

如需了解更多信息

如需了解更多信息，请访问

agilent.com/chem/GCMS_QTOF

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/purification

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015年1月1日，中国印刷

5991-2358CHCN



制备型液相色谱 原理与实践

基础导论

制备型液相色谱 原理与实践

基础导论

Helmut Schulenberg-Schell 和 Andreas Tei



Agilent Technologies

目录

前言	IV
内容简介	V
作者简介	VI
符号	VII
缩写	VII
1 制备型液相色谱简介	1
1.1 区分分析型与制备型液相色谱	1
1.2 设置化合物纯化的优先级	2
2 色谱柱选择的关键	4
2.1 选择分离柱	4
2.2 选择大规模制备柱	6
3 制备型液相色谱系统的组成	9
3.1 溶剂输送	9
3.2 进样系统	11
3.3 分流	27
3.4 检测	29
3.5 馏分收集	32
3.6 回收收集	44
3.7 系统注意事项	45

4 放大策略	51
4.1 采用分析型色谱作为放大工作的起始点	51
4.2 从分析柱到制备柱的线性放大公式	53
4.3 通过聚焦梯度提高效率	55
4.4 介绍整个放大工作流程	59
5 制备型液相色谱实践指南与详细规程	63
5.1 SAC/DAC 色谱柱的装填流程	63
5.2 测定系统滞后体积	67
5.3 测定色谱柱死体积	68
5.4 平衡色谱柱和优化流速	72
5.5 色谱柱过载	74
参考文献	79

前言

合成化学家、生物学家或工程师的工作之一是研究特定化合物的影响。为实现这一目标，您需要处于所研究领域的前沿。因此，您通常会发现在那些无关核心竞争力但对工作流程非常重要的任务上您能够投入的时间很少。化合物的分离与纯化正属于此类任务。

当目标化合物并非纯品时，就需要将其纯化。可能的情形包括在化合物的多步合成中使用纯化作为过渡步骤，或当合成过于复杂和繁琐时从天然源中分离化合物。其他需要利用纯化技术的情形包括（例如）快速色谱无法实现所需的纯度或结晶过程未达到预期时。

实际上，纯化化合物的分离是液相色谱的最初目的，其推动了分离科学在二十世纪的发展，与天然来源和新合成途径的开发存在密切联系。由于用作药物、农用化学品或保健品的高价值化合物的需求量日益增长，因此需要不断努力优化纯化工艺。

如今，制备型色谱不再基于臆测，而是以一系列完备的规律作为坚实的基础，遵循这些规律即可获得最优的结果。筛选适当的起始条件、优化分离速度、收率和纯度是重要考虑因素。所需的样品通量决定了优先级：要使多种不同样品获得高收率有待优化收率，而要处理毫克级的大量不同样品则需要适当的自动化。

现在，不必花费大量的时间研读文献即可开始制备型液相色谱操作变得异常重要。尽管基础导论无法替代论述制备型液相色谱的教科书全面介绍理论背景，但是本出版物将在教科书与提供如何获得最优结果的具体规定的常规系统用户文档之间建立沟通的桥梁。

分析型液相色谱和气相色谱是首选的纯度测定技术，也是确定纯化工艺进程时不可或缺的工具。在阅读本基础导论之前，最好先熟悉这些技术。其中还包括选择适当的色谱柱固定相作为液相色谱方法开发组成部分的概念。

这里，我们希望提醒那些已经非常熟悉分析型液相色谱的人士。在制备型色谱中，优化速度、纯度和收率时存在其他的规律和优先级。因此，我们希望本基础导论为关注化合物高效纯化的人士提供帮助。

内容简介

在本基础导论中，我们介绍了制备型液相色谱的基本原理，描述了纯化系统的组成，讨论了馏份收集的策略，并提供了一些针对常规纯化任务的实际解决方案。

我们首先重新定义了分析型与制备型液相色谱之间的差异，并非从传统的色谱柱尺寸或流速角度定义，而是从特定应用的现代解决方案的角度进行定义。

尽管本基础导论提供了关于制备型液相色谱及其应用的概要介绍，但我们仍强烈建议您进一步阅读题为“制备液相色谱解决方案”的安捷伦应用文集（出版号 5989-5948CHCN）¹。

作者简介

Helmut Schulenberg-Schell 毕业于德国明斯特大学，获化学硕士学位和生物化学博士学位。他在制备型色谱领域最先从事天然存在的环戊烯基脂肪酸和细菌萜烷类化合物的分离以及牛脂质结合蛋白的纯化。后来，他的工作主要集中在膜分离技术与生物技术的结合。过去 25 年间，他供职于惠普公司和安捷伦科技公司的多个产品和市场开发岗位，为化学家、生物学家和工程师提供新技术及新产品的培训。Helmut 当前任安捷伦科技公司液相分离业务开发总监。

Andreas Tei 毕业于德国海德堡大学，获有机化学硕士学位和自然科学博士学位。在其博士研究期间，他开始接触利用制备型色谱从天然植物中分离药物活性化合物。他的职业生涯从科学仪器制造商开始，曾从事 LC/MS 和 GC/MS 仪器的服务与支持工作。后来，他主要作为应用化学家，在关于 GC/LC-MS 应用和基于质量的纯化的现场客户培训方面积累了丰富的经验。在药物化学实验室基于质量的自动化纯化已成为他最感兴趣的主题之一。该主题对于致力于追求更高效率的药物开发团队而言至关重要。作为销售专员和业务开发经理，他对制药工作流程拥有全球化的视角。在其职业生涯的后一个阶段，Andreas 还作为产品经理设计用于制备型色谱系统的新模块和自动化软件。当前，他在安捷伦科技公司担任小分子制药部门经理。

符号

A	吸光度 [AU]
c	浓度 [mol/L]
d	光程 [cm]
d_A	分析柱直径 [mm]
d_P	制备柱直径 [mm]
ϵ_l	摩尔消光系数
$f_{a,A}$	分析型系统的实际流速 [mL/min]
$f_{p,P}$	制备型系统的建议流速 [mL/min]
k	保留因子
k_e	保留因子效率
L_A	分析柱长度 [mm]
L_P	制备柱长度 [mm]
N	理论塔板数
ρ_A	分析型系统中的色谱柱粒径 [μm]
ρ_P	制备型系统中的色谱柱粒径 [μm]
t_R	保留时间 [s]
$t_{D,A}$	分析型系统的滞后时间 [s]
$t_{i,A}$	分析型系统普通梯度的初始保持时间 [s]
$t_{c,A}$	分析型系统的过柱时间 [s]
$t_{D,P}$	制备型系统的滞后时间 [s]
$t_{i,P}$	制备型系统梯度的初始保持时间 [s]
$t_{c,P}$	制备型系统的过柱时间 [s]
$V_{D,A}$	分析型系统的滞后体积 [mL]
$V_{c,A}$	分析型系统的色谱柱死体积 [mL]
$V_{D,P}$	制备型系统的滞后体积 [mL]
$V_{inj,A}$	分析型系统的进样量 [μL]
$V_{inj,P}$	制备型系统的进样体积 [μL]
W_h	半峰高处的峰宽 (采用时间单位) [s]

缩写词

DAC	动态轴向压缩
DMF	二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砜
EIC	提取离子色谱图
id	内径
IPA	异丙醇
SAC	静态轴向压缩
TIC	总离子流色谱图

本章将介绍制备型液相色谱 (LC)，首先明确区分制备型与分析型 LC，然后讨论了实验室从混合物中富集或纯化目标化合物时所面临的不同优先级问题。

1.1 区分分析型与制备型液相色谱

凡是对研究化合物或生物衍生分子的混合物感兴趣的科学家或工程师都需要使用到分析型液相色谱这类标准技术。通过色谱分离和选择性检测混合物的组分可以对此类混合物进行全面的定性或定量分析。

相比之下，采用和配置制备型 LC 主要是为了从混合物中富集或纯化目标化合物以开展进一步研究或用于商业用途。几百年来，人们已开发出多种吸附方法用于提取和富集有价值的物质。到 20 世纪末，食品和制药行业中对于极高纯度化合物的需求促进了制备型 LC 技术的发展。

如果用一句话描述分析型液相色谱和制备型液相色谱之间的差别，那么可以这样说：

“在制备型 LC 中，分离得到的化合物被收集到各个容器中以进一步处理；而在分析型 LC 中，实验室分离得到的化合物只是简单地流入废液瓶或利用破坏性检测技术直接销毁！”

基于色谱柱规格或流速区分分析型与制备型色谱的传统做法不再适用。

分析我们的通用描述可以看到制备型 LC 的用途相当广泛。制备型 LC 完全与流速无关，其用于收集痕量蛋白质馏分时，既可采用每分钟纳升或微升的流速，也可采用较高的流速进行工业级蛋白质纯化。

在本基础导论中，我们重点介绍制备型液相色谱，这是一种简单而先进的用于从混合物中分离和提取一种或多种目标化合物的技术。混合物样品分批通过包含固定相吸收层的柱管。该过程将混合物分离为各种组成成分。然后，从洗脱液中收集目标化合物。

1.2 设置化合物纯化的优先级

当仅有少量原材料可用于（例如）复杂天然产物混合物的分馏时，可采用极低流速（处于纳升或微升范围内）的制备型 LC，其可能有助于在生命科学领域获得新发现。

相比之下，每分钟若干升的高流速常用于高价值化合物的生产工艺。由充分了解色谱的经验丰富的工艺工程师执行精确的放大流程并严格控制手动馏分的收集可获得数公斤纯品，其潜在市值达数百万美元。

药物开发或农用化学品研究实验室中的合成化学家一直专注于保持样品通量、收率与纯度之间的平衡。粗品的进样量通常为 100 至 500 mg。在重要的制药实验室中，通常每套系统每天要纯化 50 到 100 种不同的样品。系统的高度自动化使得非专家级色谱工作者也能在自助纯化实验室中纯化其宝贵的样品。为确保每位化学家都能快速、可靠地纯化样品并能够继续开展合成工作，系统必须高度稳定。要处理大量不同的样品，除非工艺能够实现自动化，否则几乎不可能单独优化各个纯化参数²⁻⁶。

在工艺开发中，化学家和工程师主要关注数克到数千克中间体、精细化学品或生物化合物的中试提纯。需要重复提纯大量同一种化合物时，应当彻底调整工艺流程。因此，经验丰富的色谱工作者会谨慎制定各种化合物的放大工艺。常见的做法是采用最优梯度，并且通常手动控制馏分的收集。纯化的化合物通常非常昂贵，尽管每套系统每天获得的纯化样品量很少，但产品的价值却可能很高。因此，高效的纯化工艺是延续有利可图的商业模式所必需的。

分离复杂样品（例如生物基质中的代谢物）时，色谱分离度具有最高的优先级。为应对这些挑战，需要采用填充 3 到 5 微米颗粒甚至亚 2 微米颗粒的 4.6×150 毫米色谱柱，并且色谱条件应当与典型的分析型分离所用的条件相近或相同。利用缓慢的梯度与交叉污染低的自动进样器和馏分收集器相结合可确保分离得到的化合物具有极高的纯度和回收率。通常，粗品的浓度很低。因此，需要从大体积的稀释样品（例如，尿液）中富集目标化合物，或以最高的收率从少量生物组织中回收目标化合物。

制备型液相色谱的第一步是分析分离。首先，我们需要确认样品中存在目标化合物。然后，必须评价从样品中回收的目标化合物的估计量是否值得进行后续的纯化工作。本章将详细介绍分离柱，提供基于纯化要求的色谱柱选择决策标准。

2.1 选择分离柱

需要在特定时间内回收的纯物质的量决定了分离柱的规格，这些规格反过来又决定了纯化系统的容量。例如，如果分析柱足够大，能够提供所需量的纯物质，那么需要做的只是在分析型系统中增加馏分收集器。

每天或每周不同样品的数量决定了纯化系统需要达到的自动化程度和容量。每天处理大量不同的样品时，最好为所有样品创建通用的方法，从而以最短的时间完成方法优化，此时需要采用自动进样。

纯化大量的同一种化合物时需要对收率和纯度进行优化，尤其是在需要定期纯化同一种目标化合物时。在此情形下，我们甚至可以考虑选用较廉价的方法。如果很少需要大量的纯化合物，那么反复注入少量样品将是一种可行的解决方案。

图 2.1 显示了制备型 LC 通常采用的各种色谱柱尺寸下推荐的流速和样品量一览。特定的纯化范围对应于粗产物的量，而与纯度或收率无关。

	分析型		半制备型		制备型		中试		
纯化范围 [mg]	1-15	7-70	30-300	64-640	180-1800	400-4000	700-7000	600-16000	2800-28000
4.6 mm	0.8-2.0 mL/min								
9.4 mm (0.5 英寸)		4-10 mL/min							
21.2 mm (1 英寸)			18-42 mL/min						
30 mm			34-85 mL/min						
50 mm (2 英寸)					94-236 mL/min				
75 mm (3 英寸)						212-931 mL/min			
100 mm (4 英寸)							378-945 mL/min		
150 mm (6 英寸)								800-2100 mL/min	
200 mm (8 英寸)									1100-3375 mL/min

图 2.1 对于常用的色谱柱尺寸，推荐的流速（单位为 mL/min）和样品量一览（单位为 mg）

通常，粗品的量可以为吸附剂重量 0.1% 到 1.0%。推荐值是基于密度为 0.6 g/mL 的反相吸附剂，适用于柱长或床层长度为 150 mm 的色谱柱。一根 21.2 × 150 mm 色谱柱中包含大约 32 g 吸附剂。

让我们先看看这个关于科学家常见要求的例子：“我希望每次进样都能纯化 100 mg 的原材料。您能够推荐哪种色谱柱规格和流速？”

图 2.1 中的推荐值表明使用粒径 5 至 10 微米、内径 21.2 毫米的色谱柱能够满足这一要求，其能够使大多数纯化任务获得良好的结果。需要 50 至 250 mm 的色谱柱长度才可满足所需的进样量。选择合适长度的内径 21.2 mm 的色谱柱的一项简单规则是：50 mm 用于 50 mg；250 mm 用于 250 mg。

如果分离过于困难，则需要减少注入的原材料的量或增加固定相的量。减少进样量时，必须首先减少进样体积，然后再降低浓度。增加固定相的量可通过增加色谱柱直径和/或柱长实现。

就流速而言，一条实用的经验法则是对于 21.2×100 mm 色谱柱，可以从 4.6 mm 内径分析柱的典型分析流速 1 mL/min 放大至 21 mL/min，其反映了文献中已有报道的放大公式。当需要获得较短的梯度时间或提高每日通量时，流速可增加至最高 42 mL/min，此时通常不会造成纯度或回收率发生显著下降。

2.2 选择大规模制备柱

内径 30 mm 以上、长度 50 mm 或更长的大型吸附剂床层逐渐趋向于随时间不断沉降，因为诸如压力、流速、温度或其他洗脱液特性等柱床承受的色谱条件会不断改变。如果色谱柱未经妥善、谨慎的处理，则运输会成为引起沉降的另一个根源。

在色谱柱装填工艺中，使用轴向压缩将吸附剂颗粒压入紧实的填充床中，从而维持柱床的稳定性。在色谱柱装填技术中会用到两种不同的轴向压缩：静态轴向压缩和动态轴向压缩。在静态轴向压缩 (SAC) 中，压缩柱床时，压杆被锁定机构固定于稳定的位置。相比之下，动态轴向压缩 (DAC) 则在色谱柱加工过程中保持吸附剂床层承受恒定的压力。

一般来说，粒径范围 5 至 10 微米的球形颗粒吸附剂能够承受较大的压力，适合大规模纯化应用。对于此类吸附剂，诸如安捷伦 Load & Lock 色谱柱等制备型液相色谱柱采用 SAC 或 DAC 模式均可，参见图 2.2。



图 2.2 安捷伦 Load & Lock 色谱柱具有内径 1、2 和 3 英寸三种规格。装填工作站便于在 SAC 和 DAC 模式下操作

相比之下，对于 10 微米或更大的粒径或者动态压缩容易损坏吸附剂的情况，推荐使用静态压缩。例如，300 Å 颗粒在动态压缩常见的液压循环过程容易碎裂为所谓的“细颗粒”。其他例子包括形状不定型颗粒或生物应用中的敏感凝胶。

当所需的化学键合相以散装形式提供时，也可选用 SAC/DAC 色谱柱。此类化学键合相在受到污染影响峰形或吸附剂床层受损时通常可以回收利用。可以取出色谱柱中的填料，清洁并重新装填。装填安捷伦 Load & Lock 色谱柱简单易学，只需有点经验就可获得每米 30,000 以上的塔板数。

如果 SAC 填充柱中以分离度衡量的分离效率开始下降（例如，由于床层磨损），安捷伦 Load & Lock 色谱柱只需重新压缩即可。操作过程中，将色谱柱放到装填工作站上，重新压缩色谱柱，然后重新锁定固定装置。

2.2.1 选择压缩系统

SAC 和 DAC 色谱柱需要通过压缩系统完成装填和拆卸操作。理想情况下，一套系统可用作三根内径为 1、2 和 3 英寸的实验室级色谱柱的在线装填工作站。装填工作站应当包括双-作用液压缸，其通过空气驱动的恒压-液压泵控制。它应当便于执行静态和动态轴向压缩。需要采用气压为大约 6 bar (90 psi) 的压缩空气源驱动液压泵。

液压组件，包括泵、储液槽、气缸、控制面板和色谱柱连接固定装置，都应当安装到移动单元上。典型的轴向压缩色谱柱采用垂直安装于色谱柱同轴上的单个液压缸。但是，在平行于色谱柱轴的色谱柱两侧安装两个气缸更加有利，这样的配置便于使用直径较小的气缸并降低缩回位置处的总高度。在地面空间和门的尺寸作为限制因素的实验室环境中使用和操作此类大型设备时，模块的移动性和高度较低的配置是重要的考虑因素。

2.2.2 装填 SAC/DAC 柱

根据所需的柱床的物理长度或吸附剂的量，可采用不同的方法装填安捷伦 Load & Lock 色谱柱。快速装填法和吸入法是在此类色谱柱中装填高性能吸附剂的两种方法。

最常用的方法是快速装填或料浆法，其能够利用可用柱床长度的 60% 或更少。在该方法中，无需使用储液槽。将匀浆液注入色谱柱，连接端盖，并通过液压除去匀浆液溶剂。达到压缩压力时，压缩活塞将锁定到位。该装填方法需要花费数分钟，无残留且能够利用所有吸附剂。

吸入法或缓慢装填法通常利用整个可用的柱长，最高能够达到色谱柱体积的 90%。因此，该方法需要在色谱柱上方添加塑料储液槽以存放较大体积的填充匀浆液。注入一份匀浆液，然后通过从底部真空吸引以除去溶剂。柱床干燥后，切除色谱柱顶部任何多余的树脂，连接端盖并压缩柱床。达到压缩压力时，压缩活塞将锁定到位。使用该方法装填色谱柱所需的时间取决于柱长、吸附剂类型、匀浆液溶剂类型和可用真空条件。所需时间为 30 分钟到数小时不等。柱床承受的液压与机械压力之比列于表 2.1 中。

色谱柱内径			
	1 英寸 (27 毫米)	2 英寸 (50 毫米)	3 英寸 (75 毫米)
机械压力 [psi]	1000	1000	1000
液压压力 [psi]	400	1500	3000
液压压力/ 机械压力比值	1:2.5	1.5:1	3:1

表 2.1 吸附剂柱床承受的液压与机械压力之比 (C18 吸附剂，填充柱床密度 0.59 g/mL)

分析型液相色谱系统只需增加馏分收集器即可用于纯化。正因如此，分析型与制备型液相色谱系统从溶剂输送到检测具有基本相同的流路。溶剂输送系统利用储液槽中所包含的溶剂生成洗脱液混合物。要达到高流速，溶剂供给需要大量的投资。出于安全考虑，主要溶剂储存装置通常处于实验室以外。适当尺寸的中间储存装置可确保为实验室中的泵正常供给溶剂。连接自动进样器、切换阀、色谱柱、检测器及最终馏分收集器的管线必须经过优化。如果管线尺寸过大，则会发生更多的扩散，而背压保持在极低水平。相比之下，如果管线尺寸过小，则可能出现相反的情况。每个组件都会影响纯化系统的总体性能。

3.1 溶剂输送

3.1.1 溶剂梯度的低压混合

在该溶剂输送方法中，洗脱液组成由比例阀控制，并在进泵腔加压之前在混合室中进行低压混合。对于高达 10 mL/min 的流速，必须使用真空脱气对溶剂进行脱气。对于更高的流速，通常采用氦气吹扫。但是，使用氦气吹扫难以从较大的储液罐中直接通过管线为泵加液。在这种情况下，可以使用市售的外部真空脱气装置。低压混合相比于高压混合的优势在于投资成本较低，能够得到四元梯度，且能够灵活地向洗脱液流中直接添加改性剂。半制备型低压混合系统的主要缺点在于滞后体积较大且存在脱气问题，两者均可导致梯度性能变差。

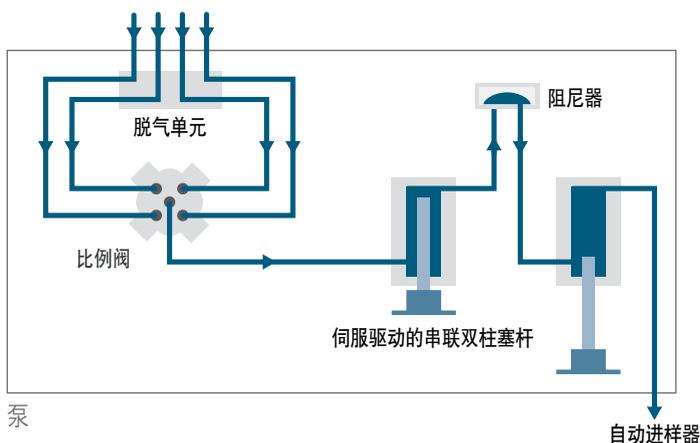


图 3.1 用于低压梯度混合的溶剂输送系统的示意图，显示了脱气单元、比例阀和泵腔

3.1.2 溶剂梯度的高压混合

另一种方法是在每个溶剂通道中使用专用的泵，其采用程序设定的流速和组成输送各种溶剂以获得所需的梯度。在高压侧进行混合，由此混合过程会成为追求高色谱性能的一个限制因素。通常在被动混合器中使用筛板或不锈钢球，而旋转搅拌器则用于主动混合器。在高压下混合时，只要洗脱液在穿过检测器的流通池之前维持在最低大约 3 bar (40 psi) 的压力下，通常就不必再进行溶剂脱气。由流通池出口或附加的背压调节阀所引起的背压可防止检测过程中气泡排出。

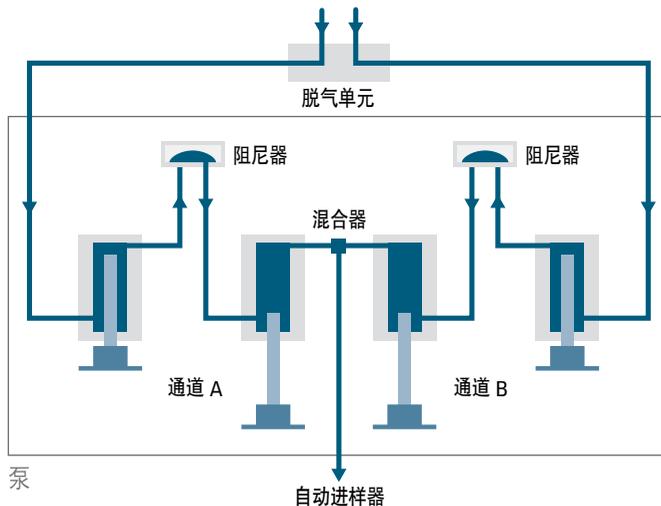


图 3.2 用于高压梯度混合的溶剂输送系统的示意图，显示了用于生成二元洗脱液梯度的两个溶剂通道

3.2 进样系统

在制备型 LC 中，注入系统的样品数量和样品含量会发生显著变化。因此，我们需要考虑采用手动进样技术以及自动液体进样器（也称为自动进样器）和进样泵作为将样品转移到流路中的备选技术。自动进样器可采用两种不同的设计方案：流通式进样针和固定式样品环。

3.2.1 采用流通式进样针设计的自动进样器

利用流通式进样针可轻松处理各种进样体积，将样品环注满时通常不会损失样品。但是，该设计的缺点是样品环和计量装置的尺寸带来的滞后体积较大。这个不足在分析型与制备型进样模式之间切换时尤其突出。但是，流通式进样针技术便于简化工作流程，且能够避免进样步骤不当引起样品损失。图 3.3 显示了洗脱液流过进样针到达色谱柱的过程。

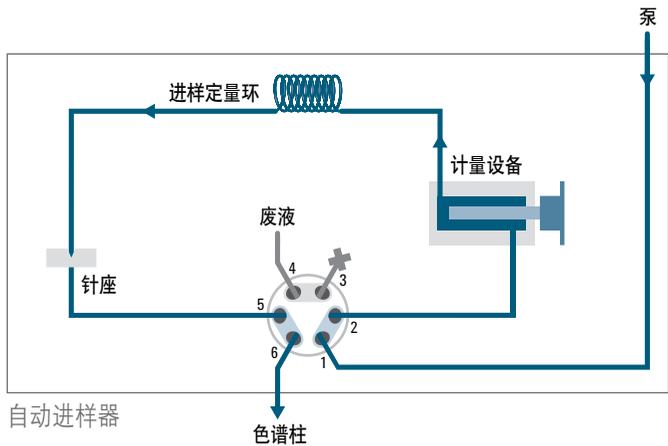


图 3.3 当自动进样器处于冲洗模式时，泵送的洗脱液流过切换阀、计量装置、样品环、进样针和针座，然后再经过阀到达色谱柱

要注入高达数毫升的样品时，可以增加针座与切换阀之间针座毛细管的容量。这一增加的体积可作为缓冲区用于容纳从样品容器中抽取的多份样品，该过程可称为多次抽取方法。提高针座毛细管的体积必然会增加滞后体积。但是，切换为旁路模式即可缓解这个难题，如后续章节所述。

在进样周期开始时，将切换阀移至旁路模式，将泵送的洗脱液直接转移到色谱柱。这样在上样时使计量装置、样品环和进样针不在制备流路中，参见图 3.4。

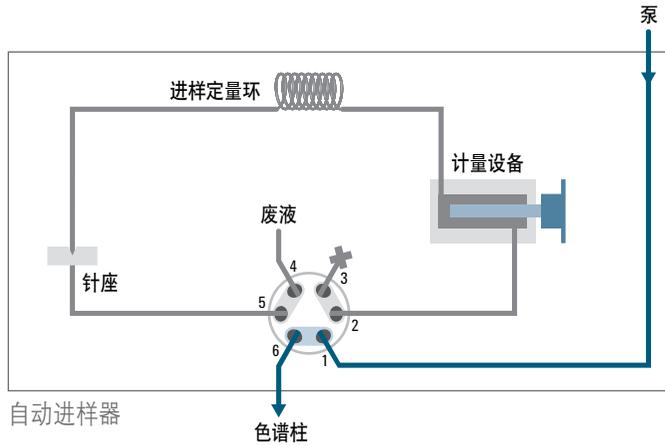


图 3.4 当自动进样器处于旁路模式时，泵送的洗脱液流直接转移到入色谱柱，取样不经过计量装置和进样针

切换到流路之外后，提起进样针，将诸如样品瓶等样品容器置于下方，并将进样针降入样品中。抽回计量装置的柱塞杆，使样品经过进样针进入样品环中，参见图 3.5。

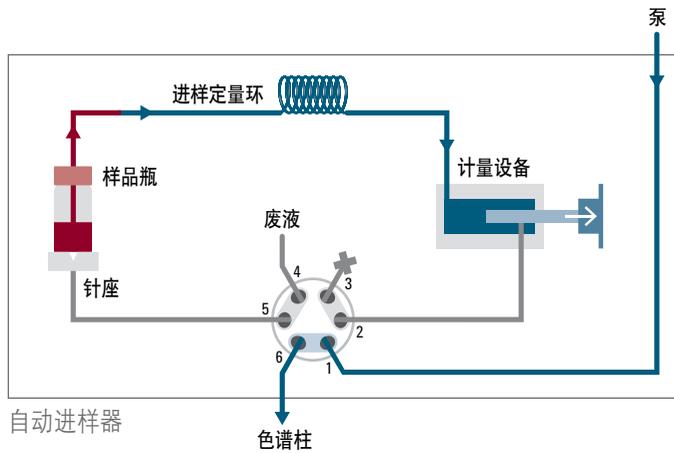


图 3.5 抽取样品，使其经过进样针进入样品环中

向样品环中转移所需量的样品后，将进样针从样品容器中提起，移开容器，并将进样针降至针座上。这时使切换阀返回冲洗模式，将样品从样品环中输送出去，经过进样针到达色谱柱，参见图 3.6。

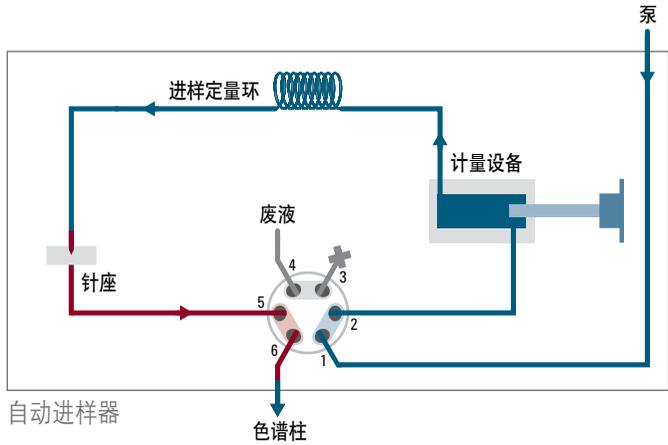


图 3.6 切换回冲洗模式，将样品输送到色谱柱中

为减小滞后体积，我们建议将样品转移到色谱柱后立即返回旁路模式。可以使用程序设定的步骤完成这一操作，而精确计算转移样品所需的时间以免部分样品残留于阀或毛细管中是非常重要的，参见图 3.7。

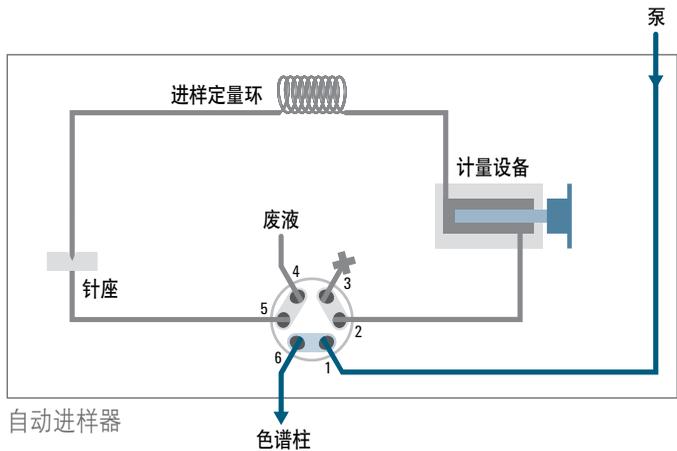


图 3.7 进样后切换至旁路模式以减小滞后体积

3.2.2 采用固定式定量环设计的自动进样器

与要求采用分析级和制备级进样体积的系统（在交替运行模式下）配合使用时，采用流通式进样针设计的自动进样器样品环尺寸将会对滞后体积产生重要影响。具有较大滞后体积的系统在使用分析级流速时将会表现较差。对于这些应用，采用配备两种不同尺寸样品环的固定式定量环自动进样器可以解决这一难题。切换阀用于构建完全分离的分析型流路与制备型流路。但是，要成功应用配备双定量环的这一固定式定量环自动进样器需要考虑若干因素。

图 3.8 显示了双定量环概念在该设置中，上部样品环的体积较大，适合在较高流速下开展制备工作。相比之下，下部进样环的体积较小，适合在较低的流速下进行分析筛选。独立的针座便于单独用样品填充定量环。后续章节对进样周期进行了更详细的介绍。

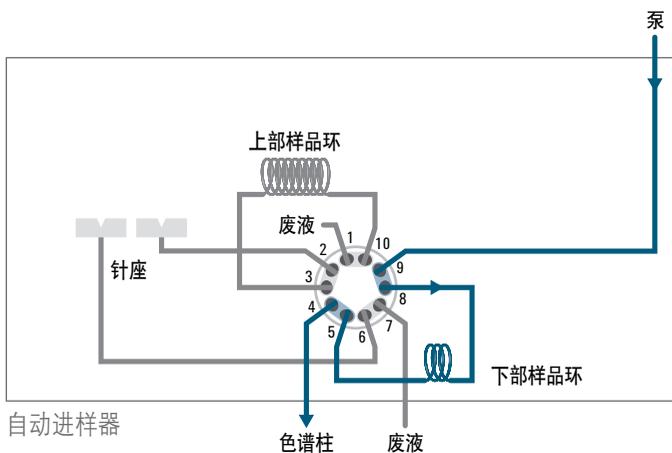


图 3.8 双定量环自动进样器的示意图，显示液流通过下部的小体积样品环（用于分析应用工作）

由于定量环是毛细管系统的组成部分，因此滞后体积将随定量环尺寸的增大而增加。因此，我们建议尽可能减小滞后体积，使其与色谱分离所用的流速达到平衡。一条经验法则是，系统的总死体积与采用的流速之比应当等于或小于 2:1，才可获得合理的色谱性能。

采用固定式定量环自动进样器时，样品环可以部分填充或过量填充，参见图 3.9 和图 3.10。



图 3.9 部分填充样品环



图 3.10 过量填充样品环

部分填充样品环是最常用的方法，而我们推荐不超过样品环容量的 65% 至 70%。进样体积接近样品环容量时，可能导致样品从样品环另一端流出，从而引起样品损失。采用有色样品可以轻松检查是否存在这一问题。

完成准确的定量工作需要使用过量填充或满环进样，我们不推荐采用该技术进行纯化，因为它会损失大量宝贵的样品。要实现准确的分析-级进样，我们推荐采用 2.3 至 5 倍的过量填充因子，用样品彻底清洗样品环。

如本节前文所述，采用双定量环设计的自动进样器非常适合进样体积变化很大的分析型和制备型 LC。双定量环设计能够最大限度减小进样系统的总滞后体积，便于在样品纯化之前以最佳的分离效率完成分析筛选。

图 3.11 显示了处于冲洗模式下的双定量环自动进样器，其中液流通过顶部较大体积的样品环（用于制备型应用工作）对于分析应用，流过较小定量环的流路的用法如上文图 3.8 所示。

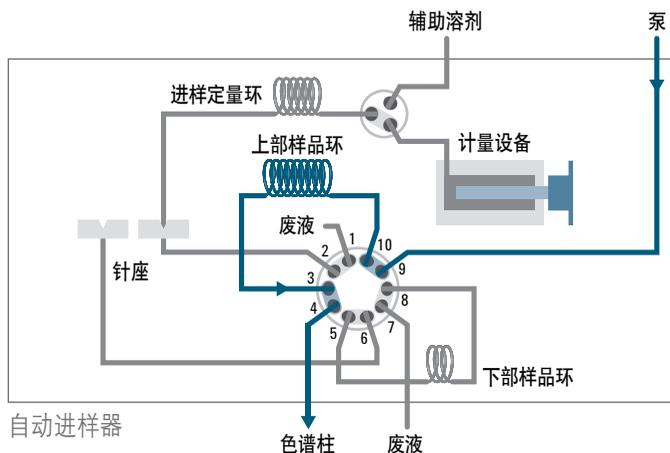


图 3.11 处于冲洗模式下的双定量环自动进样器，显示了经过制备型样品环的液流

在进样周期开始时，将阀切换至旁路模式，使泵送的洗脱液流过分析型样品环。这样将使制备型样品环离开制备取样的流路，参见图 3.12。为确保分析柱正确平衡，建议在下一运行开始时使用洗脱液清洗分析型样品环。

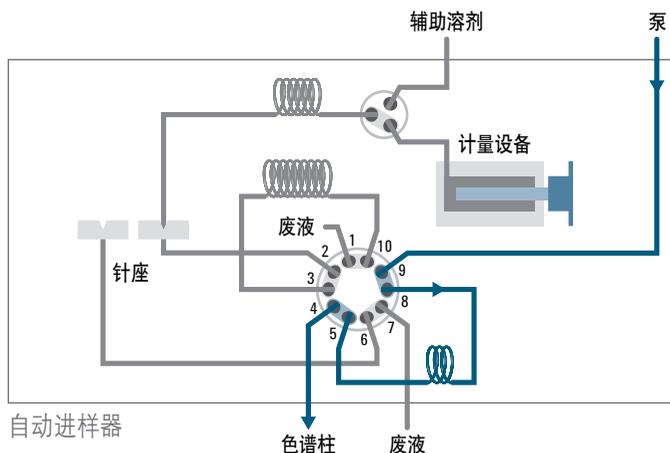


图 3.12 处于旁路模式的双定量环自动进样器，显示液流流过第二个定量环，在这个例子中采用适合分析型进样体积的定量环

提起进样针，将诸如样品瓶等样品容器置于下方，并将进样针降入样品中。抽回计量装置的柱塞杆，使样品经过进样针进入样品样品环中，参见图 3.13。

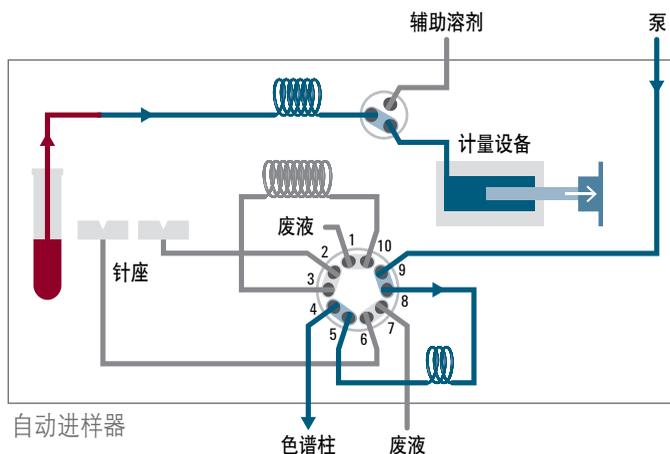


图 3.13 抽取样品，使其经过进样针进入样品环中

向样品环中吸取足量的样品后，将进样针从样品容器中提起，移开容器，并将进样针降至针座上。这时计量装置将把样品推出样品环，经过进样针和针座并进入制备型样品环，参见图 3.14。

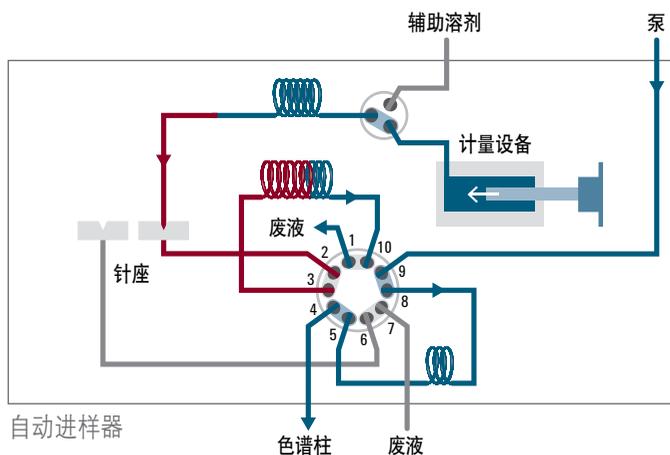


图 3.14 将样品推入制备型样品环中

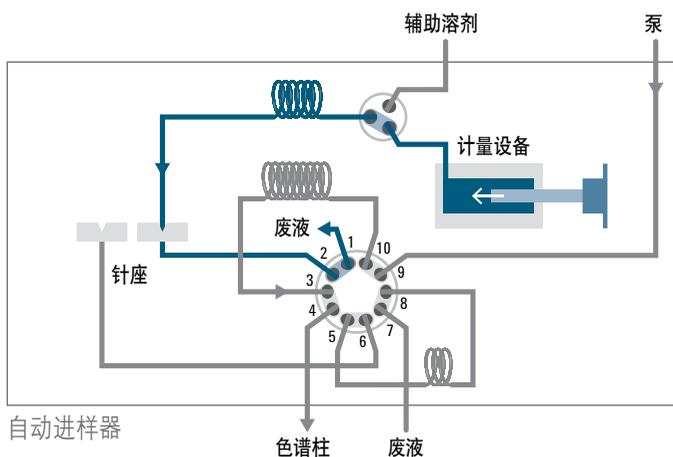


图 3.16 冲洗缓冲环和针座毛细管以避免交叉污染

3.2.3 特殊进样技术

化合物溶解性、样品制备和储存条件通常要求使用所需溶剂以外的其他溶剂作为洗脱液以获得最佳的色谱性能。在这些情况下，必须开发特殊的样品进样技术。

3.2.3.1 夹层式样品

在样品接触流动相后容易发生沉淀的情况下，可以采用该进样技术。其可能有助于避免堵塞进样器的进样针和毛细管。通过对自动进样器进行程序设定，样品可嵌入或夹在两个溶剂插入液之间以免在样品环中发生沉淀，参见图 3.17。可采用 DMSO 或与水不混溶的溶剂。对于分析进样，注入的 DMSO 体积必须尽可能地小。建议使用两种 5 μL 插入液。作为制备进样体积的一条经验法则，建议插入液的总体积大约占总进样体积的 10%。使用二氯甲烷作为夹层溶剂可获得良好的结果。

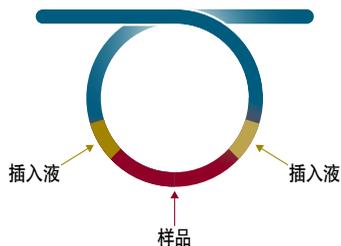


图 3.17 在样品两侧使用适当溶剂作为插入液的夹层式进样的轮廓图，该进样方式可避免样品在样品环或连接毛细管中发生沉淀

3.2.3.2 强有机溶剂的大体积进样

有机合成得到的大多数化合物在 DMSO 或 DMF 中都具有良好的溶解性。这些溶剂具有良好的溶解能力，但也具有较高的洗脱强度，可能影响色谱分离效果。当待分离的化合物具有相对较高的极性并因此具有较低的保留特性时，这种情况尤其显著。

色谱柱规格 (内径×长度, 单位为 mm)	2.1×150	4.6×150	9.4×150	21×150	30×150	50×150
推荐的进样体积 [μL]	2	10	100	500	1000	2000
最大进样体积 [μL]	5	20	200	1000	2000	3000

表 3.1 推荐的强溶剂进样体积。超出最大进样体积时，色谱性能将受到严重影响。部分样品可能会随着或作为部分初始溶剂峰被洗脱出来

如果所需的体积需要超出特定色谱柱尺寸的最大进样体积，则建议注入溶于纯有机溶剂的样品，然后在色谱柱之前直接用水性溶剂进行稀释（称为柱上稀释进样模式）。要采用这种方式进样，需要在流路中紧邻色谱柱之前增加简单的 T 形管。要注入溶于纯有机溶剂的样品，需要使用 B 通道以总流量 5% 至 10% 的流速进行输送。通过 A 通道输送剩余比例的水（总流量的 90% 至 95%），并通过 T 形管添加。利用两个 T 形管和一个切换阀便于注入大体积的强有机溶剂且不会造成样品发生沉淀，参见图 3.18。

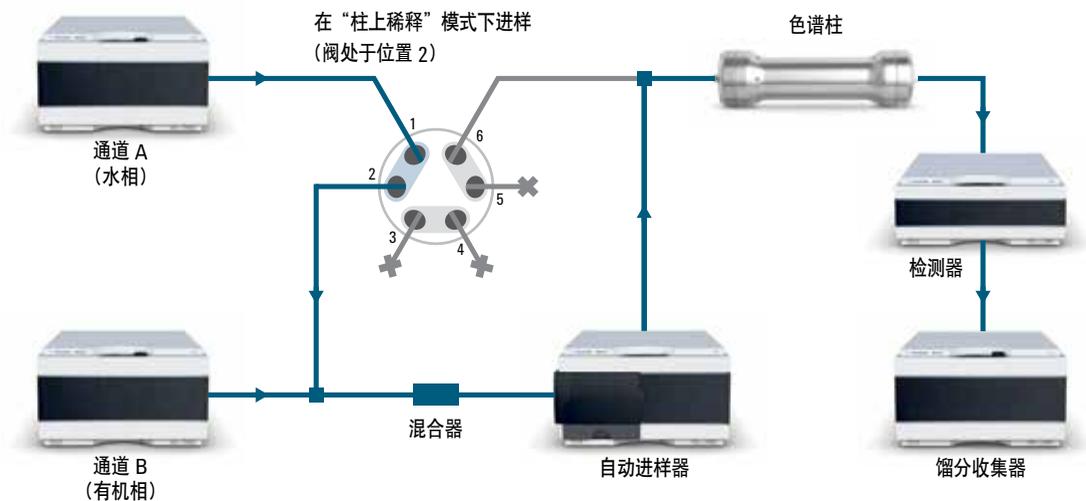
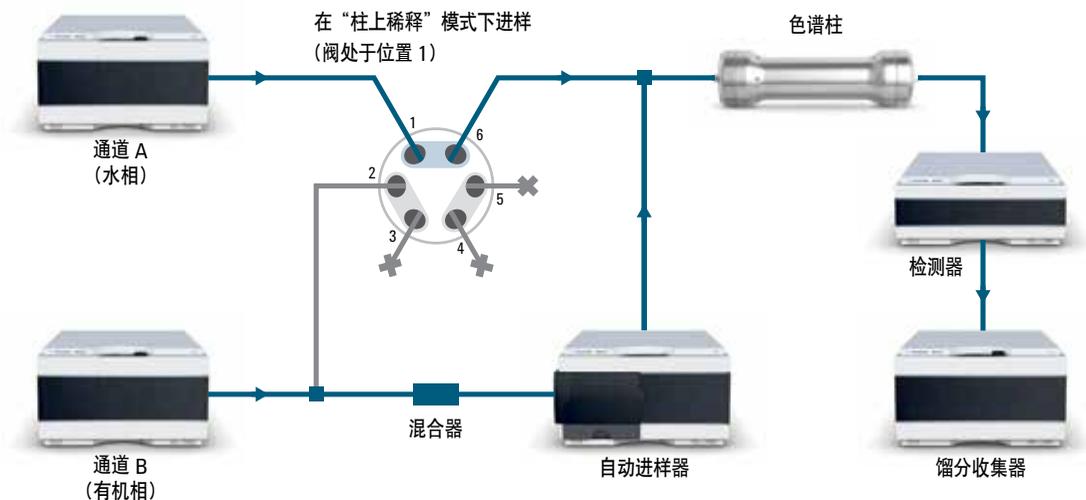


图 3.18 不同进样模式下的系统配置示意图。阀处于位置 1 时，由 B 通道泵输送溶于纯有机溶剂中的样品。阀处于位置 2 时，溶剂 A 和 B 在通过进样器之前混合。该模式可以称作“正常”进样模式。

采用如图 3.18 所示的配置时，保持混合点（T 形管）与色谱柱之间的距离尽可能短对于避免样品沉淀是至关重要的。

进样后，建议在样品转移到色谱柱上之前保持洗脱液组成不变（等度保持）。增加一个采用较低 %B 的等度保持步骤可以将有机溶剂冲洗干净。这时可以提高梯度，将化合物从色谱柱上洗脱下来。该方法还可减少注入大体积的高粘性样品溶液后产生压力波动。加载过程极其平稳，延长了色谱柱使用寿命，同时增加了柱负荷以及色谱分离度。

但是，对于非极性化合物，使用所述的进样模式时经常会出现较差的峰形。采用如图 3.18 所示的配置时，可以在两种不同的进样模式之间进行切换。当化合物为高度非极性且可能容易沉淀时，采用夹层式进样尤其会获得良好的结果。

图 3.19 显示在标准进样模式下采用大样品体积和强洗脱液得到的色谱图。峰形严重变形表明发生了样品损失。相比之下，使用另一种柱上稀释进样模式时，极性化合物聚焦于柱上，不会发生样品损失，参见图 3.20。

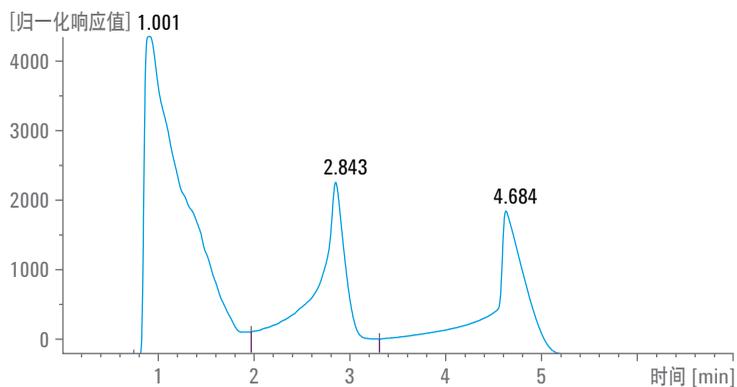


图 3.19 在标准进样模式下，采用大体积进样并使用强洗脱液。色谱图显示 2.84 分钟和 4.68 分钟处的化合物峰形严重变形。1.00 分钟处的溶剂峰中包含穿透的样品，表明样品发生损失

样品： 50 mg 乙酰氨基酚和 50 mg 咖啡因溶于 5000 μ L DMSO 中

色谱柱： Agilent ZORBAX SB C18 柱，21.1 \times 150 mm，5 μ m

标准进样模式下采用的梯度曲线：

时间	流速	%A	%B
0	37	93	7
0.6	37	93	7
6.0	37	78	22
6.1	37	2	98
9.0	37	2	98
9.1	37	93	7
14	37	93	7

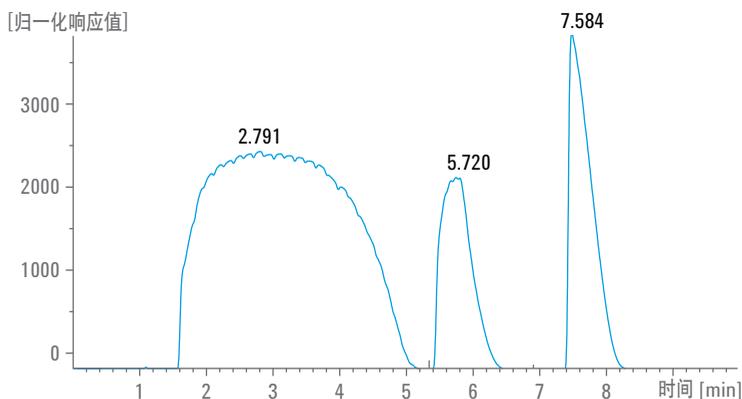


图 3.20 使用另一种进样模式时，采用大体积进样并使用强洗脱液。除非将 DMSO 冲洗出色谱柱，否则会获得宽溶剂峰。5.72 分钟和 7.58 分钟处的两种化合物保留在柱上并作为基线分离峰洗脱下来。未发现样品损失

样品：50 mg 乙酰氨基酚和 50 mg 咖啡因溶于 5000 μ L DMSO 中

色谱柱：Agilent ZORBAX SB C18 柱，21.1 \times 150 mm，5 μ m

夹层式进样模式所采用的梯度曲线，需要较长的等度保持步骤以提高梯度之前将样品转移到色谱柱上：

时间	流速	%A	%B
0	37	93	7
4.0	37	93	7
10.0	37	78	22
10.1	37	2	98
13.0	37	2	98
13.1	37	93	7
16.0	37	93	7

3.2.3.3 使用进样泵实现大体积样品的进样

要分离以水性溶剂高度稀释的样品，通常需要采用超出典型自动进样器样品环尺寸的大进样体积。在这些情况下，可以使用进样泵将样品载入色谱柱。进样泵还可用于诸如对映异构体分离等应用。此时，必须定期加载同一种样品溶液，进样泵比自动进样器能够更快实现这一目标。待样品转移到色谱柱上之后，需要彻底进样进样泵、取样和进样阀以及所有的连接毛细管，以免发生样品交叉污染。图 3.21 显示了使用进样泵进样的典型系统配置。

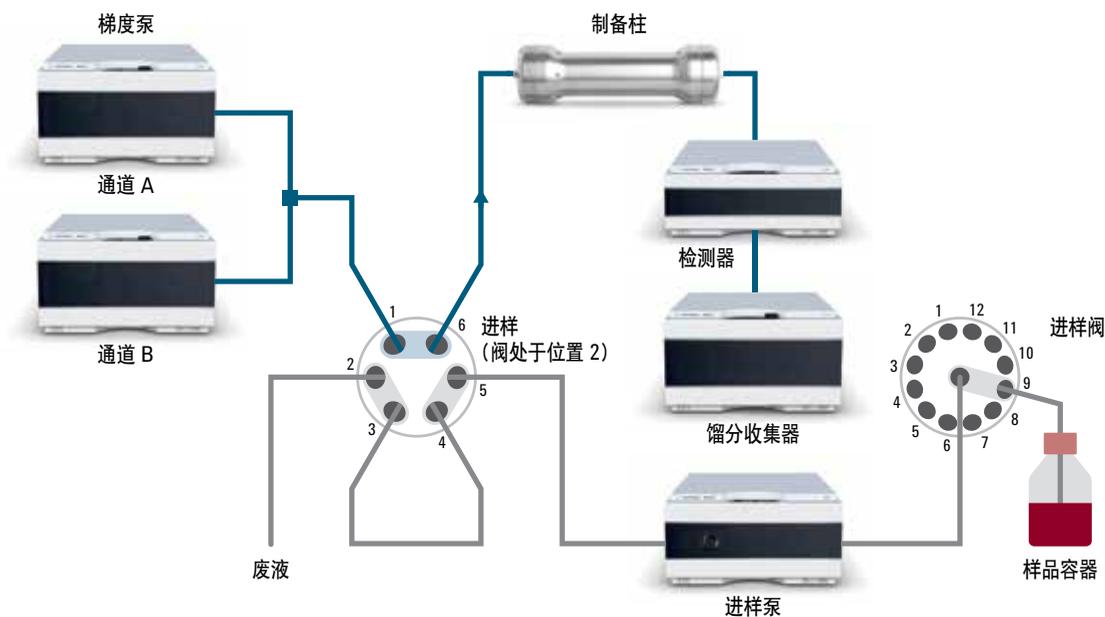
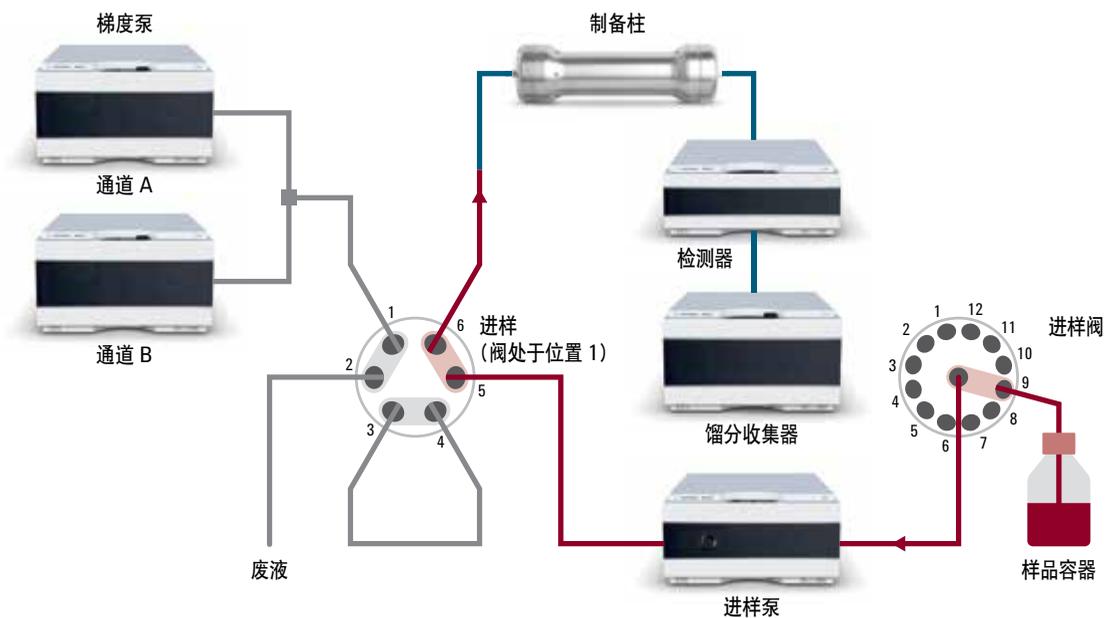


图 3.21 使用进样泵进样的典型系统配置示意图。阀处于位置 1 时，进样泵从容器中吸取样品并输送至色谱柱。在洗脱时，阀切换至位置 2，从而使 A 通道与 B 通道相结合，得到所需的洗脱液组成以实现化合物分离

3.3 分流

在制备型 LC 中使用破坏性检测器时，需要使用分流器将大部分洗脱液分流到收集装置中。分流器还可在检测器的流通池不适用于高流速时将流速降至分析范围以内。分流方法与补偿流相结合还可保证获得大部分纯化合物，而额外的溶剂可防止高浓度化合物在检测器的流通池中达到饱和。可采用其他设计达到基本类似的目的。

3.3.1 T 形管分流

使用 T 形管是一种简单、廉价的分流方法，参见图 3.22。单个 T 形管分流器用于低流速下，能够与分析柱结合使用以（例如）连接液相色谱系统与破坏性检测器（例如基于质量或蒸发光散射检测器）。利用该方法可获得包含目标化合物的大部分洗脱液。

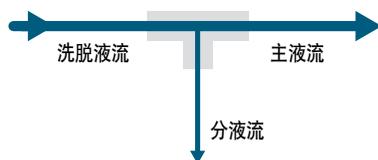


图 3.22 T 形管分流器 — 分流比由出口毛细管规格所产生的背压进行调节

分流比取决于主液流与分流流出口的背压比，必须通过实验调节以满足应用需求。使用不同长度和内径的毛细管会改变背压比，从而改变分流比。

3.3.2 双 T 形管分流

使用典型的半制备柱时，化合物以及缓冲液的浓度通常过高，无法通过单个 T 形分流器直接引入质量选择检测器。在这些情况下，需要用补偿溶剂稀释分流流，参见图 3.23。补偿溶剂支持电喷雾离子化，可保证化合物稳定而快速地从分流点输送到检测器。质量选择、蒸发光散射和示差折光检测器用于制备应用时均需要补偿溶剂。

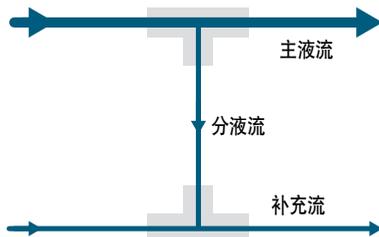


图 3.23 双 T 形管分流器 — 在特殊检测技术需要补偿流的情况下使用。分流比由背压进行调节

在双 T 形管中，分流比取决于多个参数，其主要取决于主液流与补偿流之间的压力差。通常基于使用不同限流器实现不同流速的实验将压力差值设置为 6 bar (90 psi)。在此压力下，分流器还可用于梯度模式，其中主液流的压力随溶剂组成的粘度而改变。市售分流器的分流比通过不同直径和长度的分流毛细管预设好。某些分流器具有额外的针阀，可进一步调节压力比。获得的分流比仅为估计值而非实际值。但是，使用这些 T 形管能够实时获得真实的分流效果，不会损失任何信息。

3.3.3 主动式分流

主动式分流器是能够将少量液体从主液流中机械转移到分流液流中的装置，通常是阀门，参见图 3.24。

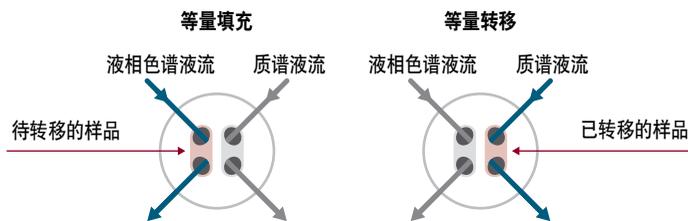


图 3.24 主动式分流器的示意图，显示了阀的填充和转移位置

分流比取决于阀的切换频率、凹槽的体积和采用的液相色谱流速，参见公式 3.1。

$$\text{分流比} = \frac{\text{液相色谱流速 } [\mu\text{L}/\text{min}] / \text{阀槽的体积 } [\mu\text{L}]}{\text{切换频率 } [\text{Hz}] \times 60}$$

公式 3.1 计算主动式分流器的分流比

可通过软件选择纳升级别的不同凹槽体积，以适合所用的流速。

通常，采用 1 Hz 的切换频率可获得良好的结果。补偿流速是影响信号强度以及分流点与检测器之间延迟时间的重要影响因素。某些质量选择检测器在较高流速下的灵敏度可能很低，但另外一些检测器则适用于 1 mL/min 以上的流速条件。

通过仅在需要收集馏分时才启用分流操作能够延长分流器中转子密封垫的使用寿命。在色谱柱清洗和平衡以及进样周期中可以停用分流器并将液体分流入废液瓶，从而延长预防性维护的间隔。

3.4 检测

液相色谱中最常用的检测技术是基于紫外 (UV) 和可见光的吸光度。以固定波长进行检测是最经济的方法。对于分析筛选，采用光电二极管阵列检测器（称为二极管阵列检测器 (DAD)）是更安全的选择，因为采集的光谱信息可用于确证化合物鉴定结果、测定峰纯度并选择后续纯化工艺中的最佳检测波长。图 3.25 显示了二极管阵列检测器的光学系统。



图 3.25 二极管阵列检测器的光学系统

二极管阵列检测器可提供 UV 和可见光范围内的完整光谱图。所有波长的采样频率可以高达 240 Hz，且不会损失灵敏度。对于大多数制备型应用而言，采用 20 Hz 的数据采集速率即可获得良好的结果。如果目标化合物具有完全不同的光谱，在二极管阵列检测器上设置较宽的带宽将有利于在一张色谱图中监测整个 UV 吸收范围。例如，将检测波长设置为 420 nm，带宽设置为 400 nm，能够分析具有不同紫外光谱的染料，如图 3.26 所示。在这个例子中，采用 220 至 620 nm 的连续谱带能够检测具有不同的最大吸光度的化合物并将其显示在一张色谱图中，而采用特定波长与较小的带宽相结合将选择性显示化合物。

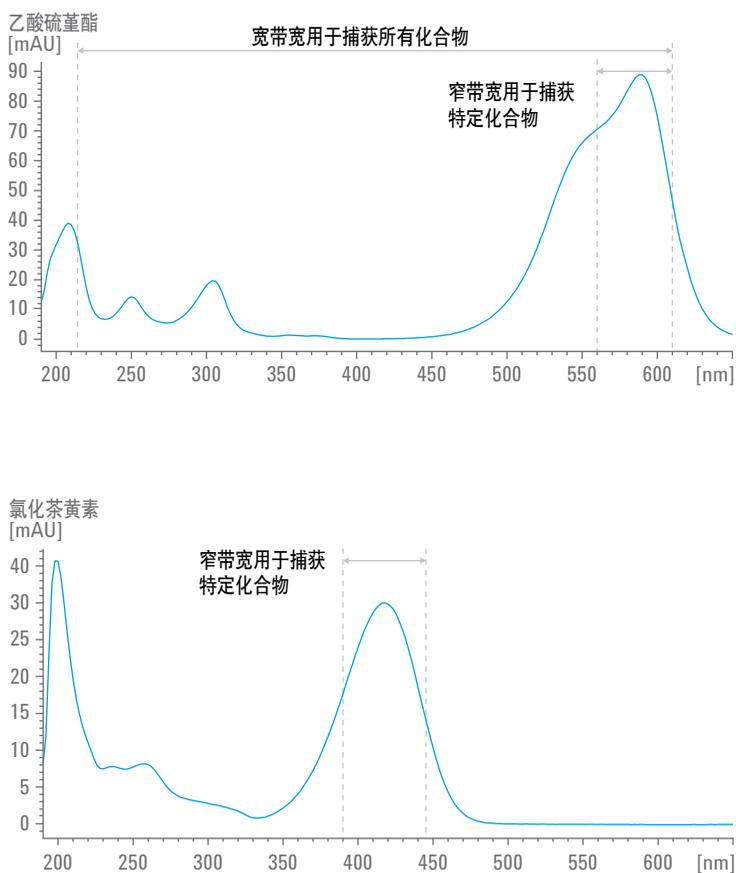


图 3.26 具有不同紫外光谱的两种化合物。使用较宽的带宽进行数据采集有利于在一张色谱图中监测这些不同的化合物。而使用较小的带宽则只能选择性监测其中一种化合物

3.4.1 匹配浓度范围与动态范围

样品浓度的差异可能很大，这对检测器的光学设计提出了很高的要求。分析筛选过程中应当能够观察到杂质（即使它们具有较低的吸收系数）。相比之下，高纯度和高柱负荷的目标化合物可能具有极高的纯度。

根据朗伯-比尔定律（见公式 3.2），按浓度范围使用的最重要参数是流通池的光程。

$$A = \epsilon_{\lambda}cd$$

公式 3.2 朗伯-比尔定律

A	吸光度
ϵ_{λ}	摩尔消光系数
c	浓度 [mol/L]
d	光程 [cm]

在分析工作中，通常使用 10 mm 的光程。但是在分析筛选中，样品浓度通常远高于分析工作。在这些情况下，一开始最好使用 1 到 3 mm 光程的流通池。利用内径 21 mm 的色谱柱开展半制备工作时，可采用 0.3 mm 的光程。在更大内径的色谱柱上以更高流速加载更多样品量时，建议使用 0.06 mm 的光程。

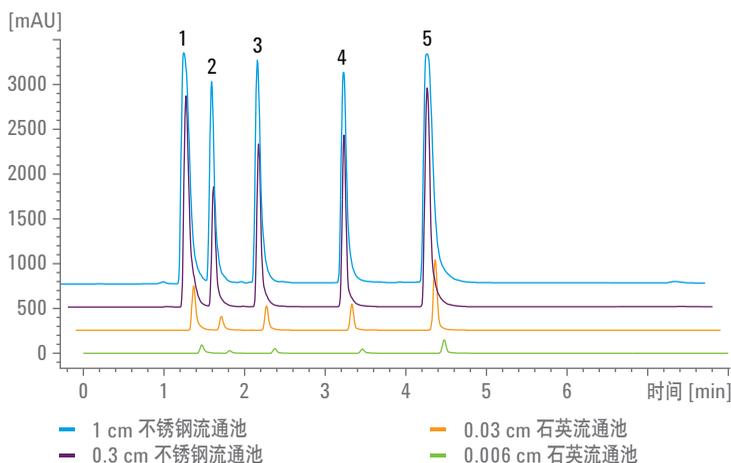


图 3.27 采用光程较短的流通池会减小峰面积。

1 咖啡因, 2 扑米酮, 3 非那西汀, 4 扁桃酸苄酯, 5 联苯

增加动态范围的另一种方法是在一个或两个检测器中使用不同长度的两种光程同时测量紫外吸收度。在低浓度下，采集较长光程的信号。当信号达到测量二极管的饱和度时，系统使用较短光程的信号。该组合能够将检测的动态范围扩展至少一个数量级。图 3.28 显示了双光程流通池的剖视示意图。

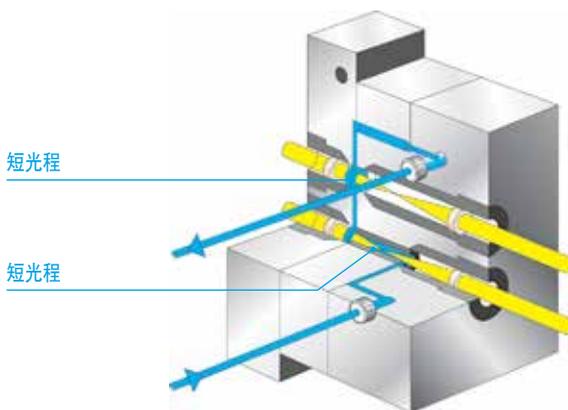


图 3.28 双光程流通池的示意图

3.5 馏分收集

增加馏分收集器将洗脱液收集到各个收集容器中，这是分析型与制备型液相色谱系统之间的差别，而与流速或泵容量无关。在手动控制馏分收集过程中，操作者需要确定开始和停止收集的合适时机。基于时间的收集可确保在整个运行过程中收集到所有相关的馏分。通常，该方法的工作负荷较高，因为收集到的大量馏分有待分析和处理。另外，在同一样品瓶中收集不同色谱峰对应的化合物时，意味着馏分不纯。基于选择性检测触发馏分收集有助于减少待处理的馏分数量，从而提高实验室的效率。

在多用户环境中，需要在一套系统中配置多个馏分收集器，各个馏分收集器可分配给不同用户使用。馏分收集器通过多用阀连接到一起并形成由软件控制的簇。当第一个馏分收集器超出其容量时，多用阀将自动切换流路中的液体进入下一个可用的馏分收集器（如果需要）。

3.5.1 手动收集馏分

如果样品具有特殊价值或特性未知行为，则由操作者单独进行控制通常是一种优选的方法。包含在线信号图的图形化用户界面使操作者轻点鼠标即可控制馏分收集过程。

3.5.2 基于时间收集馏分

按时间片段进行馏分收集是一种简单的收集模式。在该模式下，定期收集馏分，参见图 3.29。该收集模式通常应用于纯化复杂混合物，例如植物提取物中的天然化合物。

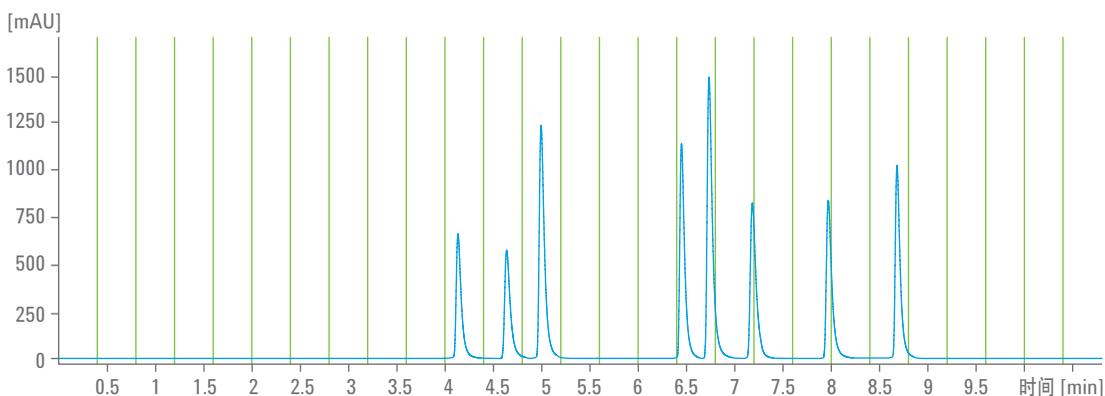


图 3.29 基于时间的馏分收集的馏分预览。每 0.40 分钟收集一种新馏分

3.5.3 基于紫外检测收集馏分

使用基于色谱峰的馏分收集时，将根据斜率或阈值设置或两者组合从紫外检测器或其他检测器（例如蒸发光散射 (ELS) 检测器等）收集化合物。当信号超出阈值时，馏分收集器将开始收集。为避免在梯度斜率中基线上升引起假阳性触发，可以在阈值触发器中引入第二个参数（称作斜率识别）。

在纯化实际样品前，可通过将之前采集的制备色谱图载入到馏分预览工具中来设置收集参数，该色谱图中应包含浓度接近随后所用浓度的标准化合物。参见图 3.30，其中显示了色谱图，可交互式设置馏分收集参数。

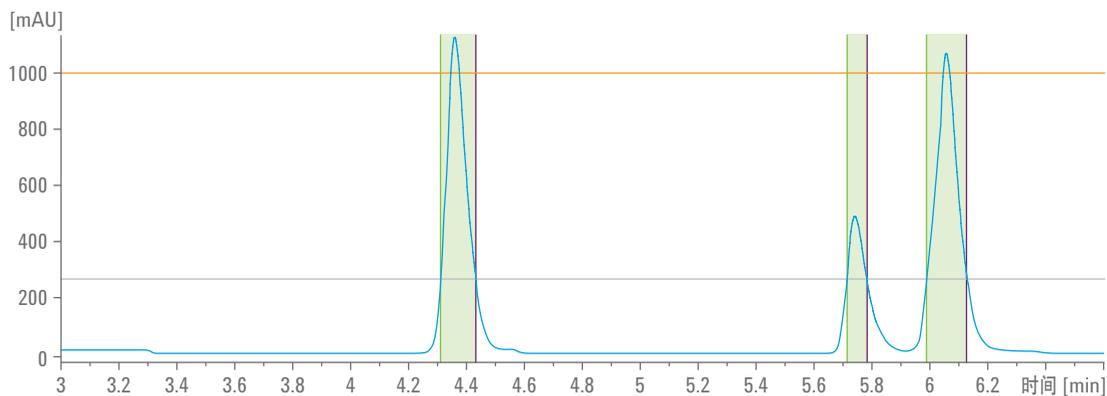


图 3.30 馏分预览工具 — 交互式设置触发阈值和斜率参数

3.5.3.1 设置阈值

如果信号强度高于阈值，将启动馏分收集。当信号低于阈值时，停止馏分收集，参见图 3.31。

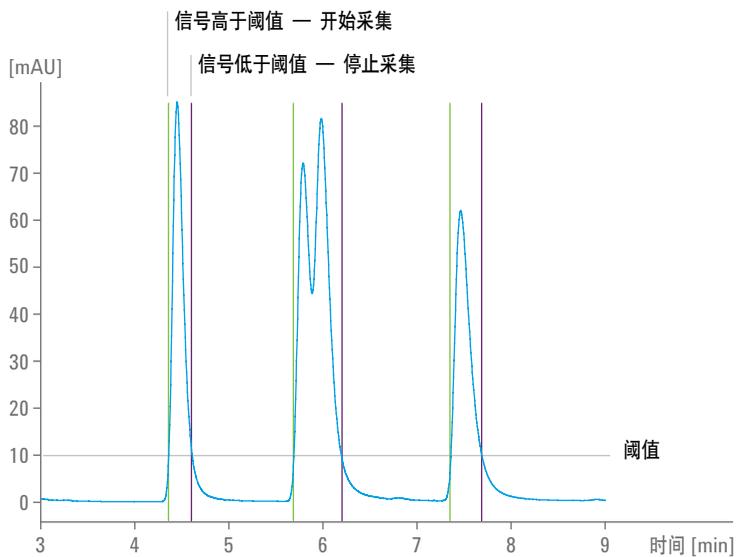


图 3.31 馏分收集由阈值设置触发

3.5.3.2 设置斜率参数

色谱图的斜率可作为一阶导数进行计算。它是一个合适的洗脱峰指示参数。获得的信号从基线处开始升高直至达到洗脱峰的第一个拐点。沿色谱峰曲线向前，一阶导数变为负值。在色谱峰的第二个拐点之后，一阶导数达到其初始值，参见图 3.32。

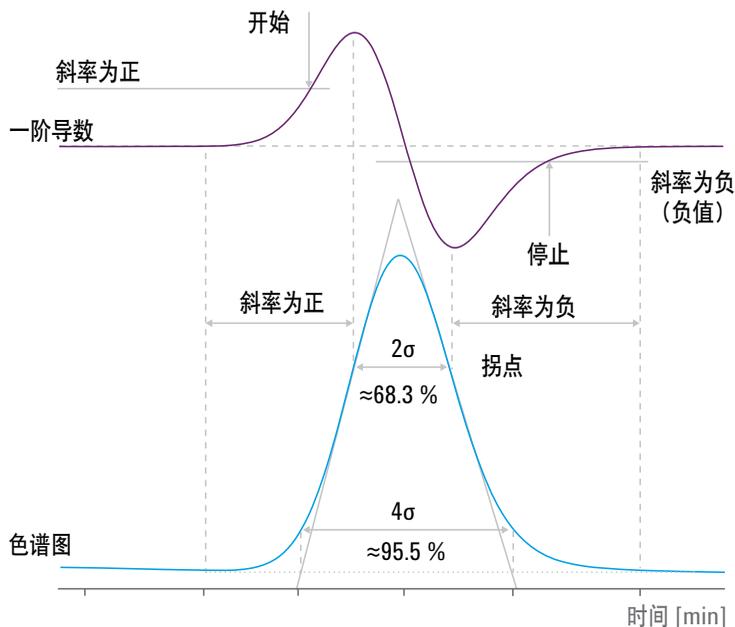


图 3.32 使用色谱图的一阶导数进行斜率识别

馏分收集的正斜率和负斜率设置可避免由于溶剂梯度引起基线缓慢上升（基线漂移）时发生假阳性触发。另外，这些设置有助于分离非基线分离的色谱峰。

3.5.3.3 设置阈值上限

当上样量较高或吸收系数较高时，检测器电子元件会达到饱和，产生可能存在信号波动的平头峰。这一现象会造成这些波动可能是其他色谱峰的假象并导致馏分收集器正斜率和负斜率算法触发其他馏分的收集。阈值上限可避免检测器发生此类触发，除非体积超出馏分收集容器的容量。通常，将阈值上限设置为发生饱和前最大信号强度的大约 90%。如果检测器信号始终会达到饱和限值，则建议减小光程长度并换用较短的流通池以启用基于色谱峰的馏分收集。减少进样量是另一个选择。

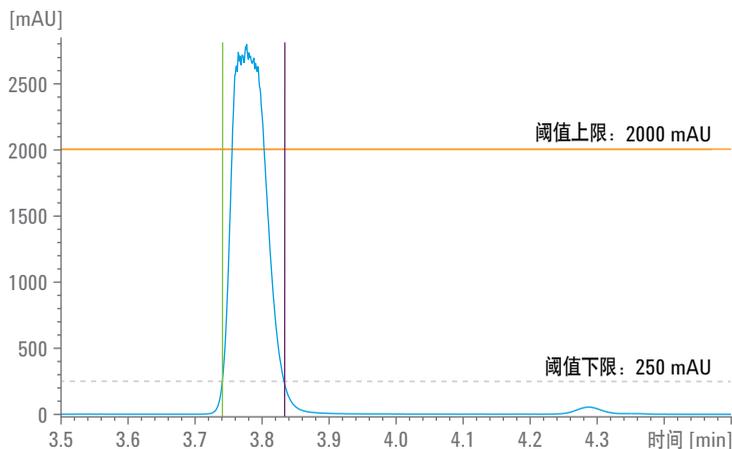


图 3.33 阈值上限可避免发生检测器饱和时产生的虚假信号波动触发馏分收集

3.5.4 基于蒸发光散射检测收集馏分⁷

目标化合物能够吸收紫外或可见光是使用二极管阵列或其他紫外检测器的前提条件。如果目标化合物中不含任何发色团结构，则蒸发光反射 (ELS) 检测可作为另一种解决方案。已证实，ELS 检测是紫外吸收检测的一种非常重要的补充技术，其尤其适合检测未知的混合物，例如天然产物提取物、多肽、脂质、油类或其他脂肪族化合物。与质谱联用时，ELS 检测甚至可成功应用于目标化合物离子化受到抑制或难以实现的情况下。

洗脱液蒸发时将发生光散射，溶质在理想情况下会形成颗粒或液滴而残余溶剂则处于干气流中。通过分流在馏分收集器与 ELS 检测器之间的柱流出物，可以在分流大部分样品进行收集的同时满足 ELS 检测器动态范围的要求，参见第 3.3 节“分流”。

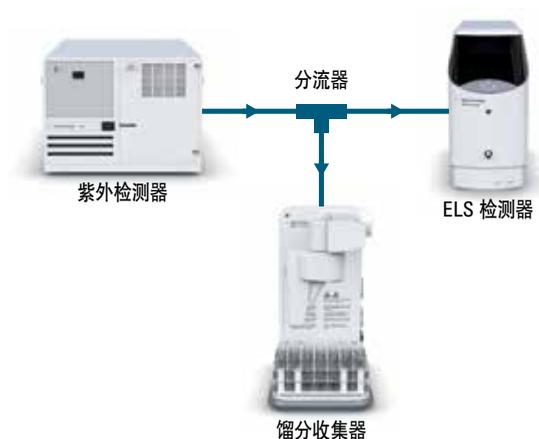


图 3.34 使用补充性检测技术时，简单 T 形分流器的示意图

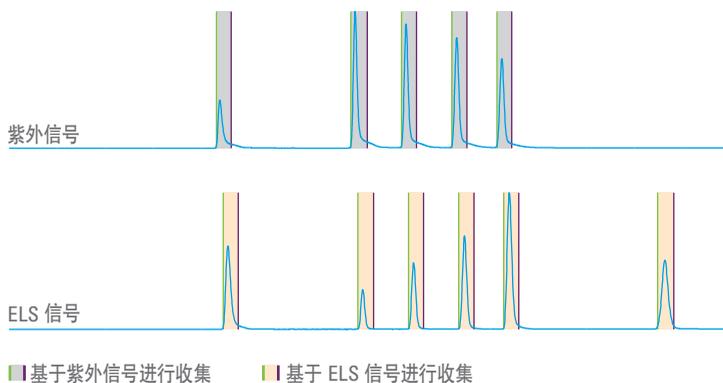


图 3.35 基于 UV 和 ELS 的馏分收集。在两个色谱峰检测器上均触发收集。灰色区域代表由紫外检测器收集的馏分，橙色区域代表由 ELS 检测器收集的馏分。绿色和红色刻度标记代表收集的开始和结束

3.5.5 馏分延迟

可以处理紫外检测器的信号，确定是将流出物分流到收集容器还是分流到废液瓶。当潜在的馏分在检测器流通池出口与馏分收集器的分流阀之间的管路中传输时，对检测器信号进行处理。该管路的死体积必须足够大，才可在分流阀切换至所需位置之前保留目标峰所对应的化合物。所需的时间取决于检测器的响应时间、流速以及检测器与馏分收集器之间的死体积。图 3.36 显示了馏分收集器的功能组件。

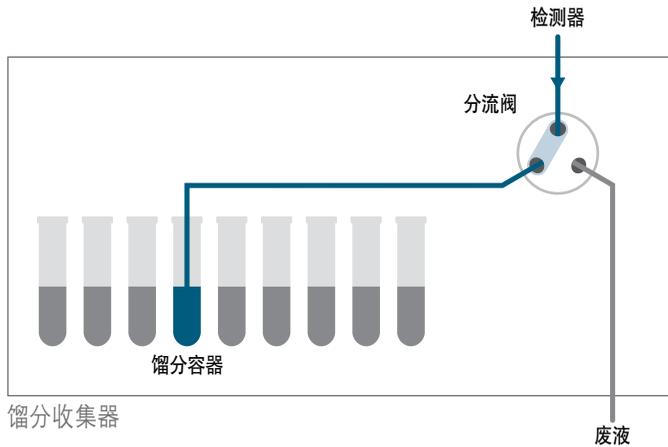


图 3.36 馏分收集器的示意图，显示了基本的功能组件

3.5.5.1 馏分延迟传感器

要测定检测器流通池与分流阀之间色谱峰的精确延迟时间，安捷伦馏分收集器中可配备馏分延迟传感器。在校准过程中，该装置会测量色谱峰所对应的化合物从检测器传输到延迟传感器所需的时间，该延迟传感器位于邻近分流阀的位置。通过溶剂输送系统所采用的流速反馈将测得的时间差转换为延迟体积。延迟体积值保存在馏分收集器的固件中，以便将来使用不同流速时计算延迟时间。只要管路保持不变，就无需重复校准延迟时间。

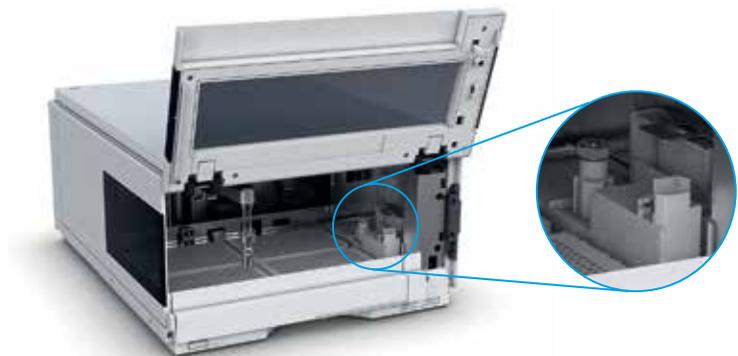


图 3.37 Agilent 1260 Infinity 制备型馏分收集器中馏分延迟传感器的位置

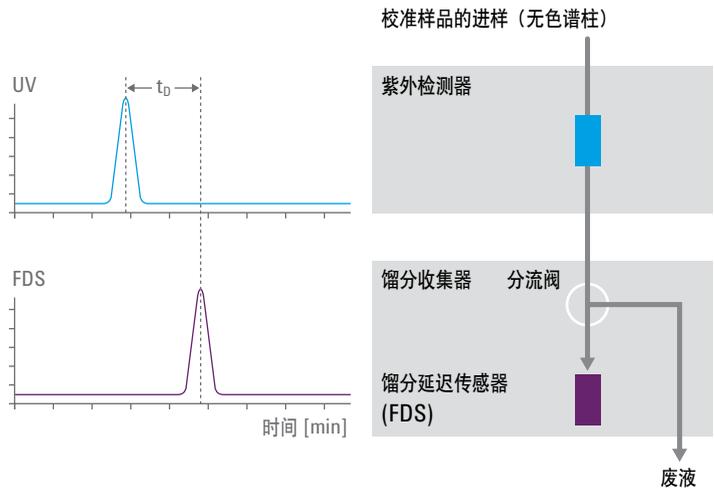


图 3.38 检测器与馏分延迟传感器之间的时间差。在校准过程中，由软件自动计算延迟体积

3.5.6 基于质量选择性检测 收集馏分

基于质量的馏分触发可显著提高纯化工作流程的效率，该方法适用于每天的样品数量及收集的馏分数量不再能被处理的情况下。使用质量选择性触发时，会大大减少收集的馏分数量。可瞬间完成对收集到的化合物的确切表征。换言之，无需采集所有收集到的馏分样品并将其提交到单独的液/质联用系统中进行鉴定。

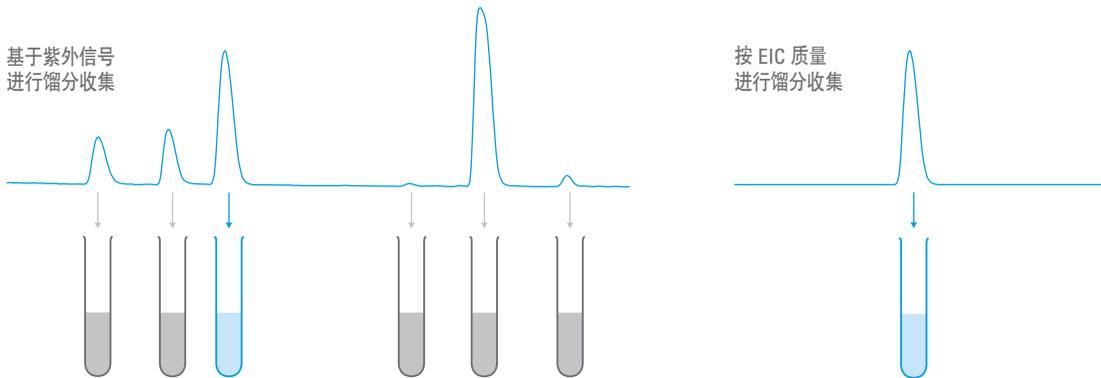


图 3.39 基于质量的纯化是一种选择性方法，相比于基于紫外的收集能够减少收集到的馏分数量

常见的做法是将非选择性紫外检测器与选择性质谱检测器的信号结合起来触发馏分收集。采用布尔 AND 逻辑算符可确保获得极高的纯度。作为主要信号的紫外信号比质量信号的分离度更高。因此，使用更好解决的信号控制馏分触发时将提高所收集的馏分的纯度。质量信号有助于增加选择性因子。

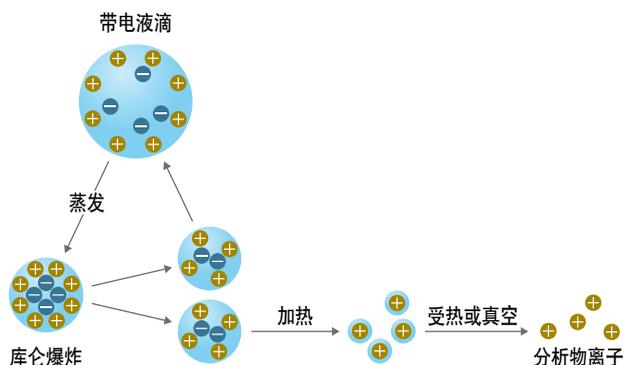


图 3.40 电喷雾离子化过程溶剂蒸发后，液滴内部的电荷密度将会增加，直至自由离子被喷入气相中。影响离子化过程的因素包括必须蒸发的洗脱液的体积以及液滴内部抑制离子化过程的缓冲液或基质化合物的浓度

目标化合物的质量可以从分析 LC/MS 结果中获得或根据合成计划进行预测。这样能够用质量选择性 (MS) 检测器触发馏分收集，获得无与伦比的工作效率。除非存在多种异构体并在不同时间洗脱下来，否则该方法只能得到非常有限的几种馏分（如果不是单一馏分的话）。分析馏分纯度和集中馏分比较容易。但是，必须确保在色谱条件下目标化合物发生离子化，从而使质量选择性检测器可以检测到目标离子。使用单一同位素（而非平均）的质量对于获得成功至关重要。软件应当允许输入总和公式及加合物信息。目标质量与加合离子之和等于触发离子，MS 检测器利用该触发离子触发馏分收集。当 UV 或 ELS 检测器与 MS 检测器结合使用时，检测器信号的同步过程中必须考虑延迟时间。在这种情况下，馏分延迟传感器可测量不同的延迟体积并确保获得最高纯度和回收率。

图 3.41 显示了 UV 和 MS 检测器之间的时间差，以及馏分延迟传感器。MS 触发的延迟时间由软件工具在校准过程中进行计算。主流流的一小份被分流器分流并被补偿溶剂稀释。如果补偿流速超过 0.5 mL/min，可能需要在 MS 进样口之前安装另一个 T 形管才可保持离子源的流速接近 0.5 mL/min，因为过高的流速将导致检测器的灵敏度下降。离子化过程取决于所用的补偿溶剂。通常，APCI 离子源可以使用 95% 乙腈、4.9% 水和 0.1% 甲酸的混合液或者 75% 甲醇、20% 乙腈、4.9% 水和 0.1% 甲酸的混合液。

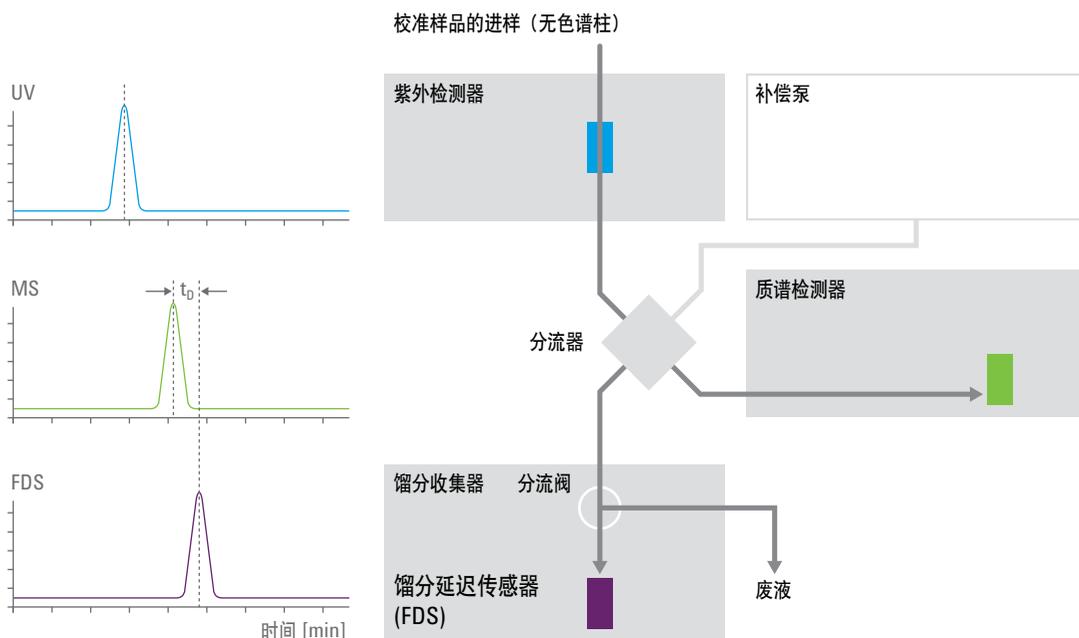


图 3.41 UV 和 MS 检测器之间的时间差，以及馏分延迟传感器

生成负电荷离子还是正电荷离子属于分子自身的特性。如果化合物为碱性，则可能发生质子化。因此，优先生成正离子。如果化合物具有一些酸性基团，则更容易发生去质子化。在这种情况下，优先生成负离子。另外，所用的缓冲液强度也会影响离子化模式。使用低浓度甲酸或乙酸时，两种离子化模式共存。极强的改性剂（例如三氟乙酸 (TFA)）会抑制负离子化，也会影响正离子化，因为化合物自身会形成离子对。

在诸如水和甲醇等溶剂中形成离子非常高效。溶剂的极性越小，则离子化过程的效率越低。特别地，正相溶剂（例如己烷或乙酸乙酯）在电喷雾模式下不支持化合物离子化。柱后补偿溶剂可解决这个问题。例如，含 0.1% 甲酸改性剂的异丙醇与甲醇的混合液 (1:1) 或者含 0.1% 甲酸改性剂的二氯甲烷与甲醇的混合液 (1:1) 能够与各种非极性溶剂混溶并在溶液中形成预定的离子。

然而，常见的做法仍然是在 LC/MS 中仅使用正离子模式，尽管该模式由于质子亲和力低而存在无法检测大量化合物的风险。

为实现最高效的离子化过程，建议在正离子模式和负离子模式下交替进行离子化（不使用三氟乙酸作为缓冲液）。在这种情况下，可以获得互补的、更可靠的样品信息，如图 3.42 所示。

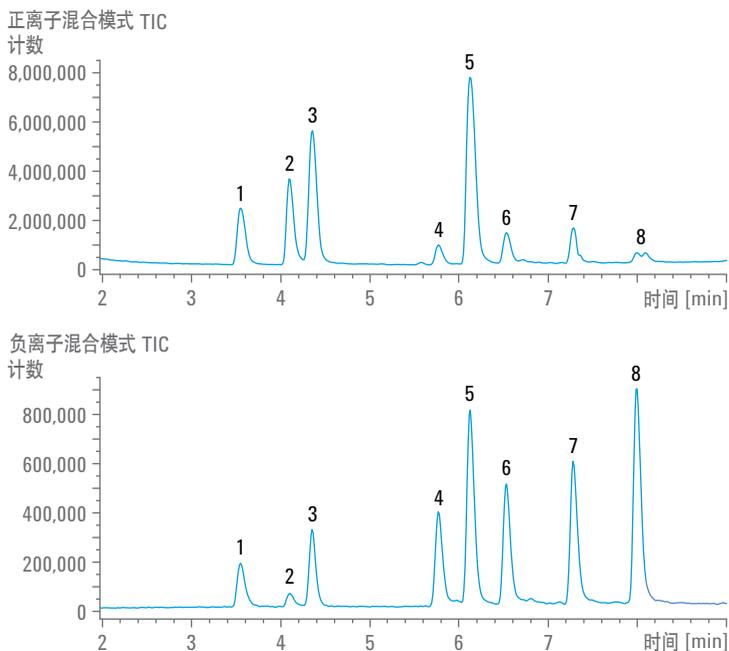


图 3.42 双离子化模式可提供互补而可靠的信息。1 乙酰氨基酚，2 咖啡因，3 磺胺二甲嘧啶，4 对羟基苯甲酸甲酯，5 磺胺地索辛，6 对羟基苯甲酸乙酯，7 对羟基苯甲酸丙酯，8 对羟基苯甲酸苄酯

在扫描模式下进行采集时，可获得总离子流 (TIC) 色谱图。TIC 色谱图并非特定目标化合物的质量选择信号。在图 3.43 中，第三个峰代表目标化合物磺胺二甲嘧啶 ($M = 264$)。

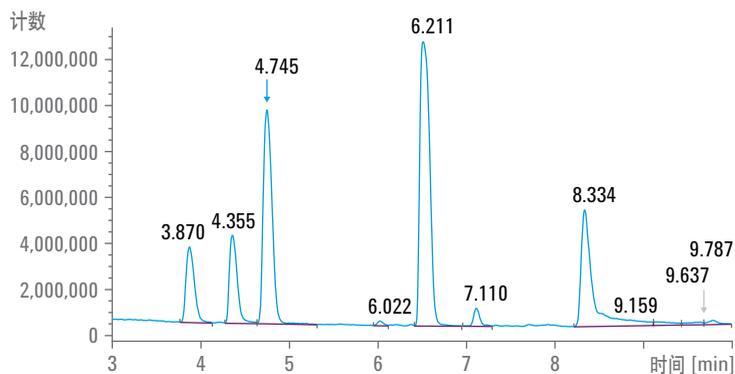


图 3.43 TIC 色谱图，无法获得特定化合物的信息

输入磺胺二甲嘧啶的分子量时，将在背景中实时生成提取离子色谱图 (EIC)。数据系统将添加所选的加合质量（大多数情况下为质子）并监测 $m/z = 265$ 处的 EIC。要触发馏分收集器，观测到的信号强度必须超过所选触发器的阈值，参见图 3.44。

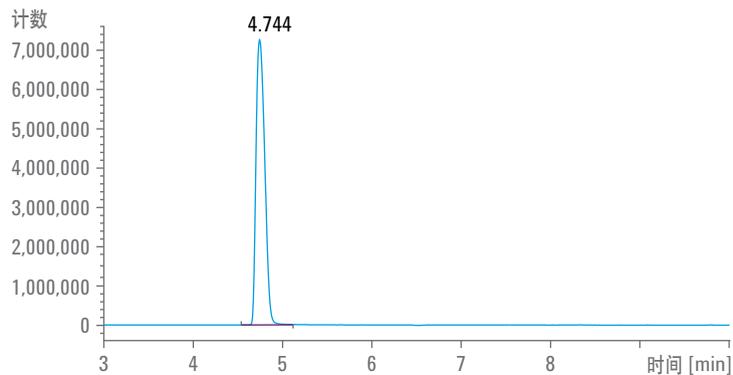


图 3.44 $m/z = 265$ 处目标化合物的选择提取离子色谱图

3.5.7 使用多检测器配置收集馏分

当纯化系统中配置多个检测器时，必须正确设置馏分触发，可采用多种决策途径。通用接口盒可以采集多个检测器的信号。当一个或多个检测器识别出洗脱峰时，将收集馏分。该步骤可采用布尔 AND/OR 逻辑算符。

3.6 回收收集

任何纯化工作的目标都是基于对特定波长下的保留时间、紫外信号强度或目标质量的丰度的鉴定收集所有的目标化合物。目标化合物未得到收集存在若干可能的原因：

- 馏分收集设置不当，例如目标质量或阈值上下限设置不当
- 质量选择检测器中离子化不足
- 在无人值守环境下选择的方法不当
- 机械故障或软件错误

为避免样品完全损失，越来越多的纯化系统配备有样品回收位置或专用回收馏分收集器，其连接到主要馏分收集器的废液管线上，参见图 3.45。对于各种样品，应首选单独的容器收集预计为废液的部分。必须报告回收位置以及样品信息。这样确保您能够将整个样品返回给任何提交纯化样品的人。

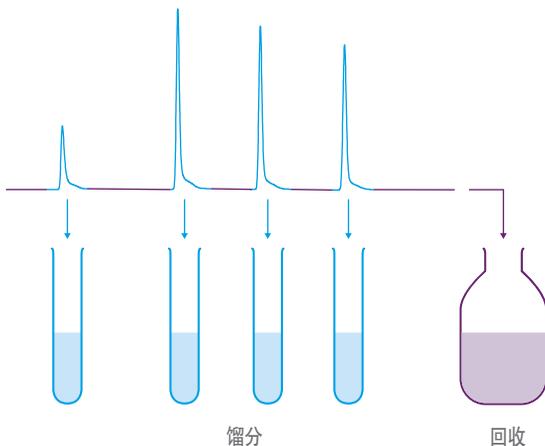


图 3.45 回收收集 — 主馏分收集器未收集的溶剂部分由回收收集器捕集到

3.7 系统注意事项

纯化系统应当根据各种色谱柱尺寸和流速进行扩展。当优先要求灵活处理各种样品量时，就需要进行扩展。但是，它对管线规格具有重要影响，并因此影响系统的内部体积。在系统中发生扩散会影响色谱性能，从而影响目标化合物的纯度和回收率。从分析条件下的规格进行放大时，需要考虑系统的滞后体积。

为方便大体积进样从而增加每次运行纯化的样品量，增加进样器样品环的尺寸是一种简单的方法。较大内径的毛细管有助于解决较高流速引起的背压问题。这些看起来是将分析型液相色谱系统应用于制备工作的合理步骤。但是，这些指标会严重影响应用的分离效率。

3.7.1 系统滞后体积和色谱柱死体积⁸

系统死体积包括流路产生的体积以及色谱柱的死体积。滞后体积是指从两种洗脱液的混合点到柱头的死体积。滞后体积和色谱柱死体积可按照第 3.7.1.4 节“测定滞后体积和色谱柱死体积”、第 5.2 节“测定系统滞后体积”以及第 5.3 节“测定色谱柱死体积”所述的方法进行测量。

图 3.46 显示了系统滞后体积对色谱性能的影响。在滞后体积较小的系统中，较早流出的化合物的分离度可能比较低，当注入大体积样品并在进样后立即启动梯度时尤其如此。等度保持步骤有助于改善色谱图第一部分的分离效果。

在滞后体积较大的系统中，后流出的化合物的分离度通常较差。在相同流速下，洗脱所有化合物所需的周期较长。只有减小滞后体积，才可改善较差的色谱分离结果。

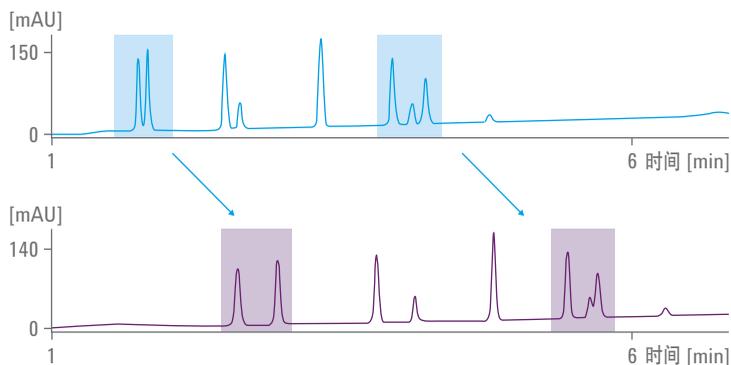


图 3.46 系统滞后体积对分离效率的影响。上方色谱图使用滞后体积较小的系统获得。相比之下，下方色谱图在滞后体积较大的系统上获得

3.7.1.1 最优系统设置的组成

适当规格的制备型液相色谱系统既可用于在 4.6 mm 内径色谱柱上运行分析筛选，也可用于在 50 mm 内径制备柱上进行纯化。在这种情况下，系统滞后体积必须尽可能小，这样在梯度模式下工作时才可获得良好的结果。

一般情况下，当滞后体积与色谱柱死体积等于或小于 1 时可获得最优的系统。另外，系统的总死体积与采用的流速之比应当等于或小于 2:1，才可获得合理的色谱性能。

较大的比值会延长色谱图的长度并降低色谱性能，如图 3.46 所示。毛细管、混合器和进样环的体积对滞后体积具有重要影响。因此，尽可能减小样品环的尺寸或使用两个不同的样品环和流路非常重要。另外，必须使用适合所用流速的正确毛细管直径，减小系统死体积，从而减少色谱峰的扩展。

3.7.1.2 毛细管长度和内径的影响

毛细管的内径必须与流速同步，参见表 3.2。

对于大多数流速在 10 到 100 mL/min 范围的半制备型应用，可使用内径为 0.02 或 0.03 英寸的标准 1/16 英寸毛细管。

- 对于高达 200 mL/min 的流速，可使用内径为 0.04 英寸（1 毫米）的标准 1/16 英寸毛细管。这对于内径为 50 mm 的色谱柱也适用。
- 当系统仅在 100 mL/min 以上的流速、甚至高达 500 mL/min 的流速下使用时，可使用 1/8 英寸毛细管。
- 当系统在 200 mL/min 以上的流速至最高每分钟数升的流速下使用时，可使用 1/4 英寸毛细管。

颜色	色谱柱内径 [英寸]	色谱柱内径 [毫米]	推荐流速 [mL/min]	死体积 [$\mu\text{L}/\text{cm}$]	在最大推荐流速下计算得到的每米的背压 [bar]*
黑色	0.004	0.102	0.1 – 0.8	0.081	103
红色	0.005	0.127	0.2 – 1.5	0.127	72
黄色	0.007	0.178	0.8 – 3.0	0.249	37
蓝色	0.01	0.254	2.5 – 10	0.507	30
橙色	0.02	0.508	7.5 – 100	2.027	19
绿色	0.03	0.762	20 – 150	4.56	6
棕色	0.04	1.016	30 – 200	8.11	2

表 3.2 推荐用于不同流速的 PEEK 毛细管内径 (* 使用 1:1 甲醇 / 水作为溶剂测得背压)

3.7.1.3 色谱柱死体积

对于制备柱而言，色谱柱死体积对系统的总死体积有显著影响。色谱柱死体积包括柱套内不含填料的体积，参见图 3.47。除色谱柱内径以外，还必须考虑颗粒的孔隙率。Agilent ZORBAX SB C18 色谱柱的孔隙率为 0.53，参见表 3.3。

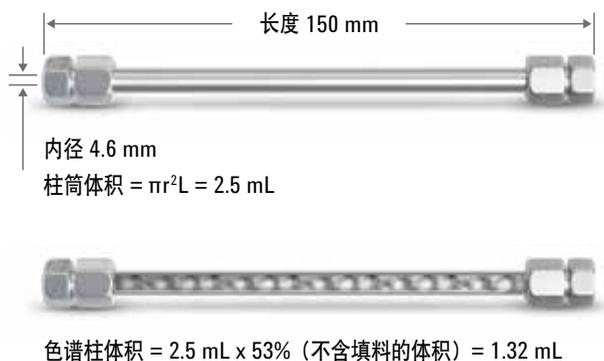


图 3.47 色谱柱死体积的数学计算方法

直径 [mm]	长度 [mm]	粒径 [μm]	孔隙率	死体积 [μL]
2.1	50	5.0	0.53	0.092
3.0	50	5.0	0.53	0.187
4.6	50	1.8	0.53	0.440
4.6	50	3.5	0.53	0.440
4.6	50	5.0	0.53	0.440
4.6	100	5.0	0.53	0.881
4.6	150	5.0	0.53	1.321
9.4	50	5.0	0.53	1.839
21.2	50	5.0	0.53	9.354
21.2	100	5.0	0.53	18.708
21.2	150	5.0	0.53	28.063

表 3.3 不同 Agilent ZORBAX SB C18 色谱柱的死体积。ZORBAX SB C18 材料的孔隙率为 0.53

3.7.1.4 测定滞后体积和 色谱柱死体积

系统的滞后体积与色谱柱的死体积可采用不同方式进行测量。本节介绍的方法是在 10 分钟运行中使用 5% 到 95% 的溶剂 B 的线性梯度。在该计算方法中，溶剂 A 为有机溶剂（乙腈），溶剂 B 也是有机溶剂（乙腈），但其中加有 1% 丙酮作为在 270 nm 下进行紫外检测的示踪物。首先，将色谱柱替换为零死体积的连接头以测量系统的滞后体积。相对于梯度曲线（蓝色）绘制吸收曲线（红色）。两条曲线 50% 处的时间差乘以所用的流速得到系统的滞后体积。然后重新装载色谱柱，采集第二条吸收曲线（绿色），确定系统的总死体积。色谱柱必须经过充分平衡——用至少十倍于色谱柱体积和系统体积的溶剂冲洗——以免示踪物发生保留。色谱柱死体积由滞后体积与系统的总体积之间的差值确定，参见图 3.48。

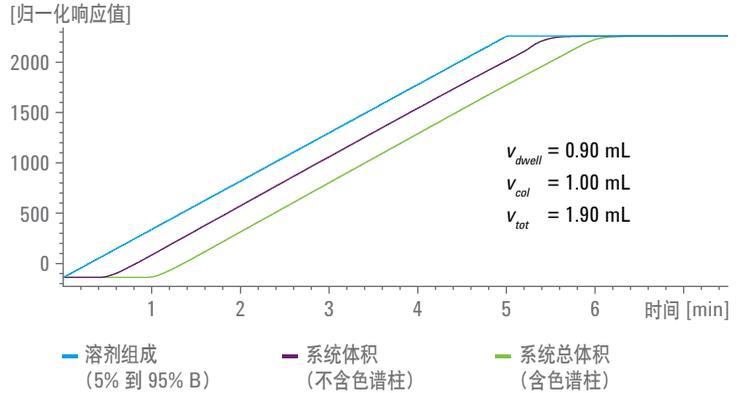


图 3.48 利用线性梯度测定滞后体积和色谱柱死体积

3.7.1.5 平衡和清洗色谱柱

为获得可重现的保留时间，需要采用足够长的色谱柱平衡时间。建议在每次色谱柱清洗阶段之后，采用三倍于色谱柱死体积及两倍于滞后体积的溶剂使色谱柱达到平衡。要做到正确清洗，需要使用至少两倍于色谱柱死体积的溶剂。

3.7.2 系统通讯

安捷伦液相色谱系统使用控制器局域网 (CAN)。峰触发器评价进程以及不同信号示踪物的同步监测，尤其是涉及诸如二极管阵列检测器和质量选择检测器等数据密集型装置时，为工作站带来沉重的负担。病毒扫描或软件更新/下载等活动会影响馏分收集进程。安捷伦的 CAN 通讯独立于 Windows 的软件运行，它是不同系统模块之间直接、迅速而稳定的通讯线路，可保证极高的稳定性。另外，采用 CAN 通讯的纯化系统能够同步紫外检测器与馏分收集器之间的延迟时间，便于采用不同的流速。



图 3.49 CAN 通讯线路 — 实现模块间快速、直接的通讯，独立于主机软件

3.7.3 安全事项

运行制备型液相色谱时，与分析级工作相比，所用的有机溶剂的体积大得多，因此潜在危害也要大得多。必须特别小心，以免（例如）发生泄漏时溶剂溢出。另外，包含挥发性有机溶剂的大量馏分所产生的溶剂蒸气可能导致实验室发生安全事故。具有适当的安全防护功能的纯化系统可避免此类情况威胁实验室人员及设备。样品损失可能是系统泄漏导致的另一个结果。

各个模块中的泄漏检测器可停止溶剂输送并防止系统继续处理下一个样品，参见图 3.50。废液排放系统应当能够将流出物引入废液收集容器中。可通过抽气风扇去除收集区域的溶剂蒸气，并将其导入排气管线（例如通风罩）中，参见图 3.51。

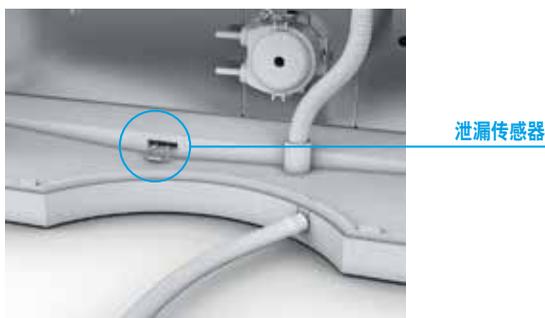


图 3.50 泄漏传感器和泄漏管理，显示了用于将泄漏溶剂引入废液容器的废液排放系统



图 3.51 馏分收集器背面用于连接强制排气装置的接头

4.1 采用分析型色谱作为放大工作的起始点

本章介绍了从 4.6×150 mm 分析柱放大至 21.2×150 mm 制备柱的过程, 开始时采用一般洗脱梯度。两种不同色谱柱尺寸之间的放大过程只有在使用相同的化学键合相、pH 条件、粒径和柱长时才可顺利实现。

首先需要使用分析型色谱确认目标化合物的存在以及在所选色谱条件下能够将其与其他化合物分开。通常, 2% 至 98% 的有机溶剂梯度曲线非常适合各种化合物。进样之后紧接的另一个等度步骤可确保较早流出的化合物得以保留, 尤其是在样品溶解于高洗脱强度的溶剂(例如 DMSO)以获得更高溶解性的情况下。UV 信号或质量选择检测器的 TIC 曲线可用于监控该步骤。

10 %B/min 的一般梯度曲线可用于柱长为 150 mm 的情况下。为尽可能提高效率, 在柱长为 50 mm 的情况下, 可以将斜率增加至最高 30 %B/min。相比之下, 在柱长为 250 mm 的情况下, 斜率必须下降至 6 %B/min。对所选色谱柱直径使用适当的流速时, 可通过改变梯度斜率的陡度提高分离度。

在我们的系统上开展的实验表明使用 4.6×150 mm 的 $5 \mu\text{m}$ 色谱柱时, 采用流速 1.5 mL/min 能够获得最高的分离度和理论塔板数。该流速是所有其他放大过程的起始点。

切换为制备型系统需要改变流速、增加等度保持步骤、改变梯度斜率并调整进样体积和运行时间, 其中制备型梯度曲线应类似于分析型梯度曲线。

图 4.1 显示了分析筛选运行的梯度曲线。图 4.2 显示了将方法从滞后体积较小的系统转移至滞后体积较大且色谱柱内径较大的系统后采用的梯度曲线。延长了等度保持步骤以补偿两个系统滞后体积的差异。从分析型系统至制备型系统的线性方法转移使用第 4.2 节“从分析柱放大至制备柱的线性放大公式”中的公式来实现。

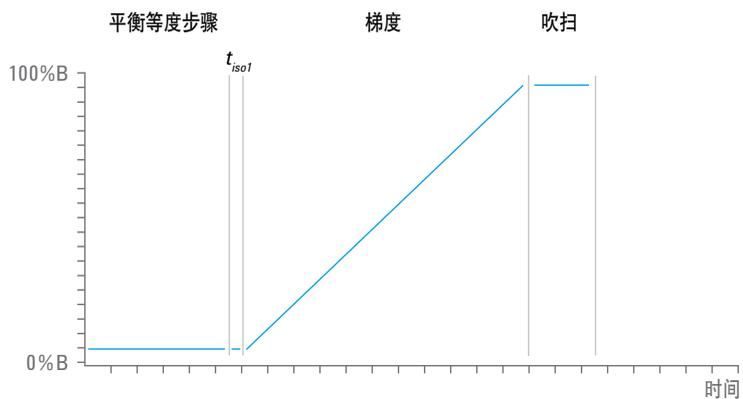


图 4.1 使用 4.6 mm 内径色谱柱的分析筛选运行的梯度曲线，其中包括进样、可选等度保持、梯度斜率和清洗阶段

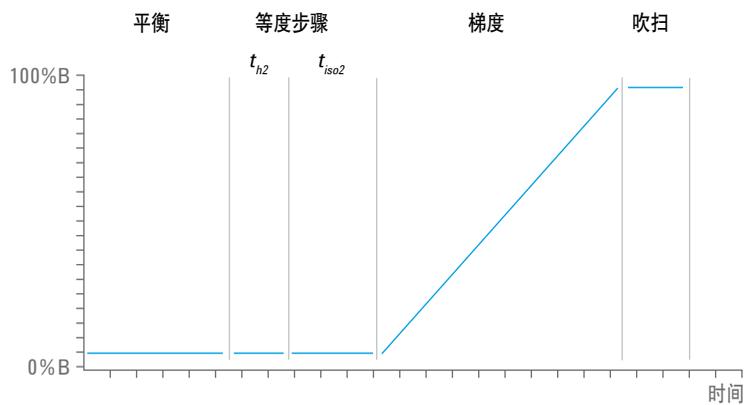


图 4.2 放大至 21.2 mm 内径色谱柱后的梯度曲线，其中包括延长的等度步骤以补偿所采用的流速，因为分析型系统与制备型系统之间滞后体积存在差异

4.2 从分析柱到制备柱的 线性放大公式

放大流速时需要兼顾分析柱和制备柱的直径与粒径。如果粒径保持不变，则对 4.6 mm 内径色谱柱采用 1.5 mL/min 的流速时，将需要对 21.2 mm 内径色谱柱采用 31.86 mL/min 的流速，见公式 4.1。

$$f_{p,P} = f_{a,A} \frac{d_P^2 \rho_A}{d_A^2 \rho_P}$$

公式 4.1 从分析型放大至制备型的流速计算公式

d_A	分析柱直径
d_P	制备柱直径
$f_{a,A}$	分析型系统的实际流速
$f_{p,P}$	制备型系统的建议流速
ρ_A	分析型系统中的色谱柱粒径
ρ_P	制备型系统中的色谱柱粒径

初始等度保持步骤用于补偿分析型系统与制备型系统之间滞后体积的差异。另外，当满足公式 4.2 所述的条件时，可以在不同系统之间转移梯度。

$$\frac{t_{D,A} + t_{I,A}}{t_{c,A}} = \frac{t_{D,P} + t_{I,P}}{t_{c,P}}$$

公式 4.2 梯度转移条件

$t_{D,A}$	分析型系统的滞后时间
$t_{I,A}$	分析型系统一般梯度的初始保持时间
$t_{c,A}$	分析型系统的色谱柱通过时间
$t_{D,P}$	制备型系统的滞后时间
$t_{I,P}$	制备型系统梯度的初始保持时间
$t_{c,P}$	制备型系统的色谱柱通过时间

制备型梯度的初始保持阶段基于一次性确定系统滞后体积与色谱柱死体积来测定，见公式 4.3。

$$t_{I,P} = \left(\frac{t_{I,A} f_{a,A}}{V_{c,A}} + \frac{V_{D,A}}{V_{c,A}} - \frac{V_{D,P}}{V_{c,P}} \right) \frac{V_{c,P}}{f_{a,P}}$$

公式 4.3 计算初始等度保持步骤

$f_{a,A}$	分析型系统的实际流速
$f_{a,P}$	制备型系统的实际流速
$t_{I,A}$	分析型系统一般梯度的初始保持时间
$t_{I,P}$	制备型系统聚焦梯度的初始保持时间
$V_{D,A}$	分析型系统的滞后体积
$V_{c,A}$	分析型系统的色谱柱死体积
$V_{D,P}$	制备型系统的滞后体积

将方法转移至固定相含量更高的色谱柱时，可使用一个简单的公式计算柱负荷或进样体积，见公式 4.4。

$$V_{inj,P} = V_{inj,A} \frac{d_P^2 L_P}{d_A^2 L_A}$$

公式 4.4 柱负荷的放大计算公式

d_A	分析柱直径
d_P	制备柱直径
L_A	分析柱长度
L_P	制备柱长度
$V_{inj,P}$	分析型系统的进样体积
$V_{inj,A}$	制备型系统的进样体积

图 4.3 显示了应用本节所述公式得到的方法转换结果。

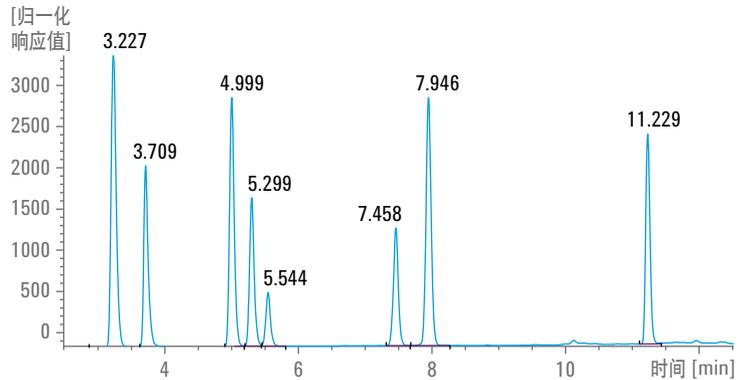
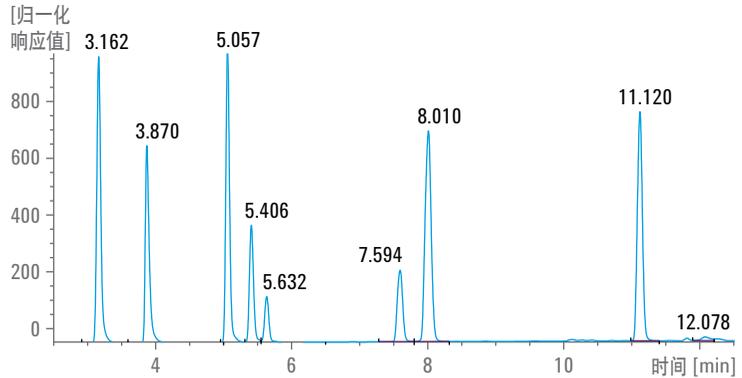


图 4.3 从 4.6×150 mm 的 $5 \mu\text{m}$ 分析柱线性放大至 21.2×150 mm 的 $5 \mu\text{m}$ 制备柱后的结果。两种色谱柱上的保留时间非常接近

上方色谱图：使用 $500 \mu\text{L}$ 进样量和 31.8 mL/min 流速的制备型运行

下方色谱图：使用 $5 \mu\text{L}$ 进样量和 1.5 mL/min 流速的分析型运行

使用放大公式确定滞后体积后，可以将方法从 4.6 mm 内径色谱柱转换至 21.2 mm 内径色谱柱。两张色谱图中所有化合物的保留时间非常接近。

4.3 通过聚焦梯度提高效率¹²⁻¹⁵

为获得最高的效率，必须最大限度提高柱负荷并最大限度缩短运行时间。但是，提高柱负荷会降低分离度，因为色谱峰会展宽。需要提高目标化合物的其他分离效率，以实现较高的载样量和足够的分离度，从而提高纯馏分的回收率。

4.3.1 聚焦梯度的概念

使用聚焦于目标峰的平缓梯度曲线可提高相邻峰组之间的分离度。本节展示了不同的聚焦梯度曲线及其生成方法。

将所有化合物溶解于一个样品中，尽管极性不同且浓度较高，但仍是提高方法稳定性的关键。聚焦梯度曲线的起始条件由目标化合物的极性决定。同时，必须使用浓度尽可能低的有机溶剂 B 使目标化合物得以保留。对于极性化合物，开始时使用较低比例的溶剂 B 可获得良好的结果。甚至极性化合物也可保留在柱头上。经过等度保持后，可使用陡峭的梯度步骤提高各个区域的初始聚焦梯度。采用平缓的梯度曲线，使目标化合物与相邻洗脱的杂质实现最佳分离。

非极性化合物在较高比例的溶剂 B 中具有更高的溶解性。当起始条件与该洗脱区域所采用的梯度曲线的初始条件相接近甚至相同时，可减少进样过程中发生沉淀和毛细管堵塞的风险。样品成功转移至色谱柱后，在目标化合物的洗脱区域附近将采用平缓的梯度曲线。这些化合物流出后，将立即清洗色谱柱。将所有其他化合物清洗出来。优化该过程以缩短运行时间。

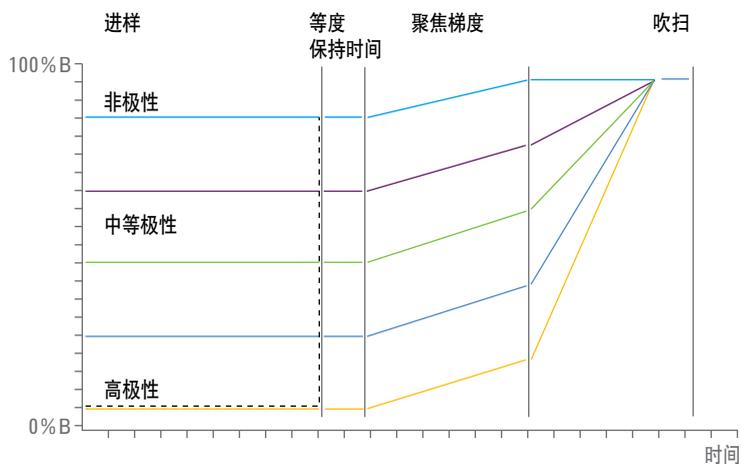


图 4.4 具有不同极性的目标化合物的聚焦梯度曲线。虚线表示另一条阶梯梯度曲线

4.3.2 开发聚焦梯度

开发聚焦梯度的过程从运行分析筛选开始，使用从 2% 到 98% 有机溶剂的线性梯度曲线。分析筛选运行可确定目标化合物的运行时间。当系统的滞后体积和色谱柱死体积已提前确定后，可根据筛选运行的结果计算各种目标化合物洗脱的精确梯度条件。通过死体积之和除以流速可计算出程序设定的溶剂与柱头实际的溶剂组成之间的偏移时间。通过从保留时间中扣除偏移时间后得到梯度组成，可计算出实际洗脱点，其反映了检测到色谱峰时的实际溶剂组成。

计算出目标化合物的实际洗脱点后，必须采用新的平缓或聚焦梯度斜率。通常，当聚焦梯度步骤从实际洗脱点以下 15% 的数据点开始并提高至计算出的洗脱点以上 5 个数据点时，可获得良好的结果。或者，更常见地，新梯度步骤在梯度长度的大约 75% 处达到目标化合物的实际洗脱点。斜率主要根据色谱柱长度而改变，如下所示（筛选流速为 1.5 mL/min）：

- 250 mm 色谱柱 = 10 分钟； 斜率 = 2.0 %B/min
- 150 mm 色谱柱 = 6 分钟； 斜率 = 3.33 %B/min
- 100 mm 色谱柱 = 4 分钟； 斜率 = 5.0 %B/min
- 50 mm 色谱柱 = 2 分钟； 斜率 = 10.0 %B/min

在这个观念下，针对较早流出的化合物的最早梯度将采用 2% 有机溶剂。在这种情况下，最低匹配的洗脱点为 17 %B。如果化合物洗脱时间早得多，则建议采用不同的色谱条件（溶剂组成、pH、化学键合相）使目标化合物较晚流出。

4.3.3 创建聚焦梯度的简单方法

图 4.5 显示了应用于样品的聚焦梯度的简要概念。由于系统延迟体积和色谱柱死体积的存在，导致程序设定的梯度（绿色）变为实际梯度（橙色）。在这个例子中，色谱图被划分为六个时间窗口或区域，包括起始和结束区域以及四个中间区域，在每隔中间区域中，梯度都增加 20 %B。例如，区域 2 的聚焦梯度从 5 %B 开始并以下降斜率增加至 25 %B。对于 150 mm 的色谱柱长度，该梯度步骤需要六分钟完成。对于其他的色谱柱长度，请使用第 4.3.2 节“开发聚焦梯度”中所述的斜率持续时间。

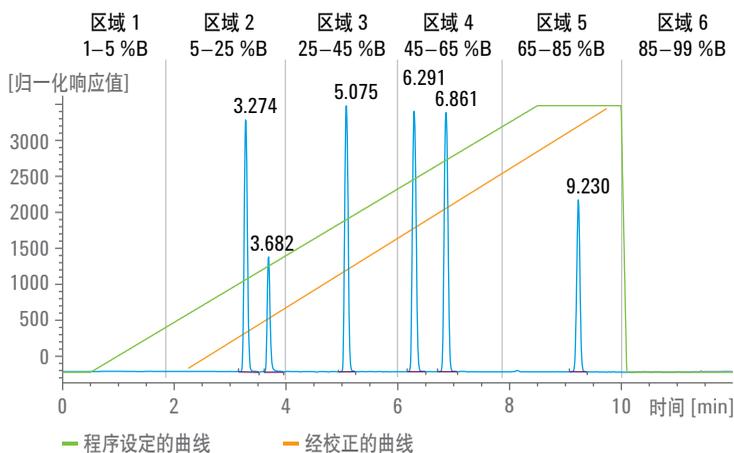


图 4.5 将一般梯度划分为六个时间窗口。定义了各部分色谱图的聚焦梯度步骤

图 4.6 显示了应用聚焦梯度曲线后得到的结果。在这个例子中，在一般筛选运行中，目标化合物在区域 2 中流出。应用从 5 %B 到 25 %B 的聚焦梯度曲线。在梯度斜率内流出的化合物具有明显更高的分离度。非目标化合物被清洗出来。可加载更多的样品量以提高该工艺的效率。请注意，采用数量较少的聚焦梯度的简化方法获得的色谱性能低于根据第 4.3.2 节“开发聚焦梯度”中所述的方法计算出各种目标化合物的实际洗脱点的精确程序。

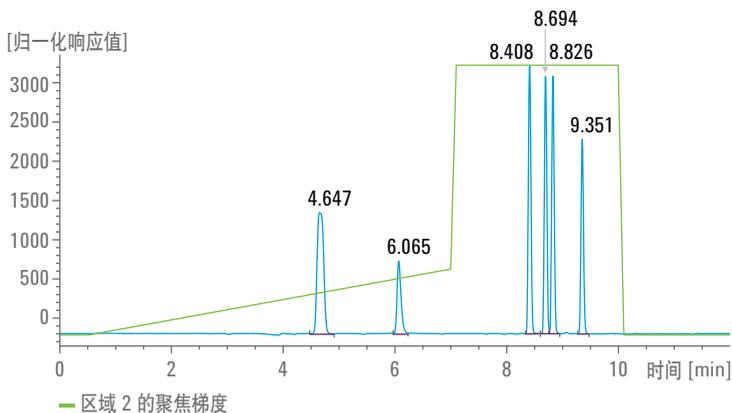


图 4.6 对区域 2 中流出的目标化合物应用聚焦梯度

色谱柱: ZORBAX SB C18 柱, 4.6 × 150 mm, 5 μm;

流速: 1.5 mL/min;

梯度: 5% 到 25% ACN, 6 min 内

4.4 介绍整个放大工作流程¹⁶

纯化工作流程中最重要的步骤是从分析柱规格放大至半制备柱或制备柱规格的过程。当开发聚焦梯度面临额外的负担并且队列中存在过多的样品时，可使用一般梯度曲线快速完成放大过程。但是，如果必须实现最高的性能，那么采用聚焦梯度将是理想的选择。采用自动化系统只需轻点几下鼠标即可获得梯度计算结果，适用于大量样品和用户，值得投资。手动放大工作流程可以按本文所述的方案来执行。它可以概括为四个不同的步骤，如图 4.7 所示。由日内瓦大学开发的基于电子表格的放大计算器有助于解决计算问题。该计算器提供免费下载：

<http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/telechargement-en.htm>
(2014 年 11 月 1 访问)

步骤 1

确定合适的分析筛选条件，例如 pH、流动相和化学键合相

步骤 2

应用聚焦梯度优化分离度和柱负荷

步骤 3

确定分析柱的最大负荷（载样量研究）

步骤 4

放大用于制备型进样和馏分收集

图 4.7 四步放大流程

放大过程中的一个重要问题是样品在所用溶剂中的溶解度。强溶剂（例如 DMSO 或 DMF）能够溶解大多数化合物并获得高浓度溶液。但是，注入大体积的极性化合物溶液会对色谱分离产生不利影响。必须使用最合适的溶剂来溶解化合物，请参见第 3.2.3.2 节“强有机溶剂的大体积进样”。

4.4.1 步骤 1 — 确定合适的分析筛选条件

要首先获得样品的色谱信息时，建议在 2.1×50 mm、 3.0×50 mm 或 4.6×50 mm 的 UHPLC 或 HPLC 色谱柱上采用 1 至 5 μ L 的典型分析体积。目标化合物的保留因子 k 应达到 2 到 9 之间。如果保留因子过低，化合物无法保留。如果保留因子过高，则化合物在梯度曲线的等度清洗阶段可能发生峰展宽。

使用酸性改性剂时，碱性化合物将发生质子化。如果改性剂的浓度足以使注入的全部分子发生质子化，那么将获得对称的峰形。当改性剂浓度过低时，注入的样品分子并非全部质子化。这时通常会造成峰分裂和峰形变差。溶解样品时添加一些酸可减少这一现象的发生。

发现在较低 pH 条件下保留特性较差或分离度较差时，有必要使用 0.5% 氨水作为改性剂并采用可耐受高 pH 条件的色谱柱化学键合相（例如 ZORBAX Extend C18）在较高 pH 下分析样品。请注意，氨水适用于基于质量的纯化工作流程的电喷雾离子化。

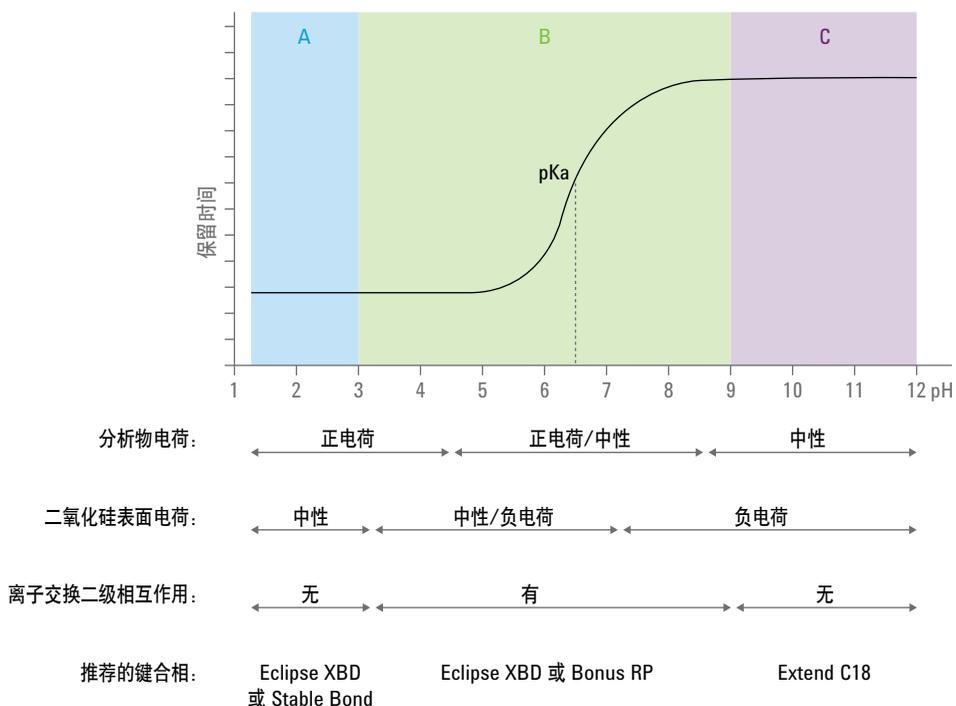


图 4.8 不同 pH 范围内推荐采用的化学键合相 ZORBAX SB C18 色谱柱和 ZORBAX Extend C18 色谱柱在低 pH 和高 pH 条件下便于从 4.6 mm 放大至 21.2 mm 内径

4.4.2 步骤 2 — 应用 聚焦梯度

如第 3 章“制备型液相色谱系统的组成”中所述，聚焦梯度对于超出一般梯度条件下所能达到的纯度、载样量或回收率的样品量而言非常有用。当样品数量增加时，需要采用半自动或优选全自动方法进行梯度开发。在后者情况下，软件可根据筛选运行以及制备型系统和色谱柱的规格自动准备制备型方法。

4.4.3 步骤 3 — 确定最大 柱负荷

色谱柱载样量是获得成功的一个关键因素。当色谱柱在过载模式下超出朗格缪尔吸附等温线范围使用时，针对分析柱精心设计的聚焦梯度曲线可能会导致制备型色谱的分离度很差。注入过多的强溶剂（例如 DMSO）时，体积过载会成为影响峰形和分离度的最重要因素。图 4.9 显示了载样量研究的结果，其中不断增加色谱柱载样量直至达到分离度限值。

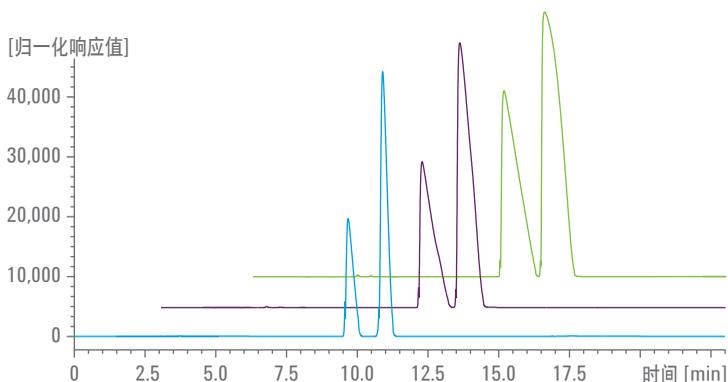


图 4.9 载样量研究结果 — 不断增加柱负荷直至达到分离度限值。

色谱柱: Agilent Scalar 柱, 4.6 × 250 mm, 10 μm

流速: 1.5 mL/min

进样体积: 5 到 50 μL

梯度:

时间	流速	%B
0	1.5	2
0.01	1.5	2
16.01	1.5	98
19.0	1.5	98
19.5	1.5	2
25.0	1.5	2

通过对分析柱应用聚集梯度，以 5 μL 的步长增加进样体积，确定柱负荷的限值。进样量为 40 μL (18.7 mg) 时，两种化合物的分离仍可获得 1.11 的分离度 (R_s)。

在 50 mm 内径色谱柱上纯化的最终进样体积通过色谱柱放大公式计算得到（参见第 4.2 节“从分析柱放大至制备柱的线性放大公式”）。注入 4500 μL 或 2.11 g 混合物时能够在 50 mm 内径色谱柱上获得相同的分离度。

4.4.4 步骤 4 — 放大实现制备型进样和馏分收集

图 4.10 显示了经过放大计算后的色谱图。应用第 4 章“放大策略”中的公式，能够精确预测制备型色谱图。两种化合物获得基线分离，且收集到的纯度高于 95%。

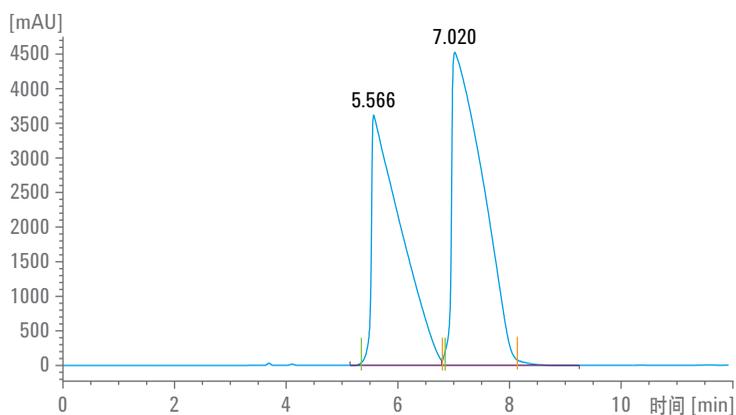


图 4.10 制备级色谱图。刻度标记表示收集到的馏分。根据 4.6 mm 内径分析柱的载样量研究结果，对方法进行放大以满足 50 mm 内径色谱柱所需的流速、梯度曲线和进样体积。该色谱图显示了进样 4500 μL 后得到的两种目标化合物的分离效果

本章介绍了制备型液相色谱的实践指南，包括色谱柱填充的流程、滞后体积的测定、色谱柱平衡以及色谱柱载样。

5.1 SAC/DAC 色谱柱的 装填流程

可使用下列流程逐步制备和装填 SAC/DAC 色谱柱填料。

1. 根据所需的色谱柱体积、色谱柱内径以及要填充的长度计算并称量适量的干物质。大多数填料都以干粉形式提供，可直接使用
2. 计算色谱柱的体积：

$$V_{col} = \left(\frac{id}{2} \right)^2 \pi L$$

3. 计算所需的填料量：

$$M = V_{col} \times \rho$$

$(\rho \sim 0.668 \text{ g/mL})$

4. 计算填料密度 (M)：

$$\rho = \left(\frac{g_M}{V} \right)$$

5. 按 1 g 干填料对 2 mL 填充溶剂的比例将填料分散到填充溶剂中。填充溶剂通常为异丙醇 (IPA)。为确保填料完全分散且不含结块, 应当振荡但不要搅拌装填匀浆液或将瓶子转动大约五分钟。对于所有的 HPLC 填料, 均不得使用磁力搅拌棒, 因为它会将颗粒磨碎为细颗粒。充分混合匀浆液是非常必要的。由于固定相的特性 (例如, 粒径、形状、官能团的性质等) 存在显著差异, 因此应咨询树脂制造商以确定最佳的匀浆溶剂和压缩压力。随着您对采用特定树脂装填色谱柱的经验日益丰富, 可调整装填条件以优化结果。现在装填匀浆液即可投入使用
6. 在一步连续操作中, 将均匀的、自由流动的匀浆液快速倒入装配好的色谱柱中
7. 完成色谱柱装配, 并按提供的说明书操作装填工作站。对于孔径 100 Å 的反相填料, 推荐采用大约 1000 psi 的机械压力。因此, 需要采用 1500 psi 的液压压力。确保已根据所用的色谱柱内径和装填工作站的合适组合比设置好液压压力
8. 完成色谱柱装填后, 终止装填溶剂流并停止泵, 使色谱柱保持/平衡 10 分钟。色谱柱即可转移至色谱洗脱液中。如果需要, 可以在压缩位置锁定柱塞杆, 从而使色谱柱可以在 SAC 模式下操作
9. 现在填充柱即可投入使用。它也可装在装填工作站上使用, 或者可从装填工作站上移除以用于纯化设备

台式 Load & Lock 色谱柱中 10 微米反相填料的典型柱效为 30,000 塔板数/米。

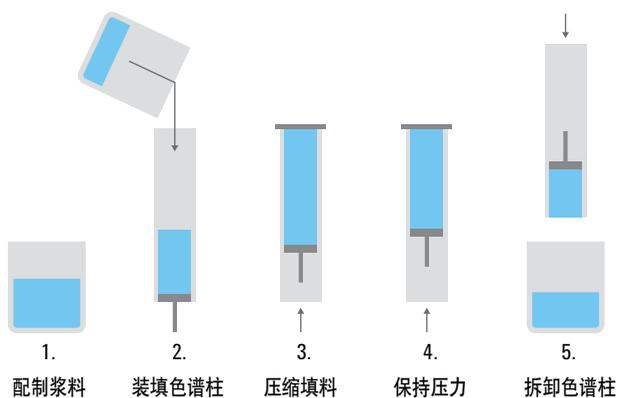


图 5.1 DAC/SAC 色谱柱的基本装填和拆卸流程

内径 [mm]	长度 [mm]	体积 [mL]	吸附剂的量 [g] (硅胶基 $\rho \approx 0.67 \text{ g/mL}$)	吸附剂的量 [g] (聚合物基 $\rho \approx 0.33 \text{ g/mL}$)
25	250	122.7	82	41
	450	220.8	148	73
50	250	490.8	329	162
	450	883.4	592	292
75	250	1104.2	740	364
	450	1987.6	1332	656
100	250	1963.1	1315	648
	480	3769.2	2525	1244
150	250	4417.0	2959	1458
	480	8480.7	5682	2799
200	250	7852.5	5261	2591
	480	15076.8	10101	4975

表 5.1 装填 DAC/SAC 色谱柱时所需的树脂量。对于聚合物基色谱柱，需要考虑远远更低的压力限值。

5.1.1 测定色谱塔板数

装填完色谱柱后，需要测试柱效。用 80:20 乙腈和水的混合液冲洗色谱柱，并在适合色谱柱规格的适当流速下进行平衡。为平衡色谱柱，建议采用色谱柱死体积至少四倍和滞后体积至少两倍的溶剂进行冲洗。在这个例子中，在等度模式下使用 100 mL/min 的流速注入 500 μL 含 1% 甲苯的乙腈溶液。可使用公式 5.1 计算理论塔板数。理论塔板数应当高于每米 30,000。

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

公式 5.1 理论塔板数的计算公式

N	理论塔板数
t_R	保留时间
W_h	半峰高处的峰宽 (采用时间单位)

可使用 DAC 模式在一定压力下将色谱柱固定在装填工作站上, 也可使用 SAC 模式将其从装填工作站上移除。使用聚合物填料时, 保持压力处于填料的压力限值以内非常重要, 否则将变得不适用。在这种情况下, 需要使用 SAC 模式。

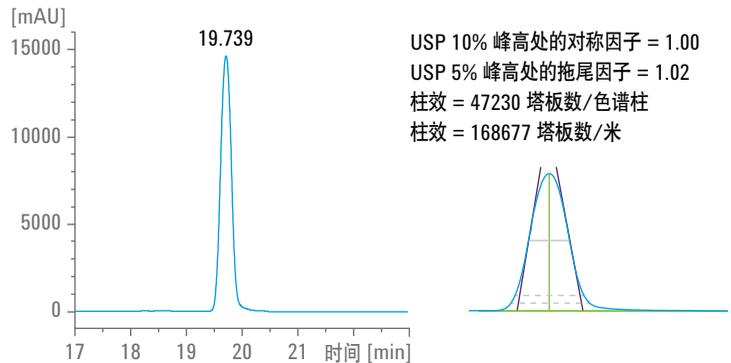


图 5.2 注入含 1% 甲苯的乙腈溶液测定色谱理论塔板数

5.1.2 拆卸色谱柱

拆卸色谱柱之前, 建议用至少四倍于色谱柱体积的 IPA 溶剂冲洗色谱柱。将色谱柱装载到装填工作站上并移除顶盖。这时可使用液压活塞移除柱床。可除去受到严重污染的色谱柱填料, 用 IPA 将剩余的固定相冲洗出来并在旋转蒸发器中进行干燥。由于吸入颗粒可能有害, 因此需要特别小心。

5.2 测定系统滞后体积

可采用两种不同的方法测定系统滞后体积。对于能够输送高度准确的分析级流速（例如 1 mL/min）的系统，采用线性梯度曲线的方法可获得优于逐步法的准确结果。该方法还可用于测量色谱柱死体积。

5.2.1 测定分析型系统的滞后体积

按照以下步骤可测定能够输送准确流速的分析型系统的滞后体积。

1. 配制溶剂 A: 100% 水
2. 配制溶剂 B: 99% 乙腈, 含 1% 丙酮作为示踪物
3. 用溶剂 A 和 B 冲洗系统
4. 将检测波长设置为 263 nm
5. 用低死体积限流器替代色谱柱 (保持背压为 50 bar)
6. 在 0 到 10 分钟内运行线性梯度, 使用 5% 至 95% B, 流速 1 mL/min
请注意, 使用体积大于 1 mL 的制备型样品环时, 需要提高流速以在合理的时间内完成滞后体积测定。一个好的折中方案是保持流速等于样品环尺寸。
7. 测定组成为 50% 的梯度下程序设定的洗脱时间与实际洗脱时间之间的时间差 ($t_{\text{滞后时间}}$)
8. $V_{\text{滞后体积}}$ 可根据 $V_{\text{滞后体积}} = t_{\text{滞后时间}} \times f$ 进行计算

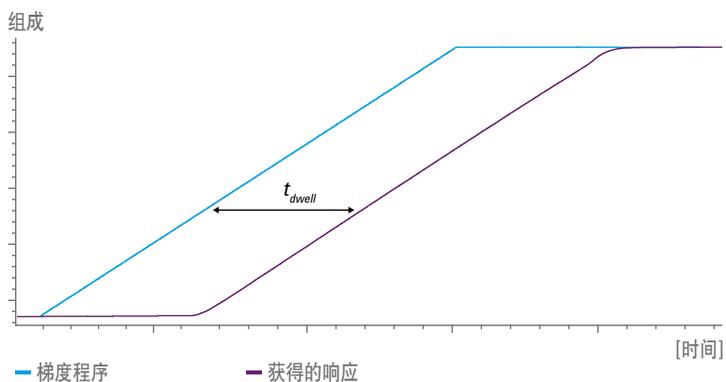


图 5.3 测定分析型系统的系统滞后时间

5.2.2 测定制备型系统的滞后体积

按照下列逐步梯度方法可测定配备制备型泵的系统滞后体积。

1. 配制溶剂 A: 100% 水
2. 配制溶剂 B: 99% 乙腈和 1% 丙酮
3. 用内径 0.005 英寸 (内径 0.12 毫米) × 750 毫米的限流毛细管替代色谱柱
4. 将检测波长设置为 263 nm
5. 在 4 分钟内运行台阶梯度, 使用 10% 到 90% B, 流速 2 mL/min
请注意, 使用体积大于 5 mL 的样品环时, 需要提高流速。一个好的折中方案是保持流速等于样品环尺寸。
6. 计算程序设定的梯度与获得的信号曲线 50% 处的时间差 ($t_{\text{滞后时间}}$)
7. $V_{\text{滞后体积}}$ 可根据 $V_{\text{滞后体积}} = t_{\text{滞后时间}} \times f$ 进行计算

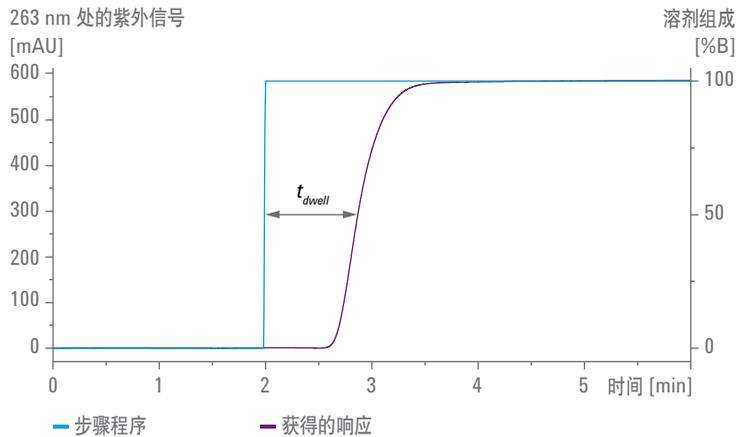


图 5.4 测定制备型系统的系统滞后时间

5.3 测定色谱柱死体积

可以按照两个流程测定色谱柱死体积。第一个流程比较简单, 可快速提供结果。另一个流程更加高级, 可提供更准确的结果。

5.3.1 测定色谱柱死体积的简化流程

1. 配制溶剂 A: 100% 乙腈
2. 配制溶剂 B: 99% 乙腈, 含 1% 丙酮作为示踪物
3. 用溶剂 A 和 B 冲洗系统
4. 将检测波长设置为 263 nm
5. 安装色谱柱
6. 用 95% A 和 5% B 平衡系统直至基线稳定
7. 在 0 到 10 分钟内运行线性梯度, 使用 5% 至 95% B, 流速 1 mL/min
请注意, 当计算出的总系统体积 (样品环与色谱柱) 大于 3 mL 时, 建议提高流速以在合理的时间内完成滞后体积的测定。一个好的折中方案是保持流速等于计算出的系统死体积。
8. 测定组成为 50% 的梯度下程序设定的洗脱时间与实际洗脱时间之间的时间差 ($t_{\text{滞后时间}}$)
9. $v_{\text{滞后体积}}$ 总数可根据 $v_{\text{滞后体积}} \text{总数} = t_{\text{总滞后时间}} \times f$ 进行计算
10. 用低死体积限流器替代色谱柱 (保持背压为 50 bar)
11. 在 0 到 10 分钟内运行线性梯度, 使用 5% 至 95% B, 流速 1 mL/min
12. 测定组成为 50% 的梯度下程序设定的洗脱时间与实际洗脱时间之间的时间差 ($t_{\text{滞后时间}}$)
13. $v_{\text{滞后体积}}$ 可根据 $v_{\text{滞后体积}} = t_{\text{滞后时间}} \times f$ 进行计算
14. $v_{\text{总滞后体积}}$ 减去系统滞后体积 $v_{\text{滞后体积}}$ 可计算出色谱柱死体积

5.3.2 测定色谱柱死体积的高级流程

单独的分析型或制备型系统或两者组合需要使用下列化学品:

- 溶剂 A: 水 (可选包含 0.1% 甲酸)
- 溶剂 B: 乙腈 (可选包含 0.1% 甲酸)
- 进样针和吹扫清洗溶液 (在超声水浴中脱气): 80% 乙腈或其他合适的溶液

需要采用溶于乙腈和水 (75:25) 混合液的硫脲作为标记化合物。其浓度必须与所用的紫外流通池的光程 (对应于灵敏度) 相对应。必须避免达到饱和。为获得最佳的色谱柱性能和使用寿命, 建议在样品使用前用再生纤维素注射式过滤器 (安捷伦部件号 5190-5108) 对其进行过滤。

下文所述的色谱柱体积的鉴定是基于不保留化合物（标记物）硫脲的洗脱过程。在第一步中，采用零死体积接头替代色谱柱，并在性能可靠的尽可能低的流速下洗脱标记物。该设置下的保留时间可用于确定进样点与检测点之间管线的死体积。在第二步中，安装目标色谱柱并用 75% 乙腈使其达到平衡。在含有色谱柱与不含色谱柱的设置下标记物的保留体积之间的差值确定了目标色谱柱的体积。为获得最佳结果，请在单独的分析型液相色谱系统中测量色谱柱体积（如果可行）。下列流程介绍了在单独的分析型系统中鉴定色谱柱体积的方法。针对 ZORBAX SB C18 柱优化了使用硫脲鉴定色谱柱体积的方法。对于其他色谱柱，可能需要调整溶剂组成，甚至换用不同的标记化合物。

1. 根据检测器流通池的光程配制下列浓度之一的硫脲溶液，并将样品瓶安放到自动进样器中：
 - 3 mm 流通池：0.5 mM 硫脲，溶于 75% 乙腈
 - 10 mm 流通池：0.2 mM 硫脲，溶于 75% 乙腈
 - 60 mm 流通池：0.03 mM 硫脲，溶于 75% 乙腈
2. 在样品使用前，采用再生纤维素注射式过滤器对其进行过滤
3. 用零死体积接头替代色谱柱
4. 配制溶剂和清洗溶液并吹扫溶剂管线：
 - 溶剂 A：水（可选包含 0.1% 甲酸）
 - 溶剂 B：乙腈（可选包含 0.1% 甲酸）
 - 进样针清洗溶液：80% 乙腈或其他合适的溶液
 - 用新溶剂吹扫溶剂管线
5. 设置方法：
 - 将所有模块中的停止时间设置为无限（不限定运行时间）
 - 将溶剂 B 设置为 75%
 - 清空时间表
 - 将进样体积设置为 1 μL
 - 将紫外检测信号设置为 242 nm，带宽 4 nm，无参比

6. 将 242 nm 处的紫外曲线显示于在线图中
7. 使用 75% B 平衡系统，流速 1 mL/min，平衡时间 2 分钟
8. 设置流速为 0.2 mL/min（如有需要，使用已知体积的限流毛细管将背压维持在 15 bar 以上）
9. 打开样品信息对话框：
 - 输入样品瓶的位置
 - 输入运行名称
 - 运行方法
10. 记录到标记物色谱峰后停止运行
11. 重复运行两次（共运行 3 次）
12. 安装目标色谱柱
13. 平衡色谱柱，使压力和紫外吸光度达到稳定
14. 设置处于 0.2 到 4 mL/min 范围内的合适流速，使标记物在 1 min 或之后流出

由于预期的色谱柱体积为色谱柱几何体积（即，横截面积乘以长度）的大约一半，因此将流速设置为色谱柱几何体积的大约一半，单位为 mL。例如， 4.6×50 mm 色谱柱的几何体积为 $(3.14 \times 2.3 \times 2.3 \times 50) / 4000 = 0.83$ mL，因此将流速设置为 $(1/2 \times 0.83)$ mL / 1 min \approx 0.4 mL/min。

15. 根据所采用的流速（和色谱柱体积）调整进样体积：
 - 流速 0.2 至 0.5 mL/min，进样体积 1 μ L
 - 流速 0.5 至 1 mL/min，进样体积 2 μ L
 - 流速 1 至 2 mL/min，进样体积 5 μ L
 - 流速 > 2 mL/min，进样体积 10 μ L
16. 注意所采用的流速和进样体积
17. 记录到标记物色谱峰后停止运行
18. 重复运行，检查一致性

19. 评估数据

- 记录顶点处所有峰的洗脱时间
- 计算不含色谱柱时的洗脱体积：
 - 计算不含色谱柱时数据的平均洗脱时间
 - 乘以所采用的流速
 - 减去限流毛细管的体积（如果使用）和进样体积的一半
- 计算最终的色谱柱体积：
 - 计算含色谱柱时的平均洗脱时间
 - 乘以所采用的流速
 - 减去不含色谱柱时的洗脱体积和进样体积的一半

5.4 平衡色谱柱和优化流速

5.4.1 平衡和清洗色谱柱

为获得可重现的保留时间，需要采用足够长的色谱柱平衡时间。建议在每个色谱柱清洗阶段之后，采用四倍于色谱柱死体积及两倍于滞后体积的溶剂使色谱柱达到平衡。需要采用至少三倍于色谱柱死体积的溶剂才可实现合适的色谱柱清洗。

5.4.2 优化流速

纯化系统中分析筛选的最佳流速

在配备 4.6×150 mm 分析柱的手动放大系统中注入测试混标。系统的总死体积（滞后体积与色谱柱死体积）为大约 3 mL。使用 1 mL/min 的流速和 2% 到 98% 有机溶剂的一般梯度，采用 10 %B/min 的梯度斜率，参见图 5.5。在另外两个实验中，我们将流速增加至 1.5 mL/min 和 2 mL/min，参见图 5.6 和图 5.7。

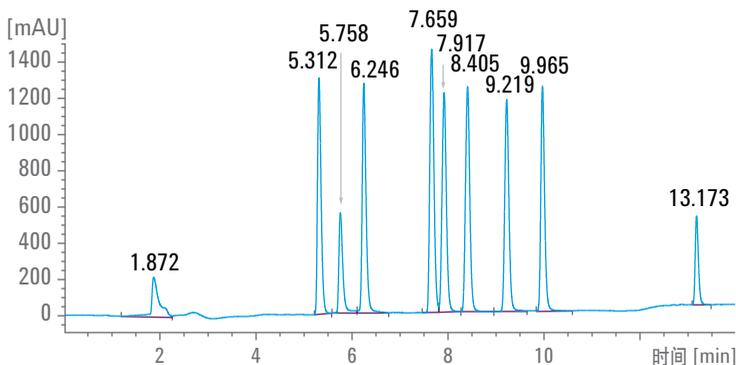


图 5.5 在 1 mL/min 下 (4.6×150 mm, $5 \mu\text{m}$ 色谱柱) 用于确定最佳流速的色谱图

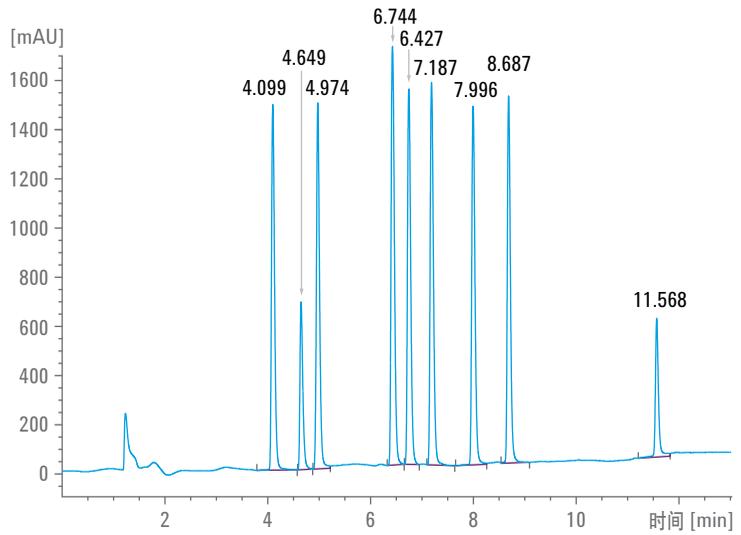


图 5.6 在 1.5 mL/min 下 (4.6 × 150 mm, 5 μm 色谱柱) 用于确定最佳流速的色谱图

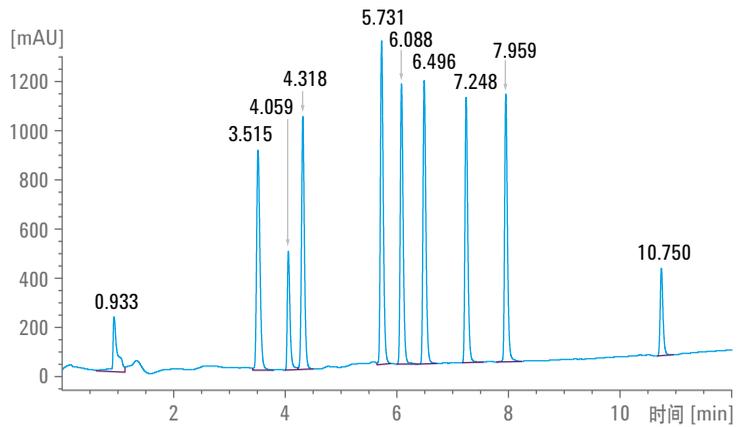


图 5.7 在 2.0 mL/min 下 (4.6 × 150 mm, 5 μm 色谱柱) 用于确定最佳流速的色谱图

采集到色谱图后，计算图 5.5 中 7.659 分钟和 7.917 分钟处色谱峰之间的分离度以及理论塔板数。表 5.2 总结了所有的结果。

流速 [mL/min]	分离度 (前峰)	分离度 (后峰)	峰宽	塔板数
1.0	1.594	2.955	0.09708	36843
1.5	2.943	4.108	0.06208	65792
2.0	2.892	4.012	0.06292	64092

表 5.2 色谱分离度、峰宽和理论塔板数。流速 1.5 mL/min 是合适的，能够使该系统获得最佳的分离度

5.4.2.1 比较运行时间和溶剂消耗

比较运行时间、溶剂消耗和峰宽，可以看到流速为 1.5 mL/min 时结果最佳，见表 5.3。将流速从 1.5 mL/min 增加至 2 mL/min 后可进一步缩短 10.7% 的运行时间，但会使溶剂消耗增加 20.3%，这样是不利的。但是，如果要求的样品通量需要较短的运行时间，那么必须接受溶剂成本的增加。

为获得良好的结果，一项简单的规则是使系统死体积与流速之比等于 1 或小于 2。根据此项研究的结果，所有的后续放大计算均使用 1.5 mL/min 的流速。

流速 [mL/min]	目标化合物的保留时间 [min]	溶剂消耗 [mL]	时间节省 [%]	溶剂消耗的增加 [%]	峰宽	备注
1.0	7.917	7.917			0.09708	分离度降低
1.5	6.744	10.116	18.1	27.77	0.06208	最佳分离度
2.0	6.088	12.170	10.7	20.3	0.06292	溶剂消耗增加

表 5.3 不同流速对分离度和运行时间的影响 — 基于用于测量的系统所获得的结果

5.5 色谱柱过载

需要大量的纯化合物时，要求提高通量。多次进样或增加每次进样的柱负荷能够应对这一挑战。浓度或体积过载会造成色谱柱过载。如果浓度过载，体积保持不变，但样品浓度会增加。当体积过载时，浓度保持不变，但进样体积增加。然而，当杂质或目标化合物的溶解度与色谱要求之间存在矛盾时，样品可能难以处理。可采取多种措施应对这些挑战。本节介绍了体积过载对峰形和分离度的影响。

5.5.1 体积过载

图 5.8 显示了在 4.6×150 mm 色谱柱上注入 $10 \mu\text{L}$ 溶解于 DMSO 的样品后获得的色谱图。所有化合物均在可接受的分离度范围内得到分离并表现出良好的峰形。图 5.9 显示了注入 $20 \mu\text{L}$ 同一样品所得到的结果。两种含氮碱性化合物的色谱峰表现出严重的前伸现象并开始分裂。图 5.10 显示了进样量为 $30 \mu\text{L}$ 时获得的结果。三个峰出现严重的前伸和分裂现象。严重的前伸峰和较差的峰形会影响触发过程，在斜率识别参数过于灵敏的情况下尤其如此。

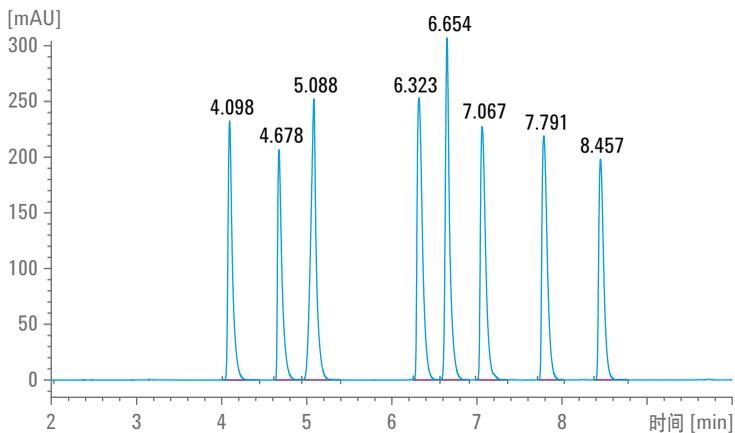


图 5.8 在 4.6×150 mm 色谱柱上注入 $10 \mu\text{L}$ 溶解于 DMSO 的样品混合液。所有组分均得到分离，表现出良好的峰形

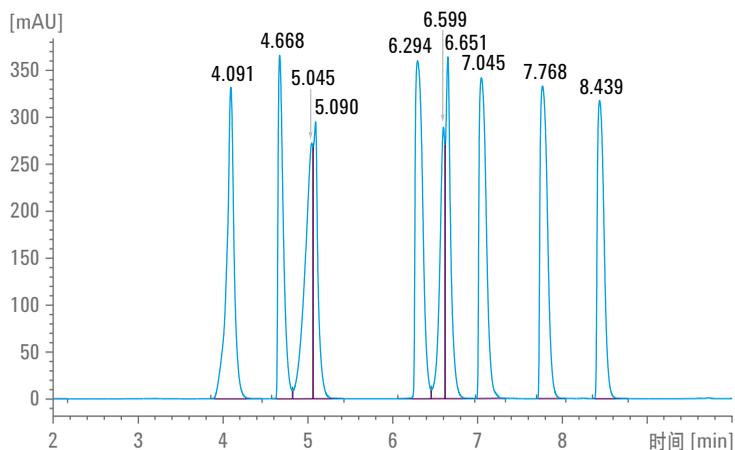


图 5.9 注入 $20 \mu\text{L}$ 同一样品时，两种含氮化合物的色谱峰出现严重的前伸以及峰分裂现象

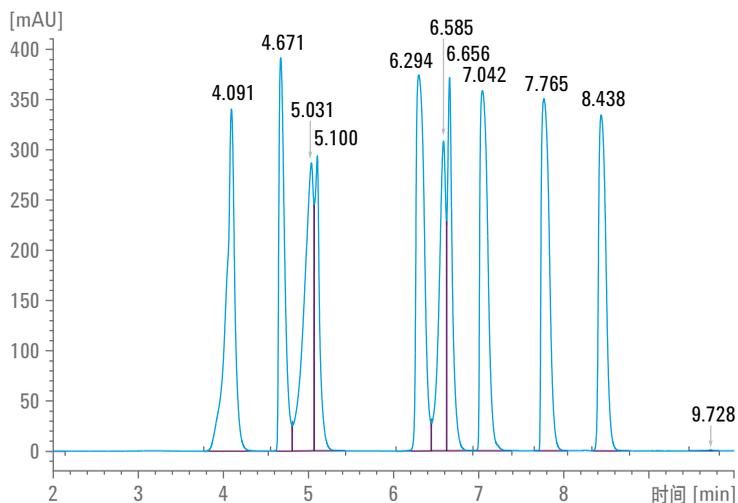


图 5.10 进样量为 30 μL 时影响更加严重，如含氮化合物 1、3 和 5 所示

5.5.2 色谱柱的载样量

表 5.4 显示了用于不同色谱柱规格的固定相的量以及对应于载样量的推荐样品量。在色谱工作中经常采用 0.1% 到 1% 载样量的柱负荷。色谱工作越困难，需要采用的柱负荷越少。对于简单的或质量通量分离，甚至可使用固定相重量 5% 的柱负荷。

直径 [cm]	0.46	1.09	2.12	3.00	5.00
长度 [cm]	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
体积 [mL]	2.49	42.55	52.97	106.07	294.64
流速 [mL/min]	1.50	25.59	31.86	63.80	177.22
大致需要的吸附剂量 [g]	1.50	25.53	31.78	63.64	176.79
极高效率0.1% 载样量 [克/运行]	0.001	0.026	0.032	0.064	0.177
载样量和效率1% 载样量 [克/运行]	0.015	0.225	0.318	0.636	1.768
通量导向5% 载样量 [克/运行]	0.075	1.276	1.589	3.182	8.839
运行时间基于 15 分钟运行 [h]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
通量 [g] 24 小时/天, 得自 1% 载样量	1.4	24.5	30.5	61.1	169.7
通量 [kg] 365 天/年, 24 小时/天	0.524	8.944	11.136	22.300	61.945

表 5.4 安捷伦 Load & Lock 色谱柱的通量计算结果。固定相密度: 0.6 g/mL

在这些计算中, 可使用 0.6 g/mL 的吸附剂密度估算不同色谱柱规格下的吸附剂量。根据工作要求不同, 30 × 150 mm 色谱柱可使用 64 mg 到 640 mg 的固体粗品混合物。由于粗品混合物通常存在溶解性问题, 因此在推荐的进样体积下经常会达到限值。对于这些色谱柱规格, 建议在进样时 DMSO 不得超过 2000 μ L。最大的限制因素是化合物的溶解度。

表 5.5 列出了不同色谱柱直径和长度下推荐采用的 DMSO 的进样体积。所有推荐值均基于经验及实验室实验结果。

色谱柱规格	进样体积 [μL]	固定相 [g] 密度 0.6 g/mL	柱负荷 [mg]		
			0.1 %	0.5 %	1.0 %
2.1 \times 50 mm, C18	1.75				
4.6 \times 150 mm, C18	25				
19 \times 100 mm, C18	284	17	17	85	170
19 \times 150 mm, C18	426	26	26	130	260
19 \times 250 mm, C18	710	43	43	215	430
21.2 \times 100 mm, C18	354	21	21	105	210
21.2 \times 150 mm, C18	531	32	32	160	320
21.2 \times 250 mm, C18	885	53	53	265	530
30 \times 100 mm, C18	706	42	42	210	420
30 \times 150 mm, C18	1063	64	64	320	640
30 \times 250 mm, C18	1772	106	106	530	1060
50 \times 100 mm, C18	1969	118	118	590	1180
50 \times 150 mm, C18	2953	177	177	885	1770
50 \times 250 mm, C18	4922	295	295	1475	2950

表 5.5 不同色谱柱尺寸下固定相的量以及推荐的载样量（以质量计）

如果需要注入更大的体积，建议使用柱上稀释法，参见第 3.2.3 节“特殊进样技术”。另一种方法是降低注入溶剂的强度，例如，用甲醇替代 DMSO（在化合物可溶解的前提下）。或者，可以将化合物首先溶解于少量 DMSO 中，然后用甲醇或其他强度较低的溶剂进行稀释。

参考文献

1. Huber, U., 制备液相色谱解决方案, 安捷伦应用文集, 出版号 5989-5948CHCN, **2006**
2. Schaffrath, M., von Roedern, E., Hamley, P., Stilz, H.U., High Throughput Purification Of Single Compounds And Libraries, *J. Comb. Chem.*, **2005**, 7, 546-553
3. Muhlebach, A., Adam, J., Schon, U., Streamlined approach to high quality purification and identification of compound series using high resolution MS and NMR, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, 2983-2988
4. Koppitz, M., Maximizing Efficiency in the production of compound libraries, *J. Comb. Chem.*, **2008**, 10, 573-579
5. Isbell, J., Changing requirements of purification as drug discovery programs evolve from hit discovery, *J. Comb. Chem.*, **2008**, 10, 150-157
6. Guth, O., *et al.*, Automated modular preparative HPLC-MS purification laboratory with enhanced efficiency, *J. Comb. Chem.*, **2008**, 10, 875-882
7. Penduff, P., Sample Purification Triggered With the Agilent 1260 Infinity Evaporative Light Scattering Detector (采用 Agilent 1260 Infinity 蒸发光散射检测器触发样品纯化, 安捷伦科技公司技术概览), 出版号 5991-4041EN, **2014**
8. 液相色谱手册, 安捷伦基础导论, 出版号 5990-7595CHCN, **2013**
9. Guillarme, D., *et al.*, Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particles. Part II: Gradient experiments, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2008**, 68, 430-440

10. Schellinger, A.P., Carr, P.W., A practical approach to transferring linear gradient elution methods, *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1077*, 110-119
11. Schoenmakers, P. J., et al., Gradient Selection in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **1978**, *149*, 519-537
12. Snyder, L.R., Dolan, J.W., High Performance Gradient Elution, *Wiley*, **2007**
13. Jablonski, J-A.M., Wheat, T.E., Diehl, D.M., 开发用于分离和纯化的聚焦梯度, *沃特世应用简报*, 文献编号 Z20002955en, **2009**
14. Tei, A., Penduff, P., Guilliet, R., Schulenberg-Schell, H., Using focused gradients on a combined analytical/preparative HPLC system to optimize the scale-up process from 4.6 to 50 mm columns, *LCGC Europe*, **2013**, *26*, 315-315
15. Dolan, J.W., Making the Most of a Scouting Run, *LCGC North America*, **2013**, *Volume 31, Issue 1*, 30-35
16. Penduff, P., Analytical to Preparative HPLC Method Transfer (从分析型到制备型 HPLC 的方法转换, *安捷伦科技公司技术概览*), 出版号 5991-2013EN, **2013**

