

分离纯化应用培训



上海鑫饰化工科技有限公司

联系电话: **15800716931**

联系人: 刘鑫剑 (高级分离纯化工程师)

E-Mail: liuxinjian008@163.com

QQ: **835997796**

分离纯化服务电话: 15800716931

内容提要

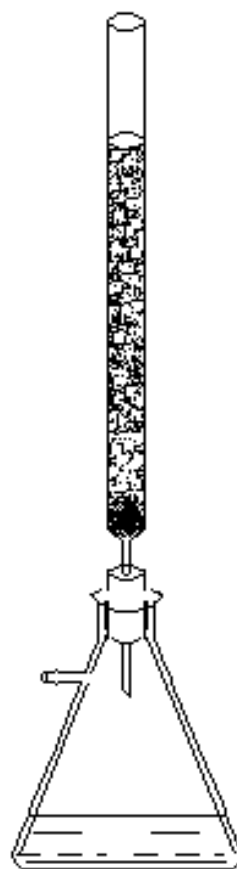
- 色谱发展历史
- 基本原理
- 优势
- 填料介绍
- 方法建立
- 使用说明
- 常见问题

发展历史

➤ ✧1903年，Tswett首次提出“色谱”一词。



色谱法创始人
——俄国植物学家Tswett



“Chromatogram”

- 1—白色吸附剂;
- 2—黄色(叶黄素 β);
- 3—墨绿色(叶绿素);
- 4—浅绿色;
- 5—黄色(叶黄素 α' 和 α'');
- 6—白色吸附剂;
- 7—橙黄色(叶黄素 α)。

发展历史

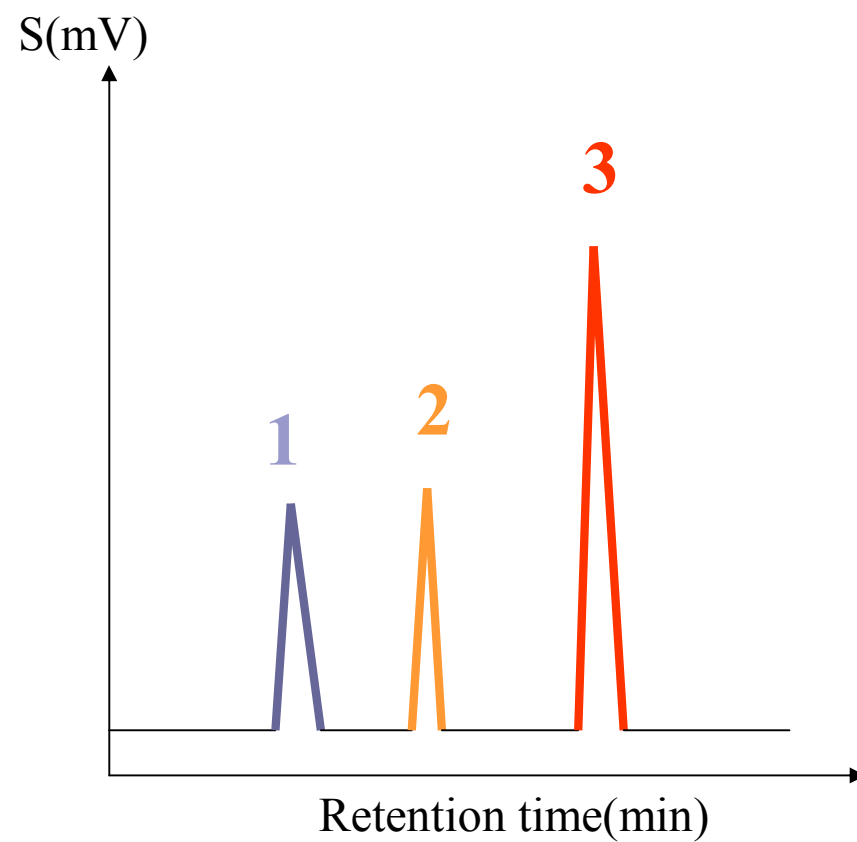
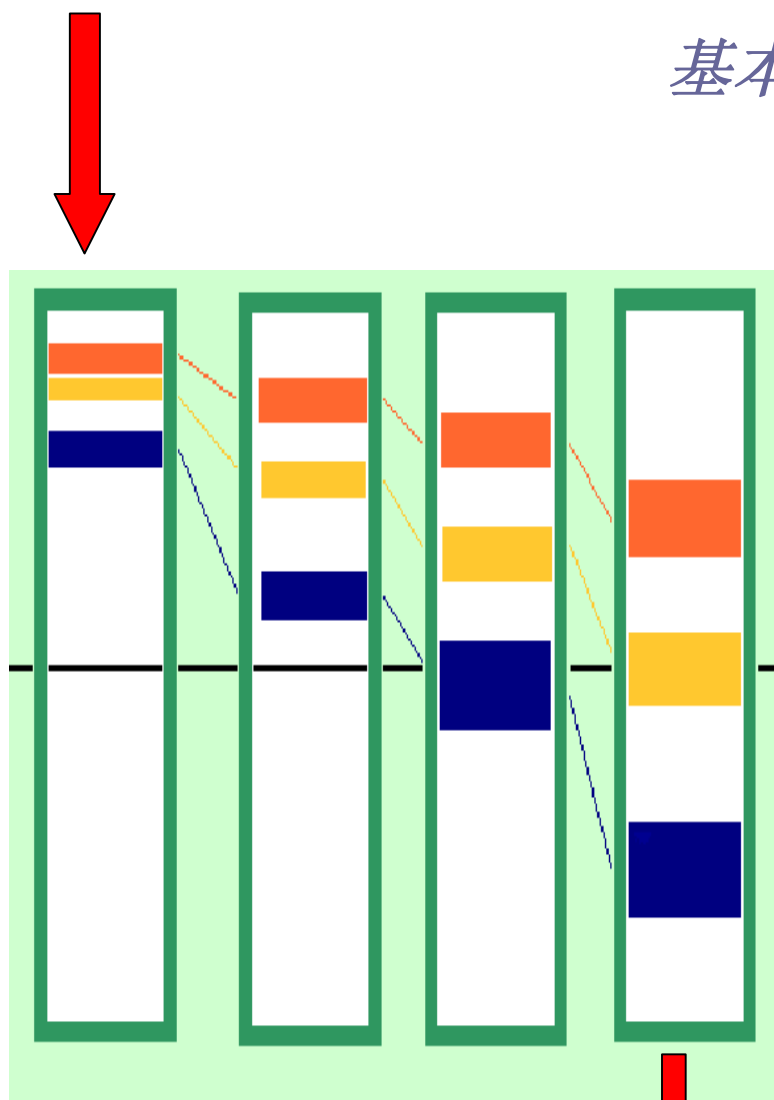
- 1906年Tswett发明色谱的研究方法
- 1954年Martin色谱塔板理论
- 1958年Giddings毛细管气相色谱
- 1960年代高效液相色谱
- 1978年Still提出了快速制备色谱，其目的在于缩短常压柱色谱的操作时间，该专利在1981年获专利保护。
- 1980年代超临界流体色谱
- 1991年代大规模制备色谱；生命科学
- 2000年代，多维色谱，超高压色谱，快速制备色谱。

基本原理

基于混合物中各组分与流动相和固定相作用力存在差异使得它们在色谱柱中停留时间不同而完成分离。

主要分离机理：分配、吸附

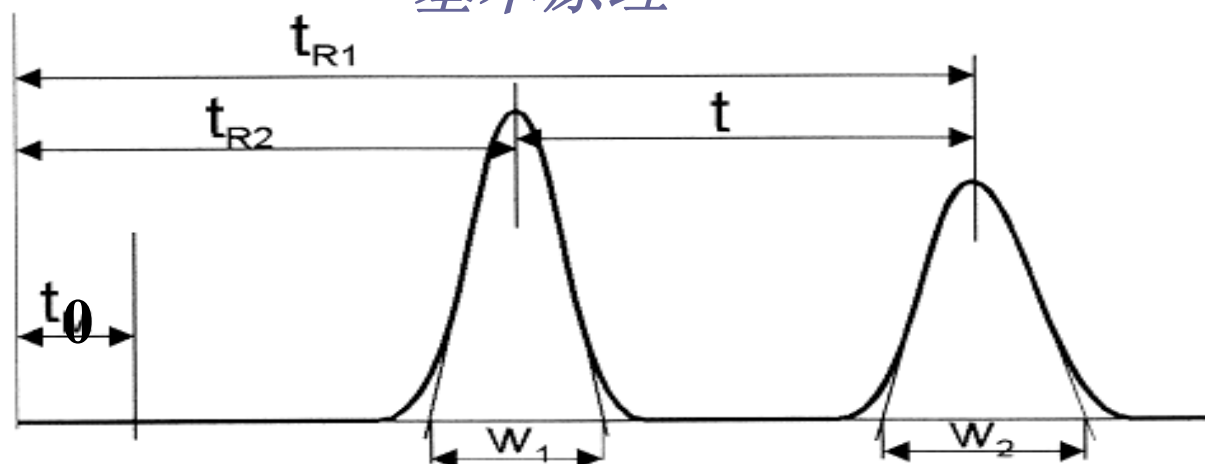
基本原理



分离纯化服务电话：15800716931

基本原理

分离度



$$R = \frac{\Delta t}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

保留因子

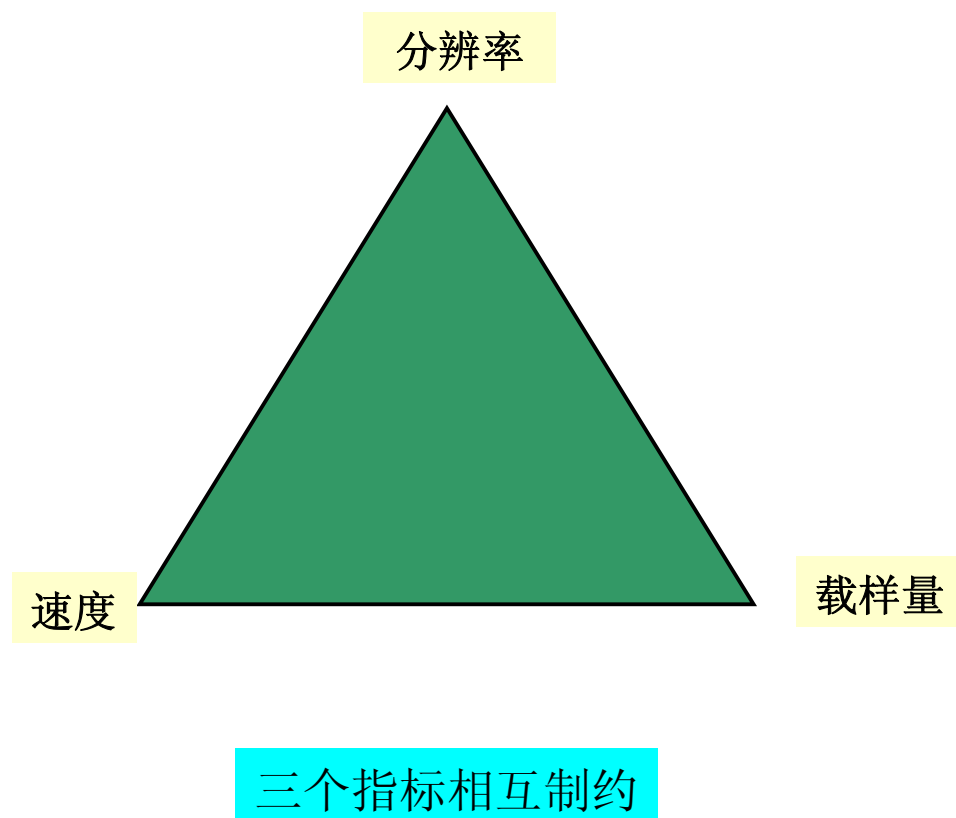
$$R = \left(\frac{k'}{1+k'} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{\sqrt{N}}{4}$$

色谱柱
塔板数

选择性

基本原理

中高压制备色谱的关键因素：



对某一个参数进行优化会影响其他分离参数：增加洗脱液的流速会降低分辨率。分辨率会因为上样量过大而下降。（上样量的过大的原因包括样品溶液的体积过大或数量过大）

色谱柱的载样量又取决于柱子的直径、长度，吸附剂的颗粒度及装柱的紧密程度。

基本原理

各种制备型液相色谱：

- 快速色谱 （约2 bar /30 psi）
- 低压液相 （ < 5 bar / 75 psi）
- 中压液相 （5~50 bar / 75~750 psi）
- 高压液相 （> 50 bar / 750 psi）

彼此压力范围会有交叠

一般压力**2MPa-20MPa**比较理想，压力太低容易超压影响分离效率，压力太高对仪器要求很高，成本也大。

基本原理

全自动中高压制备色谱发挥的作用：

- 1、加快洗脱剂的流速，提高分离速度。
- 2、允许在分离过程中使用颗粒度更小的填料，从而获得更高的分辨率。
- 3、敏感化合物在进行长时间的常压色谱分离时，其结构可能会发生变化，缩短分离时间的最大优点在于可以避免这种变化的发生。同时避免了色带的扩散效应。

中高压制备色谱优势

与传统柱色谱比较，全自动中高压制备色谱仪器优势：

- 制备量范围广：样品量10mg-50g；
- 分离速度快：提高效率和产量；
- 可实现线性梯度洗脱；
- 拥有在线检测器，可实现在线检测；
- 自动馏分收集。

中高压制备色谱优势

与制备型高效液相HPLC比较：

- 仪器性价比高；
- 色谱柱填料可由客户自己装填，简单便宜，上样量大，也可以接高压不锈钢制备柱。中高压制备色谱上样模式多样化，上样量比高压要远远大的多，特别对于溶解度差的化合物上样量至少可以提高10倍。
- 自动收集器可以实现自动化收集，可以实现见峰收集，不出峰不收集。

优势

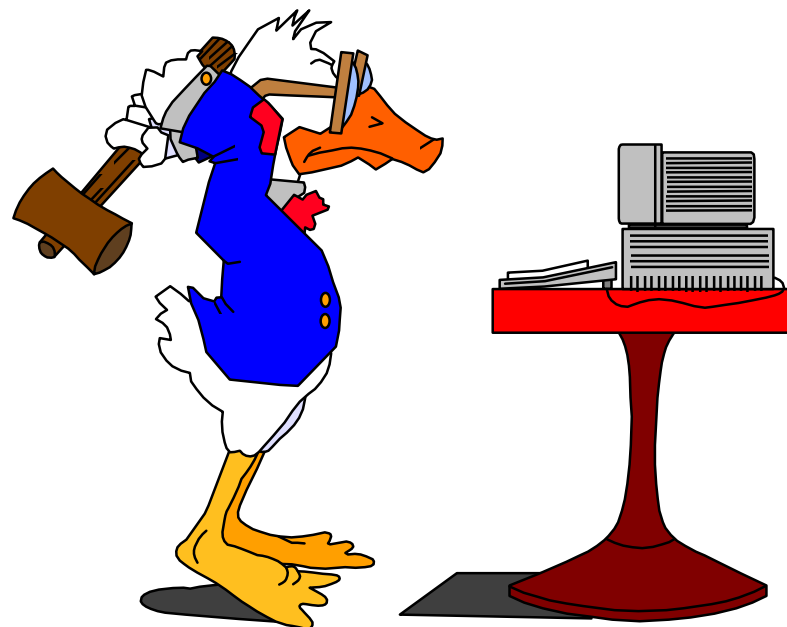
全自动中高压制备色谱独有特点：

- 全自动中高压制备色谱可取代传统高压制备液相的全部功能而且可以实现自动化收集；也可以取代传统全自动中低压制备色谱的全部功能但压力比中低压色谱高，不容易超压。极大的提高了全自动中高压制备色谱的应用范围，针对复杂的天然产物、合成产物、微生物发酵产物等粗分或精制均可适用；
- 泵头压力高，最高可达**25MPa**，既可接高压制备柱，也可接中高压玻璃柱，更可以接中低压塑料**Flash**柱，最大程度提高了仪器的使用环境；
- 泵头能承受各类有机溶剂腐蚀，如氯仿，乙酸乙酯等，既可用于正相色谱分离，也可用于反相色谱分离，最大程度满足仪器使用的各种条件；
- 检测器精确，灵敏，尤其是在药物杂质或含量低的天然产物分离纯化过程中，优势明显，可以精确检测收集到目标化合物；
- 上样量范围广，总流速可实现从**0.1-100.0ml/min**，适合样品从毫克级到十克级的分离纯化；
- 整个系统可以根据用户需要进行升级，连接自动收集器系统，可以实现反控；可以放置**100**支试管或者**9**个烧杯（锥形瓶），分别用于小量样品精制单体和大量样品粗分离使用。

填料介绍

色谱柱是制备色谱的**心脏**

现代制备色谱中，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 and 了解。



填料介绍

柱子填料的选择

- 正相硅胶:微酸性介质，常用于中等极性 & 弱极性(不含酸碱)化合物分离；
(硝酸银硅胶常用于小极性化合物的纯化，原理：根据样品中不同化合物双键的数量和位置不同，形成硝酸银络合物的牢固性不同从而实现分离。)
- C18反相硅胶:用于纯化中等至高极性物质:碳水化合物,酸性化合物，小分子肽类，氨基酸等化合物；
- C8反相硅胶：用于纯化极性更大的化合物（相对C18）；
- 氨基取代填料:用于碱性化合物的分离(不能用于醛/酮以及能与氨基反应的化合物)；
- 氧化铝填料:碱性、中性、酸性；
- 聚酰胺填料：常用于多羟基黄酮，酚类，羧酸鞣质类化合物的分离纯化。

填料介绍

正相硅胶

- 微酸性介质
- 活性基团 Si-OH
 - 氢离子很容易解离
 - 实际活性基团Si-O-
- 使用寿命较短，通常用于一次性柱

缺点:

- 正相硅胶的酸性pH可能会使酸性或碱性物质的分离困难；
- 对于拥有酸性基团或者碱性基团的化合物要求对流动相进行修饰
 - 碱性物质常用三乙胺或二乙胺；
 - 酸性物质用醋酸；
- 修饰剂可能与化合物反应。

优点:

- 样品容易蒸干，浓缩快；
- 制备过程时间短；
- 制备量大（正相一般样品和硅胶的比例可按1： 10-1： 100）

填料介绍

C-18 反相填料

- 主要用于纯化中等至高级性物质: 碳水化合物, 酸性化合物, 小分子肽类, 氨基酸等化合物;
- 典型溶剂系统: 甲醇-水, 乙腈-水, 乙醇-水;
- 流速相对比正相柱低;
- 一般样品分离纯化完后, 可保存在甲醇溶液中, 可重复使用。

填料介绍

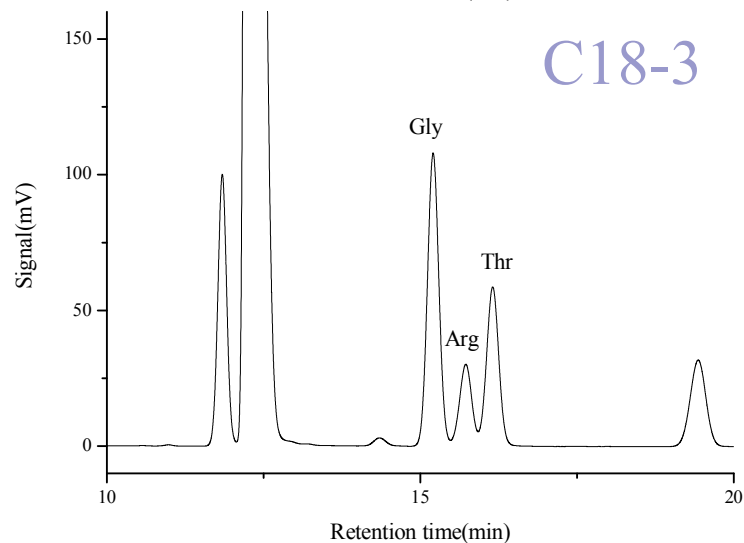
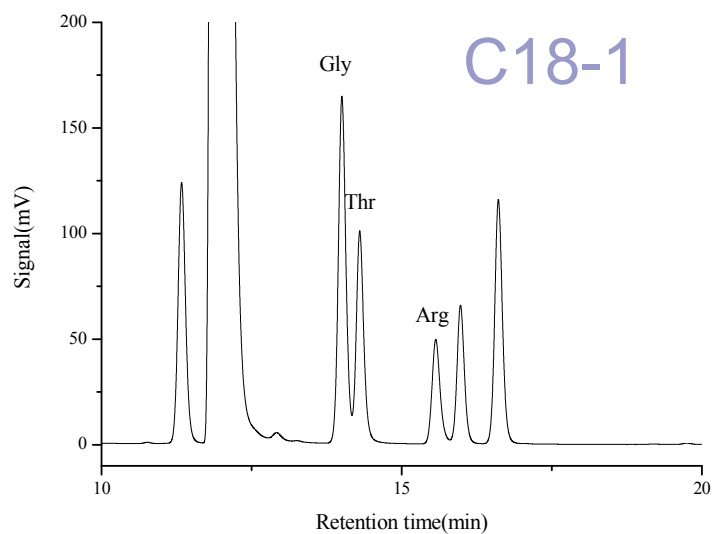
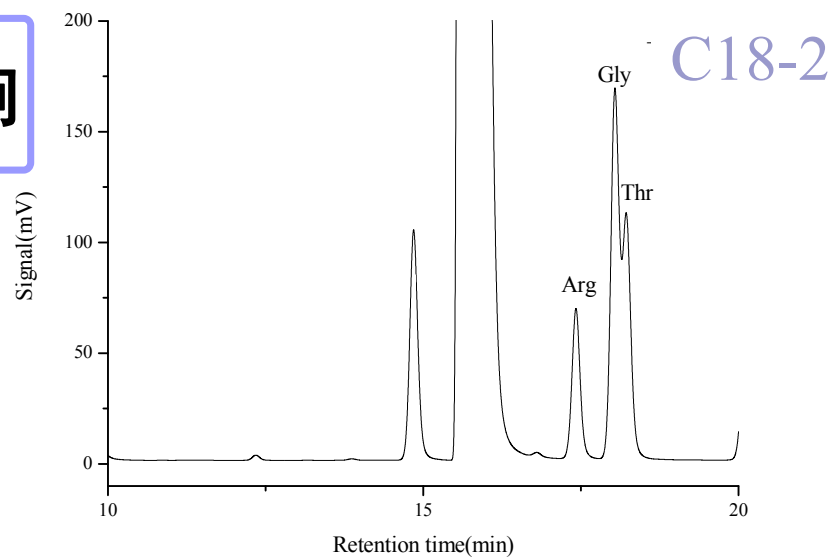
C-18 反相填料

- 缺点:**
- 样品分离纯化耗时长；（上样量相对较小，制备单体一般用1: 100-1: 300）
 - 样品分离纯化好后，因为有水，浓缩需要较长时间；

- 优点:**
- 填料可反复使用多次；
 - 一般条件设定得当，样品分离后纯度高，可达98%甚至99%；
 - 一般可用于处理很多正相分离效果不理想的样品。

填料介绍

C18填料对选择性的影响



其他填料介绍

色谱树脂填料

聚苯乙烯（Polyacrylic）/二乙烯苯或聚丙烯酸骨架（PS-DVB）

刚性强：耐压

单分散工艺：粒径大小均一；分离效果好

pH范围广：0-14

主要应用：植物提取物，如生物碱、甙类、酚类、糖类等植物提取物的分离纯化；
多肽和蛋白质的分离纯化；
寡聚核苷酸的分离纯化；
芳香族类抗生素的分离纯化；
糖肽类抗生素的分离纯化

优点：使用寿命更长。

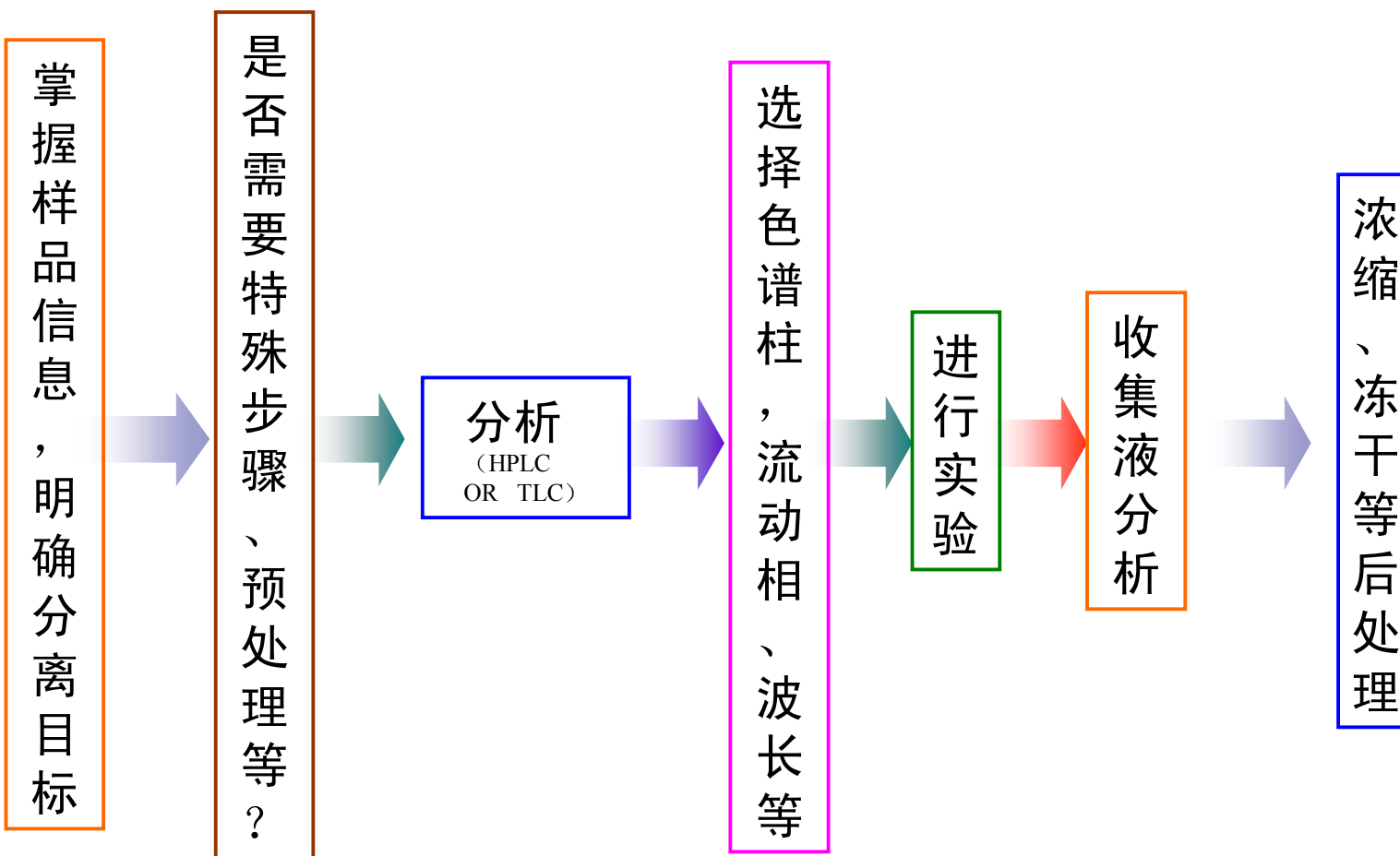
方法建立

两个必要的条件：

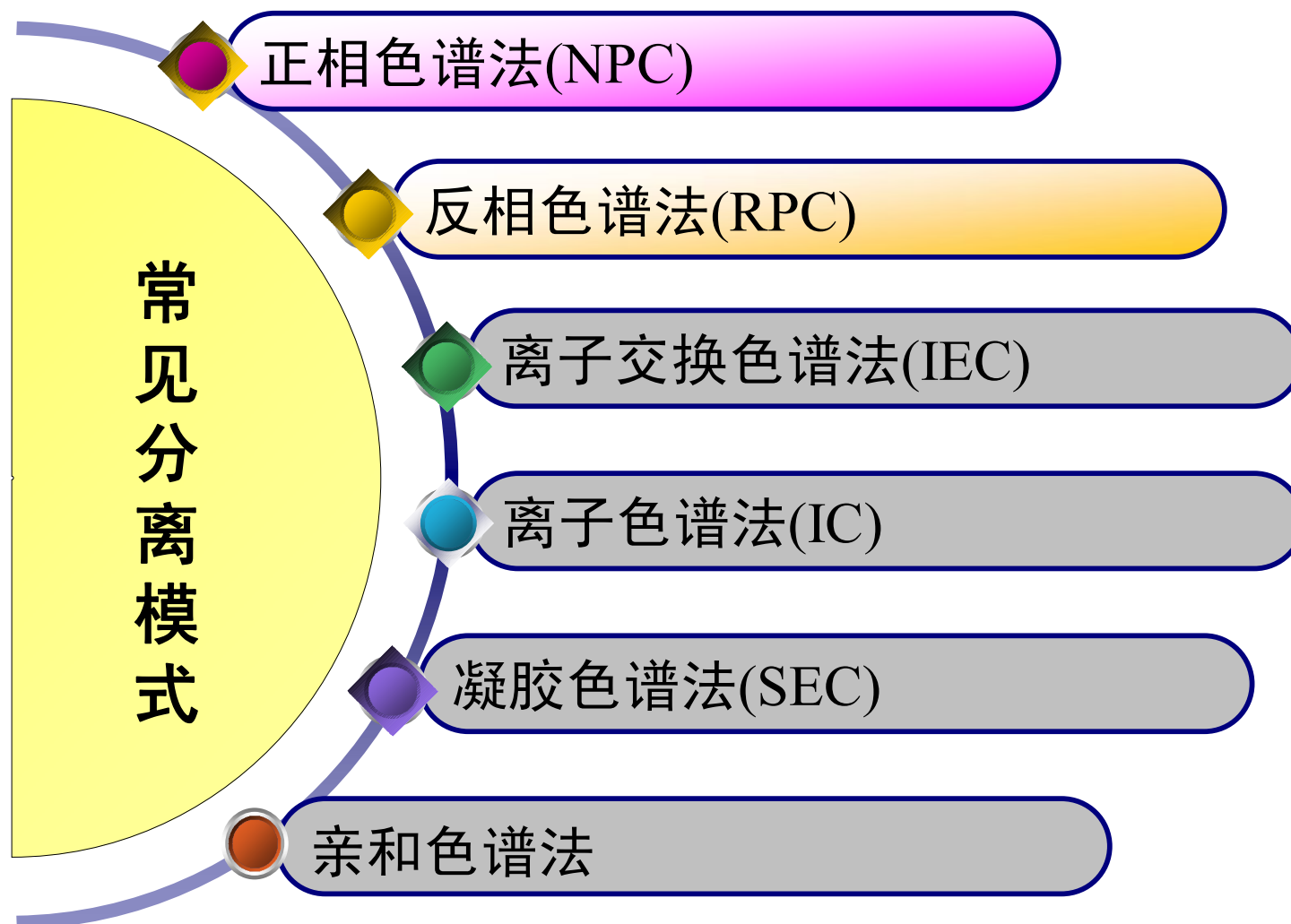
- ✓ 化合物溶解于系统溶剂
- ✓ 化合物与柱子中的填料不存在不可逆吸附

方法建立

一般步骤



方法建立



正相方法建立

1. 正相色谱法 (NPC)

定义

采用极性固定相、非极性流动相的一种操作模式。
根据样品极性大小将其分离的液相色谱技术。

机理

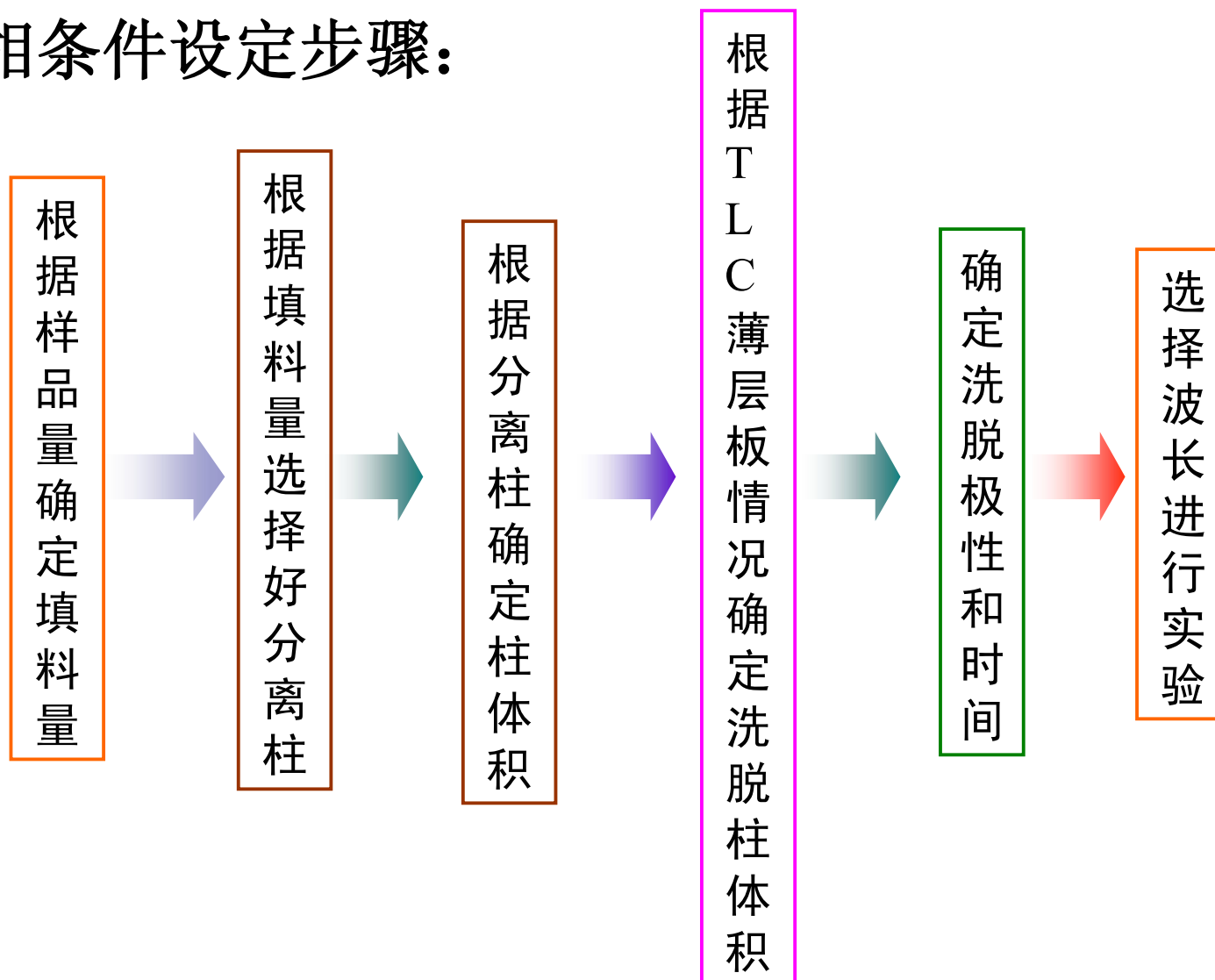
极性溶质与固定相表面极性位点作用 (SiOH , $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$) 引起保留;
样品分子与固定相作用力不同导致分离

洗脱顺序

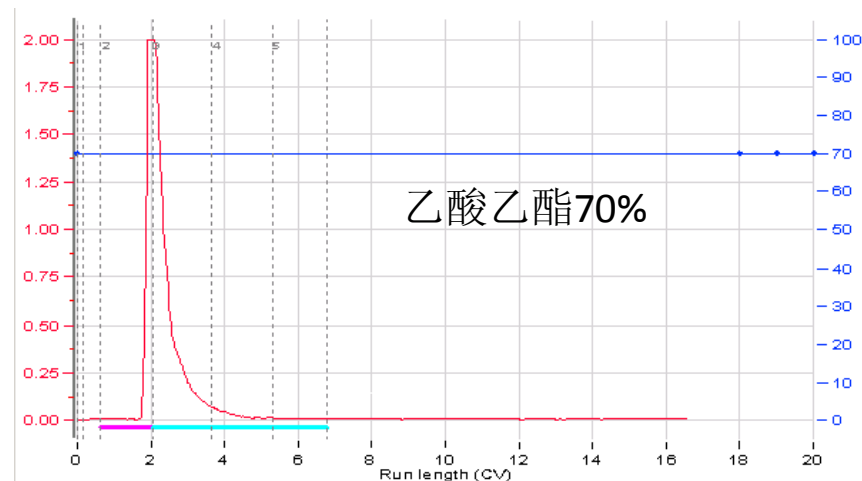
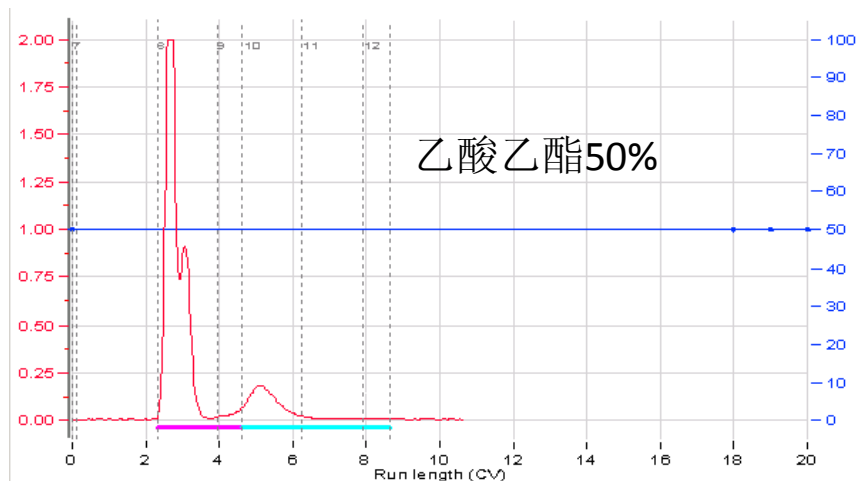
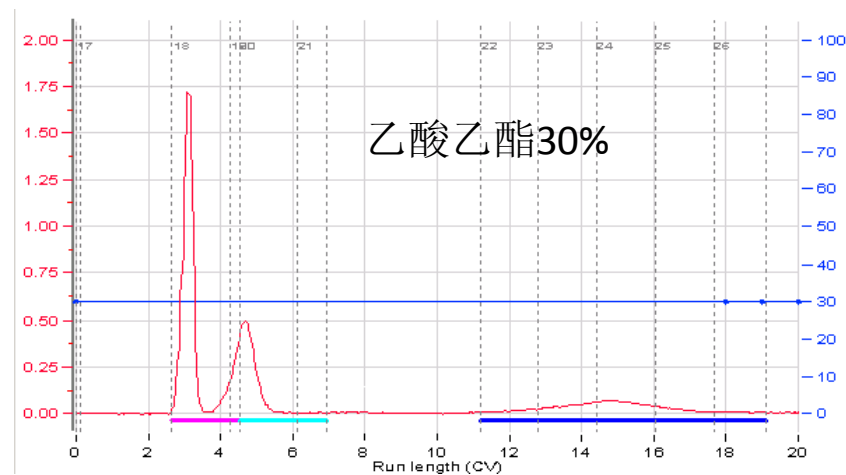
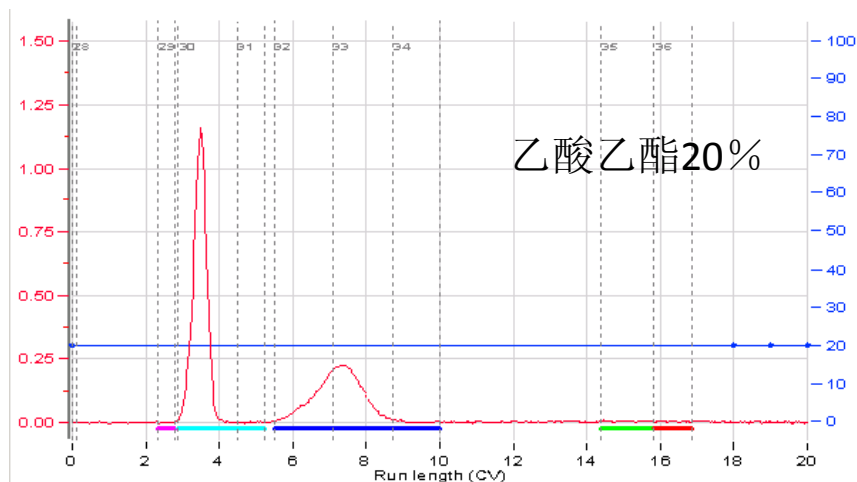
弱极性化合物先洗脱，强极性化合物后洗脱

正相方法建立

正相条件设定步骤:

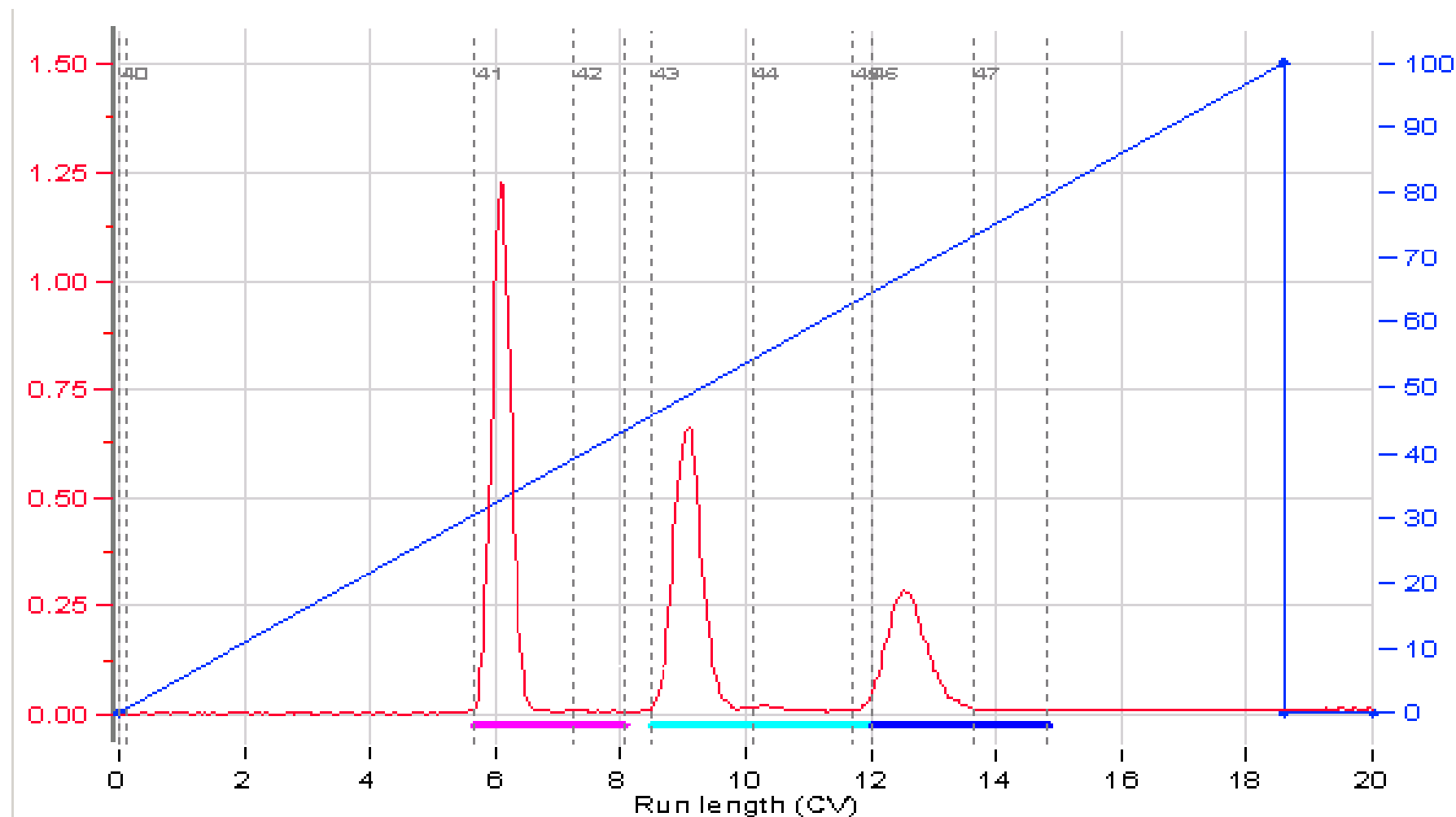


正相方法建立 梯度程序对分离的影响



正相方法建立

线性梯度洗脱



分离纯化服务电话: 15800716931

正相方法建立

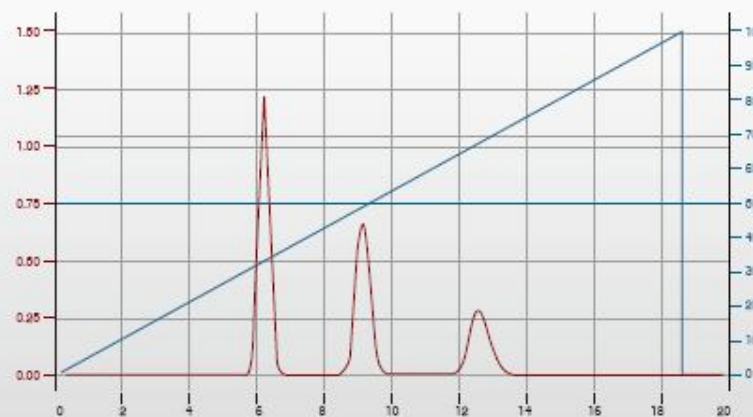
梯度的好处：

- 由于物质在最佳的极性位置被洗脱，所以峰形更尖；
- 提高了纯度；
- 提高了色谱柱上样量；

使用梯度的原则：

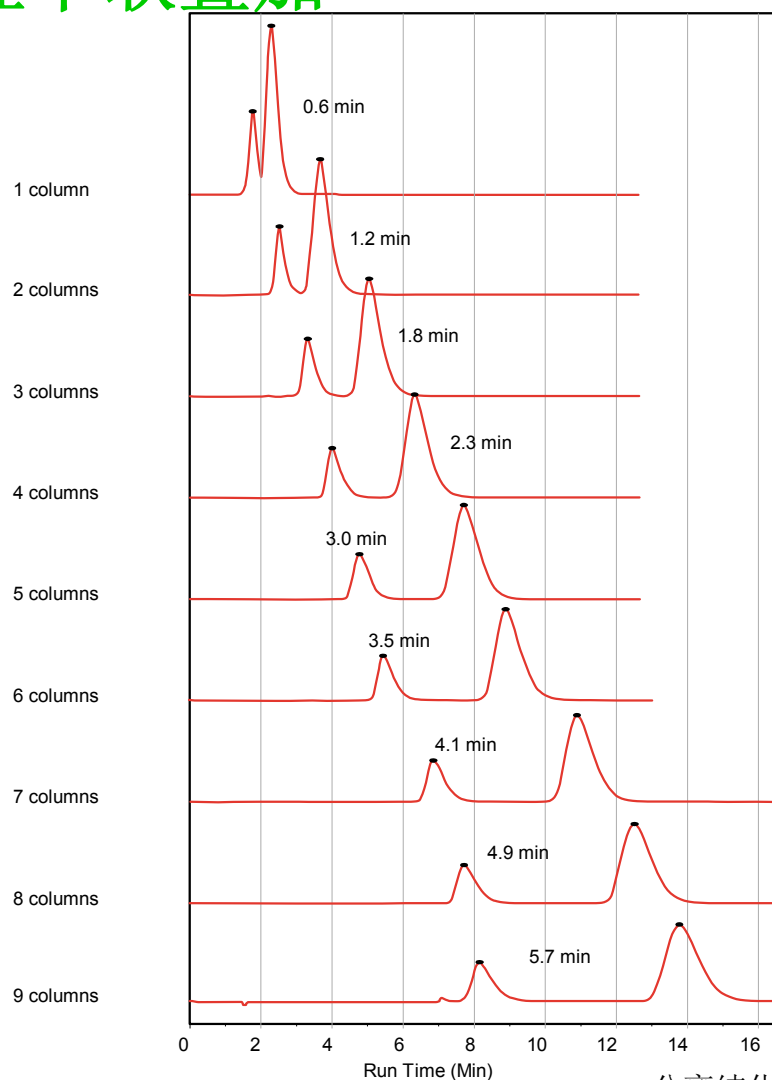
- 用TLC进行方法研究试验；
- 选择具有最佳选择性的溶剂系统；
- 分离前无需知道确切的溶剂系统浓度；
- 从尽可能低的浓度开始梯度洗脱以确保不丢失目标物质。

使用线性梯度洗脱的效果



正相方法建立

柱串联叠加

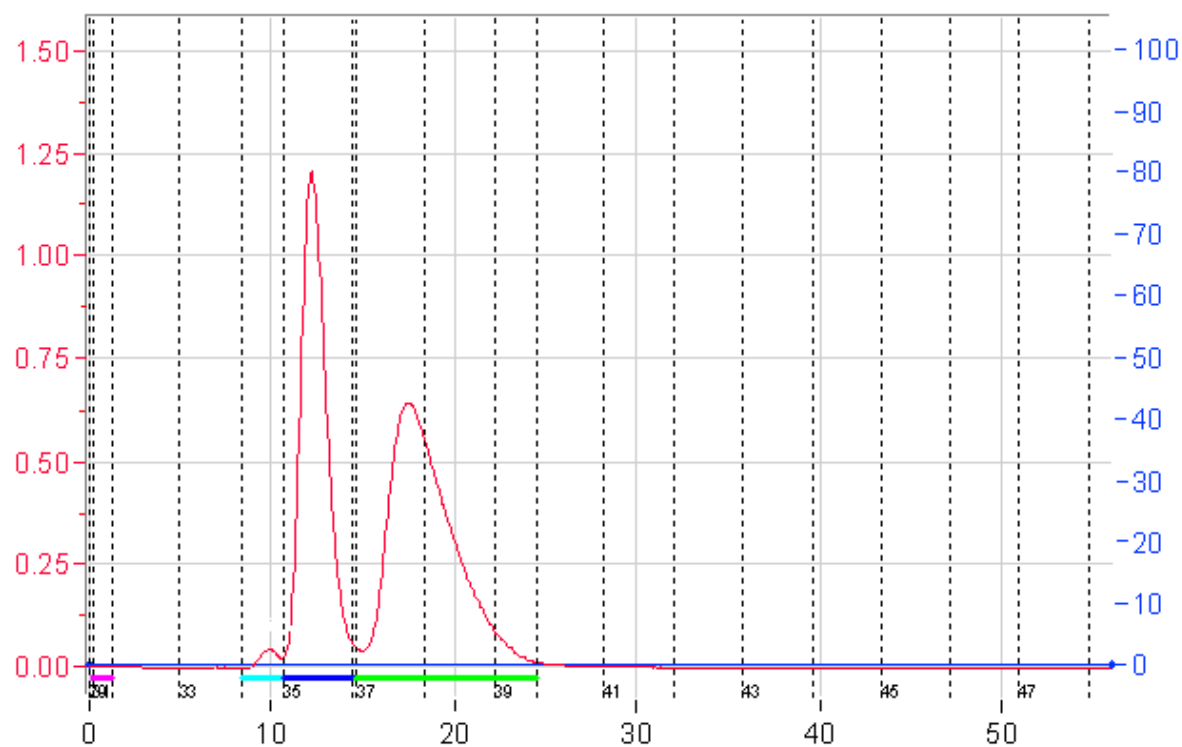


优点:

- 增加柱的长度可有效提高分辨率，是一个可以显著提高分辨率的有效工具；
- 每增加一个柱就可以提高分辨率；
- 无需对介质和溶剂系统进行大的改变。

正相方法建立

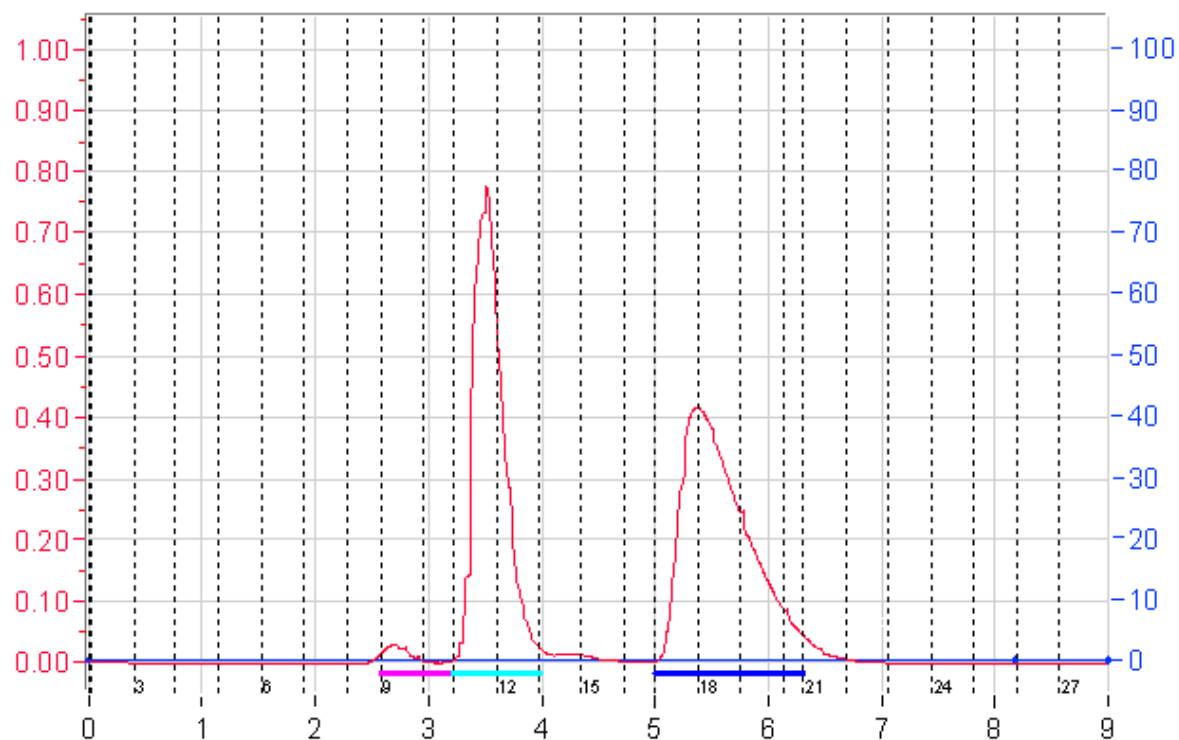
1 根正相柱



分离纯化服务电话：15800716931

正相方法建立

6 根柱串联叠加



正相方法建立

流动相的选择

一般选择一种较弱(非极性)的溶剂A和一种较强(极性)的溶剂B，然后按某种比例混合获得。

注意：

选择流动相时，应考虑如下情况：

一般要求实验设定波长在溶剂截止波长以上，否则将会有溶剂峰的干扰，影响检测。（如丙酮330nm, 乙酸乙酯252nm, 氯仿245nm等等）

反相方法建立

2. 反相色谱法 (RPC)

定义

以非极性表面的载体为固定相，以比固定相极性强的溶剂系统为流动相的一种液相分离模式。

机理

色谱柱的极性弱于流动相。样品分子在极性流动相和非极性固定相间进行分配，疏水性强的(非极性)化合物保留较强。

洗脱顺序

强极性化合物先洗脱，弱极性化合物后洗脱。

反相方法建立

流动相的选择

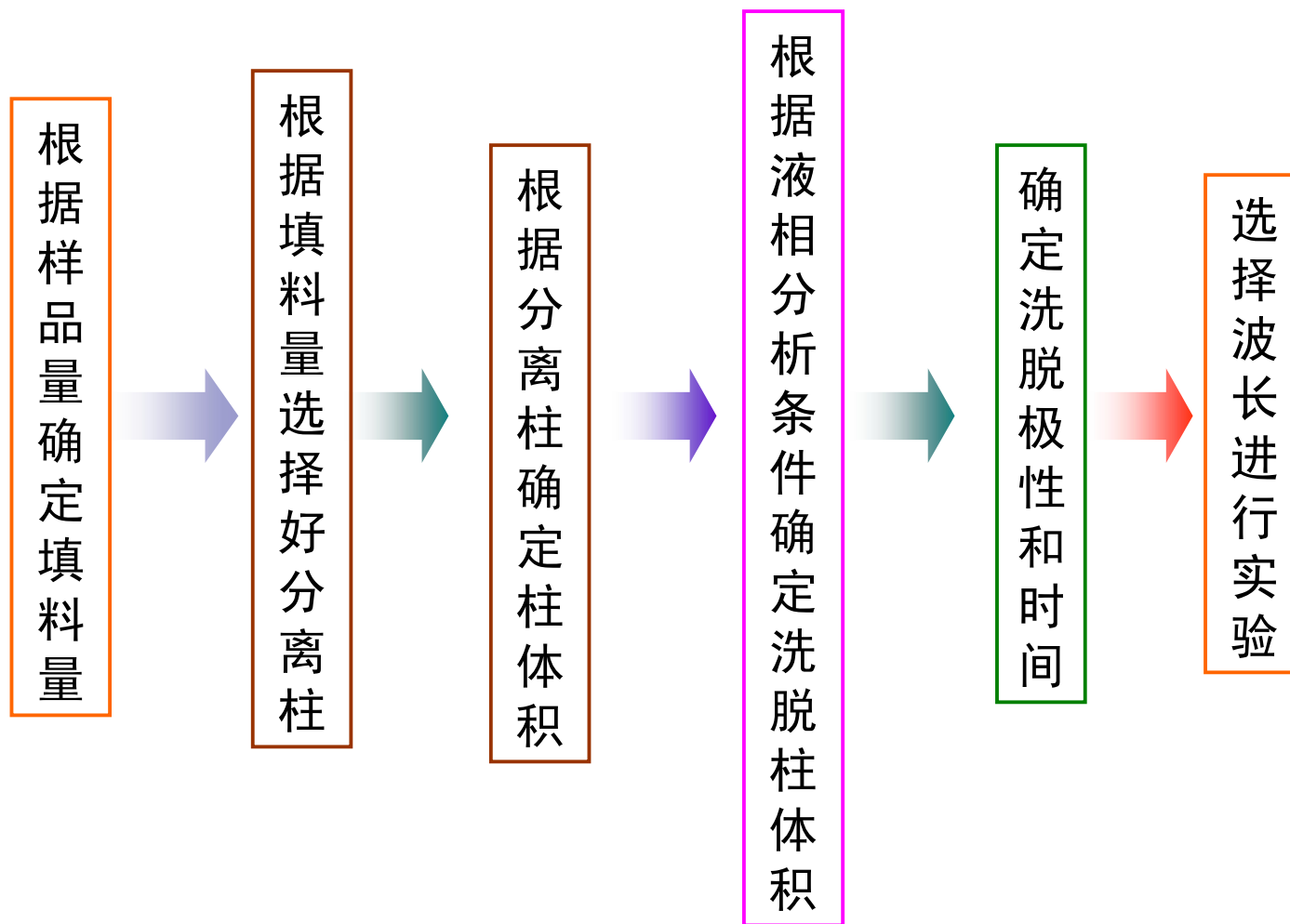
常用溶剂系统：甲醇-水；乙腈-水；乙醇-水。

反相中溶剂强度顺序

水（弱）<甲醇<乙腈<乙醇<<丙醇<二氯甲烷（强）

反相方法建立

反相条件设定步骤：



反相方法建立

反相分离案例：

检测：

色谱条件

色谱柱-SinoChrom ODS-BP 150mm×4.6mm

波长-294nm

流速-1.2ml/min

流动相-A - 1.5%醋酸水溶液

B - 乙腈

流动相梯度：

时间	B%
0~7min	15%
7min~15min	15%~20%
15-35	70%~90%
30min~35min	90%

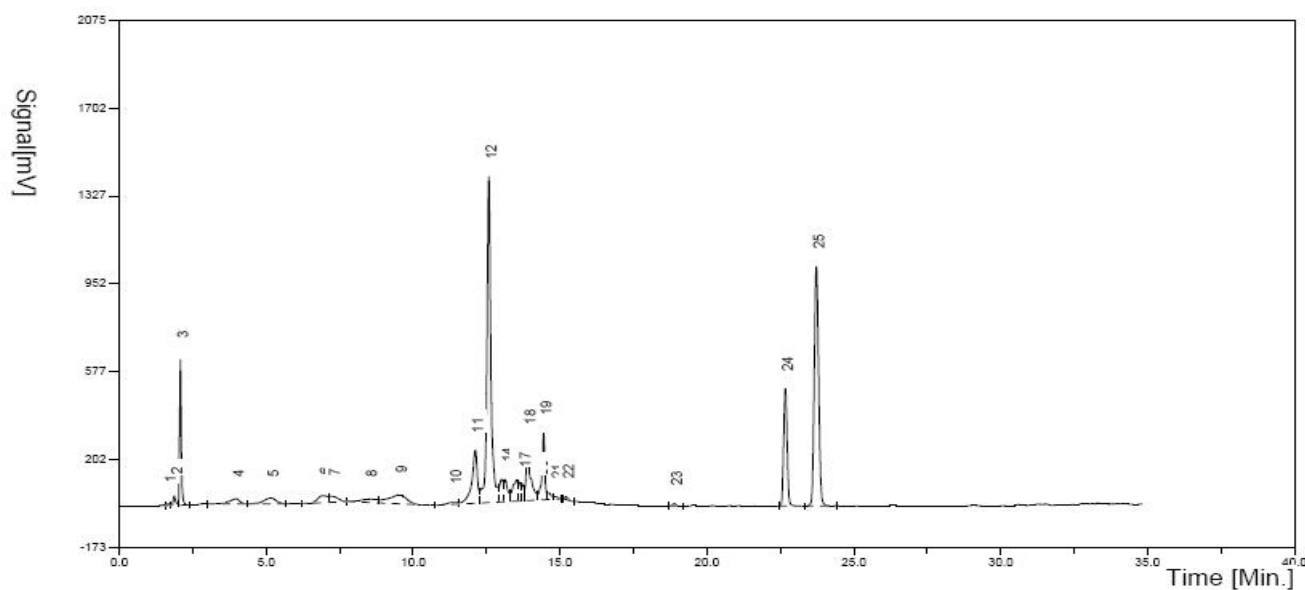
样品少量，甲醇超声溶解，进样。

分离纯化服务电话：15800716931

反相方法建立

反相分离案例：

HPLC分析



反相方法建立

反相分离案例：

制备分离条件

分离柱-12g×4，进口C18，30 μ m；

波长-294nm（收集），327nm（监测）

流速-20ml/min

流动相-A - 1.5%醋酸水溶液

B - 乙腈

收集-10ml/管

反相方法建立

反相分离案例：

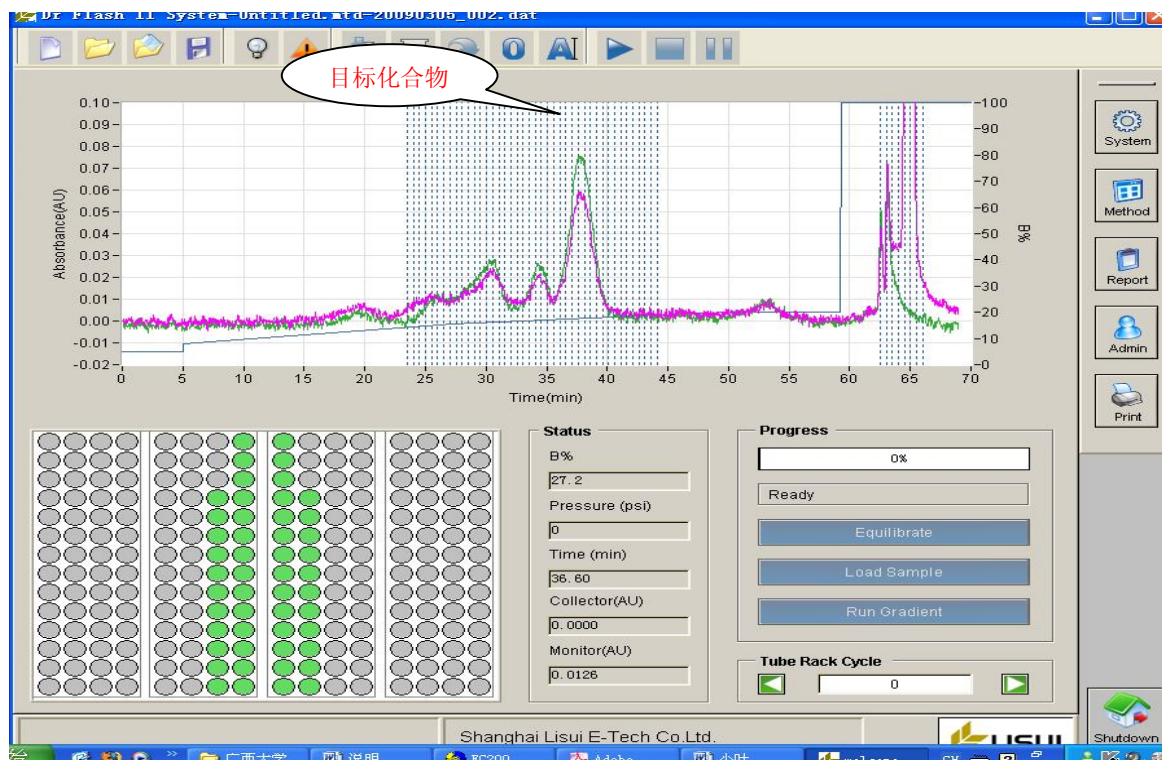
流动相梯度：

B%	start	end	duration
EQ	5	5	10
2	5	5	5
3	5	20	30
5	20	20	10
6	100	100	10

备注：

在流动相梯度第4、5步可改以15%等度30min，后接第6步。

反相方法建立

反相分离案例：
制备谱图

备注：样品54mg，1ml甲醇溶解，注射进样。

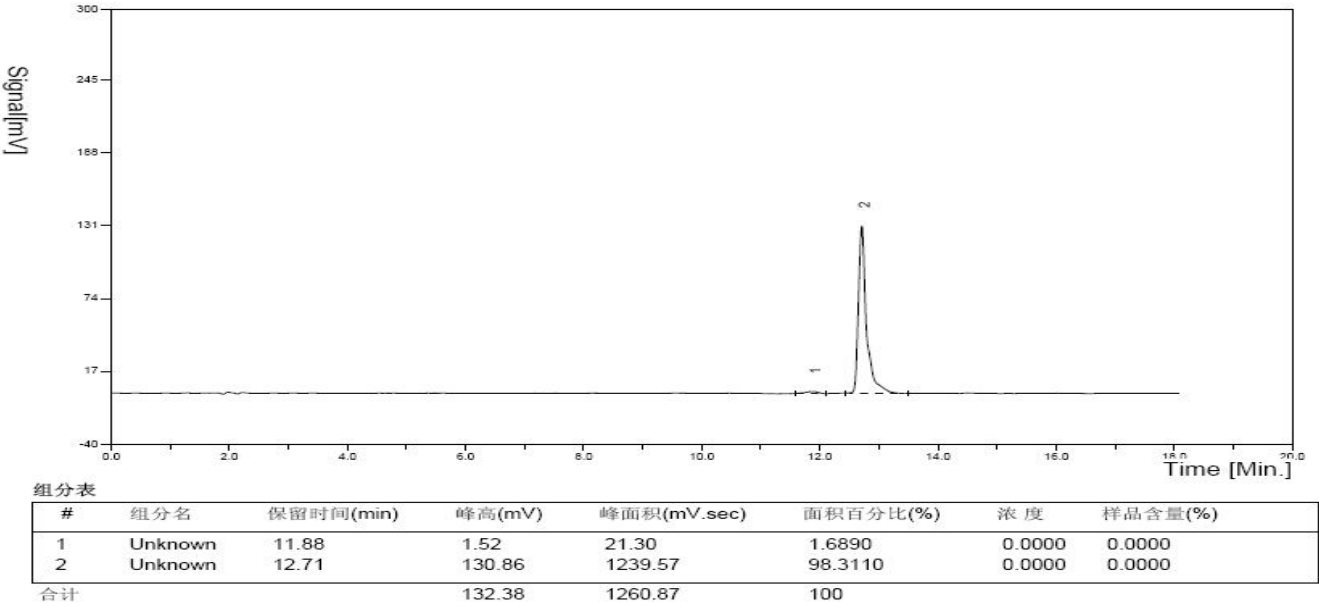
目标化合物实现完全分离，起峰部分和落峰部分含量均大于98%。

分离纯化服务电话：15800716931

反相方法建立

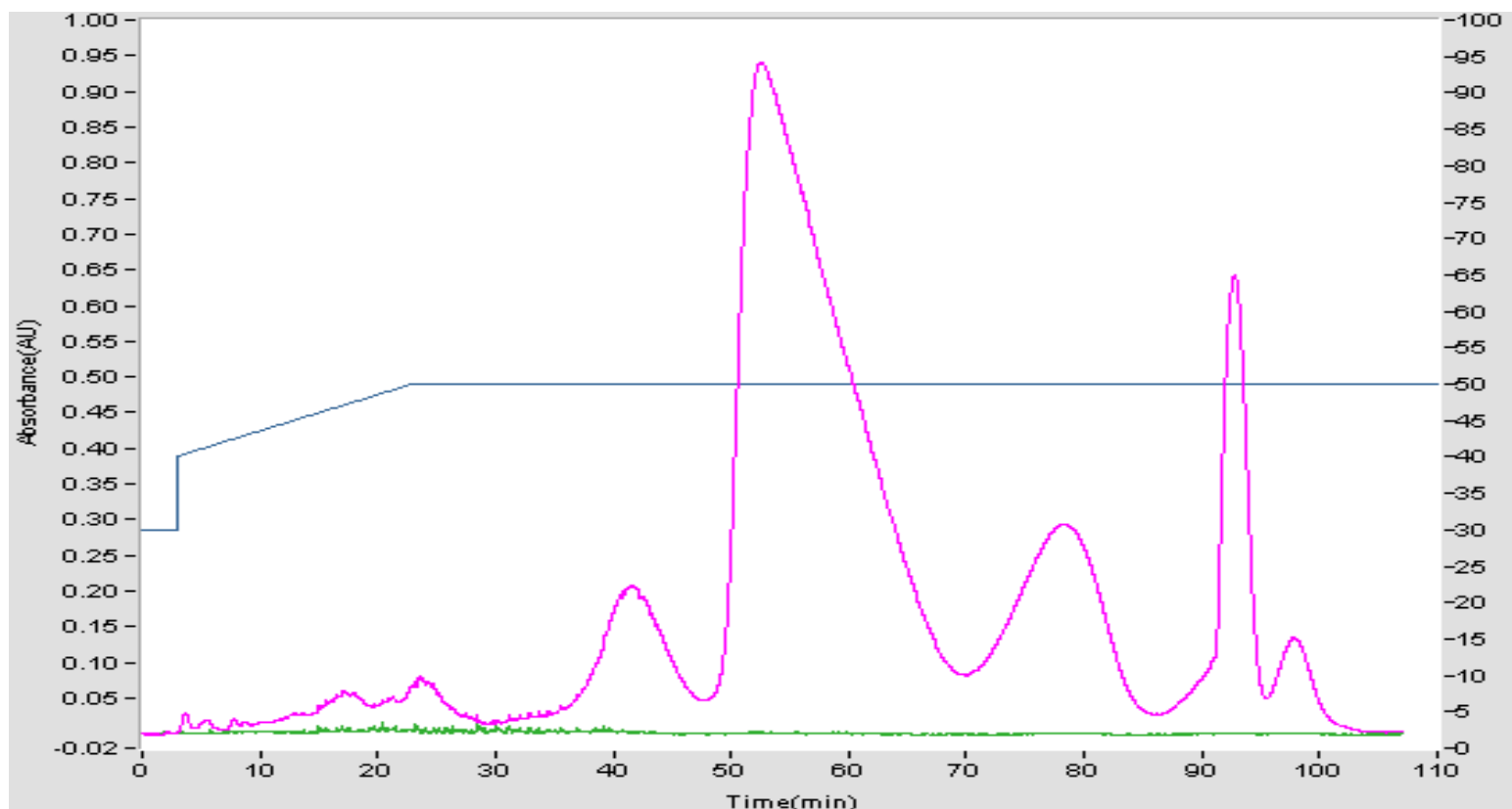
反相分离案例：

结果



反相分离案例：反相方法建立

案例二：植物提取物的分离



流速: 20 ml/min

收集波长: 270 nm

柱子填料: C18

溶剂系统: 甲醇-水

反相分离模式

分离纯化服务电话: 15800716931

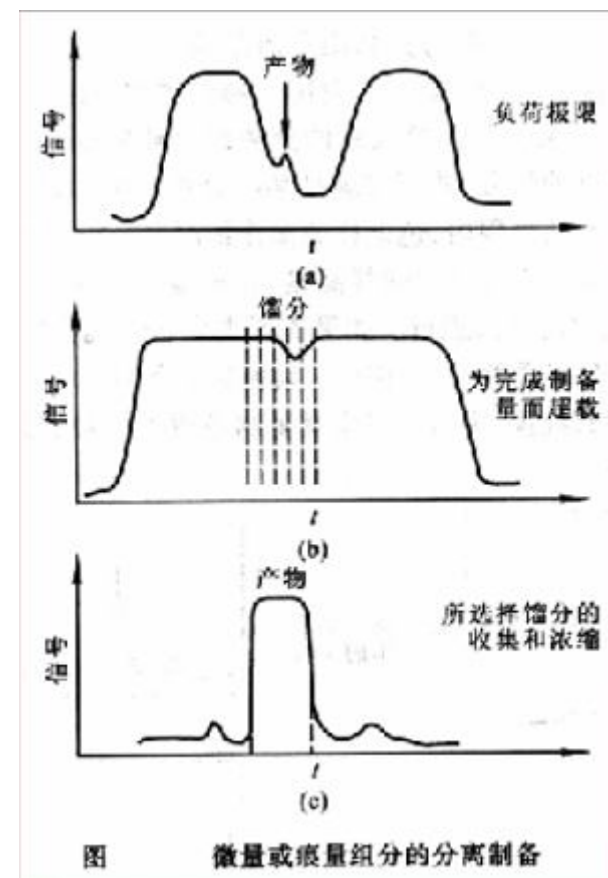
方法建立

药物杂质分离时，通常有以下情况：

(1) 可获得良好分离，主峰使用制备柱，超载提高效率。

(2) 两主成分之间的小组分：超载，分离切分使待分离组分称为主成分（富集）后，再次分离制备。

制备讲究的是效率，能用最少的成本拿出更多的化合物讲究的是策略。



使用说明

柱子的装填与拆装（正相硅胶，反相C18）清洗：

- 正相柱基本上是干法装柱，采用震装青岛海洋的硅胶（300-400目）。
- 反相柱干法装柱或者湿法装柱均可。一般干法装柱比湿法装柱多装15%填料，但容易使填料扬起；湿法装柱相对清洁。
- 压柱：一般人工装好反相柱后可采用50%的甲醇-水系统反复压柱，以提高柱效。
- 硅胶一般只用一次，C18可拆装，用异丙醇泡制，清洗后可长期使用。

使用说明

上样

- **固体上样：**正相分离系统；反相溶解性差系统；（正相拌样可用80-100目粗硅胶拌样以减少死吸附带来样品的损耗；反相可用粗聚酰胺拌样或者较大颗粒的C18拌样）
- **液体上样：**反相系统多使用液体上样方式，也可以采用湿法拌样，特别是对于溶解度很差的化合物，是非常有效的手段，这也是中高压独有的上样分离模式，是传统高压制备液相无法做到的，特别是对于中药多组分的分离。是特别有效的分离手段。
- **注意：**
 - 1、不管是正相系统还是反相系统，样品在上样前一定要充分溶解；
 - 2、原则：用尽量少的溶剂溶解尽量多的样品。

常见问题

色谱分离纯化过程中常见问题：

- 1、样品在TLC板上两个点分得很开，如一个比移值0.2，一个比移值0.3，但是分离过程中两个化合物总是分离不开；
- 2、样品是两个对映异构体，如液相等度分析15min出来的是两个骆驼峰要求制备出纯品1克；
- 3、样品在TLC板上呈现两个葫芦点分布，分离过程纯品收率不高；
- 4、样品极性很大，如水溶性化合物在液相分析上10%的甲醇-水系统6min就出来，目标物与杂质基本分开，但制备过程却困难；
- 5、样品极性很小，如95%的正己烷-氯仿体系，两个峰制备过程呈现骆驼峰，纯品收率不高甚至得不到纯品；

常见问题

色谱分离纯化过程中常见问题：

- 6、样品溶解性很差，在正相分离过程中就有晶体析出来，但两个化合物结构很相近；
- 7、小量样品用高压制备可以实现，但大量样品制备却困难；如液相梯度分析一个峰25min出来，另一个峰28min出来，现要求制备纯品10克，纯度96%以上；
- 8、液相梯度分析两个峰分得比较开，如一个峰12min，另一个峰15min，但是中压色谱制备过程中两个峰呈现骆驼峰，不能完全基线分离；
- 9、某些附加值很高的样品，小量分离纯化制备可实现，但是大量制备在放大过程中却难以实现。如要求一个月制备300克甚至1kg纯品。

中高压色谱柱



分离纯化服务电话：15800716931

全自动中高压制备色谱



分离纯化服务电话：15800716931

謝謝！



www.soppt.cn

感谢支持和帮助过我的人，他们让我更快地成长；感谢批判和挑战，他们让我更加清醒；感谢挫折与风浪，他们让人生得到洗礼；感谢父母，感谢老师，感谢朋友.....