手性分析条件的建立和优化

手性分析中的注意事项

大赛璐（中国）手性事业部

奚文伟

ダイセル化学工業株式会社

内容提纲

1. 手性HPLC分析条件的建立和优化
   - 1-1 正相色谱
   - 2-2 反相色谱
2. 手性色谱柱的自动筛选
3. 手性分析中的注意事项

ダイセル化学工業株式会社

Daicel手性色谱柱一览表

正相

●直链淀粉衍生物

CHIRALPAK® **AD / AD-H**

CHIRALPAK® **AS / AS-H**

●纤维素衍生物

CHIRALCEL® **OD / OD-H**

CHIRALCEL® **OJ / OJ -H**

CHIRALCEL® OA, OB, OC

CHIRALCEL® OF, OG, OK

CHIRALCEL® CA-1

反相

CHIRALPAK® AD -RH

CHIRALPAK® AS -RH

CHIRALCEL® OD-RH

CHIRALCEL® OJ -RH

共价键合型－新产品

CHIRALPAK® IA

CHIRALPAK® IB

其它

CROWNPAK® **CR (＋), (－)**

CHIRALPAK® OT(＋), OP (＋)

CHIRALPAK® WH, MA (＋)

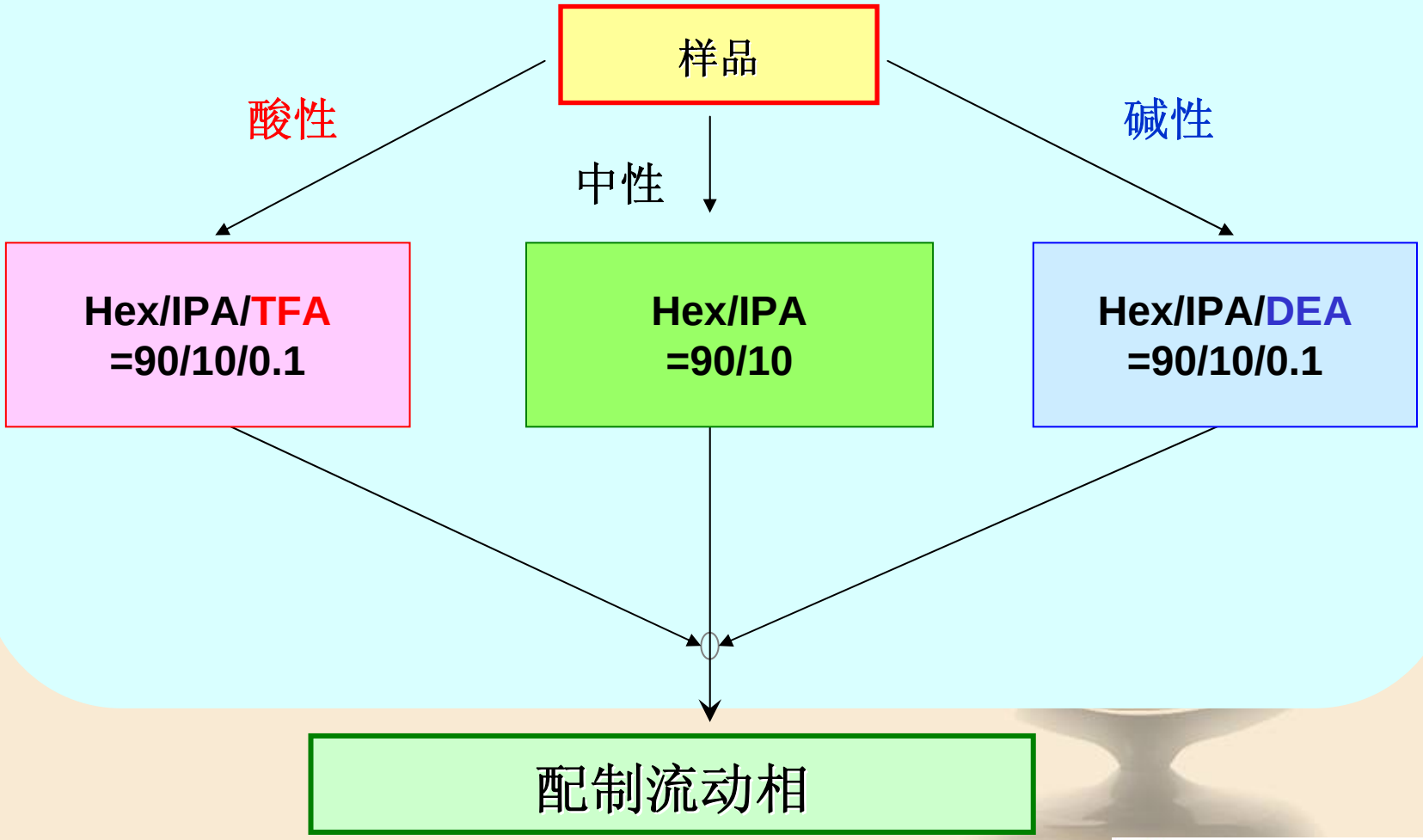
CHIRALPAK ® QD-AX

CHIRALPAK ® QN-AX

ダイセル化学工業株式会社

分析条件优化流程图 (1)

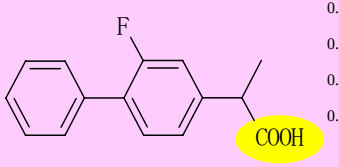
1. 流动相中添加物的必要性

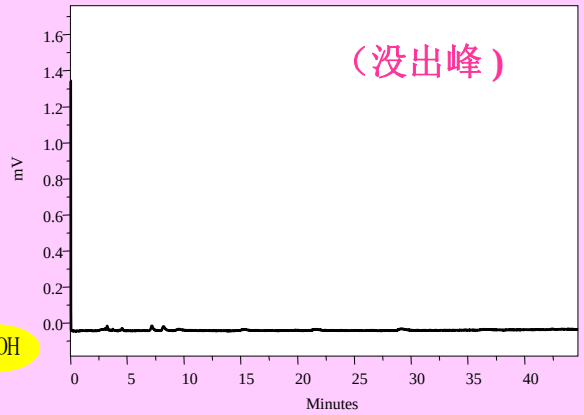


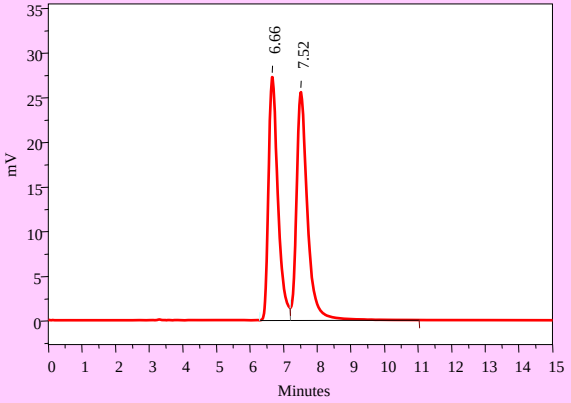
ダイセル化学工業株式会社

添加物在分离中的作用

酸性样品



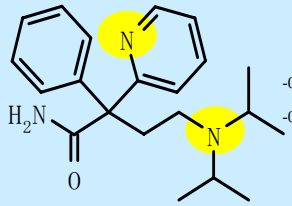


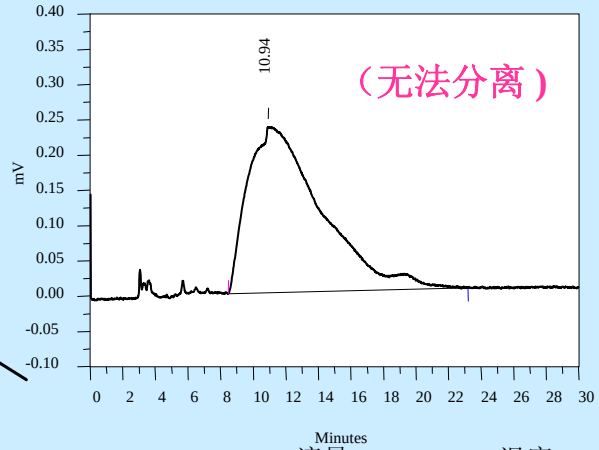


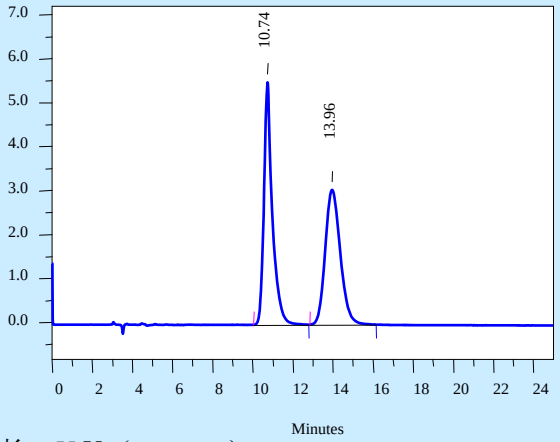
流量：1.0mi/min.温度：40℃、检测波长：ＵＶ（254ｎｍ）

流动相　Hex/IPA=90/10　　Hex/IPA/**AcOH**=90/10/**0.1**

碱性样品







流量：1.0mi/min. 温度：25℃、检测波长：ＵＶ（254ｎｍ）

流动相　Hex/IPA=90/10　　Hex/IPA/**DEA**=90/10/**0.1**

ダイセル化学工業株式会社

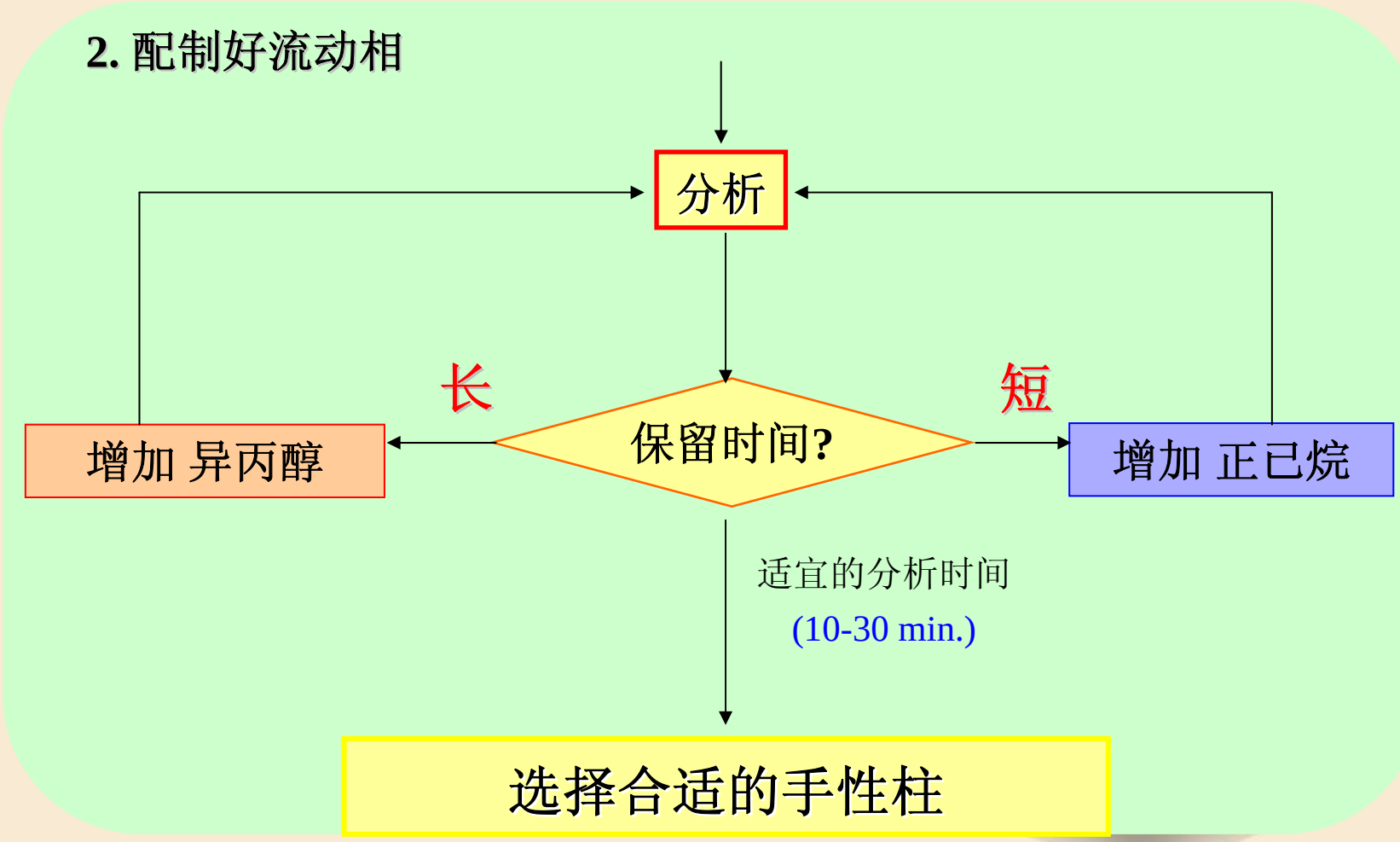
添加物的种类和用量

样品酸碱性	添加物种类	添加量
中性	不需要	
碱性	乙二胺 (DEA) (n-丁胺*1) (乙醇胺*2)	≦0.5% 通常0.1%
酸性	三氟乙酸 (TFA) 醋酸	≦0.5% 通常0.1%

*1 主要用于1级胺
*2 主要用于1级氨基醇

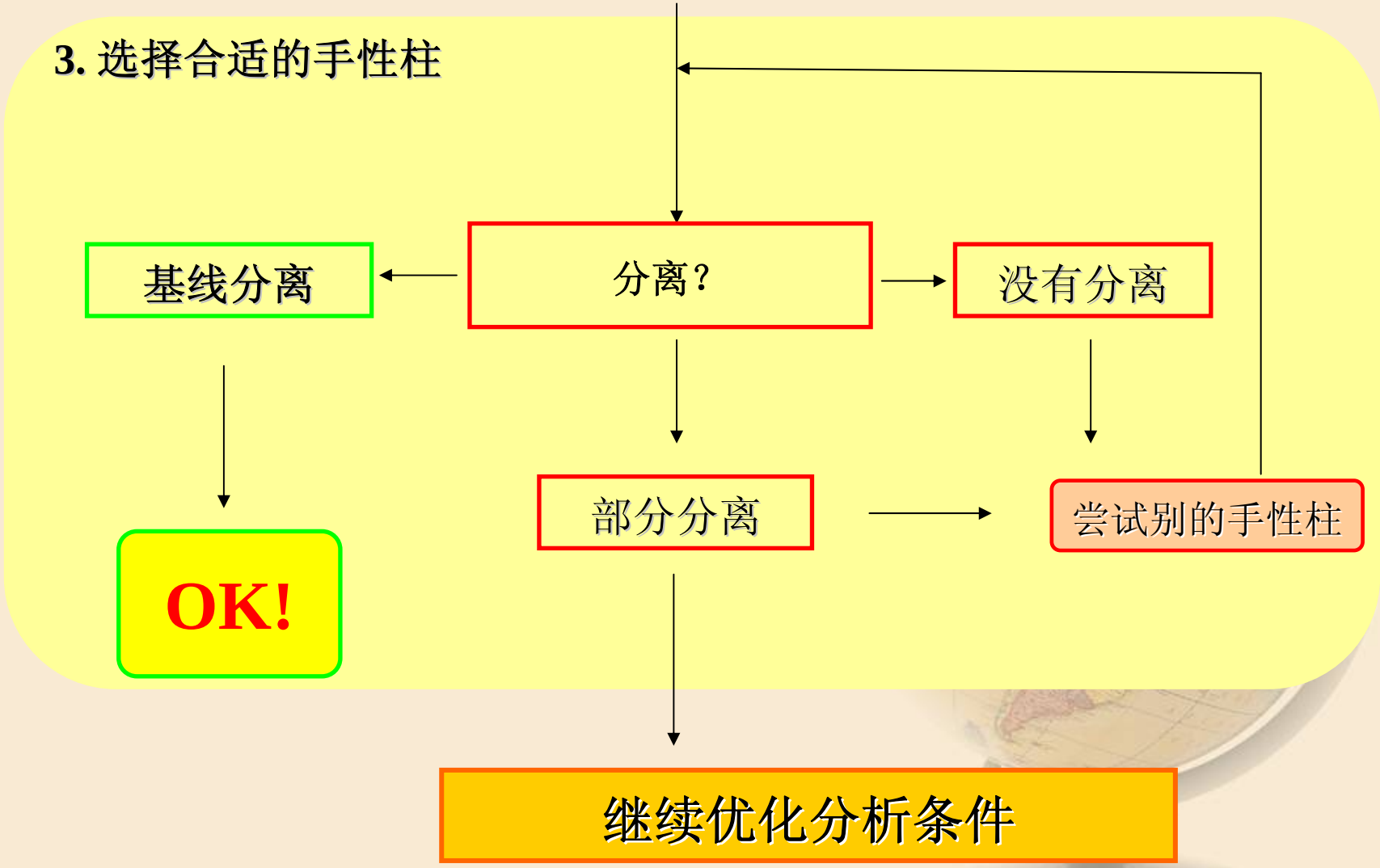
ダイセル化学工業株式会社

分析条件优化流程图 (2)



ダイセル化学工業株式会社

分析条件优化流程图 （3）

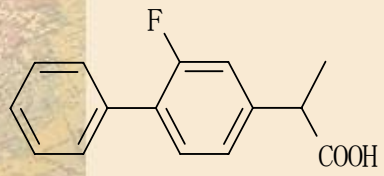


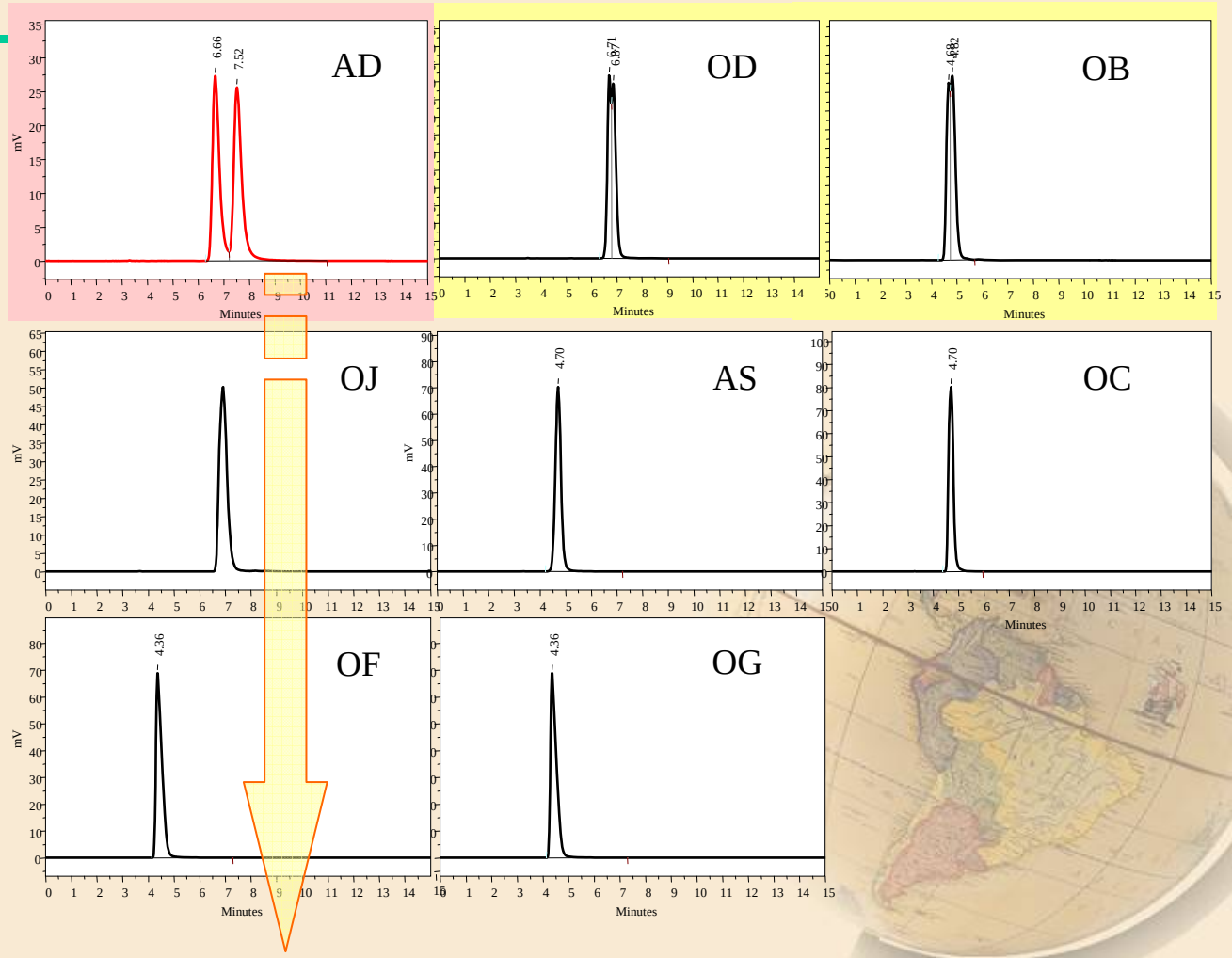
ダイセル化学工業株式会社

筛选结果

色谱条件

流动相：
Hex./IPA/ AcOH =
90/10/0.1
流量 ： 1.0ml/min.
温度 ： 40℃
检测波长： UV254nm
样品 ：

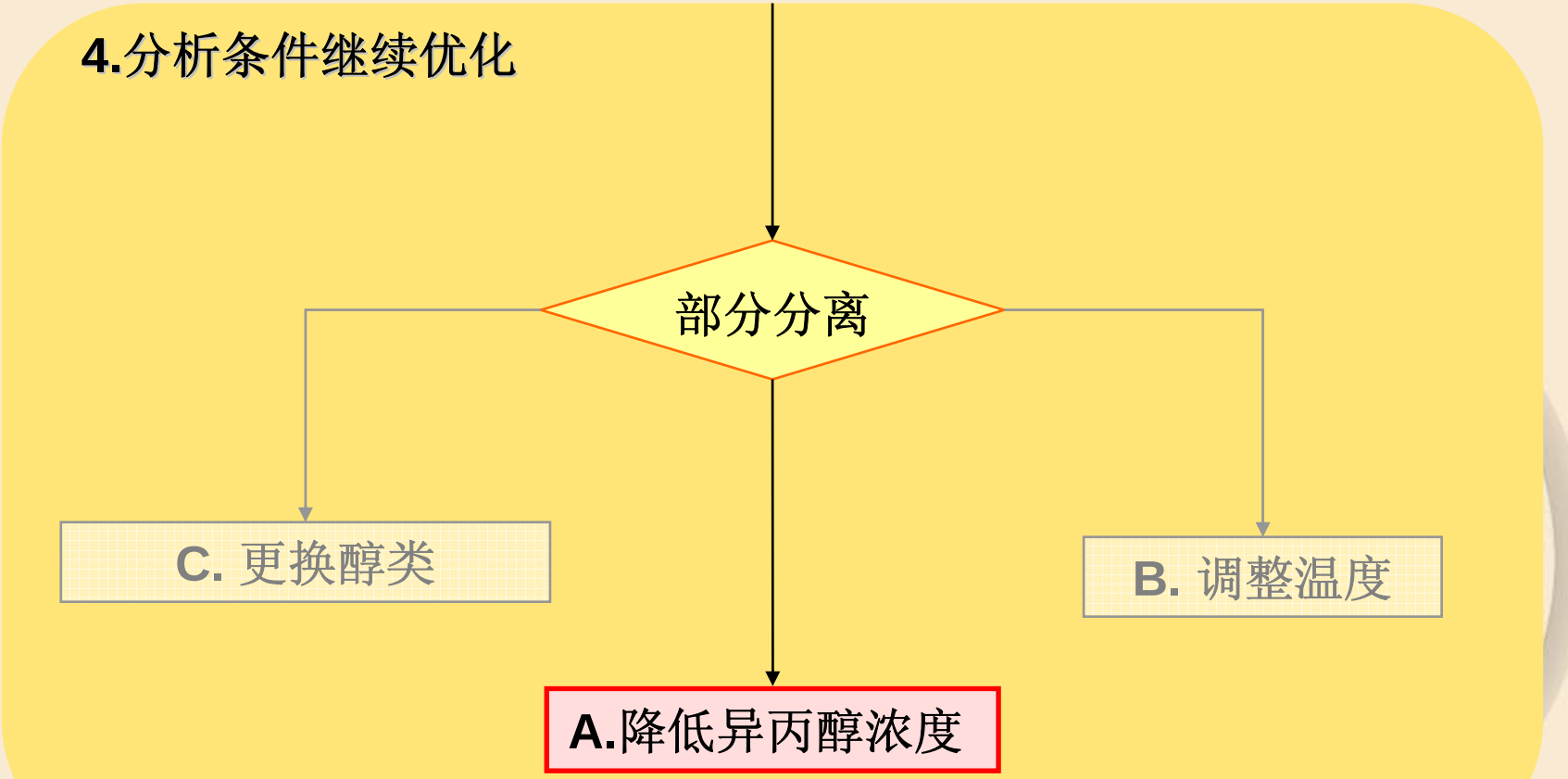




先择效果最好的手性柱, 然后继续优化分析条件

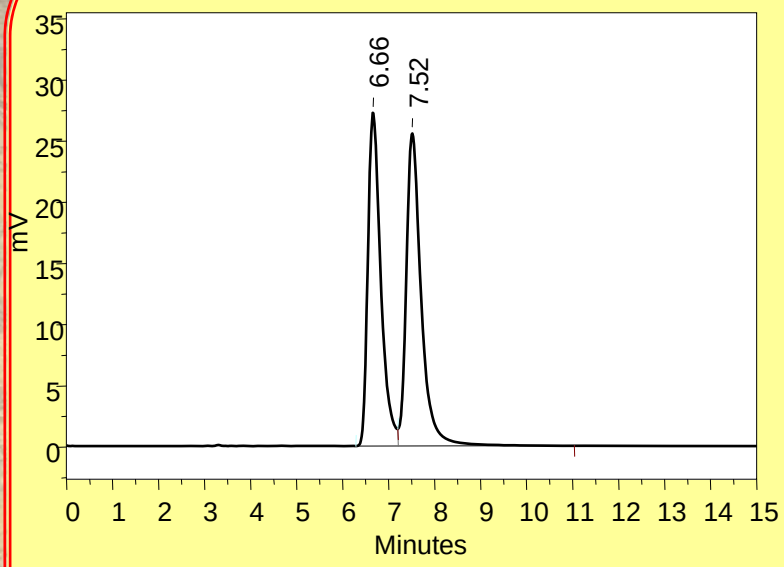
ダイセル化学工業株式会社

分析条件优化流程图 （4-A）



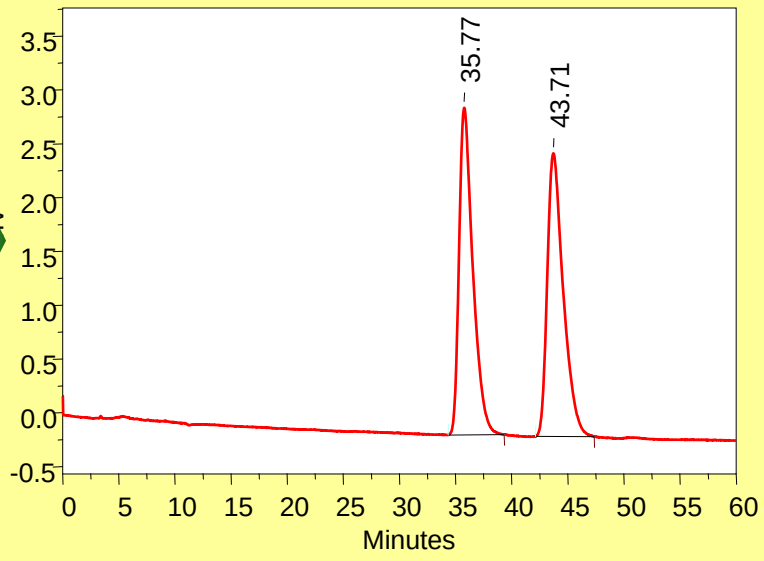
ダイセル化学工業株式会社

醇浓度的影响



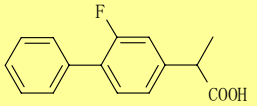
Hex./IPA/ AcOH =**90/10**/0.1

Column：AD, Temp.：40℃, Flow rate：1.0ml/min.



Hex./IPA/ AcOH =**100/1**/0.1

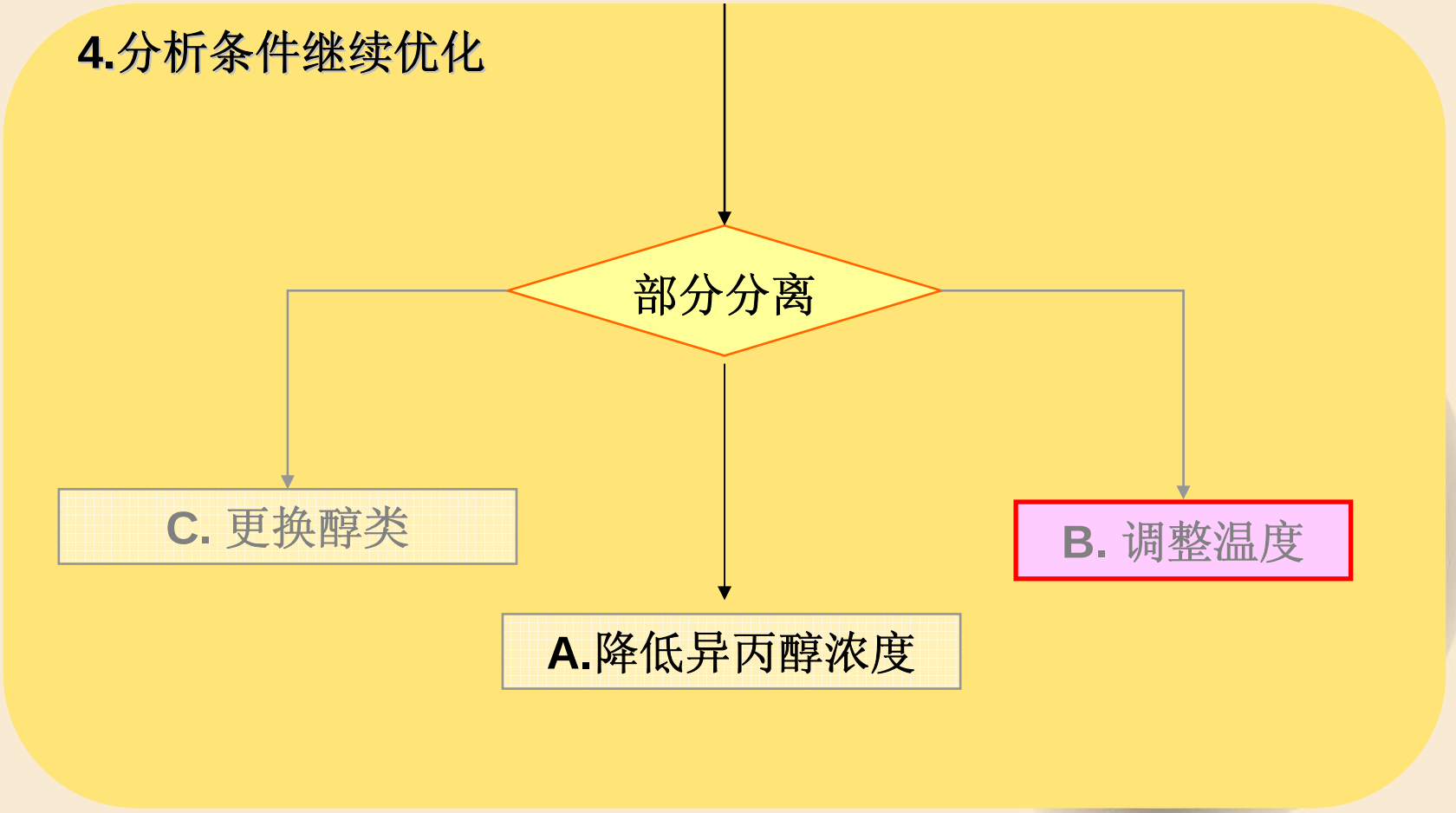
Sample：Flurbiprofen



在多数情况下，降低醇的浓度可延长保持时间，改善分离度

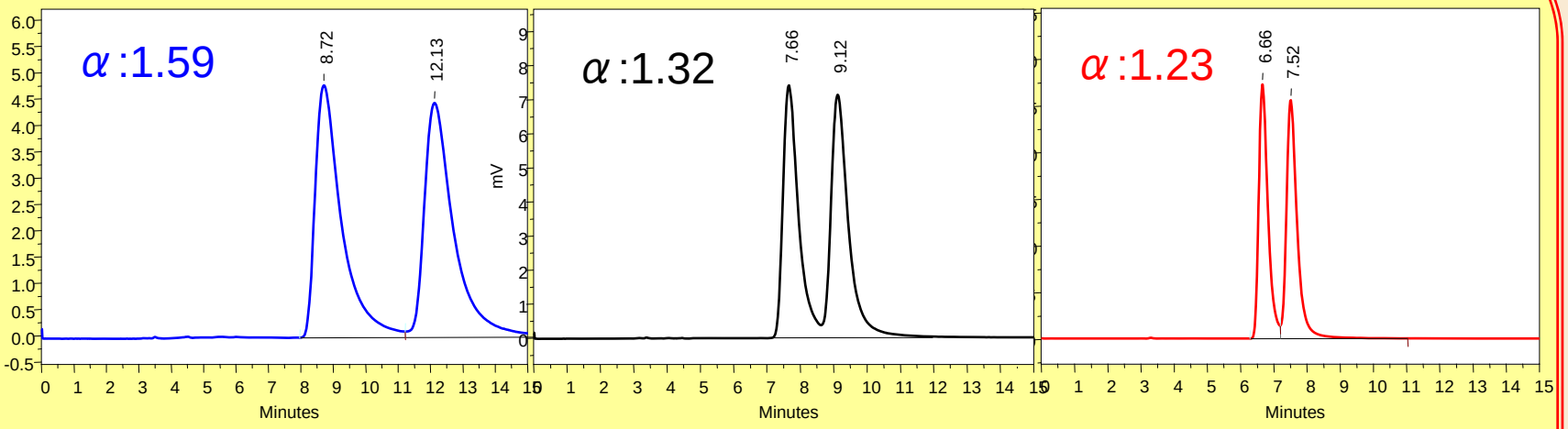
ダイセル化学工業株式会社

分析条件优化流程图 （4-B）



ダイセル化学工業株式会社

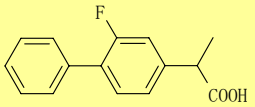
温度的影响



Temp.： **5℃** ⟵ **25℃** ⟶ **40℃**

Column：CHIRALPAK AD

Mobile phase： Hex./IPA/ AcOH =90/10/0.1, Flow rate：1.0ml/min.

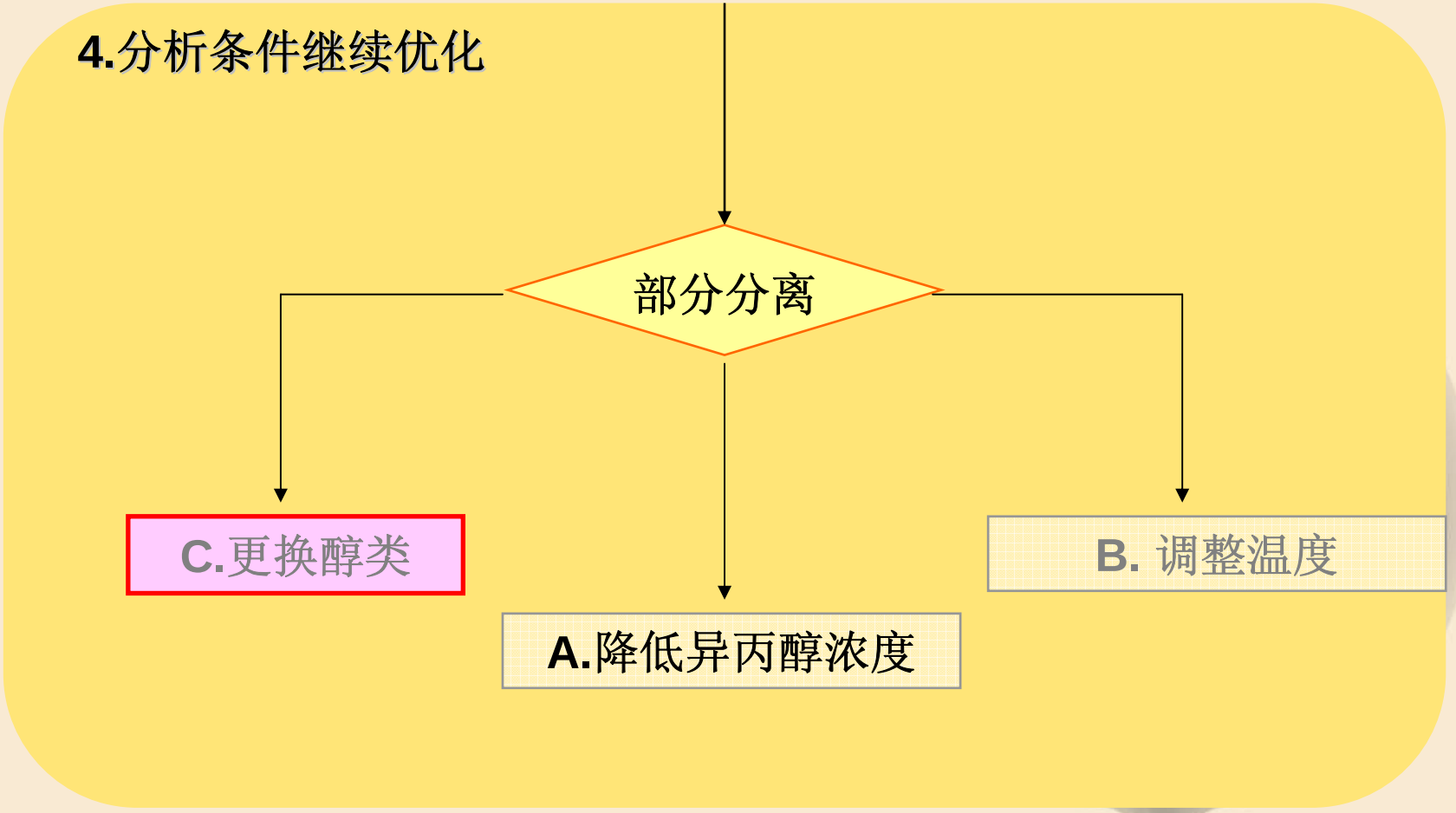


降低柱温会使峰形变宽，但可增大α值

升高柱温会使峰形锋利，但α值却变小

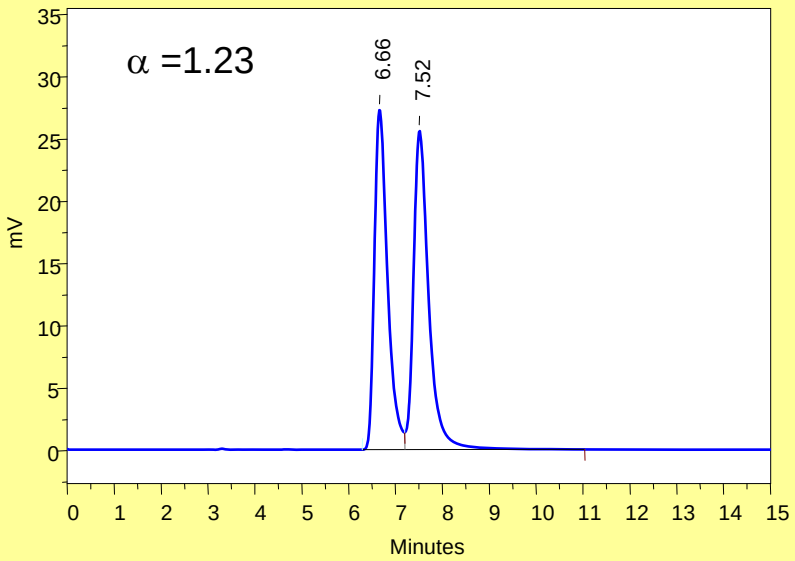
ダイセル化学工業株式会社

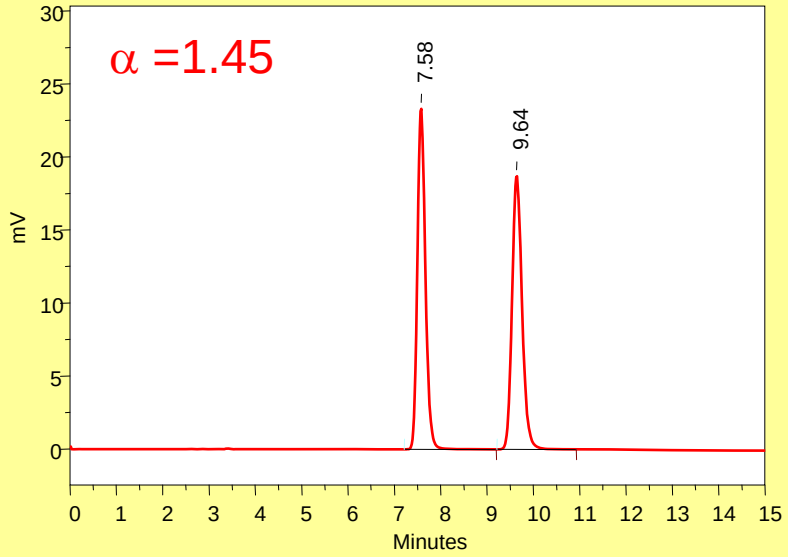
分析条件优化流程图 （4-C）



ダイセル化学工業株式会社

醇种类的影响



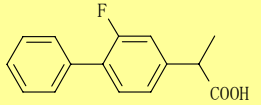


Hex./IPA/AcOH=90/10/0.1

Column：CHIRALPAK AD
Temp.：40℃, Flow rate：1.0ml/min.

Hex./EtOH/AcOH=95/5/0.1

Sample：Flurbiprofen



IPA和EtOH有时会使峰形和α值发生明显变化

ダイセル化学工業株式会社

正相柱分析条件优化的总结

1. 根据样品性质判断是否需要往流动相中加添加物
2. 调整正己烷/醇的比例，从而选择适当的保留时间
3. 其它优化方法
   - a. 流动相的醇浓度
     - 降低醇的浓度虽改善分离度，但会延长分析时间
   - b. 色谱柱温度
     - 升高柱温虽可使峰形锋利，但 α 值会降低
   - c. 流动相中醇的种类
     - 改换醇的种类(IPA⇔EtOH)，有时可使分离发生一些变化

ダイセル化学工業株式会社

内容提纲

1. 手性色谱柱分析条件的建立和优化

   2-1 正相色谱

   2-2 反相色谱

2. 手性色谱柱的自动筛选

3. 手性分析中的有关注意事项

ダイセル化学工業株式会社

RH系列（反相用）的规格

	流动相	耐压 (MPa)	温度范围 (℃)	pH范围
OD-RH	水溶液/有机溶剂*1 =90/10~0/100	10	5～40	2～7
OJ-RH				
AS-RH			5～40*2	2～9*2,3
AD-RH				

***1** 有机溶液:醇（甲醇，乙醇，异丙醇）或乙腈
***2 pH＞7**使用时，温度在**5～25℃**
***3 pH**超过**8**时，使用硼酸缓冲液

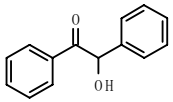
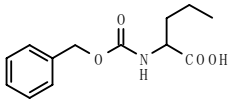
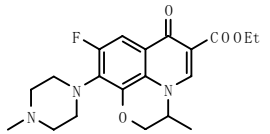
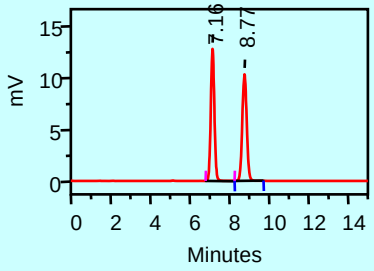
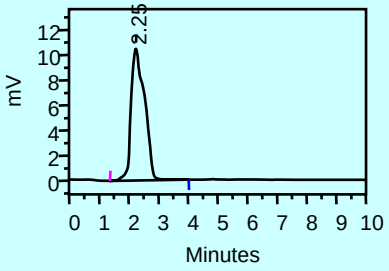
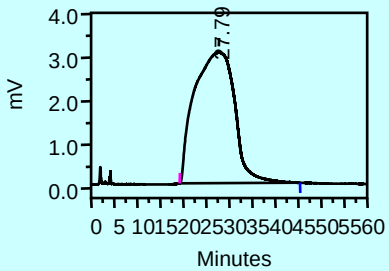
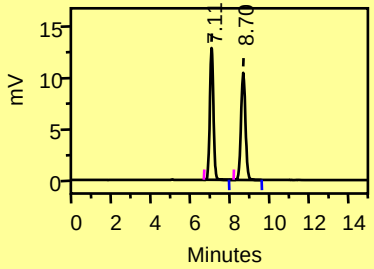
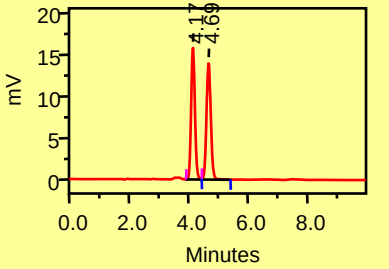
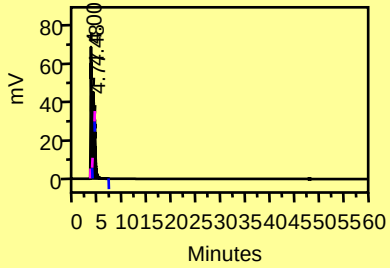
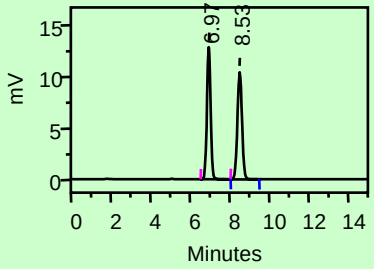
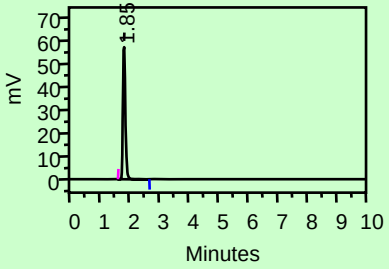
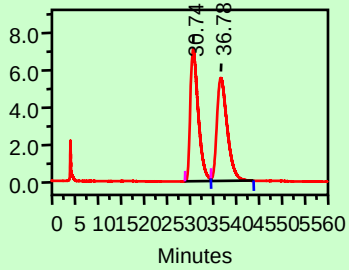
ダイセル化学工業株式会社

根据样品性质选择流动相

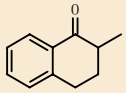
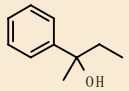
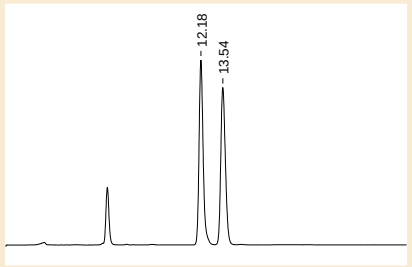
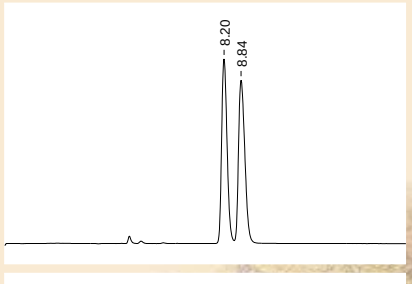
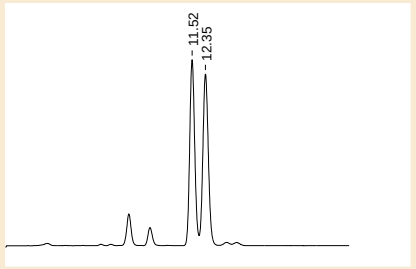
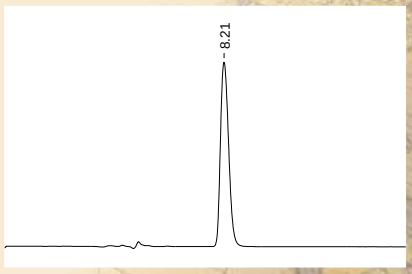
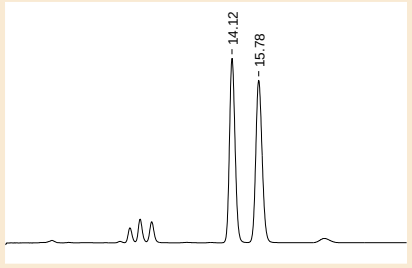
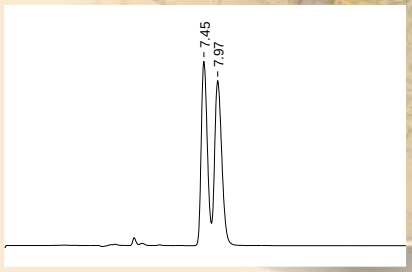
样品性质	OD-RH、OJ-RH	AD-RH、AS-RH
中性	水/乙腈	
酸性	磷酸水溶液(pH2)/乙腈 0.1M 磷酸缓冲液(pH2)/乙腈	
碱性	0.1M KPF_6 水溶液/乙腈 0.1M $NaPF_6$水溶液/乙腈	20mM 硼酸缓冲液(pH9)/乙腈 20mM 磷酸缓冲液(pH8)/乙腈

ダイセル化学工業株式会社

反相流动相的pH值对分离度的影响(AS-RH)

	中性化合物	酸性化合物	碱性化合物
	Benzoin	**N-CBZ-Norvaline**	**Ofloxacin ethyl ester**
			
水溶液	水溶液/CH_3CN=60/40 流速:1.0ml/min.	水溶液/CH_3CN=60/40 流速:1.0ml/min.	水溶液/CH_3CN=80/20 流速:0.5ml/min.
水			
磷酸水溶液 (pH2)			
硼酸缓冲液 (pH9)			

有机溶剂种类对分离的影响

	2-Methyl-1-tetralone	2-Phenyl-2-butanol
		
水/乙腈 =50/50		
水/乙醇 =35/65		
水/甲醇 =25/75		

手性柱：CHIRALPAK AD-RH 、流速：0.5ml/min、温度：25℃

ダイセル化学工業株式会社

反相柱分析条件优化的总结

1. 根据样品性质选择流动相

※中性，酸性样品对4种反相柱可使用相同的流动相。但是，碱性样品对OD-RH、OJ-RH组和AD-RH、AS-RH使用的流动相是不同的。

2. 探索适当的保留时间和流动相组成

3. 其它优化条件

a. 水溶液和有机溶液比例

- 多数情况下降低有机溶液的浓度可改善分离性能，但将延长分析时间。

b. 色谱柱温度

- 升高色谱柱温度会使峰形变得锋利，但会降低 α 值。

c. 有机溶剂的种类

- 有机溶剂的种类不同，其洗脱强度也不同。有时其分离效果也发生一些变化

ダイセル化学工業株式会社

内容提纲

1. 手性色谱柱分析条件的建立和优化
   - 2-1 正相色谱
   - 2-2 反相色谱

2. 手性色谱柱的自动筛选

3. 手性分析中的注意事项

ダイセル化学工業株式会社

手性色谱柱组合筛选

手性色谱柱组合

CHIRALPAK ® AD-H

CHIRALPAK ® AS-H

CHIRALCEL ® OD-H

CHIRALCEL ® OJ -H

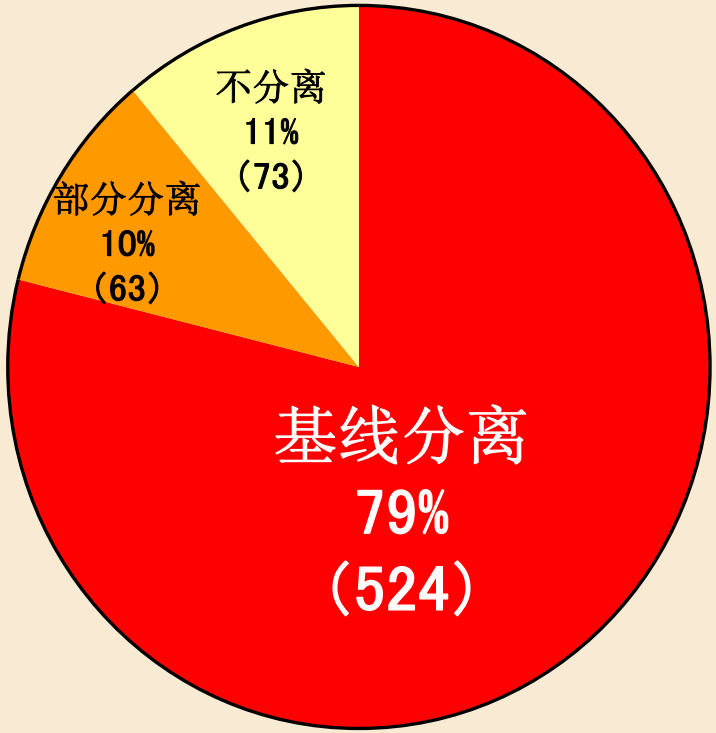
手性色谱柱尺寸:

0.46cmI.D.×15cmL

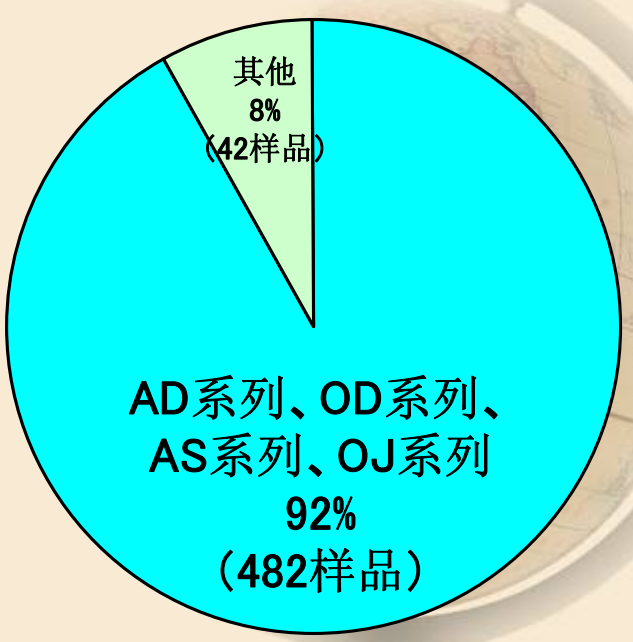
ダイセル化学工業株式会社

为何选用AD-H,AS-H,OD-H,OJ-H这4种柱子？

2000～2004年 客户样品分析 660个样品的分析结果

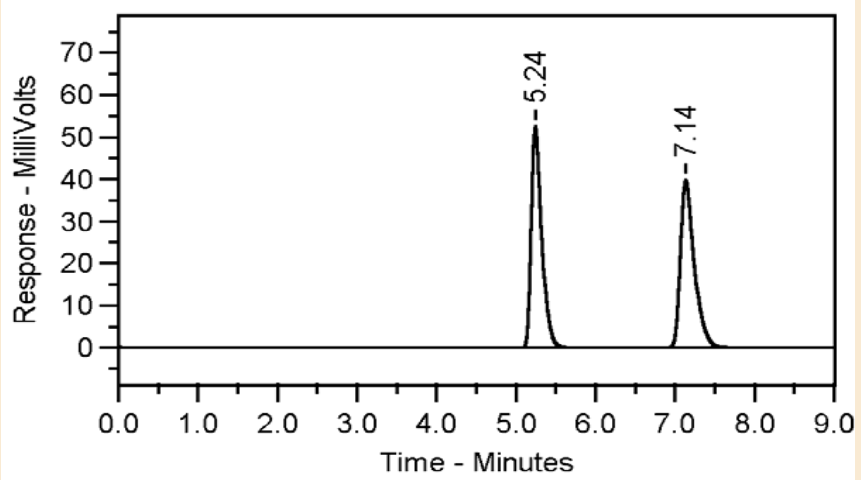


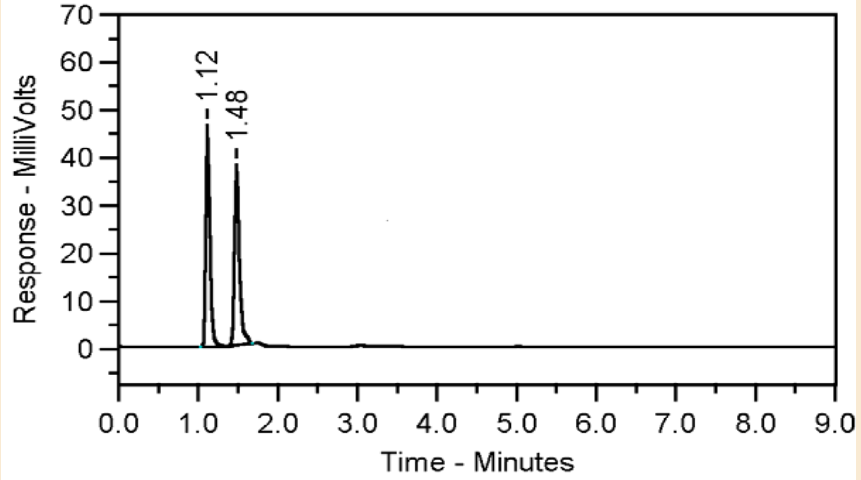
达到基线分离的手性柱比例：



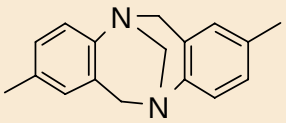
ダイセル化学工業株式会社

为何选用15cm长度手性色谱柱呢？





手性柱　：AD-H(25cmL)
流动相　：Hex/IPA=9/1
流速　　：1.0mL/min.
温度　　：25℃
UV波长　：254nm



标准条件

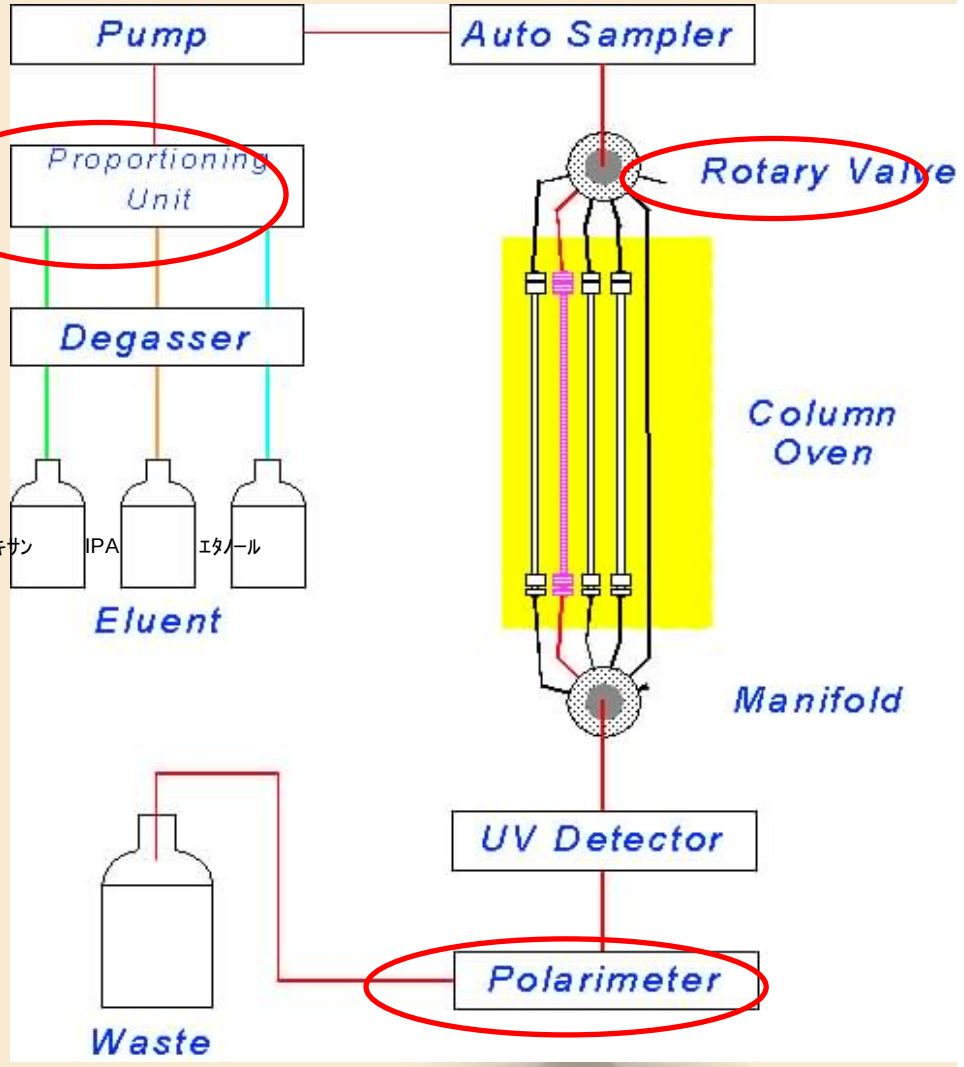
手性柱　：AD-H(15cmL)
流动相　：Hex/IPA=9/1
流速　　：3.0mL/min.
温度　　：25℃
UV波长　：254nm

筛选条件

柱长（15／25）×流速（1／3）＝分析时间短缩为（1／5）

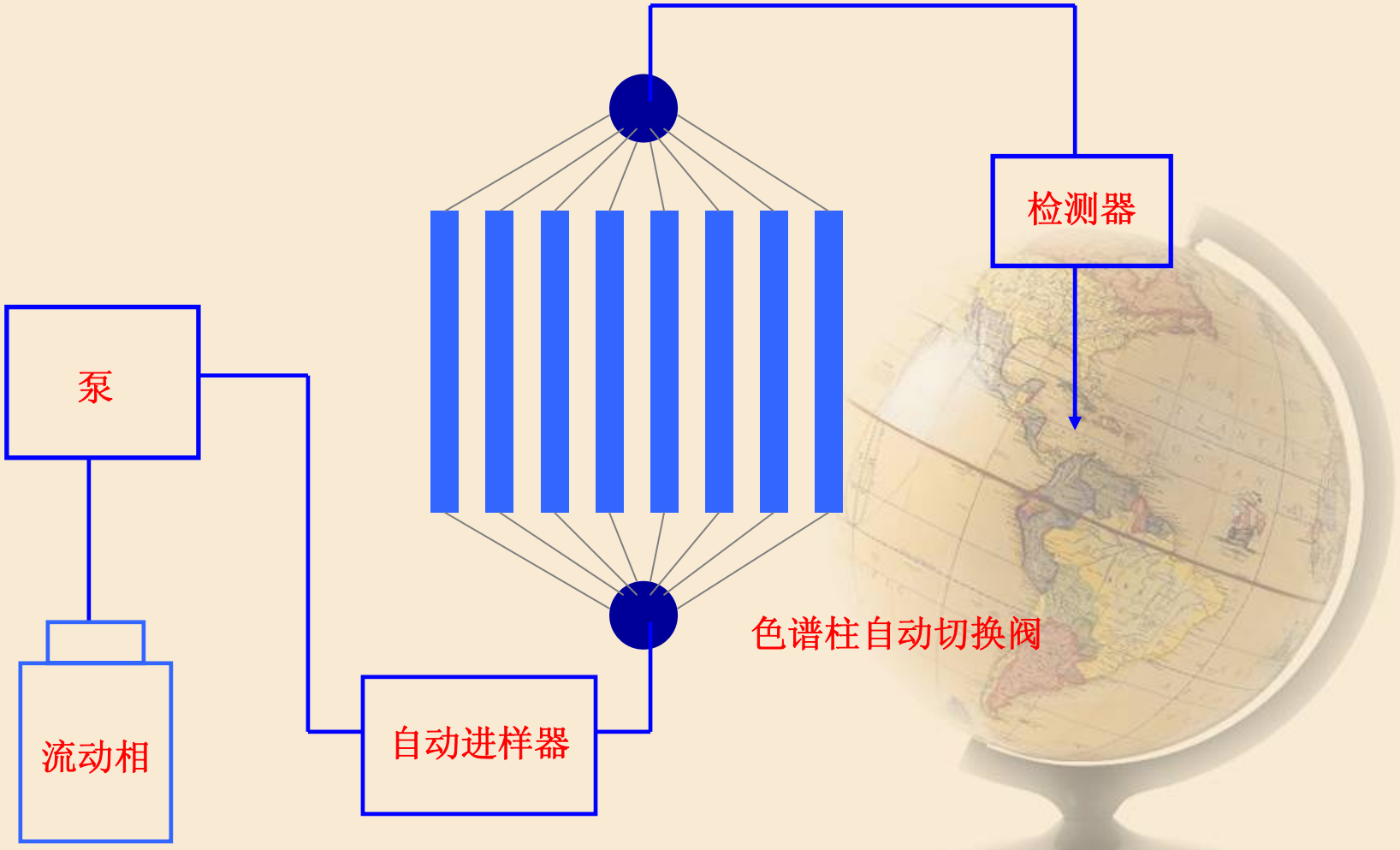
ダイセル化学工業株式会社

组合筛选设备



ダイセル化学工業株式会社

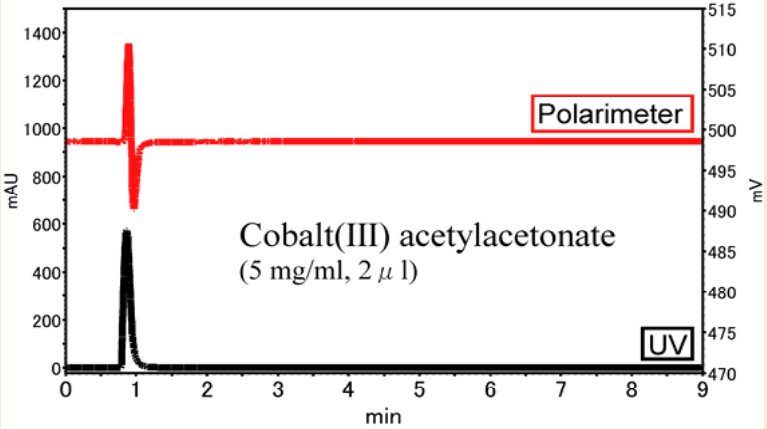
组合筛选设备示意图



ダイセル化学工業株式会社

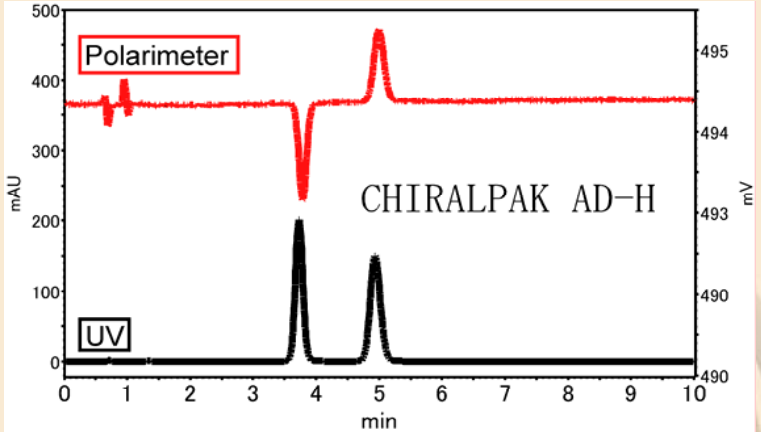
串联旋光检测器的好处

1. 用UV检测器只出现“１峰”的时候
→应用旋光检测器可确认其分离状况



Column: CHIRALCEL OJ-H
Eluent: hexane/2-propanol=9/1, Flow rate: 3 ml/min
Temp.: 25 ℃, Detection: UV 254 nm + Polarimeter

2. 可确认其洗脱顺序



Sample: Benzoin (5 mg/ml), Inj.: 2 μ l
Eluent: hexane/2-propanol=9/1, Flow rate: 3 ml/min
Temp.: 25 ℃, Detection: UV 254 nm + Polarimeter

ダイセル化学工業株式会社

组合筛选设备的程序编制

色谱柱	流动相	指令	流速	时间
AD-H	Hex/IPA=9/1	平衡	3.0mL/min.	3分
		分析		9分
OD-H		平衡		3分
		分析		9分
AS-H		平衡		3分
		分析		9分
OJ-H		平衡		3分
		分析		9分
バイパス	Hex/IPA=6/4	流动相变更	3.0mL/min.	3分
AD-H		平衡	2.0mL/min.	4.5分
		分析		14分
OD-H		平衡		4.5分
		分析		14分
AS-H		平衡		4.5分
		分析		14分
OJ-H		平衡		4.5分
		分析		14分
バイパス	Hex/EtOH=8/2	流动相变更	3.0mL/min.	3分
AD-H		平衡	2.0mL/min.	1分
		平衡	2.5mL/min.	4分
		分析		11分
OD-H		平衡	2.0mL/min.	1分

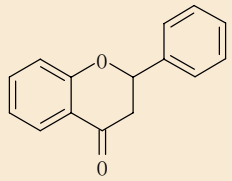
OD-H	Hex/EtOH=8/2	平衡	2.5mL/min.	4分
		分析		11分
AS-H		平衡	2.0mL/min.	1分
		平衡	2.5mL/min.	4分
		分析		11分
OJ-H		平衡	2.0mL/min.	1分
		平衡	2.5mL/min.	4分
		分析		11分
バイパス	EtOH	流动相变更	3.0mL/min.	3分
AD-H		平衡	0.85mL/min.	10分
		分析		18分
OD-H		平衡		10分
		分析		18分
AS-H		平衡		10分
		分析		18分
OJ-H		平衡		10分
		分析		18分
バイパス	Hex/IPA=9/1	流动相变更	3.0mL/min.	3分
AD-H		平衡	0.85→3mL/min.	
OD-H				
AS-H				
OJ-H				

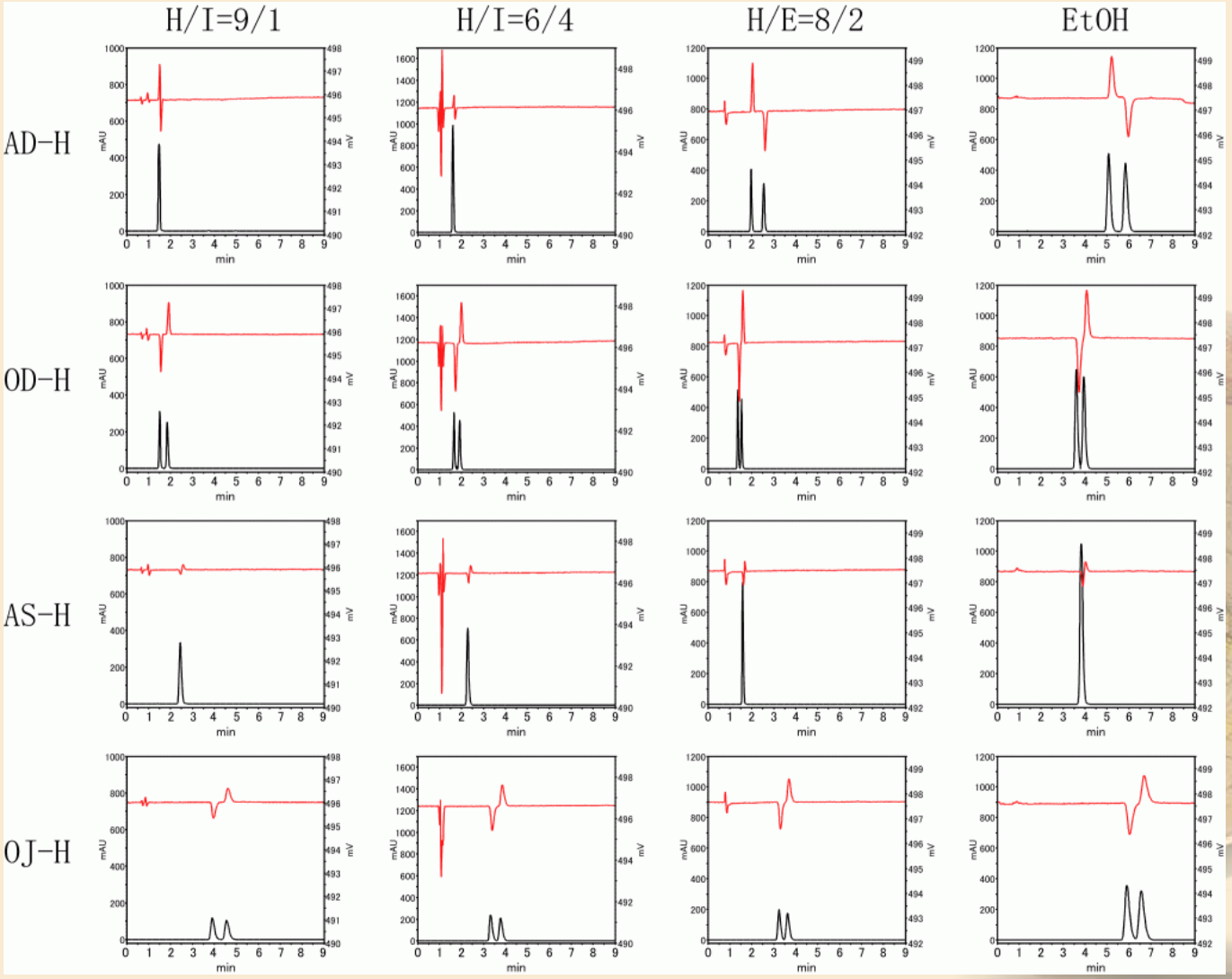
约6小时可获得16条件的色谱图
⇒1色谱图平均约20分钟

ダイセル化学工業株式会社

筛选结果示例

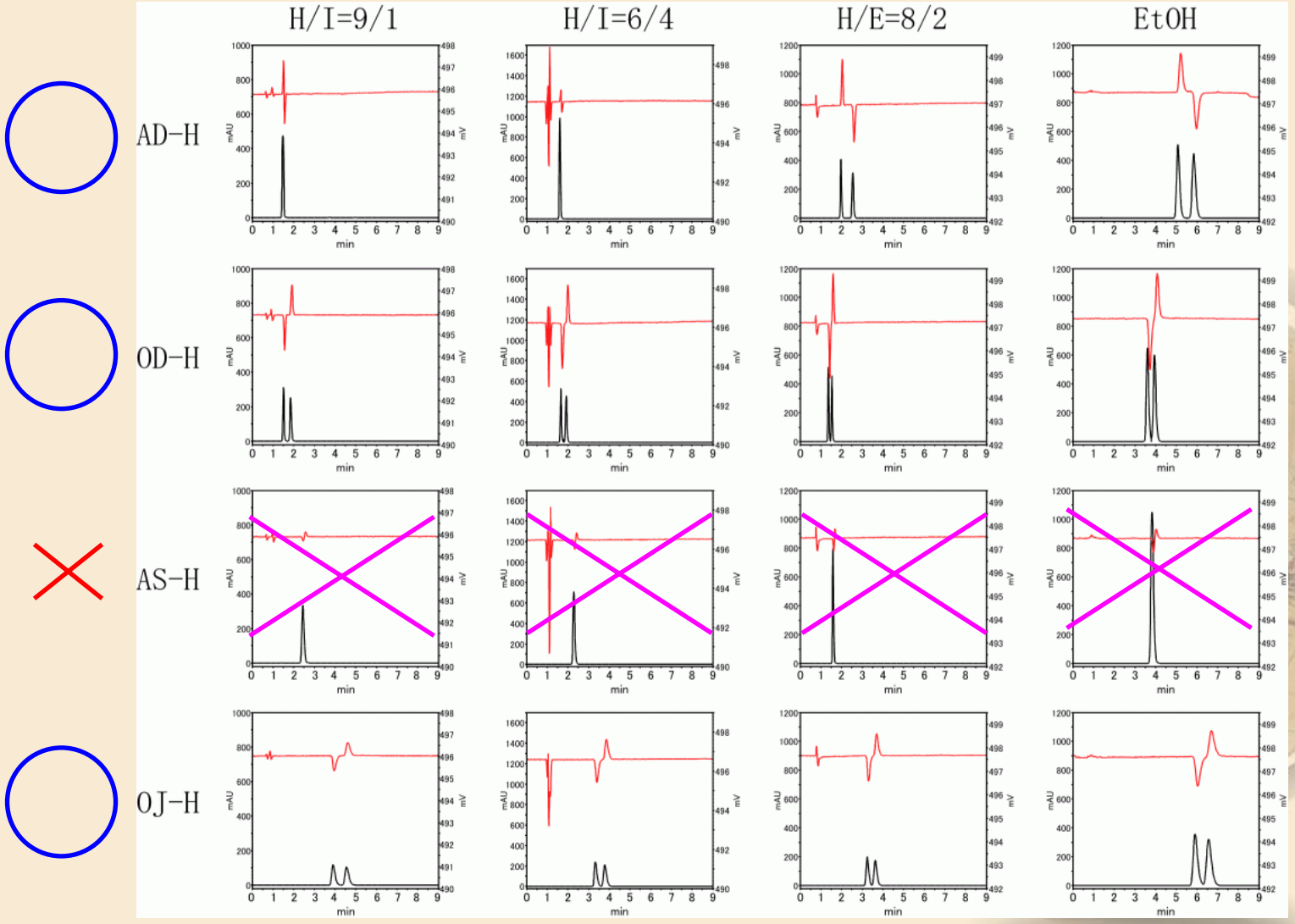
样品：





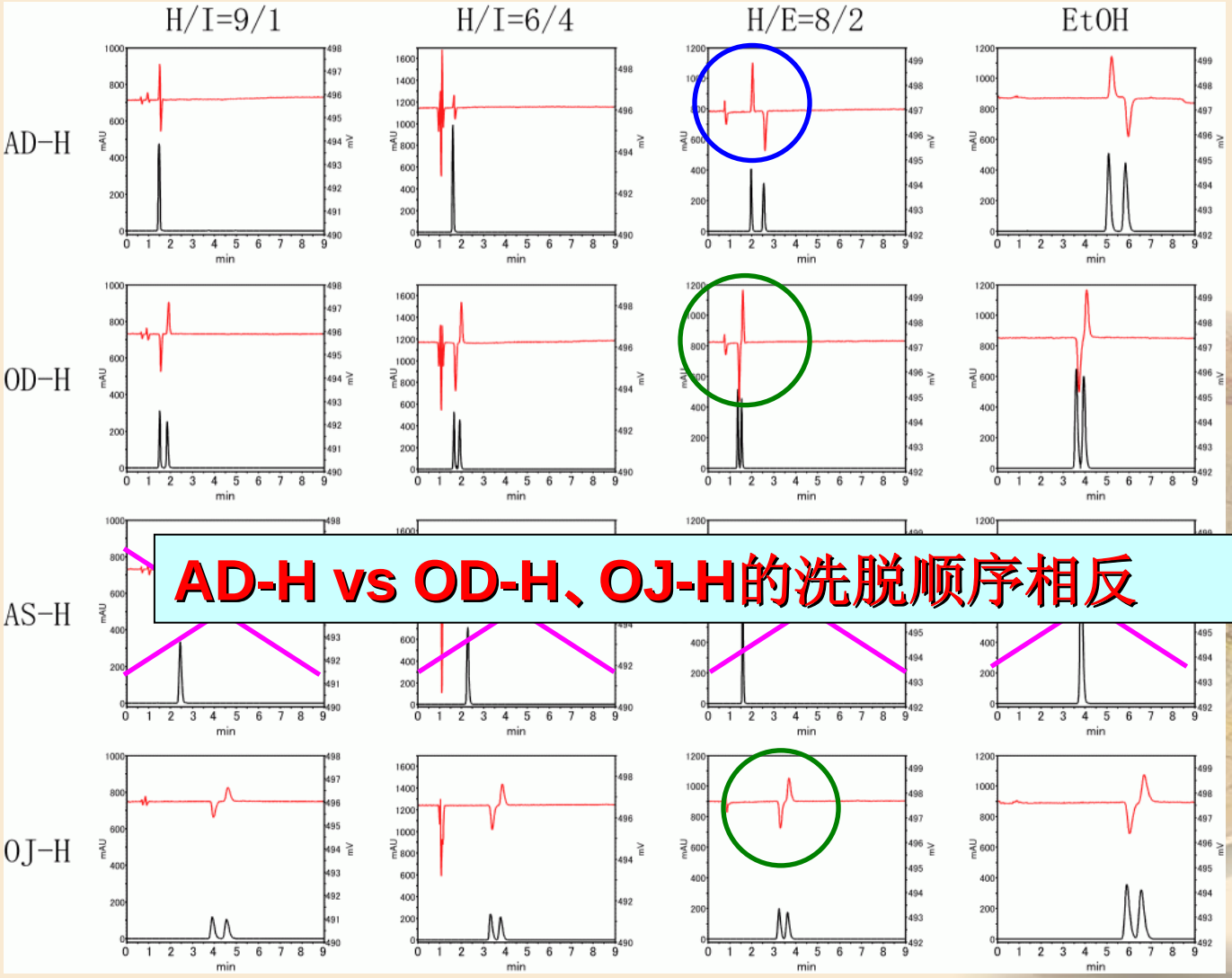
ダイセル化学工業株式会社

信息1: 判别具有分离可能性的色谱柱



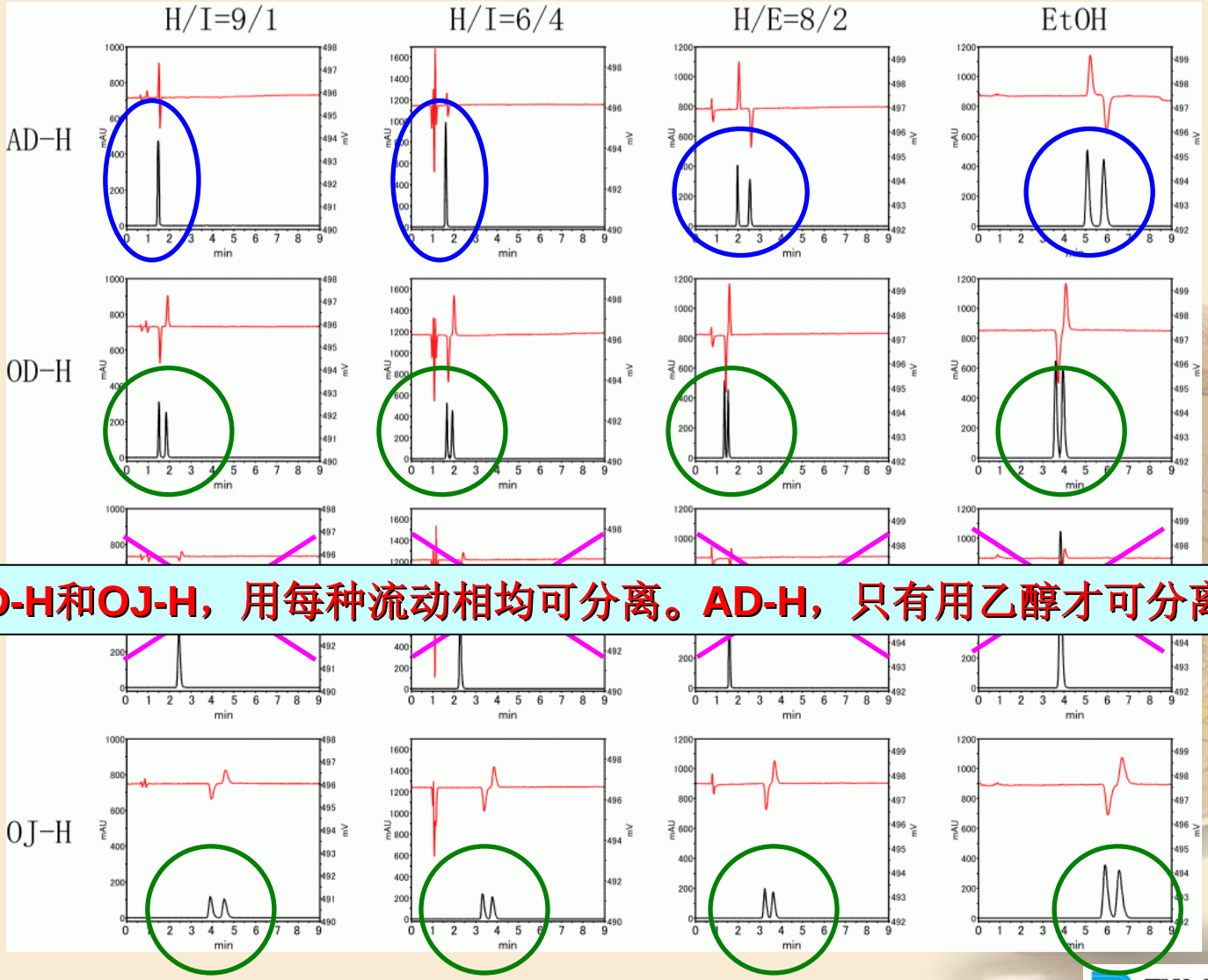
ダイセル化学工業株式会社

信息2: 色谱柱和洗脱顺序



ダイセル化学工業株式会社

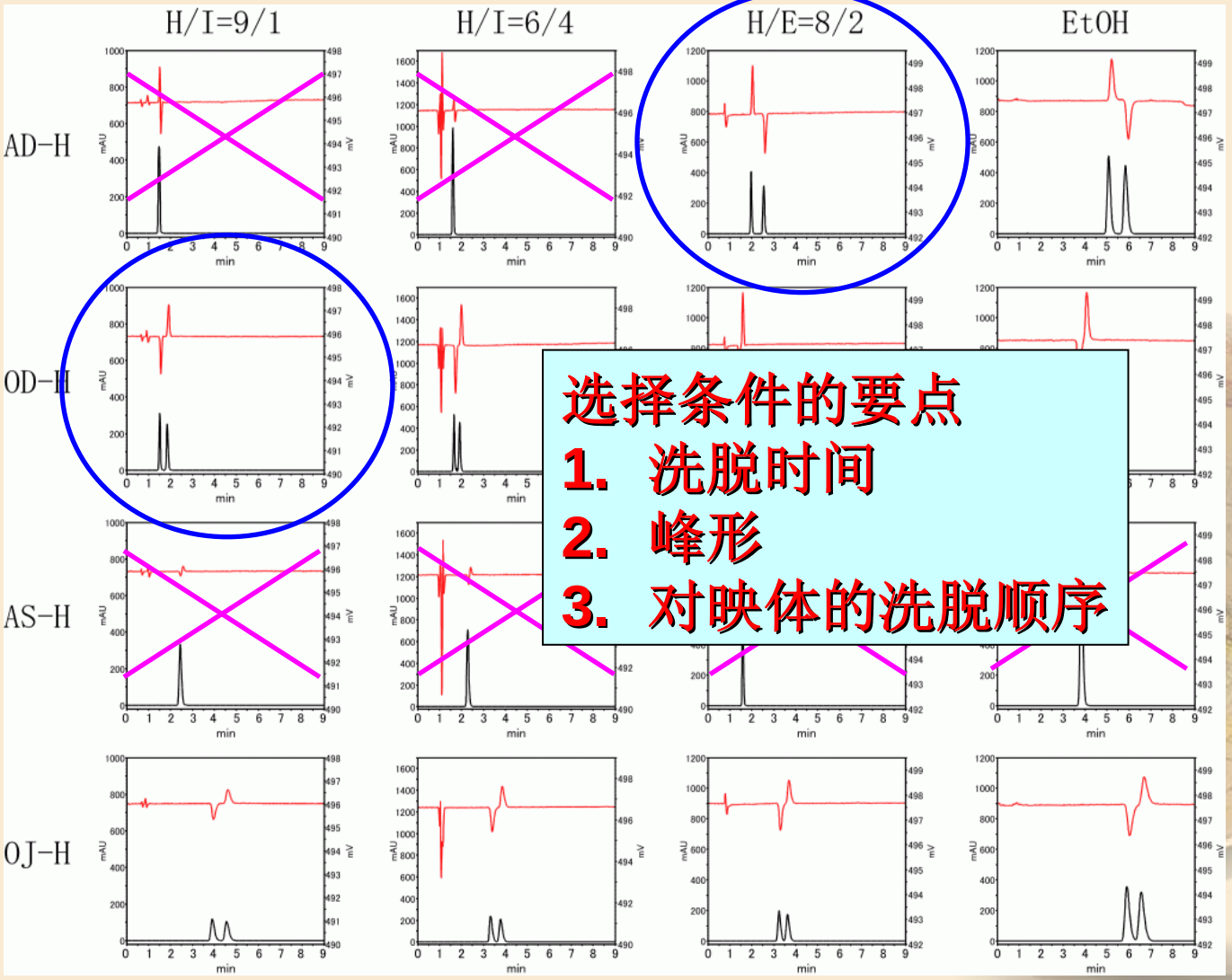
信息3: 醇的种类对分离的影响



OD-H和OJ-H，用每种流动相均可分离。AD-H，只有用乙醇才可分离。

ダイセル化学工業株式会社

分析条件的选择

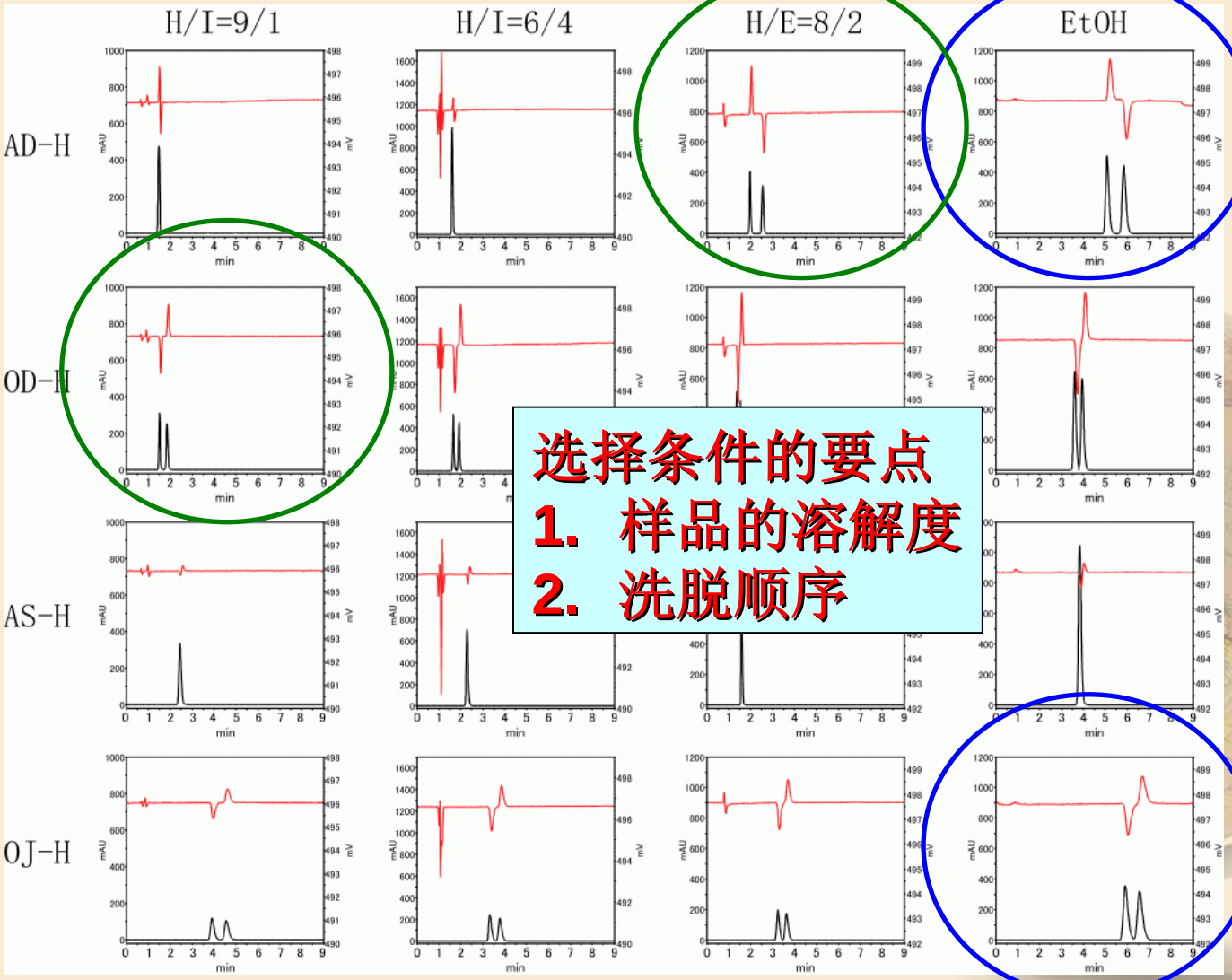


选择条件的要点

1. 洗脱时间
2. 峰形
3. 对映体的洗脱顺序

ダイセル化学工業株式会社

样品制备时・・・



选择条件的要点

1. 样品的溶解度
2. 洗脱顺序

ダイセル化学工業株式会社

若筛选没得到理想的分析条件时

1. 选择最接近基线分离的条件
2. 调整流动相中醇的比例
3. 调整流速
4. 调整温度
5. 变更为同种类长度为25cm的色谱柱。
6. 尝试其他的色谱柱

ダイセル化学工業株式会社

应用组合筛选设备探索分析条件总结

1. 使用具有广普分离能力的的4种手性色谱柱
2. 使用适合高流速的15cm的手性色谱柱
3. 组合应用2种醇，考察其分离情况
4. 和旋光检测器并用，可一次性获得更多的判断信息

ダイセル化学工業株式会社

内容提纲

1. 手性HPLC分析条件的建立和优化

   2-1 正相色谱

   2-2 反相色谱

2. 手性色谱柱的自动筛选

3. 手性分析中的注意事项

ダイセル化学工業株式会社

最常见的使用故障=溶剂错误

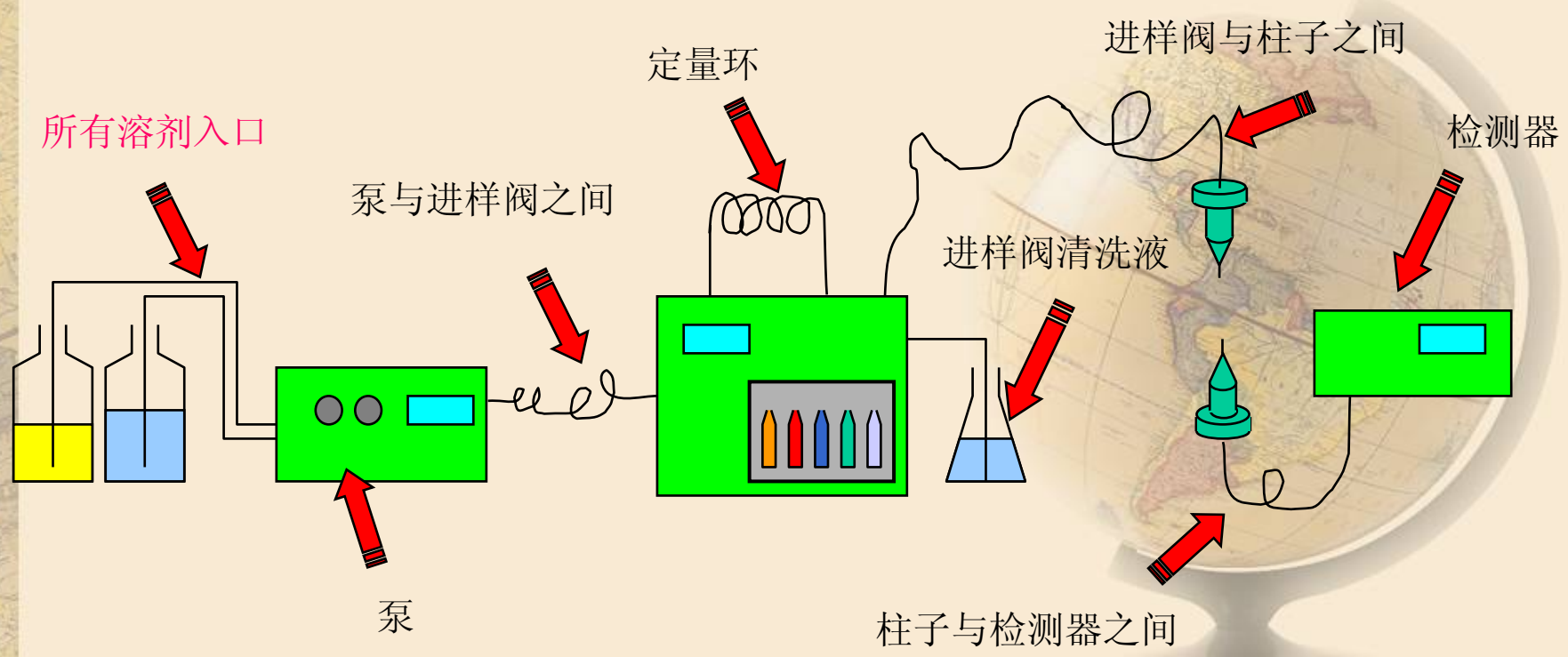
- **Daicel**大部分手性柱是涂敷型产品，在市场上具有着独特性。
- 若导入错误的溶剂，涂敷型柱子便会马上被破坏掉。
- 当导入错误的溶剂时，柱压会出现明显上升。
- 当用户出现柱压剧增或分离突然变差时，最常见的原因是错误地使用了溶剂。
- 一旦错误地使用了溶剂，重新恢复柱子性能的可能性很低。
- 若您遇到此类分析故障时，请对出厂报告重新确认柱子的性能或与大赛璐联系

ダイセル化学工業株式会社

使用前彻底清洗管路

将手性柱接入液相色谱仪之前

1. 用异丙醇将HPLC所有管路彻底清洗。
2. 用流动相将HPLC所有管路彻底清洗。



ダイセル化学工業株式会社

压力

原因：

- 流动相或样品溶液过滤不彻底，固体颗粒堵塞管路或柱头，会引起柱压过高。
- 样品中成分在柱头析出或强烈吸附，会引起柱压升高。
- 流速过快，会引起柱压升高

后果：

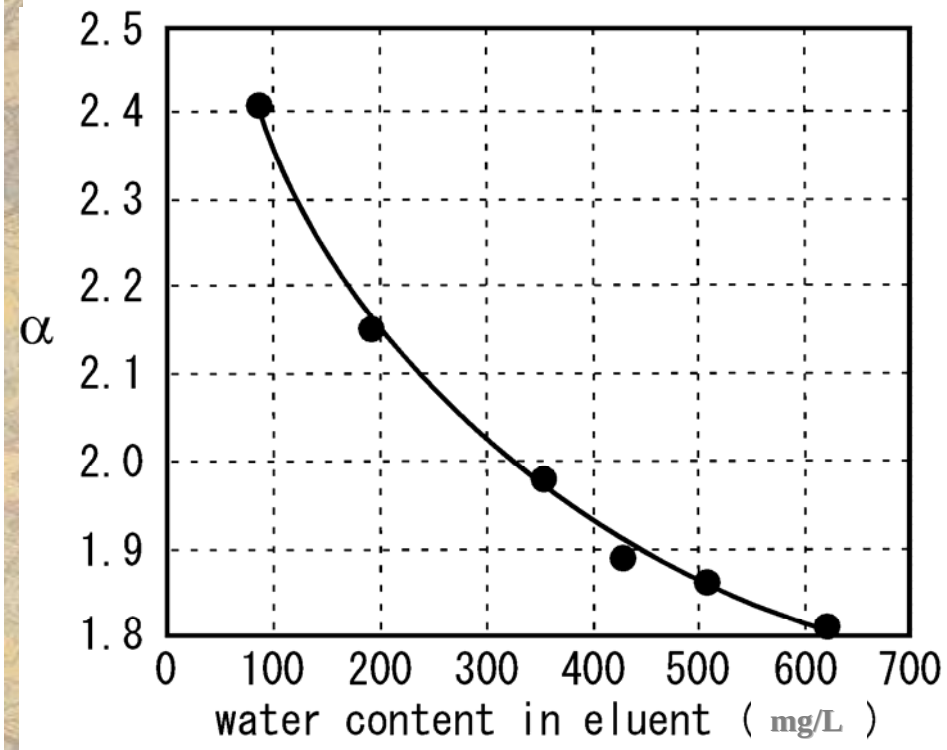
●长期超压会引起柱头塌陷，反压上升，柱效下降。

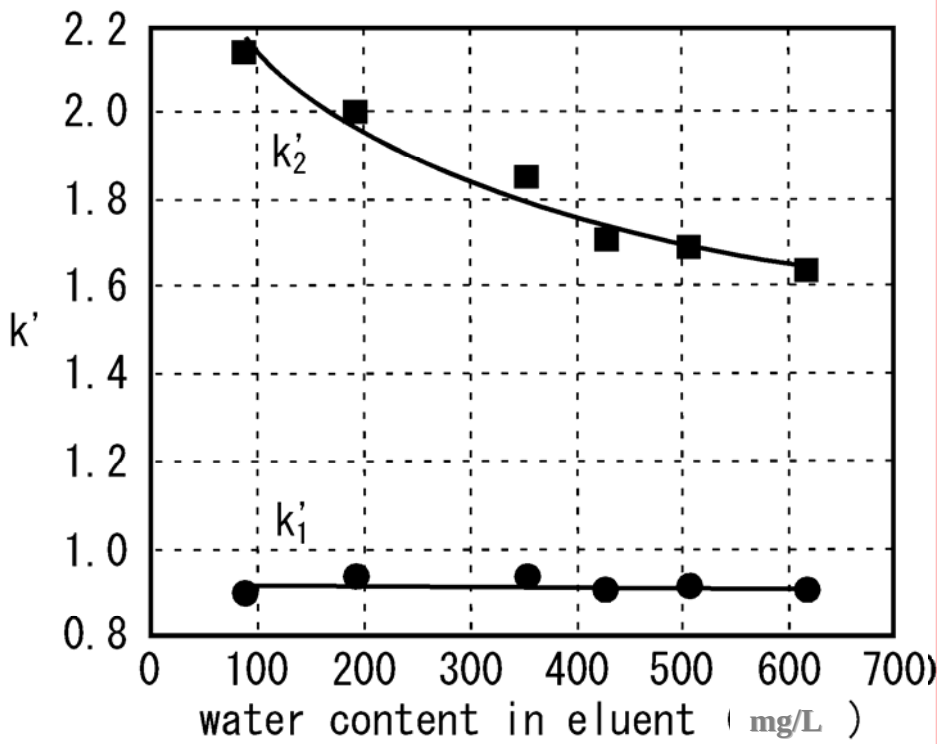
方法：

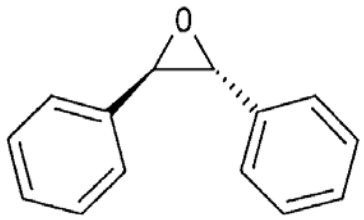
•每种柱子有特定的承压范围，请仔细参照相应的《色谱柱说明书》。
•彻底过滤流动相及样品溶液。
•样品预处理
•使用保护柱
•合理调节流速，特别在把柱子刚接上仪器的时候

ダイセル化学工業株式会社

流动相中水含量的影响







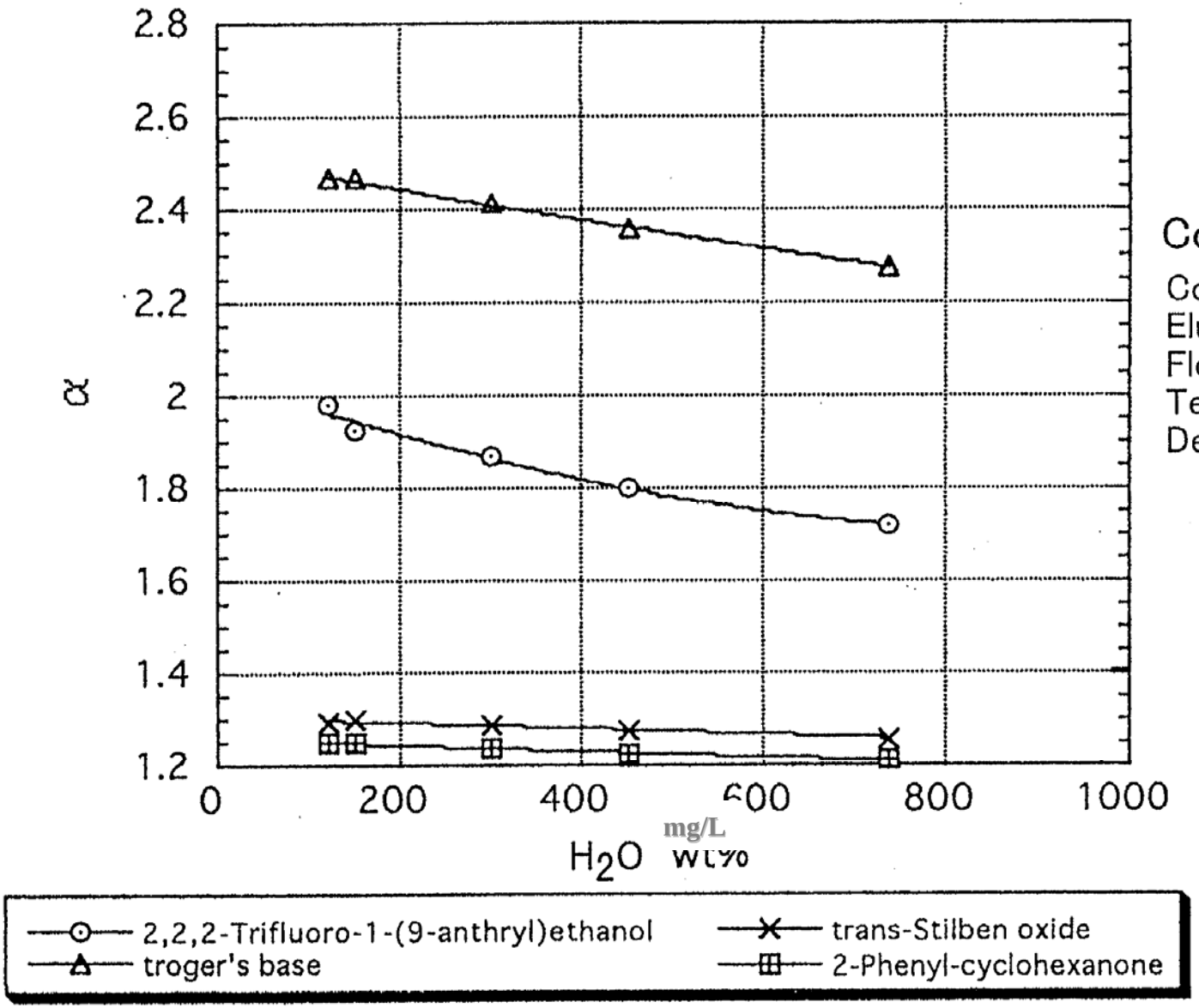
Conditions;

Column: CHIRALCEL OD-H
Flow rate: 1.0 ml/min
Sample conc.: 1.0 mg/ml
Detect.: UV 254 nm

Eluent: Hexane / IPA = 9 / 1
Temp.: 25 ℃
Inj. volume: 5 μl

ダイセル化学工業株式会社

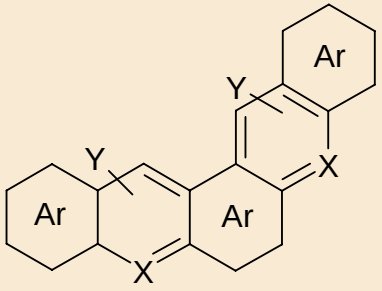
流动相中水含量的影响



Conditions;

Column: CHIRALPAK AS
Eluent: Hexane/IPA = 9/1
Flow Rate: 1.0 ml/min
Temp.: 25 ℃
Detect.: UV 254 nm

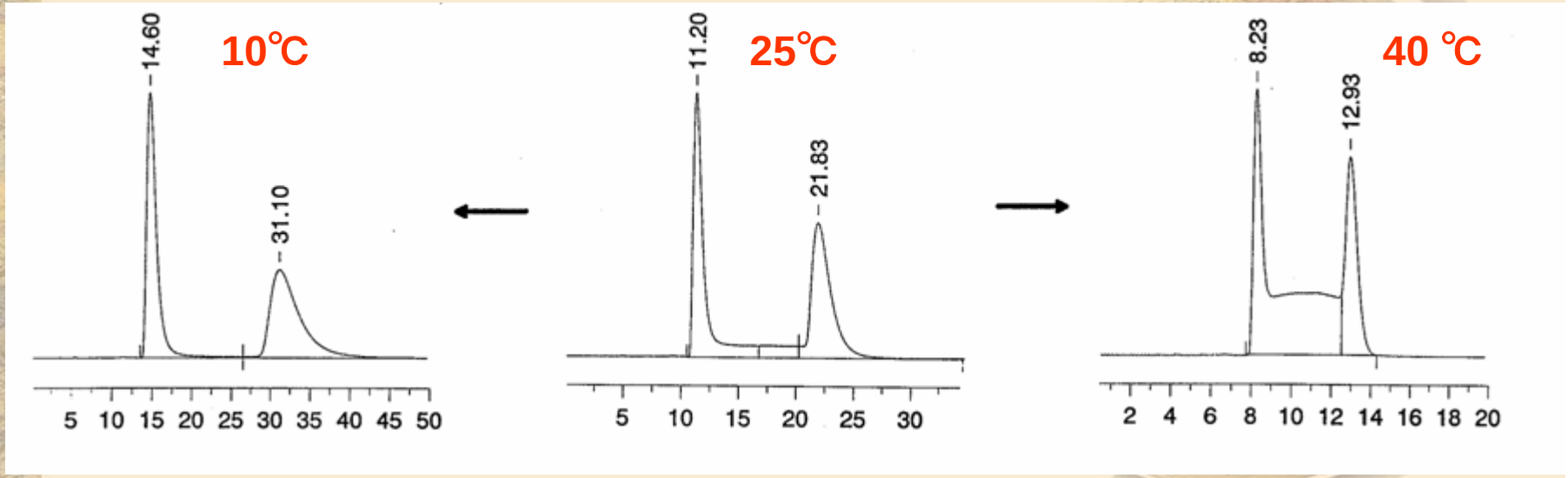
峰变形（消旋化）



CHIRALCEL OJ

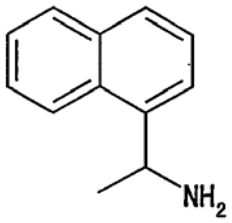
正己烷/乙醇＝90/10

1.0 ml/min，275 nm



ダイセル化学工業株式会社

添加物残留效应



Conditions;

Column: CHIRALCEL OJ

Flow rate: 1.0 ml/min

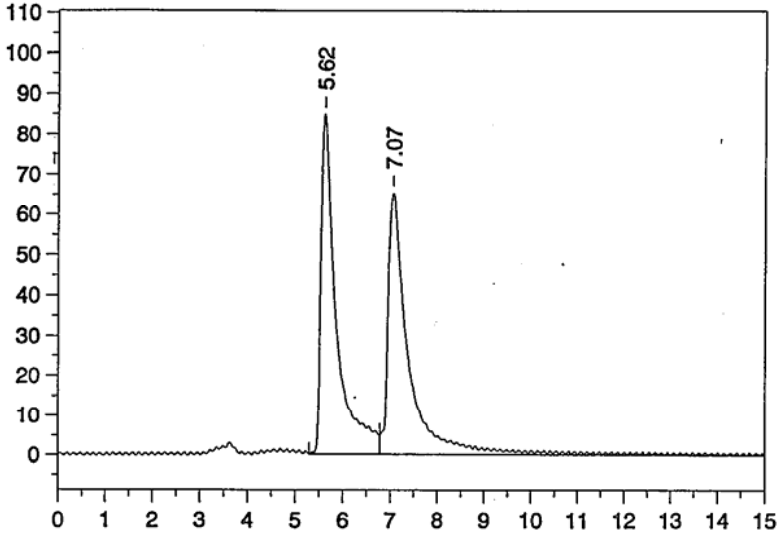
Temp.: 25 ℃

Detect.: UV 254 nm

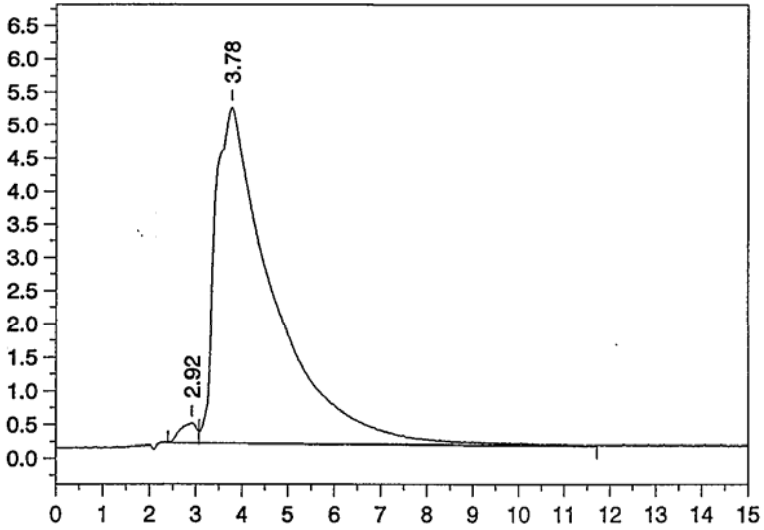
Sample conc.: 1.0 mg/ml

Inj. volume: 5 μl

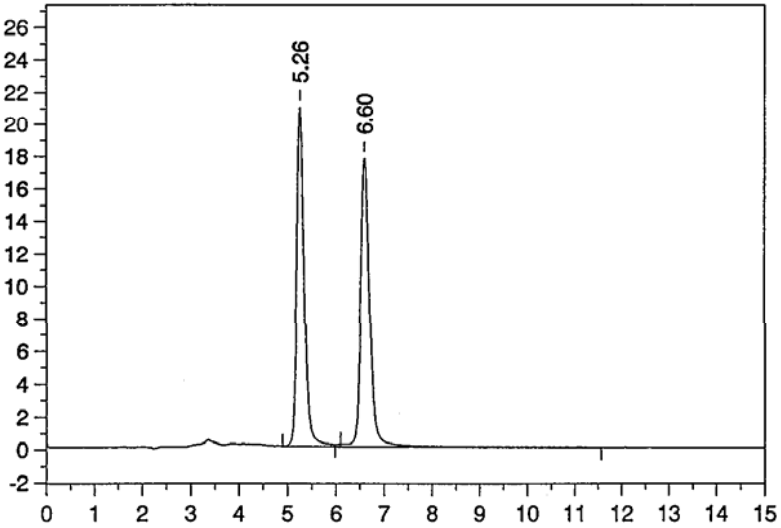
New Column,
analyzed with Hex/IPA=9/1



After flushing with Hex/IPA=9/1+0.1% TFA,
analyzed with Hex/IPA=9/1



After flushing with Hex/IPA=9/1+0.1% TFA
analyzed with Hex/IPA=9/1+**0.1% DEA**



如何避免“残留效应”

- 残留物在普通流动相中可长时间地稳定保留
- 用醇洗涤可除去大部分的碱性添加剂
- 用酸洗涤也可除去碱性残留物
- 用碱洗涤可除去酸性残留物

- 建议使用专用的酸性条件和碱性条件的手性柱
- 在分析酸性和碱性样品时，勿忘使用添加剂

ダイセル化学工業株式会社

谢谢！

ダイセル化学工業株式会社