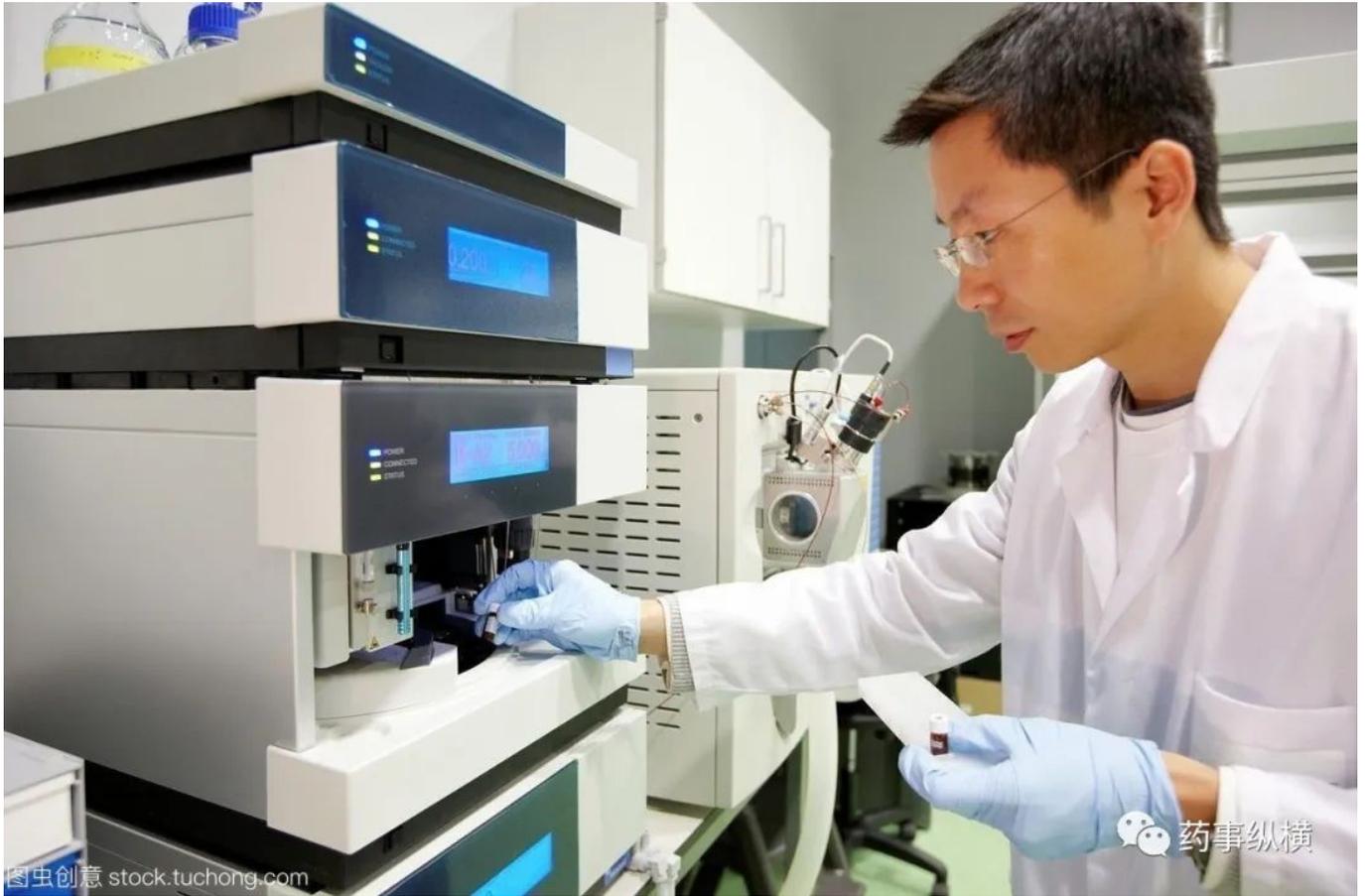


# 分析方法开发：影响关键色谱峰对分离度的三个重要因素

曾文亮 药事纵横 2022-05-25 06:00 发表于北京



## 前言

色谱分离是建立HPLC方法的首要考虑因素，深刻理解实验色谱参数如何影响分离效果，可以很好的帮助我们建立分析方法，运用HPLC技术解决研发过程中遇到的分析问题。

反相色谱方法（RPC）开发的一个重要开始起点，是选择合适的色谱条件，为一个给定的样品提供一个可靠的分离结果。两个色谱峰的分度通常采用它们的保留时间和峰宽计算得到：

$R_s = 2[t_{R(j)} - t_{R(i)}] / (W_i + W_j)$ ， $W_i$ 和 $W_j$ 代表色谱峰i和j的峰宽。

色谱峰保留因子与保留时间的关系： $k = (t_R - t_0) / t_0$

色谱峰宽、理论塔板数、保留因子的关系： $W = 4N^{-0.5} t_0 (1+k)$

由上面公式，可以导出色谱峰间分离度与保留因子、选择因子和理论塔板数之间的简单关系：

$$R_s = (1/4) [k/(1+k)] (\alpha - 1) N^{0.5}$$

(a) 药事纵横

图1：分离度公式

分离度可以划分为三项：a项（第一个峰的保留因子），b项（分离因子）和c项（柱效或塔板数）。从这个公式中可以看出两个色谱峰之间的分离度，与峰保留因子、选择因子和理论塔板数密切相关。

通过改变这三项中的任意一项的值，都可以改善峰之间的分离度，其中提高分离选择性（ $\alpha$ ），是最有力的方法。

图1是等度条件下的分离度公式，下图2是梯度条件的分离度公式。

$$R_s = 1/4 [k/(1+k)] [(\alpha - 1) \sqrt{N}]$$

图2：分离度公式（梯度）

当需要分离多个色谱峰时，对于分离程度最差的一对色谱峰来说，分离度的要求是 $R \geq 2.0$ 。这一对色谱峰通常被称为关键色谱峰对。它们的分离度是方法优化关注的焦点。

方法建立和开发时，第一步关键是选择一根柱效足够、选择性较好的色谱柱，**色谱柱固定相是影响选择性最大的因素**；依次是改变溶剂的强度，使色谱峰保留因子k值落在合适的区域范围，优化选择性 $\alpha$ ，最后是调整柱子的柱效塔板数，得到最优的分离度和分析时间。

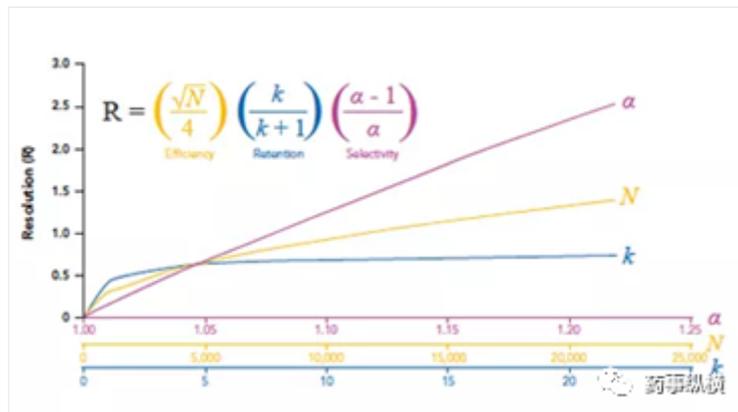


图3：色谱参数对分离度的影响

## 1. 保留因子k的优化

样品的保留因子k可以通过样品的保留时间和方法的死时间计算得到， $k = (t_R - t_0) / t_0$

死时间 $t_0$ 可以通过色谱柱柱长近似计算， $t_0 = 0.01L$ ，L为色谱柱长度（单位mm）。当选定色谱柱后， $t_0$ 是一个常数，因此k值的大小可以通过改变有机相的组成（B%）来控制。**通常k值控制在 $1 \leq k \leq 10$ 范围比较合适**，如图3。

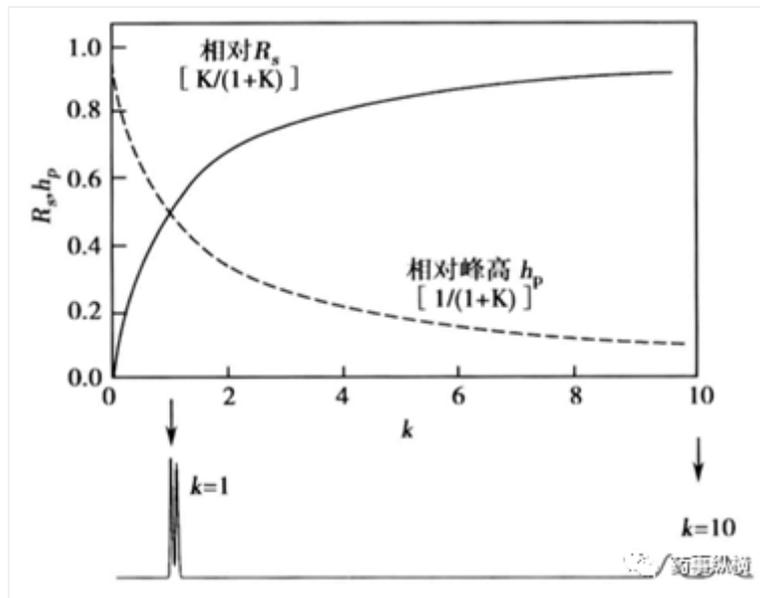


图3 相对分离度与k值的关系

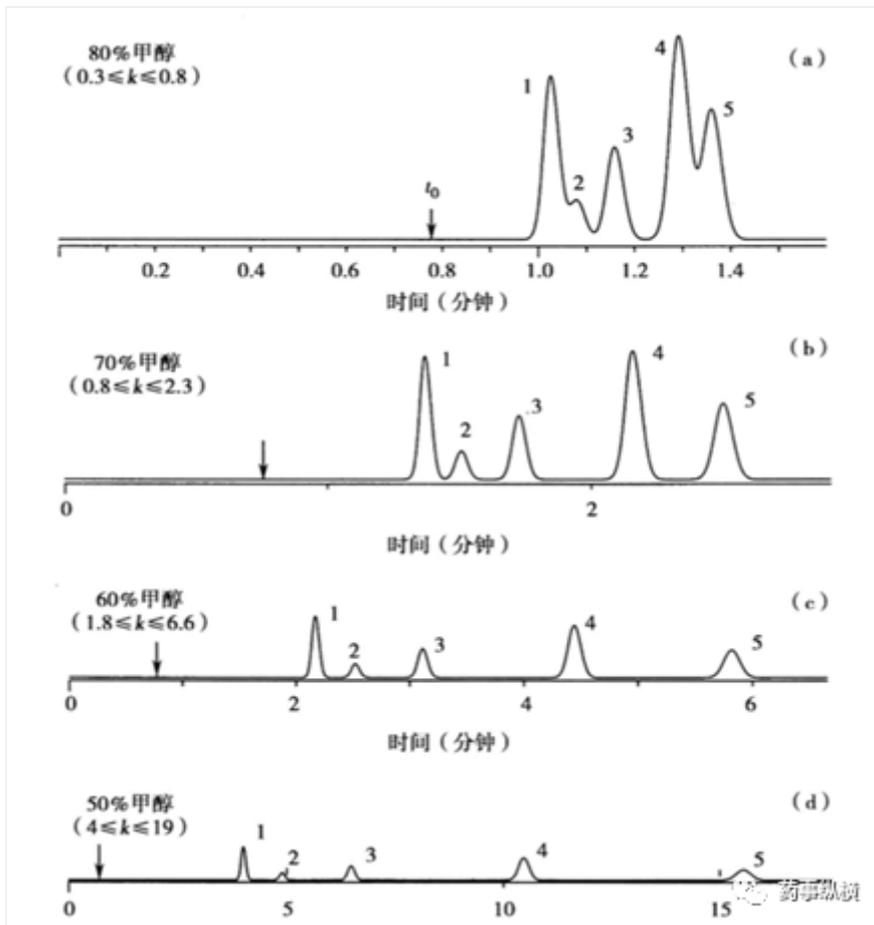
$k=10$ 时，当其它影响因素不变时， $k$ 值的增加几乎不再改善分离度，只会延长样品的保留时间。当分析方法用于制剂分析时， $k \geq 2$ 时，目标峰可以很好的与一些没有保留的辅料干扰峰分离。

RPC 的保留会随着有机相比例%B的改变而变化，表达为： $\log k = \log k_w - S \Phi$

$\Phi$ 是B溶剂的体积（为0.01\*B）， $k_w$ 是当 $\Phi$ 为0时的保留因子， $S$ 为常数，对于分子量100-500Da的化合物来讲， $S \approx 4$ 。因此 $\Phi$ 每增加0.1个单位（+10%B）， $k$ 值相应的减少到原来的1/10，或下降2.5倍。反之， $\Phi$ 每减少0.1个单位（-10%B）， $k$ 值相应的增加2.5倍。

如例1：80%的流动相B作为初始条件， $0.3 \leq k \leq 0.8$ 。当流动相B为70%时，峰1的 $k = 2.5 * 0.3 \approx 0.8$ ，最后一个峰为 $0.8 * 2.5 = 2$ ；依次降低有机相B的比例，找到合适的 $k$ 值，如c， $1.8 \leq k \leq 6.6$ 。

上述计算中的“2.5倍法测”只是一个粗略的方法，能够给出一个近似值参考。



例1：分离效果和k随流动相中%B的变化而变化

## 2. 选择性 $\alpha$ 的优化

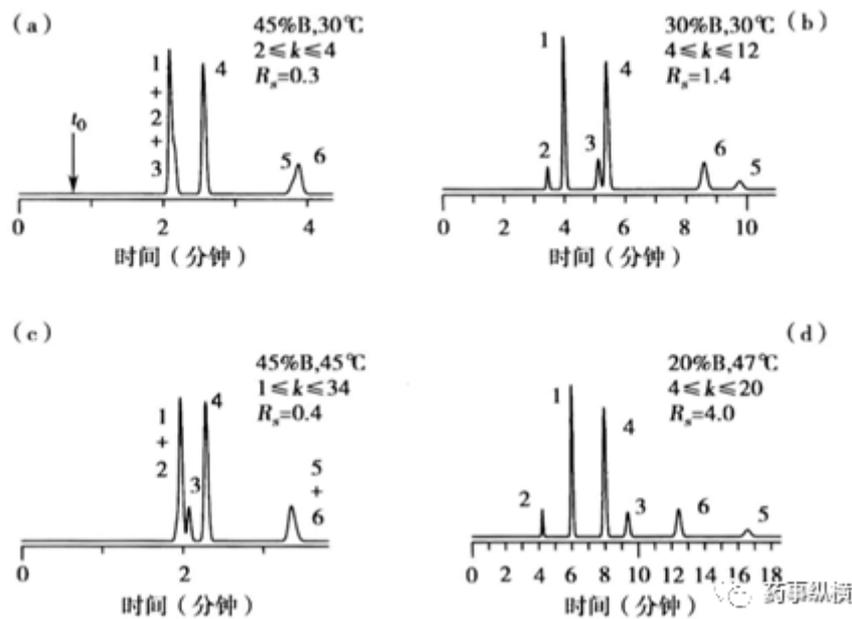
选择性与保留因子间的关系如： $\alpha = k_2/k_1$ ，色谱峰的选择性可以通过调节它的相对保留来改变。色谱条件有机相B%比例、B溶剂类别、柱温、柱子类型、流动相pH值、缓冲液离子浓度、离子对试剂浓度等对色谱的相对保留有影响。

表1：不同分离条件对保留因子、选择性和塔板数的影响。

条件	$k$	$\alpha$	$N$
%B	++	+	-
B 溶剂(乙腈、甲醇等)	+	++	-
温度	+	+	+
色谱柱的类型( $C_{18}$ 、 苯基、氨基等)	+	++	-
流动相的 pH <sup>a</sup>	++	++	+
缓冲液浓度 <sup>a</sup>	+	+	-
离子对试剂的浓度 <sup>a</sup>	++	++	+
色谱柱的长度	0	0	++
颗粒大小	0	0	++
流速	0	0	+
压力	-	-	+ <sup>b</sup>

注: ++, 主要影响; +, 次要影响; -, 相对影响很小; 0, 没有影响; 加粗的量主要(和推荐)用于分别控制  $k$ 、 $\alpha$  和  $N$ (比如改变 %B 可以控制  $k$  或  $\alpha$ , 改变色谱柱长度可以控制  $N$ )。

如例2：B%的改变可以使得 $k$ 值落在合适的范围内，但需要进一步优化条件。因此通过调整B%比例和柱温，使得六个色谱峰都达到了分离的要求，如d。这个例子是改变选择性的一个简单且典型的示例，通过两因素两水平的改变，设计四个实验，可以达到优化方法的最终要求。



例2：同时改变B%比例及柱温来优化分离度

目前市场上有一些方法开发的软件，如Drylab, ACD lab，可以进行方法开发的实验设计，两个或三个因素，两个或三个水平的变化，得到的分析数据通过专业软件，建立分离度与因素和水平之间的模型，预测分离度在哪个范围条件下可以达到最优的结果。

### 3. 色谱柱柱效优化

根据上图1分离度公式，色谱柱塔板数的提高可以改善色谱峰间的分离度。通过改变色谱柱的长度、粒径和流速，可以改善塔板数N。

理论塔板数公式： $N=16(t_R/W)^2$ ， $N=(1/H)L$ 。

一般情况柱子塔板数的提高，意味着保留时间的延长。延长色谱柱、减小粒径和降低流速都可以增加理论塔板数。延长色谱柱和减小粒径的条件改变，会提高系统的压力，这个需要分析工作者注意。

在以前的很长一段时间，由于色谱柱填料是 $5\mu\text{m}$ ，分析实验室喜欢使用长度为250mm的色谱柱，来提高柱效和分离。随着色谱柱和分析技术的提高，实验室很少有通过延长色谱柱来提高分离效果，现在是通过使用较小粒径（ $2.7\mu\text{m}$ 、 $3.0\mu\text{m}$ 、 $3.5\mu\text{m}$ ）色谱柱，优化保留因子和选择性来获取较短实验时间及满意的分离。

#### 4.小结

分析方法的开发包括分析目标的选择和样品组成，样品的处理，色谱模式的选择，检测器的选择，分离条件的选择，以及潜在问题的评估和解决。

分离度的提高可以通过优化保留因子、选择性和柱效三个因素，其中选择性的改变是最重要的因素，影响选择性的第一要素是色谱柱固定相。优化有机相B%的比例和柱温两个影响因素，一般不复杂的规则样品可以找到满足目标的分离条件。对于复杂不规则样品，需要通过更多的因素和水平的优化，评估样品的疏水性（LogP,LogD）和pKa,选择合适的流动相pH值，通过实验设计和统计学知识，评估多因素和多水平的参数，建立模型，最终选择最优的分析条件，达到分析的目标。

#### 参考文献：

1. 现代液相色谱技术导论，陈小明等
2. HPLC方法开发的top3 Tips，爱色谱

END

药事纵横投稿须知：稿费已上调，欢迎投稿



**推广合作/整合营销联系：**

张经理15057280775（微信同号）

周经理15858667450（微信同号）

药事纵横

技术分享，信息传递



药融圈

全球前沿即时医药资讯  
医药大数据平台



喜欢此内容的人还喜欢

张连山博士：恒瑞近20年的创新之路

药事纵横