



色谱分离与在线检测技术已经成为当今分析化学的一门重要学科，而因其衍生出的相关产品也日益丰富。对色谱工作者来说，在面对具体方法开发中如何获得适当的分离度则成为关注的焦点。本文仅从网络上的资源收集简要介绍反相液相色谱法的建立思路。

一、基本术语

读者可跳过本部分内容，直接阅读[实例讲解部分](#)
在评价色谱分离的品质时，通常用以下相关术语来反映色谱特征（如图 1.）：

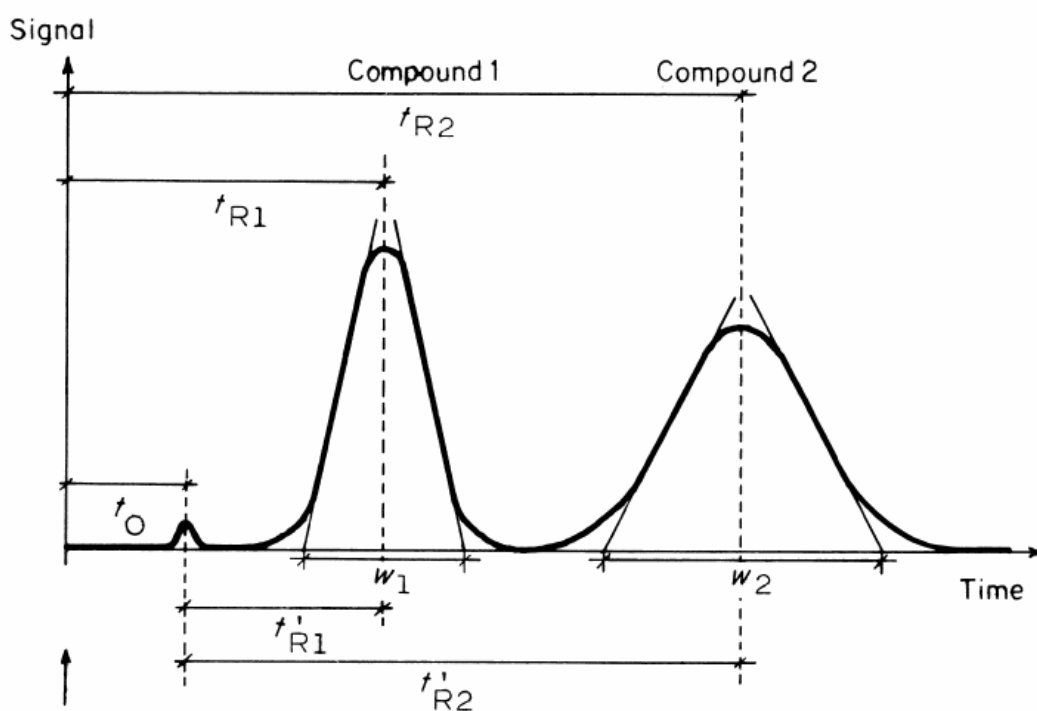


图 1. 典型色谱图

1. 保留因子(k):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

用于反映化合物的色谱保留性质，跟化合物性质有密切关系。如图 1，设 $t_{R1} = 3.65\text{min}$, $t_0 = 1.20\text{min}$ ，则峰 1 的保留因子为： $(3.65 - 1.20) / 1.20 = 2.04$

2. 拖尾因子(T_f)



液相色谱方法开发（实例讲解）

$$T_f = \frac{W_a + W_b}{2W_a} \quad (2)$$

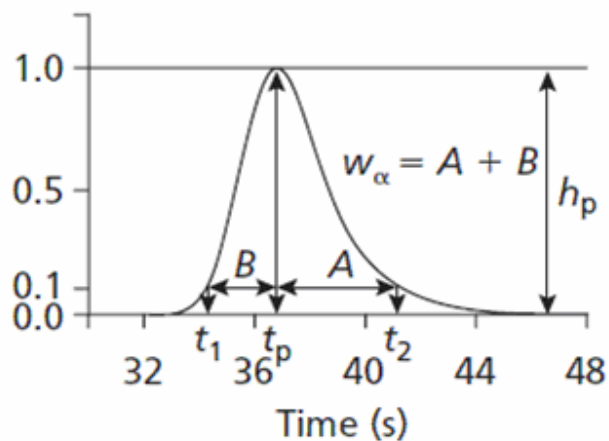


图 2. 典型拖尾峰

在理想情况下，色谱峰为高斯型对称峰，其拖尾因子为 1.0，但在实际情况中，由于化合物的二次保留等其他因素，色谱峰大多会呈现一定程度的拖尾。如图 2 中，该色谱峰的拖尾因子可计算得： $\{(41.5-37.0)+(37.0-35.0)\}/\{2*(37.0-35.0)\}=1.63$ 。

3. 理论塔板数 (N)

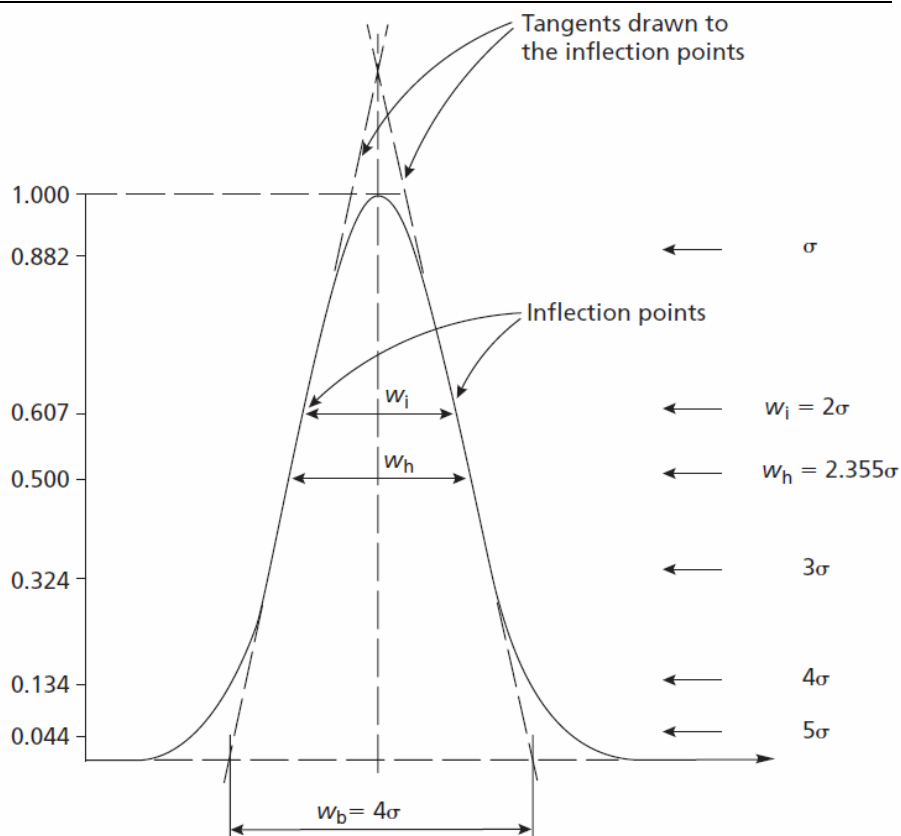


图 3. 峰高与峰宽的关系

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (3)$$

或

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2 \quad (4)$$

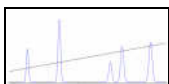
注意：在上式中 W 为图 3 中的 W_b ，为基线峰宽(4σ)， $W_{0.5}$ 为峰高一半处的峰宽 $W_h(2.335\sigma)$ ，并非峰宽的一半(2σ)。

设图 1 中峰 1 的基线峰宽为 0.25min，则塔板数为： $16 \times (3.65/0.25)^2 = 3410$

4. 分离因子(α)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (5)$$

又称两个色谱峰的相对保留值。只有当 $\alpha > 1$ 时，两个色谱峰才有分离的可能性。设在图 1 中峰 2 的保留时间为 6.50min，则分离因子为： $(6.50 - 1.20)/(3.65 - 1.20) = 2.16$



5. 分离度 (R_s)

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_2 + W_1} \quad (6)$$

分离度用于评价色谱分离的品质，通常当 $R_s > 1.5$ 时，则认为两峰达到基线分离（完全分离）。设在图 1 中峰 2 的基线峰宽为 0.45min，则峰 1 与 2 的分离度为： $2 \times (6.50 - 3.65) / (0.25 + 0.45) = 8.1$

上式为分离度的定义公式，用于精确计算两个色谱峰的分离度，而由此可推出如下为色谱工作者的经验公式：

$$R_s \approx \sqrt{N} / 4 * (\alpha - 1) * \frac{k}{k + 1} \quad (7)$$

该式为经验公式，其目的在于描述分离度与理论塔板数、分离因子和保留值三者之间的关系，多用于指导色谱分离方法的建立，而不用于具体计算。

二、分析方法的建立（实例讲解）

简要介绍了色谱的基本术语，下面用实例来介绍分析方法的建立过程。

1. 准备工作

在进行方法开发的时候，应记住良好的方法要具有以下三个要素：

- ◆ 能提供适当的分离度（通常要求 $R_s > 1.5$ ）
- ◆ 方法运行时间要适中，以利于日常分析
- ◆ 方法应具有稳定性，可以在不同实验室之间移植

在进行方法开发之前，应该对所分析样品和仪器设备进行信息剖析：

- 样品的来源（单一化合物，生物样品，提取物等）及是否前处理；
- 样品的溶解度；
- 所分析化合物的结构（是否有官能团，发色基团等）及酸碱性；
- 化合物的分子量（常规小分子， $M < 1000$ ；生物大分子及聚合物， $1000 < M < 10,000$ ）；
- 仪器配置（柱类型，监测器类型，可否梯度洗脱）；
- 方法要求（定性，定量，制备，指纹图谱）

2. 建立步骤

在了解了上述信息后，即可进行方法开发了：

本例是对含有 5 个苯取代化合物的样品进行分离。通过对样品的结构解析，得到如下信息：5 个化合物为中性分子，分子量都低于 200，在甲醇等有机溶剂中溶解，不溶于水。含有苯环，在 254nm 处有明显的紫外吸收。在了解以上信息后，并综合文献，选择了 Eclipse(Agilent) C18 色谱柱，规格 4.6×150mm，填料粒径 5μm。液相色谱仪为 Agilent 1200 型，配置 Chemstation 工作站，VWD 检测器，



液相色谱方法开发（实例讲解）

四元低压梯度泵，柱温箱和自动进样器。流动相选用乙腈-水系统。样品直接用甲醇稀释定容。

通常在方法开发之前建议先运行一个全范围的线性梯度洗脱（如 0-100% 乙腈），它会给后续是否采用等度洗脱还是梯度洗脱提供非常重要的信息。在本例中，首先运行一个梯度持续时间 25min，乙腈浓度范围为 5-100%，流速为 1.0ml/min，检测波长为 254nm，柱温为 30°C。色谱图如下：

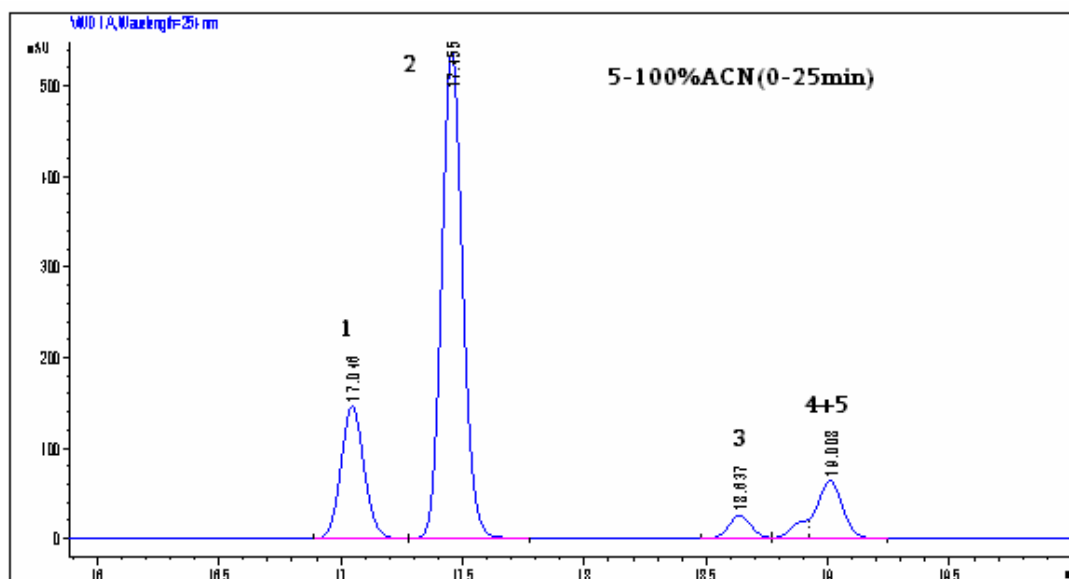


图 4. 初始梯度运行结果

在上述的条件下，所有色谱峰的平均保留因子(k')约在 4~5 之间。

在对上述图谱解析时，会运用到 Snyder-Dolan 提出的“1/4 规则”：

- 当所有色谱峰的保留范围小于全梯度时间范围的 1/4（即 25%）时，则建议采用等度洗脱，若大于 1/4 时，则建议采用梯度洗脱。

在图 4 中，第一个化合物峰 1 的保留时间为 17.046min，最末一个化合物峰 5 的保留时间为 19.008min，整个梯度时间为 25min，计算可得：

$\Delta t_R/t_G(19.008-17.046)/25=0.08<0.25$ ，则可以运用等度洗脱进行分离。

再仔细分析图谱，发现整个保留范围约在乙腈的高浓度范围内(约 70%~75%)，但实际上由于系统的梯度滞后及柱死体积的因素，实际浓度约在 60%~65%之间，为使保留因子在 1~20 范围内，先选择 60%乙腈进行等度洗脱，其他条件不变。色谱图如图 5 所示：



液相色谱方法开发（实例讲解）

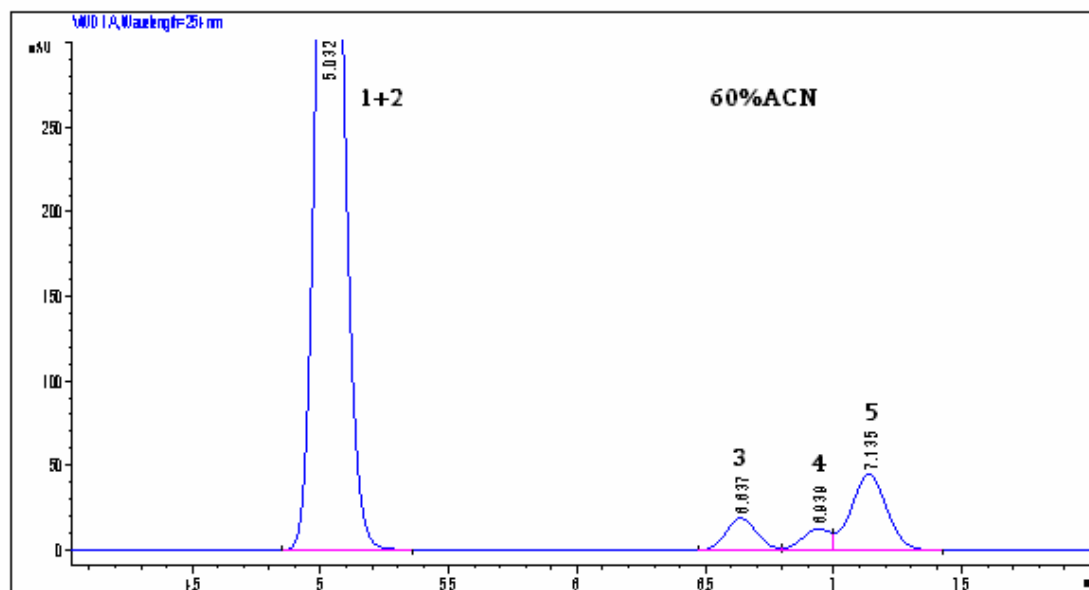


图 5. 60%乙腈

在 60%乙腈洗脱条件下，所有峰的保留值范围在 2.43~3.86 之间，符合保留因子在 1~20 的条件，但峰 1 与 2 完全重叠，4 与 5 也未完全分离。分离结果不理想，分离条件需要优化。

在前面公式(7)中，提到分离度与柱效（塔板数），选择性（分离因子）和保留值有重要关系，其中柱效跟柱子本身有关，选择性与保留值则与溶剂强度，种类和柱类型有关，但通常在方法开发过程中，不建议频繁更换色谱柱，而是选定一根色谱柱后，依次通过改变溶剂强度，溶剂类型，柱温和流速来获得适当的分离度。按照溶剂强度改变 10%，则保留值改变 2~3 倍的规则（简称 3 倍原则，当然这只是一个粗略的经验值，不完全符合所有情况，但在方法开发中能起到不小的作用），接下来运行了 50%和 40%的乙腈浓度分离条件，色谱图如图 6 和 7 所示：



液相色谱方法开发（实例讲解）

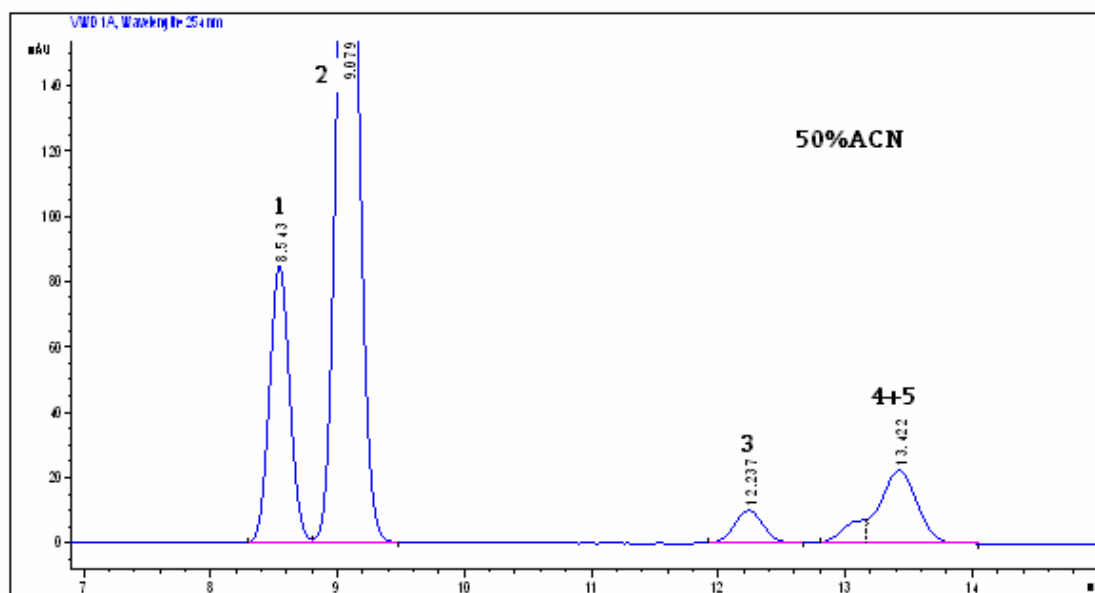


图 6. 50%乙腈

在 50%乙腈条件下，所有峰的保留值则变化为 4.82~8.15，仍满足 $1 < k < 20$ 的要求（但与三倍原则稍有出入，变化倍数为 1.98~3.35），同时可观察到峰 1 与 2 基本达到基线分离，但 4 与 5 则重叠更加严重，仍无法满足分离要求。

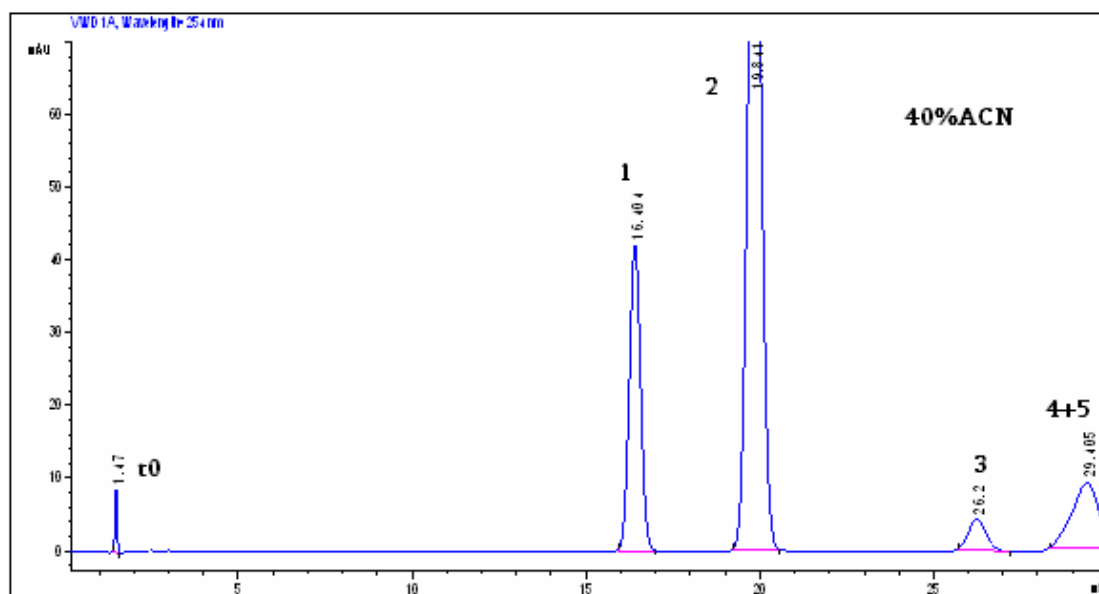


图 7. 40%乙腈

在 40%乙腈的条件下，所有峰的保留值变化为 10.18~19.04，满足 $1 < k < 20$ 的要求，同时也大致符合三倍原则（实际变化倍数为 2.11~2.33），同时可发现峰 1 与 2 的间距更大，但 4 与 5 则完全重合，仍无法满足分离要求。可能会有读者说：可以降低



液相色谱方法开发（实例讲解）

低乙腈浓度使 4 与 5 分离，但此时降低乙腈浓度会使保留时间延长，不利于日常分离，而且随着保留时间增大，峰宽也会随之变大，仍不会获得满意的分离度。而且通过上述三个等度试验后，基本上可以确定峰 4 与 5 无法在乙腈/水体系下达到基线分离。

另外，根据 [Snyder](#) 提出的理论：[在二元流动相（如甲醇/水，乙腈/水）等度洗脱时，化合物的保留值的对数值与流动相中有机相的浓度成线性关系](#)（仅为经验规则），用数学公式表示既如下：

$$\ln k = \ln k_w - S\phi \quad (8)$$

式中 k 为化合物在特定条件下的保留值， k_w 为化合物在流动相为水的条件下的保留值（外推理论值）， S 为化合物分子特性常数， ϕ 为有机相在流动相中的含量。通过上述三个试验后，可做出 $\ln k$ 对 ϕ 的线性曲线，如下图所示：

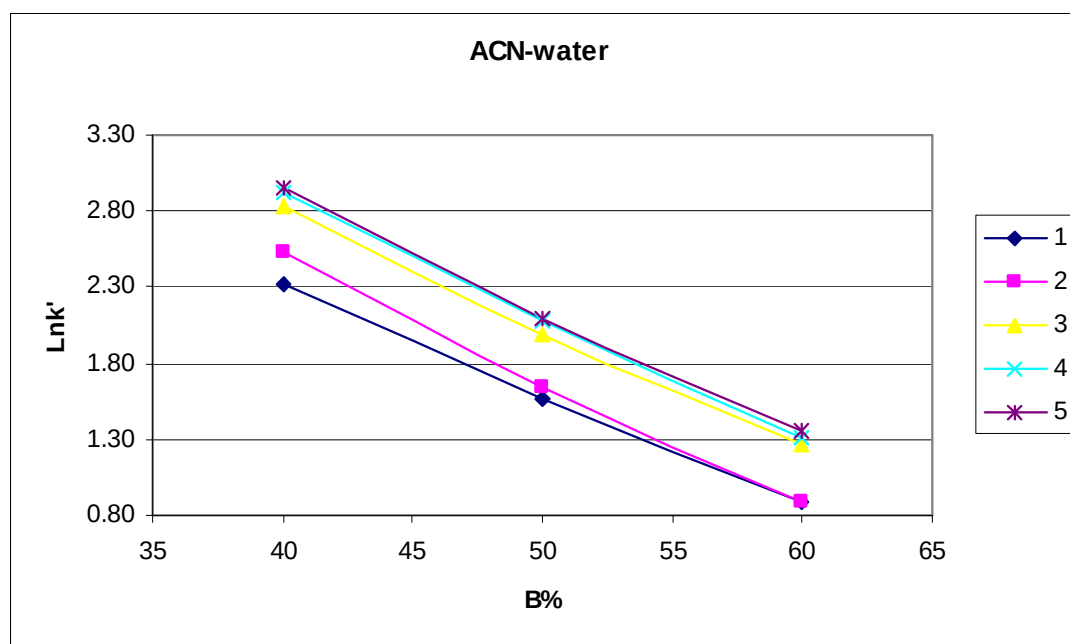


图 8. $\ln k$ - ϕ 曲线（乙腈-水体系）

由曲线上可以看出峰 4 与 5 几乎近于重合，故此可以推断峰 4 与 5 在乙腈/水系统中为难分离峰对。

接下来，可以考虑用溶剂种类来改变分离效果。

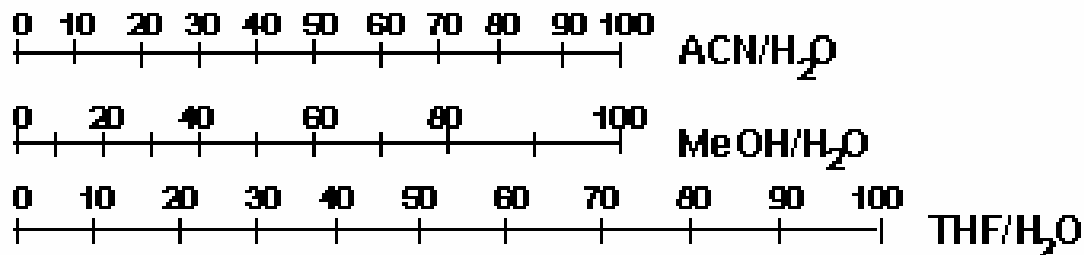
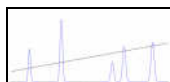


图 9. 溶剂强度换算表

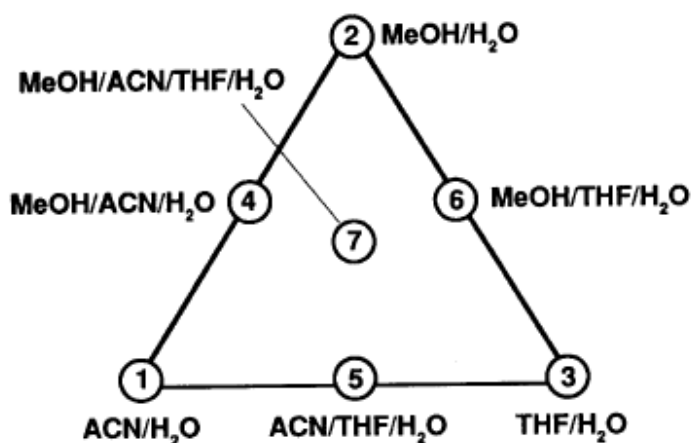


图 10. 溶剂选择三角形

在反相色谱法中，常用溶剂为甲醇、乙腈和四氢呋喃，这三种溶剂基于偶极矩作用力、氢键和供（吸）电子的作用提供不同的选择性，在相同溶剂强度下，可对色谱分离起到不同的分离效果，如图 9 和 10 所示。但四氢呋喃的紫外吸收强、易形成过氧化物、平衡较慢，且不与 PEEK 管兼容，所以大多不轻易使用。在上述考虑下，选用甲醇作为有机相来试图改善分离效果。通过图 9 中，可以看出 70% 甲醇与 60% 乙腈强度相当，故选择 70% 甲醇进行试验，结果如图 11 所示：

液相色谱方法开发（实例讲解）

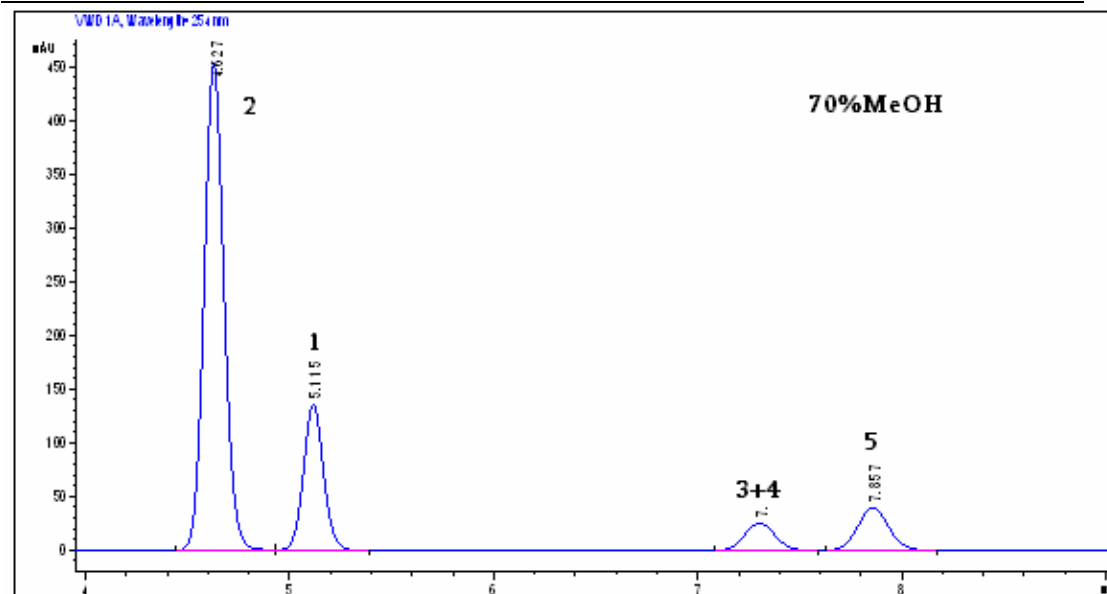


图 11. 70%甲醇

可以发现，甲醇改变了出峰顺序，峰 1 比峰 2 后流出，峰 3 与 4 完全重叠，峰 5 与 4 达到基线分离。所有峰的保留因子位于 2.49~4.36（同 60%乙腈相当）。然后试想是否可以通过甲醇浓度来改变峰 3 与 4 的分离效果，接下来，又运行 60%甲醇的洗脱试验，结果如图 12

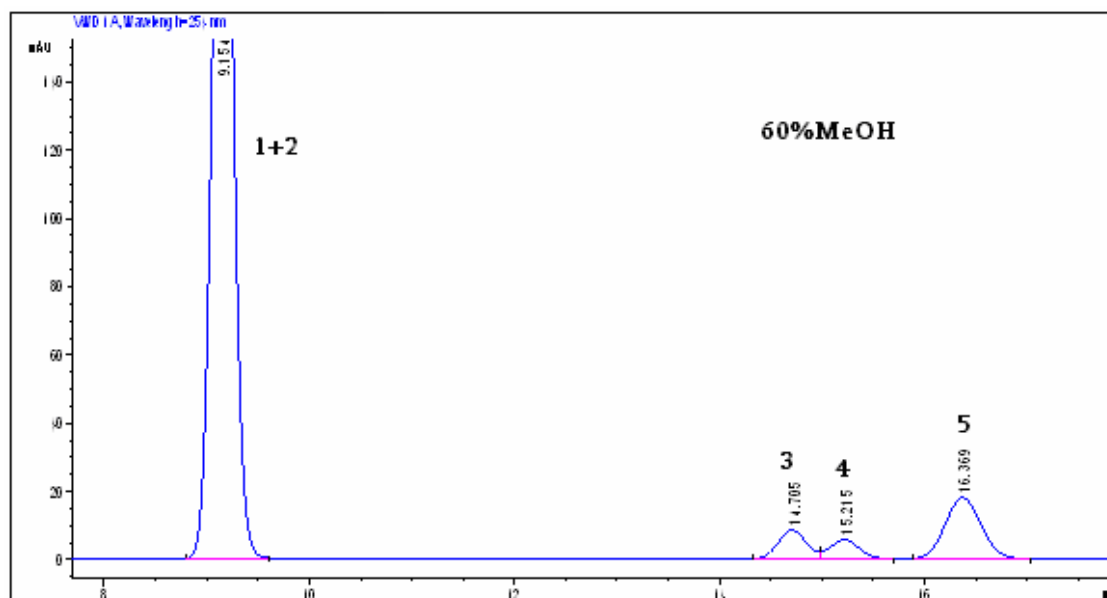


图 12. 60%甲醇



液相色谱方法开发（实例讲解）

可以观察到在 60%甲醇条件下，峰 1 与 2 重叠，峰 3 与 4 分离度有所增加。所有峰的保留值在 5.24~10.16 范围内（大致相当 50%乙腈），且大致符合三倍原则。再根据公式（8）绘制 $\ln k'-\phi$ 线性图，如图 13 所示：

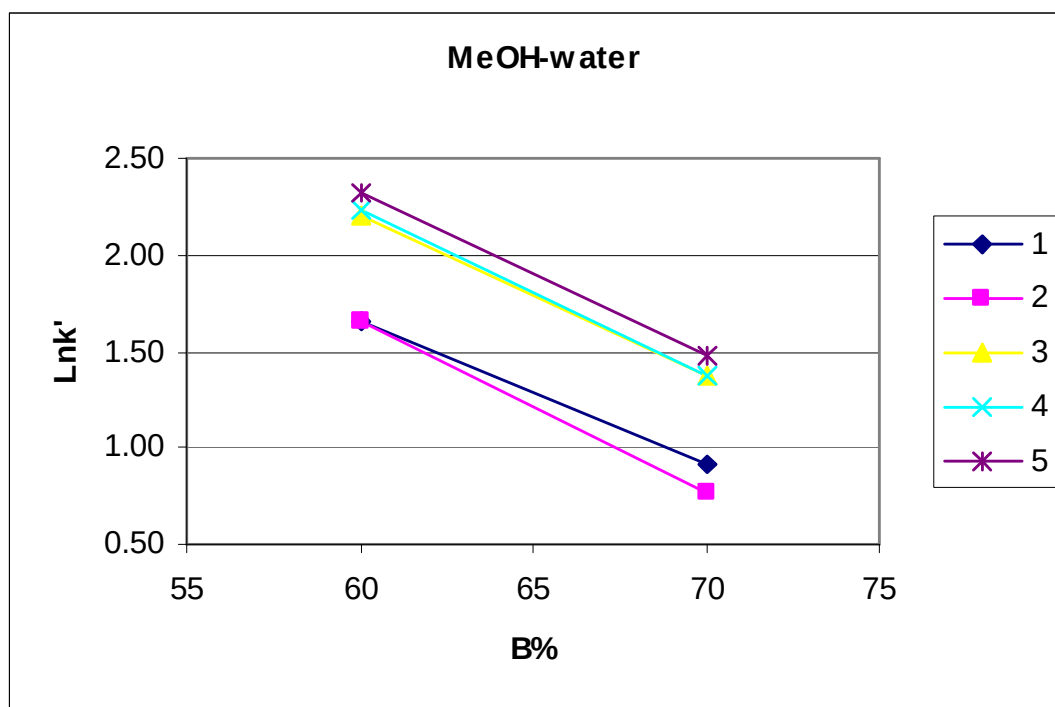


图 13. 甲醇-水体系中 $\ln k'-\phi$ 曲线

从图 13 中可以看出峰 3 与 4 的曲线几近重合，所以在甲醇-水体系中峰 3 与 4 为难分离峰对。

接下来，又试验了四氢呋喃-水的分离效果，通过查阅图 9，选择 45%和 35%四氢呋喃进行分离，结果如图 14 和 15



液相色谱方法开发（实例讲解）

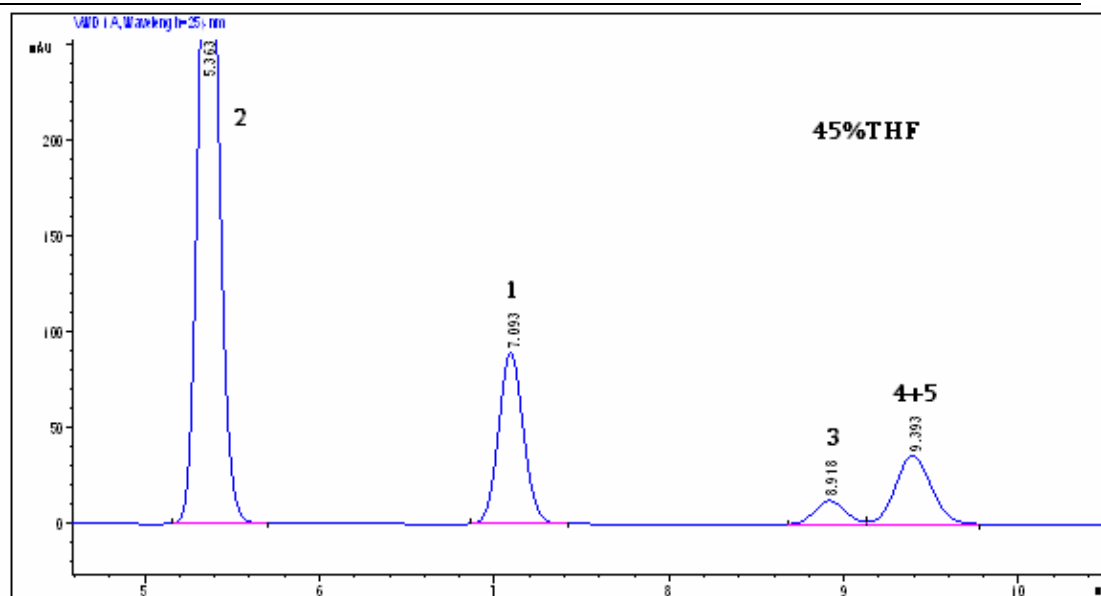


图 14. 45%四氢呋喃

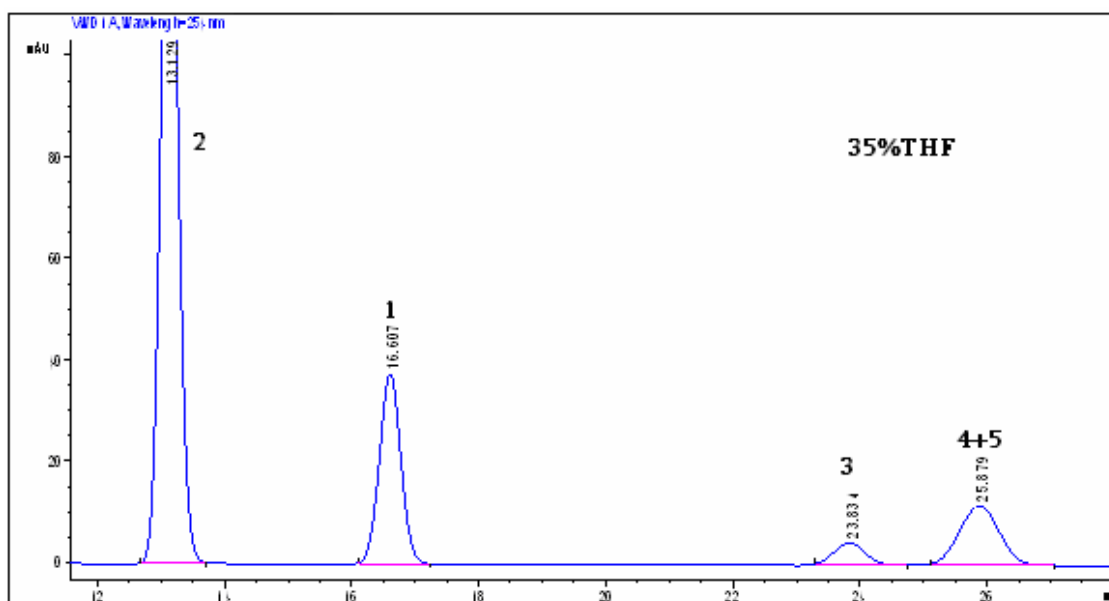


图 15. 35%四氢呋喃

在上述两次试验中，峰 4 与 5 都完全重叠，说明在四氢呋喃水体系中，峰 4 与 5 为难分离峰对。

通过三种溶剂的比较，可以看出在乙腈和四氢呋喃-水溶液中，峰 4 与 5 为难分离峰对，而在甲醇-水体系中，峰 3 与 4 为难分离峰对，说明单一有机溶剂无法达到完全分离所有峰，此时则可考虑用多元有机溶剂来改善分离度，在接下来的试验中



液相色谱方法开发（实例讲解）

可采用的溶剂组合为：1. 甲醇-乙腈-水 2. 甲醇-四氢呋喃-水。基于前面讨论中关于四氢呋喃的不足之处，在后续试验中选择了体系 1 进行试验。

首先，基于前面的试验结果和估计，先采用 60%乙腈与 70%甲醇溶液等体积混合以形成新的流动相：甲醇-乙腈-水（35:30:35）进行分离（其他条件不变），结果如图 16 所示

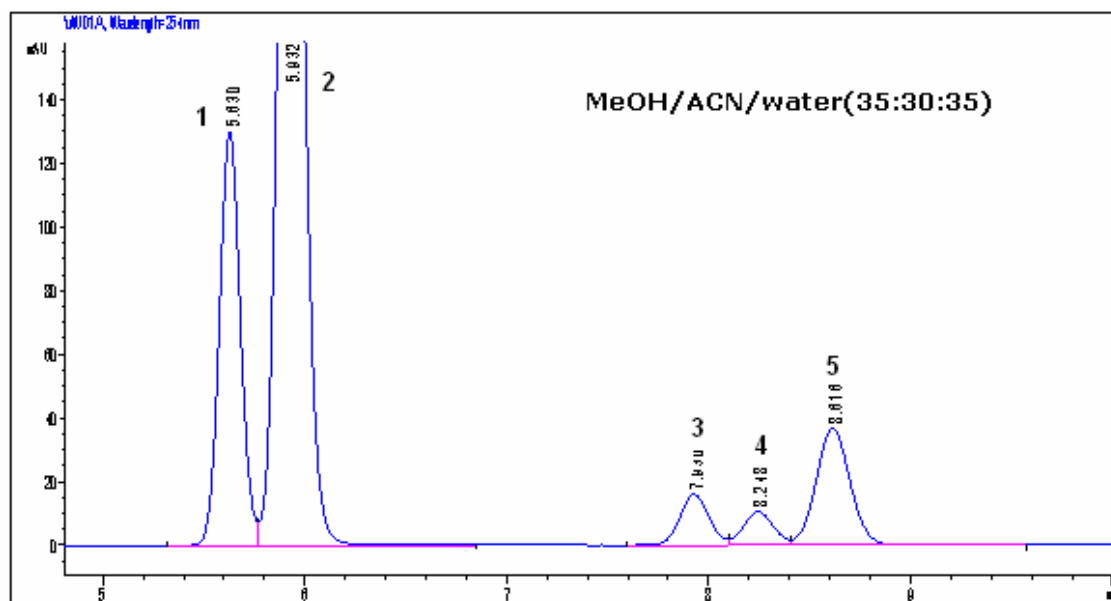
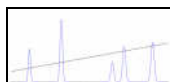


图 16. 甲醇-乙腈-水（35:30:35）分离效果

可以观察到，在此条件下峰 3，峰 4 和峰 5 之间的分离度已经有所改善，但峰 1 与 2 的分离度较差，随之考虑温度可能会对分离有改善，保持前述条件不变，将柱温由原来 30°C 上升到 40°C，结果如下：



液相色谱方法开发（实例讲解）

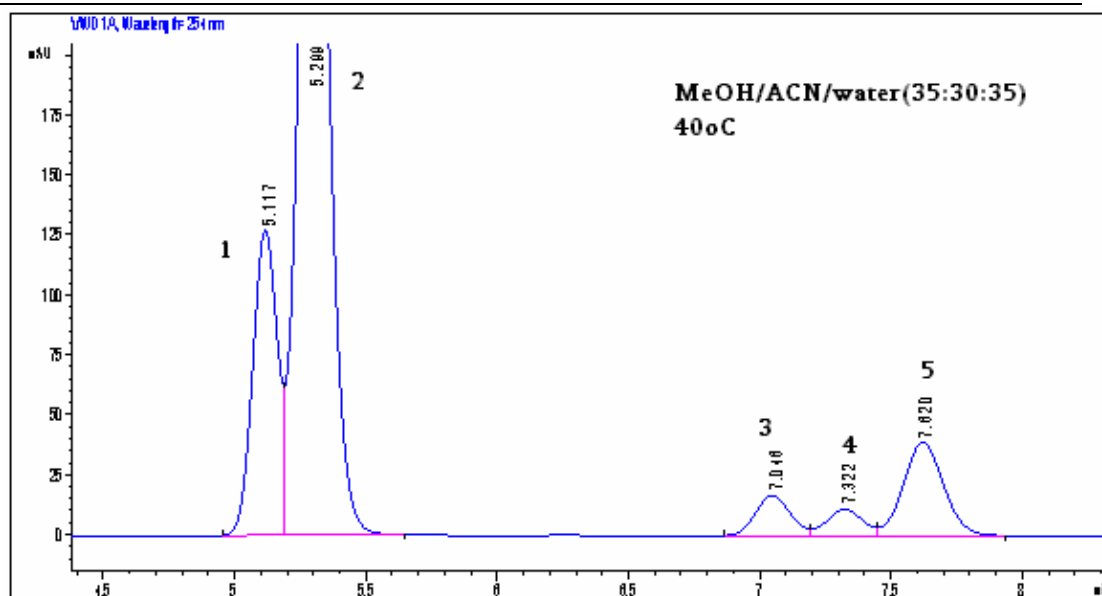


图 17. 柱温对分离效果的影响

从图 17 中，可以看出柱温上升，所有峰的保留时间向前推移，但选择性并不发生变化，峰 1 与 2 较 30°C 条件下发生更多重叠，而后面三个峰之间的分离度也有变差的情况，因此可以说明通过改变温度对分离效果影响不明显（但对离子化合物则能明显改善分离度）。

于是将柱温仍回复到 30，接下来考虑通过改变乙腈和甲醇的相对含量来改善分离度。由前述甲醇-水体系可知，当甲醇含量降低时，有助于峰 3 与 4 的分离，于是将甲醇含量降低到 30%进行试验，结果如下图：

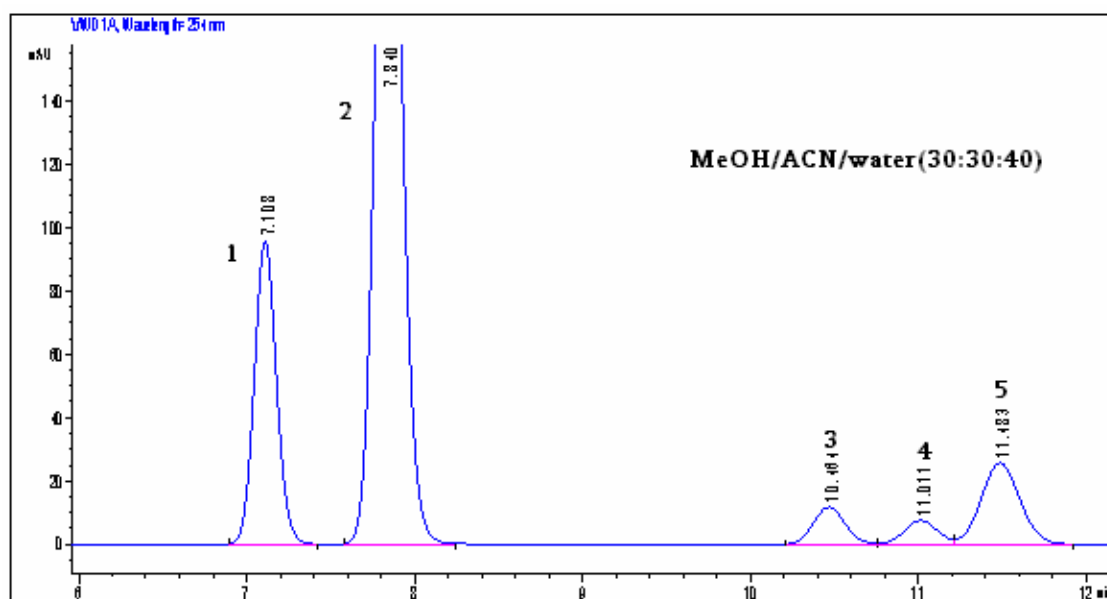
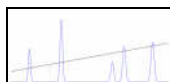


图 18. 甲醇-乙腈-水（30:30:40）分离效果



液相色谱方法开发（实例讲解）

从上面结果看到，峰 1 与峰 2 完全达到基线分离，峰 4 与 5 的分离度较前面有所改善（从 1.02 到 1.21）。通过后来的试验，当流动相为：甲醇-乙腈-水（34:28:38）时，峰 4 与 5 的分离度能达到最好的分离度（1.33），见图 19

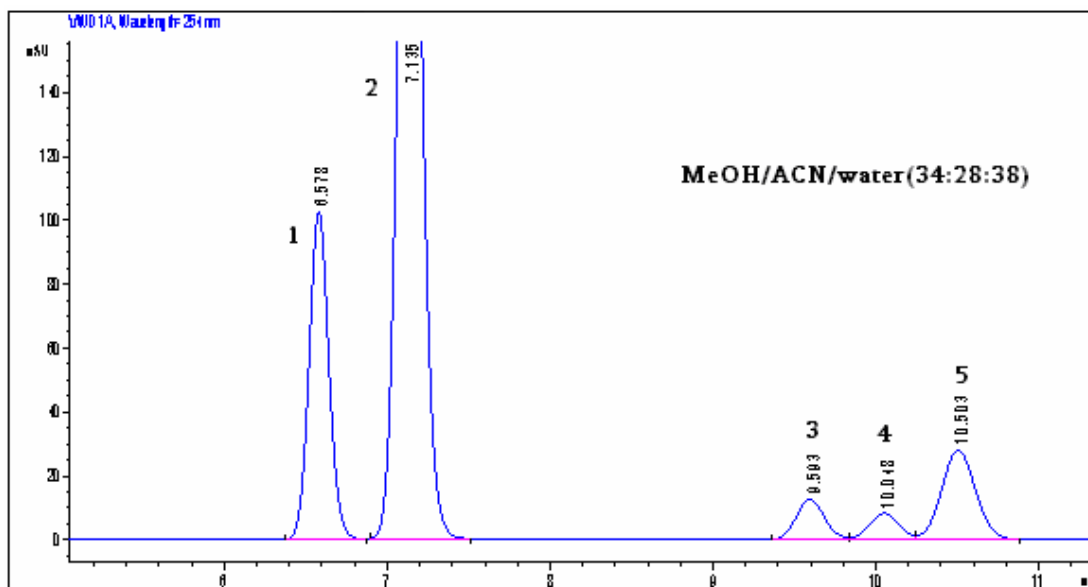


图 19. 甲醇-乙腈-水(34:28:38)分离效果图

三、总结

1. 在方法开发之前，尽量查找文献，以获得更大帮助。同时要详细了解所分析样品的性质。
2. 对每次试验结果，要详细分析，尽量从中获得最多信息，以指导后续研究工作。如上面单一溶剂分离试验，实际上在进行完乙腈和甲醇的分离比较后，就没有再必要进行四氢呋喃的试验了，直接进入多元溶剂的分离效果研究工作。要记住方法开发的一个宗旨就是：以最短时间和最低成本获得满意的结果。
3. 要明确方法开发的最终目的。方法优化是无止境的，有些时候可能并不能达到美仑美奂，要清醒的认识到在什么样的情况下必须做到适可而止。在本例中峰 4 与 5 始终无法达到分离度为 1.5 的要求，但这不影响对峰 2 的定量分析和四个杂质的监测，因此这一结果也能算得上是“满意”的分离度了，故而方法优化就到此结束了。