RPC 分离的一种补充方法。

某些样品的首份色谱图可能提示等度 RPC 不可代替梯度洗脱，如图 7－8 所示。图 7－8*a* 的初始梯度分离表明用该流动相不可能得到满意的等度分离(见图 8－6 中的讨论)，这一点被图 7－8*b* 的 30% B 的等度分离所证实。图 7－8 中第 1 谱峰在 $k<0.5$ 流出，最末谱峰的 $k>20$。然而，分析早与晚流出的谱峰的酸－碱性质则可找出缩小保留值范围，使等度分度满意的办法。

早流出峰 X～X3 为强碱性，因此在 pH2～8 范围内解离且保留较弱，改变 pH 不会影响它们的分离。晚流出峰 MP 和 PP 为中性(而且疏水)，故其保留值也不受 pH 影响。但是，用阴离子试剂的离子对会选择性地提高这些早流出的阳离子谱峰的保留值，对晚流出的中性谱峰的影响相对较小，使样品的等度分离满意(见图 7－8*c*; 以及下面的讨论)。

7.4.1 保留的基础

样品的 IPC 保留过程见图 7－9 中所示。图 7－9*a* 简单描述了 C_8 或 C_{18} 柱填料的表面，一个被负离子对试剂(如己烷磺酸盐)的吸附分子覆盖的矩形体。离子对试剂因其疏水的烷基被固定相所吸引，于是该试剂所带的电荷($C^6-SO_3^-$)连结于固定相上。固定相上的该负电荷与试剂和/或缓冲剂中的正电荷(Na^+)保持平衡。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

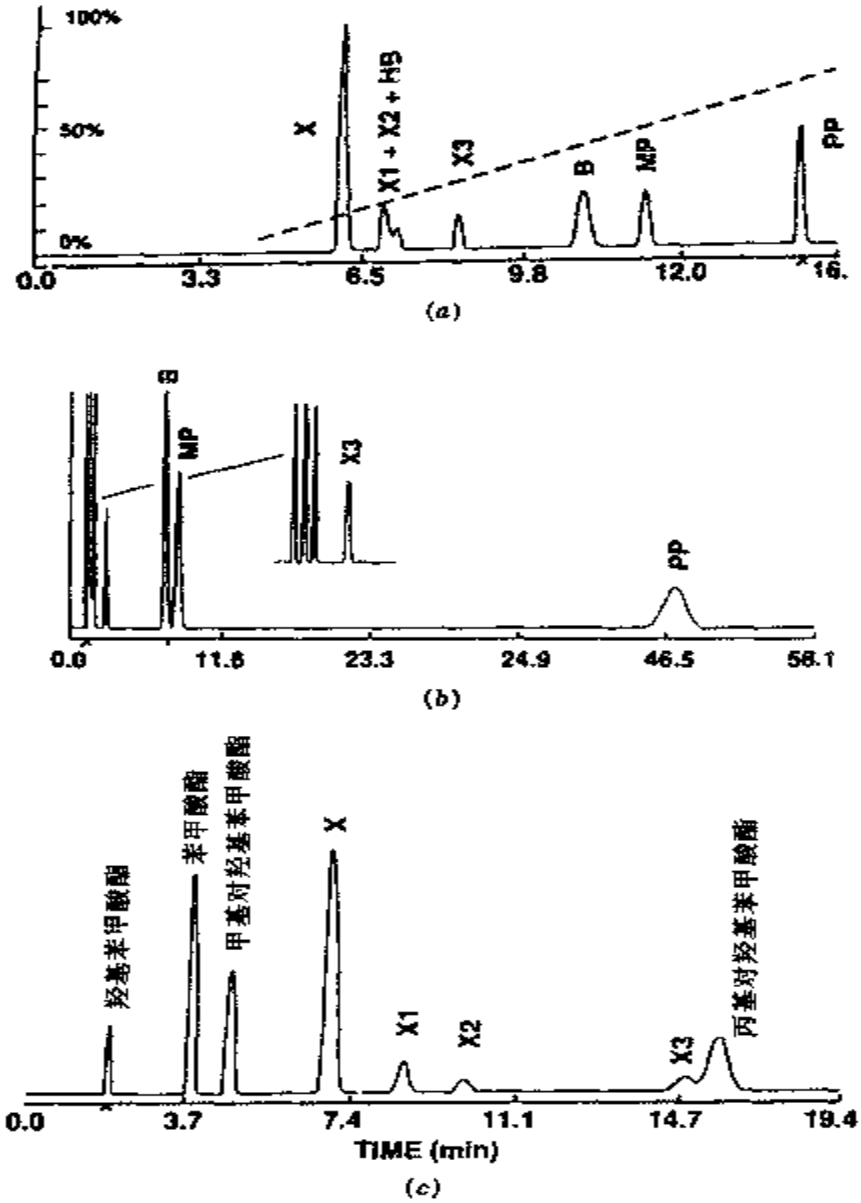


图 7－8　酸、碱、中性专有混合物的分离

样品：X，碱性药物；X1－X3，碱性药物降解物；HB，中性防腐剂 MP 与 PP 的酸性降解物；B，酸性防腐剂。

条件：(*a*) 15×0.46cm Zorbax SB－C_8 柱，20min 梯度，5→100% 甲醇－缓冲剂 (25m*M* 醋酸钾，pH3.5)；1.0ml/min；30℃；(*b*) 同 (a)，但用 30% B 等度分离；(*c*) 同 (*a*)，但用等度离子对分离，40% 甲醇－缓冲剂 (65mM 辛烷磺酸盐)，1.5ml/min。(美国俄勒冈州 McMinnville 液相资源实验室未发表的数据)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

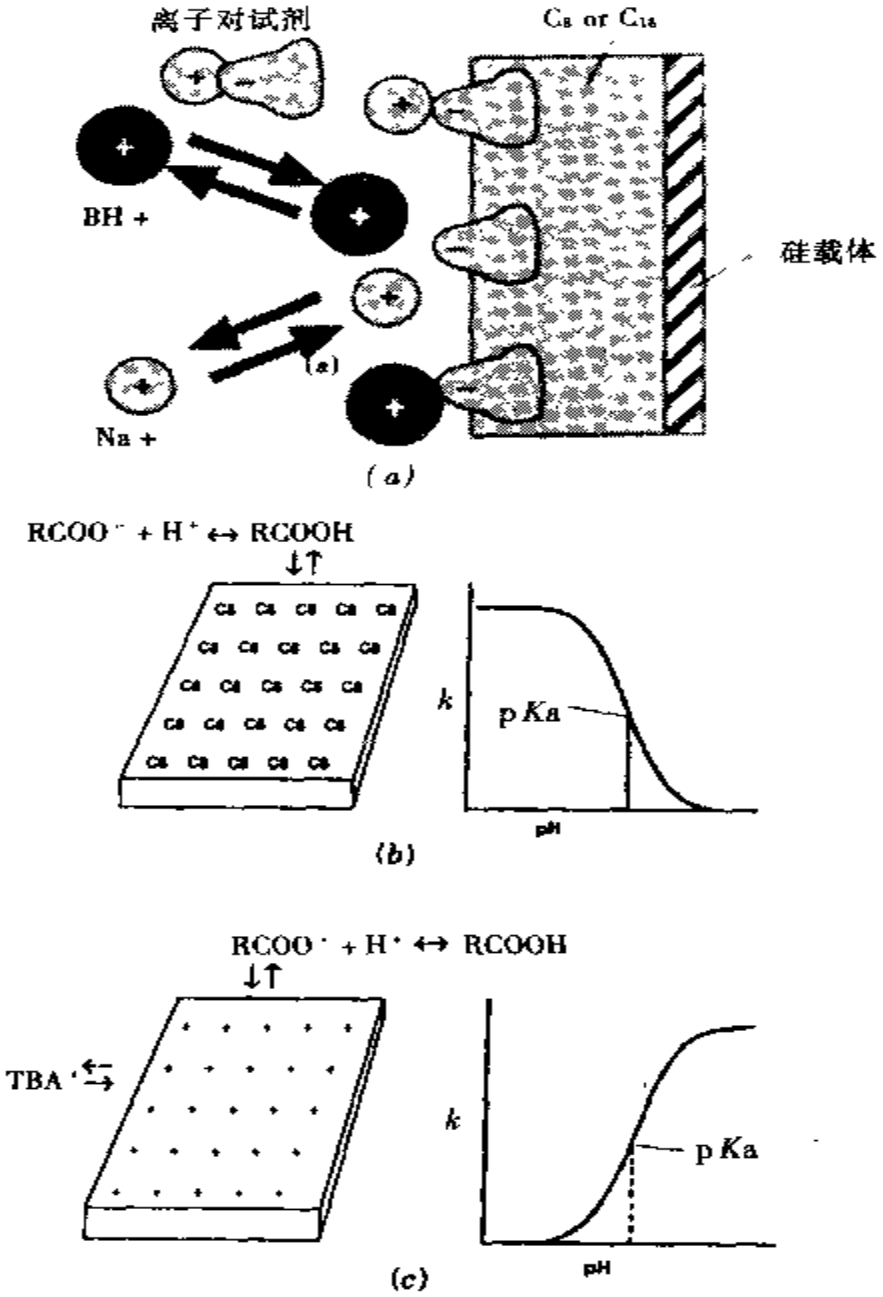


图 7－9　离子对色谱保留示意图

(a) IPC 期间，质子化碱(BH^+)的保留：Na^+为流动相的阳离子，离子对试剂为己烷磺酸钠；(b)羧酸样品 RCOOH 在 C_8 固定相上的反相保留与 pH 的关系；(c) 离子对试剂 (TBA^+) 在固定相上的吸附及羧酸样品 ($RCOO^-$) 的保留值与 pH 值的关系。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

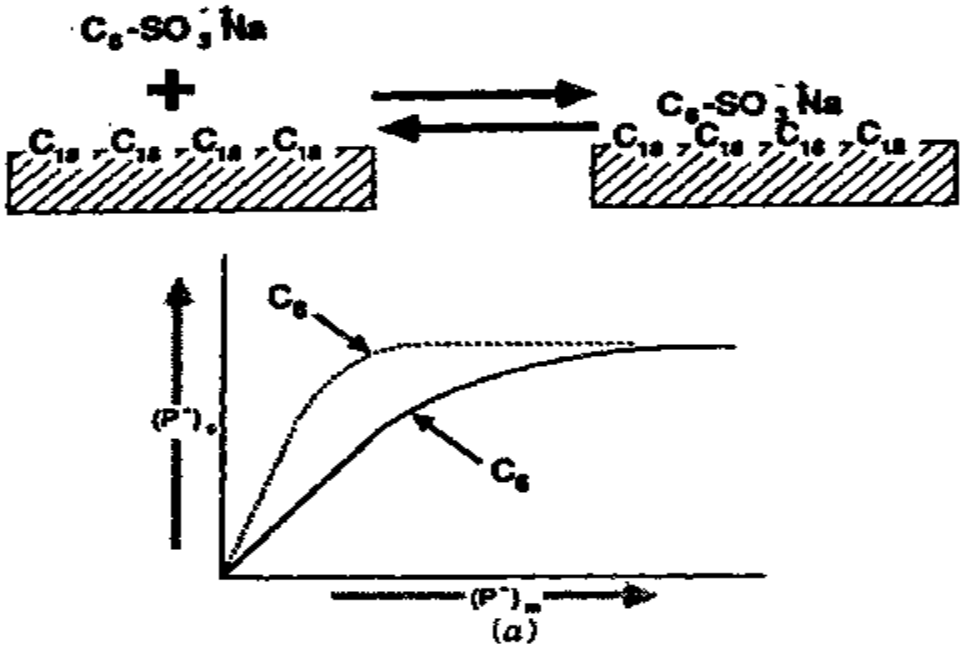
这样，一带正电荷的样品离子（质子化碱，BH^+）可与所示的 Na^+ 离子（箭头所指）进行交换，使样品离子通过离子交换过程得以保留。图 7－9*a* 中进行的离子对 HPLC 与离子交换色谱非常相似，见 7.5 节中所述。

7.4.1.1 pH 和离子对 图 7.9*b* 和 *c* 进一步详述了酸性（阴离子）样品 RCOOH 与带正电的离子对试剂（四丁基铵，TBA^+）在 IPC 中的保留过程。图 7－9*b* 的流动相中未加离子对试剂（简单的 RPC 分离）。在低 pH 时，与解离的酸 $RCOO^-$ 相比，未解离的 RCOOH 分子被牢固保留。所以这种情况下，保留值对 pH 作图则显示图 7－2*a* 的特征图形（注意：图 7－9*b* 的酸性样品与图 7－2*a* 的碱性样品图形相反）。图 7－9*b* 的示例中，最大保留值出现在低 pH，而最小保留值出现在高 pH。在图 7－9*c* 中，流动相中加了足量的离子对试剂 TBA^+，完全覆盖了固定相，于是使中性分子 RCOOH 的保留值降到了最小。但是固定相上产生的正电荷（吸附的 TBA^+）强烈吸附带负电的 $RCOO^-$。在该离子对条件下，样品保留值对 pH 作图时，最大保留值会出现于高 pH（样品完全解离），最小保留值出现在低 pH（无样品发生解离）。

图 7－9*c* 所示的 IPC 性质引起的保留过程与图 7－9*b* 中反相 HPLC 有很大不同。因此，一旦在反相 HPLC 使用的流动相中加入一种适宜的离子对试剂，离子样品的分离选择性将会发生较大变化。

7.4.1.2 离子对试剂的浓度 通过改变被固定相吸收的离子对试剂的多少，有可能将保留过程由反相连续地改变为离子交换色谱。这种变化通过改变流动相中的试剂浓度而实现。首先考虑被 C_{18} 柱吸收的磺酸盐试剂 P^-，图 7－10*a* 所示。对固定相中的试剂浓度 $(P)_s$ 与流动相中的试剂浓度 $(P^-)_m$ 作图，离子对试剂分别为 C_6－磺酸盐和 C_8－磺酸盐。当流动相中离子对试剂浓度增加时，柱吸附量也增加，但后来当柱对离子对试剂达到饱和时，吸附

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn



样品离子的保留

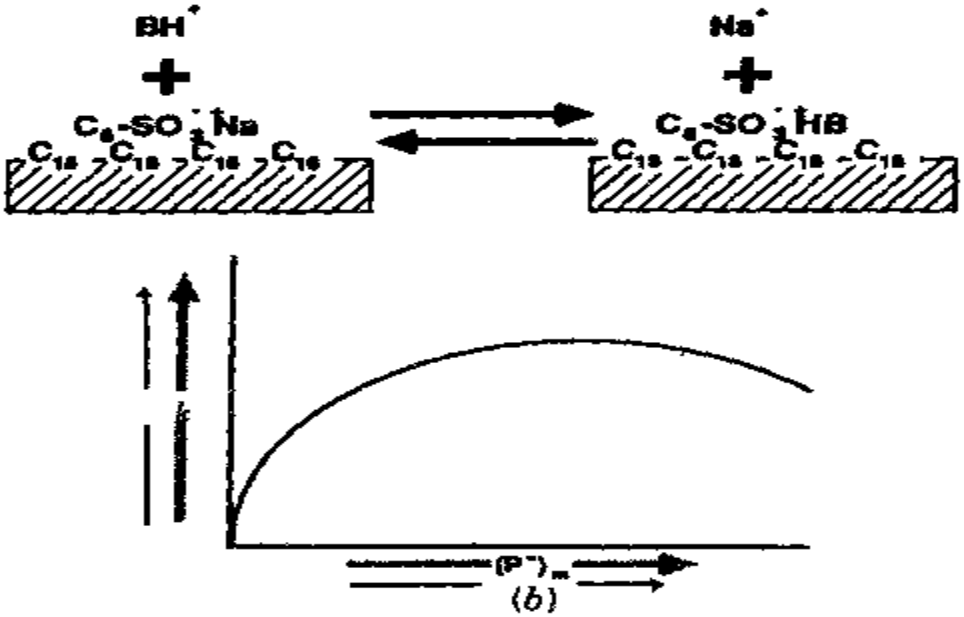


图 7－10　离子对试剂浓度对分离的影响

(a)离子对试剂的吸附与不同疏水性试剂(C_6－、C_8－磺酸盐)浓度的关系；

(b)保留值与试剂浓度的关系。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

量呈稳定水平。由于 C_8 磺酸盐疏水性较强，故保留也较牢固，在流动相中离子对试剂浓度较低时，色谱柱即达到饱和。因此，强疏水的 C_8 – 试剂使色谱柱达到一定的吸附容量(如 50% 饱和量)时，其浓度低于疏水弱的 C_6 – 试剂。样品保留主要由柱上离子对试剂的吸附量与所产生的电荷决定。因此，当调节流动相中的试剂浓度，以使色谱柱摩尔吸附量相同，该两种试剂(C_6 与 C_8)的分离效要将会相似(亦见图 7 – 12*c* 与有关讨论)，详细讨论见文献 *36*。

再考虑磺酸盐离子对试剂浓度增加时，样品保留值的改变(见图 7 – 10*b*)。对于亲水的离子样品化合物 BH +，发生保留主要由图 7 – 9*a* 或图 7 – 10*b* 的离子交换过程决定。于是，当 $[P]_m$ 增加，色谱柱上的电荷增加，化合物 BH^+ 的 *k* 值也增加。一旦柱对离子对试剂达到饱和(最大柱荷载)，样品的保留趋于平衡。因为 IPC 保留包括离子交换过程，进一步增加离子对试剂浓度也增加反离子(Na^+)的浓度，它们与样品离子竞争在柱上的保留。因此，随着离子对试剂浓度的进一步增加，保留值通过极大值后开始下降。在 IPC 方法建立中，试剂浓度通常由零改变至某一值，以使荷电相反的样品离子保留最大。这种方法可提供较大范围的分离选择性，避免离子对试剂浓度过高，降低费用，增加获得良好分离的机会。

当同时改变 pH 和离子对试剂浓度时，能很好地控制保留值范围和峰间距，这是样品通过反相和离子交换(或离子时)过程两者同时保留的结果。当色谱柱吸收的离子对试剂量增大，离子交换保留机制为主，而反相保留机制为次要。该效果见图 7 – 11 所示的胆酸混合物的分离[log *k* 对 pH 的曲线图；注意图 y 轴的开始单位分别为(*a*) – 0.5、(*b*) – 0.2]。图 7 – 11*a* 表明不加离子对试剂时，样品反相保留值与 pH 值的关系。所有组分的最大保留值发生于低 pH，而高 pH 时的保留值与 pH 值的关系。所有组分的最大保留值发生于低 pH，而高 pH 时的保留值最小。一旦在流动相

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

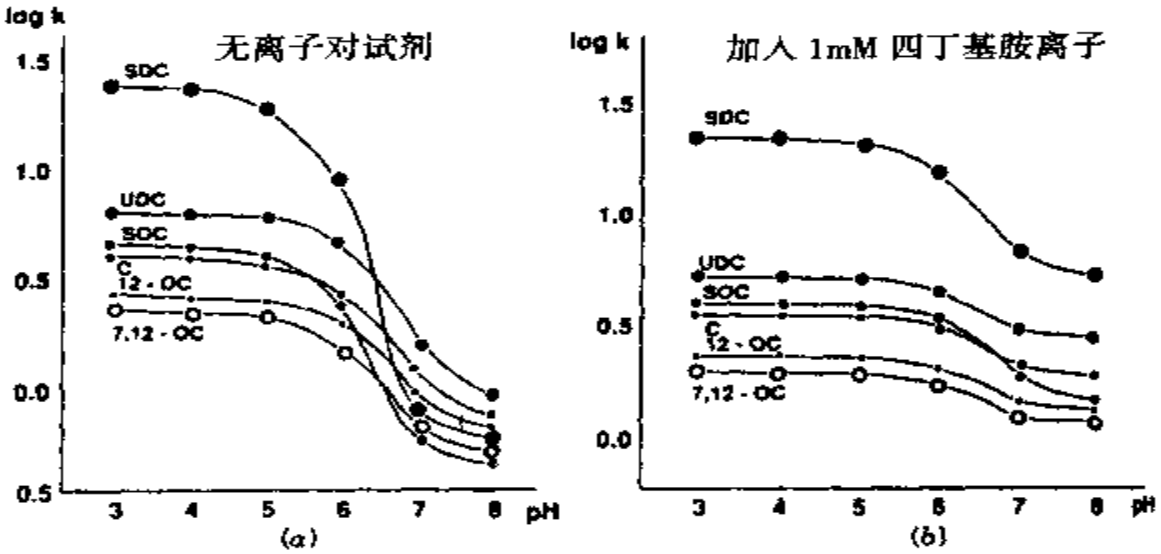


图 7－11 流动相 pH 和离子对试剂浓度对不同胆酸保留的影响[37]
条件：C_{18} 色谱柱；45% 乙腈－缓冲剂（磷酸盐）；室温。
(a)无离子对试剂；(b)加入 1mM 四丁基铵（TBA）离子。

中加入了 1m*M* 四丁基铵离子（TBA^+），色谱柱对试剂有较小的吸收（饱和量的 5～10%）。该吸收使高 pH 值时的样品保留值增加了大约 5 倍。而在低 pH 值处，由于吸收的离子对试剂部分阻塞了固定相，保留值却有所降低。通常，用浓度非常高的离子对试剂（TBA^+）制造较大的离子对效应（见图 7－13*c* 中的讨论，对图 7－11）以 45% 以 45% 乙腈－缓冲剂为流动相的示例，推荐浓度约为 100m*M*）。样品的较大的 *k* 值发生于高 pH 值，并非低 pH（如图 7－9*c*）。

7.4.1.3 离子对试剂的类型 图 7－12 以带正电的碱（Adr^+）、带负电的酸（NpS^-）和中性化合物（BzOH）的分离，进一步说明了随着离子对试剂浓度的改变，样品保留值的情况。未加离子对的分离结果见图 7－12*a*。质子化碱（Adr^+）不保留（$k=0$），其它两化合物（BzOH 和 NPS^-）的保留足够（$k\approx5$）。图 7－12*b* 因为在流动相中加了 14mM 辛烷硫酸盐作为离子对试剂（柱吸收量为

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

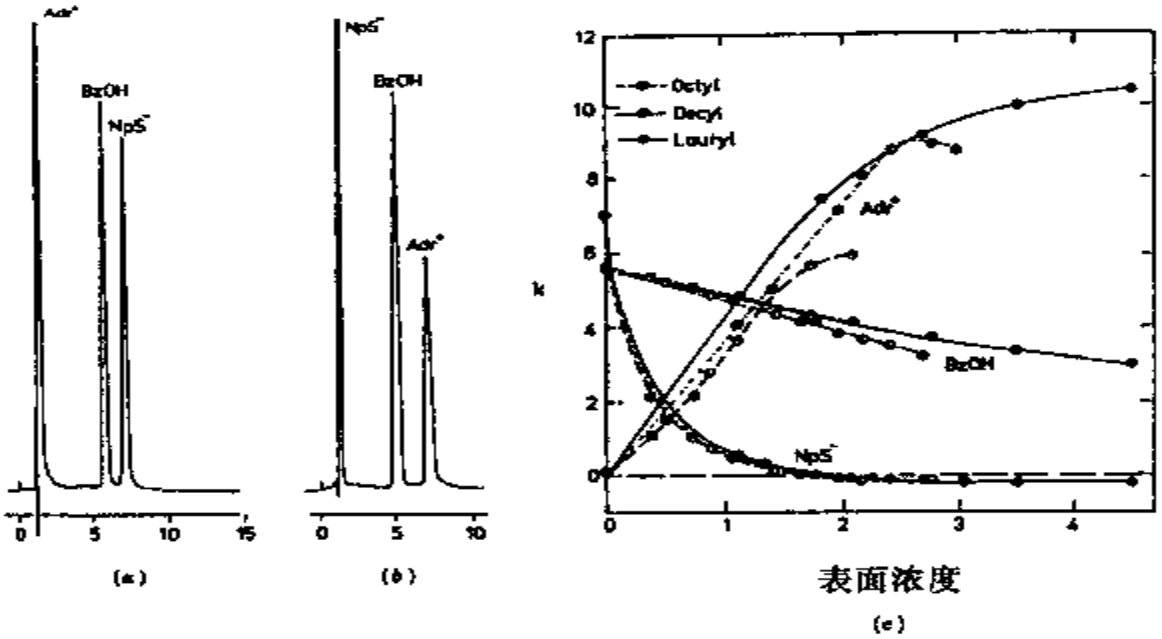


图 7－12　离子对试剂浓度和类型对离子样品分离的影响[38]

样品：Adr^+肾上腺素，BzOH 苯乙醇，NpS^-为萘磺酸；

条件：C_{18} 柱；20% 甲醇－缓冲剂(20mM 磷酸盐，pH6)；25℃。

(*a*)未加离子对试剂；(*b*)14mM 辛烷磺酸盐[(*c*)中的 1.6μmol/m²]；(*c*)溶质保留值对色谱柱试剂吸附量(μmol/m²)的关系图

1.6μmol/m²)，分离发生了变化。中性化合物 BzOH 的保留值略有变化，而另两种离子样品在色谱图上交换了位置。图 7－12*b* 中 Adr^+保留值的大幅增加是由于色谱柱上负电荷(吸附负电试剂的结果)的吸引所致。而 NpS^-保留值的剧烈减小是由于受固定相上同种负电荷排斥作用的结果。

图 7－12*c* 所示说明受所加试剂影响的分离仅仅取决于色谱柱的有效荷载量。以该三种化合物的各自的保留数据对三种不同的离子对试剂：C_8－、C_{10}－、C_{12}－硫酸盐被色谱柱吸收的 μmol 量作图。一定浓度种类不同的吸收试剂 μmol/每柱)，使各化合物本身的保留时间大致相等(即分离结果相同)。这说明用不同的离子对试剂可获得完全一致的分离效果。为了获得与使用 C_{10} 试剂同

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

样的分离效果，需要更大浓度的 C_8 试剂流动相，或更低浓度的 C_{12} 试剂流动相。亦见文献 39 的图 -2，及文献 40 中的进一步的讨论。有时，两种离子对试剂的疏水性差别很大，以至无适宜浓度的低疏水性试剂能提供与高疏水试剂相同的柱吸收量与色谱柱填料荷载。例如[41]常用于肽和蛋白质分离的三氟醋酸(TFA)和七氟丁酸(HFBA)(见 11.2 节)。TFA 的吸收明显少于 HFBA，当 HFBA 的流动相浓度>10m*M* 时，任何浓度的 TFA 都无法达到与 HFBA 类似的分离效果。关于离子对的保留理论，详见文献 38、42～44。

7.4.2 初始实验

对于离子样品，IPC 的初始实验条件一般与反相分离相同(见图 7-7)。也就是说，开始时不用离子对试剂。当已确定 IPC 合适后，则在流动相中加入合适的离子对试剂。其它条件保持不变，所以问题是：选用何种离子对试剂与用多大的浓度？

目前应用的大多数离子对试剂为烷基磺酸盐或四烷基铵盐，二者都可以在 210nm 波长以上进行 UV 检测。烷基硫酸盐和高氯酸盐(ClO_4^-)有时用于分离碱性化合物，但通常这些 IPC 试剂并无特殊优点。磺酸盐通常用于碱性样品，以增加质子化碱和其它阳离子的保留值。四烷基铵盐用于酸性样品，以增加解离的酸和其它阴离子的保留值。酸、碱和/或中性混合物的试剂类型(阴离子或阳离子)的选择将取决于初始色谱图，如图 7-8 中所示。

混合荷电相反的离子对试剂(如磺酸盐加季胺盐化合物)，其结果通常适得其反，因为两试剂会发生结合，因此易于抵消它们各自对样品的保留效果。据报道[45]可以十六烷基三甲铵(CTMA)和十二烷基磺酸盐(DS)的联合使用分离碱性样品，其中 CTMA 的主要作用是降低固定相硅羟基的影响。该项研究也报道用该两种 IPC 试剂可进一步控制保留值和选择性。

7.4.1.3 节的讨论表明如果改变离子对试剂浓度，以获得相同的固定相荷载[如 C_6-与 C_{10}-磺酸盐(如图 7-12c)或四乙基

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

与四丁基铵盐]，则采用不同链长的离子对试剂也能获得相似的分离效果。特殊离子对试剂的选择(强疏水或弱疏水)依赖于流动相强度(%B)，如文献46中的讨论。图7－13为一概括总结。图7－13*a*为色谱柱的试剂吸收量与辛烷磺酸盐的流动相浓度的关系图。不同的曲线(0，10，25，40)代表流动相中不同百分比的甲醇浓度。如所预期，%B值越高，溶剂的吸收量(保留量)越小(恰似样品化合物的保留值)。

选择特殊的离子对试剂的目的是在适宜的试剂浓度下，能有显著的柱试剂吸收量。这种方法通过改变试剂浓度，可发掘较大范围的离子对选择性。图7－13*a*的曲线(在约300μmol/g)的色谱柱最大试剂吸收量时，趋于平衡，这可通过在0%甲醇时采用大约40mM的试剂浓度来实现。若流动相是40%的甲醇，需要的该试剂浓度则高得多(≫40mM)，以获得最大的色谱柱吸收量。因此，辛烷磺酸盐对于含40%以上甲醇的流动相不甚合适。该情况下，应用保留更强的离子对试剂(如C_{10}－或C_{12}－磺酸盐等)可能更好。

图7－13*b*总结了较好的磺酸盐试剂及其浓度，它们能为含不同甲醇浓度的流动相提供有效的离子对(有效的试剂吸附量)。例如：若流动相为25%甲醇－水，最好选用C_8－与C_{16}－磺酸盐，初始浓度分别为大约30或10mM。该初始浓度(约能提供1/3的最大色谱柱试剂吸收量)可以在不同条件时上下调整，以改变试剂吸收量和离子对的范围，进而改变峰间距。

若以乙腈或THF代替甲醇，可用表7－3估计所推荐的试剂类型及浓度。例如，以25%乙腈作流动相，相当的甲醇百分比为50%。那么，图7－13*b*显示C_{10}－或C_{12}－磺酸盐的初始浓度分别为25mM或5mM。图7－13*c*提供的类似指南为应用四烷基季铵试剂分离酸类的情况。

7.4.3控制保留值范围和选择性：改变%B、pH和离子对试剂浓度

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

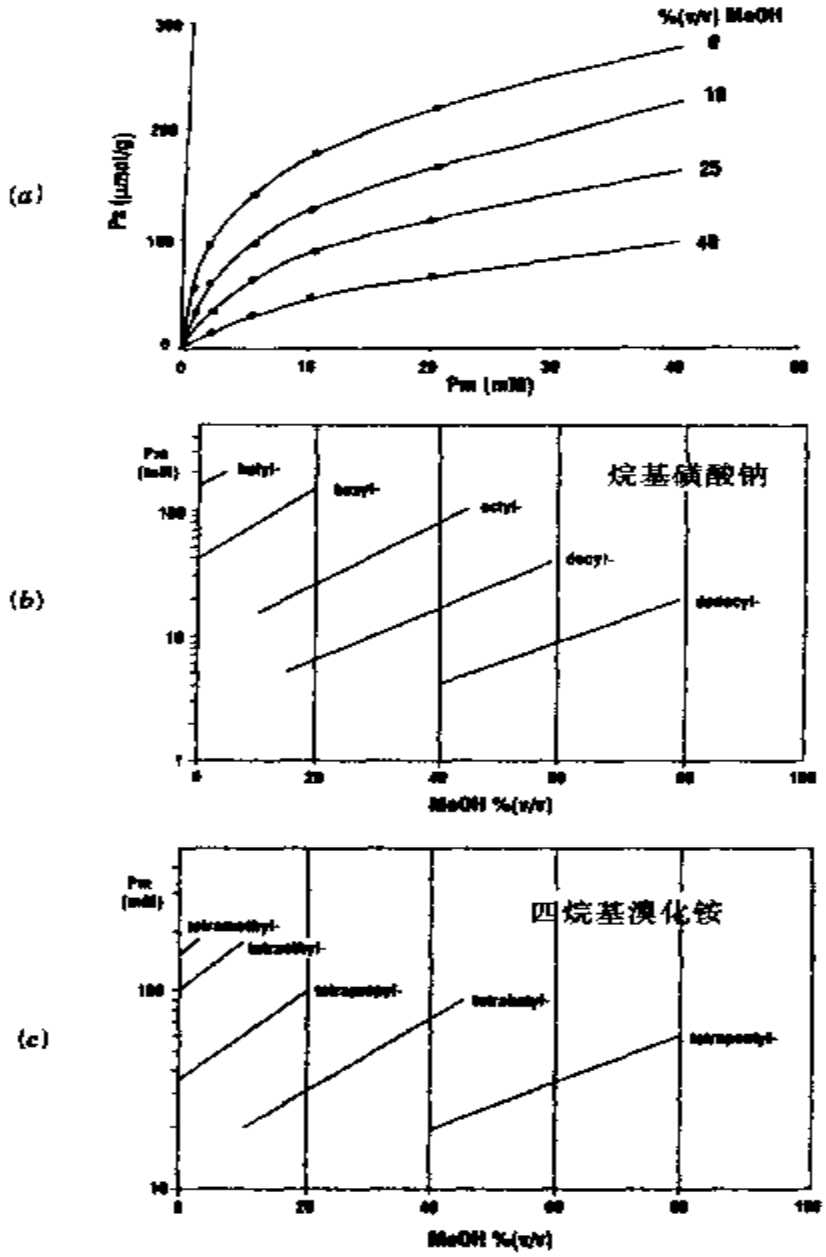


图 7－13　离子对类型和浓度的选择与样品类型和流动相强度(%B)的关系[46]

条件：流动相为甲醇－缓冲剂，C_{18} 柱。(*a*)C_8－磺酸盐吸收量与不同%B值的试剂浓度的关系；(*b*)为不同%B值(碱性样品)推荐的烷基磺酸盐类型和浓度；(*c*)对不同%B(酸性样品)推荐的四烷基铵离子和浓度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 7－3　用阴离子对试剂(如烷基磺酸盐)[a] 的 HPLC 中的溶剂强度关系(百分比)[40]

甲醇	乙腈	THF
0	0	0
10	3	1
20	8	4
30	13	8
40	19	14
50	25	21
60	32	30
70	39	(40)[b]
80	(46)	(51)
90	(53)	(64)
100	(60)	(78)

[a] 例如，若 20% 甲醇可获得较好的保留值范围($0.5 < k < 20$)，则 8% 乙腈或 4% THF 应具有相近的运行时间。

[b] 近似值

7.4.3.1 保留值范围　RPC 方法建立期间，分离中性样品时控制保留值范围比较容易。首先改变流动相组成(% B)以获得$0.5 < k < 20$。若改变溶剂类型，可用图6－4来估计相同保留范围所需要的% B 变化。因此不难寻找和保持能获得良好保留范围的% B 值。

分离离子样品的情况略有不同。在通过改变 pH、离子对试剂浓度等试图改变选择性时，可能会使保留值和保留值范围发生过大的变化。使得 IPC 的方法建立略复杂于 RPC。但另一方面，也可以对这种保留值的过度变化加以利用。例如，对于起初似乎需要梯度洗脱的离子样品，用离子对条件都可以进行等度分离，$0.5 < k < 20$。而且，在 IPC 中若已知样品谱峰的酸－碱性(pKa 值)，就可以准确地预测不同条件对这些组分的相对保留值的影响。这一示例见图 7－8 的分离。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

在图 7－8a 的梯度分离和图 7－8b 的等度分离中，四种化合物 X～X2 与 HB 的保留较弱，而 MP 与 PP 的保留很强。该种流动相的等度洗脱不可能达到 $0.5<k<20$。不过，化合物 X～X2 均为强碱（$pKa\approx10$，见表 7－2），所以这些化合物在所有合适的 pH 值下都带正电荷，而化合物 MP 与 PP 为中性。这意味着加入磺酸盐离子对试剂，将有选择地增加谱峰 X～X2 的保留值，并适度地减少谱峰 MP、PP、的保留值（如图 7－12*c*），因而缩小了保留值范围，能进行等度分离。加入离子对试剂的等度分离见图 7－8*c* 所示，该样品的保留值范围得以改善：$0.8<k<15$。

其它样品也可以图 7－8 示例的类似方式，通过改变 pH 或离子对调整其保留值和保留值范围。应记住磺酸盐试剂可剧烈增加带正电荷组分的保留值，并剧烈降低带负电荷组分的保留值（四烷基铵试剂则相反）。任何离子对试剂都可能降低中性样品的保留值，但幅度不大。同样，增加 pH 值会使酸的解离增加，使碱的解离降低。这样，当改变流动相 pH 值和/或离子对试剂的类型与浓度时，可以根据各化合物的 pKa 值预测出保留值的变化。进一步的讨论与示例见文献 16。

前述的方法（当改变 pH 与 IPC 试剂浓度时，预测样品保留值的变化）需要知道色谱图中每种组分的酸碱性质（pKa 值），以及峰的轨迹，如 10.7 节中所讨论。或者，当开始不知道样品的 pKa 值时，改变 pH 进行实验（如图 7－1 或 7－4），以估计每个谱峰的酸－碱行为。一旦通过这种方法赋予给每个峰近似的 pKa 值后，则可按上述方法进行保留值和保留范围的预测性调整（通过改变 pH 或试剂浓度）。

7.4.3.2 选择性 可采用图 7－14 所示的另一种方法优化 pH 和离子对试剂浓度[43]。以低 pH(B)、高 pH(C)的缓冲剂以及稍加缓冲的中等 pH 的缓冲剂另加离子对试剂(D)与有机溶剂（甲醇，A）以系统方式混合，以使 pH 和离子对试剂浓度在较宽范围内

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

进行变化。该实验设计在概念上类似于先前讨论的反相 HPLC 中的溶剂类型选择性的优化(见图 6－15)。通过调节流动相 1～3 中的甲醇百分比,可使有关样品的运行时间大致相等。

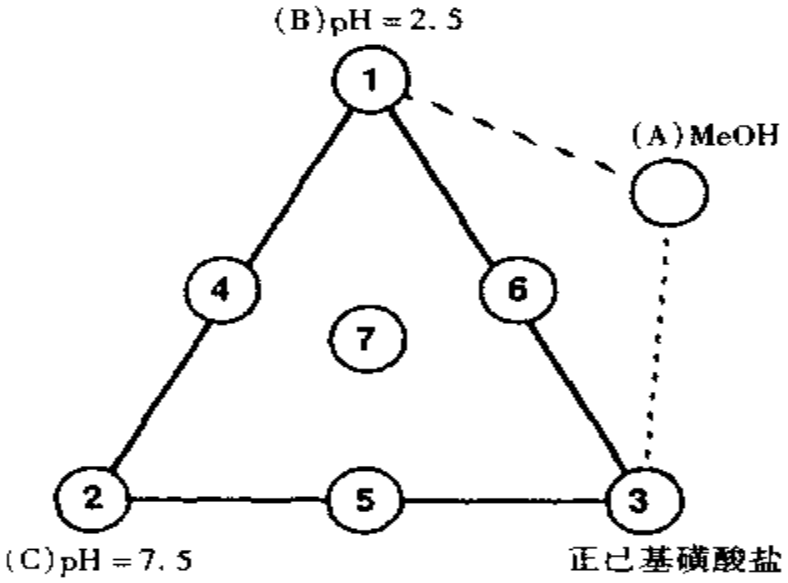


图 7－14 离子对 HPLC 中快速优化保留值范围和选择性的实验设计[43]
流动相 pH 和离子对试剂浓度同时改变

图 7－14 中的首次实验(低 pH, 1 号),需调整% B(甲醇),以提供良好的保留值范围($0.5<k<20$),或使最末峰的保留值 $k=10\sim20$。一旦达到了分离,用类似的办法实验第二次高 pH, 2 号与第三次离子对,3 号。有时,这三种实验仅需要很小的% B 改变即可保持恒定的保留时间,但有时也可能有必要改变 10～20% B。

下一步是混合三种初始流动相(1～3),以配制流动相 4～7(见图 6－15 的类似讨论)。用相同摩尔浓度的枸橼酸盐缓冲剂作 1 号与 2 号缓冲剂,完成该方法很方便,由于 1 和 2 缓冲剂按其各自溶液的比例混合时,pH 值呈线性变化。于是,流动相 4 的 pH 值为 1 和 2 的中间值(当选好接近于最佳的 pH 值后,可由磷酸盐或醋酸盐代替枸橼酸盐,以利于低 UV 检测)。当完成了所有 7 次运

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

行后，以图 7－14 的格式列出所得色谱图：见图 7－15 的示例。所得流动相的性质总结如表 7－4，实验条件的进一步调整如图 6－16。该 IPC 实验方法见图 7－15 混合五种化合物的示例所示，包括一种或多种酸、碱与中性物质。

表 7－4　运行条件

运行	pH	离子对(%)[a]
1	低(2.5)	0
2	高(7.5)	0
3	中(5.0)	100
4	中(5.0)	0
5	高(7.5)	50
6	低(2.5)	50
7	中(5.0)	33

[a]　%离子对试剂(见运行 3)

图 7－15 的分离对快速找出 pH 与离子对试剂浓度的最佳结合很有效。首先应考虑具有良好的保留值范围的分离：$0.5 < k < 20$。实验 1～5 均有一极为接近于 t_0 流出的谱峰($k \approx 0$)，而实验 6 和 7 均表明其第一峰的 $k > 1$(保留值可接受)。在图 7－15 的所有 7 次实验中，末峰的 k 值均约为 5。由这些初始实验运行(见图 7－15) 可以断定 pH2.5～5，离子对试剂 33～50% (67～100m M 己烷磺酸盐)可以有效地保持一个适宜的保留值范围。

然而，由于谱峰间距不好，实验 6 和 7 中的分离度 (见图 7－15) 很勉强。两次实验中关键峰对不同，所以采用中间的 pH 值有望改善分离。另外，实验 4 的分离度良好，表明可保持 pH 在 5.0，混合流动相 4 和 7 以改善离子对试剂浓度，对改善第一峰的保留值可能有利。两流动相 50/50 混合的分离结果见图 7－16(实验 4/7)所示。实验 4/7 的保留值范围可以接受($1 < k < 7$)，而且分离离几乎足够($R_s = 1.3$)。实验 7 和 4/7 的比较表明，不同比例地混

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

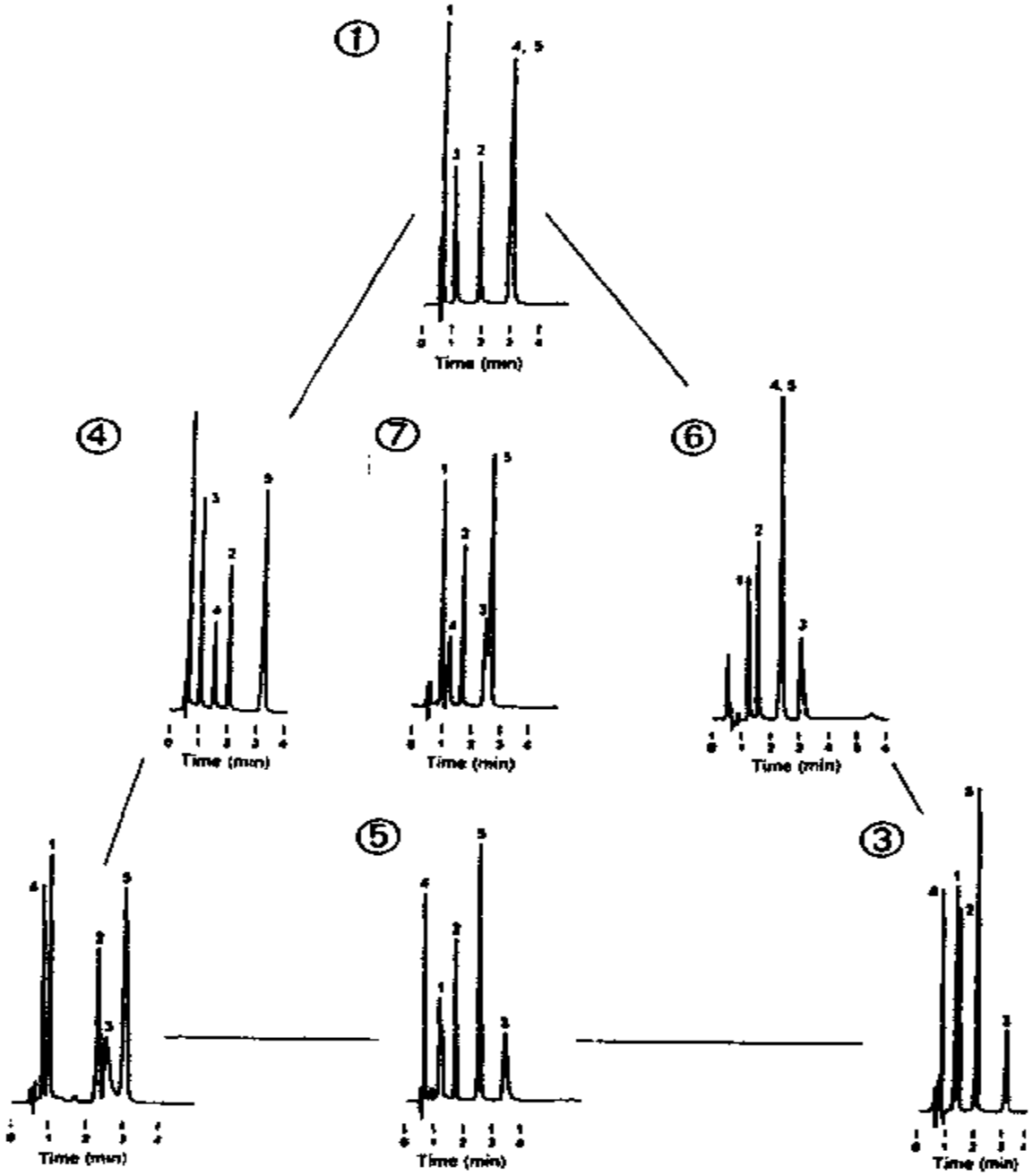


图 7－15　图 7－14 系统优化图示的应用，一种镇咳－抗感冒制剂的分离[43]

样品为混合的五种化合物：1. 去氧肾上腺素，2. 愈创木酚甘油醚，3. 伪麻黄碱，4. 苯甲酸钠，5. 对羟苯甲酸甲酯（尼泊金甲酯）。条件：15×0.46cm Zorbax C_8 柱，流动相如下：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

溶　　剂	1	2	3	4	5	6	7
A:甲醇	30	27	34	29	30	32	30
B:pH2.5 缓冲液	70	0	0	35	0	35	23
C:pH7.5 缓冲液	0	73	0	36	36	0	24
D:200mM 己烷磺酸盐	0	0	66	0	33	33	22

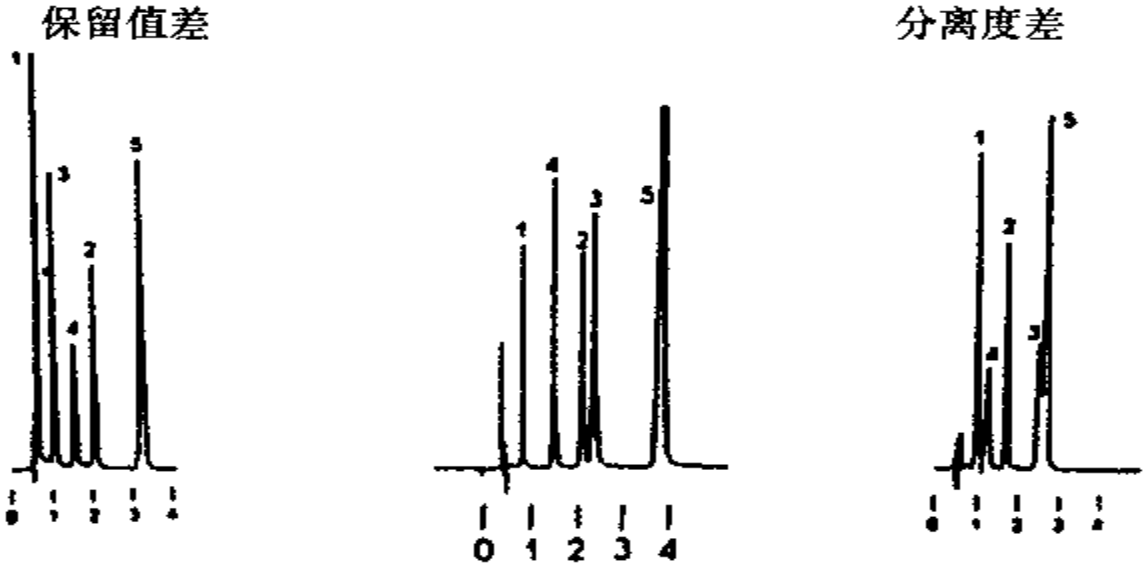


图 7－16　图 7－15 中镇咳－抗感冒制剂的方法建立的继续[43]
实验 4 与 7 的重复色谱图;混合实验 4 与 7 的流动相,制备新流动相的色谱图。

合这两种流动相,能使峰 3 位于峰 2 和峰 5 的中间,得到极好的最终分离效果。

据报道[47]另有一种同时优化 pH 和离子对试剂浓度的实验步骤。它更适于定量预测分离与这两种条件的关系。用四水平两因子解析设计,需改变 pH 和离子对试剂的浓度的 16 次实验。类似的方案也有其它报道[17],需要的实验工作更多,应用于对付那些极具挑战力的样品。

7.4.4 选择性的其它变化

7.4.4.1 溶剂的强度(%B)　如上文讨论,一并改变 pH 和离

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

子对试剂浓度，可很好地控制保留值范围与峰间距。控制保留值范围也可能需要同时改变%B，进一步小量改变%B（仍保持 $0.5<k<20$）往往对 IPC 峰间距产生有用的改变[48-50]，如图 7－17 所示。该分离的关键峰对是 X3/对羟基苯甲酸丙酯（最末两峰）。甲醇百分含量的增加导致所有四种质子化碱（X～X3）的相对保留下降，以及最末两峰分离度的有效增大。最终，以 50% 的甲醇浓度，峰 X 与对羟基苯甲酸甲酯峰发生重叠（产生一新的关键峰对）。45% 甲醇的流动相获得该示例的最佳分离。

图 7－17 的结果可归纳如下。当 IPC 分离离子和中性化合物时，%B 的增加会减少离子对试剂在固定相上的吸附（如图 7－13*a*）。这会导致选择性地减少与离子对试剂荷电相反的离子化合物的保留值。反过来又选择性地减少了这些离子化合物的相对保留值，如图 7－17。

7.4.4.2 温度 当两个或多个不同机制影响样品保留时，可试用温度改变选择性。在离子对 HPLC 中，通常包括下面数种平衡过程：样品保留通过离子交换和/或反相过程；缓冲剂和样品的解离；离子对的吸附。因此，IPC 中改变温度确实会显著地改变峰间距。文献报道了许多 IPC 中 α 随温度发生较大改变的示例[51,52]。必须注意：如使离子对 HPLC 的分离重现性好，对柱恒温是非常重要的。

7.4.4.3 缓冲剂的浓度 缓冲剂（或盐）浓度的增加会降低那些形成离子对的样品化合物的保留值。其原因是这些化合物在分离条件下发生离子交换（见图 7－9*a* 和 7－10*b*）。这样，增加离子对 HPLC 中缓冲剂（或盐）的浓度与郭对试剂浓度的降低起着非常相似的作用。由缓冲剂浓度改变引起的选择性影响可通过改变离子对试剂浓度来模拟。因此，很少以缓冲剂浓度作为离子对 HPLC 中控制溶剂选择性的办法。

7.4.4.4 溶剂的类型 改变 IPC 中溶剂的类型（甲酸、乙腈、

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

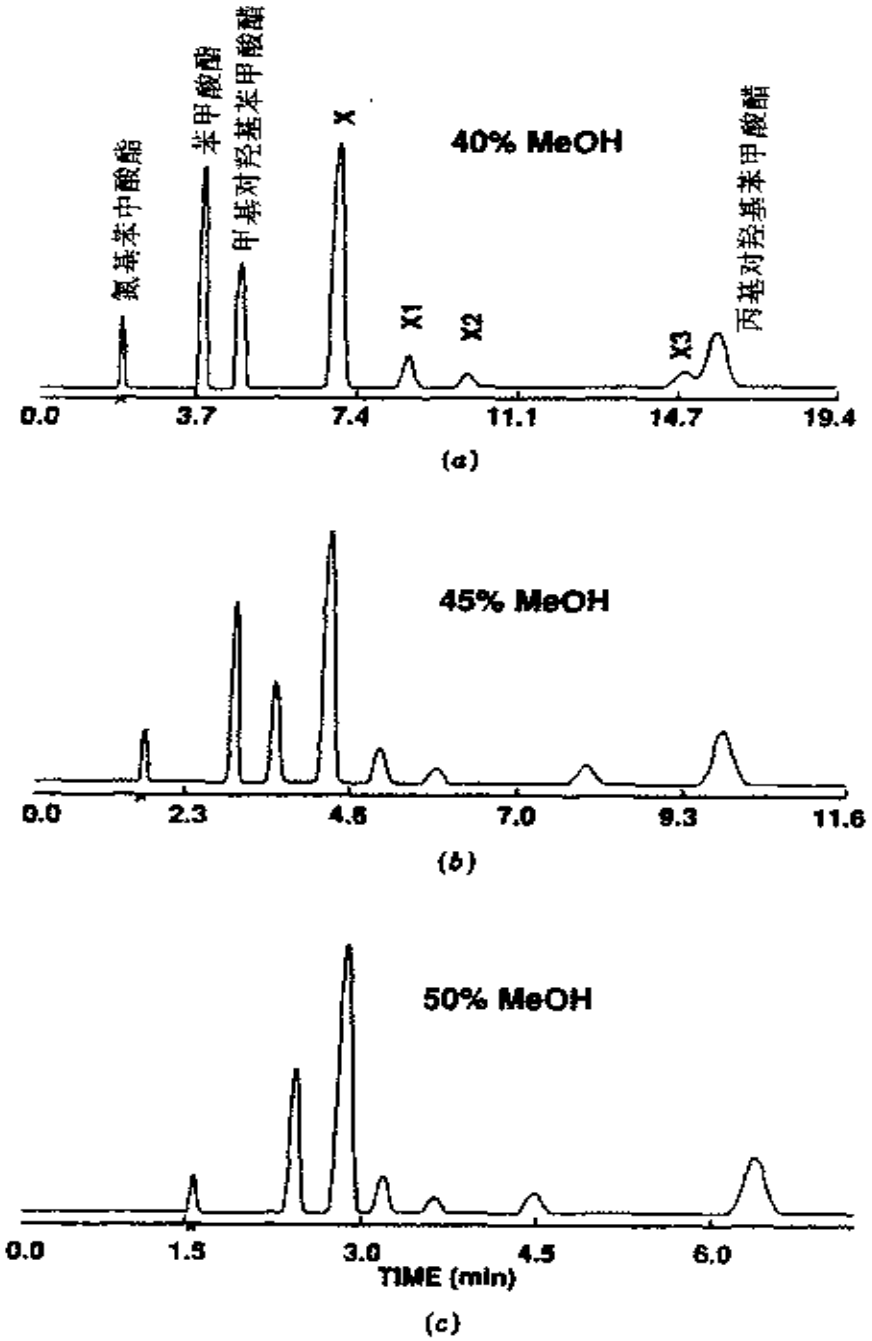


图 7－17　溶剂强度(%B)对离子对色谱中峰间距的影响。
样品与条件同图 7－8 c，但改变了甲醇浓度；本图中重复 7－8 c 的分离(40%甲醇)。(美国俄勒冈州 McMinnville 液相资源实验室未发表的数据)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

四氢呋喃)偶尔可用作改变选择性的手段。有些情况下[43,53-55],改变溶剂类型产生的峰间距变化不大。而另外情况下[56],通过改变溶剂类型却会使选择性发生显著且有用的改变。该效果见图7-18中所示的离子对IPLC分离儿茶酚胺混合物，用的溶剂不同：(*a*)10%甲醇；(*b*)2.5% THF；(*c*)6%乙腈。乙腈为合适的溶剂。然而，峰间距的类似变化也可通过上述任何一种改变（%B，pH等）来实现。

另一IPC中溶剂类型-选择性的示例见图7-19所示，为图7-8和7-17中所述的药品制剂的分离。当用乙腈作有机溶剂时，优化%B与离子对试剂浓度得到了图7-19*a*的分离结果。谱图中间有6谱峰(X~X2)紧挨在一起，勉强分开。当以甲醇代替乙腈，再优化%B和离子对试剂浓度后，碱性化合物X-X3的保留显著增大，使分离得到很大改善，见图7-19*b*。该示例中改变溶剂类型使一组关键峰(图7-19*b*的峰2-6)的保留值范围得以扩展，分离度大增。

当如图7-18和7-19改变有机溶剂类型时，用溶剂列线图(见图6-4)可方便地使溶剂强度和运行时间保持恒定。然而，如文献40所讨论，图6-4对于IPC往往不可靠。因此，可能有必要照图6-4改变溶剂类型后，再进一步调节%B。当采用磺酸盐离子对试剂时，已证明表7-3中的关系图比图6-4更可靠(但未包括图7-19的浓度)。

7.4.4.5 缓冲剂类型或添加盐 在IPC中通常不采用改变缓冲剂类型来改善选择性。流动相中一般也不再添加盐。由于IPC部分地依赖离子交换过程，当改变缓冲剂或加入盐时，可期望得到类似于离子交换色谱的效果(见7.4节)。离子强度的降低会导致那些与离子对试剂发生作用的化合物的保留值增加。

7.4.4.6 胺改性剂 在IPC中的流动相中加入胺改性剂已被用于改变碱性样品分离中的选择性[53]。这种情况下的离子对试

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

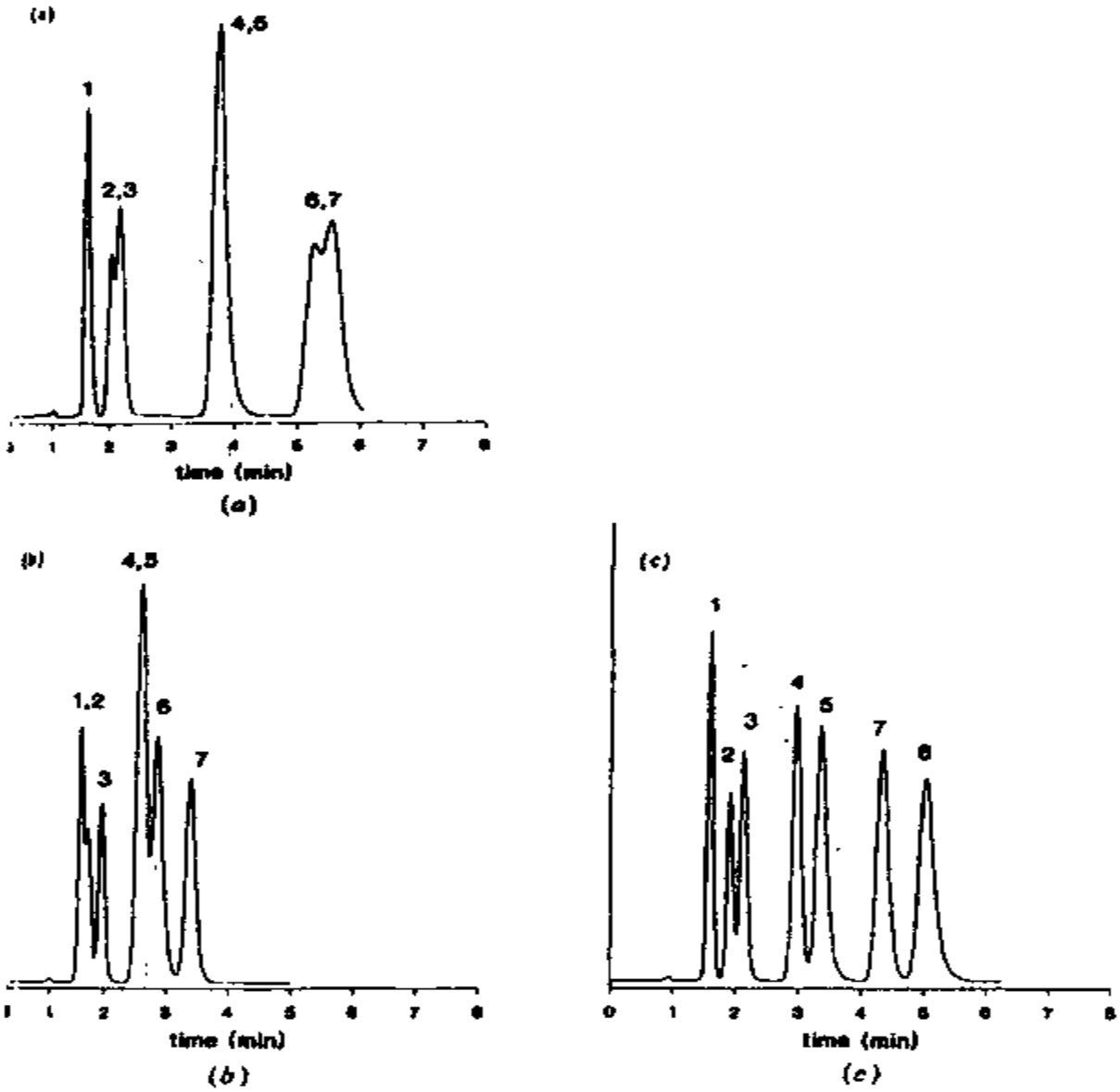


图 7－18　离子对色谱中溶剂类型对峰间距的影响[56]

儿茶酚胺的分离；样品：1. 去甲肾上腺素，2. 肾上腺素，3. 辛胺，4. 3，4－二羧基苯胺，5. 多巴胺，6. 异戊二烯醇，7. 酪氨酸；

条件：15×0.46cm C_{18} 柱；50mM 磷酸盐水溶液（pH2.5）；1ml/min；25℃。

（a）10% 甲醇－缓冲；（b）2.5% THF；（c）6% 乙腈。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

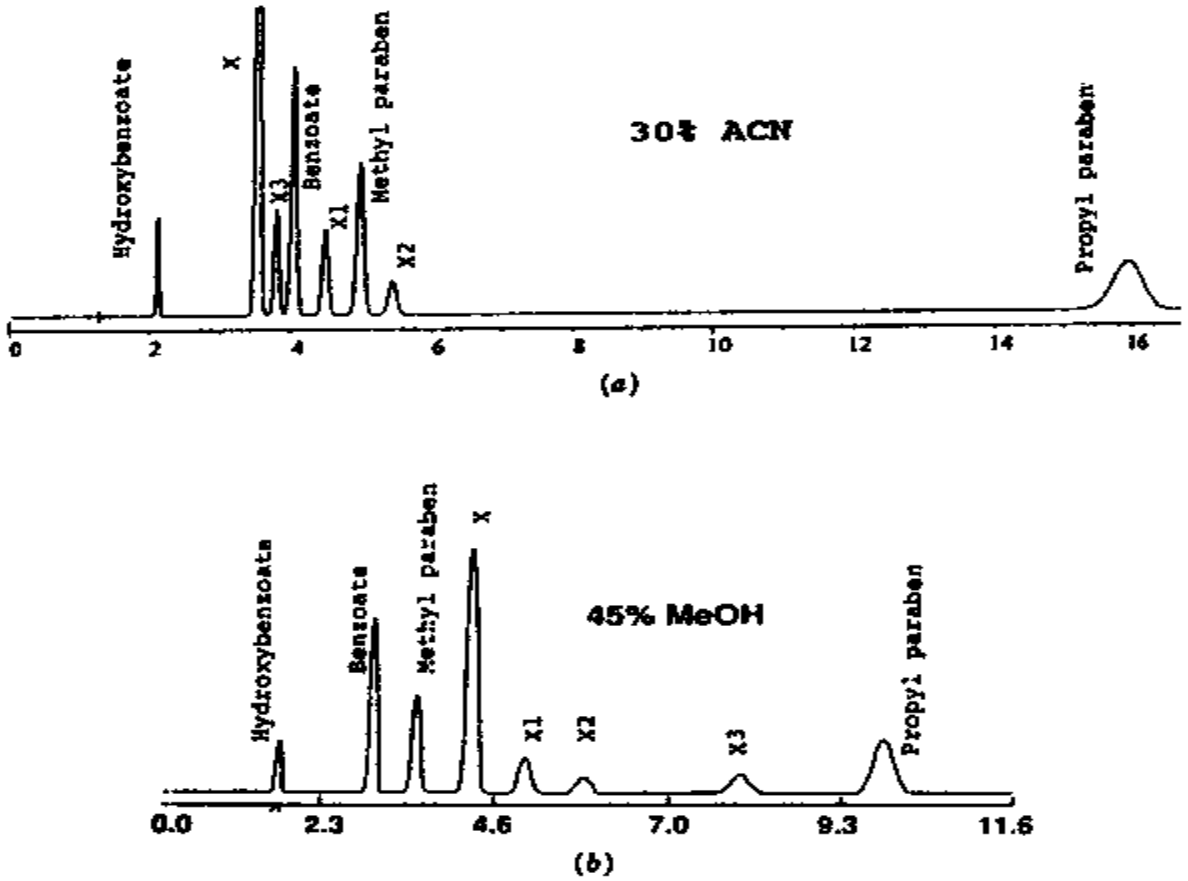


图 7－19　离子对色谱中溶剂类型对峰间距的影响

样品同图 7－17，但有机溶剂不同。

(*a*)15×0.46cm Zorbax SB－C_8 柱，30% 乙腈－缓冲；缓冲为 100mM 乙酸钾，pH3.5 和 27mM 辛烷磺酸盐；45℃；2.0ml/min；(*b*) 分离如图 7－17*b*(45% 甲醇－水)。(美国俄勒冈州 McMinnville 液相资源实验室未发表的数据)

剂为阴离子试剂(如烷基磺酸盐)，胺改性剂与烷基磺酸盐易于形成离子对，易抵消其效果。因此，加入胺改性剂或降低离子对试剂浓度可期望得到类似的选择性。然而，有一示例[53]的情形却不同。即使用了胺改性剂对选择性增加了其它控制。

7.4.5 特殊问题

离子样品在反相分离中的问题(见 7.2 节)在离子对 HPLC 中也可能发生：pH 敏感性、硅羟基效应(不严重)、温度敏感性(较严

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

重)及峰跟踪识别。还能预期一些其它困难。

7.4.5.1 人工峰 在 IPC 中,当注入样品溶剂(空白实验)时,有时正、负峰都可观察到。这些人工峰会干扰 HPLC 方法的建立或日常应用。因此,在 IPC 方法建立开始之前和得到有希望的分离之后,均应进行空白实验。

人工峰问题通常由流动相与样品溶剂组成的差异所引起,使用不纯的缓冲剂、离子对试剂或其它流动相添加剂都会放大这种影响。IPC 中良好的通用规则是:尽可能相近地匹配样品溶剂和流动相的组成(包括试剂浓度),增大进样浓度、减小进样体积(如<50μL)。若问题仍存在,应试用不同批次的离子对试剂。进一步的讨论见文献 57。

7.4.5.2 缓慢的色谱柱平衡 在某些条件下,色谱柱吸收和释放离子对试剂的过程可能很缓慢。因此,当一种,或两种流动相均含有离子对试剂时,改变流动相后必须证实样品保留值能够重视,方可使用。当离子对试剂疏水性较强(例如癸烷磺酸盐与己烷磺酸盐)和/或使用季铵盐试剂(如四丁基铵)时,柱平衡通常较慢[38]。当欲更换 IPC 流动相时,最好先用清洗溶剂将柱中以前的离子对试剂除去,再用新流动相平衡色谱柱。

阴离子试剂(如磺酸盐)用 50 – 80% 的甲醇 – 水作清洗溶剂,则易于除去。季铵试剂需用 50% 甲醇 – 缓冲剂(100 ~ 200mM)(如 pH4 ~ 5, 100mM 磷酸钾盐;加入磷酸钾以降低试剂铵基与硅羟基发生作用)进行清洗。两种情况下,在用新流动相检查保留值重现性(柱平衡)之前,应至少用 20 倍柱体积的清洗溶剂进行清洗。

色谱柱用含有离子对试剂的流动相进行初始平衡时,也可能比较缓慢。开始时认为图 7 ~ 17*b* 的 IPC 方法用 20 ~ 30 倍柱体积的流动相冲洗后,达到了平衡[58]。然而,当后来延续运行一段时间后,发现 11 小时后碱性化合物 X ~ X3 的保留值出现了非常缓慢的下降。为避免每一个系列实验前都进行 12 小时的柱平衡,有必

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

要在一个系列实验完成后，将色谱柱保存在流动相中。这样可在下次实验开始之前，极快地达到平衡。

若在这些条件下使用梯度洗脱，色柱与许多离子对试剂的缓慢平衡会带来一系列问题。保留值重现性较差、基线不稳及其它一些分离问题。因此，通常不推荐离子对 HPLC 用梯度模式。但有例外应注意：用小分子的离子对试剂如三氟醋酸盐(TFA)和三乙胺时，其柱平衡过程较快。TFA 经常用作肽和蛋白质梯度分离的添加剂，一般没问题。有报道，三乙胺在梯度洗脱中作离子对试剂情况不错。

7.4.5.3 较差的峰形 与反相分离一样，IPC 中硅羟基效应也会使峰形变坏。因此，当分离碱性化合物时，应注意选择色谱柱和流动相(见表 5－4，7.3.3.2 节)。然而，用离子对试剂时，硅羟基效应往往不甚明显。原因是阴离子试剂给予柱填料额外的负电荷，这削弱了通过硅羟基的离子交换过程对样品保留的重要性；同样，由于离子对试剂与解离的硅羟基之间强烈的相互作用，阳离子试剂对掩蔽硅羟基非常有效。

有研究表明提高柱温操作可修正 IPC 中的峰前伸[60]。相反，图 7－19a 中样品分离在低温度最好。流动相条件再稍作改变(39% ACN 和 25mM 醋酸钾及 27mM 辛烷磺酸盐)，色谱图中最末两峰变为 X3(碱性)和对羟苯甲酸丙酯(中性)。图 7－20 所示为用不同温度对 X3 与对羟基苯甲酸丙酯的分离：说明 28℃是该分离的最佳温度。造成这一奇怪峰形行为的原因尚不清楚，但它可能与在某些 IPC 实验条件下，流动相中试剂胶束的形成有关。任何情况下，IPC 中遇到峰形不好和/或塔板数降低时，最好研究一下温度变化对峰形的影响。一般降低或提高柱温会对峰形和塔板数会有所改善。

7.4.6 小结

初始实验应先不加离子对试剂)RPC 条件)。由于用 IPC 带来

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

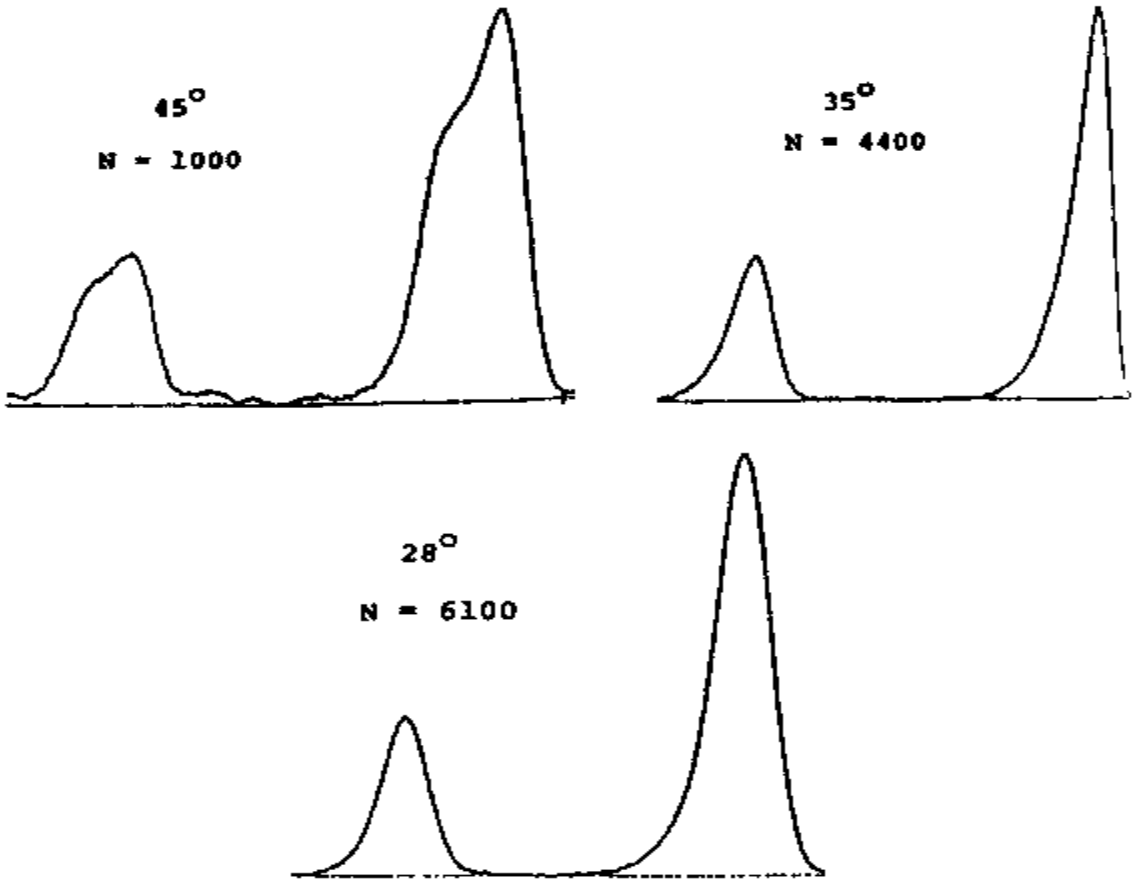


图 7－20　离子对色谱中温度对峰形的影响

分离如图 7－19*a*，但温度和其它条件有别：25×0.46cm Zorbax SB－C_8 柱；39% 乙腈－缓冲剂；缓冲剂为 25m*M* 醋酸钾水溶液（pH3.5），含 27mM 辛烷磺酸盐；2ml/min。（美国俄勒冈州 McMinnville 液相资源实验室未发表的数据）

的复杂性和潜在问题，只有为达到特殊目标时才应加入离子对试剂（如更好地控制整体保留值范围或峰间距）。不管是否在流动相中加入离子对试剂，开始时方法建立均以类似的方式进行。

第 1 步　初始分离（梯度洗脱较好）同反相方法建立的第一步（见 7.3.4 节与图 7－7）。

第 2 步　用初始梯度色谱图决定是否可用等度洗脱（见图 9－6）。如等度洗脱可行，估计等度分离的最佳% B（见图 9－7）。若

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

等度洗脱不合适，照第 2a 步继续进行。

第 2a 步　若需用等度分离，但第 1 步中的条件不行，则有两种选择：改变 pH 和/或加入离子对试剂。用 IPC 需选用合适的试剂；见图 7－13 和有关的讨论。

第 3 步　调整%B 以达到 $0.5<k<20$；微调%B 以改善选择性和分离度。

第 4 步　改用乙腈为有机溶剂，调节%B 以进一步改善选择性和分离度。

第 5 和 5a 步　改变 pH 或离子对试剂浓度以使峰间距最佳。若已知各样品峰的酸碱性，改变 pH 或试剂浓度通常可以预测到峰间距的改变（如图 7－8 所示）；另一种方法是通过图 7－14 的实验设计，发掘较大范围的 pH 值和试剂浓度。

第 6～8 步　IPC 方法建立中的其它步骤与 RPC 相同。见图 7－7 和 7.3.4 节该规划的讨论。IPC 中柱类型的改变（第 7 步）可能不如在 RPC 中有用，这是由于吸附在固定相上的离子对试剂将固定相与样品分子"隔开"的缘故（见图 7－9 和有关的讨论）。

7.5 离子交换色谱

自 1968 年高效液相色谱仪商品化以来，离子交换色谱（IEC）就是一种重要的 HPLC 方法[61]。然而在以后的 10 年中与其它HPLC 方法相比，它的分离应用渐渐减少。目前，只在某些"特殊"样品中可以用到：包括生物来源的混合物（氨基酸、低聚核苷酸、肽、蛋白质、核酸）、无机盐和一些金属有机化合物。

因为离子交换与离子对 HPLC 保留机制的相似性（见下文），许多可用 IEC 的分离用 IPC 也可解决。对于典型小分子样品的分离，IPC 可能有一定优势：柱效高、选择性与分离度易于控制、柱更稳定及重现性好。除了用于生物样品外（见第 11 章），度子交换代替反相和离子对 HPLC 的原因如下：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

检测限 许多无机盐用一般 HPLC 检测器不好检测(见第 3 章)。而采用电导检测的离子色谱技术[62]基本上解决了这一问题,这也是这类样品广泛采用离子色谱的原因之一。对于 UV 吸收较弱的有机离子(如烷基胺与磺酸盐)也可使用该方法。同样,用质谱检测器需用可完全挥发的流动相。用挥发性缓冲剂的离子交换色谱符合这一需要,而大多数离子对试剂的挥发性不够。

制备分离 一旦一种化合物用 HPLC 分离或纯化后,有必要除去流动相。如果流动相可完全挥发,则非常容易实现。一般避免在制备 HPLC 中使用离子对试剂,因为它们的挥发性较差,而离子交换色谱可以采用挥发性缓冲剂(如三氟醋酸、甲酸或醋酸、碳酸铵,甲酸铵与醋酸铵)。如果有必要使用 IPC 纯化与回收样品,样品馏分中的离子对试剂可再通过以后的离子交换分离除去(阴离子试剂用阴离子交换柱,阳离子试剂用阳离子交换柱)。

多步分离 为分开非常复杂的样品,有时(见 4.6 节)有必要采用二步或多步连续的在线分离。一般来说,开始用低分离度分离模式,再结合使用 HPLC 分离,但也可以将两种 HPLC 串联使用(见 4.6 节)。两种情况上,前面色谱分离使用的流动相都不能干扰后面的分离(例如,前一分离的流动相绝不可成为后一分离的强溶剂)。离子交换中所用的水缓冲剂/盐流动相一般可以直接将样品馏分注入反相色谱柱中,用其进一步分离这些馏分。其原因为水缓冲液对反相分离是极弱的溶剂。

7.5.1 保留的基础

与固定相共价相连的荷电基团决定用于离子交换的色谱柱的特性:阴离子交换柱带正电荷(通常为季铵或胺基团),阳离子柱带负电荷(磺酸盐基或羧基)。阳离子交换柱用于阳离子的分离,如质子化碱;阴离子交换柱用于阴离子或酸性样品的分离。

若固定相用 R^-(阳离子交换剂)或 R^+(阴离子交换剂)表示,样品用 X^+(阳离子)或 X^-(阴离子)表示,IEC 中的保留过程可表

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

示如下：

$$X^+ + R^-K^+ \Leftrightarrow X^+R^- + K^+ \text{（阳离子交换）} \quad (7.4)$$

$$X^- + R^+Cl^- \Leftrightarrow X^-R^+ + Cl^- \text{（阴离子交换）} \quad (7.5)$$

这里假设流动相中的反离子为 K^+ 与 Cl^-，样品离子为一价。

对于带电荷 z 的样品离子和一价的反离子，反离子浓度对其保留值的影响可总结为：

$$k = \frac{\text{常数}}{(\text{反离子浓度})^z} \quad (7.6)$$

于是，IEC 中盐或缓冲剂浓度的增加会导致保留值下降，对荷电较高的样品化合物（$z>1$）的影响甚至更大。为控制样品的保留值范围达到 $0.5<k<20$），一般可改变流动相的离子强度，对荷电不同的两化合物的选择性也有影响（见式 7.6）。

7.5.1.1 pH 影响 IEC 一般用于酸性或碱性样品。由于保留机制（见式 7.4 和 7.5 要求样品分子所带电荷与柱上的相反，所以只有解离形式的酸或碱才能被显著地保留。7.2 节的讨论说明能够理解和控制离子交换分离中 pH 对保留值的影响。阴离子交换色谱分离酸时，pH 增大导致样品解离增多，保留值增大。而降低 pH 在阳离子交换 HPLC 中有利于碱的保留（与 RPC 保留相反）。在离子交换分离中，改变 pH 通常是改变选择性的良好办法。

7.5.1.2 盐或缓冲剂类型 在离子交换分离中，不同的流动相阴离子或阳离子的保留性能有强有弱，有时选用特殊的盐能获得更强或更弱的保留值。因此，我们可以称其为强或弱离子置换剂或反离子：强置换剂可比同等浓度的弱置换剂更多地降低样品的保留值。一般来说，高荷电的置换剂为强置换剂。阴离子交换色谱中，不同置换剂的相对强度顺序为：

F^-（弱）$<OH^-<$醋酸根$^-<Cl^-<SCN^-<Br^-<CrO_4^-<NO_3^-<I^-<$草酸根$^{2-}<SO_2^{2-}<$枸橼酸根$^{3-}$（强）

同样，阳离子交换色谱中置换剂强度顺序为：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

Li^+(弱)<H^+<Na^+<NH_4^+<K^+<Rb^+<Cs^+<Ag^+<Mg^{2+}<Zn^{2+}<CO^{2+}<Cu^{2+}<Cd^{2+}<Ni^+<Ca^{2+}<Pb^{2+}<Ba^{2+}(强)

改变离子交换色谱中所用的盐也会影响选择性;见 11.2.2 节听离子交换分离蛋白质样品。

7.5.1.3 有机溶剂 流动相中加入有机溶剂会导致保留值下降,这一点与反相 HPLC 情况相同。象甲醇或乙腈溶剂也常用于离子交换,以改善分离的选择性。

7.5.1.4 色谱柱类型 离子交换柱可以分为四种:弱、强阳离子交换剂(分别为 WCX 和 SCX)与弱、强阴离子交换剂(分别为 WAX 和 SAX)。强离子交换剂带有的离子基团在通常 pH 范围(2<pH<12)内解离不改变[例如,$-SO_3$ 基团用于阳离子交换;$-N(CH_3)_3^+$ 基团用于阴离子交换]。弱离子交换剂在一定的 pH 范围将失去电荷及样品的保留能力(如 $-COO^-$ 基团用于阳离子交换时在 pH<5 逐步失去电荷)。离子交换色谱大多数的应用(除生物样品的分离外)使用强离子交换剂。改变选择性或降低保留值时可用弱离子交换柱。

7.5.2 方法建立

选择的色谱柱必须与分离的样品组分匹配。对于酸性或阴离子化合物,用强阴离子交换柱。对于碱性或阳离子化合物,用强阳离子交换柱。通常不用离子交换色谱同时分离样品阴离子和阳离子。下一步,选择能使样品化合物解离的水缓冲液。通常,pH>6 用于阴离子交换,pH<6 用于阳离子交换。若已知样品的 p*Ka* 值,阴离子交换时,要求 pH>p*Ka*,而对于阳离子交换,则要求 pH<p*Ka*。缓冲剂浓度应比较低[如 2-5mM,以避免与样品离子竞争保留(式 7.4 和 7.5)]。

下一步选择 B 溶剂,通常在缓冲剂中加入 0.5-1.0 磺酸钾或其它盐(避免将 pH<4 的卤化物用于不锈钢设备中)。用 0→100% B 梯度确定样品的相对保留值范围、采用等度分离的可能性

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

以及等度分离的最佳%B(与8.2.2节中对RPC的讨论类似)。对于在这些条件下不能流出，或者需要在流动相中加入>200mM盐的样品，可通过以下几种手段改善分离：(1)增加温度；(2)加入甲醇；或(3)在能降低柱上电荷的pH下，用弱离子交换剂。

一旦用等度洗脱得到了足够的保留值范围($0.5<k<20$)时，可通过改变%B或pH以及流动相中盐的类型或加入少量(<25%)的甲醇或异丙醇，来改变选择性。近来的工作[63,64]表明含有>60%甲醇的流动相可能非常适于强碱性和季铵化合物的阳离子交换分离。关于离子交换色谱的进一步讨论，见文献65和66。

7.5.3 混合模式分离

混合模式分离是指使用能利用一个以上保留过程的色谱柱。最常见的示例是既有反相又有离子交换行为的色谱柱[67-69]。带有与色谱柱电荷相反的化合物，以离子交换保留为主，增加流动相的离子强度会减小其保留；中性化合物的保留以疏水吸附为主，不过保留比常规反相柱要弱。增加有机溶剂浓度(%B)会使中性化合物降低保留。如流动相中盐浓度较高，由于与疏水作用色谱相似的"盐析"效应(11.2.3节)，离子与中性化合物的保留值均随离子强度的增长而增大[70]，对于疏水性较强或具有反相行为的色谱柱，在低盐浓度时也会发生这种现象。

使用混合模式色谱柱有两个主要原因。第一，使用单支色谱柱就可进行离子交换和反相分离，这类似于氰基柱用于反相和正相分离。第二，混合模式柱具有独特的选择性，例如在细胞培养样品中，单克隆抗体完全分离于其它蛋白质[69]。到目前为止，混合模式色谱柱主要用于(在有限范围内)分离生物样品(见第11章)。由于生产混合模式色谱柱需更复杂的反应，预期可出现的柱间差异会更大。

7.5.4 硅胶柱

一种IEC不常用的、但有意义的形式是用"原"硅胶色谱柱[71-

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

[73]分离强碱性化合物(pKa>8)。流动相为 90% 甲醇/(硝酸铵缓冲液 pH9～10),通过改变离子强度或 pH 来调节保留值。据报道,柱效 N 可与反相分离中最佳值相媲美(见表 5－9),"原"硅胶色谱柱可在 pH9、进样约 2000 次后仍保持稳定[74]。

这些分离的示例见图 7－21 所示,用四种不同硅胶柱,分离七种强碱性化合物的混合物。图 7－21 用原硅胶的分离表明,用四支极为不同的色谱柱(A. Hypensil; B. Spherisorb; C. Nucleosil 和 D. Zorbax)其保留值仅有微小的差别。Spherisorb 柱(B)的柱效比其它色谱柱略高,大多数采用原硅胶柱的 IEC 的文献都采用这种类型的色谱柱。能与金属螯合的化合物可能会出现拖尾,但可用 EDTA 冲洗色谱柱,加以纠正[75]。

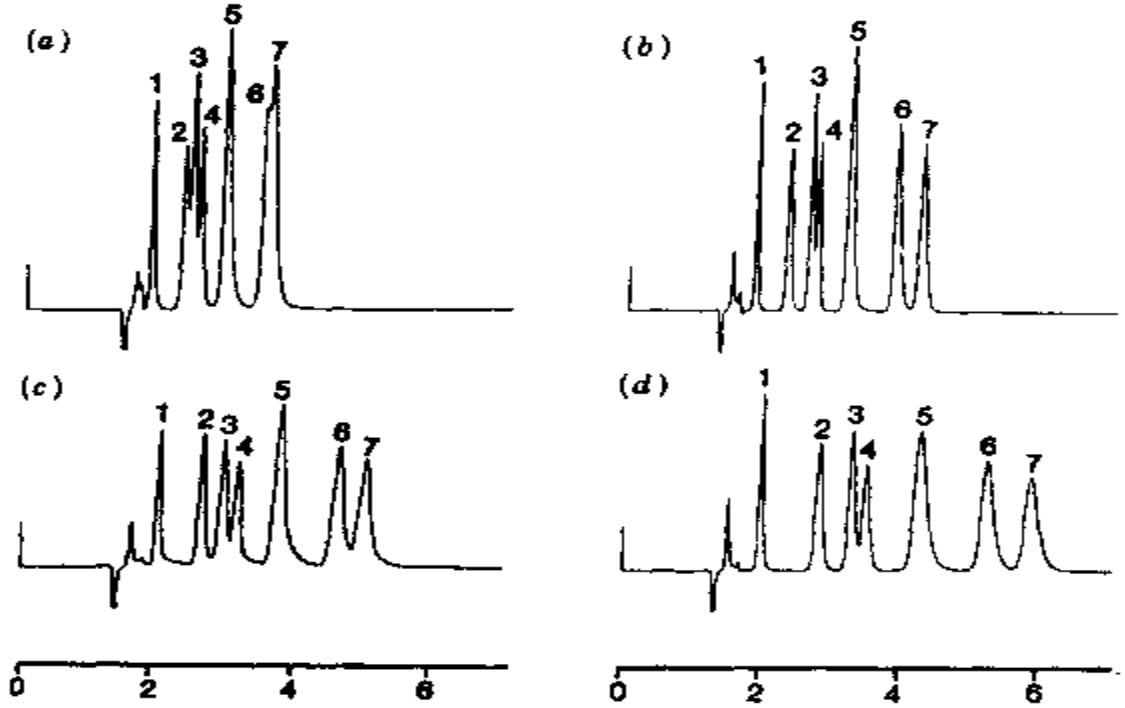


图 7－21　碱性化合物在原硅胶柱上的离子交换分离[71]

样品:1. 苯甲曲嗪,2. 苯丙醇胺,3. 酚特明,4. 苯丙胺,5. 吗啡,6. 麻黄碱 7. 甲基苯丙胺。

条件:25×0.5cm 柱(a)Hypersil,(b)SpHerisorb S5W,(c)Nucleosil 50－5,(d) Zorbax BP－SIL; 流动相:90% 甲醇－硝酸铵 pH10.1; 2.0ml/min;室温。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

参考文献

1. P. J. Twitchett and A. C. Moffat, *J. Chromatogr.*, Ill (1975) 149.
2. W. R. Melander and C. Horvath, in *High – Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol. 2, C. Horvath, ed., Academic Press San Diego CA, 1980, p. 113.
3. J. A. Lewis, D. C. Lommen, W. D. Raddatz, J. W. Dolan, and L. R. Snyder , *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 183.
4. P. J. Shoenmakers and R. Tijssen, *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 577.
5. B. T. Bush, J. H. Frenz, W. R. Melander, C. Horvath, A. R. Cashmore, R. N. Dryer, J. O. Knipe, J. K. Coward, and J. R. Bertino, *J. Chromatogr.*, 168 (1979)343.
6. E. P. Kroef and D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, SO (1978) 502.
7. J. B. Li, LC/GC, 10 (1992) 856.
8. J. W. Dolan, LC Resources, McMinnville, Oregon unreported studies, 1996.
9. D. Guo, C. T. Mant, and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, 386 (1987)205.
10. H. Otto and W. Wegscheider *J. Chromatogr.*, 258 (1983) 11.
11. H. Otto andW. Wegscheider, *J. Liq. Chromatogr.*, 6 (1983) 685.
12. R. F. Doerge, ed., *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, J. B. Lippincott, Philadelphia, PA, 1982, Appendix B.
13. *pKalc Expert System*, CompuDrug Chemistry, Inc., Budapest, Hungary, 1992.
14. E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, and M. Roses, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3651.
15. D. V. McCalley, *J. Chromatogr A.*, 708 (1995) 185.
16. A. Bartha and G. Vigh, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 383.
17. G. K. C. Low, A. Bartha, H. A. H. Billiet, and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 478(1989) 21.
18. J. W. Dolan, D. C. Lommen, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 535 (1990) 55.
19. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, 535

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

(1990) 75.

20. J. A. Lewis, J. W. Dolan, L. R. Snyder, and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 592(1992) 197.

21. W. Hancock, R. C. Chloupek, J. J. Kirkland, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*,686 (1994) 31.

22. J. L. Glajch, J. C. Gluckman, J. G. Charikofsky, J. M. Minor, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, 318 (1985) 23.

23. J. S. Kiel, S. L. Morgan, and R. K. Abramson, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 585.

24. J. J. DeStefano, J. A. Lewis, and L. R. Snyder, *LC/GC*, 10 (1992)130.

25. W. Golkiewicz, J. Kuczynski, W. Markowski, and L. Jusiak, *J. Chromatogr.*, 686(1994) 85.

26. P. F. Vanbel, B. L. Tilquin, and P. J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.* A, 697(1995) 3.

27. M. A. Stadalius, J. S. Berus, and L. R. Snyder, *LC/GC*, 6 (1988)494.

27a. D. V. McCalley, *J. Chromatogr.* A, 738 (1996) 169.

28. T. Welsch, H. Frank, andG. Vigh, *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 97.

29. R. J. M. Vervoort, F. A. Maris, and H. Hendriks, *J. Chromatogr.*, 623 (1992)207.

30. R. M. J. Vervoort, M. J. W. Derksen, and F. A. Maris, *J. Chromatogr.* A, 678 (1994)1

31. H. A. Claessens, E. A. Vermeer, and C. A. Cramers, *LC/GC Int.*, 6 (1993) 692.

32. D. V. McCalley, *J. Chromatogr.*, 636 (1993) 213.

32a. J. J. Kirkland and J. J. DeStefano, *GIT Verlag*, GIT Special, Chromatography Special, June 1996, 62.

32b. J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, and H. A. Claessens, *J. Chromatogr.* A, in print.

33. S. D. McCrossen and C. F. Simpson, *J. Chromatogr.* A, 697 (1995) 53.

34. S. H. Hansen and J. Tjornelund, *J. Chromatogr.*, 556 (1991) 353.

35. P. Helboe, S. H. Hansen, and M. Thomson, *Adv. Chromatogr.*, 28 (1989)195.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

36. A. Bartha, H. A. H. Billiet, L. de Galan, and G. Vigh, *J. Chromatogr.*, 291 (1984) 91.
37. D. S. Lu, J. Vialle, H. Tralongo, and R. Longeray, *J. Chromatogr.*, 268 (1983) 1.
38. J. H. Knox and R. A. Hartwick, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 3.
39. M. W. Dong, J. Lepore, and T. Tarumoto, *J. Chromatogr.*, 442 (1988)81.
40. A. Bartha, G. Vigh, H. A. H. Billiet, and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 303 (1984) 29.
41. M. Patthy, *J. Chromatogr.* A, 660 (1994) 17.
42. M. T. W. Hearn, ed., *Ion – Pair Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1985.
43. A. P. Goldberg, E. Nowakowska, P. E. Antle, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 316 (1984) 241.
44. H. Liu and F. F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 993.
45. P. Helboe, *J. Chromatogr.*, 523 (1990) 217.
46. A. Bartha, G. Vigh, and Z. Varga – Puchony, *J. Chromatogr.*, 499 (1990). 423.
47. R. C. Kong, B. Sachok, and S. N. Deming, *J. Chromatogr.*, 199 (1980)307.
48. P. Jandera and H. Engelhardt, *Chromatographia*, 13 (1980) 18.
49. W. Lindbergh. E. Johansson, and K. Johansson, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 201.
50. P. M. J. Coenegracht, N. V. Tuyen, H. J. Metting, and P. J. M. Coenegracht – Lamers, *J. Chromatogr.*, 389 (1987) 351.
51. C. P. Terweij – Groen and J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, 138 (1977) 245.
52. N. Lammers, J. Zeeman, and G. J. deJong, *J. High – Resolution Chromatogr. and Chromatogr. Comm.*, 4 (1981) 444.
53. S. 0. Jansson and S. Johahsson, *J. Chromatogr.*, 242 (1982) 41.
54. M. Bieganowska, E. Soczewinski, and M. Janowska, *Chromatographia*, 18(1984) 99.
55. K. Dihuidi, M. J. Kucharski, E. Roots, J. Hoogmartens, and H. Vanderhaeghe, *J. Chromatogr.*, 325 (1985) 413.
56. A. Bartha, G. Vigh, and J. Stahiberg, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 403.

PDF 文件使用 "pdf Fact or y" 试用版本创建 www.f i nepri nt . cn

57. J. W. Dolan and L. R. Snyder, *Troubleshooting LC Systems*, Humana Press, Totowa, NJ, 1989, pp. 429 – 435.
58. L. R. Snyder, LC Resources, Walnut Creek, California, personal communication, 1995.
59. C. Z. Chuang, F. A. Ragan, and C. Prasad, *J. Liq.* Chromatogr., 17 (1994)2383.
60. P. A. Asmus, J. B. Landis, and C. L. Vila, *J. Chromatogr.*, 264 (1983) 241.
61. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley – interscience*, New York, 1974, Chapter 9.
62. H. Small, *Ion Chromatography*, Plenum, New York, 1989.
63. K. Croes, P. T. McCarthy, and R. J. Flanagan, J. Chromatogr. A, 693 (1995) 289.
64. B. Law and J. R. G. Appleby, *J. Chromatogr. A*, 725 (1996) 335.
65. P. R. Haddad and P. E. Jackson, *Ion Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1990.
66. H. F. Walton and R. D. Rocklin, *Ion Exchange in Analytical Chemistry*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
67. J. T. Eleveld, H. A. Claessens, J. L. Ammerdorffer. A. M. van Herk, and C. A. *Cramers, J. Chromatogr. A*, 677 (1994) 211.
68. M. P. Henry, in *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, M. T. W. Hearn, ed., VCH, New York, 1991, Chapter 5.
69. D. R. Nau, in *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, M. T. W. Hearn, ed., VCH, New York, 1991, Chapter II.
70, W. R. Melander, Z. El Rassi, and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 469 (1989) 3.
71. B. Law, R. Gill, and A. C. Moffat, *J. Chromatogr.*, 301 (1984) 165.
72. B. Law, *J. Chromatogr.*, 407 (1987) 1.
73. B. Law, *Methodol. Surv. Biochem. Anal.*, 22 (1992) 57.
74. B. Law and P. E. Chan, *J. Chromatogr.*, 467 (1989) 267.
75. B. Law and P. E. Chan, *J. Chromatogr.*, 552 (1991) 429.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第 8 章　梯度洗脱

8.1 引言

如前所述，等度分离在洗脱全过程中流动相组成不变（例如 50% 甲醇－水），而在梯度洗脱中流动相组成随运行过程是变化的（例如 5→100% 甲醇－水）。梯度洗脱中一般采用二元（溶剂）流动相：A 与 B，其中强溶剂 B 的浓度（% B）在运行过程中逐渐增加。图 8－1 所示为几种不同类型的梯度形状，其中线性梯度最为常用。除另有说明，本书中均假设为线性梯度。图 8－1 所示为流动相组成在 20min 内，B 浓度由 0 增大为 100%（线性梯度，5% / min）。

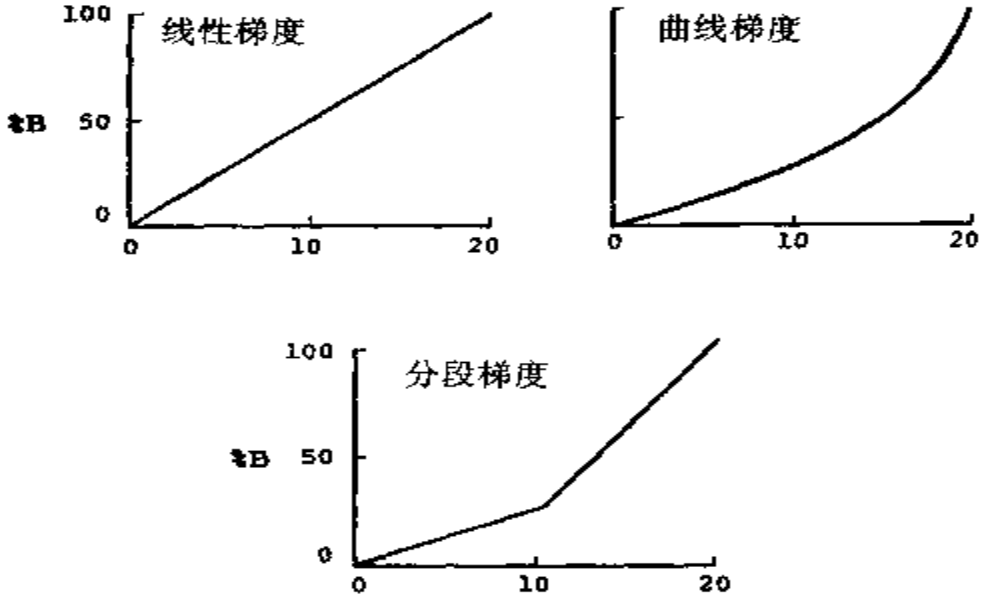


图 8－1　不同的梯度形状

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

许多样品需用梯度洗脱，但许多实验室却对梯度洗脱的应用存有很大偏见。他们偏爱等度洗脱的原因有如下几点：

1 有些实验室尚不具备梯度洗脱设备。

2 梯度洗脱更复杂，似乎更难进行新方法建立与常规分析。

3 某些 HPLC 检测器（如示差折光检测器）不能使用梯度洗脱。

4 每次运行梯度洗脱后需重新平衡色谱柱，耗时较长。

5 不同设备的分离结果可能不同，所以梯度洗脱法移置时会出现差异。

6 梯度洗脱中的基线问题更为普遍，并且必须使用高纯溶剂。

7 某些色谱柱/流动相的联合应用不适于梯度洗脱。

如权衡采用梯度洗脱对每一分离的优缺点，那么很多分离将只适于使用梯度洗脱。本章中我们将说明梯度洗脱分离实际上与等度洗脱非常相似，因此梯度洗脱的方法建立和日常操作与等度洗脱相比并不太难。在 8.5 节中我们将探讨上述列举的梯度洗脱中存在的问题，以及如何避免或减少这些问题的方法。

下面的讨论主要针对反相条件，但是其它 HPLC 模式的梯度洗脱也遵循相同的原理。我们以目前对梯度洗脱详尽而全面的理解，可以通过几次初始实验的分离情况对以后分离进行准确地预测（见文献[1,2]和 10.2.2 节）。关于梯度洗脱原理的全面讨论，参见文献[3~5]。

8.2 梯度洗脱的应用

常规的梯度洗脱分离适合于下列样品：

1 具有较宽 k 值范围的样品（即等度条件下不可能使所有谱峰达到 $0.5<k<20$）。

2 大分子样品（如分子量大于 1000，尤其是生物样品，见第 11 章）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

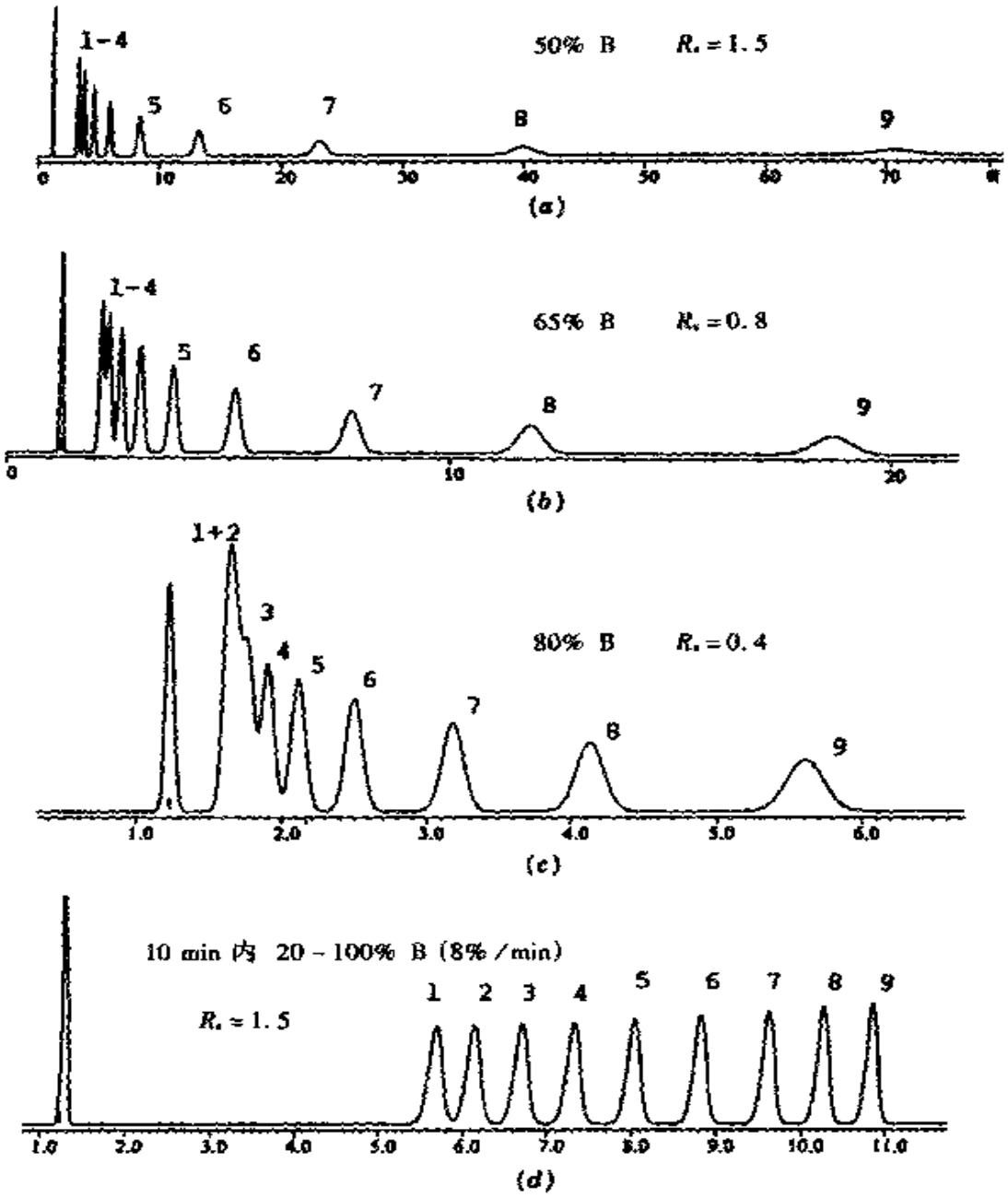


图 8-2　二烷基邻苯二甲酸酯同系物的反相 HPLC 分离[6]

样品峰为 C_2(二甲基，1 号峰）至 C_{10}(二正戊基，9 号峰)；25×0.46cm，5μm C_8 柱；乙腈(B)－水流动相；2ml/min；60℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

3 样品含有晚流出干扰物，它们会污染色谱柱或在后续运行中流出。

4 溶于弱溶剂的样品稀溶液（如用反相柱分离的样品水溶液）。

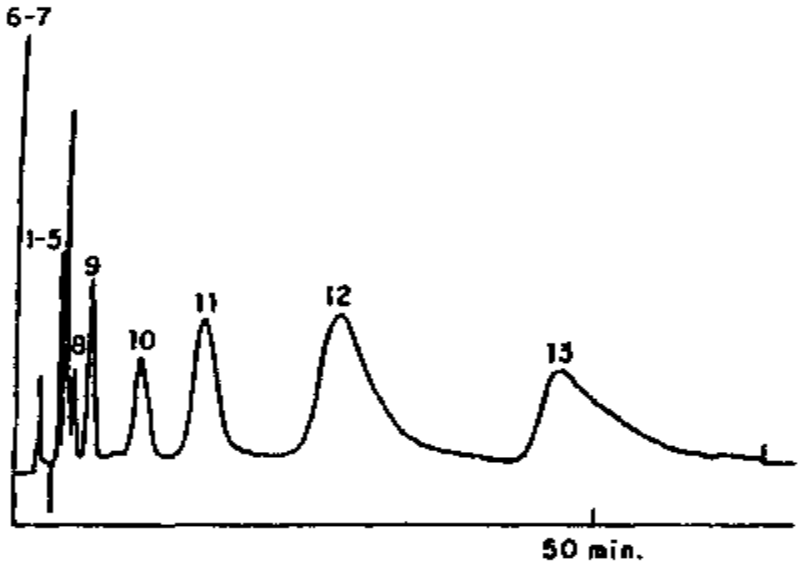
此外，即使最终有可能使用等度方法，初始试验采用梯度洗脱往往是 HPLC 方法建立的最佳起点。

8.2.1 梯度洗脱用于常规分析

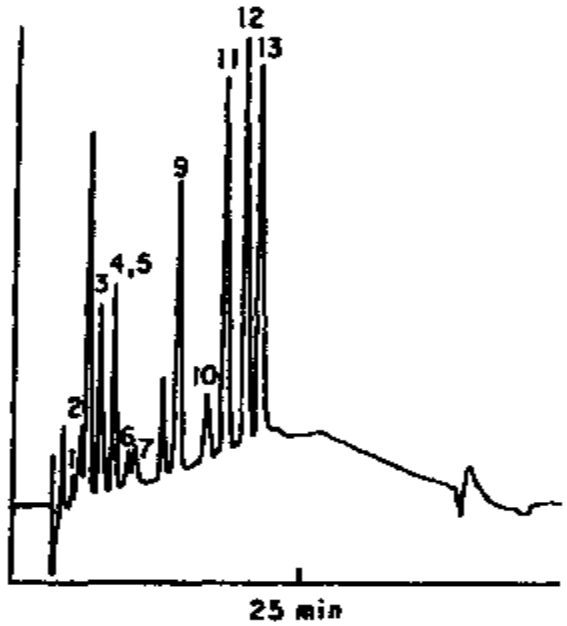
8.2.1.1 样品的保留值范围 选择梯度洗脱的一般理由是样品具有较大的保留值范围。图 8－2 所示为二烷基邻苯二甲酸酯混和物的分离，该同系混合物包括二甲基(1)、甲乙基(2)、二乙基(3)、二正戊基(9)邻苯二甲酸酯，在 C_8 柱上采用不同组成的乙腈－水流动相进行分离。50% B 的等度分离可以获得较好分离度［见 图 8－2*a*；关键峰对 1/2 的 $R_s=1.5$，但运行时间较长(70min)］；而且，后面谱峰(8 和 9)展宽，难以检测。采用较强流动相(65 或 80% B；图 8－2*b* 和 *c*)可使运行时间缩短，峰 8 和 9 变窄，有利于检测和定量。然而，前面谱峰 1～4 的分离效果变得很差(关键峰对的 $R_s<0.8$)。由于前面谱峰需用较弱流动相(如 50% B)，而后面谱峰需用较强流动相(80% B)，所以该样品采用等度条件无法足够分离。

该样品采用梯度洗脱则分离很好(见图 8－2d)：10min 梯度，20→100% B。所有峰均很好地分离(关键峰对 1/2 的 $R_s=1.5$)，运行时间仅 11min，所有谱峰都较窄，利于检测及准确定量。对于保留值范围较宽的样品，梯度洗脱显然是良好的选择。采用梯度洗脱的另一个原因是，在等度洗脱条件下，$k>20$ 的晚流出峰往往会出现较严重拖尾，如图 8－3*a* 中羧酸混合物的离子交换分离。而采用梯度洗脱的同一样品(图 8－3*b*)，色谱图中最末峰仍较窄，峰形也很好，前面谱峰的分离得以改善。然面应注意，梯度洗脱并不能解决所有谱峰的拖尾问题。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn



(a)



(b)

图8－3　离子交换色谱分离芳香羧酸混合物[7]

(a)55mM 硝酸钠水溶液流动相的等度分离；

(b)10→100mM 硝酸钠水溶液流动相的梯度洗脱。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

8.2.1.2 大分子样品组分 大分子量样品(肽、蛋白质、合成聚合物等)一般采用梯度洗脱分离会更好,尤其用反相分离条件时。这类样品的等度保留往往对于流动相组成(B%)的微小改变极其敏感,难以将保留值控制在合适的范围内[8,9]。例如丙醇-水流动相等度 RPC 分离碳酸酐酶(一种分子量 29000Da 的蛋白质)时,仅改变 ±0.1% B,则会导致保留时间 ±20% 的变化(见文献 10 中表Ⅷ)。当用梯度洗脱代替等度条件时,HPLC 分离大分子时也会使峰形有较大改善。

8.2.1.3 晚流出组分 有些样品采用等度洗脱可很好地分离(有关谱峰达到 $0.5<k<20$),但所含有的晚流出干扰组分会污染色谱柱或对后续分离产生干扰。图 8-4*a* 所示为对单一化合物(标有 EP 的阴影峰)定量的等度分离,但晚流出的干扰峰仍连绵不断。而梯度洗脱可以通过在下一次进样前将这些晚流出峰快速洗脱出。图 8-4*b* 所示为梯度分离木浆提取物中蒽醌的结果。其中宽且保留严重组分(箭头所指)在等度条件下未能流出,所以首次采用等度洗脱分离这些木浆提取物,即由于强保留化合物滞留在色谱柱上,使色谱柱活性迅速丧失,不能达到充分分离。而改用梯度洗脱后,每次运行过程中均可除去强保留组分,此问题便迎刃而解。

8.2.1.4 增强检测灵敏度 在等度洗脱中可通过增大%B,以降低 k 值和峰宽来提高检测灵敏度(见式 2.15)。但是,因为 t_0 附近的干扰峰和基线波动,使该方法的应用常受到限制。而在梯度洗脱中,采用陡梯度通常具有等度分离相同的优点($k<2$),且可避免等度洗脱中的这类干扰(见图 8-5*a* 与 *b*,首峰以星号标记)。梯度洗脱可增强检测,与相应的等度洗脱分离比较,样品峰变窄约两倍(且峰高增大 2 倍)[5]。

8.2.1.5 稀样品溶液 对于溶解于弱溶剂中的稀样品,梯度洗脱可以采用大体积进样,而不会引起峰展宽。在这种条件下,

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

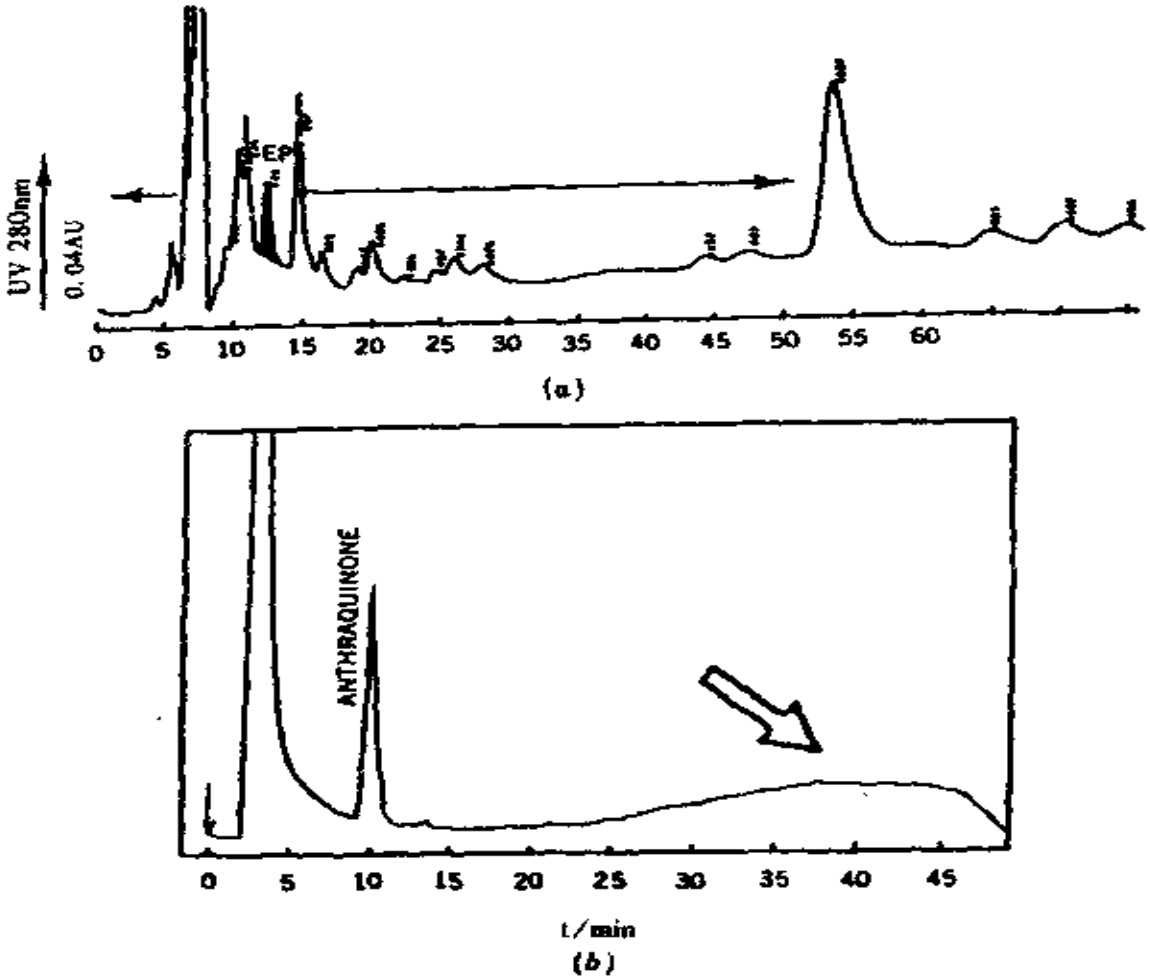


图 8－4　含晚流出物的样品是梯度洗脱的良好候选

(a)等度反相分析药物 EP 的血浆提取液[11]

(b)反相梯度洗脱分析木浆提取物中的蒽醌[12]

样品在进样过程中于柱入口处完成柱上浓缩，因此可以大体积(如 1～10ml)进样。等度洗脱也可以进行相似的柱上浓缩，但是由于进样过程中样品与流动相的混合，使样品体积过大，引起样品峰严重展宽(梯度洗脱在样品进样时仅与弱溶剂 A 混合，而不是较强的等度流动相)。

梯度洗脱不可能适用于每种情况。在流动相中使用强保留添加剂(如胺改性剂，疏水离子对试剂)会使梯度洗脱复杂化，由于

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

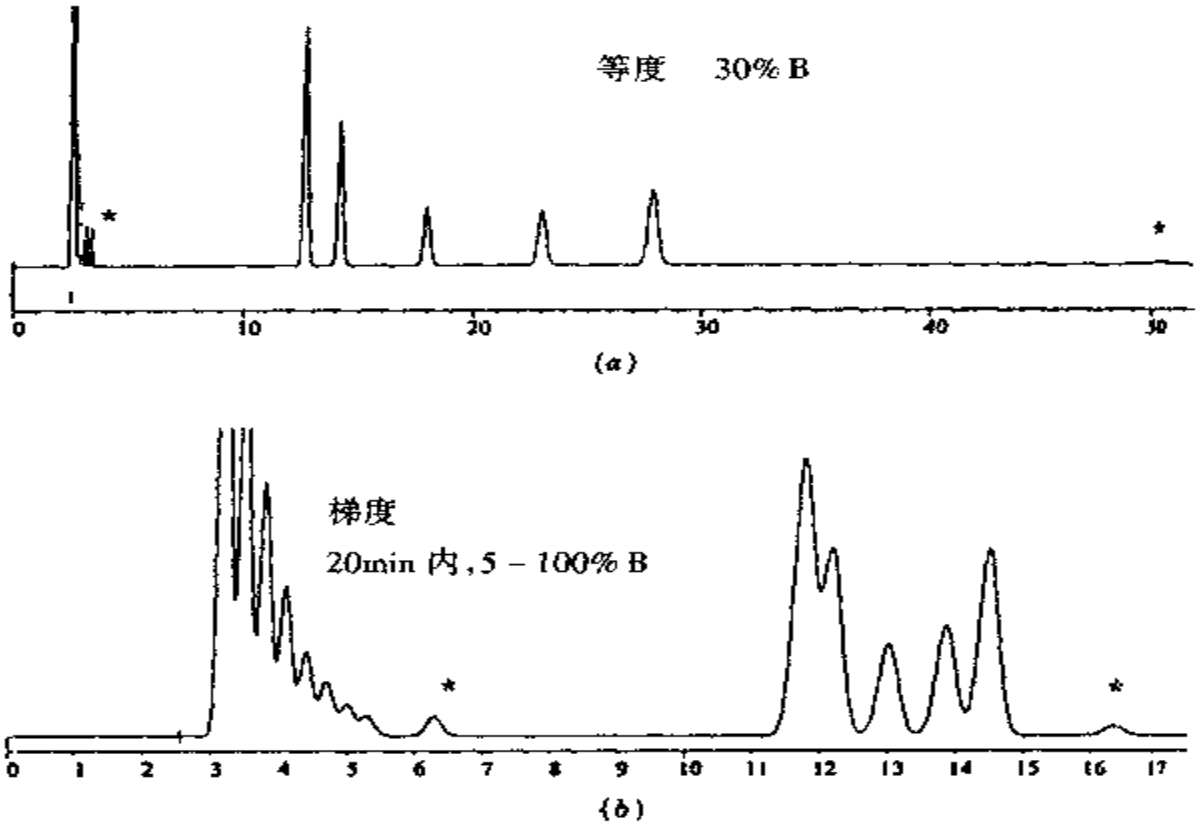


图8－5 样品初始用等度及梯度洗脱的分离

星号标出早或晚流出的小峰。

柱再生变慢，分离重现性下降。因为许多极性溶剂（如硅胶作为柱填料时的丙醇）的保留极强，用非键合硅胶柱的正相分离也有相似问题；见 6.8.4.1 节中的“溶剂分层”。

8.2.1.6 梯度洗脱的替代方法 有时，即使样品保留值范围超出 $0.5<k<20$，仍是采用等度洗脱较好。用极性较强的反相柱（如氰基柱）通常可以缩小保留值范围。极性的弱保留组分易与强极性固定相发生作用，而非极性组分与其作用较弱。图 6－11 为该现象的示例。也有研究表明采用 THF 作强溶剂时，能比含甲醇或乙腈的流动相减小保留值范围。对于某些样品，通过柱切换（见 4.6 节）代替梯度洗脱也很方便[13]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

8.2.2 梯度洗脱用于方法建立

当对组成未知的样品进行 HPLC 方法建立时，即使最终分离拟用等度洗脱首先采用梯度洗脱试验仍有以下益处：

1. 初始梯度洗脱分离可以近似估计出样品的保留值范围，为后续实验应该选用等度或梯度洗脱提供必要的依据。通过最初的梯度分离可识别那些不适于反相 HPLC 的保留极弱或极强的样品（见图 9－1 *c*，*d* 和相关的讨论）。

2. 若等度洗脱是较好选择，初始梯度实验可为进一步实验提供最佳% B 的估计值。若梯度洗脱更合适，则初始实验可为下一步的梯度洗脱估计出开始和终止% B 的最佳值；见图 8－6，表 8－1～8－3 及相关的讨论。

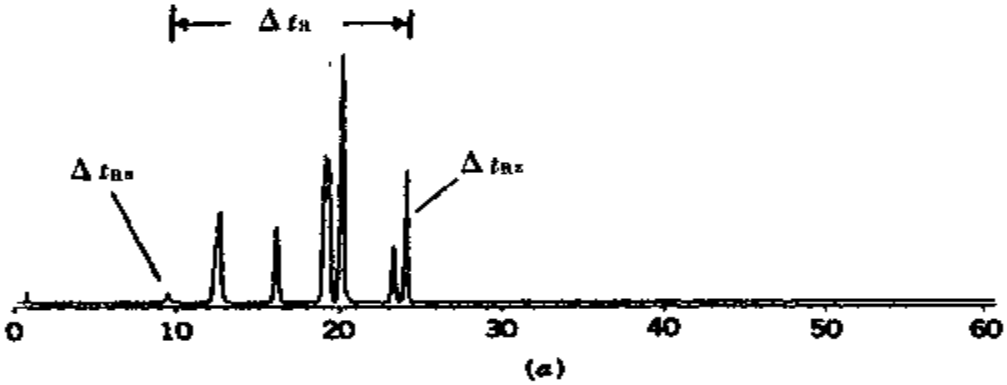
3. 初始梯度洗脱实验可以使整体样品分离更好、更快（与等度分离相比），对方法建立极为有利（见图 8－3）；初始实验中能分离出的峰数越多越好。

4. 初始梯度实验遗漏早与晚流出的低浓度组分的可能性不大；如图 8－5 中假想的分离，其中标有星号的被测物峰，在等度洗脱中很可能被遗漏。

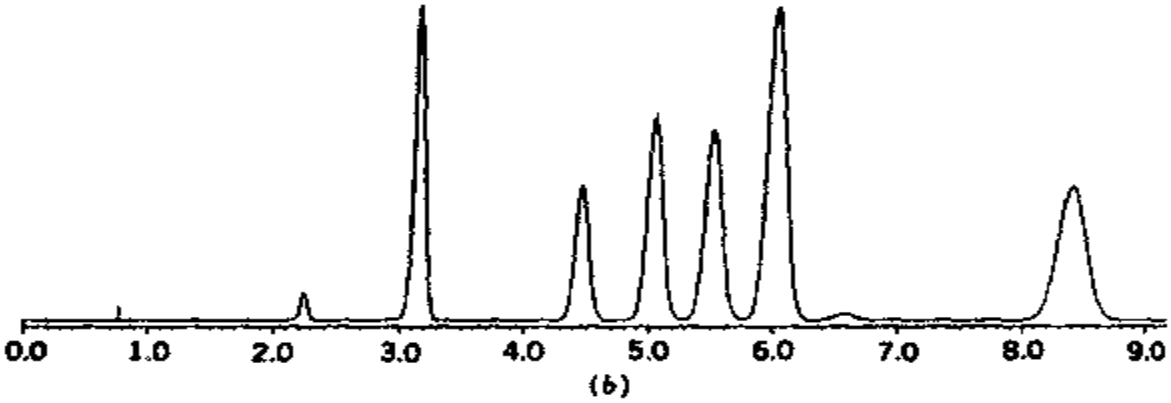
应用初始梯度实验以指导进一步的 HPLC 方法建立见文献 14 的论述及图 8－6*a*。较好的梯度条件为：15×0.46cm 柱，5－100% 乙腈，梯度时间 t_G = 60min，流速 2mL/min（采用其它柱长，溶剂，流速也可以）。若初始实验中大部分样品峰拥挤于 t_0 附近，则样品亲水性太强，不适合反相分离。若谱图中未出现样品峰，或者因检测器响应较差（见第 3 章）或者样品疏水性太强，也不适合反相分离。无论哪一种情况，均需采用其它分离模式；见图 9－1*c* 与 *d* 的示例与讨论。

8.2.2.1 用等度还是梯度分离？ 如图 8－6*a* 的色谱图所示，最早流出峰晚于 2 倍 t_0，晚流出峰早于梯度结束，表明反相 HPLC 适于该样品。下一步则需考虑采用梯度还是等度洗脱方式

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn



60min 梯度，5→100% 乙腈－水梯度；



37% 乙腈－水等度分离。

图 8－6　HPLC 方法建立中初始梯度洗脱的应用

取代苯胺样品[14,15]；条件：15×0.46－cm 柱；2.0ml/min；35℃。

最合适。可以通过谱图中标出的初峰和末峰的保留时间（图8－6*a*中的 t_{R1} 和 t_{R2}）确定。如果我们限定保留时间差 $\Delta t_R = t_{R2} - t_{R1}$，则比值 $\Delta t_R / t_C$ 可以决定等度分离是否可行。最大允许 k 值范围为 $0.5<k<20$，此时 $\Delta t_R / t_C$ 应小于 0.40，也就是说，该样品保留值范围应小于梯度时间的 40%。表 8－1 根据 t_{R1} 观测值，方便、准确地总结了（等度洗脱）t_{R2} 的允许值。图 8－6*a* 中，首峰和末峰的保留时间分别为 9.5min 和 24.5min（$\Delta t_R / t_C = 0.25$）。由表 8－1 和首峰 9.5min 的保留时间，只要末峰保留时间小于 32min，等度洗脱即可行。图 8－6*a* 为这种情况下进行等度洗脱的示例。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 8－1　基于初始梯度实验确定等度分离是否可行[a][14,15]

t_{Ra}(min)[b]	如下 k 值范围内允许的 t_{Rz}值(min)[b]	
	$1 < k < 10$	$0.5 < k < 20$
<1.5	c	c
2	8	17
3	12	21
4	14	24
5	16	26
7	19	29
10	23	33
15	29	38
20	35	44
25	40	49
30	45	54
35	50	59
40	55	64
>40	d	d
不确定度[e]	±3min	±5min

[a] 见图 8－6a，条件 15×0.46cm 柱，60min 梯度，5→100% ACN－水，2ml/min；
当不能确定是否需要梯度洗脱时，推荐采用这些条件

[b] t_{Ra}＝分离中首峰的保留时间，t_{Rz}＝分离中末峰的保留时间

[c] 反相分离中样品可能保留不足；见 9.2.2.3 节

[d] 反相分离中样品可能保留太强；见 9.2.2.3 节

[e] 估计这些值的不确定度

即使有时等度洗脱可行(因为 $0.5<k<20$)，但用梯度洗脱或许会更好。在 6.3.1 节中，我们曾指出改变%B(相当于改变 k 值)会使选择性发生改变，因此对某些样品而言，达到充分分离可能更容易。但是，当样品 k 值范围较大(如 $k_z / k_a>20$，k_a 和 k_z 分别为首峰 a 与末峰 z 的等度 k 值)，即使%B 改变很小，也会导致一些峰超出 $0.5<k<20$ 的范围。这即意味着由于所允许的%B 变化有限，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

通过改变%B值，不能使样品分离度改变很大。此时采用梯度洗脱代替等度（为改变 k 和 α），通过改变梯度变化速率而不是%B，可使选择性发生很大改变（见8.3.2节）。只要 $\Delta t_R/t_G>0.15$ 时，最好采用梯度洗脱（改变 k 值和 α）。

8.2.2.2 估计最佳等度条件 如果图8-6a中的实验表明采用等度条件较好，下次（等度）实验的最佳%B值则可由表8-2确定。梯度分离中末峰的保留时间 t_{RZ} 可用于估计最佳%B值，该值在样品的等度分离中可使末峰的 k 值较理想。例如图8-6a，$t_{Rz}=24$min，由表8-2可知15×0.46cm柱，流速2mL/min，梯度时间60min，末峰 $k=10$ 时，预测的流动相组成为37%B。图8-6b为该样品实际的等度分离（37%B）结果。如所期望，该分离的 k 范围可以接受（$2<k<10$）。

表8-2 由梯度洗脱中末峰保留时间 t_{Rz} 估计出的等度运行的%B(ACN)值[a][14,15]

t_{Rz}(min)	等度运行中末峰 k 值对应的%B估计值		
	$k=5$	$k=10$	$k=20$
5	6	0	–
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	62	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	–	100	94

[a] 条件：15×0.46-cm柱，60min梯度，5→100%ACN，2mL/min。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

8.2.2.3 估计最佳梯度条件 如果表 8－1 实验表明样品更适于梯度条件，可由表 8－3 估计分子量小于 2000Da 样品的初始和终止%B 的最佳值。例如，一分子量低于 2000Da 样品，假设首峰的保留时间为 10min，末峰为 40min，由表 8－3 可知推荐的初始%B 为 11%、终止%B 为 68%。当选好最终梯度条件后，这些%B 值仍应照 8.4.1 节的讨论作进一步调整。

表 8－3 基于初始梯度运行中的首峰(a)、末峰(z)的保留时间 t_R，估计梯度洗脱的起始和终止%B[a][14,15]

t_{Ra}或t_{Rz}[b](min)	起始%B	终止%B[b,c]
5	3	14
10	11	22
15	19	30
20	27	38
25	35	46
30	43	54
35	51	60
40	59	68
45	67	76
50	75	84
55	83	100
60d	–	–

[a] 见图 8－6，条件：15×0.46cm 柱，60min 梯度，5→100%ACN，2ml/min
[b] 首峰 a(起始%B)或末峰 z(终止%B)的保留时间
[c] 对于变化速率大的梯度，%B(终止)必须增加(高达 35%)
[d] 可能需用正相或非水反相 HPLC(见 9.2.2.3 节)

8.3 梯度洗脱的原理

梯度洗脱中，流动相强度(%B)在分离过程中逐渐增加。也就是说随样品迁移过色谱柱中，以 k 衡量的样品各谱峰的保留值是减小的。见图 8－7 中的假想 k 变化曲线。其中假设谱峰 X 是流出

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

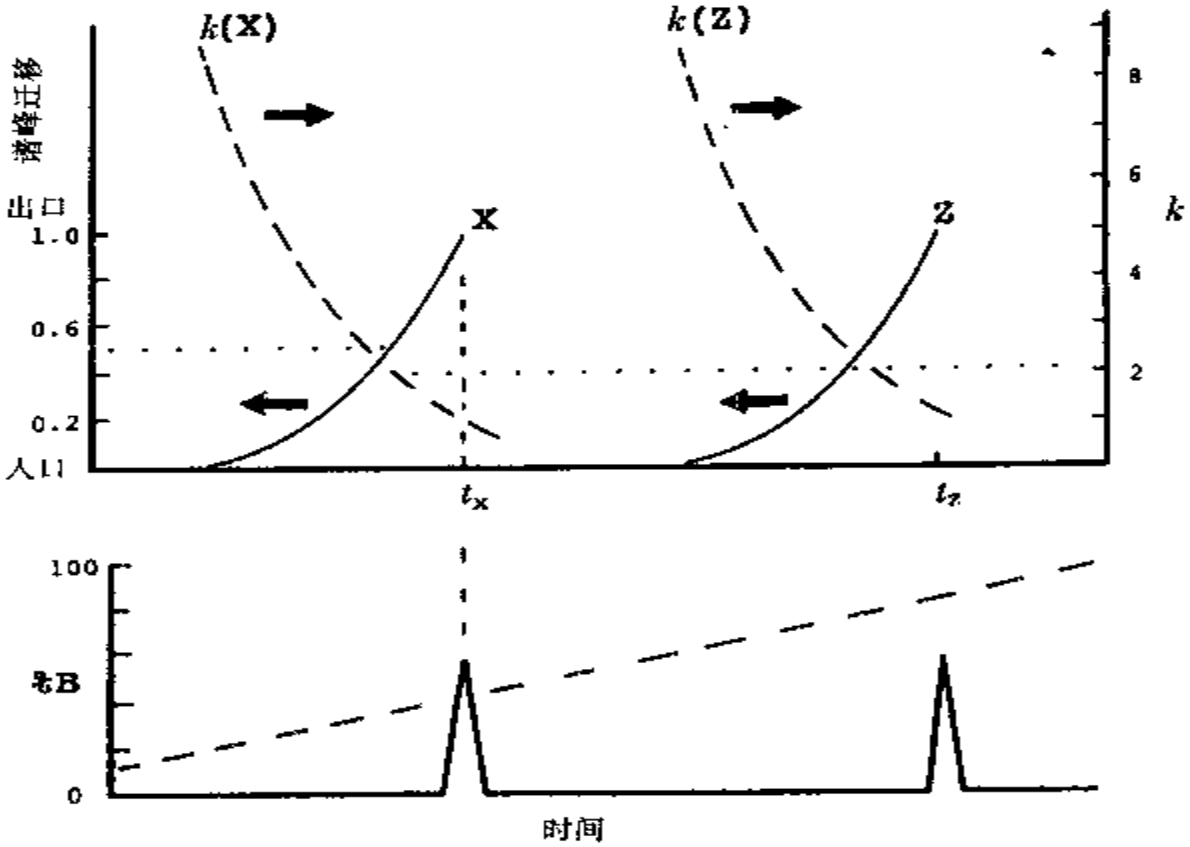


图 8－7　梯度洗脱过程中的峰迁移。

上图:实线为峰迁移;虚线为 k 的即时值。详情见正文。

的第一样品峰,谱峰 z 是末峰。首先考虑峰 X 的行为,标有"X"的实曲线表示该谱峰从柱入口(0.0)到柱出口(1.0)的迁移分数。分离开始时,%B 较低,峰 X 的 k 值较大。因此初始谱峰 X 仍停留于柱入口附近(很少或尚未迁移)。然而一段时间后,%B 值的增加使谱峰 X 的 k 值达足够小($k<10$),以使其开始在柱内移动。图 8－7 中标有"k(X)"的虚曲线表示峰 X 在分离过程中不同时刻的 k 值。随着时间的增加,峰 X 的 k 值继续下降,X 的迁移越来越快。最后,在该峰的保留时间 t_x 时,X 到达柱出口,被检测器检出,在色谱图中被记录为一个峰。

等度洗脱中每个峰的 k 值对于理解与控制 HPLC 的分离条件

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

都非常重要。在梯度洗脱中 k 也同样重要。图 8－7 中 X 的 k 值有多大?答案很简单[3]:梯度洗脱的有效 k 值等于谱峰在柱上迁移至一半路程时的 k 值。图 8－7 中的谱峰 X 见上点线,当峰在柱中迁移一半时的近似值 $k=2$(下点线)。梯度洗脱中 k 的平均值定义为 k^*,与等度分离一样,它决定样品的分离度和峰宽(见式 2.3 和 2.15)。

从图 8－7 也可以看到末峰 Z 在柱入口端停留很长时间,但最终流动相变得足够强,即 $k<10$。峰 z 以与首峰同样的方式迁移,并在保留时间 t_r 时流出,其有效 k 值(k^*)也等于 2。不同峰的 k^* 近似为常数值是反相线性梯度分离(如图 8－7)的主要特征。因此,线性梯度色谱图中每一谱峰具有相似的峰宽,并且不象等度洗脱中常见的那样,开始时样品的分离度较差(见图 8－2 和 8－3)。

8.3.1 梯度与等度洗脱

等度分离中的每个谱峰在穿过色谱柱的过程中,被组成恒定不变的流动相(%B)所包围,由容量因子 k 衡量的某一谱峰的保留值在分离过程中保持不变。但在梯度洗脱中,一谱峰在穿过色谱柱的过程中周围的流动相是改变的,该谱峰的即时 k 值也是在变化的。另外,等度色谱图中被分离的谱峰通常具有不同的 k 值,而在梯度洗脱中不同谱峰的有效 k 值(k^*)却几乎相同。

当梯度洗脱中两相邻谱峰的平均 k^* 值与等度分离中的相同时(其它条件不变),等度和梯度分离中该两个谱峰的分离度也将类似。梯度洗脱中的 k^* 值可通过实验条件进行估计[5]:梯度时间 t_G(min),流速 F(ml/min),柱死体积 V_m(ml,见式 2.6),初始和最终%B 的差值(Δ%B)以及样品化合物的性质 S(见式 8.1)。

$$k^* = \frac{87 t_G F}{V_m (\Delta\% B) S} \qquad (8.1)$$

式 8.1 用于色谱图中洗脱时间不很短的谱峰(在等度与“半等度”

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

条件下)。对于任何峰,洗脱时的 k 值可由下式得出:

$$k = \frac{1}{(2/k^*) + (1/k_0)} \tag{8.1a}$$

其中 k^* 由式 8.1 计算代入,k_0 是梯度开始时的 k 值。对于分子量 100 ~ 500Da 的样品,$S \approx 4$,式 8.1 可近似为:

$$k^* = \frac{20 t_G F}{V_m(\Delta\% B)} \tag{8.2}$$

大分子的 S 值可以为 10 ~ 100 不等,这说明变化速率低的梯度适于这类样品;梯度变化速率低(%/min 值较小,%/min = Δ%B/t_G)补偿了较大 S 值对 k^* 影响(见式 8.1);详见 11.2.1.1 节的讨论。

梯度变化速率对 k^* 和分离效果的影响可由校正的梯度变化速率参数 G_s(corrected gradient steepness parameter)来估算:

$$G_s = \frac{V_m(\Delta\% B)}{F t_G} \tag{8.2a}$$

式 8.2 可改写为

$$k^* \approx \frac{20}{G_s} \tag{8.2b}$$

G_s 为由(%B/min)柱死体积除以流速测得的校正梯度变化速率;也等于单位柱体积的流动相中%B 的变化。只要流速和柱尺寸不变,梯度变化速率的测定结果(%/min = Δ%B/t_G)可用于描述由于梯度变化速率的改变引起的分离结果变压。当流速或柱长改变时,G_s 在研究柱条件(柱长与流速)对分离的影响时的重要性将在 *8.4.3* 节中进一步探讨。

理想的 k^* 值可通过选择合适的实验条件得到。梯度变化速率通常以%/min 表示,故式 8.2 还可表示为:

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

$$k^* \approx 20\frac{F/V_m}{\%/\text{min}} \qquad (8.3)$$

注意，柱型和流速相同时，如梯度变化速率（%/min）下降，k^*值变大。若已知某一样品需用梯度洗脱，选择 $k^* \approx 5$ 进行初始试验较为合适，这样可以兼顾分离度 R_s、能方便检测的峰高和运行时间（见 2.3.1 节）。

图 8－6a（及表 8－1 与 8－2）为采用较大 k^*值（$k^* \approx 17$）的示例。当其它条件等同时，大 k^*值需要较长的运行时间（t_G 值较大），但可使整体分离度有所增加，尤其是有可能用等度分离时（$0.5<k<20$）更适于后续的 RPC 方法建立[15]。

8.3.2 梯度变化速率的影响

由于等度与梯度洗脱的相似性，较大 k^*值的影响应与较大 k 值一样：（1）k^*增加，分离度 R_s 开始先增加，然后达到平衡；（2）谱峰伴随峰高相应减小而展宽；（3）运行时间延长。该说明见图 8－8 中 15 种组分的除莠剂混合物的分离，梯度时间从 5min 增加至 100min，k^*从 0.7（5min）升至 14（100min）。当梯度变化速率从 20%/min 降至 5%/min 再降至 1%/min 时，可清晰分离的峰数由 9 个增至 14～15 个。分离度随梯度变化速率降低（或增加梯度时间）的这种增加，以峰高降低（峰展宽）和运行时间增加为代价，正如等度洗脱中%B 的降低时一样。梯度和等度洗脱中的这些规律简单对比如下：

- %/min（梯度）的增加类似于%B（等度）的增加
- 梯度 k^*的增加（见式 8.2 或 8.3）类似于等度 k 的增加

一旦理解了等度洗脱与梯度洗脱的相似性，梯度洗脱的方法建立几乎同等度分离一样。首先优化保留值（k^*），然后按需要改变选择性（α），最后可调节柱条件（N）以兼顾改善运行时间和分离度。进一步探讨见 8.4 节（亦见 9.5 节）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

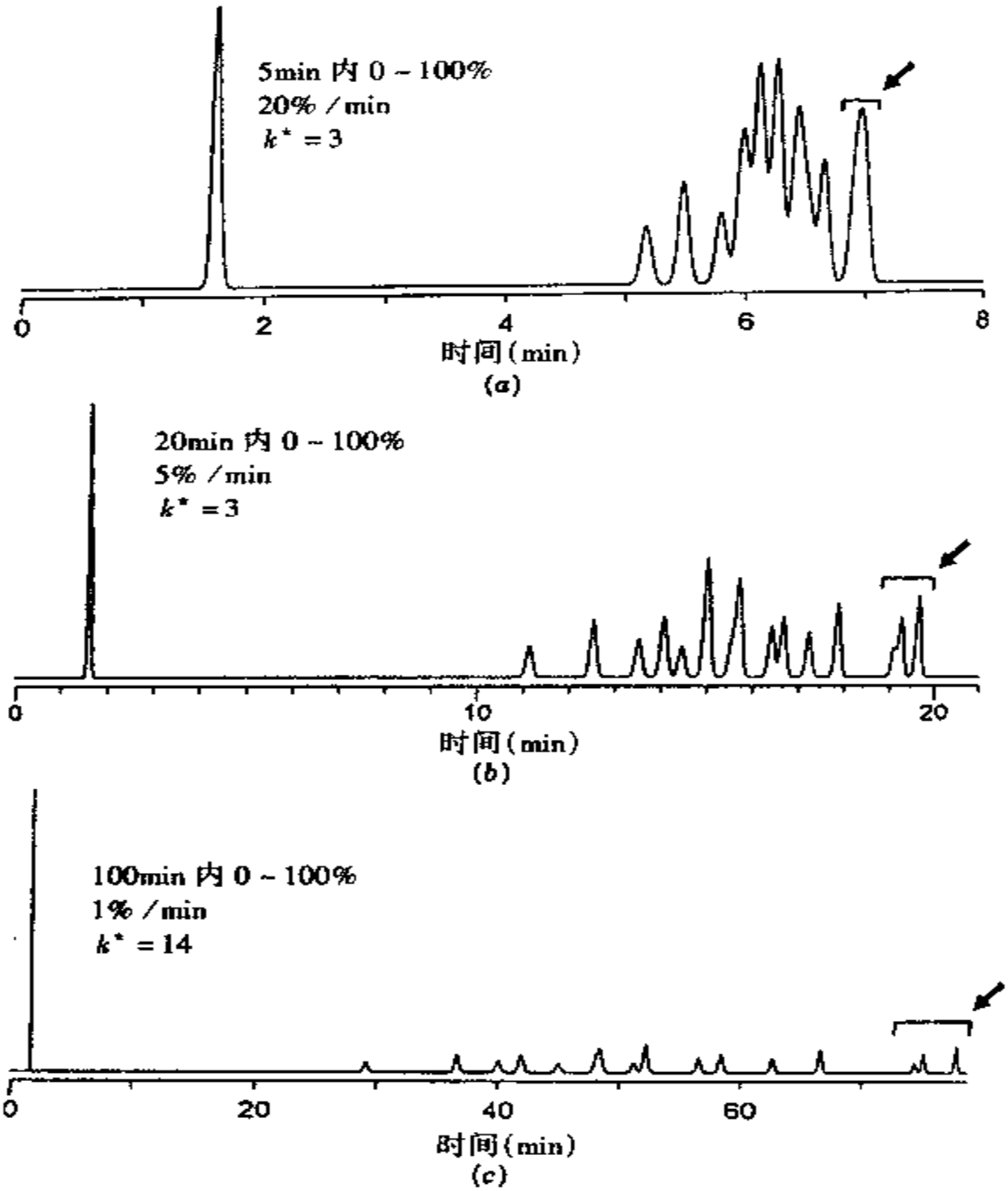


图 8 – 8　一种除莠剂样品的梯度分离与梯度时间或梯度变化速率的关系[12]

样品：九种苯基脲与六种三嗪的混合物。条件：25 × 0.46 – cm 10μm C_{18} 柱；甲醇 – 水梯度如图示；1.7ml/min；室温。箭头所指为色谱图中的最后三个谱峰。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

8.3.3 梯度范围的影响

梯度范围指梯度起始和终止%B的差值。初始的试探性实验可进行一次全范围梯度(即5→100%B)。有些C_8或C_{18}柱对不含有机溶剂的水润湿性很差;每次运行之间需重新进行柱平衡(见8.5.2节)。甚至有报道称色谱柱采用100%水作流动相后,会"显著地降低使用寿命"[16],这些问题可用5%B以上开始梯度加以避免;此处"全范围梯度"可理解为0→100%B或5→100%B。全范围梯度通常较费时,故在方法建立期间应调整起始和终止%B值。图8-8的示例用于图8-9和8-10,以说明梯度范围对分离的影响。

图8-9*a*所示为以2%/min的全范围梯度分离除莠剂样品的示例。第一谱峰的保留时间长达19min(浪费时间!),表明应增大初始%B值。当初始%B增至40%,并保持同样的2%/min梯度时(见图8-9*b*),梯度时间由50min减至30min,但色谱图改变很小(只是所有峰保留时间均有所减小)。色谱图中关键峰对在两次运行中的分离度大致相同:图8-9*a*中R_s = 1.1,图8-9*b*中R_s = 1.0。

当初始流动相组成变为60%B(图8-9*c*)时,分离度明显下降(关键峰对的R_s = 0.7),同时色谱图的前部普遍被压缩。说明尽管该实验可将梯度时间进一步缩短至20min,但60%的初始%B值过大。图8-9*d*的最终实验(初始%B = 50%)合理地兼顾了该样品的分离度(R_s = 0.9)和运行时间。注意图8-9*c*中,当初始%B值增加超过某一数值,色谱图中前部谱峰的间距(与分离度)则会降低,而后面的峰间距仍保持不变。足够大的初始%B值主要影响色谱图中的前部谱峰,使它们的k^*值降低(见式8.1*a*,t_0小);峰变窄;分离度降低。

优化图8-9*d*的分离可考虑调整初始%B值。然而末峰在27min梯度结束之前经18min流出(见图8-10*a*中的箭头;谱图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

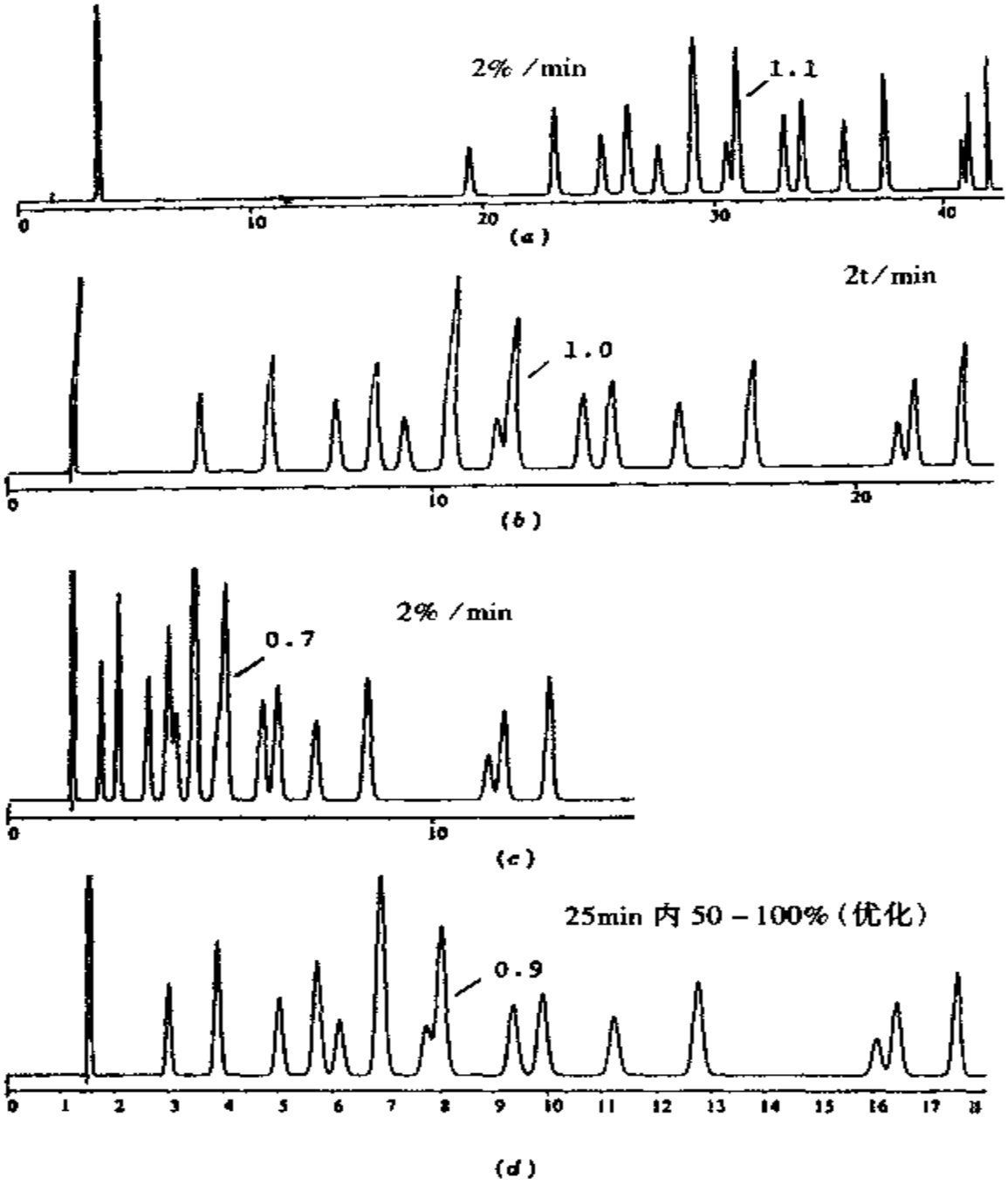


图 8 – 9　一种除莠剂样品的梯度分离与初始流动相组成(% B)的关系
梯度变化速率为 2% /min;其它条件同图 8 – 8。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

同图 8－9 d)。注意，梯度时间为 25min，但梯度完成需 27min，这是由于柱死体积（V_m）的影响。末峰至梯度结束之间的 9min 间隙是多余的；梯度（和分离）可以在 18min 结束。通过保持 2%／min 的梯度变化速率，在 18min（80% B）结束梯度即可；见图 8－10 b。该分离表明初始（50% B）和终止（80% B）流动相组成为最佳选择。

如梯度过早结束（末峰离开柱之前），通常应增加运行时间，并使后面谱峰变宽（检测灵敏度下降）。见图 8－10 c 和 d，终止% B 值分别为 70 和 60%。图 8－10 b 的实验经过 18min 完成，此时可为下一运行开始柱平衡，图 8－10 c 和 d 完成运行分别需要 26 和 70min。显然，不希望在样品末峰流出之前结束梯度。

8.3.4 梯度形状的影响

如前所示，大多数梯度分离采用线性梯度。线性梯度易于优化，应该用于方法建立的初试阶段。然而，非线性梯度有时可适当地改善分离：

1. 同系物或低聚样品，这类样品的分离度一般随化合物分子量和保留值的增大面降低。

2. 色谱图中有些区域具有大量重叠峰或少数峰间距较大

3. 色谱图中不同区域用变化速率不同的梯度时选择性最佳

优化梯度形状可能需要数次实验，非线性梯度的潜在优势通常并不显著。当能方便快捷地采用计算机模拟选择最佳条件时，采用非线性梯度会更有意义（10.2.2 节）。

8.3.4.1 同系物或低聚样品 这些样品采用梯度分离时，后面组分的峰间距往往会减小。见图 8－11 a 中聚苯乙烯样品分离的示例。虽然二聚物～四聚物谱峰可以达到基线分离，而后面谱峰的分离却越来越差。图 8－11 b 中采用凸型梯度表明这些样品谱峰的峰间距更均匀一致。较陡的初始梯度使 k^* 减小（见式

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

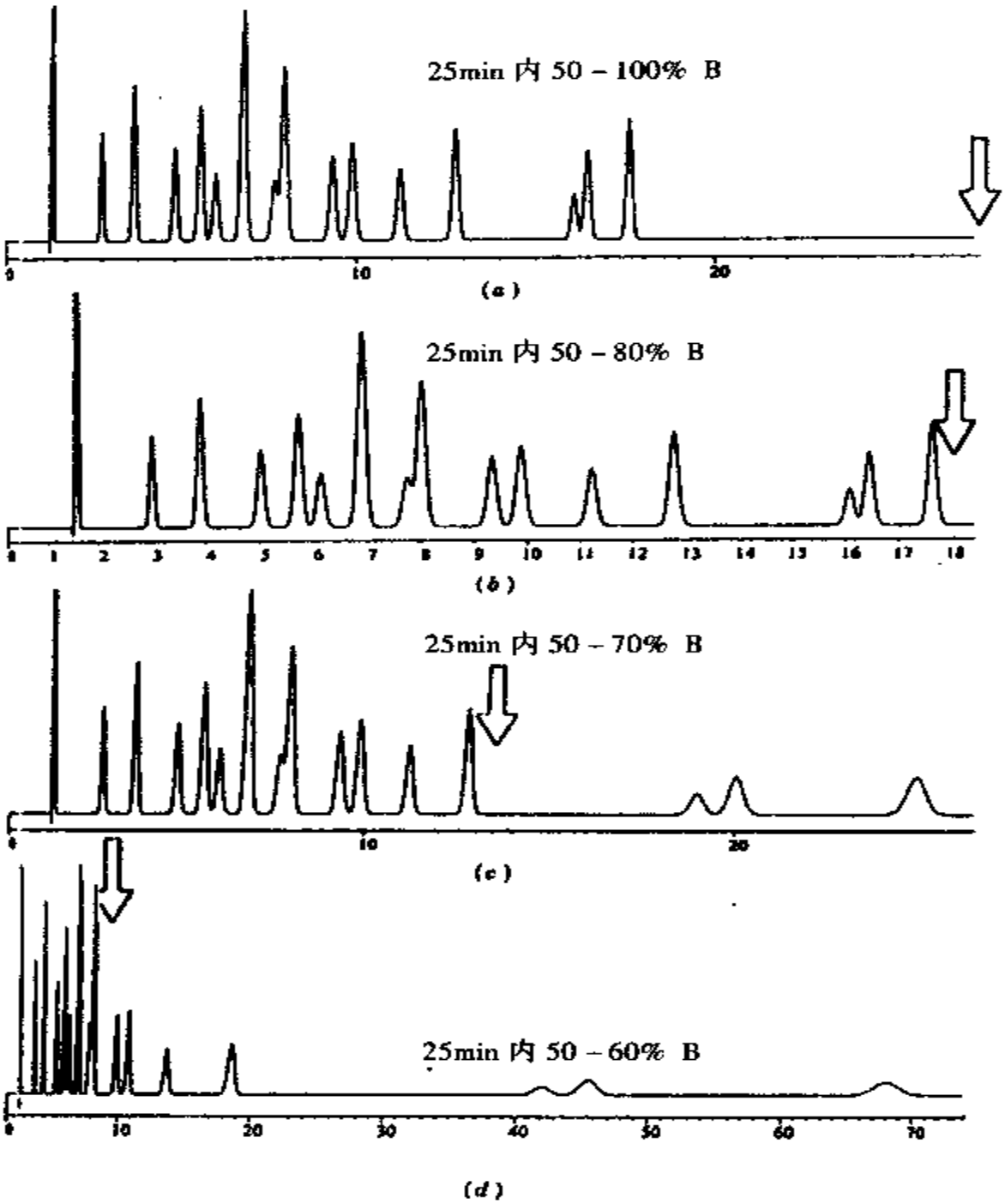


图 8 – 10　一种除莠剂样品的梯度分离与最终流动相组成(% B)的关系
梯度变化速率为 2% /min,其它条件同图 8 – 8。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

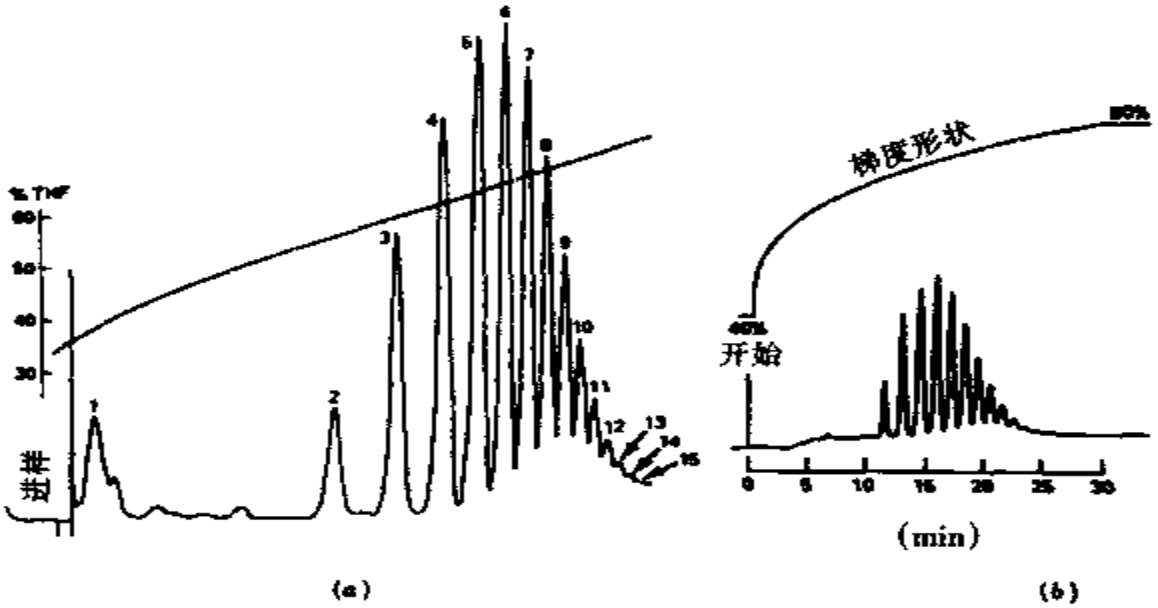


图 8－11　低分子量聚苯乙烯低聚物的梯度洗脱分离

条件如图示：(a)线性梯度；(b)凸形梯度。

8.3)，也使分离度及保留时间降低，而以后陡度较小的梯度又使 k^*、分离度及相对保留值增大。其最后结果如图 8－11b，在大致相同的运行时间中，使整体分离效果略有改善。如图 8－11b 中的曲线梯度会使此类样品中所有谱峰的分离度均等。

图 8－11 中的低聚样品的进一步研究已有报道[18]。已经证明分段梯度(如图 8－1)也能如曲线梯度那样，使这类样品的分离得到相同的改善。只需两段梯度，并且为使分离效果最佳，每段梯度的速度变化都必须进行优化(使第二段陡度较小)。初始 B% 的选择对获得均匀的峰间距也很关键。分段梯度的主要优点是更易于系统地进行优化。对于这种梯度方式以及其它非线性梯度的应用，我们建议最好在试验曲线梯度之前先试用分段梯度。详见文献 18。

8.3.4.2　含组峰的色谱图　这种情况也说明采用非线性梯度是使样品分离度均等的一种手段。即较陡的梯度可用于色谱图峰分离宽阔的部分(以节省时间)，而较平坦的梯度可用于色谱图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

峰重叠拥挤的部分(以提高分离度)。见图 8－12 中 22 种肽样品的梯度分离。图 8－12a 中,线性梯度变化速率(0→47% B)已调整至(0.63% B/min),使关键峰对 9/10,11/12 和 14/15 获得最佳峰间距和最大分离度(见 8.4.2 节)。所得分离足够(R_s=1.3),但运行时间有些长(75min)。

然而,如图 8－12a 所示,峰 15(约 48min)以后的众峰分离间距过大,说明这部分样品可用更陡的梯度分离,以缩短运行时间。通过保持原最佳梯度至峰 1～15 流出,然后增加梯度变化速率以使剩余样品快速流出。从而达到这种缩短运行时间,而不损失样品分离度(R_s=1.3)的目的(图 8－12b)。这样,运行时间缩短至 53min,节省时间 30%。用非线性梯度进一步控制选择性,详见图 8－13d 的说明(8.4.2 节)。

8.4 建立梯度分离

梯度洗脱的方法建立可以通过与等度分离的系统方式同样的步骤进行,因此,已经证明的等度方法建立策略的优点也可同样适用于梯度洗脱。梯度方法建立的步骤可总结为:

1. 以等度分离的相同方式选择初始条件:色谱柱,流动相组成,流速,温度等(见表 1－3);等度方法建立能以强流动相开始(80～100% B),但首次梯度试验却应采用较宽的梯度范围(如 5→100% B)。应先优化初次实验的 k^*(如 $k^*>2$,式 8.2),梯度变化速率不能太陡。

2. 再调节梯度范围以缩短运行时间,去除色谱图开始和结束时无用的空间。

3. 如出现谱峰重叠或运行时间太长,则需改变选择性(α)。

4.(作为备选)考虑采用非线性梯度方式,以进一步改善分离。

5. 优化峰间距后,改变柱条件以改善分离度和/或运行时

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

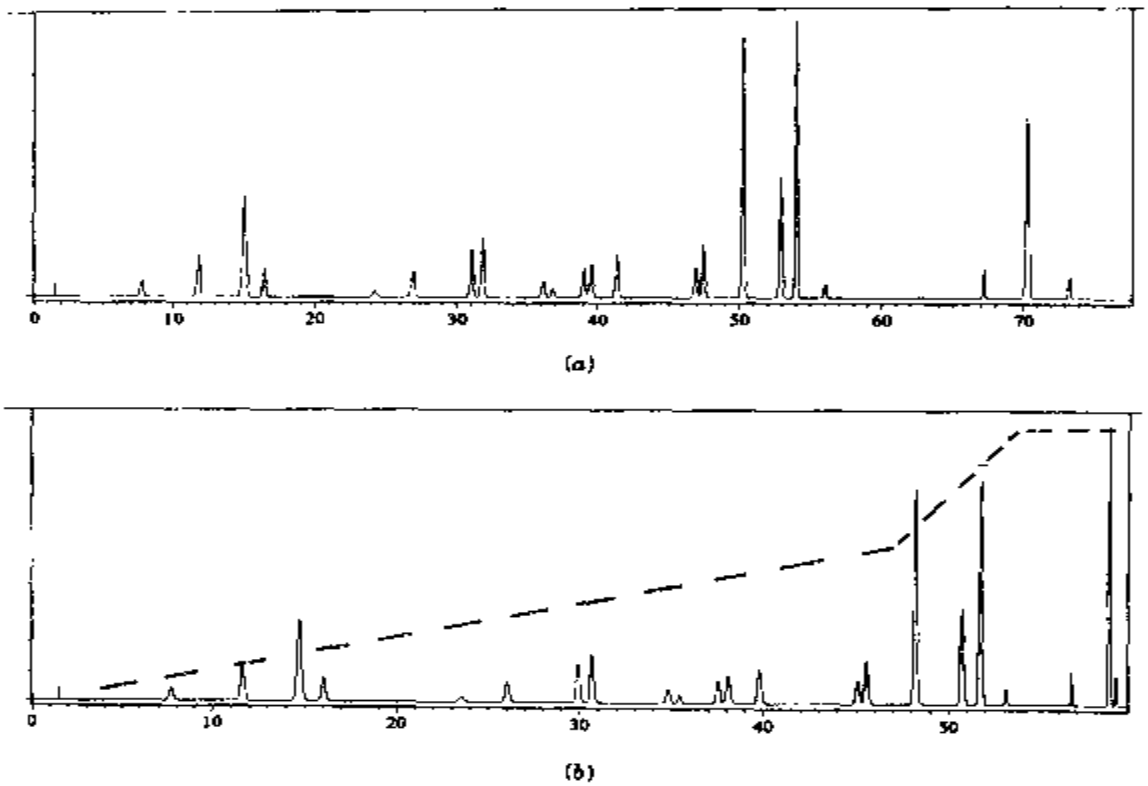


图 8－12　22 组分肽样品(重组人生长激素胰蛋白酶水解液) 的梯度分离[19]

条件：15×0.46－cm C_{18} 柱；乙腈－水梯度，含 0.1% 三氟醋酸；40℃；1.0mL/min。(a) 74min 梯度，0→47% B；(b) 0/48/56min 分段梯度，2: 32: 47% B。

间。

6. 制定平衡柱的最佳方法，并考察仪器差异对分离的影响(见 8.5.1 节)。

8.4.1 选择梯度条件

图 8－8～8－10 所示为选择优化梯度条件的重要步骤。这些实验类似于等度分离中为控制 k 值调整 B% 的方法。

8.4.1.1 梯度变化速率　初始选择梯度变化速率(如图 8－8) 之前应先估计那些能使所有样品峰 $k^* > 2$ 的实验条件(式 8.2)。如已确定最终方法采用梯度洗脱，$k^* \approx 5$ 是良好的首选。色

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

谱柱（以及其 V_m 值）和流速应在进行初次梯度分离之前选定；选择 15×0.46cm、5μm C_8 或 C_{18} 柱、流速 2ml/min 较好。通常，初次分离宜用全范围梯度：[如 5 →100% B(Δ% B = 95)]。因此，式 8.2 中未特殊标记的唯一变量为梯度时间 t_G(式 8.2 假设 S≈4)。解式 8.2 可得到：

$$t_G = 25\frac{V_m}{F}(5\rightarrow 100\%\ B) \qquad (8-4)$$

例如，对于 15×0.46cm 柱，$V_m \approx 0.1\times 15 = 1.5$ml(见式 2.7)。如流速为 2ml/min，$t_G$ 的推荐值为 25×1.5/2 = 19min。

8.4.1.2 梯度范围 如初始梯度实验采用表 8-2 中的条件进行(60min 梯度，5→100% B；15×0.46cm 柱；2.0ml/min；$k^* \approx 17$)，起始% B 与终止% B 的最佳值可由表 8-3 估计出。然后可采用 20min 梯度($k^* \approx 5$)，如图 8-9 与 8-10 通过"试-凑"实验，进一步优化梯度范围。如初始运行之前已确定需用梯度洗脱，小分子(<2000Da)最好先采用 20min 梯度试验。

8.4.1.3 梯度形状 图 8-10*b* 的分离对梯度范围和变化速率进行了初步优化。下面，应考察非线性(即分段)梯度能否进一步改善分离效果。例如，图中尽管未出现色谱图中某些区域峰过于拥挤，而另一些区域相对空旷的情况，但该分离的分离度非常勉强；方法建立的下一步应考察分离条件，以改善峰间距(通过分段梯度可能奏效，见 8.4.2.1 节)。

8.4.2 改变峰间距

在梯度洗脱中改变选择性与峰间距可通过与等度分离相同的方式实现[即通过改变 k 或 k^*(等度洗脱的% B、梯度洗脱的梯度变化速率)，溶剂类型，色谱柱型，pH，HPLC 方法，温度等]。选择哪种条件先进行研究，决定于与第 2、6 与 7 章中等度 HPLC 讨论的相同考虑。尽管这里探讨的是反相梯度洗脱，但其它 HPLC 模式可以采用相同的策略和步骤。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

反相分离中性样品时，用于改变选择性的变量的优先次序排列为：首先是流动相强度（k^*），其次是溶剂类型（乙腈>甲醇>THF），柱型（C_8 或 C_{18}>氰基>苯基），最后是温度。对于离子样品，pH 和温度是控制选择性的重要因素。在梯度洗脱中改变离子对试剂浓度对于离子样品分离的选择性改变也有效。然而由于在梯度过程中柱吸附试剂时平衡缓慢，应避免用离子对梯度洗脱。关于离子对梯度洗脱所需的平衡体积，一些研究[20]表明，低疏水性离子对试剂（如 C_8－或更小的磺酸盐）采用 5～10 倍柱体积的流动相已足够；但对于 C_{12}－磺酸盐则需更长的时间。

8.4.2.1 梯度变化速率 在等度分离中改变%B 可使 k 和 α 发生变化；在梯度洗脱中，可通过改变梯度变化速率 G_s（见式 8.2）达到相当的效果（改变 k^* 和 α）。在等度洗脱中，样品的 k 范围限制了 k 变化，难以将选择性控制在较小范围内。例如，如 $2<k<10$，k 减少的倍数不大于 4（$k=0.5$），增加的倍数也不能大于 2（$k=20$）。因此，对于此样品，k 值至多可改变 8 倍（4×2）。在梯度洗脱情况下，k^*（对所有谱峰大致相同）可在 0.5～20 之间改变，或者说可改变 40 倍，这表明在梯度洗脱中改变梯度变化速率（或 k^*）导致 α 和峰间距的改变可能要比在等度分离中改变%B（k）大得多。另外，通过采用分段梯度，可对色谱图中不同部分的 k^* 进行优化，以使整体选择性和分离度达到最大。因此，通过改变 k 或 k^* 来控制峰间距在梯度洗脱中比在等度分离中有效得多。

有些样品在梯度变化速率改变时峰间距会有显著的变化，有些则很小。图 8－8 中的除莠剂样品在梯度变化速率改变时，其选择性改变并不大。而图 8－13 中的 16 组分的多环芳烃（PAH）则是一个峰间距随梯度变化速率变化的良好示例。对于 7min 的梯度时间（图 8－13a，8.6%/min），关键峰对为 3/4（标有星号），其分离度 $R_s=1.0$。当梯度时间增加至 20min（图 8－13b，3%/min），谱峰对 3/4 的分离度增加（$R_s=1.5$），与所期望的平坦梯度情况相吻

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

合。但此时关键峰对为 14/15(标星号者),$R_s=0.9$。因此,平坦梯度时谱峰 3 和 4 的分离最佳,而峰 14 和 15 则更适于较陡梯度。

在等度洗脱中,关键峰对发生改变的两份色谱图(条件改变时)表明中间条件可使整体分离最佳(关键峰对的 R_s 最大)。图 8-13 中梯度洗脱的情况也是如此。中间的梯度时间(图 8-13c 中的 12.5min)使关键峰对 3/4 和 14/15 的分离度更大:$R_s=1.4$,这一分离效果明显优于图 8-13 *a* 或 *b*。在改变梯度变化速率时,很多样品的峰间距会发生变化,类似于图 8-13 的情况[1,17-19,21,22];类似的等度示例(见 6.3.1,7.3.2.2 与 7.4.4.1 节)进一步支持这一结论。最后,在梯度洗脱中,改变梯度变化速率通常是改变选择性最有效的方法。故应在探讨其它改变选择性的条件之前,先行试验。

图 8.13 色谱图中先后出现的两对关键谱峰,说明使用分段梯度可使选择性进一步改善。初始的平坦梯度可用于优化谱峰对 3/4 的分离,而后面较陡的梯度可用于优化谱峰对 14/15 的分离。图 8-13 *d* 中的分离说明在几乎相同的运行时间内分离度有了进一步的增加($R_s=1.7$,图 8-13 *c* 中为 1.4)。由于优化梯度变化速率和形状,图 8-13 *b*($R_s=0.9$,运行时间 18min)与图 8-13 *d*($R_s=1.7$,运行时间 13min)相比,使分离发生如此大的改善是值得注意的。

图 8-13 *d* 中的分段梯度对于其它情况是否有效,取决于样品分子量和色谱图中两对或多对关键峰的相对位置。当关键峰对紧挨在一起时,分段梯度不很有效,尤其对于分子量低于 1000Da 的样品。在为了改善选择性和分离度而进行分段梯度方法建立之前,必须首先了解不同梯度变化速率情况下,两对或多对关键峰的最大分离度。此时,应选择合适的初始分段梯度,以使先流出关键峰对的分离度较好。在此峰对即将离开色谱柱时,改变梯度变化速率以使下一对关键峰也获得合适的分离度(后续的关键峰对也应

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

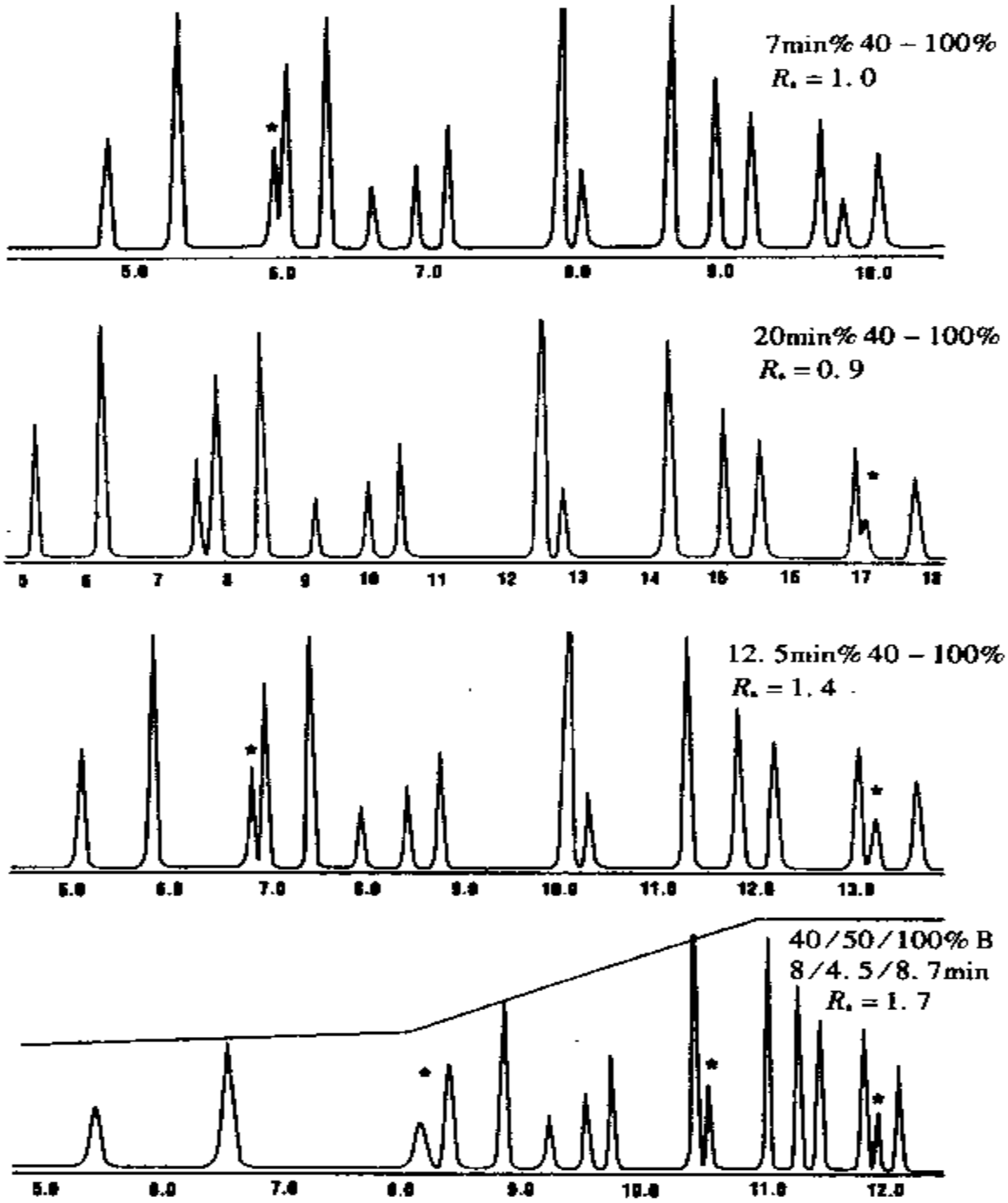


图8－13　多环芳烃样品的梯度分离与梯度变化速率的关系[21]

样品：由萘至䓛并芘的16种化合物。条件：15×0.46cm Supelco LC－PAH（反相）柱；乙腈－水梯度；2ml/min；35℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

如此处理)。关于此问题的深入讨论及优化分段梯度的实用规则,详见文献 18 和 23。

8.4.2.2 溶剂类型 改变有机溶剂为等度分离中改变选择性的一种常用手段,尤其对于中性样品(见第 6 章);在梯度洗脱中改换有机溶剂也可获得类似效果[24,25]。图 8-14 所示为苯酚混合物的分离。图 8-14*a* 中采用 0→100% 乙腈-水梯度,只有峰 8/9 发生重叠。改善峰 8/9 的分离度需要改变选择性,以甲醇代替乙腈重复该分离(见图 8-14*b*)。因图 8-14*a* 分离中 18min 以前无峰,第二次梯度(图 8-14*b*)以 20% 甲醇-水开始(而不是图 8-14*a* 中的 0% 乙腈)。现在谱峰 8/9 的分离得到改善,但谱峰对(2/3)又成为关键峰对。

以甲醇和乙腈作溶剂的等度分离,其色谱图可能类似于图 8-14*a* 和 *b*(即关键峰对发生变化)。采用等度分离时,可用甲醇与乙腈的混合物(50:50)作流动相,以获得比图 8-14*a* 和 *b*(稍微)好些的分离效果。在图 8-14 的梯度分离中,可用相似的办法(即 B 溶剂采用甲醇与乙腈的混合物)。然而更好的办法表明前面峰对(2/3)适合于乙腈洗脱,而后出峰对(8/9)适于甲醇洗脱。该实验表明运行期间应采用增大甲醇/乙腈比例的梯度。见图 8-14*c*,样品的整体分离效果明显优于前面的两次实验。这时,峰对 2/3 的分离效果与采用乙腈-水梯度时一样好(图 8-14*a*),而峰对 8/9 的分离效果与采用甲醇-水梯度一样好(图 8-14*b*)。对于某些样品,这种使色谱图不同部分的选择性发生不同变化的梯度洗脱方法非常有用,类似的示例见文献 25。

8.4.2.3 其它条件 许多研究报告显示梯度洗脱选择性的改变与其它条件有关(主要针对离子样品):pH[26],离子对试剂浓度(见图 11-11),温度[27];亦见图 11-9。这些条件及其它条件的优先次序见图 7-7 中的等度分离推荐表。当等度和梯度洗脱中的选择性效果类似时,溶剂强度选择性(k^*)于梯度洗脱中比等度分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

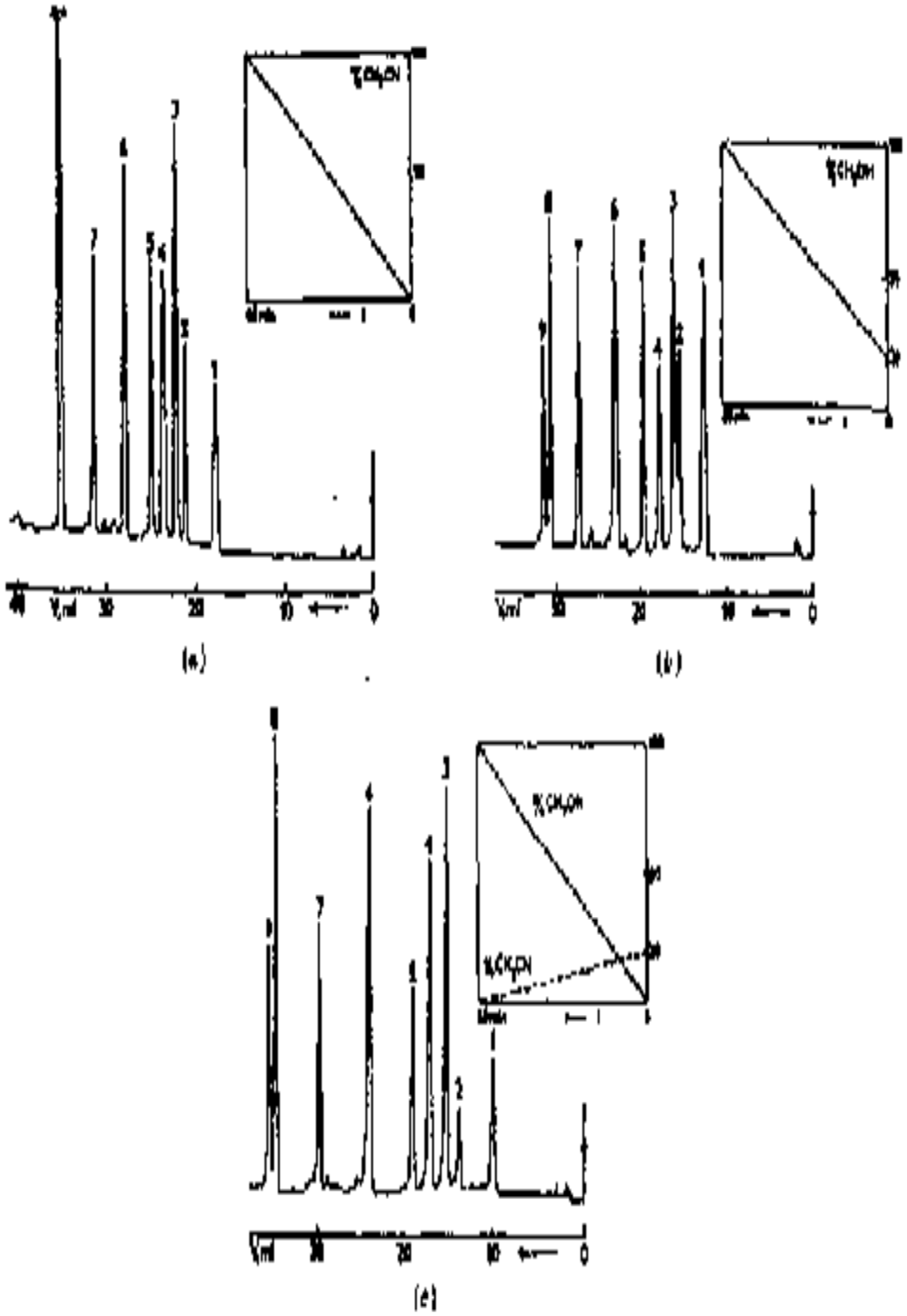


图 8－14　溶剂类型对梯度洗脱分离的影响[94]

样品：苯酚混合物。条件：30×0.42cm C_{18} 柱；梯度如图示；1.0ml/min；室温。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离中重要得多。在梯度洗脱中使用缓冲液和离子对试剂时，需比等度洗脱更加当心。某些缓冲液在高%B 流动相中的溶解度较小；而且当%B 改变时离子对试剂的吸附会发生变化（见图 7－13，8.5.2.2 节）。

8.4.3 调整色谱柱条件

当针对参数 k^* 和 α 优化了保留值以后（包括可能采用分段梯度），再改变柱长、固定柱颗粒大小和流速等柱条件，还可进一步改善分离。由于等度分离中，改变柱条件对 k 无影响，所以可以改变柱条件（如柱长），而无须担心 k，α 的改变。但梯度分离却非如此，由于 k^* 依赖于柱尺寸和流速（见式 8.2）。因而，如仅改变柱长或流速，分离效果将在两个不同方面产生影响：(a)柱塔板数 N 将会按所预测发生改变（见 2.3.3.2 节），但(b) k^*（或 α）也会改变。流速改变的影响见图 8－15 所示。

图 8－15a 的两色谱图中一组峰（6 个，箭头所示）分别在图 8－15b 中放大示出（即整个色谱图的一部分）。流速由 0.5ml/min 变为 1.5ml/min 时（梯度时间不变）使峰间距产生很大改变：峰 5 和 5a 完全重合，峰 6 和 6a 开始分离，峰 6b 和 7 的位置发生颠倒。通过改变梯度时间（如图 8－13），选择性可得益于图 8－15 中的这些改变，而且这通常是最佳方案。然而，如在改变柱条件之前优化 k^* 和 α，则在改变柱条件时必须保持 k^* 值恒定。否则，N 所获得的 N 改善可能由于 α 的损失而逊色。

k^* 的恒定需保持 $G_s=(V_m/F)(\Delta\%B/t_G)$ 不变。即在改变流速（F）和/或柱长（V_m）的同时调整梯度时间 t_G，这样做并不难。如柱长增加 x 倍，梯度时间应同样增长 x 倍。如流速减小 x 倍，则梯度时间也应同样增大 x 倍。改变流速或柱长对梯度洗脱运行时间的影响（保持 k^* 不变）与等度分离时相同（即柱较长或流速较慢时，运行时间会较长）。

图 8－16 和表 8－4 所示为以图 8－8 中除莠剂样品为例，保

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

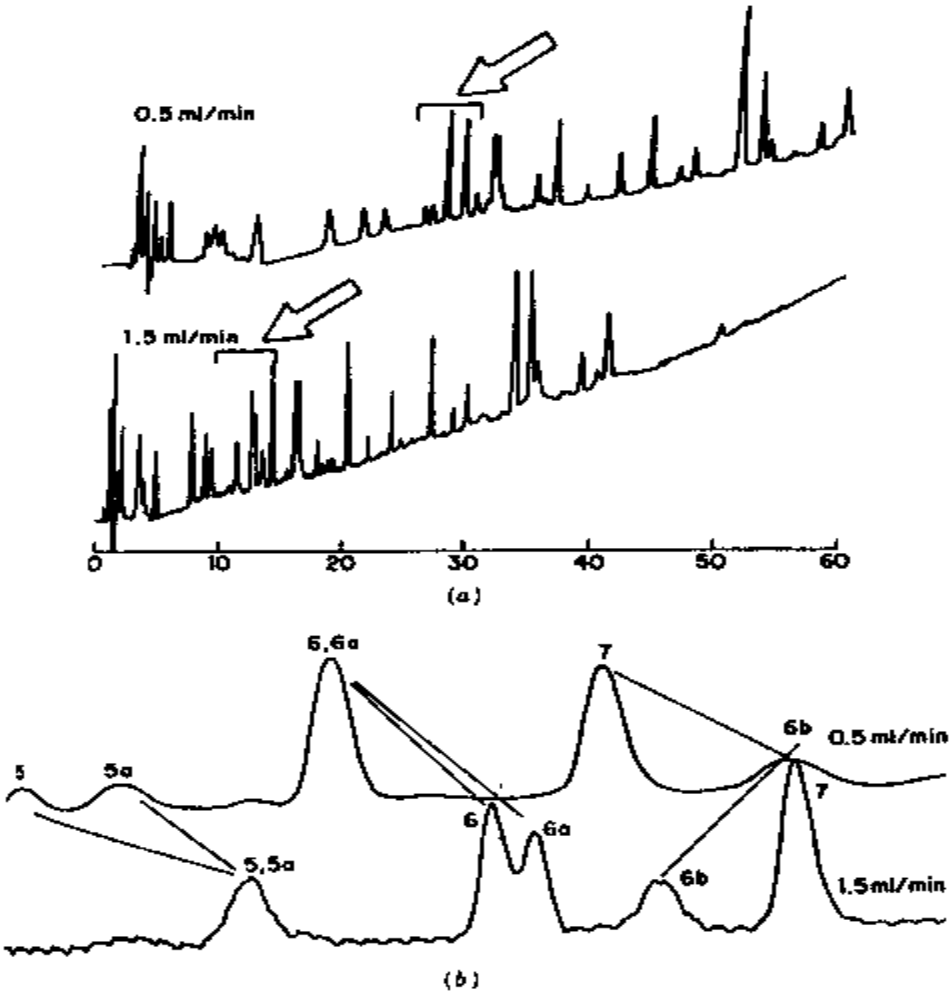


图 8－15　改变流速对梯度洗脱选择性的影响[28]

样品：肌红蛋白的胰蛋白酶水解物。条件：8×0.62cm C_8 柱；60min 梯度，10→70% 乙腈－水梯度［(a) 与 (b) 中均含 0.1% 三氟醋酸］；流速如图示；35℃。(a)全部谱图；(b)(a)中两色谱图的部分放大图(如箭头所示)。

持 k^* 和选择性不变时的柱条件优化。梯度条件优化后(图 8－16a；25min 梯度，40→77% B，2ml/min)，分离度仍然较差：R_s = 1.1(关键峰对标有星号)。期望流速由 2ml/min 降至 1ml/min 时可改善分离度。然而为保持 k^* 恒定，梯度时间必须同时由 25min 增至 50min。图 8－16b(R_s = 1.3)中，加倍的运行时间，产生分离度的增加非常小。通常采用细粒径柱(<10μm)改变流速时，情况往往

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

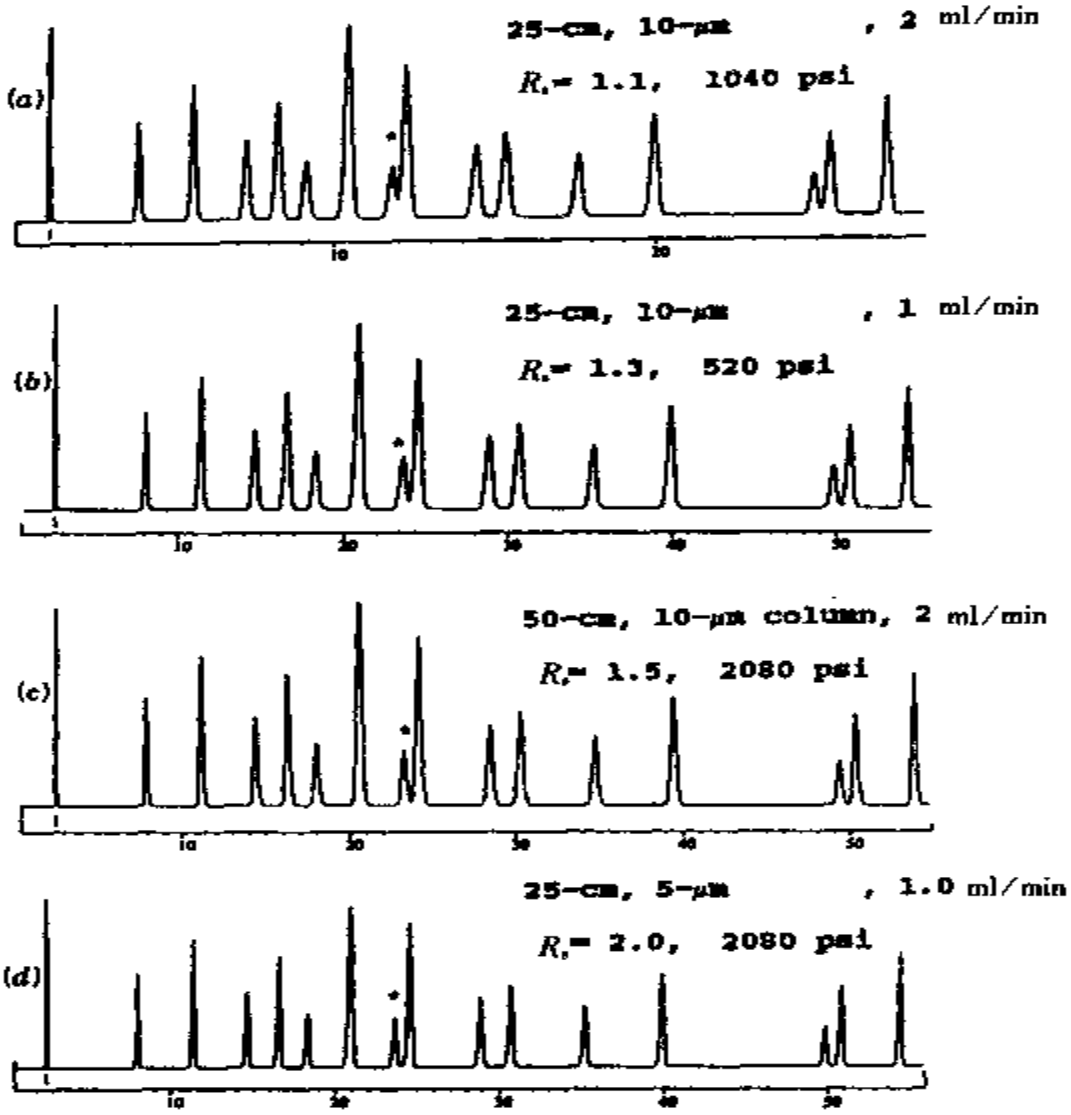


图8－16 除莠剂样品的梯度分离与柱条件的关系

条件如图8－8，但梯度为 40→77% B(0.7%/min)与图中所示，另见表8－4。

如此。增加柱长通常更有效。图 8－16*c* 示出了 50cm 柱，流速同图 8－16*a* 时的分离效果。梯度时间必须再增至 50min 以保持 k^*不变，但现在分离度可勉强接受(R_s = 1.5)。

此时，可以考虑减小固定相粒度，如 10μm→5μm。图 8－16*d* 为这种分离结果，同时降低了流速以维持可接受的柱压。梯度时间

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 8－4　k^*保持不变时，除莠剂样品的梯度分离与柱条件的关系[a]

色谱柱条件			分离		
柱长(cm)	粒径(μm)	流速(mL/min)	R_s	时间[b](min)	柱压(psi)
25	10	2.0	1.1	25	1040
25	10	1.0	1.3	50	520
50	10	2.0	1.5	50	2080
25	5	1.0	2.0	50	2080

[a]图 8－16 的分离，柱条件如表；其它条件如图 8－8，除了梯度为 40→77%B
[b]指梯度时间 t_G

50min 时分离度非常好（$R_s=2.0$）。注意如仅改变微粒大小则不需要改变梯度时间以保持 k^*恒定。由于 5μm 微粒柱需要合适的压力，所以需降低流速，反而需延长梯度时间。

梯度洗脱中，选择改变哪种柱条件，可参考对等度分离的讨论（见 2.3.3 节）。无论是梯度还是等度情况下，提高 N 值均以延长运行时间为代价。为使分离效果有所改善（10～20%），增加运行时间并不重要，而降低流速则非常方便。当需要较大增加 R_s 时，一般首选是增加柱长。若必须增加分离度，而不增加运行时间和柱压，唯一选择就是减小固定相粒度（同时降低柱长和/或流速）。当更换柱子（柱长或微粒大小）时，应考虑到柱填料批次之间的微小差异会导致选择性发生不利的变化（见 5.2.4 节）。选择性优化后，如分离度大于所需要，可增加流速和/或减少柱长，降低过量的分离，换取较短的运行时间。

8.5 实验问题

梯度洗脱同样会遇到等度洗脱中对检测、重现性和精密度等不利的实验问题。梯度洗脱时流动相组成在运行中不断发生改变，因此会引起更多的影响和潜在的问题，其中一些已在本章开始处列出。本节中将对这些影响作进一步讨论。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

8.5.1 设备对分离的影响：系统的滞留体积

8.5.1.1 设备差异 用于梯度洗脱的仪器有两种：高压混合系统和低压混合系统，如图 8－17*a* 中所示。高压混合系统在泵后（高压状态下）立刻混合 A 溶剂与 B 溶剂，而低压混合系统在泵前混合溶剂。在高压混合（HPM）系统中，溶剂一经混合，直接输送至自动进样器或进样阀。对于低压混合（LPM）仪器，溶剂先通过泵和有关组件，然后才到达进样器。

梯度设备的设计对分离的主要影响在于“滞留”体积 V_D，如图

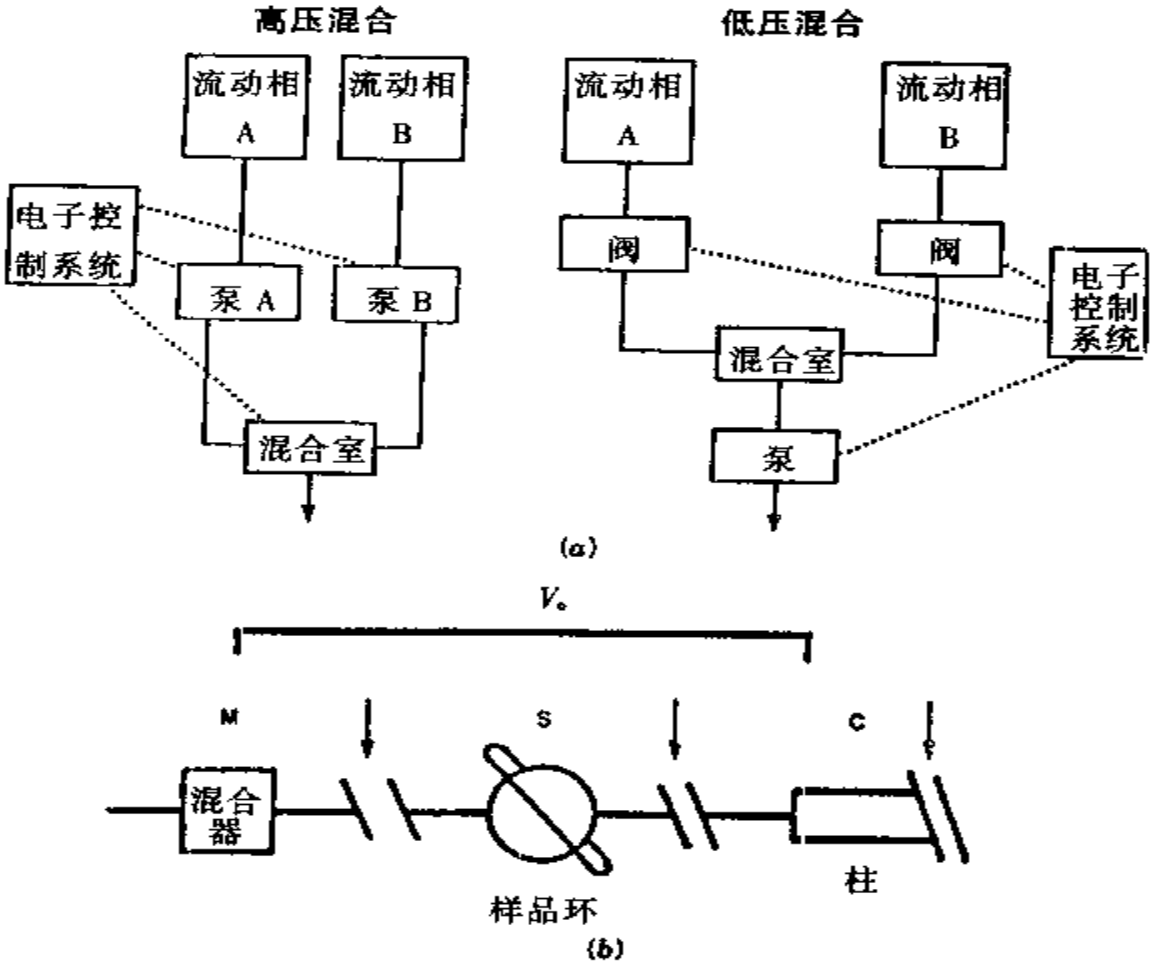


图 8－17 不同的梯度设备设计及其滞留体积 V_D[29,30]

M，混合器；S，进样器；C，色谱柱；箭头表示其它组件，如泵、在线滤器等。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 8－5　一些代表性的 HPLC 梯度系统的滞留体积 V_D 值[29]

系　　统	V_D(ml)	
	无自动进样器	带自动进样器
Beckman System Gold	2.3	
Bischoff[a]		1.0
DuPont 8800	5.5	
Hewlett－Packard1090	0.5	2.3
IBM LC/9533	4.5	
Perkin－Elmer Analyst[b]	3.4	3.9
Perkin－Elmer Analyst[c]	6.1	6.6
Shimadzu[d]		3.1
Spectra－Physics8700	4.5	
Varian Star[e]	1.0	
Waters Model 501	5.0	8.0[f]

[a] 2250 型泵，附 Alcott 2250 型自动进样器
[b] 620 型泵，附 ISS 100C 型自动进样器；除去混合管线
[c] 同 b，附混合管线
[d] LC 10AD 泵，ICI AS2000 型自动进样器
[e] 9010 型泵，9090 型自动进样器
[f] WISP 712 型泵。

8－17b 所示。其它条件相同时，LPM 系统的 V_D 值较大。表8－5总结一些代表性的 HPLC 设备的滞留体积值。自动进样器通常会大大增加 V_D。包括自动进样器在内，V_D 值范围一般为2～8ml，但管路安装不好的设备滞留体积值会超过10ml。注意，进样环体积也增加滞留体积，所以如进样环改变，HPLC 系统的 V_D 值也会改变。

8.5.1.2　不同 HPLC 系统分离效果的差异　不同设备滞留体积对梯度分离时的主要影响是使样品保留时间发生变化（变化量与滞留时间 $t_D = V_D/F$ 有关）。增加的滞留体积相当于在梯度开始时增加的等度延迟。这一影响见图8－18a 所示的假想分离。如滞留体积为0.5mL，流速1ml/min，滞留时间 $t_D = 0.5$min，末峰在

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

22min 时离开柱子。采用 $V_D = 10ml$，$t_D = 10min$ 的系统进行同样分离，末峰在 31.5min 时离开柱子［即保留值增加量(9.5min)与 t_D 值改变相等］。10ml 系统的初始峰保留值会更长，但保留时间差异(与 0.5ml 系统相比)不那么大(≈3min)。另外，采用 10ml 系统分离时，初始峰的分离度更好一些。图 8－18*a* 所示为采用 V_D 值不同的 HPLC 系统进行梯度分离时，出现的典型情况。

对某些样品来说，图 8－18*a* 的结果伴有色谱图前部的峰间距和分离度改变。图 8－18*b* 和 *c* 所示说明了不同样品的这种效果。在图 8－18*c* 中，采用 $V_D = 5ml$ 的系统分离谱峰 1～4 均达到基线分离。但是，采用滞留体积不同的设备(0.5 或 10ml)会导致峰

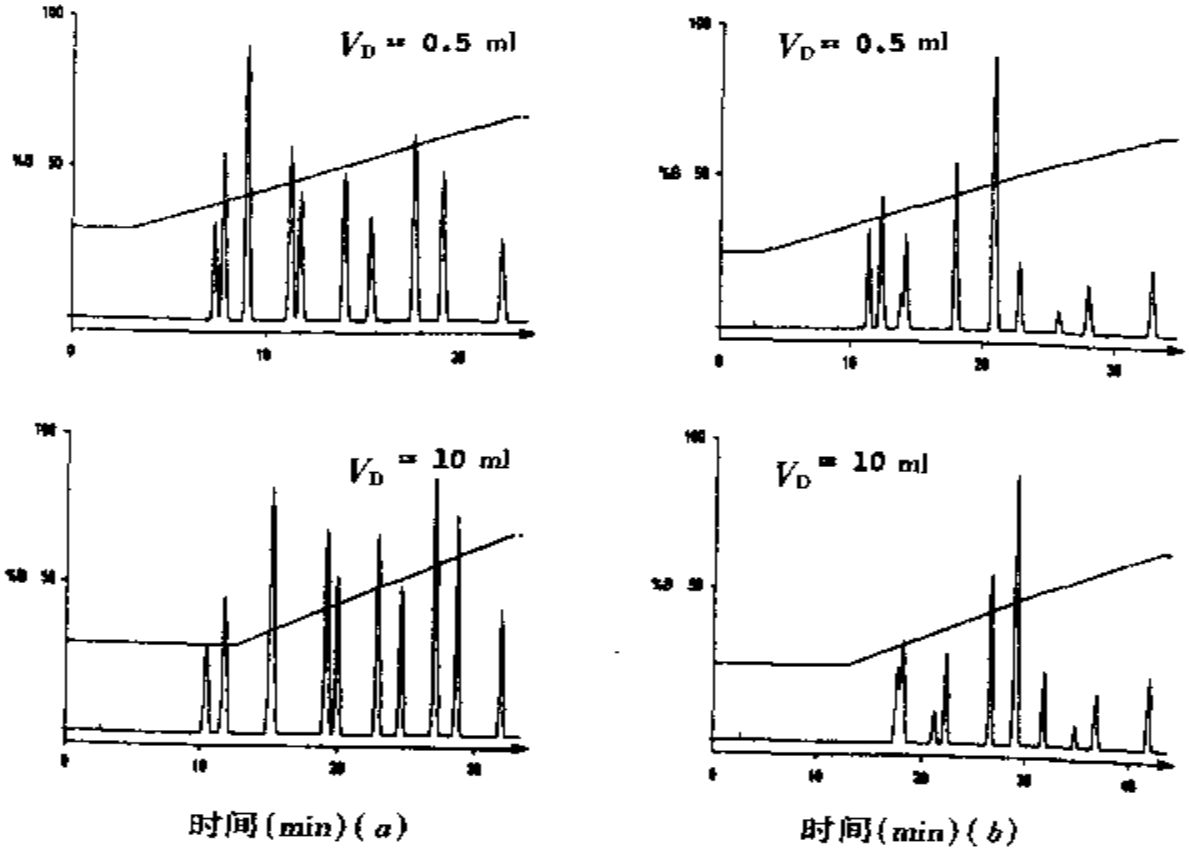


图 8－18　不同的滞留时间对梯度分离的影响[29]

1mL/min，(a)典型样品；(b、c) 非典型样品。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

间距的较大变化和样品分离度的降低(见图 8－18 *c*)。有可能对这种影响加以预测(见图 8－18 *b* 和 *c*)；初始谱峰的峰间距(选择性)随梯度变化速率或初始%B 值而改变的样品可能会发生图 8－18 *b* 中问题。亦见文献 29 的讨论。采用计算机模拟(见 10.2.2 节)，可以预测系统滞留体积对分离效果的影响，而不需用滞留体积不同的系统作另外的实验。

改变系统滞留体积对梯度分离的进一步影响，见图 8－19 中对一系列样品的重复分析。图 8－19 *a* 为一个 $V_D = 0.5$ml 的系统，样品注入后梯度很快到达自动进样器(箭头所示)。每一次梯度运行结束时，用起始流动相冲洗柱使重新平衡。图 8－19 *b* 为在 $V_D = 10$ml 系统上进行的同样分离。由于梯度延迟到达自动进样器，在前一梯度完成前即第二次注入的样品。因此，这些样品在初始的

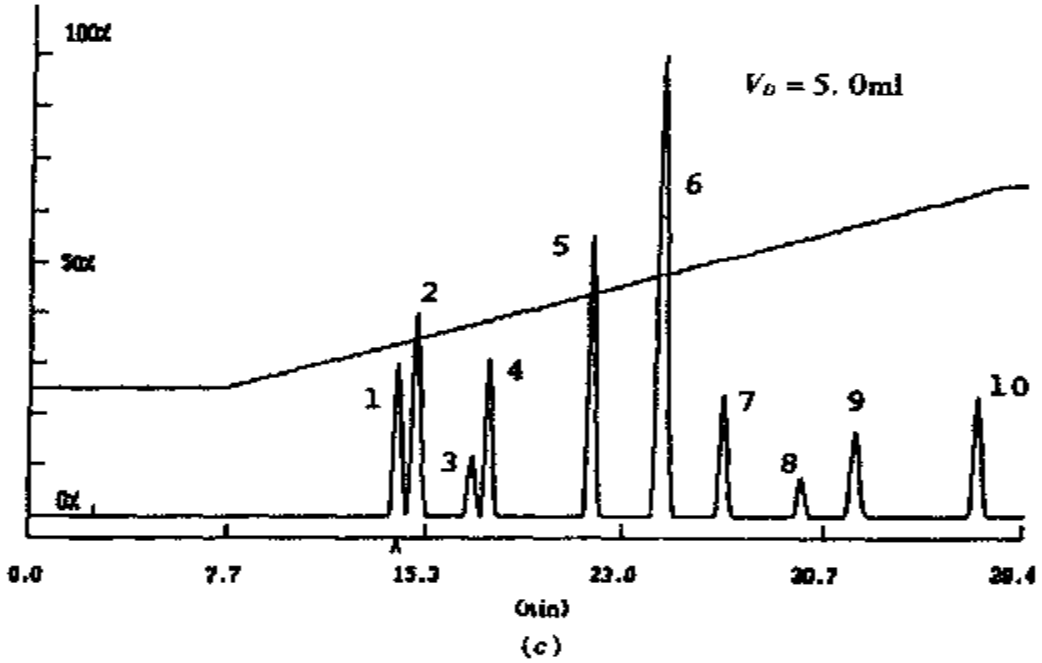


图8－19　连续进样中不同滞留时间对梯度分离的不利影响[29]

20min 梯度，35→65% B，1ml/min；每次运行开始前需用 A－溶剂平衡柱 5.0min。(*a*)滞留体积 $V_D = 0.5$ml 的 HPLC 系统的分离与梯度曲线；(b)滞留体积 $V_D = 10$ml 的 HPLC 系统的梯度分离与梯度曲线。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

高%B 条件下被洗脱，先流出谱峰（A～D）未达到分离。

由于不同 HPLC 系统的滞留体积不同，图 8－19*b* 中流动相问题可通过延长柱平衡时间加以避免。所需的延长时间等于增加的滞留时间。如图 8－19 所示，增加的滞留体积为 9.5ml，流速为 1ml/min。因此，柱平衡时间应增加 t_D 的差值，等于滞留体积之差除以流速：9.5/1＝9.5min。关于滞留体积影响的进一步讨论，见 8.5.1.3 节和文献 29。

从前文讨论可明显看出，最终梯度方法必须考虑到将用于分析的 HPLC 系统之间可能存在的滞留体积的差异。否则，在一套 HPLC 系统上建立好的方法，在不同的 HPLC 系统上应用时可能不令人满意。当柱内径减小时，系统滞留体积的影响会更甚，因为这类柱所需的低流量会使梯度到达柱入口的时间延迟更长（$t_D = V_D/F$）。因此，采用细内径柱（如 1mm 或更小）的分离通常需要 V_D 值非常小的特殊梯度洗脱设备[31]。

8.5.1.3 减小设备滞留体积的影响 因为滞留体积的差异是梯度方法在不同系统之间不能很好移置的主要原因，在方法建立步骤中有必要阐明原系统的滞留体积。另外，建立能适应不同滞留体积的梯度方法非常有用。所报道的减小不同滞留体积对分离效果影响的办法有三种。第一（最好的），某些系统控制器可以在梯度开始后的精确时间进样。如延迟进样时间 t_D，梯度和样品可同时到达柱进口。该步骤消除了滞留体积对分离的影响[32]。第一次运行（从梯度开始）可能较长（因为 V_D 和 t_D 值较大），但以后的运行时间是相同的，与 V_D 关系不大。如果从进样时开始计算保留时间，不同梯度系统应是相同的。

第二，如梯度过程开始可插入一段等度过程，用 V_D 值较大的系统时则可以缩短这一过程；而用 V_D 值较小的系统时则可延长这一过程。以此方式，样品和梯度则会同时达到柱进口[33]。为明确说明，假设用 V_D＝ 5ml 的系统建立一种样品的方法。如该方法的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

初始等度过程为 5ml，那么梯度会延迟 5 + 5 = 10ml。通过缩短或延长该等度过程可在其它（V_D 值不同的）系统中获得同样的梯度延迟。例如，如分离在 V_D = 2ml 的第二个系统上进行，为达到同样分离效果，等度过程必须增至 8ml（8 + 2 = 10ml 梯度延迟）。同样，对于 V_D = 10ml 系统的分离，等度过程进行应降至 0ml（0 + 10 = 10ml）。通过此方法，每个样品的运行时间在各（V_D 不同的）HPLC 系统中是相同的。各系统的样品保留时间也相同。然而，各样品的运行时间比前面的（经时间 t_D 后进样）要长。

第三，如初始流动相组成（20% B，最好以一较陡梯度从 5% B 至初始% B 开始。例如，初始流动相为 30% B，在此梯度之前先进行 1 ~ 2min 的 5→30% B 的分段梯度。这样使样品存留在柱进口处，直到原梯度（30% B）开始到达柱进口。因而可避免图 8 ~ 18 中滞留体积的影响；但是组分保留时间将改变，改变量等于两系统间滞留时间之差。对于 V_D 较高的系统，第一样品的运行时间会增加，但后面样品的运行时间相同，与 V_D 大小关系不大。各组分的运行时间长于经时间 t_D 后注入的样品（第一种选择）。

8.5.1.4 滞留体积的测定 在建立梯度方法前必须知晓所用设备的 V_D 值。HPLC 梯度系统的滞留体积可如下进行测定：将色谱柱与系统断开，用一零体积连接件连接柱进口与出口。用甲醇作为 A 与 B 溶剂，在 B 溶剂中加入 0.1% 丙酮，调节检测器波长（≈260nm），以使 B 溶剂的吸收度达满刻度（0.1AU），以 1.0ml/min 运行线性梯度：20min 梯度，0→100% B。该梯度图形见图 8 - 20a（实线）所示。测定吸收度到达峰开始与结束之间一半的时间，减去 10min（梯度时间的一半），结果为 $t_D = V_D / F$；详情见文献 29。

在开始梯度方法建立之前，确定梯度设备运行正常也非常重要。图 8 - 20*a* 测试的梯度图形可使操作者估价该 HPLC 系统的性能，如图 8 - 20*b* ~ *d* 所示。由于梯度通过设备时发生扩散，梯度

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的开始和结束会有些变圆滑(见图 8－20 *b* 箭头所指)。实际梯度(实线)偏移于 0 与 100% B(见箭头)的理论值(虚线)不应超过 3%。

梯度也会呈现一不规则的非线性轨迹(见图 8－20 *c*)。实际和理论梯度之间的偏离不应超过 1～2%;这也可通过运行一系列步长 10% B 的分段梯度来检测。最后,实际梯度可能是非线性的(见

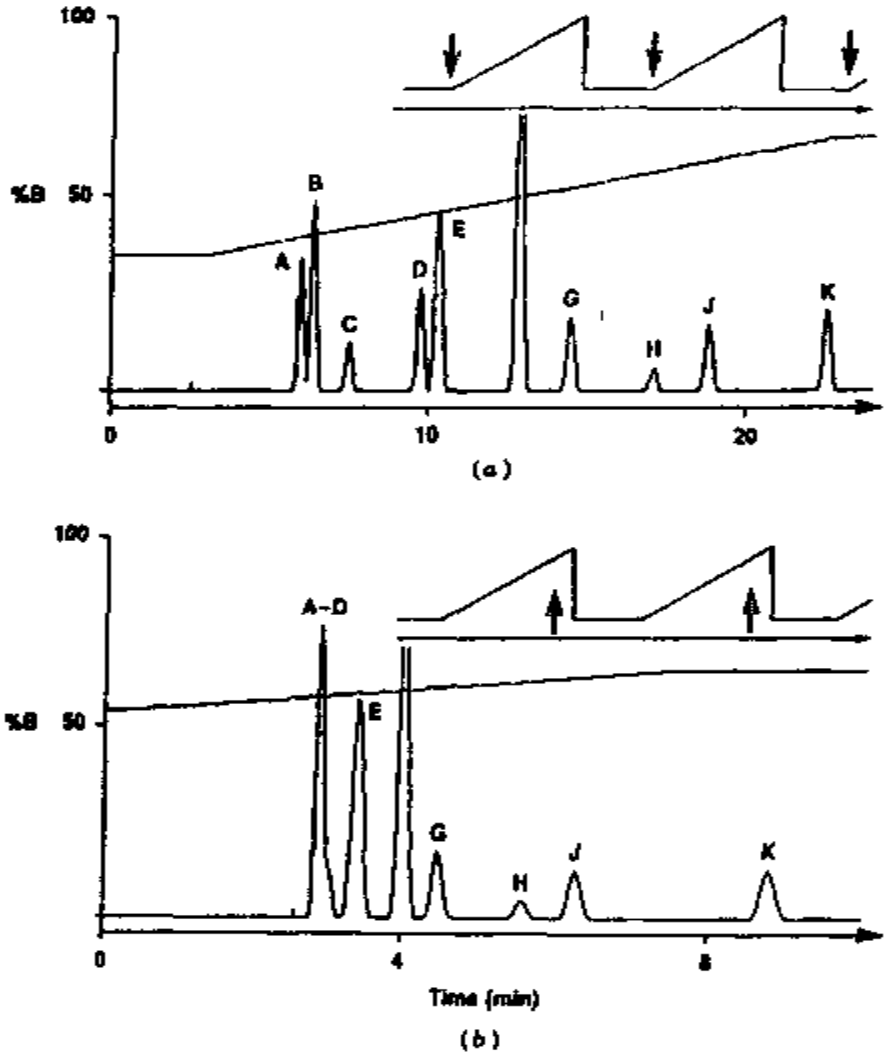


图 8－20　HPLC 系统的梯度形状[34]

(*a*)设备的滞留体积导致的梯度延迟;(*b*)系统内的扩散导致的梯度曲线变圆滑;(*c*)混合误差导致的梯度不规则;(*d*)非线性梯度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

图 8－20*d*)，这种情况下可参考设备手册，调整该 HPLC 系统(梯度控制部分)，以消除梯度的非线性。

8.5.2 可重现的分离

8.5.2.1 柱再生 在前一节中，我们讨论了由梯度设备差异引起的方法重现性问题。梯度洗脱中分离重现性不好还会由其它原因引起。方法建立通常采用纯标准品，而实际样品可能会含晚流出的干扰。若选取梯度的最终%B 仅为洗脱有关谱峰(如图 8－16*b*)，而实际样品中含有的晚流出物则会在柱上发生聚集，因而会改变柱效和保留值(如图 8－4*b* 所示)。在分离含有这类晚流出物的样品时，分离结果会逐渐发生变化。由于需要梯度洗脱的样品通常含有晚流出物，故通常在梯度洗脱末尾时保持 100% B 或快速将梯度改变至 100% B 一段时间(如 2～5 倍柱体积)，以便采用强溶剂来清洗柱子。

8.5.2.2 柱平衡 梯度洗脱中的柱平衡指上一次梯度运行结束后与下次进样之前，以 A 溶剂(初始流动相)冲洗色谱柱；见图 8－19*a*。梯度洗脱中，最好在进样和下一次梯度开始之前，用初始流动相彻底平衡色谱柱。如不能彻底平衡柱子，色谱图中的早期谱峰的保留值和分离效果会发生改变。柱平衡一般需要 5～10 倍柱体积的初始流动相(例如 15×0.46cm 的色谱柱为 7～15ml)。然而，这一平衡体积随流动相和样品而异，所以彻底平衡色谱柱需根据具体操作来确定。完全平衡可由以下方法检验：(1)用大于 30 倍柱体积的初始流动相冲洗色谱柱；(2)进行梯度分离；(3)用规定体积(5～10 倍柱体积)的初始流动相冲洗柱子；(4)立刻重复该分离。如早出峰的保留时间在两次运行之间不变，则采用的平衡溶剂体积是足够的(可能超过所需)。对于某一梯度方法规定的平衡溶剂体积，应考虑到系统滞留体积之间可能的差异；见图 8－19 和相关讨论。如在流动相中加入离子对试剂或胺改性剂，则在 A 和 B 溶剂中都应加入。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

为达到柱平衡，还可以使梯度反向运行。即（样品洗脱结束后）梯度再从终止到起始 B% 运行（如开始梯度为 10→80% B，这时可运行 80→10% B 梯度以平衡色谱柱）。最好在运行结束时，立即将% B 由终止值变至起始值（80→10% B，然后用 10% B 冲洗色谱柱）这样更简单且同样有效。

为使每次梯度运行间色谱柱能快速平衡，应避免以 0% B（不加有机物的水或缓冲液）作为初始流动相。若可能，初始的流动相组成应大于 3% B。范围有限（如 30～50% B）的梯度由于开始和终止流动相组成的差值较小。通常需要的平衡体积较小，有研究主张在 A 溶剂中加 3% 丙醇，可以加快柱平衡[35]。然而并未表明用 5% B 的初始梯度开始的简单手段需要的柱平衡时间更长。

当采用梯度方法分析一系列样品时，最好每份样品都保持恒定的平衡时间。用作流动相的水通常会被聚集在柱头的组分污染并在梯度期间洗脱出。产生的人工峰大小与平衡时间的长度（或平衡柱所用水的量）成正比。详情见 8.5.3.2 节。

8.5.2.3 不准确的梯度 分离重现性较差也会由梯度的不准确引起。梯度不准确更易导致不同梯度系统之间的分离产生差异，但是同一梯度设备不同运行之间保留值也可能不同。这对于非常平坦的梯度和高分子量样品，可能性更大。在这类情况下，梯度设备混合的 A 与 B 溶剂与梯度控制器中编程设定的值相比，流动相组成会发生随机的变化（如0.1～0.3%）。一般情况下，这些小的（随机的）误差对样品保留时间的影响很小。但是，对于大分子量样品，即使如此微小的% B 变化也会导致梯度洗脱中保留时间的很大改变。在极端情况下，会导致一单峰分裂出1个或多个人工峰[36]。

当怀疑保留时间发生变化是由梯度混合不准确所致的% B 随机波动而引起时，通过避免使用储液器中的纯溶剂 A 和 B，可降低此问题的发生。这样，若梯度范围为 20%→50% B，则在 A 容器中

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

装 20% B，在 B 容器中装 50% B。相对于使用纯溶剂 A 和 B，可减少 0.3 倍的梯度混合误差（即时% B 值）。

8.5.3 基线问题

梯度中的基线漂移和人工峰比等度洗脱中普遍得多。如图 8－3*b* 所示，在分离过程中（3～23min），梯度运行基线呈现升高趋势。其它情况时，空白梯度实验（未进样）会在色谱图中出现明显的峰及漂移。在开始建立梯度洗脱方法之前，进行一次空白运行（如 5→100% B）永远是明智的。

8.5.3.1 漂移 梯度洗脱中，基线向上漂移（如图 8－3*b*）非常普遍，通常由所用 A 与 B 溶剂的紫外吸收差异所致。在反相梯度洗脱中，有机溶剂 B 浓度在分离期间是增加的，有机溶剂的紫外吸收总是大于水，因此，采用紫外检测器时，这种梯度漂移尤为普遍。与吸收有关的基线漂移可通过运行一次空白梯度加以证实；基线应呈线性，向上漂移的时间等于梯度时间 t_G。检测器波长越短，设置越灵敏，这种漂移越显著。THF 作溶剂时，由于 THF 在 250nm 以下吸收很强，漂移尤其显著。

与吸收度相关的漂移可通过“吸收匹配”来消除（即在 A 溶剂中加入 UV 吸收化合物，以增加 A 溶剂的吸收，使与 B 溶剂相等）。任何 UV 吸收物质都可以使用，但该添加剂在反相条件下必须是非保留的（亲水性很强），不与样品反应或发生作用。这类化合物包括无机离子如硝酸盐、亚硝酸盐或叠氮化物，小有机离子（如甲酸、乙酸），亲水的小分子量化合物如尿素、硫脲、甲酰胺[37,38]。A 与 B 溶剂的吸收匹配用试一凑法很方便。例如基线的漂移为 ±0.10AU（从梯度开始到结束），可在 A 溶剂中加入少量 UV 吸收剂，并观察其对基线漂移的影响（如基线漂移从 0.1AU 降低至 0.05AU）。据此可知，多大量 UV 吸收剂会完全消除基线漂移（本例为起始加入量的两倍）。用 UV 分光光度计应更方便。

梯度洗脱中的第二类基线漂移，可由空白梯度的弯曲基线来

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

识别，最大信号接近 50% B（不是 100% B，如前例）。此种基线漂移由折射率（RI）引起[39]；大多数 UV 检测器对流动相折射率的变化较敏感；而且，有机－水溶液通常在约 50% 有机物时 RI 值最大。通过上述的溶剂配对无法消除与 RI 相关的基线漂移，其影响与检测器流通池和光路的设计密切相关，所以可能需要采用不同型号的 UV 检测器，降低这种漂移。

一些数据系统可以从样品梯度中扣除空白梯度，从而消除基线漂移。然而，由于扣除过程中可能会引入误差，这种权宜之计不如基线漂移校正令人满意。

8.5.3.2 人工峰 当进行空白梯度实验时，尤其用短波长 UV 检测和高灵敏度设置时，色谱图中可能会出现很大的谱峰。这类人工峰会（明显地）使梯度洗脱的方法建立复杂化。这种干扰通常由与流动相和设备有关的疏水且有 UV 吸收的杂质引起。流动相则更易出现问题（即水、有机溶剂或流动相添加剂）。可通过一些简单的实验查出该问题，并找出解决办法。

第一步是查出污染源。开始先用 A 溶剂（水）平衡柱 30min，然后进行一次空白梯度（15min 梯度，0→100% B，），平衡 5min 后重复空白梯度。如第一次运行中的人工峰大得多，很可能为水污染。如两空白运行间无差异，有机溶剂的问题可能较大。流动相添加剂的可能污染可通过重复不含添加剂的空白梯度来检测。当鉴别出流动相溶剂或组分被污染后，必须用干净的试剂代替原试剂（如另更换一瓶或不同厂家的试剂）。

如前面的实验未发现污染源，梯度污染则可能出自于 HPLC 系统本身。这时，可通过系统地替换组件来查出问题，并着手解决。

8.6 梯度洗脱方法建立的总结

下面的方法适于大多样品。应注意等度和梯度分离方法建立的相似性，并将等度分离中获得的经验用于梯度方法（见第 6 与7

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

章)。

8.6.1 系统方法

决定梯度与等度方法设计所需考虑的问题类似,例如,当在梯度方法建立过程中改变条件时,需用 10~20 倍柱体积的 A 溶剂平衡色谱柱,重复每一实验以确证色谱柱已完全平衡。

开始前 首先应进行一次空白梯度,以确保基线没有问题(漂移或人为峰)。如 8.5 节的讨论应校正存在的问题。

运行初始梯度 采用 60min 线性梯度,5→100% 乙腈-缓冲液,流速 2ml/min,及表 1-3 中的其它条件(等度与梯度洗脱相同;15×0.46cm 柱较好)。确证梯度洗脱是否必要(见图 8-6),然后估计这种样品(表 8-3)的最佳初始和终止%B 值(梯度范围)。另外如肯定需用梯度洗脱,以 20min 梯度开始($k^* \approx 5$)。

优化梯度变化速率 估计最佳梯度范围,用式 8.4 中的条件估算梯度时间,并进行这一条件下的分离(运行 2)。重复这一分离(运行 2a)以确定运行之间的分离重现性和柱平衡时间(如采用 10~20 倍柱体积的起始流动相)。然后,考察梯度时间对分离的影响[如改变梯度时间 2 倍或更多(运行 3)]。改变梯度时间时关键峰对分离度的任何变化都特别重要。很多样品在适中的梯度时间分离度最大,如图 8-13 所示。该情况下,调整梯度时间有希望获得最大分离度。同时按需要进一步调整初始与终止%B 值(见图 8-9 与 8-10)。

优化条件 若需改善峰间距和分离度,可按等度分离的相同方式试验,以进一步改变选择性(见 6.3,6.6 与 7.3.2 节)。在中性样品的反相分离条件下,下一步应试验改变溶剂类型(乙腈、甲醇、THF 或它们的混合物)。若不见效,可再试用不同的色谱柱(氰基、苯基)。改变溶剂或色谱柱类型后,应重新优化梯度变化速率。对于离子样品的分离,应先试验改变 pH 或温度,再改变柱类型。已发现结合改变梯度变化速率与温度对于某些离子样品尤其方便与有

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

效[27]；亦见 9.5 节。

复合梯度 有些情况下，如图 8－12 与 8－13，分段梯度可缩短运行时间和/或增加分离度。其它情况下，如图 8－13～8－15，采用分段或“复合”梯度可以优化色谱图中某一组化合物的选择性。应尽可能不用曲线梯度。

优化色谱柱条件 优化峰间距后，通过改变流速、柱长或固定相粒度可进一步改善分离度和/或运行时间。当改变柱长或流速时，重要的是应通过保持 k^* 不变，保持先前（选择性优化）所获得的最佳峰间距。这就需要在增加柱长时也相应增加梯度时间，当提高流速时相应降低梯度时间，见图 8－16 和表 8－4 所示。

其它问题 一旦选定了分离样品的实验条件，应使色谱柱达到平衡，以保证在试图减小整体运行时间时（包括柱平衡时间），早出峰的保留可重现。这一步骤需要测定可使色谱柱达到平衡的初始流动相的最小体积。

若梯度方法将用于其它 HPLC 设备，必须考虑改变滞留体积对分离的可能影响。为尽可能减小设备对分离的影响，已讨论了三种校正梯度过程的办法（见 8.5.1.3 节）；哪种方法适于实验样品，取决于分离条件和可用的梯度设备。也应切记，为避免图 8－19 的相关问题，样品间的平衡体积应尽可能大些。

8.6.2 计算机模拟

计算机模拟技术用于梯度洗脱方法建立详见 10.2.2 节。两次初始实验运行可作为所有梯度和柱条件的函数，用来预测以后的分离效果。采用计算机模拟，后续的每次（模拟）实验，计算机仅需几分钟即可完成。这意味着可以在几小时内进行大量的这类实验，结果的整理分析很简单。优化梯度分离通常需要大量的试一凑实验，如图 8－8～8－10，8－13 和 8－16 中的逐次实验。也可能有必要预测改变滞留体积而产生的问题，如图 8－18 和 8－19 所示。对

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

于一些极为复杂的样品[40]，在实验中通过试一凑试验建立最优化梯度方法几乎不可能，但通过计算机模拟用相对很短的时间和气力即可完成。用于建立梯度洗脱方法的计算机模拟还有许多其它方面的用途，详见 10.2.2.2 节中的详细讨论。

参考文献

1. J. W. Dolan, D. C. Lommen, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 91.
2. T. Sasagawa, Y. Sakamoto, T. Hirose, T. Yoshida, Y. Kobayashi, and Y. Sato, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 533.
3. L. R. Snyder, in *High – Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol. I, C. Horvath, ed.. Academic Press, San Diego, CA, 1980, p. 207.
4. P. Jandera and J. Churacek, *Gradient Etution in Column Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
5. L. R. Snyder and M. A. Stadalius, in *High – Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol. 4, C. Horvath, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1986, p. 195.
6. M. A. Quarry, R. L. Grob, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 285 (1984) 19.
7. J. Aurenge, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 285.
8. S. Terabe, H. Nishi, and T. Ando, *J. Chromatogr.*, 111 (1981) 295.
9. J. P. Larmann, J. J. DeStefano, A. P. Goldberg, R. W. Stout, L. R. Snyder, and M. A. Stadalius, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 163.
10. M. A. Stadalius, H. S. Gold, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 296 (1984) 31.
11. F. Erni, H. P. Keller, C. Morin, and M. Schmitt, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 65.
12. K. H. Nelson and D. Schram, *J. Chromatogr. Sci.*, 21 (1983) 218.
13. D. W. Patrick and W. R. Kracht, *J. Chromatogr.*, 318 (1985)269.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

14. L. R. Snyder and J. W. Dolan, *J. Chromatogr.* A, 721 (1996) 3.
15. J. A. Lewis, L. R. Snyder, and J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 15.
16. P. J. Schoenmakers, private communication, 1996.
17. T. Braumann, G. Weber, and L. H. Grimme, *J. Chromatogr.*, 261 (1983)329.
18. B. F. D. Christ and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 459 (1988) 43.
19. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 594 (1992) 65.
20. M. Patthy, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 143.
21. J. W. Dolan, L. R. Snyder, and M. A. Quarry, *Chromatographia*, 24 (1987) 261.
22. M. Kunitani, D. Johnson, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 371 (1986) 313.
23. B. F. D. Ghrist and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 459 (1988) 25.
24. P. Jandera, J. Churacek, and H. Colin, *J. Chromatogr.*, 214 (1981) 35.
25. J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *J. Chromatogr.*, 255 (1983) 27.
26. C. Z. Chuang, F. A. Ragan, Jr., and C. Prasad, *J. Chromatogr.*, 534 (1990) 13.
27. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, B. A. Marchylo, J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* A, 686 (1994) 45.
28. J. L. Glajch, M. A. Quarry, J. F. Vasta, and L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 280.
29. L. R. Snyder and J. W, Dolan, *LC/GC*, 8 (1990) 524.
30. C. F. Poole and S. A. Schuette, *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 366.
31. F. Andreoliniand A. Trisciani, *J. Chromatogr.* Sci., 28 (1990) 54.
32. H. Nakamura. T. Konishi, and M. Kamada, . *Anal. Sci.*, 4 (1988) 655.
33. S. K. MacLeod, *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 373.
34. L. R. Snyder and J. W. Dolan, *DryLab G User's Manual*, LC Resources, Inc., Walnut Creek, CA, 1987.
35. L. A. Cole and J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 16.
36. J. W. Dolan, LC/GC, 4 (1986) 1178; 5 (1987)24.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第9章　常规样品反相分离的系统方法

9.1　引言

本章总结了用反相色谱法(RPC)分离时选择恰当实验条件的初步构想，并描述了将前一次的实验结果用于下一步实验条件设定的方案。采用这种试一试法进行研究，直到得到满意的结果。建立方法(见表9.1总结)理应对很多样品给出满意的分离，并对更复杂样品的分离提供指导作用。本章所述方法基于前几章的讨论，并包含了许多尚未被讨论的实际问题。

这里假设已知分离的目标(见1.2.2节)，包括适当的分离度，合理的运行时间，更重要的是一个能在其它实验室采用、问题尽可能少的普适方法(见15章)；也假设样品形态满足进样和检测的要求。在6至8章我们探讨了HPLC分离随实验条件的变化，说明了怎样建立一个可接受的分离方法用于分离不同的样品。有多种实验方案可采用时，建立有效方法依赖于如何区分这些方案的优先次序。这种选择可能取决于对样品的认识和采用何种HPLC仪器。但是(正如本章所述)，“对于大多数常规样品(分子量低于1000道尔顿)，包括中性和离子化合物，用反相条件建立方法几乎以相同方式进行”。表9.2给出了一些不包括在常规样品内的特殊样品。

在对常规样品建立方法之前，可借鉴文献中相同或相似样品

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 9－1　反相 HPLC 分离的总体方案

1.确定样品属于常规的还是特殊的(表 9.2);对特殊样品,照表 9.2 中提供方法进行;对常规样品,照本章提供的方法进行研究。

2.选择分离条件,进行第一次运行(表 9.3)

3.做初次运行并如图 9.1 将样品分类

a.对等度方法(图 9.1*a*),照 9.3 节和表 9.5 或 9.4 节进行

b.对梯度方法(图 9.1*b*),照 9.5 节进行

c.对弱保留样品(图 9.1*c*),由(1)改变 pH;(2)加入离子对试剂;(3)改变柱子(一般键合相或交联柱)或(4)改用正相条件,来增加保留。

d.对强保留样品(图 9.1*d*),用(1)NARP 或(2)正相条件

4.对等度方法,用初始梯度运行来估计第二次(等度)运行(表 9.4)的最佳%B 值。

5.评价第二次运行中峰的质量(塔板数,峰宽,峰形)。峰太宽或不对称说明初始分离条件(柱子, pH,添加剂等)必须改变;若二次运行良好,应作进一步平行实验以保证柱平衡和可重复的保留时间。

6.a.对等度方法,照表 9.5 和 9.3 中所述进行;改变%ACN 来改善峰间距和分离度。

b.若有必要,从 ACN 改为 MeOH 并为峰间距和分离度优化% MeOH;也可以进一步混合 ACN 和 MeOH 并优化三元溶剂流动相组成。

7.对等度方法,若步骤 6a 或 b 的分离不充分,根据表 9.8 的先后顺序改变条件。

8.对梯度方法,用改变梯度变化速度和柱温(9.5)来优化峰间距和分离度。若未得到满意的峰间距和分离度,用与等度分离相同的方法(步骤 5)来改变溶剂类型,分离仍不好时,根据如表 9.8 改变其它条件。

9.对梯度方法,依 8.4.1 确定梯度条件(初始和最后%B,梯度速度变化,梯度形状)改善分离度或缩短运行时间。

10.对等度或梯度方法,改变一个柱条件(柱长,流速,填料尺寸)可以提高分离度或降低运行时间。

*一旦取得了满意的分离,无需进一步改变条件,有时不需要步骤 6 以后的实验。

的分离方法,这些信息对选择检测条件或设计样品预处理步骤很有用。但是,因为原分离方法作初始条件可能不很恰当或柱质量存

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

在差异（变化的 α 值见 5.4.1），用发表的方法分离一般不可能直接得到令人满意的结果。我们常需从头开始重新建立新的 HPLC 分离法（用本章所述方法）而不是试图通过些许改变原来的分离条件来改进文献的方法。

表 9－2 特殊样品[a]

样品类型	参　　考
无机离子	参考 1
对映体	第 12 章
生物分子	第 11 章
合成的高分子	参考 2
碳水化合物	6.6.5
异构体[b]	6.3.3 和 6.6

[a]. 此处未列出的样品可视为常规样品。

[b]. 用本章所述的方法若不能使异构体及对映体得到很好的分离，参见附录Ⅲ中的正相分离指南。

在建立方法之前了解不同样品分子的化学结构和性质是有用的（但并非必不可少）。关于样品成分的信息在样品预处理（第 4 章）；选择最佳检测方法（第 3 章）及方法建立过程中是否会遇到问题等方面会有帮助。若能得到每种组分的标准样品，可大大简化方法的建立过程。本章中假设这些标准样品都可以得到，但不论是否知道样品组成或得到标准样品，对任何常规样品的方法建立实质上可用几乎相同的方案进行。

某些情况下，并不需要对每一次实验结果作出解释或处理，可以继续进行下一步方法建立实验，直到将所有必须的实验完成后，再系统进行数据处理和分析。10.3 和 10.4 节中描述了基于此方法的计算机优化方法。如果可得到一个能自动进行这些实验的 HPLC 计算机软件系统，并且仔细地选择实验条件，这将会成为一个有用且有效的途径。但对于大多数样品而言，自动化的 HPLC 系统分析方法建立还未能实现。由于诸多因素的影响，我们更喜欢

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

现在的循序渐进方法，在为下一次 HPLC 分离实验选择条件前，先解析已有的色谱图。此法具有减少易分离样品方法建立过程总实验次数的优点，并且也能利用计算机软件优化实验条件。（见 10.2 节）

9.1.1 一些指导原则

我们所推荐的常规样品的反相色谱法的建立方案基于以下考虑：（又见文献 3 和 4）

· 改变可明显改善选择性的条件

· 避免会影响方法普适性的实际问题

· 减少必要的实验次数，尽可能地利用计算机模拟（见第 10 章）

· 选择适用于各种常规试样的实验；以便于采用同样的方法建立未知组分样品（离子的或中性的）的 HPLC 分析方法（以点代面）

· 先不做不易进行的实验（例如改变色谱柱，改变 pH 值，使用复杂的混合溶剂等）。

基于上述考虑可以提出一套简单有效的建立方法方案，我们在表 9.1 中作出总结，并在 9.2 至 9.5 节中再作详细说明。这套方法的实施程序（包括乙腈甲醇百分比及柱温的改变），对大多数样品可以建立较为满意的分析方法。对于一些特殊情况，分离效果不很理想时，可通过第 6、7 章中介绍的方案进一步通过实验加以解决。

9.1.1.1 样品分类 建立方法的第一步是确定样品类别，属常规样品还是特殊样品（见表 9.2）。对于常规样品，可按本章所述步骤进行方法建立，而对特殊样品，见表 9.2 中推荐的其它章节或参考其他文献。常规样品的分离可通过改变溶剂浓度（%B）和类型（乙腈 ACN，甲醇 MeOH）（或柱温）找到合适的分离条件。浓度%B 降低 10% 一般使保留值增加 3 倍，选择性通常随溶剂浓度或类型的变化而变化。柱温的上升会引起保留值的下降（1～2%／℃）和选择性的变化（特别是离子型样品）。

仅通过改变溶剂极性和类型（见 9.3 节）即可能分离许多常

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

规样品。另外，改变溶剂浓度和温度也可分离许多离子型样品和一些非离子型样品(见 9.4 节)。因此，对所有常规样品 RPC 方法的建立可用相同的方案开始实验(按 9.3 节开始做)。特殊样品有另外的要求，通常用其它方法可以得到更好的分离结果（表 9.2）。

9.1.1.2 初始分离条件：色谱柱和流速 初始实验的色谱柱、流动相和柱温的选择十分重要，表 9.3 对此作了较全面的总结。对柱子的一般要求在第 5 章中说明，为避免在方法建立期间样品的保留不重现，色谱柱的稳定性和重现性很重要。用特殊纯化的弱酸性 SiO_2 制成，被设计用来专门分离碱性化合物(表 5.4)的 C_8 或 C_{18} 柱通常适用于所有样品，因此应极力推荐使用。若在低 pH 值(见 9.4)，温度>50℃时实验，优先使用空间保护(sterically protected)的键合相柱填料(见 5.2.3.4 节)。

表 9－3 反相 HPLC 方法建立的初始条件

分离变量	最佳的初始选择
柱填料	C_8 或 C_{18}；弱酸性硅胶(表 5.4)；若设计温度 > 50℃，选择更稳定的空间保护填料(5.2.3.4 节)
柱结构	15×0.46cm 柱，5μm 填料 [a]
流速	2.0ml/min
流动相	乙腈—水(中性样品)或乙腈—缓冲液(离子型样品)；缓冲液为 25～50mM 的磷酸缓冲液 pH2～3(若色谱柱稳定，pH 最好更低)。对初始试验，可用 60min 内 5→100%B 的梯度；此外，见图 9.2 等度方法
温度	35 或 40℃
进样量	<50μl；50～100μg[b]

[a]. 另一选择是用 7.5×0.46cm，3.5μm 填料的色谱柱；这种色谱柱在类似的分离度下运行更快

[b]. 对离子型样品通常进样量要求更小。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

色谱柱也应提供(1)初始实验时对样品有合理的分离度,(2)短的运行时间(包括色谱柱的平衡和平行实验)(见 9.1.1.5),(3)对不同流动相有合适的压力降 5μm, 15×0.46cm 色谱柱,流速为 2ml/min 一般是较佳选择。这些条件提供了(1)合理的塔板数($N\approx8000$),(2)运行时间<15min, $k<20$, 和(3)由水、乙腈和/或甲醇的混合物制成的任何流动相的最大压力<2500psi, 这种规格和类型的色谱柱通常也是最后建立的 HPLC 方法的较好选择,文献 3 中给出了进一步的讨论。对于快速分离(见 5.2.2), 7.5×0.46cm,3.5μm 填料的色谱柱是较好的选择。

9.1.1.3 初始分离条件:流动相 要求流动相无紫外吸收且低粘度,较好满足这些条件的有机溶剂是 ACN。MeOH 也是一种适合作为 HPLC 分离的流动相有机溶剂,THF 在 250nm 以下有显著的紫外吸收,且由于它的化学活性一般不常被选用。除了为满足某些特殊选择性因素的需要,不用 THF 作溶剂的 RPC 方法更方便、普适。

初始流动相 pH 值的选择基于两点考虑。1. 选用低 pH 可以使柱硅羟基质子化并降低其色谱活性;2. 低 pH 值(<3)与常见酸碱官能团的 pK_a 值相差较远(见表 7.2),因此组分在低 pH 的保留不会被 pH 的微小变化影响,利于 RPC 方法普适性更好,对于在低 pH 下稳定的色谱柱,选 pH 在 2~2.5 之间较合适。对不太稳定的柱子,选 pH 3 更好。方法建立中为改变选择性所做的 pH 调整应在其他条件都已优化确定后进行,原因是优化 pH 并不是必需的,且要求做大量试验,也可能导致最终方法普适性不好。最好 pH2~3 作为流动相来维持,采用 25~50mM 的磷酸钾缓冲液(即 25~50mM 磷酸,用 KOH 调 pH)。

在方法建立的早期试验中应避免使用三乙胺和离子对试剂等流动相添加剂,这些添加剂需要较长的柱平衡时间,会在方法建立和方法的日常使用中带来问题。通常也会使流动相的配制复

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

杂化；引起基线不稳、峰形不佳等问题。当峰形不好或塔板数较低时，一些样品的分离需加入胺改性剂（见 5.4 和 7.3.3 节），也有一些样品可能需用离子对试剂使分离更好（见 7.4 节）。然而，流动相中是否需要加入改性剂，应根据方法建立过程中的实际需要来确定。

9.1.1.4 其它初始分离条件 可通过选择柱温达到不同的分离目的。基本要求是柱温恒定，大多数控温装置最好在室温（>30℃）以上操作。由于高温下流动相粘度降低，有较低操作压降和更高的塔板数，通常开始选用 35℃或 40℃的柱温。在没有柱恒温装置的试验室中，需要室温下进行测定。

可能的话，样品应先用水（1mg/ml）或乙腈的稀水溶液来溶解。对于最终的 RPC 方法，溶解样品的最佳溶剂是流动相，许多样品不能直接溶于水或流动相，可用乙腈或甲醇溶解并在进样前用水或流动相稀释。开始时，先进样 25～50μl（25～50μg）以得到最大检测灵敏度，对直径小于 0.46cm 和/或填料颗粒小于 5μm 的色谱柱，要求更小的进样体积。为了不超出检测器响应的线性范围或改善谱带形状和宽度，实际进样质量和/或体积可减小至所需值（见 2.4 节）。

9.1.1.5 确保准确的保留数据 保证所有试验的重现性对方法建立是很重要的。这要求在采集有效的保留数据前色谱柱达到完全平衡。当色谱柱，流动相或温度发生变化时，进样前都要求用 10 倍柱体积（对 15×0.46cm 的柱子是 15ml）的新流动相来平衡。某些流动相需要更长的柱平衡时间，例如：流动相中有 THF；三乙基胺或四丁基铵等胺类调节剂和离子对试剂（特别是在其烷基上有 10 个以上碳原子的情况）。

需通过不断改变实验条件来完成分析方法的建立。在开始阶段，应改变流动相或柱温而不是色谱柱，因为流动相和柱温的改变可以连续进行，更有可能找出多组分样品的最佳选择性。同时

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

这也比改变色谱柱更方便(假设柱子做到恒温)。严格按照下述规程操作可以保证柱平衡和数据重复性:1. 用至少 10 倍于柱体积的新流动相清洗色谱柱(对流速为 2ml/min 的 15×0.46cm 的柱子需 8min);2. 进样;3. 用至少 5 倍于柱体积的流动相清洗色谱柱;4. 再次进样。若色谱柱达到平衡,在两次运行之间保留时间的改变应不超过 0.02min。若保留值变化较大,继续进样直至得到稳定的保留值(±0.02min)或在同方向上保留的变化停止。柱平衡后,在恒温柱上的保留值在一天内运行的变化不应超过±0.05min。对于每种待研究的新流动相,这些步骤能在不到 1 小时内完成。

方法建立过程可能需花费数天时间,经多次运行以摸索条件,由于色谱柱被污染或键合相流失,色谱柱的保留性能可能会变化,这意味着不同时间得到的保留数据没有可比性。对这种情况,每天开始实验前做"参考运行"是一个好办法。用一个或多个分析物作样品,在 $k>1$ 的条件下,做"参考运行"。对于等温分离(温度变化 1℃保留时间改变 1~2%),"参考运行"的保留时间应每天相同(±0.1min),选择性每天的变化(α 改变大于 1%)比保留时间的变化更大一些。通常,α 变化 1% 意味着 R_s 变化 ±0.2 个单位;R_s 更大的变化对分离不利。

9.1.1.6 确保好的柱性能 第一步或第二步试验运行完成,更重要的是考察色谱图的峰形和塔板数。对一个 15cm,5μm 的色谱柱,流速为 2ml/min 时,不对称因子(见图 5.19)应在 0.9~1.5 之间(0.9~1.3 间更好),分子量小于 1000Da 的样品,等度洗脱的塔板数应>4000。在梯度运行情况下,半峰宽不应大于 0.4min(15cm 柱,5~100% 梯度 60min),用公式 2.8 计算梯度洗脱的塔板数偏差较大,会得到过高的塔板数。

方法建立中不断出现拖尾峰或展宽峰会浪费相当多的时间和精力以改善柱性能,进而可能同时会导致样品保留值的变化及

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

分离效果变差，这时需要完全重新优化峰间距。

9.1.1.7 峰跟踪 峰跟踪是指改变实验条件时，在两次运行之间对同一组分谱带的匹配。10.7 中将讨论峰跟踪的重要性和实现的方法。若能得到标准样品，可使用不同组成（不同组分的浓度）的两个样品在相同条件下完成实验来实现峰跟踪和峰确认（见 10.7.1）。同时，这些重复实验可被用以确定保留时间是否不变及色谱柱是否平衡的判据。若得不到峰跟踪所需的标准样品，可用峰大小加相对保留值，二极管阵列光谱图（见 3.2.6）和/或 LC－MS（见 3.3.4）来进行峰跟踪。然而，除 LC－MS 外其它方法均假设流动相的变化不会影响组分的紫外光谱。当 pH 及溶剂类型或温度变化时，紫外光谱也可能会发生变化，因此这一假设不尽合理。

9.2 实验开始

9.2.1 初始条件

初始实验条件的选择取决于样品类型属中性还是离子型。定义离子样品为（1）包含一种或几种酸、碱或有机盐；或（2）完全未知的组成（即样品可能包含酸或碱）。对常规样品，先使用表 9.3 中的条件：15cm，5μm 的 C_8 或 C_{18} 柱，乙腈－水流动相，2ml/min 的流速，柱温 35℃ 或 40℃（除非没有柱恒温装置），和适当的进样量。对离子型样品，向流动相中添加 25～50mM 磷酸钾的缓冲溶液（pH2～3）。若不知道样品类型为中性还是离子，最好用同样的缓冲液和 pH 值。

可用等度或梯度洗脱进行初始“试探”分离。最好优先选用梯度分离（见 8.2.2），但等度运行也可接受。最初梯度可以先用 5→100% 的乙腈，60min。初次梯度运行可确定（1）推荐等度或梯度洗脱（见表 9.4 和下面的讨论）和（2）是否需要特殊的反相条件。几种初始梯度分离的示例在图 9.1 中给出，每种条件将被依次检验。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 9－4　用初始梯度实验(运行 1)来指导进一步的方法建立[a]

梯度 t_R[b](min)	等度(t_R)[c](min)	梯度		等度
		初始%B[d]	最终%B[e]	%B($k=7$)[f]
5	26	0	18	4
10	33	7	27	16
15	38	15	35	25
20	44	23	43	34
25	49	32	52	42
30	54	40	60	50
35	59	48	68	58
40	64	57	77	66
45	f	65	85	74
50	f	73	93	82
55		82	100	90
60				98

a　表 8.1～8.3。柱 15×0.46cm，流速 2.0ml/min，乙腈－水为流动相
b　首峰和末峰的保留时间
c　第一个峰的保留时间，对应的保留时间是对可行的等度分离的最大值
d　第一个峰的保留时间，对应的保留对间给出梯度推荐的初始%ACN
e　最后一个峰的保留时间，对应的保留时间给出梯度推荐的最终%ACN
f　最后一个峰的保留时间，给出对运行 2 等度分离的推荐%ACN

9.2.2 调整保留值范围

RPC 方法建立的首要目标是选择能提供合适保留值范围的实验条件。若等度洗脱可行，意味着 $0.5<k<20$；k 超出此范围，则有必要梯度洗脱。但通常选择或需要选择等度洗脱。当离子型样品的初始色谱图给出较宽的保留范围(k 超出 0.5～20 的范围)时，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

使用离子对试剂通常可以使等度分离达到 $0.5<k<20$(例如图 7.8 和有关讨论)。通过改变 pH,使后洗脱组分(为降低保留)离子化或降低先洗脱样品组分(延迟洗脱)的离子化程度，同样可改变保留值范围。

9.2.2.1 等度分离 图 9.1*a* 的梯度洗脱是典型的可用反相等度洗脱的示例。忽略“溶剂峰” t_0,第一个峰在 37min 流出，最后一个峰在 49min 流出(即相对较窄的保留值范围)。由梯度保留值范围(图 9.1*a* $\Delta t_R = 49 - 37 = 12$min)比梯度时间，任何可近似估算等度条件下色谱柱及流速的保留值范围[5]。

$\Delta t_R / t_G$	等度保留值
0.25	$1 < k < 10$
0.40	$0.5 < k < 20$

如 $1<k<10$ 最好，或更小的等度保留值范围 $0.5<k<20$ 也可采用。对图 9.1*a* 的分离,$\Delta t_R / t_G = (12/60) = 0.2$。因此,等度分离对此样品是可行的。

另外,对表 9.3 推荐的条件(15×0.46cm 的柱子,流速 2.0mL/min)，可用表 9.4 解释初始梯度色谱图。为确定等度分离是否可行,选定表 9.4 中第一列的第一个色谱峰(37min)的保留时间(t_R),并确定其在第二列(等度)的对应值(61min; 在 59 和 64min 之间的内插值)。最后一个峰(49min)的保留时间小于这个值（61min），等度保留范围小于 $0.5<k<20$，等度分离则可能。这种情况下,因为 49<61，也推荐等度分离。表 9.4 也可估计最后一个峰的等度洗脱应选用的% ACN。选定第一列最后一个峰的保留时间(49min)，由最后一列确定检应的% ACN 浓度为 81%，因此在等度洗脱时可以采用 81% ACN 的流动相。相反，我们可以通过系列等度运行来替代梯度运行实验。初始运行的% ACN

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

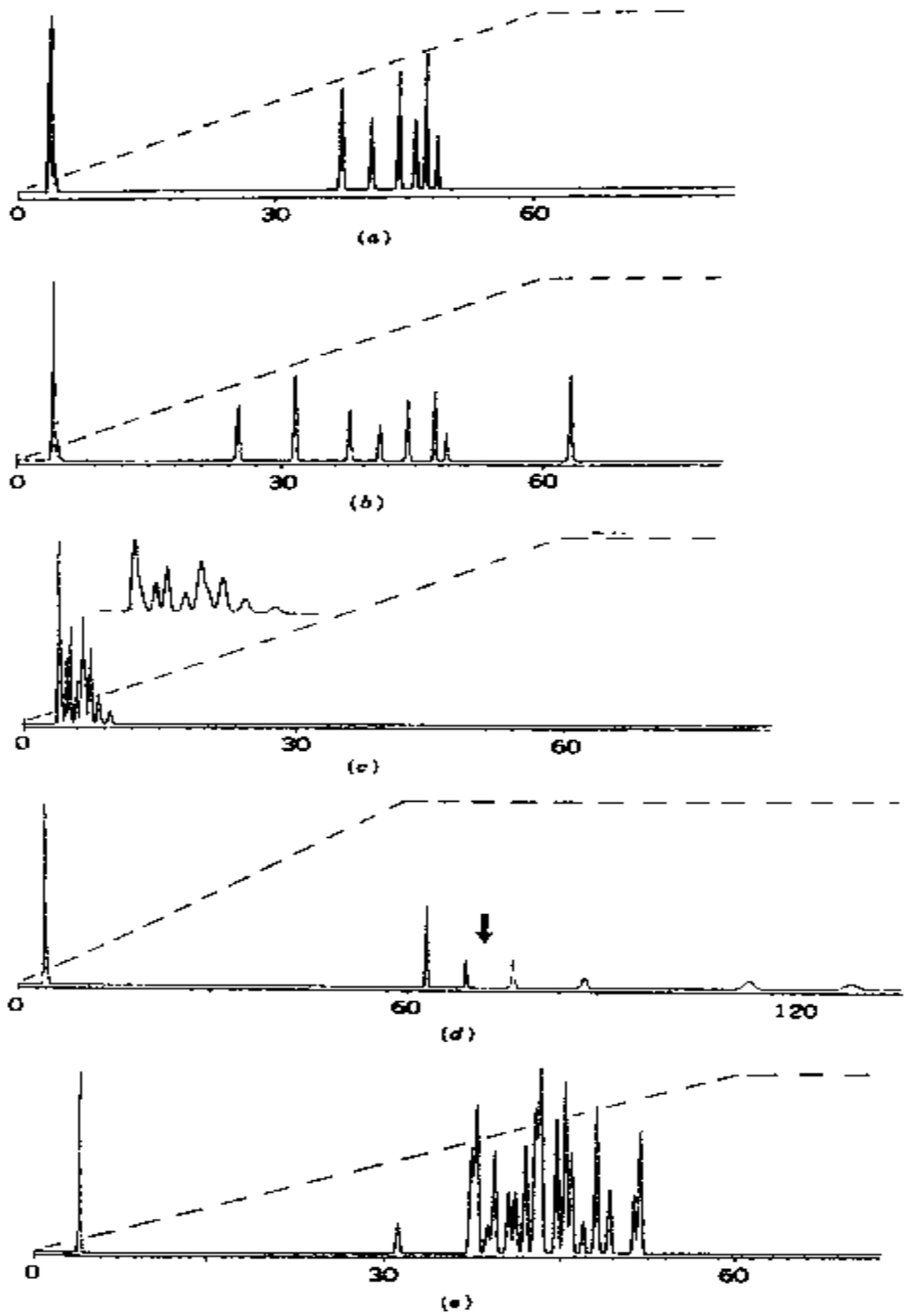


图 9－1 不同样品 RPC 方法建立初始运行梯度[3]（表 9.5 或 9.10 的运行 1）

(a)等度洗脱可行的样品；(b)建议用梯度洗脱的样品(c)RPC 保留太弱的样品(上面为放大的色谱图)；(d)对 RPC 保留太强的样品；(e)HPLC 分离过于复杂的样品。箭头标明了柱尾处梯度终了时间($t_G + t_0 + t_D$)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

浓度应该取 80% 或 100%，并以 20% 的幅度递减 ACN 的浓度，直到最后一个峰的 $k>2$（$t_R>2min$）。$k>2$ 时，再按 10% ACN 幅度递减，直到 $0.5<k<20$。这种方法的说明见图 9.2 中的典型四组分样品（以后叫做样 A）。第一个试验（a）采用 80% ACN 流动相，得到的保留值范围是 $0.1<k<0.3$。因此，对此样品用 80% 的 ACN 作流动相太强。但是试验所需时间很短（≈1min）并给出了一些重要信息。在流动相太强的情况下，可试着将有机相浓度降低 20%。图 9.2b 给出了 60% ACN 的分离结果（$0.9<k<1.2$）。并接着在 50%（c）、40% ACN（d）条件下运行（也标明了当% ACN 改变时，此样品中不同组分之间的峰间距发生变化，4 号峰相对于其它峰发生移动）。40% ACN（$Rs=1.8$，$5<k<7$）对此样品提供了较好的分离。

运用"三倍规则"（见 6.2.1.1），初次运行的最末谱带的 k 值可用来估计% ACN。有机相浓度降低 10% 可以使 k 值大约增加 3 倍。基于初始 80% ACN 的运行结果（$0.1<k<0.3$），估计 50% ACN 条件下可以得到 $k>1$ 的结果。这样，将减少一次试验（60% ACN），更快得到最终分离条件，40% ACN。

9.2.2.2 梯度分离 若起初的梯度分离（实验 1）表明等度洗脱不可行，进一步的试验（和最终的方法）应以梯度方式。图 9.1b 为一个例子。假设 5min 后洗脱的所有谱带都是需要的，由第一个峰和最后一个峰（分别为 25 和 63min）的保留时间可见采用等度洗脱不太可能。$\Delta t_R/t_G=0.63$ 对于等度分离太大。同样地，表 9.4 中最末谱带的最大保留时间时度分离是 49min，也确定了此样品需用梯度分离。表 9.4 可用来决定下一次梯度运行最佳的初始和最终% ACN 值。第一个峰的保留时间 25min 对应的 ACN 浓度为 32%，因此梯度开始时 ACN 浓度可选 32%；最后一个峰的保留时间 63min，对应的 ACN 浓度为 100%，因此梯度终了 ACN 浓度可选 100%。下一次方法建立的运行（运行 2）应以 32%

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

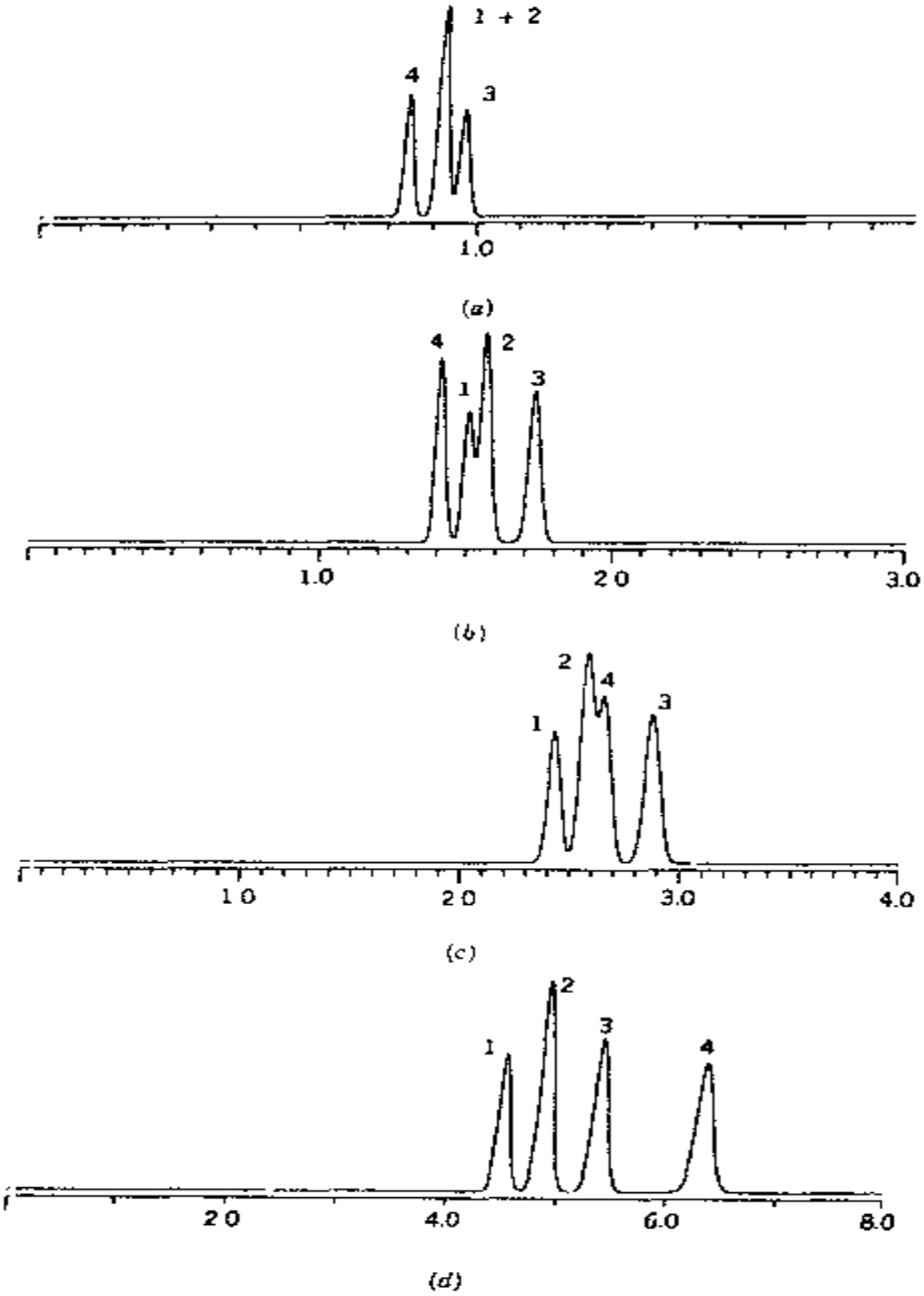


图 9－2　四组分样品的等度 RPC 方法建立

样品(见表 9.6): 1, G; 2, H; 3, I; 4, K_c 条件: 15×0.46cm Zorbax SB C_8 柱; 乙腈－缓冲液流动相 (2mM 磷酸, pH6.5); 35℃; 2.0ml/min. (a) 80% ACN (b)60% ACN (c)50% CAN (d)40% ACN.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

至 100% ACN 梯度展开。

9.2.2.3 弱或强保留组分 初始梯度分离可能会显示样品的弱或强保留。图 9.1*c* 中的先出峰组分一般为碱性溶质，因为在 2<pH<3 的分离条件下，这些溶质以离子状态存在。对于 pK_a<8 的弱碱，随 pH 的增加)，解离度下降，可以在等度洗脱情况下得到理想的保留时间增加，而对于 pK_a>8 的强碱，加入磺酸盐离子对试剂，同样可以使保留时间增加(见 7.4 节)。对于中性或酸性样品而言，先出峰的组分可能具有很强的亲水性(例如，碳水化合物等小分子水溶性有机化合物)。这种样品可以在正相色谱中得到更好的分离（第 6 章第二部分，尤其是 6.6.5)。某些情况下，保留更强的柱填料(表面积大的聚苯乙烯或石墨碳)能有效增加其 RPC 保留。

当样品组分大部分在完成 5～100% ACN 梯度(如图 9.1d)后洗脱时，有四种选择。首先，用 THF－水流动相可使该样品较好地洗脱，因为 THF 比乙腈的强。其次，可尝试非水反相(NARP) HPLC 法(见 6.5)，用更强的，极性较小的有机物如 MTBE，THF，二氯甲烷或乙酸乙酯代替水时，从纯乙腈到更强溶剂的梯度能使样品在梯度条件下洗脱。

中性样品在 RPC 中强保留时用第三种方法。与 RPC 相比，正相 HPLC(第 6 章第二部分)一般能得到较小的保留值及更好的分离效果。正相条件下无取代基的烃类样品的保留可能太弱；不过，用气相色谱常能更好地分离这些样品[6]。

最后，使用大孔（更低的比表面积）、极性更强的色谱柱如氰基柱或三异丙基柱可使保留值降低。

9.2.2.4 强疏水性阳离子 强疏水性组分和阳离子组分代表了图 9.1*d* 中强保留的一种特殊情况，需要不同的处理方法。使用硅胶基质反相柱时，疏水性阳离子可被反相(C_8 或 C_{18})保留也可被正相(硅羟基)相互作用保留(见图 6.27*c* 和相关讨论)。反相相

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

互作用导致低%B 流动相情况下有较强的保留，而正相导致高%B 流动相情况下有较强的保留。此类行为的例子已有报导[7,8]，随%B 的增加，保留时间先减少(RPC 行为)，后增加(NPC 行为)。不过，在大多数这种情况下，中等溶剂强度（50%B）可以得到较好的保留结果。

对于疏水性特别强的阳离子，不论流动相组成(%B)如何，这两种相互作用的任一种都可能会产生强保留，结果证明不可能从 C_8 或 C_{18} 柱上将样品洗脱。这种类型的一个例子是大烷基取代的碱性肽〔q〕，在 NARP 条件下用大孔聚合物柱(保留更小，非硅羟基)可取得较好分离。由于较好的保留加上更高的塔板数，弱保留的硅基反相柱(大孔氰基柱)的效果更好。选用酸性较弱的氰基柱(表 5.4)，也可降低硅羟基效应，使疏水性阳离子保留值进一步降低可采用以下方法：(1)升温；(2)降低硅羟基效应(见 7.3.3.2)；或(3)向流动相中添加阳离子对试剂。

9.2.2.5 复杂样品 图 9.1*e* 中给出了该种样品的示例。此例中色谱图中部聚集着许多重叠峰，不同于图 9.1*c* 中分离开始时的重叠峰。后一种情况通过改用使保留增加的条件可以得到分离(扩展保留范围)。图 9.1*e* 中的样品组分太多，单独用 RPC 法不能完全分开。此问题在文献[10,11]中已作过较详细讨论，一般需要另外的方法进行处理。

当只对样品中某一种或几种组分感兴趣时，可以选择合适的方法将这些组分与样品中的其余组分分开。文献[12]提供了一个从蛋白组织血纤维蛋白溶酶活性物(TPA)的酶解产物中反相分离 38 肽混合物的例子。没有一套单独条件(温度和梯度陡度变化)能分离全部样品。但是选择特定的梯度变化速率和温度能把任何一种小肽从剩下的 37 种小肽中单独分出。

复杂样品的全分离可用不同的方法实现。多维分离是一种方法(即连续使用两种或更多的分离步骤)。在第二次或后面的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

分离中能进一步分离前一次分离出的区带。柱切换是一种多维分离方法(见 4.6),特别是只对一种或几种组分感兴趣时广泛采用这种技术。这种方法在第一根柱上做样品的初始分离,含有待测物的部分通过切换阀转入柱填料和/或流动相不同的(为了改变选择性)第二根柱子。图 6.26 中给出了采用这种方法分析燕麦中 ppt 级(十亿分之一)农药代谢物的例子。对这种样品的第二种方法是使用选择性更好的检测器,如质谱,甚至可以对谱图中重叠组分进行解析(和近似定量)。

处理复杂样品的另一方法是试用不同的分离条件在第一个和最后一个峰(图 2.9 和 7.19 中有一些例子)之间提供更多空间来"展开"色谱图,通常从反相变为正相,反之亦然,这样将很大程度上改变组分特征基团的扎堆现象。若存在能离子化的组分,pH 的改变和/或离子对试剂的使用对出峰次序也有很大作用。图 7.8*b* 和 *c* 的例子与这里提出的作用正好相反,为了避免使用梯度洗脱而使组分的保留时间范围减少(因此增加堆扎堆)。

9.2.2.6 无样品峰 在初始梯度运行时,表 9.1 中未列出的其它可能性也存在。如由于检测器响应不好,或进样量太少,进样后(t_0)根本不出峰。使用"通用型"检测器如蒸发光散射检测器能解决大多数此类问题(见 3.3.1)。不出峰可能也表示仪器功能失调(错误的梯度组合,检测器灯已烧坏等等)。

最后,若用最强的溶剂(即 100% B)30min 后仍不出峰,很可能是所用的分离系统不对。例如,若在 RP 系统中用 100% ACN 还不出峰,所研究的溶质可能保留太强。换一个保留较少的 RP 柱(如低表面积,大孔氰基柱或三异丙基柱)可能会得到期望的洗脱。然而更有效的办法是改变分离模式,如换成正相 HPLC(见第 6 章第二部分)。

不纯的流动相溶剂或添加剂也可能引起许多人工峰(见 8.5.3.2)。在进行图 9.1 中的初始梯度运行前,最好先作空白梯

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

度运行以保证色谱图中不会出现人工峰。

9.2.3 评价峰型和柱效

谱图中的一些谱带至少有部分分离时(如图 9.2 中 40% ACN 运行),就可以测量和计算它们的峰宽和对称性。必须注意峰的拖尾或扭曲(5.4.2、5.4.3 和 7.3.3),因为硅烷化相互作用将导致最终建立的方法普适性变差。要特别注意硅基柱的硅烷化效应,为了减小硅烷化效应而做的分离条件改变也能引起保留值和选择性的变化,因此由于保留值和谱带扩张的影响,在校正硅烷化效应后需重新优化,在降低硅烷化效应前开展方法建立的实验没有最终价值。方法建立中的峰形问题发现后应尽快校正。

塔板数 N 低是存在的另一个问题,通常由初始条件(假设已知色谱柱是"好的")的选择引起。表 9.5 列出对于不同长度和填料颗粒尺寸色谱柱类型的 N 值。若 N 的实验值达不到这些值的一半,(例如对一根 15cm, 5μm, 流速为 2ml/min 的色谱柱<4000 塔板数),必须通过实验分析和解决这一问题(见 5.4 和 7.3.3)。样品分子量<500Da 时,较小的 N 值是允许的。

9.3 完成等度方法建立

若图 9.1a 的初始梯度运行表明等度分离是可能的,用表 9.5 的方法可实现大多数常规样品的分离。假如在完成了各种乙腈和甲醇混合流动相实验后应有必要对选择性作进一步调整,可参考第 6 或第 7 章的内容进行选择。本节中用 3 个例子来验证表 9.5 中的方法建立过程,样品为 11 种不同形式取代苯的混合物(表 9.6)。通过对流动相组成(乙腈 - 甲醇 - 水)[3]对分离影响的研究,我们可以了解对不同复杂程度样品建立分析分离方法的基本过程。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 9－5　常规样品和等度 HPLC 分离方法建立的系统策略

实　　验	问　　题
运行 1[a] 其它条件见表 9.3；60min 内 5→100% ACN 梯度[b]	1.1 能用反相 HPLC 吗？（无弱或强保留组分）？ 1.2 样品用单一 RPC 分离是否太复杂？ 1.3 等度或梯度洗脱哪个更好？
运行 2[c] 从运行 1 和表 9.4 中选出%ACN[b]	2.1 峰对称吗？ 2.2 塔板数合理吗？ 2.3 k 范围合理吗？ 2.4 分离得好吗？ 2.5 运行 3 应使用何%ACN（增加或降低 10%；改变 k1/3 或 3 倍）？
运行 3[c] %ACN 增加 10%[e]	3.1 此分离最佳的%ACN 是什么？ 3.2 分离得好吗？[d]
运行 3a[c] 运行 2 和 3 的最佳%ACN	3.3 能肯定充分分离了吗？[d]
运行 4[c] 运行 2 和 3 用来估计最佳%MeOH（表 9.7 或图 6.4）	4.1 k 范围合理吗？ 4.2 分离得好吗？ 4.3 运行 5 用什么%MeOH？
运行 5[c] %MeOH 增加 10%[e]	5.1 此分离的最佳%MeOH 是什么 5.2 分离得好吗？[d] 5.3 关键峰对在最佳 ACN 和 MeOH 运行中变化吗？（若变，运行 6）
运行 5a[c] 运行 4 和 5 的最佳%MeOH	5.4 能确定充分分离了吗？[d]
运行 6 和 7[c] 运行 2,4 及运行 3,5 流动相混合（1:1）	6.1 水/甲醇和乙腈混合物可以充分分离了吗？[d]
运行 7a[c] 优化水、甲醇和乙腈三元溶剂体系	7.1 能确定分离充分了吗？[d] 7.2 用 ACN－MeOH 混合物的分离充分了吗？

[a] 用 80～100%ACN 等度洗脱是一种选择（图 9.2）
[b] 对非离子样品不需缓冲液
[c] 重复运行，若有标准物品
[d] 优化柱条件（可选）
[e] %B 降低 10%除非"规则 3"预测对最后的峰 $k>20$；此时将%B 增加 10%
[f] 将运行 2.4 或 3.5 的流动相等体积混合；见图 6.15 讨论

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 9－6　9.3 中分析实例的样品组分

A	Benzonitrile	B	p－Cresol	C	2－Chloroaniline
D	2－Ethylaniline	E	N－Ethylaniline	F	3,4－Dichloroaniline
G	2－Nitrotoluene	H	3－Nitrotoluene	I	Toluene
J	4－Nitro－m－xylene	K	4－Nitro－m－toluene		

9.3.1　优化保留值和选择性

下面的例子基于初始梯度实验。若无梯度设备，可如图9.2所示用三或四次等度运行来代替表9.5中的第1至3次运行。

9.3.1.1　样品 A：简单分离　图9.3与图9.2是不同条件下对四组分样品的分离，图9.2在80% ACN 等度条件下完成。初始梯度运行（图9.3 *a*：60min 内5→100% ACN）用来决定最佳的下一次实验。第一个和最后一个峰的保留时间分别为19和24min，由表9.4，最末峰保留时间为43min，所以等度洗脱可行。表9.4中（最末谱带 $k=7$）推荐的等度流动相是40% ACN，它对应于表9.5中的第二次运行并在图9.3 *b* 中给出。得到的保留值范围为 $5<k<7$，分离度 $R_s=1.8$。根据 RPC 方法的要求，第二次运行的结果已达到要求，无需再作进一步改变条件的实验。如果要求提高分离度或在分离的其它方面有所改进，可以进一步改变% ACN（表9.4中第3次运行）。乙腈浓度增加10%（至50%）估计 k 值将为1.7至2.3（见6.2.1.1"三倍规则"），而浓度降低10%（至30%）大约会使 k 值由达到15至21（即30% 或50% ACN 的保留应该都可接受的）。不过，图9.3 *c* 中所示30% ACN（第三次运行）的分离不很理想，分离度更差（$R_S=1.5$，由于随% ACN 改变，选择性发生变化），运行时间也更长。对比图9.3 *b* 和 *c* 表明>40% ACN 的流动相会给出 $R_S<1.8$的结果，这是因为当% ACN 升高时关键峰对1/2（对>40% ACN）分离度下降。因此，就分离度来说，40% ACN 已接近于最佳，且只需三个实验就能得到这一条件。可开展进一步的"微调"实验来优化分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

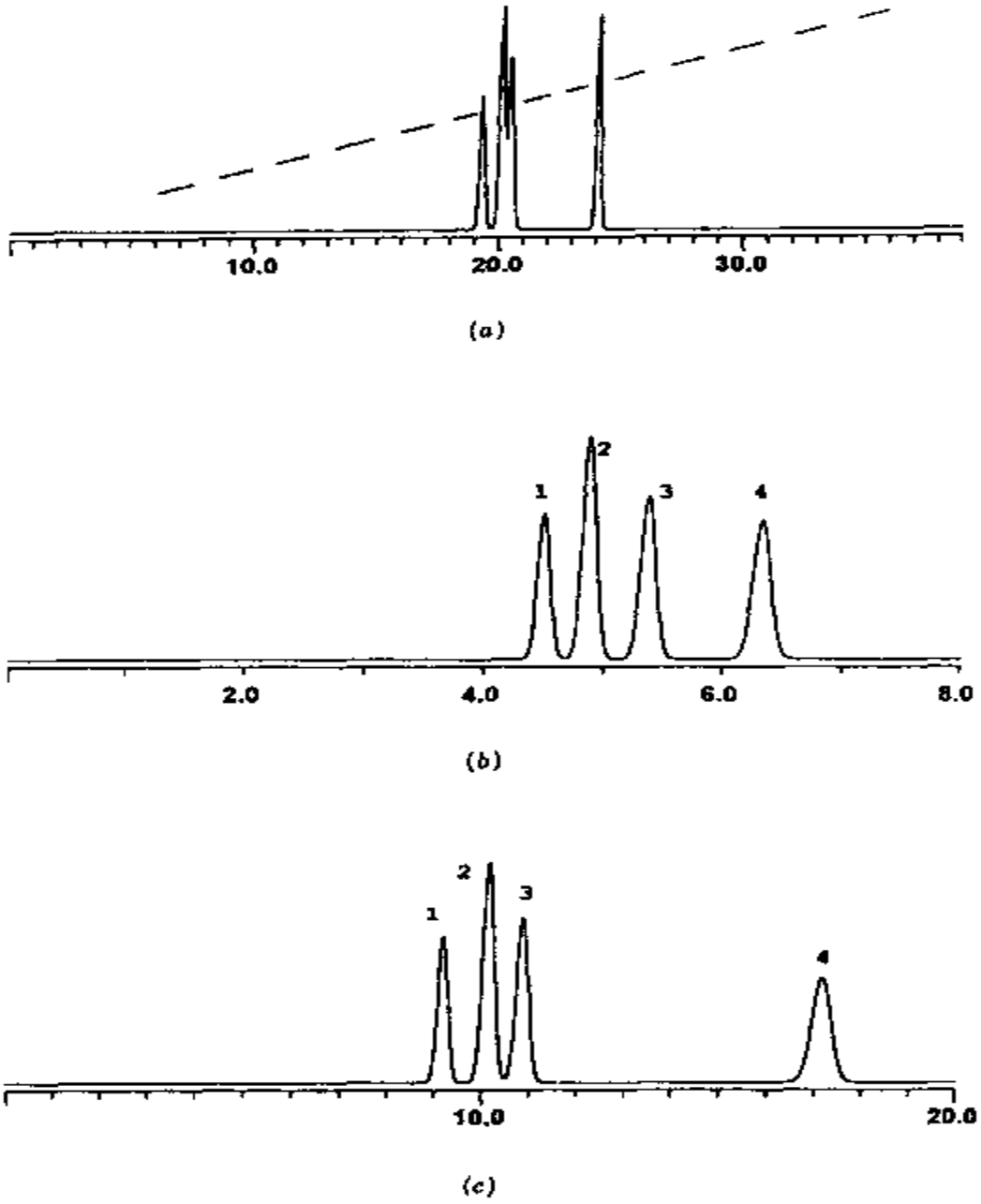


图 9－3　根据表 9.5 的方案建立图 9.2 中样 A 的 RPC 方法(以梯度分离开始)

(*a*) 5～100% CAN/60min 梯度；(*b*) 用 40% ACN 等度分离；(*c*)用 30% ACN 等度分离

其他条件同图 9.2

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离，但40% ACN 的确给出了最佳结果。

9.3.1.2 样品 B：典型的分离 图 9.4 所示为成功分离一 9 组分样品的方法建立过程。初始梯度运行（图 9.3*a*，表 9.5 第一次运行，5→100% ACN/60min）和表 9.4 表明可以采用等度分离（初峰：9min；末峰：24min）。同样末峰的保留时间说明等度洗脱可以采用 40% ACN 的流动相。这一条件（见图 9.35，表 9.5 中运行 2）能够使 9 种组分得到分离，但 2/3 峰对和 8/9 峰对的分离度较差。如前面的例子，下一步应使流动相变为 30% ACN（表 9.5 第三次运行）。图 9.4*c* 说明谱带 2/3 完全重叠，而谱带 8/9 却以相反的保留顺序被分开。这两次运行（30 和 40% ACN）表明升高% ACN 将会使 40% ACN 运行的关键峰对 2/3 和 8/9 分离的更好，事实的确如此（图 9.4*d* 经连续试验得到的 49% ACN）。不过该分离结果仍不太好（$R_s=0.9$）。由于运行时间很短（<4min），改变柱条件（见 9.32 和图 9.7*b*）可进一步优化方法。

9.3.1.3 样品 C：难分离的情况 B 样品中再加两种组分就产生了一个 11 组分更难分离的混合样品（样 C），它需要表 9.5 中的所有实验，图 9.5 是这些实验的流程图。初始梯度运行（第一次运行）后，用两种不同的% ACN（第 2，3 次运行）流动相进行等度实验，得 $0.5<k<20$ 若后面的运行说明流动相不能使样品充分地分离，用甲醇代替乙腈来再做一或两次实验（第 4，5 次运行）。选择分别和第 2、3 次运行（见表 9.7）的溶剂强度相同的甲醇流动相来做第 4、5 次运行，若用甲醇作流动相时，后两次运行仍不能得到较好分离，将甲醇和乙腈流动相作比较，研究随着溶剂的变化关键峰对是否变化。若有变化，接着用甲醇和乙腈的混合物作流动相（第 6，7 次运行）。当第 2 至 7 次运行完成后，就会弄清由水、甲醇和/或乙腈组成的流动相是否会得到满意的分离结果。当使用计算机模拟（见 10.2）时，进行第 8，9 和 10 次运行可能对得到更精确的结果有价值，尤其是对含<20% 或>80% B 的流动相而言。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

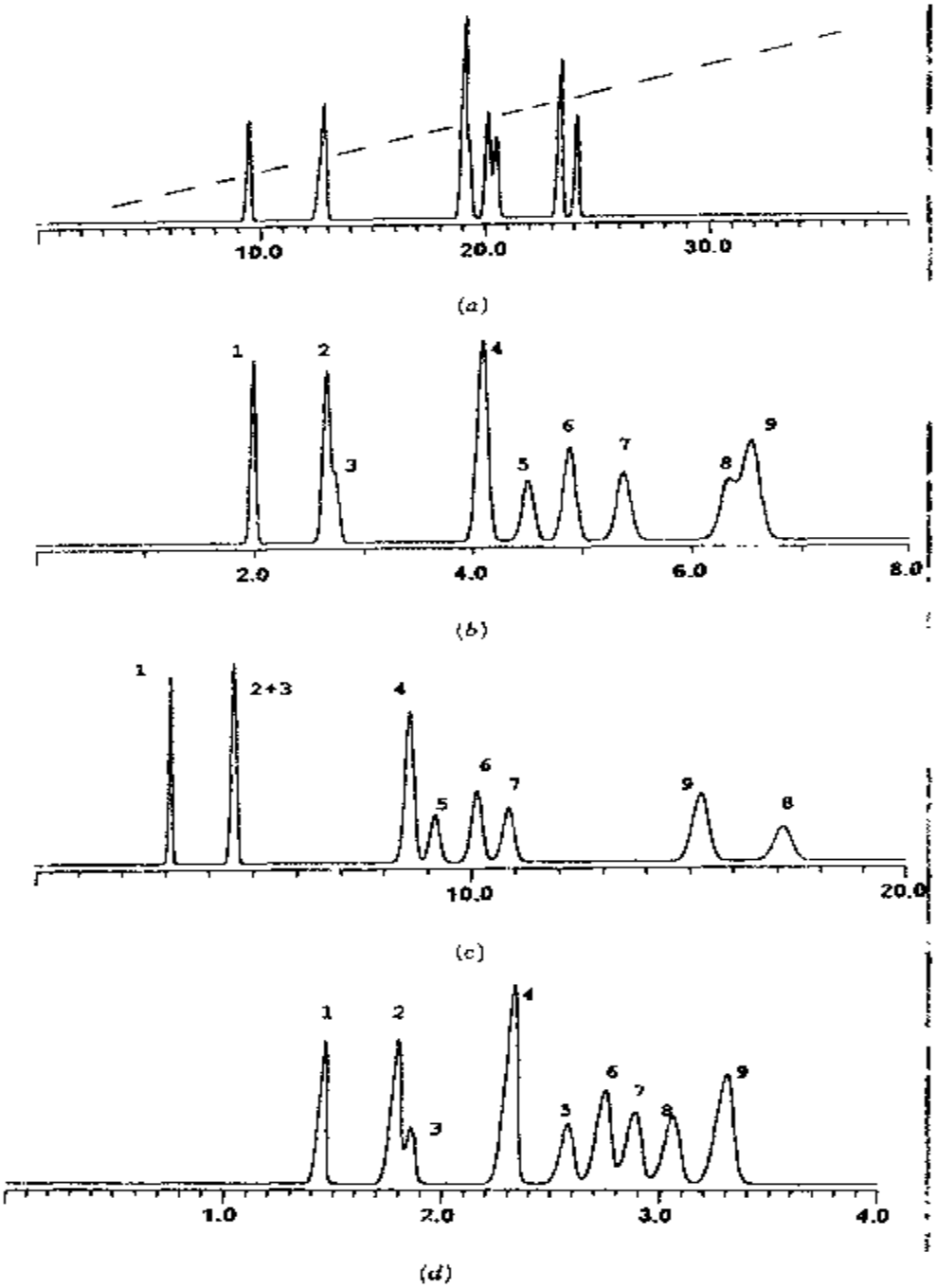


图 9－4 根据表 9.5 的方案建立样 B 的 RPC 方法(以梯度分离开始)

样品(见表 9.6): 1, A; 2, B; 3, D; 4, F; 5, G; 6, H; 7, I; 8, J; 9, K。条件如图 9.2 除了(a) 5～100% CAN／60min 梯度(b)用 40% ACN 等度分离(c)用 30% ACN 等度分离(d)用 49% ACN(优化)等度分离

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

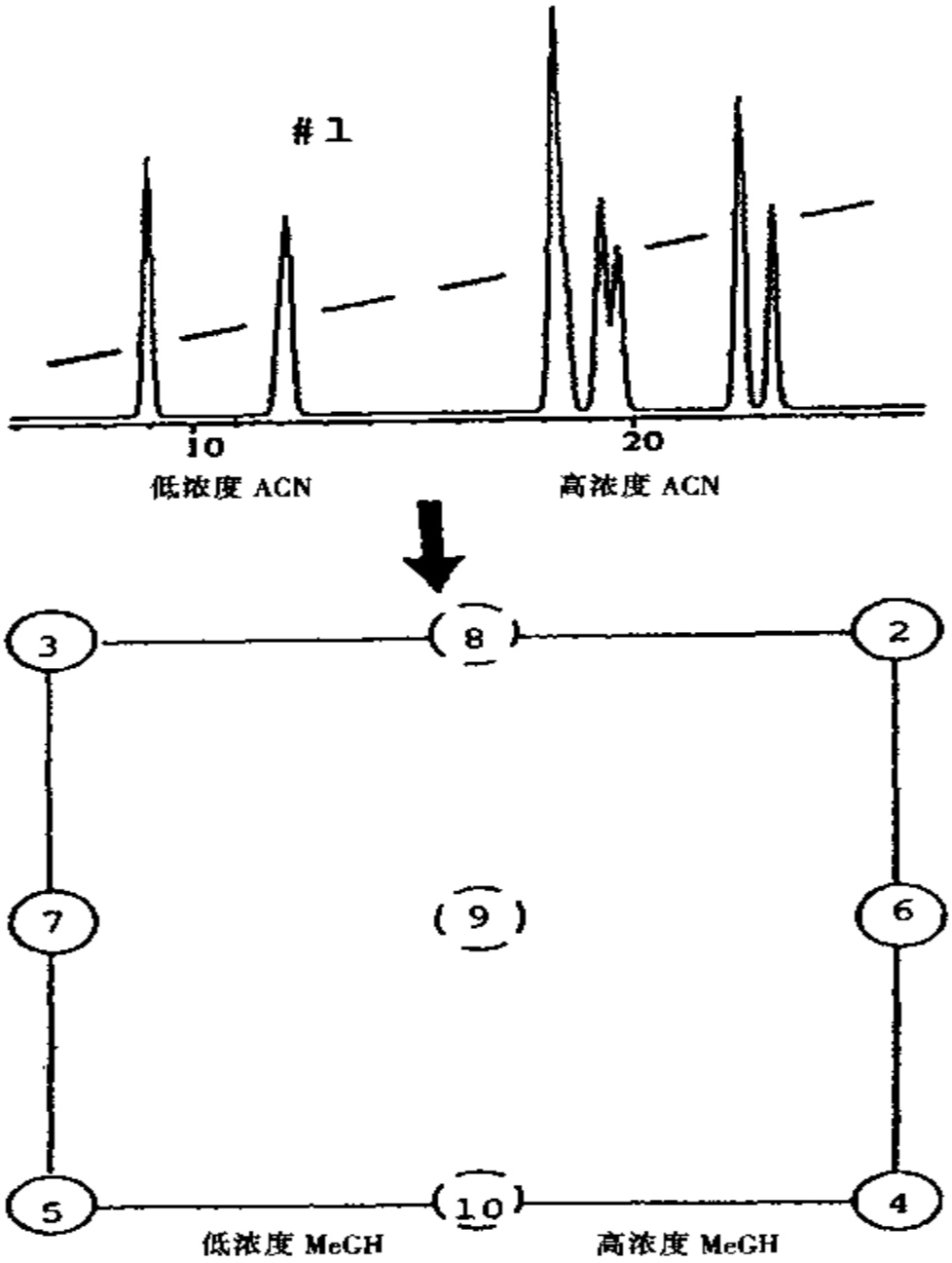


图 9－5　表 9.5 方法建立策略的实验设计

图9.6*a* 给出了图9.5中设计的分离样 C 的方法，初始梯度运行(a 5→100% ACN/60min)有和图9.4一样的首峰和末峰。因此，等度分离是可能的，且第二次运行最好为40% ACN 为流动相(表

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

9.4)。下一步用30% ACN 做第3次运行。第2,3次运行中峰1,3和4分离得不好,说明采用任何% ACN 值都不能得到成功的分离。

基于图 9.6*a* ~ *c*(见表 9.7),第 4,5 次运行应采用 40%〔*d* 部分〕和 50% 甲醇〔*e* 部分〕。两种甲醇 – 水流动相均不能分开峰 1 和峰 2,说明用甲醇 – 水流动相不能分离此样品。但用甲醇代替乙腈作流动相时,关键峰对(1/2 和 3/4)有变化。这说明甲醇和乙腈的混和物能使此样更好地分离。

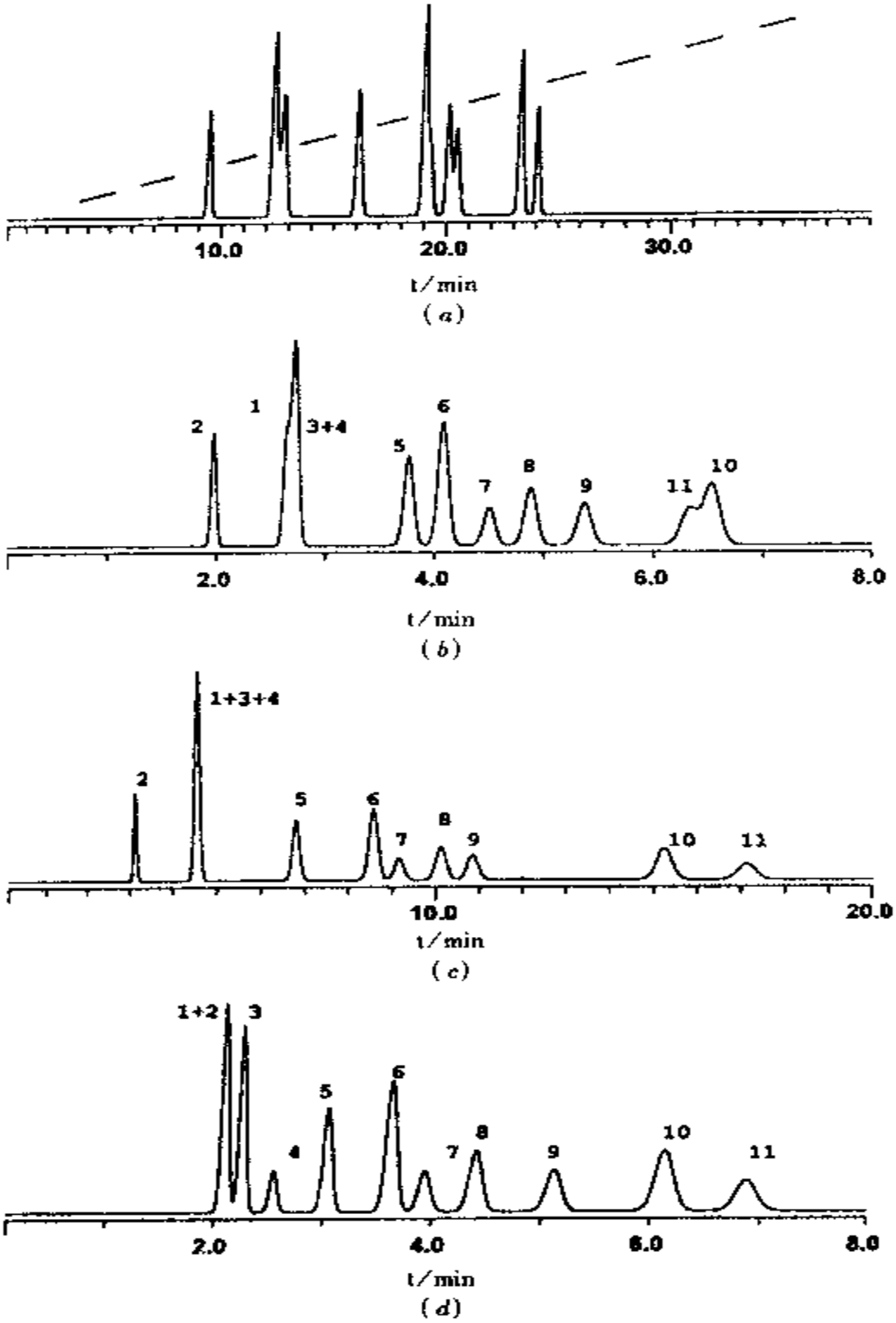
表 9 – 7　甲醇-水与乙腈-水[a] 的等溶剂强度混合物

% ACN	% MEOH	% ACN	% MEOH
5	7	55	65
10	14	60	70
15	21	65	74
20	28	70	78
25	34	75	82
30	40	80	86
35	45	85	90
40	50	90	95
45	55	95	98
50	60	100	100

[a] 亦见图 6.4

将 40% 乙腈和 50% 甲醇流动相混合(1: 1)后得到含 20% ACN 和 25% MeOH 的流动相(图 9.6*f*,第 6 次运行)。正如所期望的,分离结果比用任何一种二元流动相(谱带 1 和 3 是关键峰对,$R_s = 1.1$)效果都好。用 30% 乙腈和 40% 甲醇混合流动相来做 7 次运行(见图 9.6*g*: 15% ACN 和 20% MeOH),关键峰对 1/3,6/7 和 8/9 的分离度很差。因为与第 7 次运行[图 9.6*g*, 35% 有机相]相比,第 6 次〔图 9.6*f*, 45% 有机相〕运行中 1/3 峰的分离度较好。继续增加有机相可能改善图 9.6*f* 中的分离。目前最好的分离是用 53% 有机相(图 9.6*h*: 23% 乙腈 + 30% 甲醇),$R_s = 1.3$。可改变条件来继续提高分离效果(见 9.3.2)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

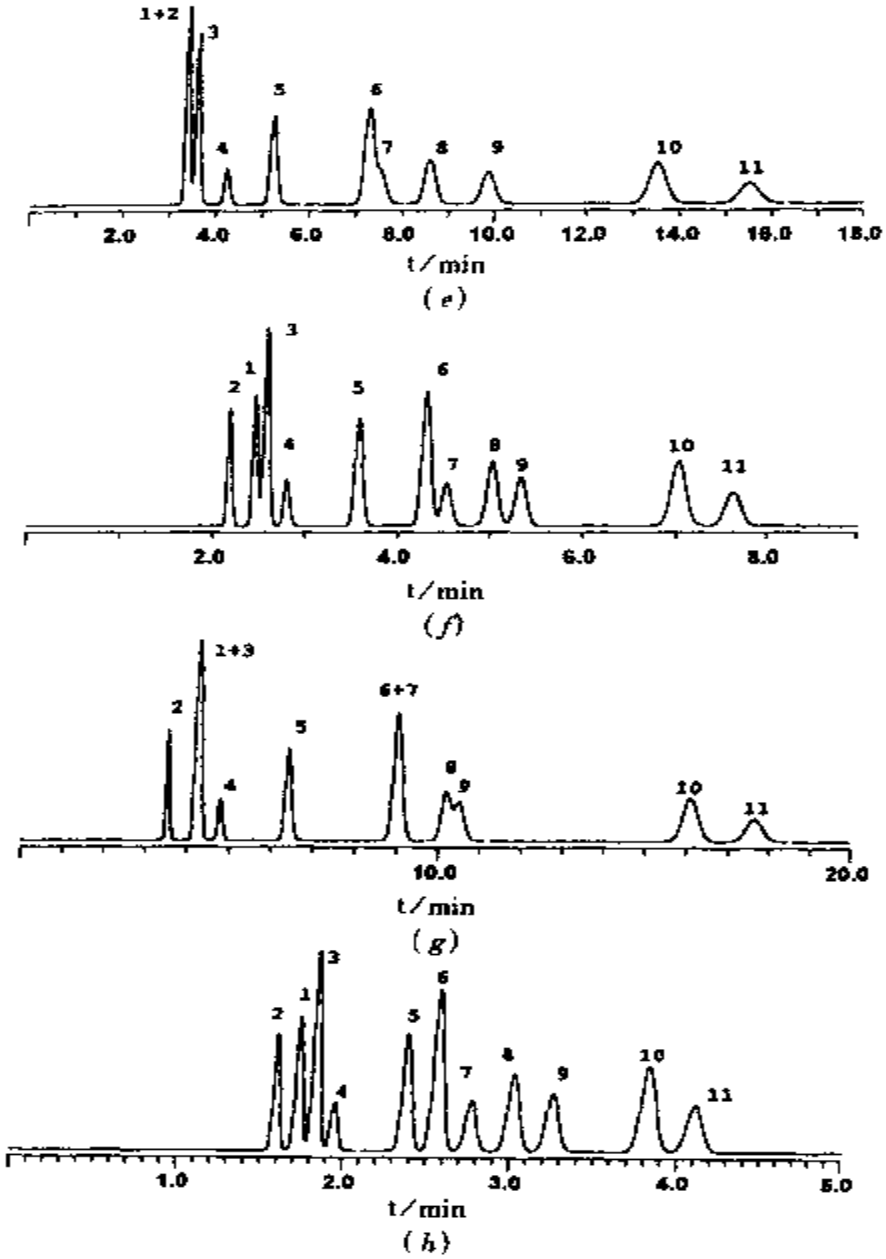


图 9－6 根据表 9.5 和图 9.5 的方案建立样品 C 的 RPC 方法(由梯度分离开始)

样品(见表 9.6): 1, A; 2, B; 3, C; 4, D; 5, E; 6, F; 7, G; 8, H; 9, I; 10, J; 11, K。除了样品中附加工种组分和不同流动相的使用外条件如图 9.2 和 9.4: (*a*) 运行 1, 5 至 100% CAN/60min; (*b*) 运行 2, 40% ACN; (*c*) 运行 3, 30% ACN; (*d*) 运行 4, 40% MeOH(*e*) 运行 5, 50% MeOH; (*f*) 运行 6, 20% ACN + 25% MeOH; (*g*) 运行 7, 15% ACN + 20% MeOH; (*h*)运行 8, 流动相水减少;23% ACN 和 30% MeOH(R_s = 1.3)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

9.3.1.4 进一步改善分离 在表9.5或图9.5中的各种实验做完后还要求分离效果的进一步提高，有两种选择：第一，用9.3.2中描述的方法优化柱条件。当要求分离度较大（R_s>0.8）且不考虑运行时间问题时，这可能是较好的选择。第二，改变其它分离条件（例如温度，色谱柱类型，pH，使用离子对试剂等）也可进一步改善选择性。表9.8给出了这种情况下所做的第一种选择，并按顺序列出了对中性或离子型样品可供选择的条件变化。对一些特殊的情况，也可以考虑进一步实验不同的优先顺序。6.3，7.3.2和7.4中的一般性讨论可以指导这些研究的条件选择及实验方案。

表9－8 表9.4的方法不成功时，改变选择性和分离的附加条件[a]

中性样品	离子样品
柱类型；氰基或苯基柱(6.3.3)	温度(7.3.2.4)
温度(6.3.4)	pH(7.3.2.1)
THF作溶剂(6.3.2)	柱类型；氰基或苯基柱(7.3.2.7)
不同的C_{18}柱(6.3.2)	离子对试剂(7.4.3.2)
	THF作流动相
	缓冲液类型或浓度；胺调节剂(7.3.2)

[a]. 反相HPLC中按由上到下的顺序改变条件

9.3.1.5 以后样品方法的改变 方法建立之初的样品与后来的样品有时存在差异。最常见的例子是新的干扰物，杂质，代谢物，或降解产物出现在后来的样品中。当新的样品组分与谱图中的分析物谱带重叠时将产生新的问题。此时，可采取两种措施：1. 根据表9.5中要求的实验，由第二次运行开始重复方法建立直到感兴趣的样品组分全部被分离；2. 以试一试法调整不同的实验条件（%B，ACN，MeOH，THF的比例，柱温，pH等）研究是否方法的微小变化能带来更好的分离。第一种方法常能以最少的工作量得到预期的分离。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

在研究项目的初期阶段，最初建立的方法通常是为了“快速和粗略”地应用。例如，方法可用于不同产品的“粗检测”或为了研究反应条件的影响。后来，可能要求更精细的检测，需要将方法应用于不同的样品基质和/或者碰到额外的样品组分。在同一组织的不同课题组中，用表9.5中的标准方案来建立方法会使初始研究结果与后来得到的(用必要的不同 HPLC 法)数据更容易比较。由于此法能为后面的工作提供保证，并避免一些随机性偏差，使得初始方法建立研究中所做的实验能够被更好的利用。当方法可能需进一步完善或改进时，在方法建立中用同样的柱填料更有利。

9.3.2 优化柱条件

柱子长度，填料大小或流速的变化常被用来优化最终的分离，特别是只要求分离度的微小提高时。表 9.9 中总结了用不同柱条件来改善分离的优点和缺点，在这种分离中(k 不变)流速提供了最方便和可预测的变化，但可能只有分离度的较小提高和运行时间增加相当大，增加柱长可使分离度增加较多而运行时间增加较少。

小粒度的柱填料在不增加运行时间的条件下能提供更好的分离度，或在不降低分离度的情况下能更快分离。但由于柱填料的多样性，柱长或填料大小的变化能带来选择性的变化，可能需要调节流动相组成来恢复原来的峰间距。图 9.4d 中，样品的分离度较小($R_s=0.9$，尽管已优化% ACN)，但运行时间较短(<4min)，首先应考虑增加柱长并降低流速。这种方法可以维持压力基本不变面使分离度显著提高，运行时间只有较小增加。图 9.7a 和 b 展示了将柱长从 15 厘米(a)变到 25 厘米(b)，流速从 2ml/min(a)变为 1ml/min(b)时的情况。分离度 R_s 从 0.9 升至 1.4，而运行时间增加到 11min。对于这种复杂程度(9 组分)的样品，这是可接受的分离。同时降低填料粒度(比如从 5 到 3.5μm)和柱长(如从 25 至 15cm)能在不增加运行时间的情况下增加分离度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 9－9　柱条件改变的特征(等度分离)

变　　量	特　　征
降低流速	能适度地增加分离度，增加运行时间，降低压力，不会发生未知的选择性改变(相同的柱子)
增加柱长	分离度明显增加 运行时间和压力明显增加，可能有预计不到的选择性变化[a]
降低填料粒度	能较大提高分离度、运行时间和柱压 可能有预计不到的，选择性变化，更短的柱子使柱外效应更重要 对填料 < 3.5μm 更易产生其它问题(堵塞)

[a] 会发生选择性的变化，因为不同批号的柱填料与所用的第一根色谱柱的柱填料之间存在差异。(见 5.2.4 节)

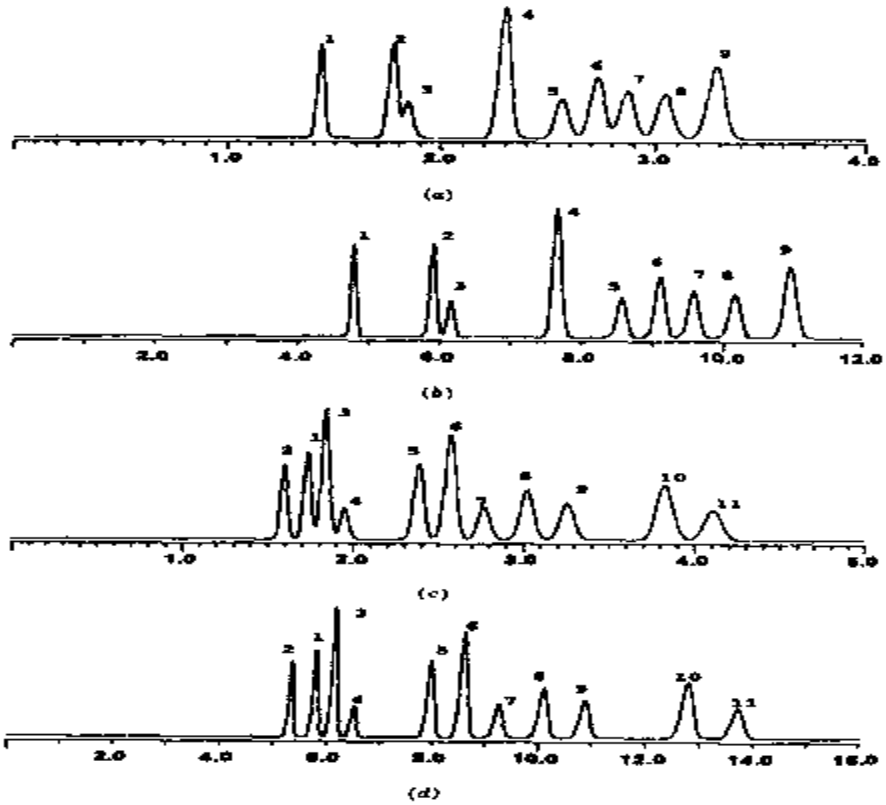


图 9－7 采用柱条件的变化改善分离

(a)同图 9.4d(15cm 柱，2.0ml/min)；(b)同(a)除了 25cm 柱和 1.0ml/min；(c)同图 9.6h(15cm 柱，2.0ml/min)；(d)同(c)，除了 25cm 柱和 1.0ml/min。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

如图 9.6*h* 所示，可以使图 9.7*c* 和 *d* 中样 C 的分离度得到类似的增加。对柱条件的同样变化，会使分离度 R_s 从(*c*)中的 1.3 增至(*d*)中的 2.0(可接受)，而运行时间从 4.5min 增至 14min。当样品分离度大于需要时($R_s \geq 2$)，可改变柱条件来减少运行时间，通用的最好的方法是降低柱长和增加流速。

9.4 完成等度方法建立的另一途径

图 9.3 至 9.6 中例证的(表 9.5 推荐)方法基于溶剂类型(乙腈和甲醇)和强度(%B)的同时改变。另一种方法是同时改变溶剂强度(%B)和温度(T)[13-16]。特别是以梯度方式进行方法建立时，更方便且需要更少的运行次数(见 9.5)。柱温的改变对离子型样品选择性影响很大，而对中性样品效果相对不明显。

图 9.8*a* 示出了相应的运行策略。初始梯度运行完成后，第 1,2 次运行对应于图 9.5 的第 2,3 次运行，图 9.8*a* 的第 3,4 次运行重复第 2,3 次运行，但温度升高。这四次运行说明了为加大峰间距和分离度，%ACN 或 T 的进一步变化趋势。若运用计算机模拟(见 10.2)，图 9.8*a* 的四次运行可预测任何%ACN 或 T 值下的分离。图 9.8*a* 的方法对离子型样品比对中性

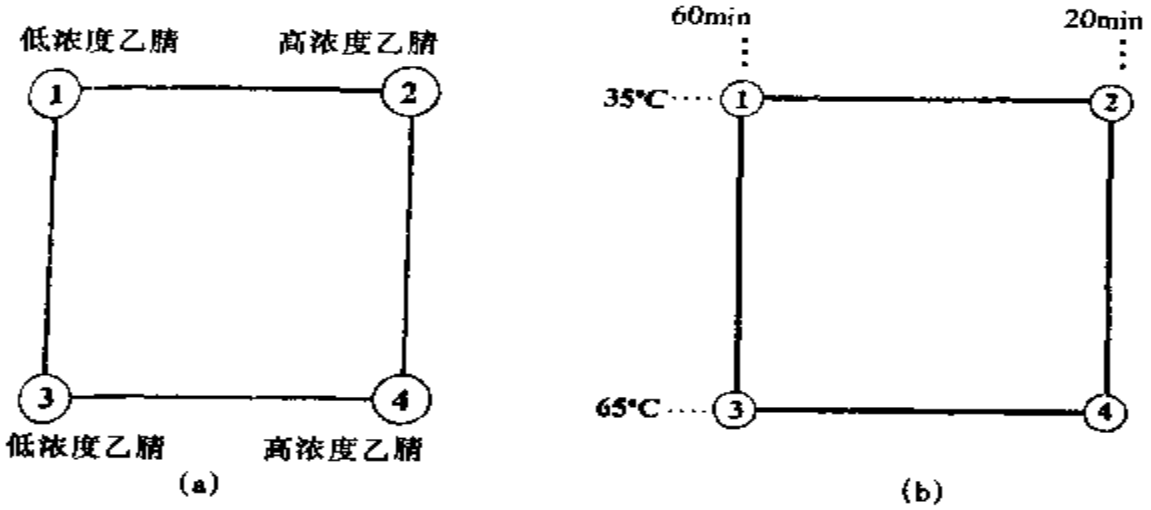


图 9-8 基于改变溶剂强度和温度的方法建立策略
(*a*)等度方法；(*b*)梯度方法

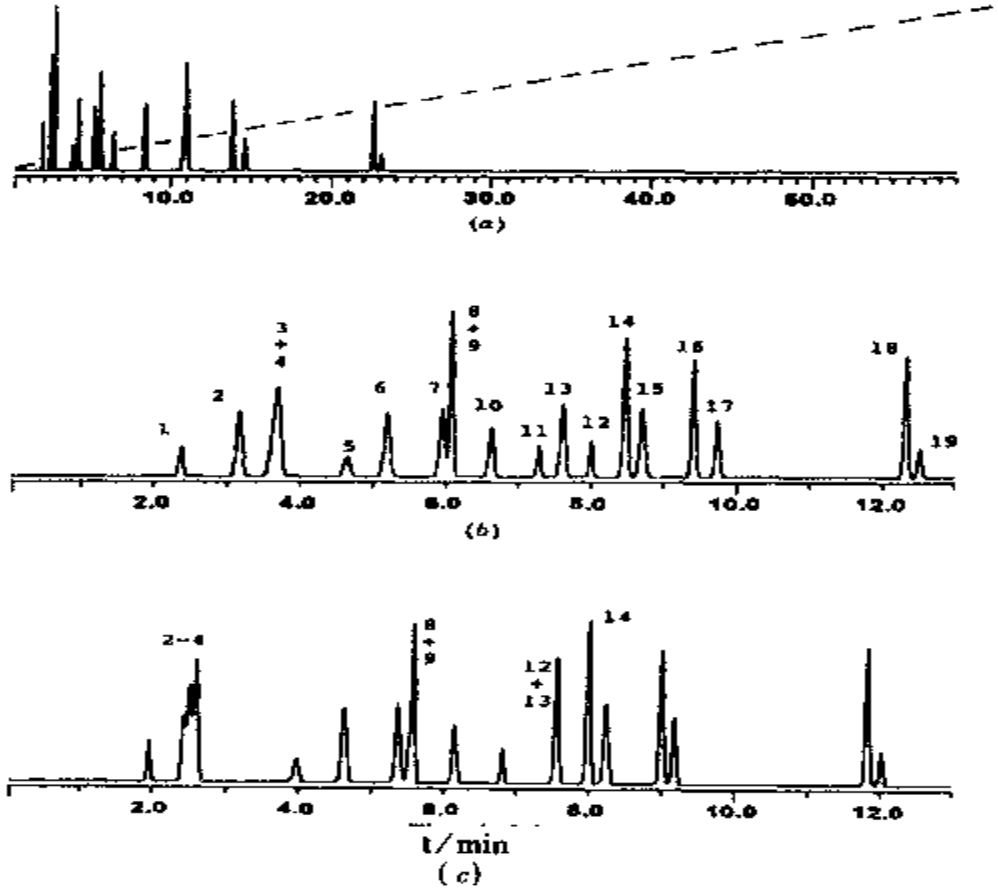
PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

样品更有效,对多取代组分比对未取代或单取代组分更有效[15,16]。

温度超过 50℃,使样品阀和进入柱子的流动相[13]恒温变得非常重要,否则带宽会增加 2 倍或更多,引起样品分离度的降低。对用低 pH 流动相的操作,也必须使用稳定的柱填料(高分子或位阻保护的固定相,见 5.2.3.4)

9.5 完成梯度方法建立

图 9.1b 中的初始梯度分离表明等度洗脱不可行,即使等度分离可行,一般梯度洗脱用更少的实验就能给出令人满意的分离,因为在梯度洗脱(6.3.1 和 8.4.2)情况下能更有效地使用溶剂强度选择性,而梯度速度的简单变化也是大多数样品[15,16]提供峰间距调整的有效途径。



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

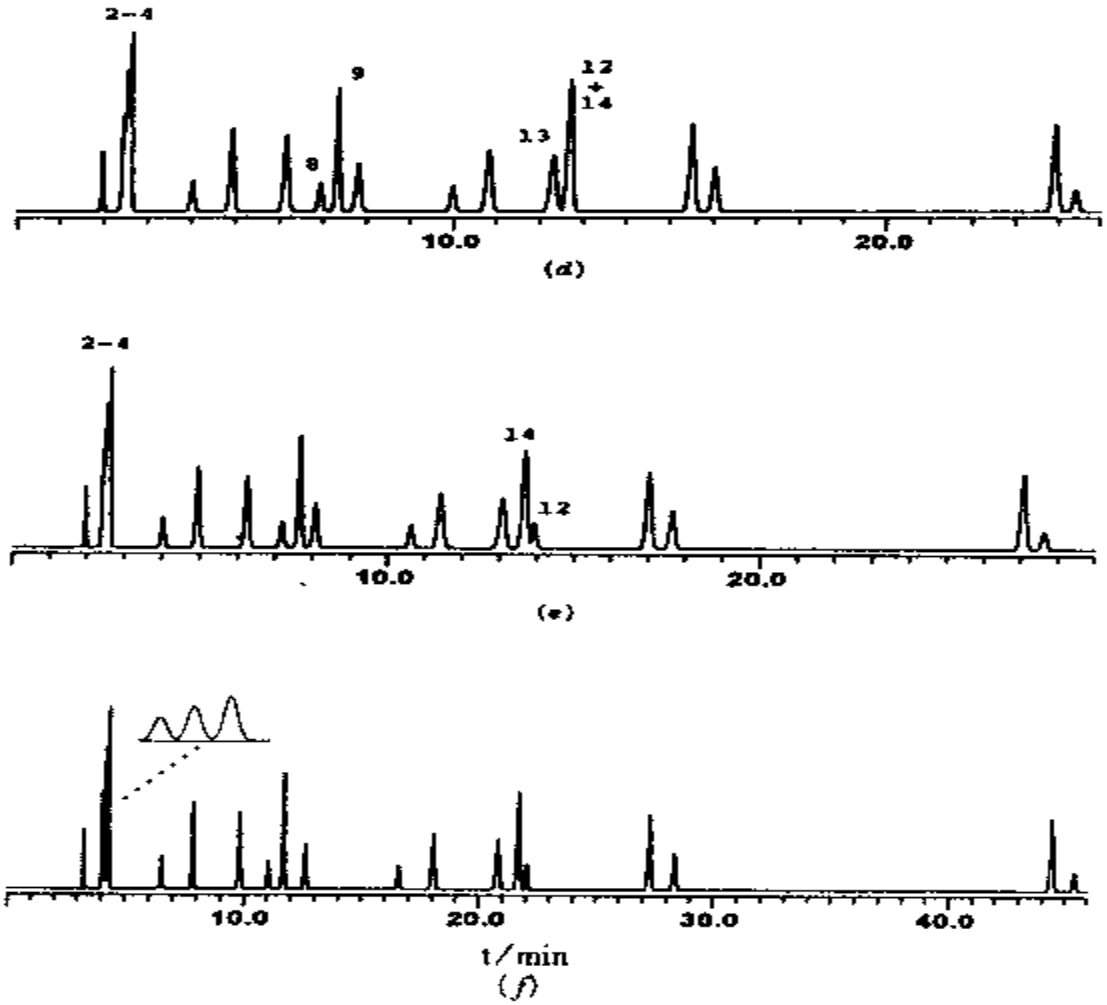


图 9-9　19 组分碱性药物样品的方法建立[13]

条件: 15×0.46cm 5μm Zorbax Rx C_{18} 柱。用 0.1% TFA-水作 A 溶剂; 0.1% TFA-乙腈作 B 溶剂的梯度运行; 2.0ml/min; 其它条件如每个谱图所注。

(*a*) 5→100% B/60min, 30℃; (*b*) 0→47% B/10min, 30℃; (*c*) 0→47% B/10min, 60℃; (*d*) 0→47% B/30min, 60℃ (*e*) 0→47% B/36min, 60℃; (*f*) 0→47% B/72min, 30×0.46cm 柱, 3.5μm 填料。

插图更清楚地说明了峰 1 至 3 的峰间距的变化。

表 9.10 列出了发展梯度方法推荐的基本策略,这里以一种含 19 种基本成份的药物样品对其加以说明(图 9.9). 第 1 个实验和等度方法建立中一样: 60min 内从 5% 至 100% ACN 的一个探索性梯度运行。用表 9.4 评价得到的谱图,图 9.9a 中第一个和最后一

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

个谱带的保留时间为 2min 和 23min，因此等度方法有可能完成分离，但较为勉强。当预测的 k 值范围较宽而使等度洗脱很难完成较好分离时，特别是样品中含有较多组分(>10)，建立梯度洗脱的分离方法通常更简单。因此，我们用梯度方式开展后面的实验。

表 9－10　对常规样品和梯度分离[a] HPLC 方法建立的系统方法

运行 1.	60min 内 5→100%B；15×0.46cm 柱，2.0ml/min；35～40℃
运行 2.	根据表 9.4 调整初始和最终%B 值；增加梯度变化速度至 5%/min；检查运行 1 和 2 的难分离峰对；$R_S>0.7$ 对任何梯度变化速度都可能吗？
运行 3.	升温至 60～70℃，重复运行 2 的分离
运行 4.	将梯度时间增加 3 倍，重复运行 3 的分离；检查运行 1 至 4 的关键峰对；对任何梯度速度或温度所有峰的 R_S 大于 0.7 吗？
运行 5.	若 $R_S>0.7$，在此条件下分离
运行 6.	若要求 R_S 增加，由改变柱条件来实现
运行 7.	若梯度速度和温度的增加不能使样品充分分离，研究如图 9.5 或表 9.5 中甲醇或乙腈－甲醇混合物的使用(用更陡的梯度代替高比例的有机相)，若此法不行，研究表 9.8 中给出的其它变化。

[a] 见表 9.3 其它条件，连续实验直至达到成功分离。

表 9.4 中推荐的初始%B 是 0(第一谱带的保留时间是 2min)，最终%B 是 47%(最末谱带的保留时间是 23min)。应以此新梯度范围和更快的梯度速度(大约 5%/min)作第二次运行探索速度陡度对谱带扩张的影响。10min 内用从 0 至 47%B 的运行在图 9.9b 中给出〔其它条件与(a)部分相同〕。(a)部分中分离了 14个峰而(b)部分中分离了 17 个峰。与通常情况相反(见 8.3.2)，更快的梯度(b 对 a)能使此样总体分离更好。第二次运行(图 9.9b)中的关键峰对是 3/4 和 8/9。即然这些谱带在初次运行中

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

不能被分离，进一步对梯度速度的调整也不能将这些峰分开。

下一步是改变温度，尤其是对离子型样品（正如现在的情形），温度升到 60℃ 至 70℃（其它条件相同）来重复第二次运行。图 9.9c 说明了此实验（60℃）的结果。可观察到峰间距的显著变化。谱带 3/4 现已部分分离，而 12/13 则互相重叠。由于样品可分离组分的最小分离度 R_s 仍小于 0.7，采用更平坦的梯度（为了改变峰间距）做第四次运行，30min 内%B 从 0 至 47% ACN（图 9.9*d*）。除 12/14 外其它所有谱带现在均能分开且 R_s>0.7，如（*c*）部分所示，12/14 峰可由梯度速度的改变来分离。图 9.9*c* 和 *d* 的比较说明应使用更快的梯度；图 9.9*e* 给出了梯度时间为 36min 的第 5 次运行；对所有 19 个峰 R_s>0.7。

峰间距的进一步变化可通过改用甲醇作溶剂及重复图 9.9*a*－*e* 中的一些实验来尝试。然而，由于样品组分较多，这将在无法保证成功的情况下增加额外的工作。此时提高分离的更合理的方法是改变柱条件（见 9.3.2 中类似的讨论）。在现有例子中，改用同类型（同系列的两根 15cm Zo bax RX C_{18} 柱）更有效的 30×0.46cm，3.5μm 柱能给出图 9.9*f* 中的分离。在低于 50min 的运行时间所有样品组分的 R_s>1.3。注意在某些情况下 3.5μm 柱填料的柱后压可能会使有效长度限制在<30cm 内，常用更高的温度来降低流动相的粘度和柱压降。

梯度洗脱中改变柱长（或流速）时，必须同时改变梯度时间（如 8.4.3 节）以保持相同的选择性和峰间距。柱长增加 X 倍，梯度时间也要增加同样的倍数。流速增加 X 倍，梯度时间则要减少 X 倍，填料大小的改变不需要调整梯度时间。图 9.9*f* 中的分离将 15cm 柱替换为 30cm 柱，梯度时间增加一倍变为 72min。因为最后一次运行中［（*f*）部分］保留最大的组分在 46min 出峰，在 45min 内使 ACN 从 0 变化到 30%（见 8.3.3）可能会进一步缩短分析时间。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

参考文献

1. H. Small, *ion Chromatography*, Plenum, New York, 1989.
2. W. W. Yau, J. J. Kirkland, and D. D. Biy, *Modem Size – Exclusion Liquid Chromatography*, Wiley – interscience, New York, 1979.
3. J. A. Lewis, L. R. Snyder, and J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, Til (1996)15.
4. L. R. Snyder, *Today's Chem. Work*, 5 (1996) 29.
5. L. R. Snyder and J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 3.
6. S. R. Lipsky and M. L. Duffy, *LC/GC*, 4 (1986) 898.
7. K. E. Bij, C. Horvath, W. R. Melander, and A. Nahum, *J. Chromatogr.*, 203(1981) 65.
8. M. 1. Aguilar and M, T. W. Hearn, in *HPLC of Proteins, Peptides and Nucleotides*, M. T. W. Hearn, ed., VCH, New York, 1991, Chapter 8.
9. L. R. Snyder, L C Resources, Walnut Creek, California, unreported experiments, 1992.
10. D. P. Herman, H. A. H. Billiet, and L. de Galan, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2999.
11. H. A. H. Billiet and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 27.
12. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, B. A. Marchylo, J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A*, 686 (1994) 45.
13. P. L. Zhu, L. R. Snyder, J. W. Dolan, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, L. C. Sander, and T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A*, 756 (1996) 21.
14. P. L. Zhu, L. R. Snyder, and J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A*, 756 (1996) 41.
15. P. L. Zhu, L. R. Snyder, J. W. Dolan, D. W. Hill, L. Van Heukelem, and T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A*, 56 (1996) 51.
16. P. L. Zhu, L. R. Snyder, J. W. Dolan, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, J. –T. Lin, L. C. Sander, and L. Van Heukelem, *J. Chromatogr. A*, 756 (1996) 63.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第 10 章　计算机辅助方法建立

10.1　引言

在第 6 章至第 9 章中，我们介绍了高效液相色谱方法建立的系统步骤。进行初始分离后，可对色谱图进行评价，根据首次运行的结果，进行第二次运行和评价，然后再根据前两次的结果选择第三次运行的条件，这种过程一直进行至获得满意的分离结果。受该试一凑方法的启发，色谱工作者可以分析每次结果，以确定下次运行的条件，进行全部实验。

有效的方法建立取决于对色谱分离和分离随条件变化规律的准确掌握。许多规律是定量的，经计算可以很好地预测下一次实验的操作条件。例如，在反相 HPLC 中保留值与%B(100 中)的关系，表达式为：

$$\log k = \log k_w - S\varphi$$

对特定的样品和分离条件，k_w 和 S 为常数。如发生只有%B 两组实验变化，可以先确定每种组分的 k_w 和 S 值，然后可放出任何中值(或%B 的样品保留值与分离情况)。这些计算结果以表格、图、色谱图等多种形式列出，每种形式都有助于色谱工作者更快地选择到最佳分离条件。

运行次数较多(>10)时，在方法建立过程中利用初始有限的实验结果进行分离效果的预测非常重要。实际工作中，经常遇到含六种以上化学性质相似组分的样品，或者涉及梯度洗脱和需要

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

两个及两个以上变量优化的分离。此时采用计算机辅助进行方法建立则具有很大优势。色谱工作者首先进行数次精心设计的实验，并将实验结果输入计算机，计算机即能够根据理论或经验关系式进行计算，预测其他条件下的分离结果。

10.1.1 商品化方法建立软件的概述

有20世纪70年代末以来，利用计算机程序简化HPLC方法建立的进展已引起人们广泛的关注[1-4]，并且有大量相关论文发

表10-1 商品化方法建立软件的性能分类

1. 一次改变一个保留变量，预测该变量与分离的关系（DryLab[b]***10.2.1节）
2. 一次改变一个或一个以上变量，预测这些变量与分离的关系（ICOS[c]**，DIAMOND[d]** 10.3节）
3. 改变柱条件（柱尺寸，微粒大小，流速），预测在任意柱条件下的分离（Drylab[b]*** ENHANCER[d]**，10.2和10.3节）
4. 改变梯度条件，预测任意梯度下的分离（Drylab[b]***，10.2.2节）
5. 改变一个或一个以上条件，检验实验色谱图，以得到最佳分离（PE-SOS[e]**，10.4节）
6. 根据样品组分的分子结构预测最佳初始分离条件的专家系统（ELUEX[f]*，CHROMDREAM[g]*，HPLC－METOBOLEXPERT[f]*，ProDigest－LC[h]*，10.5节）
7. 对HPLC方法建立其它方面提供建议的专家系统（本书不作讨论，请参考文献[4]）

[a] 括号中为各计算机程序在本书中的应用示例，这些程序在1996年均已商品化。*，独立应用软件；**，集成系统软件；***，以独立应用或以集成系统形式复合的软件。

[b] LC Resources，Walnutreek，CA.（在1997年问世的Drylab 2.0可同时变化两个变量）。

[c] 惠普，Wilmington，DE

[d] ATI，剑桥，英国（前飞利浦）

[e] Perkin－Elmer公司，Nowwalk，CT

[f] CompuDrug，Budapest，匈牙利

[g] H. Knauer GmbH，柏林，德国

[h] Sythetic Peptides，Alberta，加拿大

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表。在本章中主要评述 1996 年后推出或应用在色谱文献中被介绍和评价过的一些商品化计算机程序。在实际应用中，这些软件应对色谱工作者有所帮助，并且界面友好。

根据商品化方法建立软件的性能和功能，表 10.1 中进行了归纳分类。应将独立应用程序与属于系统控制或数据系统的软件区分开来。系统集成软件使用起来更为方便，从已运行的实验中获得的数据可以方便地转移到方法建立程序中；系统控制软件能自动进行认为是最佳的分离。系统集成软件的缺点为只能作为整个 HPLC 系统的一部分，费用较高并且离开特定的 HPLC 系统有可能无法正常工作。

10.2 计算机模拟软件(DBRLAB)

DryLab(LC 资源公司，Walnut Greek，美国加州)是一个广泛使用的计算机模拟程序，一次可改变一个变量[5-11]。该软件用于人工方法建立方式相同(第 6 章～第 9 章和 11 章)。根据给定样品的两、三次实验结果，该软件可对其它条件的分离进行预测，为改变流动相组成、温度、等度或梯度分离，或者改变柱条件(柱尺寸、微粒大小、流速)。作为一种独立应用程序，DryLab 软件可以在 Windows 或 Macintosh 平台上使用；软件包含 Perkin－Elmer 系统控制和数据处理程序，有关 Drylab 预测实际样品的应用和其准确性已有论述[12-19]。

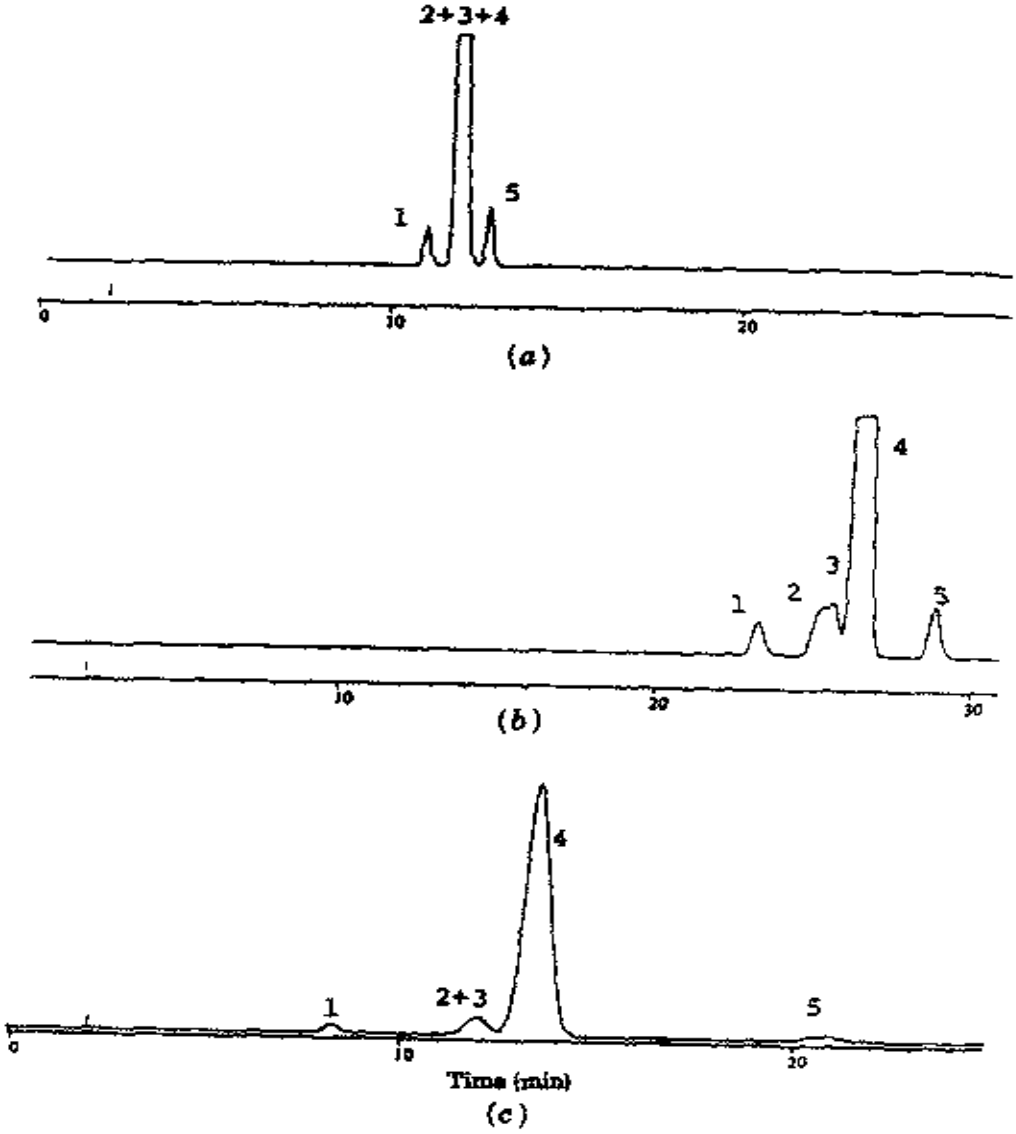
10.2.1 改变%B 和柱条件的等度分离

DryLab 计算机模拟需要两次初始等度或梯度运行的结果。利用这些实验结果，在不同的%B 和柱条件(柱长和直径、填料粒度、流速)下，可对等度分离结果加以预测。可通过分析柑桔中的苎烯[20]的例子来说明 DryLab 的工作原理。这些 1988 年报道的数据[20]可以提供给今天的 DryLab/Windows 软件系统，以完成重新建立最终方法的全部过程。在建立等度(或梯度)方法时，DryLab 要求

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

用户开始进行两次梯度实验。图 10.1 *a* 和 *b* 分别为 5～100 乙腈－水/20min 和 5～100 乙腈－水/60min 的结果。

将分离条件(柱尺寸、流动相、流速、梯度条件)和所有感兴趣峰的保留时间、峰面积(图 10.1 *a* 和 *b*)从 HPLC 数据库中转移至 Drylab 程序。这种情况下，应考虑苎烯(图 10 *a* 和 *b* 中的峰 3)和 4 个潜在的干扰。可以用两次等度运行(只有% ACN 变化)替代图 10.1 *a* 和 *b* 的梯度运行，使用等度数据需要使% ACN 对两次等度运行的所有



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

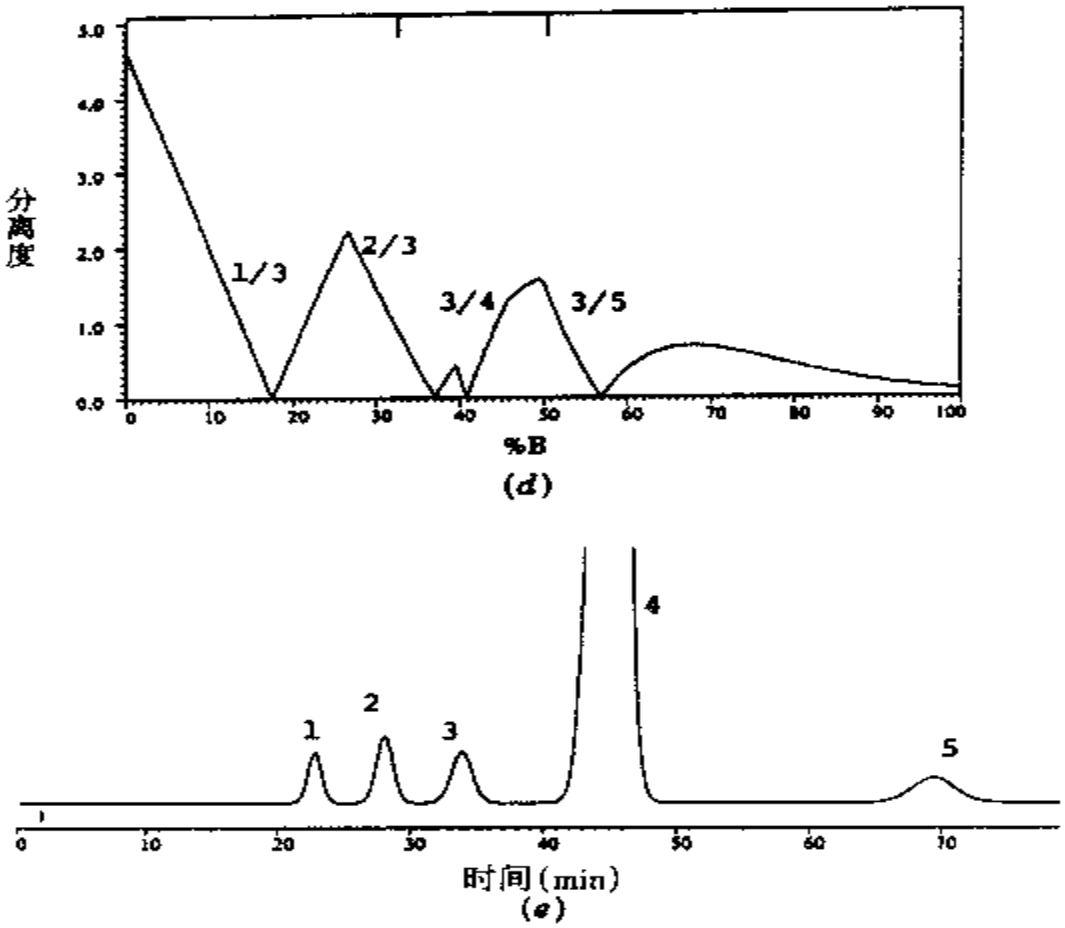


图 10－1　使用 DryLab 软件建立桔油中苎烯的分离方法[20]

(*a*) 在 20min 内使用 5～100% 乙腈/水分离五种组分。10×0.46cm5μm C_{18} 柱，0.5ml/min，室温，模拟色谱图；(*b*)除 60min 梯度外，同(a)；(*c*) 37% 模拟等度色谱图；(*d*)五组分样品的 DryLab 分离度与% B 的关系；(*e*) 27% 乙腈时的梯度色谱图[从(*d*)或表 10.2b 中确定其最大值 R_s]，组分 1，2 和 5 未知，组分 3 为苎烯，组分 4 为补骨脂素。(*a*)～(*c*)和(*e*)在 2min 处的垂直线标明 t_0。

峰均有$0.5<k<20$(8.2.2.2 节论讨的初始梯度运行用于此目的)。

初始的分离数据输入 Drylab 后，开始计算机模拟。就柑桔样品的等度分离而言，可以画出任意% ACN(% B)和柱条件下的色谱图或相关分离数据表，这一过程与一般的实验室方法建立过程相似。图 10.1c 和表 10.2a 为任意% B 值下的计算机模拟结果，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

37%B 时的运行时间是可以接受的(图 10.1c 中峰 5 的洗脱，21min)。但苎烯峰(峰 3，通过苎烯标准样辨别)完全被峰 2 覆盖。可尝试改变%B，但更好的方法是参考分离度表(图 10.2b)或图(图 10.1d)选择实验条件。

表 10－2　柑桔油分离的方法建立(由 Drylab 软件提供)

(a)37%乙腈/水，0.5ml/min 等度分离数据

峰	峰名	保留时间 (min)	k	R_S[a]
1	未知	8.3	3.0	4.1
2	未知	12.0	4.9	0.0
3	苎烯	12.0	4.9	1.3
4	补骨脂素	13.5	5.6	0.8
5	未知	20.9	9.1	–

(b)不同%B 的分离度、运行时间和范围

%B[b]	最小	关键峰对[c]	运行时间 (min)	k 范围[d]
20	0.7	1/3	167	24～81
24	1.9	1/3	101	15～49
27	2.3	1/3	67	10～32
28	2.0	2/3	61	9～29
29	2.3	2/3	54	8～26
30	1.8	2/3	48	7～22
31	1.5	2/3	42	6～20
32	1.3	2/3	38	6～17
34	0.7	2/3	31	4～13
36	0.2	/3	23	3～10
40	0.3	3/4	15	2～6
44	0.2	3/4	10	1～4

[a] 相邻谱峰间的分离度(即对谱峰 1 和谱峰 2 而言 $R_S = 4.1$)

[b] 选定的%B 值，实际计算机输出为 0～100%B，增幅为 1%B

[c] 在这种情况下，一个谱峰总是苎烯(峰 3)

[d] 色谱图中第一个或最后一个峰的 k 值，如：(20%B，峰 1，$k = 24$；峰 5，$k = 82$)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

如仅对分离苎烯感兴趣，即要求在分离度图中看出将此化合物与其它所有组分峰分离开的条件。图 10.1*d* 为苎烯的分离度图（R_S - %B），图中的数字代表关键峰对最大重叠的极限状态。在对所有样品组分都感兴趣的情况下，应将分离度图替代为每一关键峰对的 R_S 与%B 或其它变量的关系（见对图 2.4 的讨论）。由表 10.2*b* 或图 10.1*d*，在 27%B 时可获得最佳的分离度（由于保留值太大，10%B 的运行不太可取）。27%B 时的模拟色谱峰见图 10.1e，这种情况下，运行时间太长（<70min），最后一个峰的 *k* 值已超出要求的范围（$k=33$）。由分离度表 10.2*b*，当 23%<B%<31% 时 $R_S>1.5$，即可以达到基线分离，而 31%<B%<44% 时，*k* 的范围在 0.5～20，说明 B% 的选择应接近 31%。遗憾的是 31%B 的运行时间达 42min。这对于处理大量样品的日常分析而言，时间显得过长。

进一步进行计算机模拟（与实验室中的实验类似，但速度更快）以在分离度和运行时间间做出较为合理的折衷。这种计算机“实验”包括改变%B 和柱条件（柱长、粒子尺寸、流速）。根据用 32%B 和从 0.5 至 0.9ml/min 增加流速（同柱）的模拟来确定最终的分离条件。图 10.2*a* 为模拟色谱图，$R_S=1.2$（接近基线分离，对色谱工作者来说可以接受），$6<k<17$，运行时间约为 25min。图 10.2b 为相同条件下实际运行结果，预测（图 10.2*a*）与实际的分离（图 10.2*b*）相符得较好。

在这个计算机辅助方法建立的例子中，模拟能够快速确定最佳的流动相组成（30% 至 32%B），进一步调整流速可获得令人满意的分离条件。此例也说明色谱工作者的经验如何与计算机模拟结合以便在短时间内得到最佳结果（在本例中，计算机模拟的时间为 30min，相应的实际实验需 1 至 2 天）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

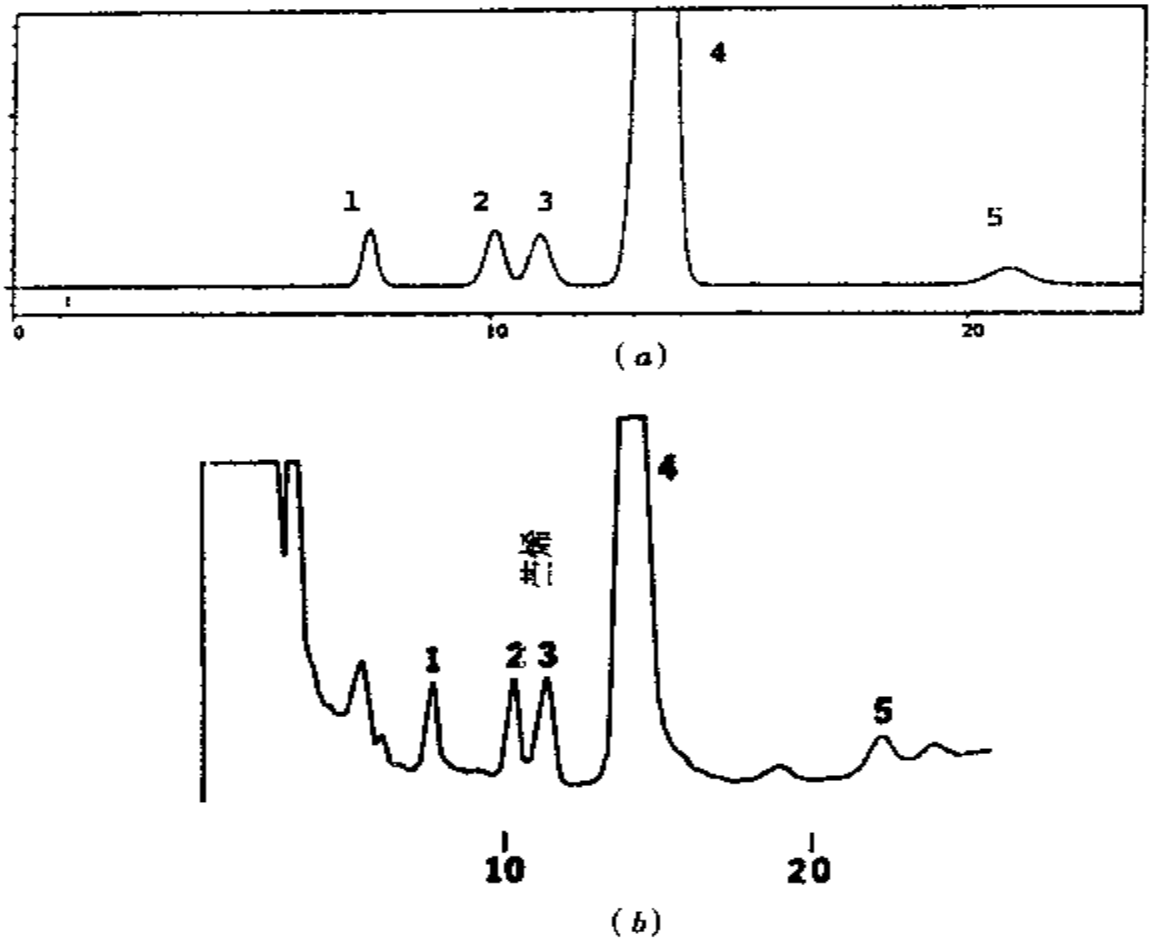


图 10－2　柑桔油样品中芒烯在最佳的分离条件下的预测和实际色谱图[20]

(*a*)：DryLab 预测的分离结果，32% 乙腈，9ml/min；(*b*)：在(*a*)条件下的实际分离。

其它条件同图 10.1。

10.2.1.1　利用其它变量改变选择性　溶剂类型、pH 值、温度等参数改变以后，需重新开始两次梯度或等度实验，并进一步通过计算机模拟选择最佳%B。用乙腈、甲醇或四氢呋喃等作为有机溶剂 B 的实验可将溶剂类型选择性与溶剂强度选择性结合起来，这种方法已被成功用于分离中等难度的样品[8,21]。

DryLab 也能够模拟改变除%B 或柱条件以外的其它参数，如

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

三元溶剂组成(两种有机溶剂与水的混合物)、pH、水、缓冲液、离子对试剂或胺改性剂浓度等。下面的例子将说明同时快速考察几种不同变量以实现对选择性和分离的优化。取代苯甲酸混合物的分离已有报导[22],分离效果与%B、pH、温度和缓冲液浓度(离子强度)有关。在本例中计算机模拟用于优化九种化合物的分离,如图10.3所示。初始的梯度运行(图10.3*a*)用于选择采用等度洗脱(8.2.2.2节)的第二次运行的分离条件(图10.3b,40%甲醇),而这次等度分离的结果将作为绘制分离度与多变量关系图的始点,

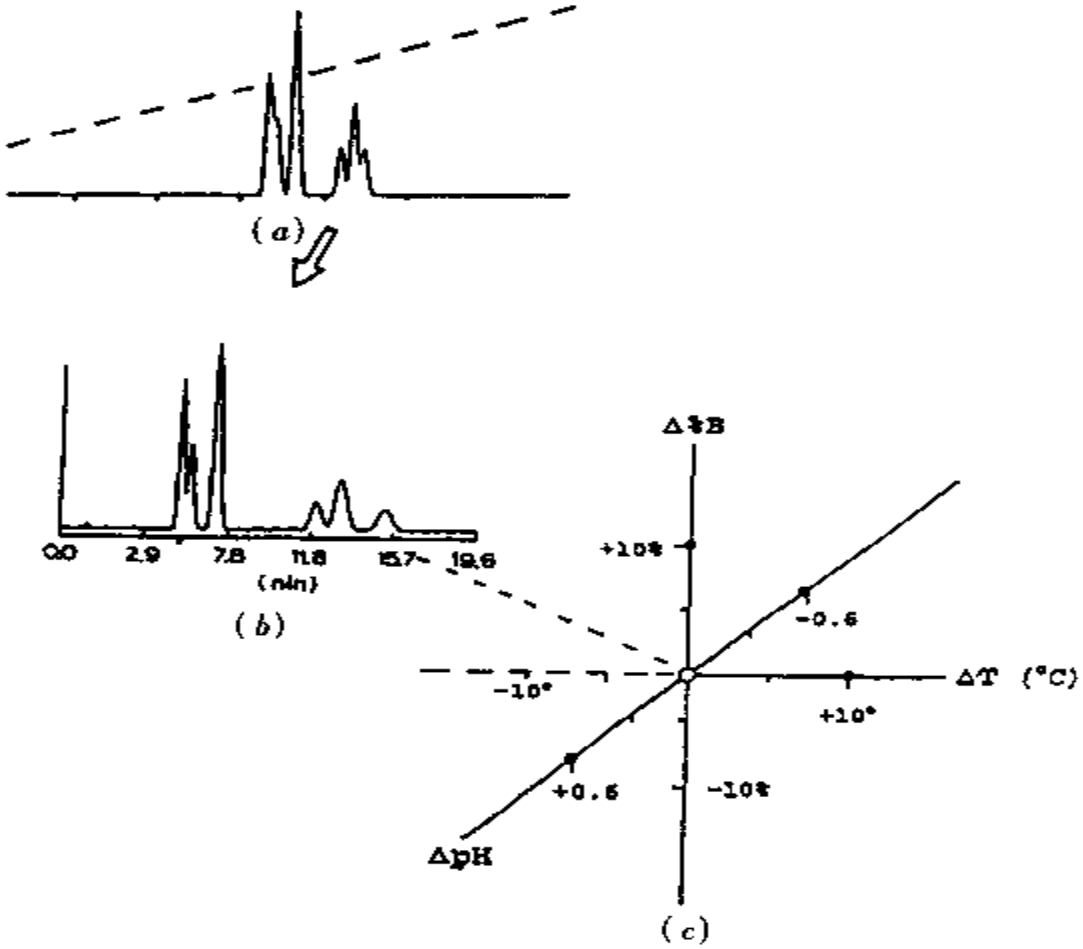


图10-3　Drylab多参数计算机模拟优化分离

a 初始梯度实验;*b* 两次等度实验;*c* 以 *b* 为初始点,改变其他条件实验

○参考运行　●计算机模拟要求的实际运行

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

即在图 10.3c 中所示的 n 维图中圆点(空心圆)。图 10.3c 中,%B 沿一轴变化(Δ%B),温度沿第二轴变化(ΔT),pH 值沿第三轴变化(ΔpH)。为了预测%B 或温度对分离的影响还需要作另外的运行实验[预测%B 影响需完成运行 3,+10%B,预测温度影响需运行 4,+10℃];此外还需要两次运行来预测 pH 对分离的影响(运行 5 和 6),同理预测分离将与缓冲液浓度关系也需要作两次运行(运行 7 和运行 8)。

图 10.3*c* 所示的五次实验和缓冲液浓度变化的两次附加运行用于此样品的分离(其它条件如图 10.3*b*)条件优化。当这些分离线条的数据被输入 DryLab 后,可以预测这 4 个变量中的每一变量对分离的影响(在某一时刻只有一个变量发生变化)。图 10.4a 至 d 显示了分离度图与每个分离条件的关系,垂直的点线为初始参考运行条件。四个变量中的每个对分离度都有很大影响,但%B(图 10.4*b*)的变化可使 R_s 达到最大值,36%B 时:$R_s = 1.8$,参考运行如图 10.5*a* 所示 40%B,35℃,pH2.95,25mM 缓冲液($R_s = 1.1$)。

初始运行选择 36%B(其它条件同参考运行),优化温度或缓冲液浓度可使分离度进一步增加。这需要一次变化温度的运行(36%B;pH2.95;25mM)和二次只改变缓冲液浓度的运行(36%B;pH2.95;35℃)。从后面实验得到的分离度图(如图 10.4e 至 f 所示),缓冲液浓度的变化几乎不再增加分离度,温度(从参考运行 35℃)变化到 32℃分离度有小的改善,$R_s = 2.1$,35℃时,$R_s = 1.8$,后面的分离(32℃,36%B)如图 10.5*b* 所示(模拟)和 c(实际)。图 10.5 所示最后一次运行和(*c*)及开始的参考运行(*a*)相比分离度有所改善。软件系统可准确预测保留时间和分离度[(*b*)模拟,(*c*)实验],方法的疏漏之处也可以从计算机模拟中评估和改进。在 10.6 节中还将作进一步讨论。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

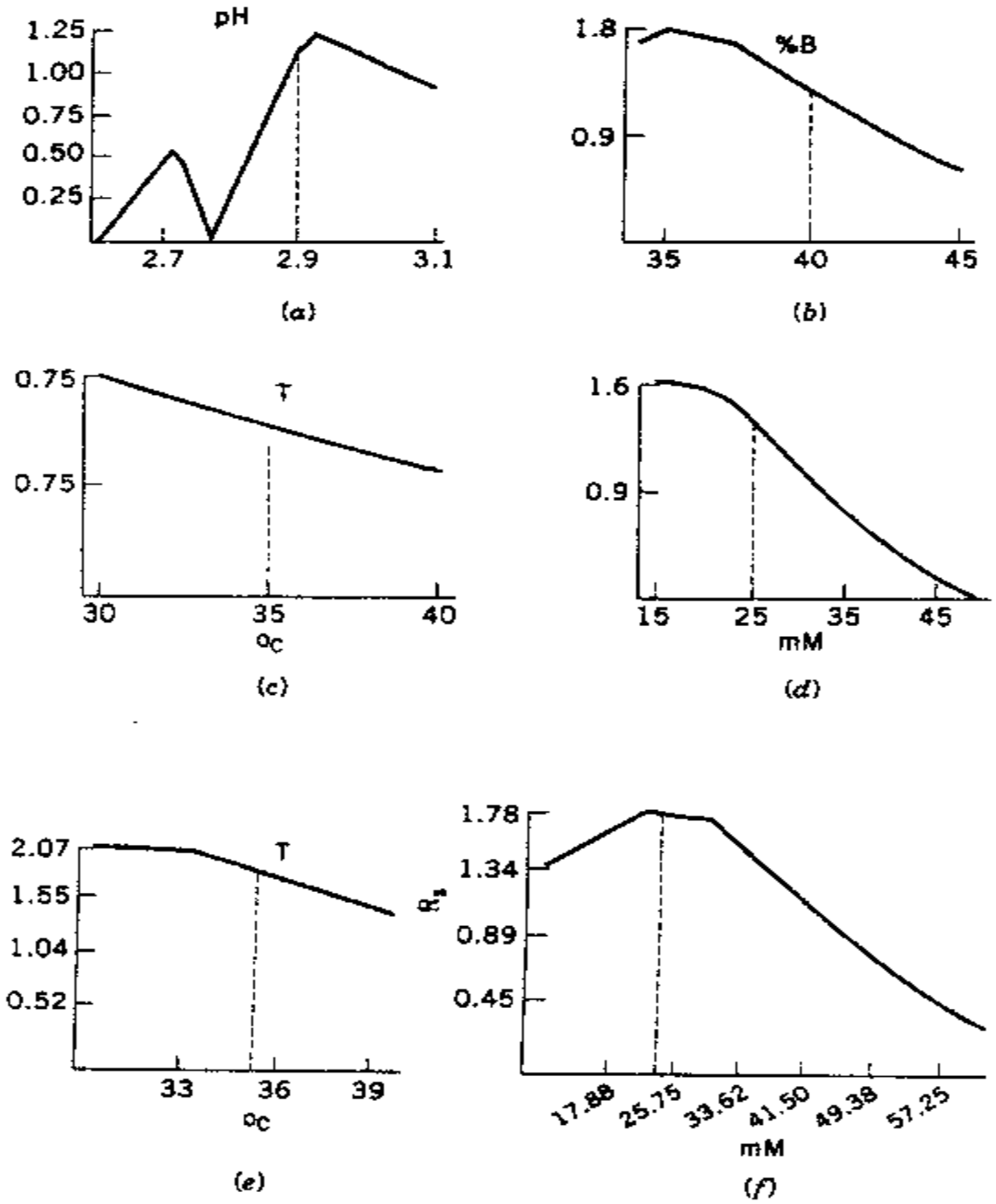


图 10－4　取代苯甲酸样品分离度图[22]

图(*a*)至(*d*)的参考运行为40%甲醇—缓冲液(%B)；pH2.9，25mM乙酸盐缓冲液，图(*e*)到(*f*)，除36%B外，参考运行相同，点线表明参考条件，九组分样品为苯甲酸衍生物的混合物：2－硝基苯甲酸、苯二甲酸、杂质，3－氰基苯甲酸，2－氯苯甲酸，3－硝基苯甲酸，3－氟苯甲酸，2，6－二甲基苯甲酸。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

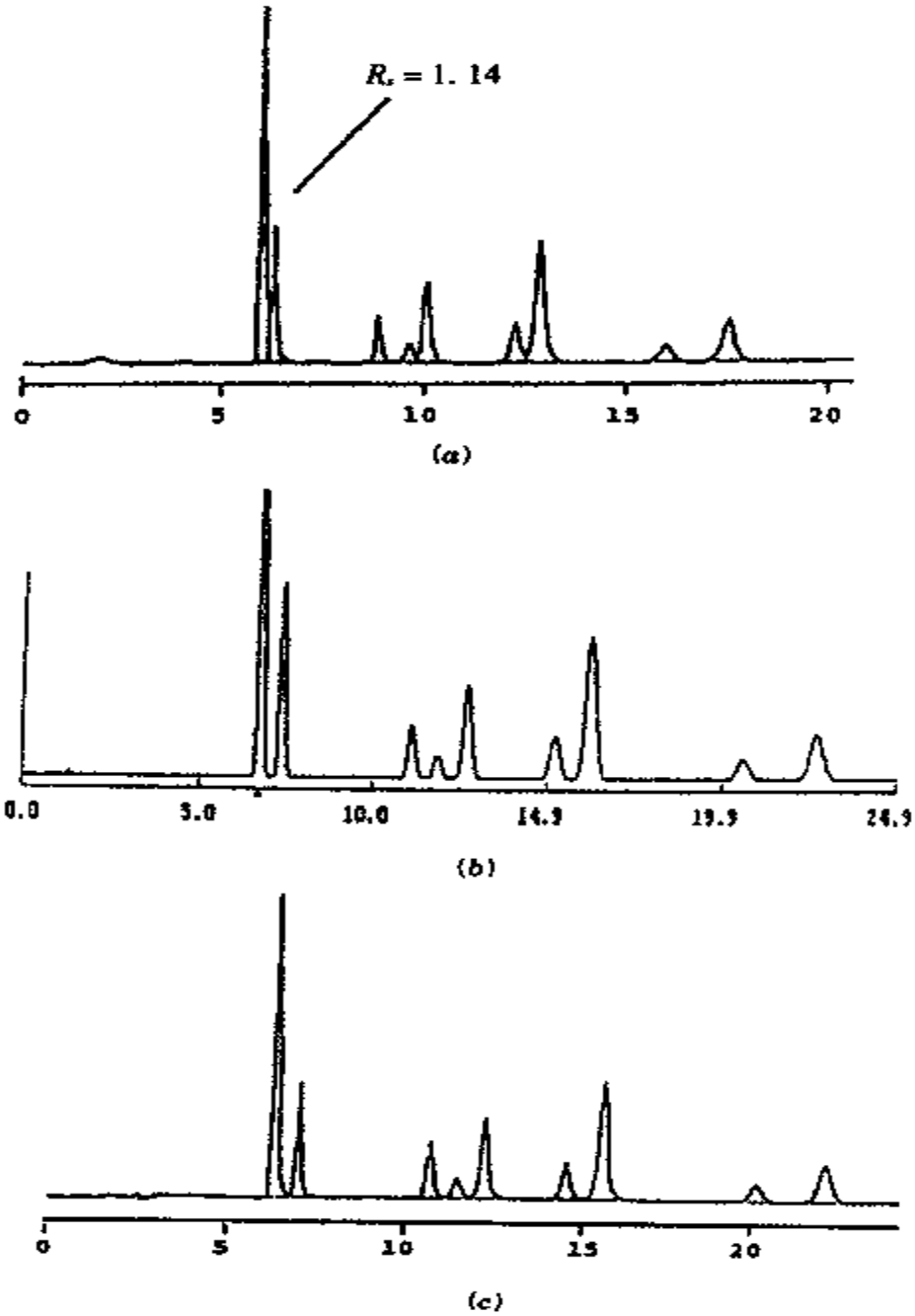


图 10－5　取代苯甲酸样品初始和最终的等度分离

(a)40% B，35% ℃；(b)36% B，32℃（Drylab 预测）；(c)36% B，32℃（实际分离）

图 10.4 中其它条件见文献[22]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

10.2.2 梯度分离

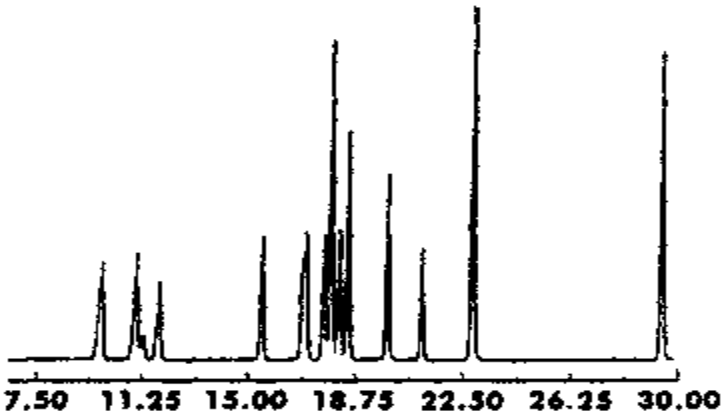
采用梯度分离时，由于初始和最终%B、梯度时间和速度、梯度形状等多种参数需要优化，因此计算机模拟在建立梯度方法方面可发挥巨大作用[7,8,23-25]。梯度方法的建立一般需要做大量的实验，而计算机模拟则仅需进行少数实验，其余的条件选择实验通过模拟完成，因此相对需时很短。为了减少所需的模拟实验次数，已有相关的表格和分离度图供参考，后面还要做详细说明。

图 10.6 为采用 DryLab 进行 15 组分除草剂样品梯度分离方法建立的例子[7]。图 10.6*a* 和 *b* 为计算机模拟前初始实验结果。梯度时间为 30min(*a*)和 90min(*b*)，其它条件相同(5～80%乙腈/水，25×0.46cm，5μmC_{18} 柱，35℃，2.0ml/min)，将运行条件、保留值、峰面积输入计算机。计算分离度图与梯度时间关系经常为计算模拟的最佳起始点(图 10.6*c*)。Drylab 可从初始的梯度时间外推：从实验的 30 和 90min 梯度可预测 5 至 120min 梯度(图 10.6*c*)。在图 10.6*c* 中发现梯度时间从 5 试一凑法 90min，六个峰序颠倒。改变梯度时间不易得到最佳的分离，但从分离度图中可直接找到最佳的梯度时间 16.5min(图 10.6*c* 箭头所指)，计算最佳的梯度最长速度：R_s=1.0[(80-5)/16.5=4.5%B/min]。

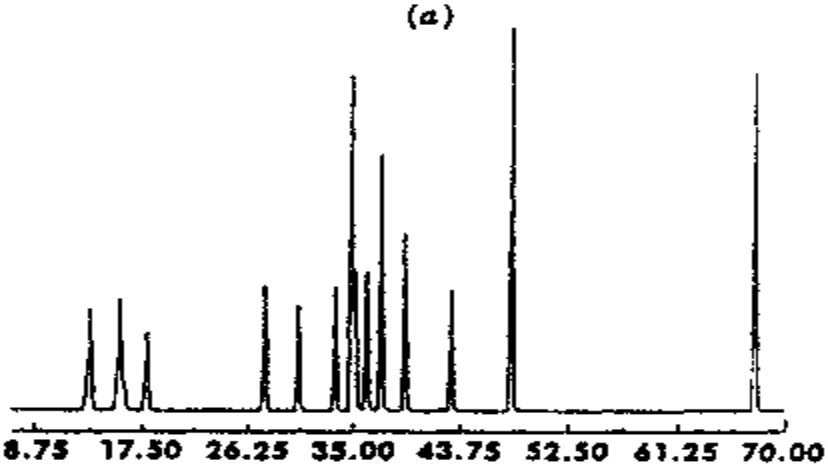
调节梯度范围可以缩短运行时间(8.3.3 节)。计算机模拟获得的较理想梯度条件为 10～77%B/15min(4.5%B/min)。虽然运行时间令人满意但分离度却不尽然，下一步计算机模拟将改变柱长和流速，几次模拟之后，最终的柱条件为 50cm 柱长(两根 25cm 柱)，流速为 1.0ml/min。在此条件下，预测基线分离度为 R_s=1.5，图 10.6*d* 显示(插图为 5～10 峰的放大图)柱压降也较为理想，在梯度洗脱过程中从 1100 变化到 2000Psi，预测(图 10.6*d*)与实际(图 10.6*e*)相符很好。

改变柱条件时，需调整梯度时间以保持 G_s 为常数(公式 8.2a)，否则梯度保留值将发生变化并且选择性将不再是优化结

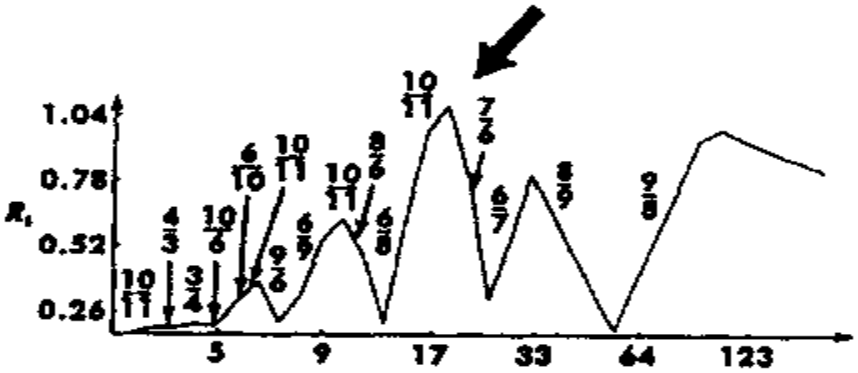
PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



(a)



(b)



(c)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

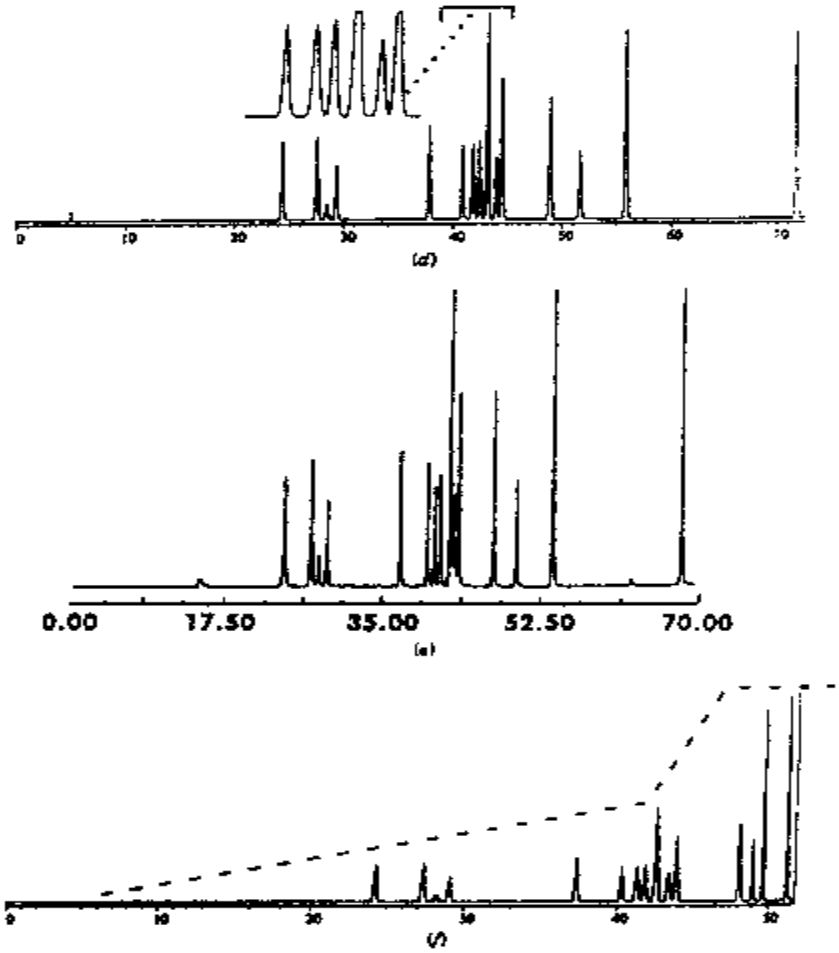


图10－6　采用计算机模拟建立15组分除草剂样品的梯度方法[7]

(*a*)初始实验：条件25×0.46cm C_{18}柱，5～80%乙腈/水，梯度30min，2.0ml/min，35℃；(*b*)除90min梯度外同(*a*)；(*c*)分离度对梯度时间图(箭头所指最大)；(*d*)预测的最终优化分离；10～77% B梯度60min，50×0.46cm柱，1.0ml/min，其它条件同(*a*)(插图为峰5至10放大图)；(*e*)d条件下的实际分离；(*f*)缩短运行时间但不降低分离度且具有分段梯度的模拟分离。[10:49:100% B 0/37/41min]其它条件如(*d*)；梯度如虚线所示。

果。在柱尺寸或流速变化时，Drylab可自动调整梯度时间，在柱长和流速均增加2倍时，柱条件变化前的15min保留时间增加4倍，达60min(参阅图8.16)。

在另外的研究中[26,27]，两个不同温度通过Drylab模拟能够将

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

梯度速度对选择性的影响和温度影响结合起来，有效控制肽和蛋白质样品的分离选择性，预期对其它的离子样品也有类似效果。

10.2.2.1　分段梯度　前面的例子说明线性梯度计算机模拟在减轻 HPLC 方法建立工作量方面的能力。当采用分段和其它非线性梯度时[8.3.4 节]，需要更多的实验以优化梯度条件，计算机模拟的作用也将更为明显[23, 24, 28]。图 18.12(肽样品)和图 8.13(多芳烃)均为采用 Drylab 软件建立的分段梯度功能得到的结果，图 10.6f 也显示了分段梯度在不影响分离度前提下缩短除草剂样品运行时间方面的应用[52min，(*e*)为 72min]。反相梯度分离含 20 至 35 组分的蛋白质样品，需采用 4 段相互分开的梯度以获得满意的分离，每段梯度的速度不同以优化峰间距及该段洗脱蛋白质的分离度。若无计算机模拟，这种分离的优化方法建立简直是不可能的。在设计分段梯度时为了更好地利用计算机模拟，文献 24 给了出一些实践规则。选择第一段梯度陡度应考虑第一对关键峰对的分离度，选择下一段应考虑优化下一对关键峰对，以此类推。图 8.13d 为此方法的例子。使用超过 4 个梯度段的洗脱方式实际意义不大，尤其是对于分子量低于 5000 的样品。

10.2.3　其它应用

由于不同的梯度 HPLC 系统具有不同的滞留体积(V_D)，在一种系统上建立的方法或许对另一种系统不适用(8.5.1节)。与第一种系统相比，当第二种 HPLC 系统的滞留体积过大时，所有样品的保留时间将增加。保留时间变化一般不会对方法产生大的影响，但有些样品在色谱开始时滞留体积的变化对分离度影响较大(如图8.18*b* 和 *c*)。采用计算机模拟将不同的 V_D 值输入程序并确定其对分离的影响，可以对这些潜在问题进行评估[29]。在一台仪器上设定的梯度系统，在另一台仪器上能否得到相同的效果，在将

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

该方法移置到另一实验室之前就可以通过计算机模拟的方法得到证实。在某些情况下，(8.5.1.3 节)改变梯度方法有可能降低方法对滞留体积的敏感性；计算机模拟也可以用来改善方法的普适性(10.6 节)。

计算机模拟也可用于确定梯度系统的滞留体积。如果进行时间不同(如：30，60 和 90min)的三个梯度实验，两次运行用于输入计算机机模拟，(如 60 和 90min 的运行)，改变假定的滞留体积，直至第三次运行的预测保留时间(30min)与实验值一致，那么实验数据拟合得到的最佳滞留体积即等于系统的真实滞留体积。

10.3 溶剂类型优化软件

如 Glajch，Kirkland 等人[30]在 1980 年所描述的那样，早期的计算机辅助 HPLC 方法建立的例子实际上即为反相 HPLC 的溶剂类型优化。这种方法用于甲醇，乙腈与水或缓冲液混合物改变选择性而优化分离。有相同溶剂强度(相似的样品 k 范围)的七种溶剂混合物用于流动相，如图 6.15 和 6.16 所示。可从数据推导出描述每个样品组分在不同的流动相中 k 的经验表达式，并进一步对样品在具有相同溶剂强度和 k 值范围的四种溶剂混合物中的 k 值和分离度加以预测。

从 1980 年以来，Glajch－Kirkland 方法已被广泛研究和应用，并成功分离了很多样品[30－36]。在写此书时这种方法建立的软件的两次修改版已商品化[37]：ICOS(Hewlett－Packard)和 DIAMOND(ATI)。这两种软件作为系统集成软件出售其操作方法相似。ICOS 软件的一些性质如图 10.7 所示。

ICOS 优化选择性和分离有一、二、三维模型等多种方式。一维模型与 DryLab 类似，进行两次或两次以上实验(只改变一个操作参数，流动相组成和温度等)，通过经验公式描述每种溶质的保留值及分离度与操作条件的关系。采用一维模型优化三元流动相

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepriint.cn

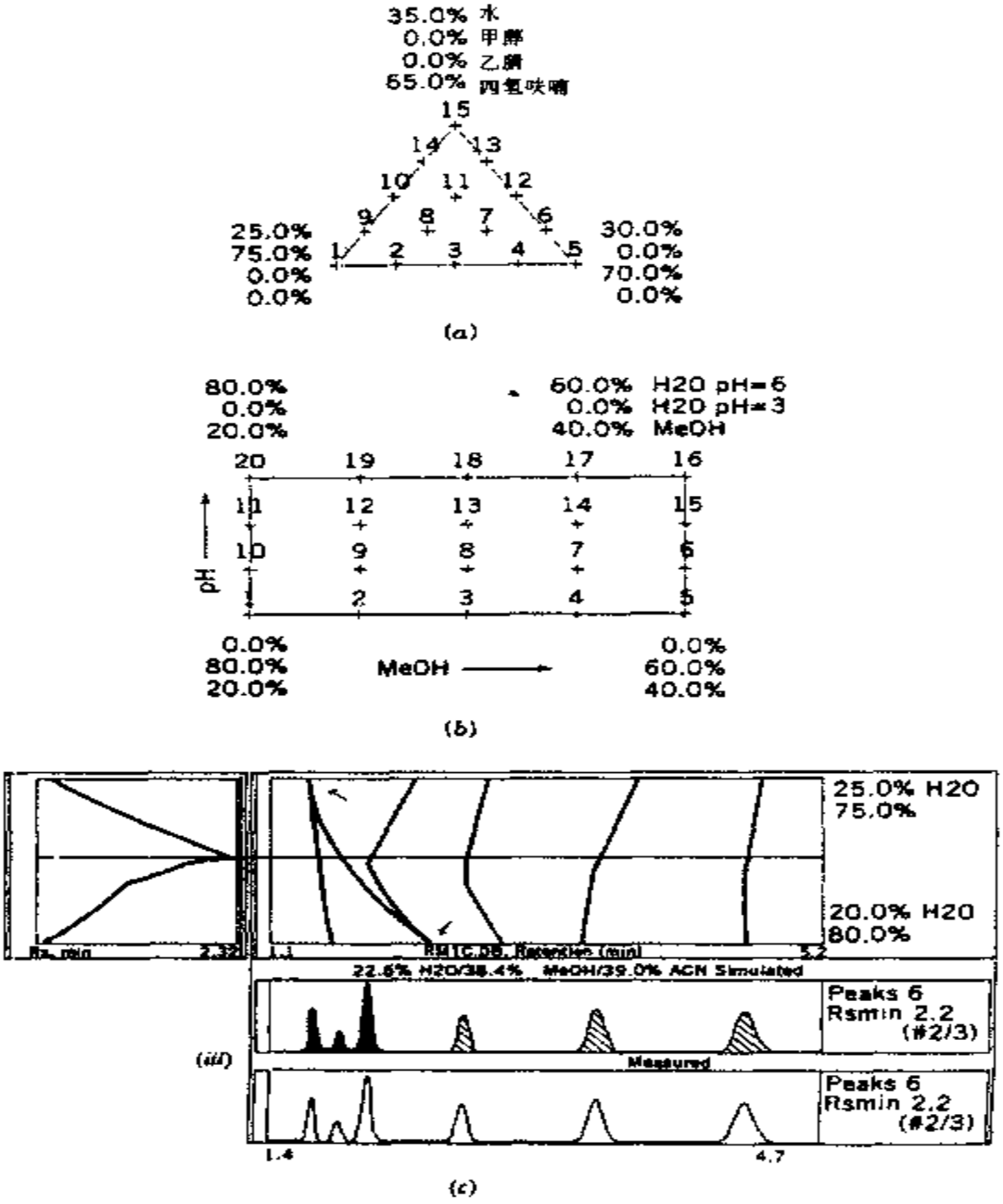


图 10－7　ICOS 软件的实验设计和计算机显示屏[37]

(*a*)用于推荐实验以优化全部溶剂类型；(*b*)用于推荐实验以优化%B 和 pH；(*c*)计算机输出方法建立的结果。

(i) R_S 对流动相组成图；(ii) 每一峰的保留值对流动相组成图；(iii) 在最佳的流动相组成时预测色谱图与实际色谱图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

(乙腈－甲醇－水)的结果如图 10.7c 所示。在这种情况下，将 75% ACN 和 80% 甲醇按不同比例混合进行 5 次实验(运行 1 至 5 如图 10.7a 所示)，得到的五次运行保留值数据被输入到计算机中，ICOS 可绘制出每个样品组分的保留值对流动相组成曲线，(图 10.7c (ii))，可以看出前两个峰在乙腈 75% 时重叠，而第二、三峰在甲醇 80% 处重叠(图 10.7c (ii)箭头所指)。图 10.7c (i)为分离度与流动相组成关系图，在两溶液中等配比情况下分离度较大，计算机进一步指导 HPLC 系统进行后面的分离，图 10.7c(iii)底部为实验运行结果，上方为预测的色谱图。

采用 20 次初始实验通过 ICOS 可同时优化另外两个变量(如图 10.7b 的 pH 和% 甲醇)。三维模型中使用的参数较多，预测一般需要作大量的初始实验，仅限于对分离难度较大的多组分样品进行条件优化。图 10.7a 为同时优化三种有机溶剂种类、温度和水的百分含量(溶剂强度)的例子。在 Glajch－Kirkland 方法中 ICOS 不能用于全局优化，如图 10.7c 所示，输入实验数据后，在某一时刻优化只能以一维方式进行。

ICOS DIAMOND 二维模型也主要基于 Glajch－Kirkland 方法，但必须首先完成 DIAMOND 需要的 10 次实验和 ICOS 需要的的 15 次实验(图 10.7a)。显然，只采用如图 6.15 所示的七种流动相已不能满足准确预测保留值和分离度的要求[38,39]。与图 10.7a 类似的实验完成后，绘制分离度图(仅以 DIAMOND)，并找出甲醇、乙腈和四氢呋喃混合物的优化组合。图 10.8 为采用 DIMAMOND 程序进行含 10 种酚样品分离方法建立的例子。首先进行 10 次实验(类似于图 10.7a，采用 ICOS 进行的 15 次实验)，绘制分离度对甲醇、乙腈和四氢呋喃混合物的溶剂强度关系图。图 10.8a 的三维图给出了样品的最大分离度，而图 10.8b 的等高分离度图(等高线为不同分离度值)以不同形式也可以提供类似的信息(箭头标明最大分离度)。为了清晰明了地说明最大分离度的位置，在

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

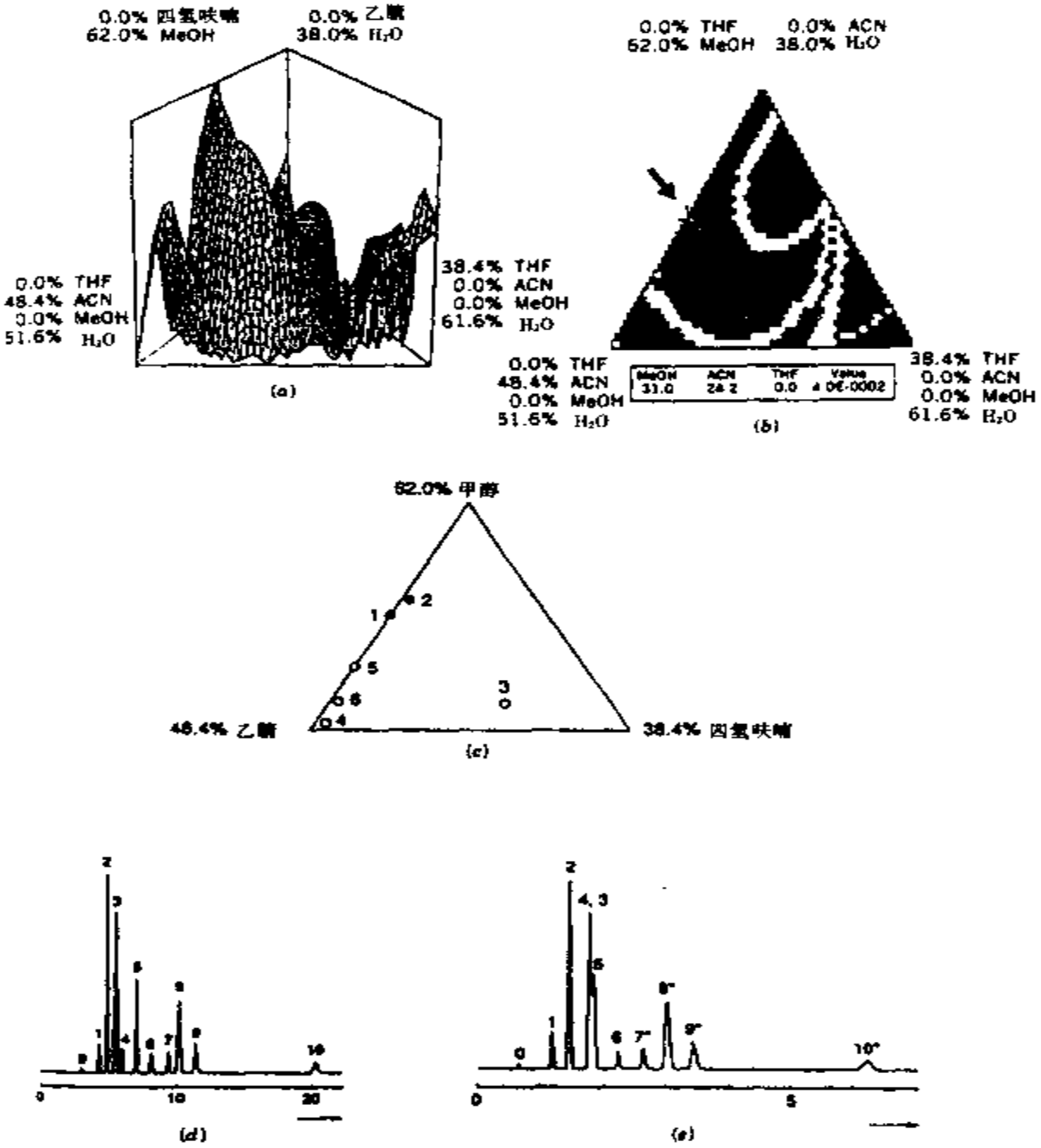


图 10－8　使用 DIAMOND 软件分离含 10 种酚的样品[44]

(*a*, *b*)准三维和等高线分离度图，箭头标明最佳的流动相组成(最大 R_s)；(*c*)最大分离度流动相组成，空心圆是峰 7/9 的分离；(*d*)从(*c*)中得到的所有 10 种组分的最佳分离(实心圆)；(*e*)从(*c*)中得到的组分 7/9 的最佳分离(空心圆)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

重新绘制的等高分离度图图 10.8c 中标明了最大分离度附近的流动相组成(黑点);图 10.8d 为运行时间最短的分离。

如只对图 10.8 中的组分 7~9 感兴趣,可重新绘制分离度图。从图 10.8c 看出有多种流动相可提供最大分离度,图 10.8e 是组分 7/9 分离时间短且分离度最大的分离。需指出的是与图 10.8e 相比,峰 7 至 9 分离较好,但以损失峰 3~5 的分离度为代价。此方法的优点之一为:根据方法建立的目标可从相同的起始数据获得不同的优化分离。

ICOS 和 DIAMOND 均可进行自动峰跟踪。ICOS 通过二极管阵列检测(10.7.4节)光谱数据实现峰跟踪,而 DIAMOND 利用二极管阵列检测光谱数据、峰面积或相对保留值综合进行峰跟踪[40]。DIAMOND 也可与预测柱条件对分离影响的软件(ENHANCE)一同使用[40]。有关 ICOS 和 DIAMOND 软件在优化保留值方面的更多信息可请参阅文献41~49,表10.3总结了两种软件间的一些重要区别。

10.4 网格—搜索软件(PESOS)

网格-搜索软件并不依靠分析条件来预测分离结果,相反计算机指导 HPLC 系统进行相对大量的实验,这些实验经常可同时改变两种不同条件。图 10.9 所示的取代苯甲酸样品分离实验中,甲醇浓度在 31~43% 之间变化,pH 值在 2.8~3.1 之间变化。计算机每次实验运行可提供 R_s 值(每个 pH 值下的最大值在图 10.9 中圈出),最后得到使分离度最大的条件(34% 甲醇; pH3.1)。

PESOS[37,50~52]是与 Perkin-Elmer HPLC 系统匹配使用的网格-搜索软件。这种软件能够以分离度图的形式给出图10.9的实验结果,既便于选择最佳条件,也可对方法的普适性进行评估(10.6节)。PESOS 不仅可详细绘出图10.9所示的谱图,也可对不同分离条件下的分离结果进行快速浏览。PESOS 不需进行峰跟踪,也不必做出有关保留行为或峰形的假设,并可同 Drylab 结合使用[51,52]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

表 10－3　ICOS 和 DIAMOND 溶剂优化软件包的差别[45]

性　　质	DIAMOND	ICOS
HPLC 方法：安装运行	半自动 位于 DIAMOND 壳外	半自动 位于 ICOS 壳内
溶剂平面确定	PLANE 软件 默认范围：$1 < k < 10$ 甲醇梯度＋溶剂输运规则	ESS 软件 用户自定义
色谱数据采集	程序可调 默认：步骤固定 半自动 随后可加其它数据	程序固定 用户自定义步骤 全自动 随后可加其它数据
优化过程	相互匹配 确定全局优化 半自动	相互匹配 确定局部或线性优化 半自动
方法开发：参考光谱库	有设于 DIAMOND 壳内的光谱数据库，供优化参考	有设于 ICOS 壳外的谱图库、与优化无关
峰跟踪	人工或自动 为优化数据库的完整部分 通过光谱图、峰面积或保留时间匹配进行峰跟踪（用户可自定义） 结果自动进入数据库，但用户可修改跟踪结果	人工 可选，从 ICOS 壳中激活谱库查询 通过光谱和保留时间匹配跟踪（用户自定义标准） 结果需人工输入 ICOS
峰均一性检查	数据检查用户—PCA 信息 ITTFA	光谱比较（Upslope/Apex1Downslope）在数据收集过程中可选
峰保留值进入数据库	数据检查的一用户部分可修改最后结果　输入数据库时需用户确认	在数据收集过程中产生色谱峰保留数据 用户可自定义每一个组分的保留时间 用户人工将时间输入数据库
信息来自	每峰的重叠分离数据度图点间非线性内插	色谱峰保留时间或 k 间线性内插

10.5　基于分子结构的预测软件

10.2 和 10.3 节中介绍的计算机软件基于初始实验条件和结果数据完成进一步的模拟实验。通过初始实验条件下的操作参数

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

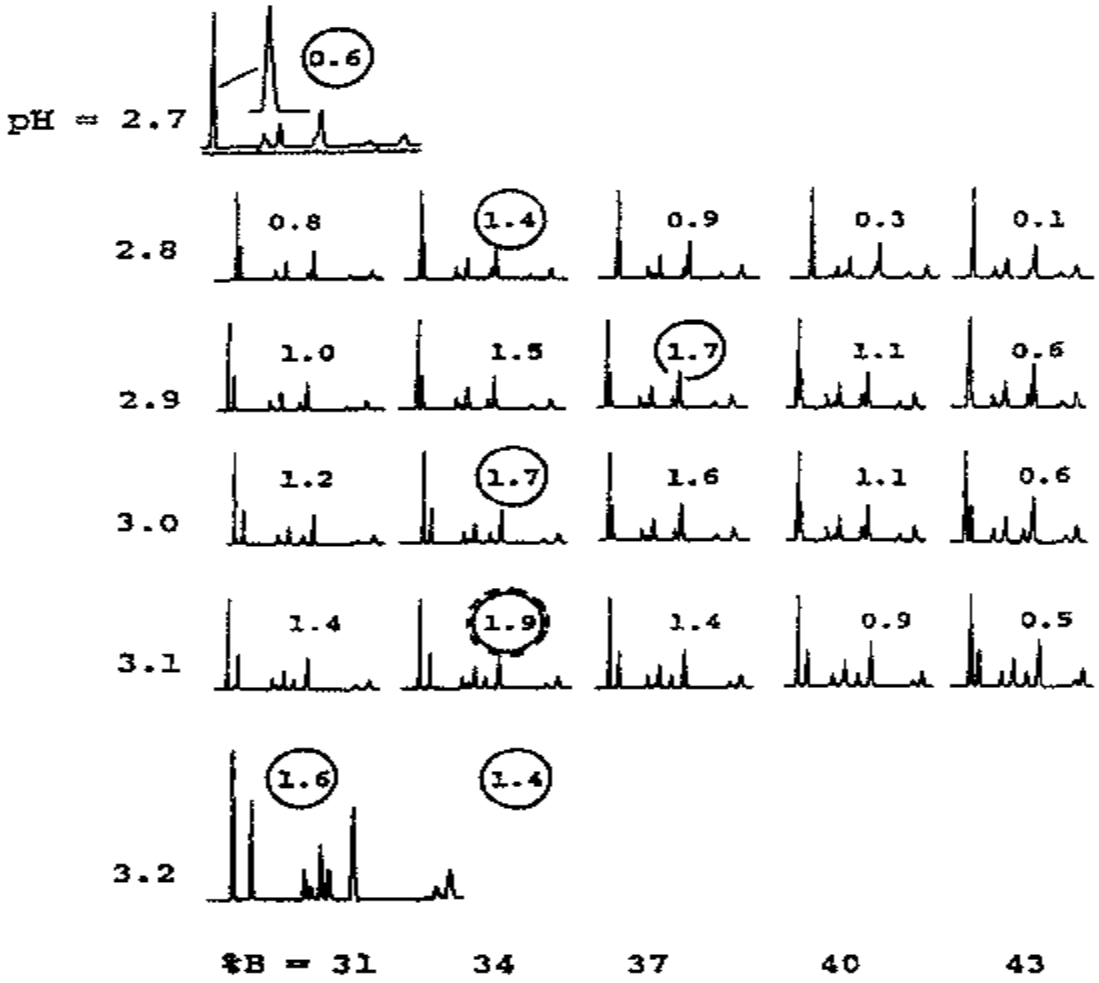


图 10－9　网格－搜索分离实验(以甲醇百分含量和 pH 为变量)

及样品分离结果，预测其它条件下的保留值和分离。这里介绍一种与上面预测软件采用不同原理的预测软件，这种预测软件基于样品中各组分的分子结构(假设可知)推测其保留值，然后推荐适合的初始运行条件[53－56]，使在第一次实验中即可获得较佳的保留值范围($0.5<k<20$)。基于分子结构的预测软件有两大缺陷：(1)所有样品组分的分子结构有时未知，尤其是在本底对峰有干扰时不能采用；(2)预测的保留时间相当粗略，尤其对实际复杂样品分子精度很差。但假使首先进行一次初始梯度实验，并进一步采用这种方

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

法进行预测，可以使预测精度得到较大提高。

10.5.1 ELUEX

ELUEX 是由 CompuDrug 化学有限公司制作的单独应用软件。样品组分的分子结构被输入计算机后，可估测出组分的疏水性和 pk_a 值。最好调节 pH 值使组分以非离子化（离子抑制）的状态存在，满足这一条件的 pH 如不在 2～7 之间，应考虑调节 pH 使样品中各组分完全解离。最后由软件给出在初始分离中使所有组分 $1<k<5$ 推荐使用的乙腈、甲醇－缓冲液流动相组成。

图 10.10 为该方法的两例说明，在第一个分离三嗪除草剂混合物的例子中，根据样品的分子结构，Eluex 推测样品的 pk_a 值小于 4.5，推荐采用 39% 乙腈－50mM KH_2PO_4（pH5.5）为初始流动相，在此条件下得到图 10.10a 的分离结果（$1<k<10$）。通过一次运行完全分离 11 种组分样品的实例并不常见。

图 10.10b 和 c 为使用 ELUEX 的又一个例子，这个例子中的样品三种氯酚分离在前面的有关章节里已作过讨论。根据组分结构，软件估测样品的 pK_a 为 4.9～7.9。推荐的初始流动相组成为 79% ACN－缓冲剂（pH3.5）。图 10.10b 为推荐初始流动相条件下的分离结果，结果三种组分已被分开，但 $0.2<k<0.8$。根据此实验结果 ELUEX 推荐下一次运行使用的流动相组成为 50% ACN－缓冲剂，结果如图 10.10c，保留值范围：$1.5<k<6.2$。为了获得较理想的样品保留值（$1<k<5$），使用 ELUEX 进行方法建立过程的大多数例子都经常需要进行一次以上的实验。由 ELUEX 预测选择性相当粗略，因此在大多数情况下为确定最终分离仍需要做必要的实验。

ELUEX 另一个特点是其中包含有用于 HPLC 方法建立的简单专家系统软件包。例如，在实验过程中发现拖尾峰，如将此信息输入到程序，并建议改变 pH 或增加胺改性剂浓度以改善峰型，可通过计算机屏幕显示预测得到的相应色谱图。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

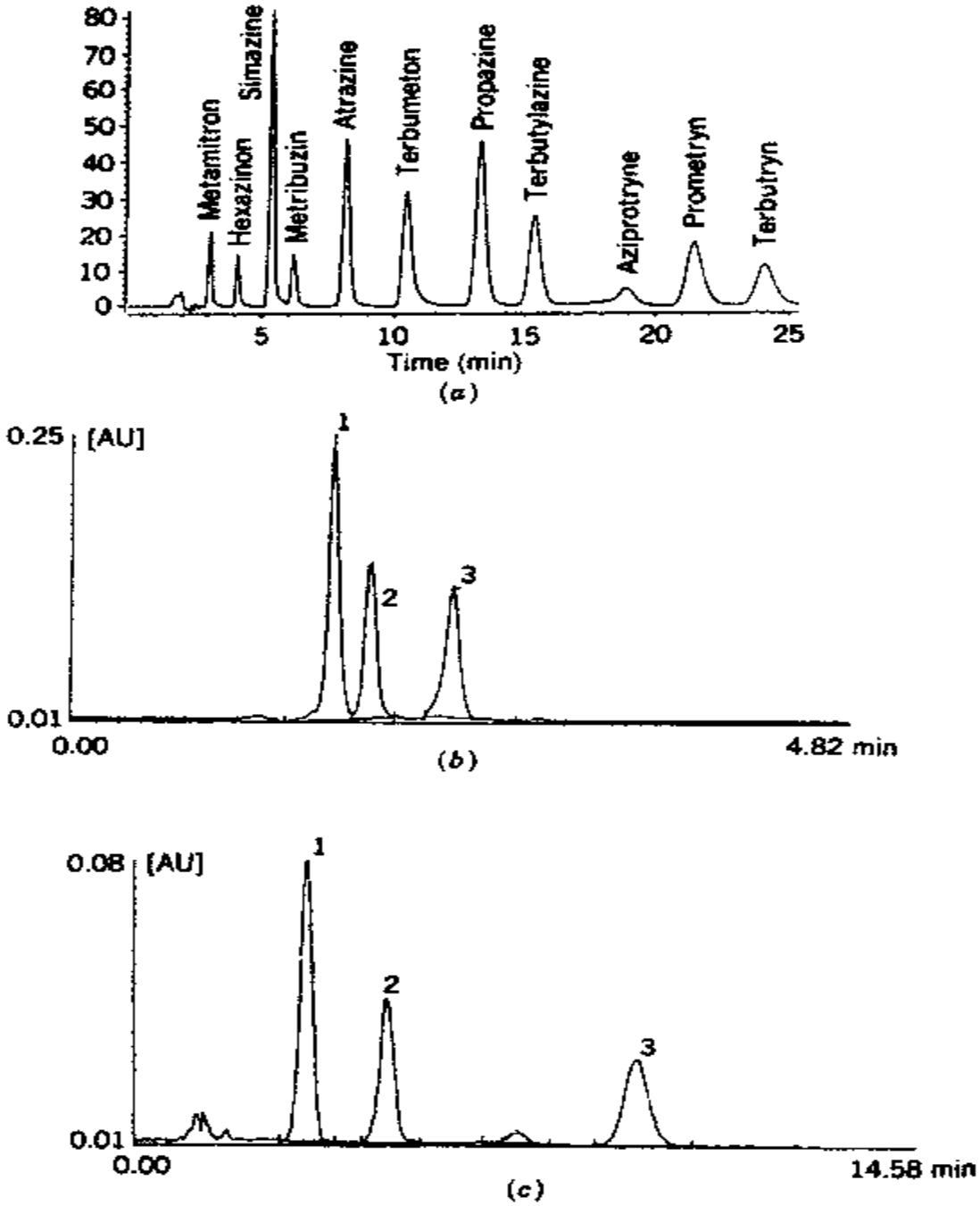


图 10－10　通过 ELUEX 预测最佳初始流动相组成[56]

(a) 三嗪除草剂样品，条件：15×0.46cm 碱基去活 C_{18} 柱 40% ACN－缓冲液 (pH5.5)；(b) 氯酚样品，条件：25×0.46cm C_{18} 柱，80% ACN－缓冲液 (pH3.5)；(c)除流动相为 50% ACN－缓冲液外，其他条件同(b)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

10.5.2 CHROMDREAM

CHROMDREAM 是一种由 H. Knauer GmbH(柏林)推入市场的单独应用软件。不仅可预测保留值和分离(与溶剂类型和% B 的关系),而且可显示谱图。图 10.11 为一个应用实例,(a),(b)分别为预测和实验得到的 lnk - % 甲醇曲线。对简单有机样品预测与实验很好相符,但对于含复杂分子的实际样品则很难得到满意的结果。正如 CHROMDREAM 开发商指出的:"CHROMDREAM 软件没有考虑立体化学和分子内相互作用效应",而这些因素对于 HPLC 分离来说却是至关重要的化合物特征。

10.5.3 特殊目的的程序

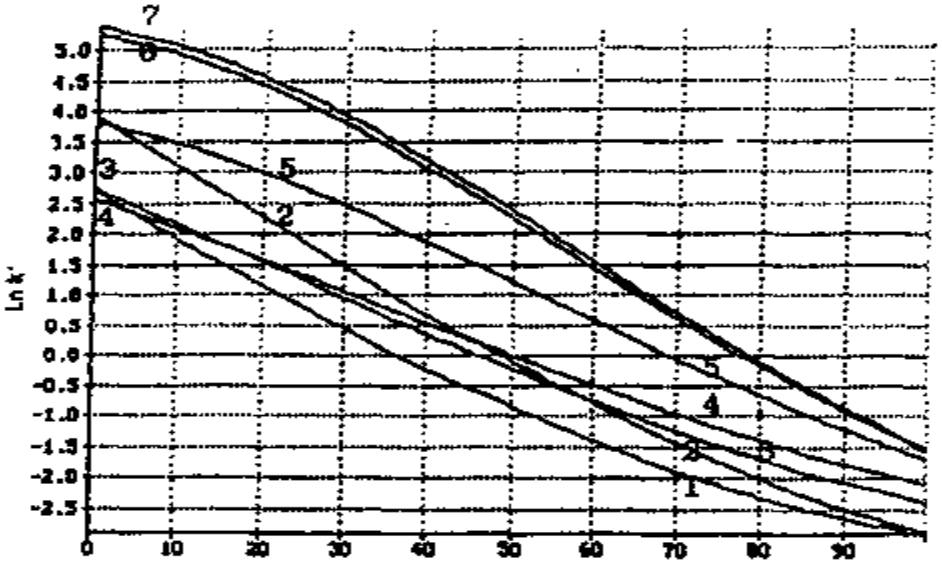
前面介绍的基于分子结构的软件(10.5.1 和 10.5.20 节)可应用于如合成药物、杀虫剂等典型的有机化合物,此外还有一类针对特殊目的的专用软件。ProDigest - LC 为分离用于由蛋白质酶分解得到的肽样品专门设计的应用软件[58,59]。将蛋白质的基本结构和酶的名称等输入程序,软件即可给出通过反相、离子交换、体积排阻色谱等可得到的预期分离谱图。与 ELUEX 或 CHROMDREAM 相同,这类软件对选择性的预测不够准确。

HPLC - METABOLEXPERT 为药物及其代谢物分离软件。将药物分子结构输入计算机,能够预测最可能的代谢物种类,并估测每种化合物的保留值[60]。ProDigest - LC 和 HPLC - METABOLEXPERT 计算得到的保留值和分离结果并不十分准确,但在对样品分离作粗略预测时也是非常有用的。

10.6 方法的普适性

在 10.2 至 10.4 节中阐述了计算机绘制分离度图(分离度与一个或一个以上实验条件关系图)的过程,并以此找出满意的分离条件。绘制出分离度图(或表),即有可能对方法的普适性加以检验,即研究方法对实验变量微小变化的敏感性。这种方法在图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



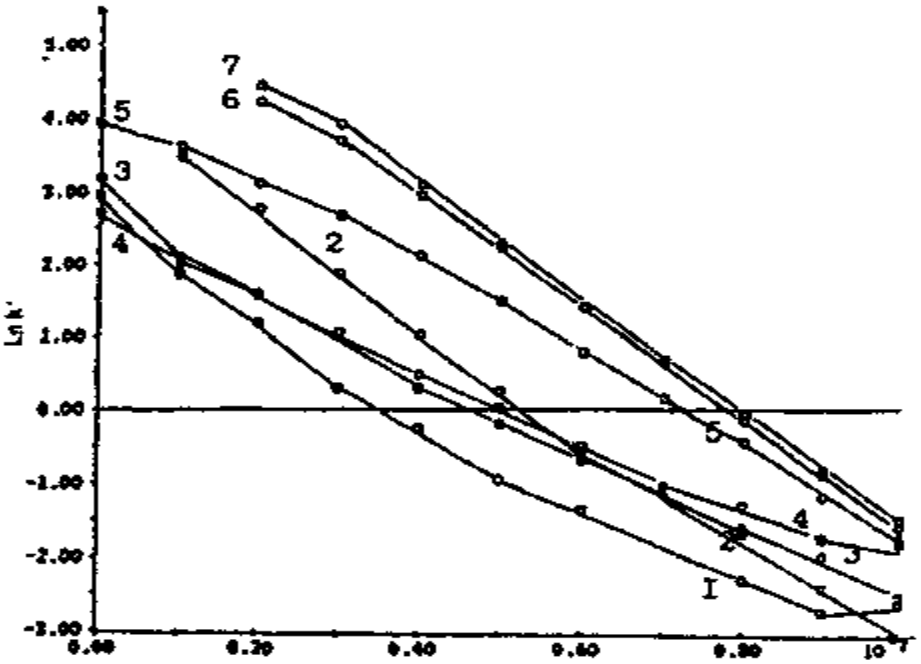


图 10－11　用 CHROMDREAM 预测保留值 k 与% 甲醇的关系[57]

样品：1，P－羟基苯甲醛（P－hydroxybenzaldehyde）；2，3－羟基甲酸甲酯；3，苯酚；4，吡啶；5，苯；6，甲苯；7，氯苯。条件：C_{18} 柱，甲醇/水流动相。（a）预测结果；（b）实验结果。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

10.1d 和表 10.2b 柑桔油的分离中已有说明。该例中，最终的流动相组成为 32% 甲醇，%B 的实验误差一般为 2%B，这意味着实际的流动相组成在 30%B～34%B 之间，由表 10.2a 预测的分离度在 0.7～1.8 之间。因此分离效果随流动相组成的变化较大，程序告诫操作人员尽可能准确配制流动相。

使用计算机评价和改进方法普适性的进一步说明也见图 10.4*a*～*d* 分离取代苯甲酸样品的例子。假设实验条件同10.5*a*（尽管分离效果不理想），每个分离度图（或相应的表格）可用于确定 pH、%B、温度、缓冲液浓度的变化对分离结果的影响。可以看出，分离结果对 pH 值变化相当敏感（图10.4*a*），pH 值只降低0.05单位（从2.95至2.90）即可使分离变得很差 R_S（=0.5）。而%B、温度、缓冲液浓度的变化对分离结果的影响相对较小（图10.4至 *d*）。

图 10.5*c* 为优化条件下的色谱图（取代苯甲酸样品），其条件的选择仅基于获得最大分离度（R_S=2.1）。此方法对 pH 值的变化非常敏感，在如图 10.12*a* 和 b 中，除 pH 不同（2.8；3.0）外其他条件完全相同，分离度相差非常大。分离度随 pH 值由 2.9 降至 2.8 而下降至 1.16，这是令人难以接受的。

由图 10.4*a*，在最佳 pH 值附近，如果 pH 较最佳值稍有下降，分离度则快速下降，而在较高的 pH 值条件下，pH 值的较小变化对分离度的影响相对较小（图 10.12*b*）。这一规律表明建立方法时，应采用较高 pH 值以降低方法对 pH 值的感敏性，然后重新优化其它条件达到最大分离度。模拟实验的结果给出 pH 在 2.9～2.95，%B 在 37～36 之间变化时，可以得到最稳定的结果，条件的微小变化使分离度损失最小，如此通过计算机很快完成了通过大量实验才能够得到的结果。

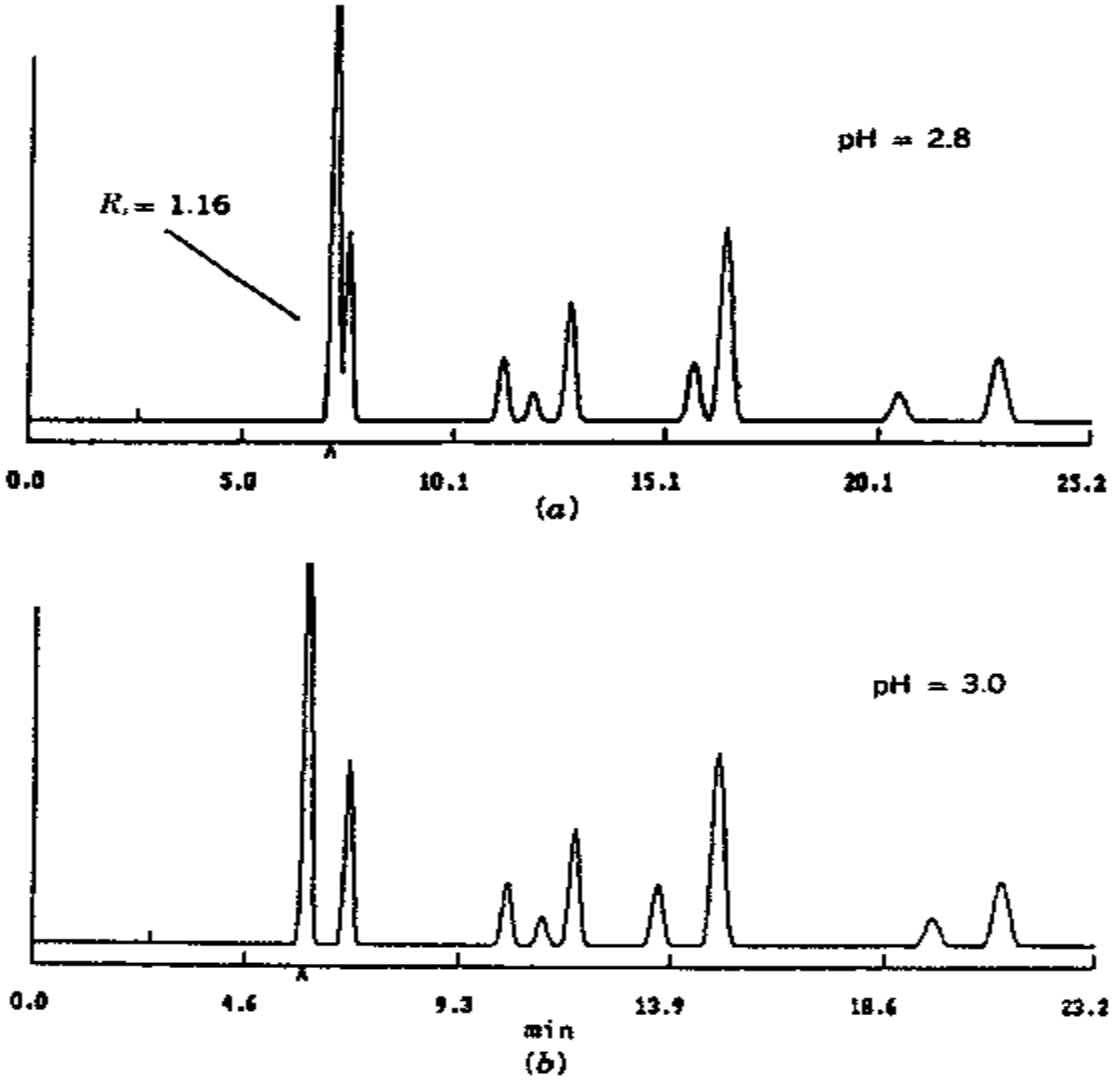
10.7 峰跟踪

采用 10.2 和 10.3 节讨论的计算机模拟程序需进行峰跟踪：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

确定每一组分的洗脱次序，或者在两个或两个以上的色谱图中找出同一化合物对应的色谱峰。峰跟踪在人工方法建立时也非常有用（第九章阐述），在两次方法建立的运行过程中，根据同一化合物在不同条件下的出峰位置变化，以便更可靠地预测在下一次条件改变后出峰的可能位置。峰跟踪也可能发现“隐藏”的谱峰，避免峰丢失[61]（如多个小峰，其中一些被大峰掩盖）。

如图 10.13 *a* 和 *b* 所示为一假想样品在分离条件（如 pH）改变时进行峰跟踪的例子。对两次运行得到的色谱图中同一化合物



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

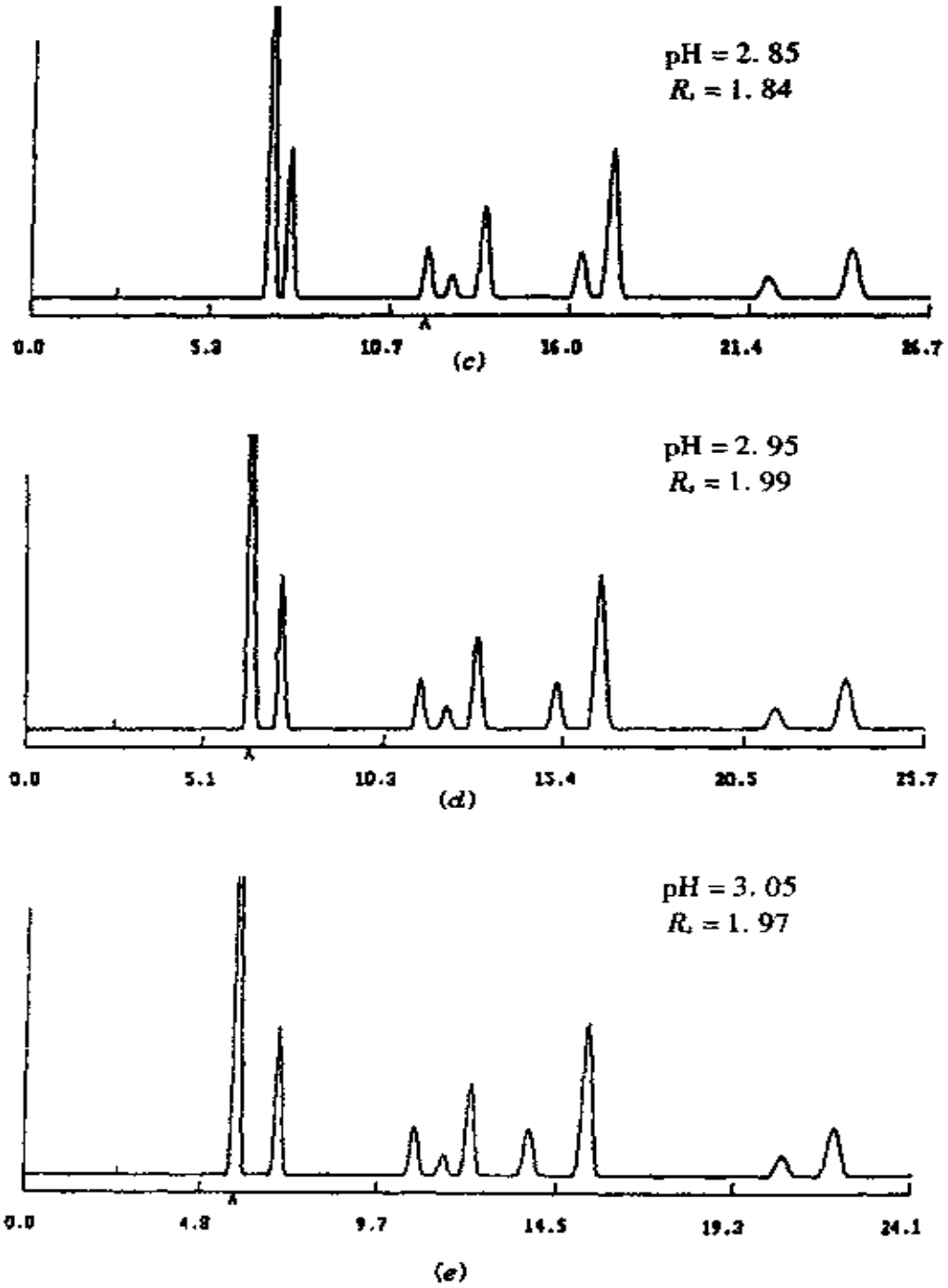


图 10－12　分离条件对方法普适性的影响(pH 选择性)[22]

分离图 10.3－10.5 的取代苯甲酸样品。(*a* 和 *b*)的条件如图 10.5*c*;(*c*)－(*e*),36% B,32℃,25mM[精确的 pH,(*d*)为 pH2.95]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的对应峰进行匹配。如：谱峰 1 在每次运行时都对应于化合物 A，类似地，谱峰 2 在每次运行中为化合物 B，以此类推。

峰跟踪主要有下面几种方法：

1. 注射已知标准物

2. 对比两次运行色谱图中谱峰的相对保留值和峰面积。

3. 在三或三张以上色谱图中，研究谱峰相对保留值和峰面积的变化趋势。

4. 光谱识别

5. 上述几种方法结合使用

10.7.1 标准物进样

如可获得每种组分的标准样品，在相同条件下注射标准物有可能辨别出每一个峰。在图 10.13 *a* 和 *b* 的例子中，注射各自的标准样 1 至 5，共需 10 次运行以获得峰识别和跟踪。如果需 n 次运行进行保留值优化且样品中有 m 种组分，注射每种标准物的峰跟踪需额外运行 $n \times m$ 次。在图 6.17 的例子中，保留值优化需七次运行，样品含 9 种组分，因此需完成 63 次运行 .

这种基于注射单个标准样的峰跟踪需进行大量实验，因此几乎没有人直接采用这种方法。取而代之的方法是：配制每一组分浓度比一致的两个样品进行实验，每个化合物在两次运行中谱峰面积比等于其含量比。例如：为了对图 10.13 中的组分进行峰跟踪，由纯样品 1 至 5 的配制成两个新样品，样品 1 中每种组分含量均为 0.1mg，样品 2 中各组分含量分别为：1，0.1；2，0.15；3，0.075；4，0.2；5，0.05mg/ml，则样品 1 和样品 2 中各组分的含量比分别为：1，1；2，1.5；3，0.75；4，2；5，0.5。对每次改变条件的方法建立实验，按顺序注射样品 1 和 2（运行 1 和 2），确定运行 1 与运行 2 中各谱峰的面积比（如对峰 1 为 1.5）。因为峰面积等于样品 1 与样品 2 中对应组分的含量比，即可知在此分离条件下的每一组分的谱峰位置（峰 1 为化合物 B），

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

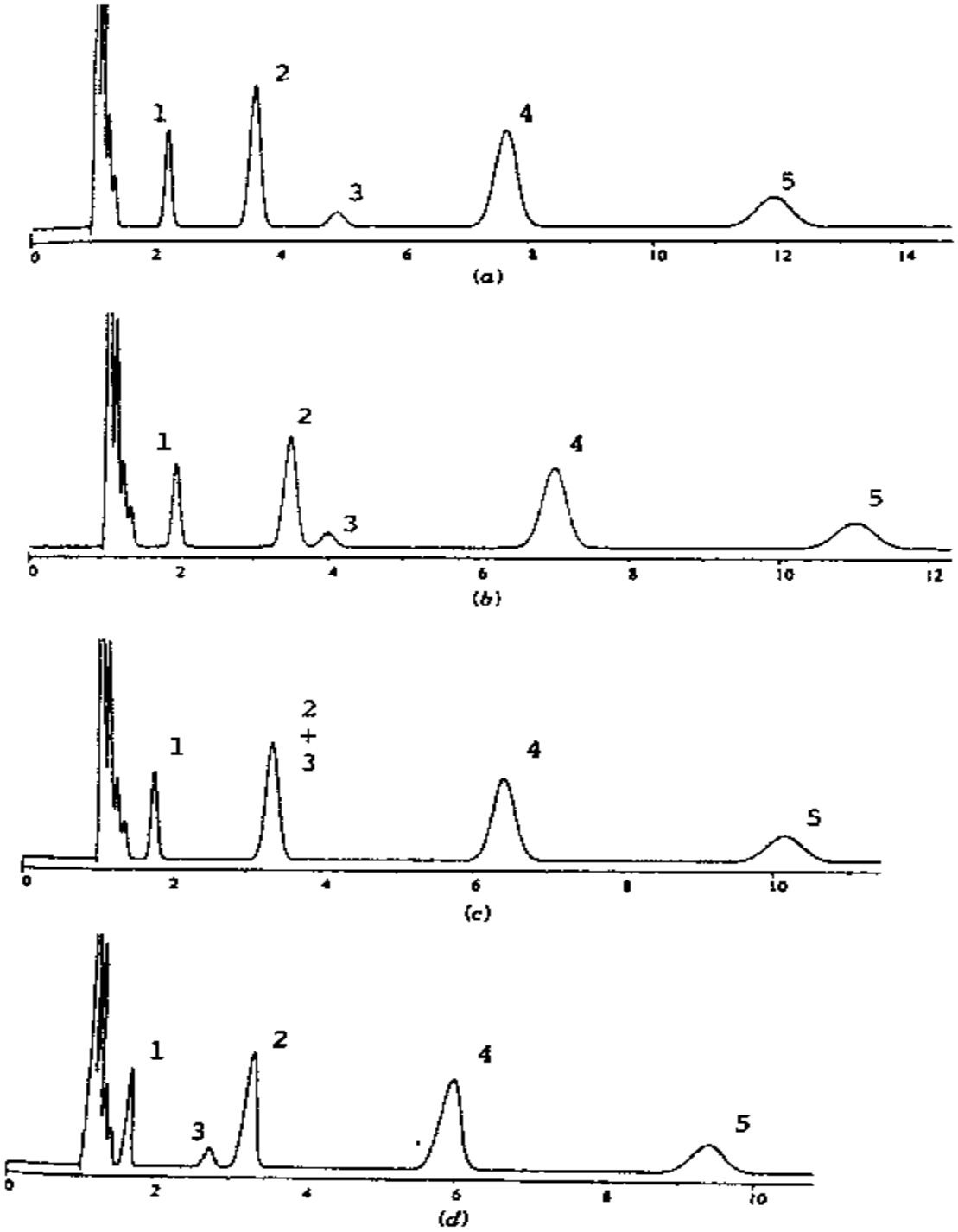


图 10－13　假想样品的峰跟踪

(a)－(*d*)改变操作条件(如 pH)时色谱图的变化

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

采用这种双样品法在每次条件变化时只需多增加一次运行，而且增加的一次运行可以同时起到检验柱平衡的作用(运行 1 和 2 保留时间相同，参阅 1.4.4 节)。由于柱平衡在方法建立过程中的重要性，即使不需峰跟踪也常需进行附加的运行以确定柱平衡。峰跟踪方法的另一个优点为可以对样品中的所有组分同时进行峰跟踪。因此，当标准样品较易得到时，推荐采用这种双样品法。

如果样品中组分数大于 8，最好将标准物至少分为两组。尽管需要更多的样品混合物进行峰跟踪，且增加了运行次数，但因此也会使谱峰重叠问题减少。如果将大量标准物混为一个样品混合物，也难以准确提供不同含量比的两个样品，或者比率相似；或者比率变化过大，使峰跟踪更为困难。为便于峰识别，不同化合物的浓度比应相差 1.5 倍以上，但不要大于 10 倍，否则由于化合物间在检测灵敏度方面的差异；小峰与大峰的重叠等问题，可能导致一些峰太小以致无法识别。将样品组分分为两个或两个以上独立的样品组，并配合以适合的检测波长将有助于减少这类问题。

10.7.2 保留值与峰面积比较

采用相对保留值和峰大小对比用于谱峰跟踪可避免使用标准物的方法，如图 10.13 所示。对比图 10.13 *a* 和 *b* 中的各色谱峰，可以说明不同组分在两谱图中的对应情况。根据峰的相对大小：中等(1)；大(2)；小(3)，*a* 中的色谱峰 1 至 3 与 *b* 中的 1 至 3 对应。有些样品的分离通过直接对比峰大小可能并不可靠。如图 10.13 *c* 中的重叠峰 2/3，很难与 *b* 中的色谱峰 2 和 4 区分。类似地，*b* 与 *d* 的两个色谱峰 2 和 3 峰序发生变化，如果两个色谱峰大小相当(图 10.14)，将很难作出准确判别。

定量比较两谱峰保留时间和峰面积相似性比基于相对保留值和峰面积的峰跟踪更为可靠[63,64]，DryLab 计算机模拟软件中即采用此种方法(10.2 节)。然而，仅使用保留值和峰面积并不能对每个样品中的所有组分进行实时峰跟踪。当两次运行时出现峰颠倒，

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

且峰面积相近时，则很难作出判断。同时 pH 值变化影响到可解离样品的解离程度，并可能使发色团的电子结构发生变化，进而导致峰面积的改变（如：苯胺与质子化苯胺），这种效应可严重影响基于保留值和峰面积的峰跟踪的准确程度。流动相中有机物类型、含量及温度改变时，不同运行之间也可能会发生类似的峰面积改变（但不常见）[45]。

10.7.3 保留值趋势

只有一种分离条件改变时，采用三次或三次以上改变条件的运行，并跟据保留值的变化趋势可进行样品中不同组分的峰跟踪。在图 10.14 中，由于相邻谱峰 2 和 3 大小相似，如只基于任意两次运行的保留值和峰面积进行峰跟踪显然并不可靠。利用不同分离条件微小变化的几次运行，找出相对保留值的变化趋势（由峰 2 和 3 的连线表示），再进行峰跟踪一般是可行的。

将这种峰跟踪方案加以适当调整也可用于计算机模拟（10.2 节），两次运行的结果被输入计算机进行模拟（如图 10.14 *b* 和 *d*）则可能预测下一次（*c*）的分离。如果在计算机模拟之前的 *b* 和 *d* 运行中，峰 2 和 3 不能正确跟踪，则在运行 *c* 中不可能进行准确预测（没有预测到峰 2 和 3 的重叠，表明峰匹配存在误差）。图 10.14*c* 的实验与预测结果对比也可以证实峰跟踪有误。

10.7.4 光谱识别

二极管阵列（PDA）检测器的使用使获得每个色谱峰的紫外光谱成为可能。图 10.14*a* 和 *b* 两次运行中色谱峰的光谱比较可用于峰跟踪[65-71]，在 ICOS 和 DIAMOND 程序中即采用这种方法。因为结构相似的不同组分具有相同的 UV 生色团，因此 PDA 峰跟踪不能用于这类样品（如：产品及其杂质、降解产物，代谢物等）。流动相种类以及其它因素（尤其 pH 变化）的变化也会限制 PDA 峰跟踪方法单独应用[72]。

通过注射标准物进行峰跟踪是唯一在任何条件下都有效的方

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

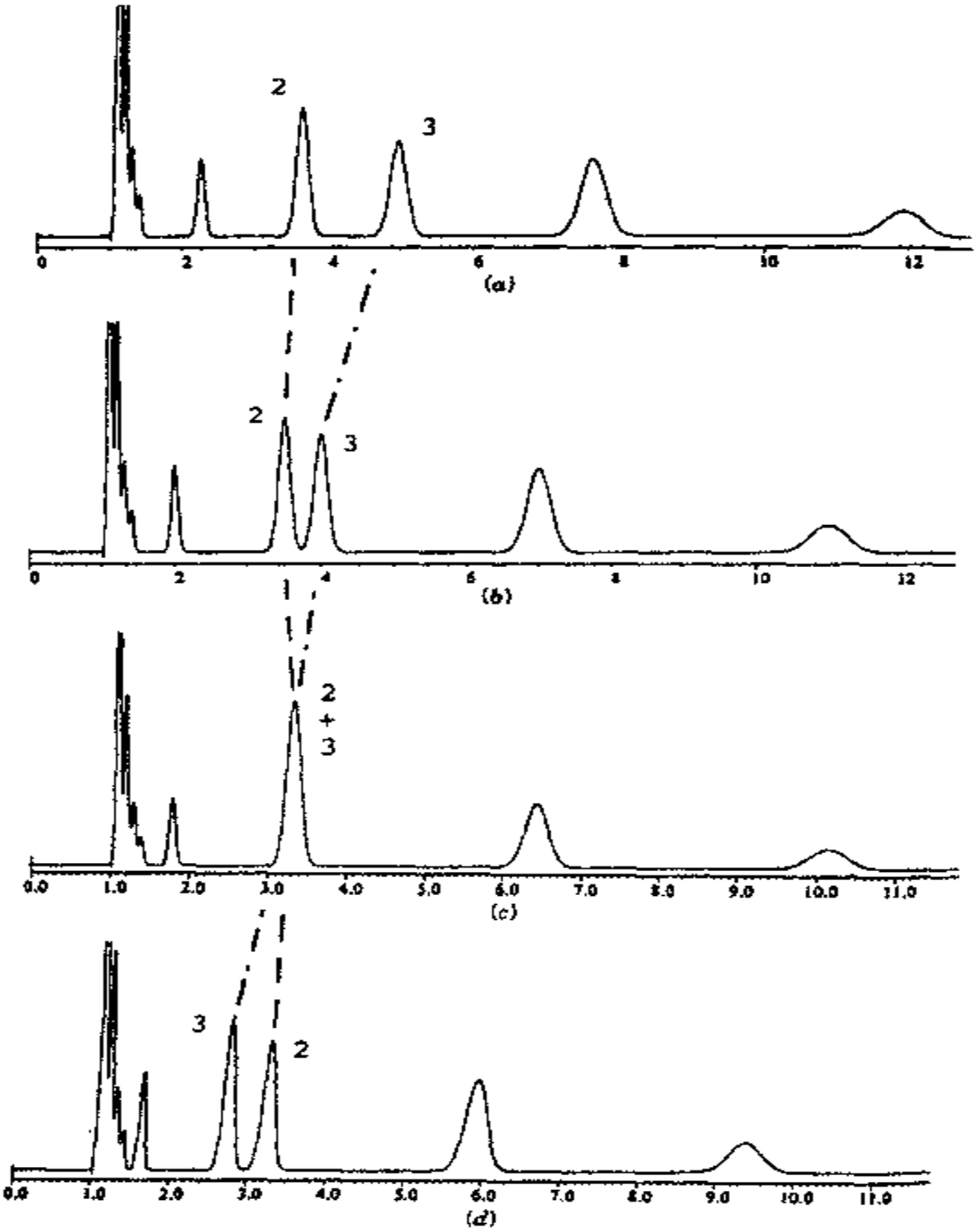


图 10－14　与图 10－13 相同实验的峰跟踪

除了峰 3 的浓度不同外。其它条件同图 10.13

色谱图(a)～(d)对应的 pH 分别为 3.0，3.5，4.0，4.5

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

法。当无标准物时，对于特定样品，可以尝试采用任一种峰跟踪方法。基于保留值趋势的峰跟踪尽管有烦琐且不易自动控制的弊端，但仍不失为较为可靠的方法之一，尤其在缺少自动峰跟踪软件的情况下，推荐采用这种方法。使用保留值；峰面积和/或光谱匹配相结合的技术对解决实际问题更为有效[49、72]，此项技术已被用于 DLAMOND 软件，但目前尚不很成熟，有待于改进和完善。

10.8 缺陷

计算机辅助方法建立所带来的便利可能被误解。这些程序决不会减轻对良好的色谱实践的需要。用于输入计算机进行预测分离(10.2 和 10.3 节)的初始实验数据必须非常精确，这些数据的微小误差将导致很大的预测保留时间和分离度误差。因此，小心进行初始实验并在用其进行计算机预测之前进行评价是非常重要的(这种建议也适用于人工 HPLC 方法建立)。

此外，引起预测结果偏差较大还可能包括以下原因：

1. 配制流动相或调节 pH 值不准确
2. 流动相改变时柱未达到完全平衡
3. 柱自身性能的改变
4. 峰形差(拖尾)
5. 峰簇(在色谱图中峰过多)

由于流动相浓度配制不准确；未达到完全柱平衡即开始实验或不同时间柱性能的改变都会引起保留时间的预测偏差。将初始实验数据用于外推，预测分离偏差更大。初始实验在数天内完成，也会增加出现这类偏差的可能性。

类似地，由于色谱峰形较差，人工或用计算机方法都很难处理。计算机通常没有办法处理峰拖尾，所以忽略谱峰拖尾的优化分离不会令人满意。在继续进行实验之前最好先查找出拖尾谱峰并采取适当的补救措施(5.3.2，5.4.2 节和 7.3.3.2)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

最后，如果色谱图中大部分峰重叠严重，分离条件改变时将很难进行谱峰跟踪。同时，与注射标准物的单峰保留值比较重叠峰的保留时间也会有误差，并且该误差在后面的计算机预测中将导致更大的误差。

参考文献

1. J. C. Berridge, *Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separation* Wiley, New York, 1985.
2. P. J. Schoenmakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
3. L. R. Snyder, J. L. Glajeh, and J. J. Kirkland, *Practical HP LC Method Development* Wiley – interscience, New York, 1988, Chapter 8.
4. J. L. Glajch and L. R. Snyder, eds., *Computer – Assisted Development for High Performance Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1990 (*J. Chromatogr.* 485 1989).
5. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and M. P. Rigney, *LC/CC*, 4 (1986) 921.
6. L. R. Snyder and M. A. Quarry, J. Liq. *Chromatogr.*, 10 (1987) 1789.
7. J. W. Dolan and L. R. Snyder, *LC/GC*, 5 (1987) 970.
8. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 65, 91
9. J. D. Stuart, D. D. Lisi, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 485 (1989)657.
10. J. A. Lewis, D. C. Lommen, W. D. Raddatz, J. W. Dolan, L. R. Snyder, and I Molnar, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 183, 197.
11. J. W. Dolan, J. A. Lowis, W. D. Raddatz, and L. R. Snyder, *Amer. Lab.*, 24(5)(1992) p. 40D.
12. F. Erni, *J. Chromatogr.*, 507 (1990) 141.
13. N. G. Mellish, *LC/GC*, 9 (1991) 845.
14. R. Dappen and 1. Molnar, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 133.
15. L. Wrisley, *J. Chromatogr.*, 628 (1993) 191.
16. R. Bonfichi, *J. Chromatogr.*, 678 (1994) 213.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

17. T. H. Dzido and H. D. Smolarz, *J. Chromatogr.*, 679 (1994) 59.
18. H. Fritsch, I. Molnar, and M. Wurl, *J. Chromatogr.*, 684 (1994) 65.
19. R. C. Chloupek, (. S. Hancock, and L. R. Snyder. *J. Chromatogr.*, 594 (1994) 65.
20. P. E. Shaw and C. W. Wilson III, *J. Chromatogr.* Sci., 26 (1988) 478.
21. L. R. Snyder, M. A. Quarry, and J. L. Glajch, Chromatographia, 24(1987) 33.
22. J. W. Dolan, D. C. Lommen. and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 535 (1990) 55, 75.
23. J. W. Dolan, L. R. Snyder, and M. A. Quarry, *Chromatographia*, 24 (1987) 261.
24. B. F. D. Christ, B. S. Cooperman, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 459 (1988)1, 25, 43.
25. J. D. Stuart and D. D. Lisi, *J. Chromatogr.*, 550 (1991) 77.
26. W. S. Hancock, R. C. Chloupek, *J. J. Kirkland*, and L. R. Snyder, J. Chromatogr. A, 686 (1994) 31.
27. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, B. A. Marchylo, J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* A, 686 (1994) 45.
28. D. D. Lisi. J. D. Stuart, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 555 (1991) 1.
29. L. R. Snyder and J. W. Dolan, *LC/GC*, 8 (1990) 524.
30. J. L. Glajch, J. J. Kirkland, K. M. Squire, and J. M. Minor, *J. Chromatogr.*, 199(1980) 57.
31. A. C. H. Drouen, H. A. H. Billiet, and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 127.
32. S. Sekulic, P. R. Haddad, and C. J. Lamberton, *J. Chromatogr.*, 363 (1986) 125.
33. H. A. H. Billiet and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 27.
34. C. Geiger and H. Rimpler, *GIT Fachz.* Lab., 34 (1990) 1496.
35. M. Solfrizzo, M. Forbes – Smith, R. N. Strange, and A. Visconti, *Chromatographia*, 39 (1994) 443.
36. A. Santos – Montez, A. I. Gasco – Lopez, and R. Izquierdo – Hornillos, *J. Chromatogr. Biomed. Appt.*, 620 (1993) 15.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

37. A. Drouen, J. W. Dolan, L. R. Snyder, A. Poile, and P. J. Schoenmakers, *LC/GC*, 9 (1991) 714.
38. P. J. Naish – Chamberlain and R. J. Lynch, *Chromatographia*, 29 (1990)79.
39. J. A. Lewis, L. R. Snyder, and J. W. Dolan, *J. Chromatogr.* A, Til (1996) 15.
40. P. J. Schoenmakers, N. Dunand, A. Cleland, G. Musch, and T. Blaffert, *Chromatographia*, 26 (1988) 37.
41. *Optimization Software*, product brief. Publication 12 – 5091 – 0325E, Hewlett – Packard, Waldbronn, Germany.
42. R. L. Lynch, S. D. Patterson, and R. E. A. Escott, *LC/GC* Int.,3 (1990) 54.
43. R. Faulstich and T. Catalano, *LC/GC*, II (1991) 776.
44. P. J. Schoenmakers, A. Peeters, and R. J. Lynch, *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 169.
45. P. B. Bowman, J. T. Hann, J. G. D. Marr, D. J. Salvat, and B. E. Thompson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, II (1993) 1295.
46. P. B. Bowman, J. G. D. Marr, D. J. Salvat, and B. E. Thompson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, II (1993) 1303.
47. S. D. Patterson, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 43.
48. S. Pichini, 1. Altieri, A. R. Passa, M. Rosa, P. Zuccaro, and R. Pacifici, *J. Chromatogr.* A, 697(1995) 383.
49. E. Lesellier, P. Saint Martin, and A. Tchapla, *LC/GC. Int.*, 8 (1995)386.
50. S. T. Colgan and E. B. Pollard, *LC/GC*, 9 (1991) 772.
51. J. R. Gant and A. F. Poile, *Amer. Lab.*, 22(1990) 15.
52. L. R. Snyder and D. C. Lommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(1991)611.
53. T. Hamoir, D. L. Massart, W. King, S. Kokot, and K. Douglas, *J. Chromatogr.* Sci., 31 (1993) 393.
54. G. Szepesi and K. Valko, *J. Chromatogr.*, 550 (1991) 87.
55. K. Valko and P. Siegel, *J. Chromatogr.*, 631 (1993) 49.
56. J. Fekete, G. MorovJ'an, F. Csizmadia, and F. Darvas, *J. Chromatogr.* A, 660(1994) 33.
57. S. V. Galushko, A. A. Kamenchuk, and G. L. Pit, *J. Chromatogr.* A, 660 (1994) 47.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

58. C. T. Mant, T. W. L. Burke, N. E. Zhou, J. M. R. Parker, and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, 485 (1990) 365.

59. C. T. Mant and R. S. Hodges, in *High – Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, C. T. Mant and R. S. Hodges, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 705.

60. K. Valko, G. Szabo, J. Rohricht, K. Jemnitz, and F. Darvas, *J. Chromatogr.*, 485(1989) 349.

61. I. Molnar, R. Boysen, and P. Jekow, *J. Chromatogr.*, MS (1989) 569.

62. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 65.

63. J. L. Glajch, M. A. Quarry, J. F. Vasta, and L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 280.

64. E. P. Lankmayr, W. Wegscheider, J. Daniel – Ivad, I. Kolossvary, G. Csonka, and M. Otto, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 557.

65. A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, and L. De Galan, *Anal. Chem.*, 60 (1984) 971.

66. A. G. Wright, A. F. Fell, and J. C. Berridge, *Anal. Proc.*, 25 (1988)300.

67. J. K. Strasters, H. A. H. Billiet, L. De Galan, B. G. M. Vandeginste, and G. Kateman, *J. Liq. Chromatogr.*, 12 (1989) 3.

68. T. P. Bridge, M. H. Williams, and A. F. Fell, *J. Liq. Chromatogr.*, 12 (1989) 23.

69. P. J. Naish, R. J. Lynch, and T. Blaffert, *Chromatographia*, 27 (1989)343.

70. N. Perez – Souto, R. J. Lynch, G. Measures, and J. T. Hann, J. *Chromatogr.*, 593(1992) 209.

71. A. J. Round, M. I. Aguilar, and M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A*, 661 (1994) 61.

72. J. K. Strasters, H. A. H. Billiet, L. De Galan, and B. G. M. Vandeginste, *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 523.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第 11 章　生化样品:蛋白质,核酸,糖类及相关化合物

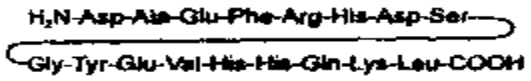
11.1　引言

HPLC 应用于生物化学样品开始于七十年代中期,今天已被广泛采用。这些分离与早期主要用于分离纯化样品的低压液相色谱(LC)原理基本类似。LC 与 HPLC 均可用于产品纯化,但 HPLC 具有速度快、分辨率高的特点,因而更适于样品分析。尽管本章中提出的原理对这两项技术同等适用,但主要针对的乃是 HPLC。有人曾提出生物大分子的色谱分离所依据的原理与小分子的不同,现在人们已知道情况并非如此[1]。因此,前面章节(尤其第 2 章与第 6 ~ 8 章)所述的 HPLC 方法建立的通用原理对合成的或生物来源的样品分离同样适用。

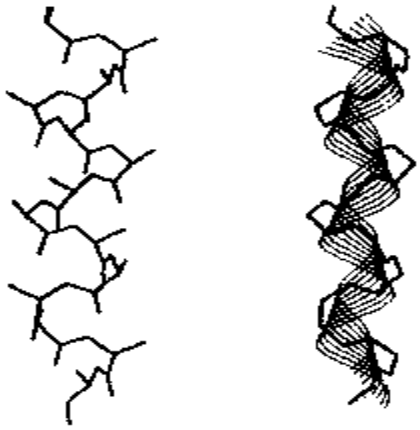
生化样品与其它类型样品有较大差异。生物大分子一般具有在水环境中稳定的三维结构(构象);而前面章节中提到的样品为小分子,其构象对分离和应用的影响一般不大。图 11 - 1 所示为蛋白质的各种层次结构。一级结构为能结合生成蛋白质的氨基酸序列。二级结构为蛋白质中某些氨基酸于分子内相互作用(折叠)形成的 α - 单螺旋或 β - 折叠结构。三级结构为整个分子的再折叠。四级结构即为二个或多个三级结构聚集而成的蛋白质。天然(具生物活性的)蛋白质分子具有严格的三级和/或四级结构。分子变性即该结构发生了变化,通常是折叠减少(卷曲无规则),生物活性丧失。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

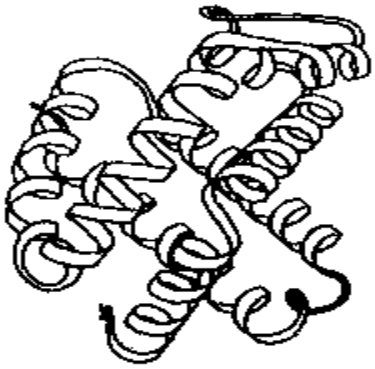
(a) 一级结构



(b) 二级结构



(c) 三级结构



(d) 四级结构

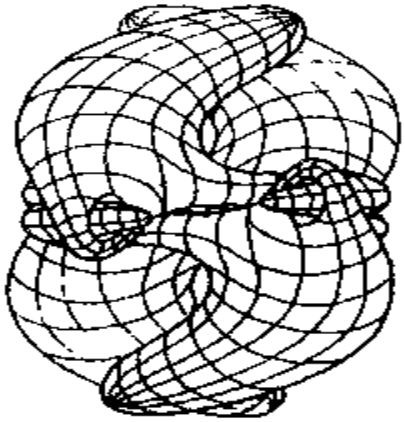


图 11－1　多肽结构[3]

（a）多肽中氨基酸的线性排列决定一级结构。（b）由 14 个残基的丙氨酸（自）低聚体形成的条形 α－螺旋二级结构和带状螺旋覆盖于唯一骨架上的氨基酸序列。（c）血红蛋白的 β－亚基骨架的带状结构[2]。（d）多重亚基酶触酶[3]。

蛋白质构象(天然与变性)可随 HPLC 的分离条件而发生变化：

- HPLC 模式(离子交换,反相等)
- 流动相组成(水相与有机相,pH 等)
- 色谱柱填充材料的性质(亲水性与疏水性)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

· 流速(在色谱柱中驻留的时间)

· 分离温度

构象在分离期间或之后发生的变化可能是可逆的，也可能是不可逆的。如果某一生物分子在分离期间构象发生缓慢变化，则不会得到令人满意的分离（谱峰会展宽和/或变形，回收率降低等[4]）。

由于这些原因使生物大分子方法建立中色谱原理的重要性失色不少。所以，关于生化 HPLC 的文献非常丰富，它们强调对不同样品的方法建立应凭经验并应注意特殊条件[5]。即象医生开"处方"一样，必须对具体问题作具体分析。本章采用前面几章中论述的色谱原理讨论生化样品的分离，同时也注意到这些样品的特殊性(例如构象)，所讨论的范围有限且笼统；读者如需深入了解，可参阅其它书籍[1,6~10]。这里，我们假设读者已对教科书中的基础生物化学知识比较熟悉。

11.1.1 一级结构

生化大分子一般由重复的结构单元组成：氨基酸组成肽和蛋白质；核苷酸组成低聚核苷酸和核酸，单糖组成多聚糖。除第6.6.5节外，本书对多聚糖的结构与分离不作讨论，可参阅文献[11]。

11.1.1.1 肽和蛋白质 肽和蛋白质为由氨基酸单元组成的聚合物，氨基酸的 $-NH_2$ 与 $-COOH$ 基团反应生成酰胺链($-CONH-$)。我们在本章中以肽作为氨基酸聚合物的通用术语；而分子量超过 5000Da 的肽则专称作蛋白质。图 11-2 中所示为构成肽的天然氨基酸以及缩写形式。为论述方便，可将这些氨基酸分为酸性、碱性和中性三类。而中性氨基酸又可如图 11-2 进一步分类。酸性与碱性氨基酸侧链的 pK_a 值在图 11-2 中标出。这些取代基侧链可决定一个肽的整体酸碱性。酸性肽的酸性基团多于碱性基团，碱性肽则反之。酸性与碱性氨基酸在肽分子中的比例决定了其净电荷为零时的 pH(称为等电点或 pI 值)，在低于此 pH 的氛围中，肽将带正电，反之则带负电。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

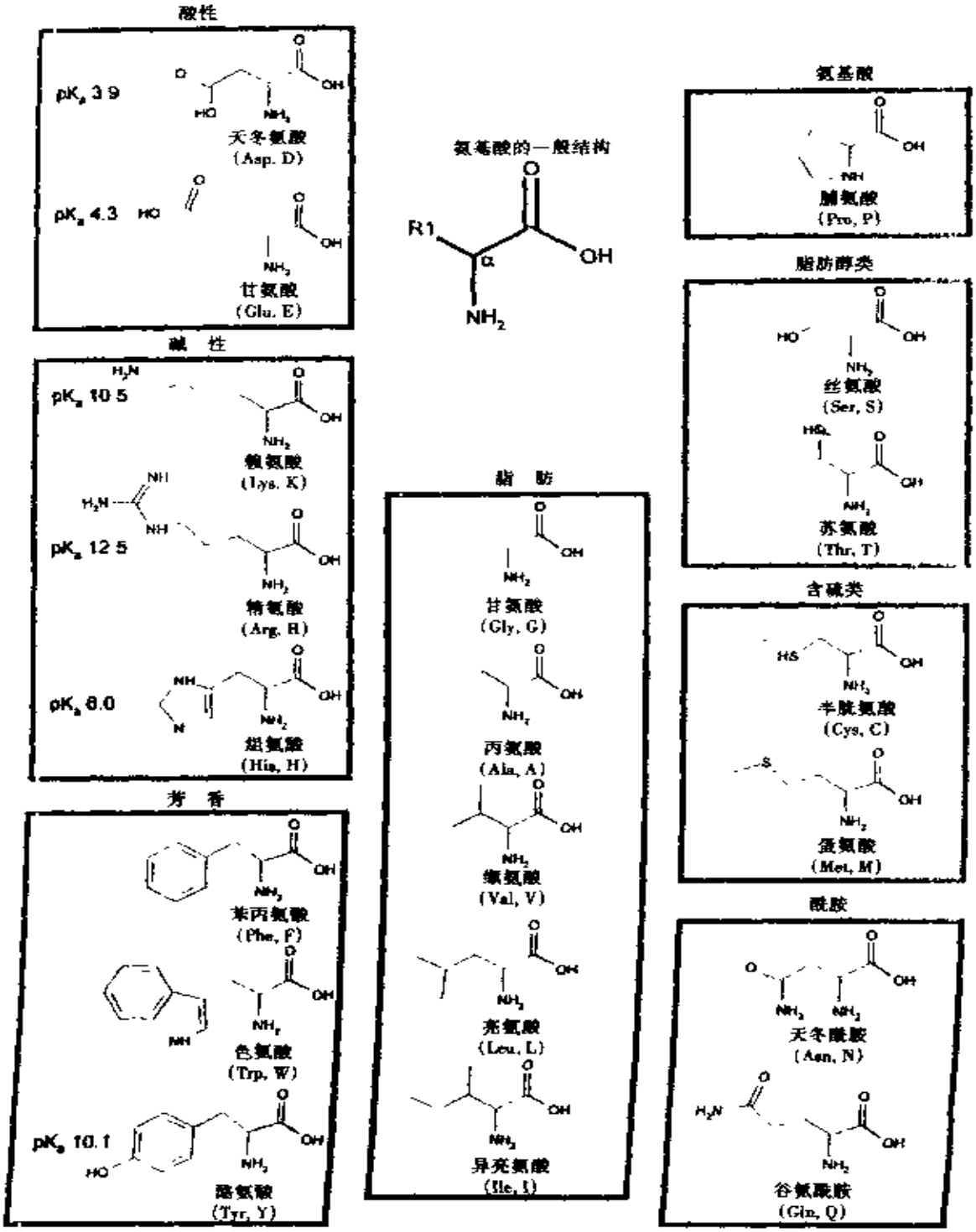


图 11－2 蛋白质中常见的氨基酸结构[2]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

氨基酸和肽分子所带电荷在肽分离中具有重要的作用，改变流动相的 pH 可对其加以控制（见 7.2 节）。天然肽分子（折叠的）中侧链与端基的 pK_a 值可能会有所变化[12,13]，人们通常将端基氨基或端基羧基（见图 11.1 节）分别保护封闭为酰胺或酯。

有两种氨基酸(脯氨酸与半胱氨酸)的色谱性质值得注意。许多天然蛋白质中的脯氨酸残基以反式(trans)构型为主，又与顺式(cis)构型呈平衡态。

在典型的反相色谱(RPC)条件下，顺式与反式脯氨酸构型之间的缓慢转换将影响它们的分离[14,15]，单肽可能以部分分裂或完全分离的峰对出现(通常不理想)；然而在高温时，脯氨酸两异构体的双峰通常会合并为单一谱峰。半胱氨酸残基能形成可逆的(分子内或分子间)二硫键——交联成肽。二硫键的形成与消失使某些肽分离时很棘手，可能导致活性丧失和/或同一个肽出现一个以上的峰。

蛋白质和肽的氨基酸组成对不同 HPLC 方法保留值的影响不一。与碱性肽相比，中性 pH 时酸性肽的保留值在阴离子交换中较大，而在阳离子交换中较小。在低 pH 反相色谱分离时，酸性肽的保留值通常大于碱性肽。同样，亮氨酸或异亮氨酸残基比例大时，会增加在 RPC 和 HIC 中的保留值，却对离子交换的保留值影响不大。

反相分离时，疏水氨基酸对保留值影响较大。表 11－1 所示为在低 pH 与高 pH 时，各氨基酸对 RPC 保留值的相对影响。显然，非极性的芳香和脂肪族氨基酸侧链导致较大保留，而电离的侧链使保留减小。由于如图 11－1 概述的构象影响，表 11－1 的相对保留数据对大分子肽只能作参考。

氨基酸的一些常见反应能生成“肽杂质”(变体)，如图 11－3 所示。这些反应包括天冬酰胺与谷酰胺的脱酰胺、蛋氨酸的氧化以及生成在天然结构中不存在的胱氨酸二硫桥键。这些变体能在肽

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 11－1　不同氨基酸对肽 RPC 保留的影响[a][16]

氨 基 酸	保留值的变化(min)	
	pH2	pH7
色氨酸 Trp(疏水性最强)	8.8	9.5
苯丙氨酸 Phe	8.1	9.0
亮氨酸 Leu	8.1	9.0
异亮氨酸 Ile	7.4	8.3
蛋氨酸 Met	5.5	6.0
缬氨酸 Val	5.0	5.7
酪氨酸 Tyr	4.5	4.6
半胱氨酸 Cys	2.6	2.6
脯氨酸 Pro	2.0	2.2
丙氨酸 Ala	2.0	2.2
谷氨酸 Glu	1.1	1.3
苏氨酸 Thr	0.6	0.3
天冬氨酸 Asp	0.2	－2.6
谷氨酰胺 Gln	0.0	0.0
丝氨酸 Ser	－0.2	－0.5
甘氨酸 Gly	－0.2	0.2
精氨酸 Arg	－0.6	0.9
天冬酰胺 Asn	－0.6	－0.8
组氨酸 His	－2.1	2.2
赖氨酸 Lys (亲水性最强)	－2.1	－0.2

[a] 将一氨基酸取代为谷氨酰胺引起的保留时间的变化(如将 Trp 取代为 Gln，在 pH 2 时，保留时间增加 8.8min)。条件：1%/min 乙腈－水梯度；1ml/min

制备或贮存中生成(既可自然发生，也可重组生成)。细胞内磷酸化与糖基化转译后变性也可影响样品的稳定性、效能以及异质性。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

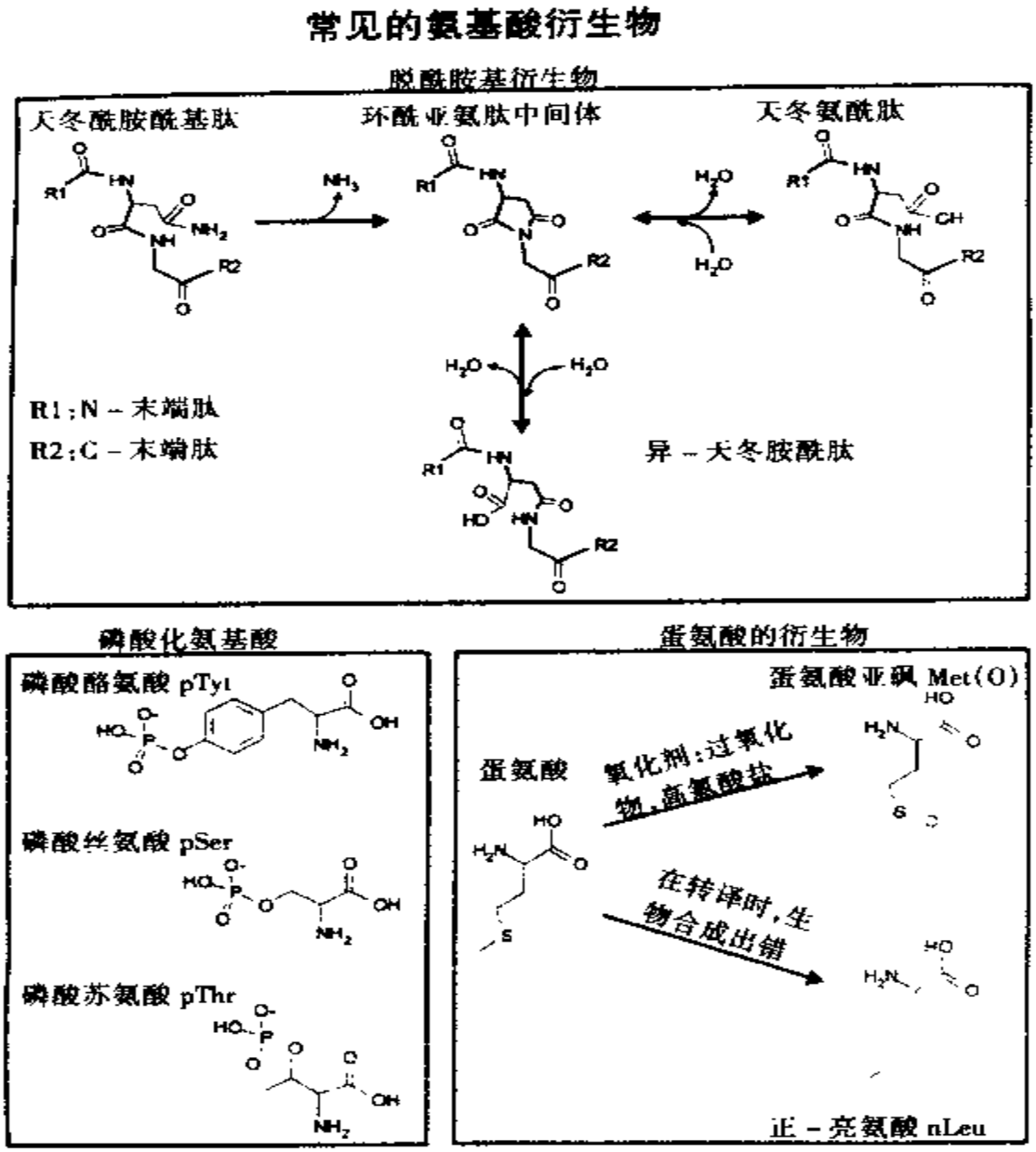


图 11－3　蛋白质中发现的一些常见氨基酸衍生物的结构以及能生成这些衍生物的一些反应[2]

11.1.1.2　低聚核苷酸与核酸　低聚核苷酸(oligos)与核酸的组成就重复单位的种类而言,比蛋白与肽简单,由交替糖基和磷酸盐基团的骨架组成,核酸碱基连接于糖上(图 11－4*a* 和

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

b)。DNA 的糖基为脱氧核糖，常见碱基包括胸腺嘧啶(T)，腺嘌呤(A)，胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)。RNA 的糖基为核糖，而碱基除胸腺嘧啶换为尿嘧啶(U)外，其它与 DNA 的相同。

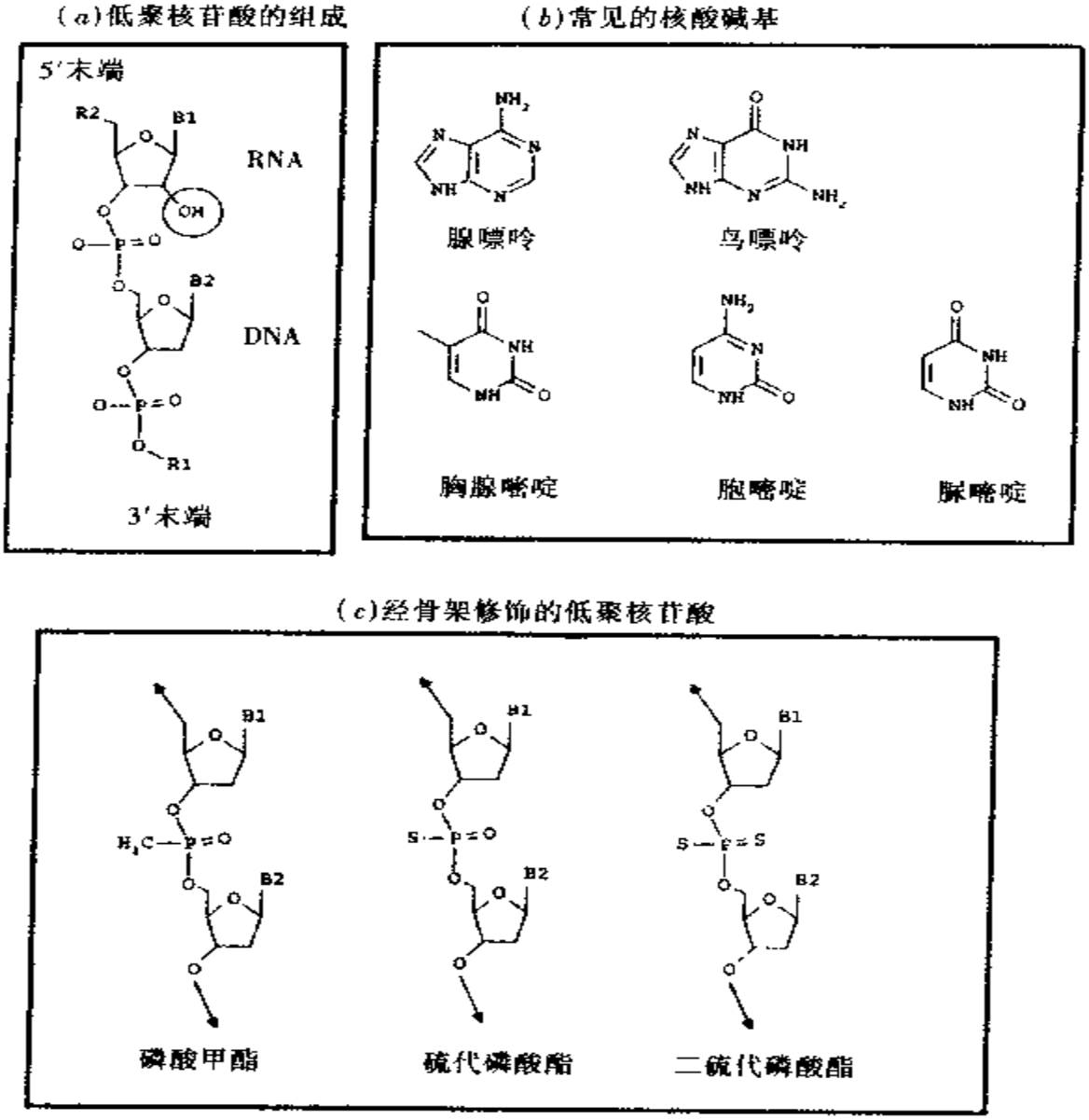


图 11－4　核酸的结构[2]

(a)低聚核苷酸的骨架组成；RNA 中，2′核糖位置羟基化(见圈处)，DNA 中没有这种现象。B_1 和 B_2 代表核酸碱基，见(b)中所示；(c)改性低聚核苷酸的骨架示例。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

HPLC 用于分离小分子低聚核苷酸(100 个核苷酸)多于核酸，这里不讨论核酸的分离[见(6.8 节)]。低聚核苷酸中影响色谱分离的结构特点包括：

1. 分子内碱基对 A－T 或 G－C(发夹圈型)，会引起谱峰展宽或单一低聚核苷酸出峰一个以上。

2. 分子间碱基对(聚集)，尤其是含鸟嘌呤(G)较多的低聚核苷酸，也会导致谱峰展宽，单一低聚核苷酸出峰一个以上。低聚核苷酸构象的重要性不如肽，变性一般不受关注。如需要，可用甲酰胺，尿素，高温(> 60℃)或高 pH (> 9)打开碱基对(使之变性)，减少由于碱基成对或聚集带来的问题。

11.1.1.3　改性低聚核苷酸　合成的反义低聚核苷酸具有改性的骨架（图 11－4*c*），由于其潜在的治疗作用而备受关注。它们可与天然低聚核苷酸一样生成碱基对（这样可减弱信使 RNA 的活性），但又不同于天然产物，因后者的生物利用度高，在体内耐降解。其它反义低聚核苷酸则基于糖(如双脱氧核糖)或有一肽骨架。

11.1.2　生化 HPLC 的特殊要求

第 6～8 章论述了通过改变保留值 k(或 k^*)、α 与 N，选择色谱条件以达到分离。这些原理同样适用于生物分子的分离。然而为生化样品选择初始条件与参数以改善分离却有些不同，一般需要用梯度洗脱(SEC 除外)。

11.1.2.1　色谱柱　第 5 章讨论了对 HPLC 色谱柱填料的要求，生化分离同样存在这些要求，此外对孔径大小，键合相特性，柱稳定性还有特殊要求。生物大分子的分离一般塔板数不高，应用较小和/或无孔填料以及低流速较有利。

孔径　多孔填料的大多数表面(>95%)在孔内部，孔直径大小决定大分子进入填料内部的能力。例如约 60000Da 的典型球状蛋白质，流体动力学半径约有35Å。该分子如完全变性则增加至约

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

80Å[17,18]。只有当样品分子的直径小于填料的平均孔径时，样品才能进入到大多数的微粒内部。然而，在孔径内的摩擦阻力系数能大大减少扩散，从而降低柱效（使谱峰展宽）。为避免这种不利的扩散作用，孔径应超过样品分子直径的4倍或更多[17,18]。由于低聚核苷酸与糖类具有延展构象（有效直径较大），所以需比分离类似分子量的肽更大的孔径才能有效地进行分离。

商用柱填料一般至少有两种均孔尺寸可用：60～120Å 与250～350Å。如果分子大小超过50个氨基酸的肽或25个残基的低聚核苷酸，用250～350Å 的填料较好。如样品分子量未知，也应用该孔径尺寸的填料。更大的生物分子（分子量>100000Da 的蛋白质或大分子核酸）的分离可能需要更大孔径的填料。

色谱柱的饱和容量 W_s 决定能注入的并使分离可接受的最大样品量。W_s 值与填料孔径、样品分子大小、表面积有关，对制备分离尤其重要（见第13章）。最大的可能柱容量与表面积成正比，比如样品分子比某些填料的孔大，样品不能进入所有填料孔内部，该值则会减小。小样品分子用小孔径填料时的柱容量较大，大分子样品用大孔径填料。因此，250Å 或以上的孔径适用于分子量5000Da 以上样品的制备分离。

因为 k 与表面积成正比（其它因素相同时），柱填料的孔径大小（或表面积）也影响保留值。这样，小生物分子的保留值在小孔径（大表面积）填料上通常更大。图11－5以肽在80与300Å 孔径 C_{18}柱上的分离说明了这一结果。

粒度大小 如第5章所述，填料直径为柱效的主要决定因素。与分离小分子一样，生物分子的分析分离最常用的填料是5μm 硅胶。直径更小的硅胶微粒（<4μm）尽管柱效更高，用于肽分离受限制，广泛认为在日常应用中不可靠。不过，最近对小微粒，不同孔径硅胶的合成改进好象已解决了该问题（见第5章与文献[20]）。

生物大分子的扩散速度慢所造成的柱效降低（谱峰展宽）可采

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

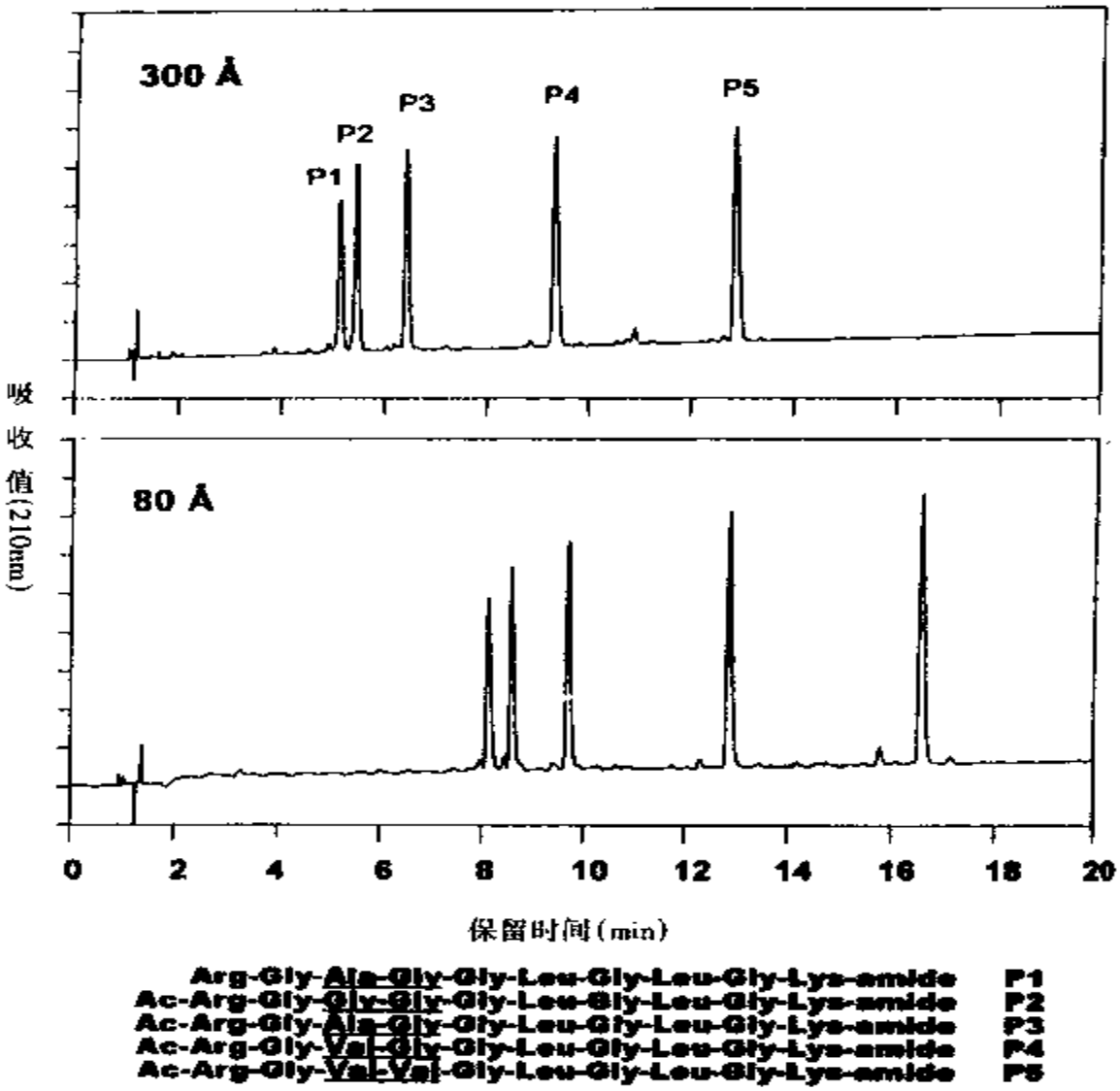


图 11－5　RPC 色谱柱孔径大小对肽保留值的影响[10]

条件：色谱柱 15×0.46cm, 3.5μm Zorbax SB－C_8；A 溶剂，0.1% TEA 水溶液；B 溶剂，0.085% TFA 于 80% 乙腈－水中；20min 梯度，10→30% B；60℃，1.5ml/min。

用下面的方法加以改善：(1)用小粒径(≈2μm)的无孔微粒，(2)用通孔或"灌注型"微粒(见 5.2.1 节)。尽管用无孔小微粒极快速地分离复杂样品(如胰蛋白水解液)的惊人示例已有报道，迄今为止这些

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

色谱柱由于下面的某些缺陷，使应用受到限制：(1)需特殊 HPLC 仪器，以减小柱外效应(见2.3.3.3节)；(2)由于表面积小，柱容量低；(3)也由于表面积小，强保留成分很快会使填料堵塞，(4)由于颗粒小，柱压高，柱长受限，柱效同样受限，(5)颗粒堵塞严重。

灌注型微粒填料孔径非常大(>1000Å)，可使部分流动相穿孔而过，从而减少了样品分子必须在微粒内部扩散的距离(见5.2节和文献[21])。这些填料允许大流速而柱效损失很少，如图11－6所示，流速为5ml/min。快速分离使方法建立过程加快：实验比用类似直径的多孔填料要快。渗透型柱迄今主要用于复杂程度较小、对塔板数要求不高的蛋白质样品的制备与分析分离。

色谱柱的稳定性 柱填料的稳定性对许多生化分离十分重要。肽的反相分离常常在低 pH(<3)条件下进行，离子交换分离经常用 pH>7。而且，许多色谱工作者喜欢用高 pH(>12)冲洗(清除)色谱柱，以除去如内毒素等强保留的样品组分。另外，有些分离在高温(>50℃)下运行较佳。对键合硅胶填料，这些条件可损失键合相或使硅胶基质溶解(见5.2.3.4和5.4.3.5节)。鉴于此以及其它的原因，以前生物化学家并不倾向于使用键合硅胶填料，尤其是不用于制备分离。糖基质填料(交联葡聚糖 Sephadex，琼脂糖等)与聚合物填料(聚苯乙烯，聚甲基丙烯酸酯等)更常用于生化样品的制备分离。

键合硅胶填料与糖基质填料或聚合物填料相比，一般柱效更高，分离更好。所以，人们一直致力于改善高或低 pH 操作条件下的键合硅胶填料的稳定性。空间保护键合相的应用(见5.2.3)已解决了低 pH 与高温下色谱柱的稳定性问题，这些色谱柱目前多用于肽的反相分离。关于高 pH 的操作，浸渍过氧化锆的硅胶用作 SEC 柱则更加稳定[23]。聚合键合相能用来加厚固定相层，更好地保护硅胶基质，从而使其在高 pH 操作时稳定性提高。用涂有聚合物的氧化铝[24]或氧化锆[25]代替硅胶，高 pH 分离蛋白时，能进一步提高色谱柱的稳定性(也见 5.2.3.2 节)。研究也表明如遵守下

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

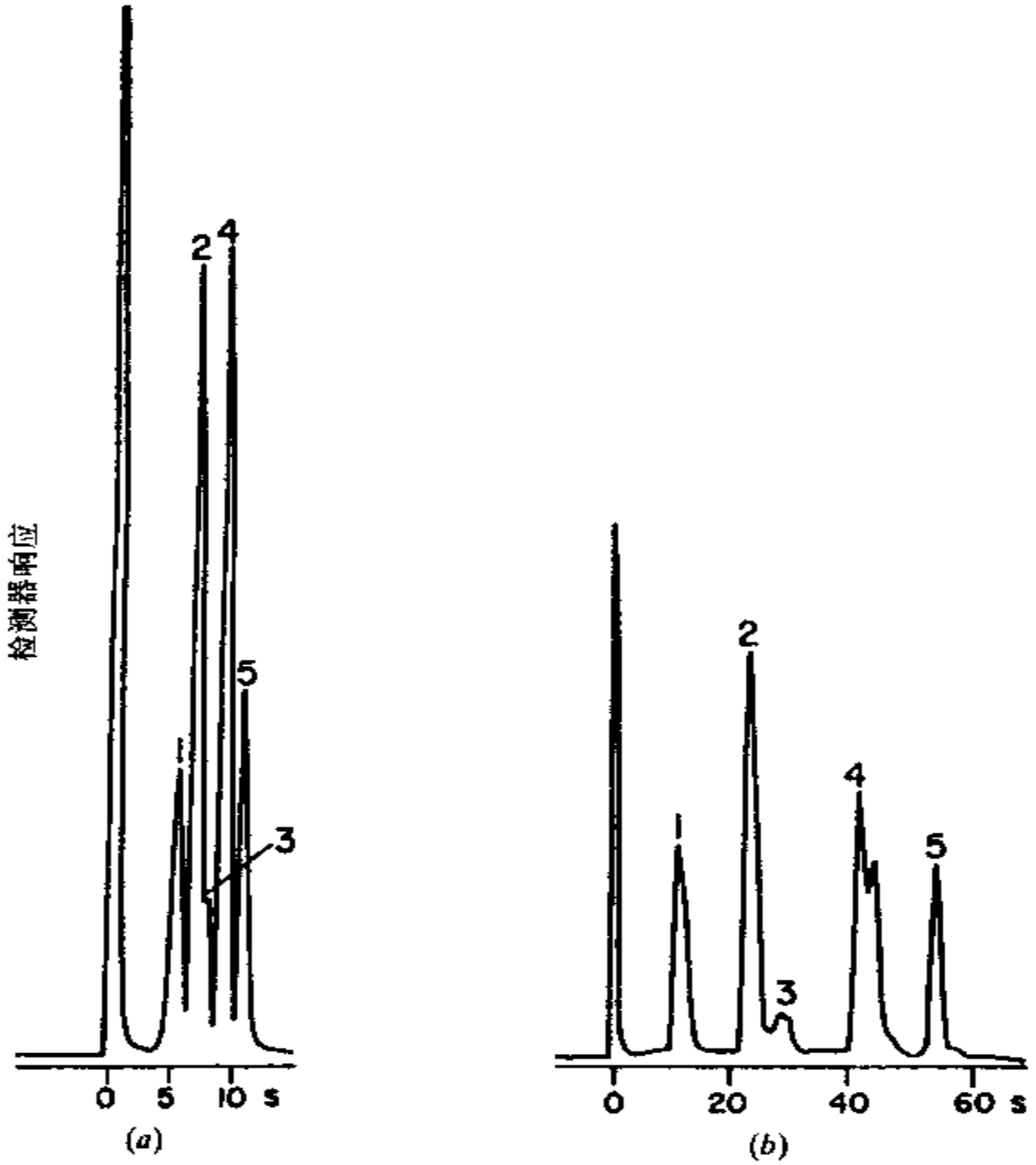


图 11－6 用大孔径(灌注)填料,高流速快速分离[22]

条件:样品,核糖核酸酶 A,细胞色素 C,溶菌酶,β－乳球蛋白,卵清蛋白的混合物;色谱柱:3 ×0.21cm,POROS R/M(聚苯乙烯－DVB);梯度 20～50% B;A 溶剂,0.1% TFA－水;B 溶剂,0.1% TFA－ACN;5ml/min;室温。(a)梯度时间 12s;(b)梯度时间 90s.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

列操作条件，硅胶基质键合相柱能在 pH≥9 时使用[25a]：(1)溶胶基质(溶胶－凝胶)硅胶载体；(2)完全反应和封尾的烷基键合相；(3)≤50 mM 有机缓冲液，如 tris(三羟基甲基氨基甲烷)，双 tris 丙烷等，(4)柱温<40℃。(也见 5.1.3.4 节与文献[46])。

色谱柱的选择 HPLC 方法与色谱柱的选择取决于分离目的。不同的 HPLC 方法可用分离度以及该方法是否使蛋白质变性来衡量。分离度或将复杂样品分离成为尽可能多的峰的能力(最大峰容量)有如下差别：SEC<HIC<≈IEC<RPC。HPLC 使蛋白质样品变性的趋势也有差别：SEC(最小)<IEC≈HIC≤RPC。表 11－2 概

表 11－2 常用于生物分子的色谱柱的特性

分离模式	色谱柱的特性				
	填充材料		色谱柱的几何尺寸		
	键合相	孔径(Å)	粒度	ID(cm)	L(cm)
RPC					
肽	烷基：C_8/C_{18}	60－80	3.5－7	0.46	15－25
蛋白	烷基：$C_3/C_4/C_8$	300	3.5－7	0.46	5－25
低聚核苷酸	烷基：C_8/C_{18}	80－300	3.5－7	0.46	15－25
IEX					
肽	SCX：SP－/SE－	100－300	3.5－7	0.46	15－25
蛋白	WAX，SAX，WCX，SCX	300－1000	3.5－7	0.46	15－25
低聚核苷酸	SAX	0；60－100	2－7	0.46	5－15
核酸	SAX	0；60－4000	2－7	0.46	5－15
HIC					
蛋白	丙基；苯基	300	5－7	0.46	10－25
HILIC					
肽	聚羟乙基天冬酰胺	200	5	0.46	10－25
蛋白	聚羟乙基天冬酰胺	300	5	0.46	10－25
SEC					
肽	二醇基/葡聚糖	60－100	4－15	1	25－60
蛋白	二醇基/葡聚糖	100－300	4－15	1	25－60
核苷酸	二醇基/葡聚糖	100－500	4－20	1	25－100

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

述了一些可能用于初始方法建立实验的色谱柱。

11.1.2.2 样品分子的构象 在方法建立中，如需保存天然构象（和生物活性），将在一定范围内制约分离条件的选择。譬如：某酶的离子交换分离需保存其生物活性，就可能需要：

1. 严格的流动相 pH 范围。
2. 有限的有机溶剂浓度
3. 严格的离子强度和/或反离子范围
4. 低温
5. 是否存在辅助因素，特殊金属离子，底物或产物
6. 是否需加入洗涤剂或其它表面活性剂
7. 限定范围的总蛋白浓度

选择 HPLC 条件能够决定一个化合物是否以天然状态或非天然状态（或二者皆有）流出，或在 HPLC 分离之前、之间或之后，样品是否发生聚集和/或沉淀。用 IEC、HIC 或 SEC 分离蛋白质，通常使用那些能保持天然构象的条件。用 RPC 分离通常会使蛋白变性，但小蛋白（<200000Da）在分离之后常常又能恢复特性。

RPC 分离期间，蛋白的部分变性产生不同构象（例如天然的和变性的），并出现多重谱峰、宽而不规则的峰、回收率低、"鬼峰"及其它一些问题。不完全变性很大程度取决于分离条件与肽的性质，具有较稳定三级结构的蛋白质更易出现这一问题。图11－7所示为柱温变化对部分变性核糖核酸酶 A 的 RPC 分离的影响[26]。低温时，蛋白部分变性，产生宽而不规则的谱峰。高温时，完全变性，出现单一窄谱峰。

对多数小蛋白，RPC 分离在完全变性条件下运行最好[4]：低 pH，乙腈/水梯度，用 C_3～C_8色谱柱，（如必要）在室温用尿素或胍使样品分离前先变性，再高温（如>50℃）分离。特别地是，应使蛋白完全展开并避免聚集或沉积。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

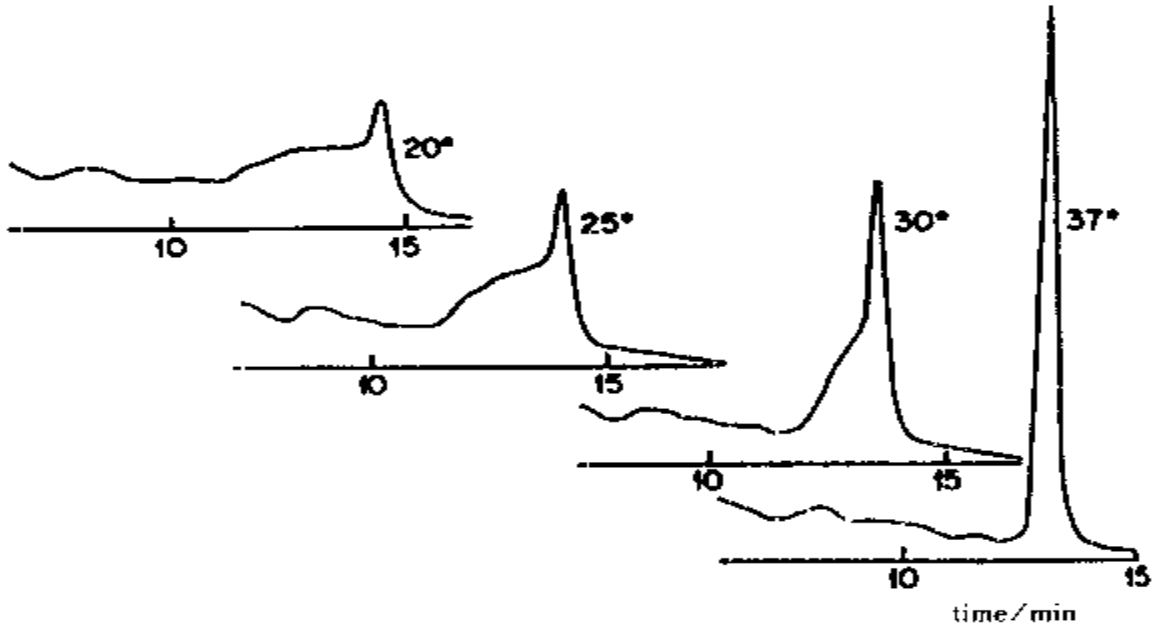


图 11－7　核糖核酸酶 A 的峰宽与峰形的变化与 RPC 梯度洗脱中温度的关系[28]

条件：10×0.46cm C_4 色谱柱；30min 梯度，0→100% B：A 溶剂，10mM 磷酸(pH 2.2)；B 溶剂同，另加 45% 1－丙醇，1mL/min

11.1.2.3　样品回收：质量和生物活性　从 HPLC 分离中回收小分子通常可达 100%（实验误差之内）。生物大分子的回收率较低。样品回收率低或生物活性较差的原因包括：(1)在分离期间样品部分发生变性，(2)有些样品不可逆地粘附在填料基质上。提高回收率可通过：(1)缩短运行时间，(2)增加样品重量/色谱柱体积的比值，(3) 用活性低的基质作填料（比如琼脂糖类的亲水材料）。

当样品昂贵和/或不足时，先证实可达到足够回收率后，再注入全部样品。小直径的短柱（如 5×0.2cm）可用于试验方法的建立，由于增强了检测与回收，所以也可用于纯化来源有限的样品(纳克至毫克级)的最终分离[27]。

11.1.2.4　样品预处理　进样前，样品必须完全溶解、无颗粒物，样品溶剂应与色谱分离流动相兼容。细胞或组织匀浆和体

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

液必须无颗粒，痕量成分必须经纯化和/或浓缩。有时，需用表面活性剂溶解生物分子。第4章论述了一般样品的制备方法，但对于生物样品还可能有其特殊要求。

样品溶剂 在HPLC分离前，多种溶剂可用于使蛋白溶解和/或变性（见表11－3）。通常，样品浓度如达到0.1～2mg/ml，用于分离已足够。样品最好能溶于可作为初始流动相的溶剂中[如0.05～0.5%三氟醋酸(TFA)－水作反相分离]。6M盐酸胍或尿素缓冲液具有：增溶效果明显、能与多数流动相混溶、可使许多蛋白质有效地变性等优点。如果用有机溶剂（醋酸、DMSO、丙醇等）溶解样品，这些样品溶剂可能对RPC分离太强（见5.4.2节），使色谱图中那些早出的峰变宽与变形。要解决该问题，溶解样品时应减少有机溶剂的浓度，或先在样品溶液中加入水，再进行RPC分离。与极性小的溶剂（如异丙醇）相比，极性大的溶剂（如DMSO）的浓度可以高一些。对IEC分离，样品溶剂的离子强度应尽量降低，尤其是需较大体积进样时。最好将样品溶剂的pH与流动相调为一致。

表11－3 选择样品溶剂

溶剂	应用	评述
0.05～5% TFA水溶液	通用	有效增溶许多样品
6M胍溶液，pH 6～8	通用	对许多蛋白与肽极为有利
5～80%醋酸或甲酸；0.1～0.5M高氯酸	肽	经常用于从组织中提取肽，沉淀蛋白与细胞碎片
6M尿素/5%醋酸	疏水肽，蛋白	用于膜蛋白碎片，聚集系统
水混溶有机溶剂：乙腈、甲醇、THF、二氧六环、DMSO；±TFA；±水	疏水肽，多肽	限制进样体积以免出现问题；尽可能多加水以改善兼容性；按所需用TFA酸化

表面活性剂 表面活性剂（洗涤剂）常用于增加生化样品的溶解度、保持生物活性或预防聚集。然而，它们又常给HPLC分离带来麻

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

烦，而对 SEC 则无妨。大多数离子型表面活性剂可用于 RPC 分离[尤其是十二烷基硫酸钠(SDS)]，少量 SDS 能使 RPC 分离肽时，谱峰形状变坏和保留值重现不好。可用溶剂[28]或固相萃取[29]最后除去 SDS，但样品可能受损。即使必须使用表面活性剂，也应尽量减低它们在样品液中的浓度。两性和中性表面活性剂(Triton X－100, X－114, Zwittergen, 辛糖苷)对 RPC 干扰较小[2]，尽管可能影响 UV 和荧光检测。当采用表面活性剂时，色谱柱需定期进行再生处理(见 11.2.1.3 节)。

如表面活性剂溶解或混溶无问题，则可用于 IEC、HIC 或 SEC 分离。这些分离方法常与表面活性剂配合使用，以保持有关化合物(如增溶膜蛋白)的生物活性或溶解度。在 SEC 中，表面活性剂可用来防止样品聚集或与固定相发生反应。在 IEC 和 HIC 中，表面活性剂不应干扰样品的保留值。可用于 IEC 和 SEC 的表面活性剂以及它们的增溶性质在文献[30～32]中有详述。

样品溶解 无论样品来源如何，都应完全溶解，应注意除去颗粒状杂质(如用膜过滤或离心，见第 4 章)。样品完全溶解可能需微热、超声处理或放置一定时间。如样品含有大分子量的肽或蛋白质，应避免剧烈振摇或搅拌，否则易产生大量泡沫，使蛋白变性。样品完全溶解后，仔细检查溶液随时间的变化情况。注意样品放置后可能会慢慢产生沉淀，如出现颗粒需再离心或过滤处理。对于进样时易于堵塞入口筛板的样品(压力突然升高)，应设法使样品与流动相组成相匹配。

11.1.2.5 样品检测 第 3 章曾讨论了不同样品/检测器组合的一般特性。这里讨论生物分子特有的专用检测器的特性。不同的生物分子基于少量不同单元的聚合性质，可以使用“标准的”检测条件。例如，不同的低聚核苷酸具有相似的 UV 光谱，因而在最大吸收波长处(250～260nm)能够检测嘌呤碱与吡啶碱。同样，可于 210～225nm 处检测肽，此处酰胺键的吸收很强。氨基酸的芳

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

侧链可于 254～260nm(苯丙氨酸和酪氨酸的吸收处)或 270～290nm(酪氨酸和色氨酸的吸收处)进行检测,此处的灵敏度虽低但选择性高。荧光检测对肽的灵敏度与选择性都更高,但通用性较差,色氨酸是唯一具有显著、天然荧光性质的残基(激发波长 280nm,发射波长 325～350nm)。

11.2 肽与蛋白质样品的分离

因为 RPC 的分离能力较强,所以最常用于肽与蛋白质的分析分离。RPC 分离通常会使蛋白质变性,但是小于 20000Da 的分子,重新折叠、复原天然构象常常是可能的。IEC、SEC、HIC 与亲和分离都能用于分离天然(具生物活性的)蛋白质。天然产品的蛋白水解物与提取物常常含有较多杂质组分,仅用 HPLC 通常不可能解析整个样品。为从如此复杂的样品中分离或定量某一特定成分,可能有必要依次使用二种或二种以上不同的色谱模式。首次分离出的部分再以第二种分离方法进一步解析,依次类推。每种分离的选择性都有所差别最为理想。用不同的 HPLC(RPC、IEC 等)时,产生差别的可能性较大(见图 11－14)。

11.2.1 反相 HPLC

反相 HPLC(RPC)广泛用于肽与蛋白质样品的分析,也用于肽与蛋白质的纯化——通常先用 SEC、IEC 或其它 LC 方法分离。

尽管等度洗脱有时也用于肽和小分子蛋白质的分离,但一般需用梯度洗脱。用 RPC 分离生物大分子的一个特点是改变有机溶剂浓度即可较快地改变保留值(k):改变 0.1% B 能使 30000Da 蛋白的 k 变化 20%(见 8.2.1.2 节),这一特点使等度条件或变化较慢的梯度保持衡定的保留时间较困难。

RPC 方法建立的通用法则如下:(1)选择初始条件,(2)优化保留值(梯度条件),(3)优化选择性,(4)优化柱条件。在每一步最好都检查有关组分的回收率。梯度方法的通用步骤在第 8 章中已

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

作详述。这里重点说明 RPC 分离肽与蛋白质的特殊要求。

11.2.1.1　初始分离的较好条件　表 11－4 为初始分离提供的推荐条件。

表 11－4 分析型反相 HPLC 分离肽或蛋白样品的较好初始条件

条　件	肽	蛋　白
色谱柱		
键合相	长链烷基(C_{18}或 C_8)	短链烷基(C_4、C_3、CN)
尺　寸	0.46×15 或 25cm	0.46×5～15cm
粒　度	3.5～10μm 直径	3.5～10μm 直径
	80～300Å 孔径	300Å 孔径
流动相		
A 溶剂	0.12% TFA/水	0.12% TFA/水
B 溶剂	0.10% TFA/水	0.10% TFA/水
梯　度	0～60%B/60min	0～60%B/60min
温　度	40～80℃	40～80℃
流　速	0.5～2 ml/min	0.5～2 ml/min
进样量		
体　积	10～50μl	10～50μl
重　量	1～100μg	1～100μg

色谱柱　肽分离中，优先选用的色谱柱与“常规”小分子的情况类似(见表 1－3；即 15 或 25cm 柱，100Å 孔径，C_8 或 C_{18} 填料)。填料尺寸为 3.5～5μm(见 5.2.2 节)。因为肽分子中含有碱性氨基酸，低 pH 条件分离较好，应选用金属含量低，非酸性硅胶制成的填料(见 5.2.1.1 节)。改变温度为改变选择性的有效手段(见 11.2.1.2 节)，因此所选择填料应在低 pH、高温条件下稳定。以 Zorbax StableBond (Rockland 技术公司)品牌销售的空间保护柱填料能满足所有这些要求。聚合物填料也可以，但柱效低，因而目前用于肽分离的不多。

对于蛋白质分离，推荐的色谱柱大致相似，只是填料优选 300Å 孔径，C_3～C_8 或氰基柱。参阅文献中有关 RPC 分离蛋白质和

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

肽的条件时，应特别注意。近期的键合硅胶填料与 1990 年以前流行的材料相比，已有了很大的改善。因此，可以期望这些新型的色谱柱有上乘的分离。

流动相 分离蛋白质和肽，建议使用低 pH、ACN－缓冲液梯度，因为这些条件：

1. 分离的化合物类型和结构范围宽。

2. 抑制硅羟基的电离。硅羟基可与碱性氨基酸分子中的侧链作用，使峰形变坏。

3. 使分子完全变性，因此将 11.1.2.2 节中阐述的问题降低至最小。

4. 能在低 UV 波长检测（< 210nm），以增强检测灵敏度。

5. 流动相粘度低，所以出峰窄。

6. 保留较小的小肽通过与自由氨基端和碱性氨基酸（当以 TFA 作缓冲剂时）结合成离子对，使保留值增大。

这些分离中，可用磷酸代替 TFA，以增强在 200nm 处的检测灵敏度。对于肽或蛋白质的回收纯化来说，TFA 挥发性强，使用更为方便。丙醇（或异丙醇）能替代 ACN 作为有机改性剂，以提高某些疏水性强的大蛋白质的回收率。然而，丙醇粘度大，使色谱柱压增高，峰形变宽。检测波长不能太短（>220nm），检测灵敏度较低。

梯度条件 大多数肽与蛋白质用浓度小于60% 的 ACN 即可洗脱，但偶尔也需更高的浓度。初始方法建立试验的良好选择是 0～60% B，肽 30min（2% B/min），蛋白质 60min（1% B/min）。然而，在最终方法中往往为得到理想的分离度，而需要较平缓的梯度。梯度变化速度（% B 溶剂/min）决定样品谱峰在其迁移通过色谱柱期间的平均保留值 k^*（见 8.3 节）。k^*值取决于色谱柱尺寸（柱死体积 V_m），流速（F），样品的分子量（M_w），和梯度变化速度（% B/min）：

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

$k^* = 87(F/V_m)$ $(1/S)$ $[1/(\%B/min)]$ (11.1)

(流速/柱尺寸) (样品分子量) (梯度变化速度)

S 与样品分子量有关,肽与蛋白质的 S 通常估计值为[33]:

$S \approx 0.48M_w^{0.44}$ (11.2)

由式 11.2 估计分子量为 1000,10000 与 100000 的 S 值分别为 10,28 与 76。这就是说为得到相同的有效 k^* 值(例如 $k^* = 3$),以%B/min 表示的梯度变化速度对分子量以 10 倍递增的样品,应降低约 3 倍。因此,分离大分子量的样品,通常需要更长的运行时间。初始实验完成后,系统地改变梯度变化速率、开始与结束的%B 值和梯度形状,以优化分离(见 8.6 节)。

其它条件 初始温度推荐用 30~50℃。高温使谱峰变窄,压力降低(二者均为期望得到的),但某一特定分离的最佳温度还将取决于其它因素。某些疏水性极强的肽与蛋白质,在 60~80℃回收率最大[4,34],而有些样品的选择性则在 30~90℃范围内某一特定温度下最佳(见 11.2.1.2 节)。

流速对一般蛋白质分离不很重要,但只要 k^* 保持恒定(例如:梯度时间增加一倍,而流速降低一半;见式 11.1 和文献[35]),降低流速可提高分离度。最大进样体积和质量与分离小分子时类似。

检测 肽与蛋白质的检测通常在 210~220nm 和/或 280nm。混合 0.12% TFA 的水溶液(A 溶剂)和 0.10% TFA 的 ACN 溶液(B 溶剂)可降低整个梯度洗脱过程中由于吸收度变化引起的漂移(见 8.5.3.1 节)。水和 ACN 中 TFA 的浓度将决定可用的检测波长(通常>210nm)。

图 11-8 所示为用表 11-4 的条件对肽进行分离的示例。重组人生长激素(rhGH)的胰蛋白水解液含有 21 种肽(图 11-8 列出了 20 个)。

在图 11-8*a* 的分离中(30min 梯度,2%B/min),仅出现了 18 个峰,说明应降低梯度变化速率。图 11-8*b* 的梯度时间增加至

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

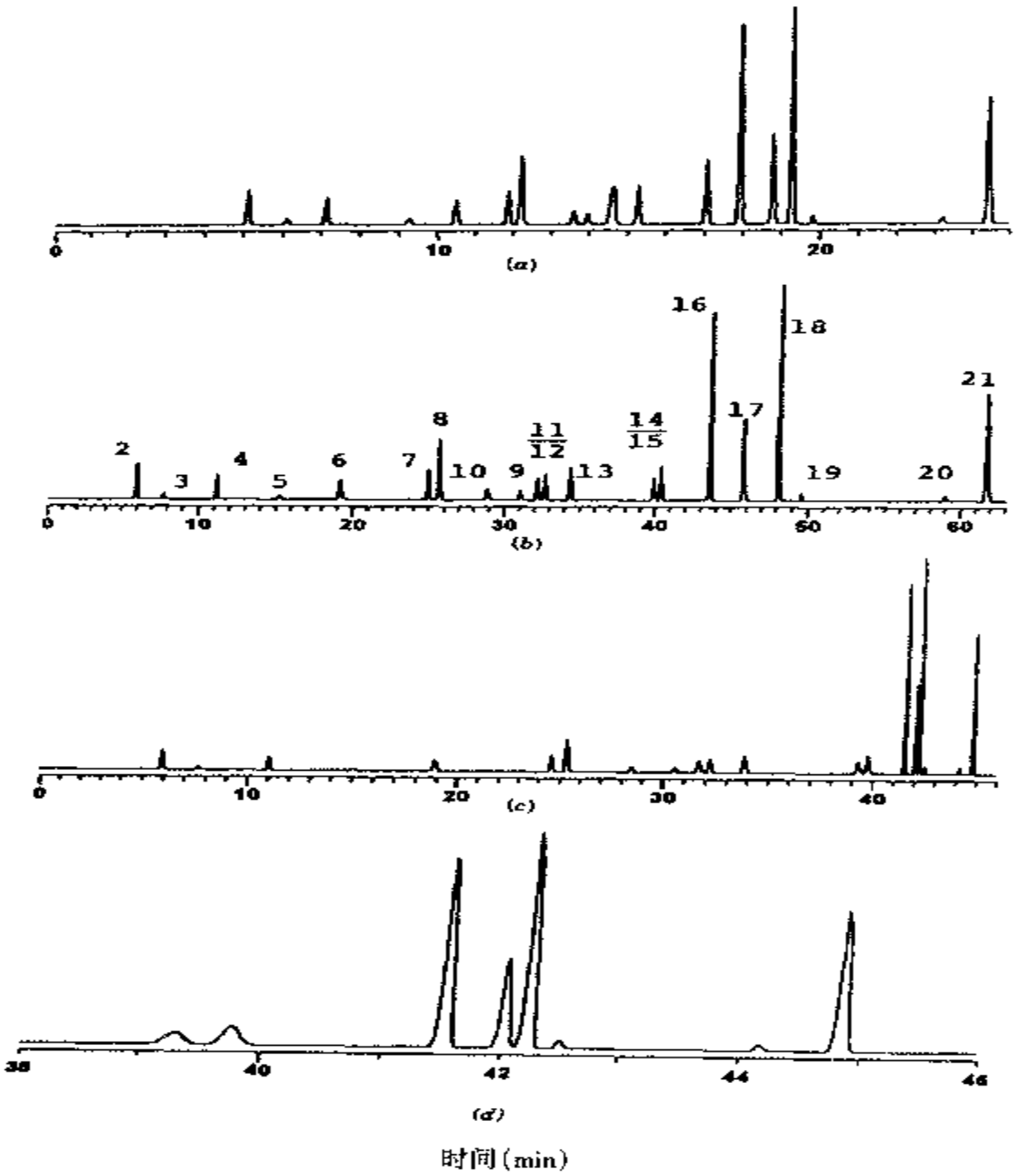


图 11－8　反相梯度分离 rhGH 胰蛋白酶水解液

条件：色谱柱，15×0.46cm，5μm Zorbax SB－C_8(30nm 孔径)；A 溶剂，0.1% TFA 水溶液；B 溶剂，0.1% TFA 乙腈溶液；40℃；1.0ml/min。(a)30min 梯度，0－60% B；(b)90min 梯度，0－60% B；(c)0/37/45min 梯度，0/25/60% B；(d)同(c)，但扩大了色谱图的后面部分。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

90min(0.67% B/min)，现在 20 个化合物均达到基线分离(最小的 $R_s = 1.6$)。因为最末峰在 60min 稍后才从柱中流出，所以梯度还可以再降低至 60min，0 – 40% B，除运行时间缩短外，色谱图基本没有改变。

如图 11 – 8 *b*，一旦达到足够分离，分段梯度(见 8.3.4 节)在某些情况下能进一步缩短运行时间且不损失分离度。图 11 – 8 *b* 中 40min 左右流出的峰之间还有宽余的空间，说明可在约 40min 处(最末关键峰对已离开色谱柱)开始使用变化速度较大的梯度。

用试 – 凑法试验得到的最终分段梯度分离见图 11 – 8 *c*，运行时间已缩短至 45min(0/37/45min 梯度，0: 25: 60% B)。尽管 40min 以后流出的谱峰显得分离不好，其实并非如此，见图 11 – 8 *d* 的放大色谱图(这些谱峰的 $R_s > 1.7$)。

11.2.1.2　用于改变选择性的参数　如果降低梯度变化速率(控制 k^*)不能使样品充分分离，则应考虑改变分离条件、柱塔板数(N)和选择性(α)。致力于生物样品的色谱工作者一般不先改变柱条件(N)，而是从改善谱峰间距(选择性)入手。表 11 – 5 总结了几种能用于改变选择性的条件，这些条件中有些对肽分离很有效，但不适合于蛋白质样品。改变梯度变化速度很方便，它是改变肽和蛋白质样品选择性的通用而有效的手段[31-41]。图 8 – 15 为肌红蛋

表 11 – 5　在 RPC 分离肽与蛋白中，改变选择性的条件
(以用途渐小的顺序排列)

肽[a]	蛋　白
梯度变化速率	梯度变化速率
温度	温度
键合相	键合相
pH	
TFA 浓度	
有效的离子对试剂	

[a] 包括小蛋白(分子量 < 10000Da)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

白胰蛋白水解物的分离，图中流速由 1.5 改为 0.5ml/min，梯度时间不变，相当于梯度变化速率改变了 3 倍（k^*变小，见式 11.1），可引起了峰间距的较大变化，如图 8－15*b* 所示。

改变温度也是改变肽和蛋白质样品谱峰间距的有效手段[36,41]。见图 11－9 中所示的图 11－8 中 rhGH 样品的分离，这里仅给出了图 11－8 中的几个重要峰（7～15）。改变温度，而其它条件保持恒定，谱峰间距发生了较大变化。图 11－9 实验的最佳分离温度为 40℃，使这些肽彼此之间达到部分分离。这类以温度改变选择性的示例在其它肽和蛋白质混合物的分离中也有报道[41,42]。

改变梯度变化速率与温度均能引起选择性变化，但它们之间没有联系[36,41]。在分离复杂化合物时，熟练地综合利用这些操作条件，对改变选择性极为有利。

改变梯度变化速率和/或温度的操作很方便（不用改变流动相与色谱柱），因此分离肽和蛋白质时应首先考虑将这些因素作为改善峰间距的手段。在低 pH 与高温下稳定的色谱柱（空间保护的烷基硅胶或聚合填料）较适于该方法（见 5.2.3.4 节）。温度如超过 40℃，先将流动相加热至柱温后再进样，可避免峰过度展宽。

如果综合改变梯度时间与温度后，样品分离还不够，下一步应试用不同类型的色谱柱。柱类型对选择性的影响见图 11－10 的示例。由疏水性强的长链 C_8 和 C_{18} 正构烷基键合相换成短链 C_3 和 CN 键合相，小肽的保留值将减小。最重要的是有效地改变了选择性。肽 L5（亮－亮－缬－酪）流出次序随键合相类型而发生了变化，它在长链键合相上于 L4 和 L6 之间流出，而用极性更强的 C_3 和 CN 键合相，则在 L7 与 L8 之间流出。

表 11－5 列出了改变选择性的其它手段。如果肽样品中含有不同数目的碱性氨基酸残基，改变 TFA 浓度可以有效地改变其谱峰间距。图 11－11 以几种合成肽的分离加以说明。TFA 浓度（0.02～0.8%）在图中的各色谱图上标出。据肽分子中的碱性氨

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

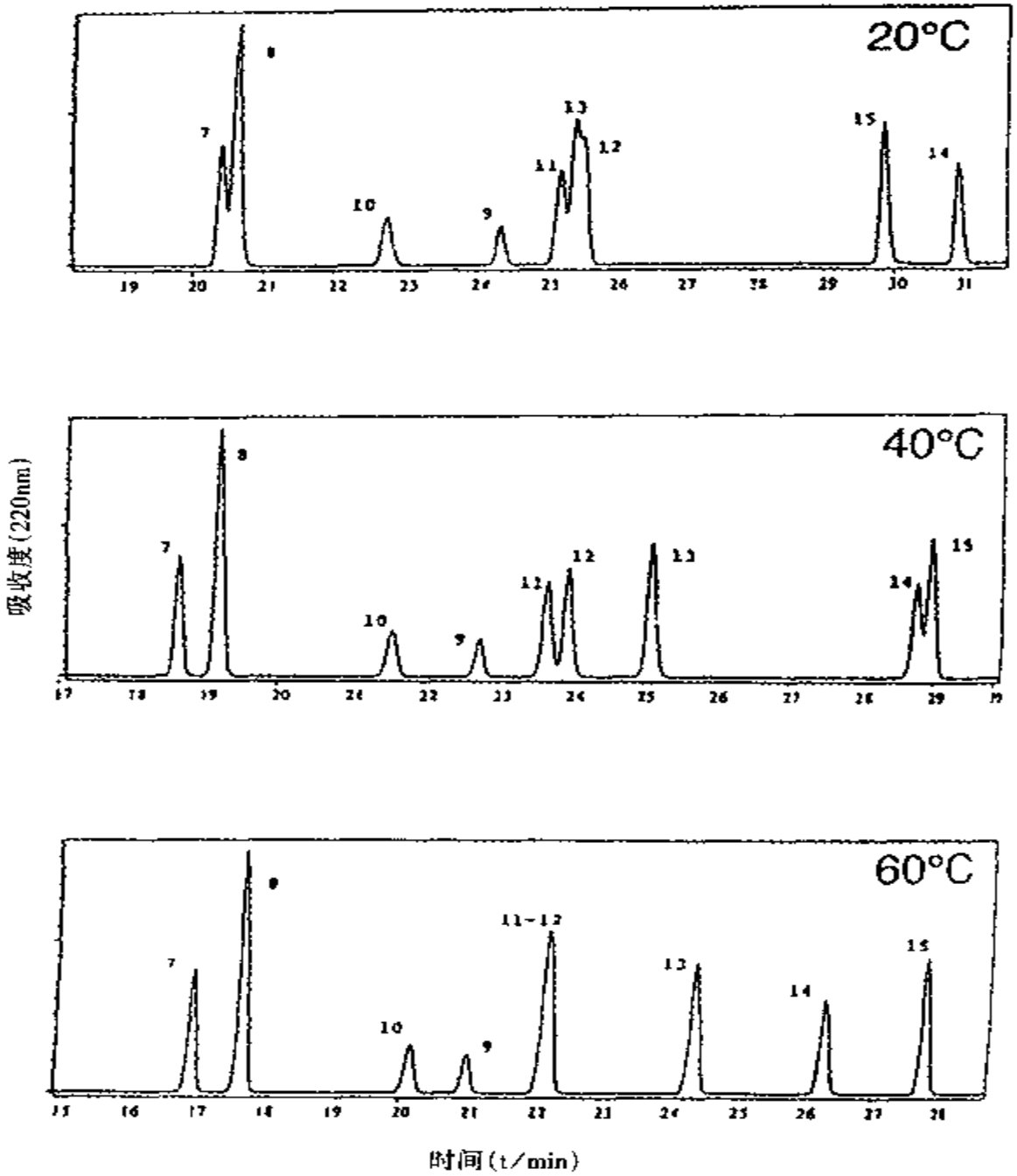
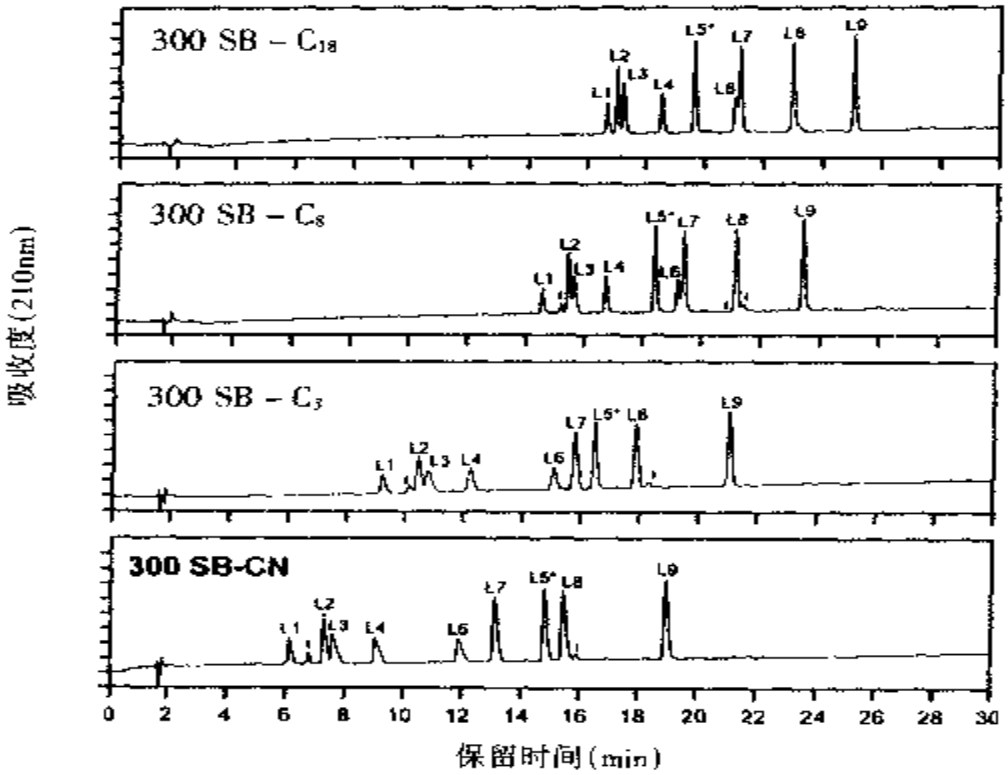


图 11－9　温度对 rhGH 胰蛋白酶水解液分离的影响

条件同图 11－8，但在所示温度下，60min 梯度，0→60% B。仅列举谱峰 7～15。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



L1 Leu-Gly-Leu
L2 Leu-His-Leu
L3 Leu-Arg-Leu
L4 Leu-Leu-Leu-NH_2
L5 Leu-Leu-Val-Tyr
L6 Leu-Leu-Leu
L7 Leu-Leu-Phe-NH_2
L8 Leu-Leu-Phe
L9 Leu-Leu-Val-Phe

图 11－10　用不同的键合相色谱柱，以梯度 RPC 分离九种肽的混合物样品[43]

条件：色谱柱，15×0.46cm，5μm Zorbax SB(30Å 孔径)，用图中标示键合相(氰基、C_3、C_8、C_{18})；30min 梯度，0→36% B；A 溶剂，0.1% TFA－水；B 溶剂，0.1% TFA－ACN；1.0ml/min；40℃。

基酸残基数目进行编号。在低 pH 的流动相中(表11－4)，这些碱性氨基酸基团将被质子化，肽的各碱基上带正电。当 TFA 浓度增加，色谱柱吸收的 TFA 也增加，柱上的负电增大(见7.4.1节)。使碱性肽的保留值增加，尤其是那些带大量碱性氨基酸残基的肽保留值增加较大。最佳分离的 TFA 浓度为0.05%，可使所有5种肽完全分离。TFA 为相当弱的离子对试剂，如用五氟丙酸和七氟丁酸

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

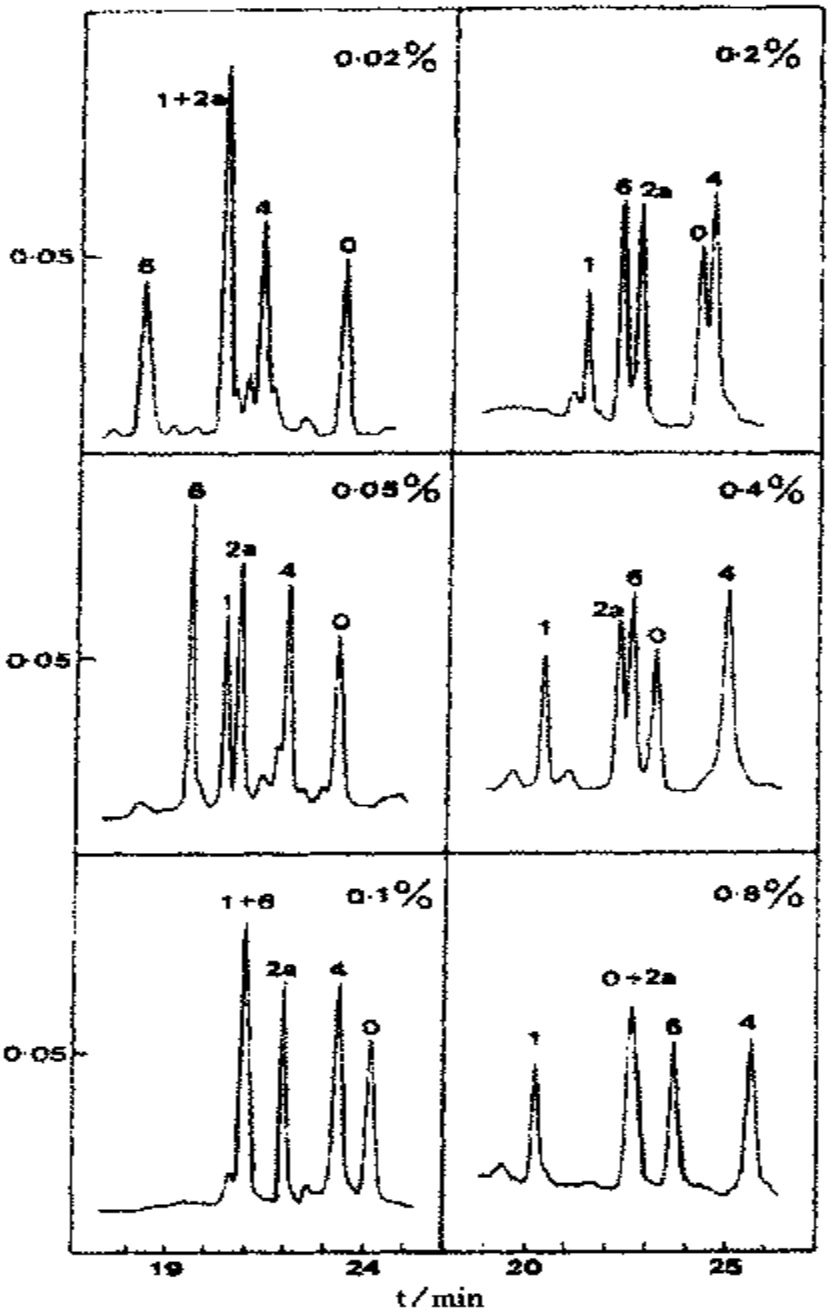


图11－11　TFA 浓度对碱性肽分离的影响[44]

条件：色谱柱，25×0.46cm SynchroPak C_{18}；A 溶剂，水＋%TFA（见图）；B 溶剂，乙腈＋%TFA（见图）；从0% B 梯度开始，1%/min；26℃；1.0ml/min。样品：含有4～10种氨基酸的肽；每一谱峰的标号代表肽中碱性氨基酸的数目（等于该条件下肽上的的正电荷数）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

[44]或各种烷基磺酸盐，对选择性的影响会更大（见7.4.1.3节）。

改变 pH 也有可能改变谱峰间距。大分子蛋白质在流动相 pH> 2 时，一般可能分离不好，而肽在 2 <pH <8 范围之间可被有效分离。高 pH 时，由于羧基的质子化作用，酸性强的比酸性弱的肽保留值大（见 7.2.1 节）。高 pH 操作需用在 pH> 6 稳定的色谱柱（见下节）。

11.2.1.3 常见问题与解决方案 除了需要改善分离选择性外，在方法建立过程中，还可能出现其它问题，其中一些问题与可能的原因在表 11－6 中列出。色谱柱性能"差"（表 11－6 的 B1）可导致谱峰展宽和/或变形（见表 11－5 的 A1）。用于分离肽和蛋白的酸性 RPC 柱能对碱性基团取代的化合物产生不良的硅羟基效应（见 5.2.1.1 和 7.3.3.2 节）。因此，分离肽和蛋白样品最好用非酸性色谱柱（见表 5－4）。

表 11－6 反相分离肽与蛋白中的问题与可能的原因

问 题：
A1.宽、拖尾、或变形峰
A2.低回收率
A3.假峰
A4.单一化合物出多个谱峰
A5.色谱柱性能随时间发生改变；保留时间不能重现
可能的原因
B1."坏"色谱柱：酸性硅胶，疏水性太强，孔径太小，柱不稳定
B2.样品有部分发生变性
B3.脯氨酸的缓慢异构化（顺式→反式）

宽和/或变形的谱峰也可能由色谱柱的疏水性和孔径不适引起。某些蛋白质能与 C_{18} 固定相牢固结合，这种情况下采用疏水性弱的短链键合相（如 C_3、氰基）可能会更好。孔径仅比样品分子的流体动力学直径稍大的色谱柱填料也可能因为扩散受到限制，造成谱峰展宽和拖尾[17,18]。这说明分离大分子蛋白质需用大孔径填

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

料(见 11.2.1 节和文献[45])。

样品的部分变性(表 11－6[4]的 B2)也会导致表 11－6 的 A1～A4 问题。反相条件下,大多数蛋白质由于低 pH、有机溶剂存在、温度高于室温与疏水键合相(表 11－4 的条件)等综合原因发生变性。然而,有些蛋白质在初始分离条件下,不会完全变性。这些化合物可能以两种或以上互变的形态存在,它们通过色谱柱的保留速度不同,导致谱峰展宽、变形、甚至出现单一蛋白有多个峰的现象(表 11－6 的 A4)。部分变性也易使蛋白在柱上聚集,造成被洗脱蛋白的回收率低(表 11－6 的 A2)和鬼峰(表 11－6 的 A3;在下次运行中虽未注入蛋白,也出现蛋白质谱峰)。

利于蛋白质样品完全变性和尽可能降低表 11－6 中 A1～A4 问题的条件有:

1. 低 pH 分离;0.1% TFA 适用于大多数样品;10～25mM 磷酸对疏水性强的蛋白质有利。

2. 以乙腈作有机溶剂;丙醇可能对疏水性强的蛋白有利。

3. 柱温 50～80℃。

4. 将样品溶于 6M 尿素或盐酸胍中(只可在室温)进行预处理。

5. 用疏水性更强的键合相(长链与短链烷基键合相)

6. 加两性表面活性剂,分离大分子和/或疏水性强的蛋白质(阴离子表面活性剂如 SDS 经常引起回收率低与峰形差等问题)。

脯氨酸的异构化(表 11－6 的 B3)主要在肽分离中见到[14,15],使肽谱峰分裂为两个重叠峰。假如分离不理想,可升高柱温至 50℃或更高,使其在柱上快速异构化并以单一峰流出。

柱效一般由于柱不稳定会随时间发生变化(表 11－6 的 A5),尤其是在低或高 pH(3>pH>7)时使用。一般进样 50 次或更少,谱峰即变宽,分离度变差。当发现此类问题时,通常建议更换不同的色谱柱。聚合色谱柱填料与高度键合(聚合物涂层)的硅胶、氧化铝

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

或氧化锆柱对极端 pH 条件较稳定(尤其是 Al 和 Zr 柱),但由于柱效不高,主要用于制备分离。对于分析应用,烷基硅胶填料较好,对预期的分离条件稳定。低 pH 下操作,空间保护填料最佳(见 5.2.3.1 节)。高 pH 下操作,推荐用封尾完全的 C_8 或 C_{18} 柱,有机或硼酸缓冲液(Tris, 枸橼酸盐)对柱填料的危害不大[25a,46]。新硅胶基质色谱柱在低 pH 使用时,键合相流失通常是柱效变化(如保留时间缩短,基线波动)的原因,用户往往以为是色谱柱用前平衡不足的缘故,有时用流动相冲洗数小时。实际上,条件适宜、稳定的色谱柱仅需很短的平衡时间即可(用最强的溶剂需 15 ~ 20 倍的柱体积);空间保护柱填料在此方面尤其有效。色谱柱如果使用(1)低温操作,(2)离子强度低的流动相,(3)有机或硼酸缓冲液时(见 5.2.3.4 节),在中等或高 pH 稳定性最佳。

11.2.2 离子交换 HPLC

就生物活性形态蛋白质的分离或纯化而言,IEC 适合于分离分子量>20,000Da 的蛋白质。不像 RPC 那样易使分子量大的蛋白质变性,这种分离模式能够保持其天然构象和生物活性。IEC 也可用于分析肽与蛋白混合物,与 RPC 相比,它们的保留机理与选择性均不同(见 7.5.1 节)。通常 IEC 分离复杂样品的能力稍弱于 RPC,但仍不失为一种高效分离技术。

与 RPC 相比,荷电不同的化合物用 IEC 分离效果更好。图 11 - 12*a* 所示为一蛋白质样品的分离(组蛋白异构体),样品中各组分的主要差异是各分子中的磷酸酯数目 X 与位置不同(X = + 1 ~ + 7)。这里大量的负电基团减少了样品分子上的正电荷,因而减小了其在阳离子交换分离中的保留值。除了磷酸酯取代作用外,该样品中的各组分对于 IEC 分离的相似性见图 11 - 12*b* 的色谱图。这里,磷酸酯基团已被酶解除去,样品用相同条件重新分离,仅分出两个大峰。

因为随流动相 pH 减小,溶质上增加的正电荷与固定相上的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

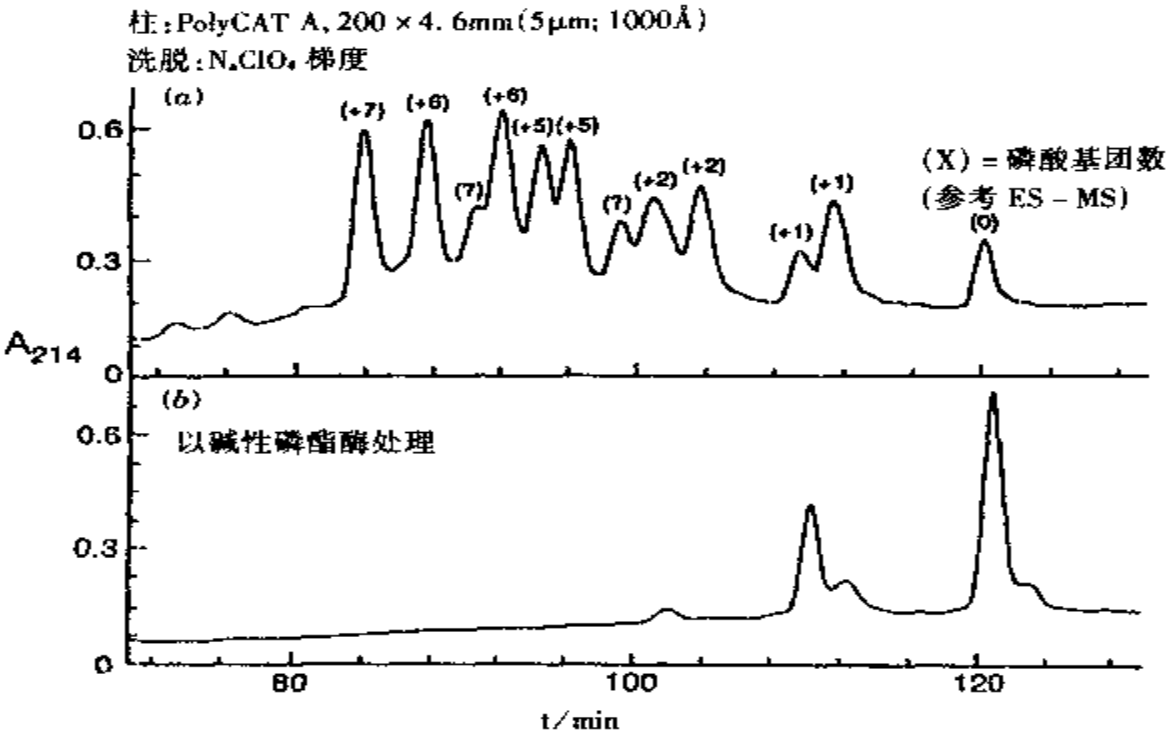


图 11－12　H_1 组蛋白异构体分离[47]

条件：色谱柱 PolyCAT A（弱阳离子交换剂）；150min 梯度，35→45% B；A 溶剂：10mM 磷酸钠；B 溶剂：A 溶剂，另加 1M 高氯酸钠。电喷雾 MS 鉴别图（*a*）中各峰。（*a*）原样品；（*b*）用碱性磷酸酯酶处理后的样品。

负电荷之间的吸引力增强，阳离子交换的保留值增加，阴离子交换的保留值随流动相 pH 的增加而增加。当 pH 与肽的 pI 值相等时，分子上的净电荷为零，其保留值则无论在阴离子交换色谱（AEC）还是阳离子交换色谱（CEC）上都最小。然而，由于整个分子荷电基团的分布不均而造成（大）蛋白分子仅有净电荷一面与固定相接触，因此，甚至在 pH＝pI 时，某些蛋白也会发生显著的 IEC 保留[48]。由于蛋白质分子中电荷分布的不均匀性（以及一些其它因素），有可能将带电相同的蛋白质分开，如图 11－12*a* 所示（带＋1，2，5 或 6 个磷酸酯的两种化合物得到分离了）。

在 pH3.0 时，多肽与蛋白质中的－COOH 不解离，而碱性残基（赖、组与精氨酸以及 *N* 末端）质子化带正电。这样，几乎所有的多

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

肽与蛋白质在 pH 3.0 时所带有的净电荷均为正，用盐梯度阳离子交换可使其保留并分离开。因此小肽的初始阳离子交换分离的推荐 pH 为 3，见图 11－13 肽标准混合物的分离示例。然而，因为低pH 促使蛋白变性，pH 低于 5 很少用于蛋白质 IEC 分离。

IEC 经常与 RPC 联合应用分离复杂混合物中的肽与蛋白质。图

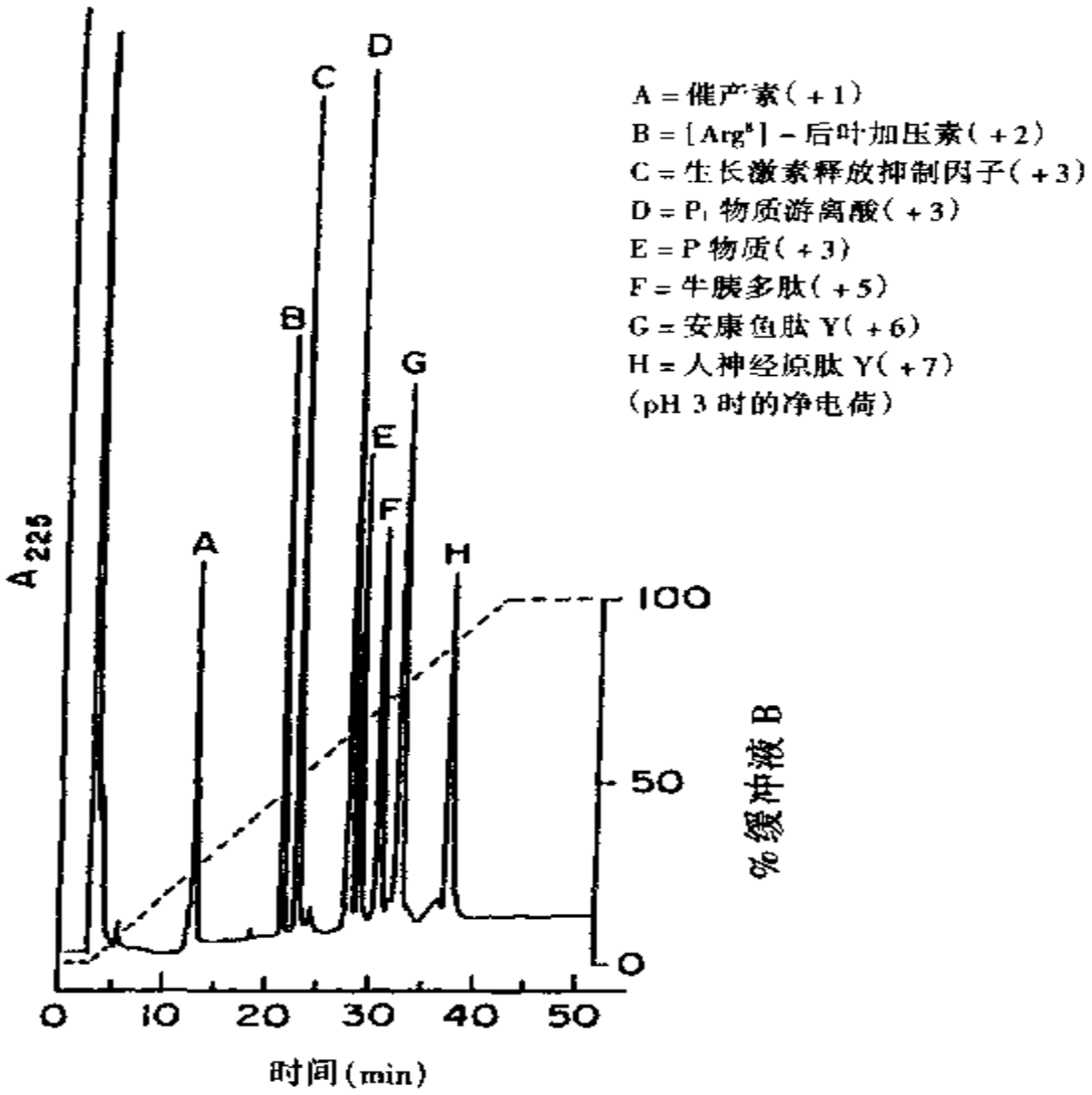


图 11－13　阳离子交换色谱分离肽标准品[49]

条件：20×0.46cm，5μm，聚磺乙基 A；40min 梯度，0→100% B；A 溶剂：5mM K_2HPO_4（pH 3.0）于 25% ACN－水中；B 溶剂：A 溶剂中另加 0.25M KCl；1.0ml/min；室温。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

11－14 以一组重组蛋白的二步分离为例对此加以说明。含有相关蛋白质的 RPC 馏分(图 11－14*a*)用 IEC 再分，目标蛋白组分与其它杂质可很好地分离(图 11－14*b*，箭头所指)。通常，最好先采用 IEC 模式，再用 RPC 进行分离。因为 IEC 的柱容量大，馏分能直接注入 RPC 系统。

11.2.2.1 初始分离的优先条件 表 11－7 总结了用 IEC 初始分离蛋白质的优先条件。如果不知道所测蛋白为酸性还是碱性，以 AEC 和 CEC 开始均可。如果在一种模式下样品不保留，用相反模式替换即可。

表 11－7 分析型离子交换 HPLC 分离酸性或碱性蛋白的较好初始条件

参数	条件	
	酸性蛋白[a](阴离子交换)	碱性蛋白[b](阳离子交换)
色谱柱[c]		
键合相	DEAE，SAX，PEI	CM，SP
尺寸	5～25×0.46cm	5～25×0.46cm
流动相		
A 溶剂	10mM Tris 或磷酸盐(pH 8)	10mM 双－tris 或磷酸盐(pH 6)
B 溶剂		同 A 溶剂，另加 0.5 M NaCl 或醋酸钠
梯度	30min 梯度，0→100% B	
温度	35℃	
流速	1.0ml/min	
进样量		
体积	10～50μL	
重量	1～100μg	

[a] DEAE，二乙氨乙基；SAX，强阴离子交换(季铵)；PEI，聚乙烯亚胺。
[b] CM，羧甲基；SP，硫丙基。
[c] 粒度与孔径，见表 11－4 的 RPC 条件。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

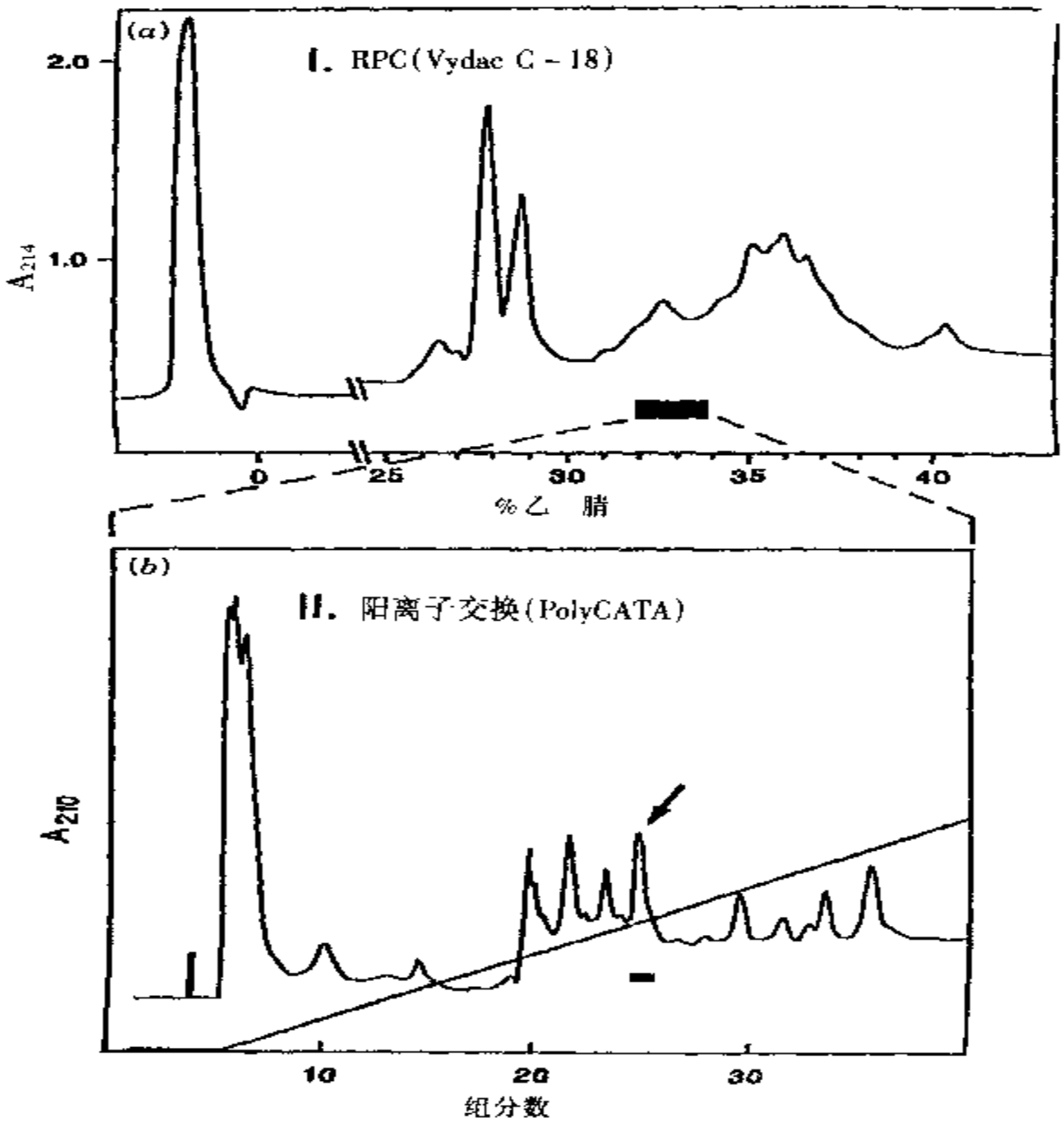


图 11－14 两步纯化蛋白质[50]

从初始 RPC 分离(a)的生物活性部分用 CEC(b)进一步分离。(b)中箭头所指为活性组分。条件(a)：色谱柱，25×0.22cm Vydac C_{18}；乙腈－水（TFA）梯度；1.0mL/min。条件(b)：色谱柱，20×0.46cm PolyCAT A(WCX)；40min 梯度，0→100% B；A 溶剂，25mM 磷酸钠(pH6.0)，另加 10% 乙腈；B 溶剂，500mM 磷酸钠(pH 7.0)，另加 10% 乙腈；1.0ml/min。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

盐 应用 NaCl 可在短波长如 220nm 检测，但 pH<5 时，HPLC 系统必须每天进行冲洗，以防腐蚀。醋酸钠无腐蚀性，但检测波长必须在 230nm 以上（损失灵敏度）。硫酸钠或磷酸钠也可用；二者均透明无腐蚀。磷酸钠有较强的置换作用，可在低浓度（0.05～0.1M）下使用（见 7.5.1.2 节），不同种类盐可用于改变选择性（见 11.2.2.2）。

有机溶剂 某些情况下，需在 A 或 B 溶剂中加入有机溶剂。样品聚集或使用疏水色谱柱填料能引起某些样品的峰形展宽和变形（见 11.2.2.3 节）。若甲醇或乙腈与柱填料兼容，仅在流动相中加入 10% 即能消除这种影响。高浓度的有机溶剂会破坏生物活

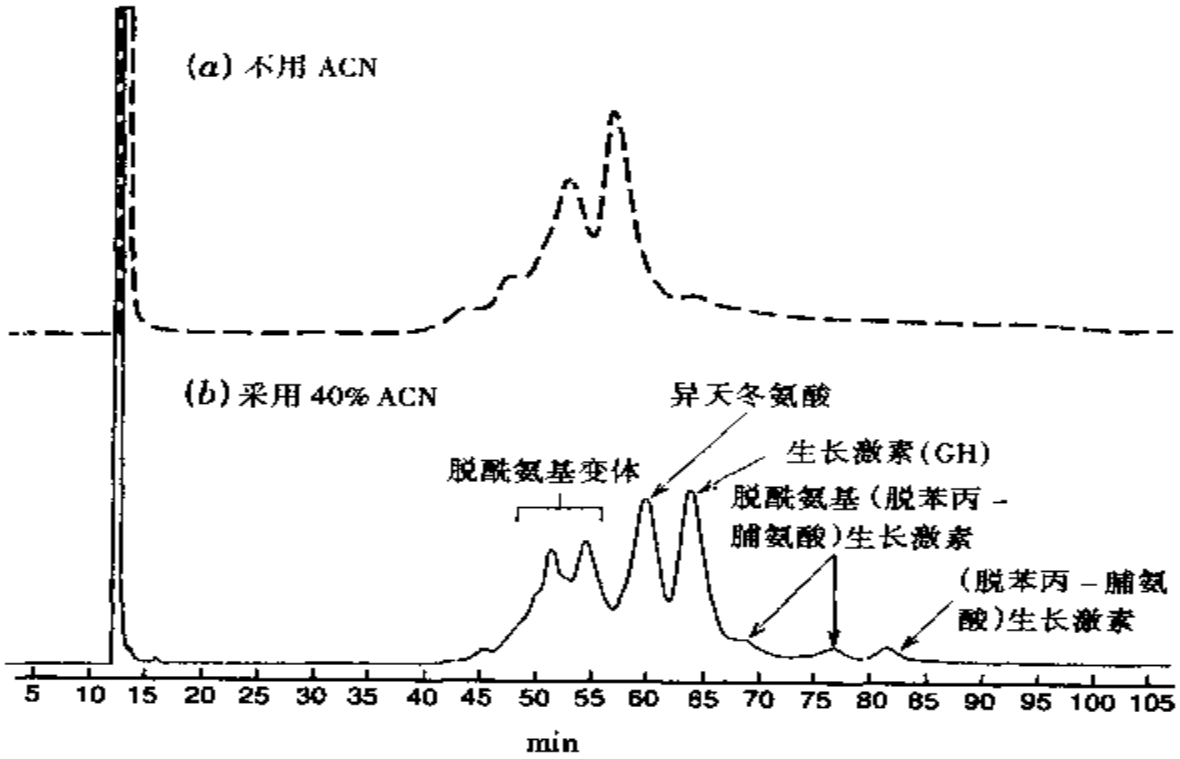


图 11－15 有机溶剂对阳离子交换分离热应力重组人生长激素(rhGH)的影响。

(a) 0/60/70 min 梯度，90: 96: 96% B，无有机溶剂；(b) 0/72/91 min 梯度，48: 54: 54% B，A 与 B 溶剂中均加 40% ACN。其它条件：色谱柱 40×0.46cm，1000－Å 孔径，PolyCAT A；A 溶剂，10mM 醋酸铵；pH 4.0；B 溶剂，同 A 溶剂，另加 250mM 醋酸铵；流速：0.5ml/min；30℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

性，但组蛋白及许多重组蛋白可承受含有机溶剂 70% 以下的流动相（流动相除去后，生物活性即可恢复）。

有时分离目的可能是分析蛋白混合物或纯化蛋白序列，并不需要考虑生物活性。许多诸如此类的情况下，在梯度分析中 A 溶剂和 B 溶剂中可加 30～40% 丙醇或乙腈优化峰形。图 11－15 所示为分离放置较长时间的重组人生长激素（rHGH）样品中的变异物和降解产物，可说明加入有机溶剂的作用。用含 40% ACN（*b*）与无 ACN（*a*）的流动相分离，显而易见（*b*）分离得更好。天冬酰胺残基可转化为天冬氨酸与异天冬氨酸残基产生的脱酰胺产物（见图 11－3），由于在该 pH 下天冬氨酸与异天冬氨酸带负电的原因，在该阳离子交换柱上最先流出。

改善分离 如果在初始实验中样品即能保留，下一步则需如 8.3 节所述改变梯度条件（开始与结束的% B，梯度时间）。可通过

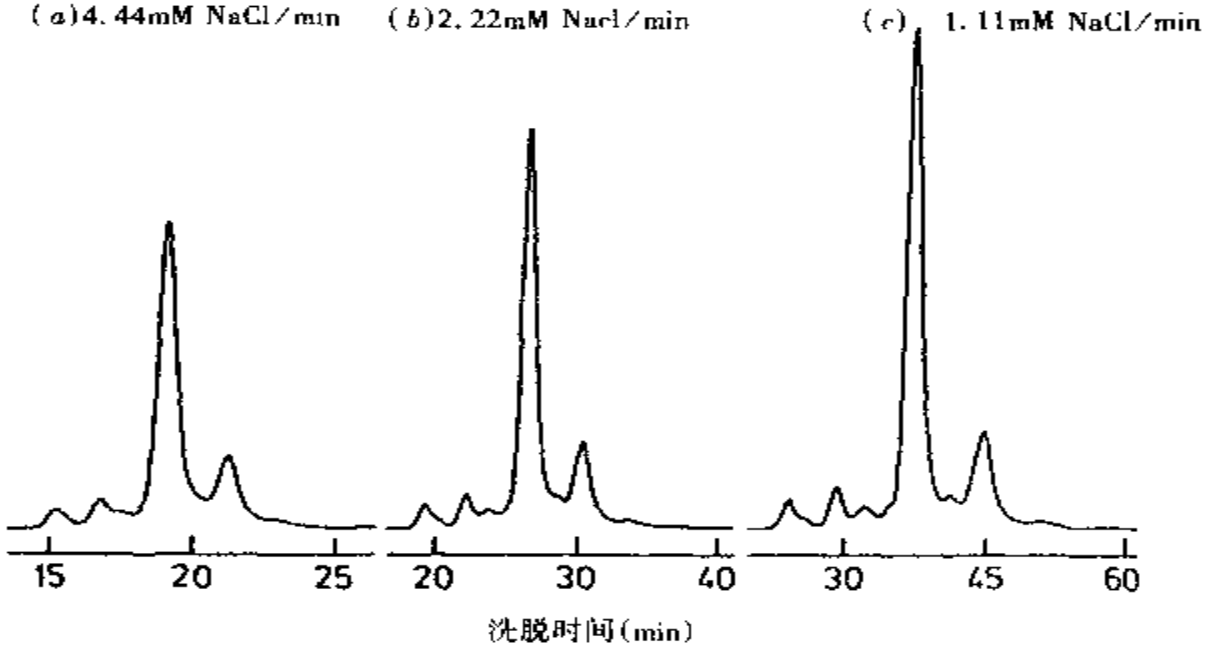


图 11－16 离子交换 HPLC 分离卵清蛋白粗品[51]

条件：15×0.6cm，5μm 阴离子交换色谱柱（TSK－GEL IEX－545 DEAE SIL）；A 溶剂：0.1M Tris－HCl 缓冲液，pH 7.5；B 溶剂：A 溶剂，另含 0.2M NaCl；梯度时间（*a*）45min；（*b*）90min；（*c*）180min 1.0ml/min，25℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

减小梯度变化速率(增加梯度时间)来改善分离度,如图 11－16 中分离卵清蛋白粗品所示。梯度变化速率由(*a*)4.44 减至(*c*)1.11 mM NaCl/min,分离度得到提高。然而,在 IEC 中应避免运行时间超过 1 小时,否则将导致回收率降低和/或对分离改善不大。

11.2.2.2　改变选择性的参数　IEC 分离蛋白质与 RPC 情况不同,改变梯度变化速度或温度对峰间距的影响不大。另一方面,改变 pH(图11－17*a*)或盐类型(图11－17*b*)却能有效改变选择性。

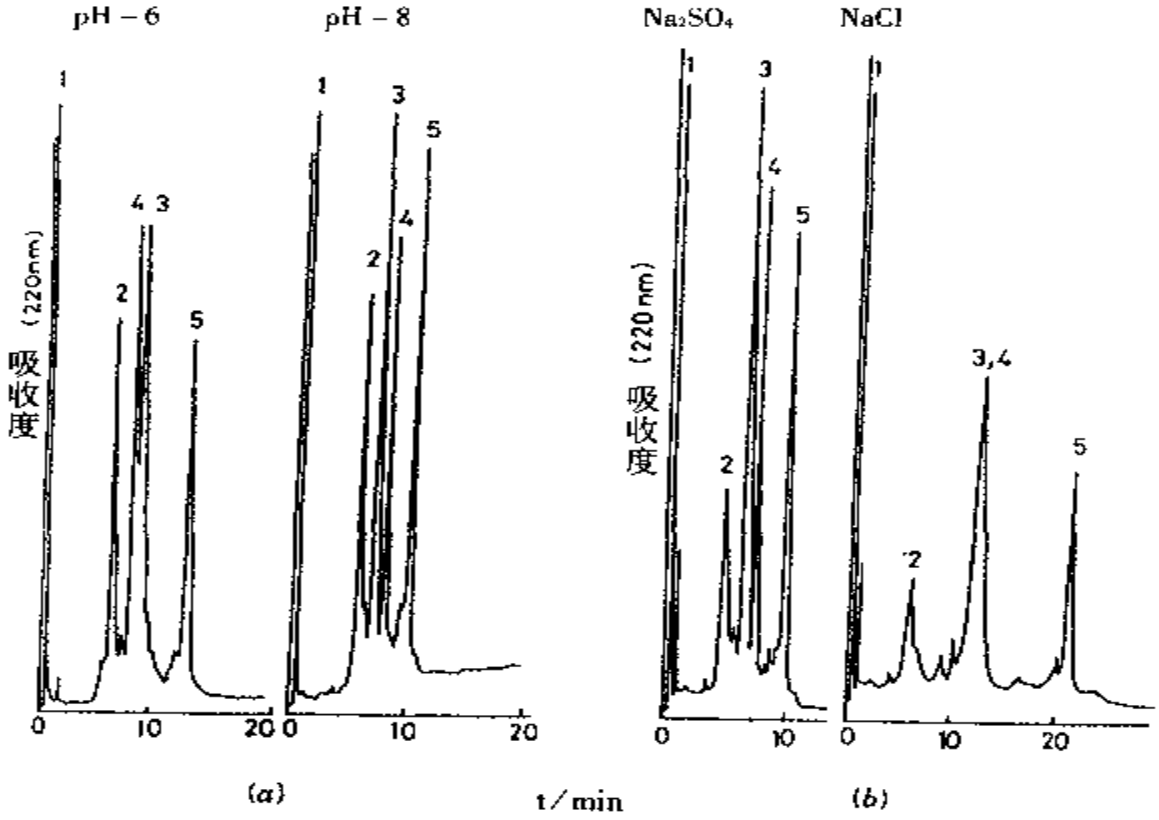


图 11－17　在阴离子交换分离中,pH 与盐种类对蛋白质样品峰间距的影响[52]

条件:5×0.4cm WAX－2 色谱柱(300Å 孔径,弱阴离子交换剂);20min 梯度,0→100% B,1.0ml/min。样品:1. 肌红蛋白;2. 铁传递蛋白;3. α_1－酸糖蛋白;4. α－乳清蛋白;5. 大豆胰蛋白酶抑制剂。(*a*)A 溶剂,0.02M 磷酸盐缓冲液;B 溶剂,0.5M 磷酸盐缓冲液。(*b*)A 溶剂,0.02M 磷酸盐缓冲液;B 溶剂,0.5M NaCl 或 Na_2SO_4。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepriint.cn

11.2.2.3　常见问题与解决方案　IEC 分离疏水蛋白和多肽时，有时回收率不高。增加盐浓度可减小离子交换保留，而过高的盐浓度将增加疏水保留（如图 6－27*c* 中的有关示例）。即蛋白保留可能首先减小，然后随分离进行又会增加，某些情况下导致峰拖尾及回收率不高。用亲水性强的 IEC 填料和/或在流动相中加 20% 的 ACN，用能减小疏水保留的盐梯度（如醋酸盐或盐酸盐）有助于改善峰形，提高回收率。

11.2.3　疏水作用色谱

大多数疏水作用色谱（HIC）的柱填料具有亲水涂层，用苯基、短烷基[53,54]，或烷基聚乙二醇基[55]取代的亲水涂层。保留类似于在蛋白质水溶液中增大盐浓度使蛋白析出的"盐析"过程。在 HIC 中随盐浓度增加保留值增加（与离子交换相反）；HIC 分离通常采用盐梯度（硫酸铵、枸橼酸铵或磷酸铵），分离期间盐浓度逐步减小。与 RPC 相似，疏水性强的蛋白优先保留，但与 RPC 不同的是，HIC 分离期间假如温度不超过 30℃，蛋白一般不会变性。HIC 在低温运行很正常，如 4℃ 的低温房间中，既保持生物活性又有利于分离。HIC 经常用于蛋白的分离与纯化，分析型 HIC 不常用。

11.2.3.1　HIC 分离的优选条件　用 HIC 开始梯度分离时，可用1支10～25×0.46cm 色谱柱，流速0.5～1.0ml/min（柱压会高于其它 HPLC 方法）。B 溶剂可用25mM 的磷酸钾水溶液；A 溶剂同 B 溶剂，只多加2.0mM 的硫酸铵。HIC 保留值受 pH 的影响小于 IEC，所以多数情况用 pH 6～8，以保持生物活性。从0→100% B 梯度运行 25～40min（室温），在210～280nm 进行 UV 检测。基线在220nm 检测时会抬高，在280nm 时则降低，在254nm 漂移不严重。由于试剂级的磷酸盐含有 UV 吸收杂质，梯度期间可能出现假峰。因此，HIC 中应使用 HPLC 级试剂。

如果样品保留太强，可使用弱疏水性色谱柱；强疏水性色谱柱则可用来增加保留值。在 HIC 中，长链键合相的保留值较大（如

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

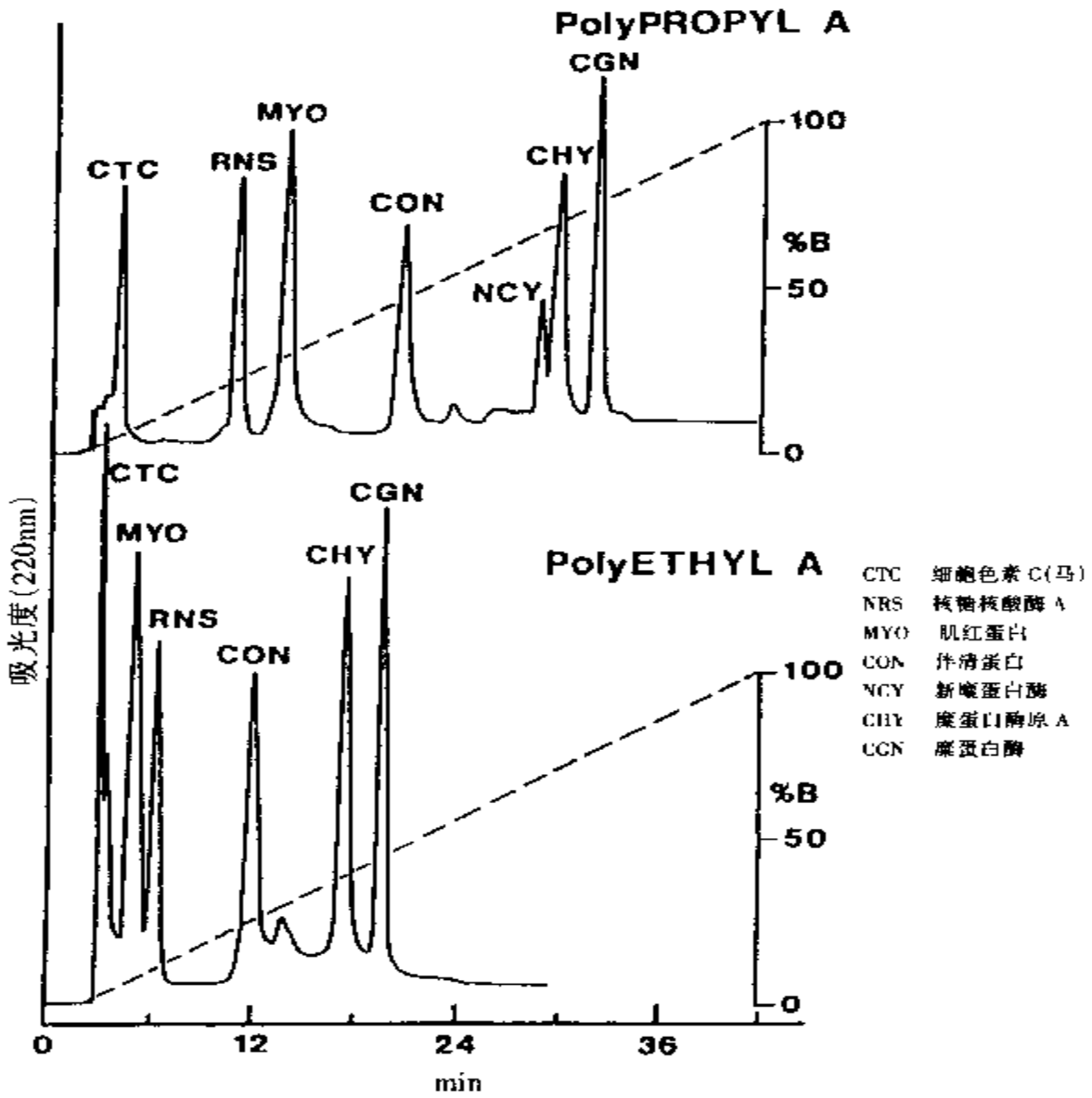


图 11－18　在疏水性不同的色谱柱上,HIC 分离蛋白标准品[54]

色谱柱:聚丙基 A 或聚乙基 A,5μm;4.6×200mm; A 缓冲液:18M(NH4)2SO4 + 0.1M K_3PO_4, pH7.0　B 缓冲液:0.1M K_3PO_4, pH7.0

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

丙基>乙基的保留值)，见图 11－18。应注意二峰分离选择性的差异［核糖核酸酶 A(RNS)与肌红蛋白(MYO)谱峰的位置发生了颠倒］，丙基或苯基的 HIC 色谱柱在蛋白质分离中用得较多。丁基或戊基填料能用于疏水性较弱的蛋白，羟丙基和甲基填料可用于疏水性强的蛋白质。

HIC 分离能通过改变梯度条件进行优化，见 8.3 节中的讨论。平缓梯度使分离度增加，开始时用低盐浓度(如 1M 替代 2M)，以后逐渐提高盐浓度(如 0.5 M 替代 0.0 M)，可减少运行时间。改变选择性可通过改变 pH、色谱柱类型、在流动相中加入 10% 的丙醇而实现。

11.3 低聚核苷酸的分离

低聚核苷酸(oligos)混合物的分离，其意义在于探讨合成的低聚核苷酸与核酸水解物之间的关系。将由固相合成的低聚核苷酸连接上疏水性极强的 4,4′－二甲氧三苯甲基(DMT)上，先制成三苯甲基衍生物。DMT 基团极强的疏水性 RPC 分离有助于分子量序列断裂的低聚核苷酸产物(不接 DMT 的)。这种借助于“三苯甲基”的 RPC 分离方法常用来纯化低聚核苷酸粗品。典型条件为：25×0.46cm、5～10μm、C_{18} 或聚合物柱；1～2mL/min，30min 梯度，0→40% ACN－缓冲液；常用的缓冲液为 0.1M 三乙胺(TEA)醋酸盐，pH7。然而应注意该(易挥发)流动相在 pH7 时的缓冲容量有限，建议再加 10～20mM 的磷酸盐或 tris(不挥发)，可使分离重现性更好。借助三苯甲基分离合成的低聚核苷酸粗品见图 11－19(29－链节)所示。有关三苯甲基 RPC 分离合成低聚核苷酸的详细情况，请参阅文献[56]。

其它低聚核苷酸样品(不连三苯甲基的合成低聚核苷酸、核酸水解物)也能用 HPLC 分析或纯化。然而，毛细管电泳(CE)在样品分析方面优于 HPLC，聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)可替代

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

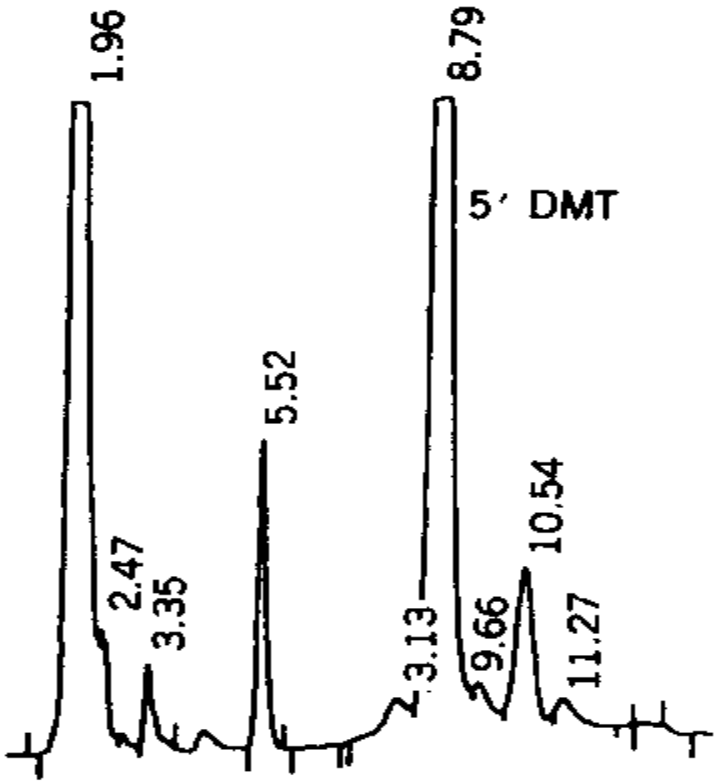


图 11－19　反相色谱分离低聚核苷酸(5′－DMT－d[GTGTTTTTTCGATCCATTTCTTAC])三苯甲基衍生物分离[56]

条件:30×0.78cm (Bondapak C_{18};0/10/15min 梯度,20/30/30% B;A 溶剂,0.1M 醋酸三乙胺,pH 7.0;B 溶剂,ACN;4ml/min。

HPLC 进行样品纯化,尤其是小量(微克至毫克)的纯化产品,这些就足够了。有人报道[57]采用小粒径无孔填料 HPLC 分离 30 个核苷酸以下的低聚核苷酸比用 CE 分离要好。HPLC 与 PAGE 相比有类似的优点[56]。因为目前 HPLC 已有这些替代方法,应用面更广,下面只对低聚核苷酸的 HPLC 作简略讨论。

低聚核苷酸混合物通常由分子中数目不等的(n 个)核苷酸的化合物组成,因此具体低聚核苷酸的归类由其单元数目 n 决定。合成低聚核苷酸的原料通常含有单体或几个单体聚合的不同序列断裂($n-1$, $n-2$ 等等)以及其它杂质。核酸水解物将含有一系列

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

单元链节不同的双株低聚核苷酸，但色谱图中相邻的低聚核苷酸通常有数个单元差异。低聚核苷酸样品的 HPLC 分离可以采用离子交换(IEC)或离子对 (IPC)模式。两种情况下的分离都依赖于分子中由形成低聚核苷酸骨架的磷酸酯基团所产生(图 11－4a)的负电荷。每个分子的总负电荷可用低聚核苷酸单元数目进行估计，IEC 和 IPC 的保留值均随分子上的负电荷而增加。因此，单元数目多的低聚核苷酸通常晚流出。由于不同核苷酸的保留值的微小差别，也可能有例外[58]：C<G<A≈T(IPC)，A<T≈C<G(弱 AEC)，C<A<T(强 AEC)。

11.3.1 离子对 HPLC

离子对 HPLC 梯度分离的典型条件是用反相色谱柱，ACN－缓冲液梯度洗脱。常用的缓冲液为 0.1M 醋酸三乙胺(TEAA)，pH 7.0，此处质子化的 TEA 作为离子对试剂。聚合物柱在流动相 pH>6 时比键合硅胶柱更稳定，因此应用较多。其它条件与表 11－4 中有关反相色谱分离肽的情况类似，只是更常用小的(<5μm)和/或无孔填料。对于 n>25 的低聚核苷酸，可用 100Å 孔径的填料；分子更大的低聚核苷酸，可用 300Å 孔径填料[59]。用这些条件进行初始分离后，需增加分离度时可采用较平缓的梯度洗脱，减小分离时间，也可提高梯度变化速度(见 8.3 节)。

低聚核苷酸样品的离子对分离有时可看作反相色谱。然而，如果不用 TEA 作“缓冲剂”，如此高度电离、亲水的溶质分子在 RPC 中的保留不足，质子化的三乙胺作为有效的离子对试剂能够将电离的低聚核苷酸很牢固地结合到柱填料上。图 11－20 所示为用小的、无孔聚合物柱填料，IPC 分离低聚核苷酸(12<n<30)混合物的示例[58]。n 多达 30 个单元的低聚核苷酸，彼此仅相差 1 个单元，能达到基线分离。

11.3.2 离子交换 HPLC

典型条件为：3～10×0.46cm 无孔 AEC 柱，粒径<5μm；在

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

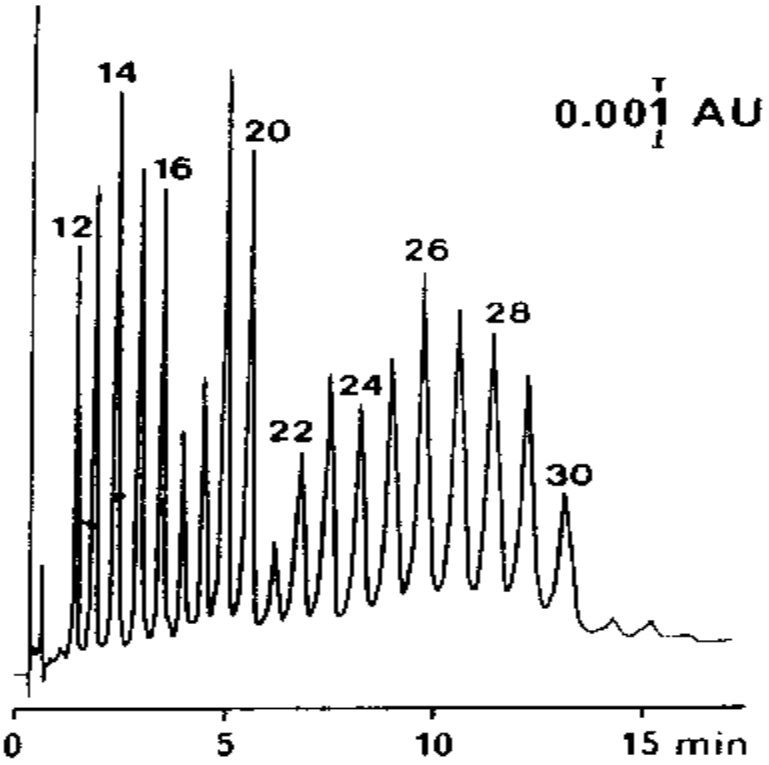


图 11－20　离子对 HPLC 分离聚 A 混合物(pd[A]12－30)[58]

条件：色谱柱，5×0.46cm，2.3μm 非多孔聚苯乙烯－DVB；0/3/23min 梯度，40: 60: 80% B；A 溶剂，0.1M 醋酸三乙胺；pH 7.0；B 溶剂，同 A 溶剂，另加 90% ACN；1ml/min；40℃。

30～60min 梯度，0→100% B；A 溶剂为 20mM Tris(7<pH<9)；B 溶剂同 A，另加 1M NaCl，1～2ml/min；>40℃。用这些条件进行初始分离后，如增加分离度时可用较平缓的梯度，为减少分离时间可提高梯度变化速度(见 8.3 节)。

图 11－21 为 IEC 分离低聚核苷酸样品的一些示例：(*a*)多聚－T 混合物(12<*n*<18)在 25℃ 和 60℃ 的分离；(*b*)48 链节低聚核苷酸的分离；(*c*)核酸水解物的分离。由图 11－21*a* 的示例中可清晰地看到高温操作的优势。除了在 60℃时 *N* 值更高外，高温还可减少分子间与分子内的碱基作用(11.1.1.2 节)。有关 HPLC 分离

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

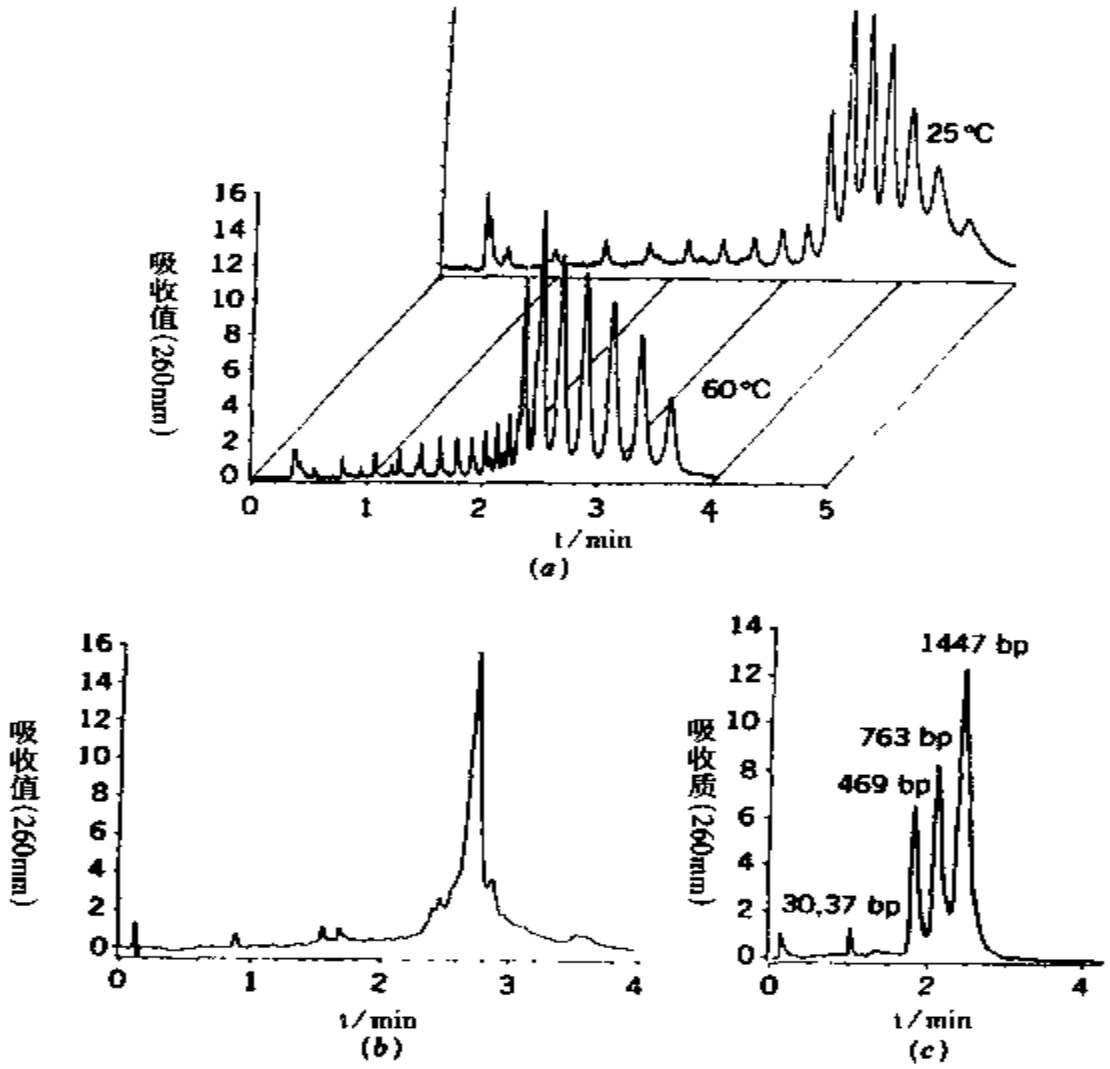


图 11－21　阴离子交换色谱分离不同低聚核苷酸样品[80]

色谱柱：3.3μm，无孔二乙氨基乙基聚苯乙烯，～DVB。(a)样品，聚 T 合成低聚物的混合物（p[dT]$_{12-18}$）；色谱柱：10×0.46cm；0/1.5/4.5min 梯度，5:30:45% B；A 溶剂，20mM tris－HCl 水液，pH 9.0；B 溶剂，同 A 溶剂，另加 1M NaCl；2.0ml/min；温度见图示；(b) 样品，48 链节合成低聚物；色谱柱，30×0.46cm；5min 梯度，10→90% B；A 溶剂，20mM tris－HCl 水溶液；B 溶剂，同 A 溶剂，另加 1M NaCl，pH 8.0；2.0ml/min；60℃；(c)样品，pGEM－3Z DNA 的水解液；色谱柱，30×0.46cm；0/0.5/5min 梯度，30:45:48% B；A 溶剂，20mM tris－HCl 水溶液中含有 1mM EDTA；B 溶剂，同 A 溶剂，另加 1M NaCl，pH 8.0；2.0ml/min；60℃。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

低聚核苷酸的深入讨论，可参阅文献 6, 8 和 56。

11.4 尺寸排阻色谱法

尺寸排阻色谱法(SEC)以水缓冲液为流动相，常被称作凝胶渗滤色谱法。SEC 广泛用于生物大分子，尤其是蛋白质的分离和表征鉴定。与本书中讨论的其它 HPLC 模式不同，这种分离模式要求吸附到固定相上的样品分子应尽可能少。这由于两个重要原因：(1)SEC 是使样品变性、回收率降低可能性最小的 HPLC 方法；(2)系统方法建立要比 RPC、JEC 或 HIC 都简单(或有很大不同)。鉴于这些原因，我们在本节中简单讨论 SEC，仅强调其通用性而非具体应用。详情可见文献 5, 8, 61 和 62。

11.4.1 SEC 保留的基础

图 11－22a 为样品分子大小和柱填料孔径对 SEC 保留的影响示意图。(a)图中填料的孔径以微粒基质(斜线阴影区域)间的空白区域表示。实心球分别表示两种不同的样品分子。较大的球形分子无法进入填料孔内，称作被填料排阻。而小分子则能够进入到网孔内，因此在流动相中需多停留一段时间，保留值较大。

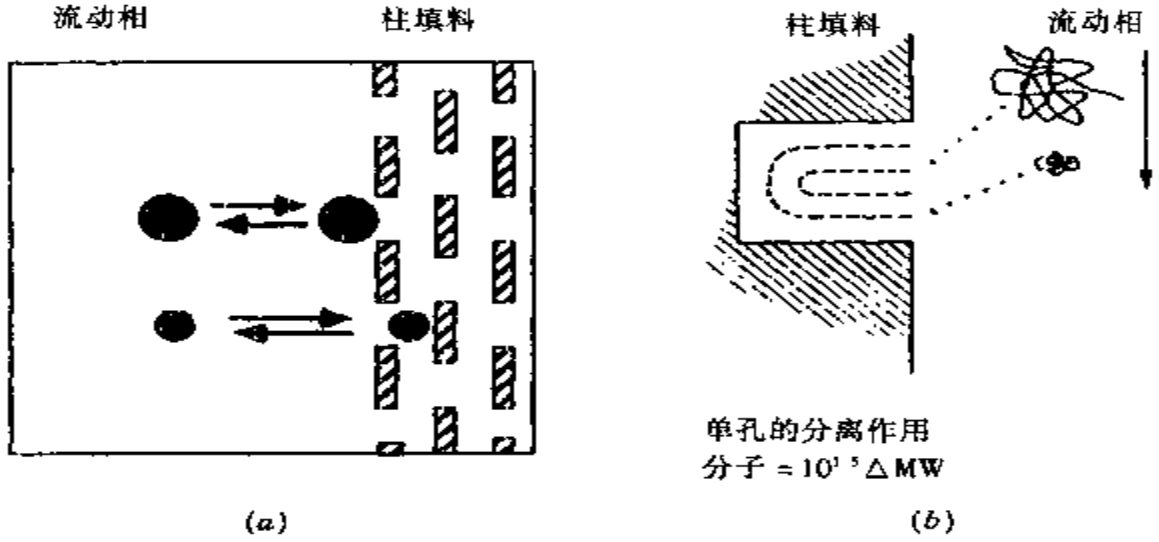


图 11－22 SEC 保留值与样品分子大小及孔径的关系

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

图 11－22*b* 为样品分子大小不同的 SEC 保留机理示意图。本例中，二分子均足够小，都能进入到填料孔中，但即使如此，由于小分子进出较多，保留倾向较大。样品分子在流动相与色谱柱填料之间的分配决定于能够进到两相中的有效分子中心的体积。在柱填料中的该体积越大，保留值就越大。小分子的中心能更贴近孔边缘，所以有效体积较大。图 11－22*b* 中的二分子的有效体积分别以微孔内部的虚线表示。小分子在固定相中有较大的有效体积，填料内部的这种分子相对较多，因此小分子比大分子晚流出色谱柱。

SEC 的分离决定于(1)与分子大小有关的保留值，(2)柱效与峰宽。如图 11－22 所示，保留值与分子的大小和柱填料的孔径有关。这一关系可用样品的对数分子量与保留时间或(更好是)保留体积作图表示。图 11－23a 所示为一假想的校正曲线。分子量大于某值(本图中约 10^5)的样品分子完全被排除于填料微孔之外，其保留体积 $V_R = V_0$(等于色谱柱内微粒间的体积)。而分子量小于某值(本图中约 10^3)的分子则可完全进入到微孔中(完全渗透)，保留体积$(V_0 + V_i) = V_m$。(*a*)下面的色谱图说明了这种关系。C 峰的保留体积为 V_0(完全排阻)，而且任何分子量大于 10^5 的化合物都将与 C 组分峰重叠在一起，(即排阻于填料之外的组分，不可能彼此分开)。同样，F 峰保留时间为$(V_0 + V_i)$，所有分子量小于 10^3 的化合物都将与 F 峰重叠。图 11－23*a* 中的 D 和 E 化合物具有不同的分子量和不同的保留体积，因而能根据分子大小被分离。在排阻与完全渗透之间的分子量范围(图 11－23*a* 中为 $10^3 \sim 10^5$)，可作为该色谱柱填料的分级范围。

建立 SEC 方法时，应选择分级范围能覆盖所有样品组分分子量的色谱柱。图 11－23*b* 给出了几种 SEC 色谱柱的分级范围(葡聚糖标准品作样品)。小孔填料(125Å)分级范围约为 $200 \sim 2 \times 10^4$，而大孔填料(1000Å)有约 10^5 至更大($\approx 10^7$)的范围。SEC 柱供货商一般提供所售色谱柱的校正曲线。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

图 11－23 c 和 d 所示为在两支孔径分别为 250Å 和 450Å 的色谱柱上，以数种蛋白为样品得到的校正曲线。空心圆为采用蛋白不变性的流动相的结果，实心圆为变性流动相的结果。得到的分级范围为：

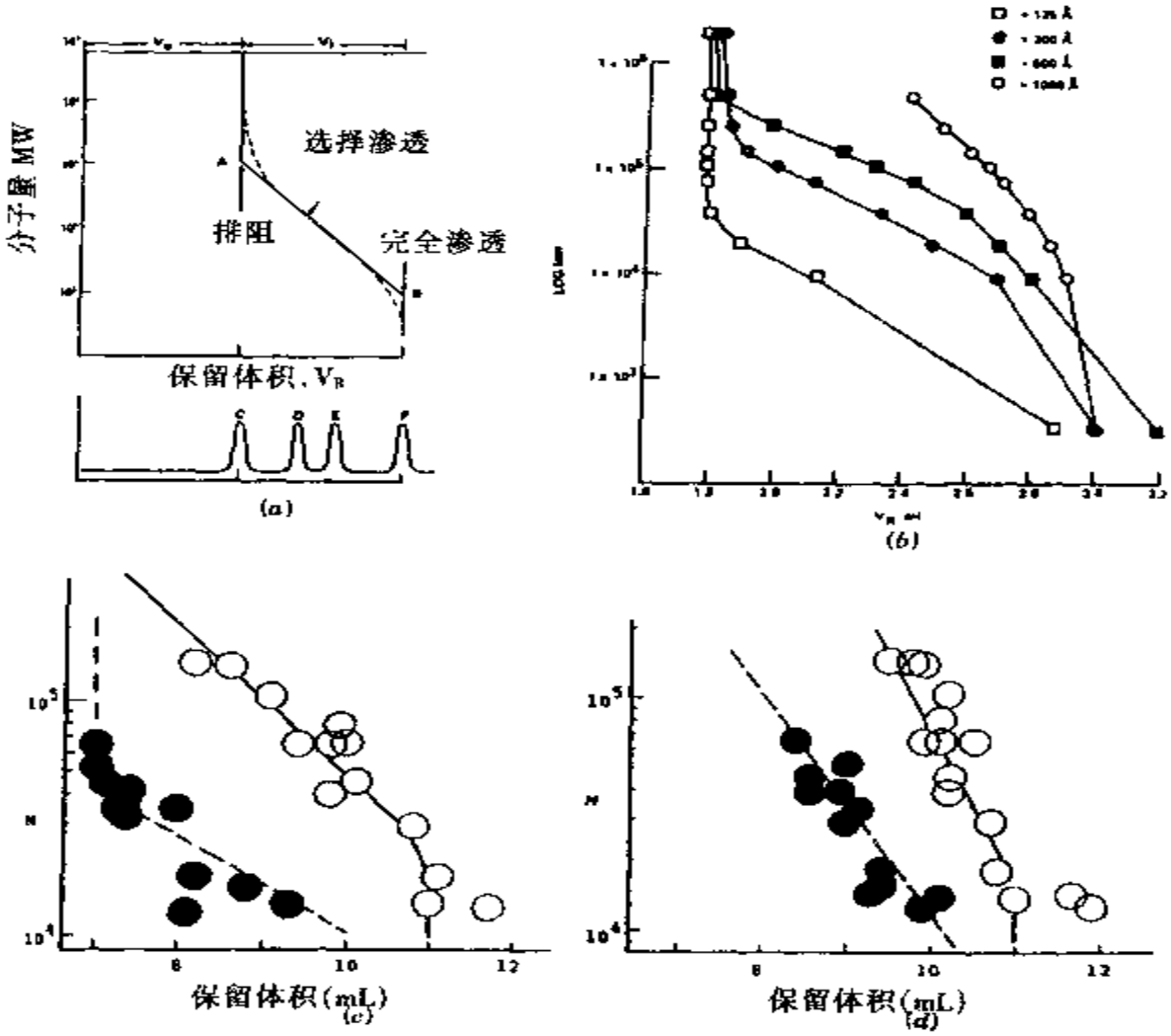


图 11－23　SEC 校正图[17]

(a) 样品对数分子量对保留体积图[62]；(b) 同 (a)，用不同孔径的葡聚糖标准品与 μ－Bondagel E 色谱柱（见图）[62]；(c) 同 (a)，球蛋白标准品与 25×0.94cm Zorbax GF－250 色谱柱；空心圆，非变性流动相为 200mM 硫酸铵水溶液，用磷酸调节 pH 至 8.1；实心圆，变性流动相为 6M 盐酸胍，另加 0.1M 磷酸钠，用磷酸调节 pH 至 6.8；[17] (d) 同 (c) 但用 Zorbax GF－450 色谱柱[17]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

色谱柱填料孔径(Å)	分级范围	
	非　变　性	变　　性
250(图 11－23*c*)	$3\times10^4\sim510^5$	$5\times10^3\sim4\times10^4$
450(图 11－23*d*)	$3\times10^4\sim2\times10^6$	$3\times10^3\sim2\times10^3$

在蛋白不变性条件下，分子量高达4百万道尔顿的蛋白质可以在孔径450Å 色谱柱上分离。但采用使蛋白变性的流动相(6M 盐酸胍)可使这些蛋白结构展开，增加了它们在 SEC 分离中的有效尺寸(溶质流体动力学直径)。从图11－23*c* 和 *d* 的曲线离散情况看，SEC 保留与分子量的关系的规律性不很好。除11.4.4节中讨论的"非理想"影响外，由 SEC 保留值推断的分子表观大小不仅与分子量有关，也与分子的形状有关。因此，由于葡聚糖分子的形状(线性)与天然蛋白质分子的形状(球形)不一样，葡聚糖标准品的校正曲线与天然蛋白(色谱柱相同)不同。有关保留值与分子形状的深入讨论，请参阅文献61和64。

图11－24所示为填料孔径对 SEC 分离四种分子量不同的蛋白混合物的影响。在小孔径 Sephacryl S－100HR 上分离时(*a*)，158－和440－kDa 蛋白在近 V_0处流出(排阻作用)，分离度不好。在大孔 S－500HR 填料上的分离时(*c*)，所有谱峰移向全渗透，三种大蛋白质的谱峰重叠在一起。而用中间孔径尺寸的填料 S－300HR 则使该样品很好地分离，甚至包括大分子量的杂质 I 也得以分离。

11.4.2　应用

SEC 被认为是一种分辨率不高的 HPLC 方法，因为色谱图中的所有谱峰必须落在一个狭窄的保留范围内[$V_0<V_R<(V_0+V_i)$]。在 SEC 分离中通常看不到五、六个以上的峰达到基线分离的情况。因而，SEC 用于分析复杂的生物样品不多，需用 IEC，尤其是 RPC 作日常分离。SEC 通常应用于下列领域：

1 预分离复杂样品，然后再使用高分辨率的 HPLC 方法(IEC、

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

HIC、RPC 等)分离或纯化蛋白质

2 分析纯化蛋白质样品,以确认二聚体、三聚体或其它聚合种类的存在

3 由校正曲线估计蛋白质的分子量,如图 11－23 *c* 和 *d*

图 11－25 *a* 所示为 SEC 预处理来分离相关蛋白的示例。样品为三种蛋白, F、HN 和 HN－。以 SEC 收集适宜的馏分,粗分需要的蛋白组分,然后再用 IEC、HIC 或 RPC 进一步纯化。

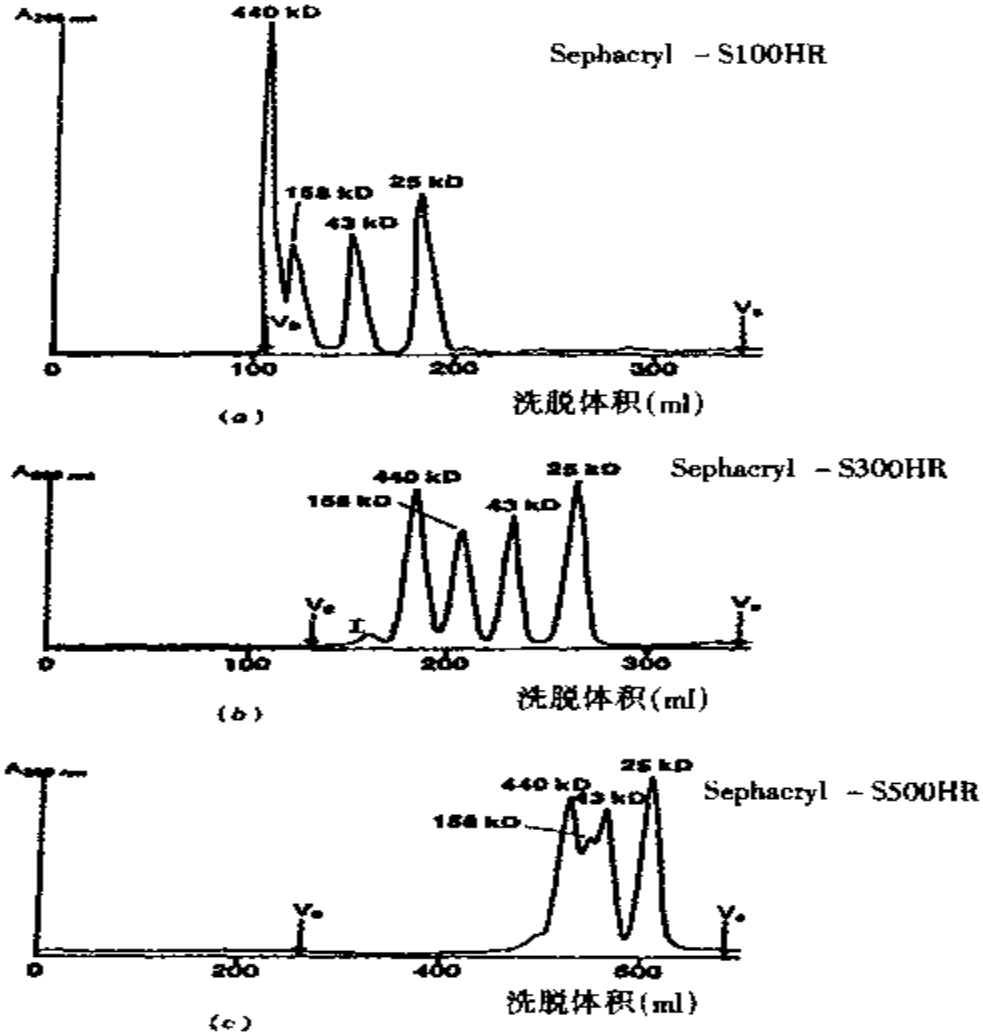
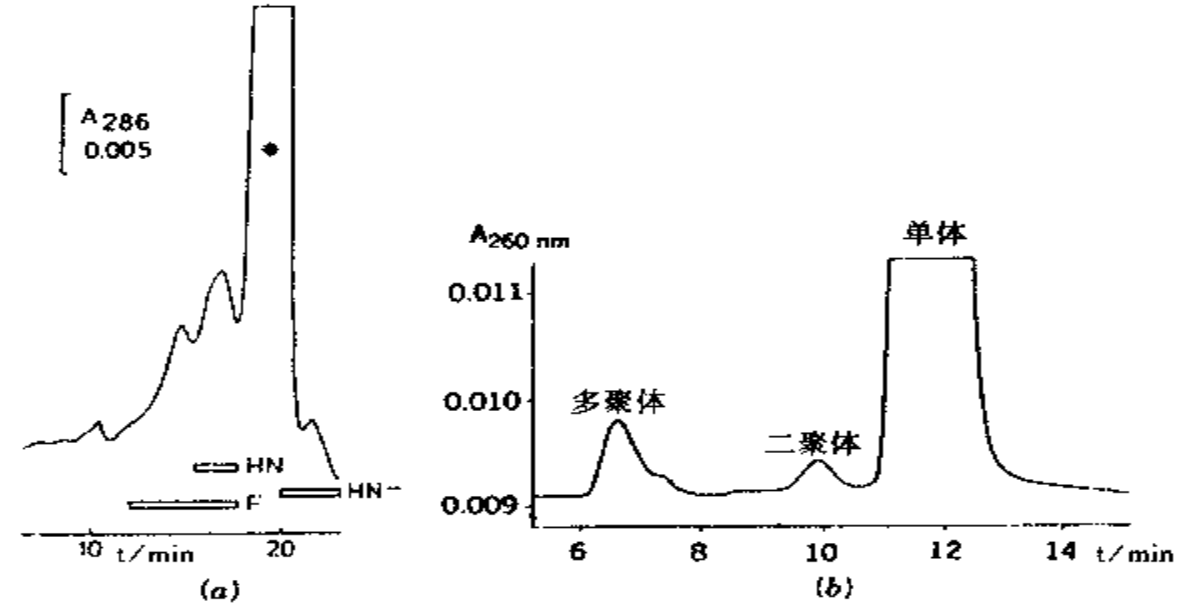


图 11－24　在孔径不同的色谱柱上,SEC 分离蛋白标准品[63]

样品为球形的混合物; 色谱柱, 65×2.6cm, 46μm; 50mM 磷酸盐, 另加 150mM NaCl,pH 7.0;室温。(a)－(c)所示,仅色谱柱不同。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn



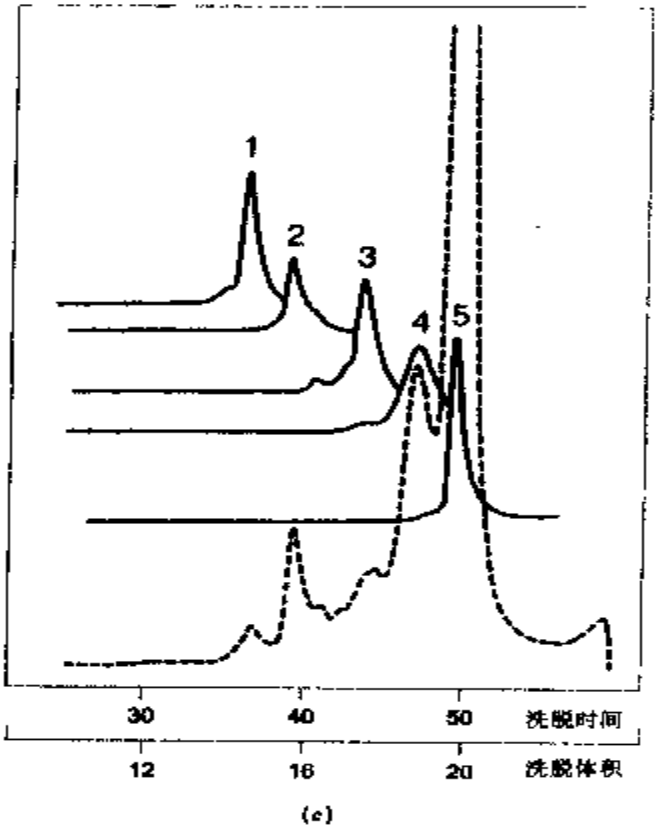


图11－25　不同样品的SEC分离

（*a*）Sendai 病毒的提取物[65]；条件：色谱柱，60×0.75cm TSK 4000SW；流动相，50mM 磷酸钠水溶液，pH6.8，加 100mM NaCl 与 0.1% Triton X－100；1.0ml/min；星号（*）峰为 Triton X－100；（*b*）重组人生长激素[66]；条件：色谱柱，30×1 cm Superdex 75HR 10/30；流动相，50mM 磷酸钠水溶液，加 100mM 硫酸钠，pH 7.3；1.0ml/min；室温。（*c*）人血清[67]：1. 人 IgM；2. 人 α－2 大球蛋白；3. 人 IgA；4. 人 IgG；5. 人血清白蛋白；虚线为总血清；条件：25×0.94cm Zorbax GF250 与 GF450 色谱柱串联使用；40mM 磷酸钠，另加 200mM 硫酸钠，pH 6.8；0.4ml/min，RI 检测。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

图 11－25*b* 所示为重组人生长激素（rhGH）降解产物的 SEC 分析。本例中，单元蛋白从二聚体及多聚体中很好分离出，可以估计蛋白质聚集的程度。图 11－25*c* 说明高分辨率分离人血清样品（虚线）和已知血中存在的几种蛋白的色谱图 1～5。本分离中至少有 6 种成分被部分分离。

11.4.3 SEC 分离的优选条件

SEC 方法建立包括下列选择：

- 色谱填料：孔径尺寸；键合硅胶与聚合物
- 流动相
- 色谱柱条件
- 色谱柱尺寸

孔径大小的选择前面已讨论过。如果开始时孔径尺寸选择不当，在首次分离中即可确认（如图11－24*a* 或 *c*）。键合相硅胶填料的粒径较小，其柱效比聚合物高得多。小尺寸的硅胶基质填料与类似的琼脂糖基质填料及聚合物填料相比，在高流速条件下物理稳定性更高，可减少样品的分析时间，硅胶基质填料是分析型 SEC 分离的首选。商品聚合物填料一般颗粒较大，用高 pH 流动相时更稳定，可能更适用于大规模的制备分离。由加锆稳定的硅胶制成的 SEC 填料（Zorbax GF－250，GF－450）也可使用高达 8.5 的 pH[23]。流动相的选择由两方面因素决定：1. 与蛋白样品兼容，2. 样品与柱填料相互作用小。11.4.4 全面讨论后一种因素。一般说来流动相由 0.1～0.2M 水缓冲液制得。最佳 pH 随色谱柱与样品不同面异，大多数分离可在 pH6～8 范围内进行。

色谱柱条件指：柱长，微粒大小和流速。一旦选定了满意的柱填料孔径，通过选择流动相组成使样品－填料间的相互作用减至最小，那么进一步改善 SEC 分离的唯一途径是增加色谱柱效 *N*（增加柱长，减小微粒尺寸，降低流速；见 2.3.3.2 节）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

SEC 色谱柱尺寸的选择与所限定的样品保留值范围有关($k<0$),这意味着其它因素相同时,峰窄于其它的 HPLC 模式。窄峰易于检测,但也更易受(不理想的)柱外谱峰展宽因素的影响。因此,分析型 SEC 色谱柱通常的内径为0.8~1.0cm,以增大所有峰的体积,尽量降低柱外效应。用内径0.8~1.0cm 的色谱柱,多数情况流速为0.5~2ml/min。直径大的色谱柱可用于大量样品的制备分离。

11.4.4 常见问题与解决方案

SEC 分离中最为严重的问题由样品与柱填料之间发生作用而引起。这些相互作用由硅胶基质填料中存有硅羟基或疏水样品-填料结合而产生。对 SEC 分离中硅羟基作用的影响见图 11-26 的说明。流动相 pH>5 时,硅羟基电离,柱填料带负电;在 SEC 分离的一般条件下 pH(6~8),这些电离的硅羟基能带来两种与电离样品分子的作用:静电排斥和 IEC 保留。当样品分子带负电荷,流动相中缓冲液浓度低时,发生静电排斥。因而,样品受带负电填料的孔穴的排斥。图 11-26*a* 所示为一假想的样品与填料之间无相互作用(排斥或吸引)的分离。如发生静电排斥,分离情况变为图 11-26*b*。样品组分靠近排阻位置被洗脱出,分离度较差。增大流动相离子强度可中和这种排斥作用,使分离得到改善。另外,降低 pH,即减少蛋白分子与色谱柱上的负电荷,也能降低静电排斥,协助解决图 11-26*b* 的问题。

如蛋白分子带正电,能通过离子交换保留于电离的硅羟基上。这一影响将导致较小蛋白流出较晚($k>0$),如图 11-26*c* 中所示。增加缓冲剂浓度和/或提高 pH,以减少蛋白质的正电荷,可减小离子交换保留。(*c*) 分离实际上比(*a*)好,当 SEC 中发生离子交换作用时情况常如此。最好还是避免这种作用。因为分离变得难以预测,后面的谱峰可能会严重拖尾,样品回收率也会受损。然而,利用蛋白吸引到带反电荷的色谱柱填料上设计的 IEC 柱,分离应更好。

因为样品与柱填料之间的疏水作用,图 11-26*c* 中的 SEC 分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

离也可发生。这种情况下，增加缓冲剂浓度将使后面谱峰流出更慢，加剧该过程。在流动相中加入 5 ~ 10% 丙醇可减小疏水作用。

11.4.5 蛋白折叠

由于得到重组蛋白已不再困难，近年来用 SEC 鉴别蛋白折叠模式与中间体的研究备受关注。图 11 - 27 所示为在平衡变性条件下，SEC 分离活性和变性溶菌酶的示例。SEC 分辨折叠与变性多肽以及（偶然）折叠中间体的能力，能够对蛋白溶液中每种组分的浓

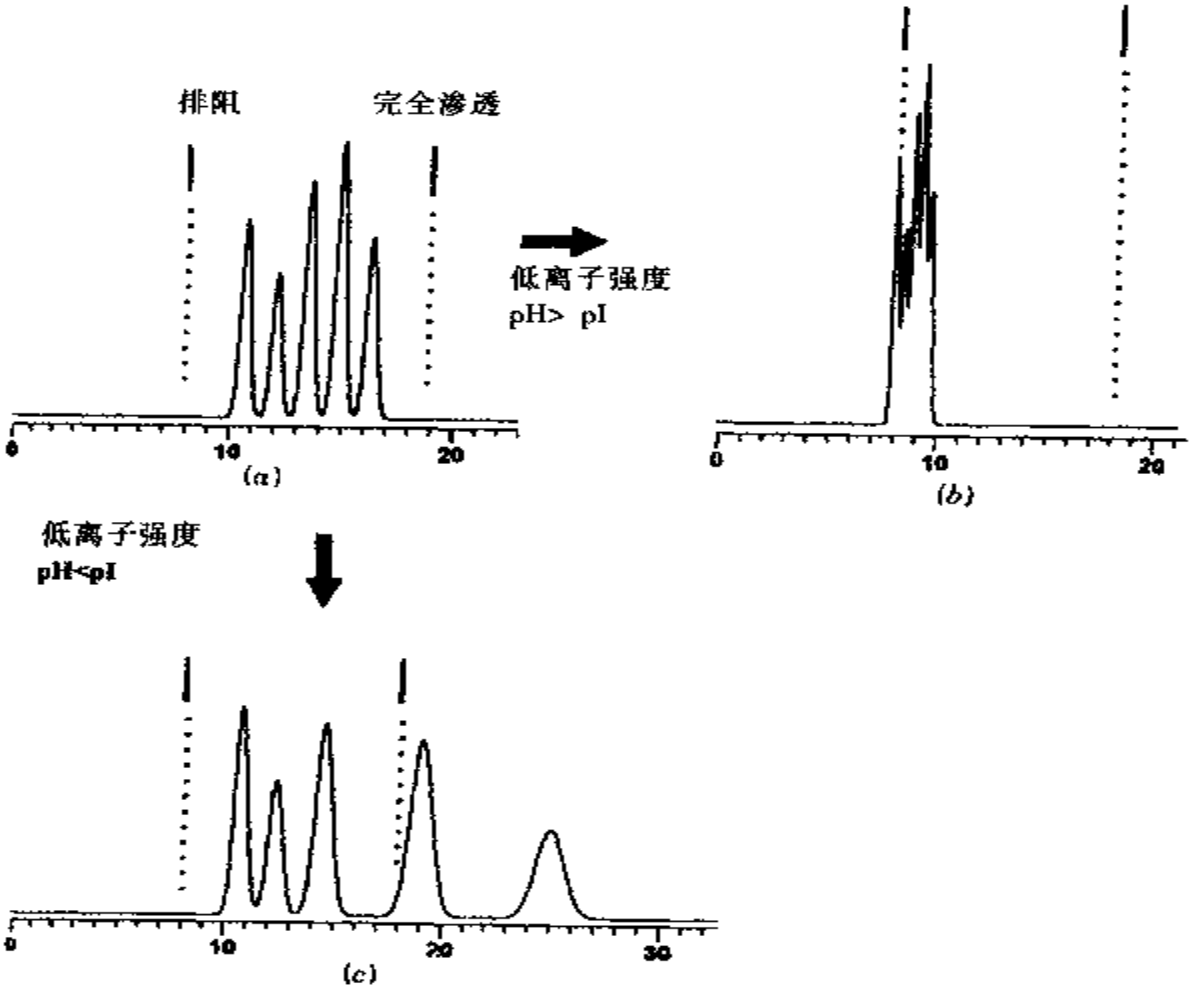


图 11 - 26 硅羟基作用对 SEC 分离的影响

（a）理想条件下的分离（无硅羟基效应）；（b）由于颗粒孔径使样品产生排阻分离；（c）由于硅羟基使样品产生离子交换保留的分离。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

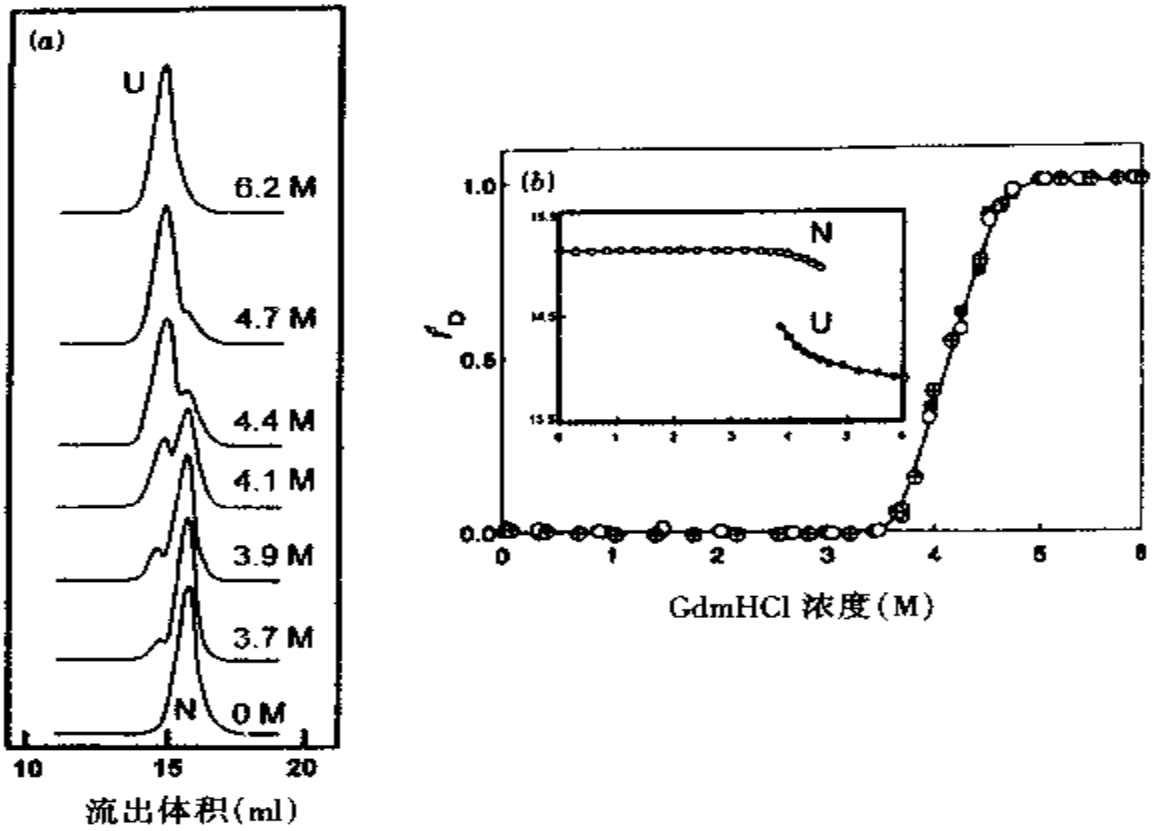


图 11－27　用 SEC 研究蛋白折叠[68]：
天然与变性溶菌酶与盐酸胍浓度的关系

(a)流动相中不同胍浓度(1～7mM)的色谱图；N 代表天然形式，U 代表伸展(变性)形式；(b)溶菌酶的变性分数与胍浓度的关系；(b 内插图)天然形式与伸展形式的溶菌酶的保留时间与胍浓度的关系。条件：色谱柱，30×1.6cm Superose 12；0.1M 磷酸盐缓冲液，另加盐酸胍；0.33ml/min；4℃。

度进行定量，进而计算链折叠的热力学和天然与重组蛋白的稳定性[68～70]。

参考文献

1. L. R. Snyder and M. A. Stadalius, *High－Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*, Vol. 4, C. Horvath, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1986, p. 195.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2. J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.*, 34 (1981) 167.
3. W. R. Melick – Adamyan, V. V. Barynin, A. A. Vagin, V. V. Borisov, B. K. Vainshtein, B. K. Fita, M. R. N. Murthy, and M. G. Rossman, *J. Mol. Biol.*, 188 (1986) 63.
4. K. D. Nugent, W. G. Burton, T. K. Slattery, B. F. Johnson, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 443 (1988) 381.
5. O. Mikes, *High – Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biooligomers*. Part B, Elsevier, Amsterdam, 1988.
6. K. M. Gooding and F. E. Regnier, *HPLC of Biological Macromolecules*, Marcel Dekker, New York, 1990.
7. C. T. Mant and R. S. Hodges, *High – Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
8. M. T. W. Hearn, ed., *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, VCH, New York, 1991.
9. W. S. Hancock, ed.. *Characterization of Proteins: New Methods in Peptide Mapping*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
10. L. R. Snyder, in *Methods in Enzymology*, 271, W. S. Hancock and B. L. Karger, eds.. Academic Press, Orlando, FL, 1996, p. 151.
11. R. Giese and S. Honda, eds., "Chromatographic and Electrophoretic Analyses of Carbohydrates," *J. Chromatogr. A*, 720 (1996).
12. J. Kyte, *Structure in Protein Chemistry*, Garland, New York, 1995.
13. T. J. Sereda, C. T. Mant, A. M. Quinn, and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, 646(1993) 17.
14. W. Melander, H. – J. Lin, J. Jacobsson, and C. Horvath, *J. Phys. Chem.*, 88(1984) 4527.
15. E. Watson and W. C. Kenney, ·*J. Chromatogr.*, 606 (1992) 165
15. E. Watson and W. C. Kenney, *J. Chromatogr.*, 606 (1992) 165.
16. D. GHO, C. T. Mant, A. K. Taueja, J. M. R. Parker, and R. S. Hodges, *J Chromatogr.* 359 (1986) 499.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

17. B. F. D. Ghrist, M. A. Stadalius, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 387 (1987)1

18. M. A. Stadalius, B. F. D. Ghrist, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 387 (1987)21

19. B. E. Boyes, Rockland Technologies, Newport, DE, private communication, 1996

20. B. E. Boyes and J. J. Kirkland, *Peptide Res.*, 6 (1993) 249.

21. N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yanf and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, 519 (1990) 1.

22. S. P. Fulton, N. B. Afeyan, N. F. Gordon, and F. E. Regnier, J. *Chromatogr.*,547(1991) 452.

23. R. W. Stout and J. J. DeStefano, *J. Chromatogr.*, 326 (1985) 63.

24. G. Heinemann, J. Kohler, and G. Schomburg, *Chromatographia*, 23 (1987)4

25. L. Sun and P. W. Can –, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3717.

25a. J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, and H A. Claessens, *J. Chromatogr.* A, in print.

26. S. A. Cohen, K. Benedek, Y. Tapuhi, J. C. Ford, and B. L. Karger, *Anal. Biochem.*, 144 (1985) 275.

27. K. D. Nugent and P. W. Nugent, *Biochromatography*, 5 (1990) 142.

28. K. R. Brunden, C. T. Berg, and J. F. Poduslo, *Anal. Biochem.*, 164 (1987) 474

29. K. M. Swiderek, M. L. Klein, S. A. Hefta, and J. E. Shively, in *Techniques in Protein Chemistry VI*, J. W. Crabb, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1995, p. 267.

30. T. C. Thomas and M. G. McNamee, *Methods Enzymol.*, 182 (1990) 499.

31. D. Josic and W. Reuter, in *High – Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, C. T. Mant and R. S. Hodges, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 231.

32. G. W. Welling, R. van der Zee, and S. Welling – Wester, in *HPLC of Biological Macromolecules: Methods and Applications*. K. M. Gooding and F.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

E. Reginier eds., Marcel Dekker, New York, 1990, p. 373.

33. M. A. Stadalius, H. S. Gold, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 296 (1984) 31

34. B. E. Boyes, Rockland Technologies, Inc., Newport, DE, manuscript in preparation.

35. L. R. Snyder, M. A. Stadalius, and M. A. Quarry, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 141

36. W. S. Hancock, R. C. Chloupek, J. J. Kirkland, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, A, 686(1994)31

37. J. L. Glajch, M. A. Quarry, J. F. Vasta, and L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 280.

38. B. F. D. Ghrist, B. S. Cooperman, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 459 (1988)1, 25, 43.

39. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, 485 (1989) 91.

40. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 594 (1994) 65.

41. R. C. Chloupek, W. S. Hancock, B. A. Marchylo, J. J. Kirkland, B. E. Boyes, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* A, 686 (1994) 45.

42. A. W. Purcell, M. 1. Aguilar, and M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A*, 711 (1995) 61.

43. B. E. Boyes and D. G. Walker, *J. Chromatogr.* A, 691 (1995) 337.

44. D. Guo, C. T. Mant, and R. S. Hodges, *J. Chromatogr.*, 386 (1987) 205.

45. W. G. Burton, K. D. Nugent, T. K. Slattery, B. R. Sumers, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 443 (1988) 363.

46. H. A. Claessens, M. A. Van Straten, and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* A, 728(1996) 259.

47. M. J. Lu, C. A. Dadd, C. A. Mizzen, C. A. Perry, D. R. McLachlan, A. T. Annunziato, and C. D. Allis, *Chromosoma*, 103 (1994) III.

48. W. Kopaciewicz, M. A. Rounds, J. Fausnaugh, and F. E. Regnier, *J.*

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

Chromatogr., 266 (1983) 3.

49. A. J. Alpert and P. C. Andrews, *J. Chromatogr.*, 443 (1988) 85.
50. J. J. Fiordalisi, R. L. Gigowski, and G. A. Grant, *Protein Exp. Purif.*, 3 (1992) 282.
51. Y. Kato, K. Komiya, and T. Hashimoto, *J. Chromatogr.*, 246 (1982) 13.
52. T. Ueda and Y. Ishida, *J. Chromatogr.*, 386 (1987) 273.
53. D. L. Gooding, M. N. Schmuck, and K. M. Gooding. *J. Chromatogr.*, 296 (1984) 107.
54. A. J. Alpert, *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 85.
55. N. T. Miller, B. Feibush, and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 316 (1984) 519.
56. G. Zon, in *Characterization of Proteins: New Methods in Peptide Mapping*, W. S. Hancock, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, p. 301.
57. P. J. Oefner, G. Bonn, C. G. Huber, and S. Nathakarnkitool, J. *Chromatogr. A*, 625 (1992) 331.
58. C. G. Huber, P. J. Oefner, and G. Bonn, *J. Chromatogr. A*, 599 (1992) 113.
59. T. L. Hill and J. W. Mayhew, *J. Chromatogr.*, 512 (1990) 415.
60. Y. -F. Ma, S. -C. Lin, C. Horvath, U. -C. Yang, and D. M. Crothers, *J. Chromatogr.*, 508 (1990) 61.
61. W. W. Yau, J. J. Kirkland, and D. D. Biy, *Modern Size - Exclusion Liquid Chromatography*, Wiley - interscience, New York, 1979.
62. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *introduction to Modem Liquid Chromatography*, Wiley - interscience, New York, 1979, Chapter 12.
63. L. Hagel, H. Lundstrom, T. Andersson, and H. Lindblom, *J. Chromatogr.*, 476(1989) 329.
64. R. Nave, K. Weber, and M. Potschka, *J. Chromatogr.* A, 654 (1993) 229.
65. G. W. Welling and S. Welling - Wester, in *HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*, M. T. W. Hearn, ed., VCH, New York, 1991, Chapter 17.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

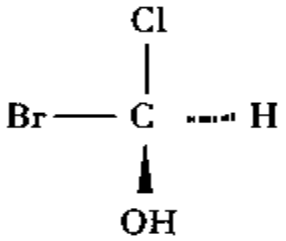
66. L. Hagel, *J. Chromatogr.*, 648 (1993) 19.
67. W. Flapper, A. G. M. Theeuwes, J. T. G. Kierkels, J. Steenbergen, and H. J. Hoenders, *J. Chromatogr.*, 533 (1990) 47.
68. V. N. Uversky, *Biochem.*, 32 (1993) 13288.
69. E. Stellwagen and W. Shalongo, in *High – Performance Liquid Chromatography Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conf ormation*, C. T. Mant and R. S. Hodges, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 599.
70. W. J. Becktel and M. A. Lindorfer, in *High – Performance Liquid Chromatography. of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*, C. T. Mant and R. S. Hodges, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 605.

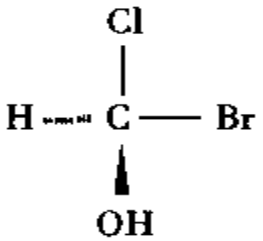
PDF 文件使用 "pdf Fact or y" 试用版本创建 www.f i nepr i nt . cn

第 12 章　手性分离

12.1　引言

手性分子定义为一种不能与其镜像重合的分子。手性分子的两种镜像形式称为对映体。对映体具有完全相同的物理和化学性质(除某些光学性质外)。一个手性分子有一个或一个以上立体异构中心,一般为与四个不同的取代基相连的手性碳原子,如氯溴甲醇的中心碳原子:





根据一定条件下其旋光方向的差异,两种立体异构体分为(+)-和(-)-(或右旋和左旋)异构体。手性中心的空间构象命名为 R 或 S。有关立体化学的详细论述,可参阅文献[1]。两种对映体与非手性分子或固定相的作用相同,所以对映体不能采用前面章节中论述的 HPLC 方法分离。为了分离1:1对映体的混合物(外消旋),必须将样品与一种手性化合物进行反应或将该对映体与一种手性固定相进行作用形成两种非对映体或非对映体更合物。非对映体具有不同的化学和物理性质,因此可由一般 HPLC 进行分离。

可用于拆分对映体的手性色谱包括:气相色谱(GC)、手性超

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

临界色谱(SFC)、毛细管电泳(CE)和高效液相色谱(HPLC),HPLC是这四种分离模式中最广泛使用的方法。在本章中我们讨论不同的手性固定相(CSP)及分离对映体对或一簇对映体的最佳色谱柱、流动相和色谱条件选择。HPLC分离对映体的能力由对映体选择性(即两种对映体的分离固定相)衡量。如果对映体对选择性因子 $\alpha>1.1$,则该对映体对被视为可分。

文献中最初报导的大部分对映体分离基于手性分子与对映体纯度的手性衍生化试剂(CDA)反应,生成两种可由常规HPLC方法分离的非对映体完成对映体分离,此方法称为间接手性分析方法。自1980年以来,手性色谱分离主要采用手性固定相(CSP)的方法,这种方法无需对样品进行手性衍生化,因此称为直接手性分析方法。如果一种方法包含对映体分子的实际色谱分离,那么不论是否采用手性试剂衍生化处理,均可认为是直接方法(即不转化为共价非对映体衍生物)。另一种直接方法采用手性流动相添加剂(CMPA)与待测物形成暂时的非对映体复合物,并进一步通过HPLC分离该非对映体复合物。

下面以萘普生[S-6-甲氧基(萘撑乙酸)图12.1]为例,阐述分离对映体的三种一般步骤。萘普生是一种非甾族消炎药物,有效成分为(+)对映体。除手性HPLC要求的特殊条件外,1~8章的一般规律在这里仍适用。

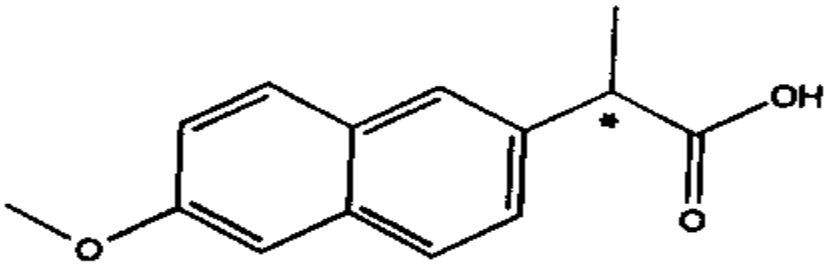


图12-1 萘普生的化学结构

12.1.1 手性衍生化

手性衍生化使对映分子与纯对映体手性衍生化试剂(CDA)反

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

应生成两种非对映体衍生物，可进一步采用常规反相或正相HPLC(第6章)分离。由于正相HPLC对异构体有较好的选择性(6.6节)，因此一般效果更佳。在衍生化反应过程中，应避免发生外消旋化作用，且CDA应有足够的光谱纯(纯度>99%)。最常用的手性衍生化反应包括生成非对映酰胺、氨基甲酸盐和脲类。在二十世纪七十年代到八十年代，手性衍生化被广泛使用，但由于新型CSP不断出现，目前手性样品的预衍生化方法已很少采用。

图12.2为萘普生转化为非对映衍生物L－氨基丙酸－β－萘胺后的分离。在本例中(＋)和(－)萘普生与N,N－二环己基碳二亚胺及L－氨基丙酸－β－萘胺反应很快(5min)，且几乎达到完全。由于手性衍生化反应一般需较长时间，且可能生成外消旋物或两种产量不同的非对映体，导致HPLC分析结果误差增大，这也限制了其应用。

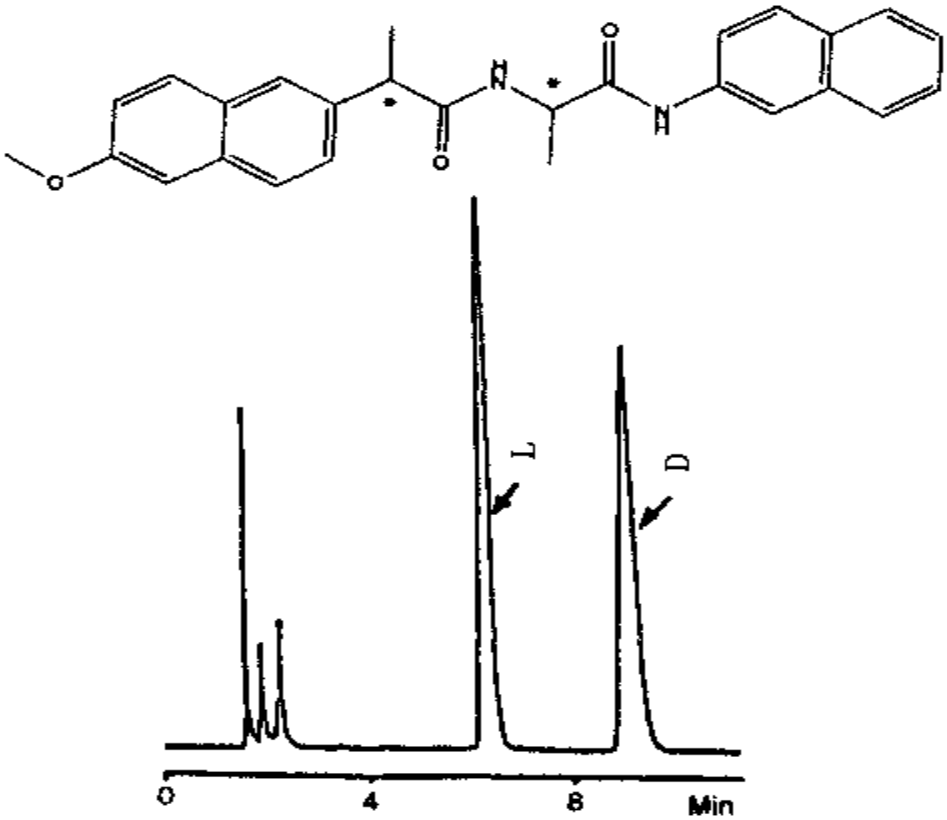


图12－2　HPLC分离萘普生对映体的L－氨基丙酸－β－萘胺衍生物[2]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

12.1.2 手性流动相添加剂

不断地将一种对映体纯度的化合物加入到 HPLC 流动相中[手性流动相添加剂(CMPA)],待测物和 CMPA 形成不稳定的非对映体复合物,被反相或正相 HPLC 分离。这种方法由于需要连续添加较为昂贵的 CMPA;检测困难;峰形差;塔板数低,而使其广泛应用受到限制。图 12.3 为以奎宁作为 CMPA,采用反相色谱分离(+)和(-)萘普生对映体的结果。同其它萘普生对映体的分离相比,分离度较差且运行时间较长(20min)(图 12.2、12.4 和 12.5)。

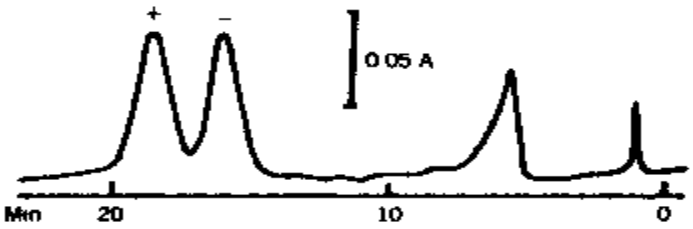


图 12-3 在流动相中添加奎宁,萘普生对映体的 HPLC 分离[3]

柱:乙酰奎宁-硅胶柱;

流动相:0.35mM 奎宁+0.35mM 二氯甲烷的乙酸溶液;流速 1.0ml/min

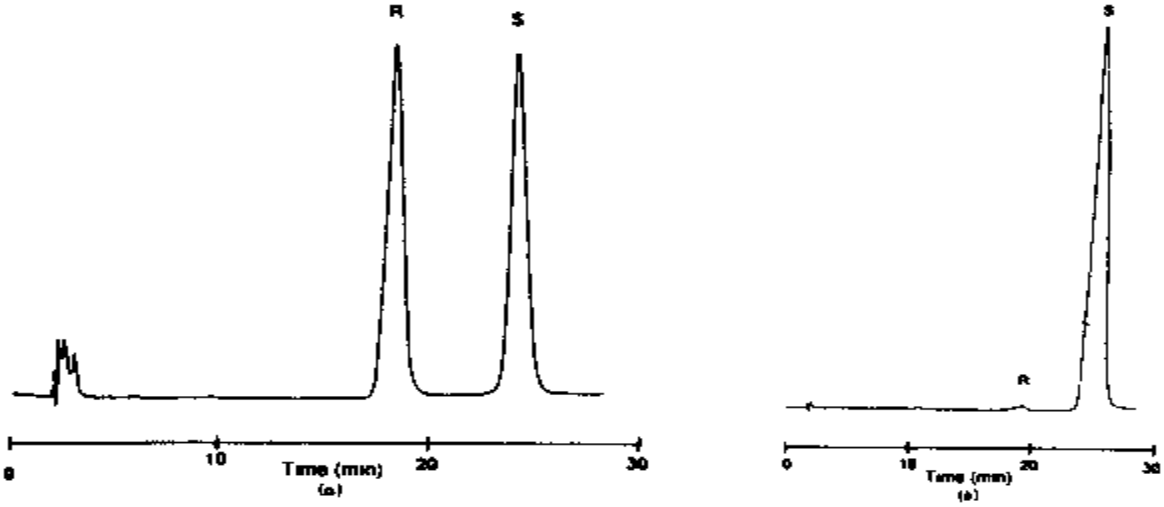


图 12-4 在 CSP 上分离衍生化的萘普生[4]

(a),在(R)-N-(2-萘)丙氨酸 CSP 上分离 R,S-萘普生的 3,5-二硝基苯胺衍生物。流动相:己烷-异丙醇(90:010)。流速:2.0ml/min。254nm UV 检测。温度:室温。

(b),除 S-萘普生含约 1.0% R-萘普生外,其他条件同(a)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.1.3 手性固定相(CSP)

手性固定相(CSP)采用一种手性物质化学键合或涂渍在固定相担体上制成。CSP 可与待测物对映体反应生成短寿命、稳定性较差的非对映体复合物。这些复合物结合强度的不同将导致其在保留时间方面的差异,进而达到分离的目的。文献中报导的大部分手性分离为采用 CSP 的直接分离,故本章主要讨论这种方法。硅胶和氨丙基硅胶常作为初始实验的担体材料,聚合物手性固定相填料也有应用。CSP 以共价键合、离子键合、物理涂渍等多种方式附着在担体上。对于一些样品,CSP 对对映体的选择性可通过与手性进行衍生化加强。例如,可以采用衍生和未衍生的直接方法分离萘普生对映体,图 12.4 为预衍生化后萘普生在 Pirkle 柱上的分离结果,图 12.5 为在蛋白质手性固定相上直接分离未衍生化萘普生对映体(12.2 节)的结果。图 12.4 的分离度较好,但

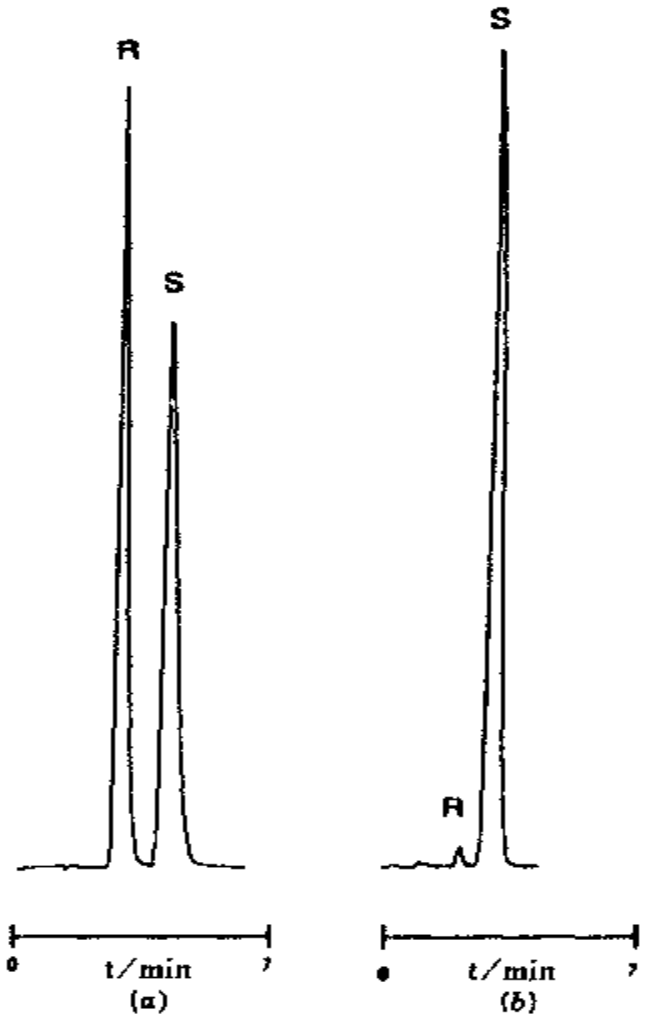


图 12-5 在手性 AGP CSP 上分离 R,S-萘普生[4]

流动相:4mM 磷酸盐缓冲液,pH7.0-异丙醇(99.5:0.5);流速:8ml/min,263nm UV 检测。温度:室温。(a),外消旋混合物;(b),同(a),含 1.5% R-萘普生的 S-萘普生

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

运行时间较长(>20min),且需要衍生化反应。图 12.5 的分离结果也较好,在 5min 内两种对映体分离完毕。

图 12.1～12.5 的例子显示,HPLC 分离对映体的方法很多,对于某一个具体样品,如何开始手性 HPLC 方法建立?是否必需衍生化?对映体能否在商品柱上直接分离?这些问题还将在本章中作进一步阐述。

12.1.4 手性识别原理

手性识别指 CSP 与两种对映体作用的不同致使其 HPLC 分离的能力。已有研究表明[5-7]：手性识别的本质随其反应类型的不同而不同，见表 12.1 的总结。待测物和 CSP 以氢键、π－π 相互作用、偶极堆积、包络和立体镶嵌形成临时的非对映体复合物的能力是对映体分离的趋动力，非对映体复合物相对结合强度决定了对映体分离的选择性。早期的研究认为[8,9]：分离对映体至少同时需要待测物和 CSP 间的三种相互作用，并且其中至少一种相互作用与立体化学有关。尽管目前对于手性识别的三点相互作用是否必要仍存在争议[10]，但在手性 HPLC 中 CSP 仍为最重要手段。在很多情况下，方法建立只是选择合适的色谱柱，并通过改变有机物类型及含量控制 k 值。对于具体的样品和色谱柱，分离度也依赖于 pH 值、缓冲液类型或柱温。CSP 主要有四种类型：蛋白质、环糊精、糖类和 Pirkle 柱[11]，此外还有：配体交换柱和硅胶键合大环抗生素柱两类 CSP。因配体交换柱不经常使用故在此不作详细讨论。键合大环抗生素柱是刚刚发展起来的一类新型 CSP，这种柱可以具有通过多种不同的反应模式解析对映体的能力，对蛋白质具有选择性，并且具有良好的稳定性和样品容量[12,13]。尽管大环柱目前已商品化，但尚没有足够的数据可以对其进行详细讨论，并用于实际设计系统方案。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 12－1 手性固定相[11－13]

CSP 类型	手性识别机理	待测物要求	流动相要求
蛋白质(12.2)	疏水和静电相互作用	可解离基团(如胺或酸);芳香基有助于分离	只可用反相
环糊精(12.5)	包络物,H 键	极性或芳香基团	反相、正相、极性有机模式
高分子烃(12.3)	包络物,吸附相互作用	形成 H－键能力先作近手性中心有立体镶嵌	反相、正相
Pirke 型(12.4)	氢键、π－π 相互作用,偶极堆积	形成氢键或 π 键能力,芳香基有助于分离	大部分为正相,反相分离度较差
配体交换[a]	与金属形成配位络合物	α－氨基和 α－羟基氨基酸	反相
大环抗生素[b]	H 键、π－π 相互作用、偶极堆积、空间和疏水作用	形成 π－、H－或偶极键的能力、先作近手性中心有立体镶嵌	反相和正相

[a] 由于不经常使用,本章中不详细讨论。
[b] 数据和应用有限,这里不讨论。

12.1.5 手性 HPLC 方法建立概论

12.1.5.1 样品信息 本节假设实验室已有普通的商品化手性柱,手性方法建立的第一步为检查待测物的化学结构,分析者应尽可能获取样品的下列信息:

- 在不同溶剂中的溶解度
- 形成 π 键或氢键能力
- pK_a
- 官能团
- 紫外光谱
- 有无大取代基
- 形成包络物的能力

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

这些性质在确定 CSP 分离对映体样品能力时具有一定作用。应着重考虑下面两点：(1)待测物分子中取代基类型；(2)π 键、氢键或位阻干扰成键的能力。取代基的空间排列(与待测物手性中心有关)对对映体的分离具有重要的作用。在大多数情况下，这些基团离手性中心越近，越容易进行手性识别，且对映体选择性越高。如待测物无基团与担体键合，则需经衍生化处理。图 12.6 中，在氢键和 π 键的位置通过衍生化加入一个氨基，生成相应的 3,5－二硝基苯胺衍生物。这种衍生化作用可以提供手性识别需要的附加结合位点。

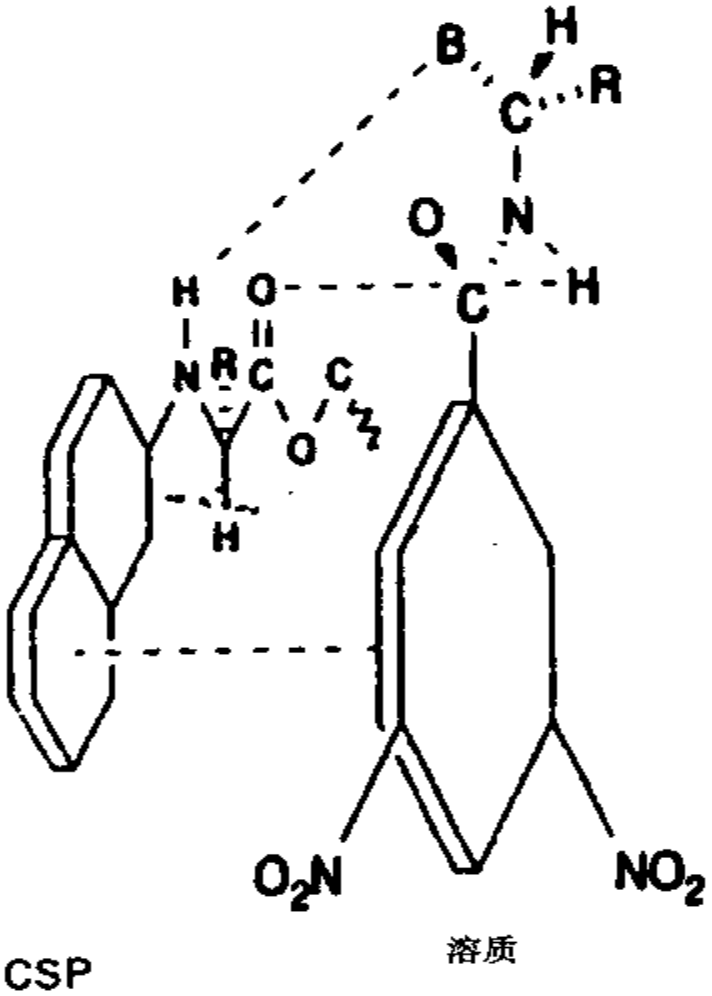


图 12－6　CSP 和保留较强的手性二硝基苯甲酰胺对映体间的手性识别模型[5]

B 表示待测物分子的碱性位点，其可形成 CSP N－H 氢键。其他相互作用为 CSP 的芳环与待测物间的 π－π 相互作用和待测物酸性 N－H 质子与 CSP 酯基间的氢键。

12.1.5.2　制备分离　建立一种手性 HPLC 方法时，应考虑该方法能否用于制备分离(第13章)。所有的商品化 CSP 均可用于分离分析，但只有糖类、环糊精和 Pirkle CSP 的大直径柱(较贵)适宜制备(12.3至12.5节)。如需要纯化的样品量大于两克，不适子采用容量较

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

低的蛋白质 CSP 制备分离。三乙酰纤维素(12.3节) CSP 同其它 CSP 相比且易于获得价格低廉[14],被广泛用于制备分离。最近有数篇综述性文章和专著[14-17]就对映体制备分离作了较详细讨论,可供参阅。

12.1.6 手性柱的选择

商品化的 CSP 已超过 100 种,但很多柱在结构、对映体选择性等方面很相似。有关文章和书籍[17-20]介绍了不同柱的分离基础及其所适合的样品。有些柱子可分离多种样品类型,CSP 通用性的大致顺序为:

蛋白质>糖类>Pirkle>环糊精

该顺序可能会随着 CSP 生产技术的进一步发展而发生改变。表 12.2 为不同类型的样品所推荐的 CSP 类型,有关内容在 12.2 – 12.5 节中介绍。

表 12.2 不同类型化合物分离的柱推荐

化合物种类	CSP 类型	柱商品名
酸类	蛋白质、纤维素、直链淀粉、Pirkle	OVM、AGP、Chiralcel、OD – OJ、Whelk – O – 1
氨基酸类	冠醚、配体交换、环糊精、蛋白质	CrownPak CR(+)、1 – 羟基脯氨酸、BSA、Cyclobond Ⅱ
胺类	蛋白质、纤维素/直链淀粉、Pirkle、环糊精	OVM、AGP、BSA、Chiracel、OD – OJ、CTA、DNBPG、萘基丙氨酸、Whelk – O – 1、Cyclobond Ⅱ
醇类	蛋白质、纤维素/直链淀粉、Pirkle、环糊精	OVM、AGP、BSA、Chiralcel OD – OJ、CTA、DNBPG、萘基丙氨酸、Whelk – O – 1、Cyclobond Ⅱ
酰胺类	蛋白质、纤维素/直链淀粉、Pirkle、环糊精	OVM、AGP、BSA、Chiralcel OD – OJ、CTA、DNBPG、萘基丙氨酸、Whelk – O – 1、(– Cyclobond Ⅱ
酯类	Pirkle、纤维素	DNBPG、Whelk – O – 1、CTA
亚砜类	Pirkle、纤维素、蛋白质	DNBPG、Whelk – O – 1、Chiralcel OA、OB、BSA

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

化合物种类	CSP 类型	柱商品名
氨基甲酸盐	Pirkle	DNBPG、Whelk－O－1
脲	Pirkle	DNBPG、Whelk－O－1
冠醚	环糊精	β－Cyclobond Ⅱ
金属茂	Pirkle	β－Cyclobond Ⅱ
硫醇	Pirkle	DNBPG、β－GEM－1
氨基醇类	Pirkle	DNBPG、β－GEM－1
琥珀酰胺	Pirkle	DNBPG、β－GEM－1
乙内酰脲	Pirkle	DNBPG、β－GEM－1
双萘酚	Pirkle	DNBPG、β－GEM－1
β－内酰胺	Pirkle、纤维素	DNBPG、Whelk－O－1、Chiralcel OC、OF
多环芳香烃	环糊精	Cyclobond Ac
脂肪环药物	蛋白质	BSA、AGP、OVM
芳香类药物	蛋白质	BSA、AGP、OVM
内酯	纤维素	Chiralcel OA、OB
环酮	Pirkle、纤维素	Whelk－O－1、Chiralcel OA、OB
生物碱	纤维素	Chiralcel OC、OD、OF、OG
二氢吡啶	纤维素	Chiralcel OC、OD、OF、OG
非甾体消炎类	Pirkle、纤维素、蛋白质	Whelk－O－1、Chiralcel OJ、AGP
噁唑烷	Pirkle	DNBPG

12.2 固载化蛋白手性固定相

12.2.1 引言

固载化蛋白质是分离对映体固定相中用途最广的几种，这种手性柱可成功分离其它手性相难以分开的外消旋物[2]-[24]。多种蛋白质固定相已被用于手性分离，其中牛和人的血清蛋白、α_1－酸性糖蛋白、卵粘蛋白、胃蛋白酶和纤维素水解酶等六种已商品化。这些蛋白质与 HPLC 全孔硅胶和聚合物担体共价结合固定相可用于快速 HPLC 分析。在生物样品 HPLC 中广泛使用的缓冲液一般皆

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

可作为固载化蛋白质柱的流动相，这是该柱的一大突出优点，但固载化蛋白质柱样品容量较小，价格昂贵，不适于制备。

12.2.2 背景

多聚糖和一些 Pirkle 型手性柱的分离经常使用非极性有机溶剂(12.3和12.4节)，而蛋白质柱采用缓冲水溶液/有机流动相。由于只有单一构型的溶质与固载化蛋白质固定相作用，因此对外消旋物对映体样品具有较高的选择性。可以通过改变 pH 值、流动相添加剂、有机调节剂类型和温度等分离参数方便地调节色谱峰间距。已有多种蛋白质固定相的优化分离方案(参阅12.2.8节)，采用这些方案可较方便地找出最佳操作条件，有助于快速建立合适的分析方法。

12.2.3 手性作用机理

蛋白质与外消旋化合物立体选择性反应的机理十分复杂，目前尚不甚清楚。不同蛋白质对不同结构对映体的选择性差别也很大。蛋白质和对映体溶质的相互作用主要表现为疏水和静电相互作用，但氢键或电荷转移相互作用对手性选择性也有贡献[25]。蛋白质上可能有不同位点参与固定相与溶质的选择性作用，这些大分子的三维结构也有益于对映体选择性[24]。有关这些作用本质的研究已有报导[26]。

样品分子与蛋白质固定相的疏水反应主要受流动相中有机调节剂浓度的影响(%B)。当%B 增加时，溶质在蛋白质柱上的保留下降。因为固载化蛋白质固定相在高于或低于蛋白质 pI 时带有电荷，因此样品分子与蛋白质相的静电作用包括离子交换过程(7.5节)，而流动相 pH 可以对手性选择性和保留值起控制作用(参阅12.2.5.2节)。蛋白质的 pI 称为等电点(即蛋白质净电荷为零)，在大于 pI 或小于 pI 时，蛋白质带有负电荷或正电荷。当 pH 与 pI 接近时，蛋白质的不同部分或者带有正电荷或者带有负电荷，受 pH 的影响较小。在蛋白质固定相正常使用的 pH 值范围内($3<pH<7$，表 12.5)，静电作用占主导地位时，增加 pH 值将使酸性溶质的保

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

留值增加；而使碱性溶质的保留值降低；疏水反应占主导地位时，则反之。因此，很难预测 pH 值如何影响在蛋白质固定相上样品的保留值变化规律，实际分离中流动相的 pH 通常用于控制保留值和手性分离的选择性。(参阅 12.2.5.2 节)

12.2.4 蛋白质手性柱的性质

蛋白质为由 L－型氨基酸组成的复杂生物聚合物大分子，用于手性分离的蛋白质和其主要性质在表12.3中给出。这些蛋白质可以与药物等小分子可逆立体选择性键合。α_1－酸性糖蛋白(AGP)和卵粘蛋白(OVM)中含有较高浓度的糖类基团，这些基团的存在对于色谱柱的高对映体选择性至关重要，结构中的双硫桥键也可以增加固载化蛋白质固定相的稳定性。有关卵粘蛋白对对映体保留的详细讨论可参见文献[26]。表12.4中给出了一些商品化蛋白质柱的特征。这类柱的担体通常为全孔型(12.5－50nm)，较大的蛋白质分子可进入担体粒子内表面进行固载化反应。

牛血清白蛋白(BSA)　是由17个双硫键起稳定作用的581个氨基酸组成的球蛋白，这种相对酸性、雪茄形的分子具有多个疏水结合位点，可以采用不同的方式与硅胶担体键合[27]。通过二乙烯砜键合到高分子复合硅胶上，是其最稳定的固载化形式之一[24]。

人血清白蛋白(HAS)　与牛血白清蛋白的分子量大致相同，但固载化的 HAS 对于许多对映体具有不同的选择性。与双醇激活

表 12－3　手性固定相蛋白质的性质[24]

蛋白质[a]	分子量	等电点(pI)	分子上的S－S桥键	糖的含量	分子唾液酸残基
BSA、HSA	66,000	4.7	17	－	－
AGP	141,000	2.7	2	45	14
OVM	28,800	3.7－4.5	8	30	0.3
CBH	64,000	3.9	12	6	－
胃蛋白酶	34,600	<1	3	－	－

[a] BSA，牛血清蛋白；HAS，人血清白蛋白；AGP，α_1－酸性糖蛋白(包清类粘蛋白)；OVM，卵类粘蛋白；CBH，纤维二糖水解酶

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 12－4　商品化的蛋白质手性柱的特征[24]

蛋白质[a]	商品名	制造商	担体	粒度(μm)	孔径(Å)
AGP	Enantipak	Pharmacia LKB	硅胶	10	250
AGP	Chiral AGP	ChromTech AB	硅胶	5	120
HSA	Chiral 蛋白质－2	ASTEC	硅胶	7	300
HSA	手性 HAS	ChromTech AB	硅胶	5	120
BSA	Resolvosil	Machery Nagel	硅胶	7	100
BSA	BSA 柱	ASTEC	硅胶	7	300
BSA	BA	Showa Denko K.K.	聚合物	15－20	500
OVM	Ulron ES－OVM	Shinwa Chemicals[b]	硅胶	5	120
OVM	OV	Shinwa Chemicals[b]	聚合物	15－20	500
CELL	Chiral－CBH	ChromTech AB	硅胶	5	120
肽	Ultron ES－PEP	Shinwa Chemicals[b]	硅胶	5	120

[a] BSA，牛血清蛋白；HAS，人血清的蛋白；AGP，α_1－酸性糖蛋白；OVM，卵类粘蛋白；CBH，纤维素酶

[b] Shinwa Chemicals 负责在日本的生产和销售；
Mac－Mod 负责在美国的销售；
Rockland Technologies，Inc. 负责全世界(除日本)的销售

硅胶担体共价键合的 HAS 为商用柱的基本形式[24]。HSA 用于研究溶液中蛋白质与药物的作用已进行多年，该项研究对说明药物在人体中的作用具有十分重要的意义。

α_1－酸性糖蛋白(AGP)　由含有 181 个氨基酸残基的多肽和与分子糖蛋白结合的 14 个唾液酸残基组成。唾液酸在中等 pH 下可与碱性化合物结合。固载化 AGP 柱有两种，其性质的差异可能取决于固载化化学反应的不同[21]。

卵粘蛋白(OVM)　是一种从鸡蛋清中提取的胰蛋白酶抑制剂。这种蛋白质可以与疏水的芳香族溶质发生强烈作用。卵粘蛋白可固化在氨丙基硅胶上，与固定相结合的蛋白质数量对样品分离度的影响很大[22]。最近的研究表明 OVM 柱的活性组分为卵糖蛋白，经纯化的固定相柱同普通商用 OVM 柱相比手性识别和稳定

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

性都有所提高[31a]。开发研制改进的蛋白质固定相商品柱仍在筹划，但目前尚未实现。

纤维素水解酶(CBH;纤维素酶) 为由真菌 Trichoder ma reesei 产生的一种蛋白质[28]，商品柱由其在二醇基硅胶上共价结合制成。

胃蛋白酶的等电点(pI<1)很低，色谱填料由 N, N′－二琥珀酰亚胺酯[32]将蛋白质结合在氨丙基硅胶上制得。

12.2.5 通过流动相调整保留值和选择性

用于手性柱的固载化蛋白质相对稳定，对映体的选择性或谱带间距通常可以通过优化有机调节剂类型、pH 和温度调节。表 12.5 总结了保持蛋白柱稳定的 pH 值范围、丙醇调节剂所允许的最大浓度及不经常使用的有机调节剂的情况，也给出了不同柱子适合的样品类型，并对可能遇到的特殊操作条件加以说明。

表 12－5 蛋白质手性柱的操作条件

柱型 a	pH 范围[b]	分离效果最佳的物质	所允许的 1－或 2－丙醇的含量	使用较少的有机调节剂	说明
BSA	4.5－8[27]	酸	10%	离子对有助于分离	
HAS	4－7[28]	酸	10%	MeOH, EtOH, ACN	离子对有助于分离
AGP	3－7[29]	酸/碱	25%	MeOH, EtOH, ACN	离子对有助于分离
OVM	2－7.5[30]	酸/碱	50%	MeOH, EtOH, ACN	一般不使用离子对
CHB	4－7[28,31]	碱	20%	CAN, THF, MeOH	常用 EDTA 溶液作为流动相
肽	3－6[32]	碱	10%	EtOH, MeOH, ACN	EtOH 首选，流动相中含 0.02%叠氮钠

[a] BSA，牛血清蛋白；HAS，人血清蛋白；AGP，(1－酸性糖蛋白；OVM，卵粘蛋白；CBH，纤维素酶；pI 值参阅表 12.3

[c] MeOH，甲醇；EtOH，乙醇；ACN，乙腈；THF，四氢呋喃

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.2.5.1 流动相有机调节剂 有机溶剂用于控制固载化蛋白质柱中溶质的 k 和 α 值。与非手性化合物(6.2.1 节)的反相色谱相同，通过改变有机调节剂浓度，固载化蛋白质柱中的溶质保留值经常调节在最佳范围内($1<k<20$)。提高有机调节剂浓度可以降低溶质保留值。每种固定相的分离能力，只能在其允许的有机调节剂浓度范围内变化，需严格遵循制造商的建议(表 12.5)。在这方面，由于 OVM 和 AGP 柱原蛋白的内在稳定性，其适用性较广，而其它蛋白质手性柱要求有机调节剂的浓度较低，应用范围一般也很窄(表 12.5)。对强保留化合物，HAS、BSA 和胃蛋白酶柱可能同时需调节 pH 和有机调节剂浓度才能达到合适的保留值范围。如果保留值太大或太小，以致于通过 B% 无法调节，则可试改变 pH 值调节。对于大多数蛋白质固定相，强保留碱性化合物经常采用最大的% B 和接近最小 pH 值的缓冲液流动相体系；相反，为控制强保留酸性化合物的保留值范围，最高有机调节剂浓度和 pH 较高的缓冲液的流动相体系常被采用。

1－和 2－丙醇是蛋白质柱中常用的水溶液流动相有机调节剂，而其它有机物使用较少。对 BSA 和 HAS 柱，出于柱稳定性方面的考虑应使用浓度相对低的有机调节剂(一般<10%)。增加有机调节剂浓度可明显减弱溶质－蛋白质疏水和氢键相互作用，导致溶质快速冲出[24]。许多能与水混溶的溶剂也可作为流动相调节剂，但 1－或 2－丙醇和乙腈使用最为广泛，并且一般能提供较大的对映体选择性。为了延长柱子寿命应遵循制造商有关有机溶剂使用的建议。有机调节剂的浓度影响对映体 k 值，其 α 值可能发生改变，OVM 柱的这种变化如表 12.6 所示。在 OVM 柱中，改变 2－丙醇的浓度对华法令的对映体选择性影响较大，而在 AGP 和 BSA 柱中影响小得多。改变丙醇浓度时，对映体的 α 值一般改变不大。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 12－6　2－丙醇浓度对华法令 k 和 α 值的影响[a][29]

%2－丙醇	AGP(4.0×100mm)		OVM(4.6×150mm)		BSA(4.0(150mm)	
	k^b	α	k^b	α	k^b	α
2.5	–	–	–	–	63.0	1.22
5	–	–	4.53	2.23	37.8	1.19
10	7.20	1.63	2.08	1.42	–	1.12
15	2.30	1.63	1.23	1.17	19.1	–
20	0.71	1.71	0.84	1.02	–	–
25	0.24	1.70	–	–	–	–

[a] 10mM 磷酸盐缓冲液，pH6.5；0.9ml/min；30℃；280nm。

[b] 第一个对映体的 k 值

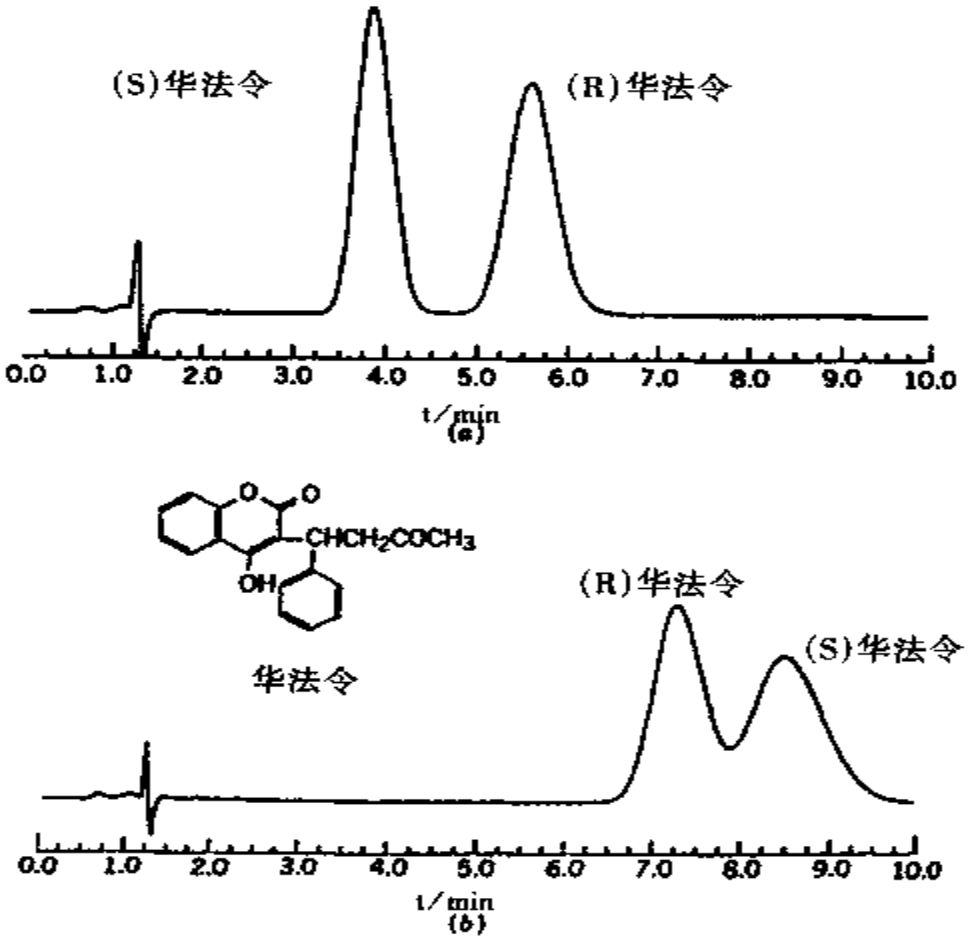


图 12－7　有机溶剂对华法令对映体选择性的影响

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

蛋白质柱中改变有机调节剂类型对映体的选择性影响较大。例如，12.7*a* 中采用 AGP 柱，15% 2－丙醇的流动相可使华法令对映体分离较好，但(图 12.7*b*)含 15% 乙腈流动相未使其完全分离。较低浓度(1～3%)的二醇如乙烯基乙二醇和 1,2－丁二醇也用于改变保留值 k 和 α 值。同其它蛋白质柱相比，OVM 和 AGP 柱一般允许使用范围较宽的有机溶剂类型和浓度范围，以控制 k 值和对映体峰间距(表 12.5)。表 12.7 说明了采用 OVM 柱分离具有不同 pKα 值的样品时溶剂类型和浓度对 k 和 α 值的影响。在相同的浓度条件下(V/V)，有机调节剂的洗脱强度顺序一般为：乙腈>异丙醇>乙醇>甲醇[33]。但也有例外，如表 12.7 中，对氯霉素，乙醇的洗脱速度比同浓度乙腈快。

表 12－7 有机调节剂的类型和浓度对 OVM 柱分离的影响[29]

化合物	乙醇含量					乙腈含量			
	pK_a	5%		10%		5%		10%	
	k_1	α	k_1	α		k_1	α	k_1	α
布洛芬	5.2	24.8	1.45	12.4	1.40	24.3	1.25	3.10	1.06
氯霉素	9.1	41.0	2.60	1.60	1.93	3.25	2.00	2.00	1.00
环巴巴比妥	8.2	1.70	1.52	*b*		1.15	1.23	*b*	

[a] 流动相：20mM 磷酸盐(pH4.6)＋乙醇或乙腈
[b] 无保留

12.2.5.2　pH，离子强度，离子对效应　蛋白质柱的峰间距变化可由改变流动相的 pH 值实现。由于离子交换或离子排斥作用，流动相 pH 值也影响溶质保留值。当固载化蛋白质上所带的电荷和样品离子的电荷相反时一般使溶质保留值增加。蛋白质上的电荷与 pI 值有关(表 12.3)，由于固载化的蛋白质电荷分布不均匀，当流动相 pH＝pI 时电荷未必为零。流动相 pH 值增加，色谱柱和酸性化合物的负电荷增加，保留值下降。类似地，增加 pH 值会增加碱性溶质的保留值。为了获得最佳的对映体选择性，蛋白质

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

固定相和样品带正电荷比较有利。因此酸性外消旋物在碱性柱(BSA,HAS)上可获得较好分离,而碱性化合物则在酸性柱(胃蛋白酸,AGP)上可获得较好分离。因为 OVM 和 CBH 的 pI 适中,因此既能分离酸性也可分离碱性化合物。

由于固载化蛋白质本质的复杂性,pH 的影响尽管很大,但难以对其加以预测及系统化研究。如图 12.8 所示,微小的 pH 变化

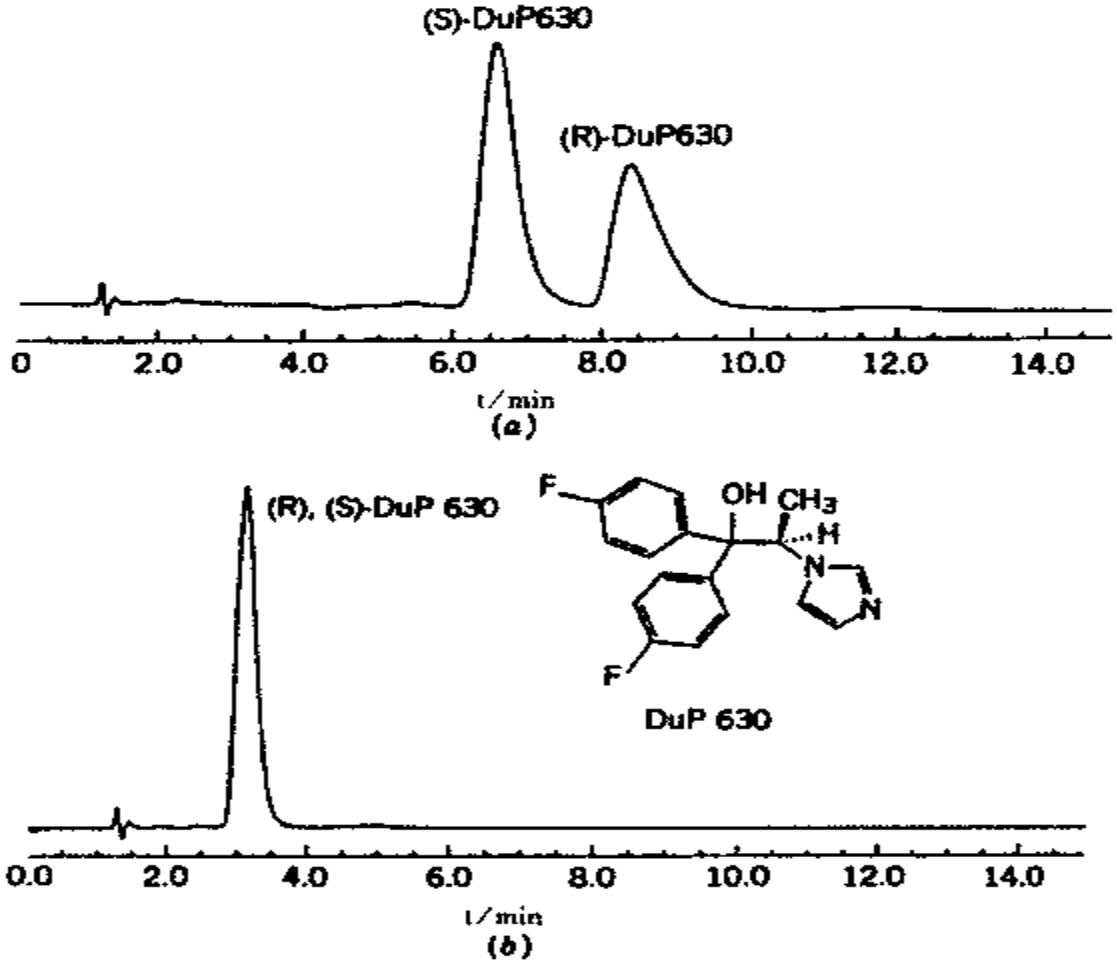


图 12－8　pH 值对对映体分离度的影响[29]

溶质:Dup630;柱:手性 AGP,4.0(1.00mm;
流速:0.9ml/min;温度:30℃;230nm UV 检测。
(a) 流动相 15%2－丙醇－85% 10mM 磷酸钠,pH6.5;
(b)流动相:除 pH5.0 外其他条件同(a)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

可使溶质的保留值产生较大变化。对 AGP 柱，Dup630 对映体在 pH6.5 下完全分离，但在 pH5.0 下却完全重合。一些外消旋物在 pH4 至 5 之间分离，且有机调节剂小于 3%，与在较高 pH(如 7)相比分离效果有明显改善[28,34]。如图 12.9 所示[30]，使用 OVM 柱的对映体选择性随 pH 值的变化而有较大变化，并与样品类型和结构有关。碱性较强的氯屈米的 α 值随 pH 值增加而迅速增加，而另两种碱性较弱的溶质 α 值变化则较小。

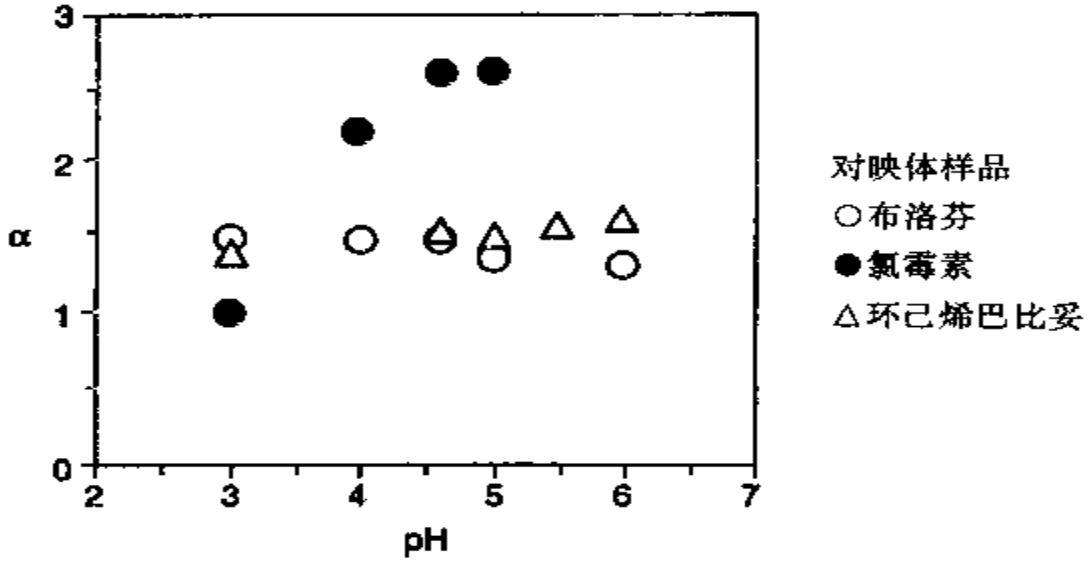


图 12－9 选择性值随 pH 的变化[30]

柱：6.0×150mm Ultron ES－OVM；流动相：20% 乙醇－80% 20mM KH_2PO_4，pH4.6；

流速：1.0ml/min；温度：250℃；220nm UV 检测。

流动相离子强度通常对选择性和保留值影响较小。当溶质与色谱柱所带电荷相反时可发生离子交换反应，提高盐浓度能够使离子交换保留值降低。在盐浓度较高时疏水相互作用使保留值增加，这种影响对于中性溶质尤为明显。因离子相互作用和疏水相互作用或离子排斥效应受离子强度的影响，两种效应重叠时，在某一点可使 α 值极小。缓冲液例子强度大于 0.1M 时，疏水相互作

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

用起主要作用，低于 0.1M 时离子相互作用相对较强。

由于固载化蛋白质性质的相似性，许多相同类型的化合物在 BSA 和 HAS 柱上均可分离。类似地，pH 和离子强度在两种柱中对保留值 k 和 α 值的影响也相似。这些固定相的立体选择性差异反映了两种固载化蛋白质键合亲和力的不同，有时对映体的洗脱次序甚至相反[24]。

离子改性剂可用于进一步控制 AGP、BSA 柱上溶质的保留值和峰间距[21]。这种方法有时用于亲水性强且使用普通流动相时保留较弱的化合物。离子改性剂也可用于改善使用普通流动相难以解决的对映体的分离选择性问题。流动相中的阳离子对改性剂如二甲辛胺和四丁基溴化铵可增加中性、阳离子和阴离子化合物的保留值和对映体选择性。有机阳离子和阴离子改性剂很少用于 OVM 柱[33]。

带电荷的有机调节剂如辛酸或二甲基辛胺对保留值和峰形影响较大。对于一些蛋白质柱，小于 1% 浓度的改性剂即可使对映体选择性产生较大变化。由于带电荷的改性剂难以从固定相中去除，因此在方法建立中一般不使用。在 CHB 柱中，50μm 乙二胺四乙酸二钠作为流动相中的离子改性剂有许多报道[28,35]，也有人推荐采用叠氮化合物作为胃蛋白酶柱的流动相添加剂[32]。

12.2.6 实验参数

12.2.6.1 流动相的影响 任何分离的最佳 pH 都决取于固载化蛋白质的 pI 和消旋体的 pK_a。在 AGP 和 OVM 柱上，如果酸性化合物在低于 pH 6 下分离，碱性化合物在高于 pH6 下分离，通常都能得到较好的对映体选择性。一般可用普通的磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸和类似的缓冲液调节控制 pH 值。浓度为 25mM 或 50mM 的缓冲液能够满足大部分分离的要求，使用浓度高的缓冲液可能使峰形有所改善。

图 12.10 给出了在最佳分离条件下，用 15×0.46cm OVM 柱

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

对三种不同药物进行分离的塔板数与流动相速度关系曲线。由于蛋白质柱 C 项较大(固定相传质速率慢),不同于典型的 RPC 柱塔板数与流速的关系曲线,这些曲线相对更陡,因此流速对 N 和 R_s 的影响更大。使用这类蛋白质柱在较低的流速下(如 0.5~1.0ml/min,15×0.46cm 柱)可获最佳分离效果。

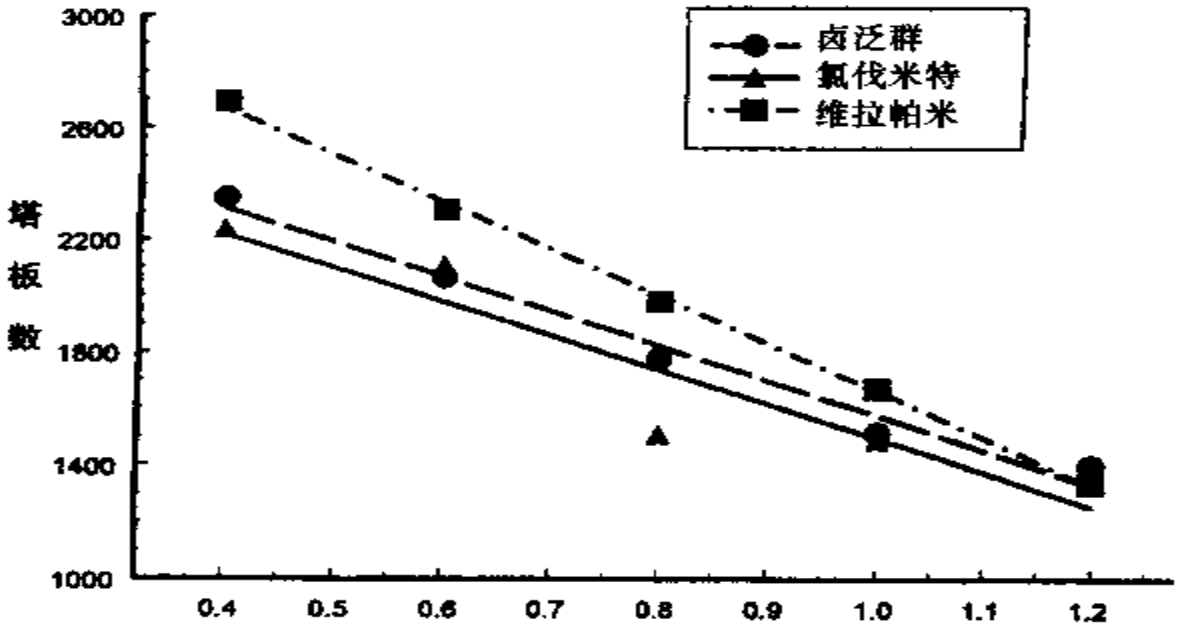


图 12-10　流动相流速对柱塔板数的影响[33]

柱:15×0.46cm Ultron ES-OVM;溶质和流动相(13mM 磷酸盐缓冲剂):卤泛群(Lorglumide),45% 乙腈,pH6.0;氯戊米特,26% 乙腈,pH6.3;维拉帕米,18% 乙醇,pH6.2。

12.2.6.2　样品荷载及进样　对于大部分 HPLC 柱,塔板数与进样量有关。蛋白质柱同其它手性分离类型柱相比具有较低的键合容量,因此这类柱的色谱制备潜力有限。在 0.4-0.5cm ID 柱中,大于 2nmol(0.5-1μg)的进样量将对塔板数和分离度产生不利影响[33,36],因此,进样量不宜过大。蛋白质柱的进样体积可稍大于用于反相分离的典型柱的样品量,原因为蛋白质柱的塔板数小于类似的 RPC 柱的塔板数,峰展宽所允许样品体积较大而不降低

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

分离度。对 15×0.46cm 柱，用于一般分析样品体积为 25 至 100μl。

12.2.6.3　柱温　使用蛋白质柱，柱温通常是方法建立需要考虑的首要问题。对所有蛋白质柱，柱温高通常会降低两种对映体的 k 值。较高温度（如>40℃）可能使一些手性化合物外消旋化，也可能使蛋白质固定相变性。柱效一般随温度增加而增加，而 α 值和保留值 k 随之下降。在许多情况下，随着柱温降低，α 值和保留值显著增加，但实验操作较不便利。较低温度也并非总能改善分离度[37]。

为了获得最大分离度，使用不同蛋白质柱的分离都要考察温度的影响。较高温度的分离会引发一些问题，如图 12.11 碱性药物劳拉西泮的分离所示[37]。在 35℃ 温度下，图 12.11*a* 中发现畸形峰，温度降至 10℃，在图 12.11*b* 中两峰分开。在 10℃ 和 35℃ 下，两对映体峰的基线升高可能是由于手性异构体之间的相互转变所致，在分离过程中高温可能导致严重的异构体互变[38]，随着温度的变化和 α 值也都可能有较大变化。对蛋白质柱需精确控制柱温以保证良好的分离重复性。如可解离化合物的反相及离子对分离(7.4)，柱温最好控制在 ±1℃ 以内(7.4 节)。

12.2.6.4　柱型　短小、低廉的蛋白质柱(10～15cm)由于其内在的高选择性适宜于多种分离，尤其是内径为 0.4 至 0.6cm 的蛋白质柱对于分析分离和纯化少量对映体最具实效。一些色谱工作者喜欢使用小 ID 柱(如 0.2cm)，尽管进样量有限，但可降低溶剂消耗。粗柱（如 2cm）较昂贵，可用于分离大量纯品。由于样品荷载量有限，蛋白质柱基本上只适用于分析，但有效的半制备应用也是可能的。例如，有人[36]使用 2.0cm ID OVM 柱分离并获得毫克级纯药物对映体。

12.2.6.5　柱维护及稳定性　用户应严格遵循制造商提供

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

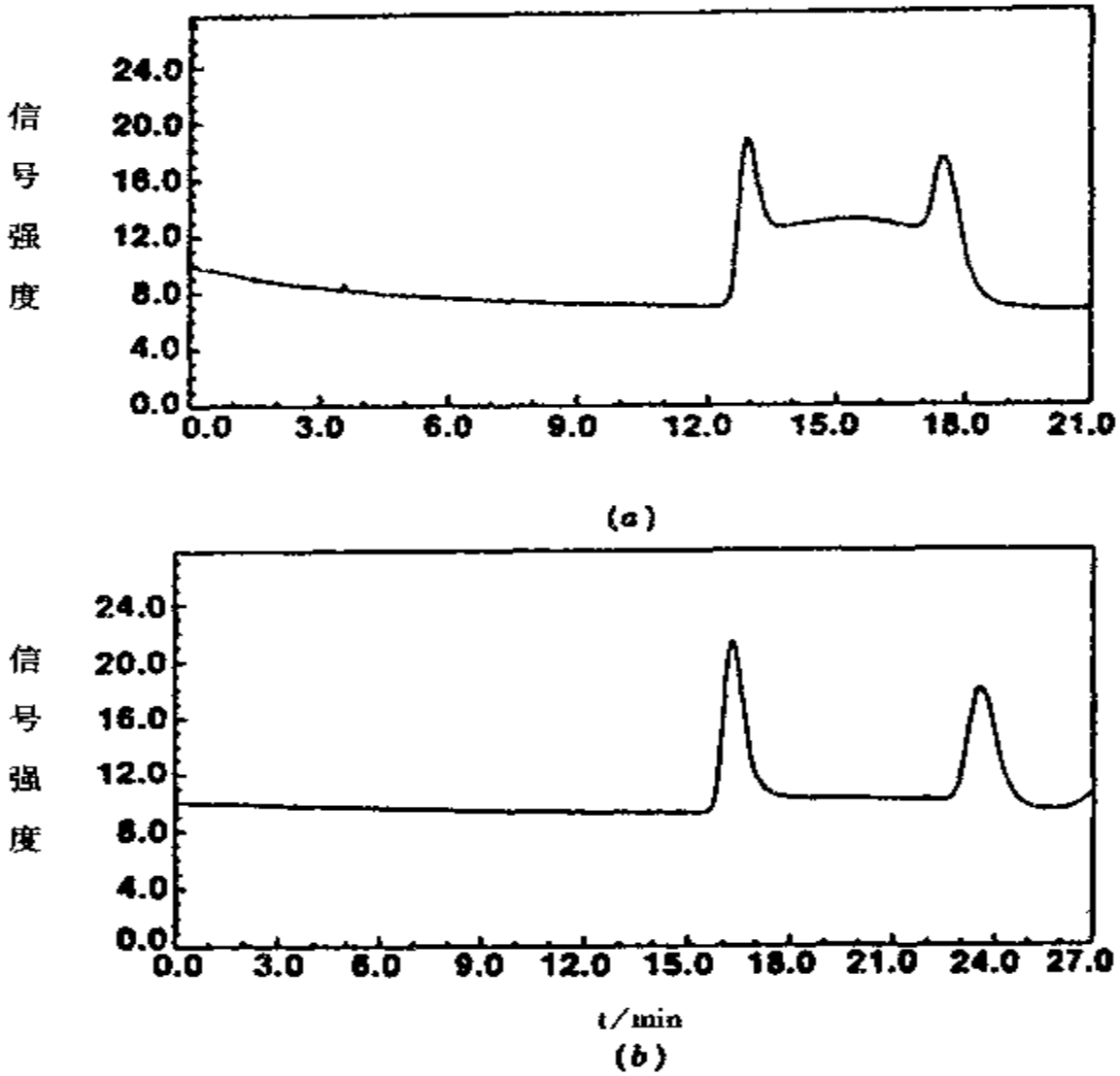


图 12－11　柱温对劳拉西泮对映体分离的影响[37]

柱：6.0×150mm Ultron ES－OVM；流动相：12% 乙腈－88% 10mM 磷酸缓冲剂，pH6.0；

流速：1.0ml/min；UV 检测：228nm。(a)350℃；(b)10℃。

的有关有机调节剂类型和浓度的建议(如表 12.5)，否则可能会导致柱失效。避免使用含有强保留性组分的样品，建议使用方便、廉价的手性预柱对昂贵的分析柱加以保护。由于柱污染而出现峰形变差时可用由制造商指定的 20 至 40 含柱体积的最强溶剂冲洗

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

使其恢复。蛋白质柱经长时间储存后，应进行彻底淋洗以除去缓冲液，然后将其浸泡入适合的溶剂中。例如，OVM 柱适宜储存在 10% ~20% 乙腈/水流动相中，一些制造商推荐将蛋白质柱在低温下储藏以延长其使用寿命[32]。

蛋白质柱的稳定性和使用寿命取决于蛋白质本身的性质和柱的使用方法，在较细心维护的情况下，一根蛋白质柱一般可以使用 500 次以上。OVM 和 AGP 柱由于其蛋白质内在的高稳定性，通常比其它蛋白质柱的耐用性好。已有的研究证实[20, 24, 28, 31, 33, 39]：可以在适宜的操作条件下，采用蛋白质柱发展普适的分析方法。

12.2.7 应用及特殊技术

蛋白质手性柱的一个明显优点是很少需要对外消旋体衍生化，即可获得足够大的对映体分离度。中性、碱性、酸性化合物通常可直接进样而不需预处理。根据文献报导，OVM 和 AGP 柱可分离多种外消旋物。在分离外消旋样品的固载化蛋白质柱中，OVM 和 AGP 分离效果较好，尤其是对合成药物和具有农业推广价值的化合物。固载化蛋白质的 OVM 柱通常具有较高的分离度，操作参数灵活，与 AGP 柱相比长期稳定性好，已成为手性分离的首推固定相[29, 33]。

同 AGP 相比，对于大约 80% 的中性、碱性、酸性化合物在 OVM 柱上都可进行较好的分离[29,33]。图 12.12 为使用 OVM 柱分离弱碱性——几乎中性的维拉帕米、碱性卤泛群、酸性氯戊米特外消旋体的结果。强疏水性药物卤泛群，需要 45% 乙腈作为流动相进行洗脱，表 12.8 列举了一些可分别用 OVM 柱、AGP 柱分离的对映体化合物。文献 24，28，35 和 40 中也分别给出了 BSA 和 CBH 柱的一些应用。制造商可提供每种类型固载化蛋白质柱的应用研究结果。

应避免样品中含有生物样品提取液等保留性强的物质。同其

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

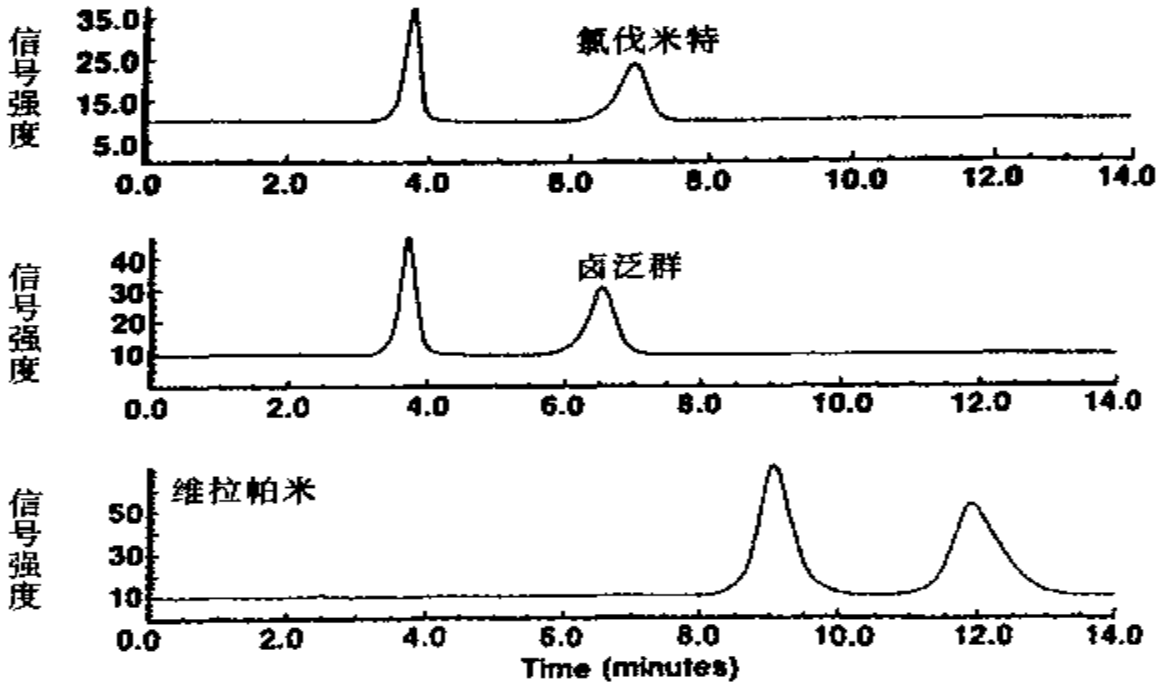


图 12－12　酸、碱和近中性对映体的优化分离[33]

样品：每种均为 0.025mg/ml；柱：4.6×150mm Ultron ES－OVM；
流速：1.0ml/min；温度：室温；UV 检测，270nm，
酸性：氯戊米特：26% 乙腈－74% 10mM 磷酸缓冲液，pH6.5，
碱性：卤泛群：45% 乙腈－55% 10mM 磷酸盐缓冲液，pH5.5
弱碱性维拉帕米：18% 乙醇－82% 10M 磷酸盐缓冲液，pH6.2。

表 12－8 用 Ultron ES－OVM 拆分对映体[30]

物　质	流动相	R_S
苯丁洗脲	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/7.5, v/v)	2.74
阿利马秦	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/25, v/v)	6.06
Bay K 8644	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/25, v/v)	5.92
苯丙哌林	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/20, v/v)	3.27
安息香	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	8.41
比哌立登	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	3.17
布民洛尔	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/3, v/v)	3.08
布比卡因	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/10, v/v)	1.26
氯美扎酮	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	6.48
氯苯甘醚	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)	2.23

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

物　　质	流动相	R_S
扑尔敏	20mM 磷酸盐缓冲液(5.0)－乙腈(100/5, v/v)	2.36
氨丙那林	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/3, v/v)	2.34
氯哌斯汀	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/15, v/v)	2.85
二甲茚定	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/15, v/v)	4.33
1,2-二苯乙胺	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)	1.74
丙吡胺	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/10, v/v)	2.04
乙哌立松	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/5, v/v)	1.15
乙噻嗪	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)	1.42
氟比洛芬	20mM 磷酸盐缓冲液(5.0)－乙醇(100/30, v/v)	1.26
格鲁米特	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	1.36
格隆溴铵	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)	1.73
海索比妥	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/5, v/v)	1.70
高氨环秦	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	3.04
羟嗪	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/15, v/v)	2.15
布洛芬	20mM 磷酸盐缓冲液(3.0)－乙醇(100/10, v/v)	1.73
酮洛芬	20mM 磷酸盐缓冲液(3.0)－乙腈(100/10, v/v)	1.37
美克洛嗪	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/35, v/v)	3.71
溴美喷酯	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)	1.40
甲苯比妥	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	1.70
哌醋甲酯	20mM 磷酸盐缓冲液(5.7)	1.13
氧烯洛尔	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/10, v/v)	1.38
吲哚洛尔	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/3, v/v)	2.04
普拉洛芬	20mM 磷酸盐缓冲液(3.0)－乙腈(100/8, v/v)	1.01
普尼拉明	20mM 磷酸盐缓冲液(5.0)－乙醇(100/15, v/v)	1.02
普罗吩胺	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/25, v/v)	3.31
丙谷胺	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/20, v/v)	1.32
异丙嗪	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/20, v/v)	0.98
普萘洛尔	20mM 磷酸盐缓冲液(6.8)－乙腈(100/30, v/v)	1.24
硫利达嗪	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙腈(100/10, v/v)	0.98
托哌酮	20mM 磷酸盐缓冲液(5.5)－乙醇(100/10, v/v)	1.50
苯海索	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/10, v/v)	5.16
曲米帕明	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/30, v/v)	3.69
维拉帕米	20mM 磷酸盐缓冲液(4.6)－乙醇(100/5, v/v)	1.49

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

它分析 HPLC 柱相比，蛋白质柱比较昂贵。大部分色谱工作者更喜欢使用蛋白质柱分离，如药物制成品或药物中间体等“纯”样品。含有浓度较高的无关化合物(如从动物器官内提取的药物代谢物)的样品一般不能直接进样，以免阻塞蛋白质柱。通常先将外消旋体反相分离，然后将预分离的组分注入具有不同选择性的蛋白质手性柱再进行分离。此方法在图 12.13 中用于跟踪分析人血浆中的

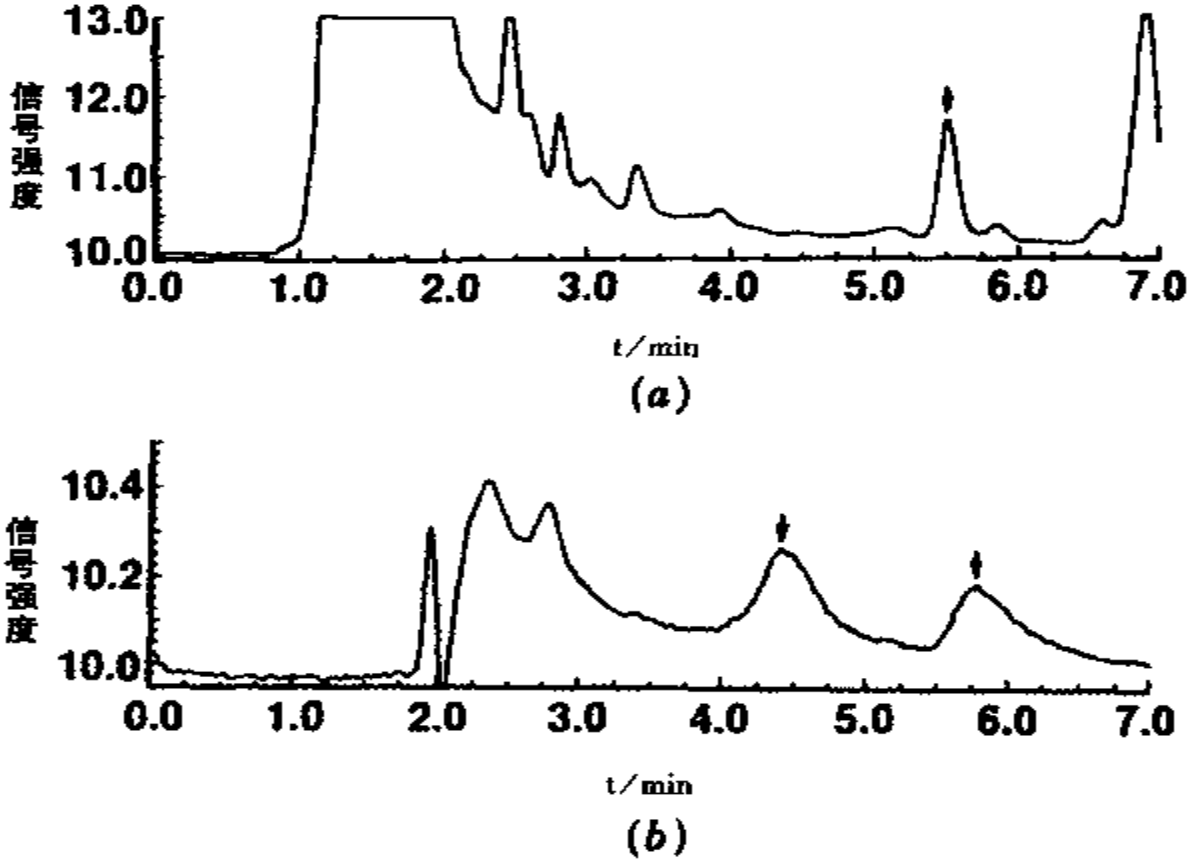


图 12－13　人血浆非手性/手性跟踪分析[33]

(a) ICI－2 的非手性分离。柱：4.6×250mm Zorbax Rx－C_8；流动相：50%乙腈/50%水；

流速：1.3ml/min；

(b) ICI－2 的手性分离。柱：4.6×150mm Ultron ES－OVM；流动相：15%乙腈－85% 10mM 磷酸盐缓冲液，pH6.0；

流速：1.0ml/min；对映体由箭头指出。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

毒品。12.13a 为含药物外消旋体的非手性分离，图 12.13b 为对映体(每种 20ng)的分离结果。同理，这种高灵敏度的分析也适用于对映体的药化动力学监测。由于手性柱柱效总体上低于反相柱，因而非手性/手性方法倍受青睐。复杂样品的直接进样也增加了峰重叠的可能性,导致较大的分析误差。

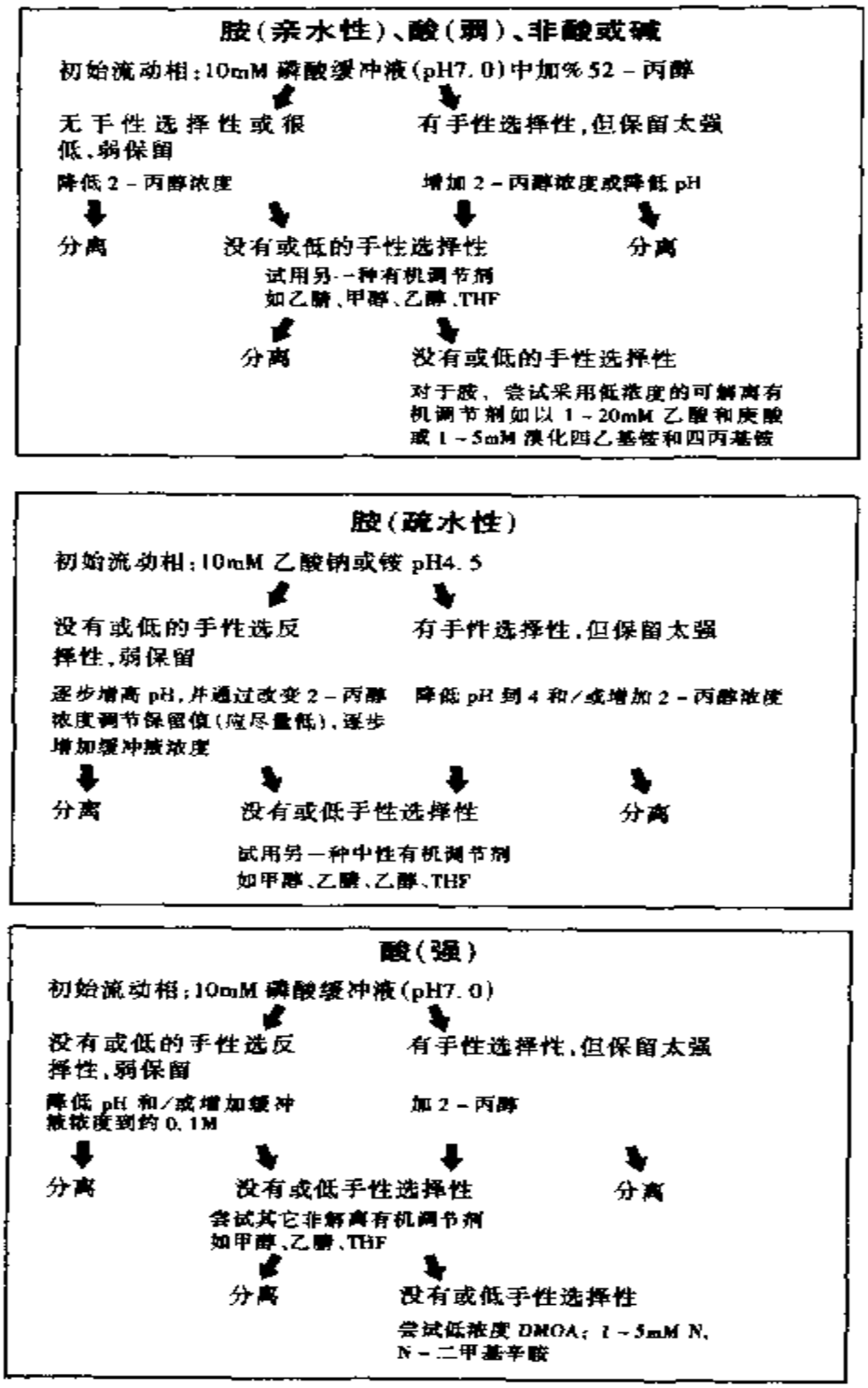
12.2.8 系统方法的建立

如前而所述,使用蛋白质柱分离对映体,其保留值和选择性可通过改变有机调节剂的类型、浓度、pH、离子强度和温度来控制。当使用这些柱进行方法建立时会产生诸如色谱柱、初始分离操作参数选择等问题。用途广泛、稳定性良好[29,33]的 AGP 及 OVM 柱在建立对映体分离方法时倍受欢迎,但如果使用 OVM 和 AGP 柱不能成功分离,可尝试采用 HAS 和 BSA 柱分离酸性对映体,或 CBH 和 PEP 柱分离碱性化合物。

由于蛋白质柱间差异较大,因此难以将最佳操作条件一般化。开始时采用 pH5 至 7 的 10mM 磷酸缓冲液并加入适量的 1－或 2－丙醇(或乙腈)一般可得到满意的 k 值(参阅表 12.5 蛋白柱推荐的 pH 值范围)。如果分离效果不佳,先改变 pH 值调整理想的对映体分离度,如果 pH 调节仍得不到理想的分离,则应考虑改变有机调节剂类型。使用新有机调节剂后,仍可通过调节 pH 来增加分离选择性。

已建立了一些蛋白质柱的优化方案。图 12.14 为 AGP 柱的一种方法建立方案,这种方法较以前的一般化方法更为系统,也可用于其他几种蛋白质柱的条件选择。对 HSA 和 CBH 柱也提出了类似的方案[28],此外,已有文献给出了 OVM 柱的方法建立方案[37],图 12.15 为使用 OVM 柱分离药物更为简单的包括了温度变化的条件选择策略。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



采用 AGP 手性柱的方法建立首先应根据样品结构将其归类，然后选择相应的方法建立策略

1. 胺
   a. 亲水性
   b. 疏水性
2. 酸
   a. 弱
   b. 强(羧酸)
3. 非酸或碱

图 12－14　采用 APG 手性柱进行分离流动相组成调节的优化策略

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

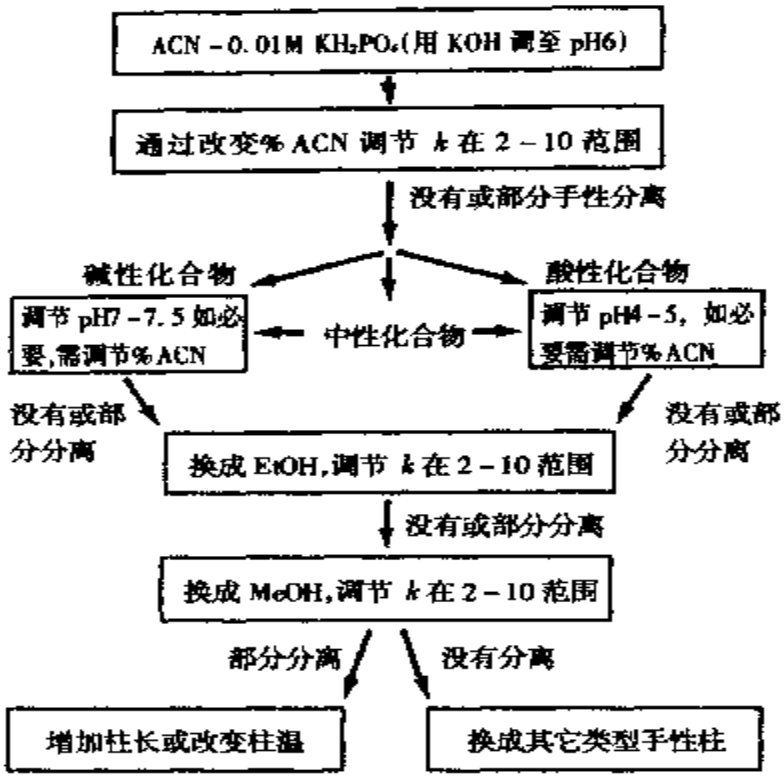


图 12－15

12.3 多聚糖(碳水化合物)柱

12.3.1 引言

多聚糖类化合物的分子结构特征是其在手性分离柱方面得到广泛应用的基础。多聚糖尤其是纤维素和直链淀粉的衍生物具有作为 HPLC 固定相的良好性质。这些化合物的商品柱已广泛用于多种对映体的分析和制备分离。大多数这种类型的色谱柱只能用于正相分离模式,仅有少量适宜于使用水溶液流动相的反相分离模式。

12.3.2 商品化多聚糖固定相的性质

一些用于手性分离的多聚糖柱的性质被列于表12.9中。这些柱子不仅可以用于对映体的大量纯化分离,也可用于一般的对映体混合物分离分析工作。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 12－9 用于手性分离多聚糖柱性质

优　　点	缺　　点
高样品荷载容量，适用于制备分离	有多种柱型可供选择，以致于难于确定最好以哪一种开始实验
采用易去除的有机溶剂，使纯化过程简化	大多数柱对水敏感，样品和溶剂中不应含水
可用于含有多种类型组分样品的分离，应用范围广	柱效中等（通常低于蛋白质柱）

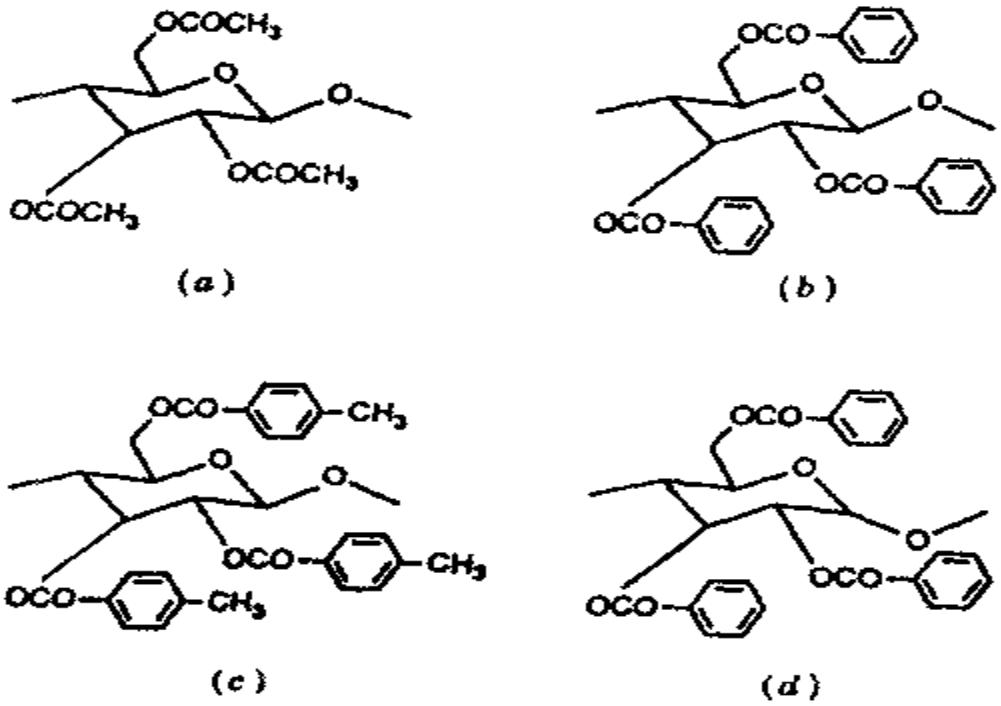


图 12.16　利用不同官能团衍生化的纤维素和直链淀粉作为手性柱聚糖固定相[43]

(a) 三乙酰纤维素；(b)三苯甲酸纤维素(Chiralcel OB)；
(c)三－(－4－甲基苯甲酸)纤维素(Chialcel OJ)；(d)三苯甲酸纤维素。

12.3.2.1　一般性质　微晶纤维素三乙酸酯(MCT)是最早发展起来的手性 HPLC 分离的柱填料之一[41]，但这种材料制成的色谱柱柱效不高，所以没有由机械性能良好的硅胶担体制成的其它类多聚糖柱应用广泛。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

图 12.16 所示结构的纤维素和直链淀粉的衍生物为有效的手性分离固定相。多聚糖结构的差异，例如，纤维素的线性结构和直链淀粉的螺旋结构，是对映体选择性差别的重要原因。各种商品化纤维素和直链淀粉衍生物柱通过在硅胶担体表面涂膜制成。与聚合物固定相颗粒相比(如纤维素三乙酸酯)，表面涂膜的固定相具有更高柱效，同时也增加了流动相溶剂的选择范围(12.3.4.1 节)。

12.3.2.2　效用　如表 12.10 所示，许多多聚糖衍生物商用手性柱可用于手性分离。表 12.11 也给出了用于改变不同结构对映体手性识别的固定相官能团。纤维素(如 Chiracel OD, OJ)和直链淀粉(如表 12.10 和 12.11 中的 Chiralpak AD)的氨基甲酸盐和苯甲酰酯衍生物(如在表 12.10 和 12.11 中 Chiralpak AD)对许

表 12－10　多聚糖手性柱[57]

吸附剂类型	色谱柱的商品名	使用的温度范围(℃)	样品合适的色谱柱[b] A	B	C	D	E	F
直链淀粉氨基甲酸酯	Chiralpak AD	0－40	X	X		X		X
	Chiralpak AS	0－40	X	X		X		X
纤维素氨基甲酸酯	Chiralcel OC	0－40						
	Chiralcel OD	0－40	X	X		X		X
	Chiralcel OD－H	0－40						
	Chiralcel OD－R	0－40						
	Chiralcel OF	0－40						X
	Chiralcel OG	0－40						X
纤维素酯	Chiralcel CA－I	0－40						
	Chiralcel OA	0－40				X		X
	Chiralcel OB	0－40				X		X
	Chiralcel OB－H	0－40						
	Chiralcel OJ	0－40						X
	Chiralcel OK	0－40						

[a] 最大柱压为 700psi；但一般柱压为 430psi 以延长柱子寿命。

[b] A，脂肪族，但非脂肪环；B，脂肪环，但不包括环烷酮或内酯；C，脂肪环或环烷酮或内酯；D，不含其他官能团的芳香类；E，芳香类或酯；F，具有其他官能团的芳香类。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

多手性分离都很有效，尤其是对医药和农药的分离。此种柱型具有多种功能性，常用于改变对映体选择性。当以正相色谱(NPC)模式使用这些柱时，因不宜改变 pH，选择性的改变经常需通过改变柱类型，而不宜改变流动相特性实现。

表 12－11　商品化多聚糖手性柱[43]

多聚糖衍生物	商品名	销售商
微晶纤维素三乙酯酸	Chiralcel CA－1 纤维素三乙酯酸 纤维素 Cel－AC－40XF	Daicel Merck Macherey－Nagel
纤维素三乙酯酸[a]	Chiralcel OA	Daicel
纤维素三苯甲酸盐[a]	Chiralcel OB	Daicel
纤维素三苯氨基甲酸盐[a]	Chiralcel OC	Daicel
纤维素三－3,5－二甲基苯氨基甲酸盐[a]	Chiralcel OD Chiralcel OD－R	Daicel Daicel
纤维素三－4－氯苯氨基甲酸盐[a]	Chiralcel OF	Daicel
纤维素三－4－甲基苯氨基甲酸盐[a]	Chiralcel OG	Daicel
纤维素三－4－甲基苯甲酸盐[a]	Chiralcel OJ	Daicel
纤维素三肉桂酸盐[a]	Chiralcel OK	Daicel
直链淀粉三－3,5－二甲基苯氨基甲酸盐[a]	Chiralpak AD	Daicel
直链淀粉三－(S)－1－苯乙基氨基甲酸盐	Chiralpak AS	Daicel

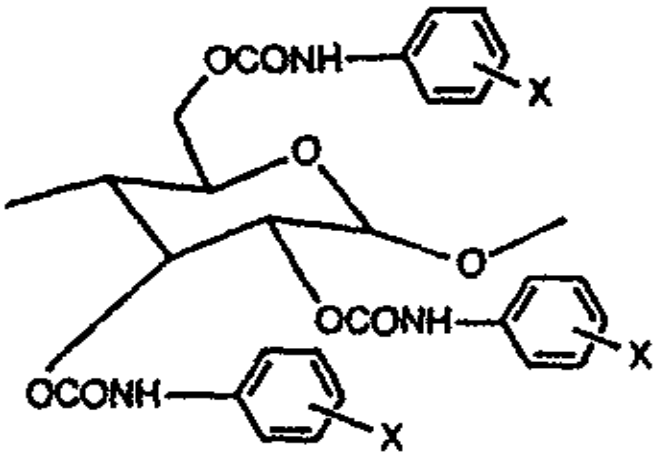
[a] 涂在硅胶担体上

线性纤维素衍生物为大多数多聚糖固定相的基础，图 12.17 和 12.16d 中的螺旋直链淀粉衍生物能够提供多种不同选择性。直链淀粉的三－3.5－二甲基苯氨基甲酸盐衍生物(Chiralpak AD，表 12.10 和 12.11)有较高的对映体选择性。人们正致力于合成新型、具有不同官能团、应用更为广泛的多聚糖衍生物。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.3.3 手性分离机理

多聚糖手性柱的保留过程复杂，至今仍不甚清楚。使用该类手性柱的分离通常采用有机溶剂的正相模式，因此极性较强的溶剂使溶剂强度（如在正己烷中增加丙醇含量）增加。衍生化多聚糖的官能团、聚合物的平均分子量及其分布、将聚合物附着在担体上的溶剂、担体本身性质[44]等因素在保留过程中起着重要作用，多聚糖衍生物的结晶度也影响到手性识别。



Amylose phenylcarbamates

X =

37: 3,5-$(CH_3)_2$

38: H　39: 3,5-Cl_2

图 12－17　取代的苯基氨基甲酸酯衍生物[43]

其中：X = H, 3, 5－$(CH_3)_2$ 或 3, 5－Cl_2

多聚糖酯及其氨基甲酸盐衍生物的固定相（表 12.10）中，衍生物的特殊官能团有可能参与手性相互作用。苯甲酰酯衍生物的分离包括与羰基的偶极一偶极相互作用和与具有羟基或胺基化合物的氢键作用[45,46]。苯基氨基甲酸盐取代多聚糖的对映体选择性受苯基上的取代基影响。通过不同的偶极作用，溶质芳环上的不同取代基可产生不同的识别能力[47]。有 m－甲氧基或 m－硝基吸电子基团时表现出弱的手性识别，而在 3 或 4 位有甲基等给电子基团时则表现出较高的手性识别能力。具有极性基团的外消旋物可能会与氨基甲酸盐官能团通过氢键发生作用。例如，图 12.18 具有羟基（或 N－H）基团的对映体可能与氨基甲酸盐固定相的羰基相互作用，并且羰基会与氨基甲酸盐的 N－H 基团相互作用（图 12.18 的三维部分）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

多聚糖固定相分离对映体不需再结合特殊的官能团，而其它一些固定相的手性分离则经常是必需的[47]。多聚糖固定相能够分离只含一个羰基的样品（如反－1－癸醇（6－1－2）[47]）。正如前面所述，此类分离可能需要一个手性空穴。只有醇或氨基而没有其它官能团的脂肪族化合物需通过酰化或甲氨酰化作用后才能分离，如有其他官能团，尤其是芳香基团时无需衍生化就可分离。如果待测物不与手性固定相相互作用，形成乙酰、苯甲酰－、苯氨羰基衍生物或许能进行满意分离，尽管芳香取代基通常可改善分离，但对多聚糖柱不需这类基团（表 12.10）。有时衍生化并不是必需的，多聚糖固定相不需衍生也可进行大部分分离。

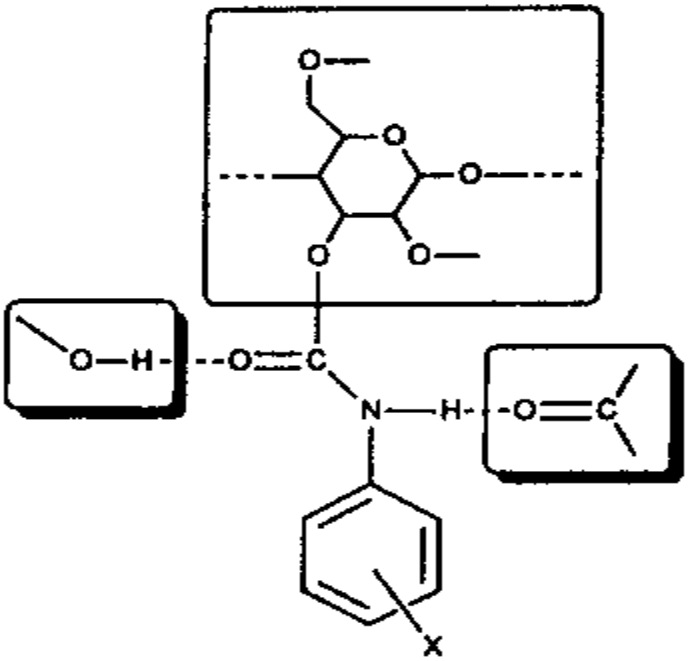


图 12－18　外消旋物与纤维素氨基甲酸盐衍生物的相互作用示意图[43]

结构表示用取代的苯基氨基甲酸盐衍生化的独立葡萄糖单位。

外消旋化合物上的羟基可与氨基甲酸盐羰基或具有 N－H 基的氨基甲酸盐羧基相互作用。

多聚糖结构的手性空穴与对映体的立体匹配直接影响到分离效果，利用这种效应可以将脂肪族对映体拆开[48]。对于具有极性取代基的化合物，氢键和偶极相互作用有助于分离，刚性溶质分子并不比柔性溶质分子容易分离[49]。如上面所提到的，纤维素衍生物为大部分多聚糖固定相的基础，直链淀粉衍生物（图 12.10）可提供不同的对映体选择性。图 12.19 中对萘丁乐对映体（共四种化合物）的分离说明了这一性质。具有线性结构的纤维素

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

OD 只能将萘丁乐分为两个峰。而具有螺旋结构和同样的 3.5－二甲基苯基氨基甲酸盐硅胶担体的直链淀粉 Chiralpak AD 可将其分为四个峰[50]。这可能是由于纤维素和直链淀粉间的不同结构所致。

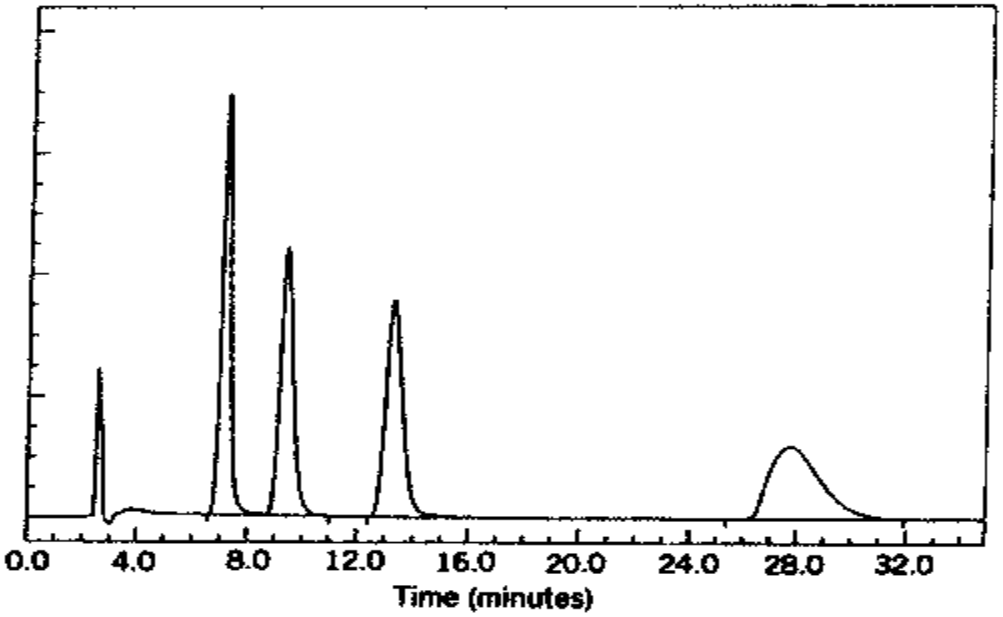


图 12－19　采用正相模式分离萘丁乐四种立体异构体[50]

柱 25×0.46 cm Chiralpak AD, 10(m; 流动相：己烷－乙醇－二乙基胺 80: 20: 30;

流速：1.2ml/min; 温度 23℃；样品：约 2mg/ml 25μL 的乙醇溶液

使用反相溶剂的色谱方法已经出现(如表 12.10 中 Chiralcel OD－R)。这类柱使用典型的反相溶剂(6.2.1 节)，溶剂强度随着极性减弱而增加。使用此类柱的经验较少，尚无法预测分离效果的规律性。

12.3.4　实验参数

12.3.4.1　流动相的选择　含有少量醇类(如 2－丙醇)的己烷为涂渍多聚糖填料的首选流动相。图 12.20 为使用该流动相拆分药物化合物对映体的实例。微晶纤维素三乙酸酯柱一般使用较强的流动相，通常为乙醇或含有乙醇的己烷。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

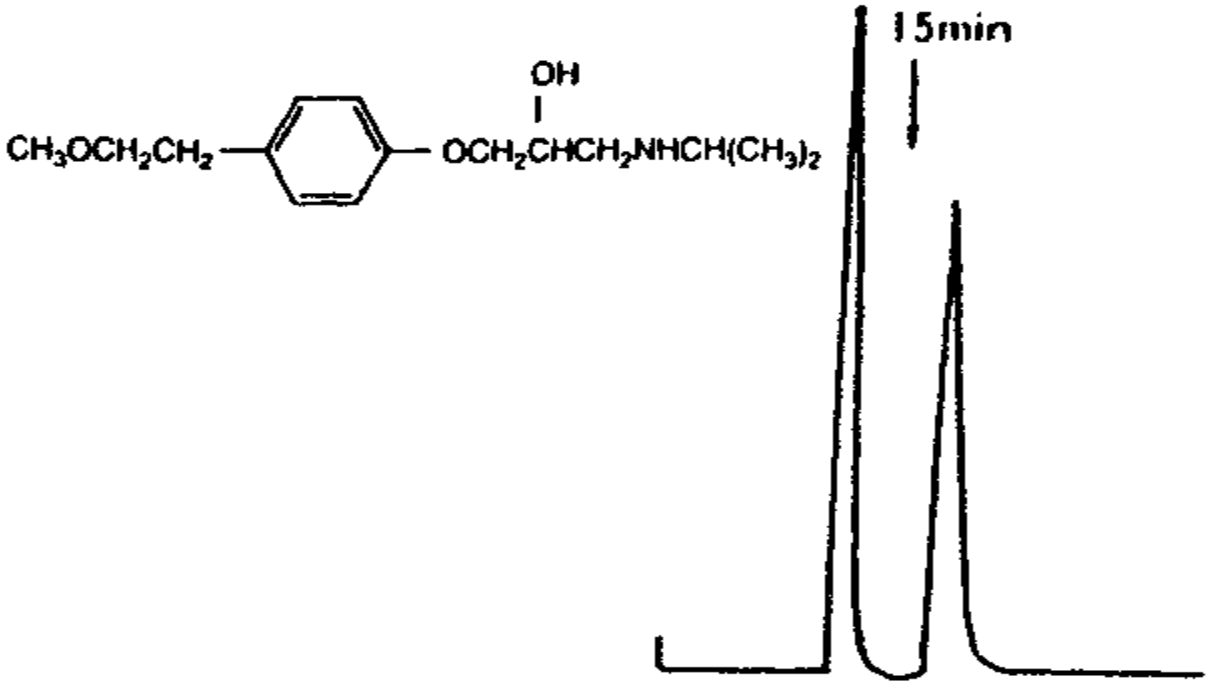


图 12－20　美托洛尔(metoprolol)对映体的分离[52]

柱：25×0.46cm Chiralcel OD；流动相：80:20:0.1；己烷－2－丙醇－二乙基胺；

流速：0.5ml/min；检测：254nm

各种多聚糖柱推荐使用的流动相溶剂及浓度列于表 12.12 中，应谨慎使用可溶解并使多聚糖衍生物溶胀的溶剂（如丙酮、乙腈、四氢呋喃）。与一般正相分离相同，增加极性调节剂浓度，使溶质保留值降低。手性 RPC 和 NPC 分离，通过向流动相中加入 10 至 50mM 的碱性有机调节剂如二甲基胺或三乙胺可使峰拖尾改善。

提高醇的含量可导致涂渍柱填料分离对映体的 α 值增加。图 12.21 表明随着分子量和醇体积的增加，在 Chiracel OD 柱上手性酯的分离度也增加。t－丁醇的 α 值最大，采用分子量大的醇作为流动相可降低其与修饰的纤维素固定相的氢键相互作用，对竞争手性活性位点的化合物提供较高的对映体分离度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

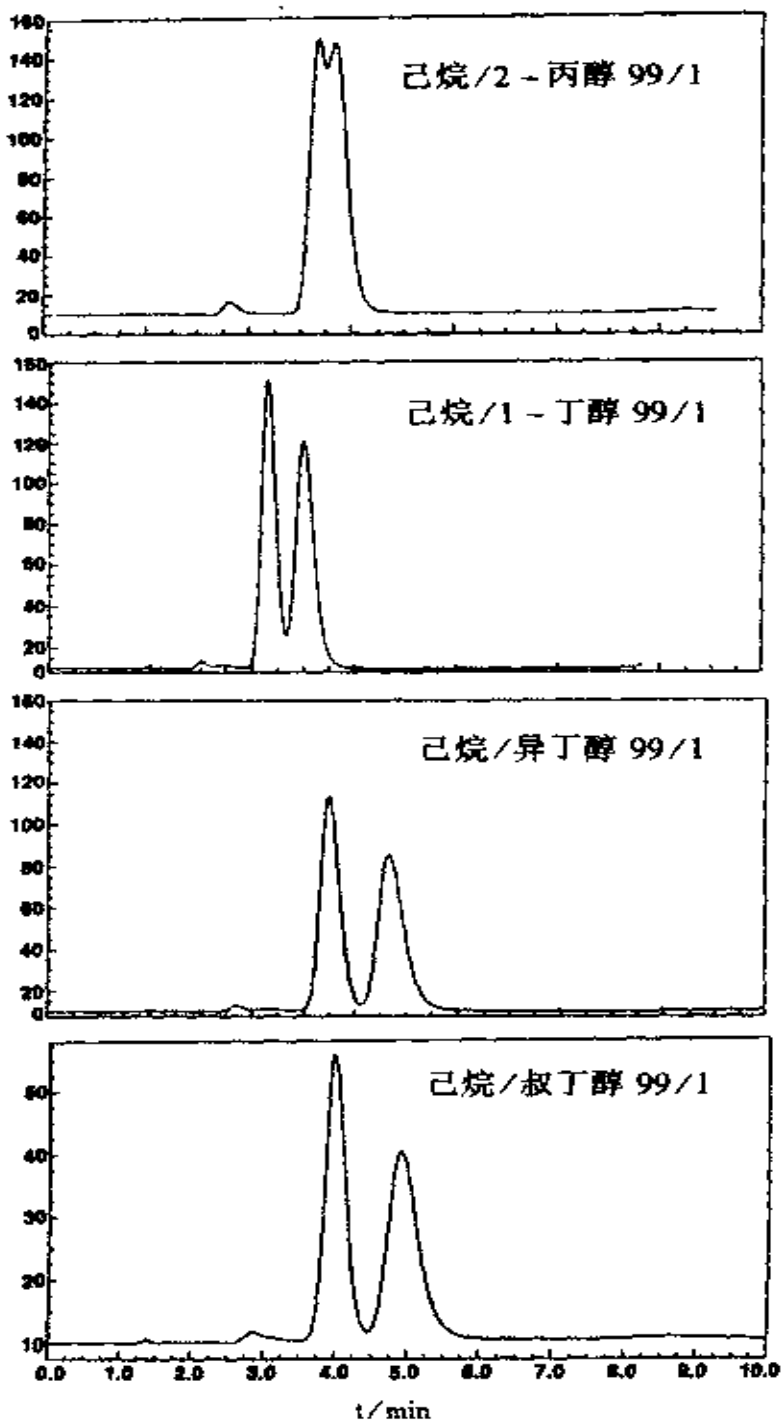
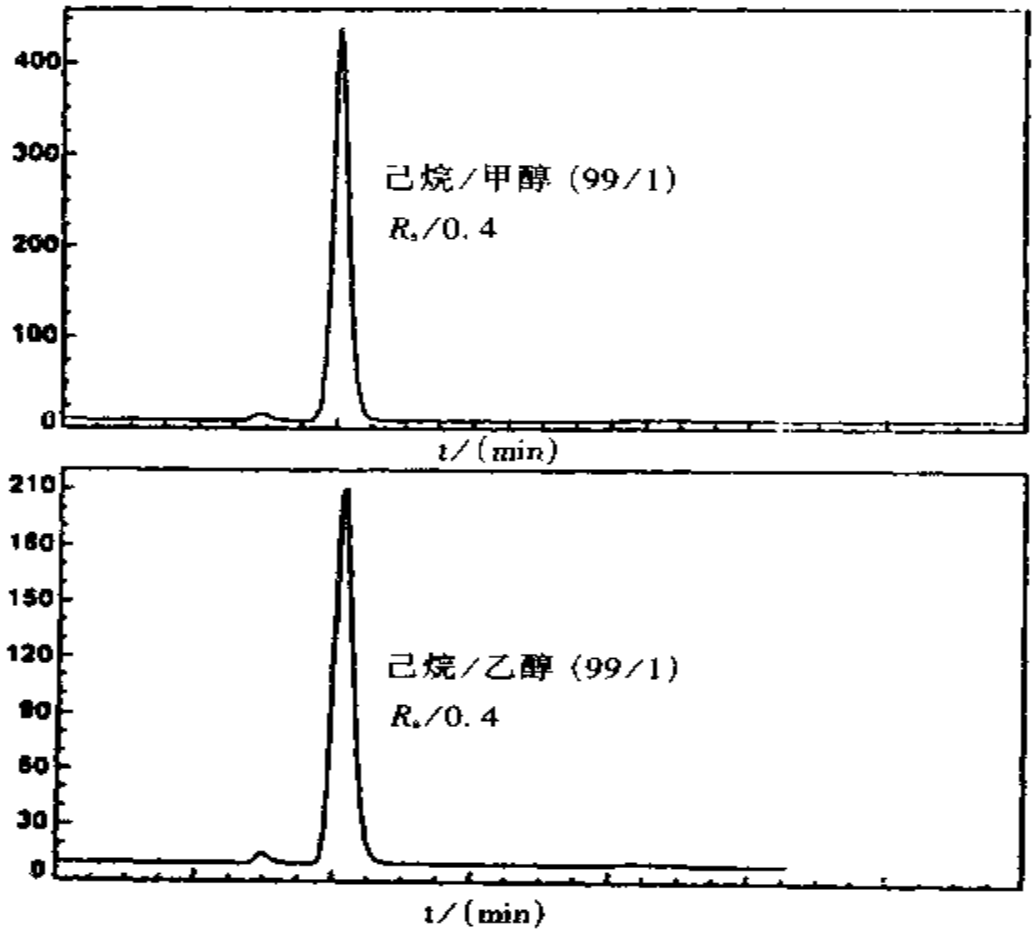


图 12－21　醇调节剂类型对手性酯分离度的影响[52]
条件同图 12.20

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

质子惰性溶剂可与某些纤维素柱共同使用，以增加手性选择性[52]。同广泛使用的醇调节剂相比，质子惰性流动相降低了溶剂对手性固定相氢键位置的竞争力。质子惰性调节剂的使用增加了溶质在位点（包括氢键位点）的作用能力。甲基－叔－丁醚、二氯甲烷、乙酸乙酯调节剂可较好分离一些对映体。根据现有经验，乙腈和四氢呋喃不能得到理想的结果[52]。图 12.22 说明了使用 Chiralcel OD 柱，质子惰性溶剂作为流动相对分离的影响。质子惰性溶剂二氯甲烷和乙酸乙酯具有很高的手性酯分离度，在所有试验过的溶剂中二氯甲烷的柱效最高（如图 12.20 所示）。需要指出的是：分离度的改善使保留值由使用醇调节剂时的 $\alpha \approx 1$ 增加到使用质子惰性流动相调节剂的 $\alpha = 2$。



PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

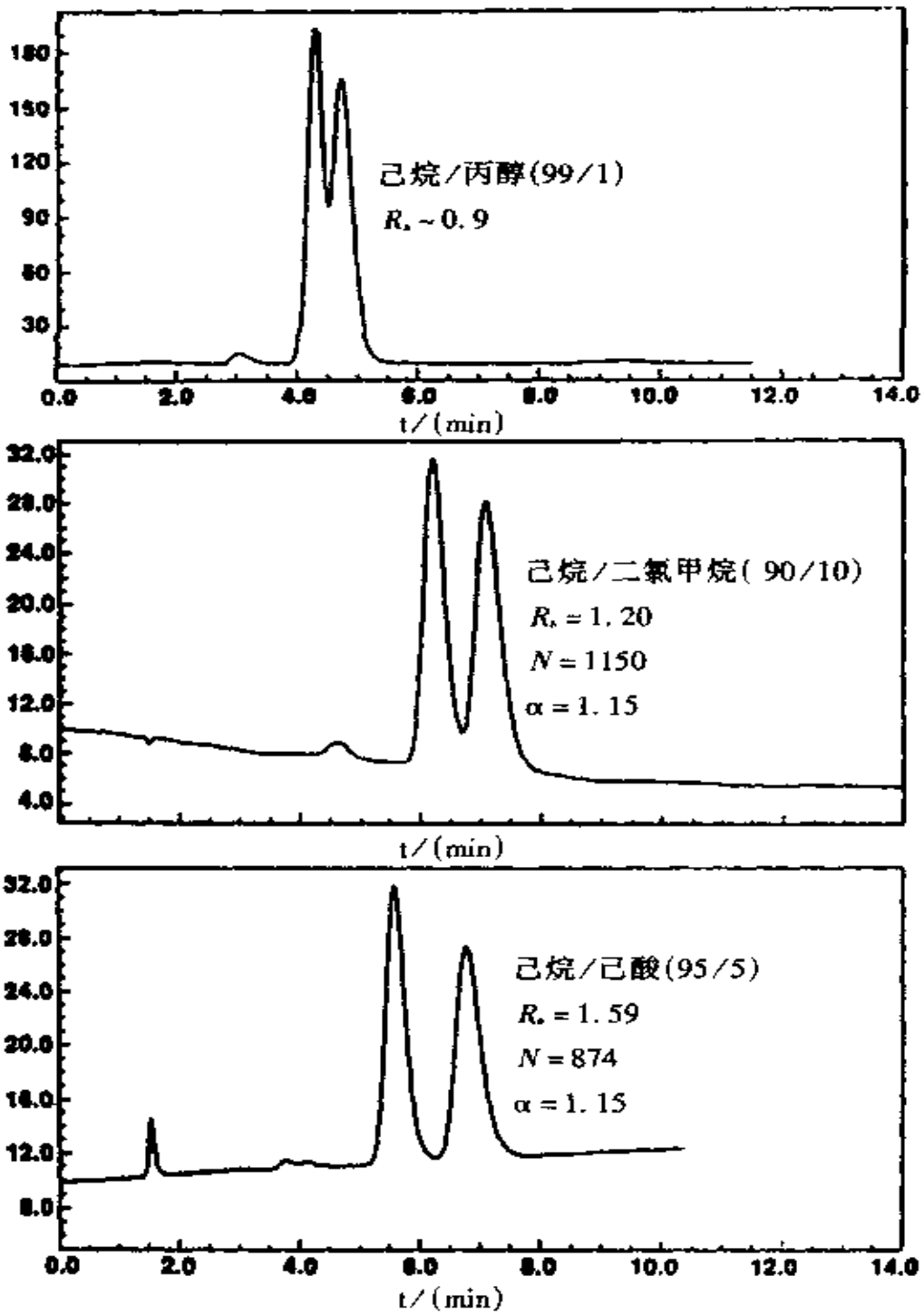


图 12－22　质子流动相调节剂对手性酯分离的影响[52]

柱：5×0.46cm Chirlcel OD；流速：0.5ml/min；温度：室温；UV 检测

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

制造商建议多聚糖柱使用加入醇调节剂的己烷流动相，且不会对色谱柱稳定性造成影响，然而根据参考文献 52 的结果，只有某些质子惰性溶剂（高达 50% 的甲基－叔－丁醚、30% 四氢呋喃、10% 二氯乙烷和 10% 乙酸已酯）用于 ChirLcel OD 柱才不会出现稳定性问题，有关纤维素柱的溶剂限制可参阅表 12.12。

纤维素柱，Chirlcel OD－R 也可采用水/有机调节剂流动相，甲醇、乙腈、高氯酸和高氯酸钠水溶液都可用作流动相。如流动相中缓冲液<1.0M 时，推荐的 pH 值范围为 2～6（表 12.11）。此类柱的应用较少，但图 12.23 中的分离表明这类柱对于在反相条件下分离极性较强的样品具有潜力。

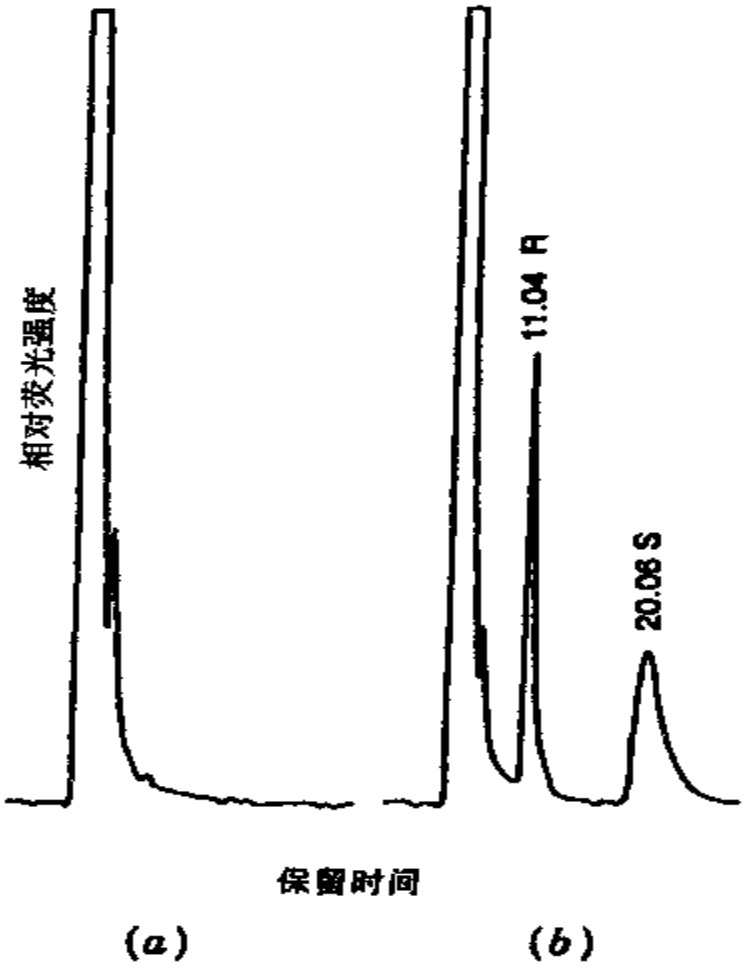


图 12－23　使用反相纤维素柱分离尿中吲哚洛尔(pindolol)对映体[63]

柱：25×0.46cm Chiralcel OD－R；流动相：40% 乙腈－60% 0.3M 高氯酸钠；流速：0.5ml/min；温度：230℃；荧光检测，Uex：270nm，Uem，310nm。(a)空白人尿样；(b)口服外消旋吲哚洛尔 1－2h 后采集的人尿；R：R(＋)－吲哚洛尔；S：S(－)－吲哚洛尔。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 12.12 聚糖手性柱使用的溶剂[15]

吸附剂类型	色谱柱名称	25℃下溶剂的最大允许体积[a]												
		己烷	2-PrOH	EtOH	MeOH	ACN	EtOAC	THF	$CHCl_3$	水	丙酮	CH_2Cl_2	HAC、TFA、DEA	ClO_4^-
直链淀粉氨基甲酸盐	Chiralpak AD	100	100	100	100		20		20	5	5	5	0.5	
	Chiralpak AS	100	100	100						5			0.5	
纤维素氨基甲酸盐	Chiralcel OC	100	100	100						5		10	0.5	
	Chiralcel OD	100	100	100		h	40	10	40	5	20	10	0.5	
	Chiralcel OD-H	100	100	100		h	40	10	40	5	20		0.5	
	Chiralcel OD-R				100	100				100				100
	Chiralcel OF	100	50		5		5			0.5	5		0.5	
Chiralcel OG	100	50	20						0.5			0.5		
纤维素酯	Chiralcel CA-1	70	100	100	100					10	10			
	Chiralcel OA	100	100	100					c	5			0.5	
	Chiralcel OB	100	100	100				10			10	10	0.5	
	Chiralcel OB-H	100	100	100				10			10	10	0.5	
	Chiralcel OJ	100	100	100	100	100	20		10	5	20	10	0.5	
	Chiralcel OK	100	100	100						5			0.5	

[a] 2-PrOH,2-丙醇;EtOH,乙醇;ACN,乙腈;EtOAC,乙酸乙酯;THF,四氢呋喃;$CHCl_3$,氯仿;CH_2Cl_2,二氯甲烷;HAC,乙酸;TFA,三氟乙酸;ClO_4^-,高氯酸和高氯酸钠;pH2-6,<1.0M。

[b] 10%丙醇;[c] 10%丙醇或异丙醇

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.3.4.2　柱温和压力的影响　如表 12.10 所示，多聚糖柱可在 0 至 40℃ 范围内使用(Chiralcel OD－R 为 5～40℃)，提高操作温度通常可缩短分离时间。一般正相分离在室温进行，现有的数据表明在室温或者低于室温下操作，可延长柱子寿命。从分离结果的重复性考虑，尤其在反相模式下运行柱子必须始终恒温，反相纤维素柱的柱效在高于温室时通常可得到改善，但与溶质的性质有关。

如表 12.10，制造商推荐纤维素柱应在压力小于 700psi(≈50bar)的流速下工作。为了延长柱寿命，操作压力应小于 430psi(≈29bar)。这些柱在较低操作压力下(同大部多数硅胶柱)运行的条件也说明纤维素填料难以填装成稳定、均一的填充床。

12.3.4.3　柱型和操作　大多数样品在 0.46×25cm 多聚糖柱上可以完成分离分析。如 12.3.6 节所述，短柱一般用于研究固定相选择性；5cm ID 以上柱用于制备。多聚糖衍生物柱通常由 20～25%(重量)的固定相和全孔硅胶担体制成[44]。已报导的大部分应用研究使用粒度为 10μm 的色谱柱。由于小粒度固定相的选择性高且分离快速，最近的分离研究青睐于使用粒度为 5μm 的柱子。使用 2.5μm 柱子的分离也有报道[54]，但这种柱目前还未商品化。与其它类型 HPLC 相同，柱效随填料粒度减小显著增加(塔板高度减小)。对大部分分离，流速为 0.4～0.5ml/min 时推荐使用 10μm 的 4.6mm ID 柱，当流速为 0.8～1.0ml/min 时，使用 5μm的柱子。由于压力限制，多聚糖柱流速通常不超过 1.5ml/min。

12.3.4.4　进样量　多聚糖柱上的进样量与前面阐述的 NPC(表 1.3)和 RPC(6.7.1 节)中的情况基本相同。对 0.46×25cm 柱，含 1～5(g 外消旋物的 10μl 样品通常用于常规分析(同其它 HPLC 方法，建议过滤样品并使用保护柱)。大直径制备柱允许的样品量较大，可在超载条件下操作。(参阅 13 章)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.3.5 应用

文献[5],55]给出的有关多聚糖柱的应用实例，包括医药、农药、天然物及多种混合物外消旋对映体的分离，可作为分析方法建立的参考。纤维素手性柱允许的样品荷载量大，适用于制备分离。使用多聚糖柱进行制备分离的限制因素通常不是手性识别位点的数目，而是样品在流动相中的溶解度。有关制备 HPLC 方法建立的进一步信息可参阅13章。

12.3.6 方法建立策略

改变多聚糖柱的选择性主要通过改变固定相官能团实现，目前尚无法准确预测最有可能获得满意的对映体分离结果的柱型。将分离效果同化合物结构相联系，可以为具体化合物选择合适的柱型提供帮助，参见文献[56]和[57]的讨论。

表12.10为对不同类型化合物柱推荐的一般原则，可供实际分离过程中选择色谱柱时参考。非离子或中等离子化样品通常采用正相色谱。使用多聚糖柱对未知样品可获满意分离的次序为 OD>AD>OJ>AS>OF>OB>OC>OK>OA。统计表明前四种柱可成功分离80% 未知样品[51]，但对某一特定的外消旋样品有时只有一种固定相才能分离。

一种简单的实验方法可快速确定哪类柱子适用于特定样品的分离，尤其是对新化合物的情况。短小(5cm)、价廉柱可用于快速验证。采用己烷/乙醇流动相，以使溶质保留值在1<k<10范围内[52]。如果分离失败，可用2－丙醇/己烷或己烷同其它醇的混合物进行实验(甲醇在己烷中的溶解度有限)，调节醇的含量使1<k<10。使用此方法，最有可能获得满意分离的柱子顺序为 Chiralcel OD<Chiralpik AD<Chiralcel OJ<Chiralcel OG。一旦显示出分离或部分分离，增加长柱(如25cm)可提高对映体分离度。

另一种方法建立策略为从单柱型开始，Chiralcel OD(纤维素的3,5－二甲基苯基氨基甲酸盐衍生物)为所有用于手性分离的多聚糖柱中用途最广的一种固定相。此种方法通过流动相而非固定相(柱型)调

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

整对映体选择性。图 12.24 为使用此柱型的成功方法建立策略[52]。

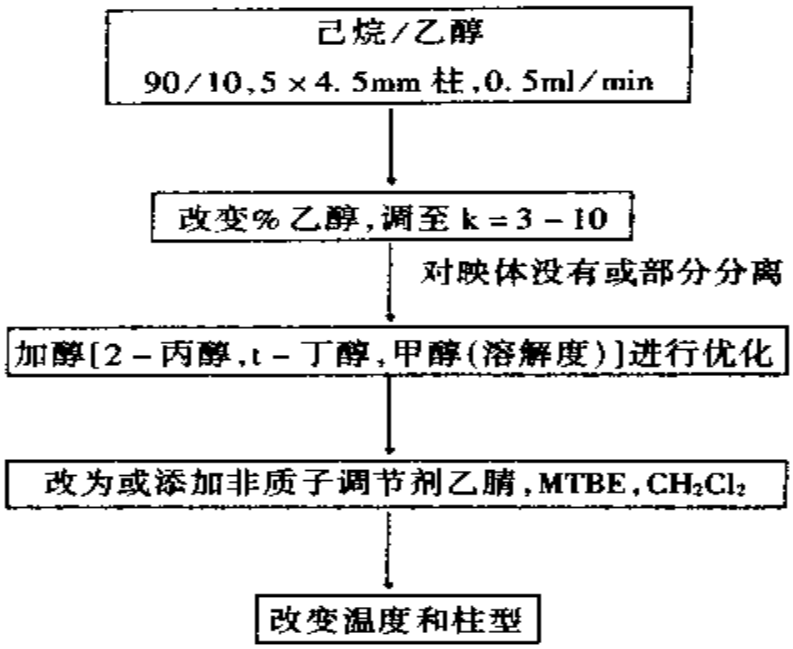


图 12-24　采用 Chiracel OD 柱的手性分离策略[52]

以 10% 乙醇(己烷溶液)流动相,流速为 0.5ml/min 在 5×0.46cm Chiralcel OD 柱上进行初始分离。通过改变流动相中乙醇的含量调整第二个洗脱出的对映体的保留值使 k 约等于 3。如果分离度太小,依次将醇调节剂改为 2-丙醇、t-丁醇和甲醇,使目标对映体 k 值维特在理想的范围内。如果分离度仍不理想,改为质子惰性调节剂(依次为乙腈、甲基-t-丁基醚、二氯甲烷)或将质子惰性调节剂加入己烷/醇流动相中,改变调节剂浓度使 k 维持在理想范围内。如果仍没有或只有部分分离,降低或升高柱温(注意:在此方法建立方案中的任一阶段,增加长柱均可用子提高对映体分离度),如果发现分离还不理想,再改换其它柱类型(Chiralpak AD 首选,Chiralcel OJ 次之),重复前面的步骤。如使用多聚糖柱未能获得满意的分离度,也可尝试其他类型柱(12.1,12.3 和 12,4 节)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.4 给体－受体柱(Pirkle)

12.4.1 引言

CSP 的分离基于三点作用规则[8,9]：对于手性识别，要求溶质和 CSP 间必须有三个相互作用位点，而且至少一种互相作用与立体相互作用有关。这些相互作用在本质上可分为吸引和排斥两类。图 12.6 为简化的三点相互作用模式。

许多的外消旋化合物在给一受体 CSP 上可得到分离，商品化的此类柱有 30 多种。这些 CSP 指刷型或 Pirkle 柱(纪念发明者)。在 1979 年曾有这样的描述："单手性固定相不能分离所有对映体，但设计合理的 CSP 却能够分离许多对映体"[58]。Pirkle 柱分离对映体基于对映体对中的一种可通过($\pi-\pi$ 键、氢键、空间相互作用或偶极堆积优先与 CSP 结合形成非对映异构体复合物。其中两种相互作用为吸引，第三种既可为吸引，又可为"排斥"。Pirkle 柱的优点之一为可获得两种对映体分离并允许对映体的洗脱顺序相反。进行分析并制备时这种相反洗脱的能力是有用处的。在手性分离过程中，对映体对的第二个峰展宽并可能拖尾，同首先洗脱出小峰相比，主对映体峰尾部的小峰定量需要较大的 α 值。倒易(peciprocity)理论，即手性识别为倒易事件，是很多 Pirkle－型 CSP 的设计基础，如果 CSP Y 可分离化合物 X，化合物 X 也可作为 CSP 以分离化合物 Y 和相关化合物的对映体。许多 Pirkle 型 CSP 都基于倒易理论，Whelk－O1 CSP 就是个很好的例子[59,60]。此柱的特殊设计是为了分离萘普生，首先发现萘普生硅胶 CSP 可将一些化合物对映体分离。当这些分离后的对映体与硅胶结合后，也可分离萘普生对映体。进一步改善 CSP 可以使 Whelk－O1 柱应用范围大大加宽。研究人员利用类似的方法也制成了多种 Pirkle 型 CSP 柱。例如，Oi 及其合作者报道了很多这类柱子[61,62]，现由 Sumimoto 公司销售。

12.4.2 商品化的给体－受体 CSP 的性质

根据 1980 年 Regis 的介绍，广泛使用的 Pirkle CSP 为 3,5－

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

二硝基苯甲酰苯基甘氨酸(DNPBG)CSP(图 12.25)。这类 CSP 为 π 电子受体,芳香化合物是良好的 π 电子给体,因此通常在分离芳香对映体时非常有效。溶质芳环与 CSP 间的 π－π(分子间)相互作用为决定 CSP 的对映体选择性的主要因素。DNBPG 相含两个酸性氢和两个碱性羰基,可与酰胺、胺或羟基等形成氢键,因此这种 CSP 可分离多种对映体,见表 12.13。

第二种 Pirkle 柱在 CSP 中含 π 电子给体。萘环是较强的 π 电子给体。π 电子给体 CSP 可用于胺类、氨基醇类、氨基酸类、醇类、羧酸类、硫醇类对映体的分离(表 12.13),CSP 尤其适合于 3,5－二硝基苯基氨基甲酸盐醇类和胺类的脲衍生物分离。图 12.26 给出了此类 CSP 的结构。

第三种 Pirkle 柱为"杂化的"π 电子给体受体 CSP(如 Whelk－O1)。这种 CSP(图 12.27)最初被设计用于萘普生对映体的分离(图 12.28),是为数不多的能分离未衍生化(＋)和(－)萘普生对映体的

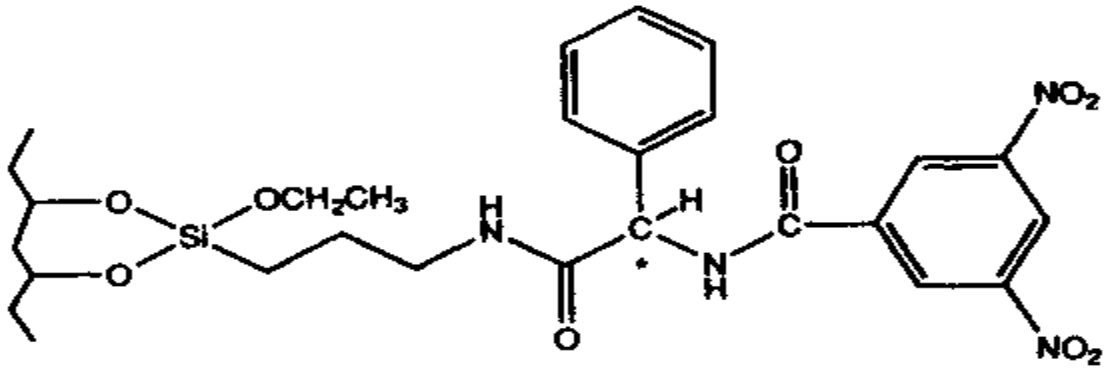


图 12－25 3.5－dinitrobenzoyl phenylglycin(3.5－NBPG)CSP 的化学结构

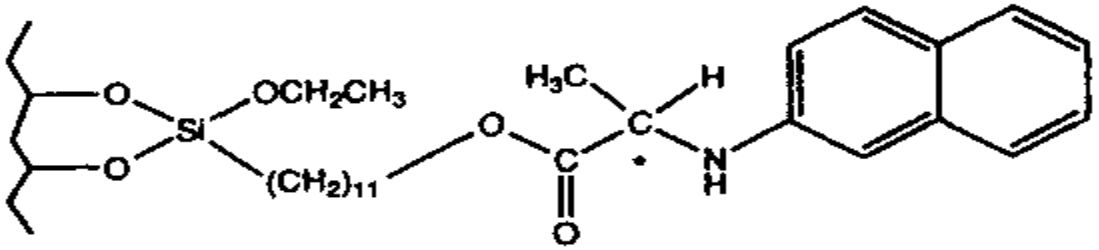


图 12－26 萘丙氨酸(naphthylalanine)CSP 的化学结构
(其为 π 电子结体)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 12－13　Pirkle CSP 的对比[63]

Pirkle CSP	π－电子受体	π－电子给体	π－电子受体/给体
填料	D－苯甘氨酸	D－N－2－1－萘丙氨酸	Whelk－O1
	L－苯甘氨酸	L－N－2－1－萘丙氨酸	
	D,L－苯甘氨酸	D,L－萘丙氨酸	
	L－亮氨酸	(S)－N－1－萘基亮氨酸	
	(R,R)－(－GEM 1		
	(S,S)－(－GEM 1		
	(R)－(－Burke 1		
	(S)－(－Burke 1		
可分离的化合物	π－电子给体	π－电子受体	π－酸,π碱
	芳香类	DNB 或 DNA 衍生物	
化合物类型	芳香醇类	醇类、氨基酸类	酮类
	芳香氨基酸类	氨基醇类	醇类、二苯乙醇酮
	芳香硫醇类	硫醇	黄烷酮类，黄酮
	芳香胺类	胺类	环氧化合物、亚砜、酰亚胺、酯、脲
	芳香亚砜类	双醇	氨基甲酸盐
	扁桃酸类似物		β－内酰胺
	芳香取代的 2 苯并[c]呋喃酮		膦酸
	芳香取代的内酰胺		阿托异构体
	芳香取代的琥珀酰胺		
	芳香取代的以内酰脲		
	α－羟基－α－芳基膦酸基		
	芳香－丙酸		
	苯氧基苄胺		
	β－阻滞剂		

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

CSP 中的一种。Whelk－O1 柱结合一个 π－碱和 π－酸，可分离含有 π－碱或 π－酸基团的对映体。另外，此柱同多聚糖 CSP 相比可分离更多种类对映体。Whelk－O1 即可用正相又可用于反相模式(图 12.28)。表 12.14 列举了一些商品化 π－给体，π－受体 CSP。

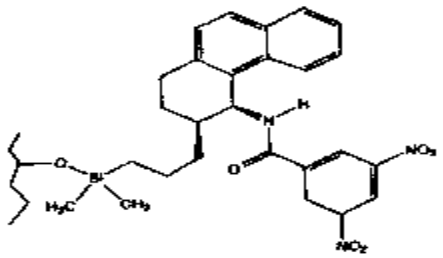


图 12.27　Whelk－O1 CSP 的化学结构
(一种 π－电子给体－受体 CSP)

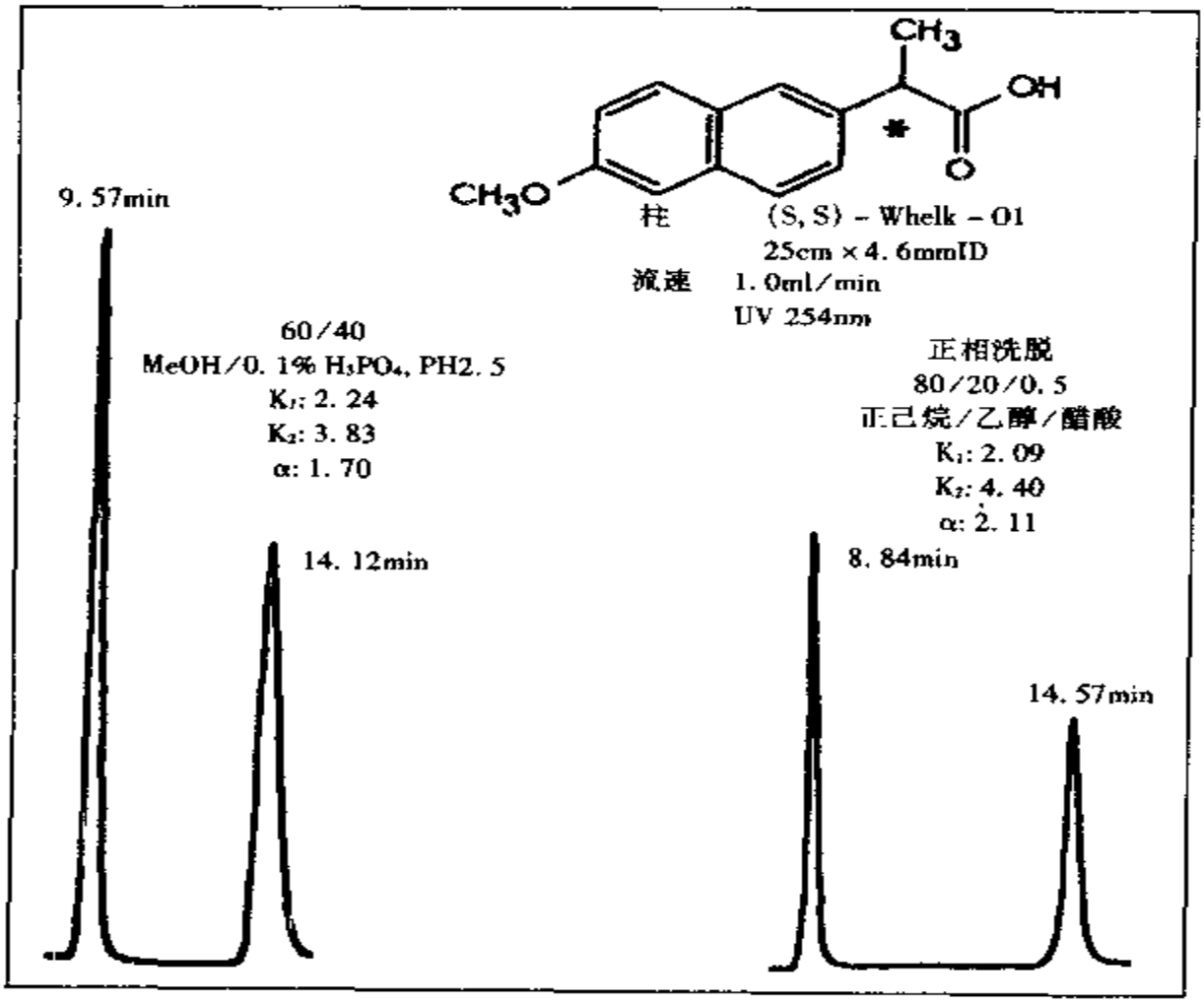


图 12－28 使用反相和正相条件分离外消旋萘普生对映体[63]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 12－14　商品化 Pirkle 型手性 HPLC 柱

π－给体或 π－受体 CSP	商品名	销售商
D－或 L－苯甘氨酸	DNBPG	Regis, J. T. Baker, ES 公司, E. Merck, Serva
D－或 L－亮氨酸	亮氨酸	Regis, J. T. Baker, ES 公司, Serva
(R, R)或(S, S)－β－GEM 1	β－GEM 1	Regis
(R)或(S)－(－Burke 1	α－Burke 1	Regis
D－或 L－N－2－萘丙氨酸	萘丙氨酸	Regis
(S)－N－1－萘亮氨酸 Whelk－O 1	萘亮氨酸	Regis
Sumimoto OA 系列(已有 12 Pirkle 型 CSP)	Whelk－O 1	Regis
Phenomenex － Chirex Pirkle 型 CSP	OA － 2000, 2500, 3100, 3200, 3000, 4000, 4100, 4400, 4500, 4600, 5000	Regis、HPLC 技术有限公司, Sumimoto
DNB 苯乙胺	Chirex CSP	Phenomenex
苯甲脲	Nucleosil Chiral－2	Machery Nagel
(R)－萘脲	Spherisorb Chiral－1	Phase－Sep
(R)－萘乙胺	Spherisorb Chiral－2	Phase－Sep
α－萘脲	YMC－Pak－K 系列	YMC, Inc.
(R)－苯乙脲	Bakerbond－α－萘脲	J. T. Baker
	Chromegabond－(R)－萘脲	E. S.公司

12.4.3　流动相条件

Pirkle 型柱通常使用非极性溶剂 A(如已烷)与极性溶剂 B(如异丙醇或乙醇等极性溶剂)的混合流动相,通过改变% B 可控制保留值 k。只要 $k>1$,同流动相相比,分离度更多地由 CSP 控制。这些 CSP 可用于反相模式,但正相分离度一般要更好些。Pirkle 型 CSP 或许是 CSP 中最为"强健"的一种,并通常具有较长的使用寿命。现有许多家 HPLC 柱制造商生产 Pirkle－型柱(表 12.14)。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

12.4.3.1　溶剂　通常正相或反相 HPLC 的溶剂都可用于 Pirkle CSP。对正相分离，己烷是最佳的 A 溶剂，也允许使用含氯溶剂，但较少使用；2－丙醇为最常用的 B 溶剂，其次为乙醇。如 6.6 节所述，在正相 HPLC 中，增加%B(极性调节剂)，对映体对的保留值和分离度将会下降。在某些情况下，乙酸乙酯或二氯甲烷作 B 溶剂同 2－丙醇相比分离度更佳。一项对 10 种对映体的研究表明：氯仿作 B 溶剂比乙醇更佳[64]。如果分离结果不理想源于使用己烷/醇作为流动相，那么将 B 溶剂改为氯仿或二氯甲烷将会使结果有所改善。

Pirkle CSP 可用反相流动相：水、醇、乙腈、缓冲液、有/或无添加剂如乙酸和三乙胺混合物等，柱子 pH 需保持在 3～8 之间，保存前将缓冲液冲出。Pirkle 型 CSP 反相与正相之间无柱稳定性差别，用甲醇或乙腈作 B 溶剂进行反相分离的效果相同。随着 B 溶剂含量的增加保留值和分离度一般下降。乙酸和三乙胺分别有利于酸性和碱性对映体的分离。如果正相对映体分离度较差，则反相分离度通常更差。

12.4.4　Pirkle CSP 的方法建立

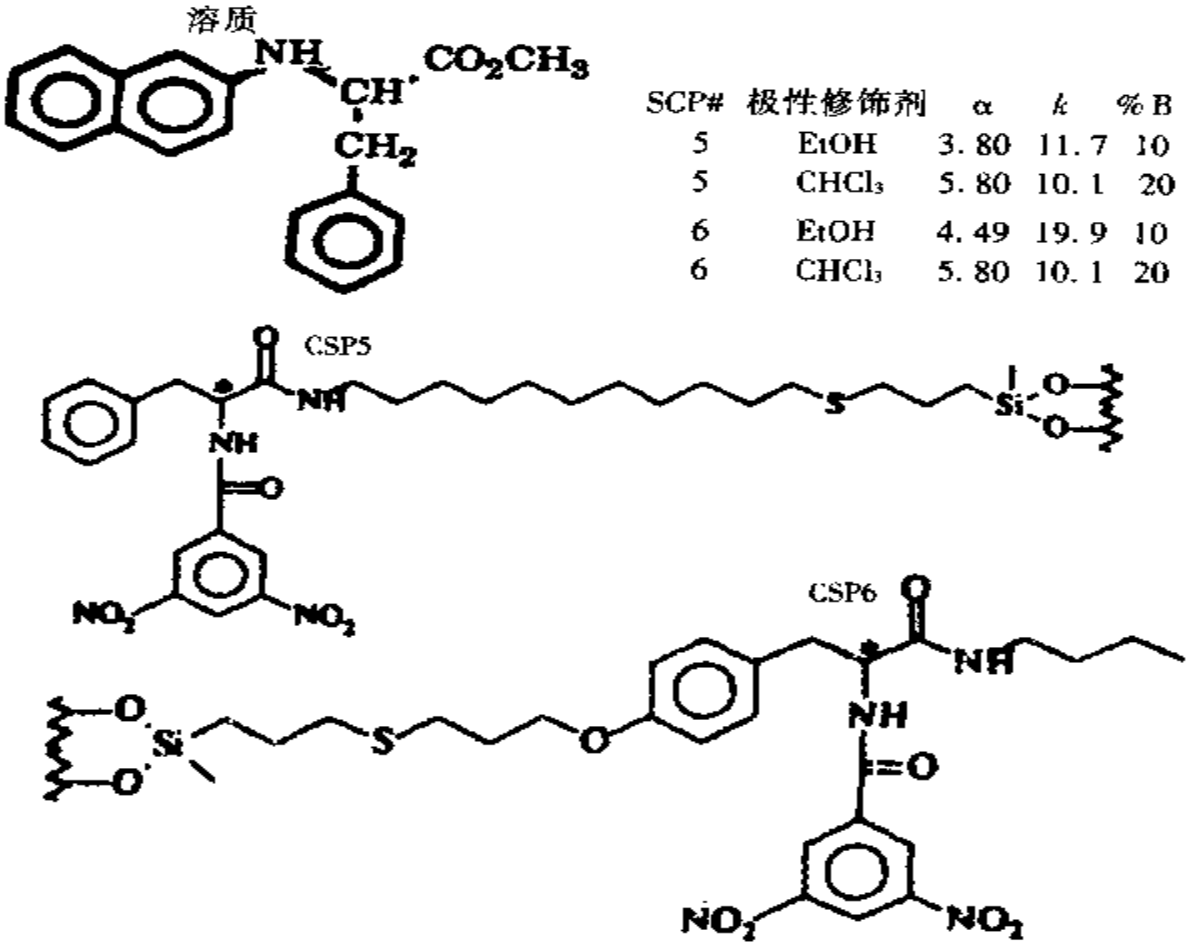
12.4.4.1　柱　分离未衍生化的对映体通常最适合的 Pirkle 柱为(R, R 或 S, S)－Whelk－O1(26×0.46cm)，如果分离不能在此柱上实现则可考虑其它 Pirkle－型柱。α－Burke 1 用于分离未衍生化的阻滞剂(β－blockers)。如果在上述两种柱上未衍生化的对映体分离度均不理想再考虑使用手性试剂进行衍生化处理。DNBPG 和萘基丙氨酸可分离酸、胺、醇的 3, 5－二硝基苯衍生物。一些 Pirkle CSP 可用于 3μm 填料的短柱(1.0cm×3mm)进行快速筛选。这种短柱由于在不同柱或流动相中试验时间短，具有一定优势。

12.4.4.2　流动相　Pirkle－型 CSP 开始方法建立较理想的流动相为 10% 异丙醇－己烷。对酸性样品 Whelk－O1 柱推荐加

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

0.1～0.5%乙酸。调节溶剂强度可改善保留值和分离度，如果两对映体间分离度没有或较小则将异丙醇降低至5%（IPA）或更低；如需降低保留值和α值，则可提高%B。通常 Pirkle 型 CSP 进行的大部分手性分离%B 在5至30%范围内，k 值保持在0.5～20之间。

有些情况下使用不同的 B 溶剂（如氯仿，二氯甲烷）可提高分离度（增大 α 值）。图12.29为 Pirkle 柱 CSP－5和6的例子：乙醇/己烷作流动相时的 α 值较水溶液中大（3.8和4.5）；如将乙醇改为氯仿 α 值将变得更大（4.5和9.3）。其它溶剂如丁醇、乙醇、四氢呋喃，乙酸乙酯和氯仿也用于 Pirikle 型 CSP 的 B 溶剂。不同溶剂对



SCP#	极性修饰剂	α	k	%B
5	EtOH	3.80	11.7	10
5	$CHCl_3$	5.80	10.1	20
6	EtOH	4.49	19.9	10
6	$CHCl_3$	5.80	10.1	20

图 12－29　己烷－乙醇－氯仿乙醇的百分含量对 k 和 α 的影响[64]
HPLC 条件：柱：150×4.6mm ID；流速：2ml/min；检测：254nm，室温。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2,2,2－三氟－1－乙醇对映体保留值 α 值的影响列于表12.15中，结果表明溶剂对保留值的影响较大而对对映体分离度几乎没有影响。因此得出如下结论：(1)长链醇效果好；(2)定位溶剂如乙酸乙酯，四氢呋喃和乙醚具有等价的 α 值；(3)改变二氯甲烷的含量 α 值变化最小。下面为一个一般规律：如果用2－丙醇/己烷不能进行对映体分离，那么使用不同的 B 溶剂，如二氯甲烷也不会进行成功的分离。如果初始的运行没有分离度或很小(k>1)，则应改变 CSP 或进行衍生化。

表 12－15　2,2,2－三氟－1－(9－蒽基)乙醇 α 和 k 值[a][65]

流动相	α	k_1
10:90 n－丁醇－己烷	1.62	1.23
10:90 2－丙醇－己烷	1.56	1.0
9:91 乙醇－己烷	1.33	1.23
10:90 四氢呋喃－己烷	1.47	2.38
9:91 乙酸己酯－己烷	1.50	3.72
14:86 乙醚－己烷	1.49	6.06
40:60 二氯甲烷－己烷	1.44	7.66
50:50 二氯甲烷－己烷	1.48	2.33
70:30 二氯甲烷－己烷	1.42	0.94
60:40 氯仿－己烷	1.33	1.94

[a] 条件：色谱柱：250×4.6mm；(R)－DNBPG；流速：2.0ml/min；UV254nm

表 12－17　用于 Pirkle 柱上易于衍生化的官能团及其相应的衍生化试剂[67]

官能团	衍生试剂				
	N－咪唑－N'－羧酸3,5－二硝基苯甲酸酰氯	α－萘基异丙腈	3,5－二硝基苯甲酸酰氯	1－萘甲胺	2－萘酰氯	3,5－二硝基苯胺
胺	π－给体	π－受体	π－给体/受体		π－给体/受体	
醇	π－给体	π－受体				
羧酸				π－受体		π－给体
氨基酸			π－给体			

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

反相条件有时效果较好，例如当样品在非水流动相中的溶解度较小时常可得到理想的分离效果。大部分 Pirkle 型 CSP 在反相溶剂中稳定[63]。因为 Pirkle 型 CSP 储存在己烷/2－丙醇中，用与水混溶的溶剂冲洗应在注入含水流动相之前进行。对反相条件，较佳的初始流动相条件为 50% 甲醇(%B)或乙腈加 50% 的 10 至 25mM 磷酸盐(pH3 或 6.2～8.2)、乙酸盐(pH3.8～5.8)或柠檬酸缓冲液(pH2.1～6.4)。调节 B 溶剂使 k 在 0.5～20 之间。如果几次实验后对映体间仍没有很好分离，那么此柱在反相模式或许无法分离对映体样品，应考虑其它 CSP。在多数情况下，正相不能分离的对映体，反相通常也不理想。

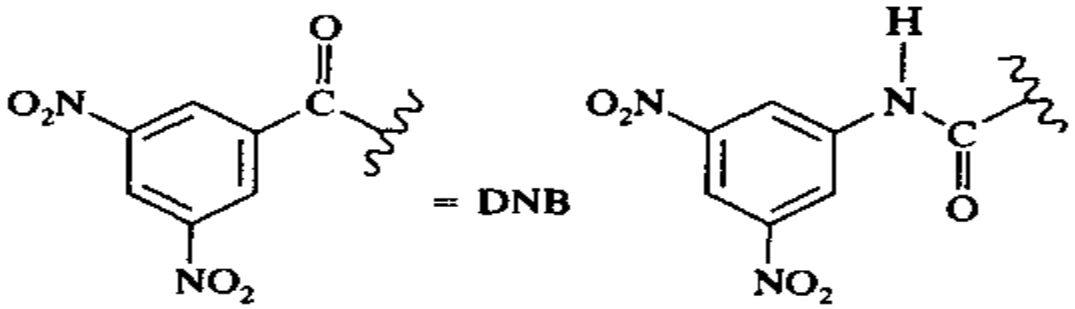
12.4.4.3　衍生化　用手性试剂衍生化样品通常能加强 Pirkle 柱的对映体分离能力。非手性试剂衍生化并结合 CSP 柱分离，因为无需光谱纯手性剂，与手性试剂衍生化相比前者更受关注(12.1.1. 节)。如果待测物的靠近立体异构中心的官能团易于衍生化，则越有可能使衍生化的对映体分离。易于衍生化的基团包括醇类、胺类和酸类。常见的衍生化试剂，官能团和相应的 CSP 见表 12.16。衍生化的缺点是因衍生化反应需要额外的时间，也增加了方法建立所需的时间。

非手性衍生化可用于增加氨基酸、胺、氨基醇类、醇类和硫醇等样品的分离选择性。表 12.7 列举了 Pirkle－型(S)－(－)－N－(2－萘基)缬氨酸 CSP 上对映体衍生物分离的很多例子。这些化合物分别衍生化为其相应的 3,5－二硝基苯甲酰胺和酯，或 3,5－二硝基苯脲和 3,5－二硝基苯基氨基甲酸盐衍生物。衍生物(表 12.17)提供附加的相互作用(π－碱和氢键键合)，在 CSP 和待测物间形成非对映异构体复合物。

12.4.4.4　温度和流速的影响　随着温度降低 CSP 分离的值通常增加。如图 12.30 所示，在 α－Burke 1 CSP 上分离普拉洛尔对映体的情况说明了这一点。随着温度从室温降至 －24℃，分

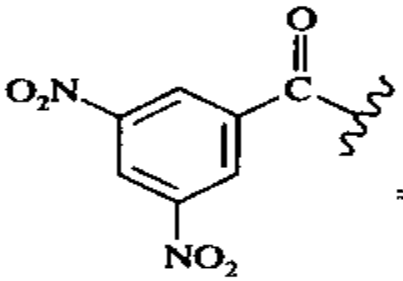
PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 12－17　用于 Pirkle 柱上易于衍生化的官能团及其相应的衍生化试剂[67]

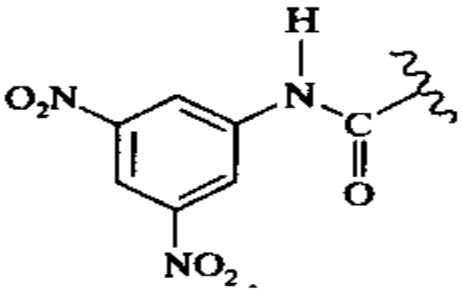


化合物	衍生试剂	分离度(α)	k_1	R_s	异两醇/正己烷(%)V/V	强保留组分
		α－和 β－氨基酸衍生物				
H_2N CONHn－Bu	DNB	17.66	0.38	10.5	10	S
H_2N CONHn－Bu	DNB	1.45	7.97	4.2	5	
H_2N CONH CO_2CH_3 SCH_3	DNB	18.66	1.87	18.3	20	S,S
NH_2 $COOCH_3$	DNB	1.97	0.93	2.2	5	R
NH_2 $COO(CH_2)CH_3$	DNB	1.25	7.33	2.1	5	
		胺基和氨基醇衍生物				
NH_2	DNAn	1.19	5.87	1.5	5	R
NH_2 NH_2	DNAn	1.33	3.27	2.8	20	S
NH_2	DNAn	1.19	6.37	2.1	S	

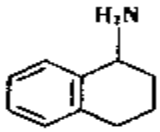
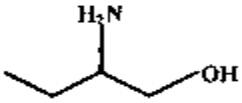
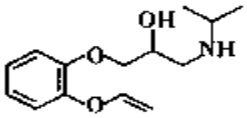
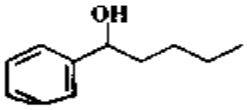
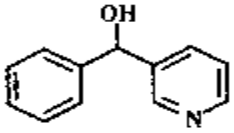
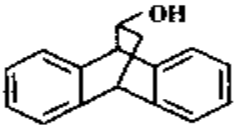
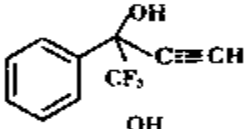
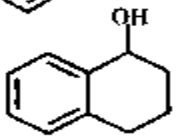
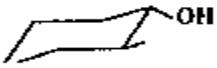
PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



= DNB



= DNAn

化合物	衍生试剂	分离度(α)	k_1	R_s	异丙醇/正己烷(%)V/V	强保留组分
	DNAn	2.42	14.87	10.6	5	
	DNAn	4.53	1.35	7.7	20	S
	bis－DNAn	1.41	13.2	3.6	20	
		醇和硫酸衍生物				
	DNAn	1.24	3.19	1.8	5	S
	DNAn	2.51	4.87	10.6	5	
	DNAn	1.20	8.71	2.0	5	
	DNAn	1.47	4.87	3.2	5	
	DNAn	1.22	5.35	2.5	5	
	DNAn	1.10	4.07	0.7	5	

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离度得到改善。然而在大部分情况下，如果室温下看不到分离，降温并不会增加对映体选择性。有关 Pirkle 柱流速对分离度影响的报导较蛋白质(12.2 节)或多聚糖(12.3 节)CSP 少，除非在特定的 Pirkle 型 CSP 上对映体样品至少可部分分离，流速的改变通常不会改善分离。

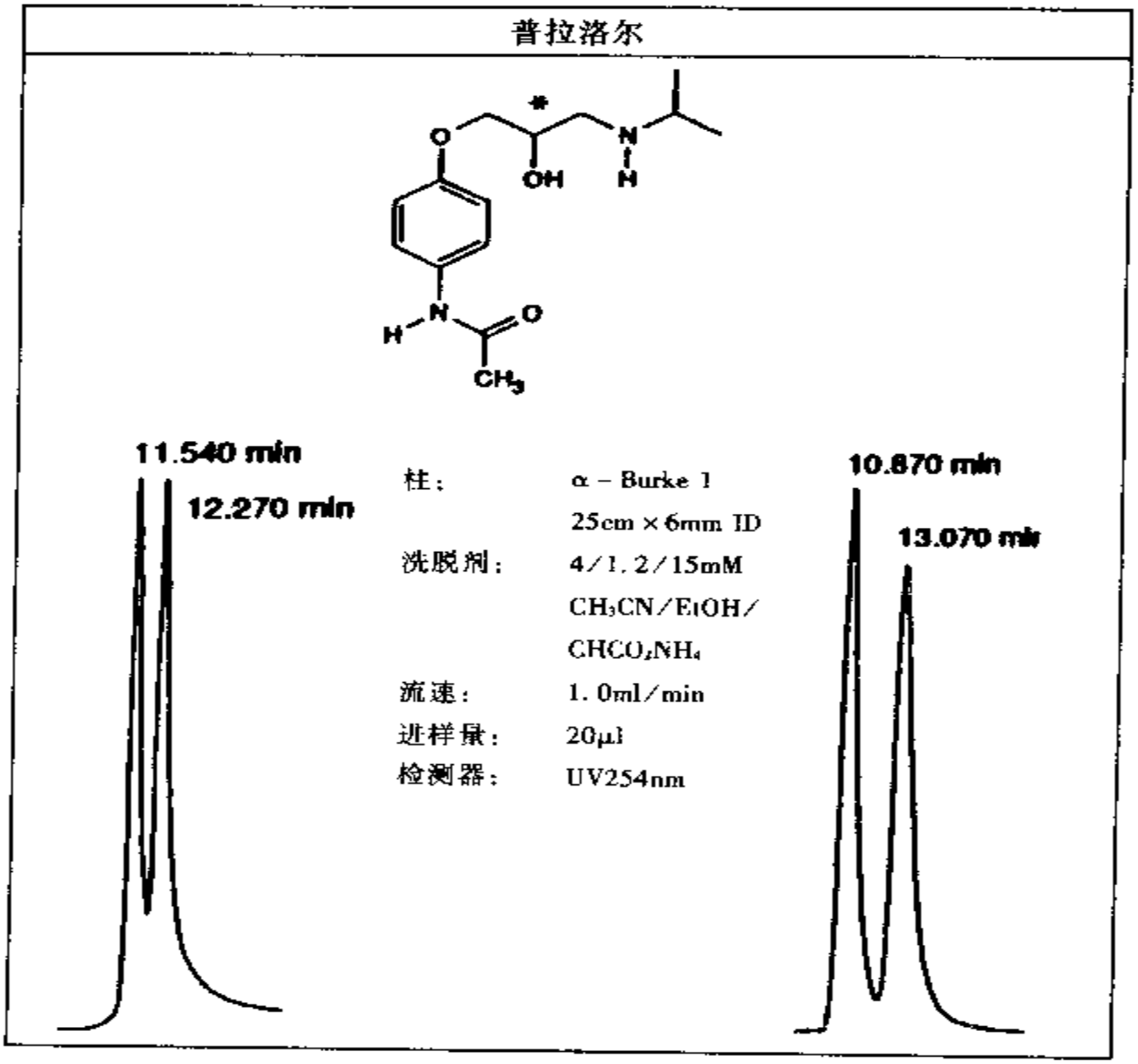


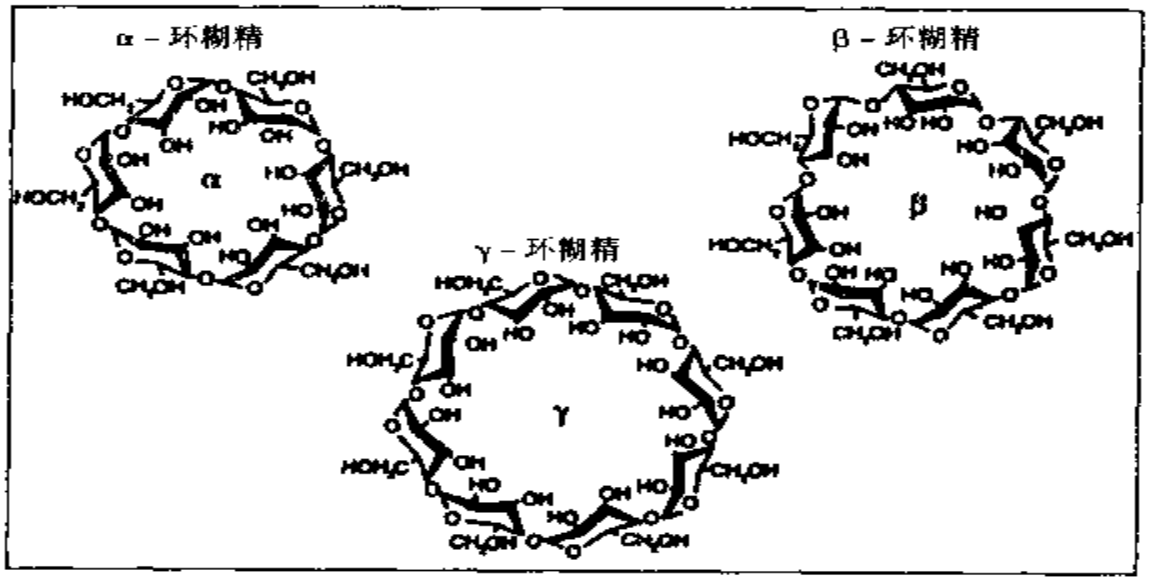
图 12－30　柱温低于室温对普拉洛尔(Practolol)保留值和对映体选择性的影响[68]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

12.5 空穴型柱

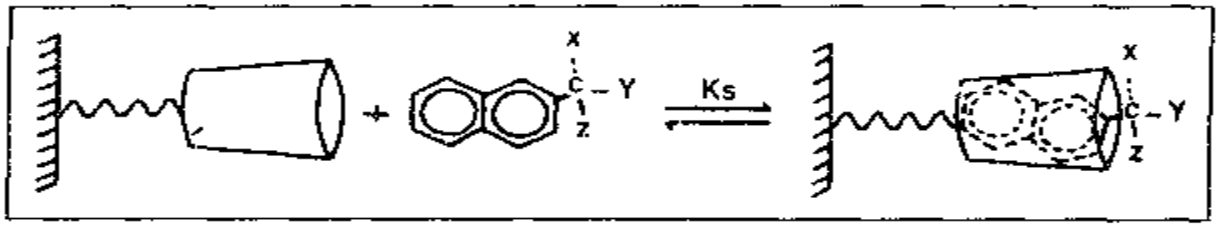
12.5.1 引言

空穴型 CSP 能够在手性空穴中包合进某一种对映体或另一对映体一起，进而增强两对映体间的手性辨别能力。空穴 CSP 大多为环糊精键合相(CD)，但手性高分子也可用于制备包结络合固定相。环糊精 CSP 可利用氢键和包络相互作用与溶质结合，包络相互作用需要溶质分子中至少含一个可嵌入 CD 空穴的疏水部分。如果待测物含有极性基团并与 CD 形成氢键，可增强对映体选择性。CD 有 α－、β－、γ－CD 等形式，分别由 6(α)、7(β)或 8(γ)葡萄糖苷通过 α－1,4 糖苷键连接而成，这样在 CD 分子中形成了一个可以允许对映体分子疏水部分进入的桶型空穴结构(图 12.31)。空穴的开口处由极性的羟基包围，但空穴本身呈疏水性。待测物分子的疏水部分易与空穴内部非极性部分结合，而极性官能团可与极性空穴开口处的羟基形成氢键。β－和 γ－CD CSP 的空穴有一定刚性，α－CD 分子可以伸展因此可接受大分子进入环糊精空穴内。表 12.8 给出了三种环糊精的物理和化学性质。



(a)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn



(b)

图 12－31　环糊精分子[69]

(a)α－,β－,γ－环糊精结构；(b)环糊精分子简图，通过间隔基与硅胶结合的截锥，并与手性萘基化合物形成可逆包络物

表 12－18 环糊精的物理和化学性质[69]

CD 类型	分子量	空穴直径	葡萄糖单体数
α	972	0.57	6
β	1135	0.78	7
γ	1297	0.95	8

溶质分子的大小(直径)决定了其是否能够进入环糊精空穴。如果溶质的疏水部分大于空穴开口，包络作用很弱或不存在，因而不能完成手性分离。相反，如果待测物疏水部分远小于 CD 空穴，因为其与空穴壁作用的可能性较小，包络同样较弱。一般认为，含有一个环的化合物如苯可在 α－CD 上分离，含有两环化合物如萘可在 β－CD 上分离，而含有三环化合物如芘可以在 γ－CD[69] 上分离。除分子大小外，其它因素(如极性官能团，尤其对可形成氢键的官能团)同样影响 CD 分离对映体的选择性。

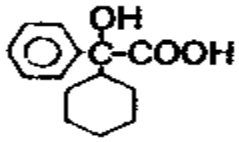
图 12.32 说明了四种结构相似的芳香酸的疏水作用规律，Ⅰ和Ⅱ酸的对映体易在 β－CD 上分离，化合物Ⅲ分离不理想，化合物Ⅳ没有分离。非极性环的引入(如Ⅰ和Ⅱ中的环己基)使其与 β－CD 空穴很好结合，从而将对映体分离。化合物Ⅲ和Ⅳ具有芳香环，使其与 β－CD 空穴结合不紧密，因此分离度差。在 CD CSP 上有助于增强对映体分离的一般结构特征为：

· 待测物分子需与 CD 空穴匹配

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

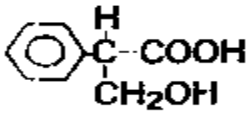
· 芳香环或环己基应在待测物分子的手性中心附近

· 在待测物手性中心或其附近必需有能与 CD 腔入口的 2' 或 3' – OH 基团相互作用的极性基团



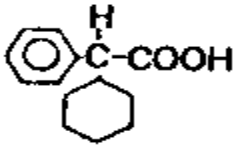
环己基苯基羟乙酸

Ⅰ



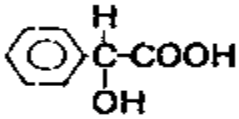
托品酸

Ⅲ



环己基苯基乙酸

Ⅱ



扁桃酸

Ⅳ

图 12 – 32　芳香羧酸的结构[70]

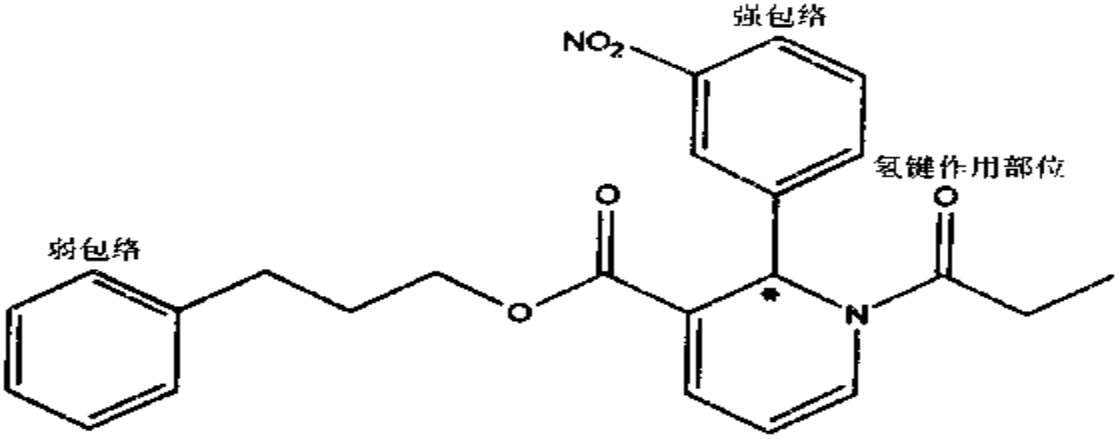


图 12 – 33　标明相互作用位点的化合物结构[69]

图 12.33 给出了具有上述结构特征的的溶质在 CD CSP 上分离的例子。硝基苯环直接与手性中心相连，而苯基距手性中心较远，因此，硝基苯基团在形成对映体选择的包络物时非常重要。另外，手性中心附近的羰基可与 CD 空穴入口处的羟基形成氢键。

β – CD 及其衍生物对分离对映体是最为适合的 CD CSP。α – 和 γ – CD 使用甚少。因此在这些 CSP 上分离对映体的应用较少。α – 和 γ – CD CSP 一般用于分离位置异构体，α – CD 可用于分离比苯小的分子如未衍生化的氨基酸和前列腺素等。γ – CD 主要用于分离含有三或三个以上环的位置异构体化合物，（如芘、蒽）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

β－CD 的衍生化可增加其对映体选择性（如图 12.34 和表 12.19 所示）。许多加入 CD 分子上的官能团同多聚糖和 Pirkle CSP 上的作用相似。表 12.19 列举了一些商品化的环糊精柱的性质。

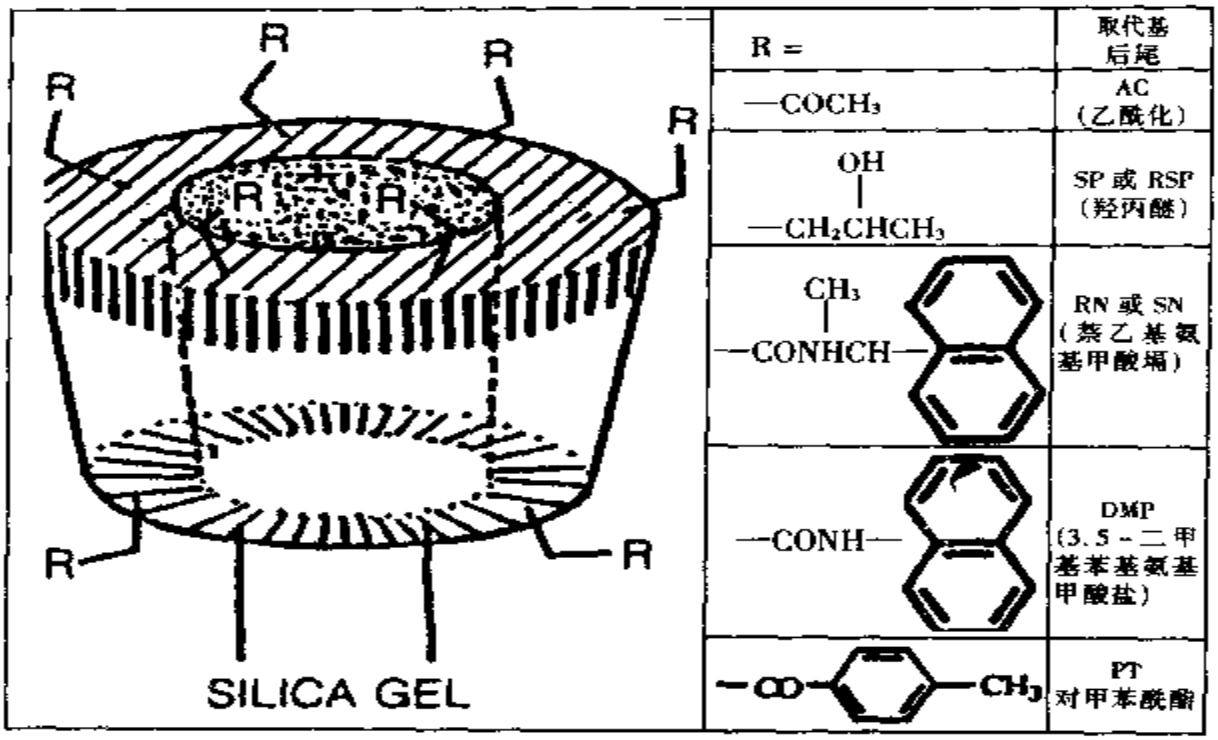


图 12－34 环糊精衍生化[66]

表 12－19 商品环糊精柱[a,b]

商品名	担　体
Cyclobond Ⅰ 2000	β－环糊精
Cyclobond Ⅱ 2000	γ－环糊精
Cyclobond Ⅲ 2000	α－环糊精
Cyclobond Ⅰ Ac 2000	乙酰化的 β－环糊精
Cyclobond Ⅰ SP 2000	羟基丙基醚 β－环糊精
Cyclobond Ⅰ RSP 2000	羟基丙基醚 β－环糊精
Cyclobond Ⅰ RN 2000	R－萘乙基氨基甲酸盐 β－环糊精
Cyclobond Ⅰ SN 2000	S－萘乙基氨基甲酸盐 β－环糊精
Cyclobond Ⅰ DMP 2000	3,5－二甲基苯基氨基甲酸盐 β－环糊精
Cyclobond Ⅰ PT 2000	p－甲苯酰酯 β－环糊精

[a] 制造商和主要供应商：Astec
[b] 粒度 5μm

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

12.5.2 使用未衍生化的 CD 柱分离方法的建立

12.5.2.1 分离模式 CD 柱可按正相、极性有机相和反相三种分离模式完成手性分离。

在选择分离模式时样品的溶解度是一个重要参数，下面的规则可供参考：

1. 如果溶质只溶于有机溶剂，则使用正相或极性有机相模式。

a. 极性有机相模式：100% 乙腈或甲醇作为溶剂，加入乙酸或三乙胺(0.1%)以控制氢键或峰拖尾。

b. 正相模式：含 9:1(己烷－异丙醇)的流动相较好，改变异丙醇浓度使 k 在适当范围内。

2. 溶质只溶于水：最好使用反相条件，80:20 乙腈－缓冲液，3.5<pH<7.0，改变有机溶剂的浓度使 k 在适当范围内。

3. 溶质既溶于水又溶于有机溶剂：如果溶质可溶于多种溶剂，三种模式的一任一种都可使用。

通常，对映体分离的成功几率为：反相> 极性有机模式> 正相。

12.5.2.2 反相模式 未衍生化 CD－CSP 通常用反相条件。反相 CD 对映体分离的主要保留机制为溶质的芳环或己烷环进入到 CD 的疏水腔中形成包络复合物[69,71～73]；%B 的改变用于控制保留值和分离度，B 溶剂经常使用甲醇或乙腈，异丙醇、乙醇、二甲基甲酰胺、二氧六环有时也用作 B 溶剂。改变 B 溶剂、pH 和离子强度可在一定程度上调节选择性和分离度。使用缓冲液可改善某些 CD 柱的分离效果和重复性。三乙胺乙酸盐已用于氨基酸和肽的分析；三氟乙酸、乙酸铵、硝酸铵用于其它类化合物的分析。因为磷酸盐可附着在硅胶上，所以建议不使用磷酸盐缓冲液[69]，如在缓冲液中使用磷酸铵，需先经过 C_{18}柱以除去可强烈保留在 CD 柱上的杂质。

因为包络物的稳定性取决于待测物的电荷，在 CD CSP 上分离对映体时 pH 值是一个十分重要的参数。带电溶质形成的包络

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

复合物较中性溶质弱，因此如果溶质含有电离基团，保留值(k)和选择性(α)受 pH 影响较大。一般采用4～7的 pH 范围，或者在高于或低于溶质 pK_a0.5单位的 pH 值下进行分离。

对于胺、易于采用乙酸缓冲液检验在 pH3.8～5.8 范围内 pH 的影响；而对于酸，可以采用柠檬酸在 pH2.1 至 6.5 范围内检验。pH 值优化后，再检验缓冲液的类型和浓度，因缓冲液可进入 CD 空穴，缓冲液类型的选择非常重要。通常，缓冲液浓度升高，峰变锐并且保留时间降低；硅胶 CD 柱在 pH 3～7.5 范围稳定[69]。对反相 HPLC，应避免使用强酸或强碱及 100% 水的流动相。当流动相 pH 值大于 6.5 时硅胶预柱应与 CD 柱一同使用以延长柱使用寿命。对乙酰化 CD 柱，流动相 pH 值应在 4 到 6.5 之间。

降低极性有机调节剂的用量通常使 k 增加并对 α 产生影响。图12.35中，将有机调节剂甲醇从35% 降至20% 可使环己烯巴比妥样品几乎基线分离。但降低极性调节剂含量并不总能增加 α 值。其它如 B 溶剂类型的变化也可能影响对映体选择性。表12.20说明了将极性有机调节剂乙腈改为乙醇后对k与 α 的影响。使用甲醇的分离度一般优于乙腈或乙醇[69]。

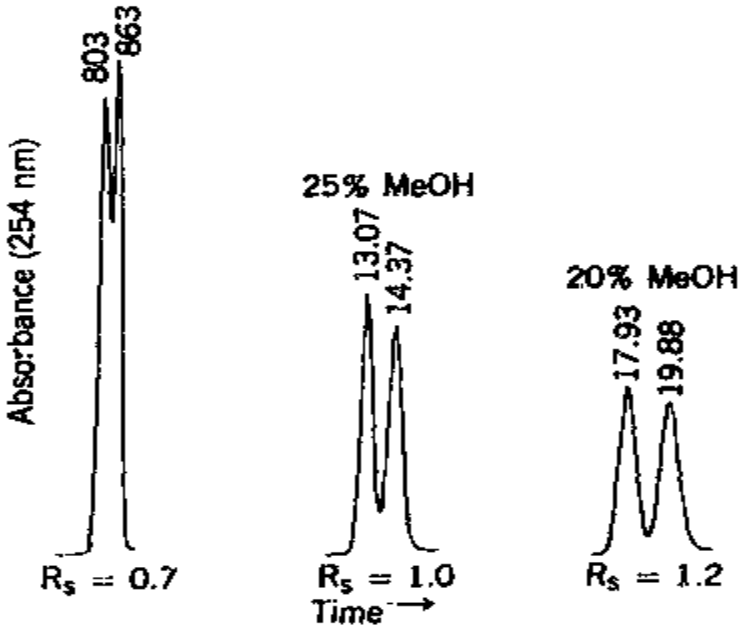


图 12－35 在 β－CD 柱上海索巴比妥(hexobarbital)对映体的分离与甲醇百分含量的关系[72]

条件：10cm β－CD 柱；流速：1.0ml/min；温度：22℃；流动相：甲醇－水

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepriint.cn

表 12－20　β－CD 上不同的流动相组分对对映体分离的影响[72]

化合物	k_1	k_2	α	R_S	流动相
Dns The	2.39	2.77	1.16	0.96	30% ACN[a]
	1.37	1.58	1.16	0.74	30% ACN[a]
	3.89	4.45	1.14	0.68	30% ACN[a]
	6.12	6.61	1.08	b	30% EtOH[c]
Dns The	0.93	1.39	1.50	1.00	40% ACN[a]
	2.94	3.63	1.23	0.93	30% ACN[a]
	3.97	4.73	1.19	0.69	30% EtOH[c]
DDDD[d]	0.10	0.10	1.00	b	40% ACN[a]
	0.35	0.35	1.00	b	30% ACN[a]
	5.8	6.9	1.19	0.51	20% ACN[a]

[a] 乙腈在水中的百分含量(v/v)
[b] 没有分离
[c] 乙醇在水中的百分含量(v/v)
[d] DDDD:反 α－α－(2,2－二甲基－1,3－dioxolane－4,5－diyl)－双－(二甲苯)

流速对柱效有较大影响。在有些情况下,CSP 和溶质间的质量传递阻碍了包络物的形成并导致峰展宽和柱效降低。流速在 1.0～2.0ml/min 之间时如溶质峰展宽,降低流速可使柱效提高。流速为 0.4～1ml/min 效果较好,推荐 CD 柱流速度为 0.2～2.0ml/min。

使用 CD CSP 时,改变柱温可增加对映体选择性。与反相色谱相同,高温可提高柱效但分离度降低。有些情况下,低于室温可改善手性分离效果(如 5～15℃)。CD 与溶质的结合常数与温度有关,降低柱温可使其结合加强[71]。图 12.36 显示了升温对分离 cy 环己基苯基羟乙酸酸(CHPGA)的影响。随着柱温升高,α 下降,但柱效改善,分离度变化不大。在许多情况下,升温使分离度损失较小,但可提高检测灵敏度,并使峰尖锐,因此升高柱温通常有益于分离。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

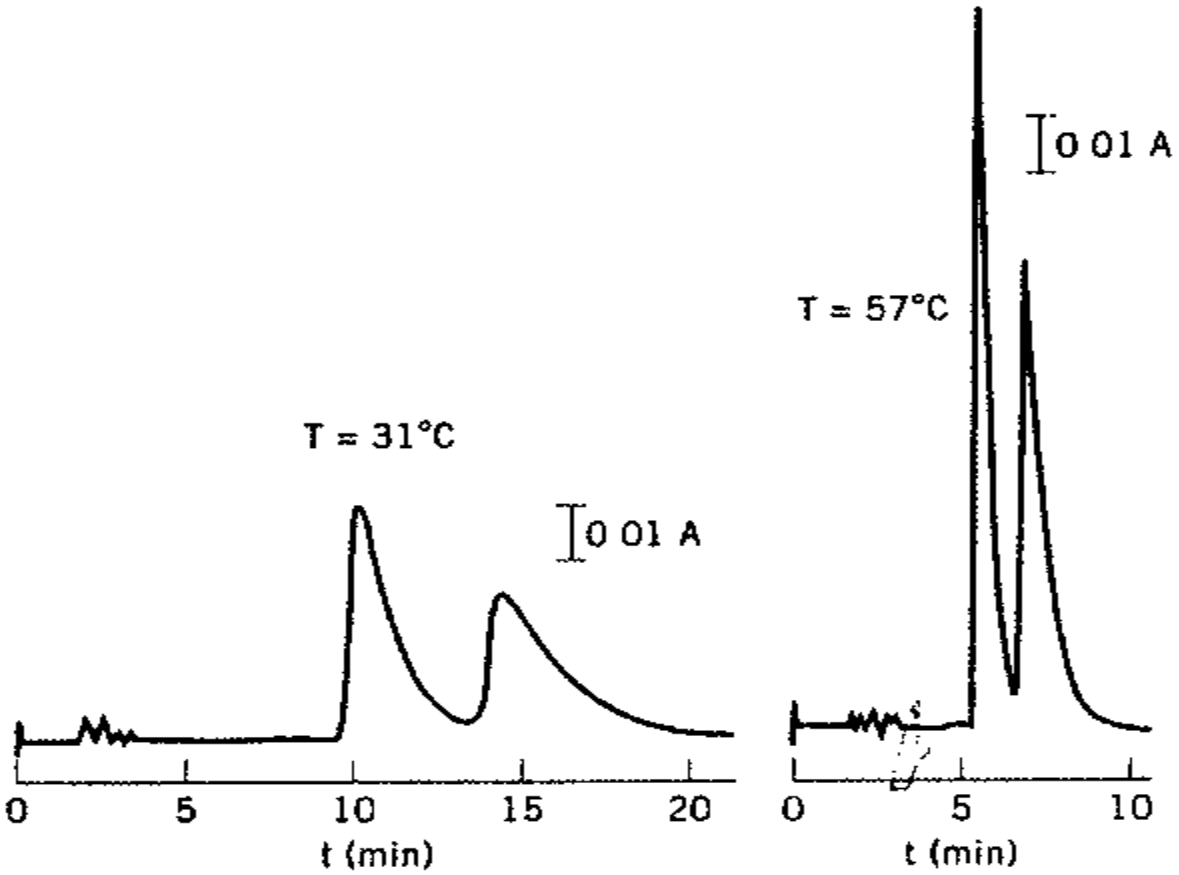


图 12－36　不同温度下环己基苯基羟乙酸(CHPGA)色谱图[70]

柱：β－CD 175(4.6mm，乙腈－甲醇－磷酸钾（0.1M），pH4.2(31.5:60:62.5 V/V/V)

对在未衍生化 CD 上的反相分离，推荐使用下面的方法建立方案：

1. 对甲醇和乙腈流动相调节剂，确定待测物的 k 值、分离度 α 与保留行为(使 $0.5<k<20$)。

2. 配制 10mM 乙酸盐或柠檬酸盐缓冲液(避免使用磷酸盐)确定最佳的 pH 值(3 和 7 之间)，pH 在 3.8～5.8 间使用乙酸盐，pH 在 2.1～6.5 间可使用柠檬酸盐缓冲液。

3. 确定在最佳 pH 值下缓冲液浓度的影响。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4. 研究温度的影响

5. 确定最佳流速

12.5.2.3 极性－有机模式和正相模式 CD－CSP 使用极性有机模式分离对映体已有许多成功的例子。使用甲醇或乙腈作为流动相，添加乙酸或三乙胺有助于控制保留值、选择性和峰型。尽管少量甲醇（通常小于 10%）可用于调整选择性，但通常选用乙腈作为溶剂。

未衍生 CD 很少在正相的条件下使用，因流动相的非极性部分可占据 CD 的空穴，溶质也可与表面的羟基相互作用。CD CSP 在正相条件下类似于二醇型固定相，保留与氢键的形成有关，一般认为无包络作用。对于这种分离，首选溶剂为己烷－异丙醇、调节剂如乙醇或丁醇有时可增加对映体分离度。二氯甲烷或乙酸乙酯作为流动相的非极性组分可增加对映体选择性，但这样的情况为数不多。

环糊精 CSP 为在色谱中使用的所有固定相中较为稳定的一种，但卤化溶剂应谨慎使用，因其可形成稳定的包络物并阻碍 CD 与对映体间的相互作用。

12.5.3 使用未衍生化的环糊精的方法建立

通过 CD 空穴开口处的羟基与乙酰、2－羟基丙基和萘乙氨基甲酸盐等基团反应制备衍生化 CD－CSP。附着在 CD 空穴开口处的官能团可以使 CSP 分离对映体的选择性增加。下面对几种衍生化 CSP 的用途和优点加以总结。

Cycloband I AC（乙酰化）：这种 CSP 在反相模式条件下，可用于分离顺反异构体、α－羟基和胺手性化合物、醇或胺基位于立体异构中心 α 位或 β 位的化合物的分离。CD－AC－CSP 可用于正相模式，其性质与乙酰化纤维素相似（12.3 节）。

Cyclobond I SP（S－羟基正丙基醚）：柔性的 S－羟基正丙

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

基醚基团可增加氢键作用。如果待测物的氢键基团距立体异构中心有 2 或 3 个碳单位，并且手性中心有大的 β 取代基时可使分离改善。与 CD 母体不同，这种衍生化 CD 的仲羟基可自由旋转，提供了另外的结合机理。此柱只用于反相模式。

Cyclobond I RSP(R 或 S－羟基正丙基醚)：有关 SP 的特点也适用于此类 CSP，形成较弱的包络物为对映体选择性的基本机制，此柱只用于反相模式.

Cyclobond I RN 或 SN(R 或 S－萘乙基氨基甲酸盐)：手性的萘乙基氨基甲酸盐与 CD 的仲羟基结合使其产生附加的手性分离作用。其选择性与 Pirkle 萘缬氨酸 CSP 相似(12.4节)。RN 或 SN CD－CSP 可用于正相、反相或极性有机模式。在正相模式中，π－π 键、偶极堆积、氢键对对映体选择性起重要作用。氨与醇的 3,5－二硝基苯甲酰衍生物在 RN 或 SN CD－CSP 上以正相模式很容易分离。在反相模式中，分离主要靠包络作用实现，位于手性中心基团的氢键由 pH 值控制。在极性有机模式中，选择性由表面相互作用(而非包络作用)决定。RN 或 SN 柱已用于分离衍生化的胺类、氨基酸酯及未衍生化的农药等。当溶质手性中心附近含有氢给体或受体位点时，RN 或 SN CD－CSP 也可采用。

Cyclobond IDMP(3,5－二甲基苯基氨基甲酸盐)：此 CSP 与 Chiracel OD(12.3 节)结构类似可用于反相也可用于正相模式。可在 Chiracel OD 上的成功分离通常也可在 DMPH 上进行[72]。但后者的 CD 与硅胶键合，稳定性好，而 Chiracel OD 为涂渍柱填料(12.3.2.1 节)

Cyclobond I PT(Para－Toluyl Ester)：在此 CSP 上 π－π 键和氢键参与了手性识别，与 Chiralcel OJ CSP 有相似的选择性。

在所有的衍生化 CD 中，RN 和 SN 最常用。统计表明 SN CSP 功用性强于 RN CSP[69]。图 12.37 和 12.38 为在 RN 和 SN CSP 上分离的具体方案。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

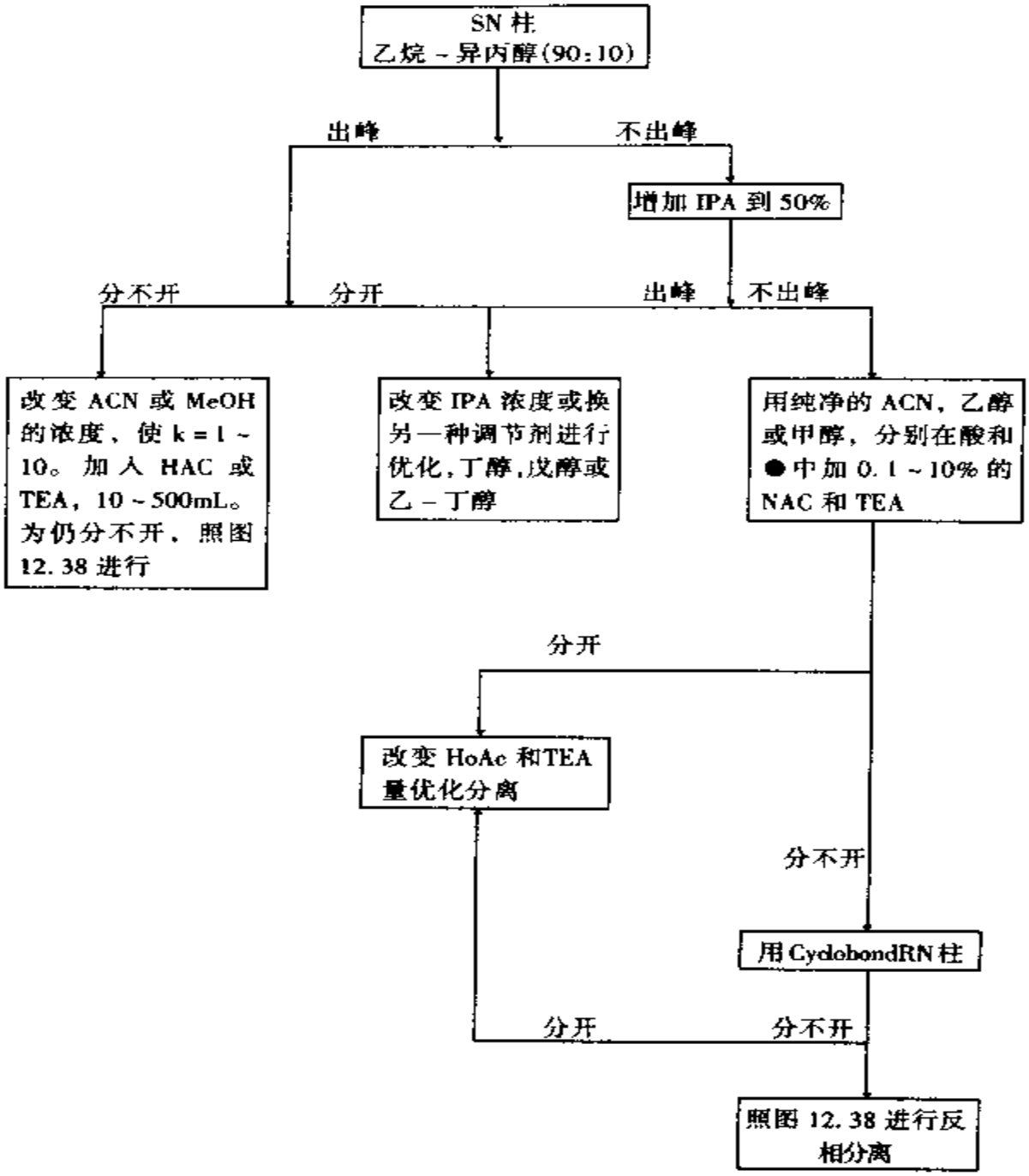


图 12－37 在 Cyclobond I SN/RN 正－极性有机相上的分离方案[69]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

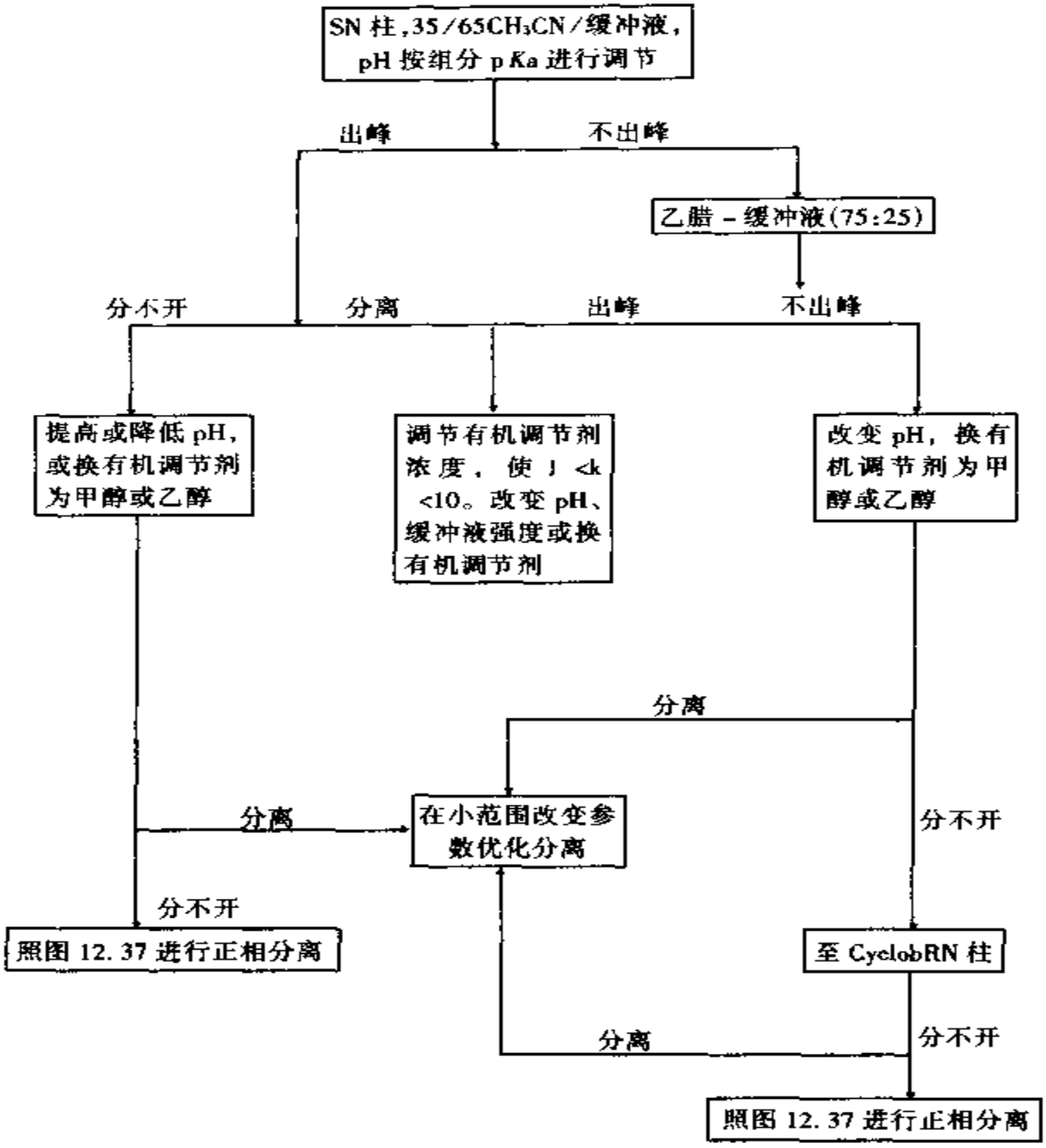


图 12－38 在 cyclobond I CN/RN 上的反相分离方案[69]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

参考资料

1. A Streitwieser and C. H Heathcock, in Introduction to Organic Chemistry 2nd ed, Macmillan, New York, 1981, p 122. –
2. Y. Fujimoto, K. Ishi, H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, and R. Shimizu, *J. Chromatogr.*, 402 (1987) 344.
3. C. Pettersson and C. Gioeli, *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 225.
4. J. R. Kern, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 355.
5. W. H. Pirkle and T. C. Pochapsky, *Chem. Rev.*, 89 (1989) 347.
6. W. H. Pirkle, C. J. Welch, and M. H. Hyun, *J. Org. Chem.*, 48 (1983) 5022.
7. I. W. Wainer and M. C. Alembik, *J. Chromatogr.*, 367 (1986) 59.
8. C. E. Dalgleish. Y. *Chem. Soc.*, 137 (1952) 3940.
9. W. H. Pirkle, D. W. House, and J. M. Fini ~ *J. Chromatogr.*, 192 (1980) 143.
10. I. W. Wainer and T. D. Doyle, *J. Chromatogr.*, 259 (1983) 465.
11. I. W. Wainer, Trends Anal. Chem., 6(5) (1987) 125.
12. D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, and J. – R. *Chen, Anal.* Chem., 66 (1994) 1473.
13. D. W. Armstrong, Y. Liu, and K. H. Ekborg – Ott, *Chirality*, 7 (1995) 474.
14. E. Francotte and A. Junker – Buchheit, J. *Chromatogr.*, 576 (1992) 1.
15. E. Francotte, J. *Chromatogr.* A, 666 (1994) 565.
16. C. M. Grill, J. R. Kern, and S. R. Perrin, in *Separations Technology: Pharmaceutical and Biotechnology Applications*, W. P. Olson, ed., Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, 1995, p. 231.
17. S. Allenmark, in *Chromatographic Enantioseparations*, Ellis Hoi – wood, Chichester, West Sussex, England, 1991, p. 230.
18. D. W. Armstrong and S. M. Han, in *CRC Crit. Rev. Anal.* Chem., 19(3) (1983) 175.
19. S. Ahuja, ed., "Chiral Separations by Liquid Chromatography," *ACS Symp. Ser.*, 471 (1991).

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

20. D. R. Taylor and K. Maher, J. *Chromatogr. Sci.*, 30 (1992) 67.
21. J. Hermansson and M. Eriksson, *J. Liq. Chromatogr.*, 9 (1986) 621.
22. T. Miwa, T. Miyakawa, and M. Kayano, *J. Chromatogr.*, 408 (1987) 316.
23. S. G. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, England, 1988, p. 111.
24. S. R. Narayanan. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (1992) 251.
25. S. Allenmark, in *Chiral Separations by HPLC*, A. M. Krstulovic, ed., Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, England, 1989, Chapter 11.
26. T. G. Pinkerton, W. J. Howe, E. L. Ulrich, J. P. Comiskey, J. Haginaka, T. Murashima, F. W. Walkenhorst, M. W. Westler, and J. L. Markey, *Anal. Chem.*, 67(1 ~ 5) 2354.
27. S. Andersson, S. Allenmark, P. Eriandsson. and S. Nilsson, *J. Chromatogr.*, 498(1990) 81.
28. *User's Guide: Application Note 13*, ChromTech AB, Hagersten, Sweden, 1994.
29. R. C. Williams, J. F. Edwards, and M. *J. Potter, J. Liq. Chromatogr.*, 16(1993) 171.
30. *Ultron ES – OVM Column*, Technical report, Rockland Technologies, Inc., Newport, DE. 1993.
31. I. Marle, P. Eriandsson, L. Hansson, R. Isaksson, C. Pettersson, and G. Pettersson, *J. Chromatoer.*. 586 <1991) 233.
31aJ. Haginaka and C. Seyama, HPLC '96, June 16 – 21, 1996, San Francisco, California, Lecture 1305.
32. *Product Bulletin IC – 201*, Shinwa Chemical Industries, Tokyo, 1994.
33. K. M. Kirkland, K. L. Nielson, and D. A. McCombs, *J. Chromatogr.*, 545 (1991) 43.
34. J. Hermansson and G. Schill, in *Chromatographic Chiral Separations*, M. Zieland L. J. Crane, eds.. Marcel Dekker, New York, 1988, Chapter 10.
35. *Chiral – CBH*: Application Note 12, Product bulletin, ChromTech AB, Hagersten, Sweden, 1994.
36. K. M. Kirkland, K. L. Nielson, D. A. McCombs, and J. J. DeStefano,

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

LC/GC, 10(1992) 322.
37. K. M. Kirkland and D. A. McCombs, *J. Chromatogr.* A, 666 (1994) 211.
38. G. Blaschke, *Angew. Chem.*, 92 (1980) 14.
39. *Chiral – AGP: Application Note H*, Product bulletin, ChromTech AB, Hagersten, Sweden, 1993.
40. J. Hermansson and A. Grahn, *J. Chromatogr.* A, 687 (1994) 45.
41. G. Hesse and R. Hagel, *Chromatographia*, 6 (1973) 277.
42. Y. Okamoto, M. Kawashima, and K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 5357.
43. Y. Okamoto and Y. Kaida, *J. Chromatogr.* A, 666 (1994) 403.
44. T. Shibata, I. Okamoto, and K. Ishii, *J. Liquid Chromatogr.*, 9 (1986) 313.
45. I. W. Wainer and M. C. Alembik, *J. Chromatogr.*, 358 (1986) g5.
46. I. W. Wainer, R. M. Stiffin, and T. Shibata, *J. Chromatogr.*, 411 (1987) 139.
47. T. Shibata, K. Mori, and Y. Okamoto, in *Chiral Separations* by HPLC, A. M. Krstulovic, ed. Wiley, New York, 1989, Chapter 13.
48. R. Isaksson, J. Roschester, J. Sandstrom, and L. – O. Wistrand, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 4074.
49. G. Blaschke, *Chem. Ber.*, 107 (1974) 237 and 2792.
50. J. P. McCarthy, *J. Chromatogr.* A, 685 (1994) 349.
51. *Operations Guide for Diacel Chiral Columns*, Chiral Technologies, Inc., Exton, PA, 1993.
52. K. M. Kirkland, *J. Chromatogr.* A, 718 (1995) 9.
53. H. Zhang, J. T. Stewart, and M. Ujhelyi, *J. Chromatogr.* A, 668 (1995) 309.
54. S. J. Grieb, S. A. Matlin, J. G. Phillips, A. M. Belenguer, and H. J. Ritchie, *Chiralty*, 6 (1994) 129.
55. T. Shibata, K. Mori, and Y. Okamoto, in *Chiral Separations* by HPLC, A. M. Krstulovic, ed. Wiley, New York, 1989, Chapter 13.
56. *Application Guide for Chiral Column Selection*, 2nd ed., Chiral Technologies,

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

Inc., Exton, PA, 1994.
57. *User's Guide for Chiral Phase Columns*, J. T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, 1992.
58. W. H. Pirkle and D. W. House, *J. Org. Chem.*, 44 (1979) 1957.
59. W. H. Pirkle and C. J. Welch, *J. Liq. Chromatogr.*, 15(11) (1992) 1947.
60. W. H. Pirkle, C. J. Welch, and B. Lamm, *J. Org. Chem.*, 57 (1992) 3854.
61. N. Oi, M. Nagasi, and T. Doi, *J. Chromatogr.*, 257 (1983) III.
62. N. Oi and H. Kitahara, *J. Liq. Chromatogr.*, 9 (1986) 511.
63. Regis Chemical Company brochure, Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL, 1993.
64. N. Bargmann-Leyder, J. C. Truffert, A. Tambute, and M. Caude, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 27.
65. M. Zeif, in *Chromatographic Separations*, M. Zeif and L. Crane, eds.. Marcel Dekker, New York, 1988, p. 315.
66. W. H. Pirkle and T. C. Pochapsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 352.
67. Regis Chemical Company brochure, Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL, 1986.
68. W. H. Pirkle and J. A. Burke III, *J. Chromatogr.*, 557 (1991) 173.
69. *Cyclobond Handbook*, Astec, Whippany, New Jersey, 1992.
70. K. G. Feitsma, J. Boeman, B. F. H. Drenth, and R. A. De Zeeuw, *J Chromatogr.*, 333(1985) 59.
71. D. W. Armstrong and W. Li, *Chromatography*, March 1987, p. 43.
72. W. L. Hinze, T. E. Riehl, D. W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, and T. Ward, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 237.
73. D. W. Armstrong and W. DeMond, *J. Chromatogr. Sci.*, 22 (1984) 411.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

第 13 章　制备 HPLC 分离

13.1　引言

本书其它章节均假设 HPLC 分离的目的是对不同样品进行分析，而本章讨论的是制备 HPLC 或称(制备 LC)目的是分离出纯组分(产品)，以供进一步使用。表 13.1 中比较了制备和分析 HPLC 的目的和特征。当只需少量纯品时，可用分析型 HPLC(用 0.46cm ID 色谱柱)来制备纳克至毫克量以下的样品。样品谱带通过检测器时可被观察，在检测器出口收集起来。通过蒸发或冷冻干燥除去流动相得到纯化样品。为了制得更多的纯样品，可加大进样量和/用多次进样，将所需产品部分收集起来。

当需要毫克级或更多的纯样品时，在超载条件下操作色谱柱是常用的方法[样品量大到使谱带变形，分离度降低(见 2.4.2)]，如图 13.1 所示。对于进样量不超过 25μg 时(图 13.1*a*，0.46cm 柱)，带宽和保留时间通常与进样量无关，且色谱图不受进样量影响。在同样条件下进样量超过很多时将导致图 13.1*b* 的分离结果。目标谱带 Y(*)增宽到与相邻的杂质谱带 X 相触的程度(称作谱带相触分离，见文献 1 和 2)。不过图 13.1*b* 的分离中产品回收率和纯度仍近似 100%，而可能比图 13.1*a* 得到更多的纯品或更高的产率。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 13－1　分析/制备 HPLC：目的和特点的区别

分析 HPLC	制备 HPLC
目的	目的
样品组成的信息	纯品的回收
通常研究大部分或全部样品组分	通常只对一种或几种样品组分感兴趣
特征	**特征**
进样量仅够检测用即可	尽可能加大进样量以生产最多的纯品
反相 HPLC 最方便	正相 HPLC 最方便
柱内径 1～5mm	柱内径 1～10cm(或更大)
柱填料 5μm 或更小	柱填料 7μm 或更大
HPLC 泵最多提供 10ml/min	HPLC 泵提供≫10ml/min
进样通常不是问题	进样较难，需多加注意
为最大灵敏度选择检测条件	为降低的灵敏度选择检测条件
样品在流动相中的溶解度通常不重要	样品溶解度一般非常重要
流动相挥发性不重要	流动相应是挥发性的，禁用不挥发性添加剂

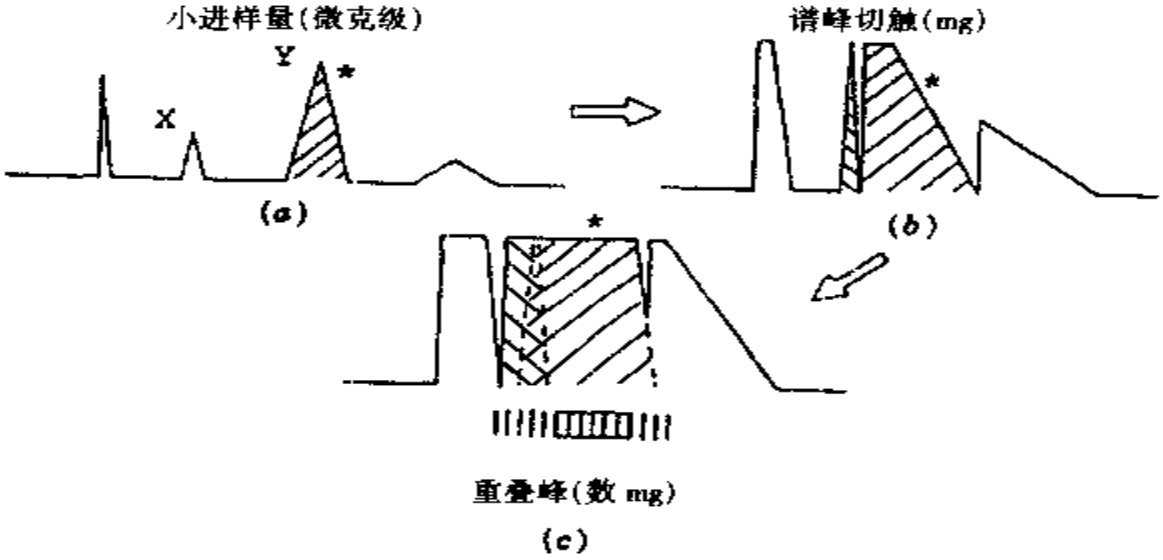


图 13－1　进样量对分离的影响

(a)分析色谱；(b)轻微过载(切触分离)；(c)严重过载(峰重叠)。在这些分离的讨论中假设柱内径为 0.46cm。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

每次进样所得纯品量最大通常是制备 HPLC 的主要目的。常常通过过分加大进样量(图 13.1*c*) 使样品谱带与一个或多个杂质谱带重叠。不过可使每次运行所得纯品量超过图 13.1*b*。收集该产品的小部分并用图 13.1*a* 中的 HPLC 法分析纯度。一旦收集到的含纯品的部分达到要求的纯度,除去流动相即可得到最终目标纯品。尽管此法需要额外的试验工作,当要求大量纯化目标组分时仍是一种经济有效的方法。

为了从不纯的起始样品中回收目标纯品,采用建立样品分析方法时相同的优化条件很方便。可按图 13.1 中的步骤通过一次或多次运行增加样品量至可以得到所需量的纯品。当需数量更大的纯品制备,可提高柱直径并加大进样量(除了流速,其它条件均相同)。不过,若所需制备的纯品量相对较大时,最好重新设计分析方法,找出制备 HPLC 的最佳条件。

13.2 建立制备 HPLC 分离方法

13.2.1 总论

建立分析 HPLC 方法通常作为制备方法的起点,可是也应注意制备 HPLC 分离的一些特征。首先收集馏分中的流动相必须能够除去。因此,用有机溶剂作流动相的正相色谱较适于用作制备色谱的分离模式,从目标组分中除去挥发性有机溶剂比含水流动相的反相 HPLC 更容易。类似地,应避免非挥发性的流动相成分。有可能的话,尽量不用离子对色谱(见 7.4)。若流动相中必须添加缓冲液,应优先选择挥发性(例如甲酸或乙酸,碳酸氨盐等)缓冲液,否则要除去缓冲液(除盐)需第二次分离。

其次,把粗产物从初始样品中分出,如图 13.2 所示。当以分析为目的时,需要样品中所有组分达到基线分离。图 13.2*a* 中的分离对谱图中每一对谱带的分离度 R_s>1.5,因此适用于样品分析。但是,若图 13.2*a* 的条件用来回收纯品(在 12.2min 大谱带流

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

出)，每次运行能分离的样品量十分有限。当进样量变大(>25μg)时，目标组分的谱带会变宽并迅速与其它组分的谱带重叠。另一方面，图 13.2*b* 的分离中，在 7～9min 洗脱的其它组分谱带分离度较差，而目标组分与相邻其它组分谱带的分离度较好(α 值大)。图 13.2*b* 中的分离可加大进样量来回收纯品。此分离不适于分析，但可设计用于制备 HPLC 纯化。

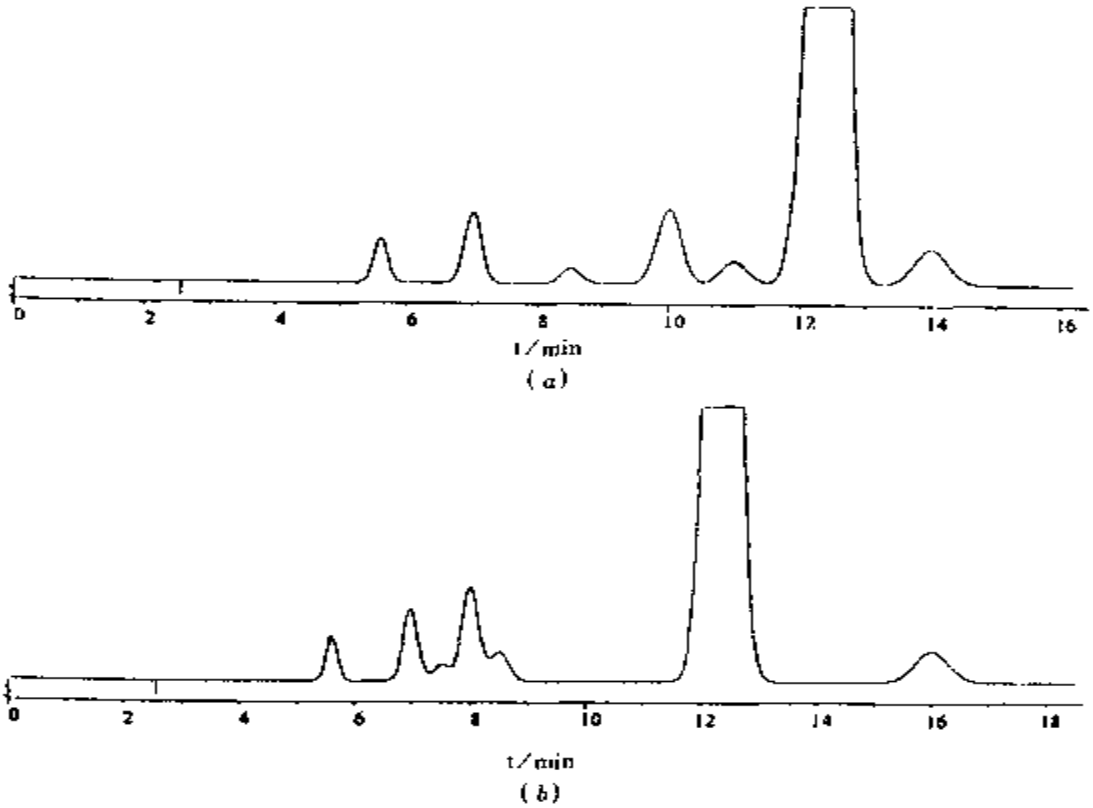


图 13－2　分析和制备分离的比较
(*a*)分析；(*b*)粗产品的制备分离

再者，需考虑样品在流动相中的溶解度，希望较多的样品溶于体积相对较小的流动相中。溶解度在制备 HPLC 中是一个关键因素，而这一因素在建立分析方法时并不重要。对溶于有机相的组分，用正相色谱较好。样品溶解度在 13.3.1 节中还要做进一步讨论。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

最后要考虑 N 和 α 的相对重要性。随进样量增加，色谱柱超载，样品带宽开始增加，色谱柱的塔板数 N（由带宽测量）随进样量的变化大于随柱条件（柱长、流速、填料大小等）的变化。制备 HPLC 中不再要求高的塔板数，因此使用较大载体颗粒和较高的流速较在分析分离中更有利。α 较大，可允许较大的进样量，对制备有利。

制备 HPLC 方法建立应按以分析为目的（6 至 9 章，11，12 章）方法建立同样的方案进行，通过调整色谱条件来得到最佳 k、α 值和目标组分谱带的 N 值（不太重要，但很有意义）。如上所述，正相 HPLC（而不是反相）通常是一首选的分离模式。正相条件中，未修饰的硅胶是较好的填料。制备时常需要较大的色谱柱，采用硅胶比极性键合相填料如氰基或二醇基便宜，也不会出现流失键合相污染已收集的馏分（不过，当含水流动相 pH>6 时，硅胶会部分溶解）等问题。

13.2.2 进样量的影响：切触谱带分离

合适的制备 HPLC 分离条件选择，希望进样量足够大，使每次运行中回收的纯品量更多。对实验室范围的制备 HPLC，最好在图 13.1b 所示的轻微超载或切触分离条件下操作，这种分离条件有以下优点：

1 高纯（99% +）目标组分的回收较便利

2 纯品几乎完全回收（95% +）

3 分离程序简单，不需要为了得到纯品去进一步分析谱带片断（如图 13.1c 中重叠谱带的分离）

4 容易发展切触谱带的分离方法

对切触峰的分离所允许的最大进样量（W_{max}）通常由尝试与误差法决定。对于第一次实验，根据进样量<10μg 所得的谱图推测接近 W_{max} 的样品量。最大样品量与目标组分谱带和最接近的其它组分谱带（表 13.2）的分离系数 α 有关。通过选择适当条件提高分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

离系数 α，W_{max} 值会迅速提高。例如，采用分析柱(25×0.46cm)，α=1.05，切触谱带分离的进样量约含目标组分 30μg。若 α=3，则目标组分的量可增大到约 6mg (2000 多倍)。在制备 HPLC 中大 α 值的重要性是选用正相分离的另一原因，因为与反相 HPLC 法相比更易得到选择性的较大变化(见 6.6)

表 13-2 切触分离[b]时选择性 α 和保留值[a] k 对 N 最佳值和进样量的影响[1]

	N			样品量(mg)[c] 25cm 色谱柱		
α	$k=0.5$	$k=1.0$	$k=3.0$	0.46 cmID	1 in.OD	4 in.OD
1.05	180,000	81,000	37,000	0.03	0.6	10
1.10	46,000	21,000	10,000	0.09	2	30
1.20	12,000	6,000	2,800	0.3	6	100
1.50	2,400	1,200	650	1.3	27	400
2.0	800	430	260	3	60	1000
3.0	300	190	130	6	130	2000

[a] k 值对应于目标组分峰或要分离的最大两峰

[b] 参见正文和图 13.1

[c] 对应于切触分离的进样量，假设目标组分和相邻峰在样品中浓度相同；若目标组分浓度为相邻峰的 X 倍，最大进样量可增加近 X 倍(或减少 1/X 倍)

表 13.2 也说明了制备 HPLC 分离的其它特征。首先，分离所要求的塔板数取决于目标组分谱带的 α 和 k 值(如公式 2.3 中分析分离的情况)。α 的增大(通过选择合适的 HPLC 条件)不仅能提高每次运行能分离的样品量，而且也可降低要求的色谱柱塔板 N 数。[例如，α=3 且 $k=3$ 时 $N=130$(表 13.2)]，较小的 N 值(更大的颗粒，更高的流速)可缩短运行时间并增加产率(单位时间生产纯品的量)。更短的分离时间也有助于提高目标组分的回收，因为在色谱柱里较短的时间使可能在柱分离时溶质的降解减少。再者，表 13.2 考虑了目标组分谱带的 k 值选择。大的 k 值要求较多的溶剂来生产单位重量(克)的纯品。在制备 HPLC 中，溶剂的价格

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

是一个重要的因素，因此更常选择较小的 k 值（其它因素相同）。表 13.2 提供了较小 k 值要求对应的更大塔板数的估算方法。

表 13.2 中的数据可作为近似规则，大的 N 值允许较大进样量；而 N 值较小允许的进样量也较少。与分析型色谱分离分析相比，制备 HPLC 分离常在更低压力下进行（如<1000psi），尤其是使用大颗粒填料大直径的柱子。不过，高压（伴随高流速和/或长柱子）能提高单位时间的制备量。

13.2.3 优化制备 HPLC 条件

下面的步骤提供了切触谱带制备 HPLC 分离方法建立条件选择的一套系统方案，这通常是低于 1 克纯品制备的较好方法，我们将以一个例子来说明其应用。

步骤 1. 对大多数样品，可选正相或反相方法，溶于有机相的样品适于用硅胶柱正相 HPLC 法。硅胶上的分离可通过薄层色谱[3]分析目标组分片断进行监测。

步骤 2. 选择一根分析柱（例如 25×0.46cm）。对于反相分离，选用适于分析分离（如对碱性样品，用非酸性 C_8 或 C_{18} 柱）的填充柱。如果分离有可能进一步移置到更大直径的柱子上，两种色谱柱的填料最好一样。一些色谱柱供应商能提供用相同批号材料填充的不同尺寸的柱子。

步骤 3. 用和分析分离（6 至 9, 11, 12）相同的方案完成方法建立，优化溶剂强度和选择性（若有可能，对目标组分 $k<2$）。尽管梯度洗脱能从色谱柱中除去强保留的杂质，但尽量不用这种模式。在制备 HPLC 中，记住只对（图 13.2）回收的样品才要求好的分离度。同样，增加目标组分的选择性也大有好处（若可能 $\alpha>1.5$），因此有必要对影响 α 的其它分离条件加以研究。

在图 13.3 的例子中，第 1 至 3 步骤得到了图 13.3a 中的反相分离。两种嘌呤在 $N=5400$ 时基线分离，运行 16min，平均值 $k=4$, $\alpha=1.20$。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

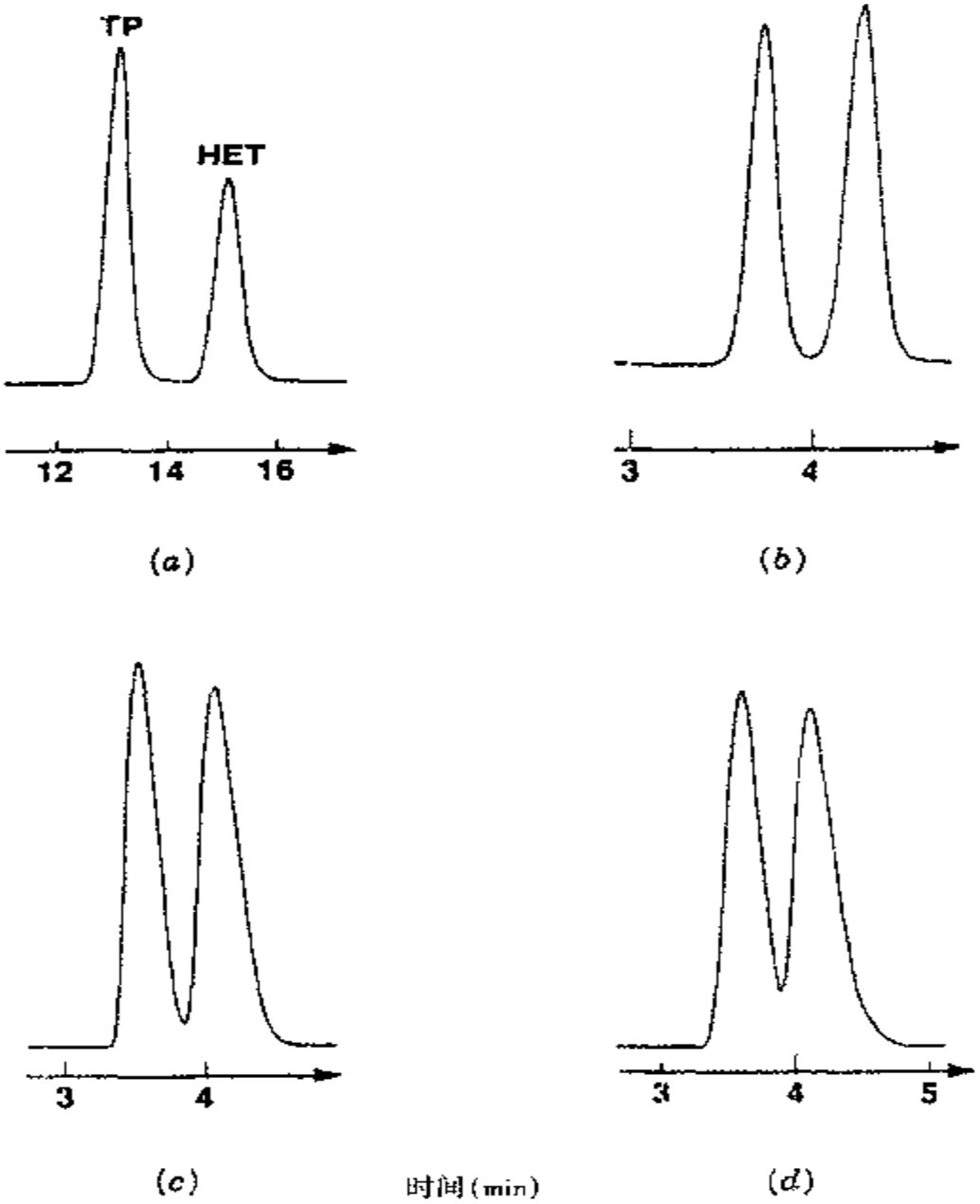


图 13.3　制备 HPLC 分离系统方法的建立[1]

样品：theophylline(TP) 和 3－α－hydroxyethyltheophilline(HET)．(*a*) 初始小进样量(1μg)分离；25×0.46cm 10μm C_{18} 柱；15% 甲醇/水流动相；1.0ml/min；室温；(*b*) 同 (*a*)，除了 3.4ml/min；(*c*) 同 (*b*)，除了 0.5mg 样品(0.25mgTP 和 HET)；(*d*)同(*c*)，除了 1 in 直径的色谱柱，72ml/min 和 5.3 mg 样品。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

步骤 4. 一旦为如图 13.3a(1μg)的小进样量运行选好条件，可加大进样量直到切触谱带分离。表 13.2 提供了 $\alpha = 1.20$ 时分离的进一步实验信息。最佳进样量是 0.3mg 产品；由于样品是两组分 1:1 的混合物，所以样品总重为 0.6mg。表 13.2 中推荐的塔板数是 2500(对 $k = 3$, $N = 2800$)。下一步是调整实际塔板数，使它接近推荐值(尽管并不太重要)。图 13.3a 中流速 1.0ml/min，压力 500Psi。因此可增加流速以缩短运行时间并使实际塔板数接近目标值 $N = 2500$。3.4ml/min 的流速可使 $N = 2600$，压力为 1700Psi。图 13.3*b* 是 1μg 样品在 3.4ml/min 流速下的分离。0.6mg 样品(条件与图 13.3*b* 相同)的分离比预想差，因此如图 13.3c，样品被减至 0.5mg，后者的分离接近于期望值(切触谱带)，对小直径(0.46cm)柱已无需再改变条件。在样品溶解度有限的情况，首先要尽可能地增加样品体积(公式 13.1)。如果不能有效溶解足够的样品，应探索采用其它方法(见 13.3.1)。

步骤 5. 制备 HPLC 方法建立的最后一步是通过提高柱直径来提高每次运行所能分离的样品量。同样的流动相，柱填料(类型和颗粒尺寸)和柱长应用于小直径和大直径柱子，进样量(质量和体积和流速)随柱填料质量成比例地变化，比例系数等于 $(d_2/d_1)^2$，d_1 和 d_2 是第一根(小直径)和第二根(大直径)色谱柱的内径。在大直径的色谱柱上也能取得与小直径柱相同的分离：目标组分谱带在同样的时间间隔内将会洗脱，对两根色谱柱上限定纯度(如>99%)目标组分的回收率也相同。

在图 13.3 的例子中，从 1in 直径的色谱柱移置到 2.12cm 内径的粗柱子上。色谱柱直径比的平方是 $(2.12/0.46)^2 = 21$，因此流速和进样量被提高为：72ml/min 和 10.5mg，分离结果如图 13.3d。通过每 5min 重复进样，每小时可回收 60μg 的纯样品。若需数克纯品，要用更大直径的色谱柱使生产更快。另外，选择性的进一步优化可能会带来更大的 α 值，并允许更大的进样量(表

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

13.2)。

13.2.4 梯度分离

正如 8.3 节中所讨论的，当使用可比的分离条件时，只需调整梯度陡度使样度运行(k^*，公式 8.1)中的保留值等于等度运行(k)中的保留值，等度和梯度洗脱对目标组分的分离给出相同的分离度。这种梯度与等度洗脱的相似性也存在于制备 HPLC 中。进样量增加时，等度和梯度运行主要的差别是峰形改变。色谱柱过载，等度分离给出正三角形峰而梯度洗脱给出鱼鳍型峰。梯度洗脱中采用不同进样量得到的峰如图 13.4 所示，比较图 13.4a 与图 2.14 中的等度结果有助于了解两种分离的特征。

图 13.4b 说明了图 2.15 中黄嘌呤样品柱超载分离时等度和梯度洗脱的相似性。图 13.4b 的每个例子对应于三次分离叠加的结果(注入每种黄嘌呤和混合物)，见图 2.15 中的有关讨论，图 13.4b 中的样品量指每种黄嘌呤的含量(例如对左边的谱图每种为 1.0mg，对右边各为 2.5 和 25mg)；上面是等度分离，下面是梯度分离。比较这些实验的结果，当其它条件相同且 $k = k^*$ 时，不论用等度或梯度洗脱，分离度和纯品回收率基本相同。由于等度和梯度洗脱在制备 HPLC 分离中的相似性，表 13.2 和 13.2.3 中所述的等度制备 HPLC 方法建立模式同样适用于梯度分离。图 13.1a 初始小进样量分离的方法建立，见第 8 章的相关讨论，再按照 13.2.3 中第 4,5 步骤进行研究。

13.2.5 痕量组分回收

前面的讨论假设要回收的纯品在样品中的比例相当高(如 80% ~90% 纯产品的制备 HPLC 分离)。当要从样品中分离出痕量组分时，最好用两步法。第一次分离时，柱子负载超过切触峰分离点。假设图 13.1 的 X 峰要被分离和纯化，要收集和富集所有含 X 的片断，使 X 量大于 Y。接着可在切触峰条件下再分离 X，因为此时大部分 Y 组分已从样品中被除去。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

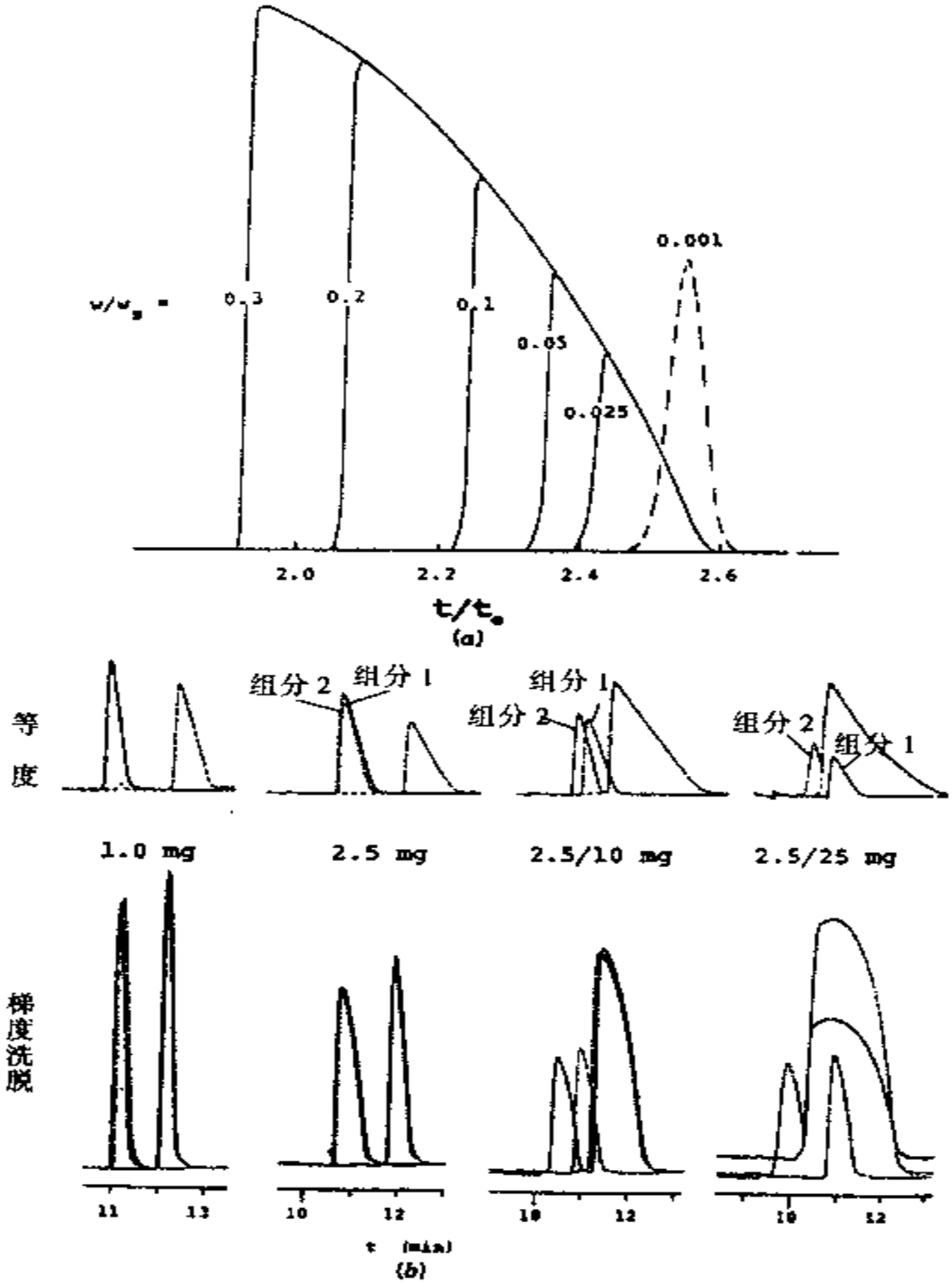


图 13－4　梯度洗脱中柱超载的影响

(a)增加样品量对峰形的影响(计算机模拟)[4]

(b)对等度和梯度中柱超载的模拟影响[6]

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

13.3 制备 HPLC 的实际应用

为了建立制备 HPLC 方法，不仅需考虑 13.2 和前面章节中提出的问题，而且还需考虑其他因素的影响。

13.3.1 样品溶解度

除了取得最大的选择性，样品溶解度通常是建立制备 HPLC 方法的主要障碍。许多情况下，样品因在流动相中没有足够大的溶解度可能在柱过程中解析出来，这使得在用于溶解样品的溶剂中样品浓度不宜过高。最大样品体积 V_{max} 可用下式估算（假设样品溶剂和流动相相同）[2,6]：

$$V_{max} \approx 0.5F(t_2 - t_1) \tag{13.1}$$

这里 V_{max} 单位是 ml，F 是流速（ml/min），t_1 和 t_2 是目标组分峰与最邻近的样品（<10μg）峰的保留时间（min）。注意因为保留时间 t_1 和 t_2 与 F 成反比只增加流速并不影响 V_{max}。样品体积大于 V_{max} 会增加谱带重叠，必须注入较少的样品。

如果最大进样体积（V_{max}）不能溶解足够量样品产生切触分离，可以探索选择不同于流动相的样品溶剂。对于离子型样品，pH 值或样品溶剂离子强度的变化可能会增加样品的溶解度。对正相分离，用高浓度低极性的强溶剂 B 会增加样品溶解度而不改变溶剂强度[7]。例如，假设流动相为 4% 甲丁醚（MTBE）/正己烷，图 6.23 说明 60% CH_2Cl_2/正己烷有和 4% MTBE 相同的洗脱能力，能以相同的 V_{max} 值用作样品溶剂。由于在这个新的样品溶剂中 B 溶剂（CH_2Cl_2）的浓度更高，它有可能溶解更多的样品。

加热样品并提高色谱柱的柱温通常是提高样品溶解度的有效方法，添加剂如离子对试剂或表面活性剂有时也能用来提高溶解度。在制备 HPLC 中，当样品溶剂与流动相的组成不同时，必须注意避免分离时样品在柱内沉积的情况。一般不用制备 HPLC 分离难溶样品，如果采用可能有相当多的麻烦，关于样品溶解度的

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

更多信息参见文献 8。

13.3.2 设备要求

制备分离通常要求直径更大的色谱柱；更高的流速和比分析 HPLC 更大的进样体积。此外，过高的样品浓度也可能会导致检测器超载。关于制备 HPLC 色谱柱和设备的详细介绍，参见文献 8。

13.4 制备 HPLC 分离的定量预测

下面关于制备 HPLC 分离的讨论建立在充分发展的切触谱带分离[2,6]的理论基础上，可以说明不同因素对分离的影响规律。

13.4.1 一般关系式

如图 2.14 和 2.15，即使每种组分可能使色谱柱超载，但轻度超载的分离行为与各样品谱带独立在柱内迁移的情况基本相同。若样品量大到足以影响峰宽和峰形，峰形可以近似为从正常 t_R 开始延至 t_0 的三角形；如图 13.5，也可以通过理论[6]加以预测。峰底宽 W 决定了它与相邻峰的分离。超载分离的带宽 W 与样品重量和实验条件的关系为：

$$W^2 = W_0^2 + W_{th}^2 = 16/N \cdot t_0^2(1+k)^2 + 6t_0^2k^2w/w_S \qquad (13.2)$$

（柱影响）　　（样品量影响）

根据此式，带宽受两种因素影响：W_0 代表小进样量时的带宽（见式 2.12）；W_{th} 表示随样品重量增多带宽的增加。此处 N 和 k 分别为一般意义的塔板数和容量因子。t_0 是死时间，w 是进样组分的重量，w_S 是柱子的饱和容量（最大进样量）。对少量样品，带宽由 k、N 和柱子的死时间 t_0 决定；对大量样品，带宽主要由 k，t_0 和样品重量决定。这些关系对制备 HPLC 方法建立有重要作用。公式 13.2 中的两项皆随 t_0，k 的增加单调增加。不过，样品重量代替 N 成为影响大进样量时带宽的主要因素。因此，当样品量较大时，带宽和分离度受 N 的影响不大。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

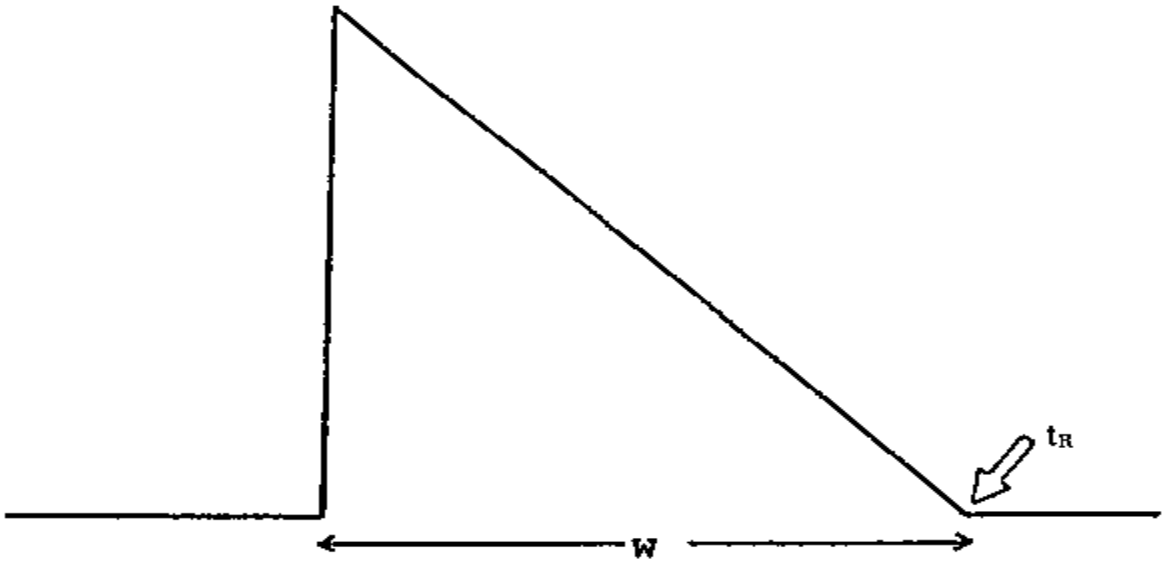


图 13－5　用直角三角形代替柱过载时的色谱峰

公式 13.2 可以得到能够说明制备 HPLC 原理的简单关系。切触谱带的目标组分质量[2]

$$w \approx \frac{1}{9} w_S \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)^2 \qquad (13.3)$$

此公式可用来推测对某一特殊分离(切触峰)的最大进样量。更重要的是它强调了在制备 HPLC 中选择性 α 和柱容量 w_S 的重要性。通常，希望增加进样量和进样频度来减少工作量和对大且昂贵的色谱柱的需求。根据式 13.3，如表 13.2，进样量可随 α 增加，分析分离通常要求对研究的所有峰 α>1.1，而对制备色谱分离目标组分峰的 α 越大效果越好。第 6，7(常规样品)11 和 12(特殊样品)章的指导原则常可对色谱图中为目标组分峰和相邻其它组分之间有更大 α 值(>1.5)提供参考。

公式 13.3 也说明了柱容量 w_S 的重要性(见 13.4.2)。w_S 越大，柱内能荷载的样品量越大，因此小孔、大表面积填料有一定的优越性。可用公式 13.2 估算特定色谱柱、样品和实验条件下的 w_S 值。先做两组分离实验，一组用少量样品(10μg)，另一组采用足够多(能引起目标组分峰明显展宽)的样品量。小样品量运行提供 k

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

和 α 值，大样品量运行给出目标组分峰宽 W，可进一步计算 w_S。w_S 也可从下式近似得到

$$w_S \approx 0.4(\text{柱表面积}, m^2) \tag{13.4}$$

参见 13.4.2 的讨论。

对每个切触峰的分离，塔板数存在最佳值[2]

$$N_{opt} \approx 40\left(\frac{1+k}{k}\right)^2\left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2 \tag{13.5}$$

随着 k 或 α 增加，切触峰分离要求的塔板数 N_{opt} 下降(表13.2)。选择 α 较大时，可注入更多样品，要求的塔板数也更小。采用快流速和大填料颗粒的柱子有较小的塔板数，可换来更短的运行时间。

13.4.2 色谱柱的饱和容量

样品质量对峰宽(式 13.3)的影响与色谱柱的饱和容量 w_S 有关，w_S 越大，对给定的峰宽和分离度，可以注入的样品量越大。许多情况下，可用式 13.4 来近似得出反相或正相 HPLC 的柱容量 w_S。对多孔柱填料，表面积与孔直径成反比。小分子(<1000Da)分离的填料孔径通常为 8～12nm，表面积 100 至 300m²/g，对应于 25×0.46cm 色谱柱的表面积为 350～1000m²。因此，这种色谱柱的预期容量 w_S 为 150 至 400mg。对于生物大分子(第 11 章)的分离要用大孔柱，其柱容量 w_S 相对较小。

柱容量随样品类型而变化[13,14]。用反相 HPLC 分离离子样品，在流动相中样品分子的互斥会使容量因子降低 10 倍左右。如果离子样品首先与反相填料(见 7.3.3.2)中的硅胶表面相互作用而保留，表面剩余活性位点浓度太小，柱容量 w_S 也许只有式 13.5 预测结果的百分之几。当观察到的柱容量小于式 13.4 所预测结果的 1/4 时，制备分离很难完成，必须改变分离条件以减少样品离子化和硅烷化效应的影响(见 5.2.1，7.2 和 7.3.3.2)。

13.4.3 梯度洗脱分离

大进样量对峰宽 W 的影响在等度和梯度洗脱[4]情况下的结

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

果相似，梯度洗脱时：

$$W^2 = W_0^2 W_{th}^2 = (16/N)\, t_0^2 (1 + 0.5k^*)^2 + 0.9\, t_0^2 t^{*2} w / w_s$$

（柱效应）　　（进样效应）（13.6）

W_0 和 W_{th} 都随和 t_0 有效保留 k^* 因子（公式 8.1）增加；W_0 与 $N^{1/2}$ 成反比，而 W_{th} 随 $(w/w_s)^{1/2}$ 而增加。这种行为与式 13.2 对等度分离的预测结果相同。图 13.4 进一步说明了在柱超载条件下等度和梯度洗脱的相似性。

13.4.4　严重超载条件下的分离

在轻微超载条件下，保留时间和峰宽不受样品中其它组分的影响。进样量增加超过某一点时情况将有所改变。从图 13.6 中可以看出与进样量有关的两种组分的分离情况，严重超载分离的两个重要特征（替换和尾随[15]）将显现出来，第一个组分（图 13.6a）主要由迟洗脱化合物 B 组成，而第二个样品（图 13.6b）主要由早洗脱化合物 A 组成（当样品中某一种组分被富集，且 α 较小时，严重超载分离的两种效应会更明显）。图 13.6 给出了每个谱图中组分 A 和 B 的相对质量。

对于图 13.6*a* 的样品，正如公式 13.2 所预测的那样，随进样量增加峰 B 的宽度增加。由于峰 A 的浓度相对很小，其宽度随进样量的变化较慢。不过，样品量增加时峰 A 的宽度的确“下降”了。峰 A 的变窄与两峰的部分重叠相符。峰 B 取代了峰 A，此效应被称为样品替换（须把这种情况和置换色谱区别开来[16]）。这里和图 2.15 中的样品替换与 A 和 B 的分别洗脱相比分离度提高，因为后洗脱的峰 B 使先洗脱的峰 A 的保留值下降造成两峰间的距离增加，峰 B 压缩峰 A 导致更好的分离。

在图 13.6*b* 的样品分离中，样品量增加时样品中存在的少量 B 也可导致峰宽的微小变化。但峰 A 和 B 的分离受进样量的影响不大。然而对超过5g 的样品量，更多 B 组分的存在会把 B 峰拉向 A 峰，引起 B 峰的展宽和纯 A 或 B 回收率的降低，这种现象被称

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

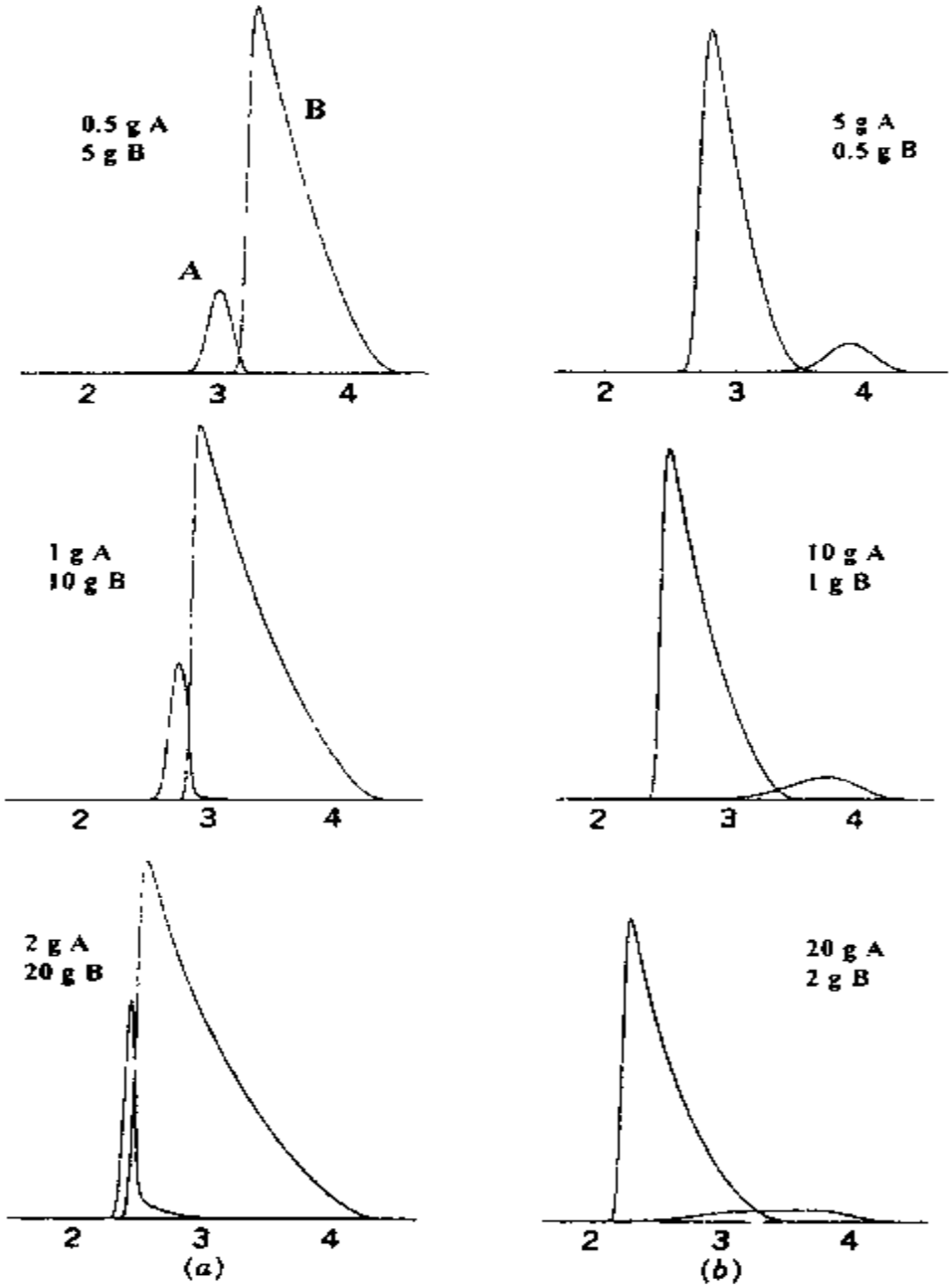


图 13－6　两组分混合物过载分离的计算机模拟
(假设符合 Langmuir 等温线)

条件：$N=800$，k 值为 1.0(组分 A) 和 1.5(组分 B)，A 和 B 的重量标在图中。柱子：25×5cm，7 μm 填料；210ml/min。(Date are courtesy of G. Cox Prochrom R&D.)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

为尾随效应[15]。尾随效应导致后面的 B 峰被扭曲使分离变差。

图13.6中进样量对分离的影响对 A 和 B 具有可比性。就是说大谱带先或后洗脱在影响纯品产率方面无太大重要性。这点可从表13.3中的数据更好地看出，大浓度的组分纯品回收率较高。假设目标组分和邻近峰以可比的浓度存在于样品中，表13.2中给出了切触分离的最大进样量。通常，目标组分的浓度更大，如果99%纯度目标组分要求得到95%的回收率，进样量可以成比例增加。

表 13－3　图 13.6a 的分离中 99%纯目标组分的回收率

样品重量(g)		纯目标组分的回收率	
A	B	A	B
0.5	5	97	100
5	0.5	100	97
1	10	87	100
10	1	99	82
2	20	41	78
20	2	87	50

a　对 $w/w_s=0.02$(表 13.2)预测的切触峰

图 13.6(替代和尾随)的严重超载分离效应对小量或批量制备 HPLC 分离都有重要作用。本书主要关心在实验室范围内少量样品(切触峰分离)的分离(分析或制备)，关于等度条件下严重超载分离的进一步讨论，参见文献 18 和 19。

13.4.5　异常等温线行为

本章对建立制备 HPLC 分离方法提供的指导方针可以说明许多典型的色谱行为。一般假设目标组分和相邻谱带(图 2.14)满足 Langmuir 型等温线。有时会发现真正的等温线与其差别较大，一种特殊但很重要的情况是，样品中不同组分的等温线在某些浓度点存在“交叉”，结果导致样品的保留值顺序颠倒，进样量较大时样品的分离度较中等进样量时有很大降低。图 13.7 为两组不同样品分离的实例，在两个不同波长条件下进行检测，可以分别得到

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

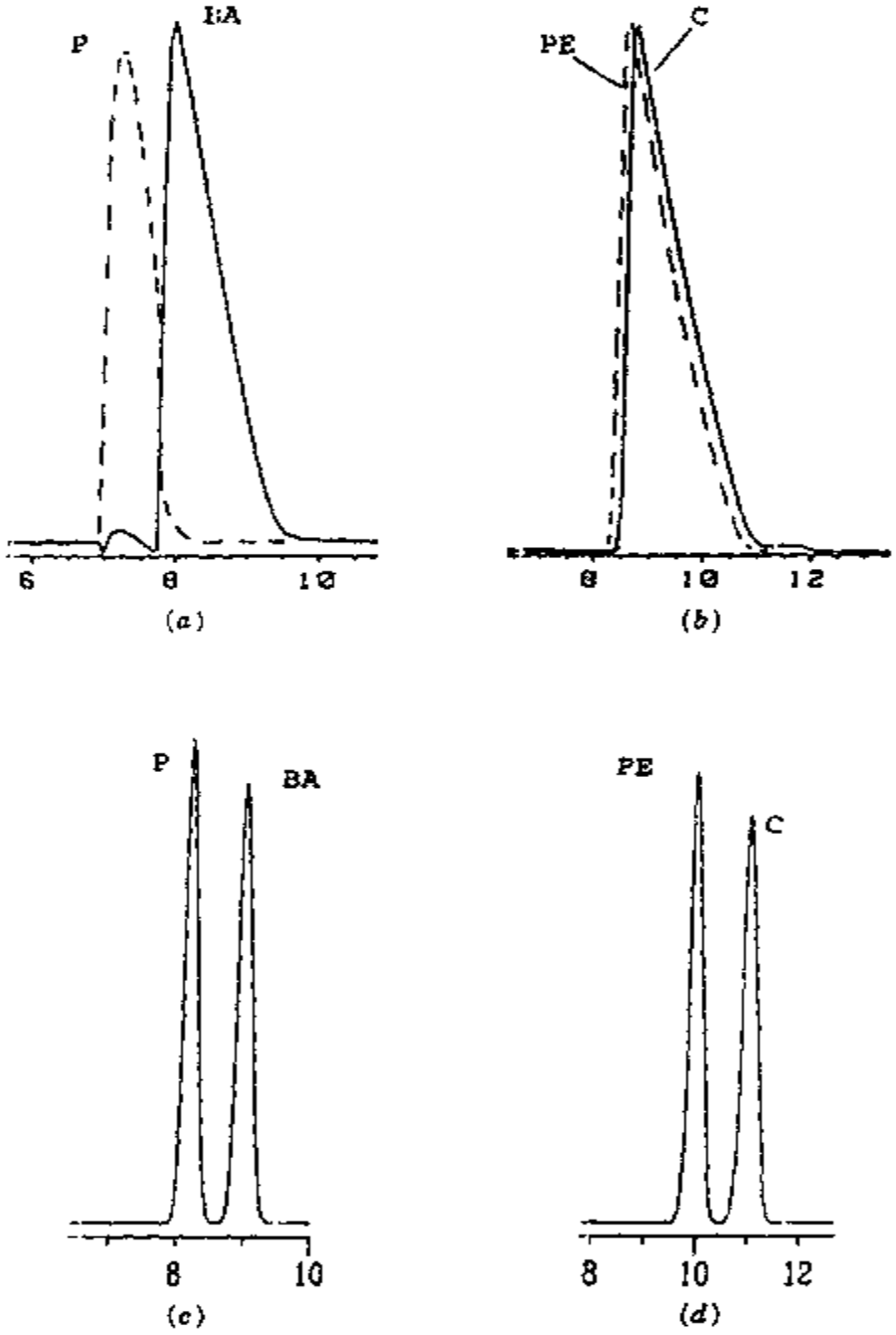


图 13－7　异常等温线情况下的分离[14]

条件：15×0.46cm，5μm C_{18} 柱；甲醇－水流动相；1.0ml/min。(a) 1mg 苯(P)和 3mg 苯甲醇(BA)；30% B；(b) 3mg 2－苯乙醇(PE)和 1mg p－苯甲酚(P)(C)，35% B；(c)同(a)，除了 10μg 样品；(d)同(b)，除了 10μg 样品外。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

样品混合物中单一组分的检测光谱图，进样量较小时，N，k 值接近，α 相同，这说明在进样量较大时，也应该有相似的分离结果。图 13.7a 为典型等温线的情况，含有 1mg 苯(P)和 3mg 苯甲醇(BA)样品的分离几乎没有重叠。图 13.7b 为等温线有交叉的情况，含 1mg p－甲苯酚和 3mg 2－苯基乙醇的样品，两峰几乎完全重叠。其他情况下进样量增加时峰形可能不同于 2.4 中的例子（例如更大样品量的峰是前伸峰而不是拖尾峰），当异常峰形出现时，制备 HPLC 的方法建立变得不可预测，需要做更多的实验研究。

13.5 制备 HPLC 方法建立的总结和例子

制备 HPLC 的方法建立依赖于能达到的制备量范围：<mg，mg～g，g～kg，或批量生产。当要求的纯品质量提高时，需要花费更多时间建立方法以便提高给定尺寸柱子的生产量。这类似于在一种分析方法上花费更多时间为了保持分离度(R_S>1.5)不变并缩短运行时间，在每一种情况下(增加进样量或降低运行时间)，α 的增加都是很有效的(见表 13.2)。

可用 9.3.1.2 中的样 B 作为如何建立制备 HPLC 方法的例子，制备 HPLC 通常由已建立的分析 HPLC 方法开始。图 13.8a 显示了在图 9.4 条件下的分离分析结果(49% ACN，25×0.46cm 的柱子，1.0ml/min)。目标组分峰(峰 1)和峰 4 几乎没分开：R_S = 1.3，k = 1.3，α = 1.1。然而，通过加大进样量，可回收到多达 25μg 的样品(0.46cm 内径的色谱柱，与柱长无关[201])，这样的进样量范围通常不会影响保留时间或分离度。对样 B，目标组分占样重的 60%，所以可注入 25/0.6 = 42μg 样品而不会影响峰形。若生产 25μg 纯品已足够，最好在此条件下运行一次制备 HPLC。每次进样 42μg，并重复进样，即可增加产量。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

改善制备 HPLC 分离的最简单方法是再优化溶剂强度(%B)。图 13.8*a* 建立的分离方法为所有样品提供了最好的分离，而在制备 HPLC 中只需要使目标组分和相邻峰的分离度最大(见图 13.2)。在大多数情况下%B 对样品分离度的影响被当作分析方法发展的一部分来研究，因此很少用额外的实验来改善制备 HPLC 分离方法。49% ACN(R_s = 1.3)改用 54% ACN(图 13.8b)可取得目标组分峰 B 的最佳分离。结果会使分离度提高(R_s = 1.4)且运行从 11min 缩短至 8min 。此法更大的优点是能够降低每次运行的溶剂量，这在批量生产中非常重要。

当需要大于约 100μg 的纯品时，最好注入更多的样品，表 13.2 可用来指导这类实验。对图 13.8b 目标组分的分离，α = 1.1，k = 0.9，N = 16,000。根据表 13.2，切触峰分离的最大进样量为 90μg(90/0.60 = 150μg 样品)。由于最接近的杂质峰(4)只占样品的 9%(峰 4/峰 2 的比例 = 9/60 = 1/7)，最大进样量可提高 7 倍产量，或 ≈ 1mg。大进样量的首次实验应该用一半的样品量(0.5mg)，再次运行进样量上调或下降取决于峰 2 和 4 的相对重叠程度。

假设 1mg 样品能带来切触分离，通过在重复分离中收集此样品峰可得到回收率大于 95% 的纯品。用此法可方便地得到 5～10mg 纯品。若要求更大量的目标组分(例如 0.1～1g)，必需首先提高方法的选择性，也可用更大直径的色谱柱。

样品选择性的进一步研究可采用第 9 章中的方法。从 ACN 含量的角度优化流动相之后，下一个合理的选择是改用甲醇。不幸的是，没有甲醇和水的混合物能给出图 13.8*b* 那样好的分离。不过，MeOH/ACN 作为流动相(图 13.8*b* 中 1/4，54% ACN；对最好的甲醇－水流动相 1/2: 65% 甲醇，R_s = 0.6)关键峰对是不同的(对目标组分和最接近的杂质峰)。因此，甲醇和乙腈的某些混合物可能给出更好的分离，实际上确实如此，如图 13.8c 采用 18% ACN－

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

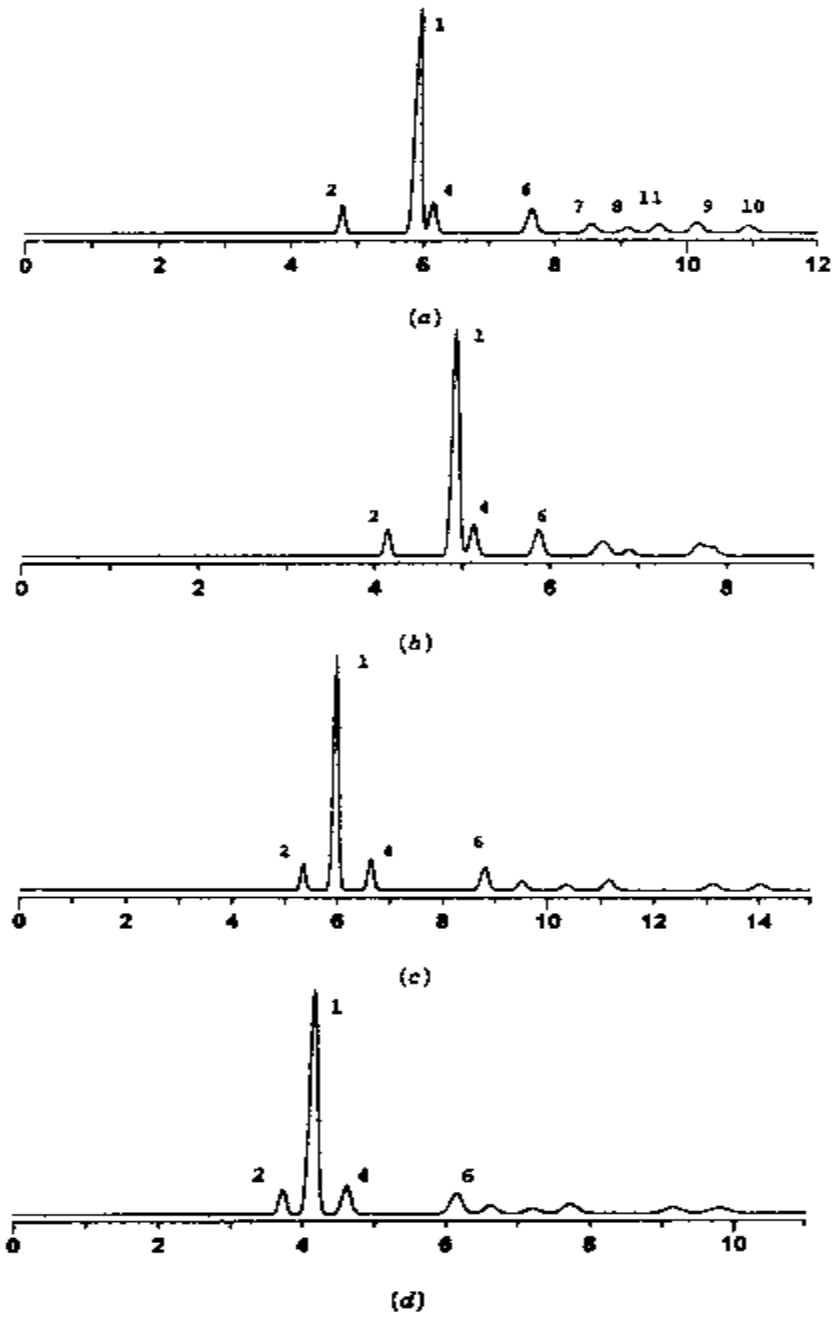


图 13－8　制备 HPLC 方法的建立

9.3.1.2 节中样 B。条件除了注明的均相同（25×0.46cm，5μmC_8 柱）；（a）49% 乙腈－水；（b）54% 乙腈－水；（c）18% 乙腈－37% 甲醇－水；（d）同（c），除了 50×0.46cm，10μmC_8 柱，2.9ml/min。（基于文献 21 的数据计算机模拟）。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

37% MeOH－水($\alpha = 1.2$)的结果。表 13.2 预测对 0.3mg 组分 1 在目标组分和峰 2,4 浓度相等时可获得切触分离。实际浓度比约为 7,因此可注入 3.5mg 样品(2mg 产品)。

在 25×0.46cm 柱内,进样 3.5mg 的实验完成,并取得了较好的结果,我们即可以进一步计算用更大直径的色谱柱能纯化的样品量及要求的流速。初始分离在 5μm 直径填料的色谱柱上进行,填料越大(如 7um 或更大)需要的色谱柱直径越大。对于目前的分离,我们假设用 10μm 填料的色谱柱。根据表 13.2,要求的 N 值($k = 1.3$, $\alpha = 1.2$)为 6000 块塔板。用 50×0.46cm 的色谱柱在 2.9ml/min(1400psi)的流速下能实现分离,图 13.8d 可以对此作出说明。基于图 13.8d 的放大分离,表 13.4 总结了不同直径的色谱柱对应的进样量和流速。注意:其它条件相同时,柱长从 25cm 变为 50cm 可使柱容量翻一番(对 0.46cm ID 的色谱柱从 3.5 至 7mg)。

类似地,0.9cm ID 色谱柱可方便地在分析 HPLC 设备上使用。通常的 HPLC 系统允许高达 10ml/min 的流速,也适用于这种色谱柱。若使用更大直径的色谱柱,必须购买制备泵(流速 50ml/min)或使用专为制备 HPLC 设计的系统。图 13.8d 的 0.9cm 内径色谱柱的放大分离可以在每次运行的 10min 中内回收 15mg 纯品,对应于 1 小时内 90mg 的产量(六次运行)。

表 13.4 中分离的最大进样体积可用公式 13.1 来计算。对 0.46cm 的色谱柱,峰 1 和 4 保留时间差为 0.41min 。流速 2.9ml/min,最大进样体积是 0.5×2.9×0.41 ≈0.6ml。有必要决定此体积的流动相能否溶解可导致切触峰分离的 7mg 样品。若情况并非如此,参见 13.3.1 节。

假使所要求的纯品量大于能便利地从一根 0.9cm 的色谱柱所得到的产量,则需要通过制备 HPLC 系统来完成。迄今为止,还没有花太多的力气去优化选择性,因此在大于 0.9cm 内径的色谱

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 13－4　样品的制备分离估计的样量和流速[a]

柱直径[b]	样品重量	最大样品体积(ml)	流速(ml/min)
0.46cm	7mg	0.6	2.9
0.9cm	25mg	2.3	11
1 in.	150mg	14	61
2 in.	600mg	56	240
4 in.	2.5g	225	960

[a] 见正文和图 13.8，条件：50cm，10μm C_8 柱；18% 乙腈－37% 甲醇－水流动相，35℃，

[b] 对外径 1 in. 和更大色谱柱，

柱上放大生产时，应该考虑通过进一步实验研究 α 的变化规律。此外，目前所描述的分离均假设在切触分离条件下完成。如图 13.1c 的峰重叠可以使进样量进一步提高，但这要求收集和分析目标组分峰的不同片断(额外的工作！)，不过用此法可使回收的纯产品增加一倍或更多。用一根 4in 柱，对应于每次运行得到 3g 以上目标组分或 2 小时 30g 以上目标组分(10 次运行)，连续两小时的分离将会消耗约 120 升流动相，应将它作为目标组分纯化费用的一部分来考虑。同样地，目标组分将包含在约两倍最大进样量的体积中(见式 13.2)，这也说明为了得到 30g 以上产品，必须从收集的馏出物中除去 2.2 l 溶剂。

由表 13.2 和本章中其它相关讨论可得到将小批量制备 HPLC 分离转换成更大范围包括更长、更粗色谱柱和/或不同直径的柱填料(因此 N 值不同)时对色谱条件的粗略估算。建议在真正购买和使用更大色谱柱和相关 HPLC 设备之前，最好先作“理论分析”，接着作小范围的实验来证实。

13.5.1　批量制备 HPLC 分离[22]

本章不是作为设计批量分离的详细指导。不过，用于在实验室中生产少量纯样的分离也可能突然要迅速转换成用于更大范

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

围。当所研究的某组分突然有异常的商业需求；要求大量的样品做更大规模的实验或客户要求较急时皆可能会如此，因此有必要掌握批量制备 HPLC 分离的一些要求。

1 常用比表 13.2 中更高的塔板数。原因是更大的 N 值允许更大的进样量；使每克纯品所要求的溶剂体积减少（溶剂的花费常为批量制备 HPLC 中的最大开销）。

2 最大进样量通常导致样品过载而不是切触分离；这也会降低溶剂（和其它）费用。

3 生产中不可行的溶剂（由于花费、毒性、难处理等原因）一开始就应避免。

4 方法建立中使用的填料在最后 HPLC 处理时同样应能大量得到。

5 不同批号的填料应在决定使用前先进行评价。

6 通常需回收溶剂（有时燃烧）以减少重新购买和处理的费用。

7 反相分离可能比正相分离便宜，正相溶剂通常较贵，也可用膜来纯化水/有机物的混合物。

8 对直径≥5cm 的色谱柱要专门设计，以保证床层稳定，并避免高压时柱损坏。

当从实验室范围转变到小规模或批量生产时，应考虑更多的问题：1 操作人员所受训练较少时，必须考虑过程的安全性；2 过程中所有组件的自动化程度也变得越来越重要；3 HPLC 本身在批量生产中是一种昂贵的方法。因此，经常将 HPLC 和其它较便宜的纯化方法相结合以降低操作的总体成本。对批量制备 HPLC 方法建立的一些例子，参见文献 23 和 24。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

参考文献：

1. G. B. Cox and L. R. Snyder, *LC/GC*, 6(1988)894.
2. L. R. Snyder, G. B. Cox, and P. E. Antle, *Chromatographia*, 24(1987)82.
3. J. C. Touchstone, *Practice of Thin – Layer Chromatography*, 3rd ed., Wiley, New York, 1992.
4. G. B. Cox, L. R. Snyder, and J. W. Dolan, *J. Chromatogr*, 484(1989)409.
5. J. E. Eble, R. L. Grob, P. E. Antle, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 405(1987) 51.
6. J. H. Knox and H. M. Pyper, *J. Chromatogr.*, 363(1986)1.
7. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed., Wiley – Interscience, New York, 1979, pp. 638 – 639
8. B. Porsch, *J. Chromatogr.* A, 658(1994)179.
9. H. Colin, in *High Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds., Wiley – Interscience, New York, 1989, p. 415.
10. W. M. Skea, in *High Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds., Wiley – Interscience, New York, 1989, p. 479.
11. P. D. McDonald and B. Bidlingmeyer, in *Preparative Liquid Chromatography*, B. A. Bidlingmeyer, ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 1.
12. M. Verzele, M. De Conick, J. Vindevogel, and C. Dewaele, *J. Chromatogr.*, 450 (1988)47.
13. J. E. Eble, R. L. Grob, P. E. Antle, and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 387 (1987)45.
14. G. B. Cox and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 483(1989)95.
15. S. Ghodbane and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 440(1988)9; 444(1988)275; 450(1988)27.
16. J. Frenz and C. Horvath, in *High – Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives*. Vol. 5, C. Horvath. ed., Academic Press, San Diego, CA, 1988, p. 212.
17. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and G. B. Cox, *J. Chromatogr.*, 483(1989)63.
18. L. R. Snyder, J. W. Dolan, and G. B. Cox, *J. Chromatogr.*, 484(1989)437; 540 (1991)21.

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

19. G. B. Cox and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 590(1992)17.
20. H. Poppe and J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, 255(1983)395.
21. J. A. Lewis, L. R. Snyder, and J. W. Dolan, *J. Chromatogr.* A, 721(1996)15.
22. Section 13. 5. 1 is besed primarily on discussions with G. B. Cox of Prochrom R&D, Champigneulles, France.
23. D. B. Williams, G. T. Carter, F. Pinho, and D. B. Borders, *J. Chromatogr.*, 484 (1989)381.
24. M. Kodama, S. Ishizawa, A. Koiwa, T. Kanaki, K. Shibata, and H. Motomura, *J. Chromatogr. A*, 707(1995)117.

参考书目

1. B. A. Bidlinmeyer, ed., *Preparative Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1987. (a good review of the principles and practice of pre – 1985 preparative HPLC, especially the first chapter)
2. J. H. Knox and H. M. Pyper, *J. Chromatogr.*, 363(1986)1. (a difficult paper to follow, but it contains many important concepts for preparative HPLC)
3. L. R. Snyder, G. B. Cox, and P. E. Antle, *Chromatographia*, 24(1987)82; L. R. Snyder, J. W. Dolan, and G. B. Cox, *J. Chromatogr.*, 483 (1989)63, 85, 95. (summary of the contributions of this group to an understanding of preparative HPLC under isocratic conditions; starts with the Knox and Pyper approach)
4. H. Colin, in High Performance Liquid Chromatography, P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds., Wiley – Interscience, New York, 1989, p. 415. (some details on experimental aspects of preparative HPLC; many references to older literature)
5. W. M. Skea, in *High Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick, eds., Wiley – Interscience, New York, 1989, p. 479. (discussion of process – scale preparative HPLC)
6. B. Porsch, *J. Chromatogr.* A. 658(1994)179. (a practical review of preparative HPLC with useful advice on several aspects of the subject)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第 14 章　定量(包括痕量分析)

14.1　引言

HPLC 的实力之一是其卓越的定量分析技术。它不仅能够用于样品(包括纯样品)中基本或主成分的定量，还能测定含有许多中等浓度化合物的混合物以及基质中痕量浓度(ppb 级或更低)。的杂质。设计合理、有效的分析方法分析主成分时，应高度准确和精密(精密度：±1－2%；准确度误差为真值的 2% 以内)。痕量组分的定量往往不会如此；不过，准确度误差在真值的 10% 以内及 ±10～±20% 的精密度对最低水平的定量仍是可以达到的。

一种定量方法，对每一种被测物均能在较宽的样品浓度检测范围内有(良好的)线性响应是关键。准确、精密的 HPLC 定量分析中使用最广泛的检测器为 UV 检测器，本章中很多示例均以 UV 作检测器。但其它类型的检测器(见第 3 章)也会用到，有时可能更适宜。为使 HPLC 方法得到最佳结果，有必要了解并控制影响定量的因素。本章中我们将讨论定量中的这些问题，包括信号的基本测定、校正方法的类型、误差来源以及痕量分析。对于更多的细节可参考文献 1～5。

14.1.1　准确度，精密度和线性范围

建立良好的 HPLC 定量方法需要给出准确度、精密度和线性范围。第 15 章中将详细论述对某种特定方法的这些指标的评价

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

技术，在此只是对其基本概念加以阐述。

准确度的定义为测量值与真值接近的程度。“真值”可通过各种方法(15.2 节)来测得：采用适当的校正技术(见 14.3 节)，及尽量减少误差的来源(见 14.4 节)，也会使 HPLC 方法的日常测定更准确。

精密度是指同一样品多次测量结果的重复程度。这种重复程度包括使用不同的仪器、操作人员、样品制备、实验室等在一天内或经过数天所得测结果的重现性。评价不同水平的精密度常作为方法论证的一部分，该一问题将在 15.3 节中详述。

方法的线性是指响应值与样品浓度的校正曲线近似成一直线的程度，或者数据满足线性的程度：

$$y = mx + b \tag{14.1}$$

式中 y 为响应值，x 为浓度，m 为斜率，b 为适合该数据直线的截距。理想情况下，呈线性关系，(而且 $b \approx 0$)最好，因这种情况下测量更精密、计算更容易，可用较少的标准品数据确定方程系数。UV 检测器对于稀样品溶液的响应符合 Beer 定律，即呈线性关系(且 $b \approx 0$)。因此，线性校正也可以说明系统在整个所研究的浓度范围内性能良好。此外，呈线性(且 $b \approx 0$)的方法可以快速方便地校验一个(最好为二个)点，以确定校正准确度。假如校正结果较原校正值的偏差大于 2σ，则需要更重新校正。$b \neq 0$ 的线性响应或者非线性响应对某些方法可能是合适，如 14.3 节所述。

14.1.2 检测限和定量限

被测物最小可检测量[常称做检测限(LOD)]指能被可靠检测的最小浓度。LOD 与系统的信号和噪音有关，通常被定义为信噪比(S/N')至少为 3:1 的峰。图 14.1*a* 所示为一个典型的信号是检测器噪音三倍的示例。这里，噪音(峰到峰)为 10 个单位，而信号为 30 个单位。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

最小定量限[亦常称为定量限(LOQ)]要求 S/N' 比值至少为 10,见图 14.1 *b*。该例中,峰对峰的噪音为 10 个单位,而信号为 100 个单位(从噪音的中点到信号峰的顶点)。第二种方法是定义某一水平的精密度,然后根据实验确定相对于该水平的精密度时,峰需要多大。通过注入能够产生不同 S/N' 值(例如 3,5,10,15 和 20)的样品浓度,并测定各样品浓度的多次进样的精密度来实现。第三种方法是假定基线噪音近似为一宽度为 4 个标准方差单位(SD)宽度($N'=4\sigma$)的高斯分布。如 3.2.3 节所述,测定偏差受基线噪音(在峰前部和后部分别测定)和信号(峰高测定)两方面的影响,故有效的不确定性近似为 $3^{1/2}\sigma \approx N'/2$。在低 S/N'(如式 3.3)的情况下,变异系数(CV)≈50/(S/N')。因此对于 $S/N'=5$,假如 $\sigma \approx N'/2$,则用峰高测量估计的最好精密度为 50/5 或 ±10%。LOD 和 LOQ 还将在 15.6 节中详述。

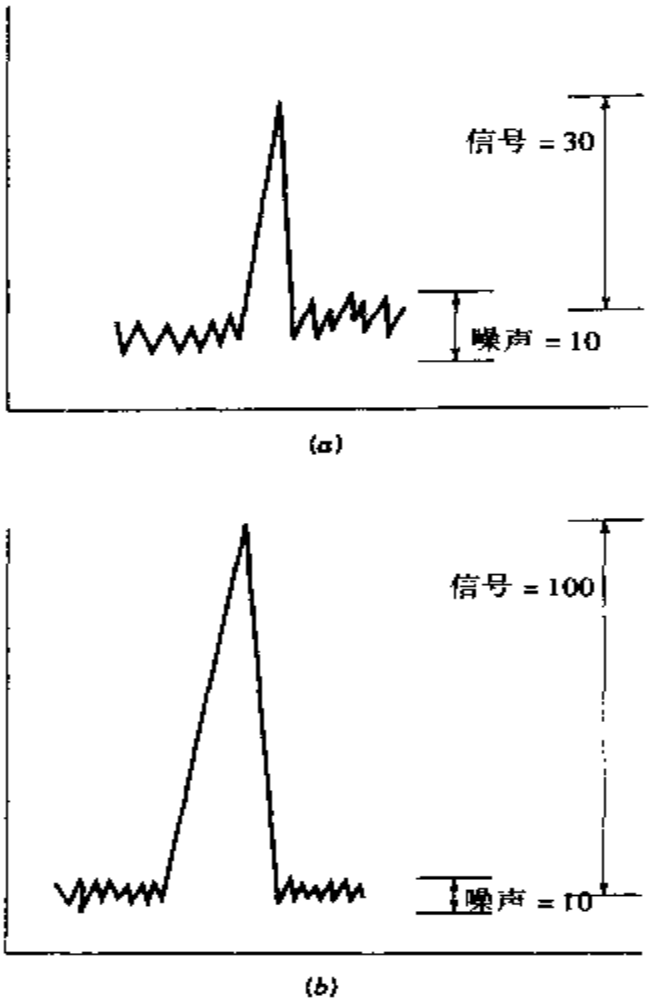


图 14-1 峰的信噪比 S/N'
(*a*)检测限(LOD) = 3:1;
(*b*)定量限(LOQ) = 10:1

定量中第三个重要的概念是最大定量限,是指使用该定量方法能够可靠测定的最大浓度。最大定量限通常由检测器的线性范围决定(即浓度增大至一定水平,检测器不再呈线性响应)。最大和

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

最小定量限将决定方法的浓度范围(见 15.5 节中的进一步讨论)。假如需定量分析高浓度样品,将样品稀释至可检测的范围往往是有效扩大方法范围的最容易且有效的手段。

14.2 信号的测量

14.2.1 噪音

任何信号测定的精度(与定量结果有关)匀受信号峰相对于噪音峰的大小的影响。噪音是指在没有被测物的情况下基线信号值的不稳定程度。噪音有三种基本类型:短期、长期、和基线飘移如图 14－2 所示。

短期噪音(亦称高频噪音)是大部分 S/N' 测量的主要关心内容。短期噪音可以由许多因素引起,包括检测器噪音、泵系统的脉动以及积分系统的电子噪音等。这种高频噪音(一般周期>1Hz)将限制 HPLC 检测信号的能力。

长期噪音(信号变化的频率<0.1Hz)可由外在因素或系统本身问题引起。图 14.2*b* 所示为一个频率为1周期/3min 长期噪音的示例。

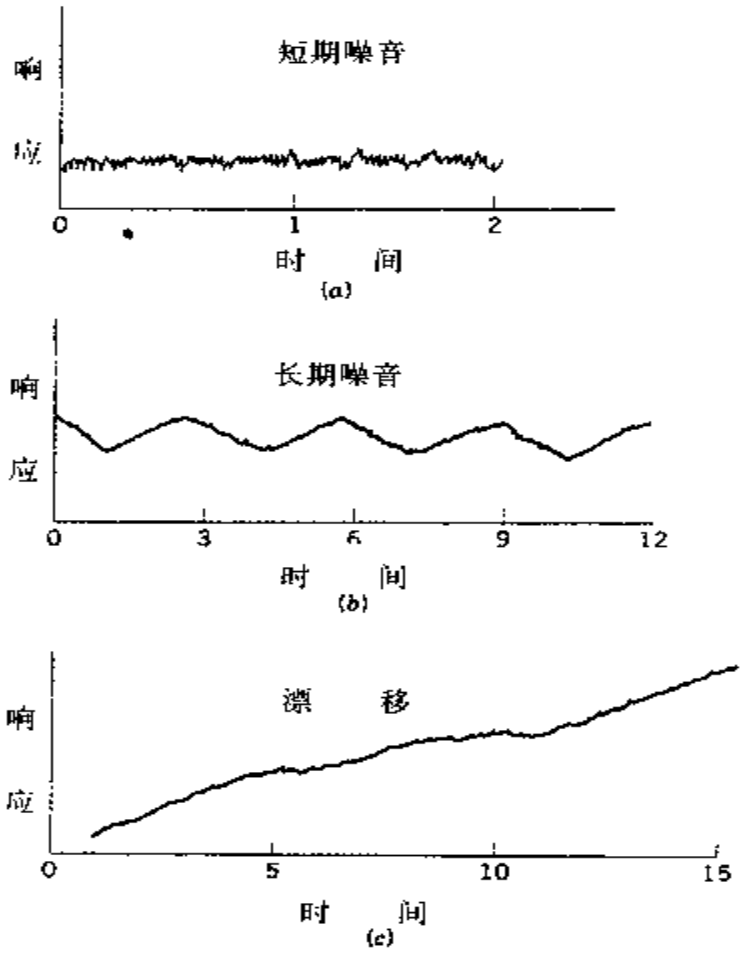


图 14－2 HPLC 色谱图的噪音类型

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

长期噪音的起因包括：

- 动相中溶剂组分的在线混合不均匀会随时间产生微小变化
- 温度波动
- 固定相从柱中流失(尤其是在梯度洗脱过程中)
- 前次进样中的未流出组分

一般说来，这种类型的长期噪音一旦被识别，在提供 HPLC 方法前可以被纠正。文献6在纠正有关噪音问题上提供了很多有益的建议。基线噪音及其对定量精度的影响在3.2.3中讨论。

基线漂移被认为是一种特殊类型的长期噪音，即使在比较完善的方法中也不可避免。基线飘移最显著的类型出现在梯度洗脱过程中，因运行过程中，溶剂组成被人为地改变；因此作为溶剂组成函数的检测器(通常为 UV)响应值会发生相应的改变。此类基线飘移如图14－2c 所示。即使梯度洗脱时基线明显飘移，由于可得到重现的基线，所以可能进行峰高和峰面积的测定。现代数据处理系统的使用可有助于修正基线飘移，不过严重的基线飘移往往需要人工处理，对自动的峰积分进行补偿，将使整个分析过程复杂化。梯度洗脱中用于消除基线飘移的技术见8.5.3中的讨论。

未流出峰或以前进样的组分出峰也可能以基线飘移出现。这些"峰"以极宽的谱带流出，有时很难与其它类型的基线飘移区别开。这种基线问题常发生于等度分离中，实验中，每次进样后，迟流出化合物未能从柱中清洗掉。可用5.4.3.2节中的技术减小或者消除该类基线飘移。

基线飘移也会由检测器性能的改变而引起。有些示差折光检测器对温度波动非常敏感；检测器流通池的任何温度改变均会导致输出信号的严重飘移。基线飘移也会发生于 UV 检测器中，这是由于灯的强度(老化)或检测器二极管或光电管的变化而引起。尽管这些变化相对于每一次操作来说要漫长得多，但如果检测器部件的使用寿命接近其极限时，飘移将会很严重。检测器噪音见

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

3.2.3 节中详述。

14.2.2 峰高

测定检测器对一化合物响应的最简单方式是测定其信号峰的高度，这种峰测定法对痕量分析较好（见14.5节）。对分离良好的单一组分，峰高是基线到峰顶点间的距离，其中基线值为峰开始前至峰结束后诸多数据点的平均值，见图14－3中峰2所示。假如由于长期噪音或飘移造成基线改变，则需修正峰高的测定，见图14－3中的峰3，基线须插入峰起始与峰终止之间（虚线）。对未全分开的峰，峰高测定可用切线铲削法，见图14－3中说明的主成分峰与峰1。但切线铲削法应仅适用于那些处于大峰尾部边沿上的小峰。尽管峰高的测定是简单的手工操作，大多数现代数据系统也能计算峰高，不过，确保基线位置的选择非常重要，尤其象图14－3中的情况。

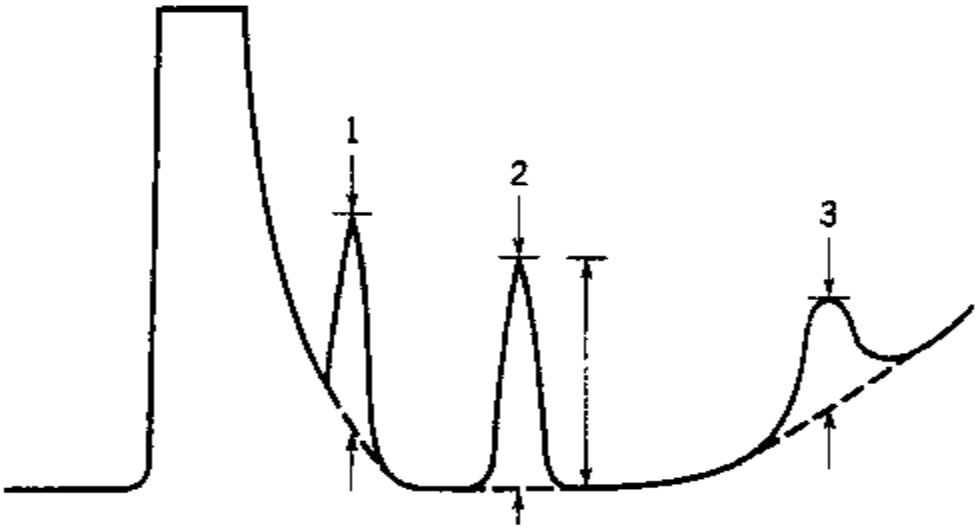


图 14－3　HPLC 中的峰高测量[7]

14.2.3 峰面积

峰面积是 HPLC 中使用最广泛的定量技术。分离良好峰的峰面积可定义为由峰开始到峰终止的时间内的信号响应积分值。该定义从理论上讲相对简单易懂，然而实际上，准确且精密地测定峰面积取决于很多因素。首先需确立正确的基线，尤其有短期或者长

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

期噪音的情况下。其次，有必要正确地定义峰的起始和结束（即当开始能分辨出信号和噪音到信号又回到基线值）。非对称峰或拖尾峰定义起、终点较困难，导致定量不准。第三，有必要采集的跨越该峰的数据点的数量应足够大，以准确估计真实的峰面积。已有研究表明一个高斯峰仅需 9 个点即可准确地描述，但一个非高斯（拖尾）峰则需要多达 32 个点[8]。大多数情况下，建议跨越所需峰至少要 15 个点；这意味着数据系统的采集速率一般至少必须为 3～5 点/秒（对于早流出的尖峰甚至需更高的采集速率，尤其对于使用 3μm 填料、在较高流速下运行的方法）。

峰面积一般用积分仪或计算机数据系统计算。不过峰面积也可以手工测量，如图 14.4*a* 和 *b* 所示。用数据系统，峰面积是跨越该峰的信号/时间切片的总和，见图 14.4*c*。如果使用得当，这种积分方法非常精确（一般大信噪比峰的精密度好于 ±0.2%）。不过，应注意大多数

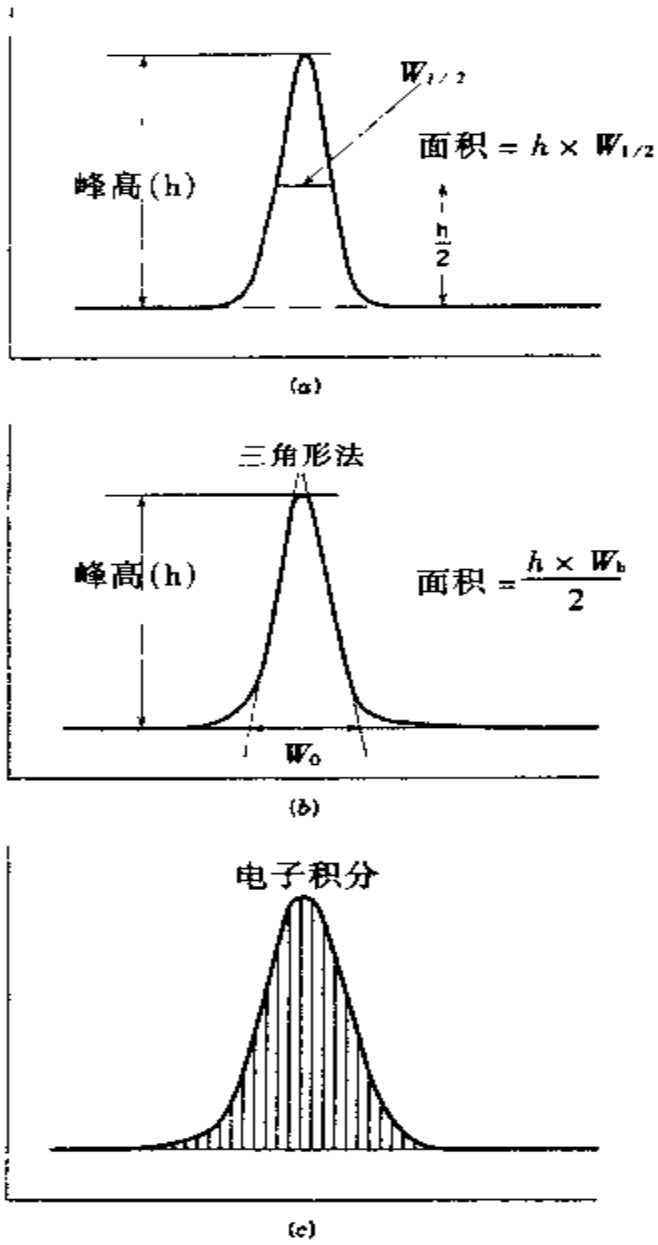


图 14－4　HPLC 中峰面积定量方法

（*a*）峰高 × 半峰宽法；（*b*）三角形法；（*c*）电子积分法（数据系统）

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

数据系统的峰检测计算(此处指峰面积计算)是利用一设定的阈值来决定峰的开始和结束,也必须能将真峰与短期噪音区分开。峰阈值不当将会影响定量的准确度,如图14.5所示。此处有对称峰(A_s = 1.00)和不对称峰(A_s = 1.58)两种,其积分峰面积均为不同峰阈值的函数。不对称峰由于拖尾部分的平坦响应,与以相同阈值鉴别的对称峰结束点比较,使得鉴别峰结束的三种峰检测计算均太早。回收的峰面积(表示为真峰面积的百分数)对称峰为99.6~99.8%,但对不对称峰仅为92.3~97.8%。每一数据系统或积分仪均有微小差别;因此,使用者必须确保适当地控制具体系统,以使所产生的数据可信。生产商应提供有关优化设置的信息,作为仪器说明的一部分。仪器准确度还需定期检查,以确保峰面积测定的稳定性。

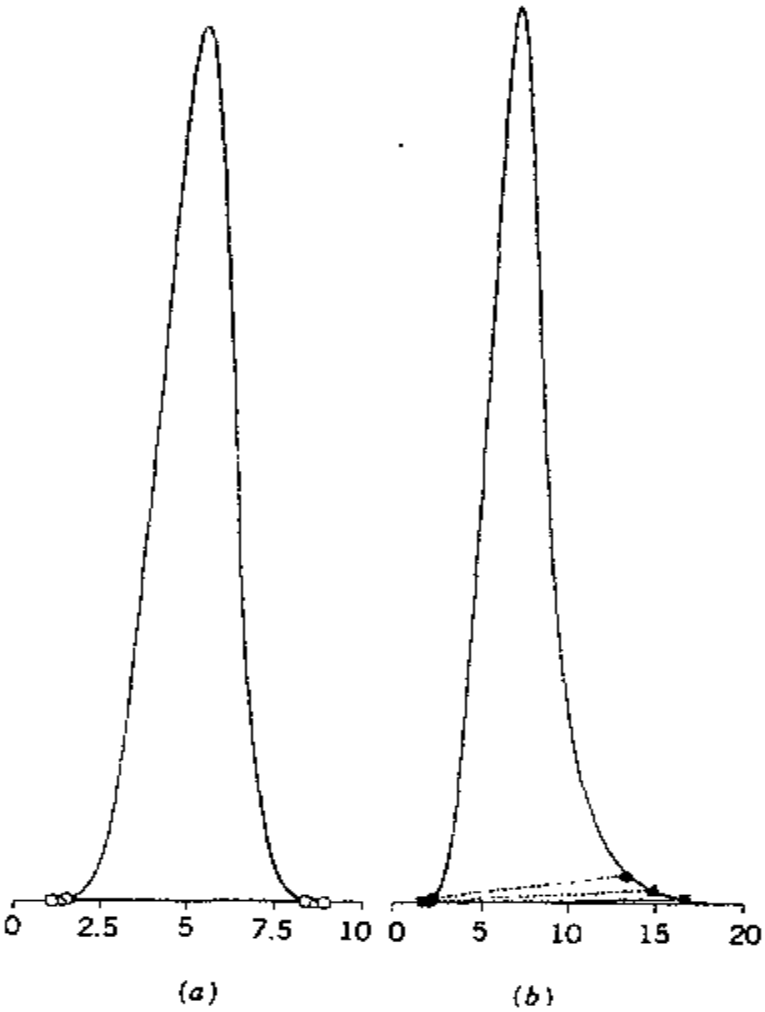


图 14-5 与设定阈值有关的峰面积积分[9]

(a)对称峰(=1.00);(b)拖尾峰(A_s=1.58)

回收峰面积□=99.9%, △=99.8%, ○=99.6%, ■=97.8%, ▲=95.3%, ●=92.3%。

14.2.4 峰高与峰面积定量

只要使用适宜的校正方法,峰高和峰面积均可用于HPLC定

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

量(见 14.3 节)。虽然峰面积定量在 HPLC 中应用较多，但并非总是该方法最好。对于一个性能良好、近似对称的峰来说，峰高测定精度同峰面积，但准确度更佳。不同的操作条件影响响应值的测定，而这些影响对峰高或峰面积定量存在差别，表 14.1 列出了操作参数的微小变化对峰高和峰面积测定的影响。例如，流量(F)的微小变化对峰高的影响($\leq F^{-0.2}$)小于对峰面积(F^{-1})的影响。影响塔板数 N 的色谱柱条件的改变影响峰高测定，但却不影响峰面积。表 14－2 列出更详细的实验条件，说明峰高还是峰面积定量更好。对痕量分析，峰高往往是更合理的定量方法(见 14.5.2 节)。由于痕量被测物分离不完全往往是问题，用峰高定量则更准确，因为潜在的干扰会影响峰面积大小的测定。

表 14－1　定量方法的确定

改变的实验条件	可能的原因	变化参数	较好的定量方法	
			峰面积	峰　高
流动相/固定相	梯度洗脱；流动相分级 吸附活性的变化 固定相流失	k	✓	
流速	泵不精确；流速改变	N		✓
柱效	柱床压缩 柱进口端强保留组分的堆积 柱填料降解	N	✓	
温度	柱温不稳定	k	✓	
峰形	化学反应造成的非高斯峰； 检测器响应慢；填充不均匀等	—	✓	✓[a]
样品体积	进样重复性差	V_S	—	—

[a] 峰形严重拖尾

表 14－2　浓度型检测器 HPLC 方法中色谱参数对定量精度的影响

变化参数	对定量方法的近似影响	
	峰高 h'	峰面积 A
k	$1/(1+k)$	无改变
N	$N^{1/2}$	无改变
u	$\leq u^{-0.2}$	$1/u$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

14.3 定量方法

峰高和峰面积测定仅是检测信号的一种响应，该响应要与有关化合物的浓度或质量关联方可成为定量方法。为此，无论是否同一色谱实验，必须进行某种校正。定量的四种主要校正技术是，峰面积归一化法、内标法、外标法及标准加入法。

14.3.1 峰面积归一化法

完成一次运行并对色谱图中所有有意义的峰进行积分后，便可计算出总的峰面积。任一峰的面积百分比均可视为归一化的峰面积。如图14－6所示，主峰占总峰面积的96%，而四个其它小组分的峰面积占总量的0.6～1.4%。因为色谱图中无任一已知数量的峰可比较，所以峰面积归一化技术本质上不是一种校正方法。然面，该技术广泛用于估计纯物质中杂质或降解化合物的相对含量。

峰面积归一化技术正确使用的前提是假设每一种组分的响应因子完全相同(即在图 14－6 中峰 2～峰 5 每单位浓度的响应值与主峰 1 一样)，这对 UV 检测几乎不可能，因为即使结构相近的化合物，其摩尔吸光度也会不同。在早期方法研究中，由于无法得到所有组分的标准品，峰面积归一化技术得到广泛应用。尽管

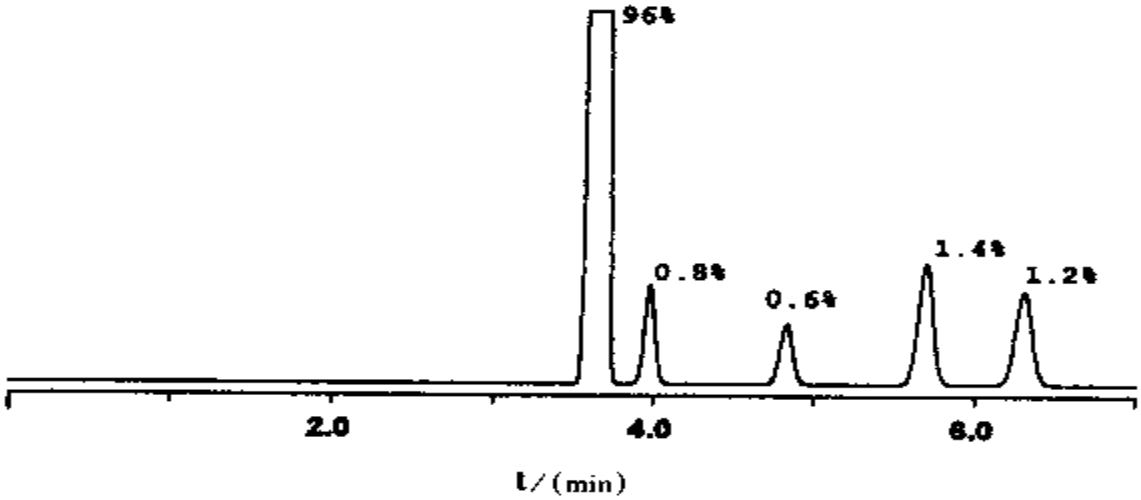


图 14－6 主成分和四种次要组分的峰面积归一化

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

响应因子可能不一致，用峰面积归一化法对某些分析可作权宜之计。

尽管不同化合物很少具有相同的 UV 吸收值，但整体特性检测器，如示差折光(RI)或蒸发光散射(ELS)检测器却对许多化合物确实有相似的响应，应用峰面积归一化法更可靠。这些检测器的深入讨论见 3.3.1 节。遗憾的是，整体特性检测比那些强吸收化合物的 UV 检测灵敏度要低得多。

14.3.2 外标校正法

确定未知样品浓度的最常用方法是用外标物质作出校正曲线，见图 14－7 所示。配制已知浓度的标准溶液(有时称校正溶液)(本例中为 1.0、2.0、3.0mg/ml)。注入并分析相同体积的各标准溶液，然后以峰响应值对浓度作图。这种方法中的校正溶液称为外标物，因为它们与未知样品分开制备、分析。然后以完全相同的方式制备、进样、分析未知样品，根据校正曲线图解或用响应因子数值计算求出其浓度值。

校正曲线应如图14－7，呈线性且截距为零。该例中，未知样品1和2的浓度分别为1.5和2.4mg/ml。如果其响应呈线性，理论上讲，只需一个标样即可确定校正曲线。但实际工作中建议使用两个或多个浓度的标准溶液。标准品溶液浓度应与样品的期望浓度接近。图14.7中的两份样品浓度均在标准品浓度范围之内，因而用内插法便可准确地测定其浓度。如果样品浓度超出所用标样的浓度范围，则需小心用校正曲线的外推值。在校正曲线不呈线性的非正常情况下，可通过将结果内插于标样之间和/或拟合一非线性方程，计算样品浓度；不过这将需很多标准品，用该技术应是最后的选择。许多这类的情况，可通过改善色谱仪器性能使之呈线性响应，这与被测物浓度是否在适宜的分析范围内有一定关系。稀释样品使其浓度在线性响应范围之内，则是另一种可能的选择。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

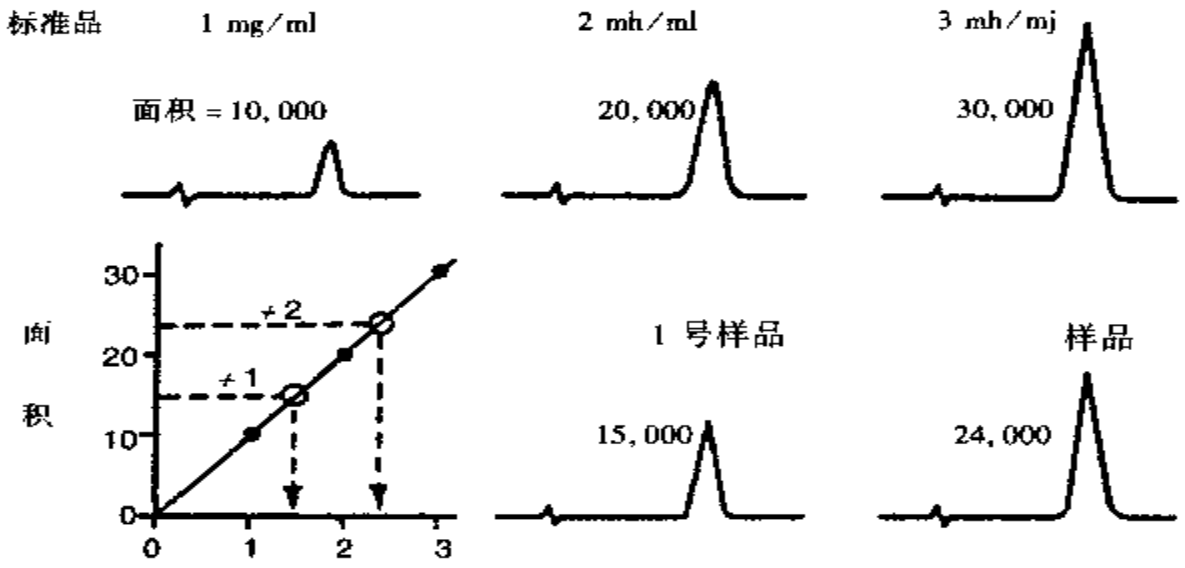


图 14－7　外标法校正曲线

测定未知样品浓度的第二种方法是采用响应因子。各标准品的响应因子 RF(有时称为灵敏度因子)按下式计算：

RF = 标准峰面积(或峰高)/ 标样浓度　　(14.2)

在图 14－7 的示例中，三种标准品的 RF 均为 10,000，可进一步根据下式用该响应因子(RF)计算样品的浓度：

样品浓度 = 样品面积(或峰高)/ RF　　(14.3)

在不同浓度下测定 RF，值可取所有响应因子的平均值作为实际 RT 值，这种多标准品的应用(虽需更多测定)具有增加测定 RF 值可靠性的优点。

对于不需大量样品制备的 HPLC 方法面言，采用外标法较好。该法主要的误差来源是进样的重现性，对于自动化仪器，多数自动进样器的定量环是全充满进样，进样精度一般优于 0.5%，这对于大多数分析已足够。如用手工(注射器)进样，方法精度要相对差一些，常需用其它校正技术(见下文)。若定量环为部分装样，用自动进样器也会得到精度不好的结果。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

外标法欲得到好的定量结果，分离所有标样与样品必须保持色谱条件恒定（相同的色谱条件、进样体积等）。除用常规的校正外，往往用外标物质来确保整体色谱系统的良好运转，以提供可靠的结果。用标准品论证系统的性能称为系统适用性试验（见15.11节），通常在样品开始分析前进行。

为确保定量准确，校正最好在样品基质中进行。痕量分析样品常在样品基质中制备，所以样品制备步骤为校正步骤中不可分割的一部分，见14.5.5节中的讨论。

14.3.3 内标校正

另一种校正技术包括在校正溶液和样品溶液中加入内标物（见下文）。内标是不同于被测物的化合物，但在分离中能与被测物良好地分开。它能补偿由于仪器变化带来的进样量或浓度的改变。使用内标的主要原因之一在于样品有时需要繁杂的预处理或制备（见第4章）步骤。样品制备步骤往往包括反应（衍生化），过滤，萃取等，可能导致样品损失。而在样品制备前加入经合理选择的内标，则能够校正样品的这些损失。选择内标物应模仿样品化合物在预处理步骤中的行为。

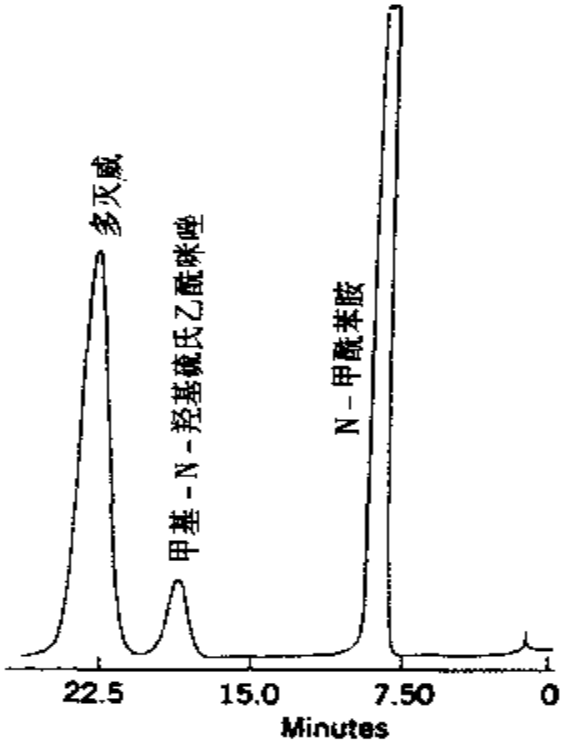


图14-8 内标法对灭多威杀虫剂混合物的分析[10]

色谱柱：100×0.21cm，1% β，β′-oxydipropionitrile on Zipax，<37μm；

流动相：7% 二氯仿/正己烷；流速：1.3ml/min；检测器：UV 254nm，进样20μl。

内标法中校正曲线通过制备并分析不同浓度的样品溶液其中加入相同浓度的内标物质

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

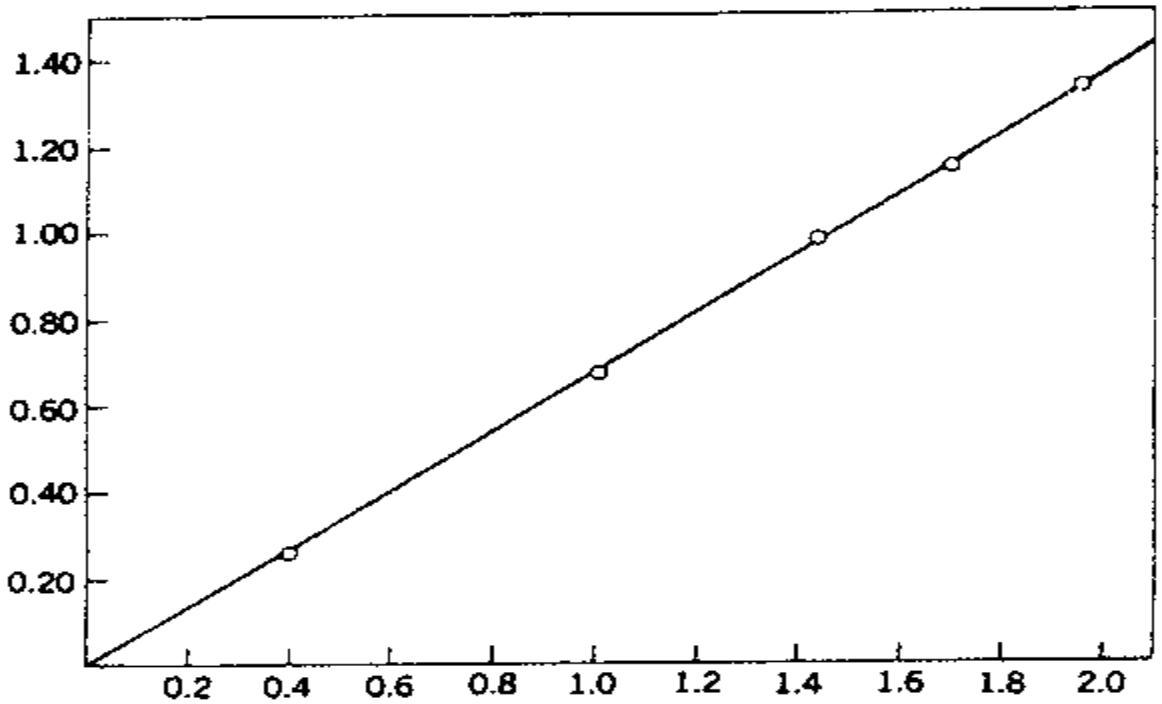


图 14－9　内标法峰面积比图校正[10]

条件：与图 14.8 相同

的校正溶液得到。该法示例见图14－8和14－9所示，以 N－甲酰苯胺作为内标物，分析灭多威杀虫剂。图14－8为校正混合物的色谱图。以已知灭多威浓度的溶液，测出制备的各校正溶液的灭多威与 N－苯甲酰苯胺内标物的峰面积比，然后以该比值对图14－9中的灭多威浓度作图。该图可直接用于测定样品中灭多威的浓度。其浓度亦可通过测定内标法曲线(如呈线性，且截距为零)的响应因子加以计算：

$$RF = AR_{mb} / M \qquad (14.4)$$

式中：AR_{mb} 是校正液中灭多威/内标物的面积比；M 是校正标准液中的灭多威浓度。在该例中，RF 为图 14－9 中曲线的斜率。可按下式计算样品中灭多威浓度(C_s)：

$$C_s = (A_m / A_b) / RF \qquad (14.5)$$

适宜的内标物的要求包括：

· 能与被测物及其它峰良好分开

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

· 与被测物有相似的保留值(k)
· 原样品中不应存在
· 在样品制备步骤中与被测物性质极相似
· 化学性质上不必与被测物相似
· 可得到高纯度的商品
· 稳定,不与样品和流动相发生反应
· 与被测物具有相似的检测器响应

也许最具挑战性的要求是内标物必须与所有分离中的有关化合物分开。对简单的样品可能不难;但对于复杂样品来说,则往往很难达到,此时使用内标物可能并不实际。

尽管内标法在某些情况下有一定优势,但结果并非总尽如人意。内标法的测定精度不如外标法,因为需测定两个峰,而非仅被测物一个峰,加大误差。此外,选择一种不干扰其它峰的化合物也增加了方法建立的复杂性,因此内标法通常仅用于需大量样品制备的情况,而外标校正法适于大多数常规分析。

14.3.4 标准加入法

理想的校正标准应该在空白基质中制备,以对实际样品提供最好的校正。所以,不含药物的药物制剂空白基质或不含添加剂的动物食品通常可用作标准校正溶液。不过在某些情况下,不可能制备有代表性的标准溶液,即它已含有被测物。例如,不含内生胰岛素的血清样品很难制成空白基质。这种情况下,可用标准加入法为定量分析提供校正曲线。

标准加入法用于痕量分析最多(见14.5节)。该法中,将不同重量的被测物加到样品基质中,开始时在基质中即已含有未知浓度的被测物。将标准加入的校正品浓度响应值的曲线外推至零浓度,即可定义出未添加样品时的初始浓度。图14-10所示为利用该法分析人脑脊髓液中5-羟吲哚醋酸(HIAA)的示例。该校正曲线的斜率等于本方法的响应因子 RF,可以用其计算初始样品中被测物的浓度。如图

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

4－10中所示，样品中与 HIAA 中的初始浓度为60ng/ml。这种校正方法也要求能较好地分离干扰组分，色谱图中基线应平稳。标准加入法的重点是添加被测物前的响应要足够大，以便提供适宜的 S/N' 比(>10)；否则结果精度不好。

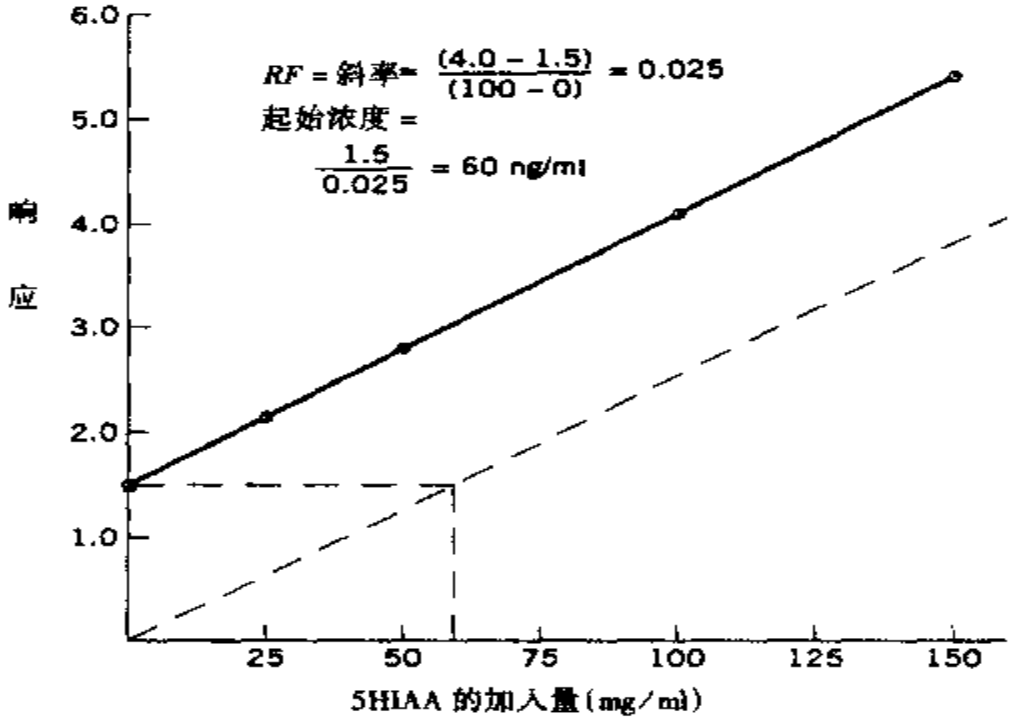


图 14－10　标准加入法校正[11]

色谱柱，30×0.4cm μBondapak－C_{18}；流动相，89% 0.01M 乙酸缓冲液，pH 4.0－11% 乙腈；流速为 1.9ml/min；荧光检测器；进样：10 μl(5HIAA)。

14.4　定量误差的来源

HPLC 方法中任何一部分的误差均对准确度和/或精密度产生影响。HPLC 中好的准确度取决于：

- 样品具有代表性
- 谱峰重叠或干扰尽可能小
- 好的峰形
- 用纯标准品准确的校正

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

· 适宜的数据处理方法

好的精密度取决于：

· 样品制备技术

· 仪器重现性，包括进样技术

· 有较高的 S/N' 比

· 好的峰形

· 适宜的数据处理方法

· 定量及校正方法

总之，定量结果偏差可视为所有各步偏差的总和：

$$\sigma^2_{tot} = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c + \cdots \qquad (14.6)$$

式中 σ^2_{tot} 代表总偏差（有时亦称偏差系数 CV），σ^2_a，σ^2_b，σ^2_c 分别代表各种来源（a, b, c）的偏差。如进样、检测器 S/N' 比或样品的预处理。式 14.6 的结果说明只有那些主要因素会显著影响整个分析的精度。比如，假如误差的四项来源为：

来　　源：	误差百分比
体积误差	0.4
样品处理误差	4.6
进样误差	0.3
检测器信噪比	1.0

$$\sigma_{tot} = (0.4^2 + 4.0^2 + 0.3^2 + 1.0^2)^{1/2} = 4.15\% \qquad (14.7)$$

在此特殊示例中，样品预处理误差在整个方法误差中起主导作用。因此，即使消除了所有其它误差来源，也不会明显改善该方法的精度。因此，欲显著改善方法的精度，通常有必要减小主要误差来源（本例中为样品预处理）。HPLC 中误差的主要来源是取样及样品制备，色谱过程，信号处理或数据处理。下面分别讨论各因素对准确度和精密度的影响。（亦见 3.2.3 节和 3.2.4 节的讨论）

14.4.1 样品和样品处理

样品的性质是产生准确度和精密度误差的基本原因。待测样

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

品必须同源且有代表性，固体样品尤其如此。例如容器中的动物饲料混合不匀，取自容器某一部位的样品则不具代表性。为确保样品具有代表性，应考虑充分混合，使用适宜的取样设备(取样步骤的进一步讨论见第 4 章。)

HPLC 中的样品处理牵涉到制备进样溶液。简单稀释的液体样品通常精度可好于 0.5%。不过，仍需注意使用合适的玻璃器皿，包括经校正的设计用作定量的容量瓶和移液管。这通常指分别使用至少 25 和 10ml 的容量瓶和移液管，尽量减少所需转移及稀释的次数。很多实验室已普遍采用自动加样器，不过体积小时(0.1～5ml)也会降低总的方法精度。仔细称重样品及溶液而非容量转移，能改善精度。必须注意使样品完全溶于溶剂中；可能需充分混合，通过搅拌保证样品充分溶解。样品应当用流动相(最理想)或用比流动相弱的溶剂制备，以保证好的峰形(尤其对早期流出化合物)。

用经校正的自动进样器进样，可提高进样重现性(CV <0.5%)。手工(注射器)进样的误差一般为 2%～3%(除非手工装样时充满定量环)，如需精密结果，应避免使用。如必须使用手工进样，采用内标校正法能改善精度，如 14.3.3 节所述。进样量必须足够大，以得到足够大的峰形，定量才准确。然而，进样量太大(体积或者质量)，色谱柱可能会严重受损，定量结果变差。一般情况下，每克填料不应超过 1～10μg 的样品。如果分离度足够，亦可注入大体积样品，但须检查响应因子的线性(尤其峰高定量时)。进样是及其对分离的影响见 13.2.2 节中的深入讨论。

样品预处理往往是 HPLC 方法精密度差的主要来源。溶剂萃取、化学反应(例如衍生化)、固相萃取为常见预处理步骤，样品需经这些预处理步骤后才能很好地分离与检测。然而，它们将产生 5～10% 的误差，这些技术在第 4 章中有详述，与样品预

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

处理有关的误差亦见文献 12 中的讨论。

14.4.2 色谱过程的影响

HPLC 方法和相关的仪器操作是定量误差的又一来源。本书的主要宗旨是建立良好的色谱方法，并具有以下特点：

- 对所有峰有合理的保留值($0.5<k<20$；最好是 $1<k<10$)
- 关键峰对的分离度>1.5(最好是>2.0)
- 定量峰的信噪比(S/N')大于 50
- 分离重现性好：日间、不同的色谱柱、仪器等。

形状不好的峰(前展或拖尾)是定量不好的主要因素。用峰面积代替峰高能改善测定精度，甚至对于那些非高斯峰。然而，峰严重拖尾将难以恰当地定义峰起始和峰终止，导致定量不准(见图 14－5)。死体积附近流出的峰($k<0.5$)往往峰形较差或者与死体积中或附近的假峰重叠。保留太长的峰($k>20$，等度)将变矮、变宽，使定量不准。

被测物峰与相邻最近峰的分离度 $R_S>2.0$ 是准确定量的保证。$R_S<1.5$ 的两峰将有部分发生重叠，导致相关峰定量不准确，如相邻峰的相对峰高差别很大和/或其中一个峰拖尾，定量结果更差。大峰(尤其先流出时)将对小峰带进显著误差，反之问题则会减轻。附录 I列举了由于大小不一的谱峰重叠而产生的分离度曲线和误差表(表 I－1)。理想的($R_S>2.0$)分离度情况下也应考虑到了日常应用期间柱效的不可逆降低。

应选择能提供卓越信噪比的检测器条件，以准确、精密定量。最后的结果受检测器基线稳定性、短期噪音或基线飘移以及检测器对被测化合物灵敏度的影响。另外，必须注意在检测器线性范围内工作，以便得到良好的校正曲线(见 14.3 节)。检测器的影响见第 3 章详述。

不同的分离参数也会对分离和定量产生影响。温度或流动相组成的改变能影响保留值与分离，尤其影响峰高测定的精度。这

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

些影响可以通过合理地对柱恒温(尤其是离子化合物)和准确地(用仪器或手工)混合溶剂，而降低到最小限度。流速变化对保留值有影响，但对于浓度型检测器(如 UV)来说，对峰面积精度的影响比峰高更大。现代 HPLC 系统的梯度洗脱能与等度分离达到同样的精度，但需注意保证梯度洗脱和溶剂混合系统的运转正常。

最后，高效短柱(例如 3.5μm 粒度，柱长小于 100cm)在分析速度和容量上有较大优势。不过仪器的工作条件必须有利于分离和定量。为使峰高增加达到期望值，以便能够更好地检测和定量，有研究发现用长 8cm，粒度为 3.5μm 的色谱柱，必须将进样体积控制在 20μL 以内，检测器的响应时间应小于 0.2 秒。

14.4.3 数据系统的影响

现代数据分析系统多数足以测定峰面积和峰高，但必须用合适的积分参数才能得到好的定量结果。其结果取决于：

- 系统如何滤除或均化短期噪音
- 每秒钟采集数据点的数量
- 设定的数据采集参数
- 计算机处理数据的计算方法

有些系统对数据处理的效果可提供翔实的信息，不过，用户仍需用典型样品评价效果，以确保定量准确。

多数数据系统需要用户自己设置操作参数，以采集分析数据。峰检测与积分设置有三个主要目的：确定基线噪音水平，及每个峰的起点与终点。两个主要参数一般是：(1)与噪音有关的设定(大于设定值检测为“峰”)；(2)期望的最窄峰的峰宽(由峰起点与终点定义)。如果收集到足够的数据点(大多数色谱图一般 3～5 个点/秒就足够；但对于极快速分离则要求 10～15 个 点/秒)，可较准确地确定基线噪音水平。峰的起点和终点与噪音和数据系统的灵敏度设置有关。然面，峰宽参数的设置较

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

确定数据点更为重要。如果峰宽设置太窄，在数据系统能判别出“峰”之前，该峰可能会被遗漏掉；反之，如果峰宽设置太宽，则鉴别峰的起点太早，峰终点太迟，导致峰面积积分不准。较好的方法是取色谱图上最窄峰，以其宽度的一半作为峰宽参数。对于峰检测和积分来说，峰宽可看作“粗调”，面噪音参数可看作“细调”[14]。

数据系统的另一问题是数据组(Data bunching)对色谱信息的准确采集和存贮的影响。数据组是大多数数据系统采用的一种技术，用来保存仅足以适宜地描绘总体色谱图和色谱峰的数据点，而不必保存太多的数据点，以免产生过大的数据文件。例如，在色谱图的平坦基线部分的众多点对准确表现分离不很重要，则不会被存贮在数据文件中。数据组及其对定量的影响见文献 15 中的叙述。

14.5 痕量分析

HPLC 是分析各种类型样品中痕量(例如≤0.01%)组分的一种有效技术，HPLC 分析痕量组分的优势为：

- 高分离能力适合准确定量
- 往往能获得灵敏和选择性的检测
- 某些样品的预处理很简单
- 有时可以对原始样品进行预富集，以提高灵敏度

痕量分析的目的与混合物中主成分的定量检测有所不同。痕量分析的主要目的是准确检测样品中的痕量化合物；一般不需高精度测定，尽管许多检测要求精密度范围在 1～2%(见 15.3 节)，由于被测物本身浓度低，痕量分析通常只要求 5～15% 精度，该精度对大多数痕量分析已足够。下面将讨论在痕量分析中的样品制备、柱分离度、进样、样品检测对定量结果的影响和校正方法。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

14.5.1 样品制备

在某些情况下，样品可以直接注入 HPLC 柱中而无须前处理（例如，软饮料中添加剂的分析[16]）。然而多数情况下，痕量分析的样品在最终 HPLC 分析之前必须经过某些处理。在第 4 章中我们介绍了制备与预富集样品中被测物的方法，可以提高痕量分析的灵敏度。这些方法包括使用固体萃取，液－液萃取、过滤、组合柱和柱反冲技术。

样品预处理也可用以确保分析的准确度。分析样品中经常含有中性、碱性和酸性组分，以及疏水性极强的化合物，样品预处理方法能系统地除去某类化合物，而保留所需组分。最好的样品预处理方法是能最大限度地除去潜在干扰组分，并可以定量回收待测组分。当样品预处理与 HPLC 分离基于不同的原理时（例如离子交换用于样品预处理，而反相进行 HPLC），通常可获得较高的方法灵敏度与痕量分析准确度。

在痕量分析中有一种特殊的样品处理方法，即使用体积排阻柱（restricted internal access columns），用该柱可以省略样品分离的预处理步骤。这些色谱柱有时可直接注入血浆或类似样品，分析那些以蛋白质为潜在干扰物质的痕量被测物。这些柱中的填料有亲水性的外表面或涂层，对蛋白质没有亲合力，而孔内有典型的疏水性表面（如 C_{18}）。样品中的蛋白质由于分子太大，无法进入窄孔中，不被亲水的外表面保留，直接流出。因此，蛋白质无保留地流过色谱柱。小溶质（如药物）进入多孔网络中，通过一般的疏水作用被保留和检测，本法示例见图 14－11 所示的直接分析血浆中的茶巴比妥。用此方法测得的数值与基于免疫检测的分析结果极为一致。

体积排除柱的缺点之一为对样品类型的选择性太强，另一个缺陷是消除干扰不如固相萃取有效，其主要作用是让蛋白质无保留地流出而保护色谱柱。分析灵敏度严格地取决于检测器

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

灵敏度和进样体积——不能使被测物得到富集。由于柱填料可能被样品中的外来物质所污染降低柱寿命。

14.5.2 柱分离度

为最大限度地消除干扰并得到最佳的准确度，痕量组分峰应与相邻峰完全分开。如两峰靠得很近，当痕量组分峰较主成分先流出时，测定较准确，如图 14－12*b*。相反，如痕量组分峰在主成分峰尾的边缘上流出时（如图 14－12a），准确测定则变得困难，有时痕量组分会被先流出的主峰完全掩盖掉，那样需很大地提高分离度，才可进行所需的痕量分析。

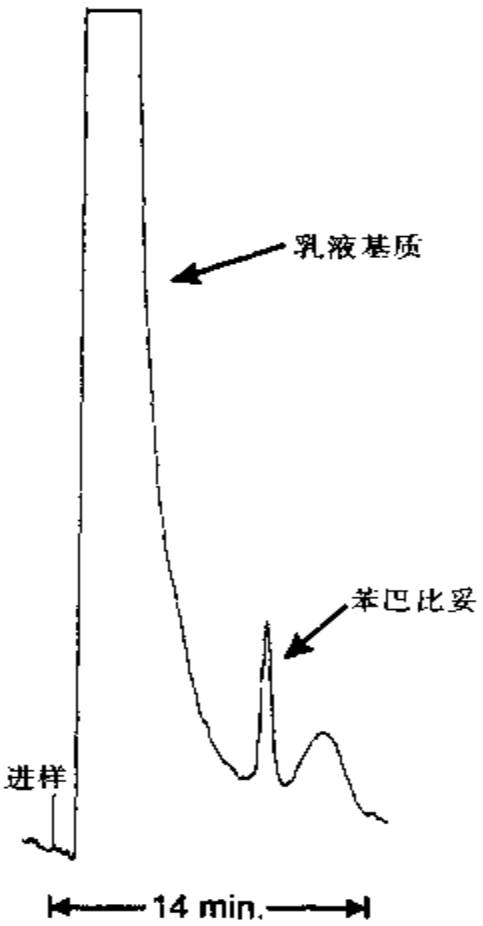


图 14－11 采用体积排阻柱的痕量分析[17]

色谱柱：15×10.46－cm 蛋白修饰 C8 柱；流动相：20% 乙腈－80% 0.1M 磷酸盐缓冲溶液，pH 6.5；流速：1.0ml/min；温度：室温；检测器：UV，230nm；样品：10μL 病人的血浆

痕量分析通常在等度条件下进行，因为这样可以得到重现性较好的保留时间和最好的检测基线。痕量分析也可用梯度洗脱，而且在某种情况下可能更好，如 14.5.6 节所讨论。然而，在梯度洗脱下，测定精度将受影响，而且分析更费时。对有较宽 *k* 范围的痕量组分进行分析时，常采用第 4 章讨论的柱切换—等度方法，文献 18 中也有较详细的论述。

痕量组分的定量分析应采用峰高法。这种方法受潜在的峰重

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

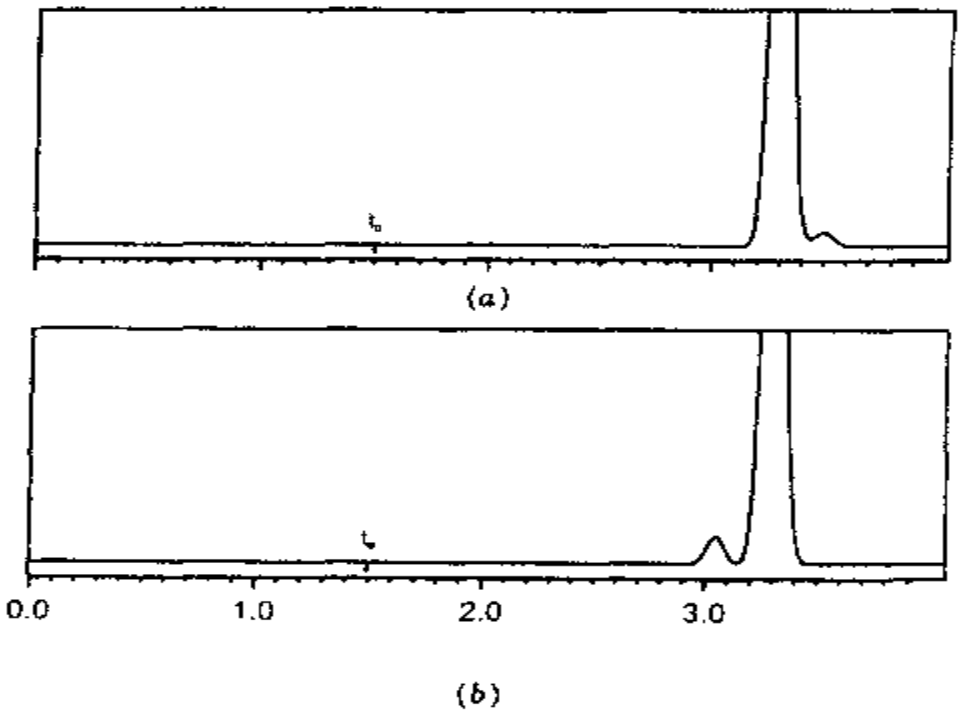


图 14－12　峰相对位置对分析痕量组分的重要性

叠影响较小，且具有足够的精密度。相邻的对称峰（$R_s = 1.0$）峰高比相差多达 30:1 时，仍可得到较好的定量准确度（约（±3%），而条件相同，如达到相同测定准确度时，峰面积比仅可相差约 3:1。因此，与面积相似的相邻峰的分离度至少为 1.0 时，才可能对大多数痕量组分进行较好地峰高测定，如果重叠峰的峰高很大，则要求分离度更大。

等度分离中，色谱过程必然稀释流过的样品。因此样品峰流出时浓度较低，使痕量组分的检测更加困难。样品被稀释的程度可近似表示为[19]：

$$C_{max} / C_0 = V_s N^{0.5} / V_r (2\pi)^{0.5} \qquad (14.8)$$

式中 C_{max} 为峰最大值时流出的浓度，C_0 为样品的初始浓度，V_s 是进样体积，N 是色谱柱塔板数，V_r 是该痕量组分的保留体积；亦见表 2－4 与有关讨论。样品通过色谱柱时的稀释取决于进样体积和溶质的保留值（k）。如进样体积较大，稀释程度与 $1/(k+$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

1)成正比。

式 14.8 预示当塔板数 N 较大时,痕量组分的峰高灵敏度也会提高。然而如用长柱提高 N,则保留体积 V_r 也增大,组分的浓度(与产生的灵敏度)会降低。提高痕量分析灵敏度的最好的折中办法是用(塔板数至少 5000 的)短高效柱,产生极尖的色谱峰且能使被测组分达到所需分离度。7.5cm 长、粒度 3.5μm 的高效柱(见 5.2.2)尤其适于痕量分析,如图 14-13 所示。用长 8cm,粒度 3.5μm 的色

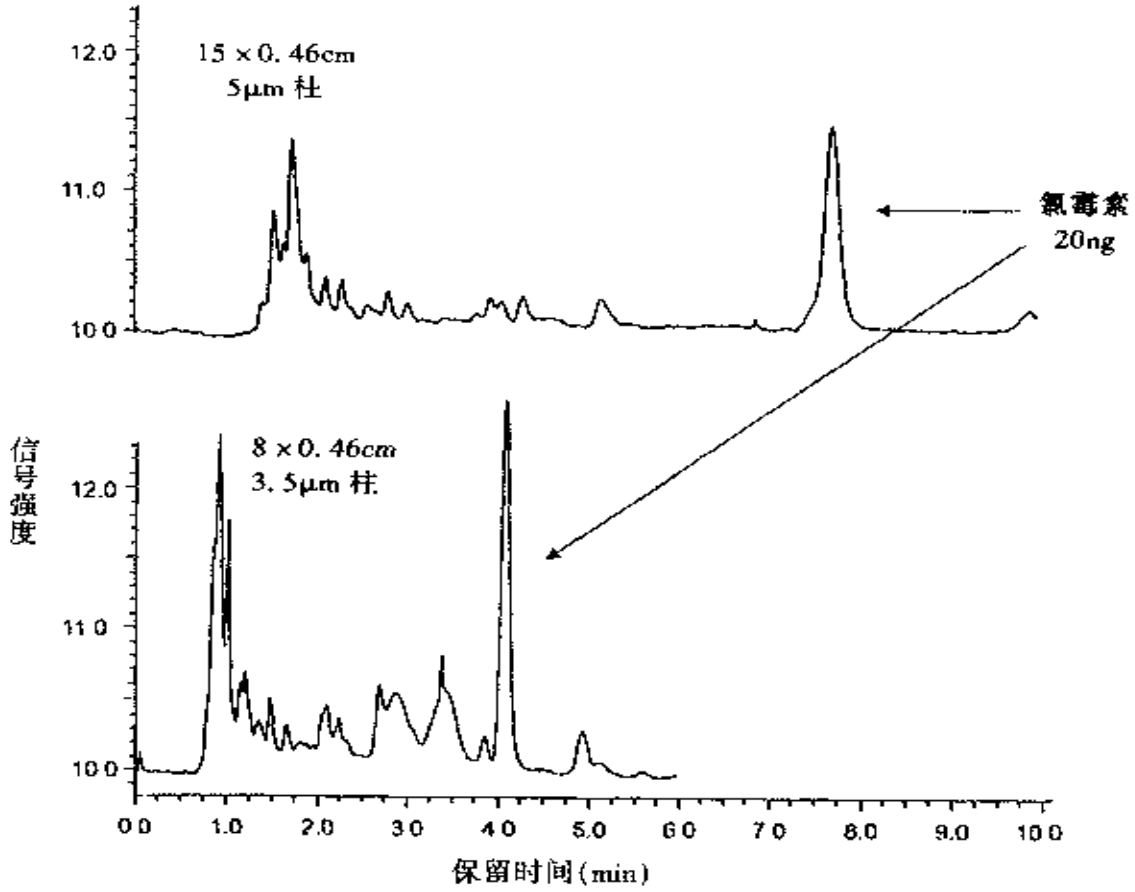


图 14-13 填料大小对痕量分析的影响[13]

色谱柱:Zorbax SB-C_8, 15×0.46cm, 5μm 填料及8.0×0.46cm, 3.5μm 填料;流动相:乙腈/0.1% 三氟乙酸水溶液(25:75), pH 3.0;流速:1.0ml/min;温度:室温;检测器:UV 278nm;

样品:20μl 含 20ng 氯霉素的鼠尿提取物

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

谱柱测定鼠尿提取物中氯霉素时，与长 15cm，粒度 5μm 的类似色谱柱比较，峰高灵敏度大约提高了一倍，而且分析时间缩短一半。

可分别改变分离度公式中的各参数（α、k、N，式 2.3）。通过改善峰间距或锐化峰宽，以优化痕量分析的准确度与灵敏度。因此，除其它参数（例如检测器类型）以外，通过优化影响分离的色谱参数，可显著改善痕量分析的灵敏度和准确度。痕量分析的峰高灵敏度尤其易受溶质 k 值（或保留体积 V_s）的影响。由于峰高与灵敏度均与 k 值成反比，在较低 k 值条件下操作可显著增强痕量分析的灵敏度，然而，被测物的 k 也必须足够大以与其它组分分开，尤其在 t_o 附近流出的组分。为了得到最大灵敏度，痕量分析应在 0.5～1.5 的 k 范围中进行。[20] 由于大多数干扰都出现于色谱图的早期，所以选择大 k 值可有助于提高分离选择性和测定被测物，但以损失灵敏度为代价。

增大分离因子 α 是保证痕量分析专属性和准确度的最有效技术。如第 6～9 章中所讨论的，改变 α 可以通过改变流动相和/或固定相的类型实现；如为可电离化合物，还可以通过改变柱温实现。优化这些参数，大多数痕量组分皆能获得足够的分离度。不过，一旦痕量组分明显地与潜在的干扰物质分开，必须确证采用方法对该组分定量分析的准确性。

基于分离测定方法的改变，有三种检查分离专属性和方法准确度的方法，如表 14－3 所总结。色谱条件的变化（见表 14－3）可以足够地改变峰间距，为交叉检验提供了另一种方法。然而，最有效的方法是，再建立第二种不同分离体系的 HPLC（参考）方法。例如，参考方法可以基于 NPC、离子对、或离子交换色谱，而不应是初始拟用的常规的 RPC 方法。由于两种不同分离方法的色谱图之间，峰间距有明显的变化，所以被测物不可能再被同一干扰物所重叠。假若有一种分离方法是为了检验干扰物，则希望这种干扰不会在第二种方法中出现。不过，若这种交替方法对该样品得出

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

不同的结果，给出较低值的方法则有可能是正确的，因为其干扰程度较小。

表 14－3　痕量分析中交叉检验的色谱方法：

改变色谱条件
%B，温度
改变 pH(仅对可电离组分)
改变溶剂
改变色谱柱键合相功能
改变 HPLC 方法
用正相取代反相
用离子对或离子交换取代反相
改变分离方法
CZE
GC
SFC

另一种色谱法确证专属性和痕量分析准确度的选择方案是收集拟用常规方法的被测物馏分，然后重新进样，再用第二种(参考)分离方法分析。任何常规方法中的干扰组分在第二种(参比)分离中可能更好地分离。因为在参比分离中，其它峰与被测物峰重叠的几率很小，痕量分析的准确度可以得到证实。第 4 章及文献 18、21 中的柱切换技术提供了对痕量分析最中分段收集和再进样的日常应用。

第三种确保所用痕量分析方法准确的方案是基于完全不同的分离原理建立测定方法(例如，毛细管区带电泳，气相色谱，超临界流体色谱等)。最好是将用常规 HPLC 方法分析出的一般样品结果与另一种方法的结果进行比较。结果一致则可足以说明采用的常规 HPLC 方法的准确性。当样品的基质类型不同时(例如不同的动物或农作物)，这种方法尤为有效。

先优化目标被测物的 α 值，则可进一步提高测定灵敏度，缩短分析时间。对于 H 和 k[19]恒定的分离体系，有下面的关系：

$$C_{max}/C_0 \approx \alpha - 1/\alpha \qquad (14.9)$$

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

从此式看出，如 α 值仅有微小增加，分离度可大大提高。若分离度的增加超过需要很多，使用者可用短柱来减小峰稀释效应，并提高分析的灵敏度(尖锐度)。

14.5.3 进样

在痕量分析中，为使灵敏度最大，应尽可能加大进样量。大容量样品环的进样阀能方便此操作。不过，如2.4.1节所讨论，样品体积太大将会使色谱柱过载，产生畸峰，峰高的增加小于期望值。较好的解决方法是先注入体积大约为最先流出峰组分保留体积的1/5[以基线峰宽(min)乘以流速(ml/min)计算的样品，然后增加样品体积直至单位浓度的峰高增加值小于期望值，或者与相邻组分的分离度达到极限。一般对于15×0.46cm 的色谱柱，可承受50至500μl 的样品体积，这需根据痕量被测物的 k 值而定；溶质 k 值越大，可以使用的样品体积越大。

假若样品量非常有限(例如：婴儿脚后跟上的一滴血)，可以用小内径的色谱柱，以使检测灵敏度大大提高。如图14－14所示，与0.46cm 内径色谱柱相比，0.2cm 内径的同类色谱柱检测质量相同的样品时，灵敏度提高了大约4倍。同样，质量相同的样品，内径0.3cm 色谱柱较内径0.46cm 色谱柱的灵敏度增加了大约1倍。然而，需注意，如果样品量充足，可以加大进样量(如药片)，则无必要非用小内径色谱柱提高灵敏度。

如被测物的溶剂较流动相弱，注入色谱柱的样品体积往往可以很大。这样，被测物在弱进样溶剂中的 k 值较大，被测组分在柱入口处富集；这种柱上富集方法有助于提高某些被测物的灵敏度。为使RPC 的样品富集达到最大，应将样品注入尽可能弱的流动相中(含水多的)，然后增加流动相中有机溶剂比例，用梯度或台阶方式改变流动相均可。本法的示例见图14－5，痕量检测尿中的环孢菌素(为MW1202的肽)。图14－15a 是1.8ml 的空白尿样直接注入色谱柱得到的色谱图，注入含被测物的尿样后，先以弱流动相(水，接着用32%

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

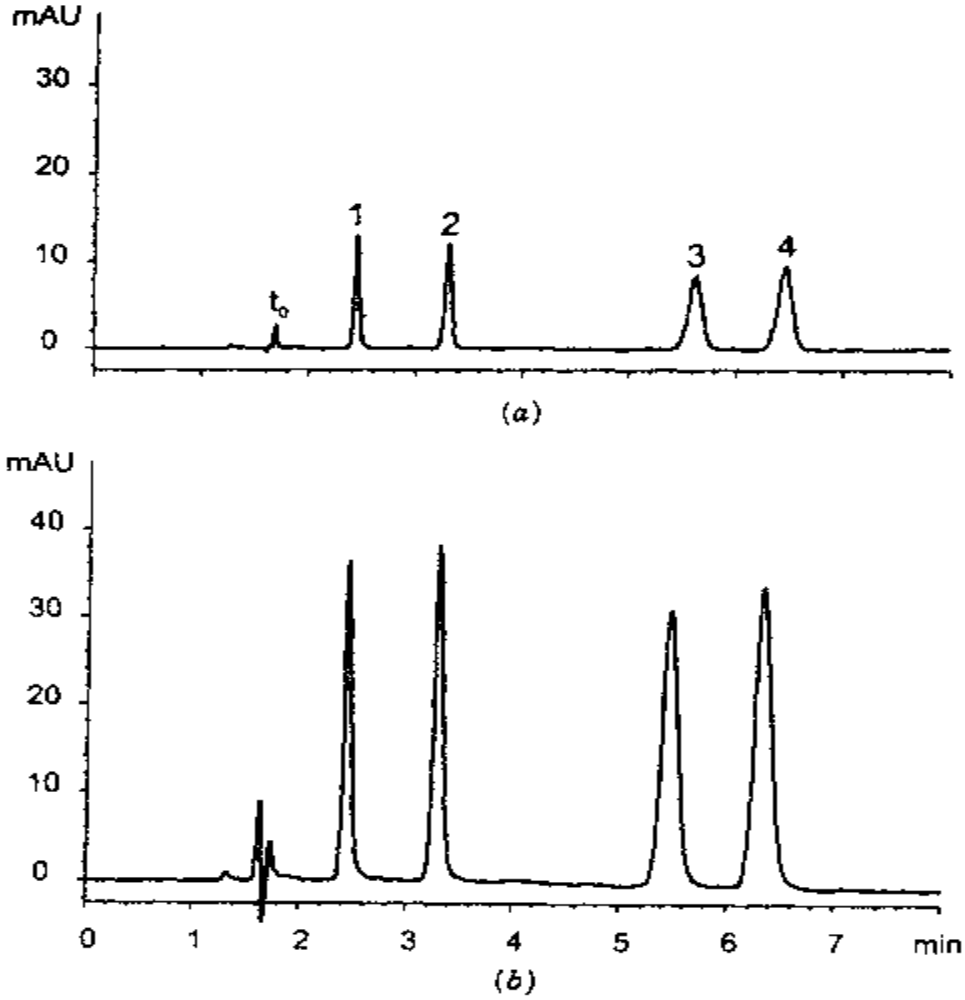


图 14－14　柱内径对维生素 B 色谱峰灵敏度的影响

进样量相同；色谱柱：15cm, Zorbax SB－C_8；流动相：26% 甲醇－0.1% 磷酸缓冲液；流速：1.0ml/min；柱温：40℃；检测器：UV 检测，230nm；样品：1, B_3；(0.42μg)；2, B_6；(2μg)；3, B_2；(0.1μg)；4, B_1；(0.42μg)；进样体积：2μL；(*a*) 0.46cm ID 柱；(*b*)0.21cm ID 柱。

乙腈－水)除去无关组分。然后以台阶梯度改变成 50% 乙腈－水洗脱，浓度为 360－ppb 的环孢菌素出现一尖锐、易于检测的峰，见图 14－15*b*。最后，用另一台阶改成 70% 乙腈－水冲掉强体留的无用样品组分；最后用水冲洗，再生色谱柱。理想情况下，有可能注入柱内 1升或以上的样品，可使痕量组分的浓度富集高达 20000 倍。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

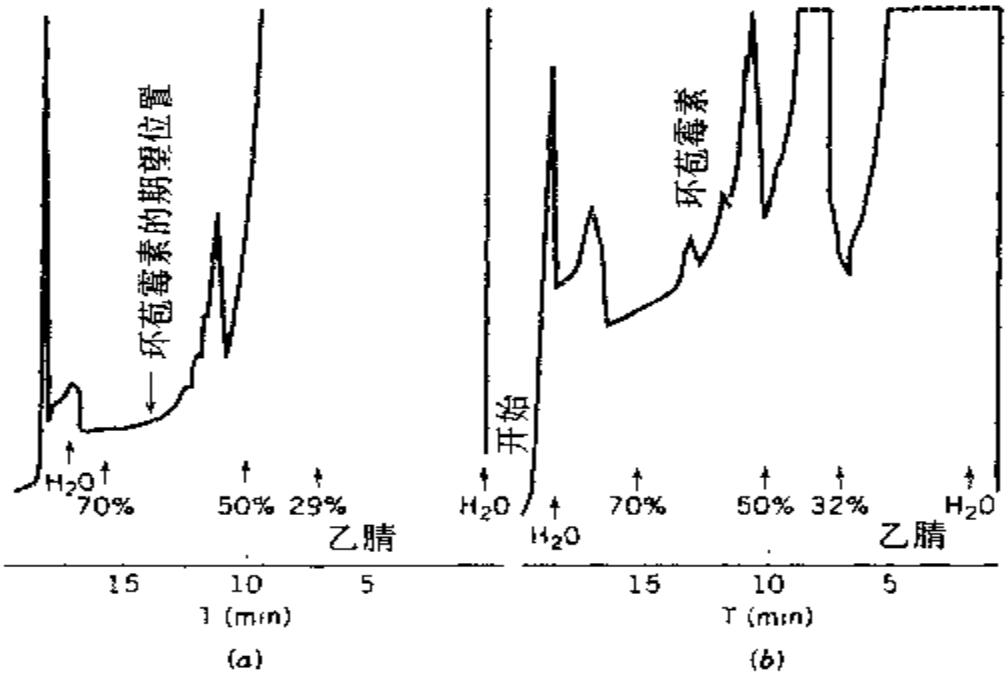


图 14－15　变梯度洗脱柱上痕量富集[22]

色谱柱：3×0.4cm, Merck RP－8，5μm；乙腈和 0.1M 碳酸铵；流速：4ml/min；70℃；检测器：UV 215nm；样品：1.78ml；(*a*) 空白尿样；(*b*) 尿中 360 ppb 环苞霉素。

痕量分析中的一个特殊问题是进行另一分析前，必须除净色谱柱中的样品干扰物，否则残存的晚期流出峰会严重干扰检测器基线，影响分析的精密度和准确度。使用较好的样品清洗方法，如用同类型的色谱柱进行固相萃取预处理，可使晚期流出物减至最低限度（见 4.4.2 节）；或者亦可用柱切换或反冲技术（见 4.6 节）。痕量被测物被洗出后，若用线性或台阶梯度提高流动相强度，往往亦可将强保留组分清洗出色谱柱。

14.5.4　检测

HPL 检测器的选择性对建立灵敏与准确的痕量分析方法是极为重要的。最终检测器的灵敏度与检测器信号响应和分辨样品中痕量被测物的能力有关。在 HPLC 痕量分析中广泛使用的检测系统有 UV、荧光、电化学和质谱（放射化学检测器严格限于测定

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

放射标记化合物)。这些检测器的潜在选择性水平不同,见表14－4中的总结。

许多化合物有足够大的 UV 消光系数(见表3－1),因此用简单的单波长 UV 检测器(通常为254nm),即可进行高灵敏的痕量测定。由于可变波长 UV 检测器能在痕量组分最大吸收处操作,此处灵敏度更高。另外,吸收波长有时也可以设置在能够最大限度地消除潜在的相邻峰,且被测物仍有足够灵敏度的波长处。如3.2.2节表明,尽管许多化合物在低波长处(≤220nm)往往灵敏度最大,但由于许多外来化合物也有吸收与干扰,检测专属性可能很差。二极管阵列UV 检测器通常不可能使灵敏度更高,但可有助于痕量分析的专属性检查,见3.2.6节。不过,为了准确进行痕量分析,S/N'比值必须足够大,才能使这种交叉检验有意义。

荧光和电化学(EC)检测器比 UV 检测灵敏(高达1000倍),且选择性更强。由于大多数化合物本身没有天然的荧光特性,荧光检测常基于被测组分的衍生化。图14－16所示为以2－(9蒽乙基)氯甲酸酯作为荧光衍生试剂,测定废水中痕量酚醛树脂的实例。由于衍生反应也可以和样品中其他化合物发生,同样产生荧光,如图14－16中其它峰,给方法的专属性带来问题。一个大的荧光基团连接到不同分子上,能产生具有相似的反相保留的衍生物,因此可能需要仔细调整谱峰间距。

尽管能被还原或氧化的组分均可以使用 EC 检测,但该方法用于易氧化的痕量被测物检测较多(见3.3.3节)。只有少量化合物具有电化学活性,降低了此检测的潜在应用价值,而且衍生化对提高 EC 灵敏度也用处不大。一般说来,EC 检测灵敏度优于荧光检测,但选择性较差,见图3－14中的比较。因此,选用 EC 检测常为提高方法的灵敏度而并非为改善选择性。尽管 EC 检测不如 UV 或荧光检测方便,但因其极高的潜在灵敏度使之在某些方面仍有重要作用,如图 14－17 中所示的细胞胺(*neurogenic amines*)分析。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

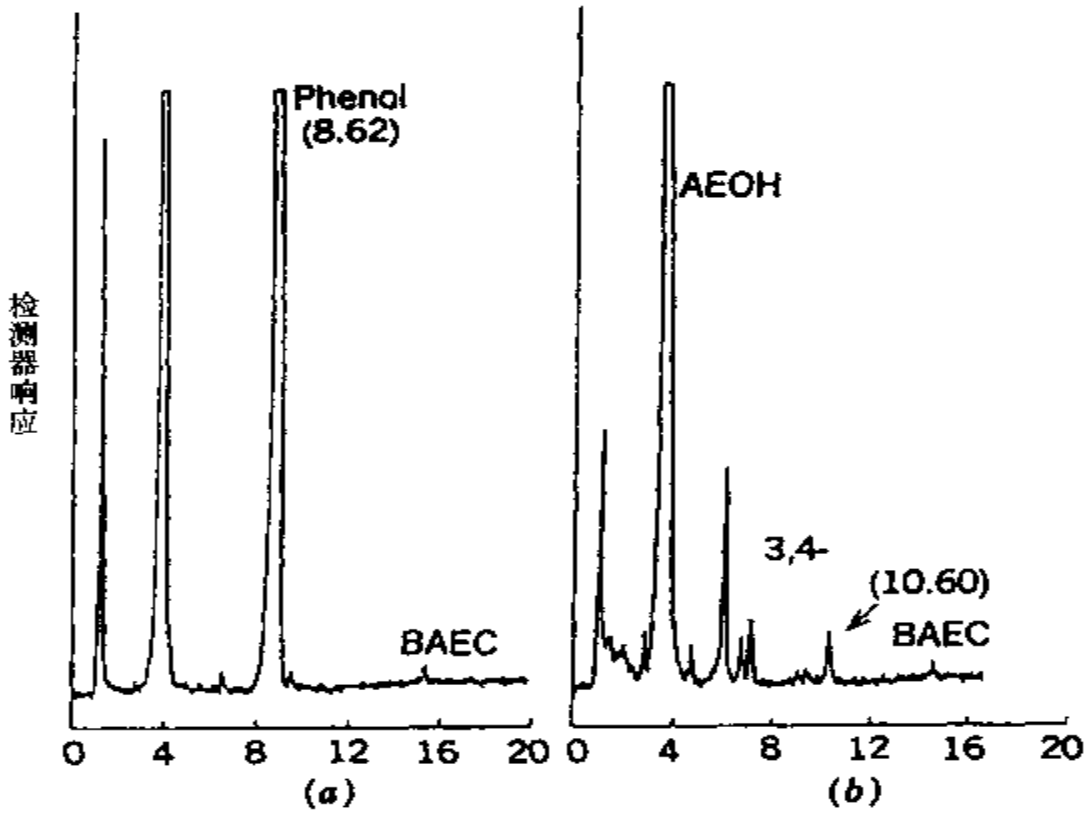


图 14－16　用梯度荧光检测分析废水中的酚醛树脂[23]

色谱柱:25×0.4cm LiChrospHer 100 RP－18;流动相:10min 内从 70% 乙腈→100% 乙腈;流速:1.0ml/min;温度:室温;检测器:荧光,λex＝256nm,λem＝>418nm。(a)每 100ml 废水中含 0.065mg 苯酚;AEOH,2－(9－蒽乙基)氯甲酸试剂;BAEC,试剂的碳酸氢盐副产物;(b) 每 100ml 废水中含 0.0048mg 3,4－二甲苯酚

表 14－4　HPLC 中常用痕量分析检测器

低选择性检测器
单波长 UV
可变波长 UV
二极管阵列 UV
中等选择性检测器
荧光
电化学
高选择性检测器
质谱
放射性检测器

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

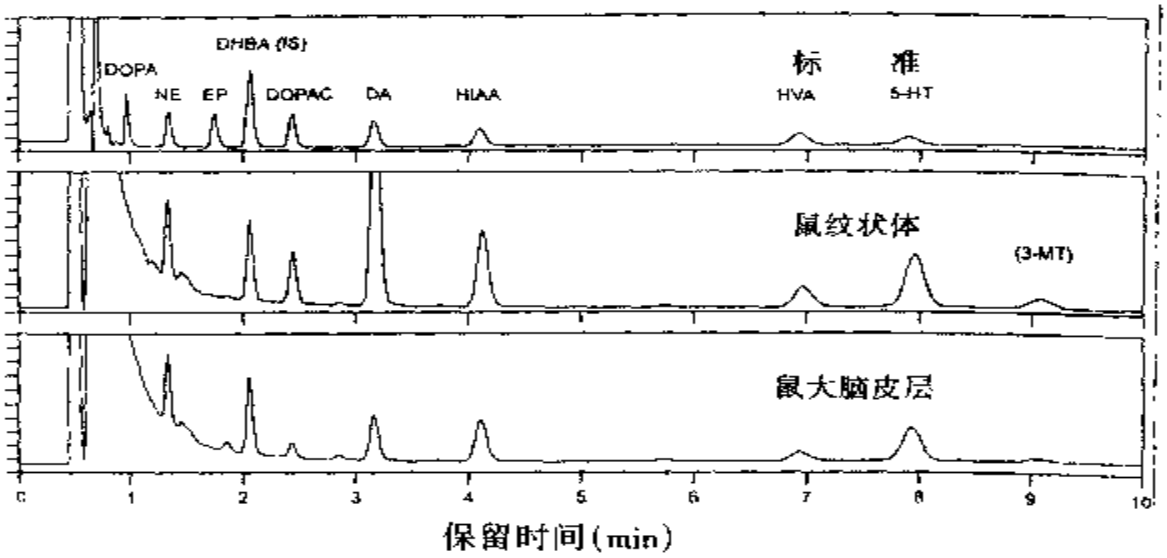


图 14－17　电化学检测法分离痕量神经细胞胺[24]

色谱柱：7.5×0.46cm Zorbax SB－C_8，3.5μm 填料；流动相：0.14M 乙酸钠缓冲液/20mM EDTA－0.75mM 辛烷基磺酸－9% 甲醇，pH 3.5；流速：1.5ml/min；温度：26℃；进样：20μl；电化学检测器：0.75V

Ag/AgCl；DOPA，二羟苯丙氨酸；DHBA，二羟苄胺；DOPAC，二羟本乙酸；NE，去甲肾上腺素；DA，多巴胺；HIAA，羟吲哚乙酸；EP，肾上腺素；AVA，高香草酸；5HT，羟色胺；3MT，甲氧酪氨酸。

14.5.5　校正

14.3 节中已对不同校正方法作了详细说明，如 14.5.2 节所讨论的，峰高法校正对痕量分析较好，峰高测定中相邻峰的干扰比峰面积测定小得多，校正也比较方便，通常易于建立满意的痕量分析方法。

如 14.3.2 节中描述，简单的外标校正法用于痕量分析最多，大多数痕量组分的校正均在样品基质(如血清)中进行。在空白样(无被测物的基质)中加入校正标准物，并进行正常的样品制备步骤。校正范围应该包含分析样品中被测物的期望浓度，被测物不应低于或高于实际校正品试验的浓度范围。有些分析工作者为取得最佳结果，对每批次的样都进行新的校正。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

应调整分离选择性，以使被测物峰在色谱图上无干扰，且先于任何大的相邻峰流出，如 14.5.2 节所述。检测限(LOD)通常由检测系统的信噪比和相邻峰的重叠程度来决定。

在设计良好的痕量分析方法中，分离被测物的校正曲线外推应能通过零点。外推值低于零点表明被测物在分离系统中有损失。为确保痕量分析有足够的精度，包括样品的预处理步骤(萃取、固相萃取等)，大多数方法中理想的被测物绝对回收率至少应为 75%。当回收率大大低于 100% 或不稳定时，使用合适的内标能改善痕量分析的精度。如果校正曲线外推值在零点以上，则说明有基线干扰或原样品基质中可能有被测物。如不能得到空白样品，也可采用标准加入法(见 14.3.4 节)。

14.5.6 总体策略

建立一种痕量分析方法的总体策略见表 14－5 中的概括。如前指出，痕量分析中测定灵敏度和选择性(准确性)之间总是一对矛盾。例如，最大灵敏度往往在低 UV 区域，而此处检测选择性却不好；k 值小，灵敏度提高，但分离选择性却受到影响。加大进样量或体积可以提高灵敏度，但色谱柱超载会导致专属性降低，峰展宽。表 14－5 中所列条件能用于改善检测灵敏度，但未涉及保持方法专属性或准确度的问题，后者见表 14－6 中的总结。

表 14－5 痕量分析中提高灵敏度的较佳条件

使用具有较大信噪比的选择性检测器
采用峰高定量
如相邻峰的分离度允许，设定 k 在 0.5 至 1.5 范围内
使用短的高效柱(大于 5000 塔板数)
尽可能地加大进样体积
如果样品量有限，采用细内径柱子(否则 0.4～0.5cm ID 也可)
为得到高灵敏度，需预富集样品
使用非脉冲泵精密输送流动相
选用能使痕量组分 α 值最大的 HPLC 体系

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

表 14－6　痕量 HPLC 方法中保证确定性和准确性的方法

1. 预测和消除潜在干扰(第四章)
   a. 优化样品制备，使对分析物回收率的干扰最小
   b. 使用不同的样品制备技术和 HPLC 分离方法以最大限度地排除干扰
2. 优化痕量组分的 α 值，得到与邻近峰重叠最小的分离度(第九章)
3. 为最大限度地消除干扰，选择检测器和检测条件(第三章)

虽然等度条件用于大多数痕量分析，但梯度洗脱也能解决等度方法中出现的一些问题。梯度洗脱的优点见表 14－7 中的总结。通过将样品注入低强度(%B)的流动相中，然后用梯度以高强度(%B)洗脱出被测物，往往能将 t_0 附近的干扰较好地与弱保留被测物分开。这种方法在改善与早期流出的干扰物的分离度时，能保证被测物的 k 值小而有效(峰尖)(见图 14－15)。

表 14－7　痕量分析中梯度洗脱的优点

实验条件	结　果
能在较小 k 值下操作且能消除早流出组分的干扰	高灵敏度
能够使用更大体积的进样量	高灵敏度
能够容易地控制谱带展宽来消除重叠的干扰	较好的准确度

使用梯度洗脱时，往往能加大进样体积。样品在有效的低 k 值被注入(%B 低)，被测物被保留于柱进口处，而无峰展宽。梯度增加%B，使被测物以尖峰被洗脱出，可提高灵敏度。这种方法类似于图 14－15 中的柱上浓缩技术。

如 8.4.2 节所讨论，用通过改变梯度洗脱条件也能改善峰间距。改变梯度斜度是消除峰重叠，使痕量分析更准确的一种方便方法，见图 14－18。当用 2%/min 乙腈梯度时，血浆样品中的组分2 和一未知组分(*)严重重叠。当乙腈梯度减至 1.6%/min 时，峰间距改变，使组分 2 以及另两个被测物与干扰组分分

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

开。

然而，用梯度方法进行痕量分析也有缺陷。空白梯度中往往有“假峰”。梯度操作通常需要较长的分析时间，因为下次运行之前，必须重新平衡色谱柱。再者，一些检测器不能使用梯度洗脱(见表 3－7)。最后，梯度导致强烈的基线倾斜或检测器基线不稳，限制了总的可检测性和测定被测物的准确度。不过，已证明当等度方法不行或不方便时，还是应考虑用梯度方法进行痕量分析。

表 14－5 概括了 HPLC 中痕量分析的较好条件。典型的痕量分析方法的建立过程可能包括下列步骤：

1. 通过液－液或固体萃取，有选择地分离出被测物，通常萃取到易挥发的有机溶剂中。(如：二氯甲烷、甲基－叔－丁基醚)(见第 4 章)。

2. 通过挥发溶剂浓缩样品(如被测物为不挥发性)(见第4章)

3. 选用 7.5×0.46cm 的色谱柱，3 或 3.5μm 的填料，C_{18} 或 C_8 键合固定相(见第 5 章)。

4. 由 UV 检测器开始，用表 3－4 中的系统方法。

5. 用相对高浓度的被测物，建立最佳分离条件，确保被测物与潜在干扰组分有足够的分离度。(见第 6～9 章)

6. 优化进样体积，在样品浓度范围内绘制峰高校正曲线(见2.4.1 节和 14.2.2 节)。

7. 如灵敏度不够大，使用 EC 或荧光检测器(见第 3 章)

这些方法建立过程并非通用，但适合于许多需痕量分析的样品。在解决某一特殊问题时，为保证所需灵敏度和准确度，一种样品也许需要一种特殊的对应方法。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

第 15 章　完善方法:论证和移植

15.1　引言

本书主要的讨论内容是建立 HPLC 方法的理论与实践。使化合物能够分离与检测只是完成了第一步，一种能在其它实验室长期使用的完善方法还有许多工作要做。如果将该方法用于产品或工艺中，则还需经官方机构的批准。这些机构包括美国食品药品管理局（FDA）、环境保护局（EPA）或世界上其他类似的部门。

方法的移植最好通过系统的方法论证规程完成。许多色谱工作者认为论证仅是使用规定条件时（如流速、进样量、柱类型等）该方法可接受程度的一种测试。其实论证过程的真正目的是为了考察该方法，并确定运行该方法时条件变化的允许限度。在论证过程开始之前，有一份考虑周全的测试该方法的论证计划与可接受的标准很重要。该计划应包含描述该方法的全部详细步骤（包括校准标准品与样品的制备，分离，数据处理与计算），他人应用起来应很方便。许多官方机构已下达了方法论证的指南或标准操作规程，一些其它建议见文献 1—7，但这些指南通常不是专用的或仅适用于某些场合。本章中，我们将详细说明良好的方法论证所应具备的各项主要内容。对于论证过程的每一阶段也列出较好的方法。在本章最后给出了一方法论证方案的具体示例。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

15.1.1 方法论证的一般方案

方法建立随样品和分离目的的不同而异，方法论证也是如此。主成分与痕量杂质的定量分析方法及可接受的标准有所不同。方法使用的频率(一天数次，一天仅很短的一次或一月一次等)也影响所需论证研究的类型。

反复探讨整体方法的论证工作往往是恰当的。方法建立初期所需要的论证也许很有限。例如，某待审批新药的最初研制与开发(R&D 研究)，分析可能只在一个实验室进行，仅有一位操作人员，使用一台仪器。一种新农药的毒理学研究预试验也可能在严格控制的条件下进行，使全面论证研究的需要降至最小。初始处方研究时，用于测定活性药物成分的 HPLC 方法，可能不需研究检测限或普适性。因此，最好按优先次序安排好需论证研究的各项内容。一个良好的论证方案，应先进行那些重要的研究，并预测将来的需要。通常先进行专属性、线性、准确度和精密度的研究；然后再进行稳定性和普适性的全面研究。

最终方法可能在世界上不同的地区使用。不同的 HPLC 装置、实验室设施和试剂来源，以及人员实验技能和经历的差异可能需要该 HPLC 方法具有具体详细的说明。另外，不同处方中的同种药物的含量和物理形态可能不同，方法建立步骤则需灵活一些。片剂主成分定量方法的建立可能必须适应洗剂、乳剂与气雾剂的特点。分析生产设备中的残留药物(通常需要的清理－论证研究)，亦需要方法修正。这些应用包括方法的匹配，而匹配的方法往往基于初始方法建立的研究。后期产品开发或商品化的论证可能要求更严格，需进一步的研究。

较好的方法论证方案是确定并执行每一步骤所需的严格的论证条款，并允许在后续的方法改进或论证中使用新的或原有的知识。另外，在原研制实验室以外日常应用一方法，可提供有价值的普适性信息(使用不同色谱柱、试剂、仪器等)。日常应用过程中，应

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

注意积累来自不同实验室的这些信息。这些后期结果可能表明应修饰该方法以改善某些特性。继续该反复修正过程，直至完成正式且完整的论证，形成正式文件（通常在提交一种药品申请、最终方法移植至新地点之前，等等）。

本章其余部分主要论述方法论证研究的各组成部分。包括准确度，精密度，线性，范围，检测限，定量限，专属性，普适性，强健性，样品、试剂、仪器的稳定性与系统适用性标准。另外还将讨论方法文件的形成、实验室间数据的交叉研究，确定性能的等同性技术。对研究的各组成部分，重要的考虑是需确定（在论证开始前）什么可使该研究的结果能够接受。这些可接受的标准随方法类型和使用目的而发生变化。例如，高精密度对主成分的定量要比分析单一的痕量杂质更重要。

15.2 准确度（Accuracy）

测定的准确度可定义为测定值与真值的接近程度。在准确度高的方法中，对样品（其真实值已知）进行分析，其理想的测定值应与真值完全一致。一般以回收实验表示和确定准确度，但准确度的确定方式有三种：(1)与参比标准品比较；(2)回收测定掺入空白基质中的被测物；(3)被测物的标准品加入法。

15.2.1 与标准品比较

对于被测物（例如纯药品物质）样品基质不复杂的情况，用直接与参比标准品比较确定准确度的技术较好。如果该被测物的定量测定很不很特殊，可由外界来源获得合格的标准品，如美国国家标准品与技术研究所（NIST）或专营参比标准品的供应商。然而，商用开发中的新化合物，如杀虫剂或待审批的新药通常没有参比标准品。在这些情况下，可用一“特殊批号”的化合物作为参比标准品。保证该物质的高纯度并进行多种特性确证（用多种方法）很重要，以确保作为标准品时真实可靠。对该标准品的适宜试验可包

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

括：元素分析、质谱、UV－Vis、IR、NMR（或需检查多种元素）、残留溶剂和/或水分分析、示差扫描量热法等。当然，“标准品”在用将论证的 HPLC 方法进行色谱分析时，应为轮廓分明的单峰。其它的色谱方法如 TLC、GC、CE 或另一种 HPLC 方法（如 RPC 或 NPC）也可用于确证用作参比标准品的该化合物是否单一、纯净。亦见3.2、6、9.1.1.7、10.7和15.7节中的关于论证峰纯度的讨论。

确定一个 HPLC 方法的准确度至少应用三种浓度（包括各样品的分别称重与制备），最少应进行九次测定。该方法可尽量减少某样品仅用一种浓度时，样品制备技术和分析中的差异和/或偏差。例如配制三种不同的浓度，每一浓度重复测定三次。平均所有九次实验的结果，用此确定最终准确度。然后将这些测定结果与用其它方法测得的结果或由外界来源分析证书上所报告的结果进行比较。

15.2.2 被测物的回收率测定

如果用 HPLC 方法测定复杂基质中的被测物，可使用掺入回收测定法。该方法仍需用经良好特性鉴定的标准品，但实验是在有基质的条件下进行。因为基质中的其它组分可能干扰分离、检测及被测物的准确定量，必须研究基质组分的潜在影响。将不同数量的被测物参比标准品加到空白基质中（有时称空白对照）进行实验。空白基质的形式可有多种。例如，在药品制剂分析中，空白基质应包括除被测物以外的所有处方组分。对农作物中的残留农药，基质则应为未施药的农作物。

通过与已知的加入量比较来确定每种含量的回收率。定量分析主成分时，掺入量一般应为正常分析中被测物期望含量的50、75、100、125和150%。各含量样品至少应重复测定三次。用其它掺入浓度系列也可以（如75、100、125%或80、90、100、110和120%），但关键是应包括最终产品的期望浓度。应进样分析该空白基质，以确定基质的背景影响（如果有的话）。如发现空白基质中有任何干扰，与有关色谱峰重叠，应如第 6～9 章中所述修改该分离，以改善

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

分离度，消除干扰。

有时，已知基质中有一个以上要分析的组分，例如，纯化合物中的多种杂质或某处方或配方中的多种活性化合物。该情况下可采用两种方法。第一种方法是在含有非活性组分和典型浓度的其它被测组分的基质中分别掺入适宜浓度的各有关化合物。第二种方法是在不含任何分析组分的空白基质中掺入等量的所有组分。两种方法可能都适用，这取决于个人喜好和不同组分间可能发生的相互作用。

15.2.3 标准品加入法

标准品加入法是将不同（但已知）量的被测物掺入已含一些（未知量）被测物的基质中。然后可通过数学计算得出原样品中的被测物浓度（见 14.3.4 节）。一般对于标准品加入法来说，不同实验中较好的方法是在基质中加入被测物期望浓度的 25、50 和 100%。未加标准品的样品与每一份加了标准品的样品都应进行分析（通常重复三次），并将测得量与加入量作图分析。当难以制备或不可能制备适宜的不含被测物的空白基质时（例如分析普通血样中的胰岛素，其中总会含有背景浓度的胰岛素），则使用这种方法。标准加入法的详细讨论见 14.3.4 节。

15.3 精密度（Precision）

精密度可定义为“当重复使用该操作步骤对一均匀样品进行多次抽样测定时，各次测定结果间的一致程度”[2]。国际协调会（ICH）提出的更全面的定义[6]将精密度分为三种类型：(1)重复性；(2)中间精密度；(3)重现性。

重复性为一种方法在相同的操作条件下短时间内的精密度。其中一个方面为仪器精密度。通过依次重复进样分析同一均匀样品（一般为 10 次或 10 次以上），并平均峰面积或峰高值，以确定全部进样的相对标准差（RSD；见下面），可测出该精密度。第二个方

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

面有时称为分析内的精密度，包括同一分析人员在同一条件下，对同一样品（不是同一次制备）的多次测定。

中间精密度指在同一实验室内多次使用同一方法时，全部测定结果（包括标准品）的一致性。其中包括不同日期、仪器或被测物的全分析，也包括多次配制的样品和标准品。

重现性检验实验室间的精密度，往往在协作研究或方法移植实验中进行测定。

初始方法论证期间，评价精密度通常采用前两种：即重复性和中间精密度。重现性通常在方法移植至其它实验室或场所的过程中进行测定。精密度通常用一组数据的标准偏差（SD）或相对标准偏差（RSD）表示。如果一个样品进行一组 n 次测定，则 n 次测定结果的均值定义为：

$$x = \frac{\sum_{i}^{n} x_i}{n} \tag{15.1}$$

x_i 为各样品的测定值。这些数据的标准差则为

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i}^{n} (x_i - x)^2}{n-1}} \tag{15.2}$$

相对标准差（RSD）或变异系数（CV）为：

$$RSD(\%) = \frac{100\ SD}{x} \tag{15.3}$$

有关数据处理实用统计学的内容详见文献 8 和 21。

采集的评价精密度的数据往往可用于有关线性（15.4 节）或准确度（15.2 节）的其它研究。一般单一样品的各浓度进行 6～15 次的重复测定。对 HPLC 中主成分的定量分析，要求方法的相对标准差（RSD）为 1～2%。获得更好精度的主要制约是使用的玻璃器皿，其精密度限度约为 0.5%。利用称重可减小这种误差，称量每份体积（移液管吸取、加满至刻度等），再以溶剂的密度将重量校正为体积；称重比容量转移更精密。测定低浓度杂质时，通常可接受 5～10% RSD 的精密度，这取决于样品的复杂程度。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

精密度较差的方法(RSD≥2%)有时仍可使用,甚至当个别样品需要准确定量时。一个简单但耗时的方法是增加重复实验的次数。例如,如果某一定量方法的精密度为3% RSD,单次测定的结果可为 $x \pm 3\%$。通过分析10个样本,求出其平均值,该值的不确定性就降低 $\sqrt{10}$倍,于是结果可以为 $x \pm (3/\sqrt{10})$,或 $x \pm 0.95\%$。

15.4 线性(Linearity)

如14.1.1节所述,方法的线性是衡量响应值与浓度的校正曲线近似为一条直线的程度。评价线性可对被测物的几个浓度进行单次测定。然后用线性最小二乘回归法对数据进行处理。产生的曲线斜率、截距与相关系数可提供该方法线性的所需信息。图15-1所示为该方法的一个示例。斜率与截距的数值取决于测定的响应值,但用设计良好的 HPLC 方法分析主成分时,通常期望的截距大于2%(相对于真浓度的响应值)。大多数方法,尤其是定量分析主成分时,其线性相关系数大于0.999即可。线性差于此值的方法可能得视为非线性,必须用更复杂的多点校正法或非线性响应模式。

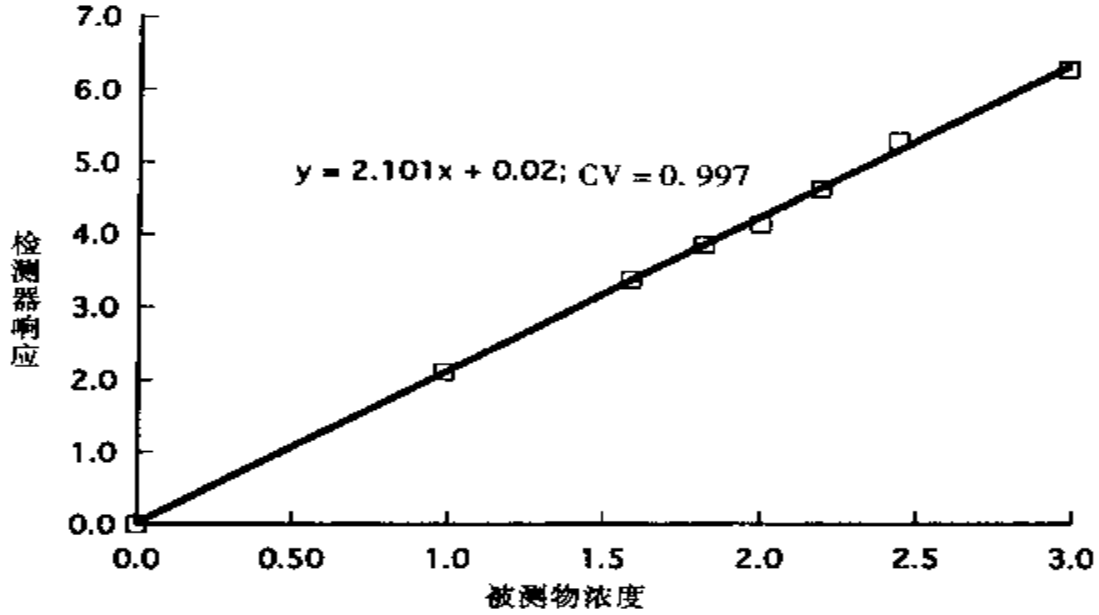


图 15-1 典型的检测器响应与被测物浓度的线性关系曲线

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

如测定的响应值超过一个或多个数量级时，决定线性的最小二乘法则有严重缺陷。低浓度或高浓度的数据能对斜率、截距和相关系数有不良影响。斜率或截距计算值的微小变化能导致估测样品真值时出现误差。因此需要评价线性的更好方法。

图15－2所示为在较宽浓度范围确定线性方法的一种通用的高级方法[9]。该方法包括在各测定浓度测定响应因子，将该响应因子（或灵敏度）对被测物浓度（或范围宽时的对数浓度）作图。响应因子可由下式计算

$$RF = \frac{DR}{C} \tag{15.4}$$

其中 DR 为检测器的响应值（峰面积或峰高），C 为被测物浓度。

理想情况下，如果方法在较大的浓度范围内真正呈线性且 $b \approx 0$（b 为截距，如式14.1中所定义），则响应因子应与浓度无关。在图15－2中，响应因子在1.2～10.0μg/mL 范围时，与浓度无关。而在低浓度时该线性关系发生偏离，假定的线性不复存在。

尽管响应因子方法仅用响应的斜率信息，但其中也含有截距和相关性的信息。例如在低浓度时，低平曲线的“弯曲”表明截距不为零（图15－2），在高浓度时的非线性同样也表明了灵敏度随浓度的变化关系。理想的相互关系图应在整个浓度范围内均不偏离图15－2的中间水平线（它代表高浓度样品的平均响应因子）。但根据分析方法的需要，在直线附近合

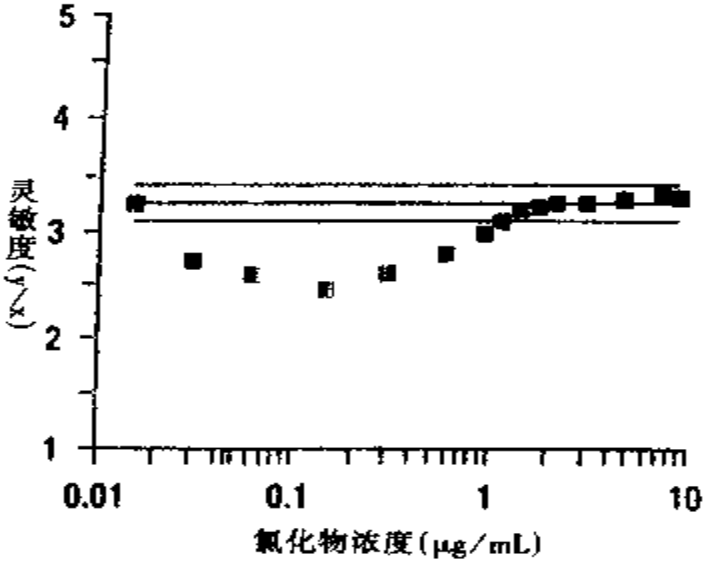


图 15－2　用灵敏度与浓度表示的线性关系[9]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

理限度内的离散仍可接受。这一点通过残差与测得的被测物浓度曲线可清晰地看到，如图15－3中另一组数据（图15－1的）所示。每一数据点的残差，即某浓度的测得值，与通过对所有数据进行线性拟合确定的斜率与截距的计算值之间的差异。该情况下，残差应分布在零参差线的上下两侧（表示方法的随机精密度），而无明显的远偏离。图15－2和15－3的方法也可用于确定该方法中是否存在系统误差。

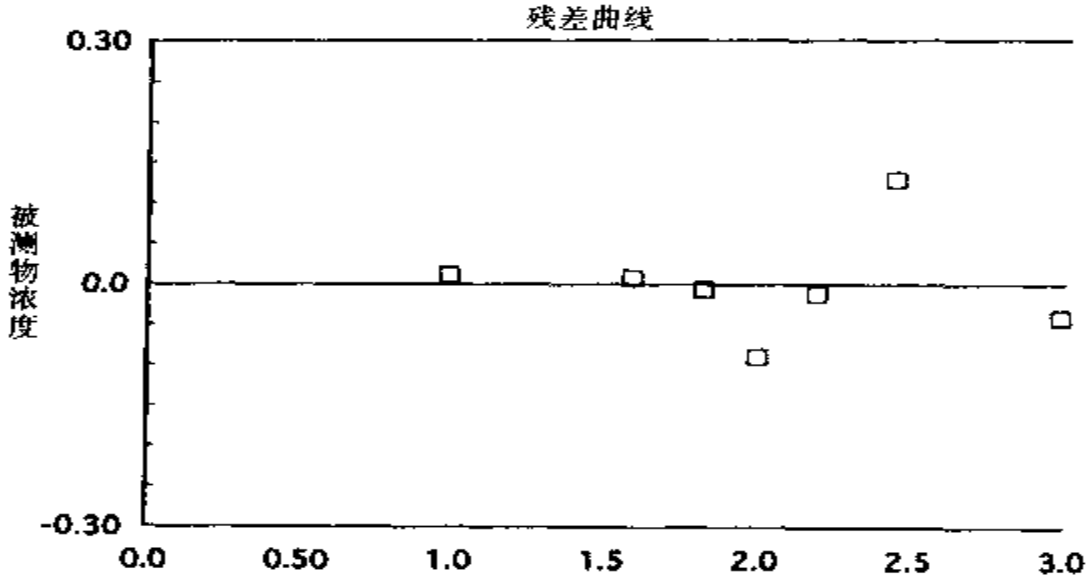


图 15－3　残差与被测物的曲线图

线性数据可由几种方式得到。一种简便技术是配制（较浓的）被测物储备液，进行系列稀释（如 1→5，1→10，1→20），以得到所需的被测物浓度。系列稀释法有助于避免独立配制几种浓度带进的潜在误差。至少用不同的储备液重复此步骤三次，可得到三整套线性和响应因子曲线图（如图 15－1～15－3 所示），可用于测定线性的重现性。另外，进行这些线性研究最好用至少 5 种不同浓度进行实验（见下面实际浓度范围的讨论）。

15.5　范围（Range）

方法的范围可定义为分析方法有足够的准确度、精密度和线

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

性的最高和最低浓度。在开始方法论证之前往往已知道了期望的浓度范围，而实际的工作范围则取决于论证研究期间得出的数据。所以浓度范围取决于方法的类型和用途。对主成分的定量分析，标准品的浓度测定应在或接近期望的目标检测浓度进行。浓度范围应包括所测样品的期望值。在目标值的 50、75、100、125 与 150% 进行研究是好策略。该范围还表明该方法超出预期使用的限度是否仍呈线性（一般为 90 ~ 110%）。

药物主成分的定量分析经常用于测定单位剂量的含量均匀度。美国药典（USP）含量均匀度项下规定单值偏离目标值可多达 25%，仍可判为合格[10]。因此，尽管期望的定量分析能在 ±5 ~ 10% 的目标值范围内，一个慎重的线性论证应包含至少 ±25% 的范围。而且，药物稳定性数据的结果（尤其那些加速实验中的数据）会超出预期的规定范围。这就要求论证范围应大大超出定量分析那些未经加速实验的产品的期望规定值或目标值。样品浓度高于校正范围的情况下，最好将样品稀释至合适的浓度。

测定杂质、降解物及其它有关物质的方法，可使浓度相差数个数量级，这取决于方法的灵敏度。药品及其有关样品在论证研究中推荐的测定范围应从定量限开始（通常 < 0.1%），至少上延至主成分浓度的 5%。一般测定不需要超出此范围，由于原料或最终产品中很少允许有高浓度的有关物质。其它类型样品的应用，可能需调整该推荐范围；然而关键是应论证所有潜在样品的期望范围。

15.6 检测限和定量限（Limit of Detection & Limit of Quantitation）

一个方法有两个重要特性：检测限（LOD）和定量限（LOQ）。在第 3 和 4 章中我们阐述了如何测定这些特性，检测限和定量限的研究被认为是任何方法论证的重要组成部分。检测限（LOD）可定义为被测物给出可测定响应信号的最小量。LOD 往往取决于其信

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

噪比（S/N'），一般为 2 或 3。我们推荐以 S/N' 比值为 3 作为 HPLC 方法的检测限。

定量限(LOQ)可定义为响应值能准确定量的被测物的最小浓度。LOQ 也可定义为精密度低于一定值(如 RSD>3%)时的浓度。如果方法要求在最低检测浓度时达到一定的精密度，往往使用 LOQ。LOQ 的大小可任意设定，如 $S/N' = 10$。图 15－4说明精密度与样品相对浓度的关系。被测物相对浓度大于 20，该示例的精密度与 S/N'(RSD≈1%)无关，但取决于其它因素。如相对浓度小于5，精密度则由 S/N' 决定。根据图 15－4，S/N' 比值 =10(本例中被测物相对浓度 =4)可使精密度好于3%。

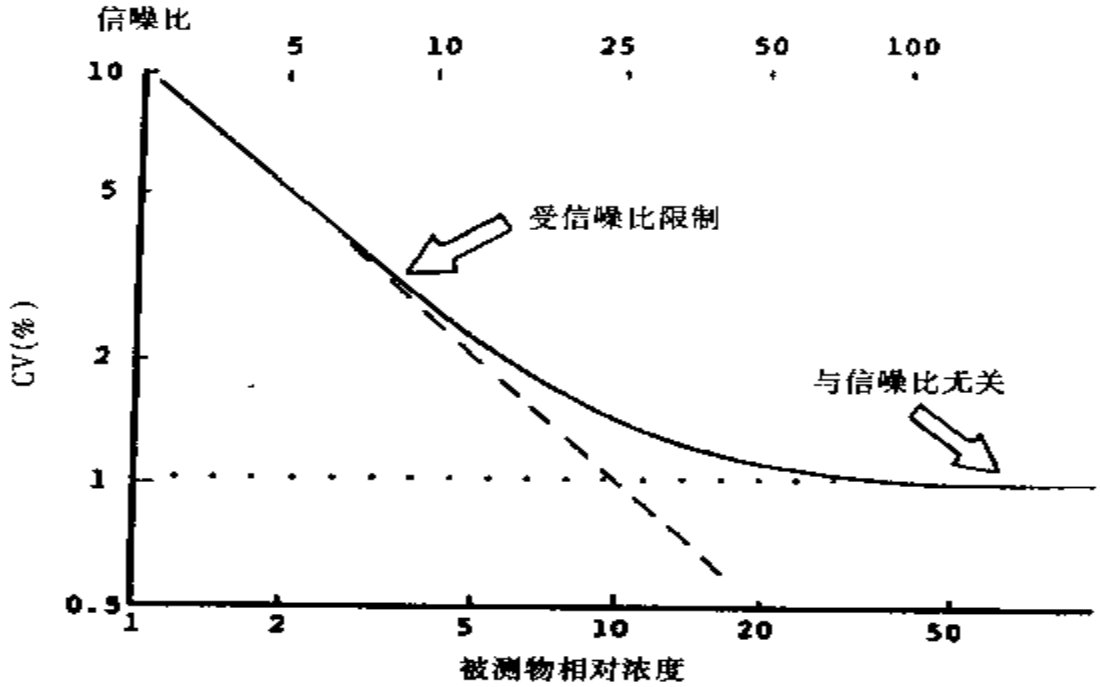


图 15－4　精密度与样品浓度及信噪比(S/N')的依赖关系

在方法论证期间测得的 LOD 和 LOQ 值受分离条件的影响：色谱柱、试剂，尤其是仪器设备与数据系统。仪器的改变，尤其是泵系统和检测器，或使用被污染的试剂将导致 S/N' 比值发生较大变化(尤其影响基线噪音和漂移)。这些影响的讨论详见第14章。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

15.7 专属性(Specificity)

专属性为大多数分析方法的中最重要指标,可定义为在其它样品物质存在的条件下可准确测定被测物浓度的能力。如果专属性无把握,方法的准确度、精密度和线性都将严重打折扣。因此确保专属性是建立和论证一个良好方法的第一步。调整谱峰间距并增大峰之间的分离度,以保证专属性的技术已在第6~9章中讨论过。方法的专属性应该在方法论证及以后的应用中不断重新评价。因为在最初方法建立过程中已被适宜论证了的方法,在以后的检测中,还会受到以后样品中的新的或以前未知的化合物的干扰。

测定方法专属性能用两种方法。第一种最理想,测试所有可能的干扰化合物以证明它们都能与检测物峰分离,并达到规定的分离度(通常 $R_s \geq 2$;参阅2.2.2节)。在第6~9章中,我们说明了调整样品保留时间实现此目的的系统方式。获得专属性的另一种方法是使用选择性检测器(见3.3节),特别是对共流出的化合物。例如,选择性检测器(如电化学或放射性)只对某些化合物有响应,而对另一些则无响应。就放射性化合物来说,即使有组分与其完全重叠,但只要不具放射性,检测器就只"检测到"该有关化合物。这种情况下,尽管色谱分离不足,也能准确测定该化合物。

在优化测定选择性时,利用特定 UV 波长也很奏效。通过衍生化并选择所生成衍生物的波长进行测定,也能加强对被测物有选择性的紫外检测。用 DABS-Cl(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰氯)对氨基酸进行衍生化,然后在436nm 的波长处进行检测即为一例。这种方法可在共存的其它化合物仅在短波长有吸收的情况下,分析这些化合物[11]。尽管用选择性检测器可有效地保证专属性,但仍然不如将有关化合物足够分离开更好。共流出的化合物,特别是其质量大大超过被测物质时,即使使用了选择性检测,仍可对分离的重现性有影响[12]。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

已建立方法的专属性往往很难保证。不过，在方法论证实验中能使用许多技术，以增加方法专属性的可信度。这些技术包括：

1 掺入已知干扰物

2 样品降解研究

3 峰收集后，再用其它技术对其分析

4 专用在线检测，如 LC/MS 或多波长扫描

5 使用另一种色谱分离模式

6 改变该 HPLC 方法的条件（如改变溶剂或梯度斜度）

这些确保方法专属性的步骤将在下面分别讨论。

15.7.1 掺入潜在干扰物

评价专属性最简明的技术是在样品中加入少量已知的干扰物、降解产物或其它杂质，以确定所加入的物质与被测物能良好分离。然而在早期的方法建立研究中，所有潜在干扰化合物不一定都知道或能得到，所以如下所述可能需要其它技术来评价干扰物。

15.7.2 样品降解研究

评估专属性的另一种技术为特意使样品降解，再在谱图上找出所出现的杂质峰（相当于样品的降解物）。这种方法在其它基质成分（如配方组分）存在或不存在的情况下都可使用。往往需用另一种技术确定已降解的样品中有关定量峰的纯度。包括在线检测方法如 LC－MS、二极管阵列波长扫描（见15.7.4节）或“离线”检测方法如借助光谱分析法（15.7.3节）收集峰，确保在主成分峰下未掩盖着另一组分。样品降解往往会出现其它峰，但如果这些峰能很好地与被测物峰分离，那么就不会影响样品的定量检测。降解研究经常使用的反应包括酸、碱、热、光及氧化反应（见表15－2的示例）。通常情况下，设计研究方案使初始样品降解10～30%。这样产生的峰很可能就是实际的降解成分，而不是（降解≥30%时）在实际样品中发生的可能性不大的其它化学产物。另外，这些降解研究也可说明将生成何种“真正”的降解产物，它们会在何处流出，这些

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

内容在建立有稳定性要求的方法中也很有用。

15.7.3 峰收集与分析

通过收集有关被测物峰，再另外进行分析，这样确定方法的专属性最好。这些方法包括质谱表征鉴定、IR、NMR、专门的生物分析或其它适宜的表征鉴定法。通过这些附加分析，有可能发现任何共流出的化合物。也可以分三部分收集一个峰（峰的初始部分，峰中心部分和峰最末部分），然后分别重新进样分析。如果其他成分与被测物主峰有部分共流出，在重新分析各收集的部分时，一般能观察到部分的分离，见图15－5所示。该例中，收集了图15－5*a* 中主峰的最后部分（5.78min 后），然后用同样的或分离度更高的色谱条件重新进样分析。在图15－5*b* 中，明显可见有另一个部分分

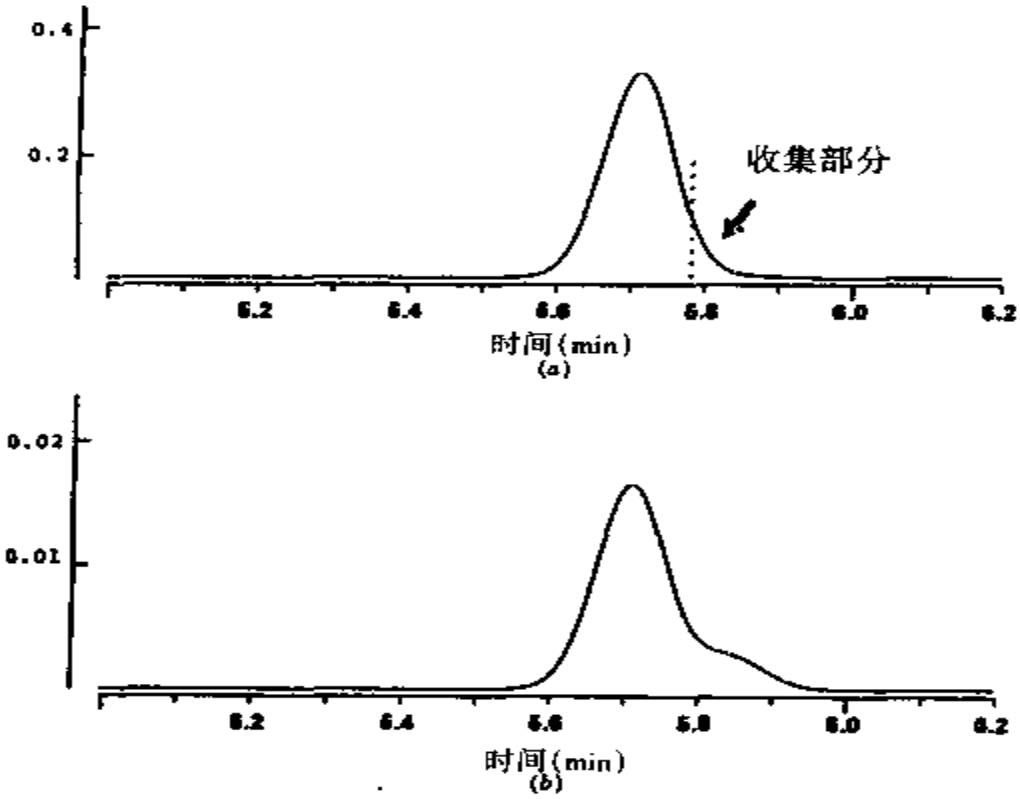


图 15－5　峰收集与再进样分析（检测峰纯度）

（*a*）中收集的主峰部分在（*b*）中用同样的分析条件分离，表明有部分共流出化合物。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

离的峰，即在图15－5a的正常条件下，其被埋没于主峰下面了。为使该方法有效，图15－5的步骤应包括收集不超过总谱峰的10%；图15－5a的分离中收集的部分为5%（5.78～5.90min）。

15.7.4 附加在线检测

专用的在线检测系统，如二极管阵列 UV 和 LC－MS，对评价方法的专属性也可能有帮助。许多使用者利用二极管阵列 UV 系统中附带的"峰纯度"技术来观察整个出峰过程的光谱是否一致，光谱图一致是单一化合物的有力证据（见3.2.6节中讨论）。虽然这种峰纯度方法很有用，但前提是检测化合物和潜在干扰物的 UV 光谱应有明显的差异。不过，如果一个干扰物和被测化合物的保留时间相同（在±0.02min 以内）或者两个化合物的光谱类似或完全相同，这种检测峰纯度的技术就不可靠了。

假设能观察到潜在的重叠物质有不同的质量或质量模式，在线 LC－MS 系统对测定峰纯度则特别有用。遗憾的是 LC－MS 价格昂贵，一般不用于日常分析，且往往不适合 HPLC 的溶剂系统。这些缺憾限制了这种有效方法的实用性。不过，LC－MS 系统将变得日益普及和通用，在方法建立实验室中 LC－MS 的日常使用正在急剧增加。另外，峰采集和离线 MS 分析（尽管十分繁琐和费时）可提供与在线 LC－MS 检测相似的信息。一些实验室的策略是用与质谱检测相匹配的溶剂和操作条件，建立方法。但是，如果有异构体存在，因为它们有类似的质谱碎裂模式，用 MS 确认峰纯度的技术会受限制。异构体是许多制备过程中的一般杂质，所以需要其它交叉检测纯度的方法（见15.7.5节）。

15.7.5 色谱交叉检测

另一种测定峰单一性或纯度的有效技术是使用不同的色谱方法。例如：如果原方法建立时使用的是反相 C_{18}柱，那么可以改用正相方法。第二种 HPLC 方法可用于整个样品，也可用于（或更好）从反相 C_{18}柱收集的单峰。如图15－6的示例所示，对主峰（保留时

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

间9.0 min)进一步的特征鉴定。在图15－6*a*所示的初始分离中有五种与主峰分离的化合物。只收集主峰，用另一种色谱方法重新进样分离(如图15－6*b*所示)，结果表明在图15－6*a*中的主峰中隐藏有一小杂质。

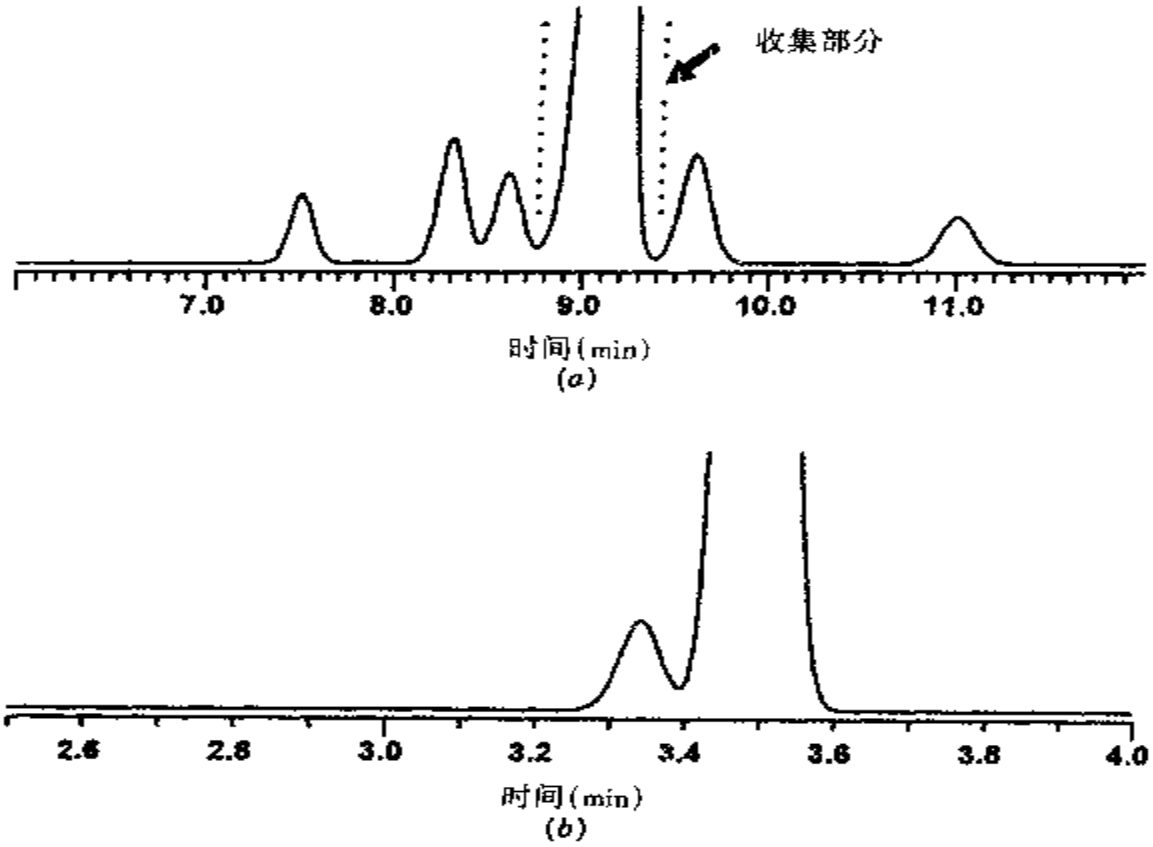


图 15－6　峰收集与用另一种色谱方法再进样分析(检测峰纯度)

图(*a*)中收集的主峰在图(*b*)中重新进样分析，表明原分离的主峰中有一共流出峰。

其它分离技术，如薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、离子交换色谱和毛细管电泳(CE)也适于检测峰纯度，具体用什么方法取决于样品的类型。CE 技术与 HPLC 高度互为补充，用 CE 技术确证 HPLC 方法的专属性应用日益增多。图 15－7 为该方法的一个示例[13]。本例中，用反相 HPLC 分离兔肝 Cd、Zn－MT 金属硫因

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

(metallothionein)异构体，在pH2.5时分离效果最佳，但只完全分出两个主峰(图15－7*a*)，而用CE分离该样品时，则至少能分出四个峰，如图15－7*d*。

15.7.6 改变HPLC条件

改变原HPLC方法的条件能改变选择性，使原重叠峰分开。如果没有新峰出现，则说明所有化合物都已被分开，该方法是专属的。例如，如果通过两次或两次以上改变%B或梯度陡度建立一个梯度(或等度)方法，所有梯度洗脱中没有出现干扰或重叠峰，可能就证明它是专属性的。同样，在方法建立过程中，使用其它溶剂、色谱柱、温度、pH、添加剂等得到的分离结果可进一步证明峰纯度。尽管有关方法专属性的重要信息往往包含在方法建立期间产生的数据中，但通常需用15.7.3和15.7.4节中描述的交叉检测方法，以使峰纯度的可信度更高。

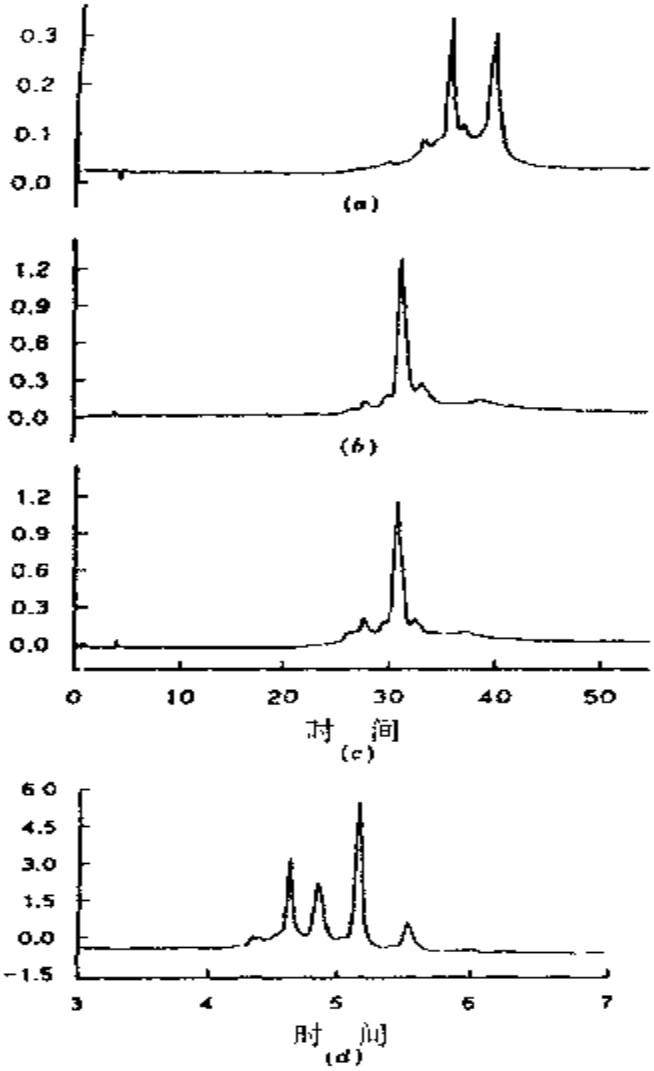


图15－7 HPLC分离的专属性：以不同pH值的反相HPLC分离兔肝Cd、Zn－MT金属硫因异构体[13]

色谱柱：25×0.46cm Vydac－C_{18}柱；流速：1.0ml/min；室温；UV检测器：214nm；流动相：乙腈/10mM磷酸钠缓冲液，两步梯度；(*a*)pH 2.5；(*b*)pH 7.0；(*c*)pH 11.0；(*d*) CE的分离：色谱柱：7cm×75μm熔融石英毛细管柱；运行缓冲液：10mM磷酸钠缓冲液，pH2.5；运行电压30kV；200nm UV检测。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

15.8 普适性(ruggedness)

方法的普适性被定义为方法在实际应用条件下运行时,其结果的重现性。这包括不同的分析人员、实验室、色谱柱、仪器、化学试剂与溶剂的来源等等。方法刚建立时,其普适性可能未知,在以后应用中便会认识到。良好的方法建立步骤需要系统地论证那些影响方法普适性的重要因素。以此方式建立的初始方法,在论证及以后的应用过程中,其性能良好的可能性较大。

测定方法普适性的策略随着该方法的类型和复杂性的不同与可供论证方法的时间而变化。测定方法的普适性可能只限于几个重要实验,如检测不同色谱柱的影响(制造商和型号相同)或不同实验室中应用该方法的影响。这种情况下,所有其它因素保持不变,包括流动相与试剂。用同一样品,比较最终的结果(定量测定值,杂质含量等),以评估出相当值。当测试普适性的时间有限时,该方法很有用。一个方法的真实普适性往往只有通过不同实验室一段时间的验证才能确定。然而,随着对方法普适性需求的增加,需要有更全面的预测普适性的计划。

15.9 强健性(Robustness)

国际协调会(ICH)[6]已将分析步骤的强健性定义为"方法被微小的、但有意的参数改变对结果影响的承受能力"。一种良好的办法为系统地改变方法中的重要参数,然后测定它们对分离的影响。例如,如果一个方法使用 36% ACN/水作流动相,那么用 33、36 与 39% ACN/水进行分析,测定流动相对保留值和选择性的影响,则有助于确定有机溶剂含量比例变化对该方法的影响力。应对所有变量(如流动相添加剂、柱温、流速等;见图 1 ~ 5 所示)进行类似的研究。如果像第 6 ~ 9 章所推荐进行分离变量的系统研究,很多数据可在方法建立过程中获得。在定义强健性时,使用参数作图步骤

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

特别有效(见 10.6 节)。

强健性最重要的方面是建立能预测分离参数变化对结果影响的方法。例如两组分在 pH 3.0 和 pH 4.5 时的分离相当,但在 pH 3.0 时,pH 变化 ±0.1,分离的变化则很大(而 pH 4.5 时则不大),那么选择 pH 4.5 就较好。考察方法强健性的有效办法是用统计学实验设计,同时评估多个参数。适宜的设计方案能够最大限度地减少所需实验的次数,并仍能提供有关各个参数影响结果的信息。一般首先应对可能影响方法的所有已知因素或怀疑因素进行多变量筛选研究。在第一步研究中,简明地检查怀疑因素,以确定哪些因素对本方法的影响较大。首次研究的结果将表明只有这些因素重要。第二步是对这些重要因素进行更详细地评估,一般对每个因素都用三水平实验。该研究结果能给出每个因素对定量的影响。在方法建立中运用实验设计超出了本书的范围,不过,有关一般实验设计的详情可以参见文献 14 ~ 17。另外,应用计算机模拟(如 Dry-Lab)对测定方法的强健性影响也很有用(见 10.2 和 10.6 节)。

注意上述的考虑将大大改善最终方法的质量。然而色谱柱是个例外。不同生产批号的色谱柱有可能使所有样品成分的保留值不能重现,甚至使分离结果不可接受。因此,在方法建立和论证过程中,至少应对三个不同批号的色谱柱进行评估,确保能得到重现性好的色谱柱,这一点十分重要。如果发现样品保留值有明显的批次差异时,应采取适当的措施,以避免将来发生问题。一种方法是储存足够的"好"批号的色谱柱,以备将来该方法使用。另一种方法是测定是否能通过微小地改变色谱条件(% B、温度、pH 等),减少或纠正批次间保留值的任何不良变化。

15.10 稳定性(Stability)

为了得到重现性好的和可靠的结果,HPLC 方法中使用的样品、标准品和试剂在适宜的时间内(根据需要,如一天、一周或一个

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

月)必须稳定。例如,即使是单一样品的分析,测定系统的适用性也需 10 或 10 次以上的色谱操作,包括制作工作曲线的标准浓度,二次或三次地重复测定被测样品。因此,即使分离时间很短(10 min),标准品和样品溶液也需稳定几小时。当分析的样品多于一个(多批次的一种样品或不同储藏条件下的同一批样品),往往进行自动的、隔夜操作,以提高实验室工作效率,这种情况进一步增加了对溶液稳定性的需求。

时间与温度对所有试剂与溶液的稳定性都很重要。如果一种溶液在室温下不稳定,温度降至 2~8℃则可以改善样品和标准品的稳定性;自动进样器的冷却装置可用于该目的。实际的分析时间对稳定性也是重要的。如需 100 min 梯度洗脱的分析实验与 5 min 的等度分离比较,需要的试剂稳定性更高。一般来说,每次分析所需配制的溶液和试剂都需要有 24 小时的稳定性。标准品溶液需有长期的稳定性(数天或数星期);否则在每次分析时,需新鲜配制标准品溶液。

选择流动相时应注意稳定性问题,特别是使用胺添加剂或特殊溶剂时。例如,已知含 THF 的流动相易被氧化。这些流动相应每天用 THF 现配。有些缓冲液流动相也存在这类问题;例如,磷酸盐和醋酸盐为微生物生长的良好介质。在这类流动相中经常加入叠氮钠(0.1%),以抑制微生物的生长;添加 5% 以上的有机溶剂也能奏效。

色谱柱的长期稳定对方法的普适性十分关键。即使最好的 HPLC 柱,最终也会降解并丧失其原有的性能,其程度往往与样品的进样次数有关。有关色谱柱稳定性的详情,见 5.4 节。

15.11 系统适用性(System Suitability)

每天在样品分析之前,操作人员必须确认 HPLC 系统和操作步骤能提供质量可靠的数据。这要依靠系统适用性试验来完成,系

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

统适用性试验可定义为：为确保方法产生的结果具有可接受的准确性和精密度的实验测试。提出系统适用性的要求通常是在方法建立和论证已经完成之后。选定的标准主要以方法论证期间测定的该方法的实际性能为依据。例如，如果样品保留时间为系统适用性标准的一部分，可测定它们在方法论证期间的变化（标准偏差SD）。于是，在该方法的日常使用中，系统适用性可能要求保留时间在 ±3 SD 的范围内（基于论证结果）。

美国药典（USP）规定了能在分析之前测定系统适用性的参数[18]。这些参数包括理论板数（N）、拖尾因子、k 或 α、分离度（R_s）和重复进样时峰高或峰面积的相对标准偏差（RSD）。一般来说，任何一种方法在验证系统适用性时，至少需用其中的两个标准。

一般将同一种标准溶液五次重复进样分析的峰高或峰面积的RSD 作为标准之一。一主成分的定量分析方法，其五次重复进样分析结果的 RSD 值一般应小于1%。而痕量化合物的测定，例如杂质标准品在定量限或其附近测定时，较高的 RSD（5 ~ 15%）也可接受。

另一种标准是测试色谱性能。只有一个峰（如用外标法测定）的情况下，使用塔板数和/或拖尾因子。对多于一个峰的色谱分离，如内标法测定或可能有许多峰的杂质法，则最好使用一些测定分离能力的因子如 α 或 R_s，具体化合物的 t_R 或 k 值的重现性也可以说明系统的性能。

15.12 论证结果和最终方法的文件形成

任何方法论证的一个重要内容是将论证实验以及适当的结论编制成文件。这种文件编集可采取备忘录、简报或更正式的书面记录形式。应请没有直接参与方法建立和论证实验的人对文件进行评论。如果确立了论证方案和希望的认可标准（见15.1节），论证报告应把这些标准和相应的结果进行比较。如结果偏离实验方案和/或数据，不符合预定方法标准时，可以要求进行另外的方法建立和/或

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

论证。有时论证结果不能完全满足开始前设定的目标或标准。如果仍能用该方法获得足够的结果(即使未达到原目标),那么在论证报告中只要有合理的解释和文件记录即可。由于方法论证往往分阶段进行(方法建立初期的初步论证,以后的全面论证),需要有多个报告。因此,最好有一种正式系统,以记录各种变化和其它情况。

另一点是需要一份正式的书面操作规程,以便他人能将该方法用于日常操作。HPLC 方法的建立者进行的几步操作可能无意识,没有认识到这些步骤对正确执行该方法的重要性。必须以书面的形式将详细的操作步骤转交给将用该方法的人。

方法说明通常用两种通用方式。第一种是以初步摘要的形式描述该方法,一般为2~5页的书面记录。这类说明的内容以及典型示例见表15-1中所示。说明应足够细,以使有经验的分析人员能明确地使用该方法。该级别的书面方法一般递交给职能机构,象 FDA 或 EPA。因此,对方法描述应非常详尽,对用途进行适当的考察。

表 15-1 通用的方法说明(摘要)

1. **方法概况**:(包括该方法的分离原理和用途)。例:该方法应用反相 HPLC 测定药物中的杂质。该方法也适用于最终剂型纯药物的分析。
2. **仪器参数**:包括所需的仪器(如必要,列出具体型号或制造厂商);流动相组成,包括梯度洗脱比例曲线图(如有用的话);流速;柱温要求;自动进样器,检测器(包括分析和参比波长)及一份色谱柱类型和来源的说明。
3. **试剂与溶液的配制**:包括该方法所需的所有溶剂、试剂与其它化学药品(可能包括来源);一份样品和标准品溶液的配制说明,包括浓度、pH 测定(如适当)、储藏和稳定性。
4. **系统适用性**:详细说明评价系统适用性的实验。
5. **样品分析**:描述分析典型样品的步骤,包括任何标准品的分析。
6. **样品的计算和/或数据分析**:举出一个需进行计算和数据分析的典型示例。
7. **样品色谱图**:提供一份色谱图的典型示例。可包括多个示例,如有可能出现多个峰,应标明。
8. **参考文献**:包括适当地参考其它文献、报告、故障排除指导等。

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepri nt.cn

第二种书面纪录的方法是详细说明实施该方法所需的每一步。这种做法往往称为标准操作规程(SOP)。当使用者的分析技能不够熟练，对类似方法的经历不多时，这类书面说明（通常 10 页或更多)尤其合乎需要。应详细说明每一步方法，以尽量减少正确操作这种方法时的困惑。当把一方法移植给生产部门或质检实验室时，经常使用这类书面说明。

无论使用哪种技术说明该方法，最好由一名未曾接触过该方法的分析人员阅读该方法说明（甚至实际操作一下），以确保说明易懂、简洁。一个设计良好并论证了的方法，如果不能恰当地编录成文字，转交到合适的实验室去使用，也就没有什么用处了。

15.13 实验室间的交叉研究(可移植性)

已被论证的方法将经常在其它实验室使用，因此应进行正式的方法移植或实验室间的交叉研究，以证明其他实验室具备资格，这一步可以作为最初方法论证的一部分，但以后情况需要时，也可经常进行。方法论证报告和方法说明可作为方法移植的基础。然而，建议有一份说明所需实验的正式议案。其中也应包括在开始交叉研究之前，对接受实验室的人员进行正式的、具体方法的培训。该研究中应使用具代表性的样品，必须注意确保两个实验室使用的样品是均质的并完全相同。方法移植的目的是评估方法的性能，而不是研究样品或基质的可能变化。在这些研究中，经常使用“控制批号”的物质或参比样品。

15.13.1 测定等同性

任何方法移植或交叉研究的一个重要内容是测定结果是否等同。一般利用统计学进行检验，譬如：

- t - 检验
- F - 检验
- 方差分析(ANOVA)

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn

Q－检验

这些检验在分析数据时，都有其特定的目的。t－检验是比较两次实验的平均结果或确定一样本均值与标准值是否存在差异。F－检验用于比较两次研究的差异。方差分析（ANOVA）技术用于比较两组以上的数据，如进行同一测试的多个实验室间的比较。评估统计学等同性通常通过比较置信度水平为95%的数据。在进行这类分析和比较时，数据偶尔会超出可接受的数值范围。这时可适宜地利用 Q－值检验（亦称为 Dixon 标准），从统计学上剔除这些数据。有关应用这些方法的详情，可参阅有关优秀的统计学参考书，如文献19，20，21。

在某些情况下，得不到统计学上的等同性，尤其在方法极为精密时。例如：一方法在一个实验室的精密度为0.5%（RSD），在两个不同实验室得到的平均测定值的差异为1.5%。这表明该结果在统计学上的偏差具显著性。然而，如果要求待测结果仅在真值的2%以内，该差异则无实际意义。在这些情况下，可能有必要通过判断观测到的差异与规格标准、样品变化性、日间变化性或其它标准相比较是否有意义，以测定这些数据组的分析等同性。如果这些差异不具分析显著性（即对这些数据的使用者有意义），那么仅本身缺乏统计学上的等同性尚不足以认为一个方法是不可用的。

正确的方法论证，文件编集和移植对任何 HPLC 方法的长期成功应用都是十分关健的。系统性的方法建立将会为方法的普适性提供一些数据，但仍需要有一个设计良好并易于执行的论证过程。

15.14 方法论证方案

表15－2中所示为一个假想样品的方法论证方案，以反相 HPLC 测定一片剂中的药物成分，但其通用原理也能用于其它分析，譬如纯药物成分的定量、杂质检查或痕量污染物的测定。根据分析方法的类型、期望的精密度或需要的测定（即被测物的规格

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

表 15－2　方法论证方案示例

--药物制剂中某种活性药物主成分的测定

专属性[a]

1.进样分析所有已知或可能与该药物有关的化合物样品。这些物质包括最终化合物的合成母体、反应中使用的其它化学药品和溶剂、合理的降解产物。所有化合物都应与被测物峰分开，$R_s \geq 2$。

2.进样分析用于压制该片剂的其它赋性剂的样品。所有化合物都应与被测物峰分开，$R_s \geq 2$。

3.将该药物和/或片剂置于下列条件下足够长的时间，以使初始物质有 10～30%的降解。

a. 0.1N HCl(酸)

b. 0.1N NaOH(碱)

c. 50℃(热)

d. 600 英尺烛光的紫外光

e. 3%过氧化氢溶液

如果这些条件太剧烈，样品降解超过 30%，则应改变降解强度和/或时间。应避免使用更剧烈的条件，除非该化合物最终有可能经受这些苛刻的条件。所有产生的化合物都应与被测物峰分开，$R_s \geq 2$。

4.收集该药物的被测物峰，然后

a. 用不同的色谱方法重新进样分析(另一种 HPLC 法、CE、GC 等)

b. 用其它光谱技术(IR、NMR、MS)分析该峰(脱溶剂之前或以后)

不应有新化合物出现或迹象。

5.分三部分(开始、中间、最后)收集该药物的被测物峰，然后用一HPLC 方法重新分析(见图 15.5)。不应有新化合物出现或迹象(峰形状)。

6.改变 HPLC 方法的操作条件(反相 HPLC 中的有机溶剂百分比、溶剂类型、梯度陡度(梯度分离中的)、温度、离子强度和/或缓冲液的 pH 值等)，然后寻找与被测物峰相分离的新峰。不应有新化合物出现或迹象。

准确度

7.在该片剂空白基质的溶液(含除药物以外的所有其他成分)中，掺入该片剂目标浓度 50、75、100、125 与 150%的药物。至少重复三次该步骤，每次分别配制空白基质和药物，最好经 2 天或以上的时间。应将 HPLC 方法的分析结果与每次加入的已知量进行比较。各浓度的被测物的平均回收率应为 99～101%。

线性

8.该特性应作为上述准确性研究的一部分进行评价。线性也可用下

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.finepprint.cn

述方法进行测试：单独配制该药物的标准溶液，最好用进样流动相作溶剂，浓度范围至少应覆盖日常分析的预期范围。如果希望用作其他分析类型（设备清洗方法、工艺中使用的药物浓缩溶液等），也可扩展测试范围（＜50%目标浓度和＞150%目标浓度）。在该期望范围内，方法应呈线性。在整个期望测定的范围，线性应作为一个恒定不变的响应因子进行测定并报告。

精密度：进样重复性

9.配制该药物的标准溶液（最好用流动相作溶剂）。取该标准溶液进样分析至少 10 次（再多会更好——有时多达 30 或 40 次是理想的）。测定每次进样分析的响应值，用式 15.1～15.3 计算精密度。相对标准偏差（RSD）应≤1.0%。

精密度：实验方法本身的重复性

10.分别配制该药物的多份溶液（最好用流动相作溶剂）进样分析，每种溶液至少重复测定三次。测定每次进样分析的响应值，用式 15.1～15.3 计算精密度。相对标准偏差（RSD）应≤2.0%。

精密度：外部条件对重复性的影响

11.至少在数天内，对该药物样品进行多次测定（最好用流动相作溶剂）。包括适宜的标准品制剂和使用规定的方法条件，但仪器、分析人员等不同。测定每份样品的测定值，用式 15.1～15.3 计算精密度。相对标准偏差（RSD）应≤2.0%。

范围

12.从上述准确性、线性、精密度研究中能决定该方法的使用范围。使用范围应包括一般日常分析中可能涉及的所有浓度范围，线性、准确性、精密度应符合上述范围中各浓度的要求。

检测限

13.用信噪比（S/N'）≥30 的药物标准品溶液，逐步稀释该样品，用 HPLC 法进行测定。继续稀释，直至 S/N' 比约为 3。

定量限

14.使用信噪比（S/N'）≥30 的药物标准品溶液，逐步稀释该样品，用 HPLC 法进行多次测定（每种溶液至少重复进样测定 6 次），继续该步骤，直至下述一种情况出现：

a. S/N' 约为 10

PDF 文件使用 "pdf Factory" 试用版本创建 www.fineprint.cn