

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

目录

1	引言	4
2	前言	5
3	作者简介	6
4	符号与缩写	8
5	制备型液相色谱简介	10
5.1	区分分析型与制备型液相色谱	10
5.2	设置化合物纯化的优先级	11
6	色谱柱选择的关键因素	13
6.1	选择分离柱	13
6.2	选择大规模制备柱	15
7	制备型液相色谱系统的组成	18
7.1	溶剂输送	19
7.2	样品引入	21
7.3	分流	36
7.4	检测	38
7.5	馏分收集	41
7.6	回收收集	55
7.7	系统注意事项	56
8	放大策略^[8-10]	61
8.1	采用分析型色谱作为放大工作的起始点	61
8.2	从分析柱线性放大为制备柱的公式	63
8.3	通过聚焦梯度提高效率 ^[11-14]	66
8.4	介绍整个放大工作流程 ^[15]	70
9	制备型液相色谱实践指南与详细规程	74
9.1	SAC/DAC 色谱柱的装填流程	74
9.2	测定系统驻留体积	78
9.3	测定色谱柱死体积	80
9.4	平衡色谱柱和优化流速	84
9.5	色谱柱过载	87
10	参考文献	92

1 引言

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产物中分离化合物。需要利用纯化技术的其他情形包括（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，最初人们开发液相色谱方法就是为了分离纯化化合物，它推动了分离科学在二十世纪的发展，与天然产物和新合成途径的开发密不可分。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，而是有了一整套完备的理论体系作为坚实基础，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：要使少数几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指导的常规系统用户文档之间建立桥梁。

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的相关概念，其为液相色谱方法开发的一部分。

在此，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则和优先级。因此，我们希望本基础导论能为关注化合物高效纯化的人士提供帮助。

2 前言

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，讨论了馏分收集的策略，并提供了一些针对常规纯化任务的实用解决方案。

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。

3 作者简介



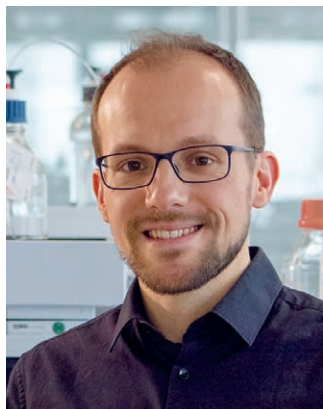
Helmut Schulenberg-Schell 博士

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，他的工作主要着重于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 博士

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。他的职业生涯从一家市场领先的科学仪器制造商开始，曾从事 LC/MS 和 GC/MS 系统的技术支持、应用支持、销售与营销工作。在担任应用科学家的这些年中，他参与了实现药物化学实验室中质谱触发的自动化纯化的解决方案开发。2011 年，Andreas 加入安捷伦，担任制备型色谱系统的产品经理。在这一工作中，他负责新模块和自动化软件的设计。他后来成为小分子制药行业市场经理，现在管理安捷伦的客户成功产品组合。



Florian Rieck 博士

Florian Rieck 毕业于德国卡尔斯鲁厄理工学院 (KIT)，获食品化学硕士学位和分析化学博士学位。在其博士研究期间，他对新型具有潜在生物活性的植物代谢物进行检测和鉴定，获得了制备型液相色谱的初步经验。Florian 于 2015 年加入安捷伦科技公司，开始在德国瓦尔德布隆担任液相色谱应用化学家。Florian 最初从事一般液相色谱应用项目工作，很快专注于制备型液相色谱和质谱触发的纯化应用。



Ronald Guilliet

Ronald Guilliet 在荷兰弗里辛根的应用科学大学接受了分析化学专业教育。他的职业生涯从科学仪器制造商开始，曾从事 HPLC 色谱柱的生产和市场推广工作。后来，他的兴趣集中在大规模（工艺）纯化上。作为业务开发经理和销售专员，他对制药大规模工作流程有了全面了解，尤其是在印度和亚洲，他成功地提供了全套解决方案。Ronald 于 2010 年加入安捷伦，担任制备型色谱和超临界流体色谱产品经理。在其职业生涯的这一阶段，他负责 Agilent InfinityLab 液相色谱纯化产品组合的设计。

4 符号与缩写

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_λ	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
p_A	分析型系统的色谱柱粒径 [μm]
p_P	制备型系统的色谱柱粒径 [μm]
t_R	保留时间 [s]
$t_{D,A}$	分析型系统的驻留时间 [s]
$t_{I,A}$	分析型系统通用梯度的初始保持时间 [s]
$t_{c,A}$	分析型系统的过柱时间 [s]
$t_{D,P}$	制备型系统的驻留时间 [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]
$V_{D,A}$	分析型系统的驻留体积 [mL]
$V_{c,A}$	分析型系统的色谱柱死体积 [mL]
$V_{D,P}$	制备型系统的驻留体积 [mL]
$V_{inj,A}$	分析型系统的进样量 [μL]
$V_{inj,P}$	制备型系统的进样量 [μL]
w_h	半峰宽 (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	二甲基亚砷
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

制备型液相色谱原理与实践

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

制备型液相色谱

5 制备型液相色谱简介

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。

5.1 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分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，它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技术，用于从混合物中分离和提取一种或多种目标化合物。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。

5.2 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）收集时，可采用极低流速（纳升或微升范围内）的制备型液相色谱，这种技术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 100–500 mg。在重要的制药实验室中，通常每套系统每天要纯化 50–100 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，否则不可能单独优化各个纯化参数^[1-4]。

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纯化。需要重复纯化大量的同一种化合物时，值得彻底优化调整工艺流程。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，并通常手动控制馏分的收集。纯化的化合物通常很昂贵，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高收益商业模式的必备条件。

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 3–5 μm 颗粒甚至亚 2 μm 颗粒的 4.6 \times 150 mm 色谱柱，且色谱条件应与典型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，必须从大体积的稀释样品（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。

6 色谱柱选择的关键因素

制备型液相色谱纯化操作的第一步是分析型分离。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。

6.1 选择分离柱

需要在特定时间内回收的纯物质质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规模。例如，如果分析柱的规格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规模。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，在需要定期纯化同一种目标化合物时更是如此。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，那么重复进样少量样品将是一种可行的解决方案。

图 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。

纯化范围 [mg]	分析型		半制备型		制备型	
	1-15	7-70	30-300	64-640	180-1800	400-4000
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

图 1. 对于常用的色谱柱尺寸，推荐的流速（单位 mL/min）和样品量一览（单位 mg）

通常，粗品的量可以为吸附剂重量 0.1%–1.0%。推荐值是基于密度为 0.6 g/mL 的反相吸附剂，适用于柱长或柱床长为 150 mm 的色谱柱。一根 21.2 × 150 mm 色谱柱中包含约 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 1 中的推荐值表明使用粒径 5–10 μm、内径 21.2 mm 的色谱柱能够满足这一要求，它能够使大多数纯化任务获得良好的结果。需要 50–250 mm 的柱长才可满足所需的进样量。选择合适长度的 21.2 mm 内径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，则需要减少粗品进样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 $21.2 \times 100 \text{ mm}$ 色谱柱，可以从 4.6 mL/min 内径分析柱的典型分析流速放大至 21 mL/min ，这个数字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。

6.2 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因为受到不断变化的压力、流速、温度或其他洗脱液特性等色谱条件，趋向于随时间不断沉降。如果色谱柱未经妥善、谨慎处理，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成紧实的填充床，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，压杆被锁扣固定于稳定的位置。相比之下，动态轴向压缩 (DAC) 则在色谱柱装填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 $5\text{--}10 \mu\text{m}$ 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 Agilent 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。

相比之下，对于 $10 \mu\text{m}$ 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 \AA 填料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”。其他例子包括不规则形颗粒或生物应用中的易碎凝胶。



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

当所需的化学键合相可以散装形式得到时，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 Agilent Load & Lock 色谱柱简单易学，稍加练习就可获得每米 30000 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），Agilent 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。

6.2.1 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，一套系统可用作内径为 1、2、3 英寸的三种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，其通过气动恒压液压泵控制。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、液压缸、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与色谱柱同轴垂直安装的单个液压缸。但是，在平行于色谱柱轴的色谱柱两侧安装两个液压缸更加有利，这样的配置便于使用直径较小的液压缸并降低缩回状态的总高度。在地面空间和门的尺寸有限制的实验室环境中使用和操作此类大尺寸设备时，系统的移动性和降低高度的设计是重要的考虑因素。

6.2.2 装填 SAC/DAC 柱

根据柱床物理长度或所需的吸附剂量，可采用不同的方法装填 Agilent 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，该法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抽吸除去溶剂。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 1 中。

表 1. 吸附剂床层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）

	色谱柱内径		
	1 英寸 (27 mm)	2 英寸 (50 mm)	3 英寸 (75 mm)
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

7 制备型液相色谱系统的组成

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。溶剂输送系统利用溶剂瓶中所包含的溶剂生成洗脱液混合物。要达到高流速，溶剂供给部分需要进行大量的投资。出于安全考虑，大量溶剂通常储存在实验室以外的地方。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，而反压保持在极低水平。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。

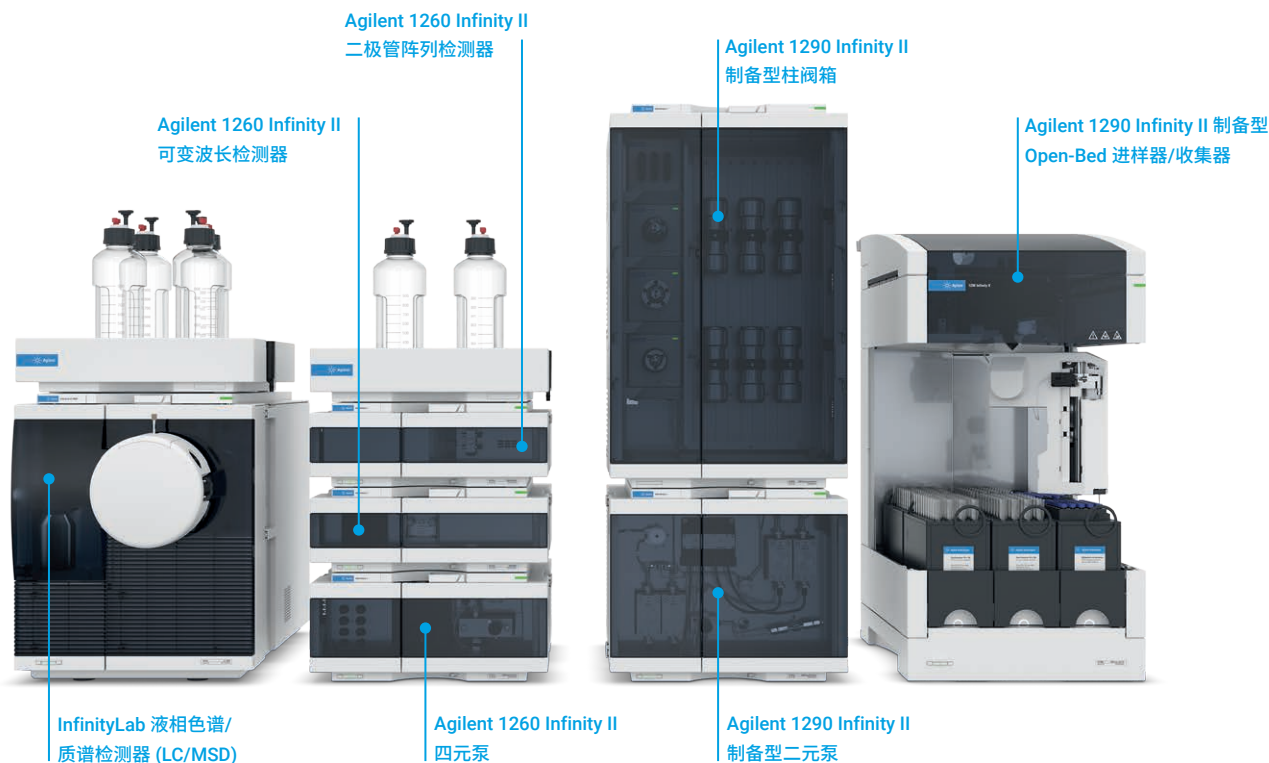


图 3. Agilent 1290 Infinity II 自动制备型 LC/MSD 系统

7.1
溶剂输送

7.1.1 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驻留体积较大且存在脱气问题，两者均可导致梯度性能变差。



图 4. Agilent 1290 Infinity II 制备型二元泵

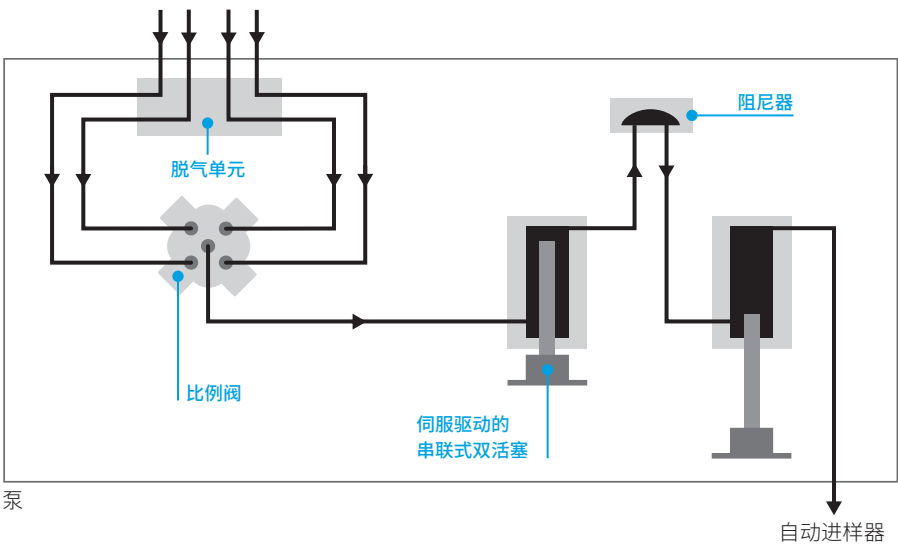


图 5. 用于低压梯度混合的溶剂输送系统的示意图，显示了脱气单元、比例阀和泵腔

7.1.2 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反压调节阀所引起的反压可防止检测过程中气泡排出。

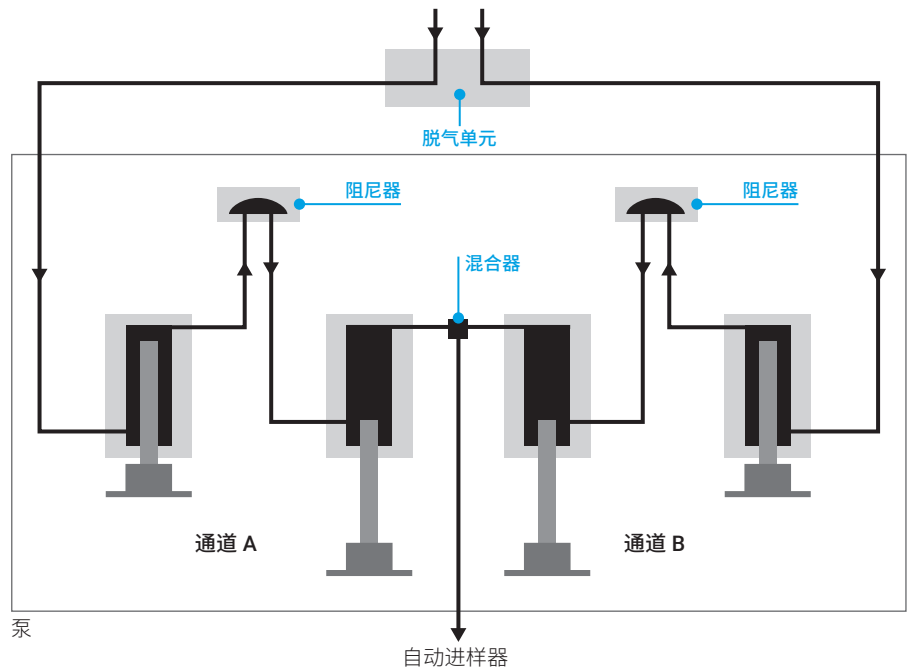


图 6. 用于高压梯度混合的溶剂输送系统的示意图，显示了用于生成二元洗脱液梯度的两个溶剂通道

7.2
样品引入

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定量环。

7.2.1 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，将样品定量环注满时通常不会损失样品。但是，该设计的缺点是样品定量环和计量装置的尺寸带来的驻留体积较大。这个不足在分析型与制备型进样模式之间切换时非常突出。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 8 显示了洗脱液流过进样针到达色谱柱的过程。

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驻留体积。但是，切换为旁路模式即可缓解这个难题，如下文所述。



图 7. Agilent 1290 Infinity II 制备型 Open-Bed 进样器/收集器

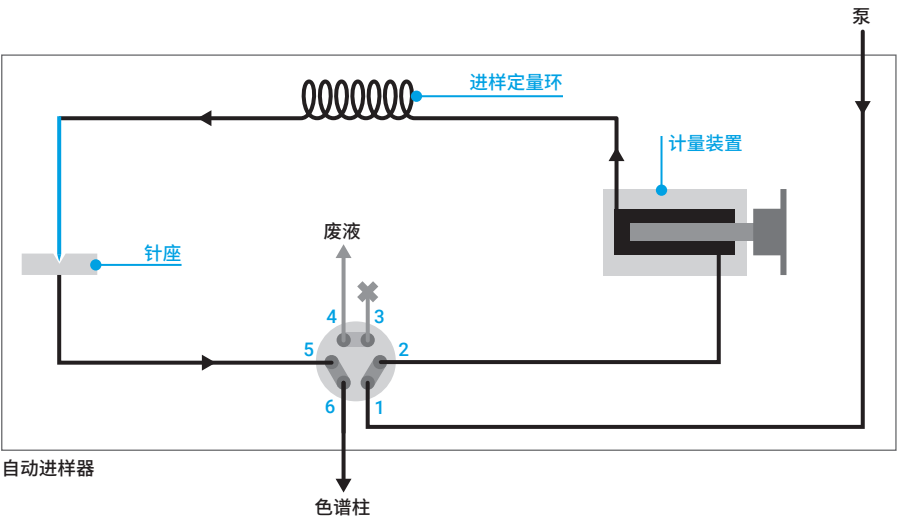


图 8. 当自动进样器处于主通道时，泵送的洗脱液流过切换阀、计量装置、进样定量环、进样针和针座，然后再经过阀到达色谱柱

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、进样定量环和进样针不在进样前处理流路中，参见图 9。

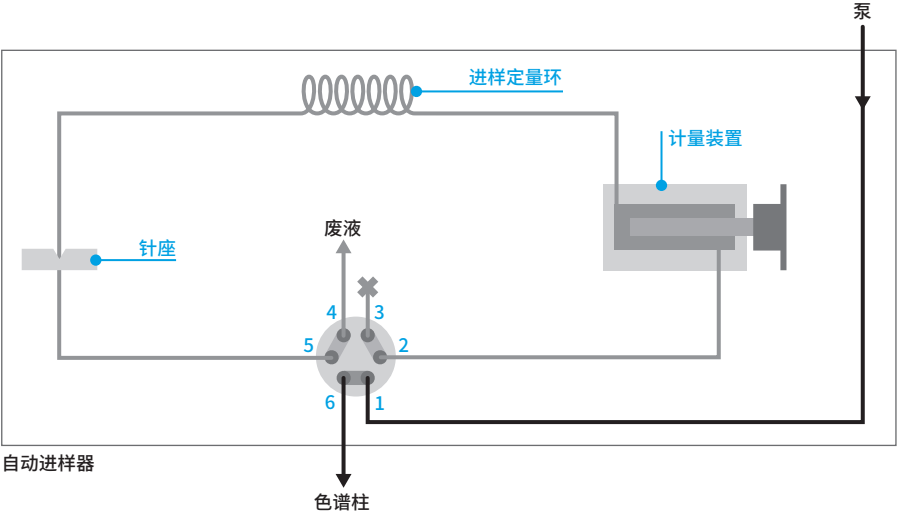


图 9. 当自动进样器处于旁路模式时，泵送的洗脱液流直接转移到色谱柱，取样不经过计量装置和进样针

切换到流路之外后，将进样针从针座中提起并降入样品容器中。抽回计量装置的柱塞杆，使样品经过进样针进入进样定量环中，参见图 10。

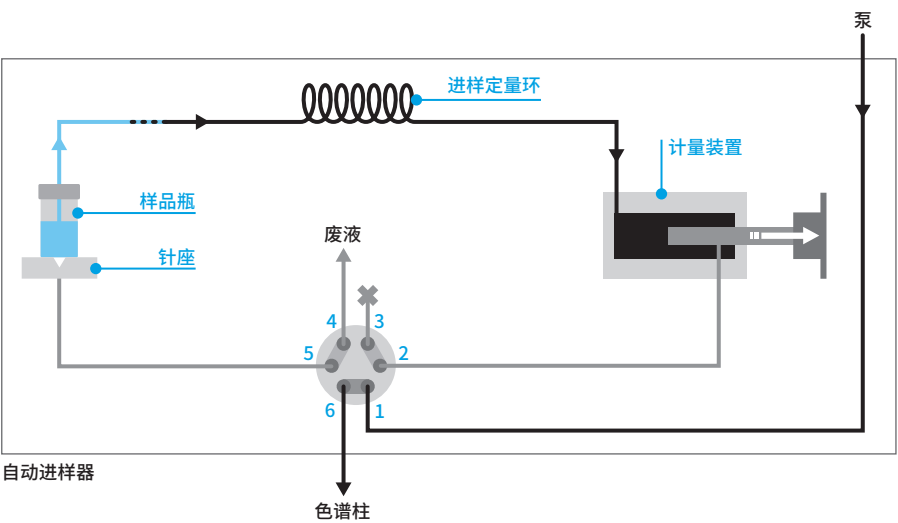


图 10. 抽取样品，使其经过进样针进入进样定量环中

向进样定量环中转移所需量的样品后，将进样针从样品容器中提起并降至针座上。这时使切换阀返回“主通道”，将样品从定量环中输送出去，经过进样针到达色谱柱，参见图 11。

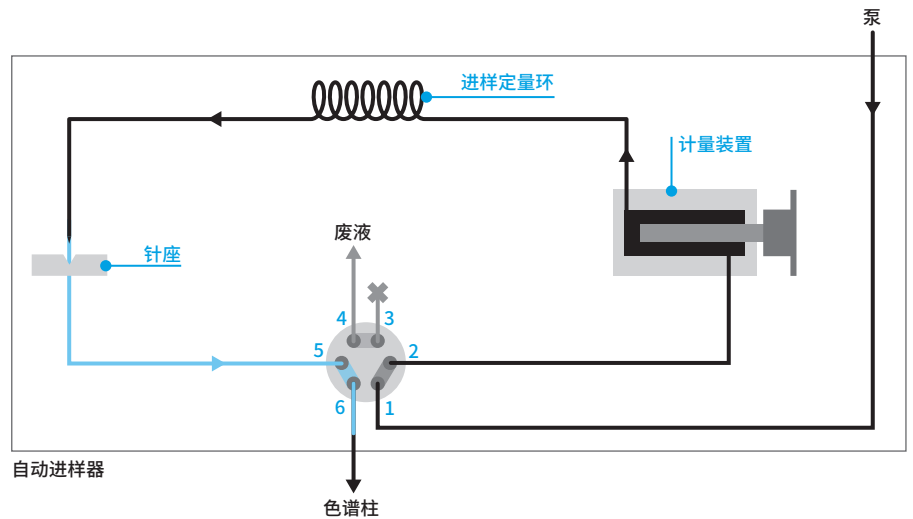


图 11. 切换回主通道，将样品输送到色谱柱中

为减小驻留体积，我们建议将样品转移到色谱柱后立即返回旁路模式。某些仪器提供进样器程序或方法选项，以在一定的冲洗时间后切换到旁路；其他仪器则没有这些功能。在任何一种情况下，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都是非常重要的。

7.2.2 采用固定定量环设计的自动进样器

与要求采用分析型和制备型进样量的系统（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定量环尺寸将会对驻留体积产生重要影响。具有较大驻留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定量环的固定定量环自动进样器可以解决这一难题。切换阀用于构建分离的分析型流路与制备型流路。

大多数此类仪器被设计为在填充分析型定量环时，制备型流路充当旁路，反之亦然。但是，某些仪器会提供特殊的阀设计，并为两个流路提供专用的旁路位置。当针对定量环体积和内径优化分析型和制备型流路时，后一种设计提供了更高的灵活性 — 消除了在高流量期间从制备型模式中的主通道切换为旁路时的过压风险。

采用固定定量环自动进样器时，样品定量环可以部分填充或过量填充，参见图 12 和图 13。部分填充样品定量环是最常用的方法。由于 Taylor 扩散，辅助溶剂与样品之间的界面将不平坦，而是呈抛物线型。因此，我们建议不超过标称定量环体积的 60%。进样量接近定量环容量时，可能导致样品从定量环另一端流出，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。

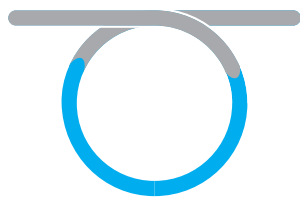


图 12. 部分填充样品定量环

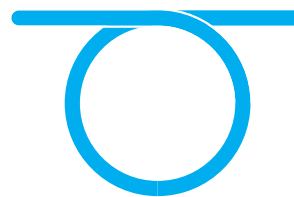


图 13. 过量填充样品定量环

最大程度减小 Taylor 扩散的一种方法是在辅助溶剂和样品之间使用空气栓。毛细管内的气-液界面将是平坦的，这将使制备型样品定量环的可用体积扩展至其标称体积的 75% 以上。

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。

由于定量环是毛细管系统的组成部分，因此驻留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定量环体积，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。

分别具有分析型流路与制备型流路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液相色谱。双定量环设计能够最大程度减小进样系统的总驻留体积，便于在样品纯化之前以最佳的分离效率完成分析筛选。

固定定量环自动进样器的设计采用以下两种方法之一来抽取样品并将其传输到定量环中，即所谓的“推入式”和“吸入式”原理。由于针尖与计量装置之间的流路并非高压流路的一部分，因此这两种原理都需要用辅助溶剂填充进样流路。

图 14 显示了推入式原理。对于制备级进样，将阀切换至制备型旁路，从而将分析型定量环移至高压流路。将进样针降至样品瓶中。计量装置吸取样品，使其通过进样针进入进样定量环中。

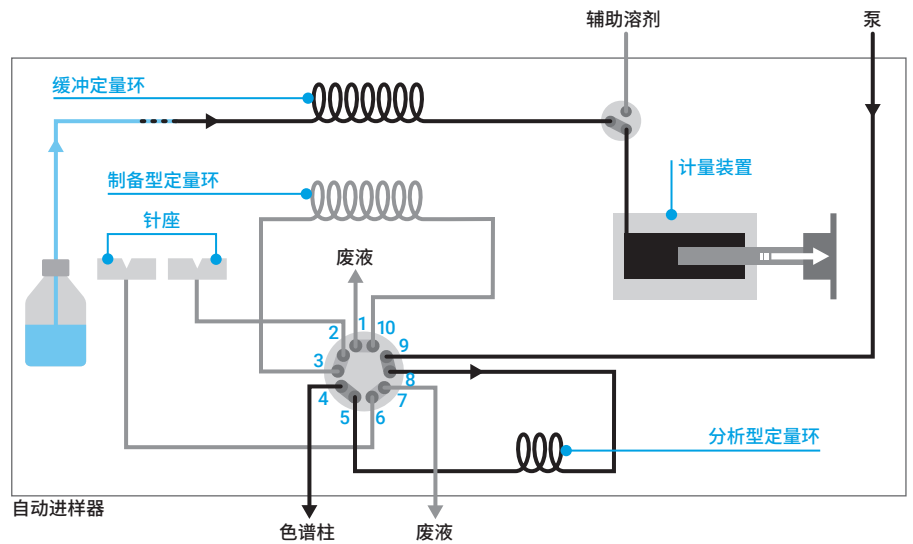


图 14. 根据推入式原理抽取样品进入固定定量环自动进样器中

将样品吸入进样定量环中后，将进样针从样品瓶中提起，移开样品瓶，并将进样针降至针座上。这时计量装置将样品推出进样定量环，经过进样针和针座并进入制备型样品定量环，参见图 15。

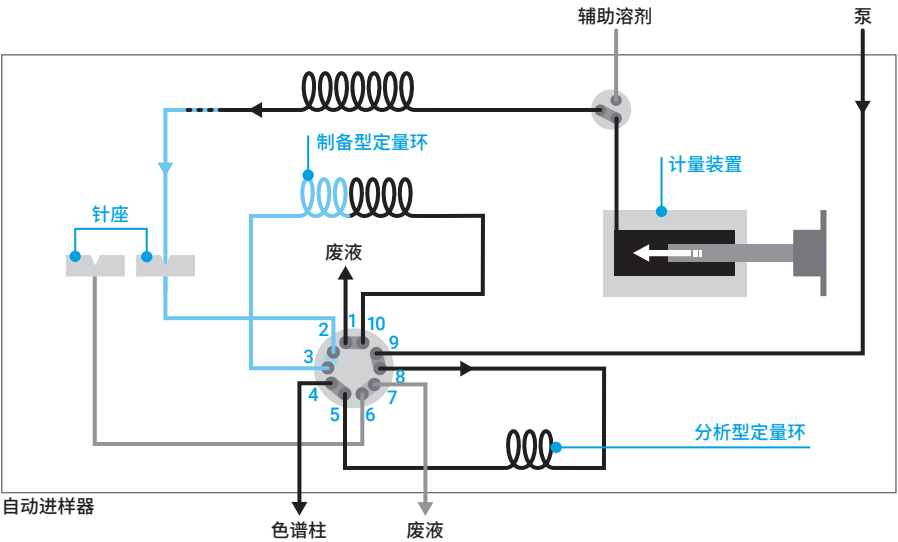


图 15. 将样品推入制备型样品定量环中

移动切换阀返回制备型主通道，将样品从制备型定量环中输送出去并进入色谱柱，参见图 16。

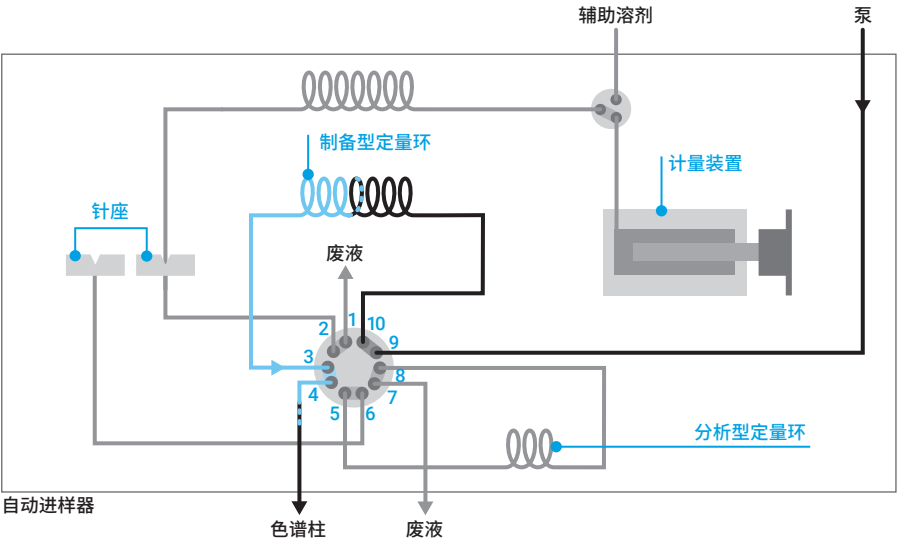


图 16. 将切换阀切换回制备型主通道，将样品从定量环中输送出去并进入色谱柱

从原理图中可以清楚地看到将这一原理称为“推入式”的原因：计量装置首先将样品吸入进样定量环中，然后将其通过针座推入样品定量环中。这一两步过程的缺点在于，两个流路中的每一个流路都需要专用针座。另一方面，吸入式原理则没有这个缺点。

与推入式仪器相比，按吸入式原理工作的固定定量环自动进样器采用与高压流路分离的进样流路概念。但是，进样针和计量装置并非直接连接，而是仅通过进样阀连接，参见图 17。

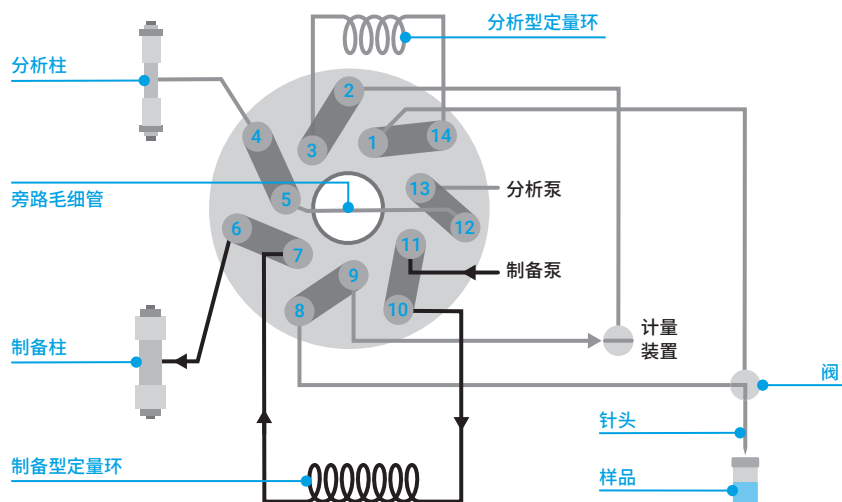


图 17. 处于制备型主通道位置的吸入式自动进样器。洗脱液从泵通过定量环流到色谱柱。但是，进样针和计量装置并非流路的一部分

在吸入式进样过程中，阀切换至旁路，进样针移入样品瓶中，且计量装置将样品通过进样针和阀抽入制备型定量环中，参见图 18。

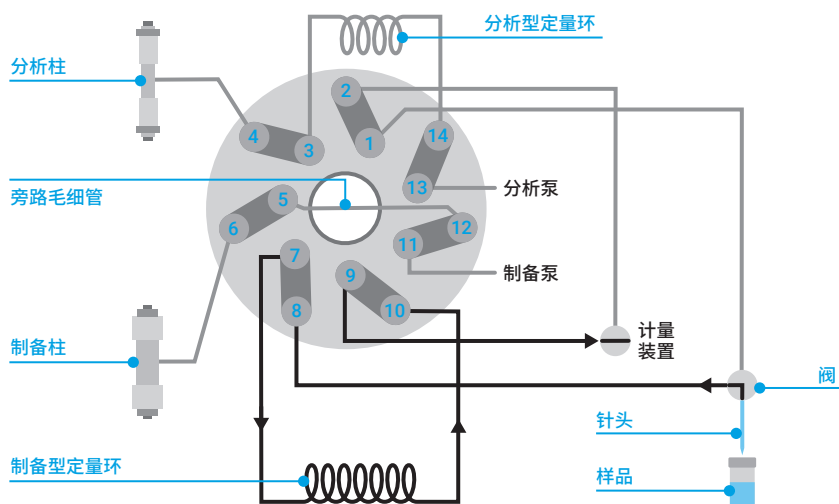


图 18. 在吸入式自动进样器的制备型旁路位置抽取样品

抽取样品后，将进样针从样品瓶中移出，计量装置继续抽取样品，直至进样针、针管线和阀槽的内容物输送到定量环中。阀切换到主通道，将制备型回路移至高压流路，样品在此处被输送到色谱柱，参见图 19。

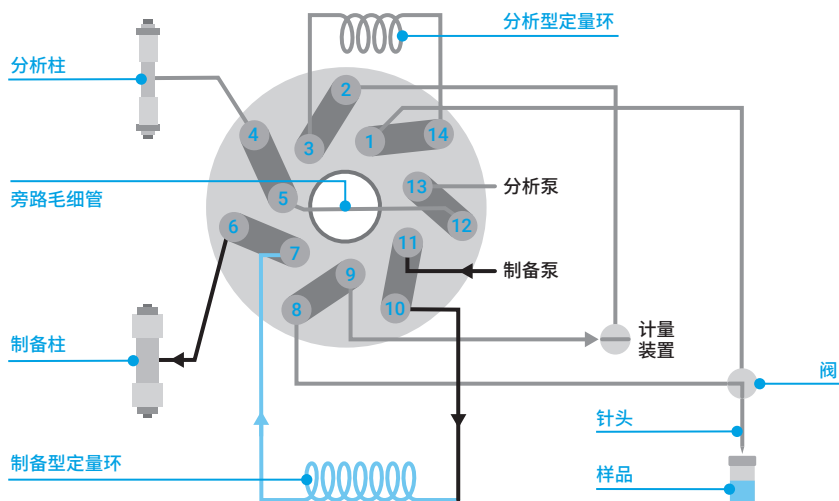


图 19. 将阀切换回制备型主通道位置，将样品输送到制备柱中

采用固定定量环自动进样器时，利用经过充分脱气的辅助溶剂冲洗进样定量环和针管线至关重要，清洗进样针外表面至少 10 秒也同样重要。此操作过程可避免进样之间发生样品交叉污染，并可防止气泡在定量环中积聚。

在制备型色谱中，清洗进样针和管线内部对于最大程度提高样品回收率至关重要。高浓度样品，特别是非极性样品，往往会粘附到管线的内壁上。在样品之后抽取纯溶剂并输送至样品定量环中，将收集样品残留物并提高回收率，参见图 20。某些自动进样器提供了专用的方法设置，以加入这些样品后溶剂栓或样品定位栓。另一种类型的溶剂栓用于进样强溶剂中溶解的高浓度样品。在下一节中了解这些特殊的进样技术。

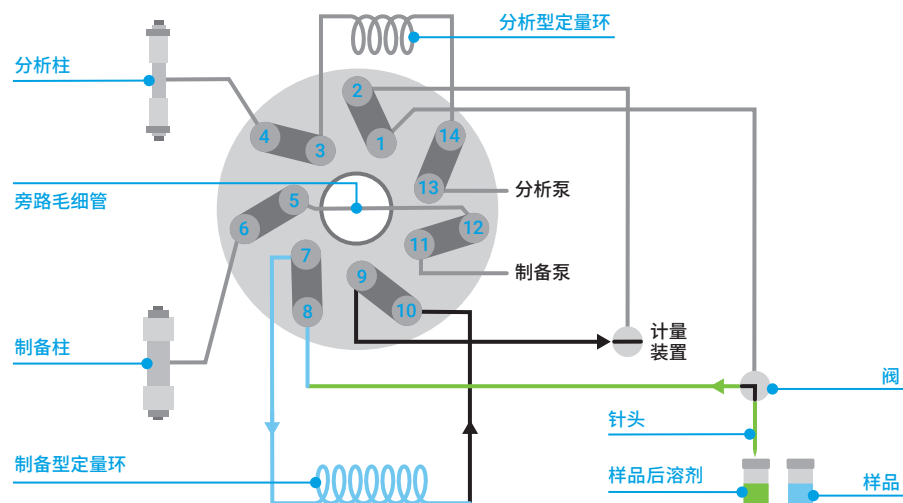


图 20. 在样品之后抽取样品后的纯溶剂栓，以将粘性残留物传输到样品定量环中

7.2.3 特殊进样技术

化合物溶解性、样品前处理或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，必须开发特殊的进样技术。

夹层式进样

在样品接触流动相起始组成后容易发生沉淀的情况下，可以采用夹层进样技术。这种技术可能有助于避免进样针、阀和毛细管的堵塞。通过对自动进样器进行程序设定，样品可嵌入（“夹”）在两个溶剂栓之间，以免在样品定量环中发生沉淀，参见图 21。可采用 DMSO 或与水不混溶的溶剂。对于分析进样，为保持色谱性能，注入的 DMSO 体积应尽可能地小。我们建议使用两个 5 μL 的溶剂栓。作为针对制备进样量的一条经验法则，建议溶剂栓总体积约占总进样量的 10%。

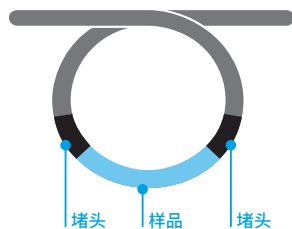


图 21. 在样品两侧使用适当溶剂作为溶剂栓的夹层式进样的示意图，该进样方式可避免样品在样品定量环或连接毛细管中发生沉淀

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。

如果所需的体积需要超过给定色谱柱尺寸的最大进样量（表 2），我们建议进行有机相进样：将进样器与有机泵通道连接，将样品注入纯有机溶剂中，并在进入色谱柱之前直接用水性溶剂对其进行稀释。

表 2. 强溶剂的推荐进样量。超出最大进样量时，色谱性能将受到影响。部分样品可能会随着或部分初始溶剂峰被洗脱出来

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
推荐的进样量 [μL]	2	10	100	500	1000	2000
最大进样量 [μL]	5	20	200	1000	2000	3000

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 通道以至少总流量 5% 的流速进行输送。补充百分比的水通过通道 A 进行输送，并通过 T 形管进行添加，参见图 22。

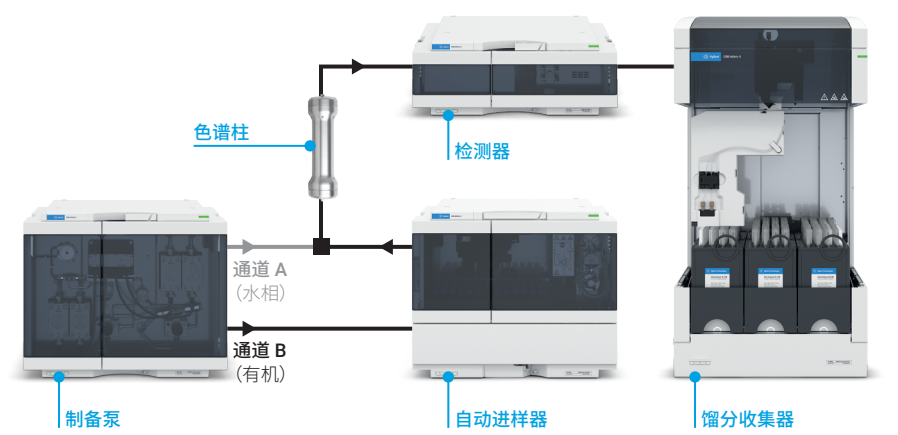
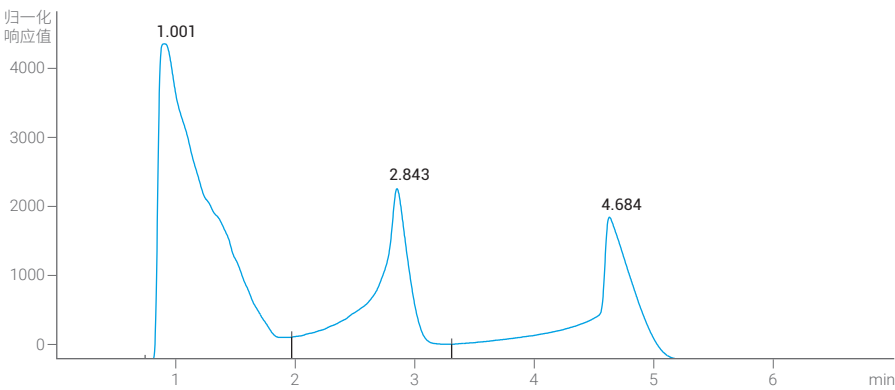


图 22. 用于有机相进样的系统配置的示意图

采用如图 22 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至关重要。

进样后，建议在样品转移到色谱柱上以及样品溶剂冲出色谱柱之前保持洗脱液组成不变（等度保持）。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的压力波动。加载过程非常平稳，延长了色谱柱使用寿命，同时增加了柱容量以及色谱分离度。

图 23 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，使用另一种有机相进样模式时，极性化合物聚焦于柱上，不会发生样品损失，参见图 24。

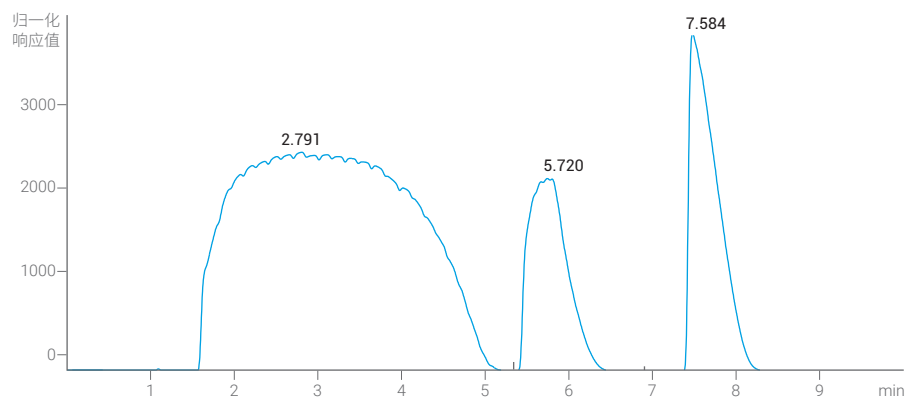


样品： 50 mg 对乙酰氨基酚和 50 mg 咖啡因，溶于 5000 μ L DMSO 中
色谱柱：Agilent ZORBAX SB C18, 21.1 \times 150 mm, 5 μ m

标准进样模式下应用的梯度曲线：

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 23. 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发生变形。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 对乙酰氨基酚和 50 mg 咖啡因，溶于 5000 μ L DMSO 中
色谱柱： Agilent ZORBAX SB C18, 21.1 \times 150 mm, 5 μ m

用于有机相进样模式的梯度曲线 – 在梯度升高之前，需要更长时间的等度保留步骤才能将样品转移至色谱柱：

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

图 24. 在有机相进样中，使用强洗脱液进行大体积进样。除非将 DMSO 冲洗出色谱柱，否则会观察到宽溶剂峰。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。未观察到样品损失

使用进样泵实现大体积样品的进样

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定量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。为避免样品交叉污染，将样品转移到色谱柱后，很有必要冲洗进样泵、阀和所有毛细管连接。

进样泵还可用于对映异构体分离等应用。在此，必须定期加载同一种样品溶液，这一操作通过进样位置和洗脱位置之间的阀切换来实现。图 25 显示了用于交替样品引入和洗脱的典型系统配置。

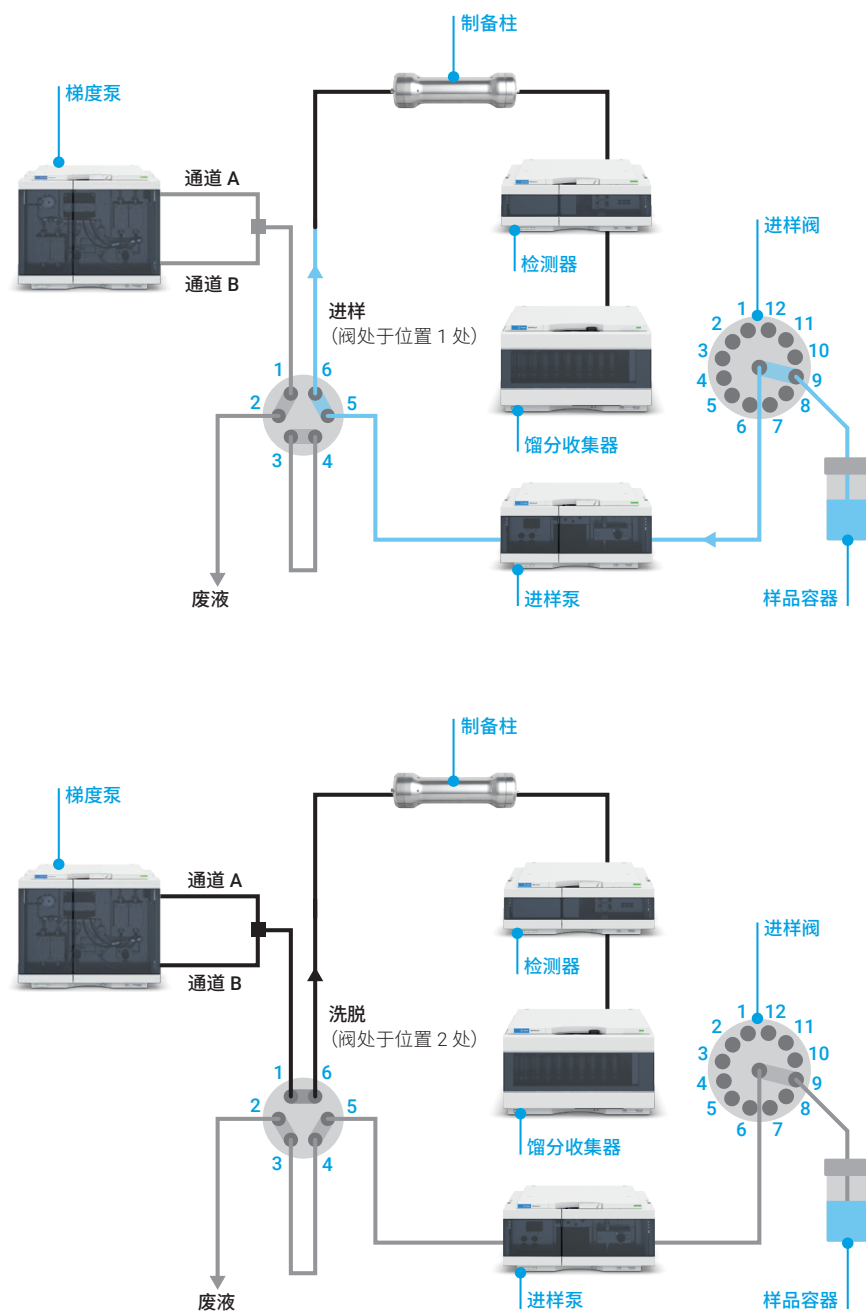


图 25. 使用进样泵和阀进行交替样品引入和洗脱的系统配置的示意图。阀处于位置 1 时，进样泵从容器中吸取样品并输送至色谱柱。在洗脱时，将阀切换到位置 2，以便将梯度泵流引向色谱柱

某些制备型二元泵具有内置的溶剂选择阀，可在单个模块内在样品引入与洗脱之间进行切换。然后，将一个水性通道用于洗脱液，另一个水性通道用于稀释样品，参见图 26。当使用此类泵进行样品引入时，从进样切换为洗脱将自动冲洗流路的关键部件：阀出口、泵头以及阀、泵头与色谱柱之间的连接。

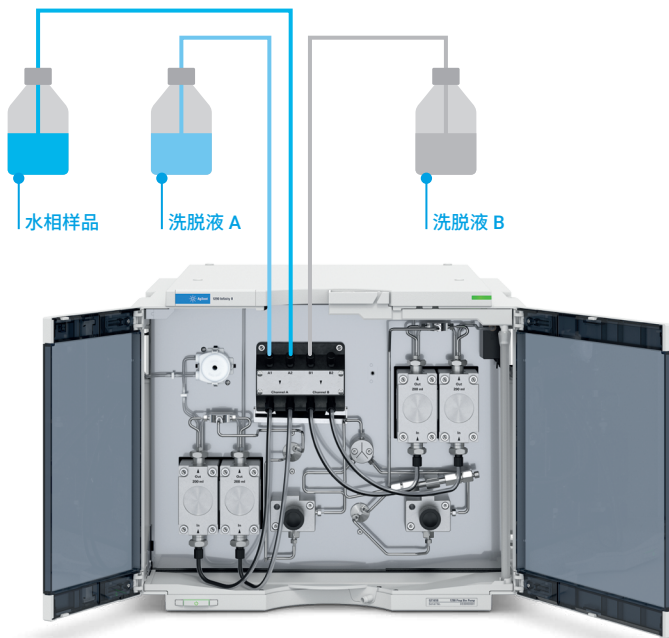


图 26. 由 Agilent 1290 Infinity II 制备型二元泵的内部溶剂选择阀实现交替进样和洗脱的示意图^[5]

7.3 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馏分收集器中。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，将液流的主要部分转移至馏分收集器，同时分流可根据检测器范围进一步稀释。可采用其他设计达到基本类似的目的。

7.3.1 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 27。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（如质谱检测器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。

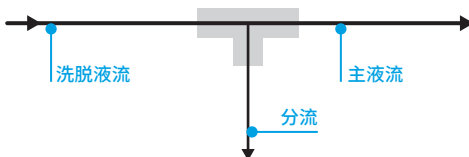


图 27. T 形管分流器 — 分流比由出口毛细管规格所产生的反压进行调节

分流比取决于主液流与分液流出口的反压比，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反压比，从而改变分流比。

7.3.2 双 T 形管分流

在制备级色谱中，化合物以及缓冲液的浓度通常过高，无法通过单个 T 形管分流器直接引入质谱检测器中。在这些情况下，需要用补偿溶剂稀释分液流，参见图 28。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。

质谱、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。

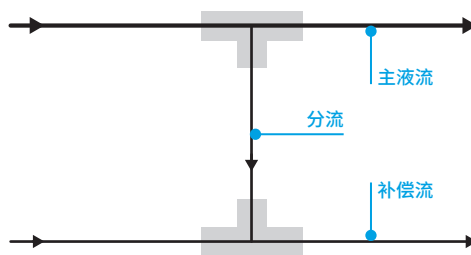


图 28. 双 T 形管分流器 — 在特殊检测技术需要补偿流的情况下使用。分流比由反压进行调节

在双 T 形管中，分流比取决于多个参数，主要取决于主液流与补偿流之间的压力差。在梯度洗脱中，流动相的粘度将随组成而变化，从而影响分流比。需要精心设置定制的双 T 形管分流器，并根据所用的流速通过实验进行调整。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。但是，由此获得的分流比仅为估计值，而非实际值。但是，使用这些 T 形管分流器可确保实时获得真实的分流效果，不会损失任何信息。

7.3.3 主动式分流

主动式分流器（例如 Agilent 1290 Infinity II 质谱流路调制器）（图 29）是将少量等分试样从主液流转移至分流的装置（通常为阀），参见图 30。



图 29. Agilent 1290 Infinity II 质谱流路调制器



图 30. 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、阀槽的体积和采用的液相色谱流速，参见公式 1。一些仪器制造商的软件根据流速计算可用的分流比，这有助于选择正确的频率和阀槽尺寸。

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

公式 1. 计算主动式分流器的分流比

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因素。某些质谱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动分流操作，能够延长分流器中转子密封垫的使用寿命。在色谱柱冲洗和平衡以及进样周期中停用分流器，从而延长预防性维护的间隔。

7.4 检测

液相色谱中最常用的检测技术基于紫外 (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)，参见图 31) 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 32 显示了二极管阵列检测器的光学系统。



图 31. Agilent 1260 Infinity II DAD-WR

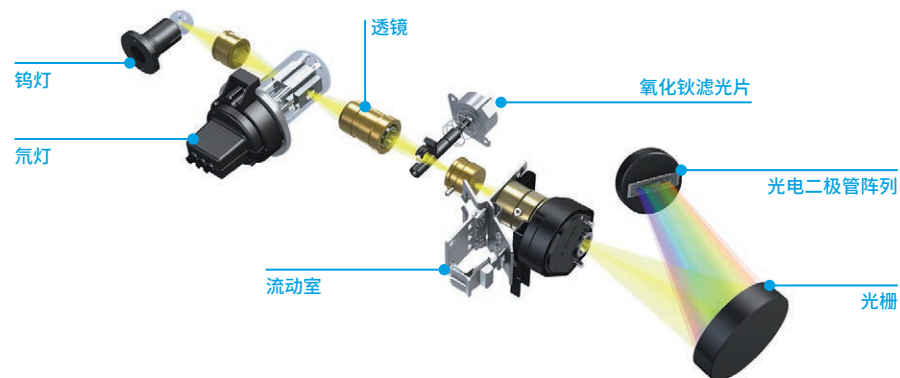


图 32. 二极管阵列检测器的光学系统示意图

二极管阵列检测器可提供紫外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 33 所示。在这个例子中，采用 220–620 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。

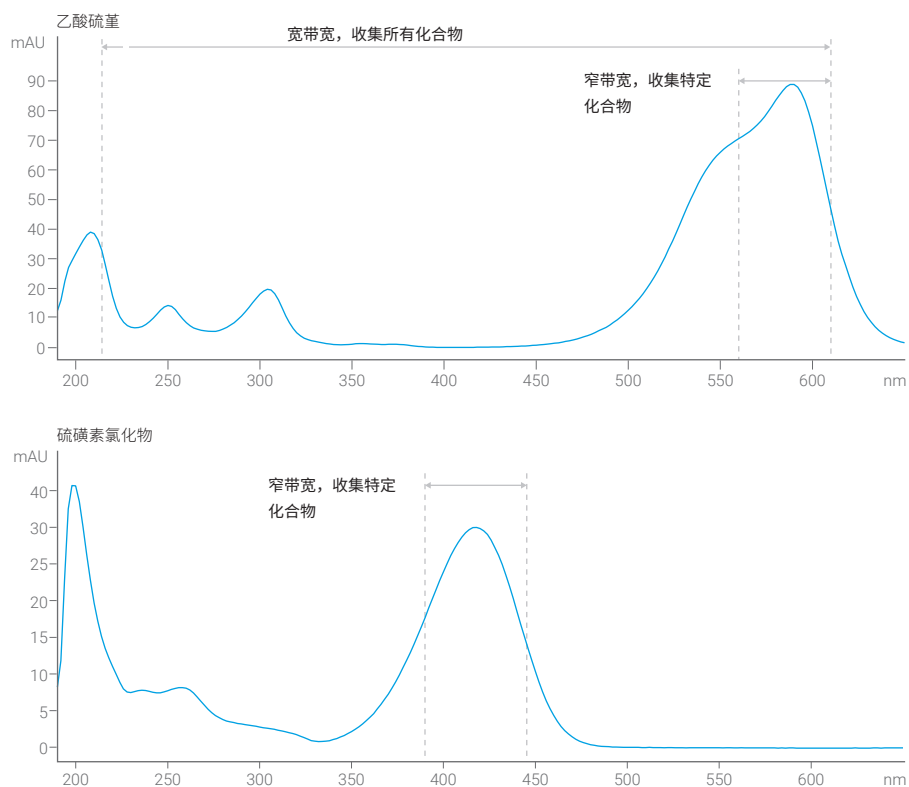


图 33. 两种具有不同紫外谱图的化合物。使用较宽的带宽进行数据采集有利于在一张色谱图中监测这些不同的化合物。而使用较小的带宽则只能选择性监测其中一种化合物

7.4.1 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。分析筛选过程中应能观察到杂质（即使它们具有较低的吸收系数）。相比之下，高纯度和高柱容量的目标化合物可能具有很高的纯度。

根据朗伯-比尔定律（见公式 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 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。但是在用于纯化的分析筛选中，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 1–3 mm 光程的流通池。采用内径 21 mm 的色谱柱的半制备型工作可通过 0.3 mm 的光程来实现。

对于在更大的色谱柱直径和更高的流速下使用的更大的样品量，我们建议采用 0.06 mm 的光程。

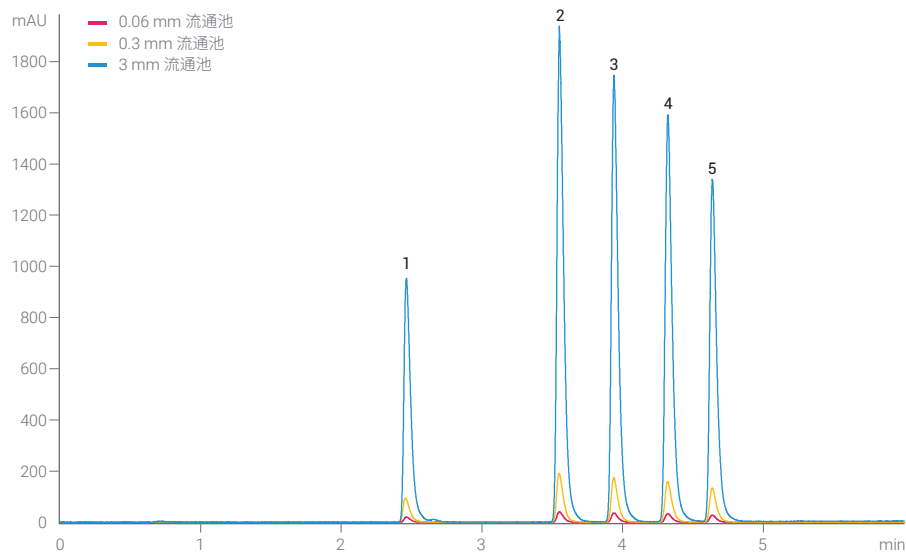


图 34. 光程较短的流通池会减小峰面积。1 咖啡因，2 尼泊金甲酯，3 尼泊金乙酯，4 对羟基苯甲酸丙酯，5 尼泊金苄酯

7.5
馏分收集

分析型液相色谱系统与制备型液相色谱系统之间的差异仅取决于是否存在馏分收集器，而与流速或泵规模无关。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指定的时间窗口中收集到所有相关馏分。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。基于选择性检测器信号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。

7.5.1 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首选方法。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。

7.5.2 基于时间收集馏分

一种简单的收集模式是采用固定时间或体积片段的基于时间的馏分收集。在该模式下，定期收集馏分，参见图 36。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 35. Agilent 1290 Infinity II 制备型 Open-Bed 馏分收集器

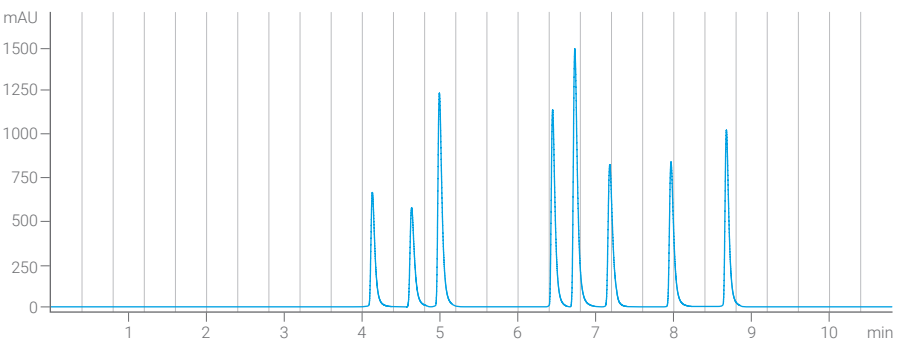


图 36. 基于时间的馏分收集：每 0.40 分钟收集一种新馏分

7.5.3 基于紫外检测收集馏分

当使用基于峰的馏分收集时，基于检测器信号（例如来自紫外或蒸发光散射检测器）收集化合物。信号阈值和信号斜率这两个参数可单独使用或结合使用以触发馏分收集。以下各节解释了何时以及如何使用这些参数。

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 37，其中显示了色谱图，可交互式设置馏分收集参数。

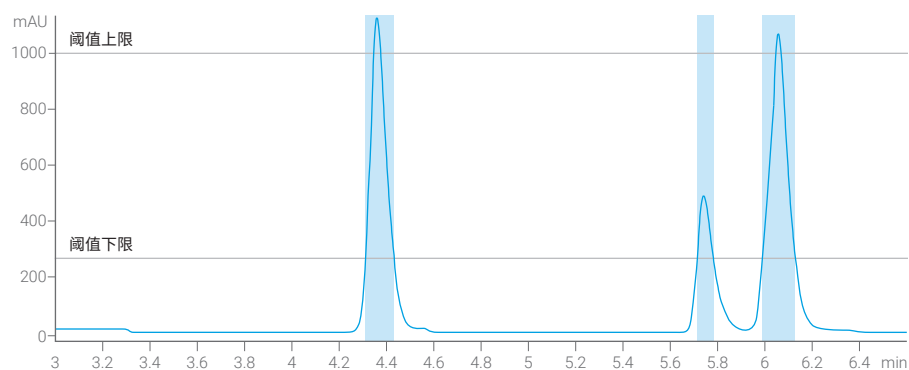


图 37. 馏分预览工具 — 交互式设置触发阈值和斜率参数

设置阈值水平

如果信号强度高于指定阈值，将启动馏分收集。当信号低于阈值时，停止馏分收集，参见图 38。

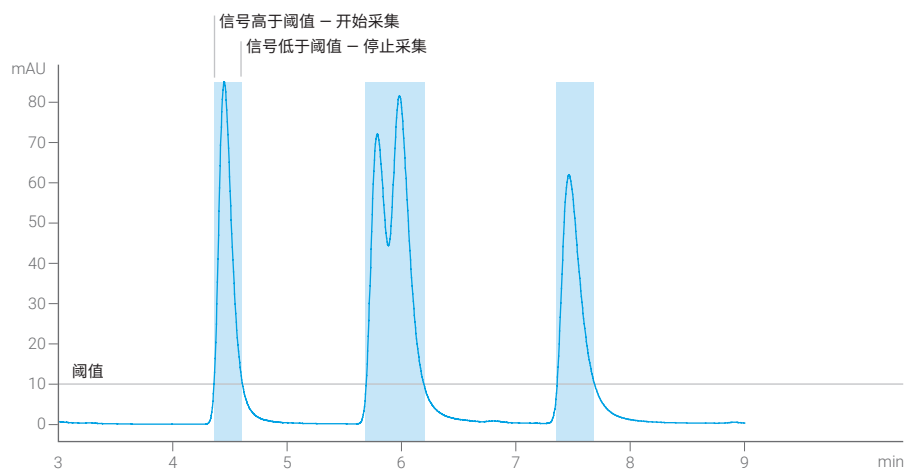


图 38. 由阈值设置触发馏分收集

设置斜率参数

色谱曲线的斜率可作为一阶导数进行计算，并是指示洗脱峰的合适的参数。在基线处，信号斜率为零。当峰洗脱时，一阶导数升高，直至达到峰的第一个拐点。沿峰的曲线到达顶点和第二拐点，一阶导数下降并变为负数。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 39。

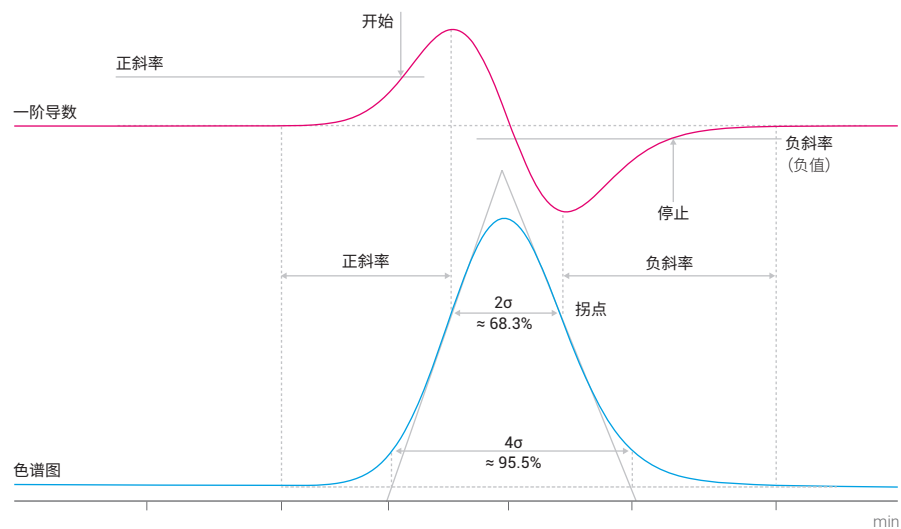


图 39. 使用色谱曲线的一阶导数进行斜率识别

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）时发生阈值假阳性触发。此外，这些设置可有助于分离分离度差的色谱峰：即使信号未降至定义的阈值以下，下降和上升的斜率也会触发新的馏分收集，参见图 40。

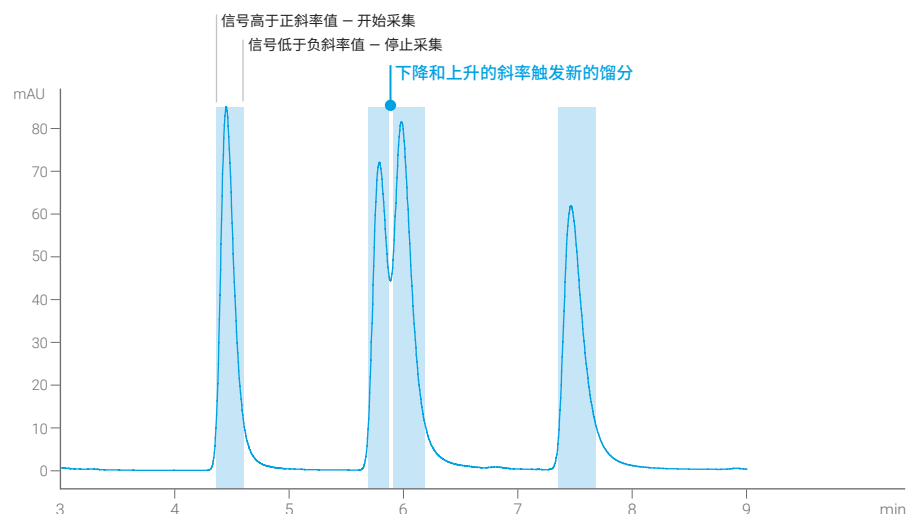


图 40. 由斜率设置触发馏分收集

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的以下触发：馏分收集器忽略了高于阈值上限的斜率变化，参见图 41。通常，将阈值上限设置为发生饱和前最大信号强度的 90% 左右。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。

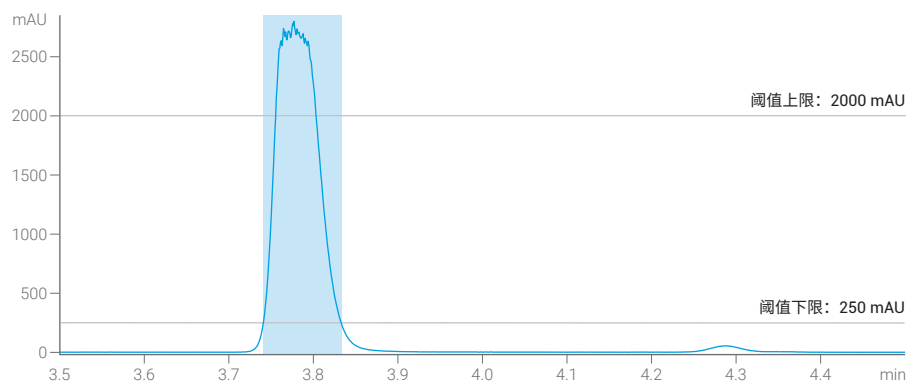


图 41. 阈值上限可避免发生检测器饱和时产生的虚假信号波动触发馏分收集

7.5.4 基于蒸发光散射检测收集馏分^[6]

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，参见图 42。已证实，ELS 检测是紫外吸收检测的一种有用的补充技术，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形。

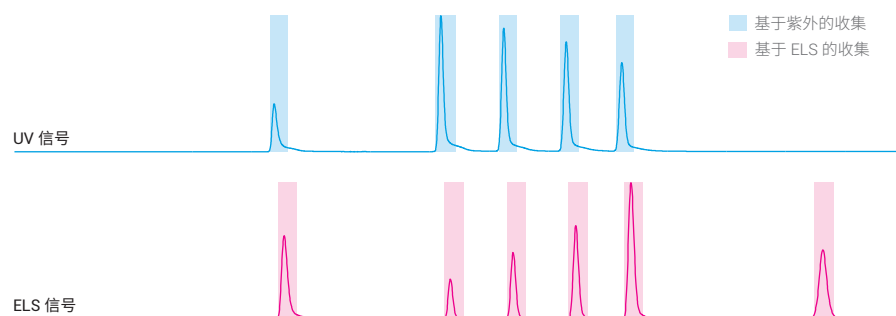


图 42. 基于紫外和 ELS 的馏分收集。在两个色谱峰检测器上均触发收集。蓝色区域表示由紫外检测器收集的馏分，红色区域表示由 ELS 检测器收集的馏分。如果互补 ELS 检测未触发馏分收集，则最后一种化合物将不会被检出并丢失

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。ELS 检测器的动态范围必须通过馏分收集器与 ELS 检测器之间的适当分流来得到满足，参见第 7.3 节“分流”。图 43 示出配备 UV 和 ELS 检测器的系统的相关流路。

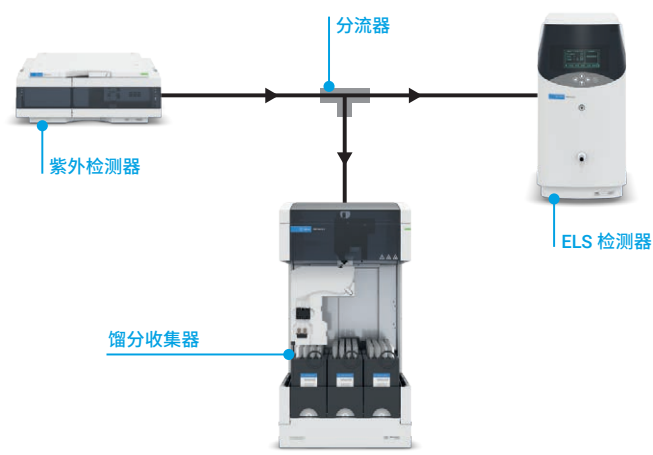


图 43. 使用补充性检测技术时，简单 T 形分流器的示意图

7.5.5 馏分延迟

激活基于峰的馏分收集后，系统需要处理检测器信号，以确定洗脱液是否转移到收集容器或废液瓶中，参见图 44。

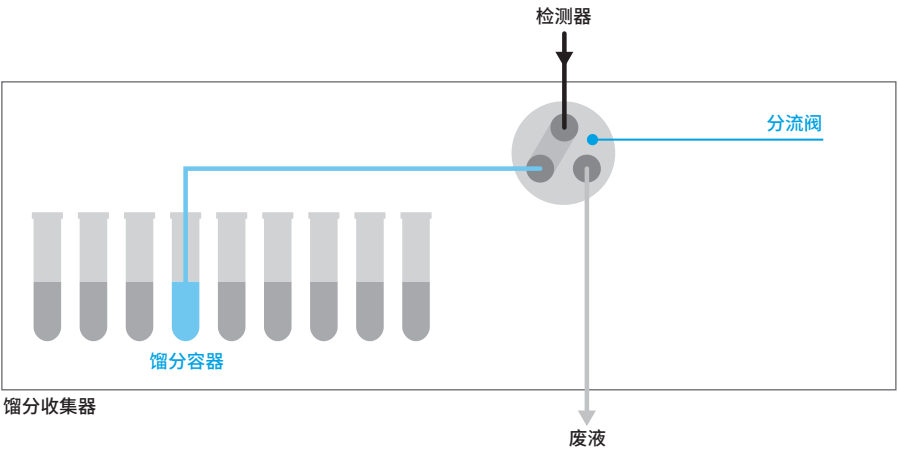


图 44. 馏分收集器的示意图，显示了基本的功能组件

在处理过程中，潜在馏分随主液流一起流过检测器流通池出口和馏分收集器中分流阀之间的管线。该管线的体积必须足够大以保留目标峰，直至系统确定是否切换到收集容器。做出该决定所需的时间取决于检测器的响应时间。在大多数基于 UV 的系统中，检测器与馏分收集器之间的延迟体积大于信号处理所需的延迟体积。

紧密延迟线圈

在配备质谱检测器的系统中，可能需要额外的延迟体积。为增加馏分延迟体积，仅仅增加检测器出口和馏分收集器入口之间的毛细管体积是不够的。由于 Taylor 扩散，峰形将在具有层流的直型毛细管中急剧恶化。因此，来自检测器的馏分开始和结束时间将无法代表馏分收集器中实际的峰开始和结束时间 — 馏分的很大一部分将丢失。

为防止毛细管中的抛物线型液流引起 Taylor 扩散，液流必须为湍流。这可以使用紧密延迟线圈来实现：狭窄的线圈使液流变成湍流，从而将峰扩散降至最低，参见图 45。

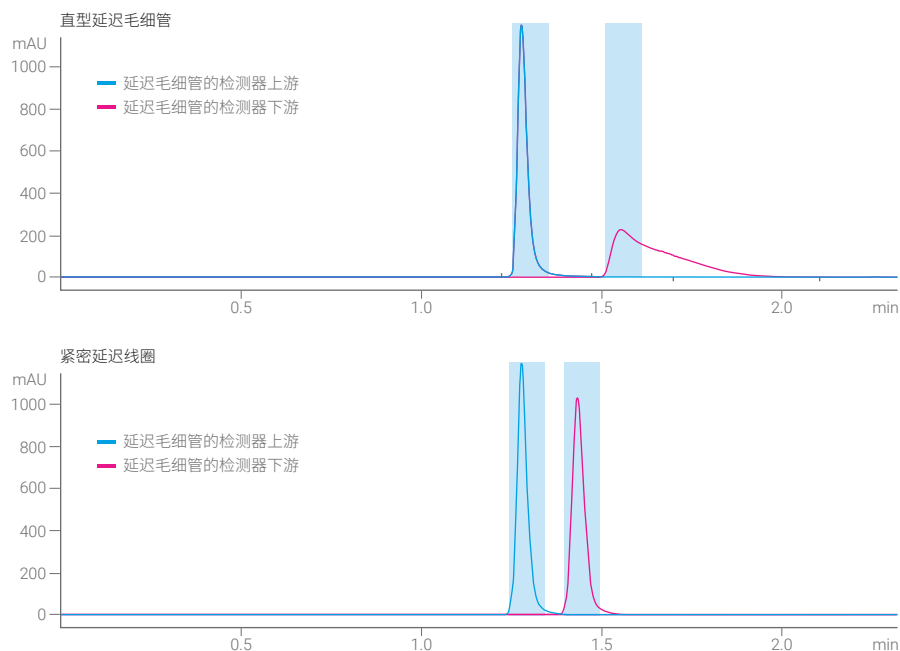


图 45. 直型和紧密延迟毛细管的比较。蓝色信号表示由紫外检测器检测到的化合物，该检测器处于延迟毛细管的上游。红色信号迹线由处于延迟毛细管下游的第二个紫外检测器记录，代表进入馏分收集器的相同化合物。由第一个紫外检测器定义的馏分触发窗口以蓝色突出显示，并复制到第二个检测器信号图中。由于存在峰扩散，在采用直型毛细管的情况下，样品损失将超过 50%

馏分延迟传感器

系统必须已知检测器出口和馏分收集器分流阀之间的体积，以测定检测和馏分收集之间的确切延迟时间。在大多数系统中，该体积必须基于毛细管长度进行计算，或者必须通过目视检查有色化合物以实验方式确定。这两种方法都不准确，其原因分别在于生产公差和人工操作误差。

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，参见图 46。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。

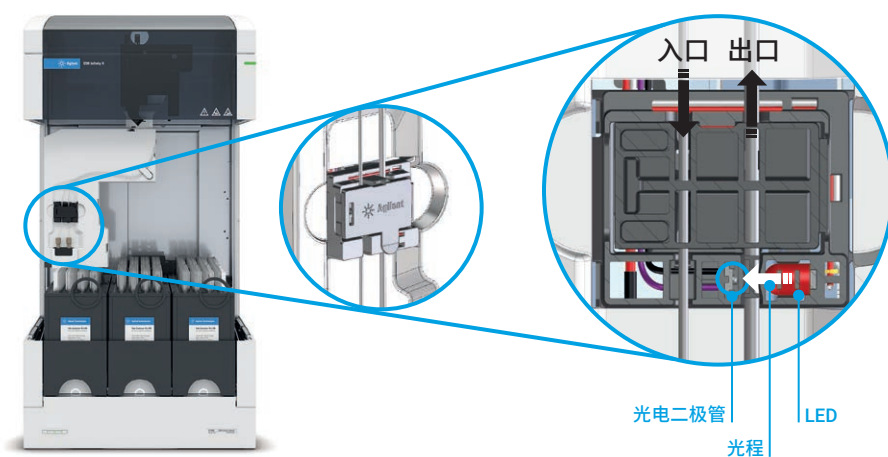


图 46. Agilent 1290 Infinity II 制备型 Open-Bed 馏分收集器中馏分延迟传感器的位置

通过泵所采用流速的反馈数据将测得的时间差转换为延迟体积，参见图 47。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。

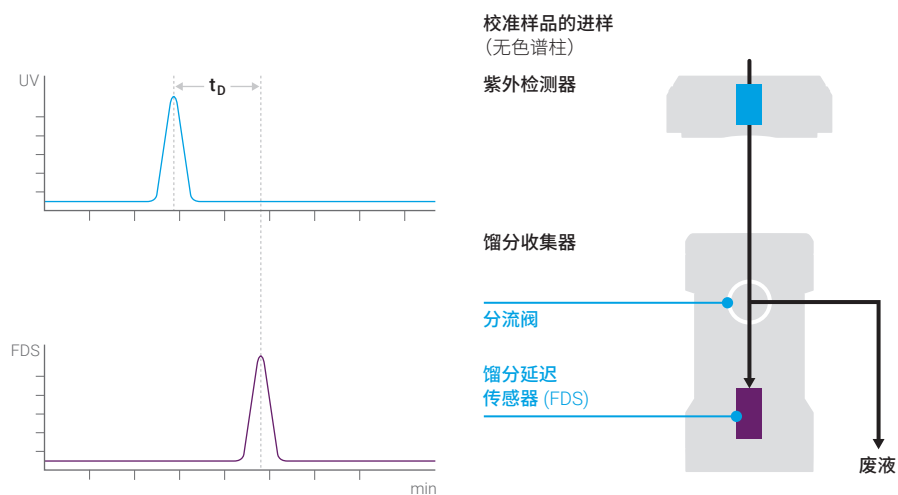


图 47. 检测器与馏分延迟传感器之间的时间差。在校准过程中，由软件自动计算延迟体积

7.5.6 基于质谱性检测收集馏分

由于其特异性和选择性，基于质量的馏分触发显著提高了纯化工作流程的效率。使用质谱触发时，会大大减少所需收集的馏分数量，这使其成为基于 UV 的非特异性收集无法处理增加的单日样品数量时的首选方法。可瞬间完成对收集到的化合物的确切表征 — 无需采集收集到的各种馏分的等分试样，并将其提交到单独的 LC/MSD 系统中进行鉴定。

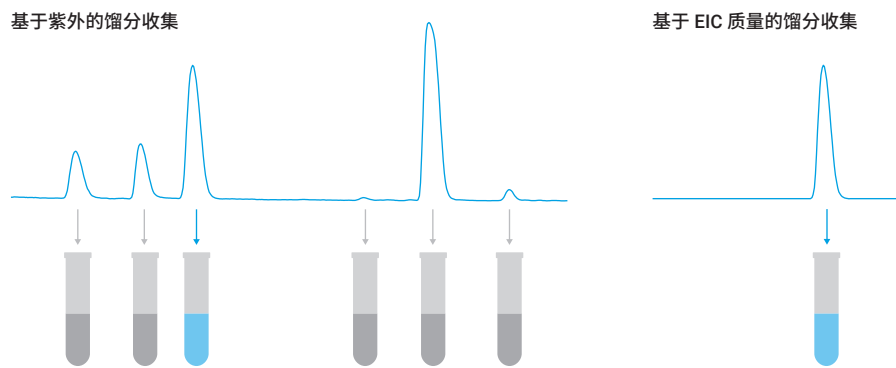


图 48. 质谱触发的纯化是一种选择性方法，相比基于紫外的收集能够减少收集到的馏分数量

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。当使用分辨率更高的信号控制馏分触发时，将提高收集到的馏分的纯度。质谱检测器信号有助于增加选择性因子。

目标化合物的质量可以从分析 LC/MSD 结果中获得或根据合成计划进行预测。这样可通过分析效率无与伦比的质谱检测器 (MSD) 触发馏分收集。除非存在多种异构体并在不同时间洗脱下来, 否则该方法只会收集非常少的几种馏分 (如果不是一种馏分的话)。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 (图 49) 发生离子化, 从而使质谱检测器可以检测到目标离子。使用单一同位素 (非平均) 质量数对于成功的触发至关重要。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, MSD 利用该触发离子触发馏分收集。当 UV 或 ELS 检测器与 MSD 结合使用时, 检测器信号的同步过程中必须考虑各种延迟时间。安捷伦馏分收集器中的馏分延迟传感器有利于测量这些不同的延迟体积, 并确保获得最高的纯度和回收率。

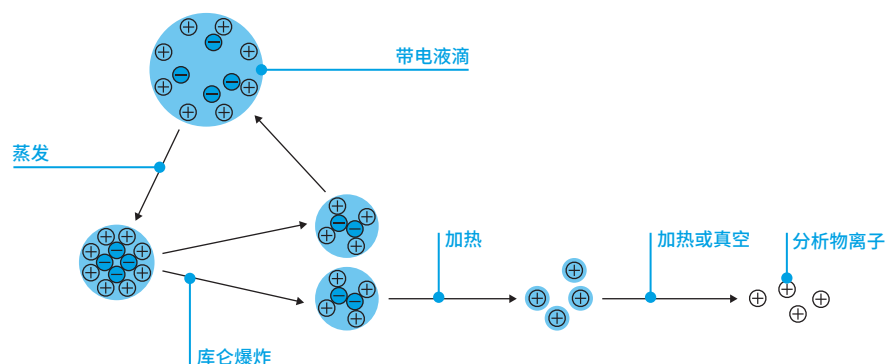


图 49. 电喷雾电离过程。溶剂蒸发后, 液滴内部的电荷密度将会增加, 直至自由离子被喷入气相中。影响离子化过程的因素包括必须蒸发的洗脱液的体积以及液滴内部抑制离子化过程的缓冲液或基质化合物的浓度

图 50 显示了紫外检测器与质谱检测器以及馏分延迟传感器之间的时间差。MSD 触发的延迟时间由软件在校准过程中进行计算。主液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 MSD 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。一开始最好使用 70% 甲醇或乙腈、29.9% 水与 0.1% 甲苯的混合物。

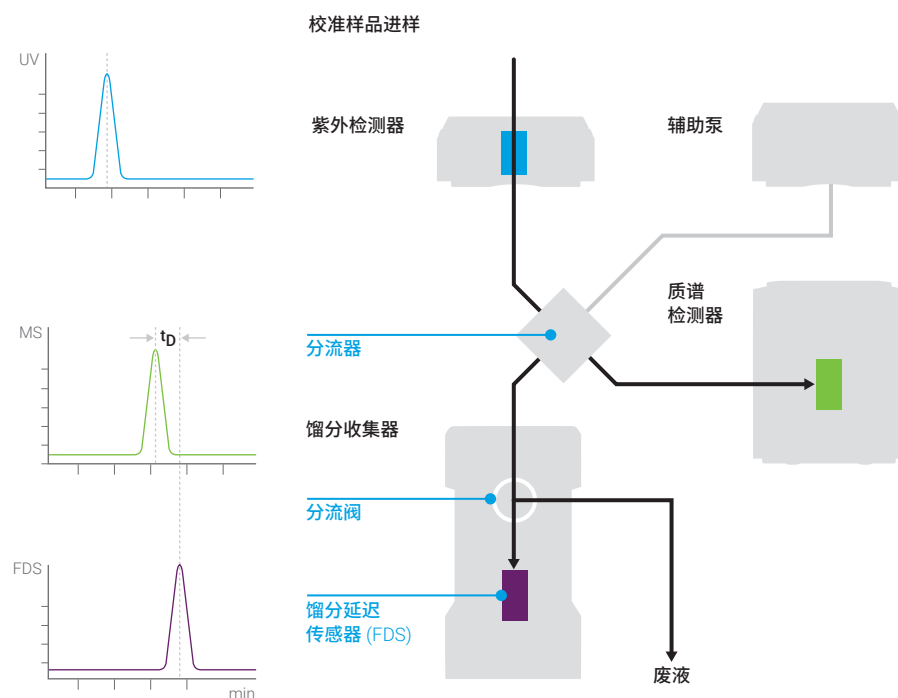


图 50. UV 与 MSD 检测器以及馏分延迟传感器之间的时间差

生成负电荷离子还是正电荷离子取决于分子自身的特性。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。强改性剂（如三氟乙酸 (TFA)）不仅抑制负离子化，也会影响正离子化，因为分析物自身会形成离子对。

在诸如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一问题。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离子。

然而，常见的做法仍然是在 LC/MSD 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改性剂）。在这种情况下，可以获得更可靠的互补样品信息，如图 51 所示。

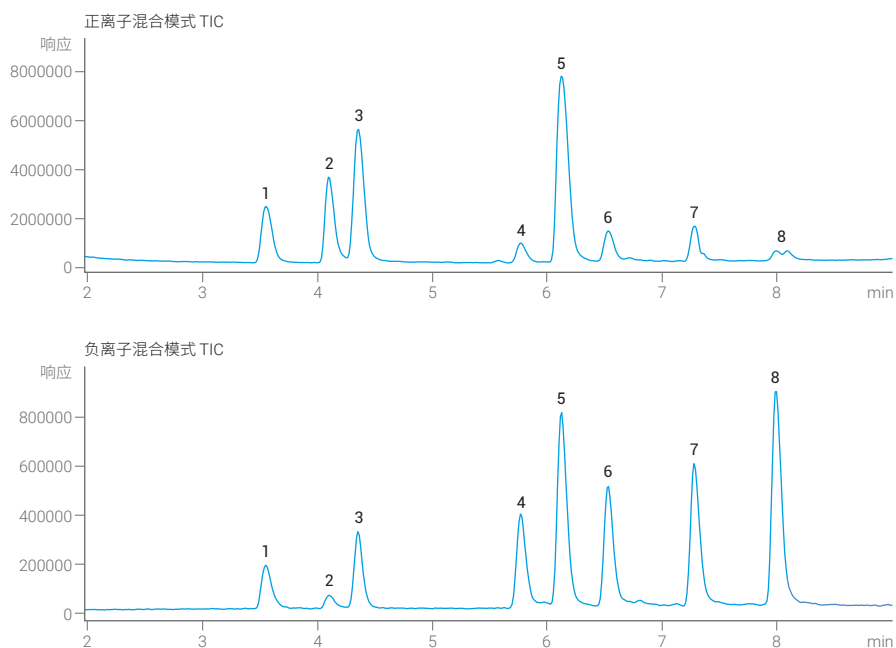


图 51. 双电离模式可提供互补且可靠的信息。1 对乙酰氨基酚，2 咖啡因，3 磺胺二甲嘧啶，4 尼泊金甲酯，5 磺胺地托辛，6 尼泊金乙酯，7 尼泊金丙酯，8 尼泊金苄酯

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 52 中, 第三个峰代表目标化合物磺胺二甲嘧啶 ($M = 264 \text{ g/mol}$)。

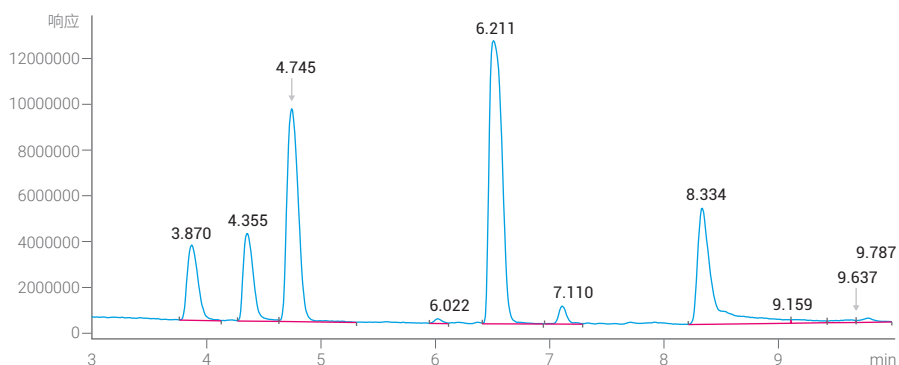


图 52. TIC 色谱图, 未获得特定化合物信息

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), 参见图 53。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。

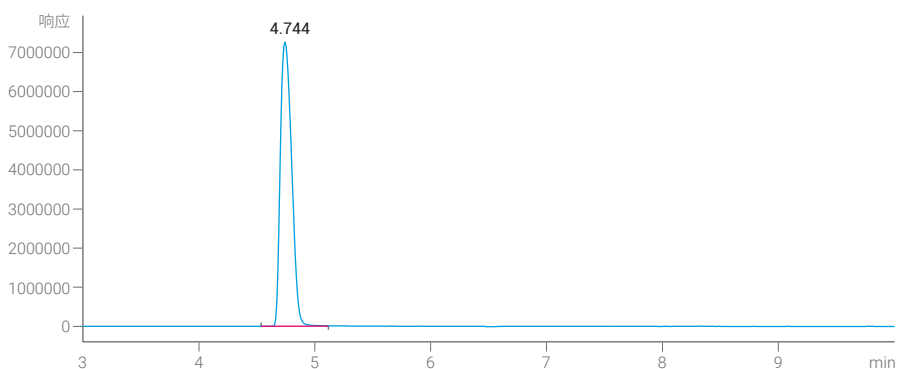


图 53. $m/z = 265$ 处目标化合物的选择提取离子色谱图

7.5.7 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。

7.6 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
- 质谱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，某些纯化系统配备有样品回收位置或专用回收馏分收集器，连接到主要馏分收集器的废液管线上，参见图 55。对于各种样品，最好选择单独的容器收集预计为废液的部分。回收位置必须与样品信息一起报告。这样可以将回收收集物对应到收集的馏分和样品的提交者。



图 54. 1290 Infinity II 制备型 Open-Bed 馏分收集器，配备 1260 Infinity II 基于阀的制备型回收收集器

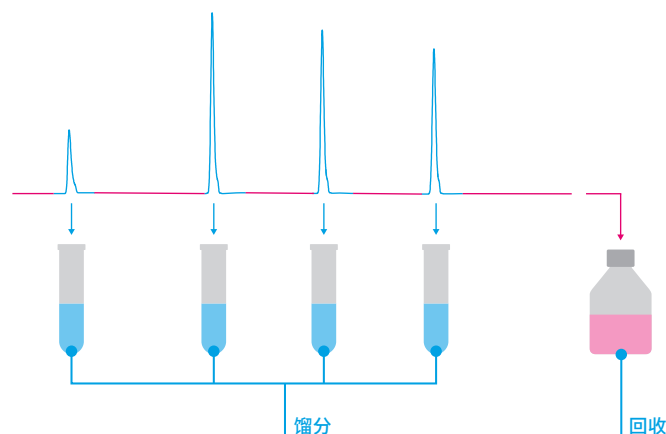


图 55. 回收收集 — 主馏分收集器未收集的溶剂部分由回收收集器收集

7.7

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，扩展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，需要考虑系统的驻留体积。

为方便大体积进样从而增加每次运行纯化的样品量，增加进样器定量环的尺寸是一种简单的方法。安装较大内径的毛细管有助于解决较高流速引起的反压问题。这两个步骤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。

7.7.1 系统驻留体积和色谱柱死体积^[7]

系统死体积包括流路产生的体积以及色谱柱的死体积。驻留体积是指从两种洗脱液的混合点到柱头的死体积。驻留体积和色谱柱死体积可按照第 9.2 “测定系统驻留体积” 节和第 9.3 “测定色谱柱死体积” 节所述的步骤进行测量。

图 56 显示了系统驻留体积对色谱性能的影响。在驻留体积较小的系统中，较早流出的化合物分离度可能较低，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。

在驻留体积较大的系统中，后流出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。只有减小驻留体积，才可改善分离度较差的色谱结果。

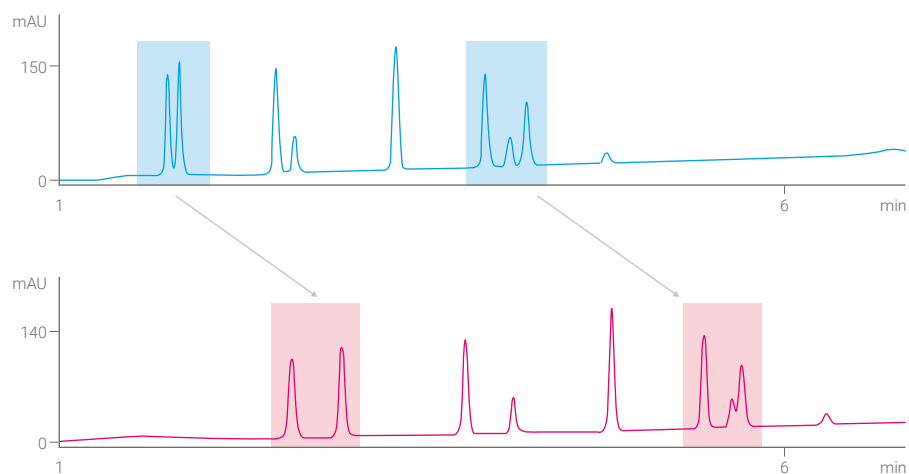


图 56. 系统驻留体积对分离效率的影响。上方色谱图使用驻留体积较小的系统获得。相比之下，下方色谱图在驻留体积较大的系统上获得

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，系统驻留体积必须尽可能小，这样在梯度模式下工作时才可获得良好的结果。

通常，当驻留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 56 所示。毛细管、混合器和进样环的体积对驻留体积具有重要影响。因此，对于分析型和制备型工作，尽可能减小定量环的尺寸或使用两个不同的定量环和流路非常重要。另外，必须使用适合所用流速的正确毛细管内径，减小系统死体积并最大程度减小色谱峰扩散。表 3 概述了典型的毛细管内径、推荐的流速范围以及所得的反压。

表 3. 推荐用于不同流速的不锈钢毛细管内径 (* 反压使用 1:1 甲醇/水作为溶剂计算得出)

颜色	内径 [英寸]	[mm]	推荐流速 [mL/min]	死体积 [μL/cm]	在最大推荐流速下计算得到的 每米的反压 [bar]*
黑色	0.003	0.075	0.1–0.5	0.044	196
红色	0.005	0.127	0.2–1.5	0.127	72
绿色	0.007	0.178	0.8–3.0	0.249	37
灰色	0.012	0.30	4–8	0.707	10
白色	0.02	0.50	15–40	2.027	8
—	0.024	0.60	40–80	2.83	6
—	0.037	0.94	80–200	6.94	5

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 57。除色谱柱内部的体积外，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 4。

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驻留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。第 9.2 “测定系统驻留体积” 节和第 9.3 “测定色谱柱死体积” 节分别介绍了确定系统驻留体积和色谱柱死体积的过程。

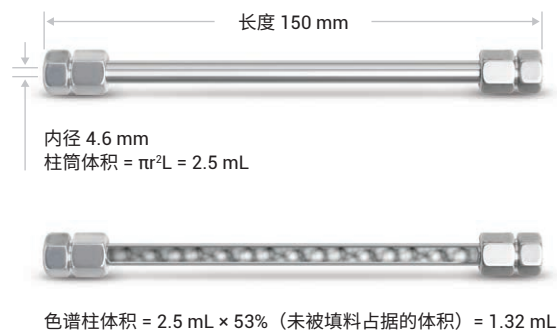


图 57. 色谱柱死体积的数学计算方法

表 4. 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

内径 [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

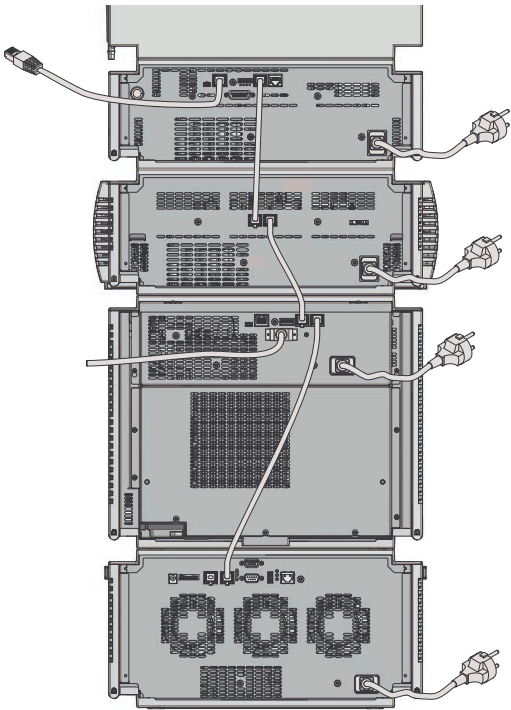


图 58. CAN 通讯线路 — 实现模块间快速、直接的通讯，独立于主机软件

7.7.2 系统通讯

安捷伦液相色谱系统使用控制器局域网 (CAN)，参见图 58。峰触发器评估过程以及不同信号轨迹的同步监测，尤其是涉及二极管阵列检测器和质谱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。但是，安捷伦 CAN 总线技术通讯独立于 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。提交样品后，即使 PC 与系统之间的连接中断，也会成功触发馏分收集。另外，采用 CAN 总线技术通讯的纯化系统基于泵传输的实际流速计算紫外检测器与馏分收集器之间的延迟时间。

7.7.3 安全事项

运行制备型液相色谱时，与分析型工作相比，所用的有机溶剂体积大得多，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。

各个模块中的检漏仪可停止溶剂输送并防止系统继续处理下一个样品，参见图 59。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 60。

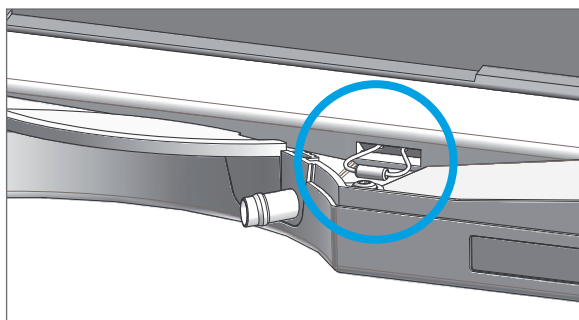


图 59. 泄漏传感器和泄漏管理，显示了用于将泄漏溶剂引入废液容器的废液排放系统

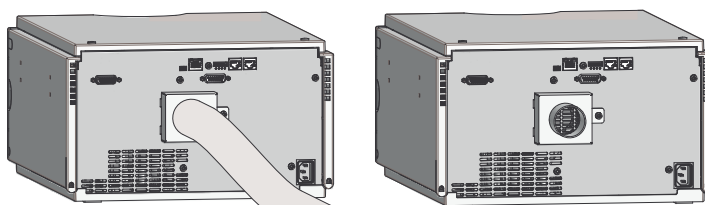


图 60. 馏分收集器背面用于连接强制排气装置的接头

8 放大策略^[8-10]

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。

8.1 采用分析型色谱作为放大工作的起始点

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%–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 信号或质谱检测器的 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计算的起始点。

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量和运行时间，其中制备型梯度曲线应类似于分析型梯度曲线。

图 61 显示了分析筛选运行的梯度曲线。图 62 显示了将方法从分析型系统转移到制备型系统后的梯度曲线，其中驻留体积与流速的比率较小。需要采用等度保持步骤来补偿两个系统之间的差异。从分析型系统至制备型系统的线性方法转移使用第 8.2 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。

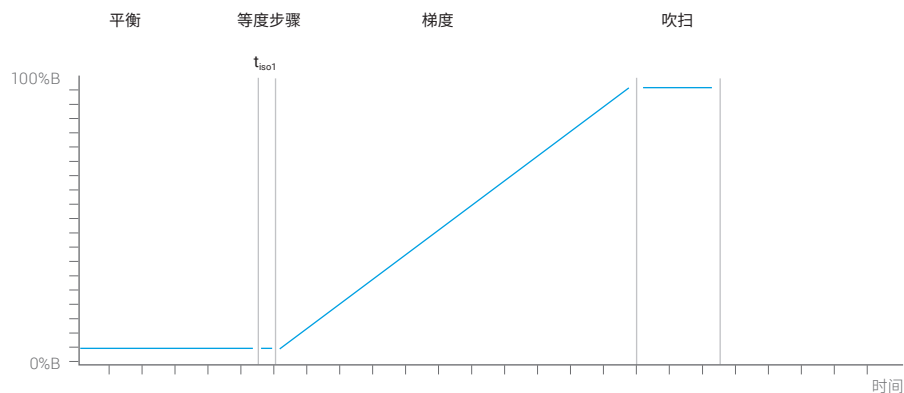


图 61. 使用 4.6 mm 内径色谱柱的分析筛选运行的梯度曲线，其中包括进样、可选等度保持、梯度斜率和清洗阶段

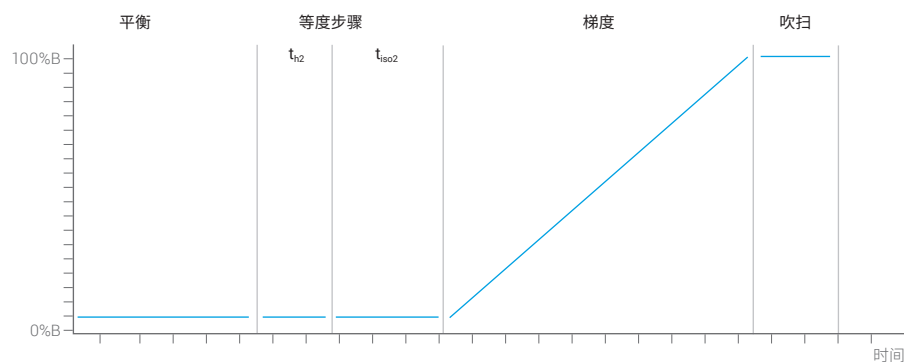


图 62. 放大至 21.2 mm 内径色谱柱后的梯度曲线，其中包括延长的等度步骤以补偿所采用的流速，因为分析型系统与制备型系统之间驻留体积存在差异

8.2

从分析柱线性放大为制备柱的公式

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，参见公式 3。

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

公式 3. 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

p_A 分析型系统的色谱柱粒径

p_P 制备型系统的色谱柱粒径

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驻留体积的差异。另外，当满足公式 4 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. 梯度转移条件

$t_{D,A}$ 分析型系统的驻留时间

$t_{I,A}$ 分析型系统一般梯度的初始保持时间

$t_{c,A}$ 分析型系统的过柱时间

$t_{D,P}$ 制备型系统的驻留时间

$t_{I,P}$ 制备型系统梯度的初始保持时间

$t_{c,P}$ 制备型系统的过柱时间

制备型梯度的初始保持阶段基于一次性确定系统驻留体积与色谱柱死体积来测定，见公式 5。

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

公式 5. 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
$V_{D,A}$	分析型系统的驻留体积
$V_{c,A}$	分析型系统的色谱柱死体积
$V_{D,P}$	制备型系统的驻留体积
$V_{c,P}$	制备型系统的色谱柱死体积

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容量或进样量，见公式 6。

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

公式 6. 柱容量的放大计算

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
$V_{inj,P}$	分析型系统的进样量
$V_{inj,A}$	制备型系统的进样量

图 63 显示了应用本节所述公式得到的方法转移结果。

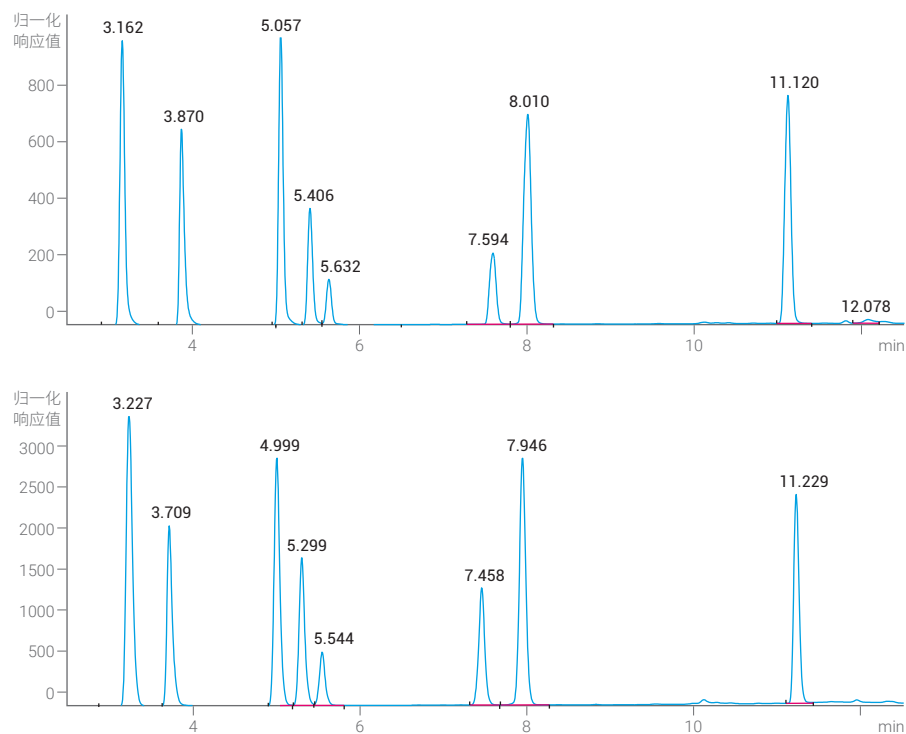


图 63. 从 4.6×150 mm 的 $5 \mu\text{m}$ 分析柱线性放大至 21.2×150 mm 的 $5 \mu\text{m}$ 前处理柱后的结果。两种色谱柱上的保留时间接近。上方色谱图：使用 $500 \mu\text{L}$ 进样量和 31.8 mL/min 流速的制备型运行。下方色谱图：使用 $5 \mu\text{L}$ 进样量和 1.5 mL/min 流速的分析型运行

使用放大公式确定驻留体积后，可以将方法从 4.6 mm 内径色谱柱转移至 21.2 mm 内径色谱柱。两张色谱图中所有化合物的保留时间接近。

8.3
通过聚焦梯度提高效率^[11-14]

为获得最高的效率，必须最大限度提高柱容量并最大限度缩短运行时间。但是，提高柱容量会降低分离度，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。

8.3.1 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，但仍是稳定的分离方法的关键。因此，聚焦梯度曲线的起始条件由目标化合物的极性决定。同时，需要保留极性高于目标化合物的所有化合物，决定了有机溶剂 B 的浓度应尽可能低。根据样品中极性最高的化合物，聚焦梯度的起始条件可能会有所不同，参见图 64。经过初始等度保持后，可使用陡峭的梯度步骤提高到各个区域的聚焦梯度初始浓度。但是，采用平缓的聚焦梯度曲线，使目标化合物与相邻洗脱的杂质实现最佳分离。

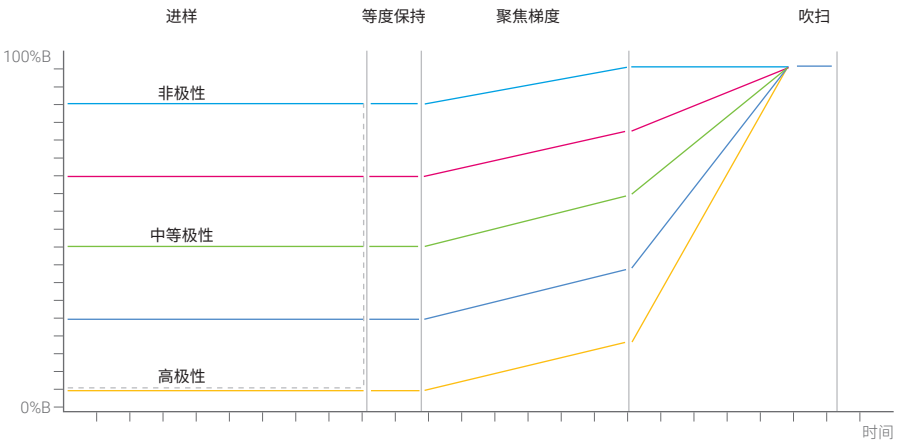


图 64. 具有不同极性的目标化合物的聚焦梯度曲线。虚线表示另一条阶梯梯度曲线

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。

8.3.2 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%–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。当系统的驻留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，更常见的是，新梯度步骤在梯度长度约 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 min；斜率 = 2.0% B/min
- 150 mm 色谱柱 = 6 min；斜率 = 3.33% B/min
- 100 mm 色谱柱 = 4 min；斜率 = 5.0% B/min
- 50 mm 色谱柱 = 2 min；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。

8.3.3 利用安捷伦自动纯化软件创建聚焦梯度的简单方法

OpenLab CDS ChemStation 和自动纯化软件^[16]

Agilent OpenLab 色谱数据系统 (CDS) 便于全面控制纯化过程。该软件的界面简化了方法开发以及从分析型纯化到制备型规模纯化的放大过程。系统提供基于时间、峰和质量数（或任意组合）的馏分收集，并可由任何检测器信号触发。智能的实时数据处理有助于实现实时、精确的馏分收集。使用放大公式确定驻留体积后，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接近。

安捷伦自动纯化软件（OpenLab CDS ChemStation 版的附加软件）有助于将纯化方法由分析级自动转换为制备级。该附加软件可自动执行流程步骤之间的数据转移，从而简化您的工作流程。算法将实时计算每种目标化合物的聚焦梯度，确保在制备型纯化运行过程中收集到最高纯度的馏分。

只需轻点几下即可选择分析柱与制备柱的所需组合、上传并处理分析结果、启动纯化运行以及审核纯化结果。通过专家模式可完全访问完整功能，该模式还为临时用户提供了预设的方法配置。

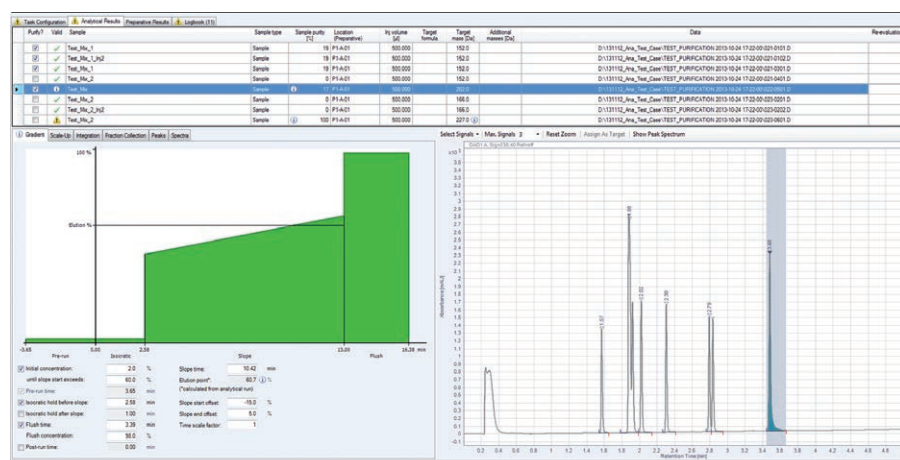


图 65. 分析色谱图中突出显示了所检测目标化合物的梯度曲线计算结果

自动纯化软件还支持全自动纯化工作流程。可使用 *.txt 或 *.csv 格式导入数据。该程序可以加快用于分析方法筛选的序列表的生成。此外，该软件能够实现自动目标化合物确证并针对纯化步骤实时计算聚集梯度，从而确保分离度最佳、运行时间最短。馏分结果浏览器可快速清晰地显示所收集馏分的位置。通过查看浏览器界面中的紫外和质谱数据还可检查每个所收集馏分的纯度。只需点击几次鼠标即可利用馏分选择工具将纯馏分导出至液体处理系统或生成新序列表，以进行馏分再分析。

8.4
介绍整个放大工作流程^[15]

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，易于用户纯化样品，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 66 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：https://ispso.unige.ch/labs/fanal/hplc_calculator:en
(2019 年 4 月 1 日访问)

第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步
确定合适的分析筛选条件，例如 pH、流动相和化学键合相	应用聚焦梯度优化分离度和柱容量	确定分析柱的最大载样量（载样量研究）	放大用于制备型进样和馏分收集

图 66. 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 7.2.3 节“特殊进样技术”。

8.4.1 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 1–5 µL 的典型分析体积。目标化合物应具有介于 2 和 9 之间的保留因子 k。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，在质谱触发纯化系统中，氨水适用于电喷雾电离模式。

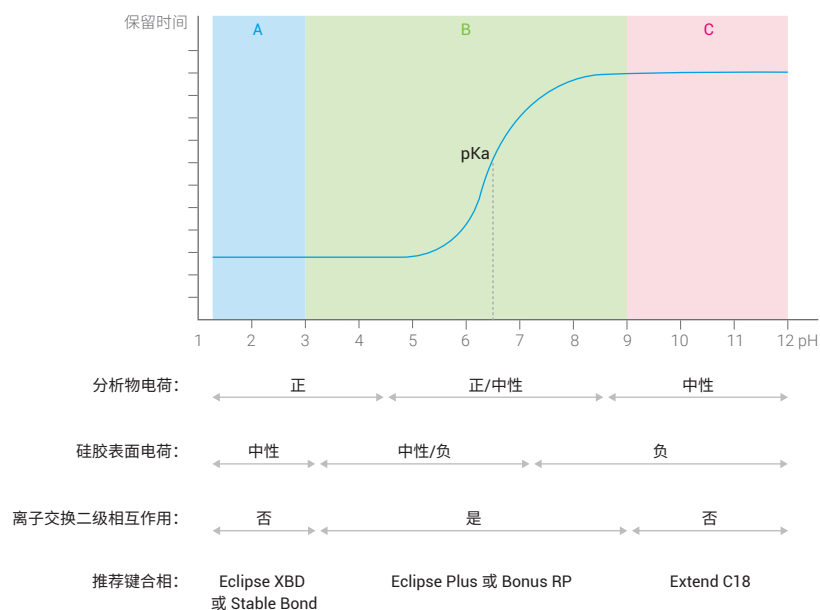


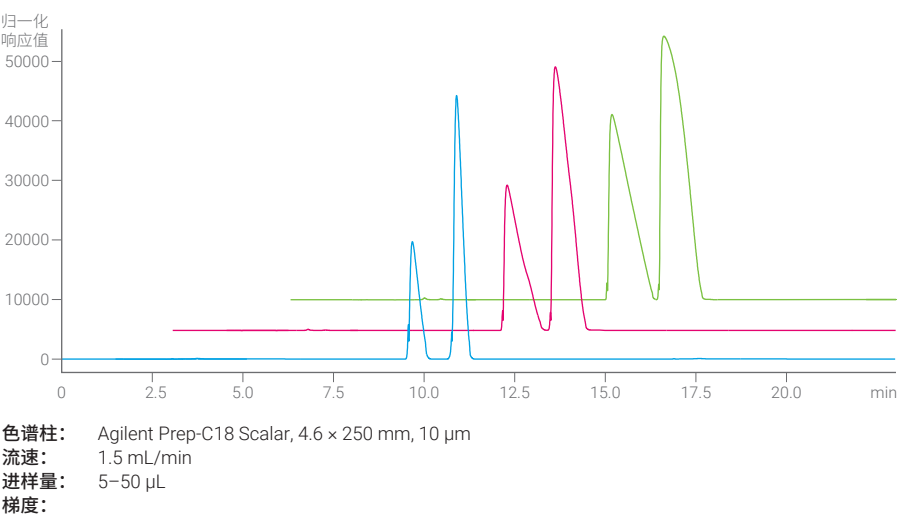
图 67. 不同 pH 范围内推荐采用的化学键合相。ZORBAX SB C18 色谱柱和 ZORBAX Extend C18 色谱柱分别在低 pH 和高 pH 条件下便于从 4.6 mm 放大至 21.2 mm 内径

8.4.2 步骤 2 — 应用聚焦梯度

如第 7 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计算制备型方法。

8.4.3 步骤 3 — 确定最大柱容量

柱容量是实现成功纯化的一个关键因素。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 68 显示了载样量研究的结果，其中不断增加柱容量直至达到分离度限值。



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

图 68. 载样量研究的结果 — 不断增加柱容量直至达到分离度限值

通过对分析柱应用聚集梯度，以 5 μL 的步长增加进样体积，确定柱容量的限值。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量通过色谱柱放大公式计算得到（参见第 8.2 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。

8.4.4 步骤 4 — 放大实现制备型进样和馏分收集

图 69 显示了经过放大计算后的色谱图。应用第 8.2 节“从分析柱到制备柱的线性放大公式”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%。

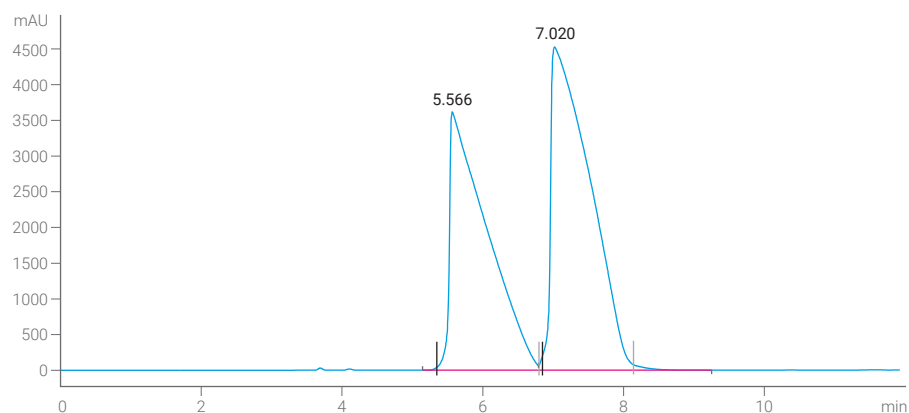


图 69. 制备级色谱图。刻度标记表示收集到的馏分。根据 4.6 mm 内径分析柱的载样量研究结果，对方法进行放大以满足 50 mm 内径色谱柱所需的流速、梯度曲线和进样量。该色谱图显示了进样 4500 μL 后得到的两种目标化合物的分离效果

9 制备型液相色谱实践指南与详细规程

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、驻留体积的测定、色谱柱平衡以及色谱柱载样。

9.1 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：

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

V_{col} 色谱柱体积
 id 内径
 π 3.14159265359
 L_{bed} 填充柱床长度

- 3. 计算所需的填料量：

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

ρ 密度
 m 质量
 V_{col} 色谱柱体积

- 4. 计算填料密度 (M)：

$$\rho = \frac{m}{V}$$

ρ 密度
 m 质量
 V 体积

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，将自由流动的均匀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，终止装填溶剂流动并停止泵，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 微米反相硅胶填料的典型柱效为 30000 塔板数/米。

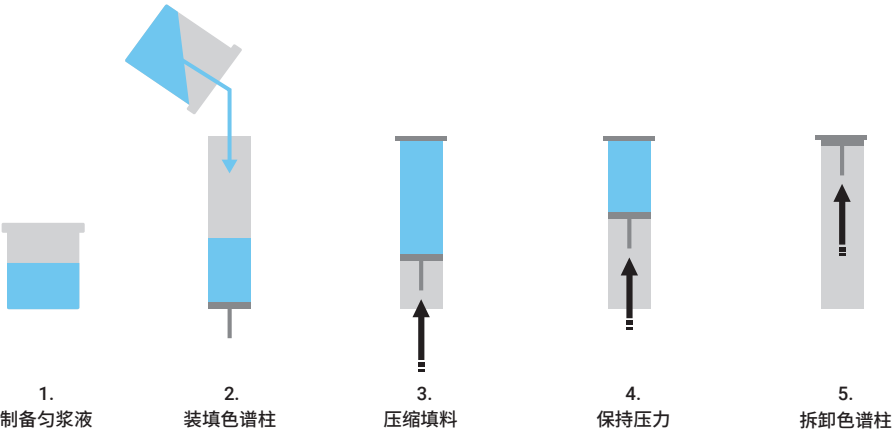


图 70. DAC/SAC 色谱柱的基本装填和拆卸流程

表 5. 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

内径 [mm]	长度 [mm]	体积 [mL]	吸附剂的量 [g] (硅胶基 $\rho = 0.60 \text{ g/mL}$)	吸附剂的量 [g] (聚合物基 $\rho = 0.33 \text{ g/mL}$)
27	100	57.28	34.37	18.90
	250	143.20	85.92	47.25
50	100	196.43	117.86	64.82
	250	491.07	294.64	162.05
75	100	441.96	265.18	145.85
	250	1104.91	662.95	364.62

9.1.1 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驻留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 μ L 含 1% 甲苯的乙腈溶液。可使用公式 7 计算理论塔板数。理论塔板数应当高于每米 30000。

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

公式 7. 理论塔板数的计算

N 理论塔板数
 t_R 保留时间
 w_h 半峰宽（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，否则将损坏填料。在这种情况下，需要使用 SAC 模式。

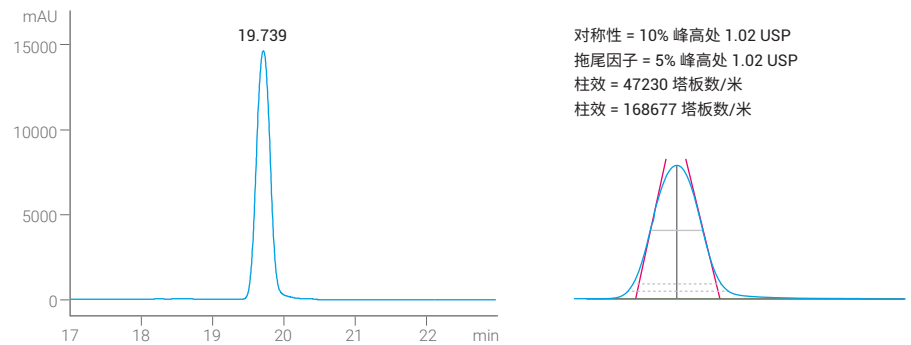


图 71. 注入含 1% 甲苯的乙腈溶液测定色谱理论塔板数

9.1.2 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异丙醇 (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。可除去受到污染的色谱柱填料，用异丙醇 (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健康，因此需要特别小心。

9.2 测定系统驻留体积

可采用两种不同的方法测定系统驻留体积。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。

9.2.1 测定分析型系统的驻留体积

按照以下步骤可测定能够输送准确流速的分析型系统的驻留体积。

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（保持反压为 50 bar）
6. 在 0–10 分钟内运行线性梯度，使用 5%–95% B，流速 1 mL/min

使用体积大于 1 mL 的制备型样品定量环时，需要提高流速以在合理的时间内完成驻留体积测定。一个好的折中方案是保持流速等于定量环尺寸。

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 ($t_{\text{驻留}}$)
8. $v_{\text{驻留}}$ 可根据 $v_{\text{驻留}} = t_{\text{驻留}} \times f$ 计算得出

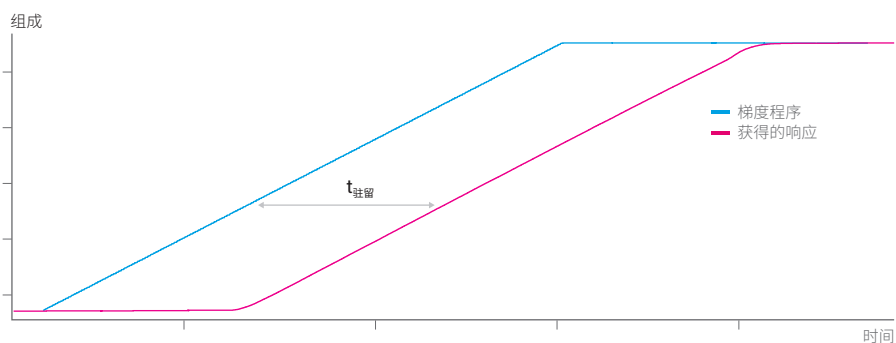


图 72. 测定分析型系统的系统驻留体积

9.2.2 测定制备型系统的驻留体积

按照下列阶梯梯度方法可测定配备制备泵的系统驻留体积。

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 mm) × 750 mm 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 分钟内运行阶梯梯度, 使用 10%–90% B, 流速 2 mL/min

请注意, 使用体积大于 5 mL 的样品定量环时, 需要提高流速。一个好的折中方案是保持流速等于定量环尺寸。

6. 计算程序设定的梯度与获得的信号曲线 50% 处的时间差 ($t_{\text{驻留}}$)
7. $v_{\text{驻留}}$ 可根据 $v_{\text{驻留}} = t_{\text{驻留}} \times f$ 计算得出

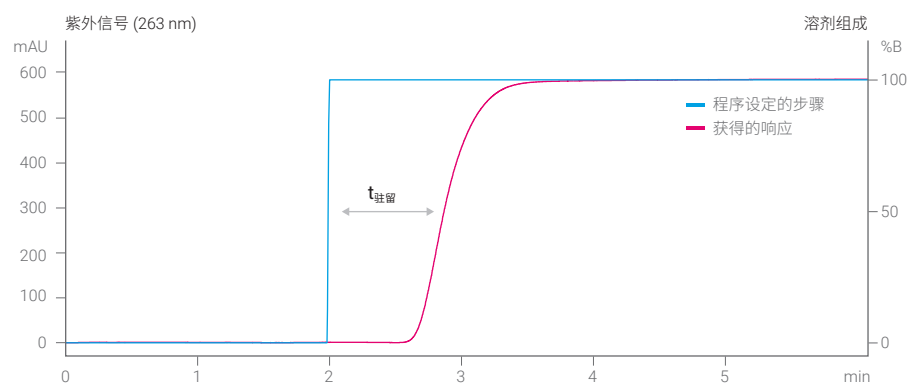


图 73. 测定制备型系统的系统驻留体积

9.3 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。

9.3.1 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 0–10 分钟内运行线性梯度，使用 5%–95% B，流速 1 mL/min

请注意，当计算出的总系统体积（样品定量环与色谱柱）大于 3 mL 时，建议提高流速以在合理的时间内完成驻留体积的测定。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 ($t_{\text{驻留}}$)
9. $V_{\text{总驻留}}$ 可根据 $V_{\text{总驻留}} = t_{\text{总驻留}} \times f$ 计算得出
10. 用低死体积限流器替代色谱柱 (保持反压为 50 bar)
11. 在 0–10 分钟内运行线性梯度, 使用 5%–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 ($t_{\text{驻留}}$)
13. $V_{\text{驻留}}$ 可根据 $V_{\text{驻留}} = t_{\text{驻留}} \times f$ 计算得出
14. $V_{\text{总驻留}}$ 减去系统驻留体积 $V_{\text{驻留}}$ 可计算出色谱柱死体积

9.3.2 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针头过滤器 (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 色谱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 mmol/L 硫脲，溶于 75% 乙腈中
 - 10 mm 流通池：0.2 mmol/L 硫脲，溶于 75% 乙腈中
 - 60 mm 流通池：0.03 mmol/L 硫脲，溶于 75% 乙腈中
2. 在样品使用前，采用再生纤维素针头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）
 - 针头清洗溶液：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
 - 将进样量设置为 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反压维持在 15 bar 以上）
9. 打开样品信息屏幕：
 - 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 0.2–4 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）的一半左右，因此将流速设置为色谱柱几何体积的一半左右，单位为 mL。例如， $4.6 \times 50 \text{ mm}$ 色谱柱的几何体积为 $(3.14 \times 2.3 \times 2.3 \times 50) / 1000 = 0.83 \text{ mL}$ ，因此将流速设置为 $(1/2 \times 0.83) \text{ mL} / 1 \text{ min} \approx 0.4 \text{ mL/min}$
15. 根据所采用的流速（和色谱柱体积）调整进样量：
 - 流速 0.2–0.5 mL/min，进样量 1 μL
 - 流速 0.5–1 mL/min，进样量 2 μL
 - 流速 1–2 mL/min，进样量 5 μL
 - 流速 > 2 mL/min，进样量 10 μL

16. 注意所采用的流速和进样量
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）和进样量的一半
 - 计算最终色谱柱体积：
 - 计算包含色谱柱的平均洗脱时间
 - 乘以所采用的流速
 - 减去不含色谱柱时的洗脱体积和进样量的一半

9.4

平衡色谱柱和优化流速

9.4.1 平衡和冲洗色谱柱

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驻留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。

9.4.2 优化流速

纯化系统中分析筛选的最佳流速

答案并非一个简单的数字，而是系统总死体积与流速之间的比值。根据经验，采用 2:1 的比值可获得良好的结果。这意味着当使用配备 2.1 mm 内径色谱柱的 UHPLC 系统进行筛查时，可显著降低流速。系统的总死体积（包括色谱柱）越大，获得高质量结果所需的流速越高。安捷伦在组合式分析型和制备型系统上通过实验测试了这一规则。

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（驻留体积与色谱柱死体积）为大约 3 mL。使用 1 mL/min 的流速和 2%–98% 有机溶剂的一般梯度，采用 10% B/min 的梯度斜率，参见图 74。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 75 和图 76。

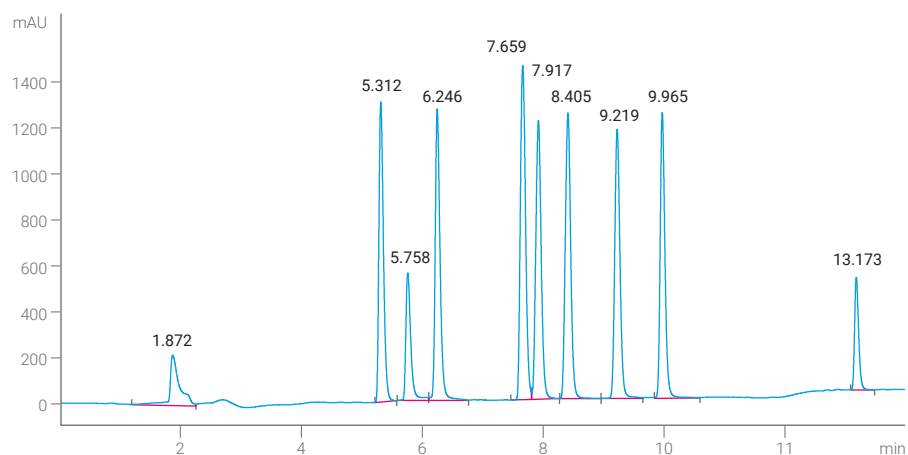


图 74. 在 1 mL/min 下 (4.6×150 mm, 5 μ m 色谱柱) 用于确定最佳流速的色谱图

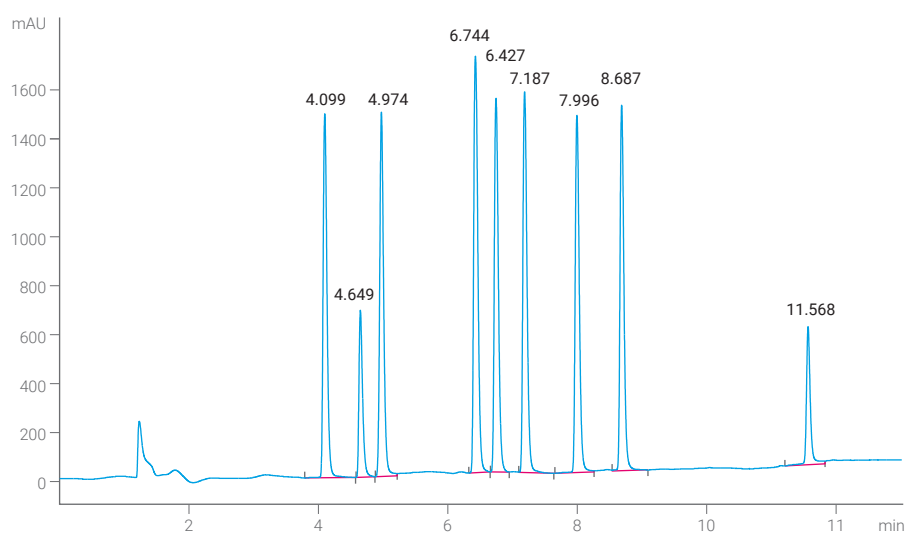


图 75. 在 1.5 mL/min 下 (4.6×150 mm, 5 μ m 色谱柱) 用于确定最佳流速的色谱图

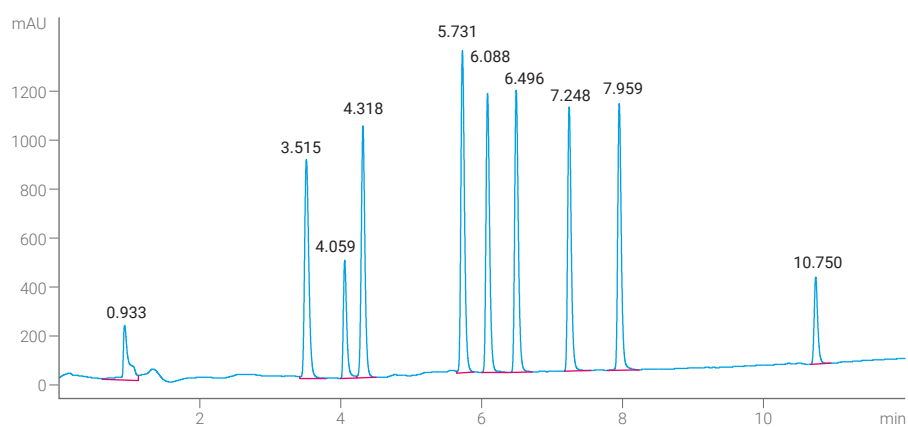


图 76. 在 2.0 mL/min 下 (4.6×150 mm, 5 μ m 色谱柱) 用于确定最佳流速的色谱图

采集到色谱图后，计算图 74 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。在 1.5 mL/min 的流速下获得了最高塔板数和分离度。表 6 总结了所有的结果。

表 6. 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

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

比较运行时间和溶剂消耗

比较上述实验中的运行时间、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 7。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，如果所需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。

表 7. 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

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

9.5
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容量能够应对这一挑战。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，但进样量增加。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。

9.5.1 体积过载

图 77 显示了在 4.6 × 150 mm 色谱柱上注入 10 μL 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。

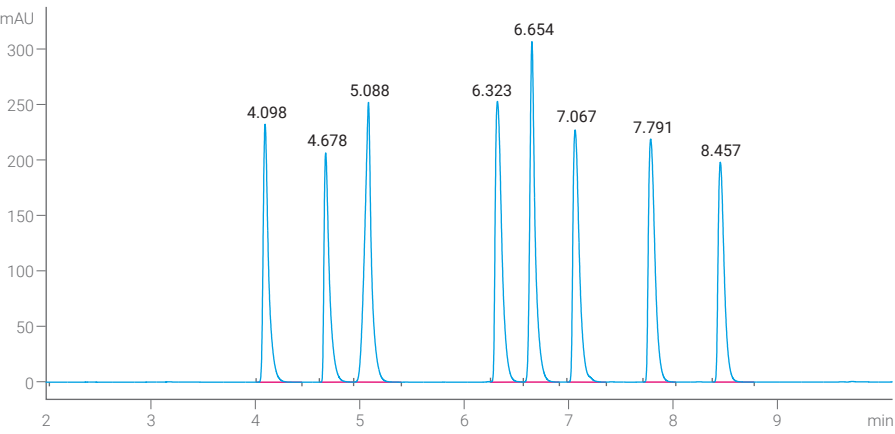


图 77. 在 4.6 × 150 mm 色谱柱上注入 10 μL 溶解于 DMSO 的样品混合液。所有组分均得到分离，表现出良好的峰形

图 78 显示了注入 20 μL 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。

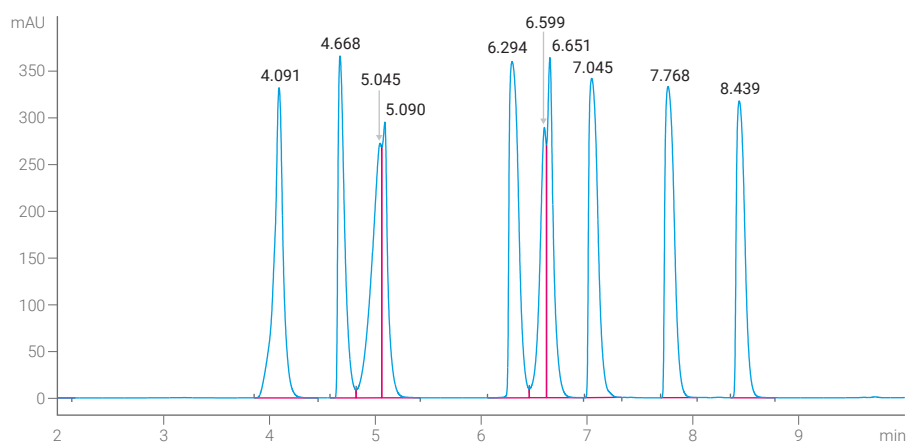


图 78. 注入 20 μL 同一样品时，三种碱性化合物中的两种化合物的色谱峰出现严重的前伸以及峰分裂现象

图 79 显示了进样量为 30 μL 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。

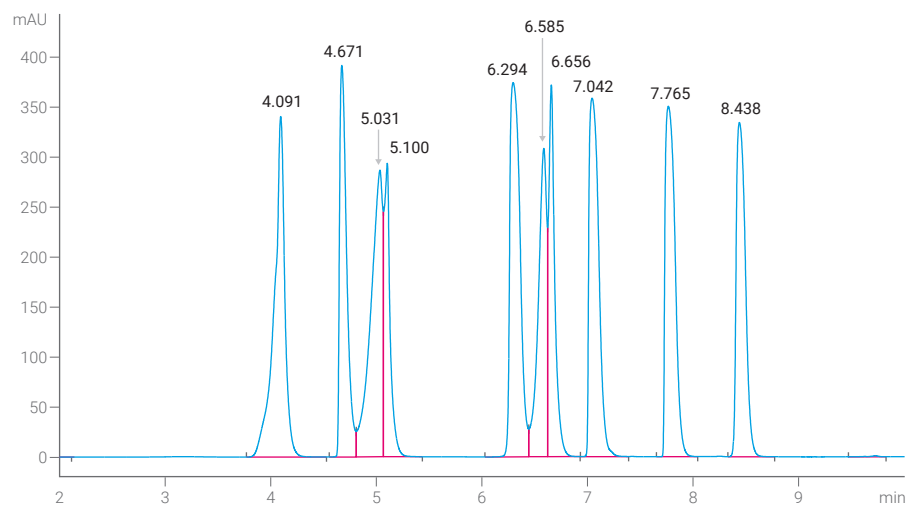


图 79. 30 μL 进样量表现出更严重的影响，如 4 min、5 min 和 6.5 min 左右洗脱的碱性化合物所示

9.5.2 色谱柱的载样量

表 8 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载样量 0.1%–1% 的柱容量。色谱工作越困难，耐受的柱容量越少。另一方面，对于简单或高通量分离，可使用占固定相重量 5% 的柱容量。

表 8. 制备型液相色谱柱的通量计算。固定相密度：0.6 g/mL

直径 [mm]	4.6	10.0	21.2	30	50
长度 [mm]	150	150	150	150	150
体积 [mL]	2.49	11.78	52.97	106.07	294.64
流速 [mL/min]	1.5	7.09	31.86	63.8	177.22
大致需要的吸附剂量 [g]	1.5	7.07	31.78	63.64	176.79
极高效率 0.1% 载样量 [g/运行]	0.001	0.007	0.032	0.064	0.177
载样量和效率 1% 载样量 [g/运行]	0.015	0.071	0.318	0.636	1.768
通量导向 5% 载样量 [g/运行]	0.075	0.353	1.589	3.182	8.839
运行时间基于 15 min 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	6.8	30.5	61.1	169.7
通量 [kg] 365 天/年，24 小时/天	0.524	2.477	11.136	22.3	61.945

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 64–640 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，因此在推荐的进样量下经常会达到限值。对于这些色谱柱规格，建议在进样时 DMSO 不得超过 2000 µL。最大的限制因素是化合物的溶解度。

表 9 显示了不同色谱柱直径和长度下推荐采用的 DMSO 的进样量。所有推荐值均基于经验及实验室实验结果。

表 9. 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）

色谱柱规格	进样量 [µL]	固定相 [g] 密度 0.6 g/mL	柱容量 [mg] 0.1%	柱容量 [mg] 0.5%	柱容量 [mg] 1.0%
2.1 × 50 mm, C18	1.75				
4.6 × 150 mm, C18	25				
10 × 100 mm, C18	79	5	5	24	47
10 × 150 mm, C18	118	7	7	35	71
10 × 250 mm, C18	197	12	12	59	118
21.2 × 100 mm, C18	354	21	21	105	210
21.2 × 150 mm, C18	531	32	32	160	320
21.2 × 250 mm, C18	885	53	53	265	530
30 × 100 mm, C18	706	42	42	210	420
30 × 150 mm, C18	1063	64	64	320	640
30 × 250 mm, C18	1772	106	106	530	1060
50 × 100 mm, C18	1969	118	118	590	1180
50 × 150 mm, C18	2953	177	177	885	1770
50 × 250 mm, C18	4922	295	295	1475	2950

如果需要注入更大的体积，建议使用有机相进样方法，参见第 7.2.3 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。

10 参考文献

1. 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
2. Koppitz, M., Maximizing Efficiency in the production of compound libraries, *J. Comb.Chem.*, **2008**, 10, 573–579
3. Isbell, J., Changing requirements of purification as drug discovery programs evolve from hit discovery, *J. Comb.Chem.*, **2008**, 10, 150–157
4. Guth, O., et al., Automated modular preparative HPLC-MS purification laboratory with enhanced efficiency, *J. Comb.Chem.*, **2008**, 10, 875–882
5. Rieck, F., Hippler, J., Fast and Easy Injection of Large Sample Volumes in Preparative HPLC (在制备型 HPLC 中快速简便地进行大体积进样), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5994-0742EN, **2019**
6. 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述, 出版号 5991-4041EN, **2014**
7. 液相色谱手册, 安捷伦科技公司基础导论, 出版号 5990-7595CHCN, **2013**
8. 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, *Eur J Pharm Biopharm*, **2008**, 68, 430–440
9. Schellinger, A.P., Carr, P.W., A practical approach to transferring linear gradient elution methods, *J Chromatogr A*, **2005**, 1077, 110–119
10. Schoenmakers, P. J., et al., Gradient Selection in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *J Chromatogr A*, **1978**, 149, 519–537
11. Snyder, L.R., Dolan, J.W., High Performance Gradient Elution, *Wiley*, **2007**
12. Jablonski, J-A.M., Wheat, T.E., Diehl, D.M., Developing focused gradients for isolation and purification, *Waters application note*, reference number Z20002955en, **2009**
13. 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
14. Dolan, J.W., Making the Most of a Scouting Run, *LCGC North America*, **2013**, Volume 31, Issue 1, 30–35
15. Penduff, P., 从分析型到制备型 HPLC 的方法转移, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-2013CHCN, **2013**
16. Penduff, P., Tei, A., 在制备型液相色谱中自动生成聚焦梯度曲线, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-6146CHCN, **2015**

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/purification

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

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，2019
2019 年 10 月 15 日，中国出版
5994-1016ZHCN