

Biotage Flash 纯化知识手册

Isolera 快速制备色谱



目 录

第一节 色谱发展概况	3
第二节 色谱简介	4
第三节 快速色谱原理	6
第四节 影响分离因素以及相关概念	8
样品溶解性	8
正相色谱和反相色谱	8
流动相	9
流动相的选择技巧	9
固定相	10
一、基质	10
二、化学键合固定相	11
三、中低压制备中常用的几种填料：	12
洗脱方式	16
第五节 TLC 转换以及方法设定	17
柱体积	17
TLC 条件转换到制备色谱	18
根据 R _f 值预测色谱条件	18
根据 CV 值，预测色谱条件	19
如何优化 TCL 点板信息，确保化合物最高效分离？	19
第六节 正相梯度的快速制备色谱技术	23
通过 TLC 预测组分的保留时间和分辨率	25
优化选择性	26
溶剂强度的优化	27
第七节 反相快速制备色谱技术	29
固定相的结构	30
流动相	30
优化反相快速制备方法	31
第八节 相关反相应用	32

1) 天然产物的纯化	32
环糊精	32
甜味剂	32
烟叶提取物	33
2) 多肽纯化	33
3) 脱盐	34
附录	35
快速制备色谱常见故障及解决方法	35
表 1. 色谱峰的问题	35
表 2：基线问题	36
表 3：回收率和保留时间的问题	37
表 4：压力问题	37
表 5：泄漏	37
等度洗脱时硅胶柱上样量：	38
梯度洗脱时硅胶柱上样量	39
快速制备色谱溶剂的性质 (按照强度增加排列)	40
根据化合物选择波长指南	41
Biotage 检测器根据波长选择化合物指南	42

第一节 色谱发展概况

将一滴含有混合色素的溶液滴在一片纸上，随着溶液的展开可以观察到一个个同心圆环出现，俄国植物学家 Tswett 首先认识到这种层析现象在分离分析方面的重大应用价值。

Tswett 关于色谱分离方法的研究始于 1901 年，两年后他发表了他的研究成果“一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用”，提出了应用吸附原理分离植物色素的新方法。他在研究植物叶的色素成分时，将植物叶子的石油醚萃取液倒入填有碳酸钙的直立玻璃管内，然后加入石油醚使其自由流下，结果色素中各组分互相分离形成三种不同颜色的 5 个谱带，然后按谱带的颜色进行分离鉴定分析。这种方法因此得名为色谱法。以后此法逐渐应用于无色物质的分离，“色谱二字虽已失去原来的含义，但仍被人们沿用至今。在色谱法中，将填入玻璃管或不锈钢管内静止不动的一相（碳酸钙）称为固定相，自上而下运动的一相（石油醚）称为流动相；装有固定相的玻璃管或不锈钢管称为色谱柱。1906 年 Tswett 把这种分离方法正式命名色谱法(Chromatography)。显然色谱法(Chromatography)这个词是由颜色(chrom)和图谱(graph)这两个词根组成的，派生词有 chromatograph(色谱仪)，chromatogram(色谱图)，chromatographer(色谱工作者)等。

色谱法发明后的最初二三十年发展非常缓慢。液-固色谱的进一步发展有赖于瑞典科学家 Tiselius(1948 年 Nobel Chemistry Prize 获得者)和 Claesson 的努力，他们创立了液相色谱的迎头法和顶替法。

分配色谱是由著名的英国科学家 Martin 和 Synge 创立的，提出了塔板理论，并因此获得 1952 年的诺贝尔化学奖。1941 年，马丁和辛格 (Martin and Synge) 用硅胶柱和氯仿-乙醇流动相首次成功分离了乙酰氨基酸，建立了液液色谱分析方法。他们在这一工作的论文中预言了用气体代替液体作为流动相来分离各类化合物的可能性。1952 年，马丁和詹姆斯 (Martin and James) 创建了气相色谱法（气液色谱法），报道了用气体（用氮气）作为流动相，硅藻土吸附的硅酮油作为固定相，用自动滴定仪作检测器，分离了若干种小分子量挥发性有机酸，创立了气-液色谱法。

遗憾的是这一对科学事业作出的重要贡献，竟被遗忘了 25 年。由于 Tswett 的开创性工作，因此人们尊称他为“色谱学之父”，而以他的名字命名的 Tswett 奖也成为了色谱界的最高荣誉奖。

色谱法从二十世纪初发明以来，经历了整整一个世纪的发展到今天已经成为最重要的分离分析科学，广泛地应用于许多领域，如石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生、环境保护，农药残留检测、奥运会兴奋剂检测乃至空间探索等。

第二节 色谱简介

色谱是研究和解决混合物分离问题的，利用混合物中各组分在不同相（流动相，固定相）中的不同分配系数进行分离的方法叫色谱法。色谱分离原理是基于混合物中各组分在两相间溶解（或吸附）等能力不同，经过反复多次的分配（或吸附）平衡，性质有微小差别的组分也能分离。

色谱分类：按固定相性质及形式分类，色谱法常见的方法有：柱层析色谱法、薄层色谱法、气相色谱法（GC）、高效液相色谱法（HPLC）等。

柱层析色谱法是最原始的色谱方法，这种方法将固定相注入下端塞有棉花或滤纸的玻璃管中，将被样品饱和的固定相粉末从玻璃管顶端装入，以流动相洗脱。常见的洗脱方式有两种，一种是从上而下依靠溶剂本身的重力洗脱，一种是从下而上依靠毛细作用洗脱。收集分离后的纯净组分也有两种不同的方法，一种方法是在柱末端收集流出的溶液，另一种方法是烘干固定相后用机械方法分开各个色带，以合适的溶剂浸泡固定相提取组分分子。柱色谱法被广泛应用于混合物的分离，包括对有机合成产物、天然提取物以及生物大分子的分离。

薄层色谱法是应用非常广泛的色谱方法，这种色谱方法将固定相图布在金属或玻璃薄板上形成薄层，用毛细管或者其他工具将样品点染于薄板一端，然后将点样一端浸入流动相中，依靠毛细作用使流动相溶剂沿薄板上行展开样品。薄层色谱法成本低廉，操作简单，被用于对样品的粗测、对有机合成反应进程的检测等用途。

优于传统的柱层析色谱法具有低效，复杂，麻烦，伤害大等不利因素，Clark Still 于 1978 年提出了 Flash chromatography (FC) 的概念，即快速制备色谱，与传统借重力驱动的柱色谱相比较，FC 的特点在于：(1) 使用粒径稍小的硅胶作填料 (40 – 63 μm)，柱效高；(2) 利用压缩空气向柱内溶剂施压 (约 10 – 15 psi)，分离速度快。目前国内还没有该色谱技术的统一中文名称，较早的译名是“闪式色谱”，以后较多采用的译名是“快速色谱”。

快速制备色谱的先驱

Biotage，快速制备色谱的先驱，全球最早研制和生产快速制备液相色谱仪和色谱柱的厂家。

FC 的名称是以经典柱色谱为背景提出来的。

“Flash”意味着某个事情发生得很快，“flash chromatography”被看作是一种非常快速的色谱分离。因此，可以将“flash chromatography”译成“快速色谱”。

至今该分离技术已得到长足进展，开发了各种柱填料供其使用，填料形状可以是无定或球形，其粒径也更加细小 (20 ~ 40 μm)；色谱柱类型包括正相、反相和离子交换等；用低压泵输送流动相，操作压力可达 200 psi；色谱分离也由手工操作发展到由全自动化系统来完成。现在，我们可以把快速色谱看作是大粒径 (20 μm 以上) 填料柱上的高速分离技术。

Biotage 持续创新，目前，已经生产出世界上第一台全自动的 Flash-Mass 联用色谱仪 -- Isolera™ Dalton。

耗材方面，Biotage® SNAP Ultra 快速制备色谱柱，和其他色谱柱比较，有着最大的上样量和最好的纯化效果。

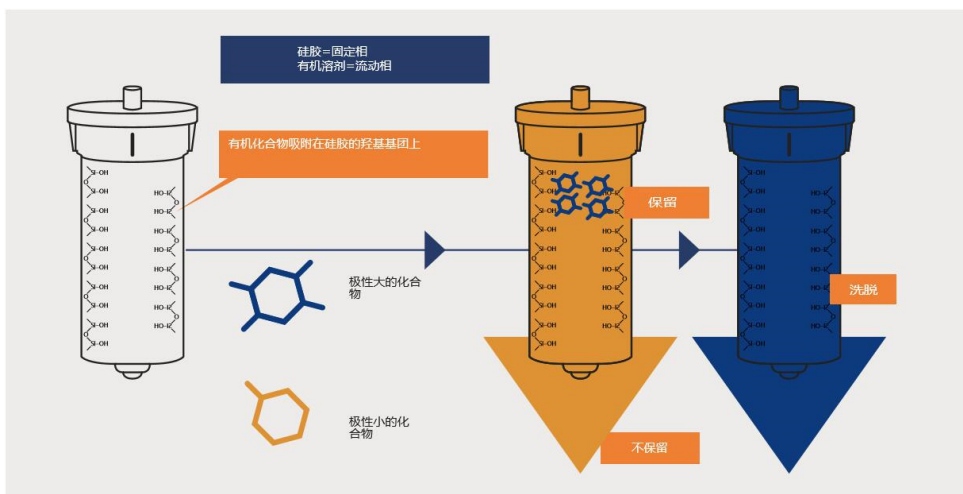




瑞典Biotage公司作为全球快速色谱柱技术的倡导者，早已在上世纪八十年代设计并生产出了色谱柱等消耗品，研发出了快速制备色谱仪以及相应的配套产品，于1990年推出手动型快速制备色谱仪，1992年推出半自动化的快速制备色谱仪，1996年推出全自动的快速制备色谱仪。目前Biotage快速制备色谱系统的市场占有率已处于绝对的领先地位。Biotage作为一家全球性的仪器设备及配件耗材的供应商，致力于帮助化学家们更安全更有效的从事科学研究工作。我们有深厚的行业知识，广泛的学术联系，专业的研发团队，我们可以为您提供最优秀的解决方案，以我们的灵活性和专业性，我们可以满足客户的各种需求。在分析和有机化学领域，我们有着坚实的知识储备和用户基础，我们可以提供市场上最广泛的产品解决方案。Biotage 将竭尽全力，为客户提供更加完美更加优秀的产品和应用解决方案！

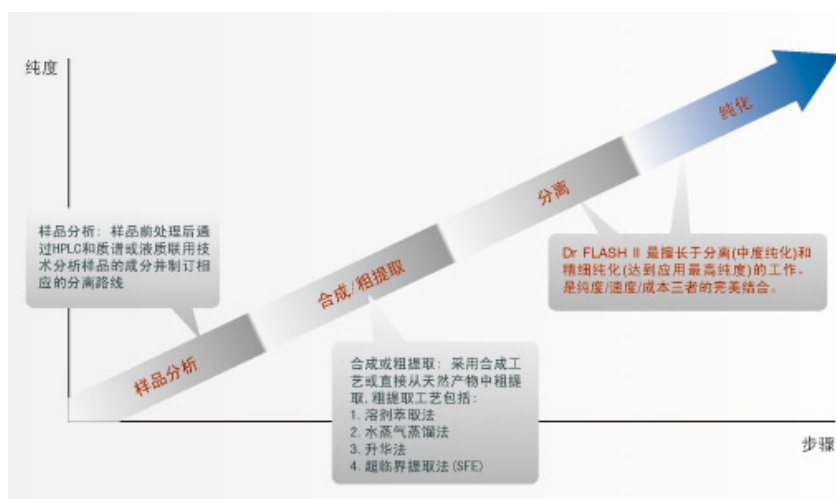
第三节 快速色谱原理

快速色谱是在原有的柱层析色谱的基础上发展而来，传统的柱层析色谱法是最原始的色谱方法，这种方法是将固定相注入下端塞有棉花或滤纸的玻璃管中，将被样品饱和的固定相粉末摊铺在玻璃管顶端，以流动相洗脱。通过溶剂的重力作用或者外部加压进行洗脱，同时收集分离纯净之后的组分。这种柱层析的原理在于混合物中各组分对色谱柱中固定相和流动相的亲和力不同，导致它们在色谱柱中的迁移速率，进而使它们在柱子下端流出的时间不同；因此根据混合物的性质选择合适的固定相和流动相，以达到将其中组分尽可能分离的目的。

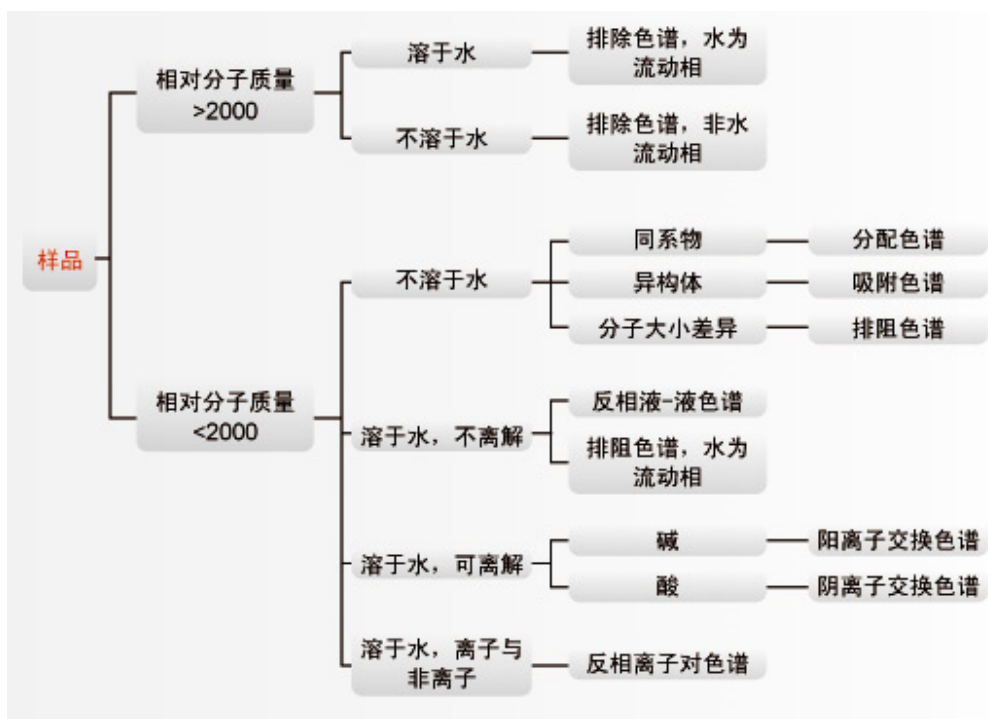


快速色谱系统是在传统的柱层析色谱原理的基础上，加入流动相的泵送系统，自动检测器以及自动收集支架等功能，使得春丽纯化更加智能，更加快速，更加高效的一套解决方案，Biotage 作为制备色谱的先驱，在快速制备领域积累和耕耘了 20 余年，积累的大量的经验和技術，是全球最早研制和生产快速制备液相色谱仪和色谱柱的厂家。目前，已经生产出世界上第一台全自动的 Flash-Mass 联用色谱仪 - Isolera Dalton。Isolera 系列产品目前已分布于全世界的每一个纯化实验室，为研发和生产，节约了时间和成本，缩短了研发周期。

目前快速制备色谱被广泛应用于混合物的分离，包括对有机合成产物、天然提取物以及生物大分子的分离。在药物中间体的纯化和有机产物纯化领域，快速制备色谱已成为最流行的一种纯化技术，它也被广泛地应用于天然产物研究领域：



在有机合成中蒸馏、重结晶和萃取均为纯化化合物的重要手段，但是，由于化合物多样性及需求量的不断增加，化合物纯化已经成为药物开发中的关键因素和瓶颈。对于复杂基质，或者是目标物与杂质类似的基质，这些技术便不能满足纯化要求了，如何选择高效率的纯化方法？这就需要用到色谱的方法以获得高纯度的化合物。



从合成到纯化，Biotage 提供了一套创新性的解决方法，使纯化分离更加方便和快捷。

第四节 影响分离因素以及相关概念

快速色谱是一种简洁高效的纯化技术，纯化方法易于建立，但是在建立快速色谱方法时，需要考察如下几个因素的影响，并且对这些因素进行优化，才能使分离纯化得到成功，这些因素包括：样品溶解性、正相色谱、反相色谱、流动相、固定相、洗脱方法、柱体积以及进样方法等。

样品溶解性

当我们在进行分离纯化的时候，样品的溶剂性会影响到分离纯化的结果。采用低极性溶剂作为流动相时，可能引起样品中脂溶性组分的沉淀，例如样品在样品瓶中或进样后在柱头部位沉淀析出。

为防止样品的析出，选择合适的溶剂体系是非常重要的，好的溶剂体系可以使样品中所有组分溶解，并使得各组分在薄层色谱（TLC）上达到最大分离。

一旦遇到样品不易溶解的情况，可以使用干法上样。当进样后，样品组分在柱头沉淀析出时，可以利用梯度洗脱逐渐增加溶剂极性直到组分溶解，样品将随流动相流过固定相。

正相色谱和反相色谱

在液相色谱中，分离效果好坏很大程度上取决于色谱填料的选择，但是色谱填料的选择范围很宽，要做合适的选择，必须对此有一定的认识和了解。正相和反相是两种对应的方法关系，他们所适用的样品体系会有所区别。

在正相色谱中，一般采用极性键合固定相，硅胶表面键合的是极性的有机基团，键合相的名称由键合上去的基团而定。最常用的有氰基（-CN）、氨基（-NH₂）、二醇基（DIOL）键合相。流动相一般用比键合相极性小的非极性或弱极性有机溶剂，如烃类溶剂，或其中加入一定量的极性溶剂（如氯仿、醇、乙腈等），以调节流动相的洗脱强度。通常用于分离极性化合物。一般认为正相色谱的分离机制属于分配色谱。组分的分配比 *K* 值，随其极性的增加而增大，但随流动相中极性调节剂的极性增大（或浓度增大）而降低。同时，极性键合相的极性越大，组分的保留值越大。

该法主要用于分离异构体，极性不同的化合物，特别是用来分离不同类型的化合物。

在反相色谱中，一般采用非极性键合固定相，如硅胶-C18H37（简称 ODS 或 C18）硅胶-苯基等，用强极性的溶剂为流动相，如甲醇/水，乙腈/水，水和无机盐的缓冲液等。

目前，对于反相色谱的保留机制还没有一致的看法，大致有两种观点：一种认为属于分配色谱，另一种认为属于吸附色谱。

分配色谱的作用机制是假设混合溶剂（水+有机溶剂）中极性弱的有机溶剂吸附于非极性烷基配合基表面，组分分子在流动相中与被非极性烷基配合基所吸附的液相中进行分配。吸附色谱的作用机制是把非极性的烷基键合相，看作是在硅胶表面上覆盖了一层键合的十八烷基的“分子毛”，这种“分子毛”有强的疏水特性。当用水与有机溶剂所组成的极性溶剂为流动相来分离有机化合物时，一方面，非极性组分分子或组分分子的非极性部分，由于疏溶剂的作用，将会从水中被“挤”出来，与固定相上的疏水烷基之间产生缔合作用。另一方面，被分离物的极性部分受到极性流动相的作用，使它离开固定相，减少保留值，此即解缔过程。显然，这两种作用力之差，决定了分子在色谱中的保留行为。

一般地, 固定相的烷基配合基或分离分子中非极性部分的表面积越大, 或者流动相表面张力及介电常数越大, 则缔合作用越强, 分配比也越大, 保留值越大。在反相键合相色谱中, 极性大的组分先流出, 极性小的组分后流出。

流动相

色谱过程中携带待测组分向前移动的物质称为流动相, 与固定相处于平衡状态, 带动样品向前移动的另一相。

用作流动相的物质有: 气体、液体、超临界流体等。而在我们正常使用的中低压制备色谱当中, 流动相是以液体为准。

一般溶剂系统是由一种高强度(极性)的和一种低强度(极性)的两种溶剂组合的混合体系。例如, 在正相色谱上, 有机化学家选择优化溶剂系统时, 通常先从正己烷/乙酸乙酯 1:1 和/或二氯甲烷/甲醇 95:5 体系开始, 这两种溶剂强度和选择性的差异可以为纯化样品确定合适的溶剂系统提供有价值的信息。

常见的中低压快速制备液相的流动相体系主要有:

正相体系: 乙酸乙酯-正己烷体系、乙酸乙酯-石油醚体系、二氯甲烷-甲醇体系、

反相体系: 乙腈-水溶液体系、乙腈-醋酸水体系、甲醇-水体系、乙腈-磷酸水体系等。

流动相的选择技巧

正相体系: 正相色谱选择原则与反相色谱相仿, 正己烷相当于是在反相色谱中的水相, 而乙醇、四氢呋喃或氯仿等相当于反相色谱中的乙腈或甲醇, 三氟乙酸和三乙胺也是用来调节 pH 值的, 但有一个问题要注意, 一般正相色谱不用缓冲盐, 因为正相色谱一般只用有机溶剂, 不用水相, 所以与缓冲盐不溶解, 而通常正己烷的量都是超过 50% 的。根据样品的结构, 酸式样品加酸调节流动相, 碱式样品加碱调整流动相。

反相体系: 常用做反相流动相的溶剂是甲醇和乙腈, 甲醇有其性价比的优势, 但是甲醇活性高, 可能与某些样品发生反应, 而且甲醇在低波长下有紫外吸收, 会降低分析方法的灵敏度; 乙腈虽然价格很高, 毒性比甲醇大, 但是洗脱能力比甲醇强, 很少与样品发生反应, 用作流动相系统压力要比甲醇低很多, 且截止波长比甲醇低 20nm, 增加了检测出在低波长下才有吸收的杂质的可能性, 所以我们一般倾向于多用乙腈, 少用甲醇。但是有时候样品峰形不好或者分离不好, 更换溶剂试试是一个很好的选择, 毕竟不同的溶剂提供不同的选择性。

对流动相的优化主要在水相上下功夫, 水里可以加酸、加碱、加盐, 从而改善峰形、提高分离度。流动相里加碱的情况比较少, 主要还是加酸, 常用的酸有磷酸、三氟乙酸、甲酸、乙酸、高氯酸、甲基磺酸等, 其中最常用的是磷酸和三氟乙酸, 磷酸在低波长下没有紫外吸收, 而三氟乙酸在低波长下有, 但是三氟乙酸易挥发而磷酸不行, 所以单纯做液相, 低波长下磷酸最合适, 三氟乙酸有吸收, 运行梯度时基线漂移很严重, 而做液质就要考虑首选三氟乙酸了, 近些年还比较流行加甲酸或乙酸。一般情况下这几种酸没有太大区别, 我们更多的是考虑通过加酸改变流动相的 pH 值, 从而改善样品的分离度和峰形。

色谱柱主要都是硅胶基质, 现有的填料处理工艺无法将硅胶上残余的硅羟基全部去除, 硅羟基会造成样品峰拖尾, 一般认为硅羟基的 pKa 在 3.5 到 4.5 之间, 低 pH 值能帮助抑制硅羟基的活性, 减小拖尾, 从而改善峰形, 提高分离度。水溶液中添加 0.1%(体积)的磷酸或者三氟乙酸其 pH 值大

一般在 2 左右，用作流动相正好抑制硅羟基的活性，所以开发液相分析方法时流动相首选水加 0.1% 的磷酸，然后再以此为基础做优化。

在单独用酸不行的时候就要考虑使用缓冲盐，缓冲盐的选择原则是：简单、稳定、缓冲能力强、配制简单，需要调 pH 值时要有相应的酸或碱。常用的缓冲盐是磷酸盐，主要是钾盐和钠盐，再有就是醋酸盐，常用的盐浓度在 10~20mmol/L 左右。以前因为色谱柱填料生产工艺的问题，往往需要在流动相里添加三乙胺来减少拖尾，但是三乙胺对色谱柱的寿命有很大影响，现在新的色谱柱都不再需要了。流动相里有时会需要调节 pH 值到碱性，具体 pH 要视色谱柱的耐受范围而定，常用 NaOH、KOH 溶液或氨水做为调节缓冲盐溶液碱性 pH 的试剂，也可以往水里单独添加氨水做碱性流动相。

在缓冲盐做流动相时，出峰太早、峰形很差、相似结构的化合物峰因为拖尾或峰型太宽而不能达到基线分离时，可以考虑使用离子对试剂，常用的离子对试剂主要是各种烷基磺酸钠和四丁基铵盐，但是流动相里使用离子对试剂时，系统需要的平衡时间长，样品保留时间不是很稳定，因为离子对试剂的背景吸收基线会很差，且做完样品后需要长时间清洗，所以我们尽量不使用离子对试剂。使用缓冲盐时要注意流动相混合以后盐可能析出的问题和盐背景吸收导致基线漂移严重的问题，尤其是在流动相里添加醋酸铵以后，在低波长下梯度变化时基线下降非常严重，严重影响对含量较小杂质的准确定量，可以考虑在乙腈里加入 10% 的水，水中预先加入 10 倍水溶液浓度的缓冲盐，这样梯度中 A、B 两项盐的浓度相同，可以避免基线漂移严重的问题。

原料药一般结构式比较大，分子构成比较复杂，开发分析方法时用水加磷酸效果可能效果不好，通常还要求最少尝试 2 和 6.5 两个 pH 值的磷酸盐缓冲溶液，并依据结果对流动相进行 pH 优化，如效果不理想再进一步尝试其它缓冲盐溶液。开发中间体或者 IPC 的分析方法时可以根据经验酌情简化流动相的选择过程。

固定相

在色谱分离中固定不动、对样品产生保留的一相。柱色谱或平板色谱中既起分离作用又不移动的那一相。

固定相的选择对样品的分离起着重要作用，有时甚至是决定性的作用。不同类型的色谱采用不同的固定相，如气-固色谱的固定相为各种具有吸附活性的固体吸附剂；气-液色谱的固定相是载体表面涂渍的固定液，液相色谱中的固定相为各种键合型的硅胶小球，离子交换色谱中的固定相为各种离子交换剂，排阻色谱中的固定相为各种不同类型的凝胶等等。而在液相色谱中的固定相主要以裸基质和键和之后的固定相填料为主。

一、基质

液相色谱中的固定相填料可以是陶瓷性质的无机物基质，也可以是有机聚合物基质。无机物基质主要是硅胶和氧化铝，无机物基质刚性大，在溶剂中不容易膨胀；有机聚合物基质主要有交联苯乙烯-二乙烯苯、聚甲基丙烯酸酯，有机聚合物基质刚性小、易压缩，溶剂或溶质容易渗入有机基质中，导致填料颗粒膨胀，结果减少传质，最终使柱效降低。

1) 硅胶

硅胶是 HPLC 填料中最普遍的基质。除具有高强度外，还提供一个表面，可以通过成熟的硅烷化技术键合上各种配基，制成反相、离子交换、疏水作用、亲水作用或分子排阻色谱用填料。硅胶基质填料适用于广泛的极性和非极性溶剂。缺点是在碱性水溶性流动相中不稳定。通常，硅胶基质的填料推荐的常规分析 pH 范围为 2~8。

硅胶的主要性能参数有：

- ①平均粒度及其分布。
- ②平均孔径及其分布，与比表面积成反比。
- ③比表面积：在液固吸附色谱法中，硅胶的比表面积越大，溶质的 k 值越大。
- ④含碳量及表面覆盖度（率）：在反相色谱法中，含碳量越大，溶质的 k 值越大。
- ⑤含水量及表面活性：在液固吸附色谱法中，硅胶的含水量越小，其表面硅醇基的活性越强，对溶质的吸附作用越大。
- ⑥端基封尾：在反相色谱法中，主要影响碱性化合物的峰形。
- ⑦几何形状：硅胶可分为无定形全多孔硅胶和球形全多孔硅胶，前者价格较便宜，缺点是涡流扩散项及柱渗透性差，后者无此缺点。
- ⑧硅胶纯度：对称柱填料使用高纯度硅胶，柱效高，寿命长，碱性成份不拖尾。

2) 氧化铝

具有与硅胶相同的良好物理性质，也能耐较大的 pH 范围。它也是刚性的，不会在溶剂中收缩或膨胀。但与硅胶不同的是，氧化铝键合相在水性流动相中不稳定。不过现在已经出现了在水相中

3) 聚合物

以高交联度的苯乙烯-二乙烯苯或聚甲基丙烯酸酯为基质的填料是用于普通压力下的 HPLC，它们的压力限度比无机填料低。苯乙烯-二乙烯苯基质疏水性强，使用任何流动相，在整个 pH 范围内稳定，可以用 NaOH 或强碱来清洗色谱柱。甲基丙烯酸酯基质本质上比苯乙烯-二乙烯苯疏水性更强，但它可以通过适当的功能基修饰变成亲水性的。这种基质不如苯乙烯-二乙烯苯那样耐酸碱，但也可以承受在 pH13 下反复冲洗。

所有聚合物基质在流动相发生变化时都会出现膨胀或收缩。用于 HPLC 的高交联度聚合物填料，其膨胀和收缩有限制。溶剂或小分子容易渗入聚合物基质中，因为小分子在聚合物基质中的传质比在陶瓷性基质中慢，所以造成小分子在这种基质中柱效低。对于大分子像蛋白质或合成的高聚物，聚合物基质的效能比得上陶瓷性基质。因此，聚合物基质广泛用于分离大分子物质。

二、化学键合固定相

将有机官能团通过化学反应共价键合到硅胶表面的游离羟基上而形成的固定相称为化学键合相。这类固定相的突出特点是耐溶剂冲洗，并且可以通过改变键合相有机官能团的类型来改变分离的选择性。

1. 键合相的性质

目前化学键合相广泛采用微粒多孔硅胶为基体，用烷烃二甲基氯硅烷或烷氧基硅烷与硅胶表面的游离硅醇基反应，形成 Si-O-Si-C 键形的单分子膜而制得。硅胶表面的硅醇基密度约为 5 个/nm²，由于空间位阻效应（不可能将较大的有机官能团键合到全部硅醇基上）和其它因素的影响，使得大约有 40~50% 的硅醇基未反应。

残余的硅醇基对键合相的性能有很大影响，特别是对非极性键合相，它可以减小键合相表面的疏水性，对极性溶质（特别是碱性化合物）产生次级化学吸附，从而使保留机制复杂化（使溶质在两相间的平衡速度减慢，降低了键合相填料的稳定性，结果使碱性组分的峰形拖尾）。为尽量减少残余硅醇基，一般在键合反应后，要用三甲基氯硅烷(TMCS)等进行钝化处理，称封端（或称封尾、封顶，end-capping），以提高键合相的稳定性。另一方面，也有些 ODS 填料是不封尾的，以使其与水系流动相有更好的“湿润”性能。

由于不同生产厂家所用的硅胶、硅烷化试剂和反应条件不同，因此具有相同键合基团的键合相，其表面有机官能团的键合量往往差别很大，使其产品性能有很大的不同。键合相的键合量常用含碳量(C%)来表示，也可以用覆盖度来表示。所谓覆盖度是指参与反应的硅醇基数目占硅胶表面硅醇基总数的比例。pH 值对以硅胶为基质的键合相的稳定性有很大的影响，一般来说，硅胶键合相应应在 pH=2~8 的介质中使用。

2. 键合相的种类

化学键合相按键合官能团的极性分为极性和非极性键合相两种。

常用的极性键合相主要有氰基(-CN)、氨基(-NH₂)和二醇基(DIOL)键合相。极性键合相常用作正相色谱，混合物在极性键合相上的分离主要是基于极性键合基团与溶质分子间的氢键作用，极性强的组分保留值较大。极性键合相有时也可作反相色谱的固定相。

常用的非极性键合相主要有各种烷基(C₁~C₁₈)和苯基、苯甲基等，以 C₁₈ 应用最广。非极性键合相的烷基链长对样品容量、溶质的保留值和分离选择性都有影响，一般来说，样品容量随烷基链长增加而增大，且长链烷基可使溶质的保留值增大，并常常可改善分离的选择性；但短链烷基键合相具有较高的覆盖度，分离极性化合物时可得到对称性较好的色谱峰。苯基键合相与短链烷基键合相的性质相似。

另外 C₁₈ 柱稳定性较高，这是由于长的烷基链保护了硅胶基质的缘故，但 C₁₈ 基团空间体积较大，使有效孔径变小，分离大分子化合物时柱效较低。

3. 固定相的选择

分离中等极性和极性较强的化合物可选择极性键合相。氰基键合相对双键异构体或含双键数不等的环状化合物的分离有较好的选择性。氨基键合相具有较强的氢键结合能力，对某些多官能团化合物如甾体、强心甙等有较好的分离能力；氨基键合相上的氨基能与糖类分子中的羟基产生选择性相互作用，故被广泛用于糖类的分析，但它不能用于分离羰基化合物，如甾酮、还原糖等，因为它们之间会发生反应生成 Schiff 碱。二醇基键合相适用于分离有机酸、甾体和蛋白质。

分离非极性和极性较弱的化合物可选择非极性键合相。利用特殊的反相色谱技术，例如反相离子抑制技术和反相离子对色谱法等，非极性键合相也可用于分离离子型或可离子化的化合物。ODS(octadecyl silane)是应用最为广泛的非极性键合相，它对各种类型的化合物都有很强的适应能力。短链烷基键合相能用于极性化合物的分离，而苯基键合相适用于分离芳香化合物。

三. 中低压制备中常用的几种填料：

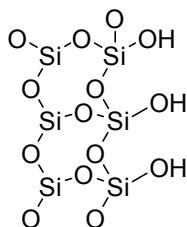
- A. 正相硅胶
- B. C₁₈ 反相硅胶
- C. 氨基
- D. 氰基
- E. 酸性氧化铝
- F. 二醇·中性氧化铝
- G. 碱性氧化铝
- H. 强阳离子交换树脂
- I. 强阴离子交换树脂
- J. 氟代十三烷

对于常用的几种固定相的选择，可以根据样品的性质和极性进行确定。如下图：

样品性质	固定相条件
低或者中等极性	正相硅胶 二醇硅胶 氰基硅胶 中性氧化铝
高极性	反相硅胶 氰基硅胶
碱性	正相硅胶 氨基硅胶 碱性氧化铝
酸性	正相硅胶 反相硅胶 酸性氧化铝
含氟原子	含氟硅胶 反相硅胶 中性氧化铝
含电荷	反相硅胶 离子交换树脂
含金属	金属清除硅胶

正相硅胶

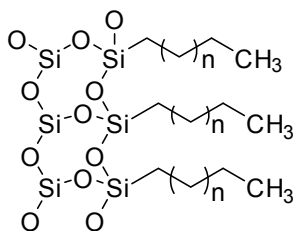
“裸露”或未功能化的硅胶含有四面体的 SiO_4 结构，在水溶液中，暴露 Si 原子的共价键吸引羟基，在其表面形成极性的硅醇基。



这些硅醇基具有极性吸附性，使裸露的硅胶可以作为正相快速色谱填料。

反相硅胶

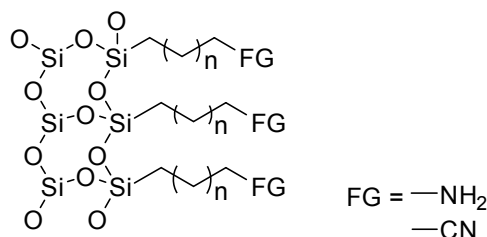
反相硅胶固定相，硅醇基被低极性或无极性的基团取代，如 C18 或苯基。



获得的亲脂性可用于纯化高极性 or 质子型化合物。（例如多羟基化合物，酸，盐等）

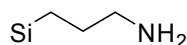
功能化填料

功能化填在碳链末端含有官能团，使得固定相对于某些化合物具有专属性。



下面介绍一些具体的功能性填料。

氨基



含有酸性或者碱性基团的化合物在正相或者反相硅胶柱上分离，有时会产生拖尾或者条纹，这些拖尾或条纹会引起色谱峰重叠或劈裂。

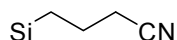
一般，对于碱性化合物添加三乙胺（TEA），酸性化合物添加乙酸（AcOH），由此产生两个问题：首先化合物分离前必须事先交换溶剂，然后运行结束后要将溶剂清除出系统；第二问题是 TEA 或者 AcOH 必须从分离后的化合物中出去，用适当的溶剂提取和清洗，或将混合物浓缩至油相，在高真空中保存过夜。

利用键和了酸性或碱性官能团的固定相，就不必转换溶剂，并且也不必使用 TEA 或者 AcOH，更不必分离后将他们除去。

氨基化硅胶可以用于正相或者反相条件，适用于纯化碱性化合物。正相硅胶纯化时添加 TEA 的化合物，其纯化用氨基化硅胶特别合适。

使用氨基化硅胶可以不必加 TEA，也就节省了分离后除去溶剂 TEA 的时间。

氰基



氰基化硅胶使用相似溶剂时，其作用跟正相硅胶相似。

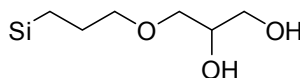
反相条件下，其作用与反相 C18 相似，只是化合物流出顺序可能不同。

氟代十三烷



全氟代十三烷硅胶用作硅胶填料，可用于分离含氟化合物。

二醇



二醇化硅胶具有较低的极性，并且比裸露的正相硅胶具有较长的保留时间。对正相硅胶难分离的化合物，二醇化硅胶提供了一种有意义的补充。

清除剂

硫醇和硫脲键合硅胶固定相是快速色谱中常用的清除剂键合固定相，用于纯化含有金属的反应粗产物。Biotage 在清除剂方面一直持续创新，推出了各种用于去除金属，亲电以及亲核分子的各种类型去除剂，为加快纯化和科学研究提供了更多的创新方法和思路。

Metal Scavenger Specifications

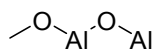
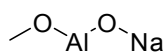
Scavenger	MP-TMT	Si-TMT	Si-Thiol	SCX-2	Si-Trisamine
Structure					
Type	Macroporous polystyrene	Silica	Silica	Silica	Silica
Name	Macroporous polystyrene-2,4,6-trimercaptotriazine	2,4,6-trimercaptotriazine silica	Silica 1-propanethiol; 3-Mercaptopropyl silica	Silica Propylsulfonic Acid	Propyl tris-(2-aminoethyl)amine silica
Particle size μm	150-355	40-63	40-63	40-63	40-63
Metals scavenged	Transition metals and group 1 or 2 alkali metals including Ag, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, K, Li, Na, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Sn, V, Zr, Z				
Typical scavenging conditions	Add 3-5 equiv. relative to Palladium to reaction and stir, RT, 5 minutes - 24 hours. Pass solution of metal through fixed bed/cartridge with scavenger, one pass or recirculate.				
Compatible solvents	Tetrahydrofuran (THF), Dichloromethane (DCM), Acetonitrile (MeCN), Toluene, Water, Methanol (MeOH), Ethyl Acetate (EtOAc), Dioxane, Dimethylsulfoxide (DMSO), N,N-Dimethylformamide (DMF)				
Storage	RT, (Long term, cool (4 °C)), dry location				
Shelf-life	Nominally 1 year but indefinitely stable when stored in original packaging under closed atmosphere conditions in a cool dark place.				

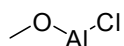
Biotage 主要几种金属去除剂以及固载试剂。

MP-Carbonate		PS-Benzaldehyde	
MP-Isocyanate		MP-Trisamine	
PS-Isocyanate		PS-TsNHNH2	
MP-TsOH			

氧化铝

有三种氧化填料可供选择：碱性，酸性，中性。





中性氧化铝可以用作作为硅胶柱的替代品，用于纯化对酸敏感的化合物，或者在纯化过程中由于硅胶本身微弱的酸性引起部分或完全降解的化合物的纯化。

同样地，酸性和碱性氧化铝可以代替正相和反相硅胶柱，用于纯化具有酸性或者碱性官能团，并且在硅胶柱上纯化会部分或者完全降解的化合物。

离子交换树脂

离子交换树脂还可以根据其基体的种类分为苯乙烯系树脂和丙烯酸系树脂。树脂中化学活性基团的种类决定了树脂的主要性质和类别。首先区分为阳离子树脂和阴离子树脂两大类，它们可分别与溶液中的阳离子和阴离子进行离子交换。阳离子树脂又分为强酸性和弱酸性两类，阴离子树脂又分为强碱性和弱碱性两类，可用于分离几乎任何的带电分子，从大的蛋白分子到小的核苷酸和氨基酸等等。

洗脱方式

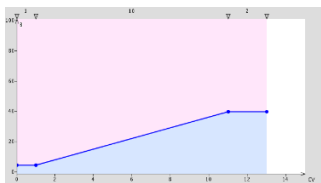
快速制备色谱分为等度和梯度两种洗脱方式，而梯度又可以分为两种，线性梯度和阶梯型梯度。

等度：



整个分离过程中，流动相的溶剂混合比例保持不变。这种方法最像薄层色谱，或者传统玻璃柱，通过反复试验，使目标化合物的 R_f 约是 0.3，确定理想的溶剂比例。任何的快速制备色谱都可以进行这种等度洗脱。Biotage Isolera 制备色谱，可以根据多个 TLC 色谱结果，形成理想的梯度条件。

线性梯度：



在分离过程中，流动相的溶剂混合比例呈线性变化。这种方法，适合样品中所有化合物的峰形都很好的情况。当然，实际操作中，也不需要如此，大多情况下，我们只对其中的一个化合物感兴趣，其他的时间和溶剂消耗，都是在分没用的杂质。

阶梯型梯度



阶梯型梯度通常所用时间较短，但是，对其中的一个，或者多个目标化合物来说，纯化的效果很好。只是建立和优化方法需要有很丰富的经验。Biotage Isolera™ Spektra 拥有专利技术，可以根据 TLC 条件，提供阶梯型梯度方法。根据展开溶剂的条件和 TLC Rf 值，Isolera Spektra 可以建立分离多达 6 种化合物的阶梯型梯度方法。这种新技术，也会基于样品量、色谱柱的载样量和纯化速度，建议合适的色谱柱。这种阶梯型梯度也适合分离纯化单一目标化合物。

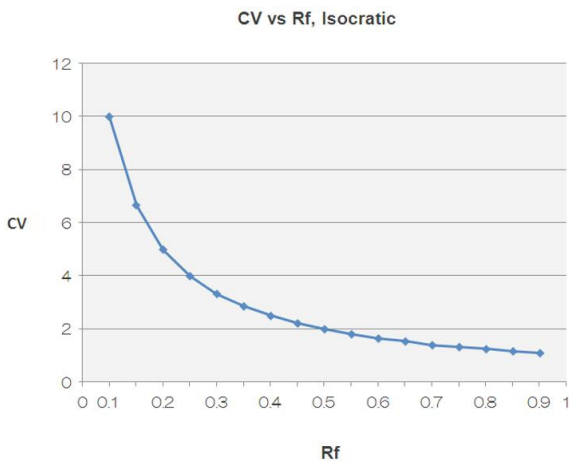
相比人工根据 TLC 条件和结果，按照经验设置的梯度方法，Biotage Isolera Spektra 提供的方法，可以节省 30-50% 的溶剂。

第五节 TLC 转换以及方法设定

柱体积

色谱柱内流动相的体积。也称为柱的死体积：包括固定相颗粒之间和颗粒内部空隙中的流动相体积。制备色谱可以用流动相通过色谱柱所需要的柱体积的数量来表示。

Rf 值和柱体积 CV 之间的关系：



Rf 值与 CV 值的关系图

柱体积 (CV) 取决于色谱柱里硅胶的量。CV 值可用来预测洗脱目标化合物所需要的溶剂条件。薄层色谱 (TLC) 结果用保留因子或者 Rf 值表达。 ($CV=1/Rf$)

TLC 所确定的保留因子可以用来预测，理想条件下，洗脱目标化合物所需要的制备色谱条件。

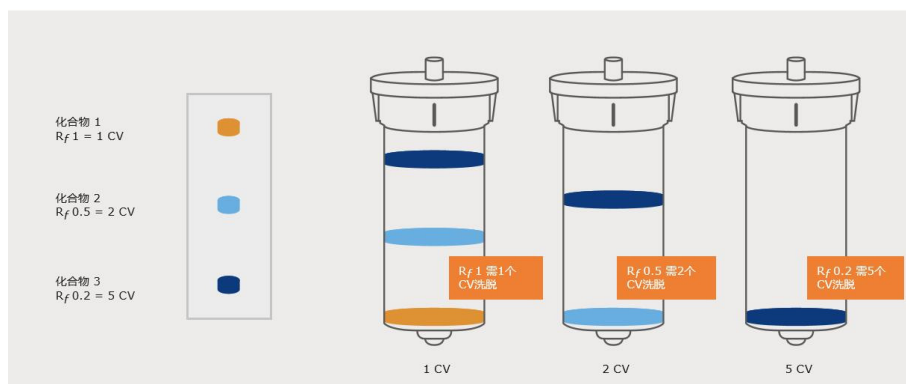
上图表示等度洗脱时， R_f 和 CV 之间的关系。例如，一个化合物的 R_f 是 0.5，CV 值是 2，则需要 2 个柱体积才能将其洗脱下来。

如果一支色谱柱的柱体积是 10ml，则需要 20ml 流动相洗脱下 R_f 值是 0.5 的化合物。而洗脱一个 R_f 值是 0.2 的化合物，则需要 5 个柱体积的流动相。

R_f 值	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70	0.65	0.60	0.55	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10
CV	1.10	1.17	1.25	1.33	1.40	1.54	1.65	1.81	2.00	2.22	2.50	2.86	3.33	4.00	5.00	6.67	10.10

R_f 值与 CV 值的关系表

TLC 条件转换到制备色谱



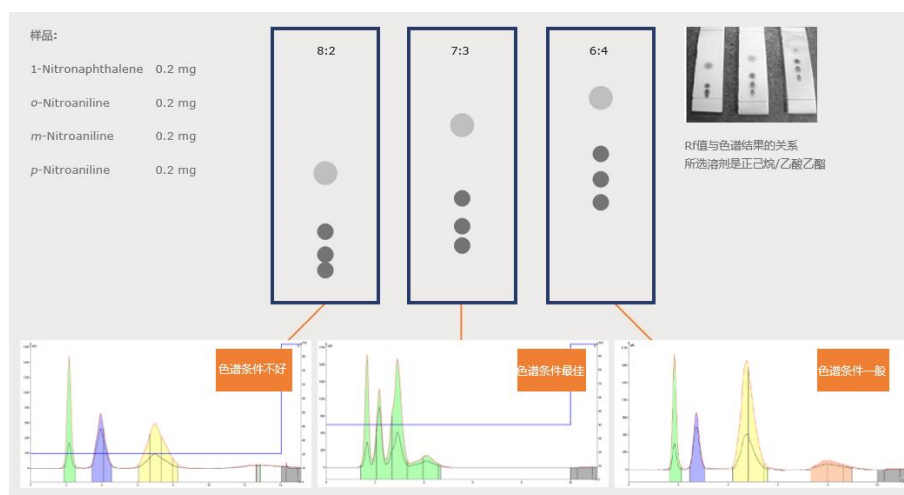
TLC 条件转换到制备色谱。化合物 1 的 R_f 值是 1，根据 $CV=1/R_f$ ，需要 1 个柱体积洗脱化合物 1。化合物 2 的 R_f 值是 0.5，根据 $CV=1/R_f$ ， $CV=1/0.5=2$ ，化合物 2 需要 2 个柱体积洗脱。化合物 3 的 R_f 值是 0.2，则需要 5 个柱体积洗脱下来。

根据 R_f 值预测色谱条件

根据 R_f 值预测色谱条件，薄层点之间的距离很重要。根据 TLC 能使点之间的距离最大的溶剂条件可以提供最佳的分离效果。然而，这种条件却不一定适合快速制备色谱。对快速制备色谱来说，当在 TLC 薄层板上，样品点离原点比较近，那么，色谱峰之间的距离会比较大，分离效果较好。比较理想的条件是，调整展开剂条件，使目标化合物 R_f 值在 0.15-0.35 之间。

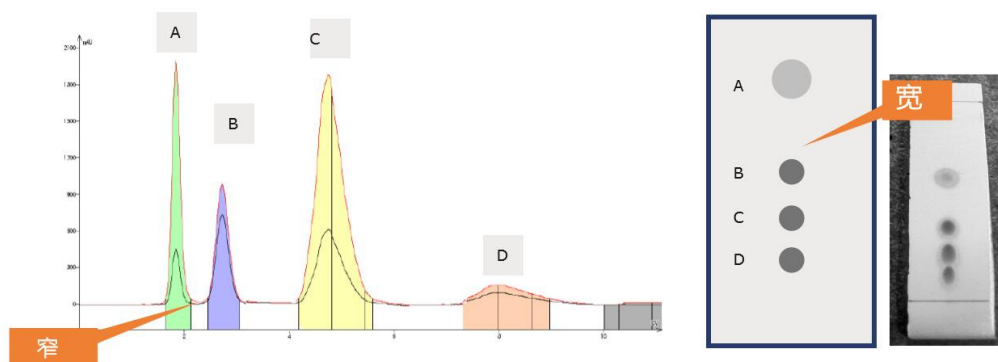
下面的例子，我们可能会认为合适的溶剂混合比是 6:4，因为，在 TLC 板上，样品点之间的距离都比较大，然而，从制备色谱看，并没有得到满意的结果。

当样品点离原点太近（比例 8:2），色谱峰是分散和彼此分开的，但是，第 4 个峰的峰高太小，几乎看不到，有丢失化合物的可能。



根据 CV 值，预测色谱条件

根据 TLC 计算出的 CV 值，被用来计算化合物的洗脱时间和需要的溶剂体积。当然，Biotage Isolera 快速制备色谱可以根据 TLC 条件预测色谱条件。下图是使用 Biotage SNAP 25g 色谱柱进行的一个纯化实验。



根据 TLC 条件，进行的制备色谱。色谱柱：Biotage SNAP 25g 制备色谱表现：峰 A 和峰 B 距离窄；TLC 板显示，化合物 A 和 B 距离宽。

如何优化 TCL 点板信息，确保化合物最高效分离？

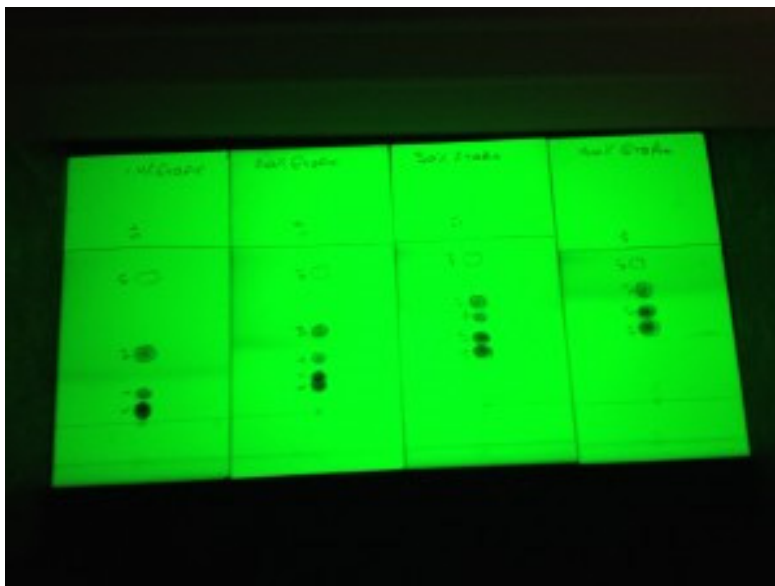
我们将讨论对洗脱溶剂比例该如何优化，以得到最理想的 Rf 值条件。同时在这样的条件下，Biotage Flash 快速制备色谱系统可以使得纯化分离效率最大化，更大上样量，更小溶剂消耗量，提高分离效率。

我们知道，对于化合物的分离而言，流动相溶剂的选择至关重要，它会直接影响到化合物的分离效果。那么在在流动相已经做好选择之后，纯化的关键就到了流动相比比例摸索和确定。这一步的优化不仅可以提高上样量，同时可以减少溶剂消耗量，节约时间和能源，进一步提高 Flash 纯化效率，很多用户反映说 Flash 并没有非常节省溶剂的原因主要出自这里。

每一次的纯化分离当中，目标化合物都是从其他杂质中分离纯化而来，但是并不是每一次的纯化都是最优条件，为了能够有快速的分离以及节约溶剂，找到最佳的优化条件是非常必要的。

当每次我们对纯化条件进行优化的时候，TLC 薄层色谱是最行之有效的办法，首先在选定的溶剂体系中，需要对溶剂比例进行调整，做到目标产物的 Rf 值保持在 0.1-0.4 之间（薄层色谱中，溶剂从原点渗透到距离 a 的时候，如果位于原点的物质从原点向前移动到 b，那么 b/a 的值（0.0—1.0）就是这种物质的 Rf 值），Rf 值的大小反应了目标化合物在对应条件下的保留难以程度，数值越大越不易保留；在 Flash 纯化中，我们常常使用柱体积（CV，之前的文章中，有提过柱体积的概念）的多少来表示保留的难易程度，那么我们知道的是，对于 Rf=0.2 的化合物的条件下，要把它从 flash 色谱柱中相同条件下洗脱下来，需要的柱体积应该是 1/Rf=5；根据定义，CV 值=1/Rf，我们就可以算出相邻两个化合物之间的柱体积之差

$$\Delta CV = 1/Rf_2 - 1/Rf_1 = CV_2 - CV_1$$



四种不同条件的溶剂体系：10% EtOAc, 20% EtOAc, 30% EtOAc, 40% EtOAc,

举例：如上图，五种组分的化合物在不同溶剂条件下（10%, 20%, 30%, and 40% ethyl acetate in hexane）进行薄层板展开实验，乙酸乙酯的含量越大，保留越弱，Rf 值越大， ΔCV 越小，越不易分离。从图中看，五种化合物在 TLC 板中都已经分离开，但是并不是每一种条件都可以应用到 Flash 柱层析当中，一般情况下，我们需要选定将 Rf 值应处于 0.1-0.4 之间，以化合物 3 为目标化合物而言，只有 10%EA 和 20%EA 的条件符合规则。

	10%	20%	30%	40%
Migration distance				
化合物 1	43	42	44	41
化合物 2	20	24	31	41
化合物 3	8	16	26	33
化合物 4	3	11	20	27
化合物 5	2	8	15	22

Solvent Front (SF)	52	50	51	46
Retention Factor (Rf)				
化合物 1	0.83	0.84	0.86	0.89
化合物 2	0.38	0.48	0.61	0.89
化合物 3	0.15	0.32	0.51	0.72
化合物 4	0.06	0.22	0.39	0.59
化合物 5	0.04	0.16	0.29	0.48
Column Volumes (CV)				
化合物 1	1.21	1.19	1.16	1.12
化合物 2	2.60	2.08	1.65	1.12
化合物 3	6.50	3.13	1.96	1.39
化合物 4	17.33	4.55	2.55	1.70
化合物 5	25.00	6.25	3.40	2.09
ΔCV				
1-2	1.39	0.89	0.49	0.00
2-3	3.90	1.04	0.32	0.27
3-4	10.83	1.42	0.59	0.31
4-5	8.67	1.70	0.85	0.3

即使已经掌握的合适的 Rf 和 CV 条件的情况下，分离方法也不一定就是完全合适，还需要看 ΔCV 值，这反应了相邻化合物之间的分离度，只有在最后确定了 ΔCV 值是处于有效范围之内，化合物才可以得到非常有效的分离，另外， ΔCV 值越大，此方法条件的载样量就会越大，所以 ΔCV 的选取至关重要，他不仅保证了化合物的分离，同时还进一步了加大了载样量，节省溶剂和时间成本。

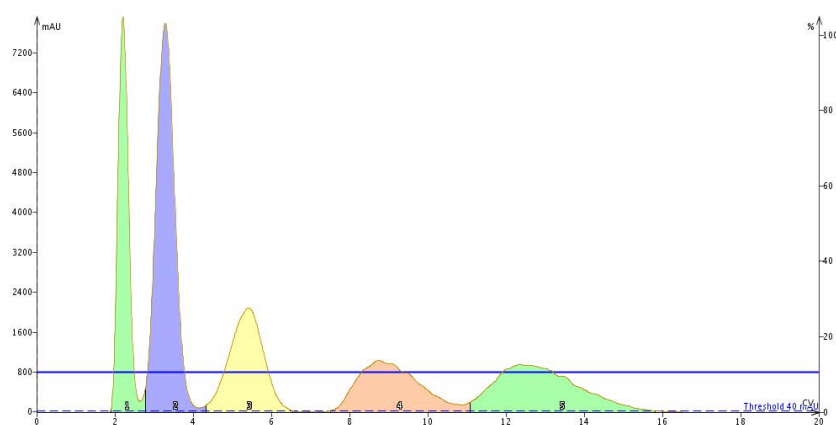
上表中，化合物 3 为目标化合物，在 10%EA 和 20%EA 的两种条件下，其 Rf 值分别为 0.15 和 0.32，相应的 CV 值分别为：6.5；3.13，为了确定更好的分离效果，我们需要计算化合物 3 与化合物 2、4 之间的 ΔCV 值，可以发现在 10%EA 的条件下， ΔCV (VS compound 2) = 3.9； ΔCV (VS compound 4) = 10.83；而在 20%EA 的条件下， ΔCV (VS compound 2) = 1.04； ΔCV (VS compound 4) = 1.42；数值小太多，会非常限制样品的分离纯化量。

Biotage 制定了不同 ΔCV ，对应使用的色谱柱以及纯化量，见下表：

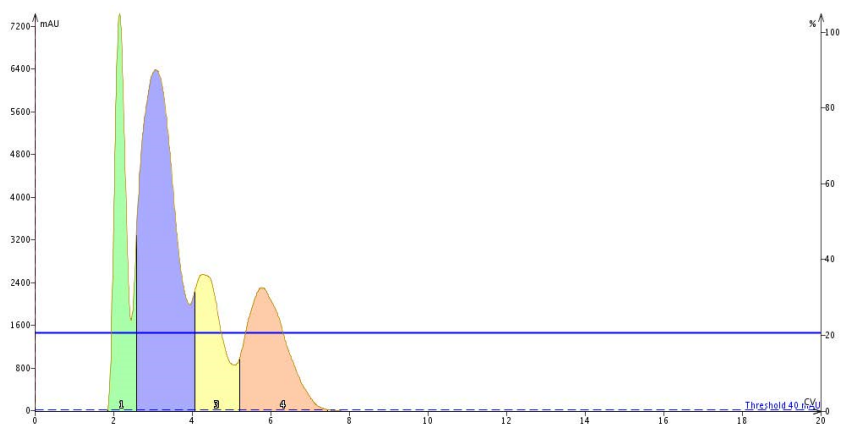
色谱柱规格	尺寸 (mm)	柱体积	流速 (mL/min)	上样量 $\Delta CV = 0.1-1.9$	上样量 $\Delta CV = 2.0-3.9$	上样量 $\Delta CV = 4.0+$
Biotage SNAP Ultra 10 g	21 x 55	17 mL	10-50	<200 mg	200-1000 mg	1-2 g
Biotage SNAP Ultra 25 g	30 x 72	45 mL	20-100	<500 mg	500-2500 mg	2.5-5 g
Biotage SNAP Ultra 50 g	39 x 81	85 mL	30-150	<1 g	1-5 g	5-10 g
Biotage SNAP Ultra 100 g	39 x 157	164 mL	30-150	<2 g	2-10 g	10-20 g
Biotage SNAP Ultra 340 g	71 x 168	582 mL	65-325	<6.8 g	6.8-34 g	34-68 g
Biotage SNAP 10 g	21 x 55	15 mL	10-20	<100 mg	100-500 mg	500-1000 mg
Biotage SNAP 25 g	30 x 72	33 mL	20-40	<250 mg	250-750 mg	750-2500 mg
Biotage SNAP 50 g	39 x 81	66 mL	30-50	<500 mg	500-2500 mg	2.5-5 g
Biotage SNAP 100 g	39 x 157	132 mL	30-50	<1 g	1-5 g	5-10 g
Biotage SNAP 340 g	71 x 168	470 mL	65-100	<3.4 g	3.4-17 g	17-34 g
Biotage SNAP 750 g	82 x 291	990 mL	100-300	<7.5 g	7.5-40 g	40-75 g
Biotage SNAP 1500 g	107 x 328	1980 mL	300-500	<15 g	15-80 g	80-150 g
Biotage ZIP Sphere 5 g	15.5 x 61	10 mL	5-25	<75 mg	75-325 mg	325-1000 mg
Biotage ZIP Sphere 10 g	20 x 69	19 mL	10-50	<150 mg	150-750 mg	750-3000 mg
Biotage ZIP Sphere 30 g	27 x 116	58 mL	20-100	<450 mg	450-2250 mg	2.25-4.5 g
Biotage ZIP Sphere 45 g	32 x 107	75 mL	30-150	<600 mg	800-4000 mg	4-8 g
Biotage ZIP Sphere 80 g	38 x 130	129 mL	30-150	<1.2 g	1.2-6 g	6-12 g
Biotage ZIP Sphere 120 g	42 x 176	213 mL	50-200	<1.8 g	1.8-10 g	10-20 g
Biotage ZIP 5 g	15.5 x 61	8 mL	5-20	<50 mg	50-250 mg	250-500 mg
Biotage ZIP 10 g	20 x 69	15 mL	10-20	<100 mg	100-500 mg	500-1000 mg
Biotage ZIP 30 g	27 x 116	45 mL	20-40	<300 mg	300-1500 mg	1.5-3 g
Biotage ZIP 45 g	32 x 107	60 mL	30-50	<450 mg	450-2250 mg	2.25-4.5 g
Biotage ZIP 80 g	38 x 130	102 mL	30-50	<800 mg	800-4000 mg	4-8 g
Biotage ZIP 120 g	42 x 176	170 mL	50-75	<1.2 mg	1.2-6 mg	6-12 g
Flash 75S	75 x 90	300 mL	100-250	<2 g	2-10 g	10-20 g
Flash 75M	75 x 150	500 mL	100-250	<4 g	4-20 g	10-40 g
Flash 75L	75 x 350	1000 mL	100-250	<8 g	8-40 g	40-80 g
Flash 150M	150 x 300	4.3 L	500-1000	<25 g	25-125 g	125-250 g
Flash 150L	150 x 600	8.6 L	500-1000	<50 g	50-250 g	250-500 g
Flash 400M	400 x 300	28 L	7000	<200 g	0.2-1.0 kg	1-2 kg
Flash 400L	400 x 600	56 L	7000	<400 g	0.4-2.0 kg	2-4 kg

可以发现，如果我们使用的是 Biotage SNAP 10g 常规色谱柱，20%的条件下，样品的最大的纯化量不能超过 100mg，而如果 ΔCV 值在 4 以上（10%EA 条件下），纯化量可以达到 500-1000mg。用户可以根据表格信息，自行选择色谱柱和溶剂纯化条件。

我们分别用这两种条件进行了对比实验：



100mg 样品，Biotage SNAP 10g 色谱柱，用 10%EA 的条件纯化以上五种化合物



100mg 样品，Biotage SNAP 10g 色谱柱，用 20%EA 的条件纯化以上五种化合物

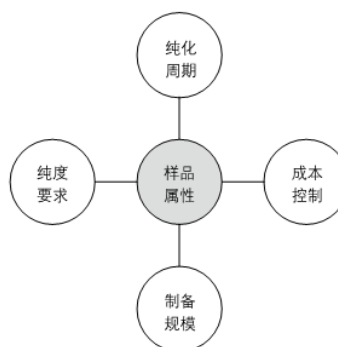
从以上色谱图可以发现，20%EA 条件下分离效果并不理想，只因为 ΔCV 值的选择并不好，而对 10%EA 条件下的分离就会有明显优势，化合物 3 在化合物 2、4 之间完美分来，同时另外几种化合物之间的分离也得到了完美呈现，相信在此条件下，上样量仍旧可以有一定的提升。

因此，从实验结果来看，仅仅在 TLC 上面显示化合物已分开的条件并不充分，我们还需要将 Rf 值以及 ΔCV 值确定下来，才能保证完美的分离。

第六节 正相梯度的快速制备色谱技术

在可接受的纯度要求下，获得大量的目标物质是纯化分离的目标。而样品的性质关系到制备过程的质量和成本，了解样品的性质，是得到好的实验结果的一个重要前提。在快速制备色谱中，需要了解的样品性质包括：

- 溶解度
- 目标成分的浓度
- 化学稳定性
- 样品基质复杂性
- 样品价值



纯化过程中的关键要素

色谱工作者常用的固定相是正相硅胶和反相硅胶。一般，正相硅胶选择低质子性溶剂（例如，正己烷/乙酸乙酯，正己烷/醚，或二氯甲烷/甲醇）；而反相硅胶选择高质子性溶剂（例如，水/乙腈，水/异丙醇，水/甲醇）；

在正相硅胶色谱上, 有机化学家选择优化溶剂系统时, 通常先从正己烷/乙酸乙酯 1:1 和/或二氯甲烷/甲醇 95:5 体系开始. 这两种溶剂强度和选择性的差异可以为纯化样品确定适合的溶剂系统提供有价值的信息。

表 1 快速制备色谱常用溶剂性质 (按照极性递增排列)

溶剂	极性	黏度 (cp 200)	沸点	UV 截止波长 (nm)
正己烷	0.01	0.33	69	210
正庚烷	0.01	0.41	98	200
甲苯	0.29	0.59	111	285
二氯甲烷	0.42	0.44	40	245
四氢呋喃	0.57	0.55	66	220
乙醇	0.88	1.20	79	210
乙酸乙酯	0.58	0.45	77	260
异丙醇	0.82	2.37	82	210
乙腈	0.65	0.37	82	210
甲醇	0.95	0.60	65	210
水	1.00	1.00	100	190

对于酸性和碱性有机化合物, 色谱固定相硅胶残存的硅醇基与之相互作用引起色谱峰拖尾。

加入流动相修饰剂 (一般百分之一或更少) 可以减小峰拖尾和使峰锐化, 改善酸性或碱性化合物的分离度。

三乙胺、氢氧化铵、乙酸和三氟乙酸是常用的流动相修饰剂。

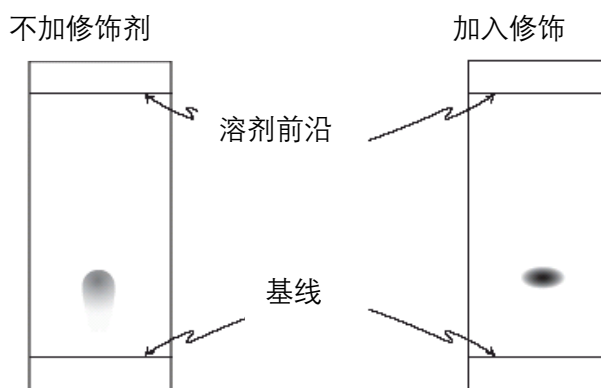
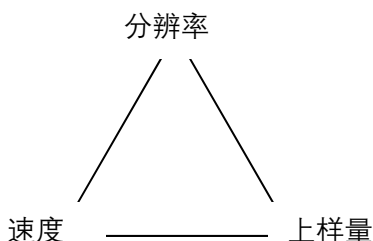


图 2. 流动相不加和加入修饰剂 TLC 板的对照

在 TLC 板上比移值 R_f 越小且各斑点间的 ΔR_f (选择性) 越高, 则进样量可以越大。

快速制备色谱的效能主要取决于分离速度和分辨率，同时，上样量也是一个重要的技术指标。所以色谱制备就要在分辨率，分离速度，上样量三者之间找一个平衡。



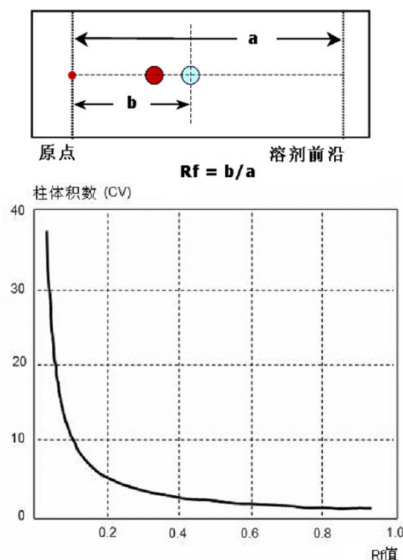
一般，在低选择性情况下，正相硅胶柱的进样量为硅胶填料重量的 1~5 %。在高选择性情况下，正相硅胶柱的进样量可以加大到硅胶重量的 10 %。

采用液体上样时，上样体积对样品的分离会产生一定的负面影响，建议液体上样体积不应超过柱死体积的 20%，否则分离度会明显降低。

在快速制备时，许多样品溶解度低。操作者有时倾向于使用强溶剂溶解样品。但是，如果所选溶剂比流动相强，则可能出现不理想的试验结果。因为强溶剂会干扰流动相的洗脱，而造成样品提前洗出，导致纯度显著降低。如果使用了强溶剂，操作者可以把样品溶解后与硅胶混合，除去溶剂进行干法上样，并且使流动相先从这段流过。

通过 TLC 预测组分的保留时间和分辨率

为了达到最佳的纯化效果，Biotage 建议使用 TLC 技术来确定一些关键参数：溶剂、溶剂强度、 R_f 等，在快速制备色谱中，利用 R_f 和 C_v 之间的关联 ($C_v = 1/R_f$)，可以把 TLC 方法转换为 Flash 的方法。



比移值与体积数的实际观察值的关系

R_f	C_v
0.9	1.1
0.8	1.3
0.7	1.4
0.6	1.7
0.5	2.0
0.4	2.5
0.3	3.3
0.2	5.0
0.1	10.0

比移值与柱体体积的换算

R_f	C_v
0.90	1.10
0.85	1.17
0.80	1.25
0.75	1.33
0.70	1.40
0.65	1.54
0.60	1.65
0.55	1.81
0.50	2.00
0.45	2.22
0.40	2.50
0.35	2.86
0.30	3.33
0.25	4.00
0.20	5.00
0.15	6.67
0.10	10.00

当探讨 TLC 的溶剂体系时，很重要的一点是要选择低的 R_f (0.15 – 0.35)，并且使其它杂质与目标化合物的相对比移值至少达到 $\Delta R_f = 0.2$ ，因为低的 R_f 相当于高的 C_v 值，高的 C_v 值意味着提

高了组分与硅胶的接触时间，提高了组分的分辨率，在 Flash 中 CV 是衡量组分保留时间的量， ΔCV 是表征分辨率的量。在理想的快速制备色谱分离中，待分离的化合物应在 3-6 个柱体积内洗脱下来，并且，两个互相分开的物质，起洗脱柱体积的差值应该在 1 以上。使用如下公式计算柱体积差值：

$$\Delta CV = \frac{1}{R_f1} - \frac{1}{R_f2}$$

举例说明：

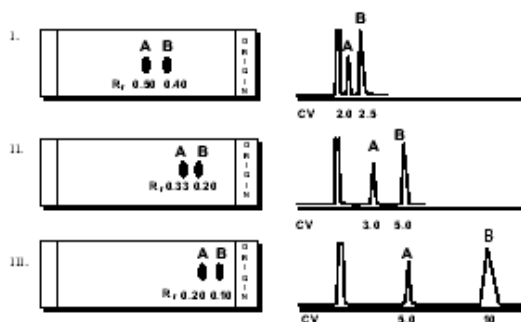


图 2 Rf - CV 关系图说明

(I) 组分 A、B 在 TLC 板上对于 $R_f = 0.5$ 和 0.4 ，有非常好的分辨率，使用同一溶剂体系，Flash 色谱上却是低的时间和低分辨率。（ $\Delta CV = 0.5$ ）

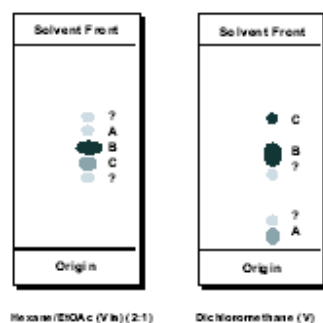
(II) 降低 R_f ($A = 0.33$, $B = 0.20$) 改进保留时间和分辨率。（ $\Delta CV = 2$ ）

(III) 进一步降低组分的 R_f 值，大大地提高了分辨率（ $\Delta CV = 5$ ）

优化选择性

首先要做的是获得最佳的 ΔCV ，根据 TLC 改变不同溶剂的混和比例，可以改变 ΔCV ，常用的方法是寻找两种溶剂的混和比例，以便增加目标组分与其他杂质之间的 ΔCV 值。

所有的溶剂都有一定的选择性，不同溶剂对于样品组分的相对保留时间具有不同的影响，表 2 是常用的溶剂及其选择性，有可能的情况下，选择性的优化包括正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲苯、四氢呋喃、醚等的混合物，对于极性强的胺类物质，使用二氯甲烷同甲醇或同乙腈的混合物，这些溶剂的混和具有很广的分离选择性，使纯化最优。



图三 溶剂选择性对于纯化分离的影响

第一种混和溶剂对分离效果比较差（目标物质 B 与杂质 A、C 的分离）

第二种混合溶剂对分离效果比较好，可以得到纯离的 B 组分

溶剂强度的优化

溶剂选定以后，接下来要调整溶剂的极性强度，使得 R_f 值在 0.15 ~ 0.35 (6.7 ~ 2.8CV) 之间的组分可以充分使得洗脱、纯化效果大大改善。

每种溶剂有自己的极性（表三），溶剂强度的对于极性相差很大溶剂具有非常有用的价值，相同强度的溶剂具有不同的选择性。

降低流动相中极性溶剂，可以使感兴趣组分的 R_f 值达到优化的范围。

例如，流动相是 50% 的正己烷和 5% 乙酸乙酯（混合后的强度为 0.3%），具有充分选择性。

下图：目标化合物 B 的 R_f 值为 0.2 (5CV)

杂质 A 的 R_f 值是 0.55 (1.8CV)

ΔCV 为 0.7，如此低的 ΔCV 只有一小部分的样品可以纯化，如果超载则分辨率和纯化组分都得不到好的效果。

降低溶剂强度到 60% 正己烷和 40% 乙酸乙酯（溶剂强度 0.24）

下图：目标化合物 B 的 R_f 值 0.2 (5CV)

杂质 A 的 R_f 值是 0.3 (3.3CV)

ΔCV 为 1.7，这样柱子的加样量可以增加五倍（表一）

找到了具有充分保留时间的溶剂配比，也可以换另外一种类似强度，但不同选择性的溶剂进行比较（图四下图），溶剂系统确定后， R_f 值， ΔCV 值也确定了，使用表一选择合适的柱子。

不同溶剂的极性强度：

混和溶剂的极性强度计算式 (A : B)

$$(A\% \times \text{溶剂强度}) / 100 + (B\% \times \text{溶剂强度}) / 100$$

例如 正己烷/乙酸乙酯 (50 : 50)

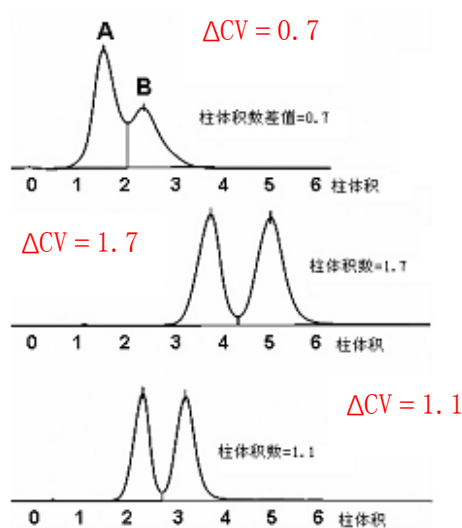
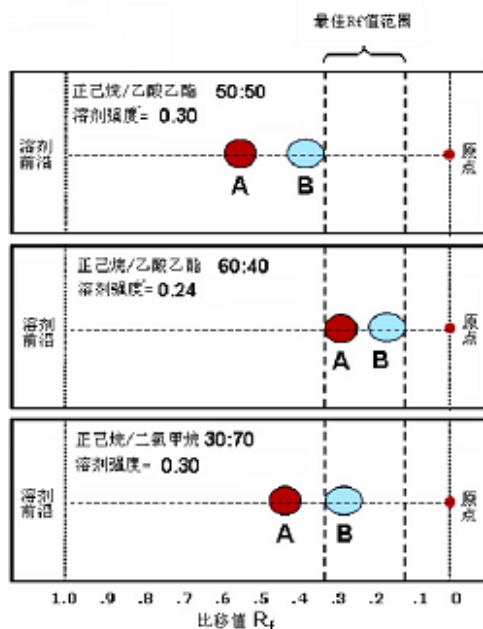
$$\text{混合后强度} = 0.5 \times 0.01 + 0.5 \times 0.58 = 0.3$$

正己烷/乙酸乙酯 (60 : 40)

混合后强度 = $0.6 \times 0.01 + 0.4 \times 0.58 = 0.24$

正己烷/二氯甲烷 (30 : 70)

溶剂强度 = $(0.3 \times 0.01) + (0.7 \times 0.42)$



溶剂强度对组分的保留时间和分辨的影响，通过 TLC 我们可以看到，正己烷/乙酸乙酯按照 50 : 50 混和 ($\Delta CV = 0.7$)

上图：无论目标化合物 B 和杂质 A 的 R_f 值都未能达到 0.15 – 0.35 的最佳值，纯化效果将比较差 (50 : 50)

中图：调整混和溶剂比例到 60 : 40，B 和 A 的 R_f 值都达到 0.15 – 0.35 之间，这样 Flash 可以得到优化的分离效果 (组分停留时间及分辨都改善了许多) $\Delta CV = 1.7$

下图：改变溶剂体系 30 : 70 (正己烷/二氯甲烷)，溶液极性均为 0.3，选择性及分辨都改变了 ($\Delta CV = 1.1$)

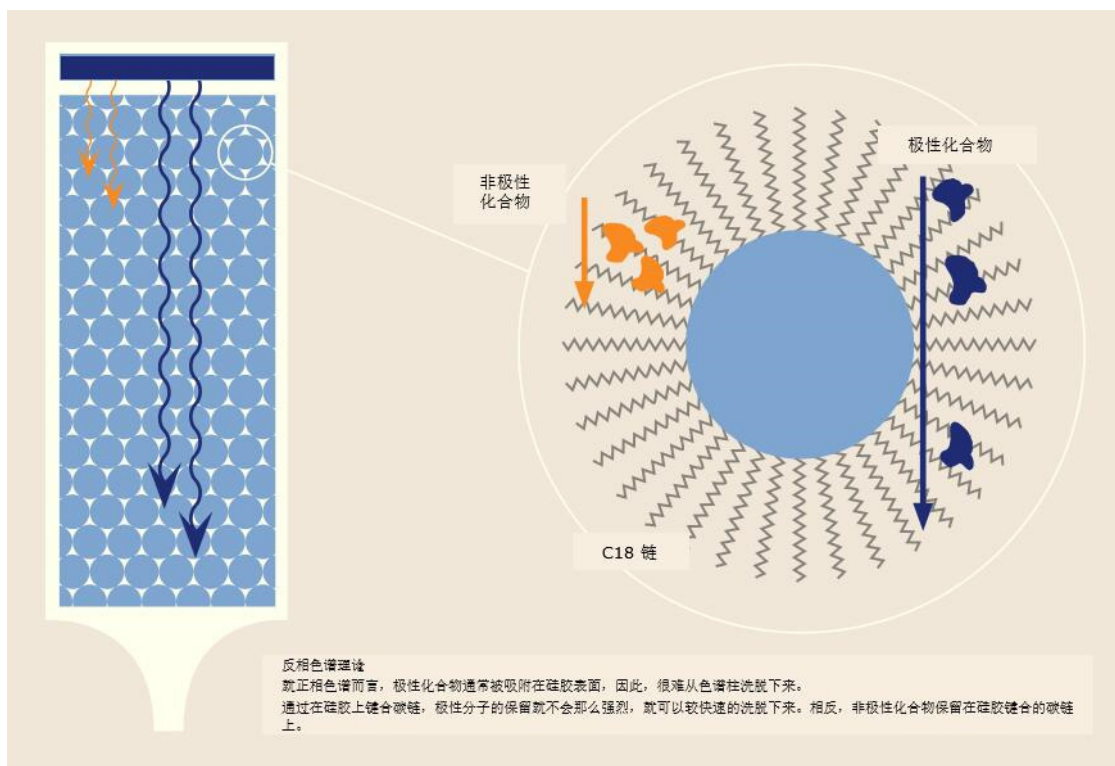
一旦溶剂系统选定，便可以得到 R_f 值，计算出 ΔCV 值，利用下表便可以选择出最合适的柱子及载样量，这样我们便可以方便、快捷的进行分离纯化了。

第七节 反相快速制备色谱技术

反相快速纯化色谱，以较低的成本，和对环境的影响，实现样品的高效分离纯化，影响了整个化学工业。反相色谱是巨大的飞跃，但是，由于缺乏信息和数据的支持，化学家在很多情况下，靠经验进行纯化工作。极性化合物、水溶性化合物被很多药物和天然产物研发机构重视。这些分子是组成生物体的重要化合物。传统方法是用 HPLC(高效液相色谱法)纯化制备此类化合物。高效液相色谱法是制备最终产物的有效方法，但是，成本太高。对于每天都要进行大量纯化工作的化学家来说，使用预装的反相快速纯化色谱柱是一种非常好的选择，可以处理天然或者合成的极性化合物。反相快速纯化色谱使用较大颗粒的填料作为固定相，这降低了色谱柱的工作压力，因此，可以使用更大的色谱柱，实现处理量从 mg 级到 g 级。

反相快速制备色谱不同于正相色谱，主要表现在三方面：

- 1) 固定相
- 2) 流动相
- 3) 需要纯化的样品类型



由于化合物的多样性，有时很难选择最合适的固定相和分离模式。适合使用反相色谱分离的化合物类型见下表

样品	举例	正相硅胶	反相硅胶	氨基键合硅胶
生物碱	可卡因, 吗啡, 烟碱, 奎宁	•	•	•
氨基酸			•	
镇痛剂	阿司匹林, 对乙酰氨基酚, 布洛芬	•	•	
芳烃		•	•	•
碱性药物			•	•
碳水化合物	糖		•	•
黄酮类化合物			•	
苷类			•	•
脂类	磷脂	•	•	
天然产物	萜类, 皂苷, 茶多酚	•	•	
(寡)核苷酸			•	
多肽 (<2k MW)		•	•	
类固醇		•	•	
单宁			•	
维生素	生育酚 (维生素E), 视黄醇 (维生素A), 维生素D, 维生素K	•	•	•

下面是关于固定相和流动相的简单介绍。

固定相的结构

正相硅胶具有极性基的表面；而反相硅胶是经过改性，表面键合烷基链（例如 C-18），它的极性更小，因此，它对极性化合物有较小的保留。



经典的反相硅胶表面的图示。C-18 的烷基链键合在硅胶表面，增加了硅胶的疏水性。

流动相

正相色谱，因为硅胶表面的硅羟基极性大，极性大的水溶性化合物很难被洗脱下来，只有使用更强极性的溶剂才能成功。在正相色谱条件下，可供选择的溶剂很少，因此，对极性大的水溶性化合物，很难得到足够纯度的产品。

然而，在反相色谱中，因为，极性化合物和固定相的吸附性较小，因此用较小极性的溶剂，就可以实现比较理想的洗脱效果。所以，在实践中，反相色谱可以提供更好的分离方法。并且使用更廉价的溶剂，例如：水、甲醇、乙腈等。

分离纯化是基于溶质在流动相和固定相之间的相互作用。在色谱过程中，流动相的组成可以逐步改变（即梯度洗脱），解吸附保留更强的化合物到流动相，以控制分离纯化的过程，以及化合物的洗脱。

优化反相快速制备方法

使用快速制备色谱系统，反相色谱分离纯化的范围得以扩展，有两种路径实现反相色谱分离纯化：

1. 副产物洗脱下来，而目标化合物保留在色谱柱上，从而从混合物中得到目标产品。
2. 目标化合物洗脱下来，而副产物保留在色谱柱上。

通常，目标化合物保留在色谱柱上更有效，因为，这样可以较为集中的把目标化合物洗脱下来。这也意味着，浓度非常低的样品也可以用在反相色谱柱上，因为，化合物以浓缩富集在反相色谱柱上，当合适的溶剂梯度通过色谱柱时，浓缩的目标化合物，可以以很窄的条带被洗脱下来，这样，含有目标化合物的馏分体积也会很小。

本册主要关注第一种方法，因为，它是最流行，最有效的反相快速制备样品的方法。

对于纯化水溶性物质，反相快速制备色谱技术方法采用了与正相技术不同的纯化方法优化途径，反相技术采用 HPLC 和 Biotage SNAP – C18 柱子来优化纯化条件。

在 HPLC 系统上使用 10 – 90% 的氰化甲烷或者甲醇的水溶液，流速为 3mL/min (1CV/mins)，创建梯度。

1. 10% ACN (MeOH) 1min
2. 10 – 90% ACN (MeOH) >10min
3. 90% ACN 2CV

不断修改这个梯度，直到目标化合物被分离开来，但至少有五分钟的保留时间，HPLC 上可以通过增样品量直到分辨率丢失的方法来优化加样量。

转化 HPLC 方法到快速制备色谱：

转化组分的保留时间 (T) 到 CV，两者关系为

$$CV = T/T_0 \quad (T_0 = \text{无效时间, 大约 1min, 3mL/min})$$

用同样的公式可以把梯度的时间到 CV

梯度时间/ T_0 = 快速制备色谱的梯度方法

用此公式和相同的溶液体系，便可很好的进行实验了。

由于不同生产商的硅胶相对湿度和结合剂的不同，有时最佳的 TLC 分离条件并不能直接应用到快速制备色谱分离。在实际工作中，应该考虑到这些因素的影响。建议使用同一规格的固定相。流动相的组成以体积比 (V/V) 表示，与快速制备色谱的表示方式一致。

第八节 相关反相应用

1) 天然产物的纯化

许多常用的、基础的药物都是天然存在的化合物。在快速增长的保健品市场，很多品种也都是天然存在的产物。这些天然存在的产物可以是花、叶、树皮、根、果实，或者其他天然物质。开发这类天然物质，最主要的挑战就是从天然物质中提取感兴趣的化合物。提取物中的活性物质（API）含量很小（可能只有 0.3%到 3%）。

环糊精

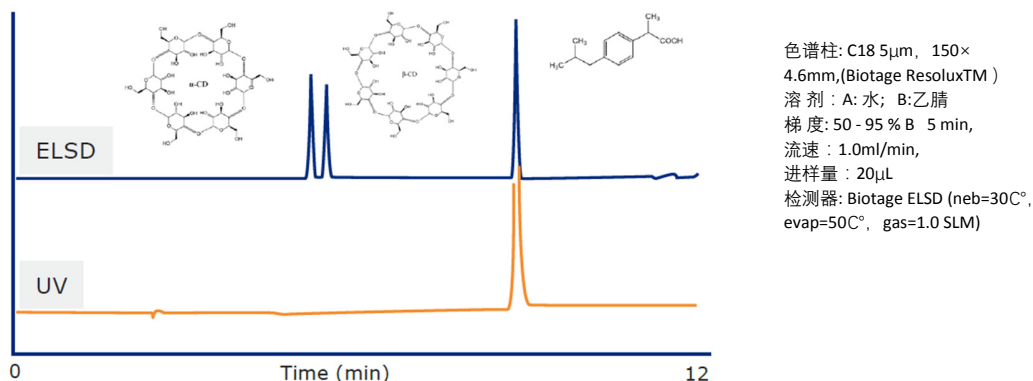


Figure 2: The ELSD revealed the true composition of a mixture of cyclodextrin and ibuprofen due to its sensitivity to compounds that possess weak or no UV chromophores.

环糊精和异丁苯丙酸紫外吸收极弱，而 ELSD 则能检测出混合物的所有成分。

甜味剂

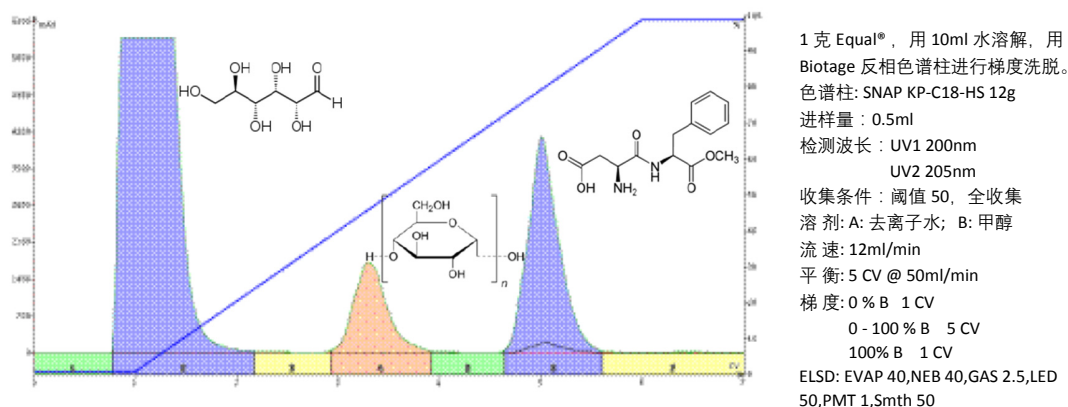
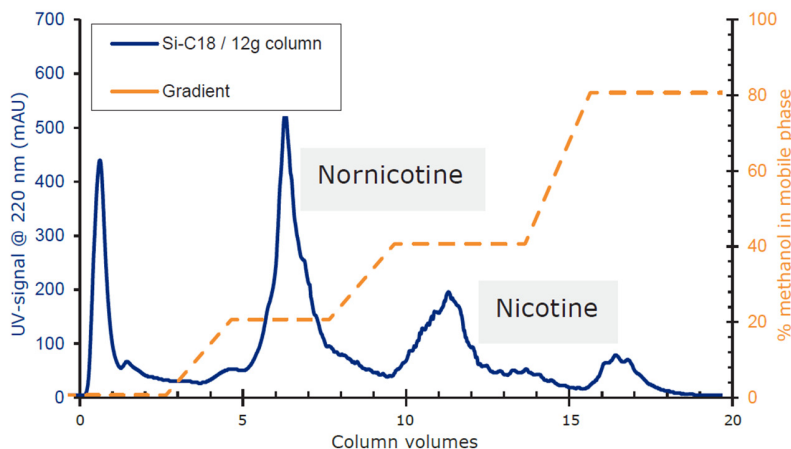


Figure 3: 1 packet (1 g) of Equal[®] was dissolved in 10 mL of water and separated using a reversed phase gradient with a pre-packed Biotage[®] SNAP KP-C18-HS cartridge.

反相色谱法处理商品 Equal[®]（阿斯巴甜[®]，右旋糖，麦芽糖糊精），成功的把四个成分分离开。

烟叶提取物



1g 市售烟草，用 10ml, 20mM 乙酸铵水溶液，pH 6.8，萃取 24 小时，离心去除固体物质。色谱柱：SNAP KP-C18-HS 12g 成分非常复杂，但是，主要成分还是能鉴定出来的：去甲烟碱、烟碱、新烟草碱、尼古丁和调味剂。

烟草提取物的成分极为复杂，化学家对它的组成极为感兴趣。

本例，使用 Biotage 公司 SNAP KP-C18-HS 快速制备色谱柱，纯化制备烟草提取物。

2) 多肽纯化

全保护的多肽分子量很大(2-3 kDa)，表现为疏水性，但是，用反相色谱柱仍然可以有效分离。相对于正相玻璃色谱柱，用反相柱分离度更好，纯化时间更短，样品回收率提高，可以大大降低溶剂和吸附剂的消耗。多肽 ACP 65-74(图 6)是一个很好的例子。在不同的阶段，使用正相和反相色谱进行分离纯化。

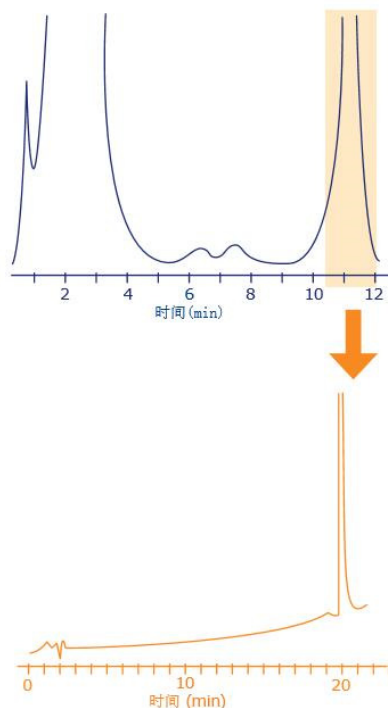
用传统方法很难合成这个序列，但是，用微波多肽合成仪（例如 Biotage® Syro Wave™）就非常简单，并且产物纯度也很高。

流动相 A: 去离子水或者 HPLC 用水 + 0.05% TFA 流动相
B: 乙腈 + 0.1% TFA
流速: 8ml/min
预平衡: 5 CV @ 50 ml/min
梯度: 10% B - 100% B 15min
检测波长: UV 220nm
色谱柱: SNAP KP-C18-HS 12g
HPLC 检测方法
流动相 A: 去离子水或者 HPLC 用水 + 0.05% TFA 流动相
B: 乙腈 + 0.1% TFA
流速: 1.5 ml/min
梯度: 0 - 100% B 40min
检测波长: UV 220nm
分析柱: C18, 5 μ m (4.6 $\times$ 250mm)

H-val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-OH

酰基载体蛋白(ACP 65-74)

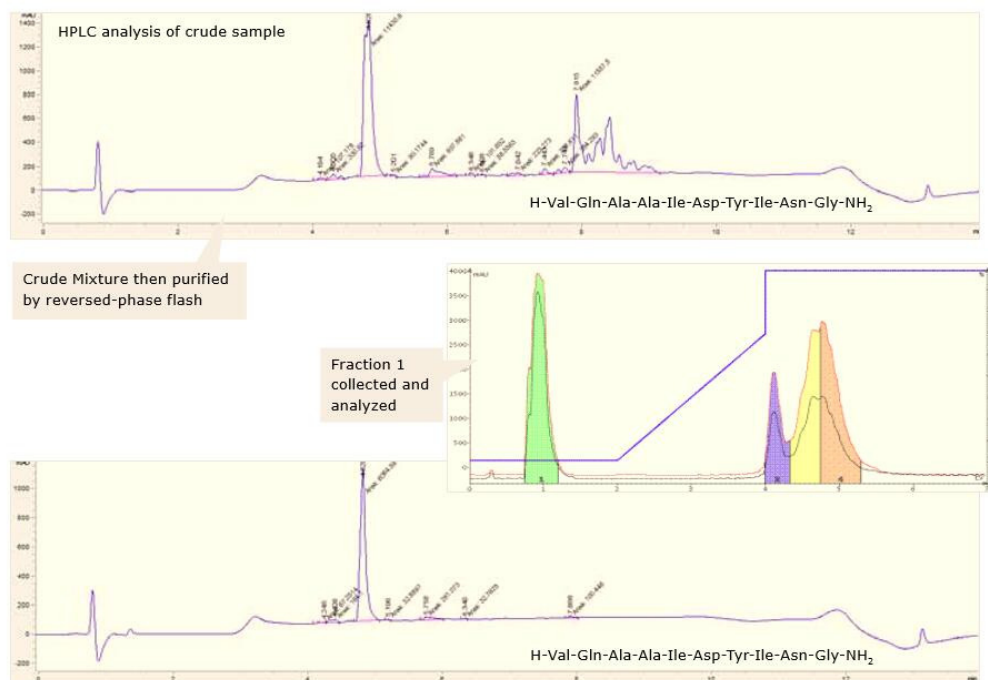
在肽链生成的过程中，通过阻止二级结构的形成和发展，可以提高多肽的收率。此例，ACP 65-74 的合成是采用液相法(5+5)片段合成技术。通过正相快速制备色谱纯化保护好的多肽片段，反相快速制备色谱纯化去保护的多肽，这样，就不用昂贵的 HPLC 进行纯化了。



3) 脱盐

脱盐是分离纯化中，常用的经典方法。它可以将小分子量的杂质或者副产物除掉，和大分子的目标化合物分开。这种方法常用于天然产物分离。

而氨基酸/多肽的产品和副产物，分子量有时候差别不大，这就要依靠试剂来进行纯化，也就是缓冲液离子交换，也可以通过分子排阻凝胶（凝胶过滤）等方法。分子排阻凝胶方法相对温和。但是相对于快速制备色谱方法，它的成本更高，方法放大有时候也会遇到问题，而且，样品会被稀释，导致需要处理大体积的溶液，以得到目标产物。反相快速制备方法脱盐，后期需要回收、处理的溶剂体积非常小。这是因为目标化合物被固定相吸附，可以用小体积的极性小的流动相（例如乙腈）洗脱。这样，后期溶剂蒸发浓缩的工作也就很简单了。



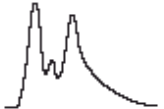
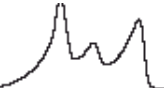
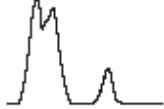
ACP 10 肽粗产物的 HPLC 分析结果（上图），样品经过 Biotage SNAP KP-C18-HS 12g 色谱柱纯化后(右图)，用 HPLC 方法对馏分 1(10ml) 进行分析检测的结果(下图)。

用传统的 SPPS 方法合成 ACP 65-74 多肽，脱盐后的效果见图 8，用 HPLC 方法分析合成出来的粗产品，纯度约 45%，用 Biotage SNAP KP-C18-HS 12g 色谱柱纯化后的产品纯度达到 90%。

附录

快速制备色谱常见故障及解决方法

表 1. 色谱峰的问题

现象	原因	维修
峰展宽 	保留时间过长	等度洗脱时增加强洗脱能力的溶剂含量也可用梯度洗脱
	柱外体积过大	将连接管径和连接管长度降至最小
	化合物流出太早	使用大柱子, 减少上样体积; 改为洗脱能力弱的流动相
	样品过载	进小浓度小体积样品, 减少上样量
	相对流动相, 样品溶剂太强	改变流动相; 或者采用固体方式上样
峰拖尾 	样品过载	降低样品量, 增加柱直径采用较高容量的固定相
	pH 值高	换成反相柱, 更换对 pH 稳定的柱子
	峰干扰	清洁样品, 调整流动相
	硅羟基作用	加三乙胺, 用碱致钝化柱增加缓冲液或盐的浓度降低流动相 PH 值, 钝化样品
	干扰峰	进样前提高样品纯度, 改变流动相, 选择亲和柱
	柱塌陷或形成短路通道	更换色谱柱, 采用较弱腐蚀性条件
峰前置 	柱装填不好	更换柱子
	柱或保护柱被污染	消除污染, 更换保护柱
	样品溶剂过强	改变流动相, 或者样品溶剂
	样品过载	换大容量柱子或减少上样量
肩峰或分叉 	干扰峰	进样前提高样品纯度, 改变流动相, 选择亲和柱
	前面运行化合物的干扰	延长运行时间, 结束运行时提高 B 相比例, 加长柱子平衡时间
	样品过载	换大容量柱子或减少上样量
	柱或者保护柱被污染, 部分堵塞	消除污染和堵塞
	柱装填不好	更换柱子和降低流动相溶剂强度
	柱塌陷或形成短路通道	更换色谱柱, 采用较弱腐蚀性条件
	样品溶剂过强	采用较弱的样品溶剂
	样品和流动相不相溶	使用易溶解的溶剂
	样品组分没分开	延长运行时间, 减缓强洗脱能力的流动相增加的速率
倒峰 	流动相吸收大于洗脱时的吸收	选择吸收低的流动相, 检验流动相纯度
	空气随样品加入系统	确保固体上样环或液体进样器没有气泡
	流动相不纯	检验流动相纯度或使用 HPLC 级溶剂
	前面实验化合物的干扰	结束运行时提高 B 相比例, 加长柱子平衡时间

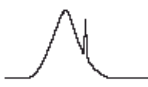
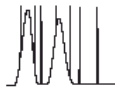
	样品中未知物	处理样品, 提高样品纯度
	柱未平衡	重新平衡柱, 用流动相作样品溶剂 (尤其是离子对色谱)
	三氟乙酸(TFA)氧化(肽谱)	每天新配, 用抗氧化剂
	流动相中含稳定剂或稳定剂变化	每天新配流动相
	流动相被污染	检查流动相, 消除污染
	进样装置被污染	清洗进样装置
	检测器中有气泡	流动相脱气; 检查流路接口
	紫外检测器故障	检查检测器, 更换灯
	电干扰(偶然噪声)	采用稳压电源, 检查干扰的来源(如水浴等)
	检测器错误	改变波长; 更换检测器
	流动相选择错误	改变流动相
	样品降解	了解样品性质, 改变纯化条件
	样品浓度太低	增加上样量; 换小容量色谱柱
单个不规则峰	样品组分没分开	延长运行时间, 减缓强洗脱能力的流动相增加的速率

表 2：基线问题

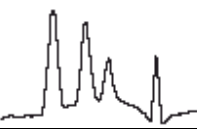
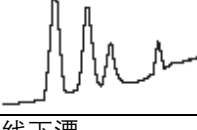
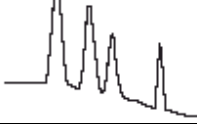
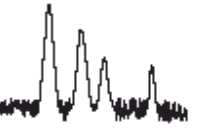
现象	原因	维修
	柱污染	使用强溶剂冲洗柱子, 更换柱子
	温度效应	控制环境, 使系统保温和稳定
	系统泄漏	停止和维修
	流动相 B 的吸收	更换低或无吸收的流动相, 流动相 A 中添加有吸收的化合物, 改变检测波长
	样品制备	在上样前提高样品纯度
	流动相 A 的吸收	更换低或无吸收的流动相, 流动相 B 中添加有吸收的化合物, 改变检测波长
	前面运行化合物的干扰	延长运行时间, 结束运行时提高 B 相比比例, 加长柱子平衡时间
	系统残留物	使用强溶剂冲洗系统, 更换柱子
	流动相、检测器或泵中有空气	流动相脱气。冲洗系统以除去检测器或泵中的空气
	流动相混合不完全	手工混合均匀或更换流动相
	漏液	检查管路接头是否松动, 泵是否漏液, 是否有盐析出和不正常的噪音。如有必要, 更换泵密封。
	流动相污染	使用纯度高的溶剂
	其他电子设备干扰	移开干扰设备

表 3：回收率和保留时间的问题

现象	原因	维修
样品回收率低	回收率低 (小于 90 %)	纯化酸性化合物应酸化流动相，纯化碱性化合物应碱化流动相；换成离子交换色谱柱
	与固定相反应	更换离子交换柱或亲和柱，除去可能反应的基团
	吸附到柱填料上了	提高流动相洗脱能力
保留时间变化	等度与梯度间未能充分平衡	充分平衡
	缓冲液容量不够	用>25mmol/L 的缓冲液
	柱污染	冲洗柱
	柱内条件变化	稳定进样条件,调节流动相
	键合相流失	填料失活；采用保护柱
	与固定相活性位点反应	修饰流动相控制反应，使用前向柱中注入大量样品钝化活性位点

表 4：压力问题

现象	原因	维修
压力增加或高压	柱子被样品污染	使用强溶剂冲洗柱子；更换填料或色谱柱
	筛板被样品堵塞	清洗或者更换筛板
	柱子堵塞，长菌 (针对反相柱)	流动相添加有机溶剂或抑制剂。如果柱子安装但不使用，定期冲洗柱子。柱子保存时要充满有机溶剂并封端。
	管路堵塞	使用强溶剂冲洗
	沉淀	使用溶解性好的溶剂和缓冲剂，使用低离子性流动相，避免快速改变流动相性质
低压	泄漏	检查和校正系统管路和接头
	低流速	检查泵和管路

表 5：泄漏

现象	原因	维修
进样	接头松动	重新安装装置上的上样筒和进样针，检查损坏情况，更换配件
	进样阀损坏	更换进样阀，制备样品和溶剂防止沉淀或成盐。
Flash 柱	硅胶量太大	减少硅胶量
	密封垫损坏	更换密封垫
系统管路部分	接头或密封松动	加固或更换
	管路损坏	更换管路
	系统其它部分泄漏， 如检测器或泵	维修或更换部件

等度洗脱时硅胶柱上样量：

色谱柱	规格 (mm×mm)	建议流速 (mL/min)	柱体积	硅胶重	难分离 $\Delta CV=1$	合适 $\Delta CV=2$	容易分离 $\Delta CV=6$
Flash 12+s	12×75	2.5 - 12	6mL	4.5g	4 – 20mg	20 – 100mg	100 – 200mg
Flash 12+M	12×150	2.5 - 12	12mL	9g	8 – 40mg	40 – 200mg	200 – 400mg
Flash 25+s	25×75	10 - 25	24mL	20g	15 – 80mg	80 – 400mg	400 – 800mg
Flash 25+M	25×150	10 - 25	48mL	40g	30 – 160mg	160 – 800mg	0.8 – 1.6g
Flash 40+s	40×75	25 - 50	66mL	50g	40 – 200mg	200 – 1000mg	1 – 2g
Flash 40+M	40×150	25 - 50	132mL	100g	80 – 400mg	400 – 2000mg	2 – 5g
Flash 65i	65×200	65 - 85	470mL	350g	0.3 – 1.6g	1.6 – 8g	8 – 20g
Flash 75s	75×90	100 - 250	300mL	200g	0.16 – 0.8g	0.8 – 4g	4 – 10g
Flash 75M	75×150	100 - 250	500mL	400g	0.4 – 2g	2 – 10g	10 – 20g
Flash 75L	75×300	100 - 250	1000mL	800g	0.8 – 4g	4 – 20g	20 – 40g
Flash 150M	150×300	500 - 1000	4.3L	2.5kg	3 – 16g	16 – 80g	80 – 160g
Flash 150L	150×600	500 - 1000	8.6L	5kg	6 – 32g	32 – 160g	160 – 320g
Flash 400M	400×300	7000	38L	20kg	0.03 – 0.25kg	0.25 – 1.0kg	1 – 2kg
Flash 400L	400×600	7000	76L	40kg	0.06 – 0.50kg	0.5 – 2.0kg	2 – 4kg
SNAP 10g	21×55	10 - 20	15mL	10g	8 – 40mg	40 – 200mg	200 – 400mg
SNAP 25g	30×72	20 - 40	33mL	25g	20 – 100mg	100 – 200mg	500 – 1000mg
SNAP 50g	39×81	30 - 50	66mL	50g	40 – 200mg	200 – 400mg	1 – 2g
SNAP 100g	39×157	31 - 50	132mL	100g	80 – 400mg	400 – 2000mg	2 – 5g
SNAP 340g	71×168	65 - 100	470mL	340g	300 – 1600mg	1.6 – 8g	8 – 20g
SNAP 750g	82×291	100-300	990mL	750g	2 – 8g	8 – 16g	16 – 80g
SNAP1500g	107×328	300-500	1980 mL	1500g	4 – 16g	16 – 32g	32 – 150g

*Biotage 色谱柱的载样量是指在等度洗脱的条件下

梯度洗脱时硅胶柱上样量

色谱柱	硅胶重	$\Delta C_v = 0.1-0.5$	$\Delta C_v = 0.6-1.0$	$\Delta C_v = 1.1-1.5$	$\Delta C_v = 1.6-2.0$	$\Delta C_v = 2.1-2.5$	$\Delta C_v = 2.6-3.0$	$\Delta C_v = 3.1-3.5$	$\Delta C_v = 3.6-4.0$	$\Delta C_v = 4.1-4.9$	$\Delta C_v > 5$
Flash 12+s	4.5g	25mg	50mg	75mg	100mg	125mg	150mg	175mg	200mg	225mg	250mg
Flash 12+M	9g	50mg	100mg	150mg	200mg	250mg	300mg	350mg	400mg	450mg	500mg
Flash 25+s	20g	125mg	250mg	375mg	500mg	625mg	750mg	875mg	1.0g	1.125g	1.25g
Flash 25+M	40g	250mg	500mg	750mg	1.0g	1.25g	1.5g	1.75g	2.0g	2.25g	2.5g
Flash 40+s	50g	275mg	550mg	825mg	1.1g	1.375g	1.65g	1.925g	2.2g	2.475g	2.75g
Flash 40+M	100g	500mg	1.10g	1.65g	2.2g	2.75g	3.3g	3.85g	4.4g	4.95g	5.5g
Flash 65i	350g	2.0g	4.0g	6.0g	8.0g	10.0g	12.0g	14.0g	16.0g	18.0g	20.0g
Flash 75s	200g	1.2g	2.4g	3.5g	4.7g	5.9g	7.0g	8.2g	9.4g	10.6g	11.8g
Flash 75M	400g	2.0g	4.0g	6.0g	8.0g	10.0g	12.0g	14.0g	16.0g	18.0g	20.0g
Flash 75L	800g	3.9g	7.8g	11.7g	15.6g	19.5g	23.4g	27.3g	31.2g	35.1g	39.0g
Flash 150M	2.5kg	15.6g	31.2g	46.9g	62.5g	78.1g	93.8g	109.4g	125.0g	140.6g	156.2g
Flash 150L	5kg	31.2g	62.5g	93.8g	125g	160g	190g	220g	250g	280g	310g
Flash 400M	20kg	110g	220g	330g	440g	550g	670g	780g	890g	1000g	1110g
Flash 400L	40kg	220g	440g	670g	890g	1110g	1330g	1550g	1780g	2000g	2220g
SNAP 10g	10g	50mg	100mg	150mg	200mg	250mg	300mg	350mg	400mg	450mg	500mg
SNAP 25g	25g	50mg	100 mg	150mg	200mg	250mg	300mg	350mg	400mg	450mg	500mg
SNAP 50g	50g	275mg	550mg	825mg	1.1g	1.375g	1.65g	1.925g	2.2g	2.475g	2.75g
SNAP 100g	100g	500mg	1.0g	1.5g	2.0g	2.5g	3.0g	3.5g	4.0g	4.5g	5.0g
SNAP 340g	340g	2.0g	4.0g	6.0g	8.0g	10.0g	12.0g	14.0g	16.0g	18.0g	20.0g
SNAP 750g	750g	4.0g	8.0g	12.5g	16.5g	20.5g	24.0g	27.0g	31.0g	35.0g	38.0g
SNAP1500g	1500g	8.0g	16.0g	25.0g	33.0g	41.0g	48.0g	54.0g	62.0g	70.0g	76.0g

梯度洗脱时可以加快纯化时间，增加收率和组分的纯度。使用梯度技术，洗脱溶剂的浓度不断增加，洗脱时间也大大缩短。但是，当快速色谱采用线型梯度分离纯化时，TLC 数据参考价值不大。因为 TLC 的流动相不能进行动力学调整。溶剂强度在纯化过程中不断增加，与等度洗脱相比， $C_v = 1/R_f$ 不再成立。梯度体系 C_v 值取决于梯度的斜率。

尽管有这一限制，TLC 方法仍然可以作为建立线型梯度分离方法的起始方法，因为 TLC 结果可以确认所选溶剂体系的强度，以及所选择的固定相对化合物会不会产生永久保留。

Biotage 已经开发了一种数学方法可以使化学家把 TLC 的 R_f 转化为梯度的 C_v 值，此方法已经包括在 Biotage 生产的软件中（专利技术）。

快速制备色谱溶剂的性质 (按照强度增加排列)

Solvent	溶剂	极性	粘度 (cp 200)	沸 点(°C)	紫外截止波长 (nm)
Petroleum ether	石油醚	0.01	0.30	30-60	210
n-Pentane	正戊烷	0.01	0.23	36	210
n-Hexane	正己烷	0.01	0.33	69	210
Iso-octane	异辛烷	0.01	0.53	99	215
Decane	癸烷	0.01	0.92		215
n-Heptane	正庚烷	0.01	0.41	98	210
Cyclohexane	环己烷	0.04	1.00	81	210
Cyclopentane	环戊烷	0.05	0.47	49	210
Carbon tetrachloride	四氯化碳	0.18	0.97	77	265
1-ClBut	1-氯丁烷	0.25	0.46	78	220
n-Butyl ether	正丁醚	0.25	0.74		220
1-chloropentane	1-氯戊烷	0.26			225
2-chloropropane	2-氯丙烷	0.29			225
Toluene	甲苯	0.29	0.59	111	286
1-chloropropane	1-氯丙烷	0.30			225
Bromoethane	溴乙烷	0.37			
Diethyl ether	乙醚	0.38	0.23	35	218
Chloroform	氯仿	0.40	0.57	61	245
Dichloromethane	二氯甲烷	0.42	0.44	40	233
MEK	甲基乙酮	0.51	0.43	80	330
Acetone	丙酮	0.56	0.32	57	330
Dioxane	二恶烷	0.56			215
Tetrahydrofuran	四氢呋喃	0.57	0.55	66	212
Ethyl acetate	乙酸乙酯	0.58	0.45	77	256
Methyl acetate	乙酸甲酯	0.60			260
DMSO	二甲基亚砷	0.62	2.24	189	265
Acetonitrile	乙腈	0.65	0.37	82	190
1-propanol	正丙醇	0.82	2.27	98	210
2-propanol	异丙醇	0.82	2.37	82	210
Ethanol	乙醇	0.88	1.20	79	210
Methanol	甲醇	0.95	0.60	65	205
Water	水	1	1.00	100	190
极性：在氧化铝上液-固色谱的溶剂强度参数					

根据化合物选择波长指南

化合物	波长 (nm)	化合物	波长 (nm)
吡啶	365	萘类	365
氨基酸	214, 280a	茚三酮	435
芳香性氨基酸	254	茚三酮-氨基酸反应产物(DYDA)	580
氨基酸, 茚三酮初级及二级衍生物	365	非芳香性肽	214
抗生素	310	核酸	254
芳香族化合物	254	核蛋白	254
苯甲酮衍生物	310	核苷酸	214
类胡萝卜素	435, 546	邻-萘醌	365
叶绿素及其衍生物	546, 580	卟啉衍生物	365
酶, NADH, NADPH	340	卟啉	435, 546, 580
铁蛋白	310	脯氨酸	435
铁氰化物	365	蛋白质	254, 280
亚铁蛋白	365	蝶呤	254
黄素蛋白	470	pyr-heme a 2 hemachrome	620
血红素	620	红素氧还原蛋白	326
血红蛋白, 氧化态	636	类固醇	214, 365
羟基脯氨酸	435	环庚三烯酚酮衍生物	365
乳糖酶	620	环庚三烯酚酮	310
类脂类化合物	214	维生素	254, 310

a. 280 nm 有较大吸收的氨基酸, 或在一定 pH 值 254 nm 有足够吸收的氨基酸。

Biotage 检测器根据波长选择化合物指南

波长 (nm)	化合物
214	非芳香性肽, 氨基酸, 核苷酸, 类脂类化合物, 类固醇
254	芳香族化合物, 蛋白质, 核酸, 核蛋白, 芳香性氨基酸, 蝶呤, 维生素
280	蛋白质, 氨基酸
310	环庚三烯酚酮, 铁蛋白, 维生素, 抗生素, 苯甲酮衍生物
326	氧化的血红蛋白
340	酶, NADH, NADPH
365	吡啶, 环庚三烯酚酮衍生物, 类固醇, 卟啉衍生物, 邻-萘醌, 萘类, 亚铁蛋白, 铁氰化物, 茚三酮初级及二级衍生物
435	羟基脯氨酸, 叶绿素 a, 类胡萝卜素, 茚三酮, 脯氨酸, 羟基脯氨酸
470	黄素蛋白
546	叶绿素及其衍生物, 类胡萝卜素, 卟啉
580	卟啉, 叶绿素, 茚三酮-氨基酸反应产物(DYDA)
620	pyr—heme a 2 hemachrome
636	血红蛋白, 氧化态

a. 280 nm 有较大吸收的氨基酸, 或在一定 pH 值 254 nm 有足够吸收的氨基酸。

在化学领域， 我们携手共进， 为您节约成本， 提高效率，加速研发。

Biotage是一家全球性的仪器设备及配件耗材的供应商。我们致力于帮助化学家们更安全更有效的从事科学研究工作。我们有深厚的行业知识，广泛的学术联系，专业的研发团队，我们可以为您提供最优秀的解决方案，以我们的灵活性和专业性，我们可以满足客户的各种需求。在分析和有机化学领域，我们有着坚实的知识储备和用户基础，我们可以提供市场上最广泛的产品解决方案。



欧洲

Main Office: +46 18 565900
Toll Free: +800 18 565710
Fax: +46 18 591922
Order Tel: +46 18 565710
Order Fax: +46 18 565705
order@biotage.com
Support Tel: +46 18 56 59 11
Support Fax: + 46 18 56 57 11
eu-1-pointsupport@biotage.com

美国

Main Office: +1 704 654 4900
Toll Free: +1 800 446 4752
Fax: +1 704 654 4917
Order Tel: +1 704 654 4900
Order Fax: +1 434 296 8217
ordermailbox@biotage.com
Support Tel: +1 800 446 4752
Outside US: +1 704 654 4900
us-1-pointsupport@biotage.com

日本

Tel: +81 3 5627 3123
Fax: +81 3 5627 3121
jp_order@biotage.com
jp-1-pointsupport@biotage.com

中国

Tel: +86 21 2898 6655
Fax: +86 21 2898 6153
cn_order@biotage.com
cn-1-pointsupport@biotage.com
地址: 上海市浦东新区科苑路 88 号
德国中心 725 室

更多信息, 请登陆:
www.biotage.com

Part Number: PPS418.v1

© 2016 Biotage. All rights reserved. No material may be reproduced or published without the written permission of Biotage. Information in this document is subject to change without notice and does not represent any commitment from Biotage. E&OE. A list of all trademarks owned by Biotage AB is available at www.biotage.com/legal. Other product and company names mentioned herein may be trademarks or registered trademarks and/or service marks of their respective owners, and are used only for explanation and to the owners' benefit, without intent to infringe.

