

制备色谱技术与操作及实验经验

1 制备色谱到底是什么？

(1) 分析色谱的目的，是分析出混合物中一个（或者几个）纯物质的含量。制备色谱的目的，是从混合物中得到纯物质。

为了加快分离的时间与提高分离的效率，制备色谱的进样品量很大，导致制备色谱柱子的分离负荷的相应加大，也就必须加大色谱柱填料，增大制备色谱的直径和长度，使用的相对多的流动相。

然而，当色谱柱上样品负载加大的时候，往往导致柱效急剧下降而得不到纯的产品。制备色谱，要解决容量与柱子效果之间的矛盾，对重现性也要考虑。从经济上来说。制备色谱要争取少用填料，少用溶剂，要尽可能多的得到产品。

(2) 样品的前处理：

制备色谱柱子由于处理的样品多，比分析柱子更容易受污染，所以，必要的前处理就显得非常的必要。萃取、过滤、结晶、固相萃取等简单的分离方法，如果用得上，而且还不是很麻烦，就要尽可能多的采用以去掉杂质。

(3) 制备色谱柱的材质及其特点

下面介绍一下，制备色谱柱常用的材质及其特点。

各种规格的玻璃柱子在实验室里头很容易得到，而且价格低廉，但玻璃柱子致命的弱点是它能承受的压力很小，且非常容易破碎。当由于压力太小而导致流动相流速很慢的时候，高位液面或加高压空气（或者氮气）的采用是一个简单的解决办法。在底下加真空，也能在一定程度上解决这个问题。

不锈钢柱子具有良好的耐腐蚀、抗压力性能，但其价格相对很贵。如果，只有很小的分离任务且经费也允许，市面上直径为 1cm 的小型制备柱就是首选。

有机玻璃柱子也能抗压力耐腐蚀，相对不锈钢柱子而言，它是半透明的，可以看到液体的运行状态，对有色的物质其特点就更为突出。

(4) 固定相的选择

硅胶、键合固定相（如 C18）、离子交换树脂、聚酰胺、氧化铝、凝胶等都可以作为色谱柱的填料。有不少文献报道，对填料可以进行一下处理提高了分离效果，如，对硅胶进行的硝酸银（或缓冲液）处理。

(5) 装柱方法的选择：根据固定相颗粒度和柱子的尺寸，采用不同的装柱方法，往往装填越好分离效果越好。装柱效果跟填料的颗粒度关系很大，颗粒度的减少会导致装柱的难度。一般来说，颗粒直径小于 20—30um 的固定相采用湿法装填。所谓“敲击—装填”技术适用于颗粒直径大于 25um 的固定相。湿法的目的是迫使相对稀松的固定相悬浆以高速装入色谱柱子，从而减少空隙的形成。然而，当柱直径大于 20mm，所加压力为 30—40bar 时，高压悬浆装填技术就变得十分复杂。为将小颗粒固定相装入更大得制备型色谱柱，可采用柱长压缩技术。这种方法，先将固定相悬浆（或偶尔是干填充物）装入柱中加压，利用物理方法将其压紧。压紧的方法有两种：径向压缩和轴向压缩。湿法装柱需要一定的设备，在柱子填完后，应用有柱效的测量，对柱效低的柱子应该重填。

(6) 流动相的选择

除了和分析色谱同样的考虑外，在选用流动相时，要考虑色谱分离后面加有旋转蒸发等二次

分离操作。一般来说，不宜采用高毒性溶剂，对多元溶剂要尽可能的少用。

如果产品中含有大量溶剂，溶剂的纯度也要考虑在其中。

(7) 加样的方法

可以采用以下方法之一进样。—用注射器进样—用旋转阀进样—通过六通阀进样—通过主泵进样—通过辅泵进样—固体上样

(8) 泵的选用

生产制备色谱泵的厂商很多。根据有无脉冲、能承受的最大压力、控制的精度、售后服务等来选择泵。

(9) 检测器的选用

一般的分析池的最大允许流速仅为 5 mL/min 或者 10mL/min。而专门的制备池的最大允许流速可为 150mL/min。有时，采用旁路分离管，将少量流体导入分析池进行检测，是一个不错的办法，但其浓度的误差会相对较大。

(10) 组分保留时间的估计

用分析柱子在同等色谱条件下（同样的固定相和流动相）测定保留时间后，按照单一组分的线流速（不是体积流速）一定，通过计算可以知道组分的大致保留时间区域。

分析谱图的峰形状，对确定保留时间也有很大的参考价值。

(11) 产品的收集

手工馏分收集费时费力，自动馏分收集器有很大的方便。许多实验室和工厂都采用了馏分收集器。

(12) 超载、边缘切割、中心切割、放大技术与非线性效用

在制备色谱中，因为没有必要达到分析色谱那样的分离度，可以在一定范围内大大加大进样的浓度和体积。在做分离的时候，也有一些分析色谱的时候，不能用到的技巧。因为篇幅关系，不在这里叙述。

(13) 柱转换技术

通过接头或者阀门，实现柱子的简单延长，或者比较方便地实现对其中一个（或几个）组分的精制。

(14) 比较新的制备色谱技术

模拟移动床可以连续进样，并可以利用边缘切割效用，而且采用了柱切换技术，能更好的利用溶剂和填料，已经应用于工业化生产。其理论和技术也日益完善。

迎头色谱、超临界流体色谱、逆流色谱环形色谱、气相制备色谱等在科研和工业生产中也得到了应用。

实验经验：

1 问：我想购买 waters600 用于分析和制备，对于其配备有什么好的建议。

答：可以配一个 PDA，另外加一个示差折光 410，另外买几根制备柱就可以了。waters600 的流速最大为 20mL/min，一般可以配 20mm ID 的制备柱，一次分离 10-100mg 的样品，如果样品量更大，可以通过配件扩展到 45mL/min，使用 30mm ID 的制备柱。另外为了保证馏分收集的准确性，最好配上 Fraction II 馏分收集器。

如果样品数量很大，可以配 2767 sample manager 和 ZQ MS，同时做自动进样并通过 MS 或

UV 信号自动收集馏分。这样可以过夜自动运行。最大通量每天可以处理 100-200 个样品。

2 问： 如何用制备色谱柱制备低含量的杂质？

制备色谱柱为 Zorbax SB-C18 9.4*250mm 及 Gilson 馏分收集器，色谱仪为 Agilent 1100 或 LC-6A。想用其制备面积归一化法含量为 0.05% 左右的杂质，初步提纯后用高分辨的 LC-MS 进行定性分析。如何设定色谱条件，如流量，进样量，样品的浓度，切割点的设置，是否要浓缩，要求将 95% 以上的主峰切除。（主峰后有二个杂质靠得很近。）

答：制备用的流动相最好等级高一点，否则流动相中的杂质会影响 LC-MS 分析；使用馏分收集器时，延迟体积一定要计算精确，检测器的响应时间设到最小，否则都会影响收集的纯度和回收率。制备柱的流速一般与直径的平方成正比，如果 4.6mm 分析柱流速为 1mL/min，9.4mm 制备柱用 $1 * (9.4/4.6)^2$ ，大约为 4ml/min。进样量设到几个 mg 应该基本没有过载。进样样品浓度越高越好。假如进样 10mg，理论计算 0.05% 的杂质大约只有 5ug，显然浓度太低，最好是多做几次，合并馏分然后浓缩后做 LC-MS 分析。

3 问： 我想用 hplc 分离一个简单的多肽,我应该选用什么样的流动相,还有他的梯度,还有选用什么样的柱子

答： RP-HPLC, C18 柱可以制备很少量的肽。如果用 RP-HPLC，首先应该用同类型的分析柱子分析一下多肽含多少杂质，设置缓缓的梯度的分离样品，在根据分析柱子跑出的峰形，逐渐放大纯化的方法。

4 问： TFA 在缓冲液中是不是只起到调节 pH 的作用呢？ TFA 的浓度越高基线的漂移越厉害，那是不是说它的浓度在缓冲液 pH 允许的情况下越低越好呢？

答：（1） TFA 起到类似离子对的作用，一般浓度在 0.05-0.1%，过高的浓度，会使溶液偏酸，长时间使用可能影响柱子寿命。

（2）同时 TFA 可以抑制硅胶表面硅醇基，改善碱性化合物的峰型。有时 0.1% TFA 分离不好的话。可以考虑加大浓度到 0.2%。但要注意用完后及时冲洗色谱柱。

（3）走梯度时，因为走成基线漂移，但对制备的影响不大。

5 问： 样品如果溶解度太低如何上制备 HPLC？

答（1） 了解一下样品的性质,根据其酸碱性,极性性质,通过调节溶剂的 pH 值等,以达到较好的溶解度

（2）样品可能某种晶型难溶，这样可以加入其他溶剂（如丙酮等）以助溶。

（3）不是一定要用流动相来溶解样品，对溶解度差的样品，可以选择甲醇，THF 或 DMSO 等溶解样品。特别是 DMSO，对一般的化合物溶解度都很好。并且在反相柱上不保留，不会造成干扰。而且 DMSO 的洗脱能力很弱，一般不会影响峰型。

（4）可以固体上样。

6 问： 多肽的分离制备，如何上量？如何增大分离度？

答：反相 HPLC 应当是很好的分离小肽方法，用 CH₃CN 或 CH₃OH: H₂O (95: 5) 做流动相，

看保留如何，若无保留，建议改用其他色谱方法进行分离。

关于多肽的分离，首先要知道它的分子量大小，然后选择不同类型的填料，如孔径的大小。我们先在分析柱（4.6MM 内径）上做一下实验，找到最大的分离度，这一过程的难度是最大的，要不断地改变流动相和固定相，然后再线性或非线性放大到制备，放大的倍数按分析柱的实验结果。分离后可以通过冷冻干燥得到固体。

还可以考虑离子交换来分离

7 问：做柱层析时（国产大孔吸附树脂），怎么才能把洗脱液中的树脂残留物处理干净？

答：大孔吸附树脂在上使用前，一般需要进行处理，方法包括用色谱纯的甲醇或乙醇洗到没有吸收；或树脂用乙醇浸泡 2 天，丙酮浸泡 2 天，然后用常规的酸，碱洗。再用丙酮回流二小时就可以用了。

8 问：由分析型液相转为制备型液相，其色谱系统需作多大调整？是否可以按照柱体积折算只改变流速？其上样量多大为宜？

答：（1）泵要换，流量要加大，压力可不变或减少；流通池要换体积更大的。

（2）整个系统的管路要更换更粗的，否则压力太大，而且特别容易发生堵塞。对流通池后的管路，最好增加反压调节器，否则管路太短的话，反压小会导致流通池气泡，管路长的话会导致峰展宽。

（3）检测器的响应时间和峰宽要设置合适，否则会导致收集时延迟体积的计算不准

（4）上样量主要根据柱子的大小、样品的浓度、制备是否根据分析条件放大（例如制备柱是否还用分析用填料）；一般上样量与柱子直径的平方以及长度成正比。

9 问：流动相中含有盐时，收集液该如何除盐？选用挥发性酸，碱或盐（如醋酸铵）是否会在挥发溶剂或冻干过程中直接除去？

答：一般可以采用离子吸附的办法去掉（可以参考离子吸附有关技术）。但也是稍微麻烦的事情，最好，不加酸碱盐，如果要加的话最好，要加挥发性的或者对产品或者检测没有干扰的。

可用 G25 脱盐，它是安马西亚出的一种葡聚糖凝胶。交联度大孔径小，对小分子的无机盐保留较大，而对分子量较大的有机物没有保留从而可以将盐份脱除。另外采用挥发性的酸，碱时，一般会在干燥过程中直接除去，但如果样品也有酸碱性，可能会与这些挥发性酸碱形成一定比例的盐。

10 问：制备型柱子柱压上升 柱效下降 怎么办？

答：对高价值的制备柱来讲，延长柱子寿命是很重要的。一般要注意保护柱子，一般来说，制备柱子一般需要保护柱配套。

下面是可能堵塞柱子的原因

（1）如果您所分离的样品中杂质较多而您在上样前没有经过过滤（0.45 微米），一些颗粒性杂质会积聚在柱头造成柱压升高，

（2）也有可能是因为您所使用的流动相中含有缓冲盐的原因，结晶或发生化学变化而堵塞。可以把柱子冲一冲。

(3) 流动相是否符合液相色谱的要求？是否过滤处理？

柱子再生处理办法如下：

(1) 依次用水，甲醇，四氢呋喃，氯仿，甲醇来冲洗柱子，每种溶剂 5-10 个柱体积。

(2) 如果效果不明显，将柱子按以上顺序反冲，一般将大大降低柱子效果，不到没有办法才采用。

(3) 如果效果还是不好，就需要打开色谱柱，超声波清洗筛片（这样也会使柱子效果下降）。必要时挖掉色谱柱内受污染部位，填入新的填料，还可用 3 个月。（填的时候小心，别重新污染柱子）

11 问：制备柱跑干了影响柱效吗？

答：如果时间不长的话，可以用流动相多冲几个小时。柱效不一定变化很大。如果时间太久，柱效一定变低。具体造成影响有多大，要靠柱效测定来确定，而不是干柱时间的长短。如果跑干了，对于 PUMP 的影响可能还大些，所以最好先把管路中的空气抽走再说。

一般说来，制备柱子跑干，属于操作失当。柱子闲置不用时，最好冲入甲醇或其他有机溶剂，一定要把两头堵住密封，这样保留的时间会较长。

12 问：分析 HPLC 如何放大到制备型 HPLC

答：在分析液相中色谱柱的典型进样量是微克级，甚至更低。样品量和固定相之比有的甚至小于 1:10000。进样体积一般来说都大大小于色谱柱体积（小于 1:100）。在这种条件下，会达到很好的分离效果，峰形尖锐并且很对称。

分析系统线形放大到制备型 HPLC 意味着使用直径更大的制备柱、更高的流速和根据色谱柱的长度增加进样量并保持样品浓度不变。峰形仍会保持尖锐而对称。这种方法需要大型的色谱柱和大量的溶剂来分离较少的样品，但这种方法从经济上一般不合适。

在制备液相中，最大的区别就是超量进样。制备的分离峰形一般不可能仍会保持尖锐而对称，分析和制备是不同的概念。制备的首要概念是在达到纯化的基础上，降低成本，加快时间（提高效率）。一般说来，纯化的成本要高于生产粗产品的成本，所以，可以加大上样量，甚至过载，出现平头峰，而收集只集中在峰的一小部分，以来保证纯度，主要为了节省流动相和提高设备利用率。

13 问：制备纯化蛋白、多肽，耗用流动相惊人，请问这些用过的流动相（乙腈，甲醇）可以重蒸使用吗？

答：流动相用一般减压方法重蒸后，往往会形成有机溶剂和水会共沸，另外，由于减压蒸馏属于单次平衡，往往得不到 100%纯度的溶剂，这会使溶剂的配置有一定困难，从而使色谱的重现性和分离度会发生一定的变化。如果要求不是很高的话，一般可以分析重蒸后馏分中的各组分含量，计算后再使用。

要通过重蒸得到纯物质是极其困难的，必须采用精馏塔多级蒸发，单就设备投资和能耗来讲，实验室规模或生产规模的废液回收处理已经是得不偿失。其实，我们没有必要得到纯的物质。

14 问：反相色谱分离纯化后，怎样除去流动相产品中的 TFA 和乙腈或其他杂质？

答：TFA 是反相色谱分离中常用的添加剂。可以用冻干的办法去除，国外许多文献是这样报道的。还可以试试离子交换、凝胶层析、甚至透析和超滤，其中，离子交换层析效果比较好，还可以起到浓缩样品的作用。

首先，冻干的办法应该可以几乎彻底地除去 TFA 和乙腈，药物实验前最好先检测一下冻干品中的残留量，只要不超过允许范围，这种办法是最简单、有效的。

其次，如果你的药物的分装量不大的话(<100ug)，建议你用离子交换层析，最好装一个小一点儿的柱子，让含盐洗脱峰的蛋白浓度达 10mg/ml 以上，稀释后完全符合试验要求。如果用分子筛，考虑稀释，最好也先过一个离子交换。此外可以试试疏水层析。如果产品是碱的话，可能会形成 TFA 盐，这样通过上述方法就无法除去。一般可以用碱水洗，然后将产品萃取出来。或者在里面加入一定量的盐酸，再干燥后形成盐酸盐。

15 问：同一种填料的分析柱、制备柱按线形放大公式套，分离度会不会变化？

答：一般会有一定的变化，原因有以下几点

(1) 制备柱的装填是否均匀，如不均匀则可能产生涡流扩散使各个组分的经过通道的直径不同、阻力不一样，停留时间不同，色谱峰可能变宽。

(2) 如果样品在流动相中溶解度小，在制备色谱上会有不同的峰展宽。

(3) 如果样品在分析柱上有展宽或拖尾的现象，放大到制备柱上后峰的展宽和拖尾经常会非常严重，导致分离失败。

16 问：制备色谱柱如何测柱效？

答：可以选择几种物质，苯，甲苯，萘、蒽等的衍生物上柱，流动相一般用 65-80% 的甲醇/水，测定后根据保留时间计算塔板数。由于制备色谱的管路死体积一般比较大，很难得到和供应商相同的柱效。建议在制备柱开始使用时在自己的色谱上测一下柱效，然后定期检测柱效进行比较。

17 问：反相色谱分离后，如何快速从流动相中得到产品？

答：可以考虑先在低温下，减压旋蒸除去其中的有机溶剂，然后用萃取的方法（如乙醚、氯仿萃取等）把产品萃取出来，然后再低温再旋蒸，这样，就可以不将温度升得很高而得到产品。

如果要直接蒸掉流动相，水泵的真空度要注意（要检查气密性），否则蒸水会很慢。一般比较好的泵在 60-70 度即可蒸掉水，如果泵的真空度不好，可能需要 80-90 度才行，这样容易暴沸导致样品损失。另为，温度太高可能引起物质变性。