

# LC 色谱柱和耗材

技术资料

# 目录

LC 色谱柱选择	03
根据美国药典标准选择 HPLC 色谱柱	08
HPLC 固定相	12
根据厂商选择 LC 色谱柱	14
快速 LC 原理	19
LC 技术信息	21
HPLC 衍生化试剂	31

# LC 色谱柱选择

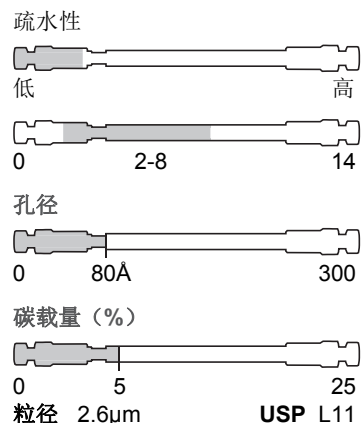
本节信息将帮助您根据固定相应用范围、分析物性质、LC-MS 要求或美国药典 (USP) 标准为您的分析应用选择适合的高压液相色谱 (HPLC) 柱。我们还将为您提供 Thermo Scientific 固定相列表及其指标, 以及其他常用色谱柱的推荐 Thermo Scientific 替代产品。

有关通用色谱柱选择的更多帮助和信息, 请参考相应产品页面上的高级用户图形 (AUG), 如右图所示。AUG 将显示用于表示色谱柱相对保留能力的疏水性信息。通常, 疏水性越高, 中性化合物的保留越强, 流动相中的有机相含量越高。疏水性越低, 表示流动相所需的水相更多, 才能获得同等保留能力和分离度。

此外, 还介绍了色谱柱的建议 pH 值应用范围, 超出此范围将缩短色谱柱的使用寿命。

还列出了色谱柱孔径。孔径较大的色谱柱更适用于蛋白质和多肽等分子量较大的分析物。碳载量的比例与疏水性有关。图标下方为粒径大小和 USP 代码。这些图示有助于您快速比较多个固定相的主要特征, 快速选择最适合的固定相。

如需更多有关色谱柱选择的帮助, 可咨询我们的专业人员, 获取帮助以做出最佳选择。



高级用户图形 (AUG)

## 常见 HPLC 固定相及其应用

通用名	备用名	官能团	正相	反相	离子交换	HILIC	应用
硅胶	硅胶	-OH	•			•	非极性和中等极性有机化合物
C1	SAS	-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		•			对于非极性溶质, 在所有烷基键合相色谱柱中保留最弱。通常用于中等极性和多官能团化合物
C4	丁基	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>		•			比 C8、C18 的保留能力弱。适用于多肽和蛋白质分离
C8	MOS	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>		•			比 C18 的保留能力弱; 通常用于小型肽段和蛋白质、药物制剂、类固醇和环境样品
C18	ODS	-C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>		•			在烷基键合相中保留能力最佳。广泛用于药物制剂、类固醇、脂肪酸、邻苯二甲酸盐和环境样品等。
氰基	CPS, CN	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CN	•	•			对极性化合物具有独特的选择性, 比普通硅胶更适用于正相梯度分离。用于反相时, 与 C8 和 C18 固定相的选择性不同。在制药领域中的应用广泛, 并适用于溶质差异极大的混合物。
氨基	APS	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	•	•	•	•	HILIC: 适用于碳水化合物及其他极性化合物。 弱阴离子交换: 阴离子和有机酸。 正相: 硅胶的替代选择性。适用于芳烃。
联苯基	官能团: -(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>			•			联苯类化学基团为 C18 柱提供了互补选择性, 并可用于分离异构体化合物 (例如滥用药物和类固醇)。
苯基		-(CH <sub>3</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		•			适用于芳香族化合物和中等极性化合物
五氟苯基	PFP	-C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>		•			对卤代、极性化合物和异构体提供额外的选择性和保留能力
二醇基		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>	•	•		•	反相: 蛋白质和多肽 正相: 与硅胶的选择性相似, 但极性较小
SCX	强阳离子交换剂	-RSO <sub>3</sub> H-			•		有机碱
SAX	强阴离子交换剂	-RN+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>			•		有机酸、核苷酸和核苷类
AX	阴离子交换剂 聚乙烯亚胺 (PEI)	-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>			•		有机酸、核苷酸和寡核苷酸类
多孔石墨碳	PGC	100% 碳	•	•			尤其适用于分离传统硅胶色谱柱难以保留的高极性化合物; 分离结构相似的化合物 (例如异构体、非对映异构体)

# HPLC 固定相色谱柱选择

在开始一项全新分析之前，需要考虑分析物的理化性质、分析模式以及分析物将如何与色谱相表面相互作用。以下指南有助于您选择色谱柱。

## 非极性

分析物溶解度	分析物化学性质		分离模式	推荐固定相
极性溶剂	酸性	$pK_a > 2$	阴离子交换/反相混合模式	Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WAX- Thermo Scientific™ Acclaim™ Trinity P1
			反相	Thermo Scientific™ Accucore™ C18
	Thermo Scientific™ Accucore™ RP-MS			
	Thermo Scientific™ Accucore™ C8			
	Thermo Scientific™ Accucore™ C30			
	Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl-Hexyl			
	Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C18			
	Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C8			
	Thermo Scientific™ Acclaim™ C30			
	Thermo Scientific™ Acclaim™ Phenyl-1			
	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™			
	中性	非极性	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C8	
Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C4				
Thermo Scientific™ Synchronis™ C18				
Thermo Scientific™ Synchronis™ C8				
Thermo Scientific™ Accucore™ aQ				
Thermo Scientific™ Accucore™ Polar Premium				
Thermo Scientific™ Accucore™ PFP				
Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl-X				
Thermo Scientific™ Acclaim™ PolarAdvantage				
Thermo Scientific™ Acclaim™ PolarAdvantage II				
中等极性	中等极性	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ aQ		
		Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ PFP		
		Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ Phenyl		
		Thermo Scientific™ Synchronis™ aQ		
		Thermo Scientific™ Synchronis™ Phenyl		
		Thermo Scientific™ Accucore™ C18		
		Thermo Scientific™ Accucore™ RP-MS		
		Thermo Scientific™ Accucore™ C8		
		Thermo Scientific™ Accucore™ C30		
		Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl-Hexyl		
碱性	$pK_a < 10$	反相	Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C18	
		Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C8		
		Thermo Scientific™ Acclaim™ C30		
		Thermo Scientific™ Acclaim™ Phenyl-1		
		Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™		
		Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C8		
		Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C4		
		Thermo Scientific™ Synchronis™ C18		
		Thermo Scientific™ Synchronis™ C8		
		Thermo Scientific™ Accucore™ C18		
Thermo Scientific™ Accucore™ RP-MS				
Thermo Scientific™ Accucore™ C8				
Thermo Scientific™ Accucore™ C30				
Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl-Hexyl				
Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C18				
Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C8				
Thermo Scientific™ Acclaim™ C30				
Thermo Scientific™ Acclaim™ Phenyl-1				
Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™				
Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C8				
Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ C4				
Thermo Scientific™ Synchronis™ C18				
Thermo Scientific™ Synchronis™ C8				
Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WCX-				
Thermo Scientific™ Acclaim™ Trinity P1				
			阳离子交换/反相混合模式	

## HPLC 固定相色谱柱选择 (续)

### 极性

分析物溶解度	分析物化学性质		分离模式	推荐固定相
极性溶剂	酸性	$pK_a < 2$	石墨的极性保留效应	Thermo Scientific™ Hypercarb™
			阴离子交换	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ AX Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ SAX
			HILIC	Thermo Scientific™ Accucore™ Urea-HILIC
				Thermo Scientific™ Accucore™ 150-Amide-HILIC
				Thermo Scientific™ Acclaim™ HILIC-10
				Thermo Scientific™ Synchronis™ HILIC
	中性		石墨的极性保留效应	Thermo Scientific™ Hypercarb™
			HILIC	Thermo Scientific™ Accucore™ HILIC
				Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode HILIC-1
				Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1
				Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1
				Thermo Scientific™ Acclaim™ Trinity P1
				Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ Amino
				Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ HILIC
				Thermo Scientific™ Synchronis™ Amino
Thermo Scientific™ Synchronis™ HILIC				
碱性	$pK_a > 10$	石墨的极性保留效应	Thermo Scientific™ Hypercarb™	
		阳离子交换	Thermo Scientific™ Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1 Thermo Scientific™ Acclaim™ Trinity P1	
		HILIC	Thermo Scientific™ Accucore™ Urea-HILIC	
			Thermo Scientific™ Accucore™ 150-Amide-HILIC	
			Thermo Scientific™ Acclaim™ HILIC-10	
			Thermo Scientific™ Synchronis™ HILIC	
非极性溶剂		正相	Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ Amino	
			Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ CN	
			Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ Silica	
			Thermo Scientific™ Synchronis™ Amino	
			Thermo Scientific™ Synchronis™ Silica	

上表推荐的色谱柱适用于分离小分子分析物。

## 低流速 LC 色谱柱类型选择

Thermo Scientific 系列产品针对低流速 LC 分析进行了各种色谱柱设计和固定相优化。您可通过下表选择最适合您应用的色谱柱类型。表中提供了多种 HPLC 色谱柱硬件配置，帮助您以高速、高灵敏度、高效率 and 便捷性获取卓越的结果。广泛的颗粒状固定相和整体固定相为优化选择性提供了众多选择。

### 低流速色谱柱硬件选择

LC-MS 应用	色谱柱硬件设计	描述
高通量分析	Javelin HTS 色谱柱	直连色谱柱 纤薄设计，20 mm 长，1-4.6 mm ID
高灵敏度分析	Acclaim PepMap 纳升、毛细管和微型色谱柱	纳升、毛细管和微型色谱柱，0.075-1 mm ID；50-250 mm 长 nanoViper 色谱柱提供手紧式无死体积连接（1000 bar）
蛋白质组学分析	EASY-Spray 色谱柱	结合色谱柱/发射器设计与 nanoViper 连接。 柔性硅胶加热柱，50 $\mu$ m 和 75 $\mu$ m ID；150-500 mm 长
	Acclaim PepMap 纳升色谱柱， Accucore 纳升色谱柱，nanoViper	nanoViper 色谱柱提供手紧式无死体积连接（1000 bar） 柔性硅胶柱，50 $\mu$ m 和 75 $\mu$ m ID；50-500 mm 长 捕获柱 20 mm x 100 $\mu$ m ID
	Acclaim PepMap 纳升经典色谱柱	柔性硅胶柱，50 $\mu$ m 和 75 $\mu$ m ID；50-500 mm 长 捕获柱 20 mm x 100 $\mu$ m ID
	EASY-column 色谱柱	柔性硅胶柱 100 mm x 75 $\mu$ m 捕获柱 20 mm x 100 $\mu$ m ID

该 LC 部分中的多个 HPLC 色谱柱也可用于 LC-MS 分析。这些色谱柱的典型流速及其与 MS 离子源的兼容性见下页表格



## 低流速 LC 色谱柱类型选择 (续)

### 适用于低流速 LC 分析的色谱柱选择

分析物分子量	样品极性	接口离子源	相对灵敏度	柱内径 (mm)	流速 (μL/min)	色谱柱硬件	
< 1000 Da	低	APCI	低	4.6, 4.0, 3.0	2000 - 200	Javelin HTS, 分析型	
			高	2.1, 1.0	200 - 50	分析型, Javelin HTS	
	中	APCI	低	4.6, 4.0, 3.0	2000 - 200	Javelin HTS, 分析型	
			高	2.1, 1.0	200 - 50	分析型, Javelin HTS	
		ESI	低	2.1, 1.0	200 - 50	分析型, Javelin HTS	
			高	1.0 - 0.3	50 - 5	Acclaim PepMap (RSLC) 毛细管和微型色谱柱	
		高 (或可电离)	ESI	低	2.1, 1.0	200 - 50	分析, Javelin HTS
				高	1.0 - 0.3	50 - 5	Acclaim PepMap (RSLC) 毛细管和微型色谱柱
	> 1000 Da	ESI	低	2.1, 1.0	200 - 50	分析型, Javelin HTS	
			高	1.0 - 0.3	50 - 5	Acclaim PepMap (RSLC) 毛细管和微型色谱柱	
					0.2 - 0.05	2 - 0.2	EASY-Spray 色谱柱, EASY-Column 色谱柱, Acclaim PepMap (RSLC) 纳升色谱柱, Accucore 纳升色谱柱

### 适用于 LC-MS 分析的整体柱

分析物分子量	柱内径 (mm)	流速 (μL/min)	色谱柱硬件
> 1000 Da	1.0	40 - 200	ProSwift 整体柱

ProSwift 还可以使用较大的 ID, 用于高通量分析。

根据美国药典标准选择 HPLC 色谱柱\*

USP 代码	描述	推荐固定相
L1	十八烷基硅烷化学键合到多孔或无孔硅胶或陶瓷颗粒（1.5-10 μm 粒径）或整体柱上	Acclaim 120 C18
		Acclaim RSLC C18
		Accucore C18
		Accucore aQ
		Accucore 150-C18
		Accucore XL C18
		AQUASIL C18
		BetaBasic 18
		BetaMax Neutral
		BETASIL C18
		BioBasic 18
		Hyperprep HS C18
		Hypersil 100 C18
		Hypersil BDS C18
		Hypersil GOLD
		Hypersil GOLD aQ
		Hypersil-ODS
		Hypersil ODS-2
		Hypersil Green PAH
		HyPURITY AQUASTAR
HyPURITY C18		
Synchronis C18		
Synchronis aQ		
L3	多孔硅胶颗粒（1.5-10 μm 粒径）或整体硅胶柱	Accucore HILIC
		BETASIL Silica 100
		Deltabond Silica
		Hypersil GOLD Silica
		Hypersil Silica
		HyperPrep HS Silica
		Synchronis Silica
L7	辛基硅烷化学键合到全多孔或表面多孔的硅胶颗粒（1.5-10 μm 粒径）或整体硅胶柱上	Acclaim 120 C8
		Accucore C8
		Accucore XL C8
		BetaBasic 8
		BETASIL C8
		BioBasic 8
		Hypersil BDS C8
		Hypersil GOLD C8
		Hypersil MOS
		Hypersil MOS-2
		Hypersil HS C8
		HyPurity C8
		L8
Hypersil GOLD Amino		
Synchronis Amino		



## 根据美国药典标准选择 HPLC 色谱柱\* (续)

USP 代码	描述	推荐固定相
L10	腈基化学键合到多孔硅胶颗粒 (1.5-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 或整体硅胶柱上	BetaBasic CN
		BETASIL CN
		BioBasic CN
		DELTABOND CYANO
		Hypersil BDS CN
		Hypersil CPS
		Hypersil CPS-2
		Hyperprep GOLD CN
L11	苯基化学键合到多孔硅胶颗粒 (1.5-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 或整体硅胶柱上	HyPURITY CN
		Accucore Phenyl-Hexyl
		Accucore Biphenyl
		BetaBasic Phenyl
		BETASIL Phenyl
		BETASIL Phenyl-hexyl
		BioBasic Phenyl
		Hypersil BDS Phenyl
		Hypersil GOLD Phenyl
		Hypersil Phenyl
		Hypersil Phenyl-2
Synchronis Phenyl		
L13	三甲基硅烷化学键合到多孔硅胶颗粒 (3-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 上	BETASIL C1
		Hypersil SAS (C1)
L14	硅胶带有一个化学键合的强碱性季铵阴离子交换涂层, 5-10 $\mu\text{m}$ 粒径	Hypersil GOLD SAX
		Hypersil SAX
		Retain SAX (SEP 小柱)
L15	己基硅烷化学键合到全多孔硅胶颗粒 (3-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 上	BETASIL C6
L17	由磺酸化交联苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (氢型) 组成的强阳离子交换树脂, 6-12 $\mu\text{m}$ 粒径	HyperREZ XP Carbohydrate H
		HyperREZ XP Organic Acids
L19	由磺酸化交联苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (钙型) 组成的强阳离子交换树脂 (5-15 $\mu\text{m}$ 粒径)	HyperREZ XP Carbohydrate Ca
		HyperREZ XP Sugar Alcohols
L20	二羟基丙烷化学键合到多孔硅胶或杂化颗粒 (1.5-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 或整体硅胶柱上	BETASIL Diol
L21	实心球形苯乙烯-二乙烯基苯共聚物, 3-30 $\mu\text{m}$ 粒径	HyperREZ XP RP 100
		MAbPac RP
L22	由含磺酸基的多孔聚苯乙烯凝胶制成的阳离子交换树脂, 5-15 $\mu\text{m}$ 粒径	HyperREZ XP SCX
L25	可分离分子量范围 100-5000 化合物 (根据聚氧化乙烯测定) 的填料, 适用于中性、阴离子和阳离子型水溶性聚合物。研究发现, 与聚羟基化醚 (表面含有一些残留的羧基官能团) 交联的聚甲基丙烯酸酯树脂适合	HyperGel AP

## 根据美国药典标准选择 HPLC 色谱柱\* (续)

USP 代码	描述	推荐固定相
L26	丁基硅烷化学键合到全多孔或表面多孔的硅胶颗粒 (1.5-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 上	Accucore 150-C4 BetaBasic 4 BioBasic 4 Hyperprep PEP 300 C4 Hypersil GOLD C4 HyPURITY C4
L27	多孔硅胶颗粒, 30-50 $\mu\text{m}$ 粒径	HyperPrep Silica
L33	填料可用于分离分子量范围 4,000-500,000 Da 的葡聚糖。该填料为球形硅胶颗粒, 经处理可具有 pH 稳定性	BioBasic SEC 120 BioBasic SEC 300 BioBasic SEC 1000
L34	由磺酸化交联苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (铅型) 组成的强阳离子交换树脂, 7-9 $\mu\text{m}$ 粒径	HyperREZ XP Carbohydrate Pb
L38	填料是一种甲基丙烯酸酯体积排阻填料, 适用于水溶性样品	Acclaim SEC-300 Acclaim SEC-1000
L40	含纤维素-三-3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯涂层的多孔硅胶颗粒, 3-20 $\mu\text{m}$ 粒径	Hypersil Chiral OT
L43	五氟苯酚基通过丙基垫片化学键合到硅胶颗粒 (1.5-10 $\mu\text{m}$ 粒径) 上	Accucore PFP Hypersil GOLD PFP
L46	聚苯乙烯/二乙烯基苯基质凝结季铵功能化胶乳珠, 9-11 $\mu\text{m}$ 粒径	OmniPac PAX 100
L50	具有反相保留能力和强阴离子交换功能的多功能树脂。该树脂由乙基乙烯基苯组成, 与二乙烯基苯共聚物的交联度为 55%, 粒径为 3-15 $\mu\text{m}$ , 表面积不小于 350 $\text{m}^2/\text{g}$ 。基底涂层含季铵官能化胶乳颗粒, 由与二乙烯基苯交联的苯乙烯组成	OmniPac PAX-500
L51	含直链淀粉-三-3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯涂层的多孔球形硅胶颗粒, 3-10 $\mu\text{m}$ 粒径	Hypersil Chiral AT
L52	由含磺丙基或磺乙基基团的多孔硅胶制成的强阳离子交换树脂, 1-10 $\mu\text{m}$ 粒径	BioBasic SCX
L58	由磺酸化交联苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (钠型) 组成的强阳离子交换树脂, 粒径约 6-30 $\mu\text{m}$	HyperREZ Carbohydrate XP Na
L59	该填料在 5-7000 kDa 范围内对蛋白质进行体积排阻分离 (根据分子量进行分离)。填料为球形 1.5-10 $\mu\text{m}$ 硅胶或具有亲水涂层的混合填料	MabPac SEC-1
L60	球形多孔硅胶, 粒径 $\leq 10 \mu\text{m}$ , 表面经烷基酰胺基团共价键合改性并封端	Acclaim Polar Advantage Acclaim Polar Advantage II (PA2) Accucore Polar Premium HyPURITY ADVANCE Prism RP Prism RPN

## 根据美国药典标准选择 HPLC 色谱柱\* (续)

USP 代码	描述	推荐固定相
L62	含 C30 硅烷键合相的全多孔球形硅胶, 3-15 $\mu\text{m}$ 粒径	Acclaim C30 Accucore C30
L78	一种由反相 (烷基链长于 C8) 和阴离子交换 (伯、仲或叔胺) 官能团组成的硅烷配体, 化学键合到多孔或无孔硅胶或陶瓷颗粒 (1.0-50 $\mu\text{m}$ 粒径), 或整体柱上	Acclaim Mixed-Mode WAX-1 Acclaim Surfactant Plus
L80	含纤维素-三-(4-甲基苯甲酸酯) 涂层的多孔球形硅胶颗粒, 5-20 $\mu\text{m}$ 粒径	Hypersil Chiral JT
L89	可分离分子量范围 100-3000 化合物 (根据聚氧化乙烯测定) 的填料, 适用于中性和阴离子型水溶性聚合物。一种与聚羟基化醚 (表面含有一些残留的阳离子官能团) 交联的聚甲基丙烯酸酯树脂	Acclaim SEC-300
L96	烷基链反相键合的全多孔或表面多孔硅胶, 设计用于使用高比例水相流动相 (包括 100% 水相) 保留亲水性和其他极性化合物, 1.5-10 $\mu\text{m}$ 粒径	Acclaim C30 Accucore C30 Hypersil GOLD aQ Synchronis aQ
L109	多孔石墨碳球形颗粒 (3-30 $\mu\text{m}$ 粒径)	Hypercarb
L111	多胺化学键合到多孔球形硅胶颗粒 (5 $\mu\text{m}$ 粒径) 上	Hypersil GOLD AX
L116	磺酸化乙基乙烯基苯/二乙烯基苯基质凝结亲水性季胺官能化的缩水甘油基衍生物甲基丙烯酸酯微珠, 粒径约为 2-50 $\mu\text{m}$	Dionex DNAPac PA100
L##	(聚乙二醇 3350, Aquagel OH 40) -可分离分子量范围 10,000-200,000 g/mol 化合物 (根据聚氧化乙烯测定) 的填料, 适用于中性、阴离子和阳离子型水溶性聚合物, 由具有亲水性表面的刚性大孔材料组成	Acclaim SEC-300 Acclaim SEC-1000

## HPLC 固定相

下表列出了适用于小分子分离的 Thermo Scientific HPLC 吸附剂。

有关色谱耗材目录中列出的每个 HPLC 固定相，也可以参考高级用户图形 (AUG)。

固定相	颗粒物类型	粒径 ( $\mu\text{m}$ )	孔径 ( $\text{\AA}$ )	标称表面积 ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	% 碳	封端	USP 代码	固定相代码
<b>Acclaim 固定相</b>								
120 C18	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	18	是	L1	–
300 C18	球形, 全多孔硅胶	3	300	100	8	是	L1	–
120 C8	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	11	是	L7	–
Phenyl-1	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	13	是	L11	–
C30	球形, 全多孔硅胶	3, 5	200	200	13	专有	L62	–
PA	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	16	是	L60	–
PA II	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	16	是	L60	–
HILIC-10	球形, 全多孔硅胶	3	120	300	8	是	–	–
Trinity P1	纳米杂化硅胶聚合物	3	300	100	–	专有	–	–
Trinity P2	纳米杂化硅胶聚合物	3	300	100	–	专有	–	–
Trinity Q1	纳米杂化硅胶聚合物	3	300	100	–	专有	–	–
Mixed Mode HILIC-1	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	–	专有	–	–
Mixed Mode WAX-1	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	–	专有	L78	–
Mixed Mode WCX-1	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	–	专有	L85	–
Organic Acid	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	–	是	–	–
Surfactant	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	–	是	–	–
Surfactant Plus	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	300	–	是	–	–
Explosives	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	–	是	–	–
Carbamate	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	–	是	–	–
Carbonyl C18	球形, 全多孔硅胶	2.2, 3, 5	120	300	–	是	–	–
SEC	球形, 树脂	5, 7	300	1000	–	–	–	–
AmG C18	球形, 全多孔硅胶,	3 $\mu\text{m}$	300	120	–	是	–	–

### Chiral 固定相

#### Accucore 固定相

RP-MS	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	7	是	–	176
C18	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	9	是	L1	171
C8	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	5	是	L7	172
aQ	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	9	极性	L1	173
Polar Premium	球形, 实心硅胶	2.6	150	90	8	是	L60	280
Phenyl-Hexyl	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	5	是	L11	179
Biphenyl	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	5	是	L11	178
Phenyl-X	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	6	是	–	279
PFP	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	5	是	L43	174
C30	球形, 实心硅胶	2.6	150	90	5	是	L62	278
HILIC	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	–	–	L3	175
Urea-HILIC	球形, 实心硅胶	2.6	80	130	–	–	–	277

#### Accucore XL 固定相

C18	球形, 实心硅胶	4	80	90	7	是	L1	741
C8	球形, 实心硅胶	4	80	90	4	是	L7	742

#### Hypercarb 固定相

Hypercarb	球形, 多孔石墨碳	3,5	250	120	100	–	–	350
-----------	-----------	-----	-----	-----	-----	---	---	-----

## HPLC 固定相 (续)

固定相	颗粒物类型	粒径 (μm)	孔径 (Å)	标称表面积 (m <sup>2</sup> /g)	% 碳	封端	USP 代码	固定相代码
Hypersil 固定相								
ODS (C18)	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	170	10	是	L1	301
ODS-2 (C18)	球形, 全多孔硅胶	3, 5	80	220	11	是	L1	316
MOS (C8)	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	170	6.5	否	L7	302
MOS-2 (C8)	球形, 全多孔硅胶	5	120	170	6.5	是	L7	303
SAS (C1)	球形, 全多孔硅胶	5	120	170	2.5	是	L13	305
Phenyl	球形, 全多孔硅胶	5	120	170	5	否	L11	309
Phenyl-2	球形, 全多孔硅胶	5	120	170	5	是	L11	319
CPS	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	170	4	否	L10	308
CPS-2	球形, 全多孔硅胶	5	120	170	4	是	L10	318
APS-2	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	170	1.9	否	L8	307
Silica	球形, 全多孔硅胶	3, 5	120	170	-	-	L3	300
SAX	球形, 全多孔硅胶	5	120	170	2.5	是	L14	341
Hypersil BDS 固定相								
C18	球形, 全多孔硅胶	2.4, 3, 5	130	170	11	是	L1	281
C8	球形, 全多孔硅胶	2.4, 3, 5	130	170	7	是	L7	282
Phenyl	球形, 全多孔硅胶	3, 5	130	170	5	是	L11	289
Cyano	球形, 全多孔硅胶	3, 5	130	170	4	是	L10	288
Hypersil GOLD 固定相								
C18 selectivity	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5, 12	175	220	10	是	L1	250
C8	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	8	是	L7	252
C4	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	5	是	L26	255
aQ	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	12	极性	L1	253
PFP	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	8	是	L43	254
Phenyl	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	8.5	是	L11	259
CN (Cyano)	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	4	是	L10	258
Amino	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	2	是	L8	257
AX	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	6	否	-	261
SAX	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	2.5	是	L14	263
Silica	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	-	-	L3	251
HILIC	球形, 全多孔硅胶	1.9, 3, 5	175	220	6	否	-	265
Hypersil Green 固定相								
PAH	球形, 全多孔硅胶	3,5	120	170	13.5	是	-	311
Hypersil PREP 固定相								
BDS C18	硅胶, 球形全多孔碱去活硅胶	3, 5, 10	145	185	11	是	L1	
BDS C8	硅胶, 球形全多孔碱去活硅胶	3, 5, 10	145	185	7	是	L7	
ODS	硅胶, 球形全多孔	3, 5, 10	130	195	10	是	L1	
BDS Si	硅胶, 球形全多孔碱去活硅胶	3, 5, 10	145	185	-	否	L3	
Si	硅胶, 球形全多孔	5	130	195	-	否	L3	
BDS Phenyl	硅胶, 球形全多孔碱去活硅胶	5	145	185	5	是	L11	
Hypersil PREP HS 固定相								
C18	硅胶, 球形全多孔超纯硅胶	3, 5, 10	100	350	15	是	L1	
C8	硅胶, 球形全多孔超纯硅胶	3, 5, 10	100	350	7	是	L7	
Si	硅胶, 球形全多孔超纯硅胶	5	100	350	-	否	L3	
Phenyl	硅胶, 球形全多孔超纯	5	100	350	9	是	L11	
Hypersil Chiral 固定相								
JT	硅胶, 球形全多孔	3, 5, 10	1000	30	不适用	否	L80	
AT	硅胶, 球形全多孔	3, 5, 10	1000	30	不适用	否	L51	
OT	硅胶, 球形全多孔	3, 5, 10	1000	30	不适用	否	L40	
Syncronis 固定相								
C18	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	16	是	L1	971
C8	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	10	是	L7	972
aQ	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	19	极性	L1	973
Phenyl	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	11	是	L11	979
Amino	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	4	是	L8	977
Silica	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	-	-	L3	970
HILIC	球形, 全多孔硅胶	1.7, 3, 5	100	320	5	-	-	975

## 根据厂商选择 LC 色谱柱

有关其他厂商色谱柱的 Thermo Scientific 替代产品，请参阅以下选择指南。结合理化性质相似性及保留方式，选择 Thermo Scientific 替代固定相。这些替代产品不能保证提供相同的保留能力或选择性，但特性应相似，以通过方法优化实现相似或更佳的分。用户应参考各个相的信息，确保替代产品的特性与分离要求相符。

下表有关制造商或产品的信息并不详尽。尽管已尽力确保所提供产品的信息尽可能准确，但在整理和转述中仍可能会出现错误。对于以下信息的使用，我们不承担任何责任。

固定相	制造商	孔径 (Å)	表面积 (m <sup>2</sup> /g)	%碳	推荐 Thermo Scientific 替代产品
ACE C18	ACT	100	300	15.5	Synchronis C18
ACE C8	ACT	100	300	9	Synchronis C8
ACE Phenyl	ACT	100	300	9.5	Synchronis Phenyl
ACE AQ	ACT	100	300	14	Synchronis aQ
ACE C18-300	ACT	300	100	9	BioBasic 18
ACE C8-300	ACT	300	100	5	BioBasic 8
ACE C4-300	ACT	300	100	2.6	BioBasic 4
ACQUITY UPLC™ BEH HILIC	Waters	130	185	–	Hypersil GOLD Silica (1.9 μm)
ACQUITY UPLC HSS C18	Waters	100	230	15	Hypersil GOLD (1.9 μm)
ACQUITY UPLC BEH C18	Waters	130	185	18	Hypersil GOLD (1.9 μm)
ACQUITY UPLC BEH C8	Waters	130	185	13	Hypersil GOLD C8 (1.9 μm)
ACQUITY UPLC BEH Phenyl	Waters	130	185	15	Hypersil GOLD Phenyl (1.9 μm)
ACQUITY UPLC HSS T3	Waters	100	230	11	Hypersil GOLD aQ (1.9 μm)
Aeris PEPTIDE XB-C18	Phenomenex	100	200	–	Accucore 150-C18
Aeris WIDEPOR XB-C18	Phenomenex	200	25	–	Accucore 150-C18
Aeris WIDEPOR XB-C8	Phenomenex	200	25	–	Accucore 150-C4
Aeris WIDEPOR XB-C4	Phenomenex	200	25	–	Accucore 150-C4
Alltima™ HP C18	Grace	190	200	12	Hypersil GOLD
Alltima HP C18 AQ	Grace	100	450	20	Hypersil GOLD aQ
Alltima HP C18 HiLoad	Grace	100	450	24	Synchronis C18
Alltima HP C8	Grace	190	200	8	Hypersil GOLD C8
Alltima HP CN	Grace	190	200	4	Hypersil GOLD CN
Alltima HP Silica	Grace	190	200	–	Hypersil GOLD Silica
Aminex™ HPX42C	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carbohydrate Ca <sup>2+</sup>
Aminex HPX72S	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carbohydrate H <sup>+</sup>
Aminex HPX87C	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carbohydrate Ca <sup>2+</sup>
Aminex HPX87H	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carbohydrate H <sup>+</sup>
Aminex HPX87N	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carbohydrate Na <sup>+</sup>
Aminex HPX87P	Bio-Rad	–	–	–	HyperREZ XP Carbohydrate Pb <sup>2+</sup>
AQUA™ C18	Phenomenex	125	320	15	Hypersil GOLD aQ
Ascentis™ C18	Supelco	100	450	25	Synchronis C18
Ascentis C8	Supelco	100	450	15	Synchronis C8
Ascentis Express C18	Supelco	90	150	–	Accucore C18
Ascentis Express C8	Supelco	90	150	–	Accucore C8
Ascentis Express F5	Supelco	90	150	–	Accucore PFP
Ascentis Express HILIC	Supelco	90	150	–	Accucore HILIC
Ascentis Express Phenyl-Hexyl	Supelco	90	150	–	Accucore Phenyl-Hexyl
Ascentis Express RP-Amide	Supelco	90	150	–	Accucore Polar Premium
Ascentis Express Peptide ES-C18	Supelco	160	80	–	Accucore 150-C18
Ascentis Phenyl	Supelco	100	450	19	Synchronis Phenyl

## 根据厂商选择 LC 色谱柱 (续)

固定相	制造商	孔径 (Å)	表面积 (m <sup>2</sup> /g)	%碳	推荐 Thermo Scientific 替代产品
Atlantis™ dC18	Waters	100	330	12	Acclaim Polar Advantage II
Atlantis T3	Waters	100	300	14	Hypersil GOLD
Atlantis HILIC Silica	Waters	100	300	–	Hypersil GOLD Silica
Atlantis dC18	Waters	100	330	12	Hypersil GOLD aQ
Capcell Core C18	Shiseido	90	150	7	Accucore C18
Capcell Pak C18 AQ	Shiseido	120	300	11	Acclaim Polar Advantage II
Cortecs C18	Waters	90	100	6.6	Accucore C18
Cortecs C18+	Waters	90	100	5.7	Accucore Polar Premium
Cortecs HILIC	Waters	90	100	–	Accucore HILIC
Discovery™ BIO Wide Pore C18	Supelco	300	–	–	BioBasic 18
Discovery BIO Wide Pore C8	Supelco	300	–	–	BioBasic 8
Discovery C18	Supelco	180	200	14	Hypersil GOLD
Discovery C8	Supelco	180	200	–	Hypersil GOLD C8
Discovery Cyano	Supelco	180	200	–	Hypersil GOLD CN
Gemini™ C18	Phenomenex	110	375	14	Hypersil GOLD
Halo C18	AMT	90	150	–	Accucore C18
Halo C8	AMT	90	150	–	Accucore C8
Halo HILIC	AMT	90	150	–	Accucore HILIC
Halo PFP	AMT	90	150	–	Accucore PFP
Halo Phenyl-Hexyl	AMT	90	150	–	Accucore Phenyl-Hexyl
Halo RP-Amide	AMT	90	150	–	Accucore Polar Premium
HALO Peptide ES-C18	AMT	160	80	–	Accucore 150-C18
Inertsil™ C4	GL Sciences	150	320	8	Hypersil GOLD C4
Inertsil C8	GL Sciences	150	320	11	Syncronis C8
Inertsil ODS3V	GL Sciences	100	450	15	Syncronis C18
Inertsil Phenyl	GL Sciences	150	320	10	Syncronis Phenyl
Inertsil Silica	GL Sciences	150	320	–	Syncronis Silica
J'Sphere M80	YMC	80	–	14	Acclaim Polar Advantage II
Jupiter™ C18	Phenomenex	300	170	13	BioBasic 18
Jupiter C4	Phenomenex	300	170	5	BioBasic C4
Kinetex C18	Phenomenex	100	–	12	Accucore C18
Kinetex C8	Phenomenex	100	–	10	Accucore C8
Kinetex HILIC	Phenomenex	100	–	–	Accucore HILIC
Kinetex PFP	Phenomenex	100	–	9	Accucore PFP
Kinetex Phenyl-Hexyl	Phenomenex	100	–	–	Accucore Phenyl-Hexyl
Kinetex XB-C18	Phenomenex	100	–	12	Accucore C18
Kromasil C18	Akzo-Nobel	100	340	19	Syncronis C18
Kromasil C4	Akzo-Nobel	100	340	8	Hypersil GOLD C4
Kromasil Silica	Akzo-Nobel	100	340	–	Syncronis Silica
LiChrospher™ CN	Merck	100	350	7	Hypersil GOLD CN
LiChrospher Diol	Merck	100	350	–	BETASIL Diol
LiChrospher NH <sub>2</sub>	Merck	100	350	5	Syncronis Amino
LiChrospher RP 18	Merck	100	350	21	Syncronis C18
LiChrospher RP-18e	Merck	100	350	22	Syncronis C18
LiChrospher RP-8	Merck	100	350	13	Syncronis C8
LiChrospher RP-8e	Merck	100	350	13	Syncronis C8
Luna™ C18 (2)	Phenomenex	100	400	18	Syncronis C18
Luna C8 (2)	Phenomenex	100	400	14	Syncronis C8
Luna CN	Phenomenex	100	400	–	Hypersil GOLD CN
Luna HILIC	Phenomenex	200	200	5.7	BETASIL Diol
Luna NH <sub>2</sub>	Phenomenex	100	400	10	Syncronis Amino
Luna PFP (2)	Phenomenex	100	400	5.7	Hypersil GOLD PFP

## 根据厂商选择 LC 色谱柱 (续)

固定相	制造商	孔径 (Å)	表面积 (m <sup>2</sup> /g)	%碳	推荐 Thermo Scientific 替代产品
Luna SCX	Phenomenex	100	400	–	BioBasic SCX
Luna Silica (2)	Phenomenex	100	400	–	Synchronis Silica
μBondapak™ C18	Waters	125	330	10	Hypersil GOLD
μBondapak CN	Waters	125	330	–	Hypersil GOLD CN
μBondapak NH <sub>2</sub>	Waters	125	330	4	Hypersil APS-2
μBondapak Phenyl	Waters	125	330	–	Hypersil GOLD Phenyl
Nova-Pak™ (HR) C18	Waters	60	120	7	Hypersil GOLD
Nova-Pak C8	Waters	60	120	–	Hypersil GOLD C8
Nova-Pak CN	Waters	60	120	–	Hypersil GOLD CN
Nova-Pak Phenyl	Waters	60	120	5	Hypersil GOLD Phenyl
Nova-Pak Silica	Waters	60	120	–	Hypersil GOLD Silica
NUCLEODUR™ C18 EC	Macherey-Nagel	110	340	18	Synchronis C18
NUCLEODUR C18 Gravity	Macherey-Nagel	110	340	18	Synchronis C18
NUCLEODUR CN	Macherey-Nagel	110	340	7	Hypersil GOLD CN
NUCLEODUR Pyramid	Macherey-Nagel	110	340	14	Synchronis aQ
Nucleoshell™ RP 18	Macherey-Nagel	90	130	7.5	Accucore C18
Nucleoshell Phenyl-Hexyl	Macherey-Nagel	90	130	4.5	Accucore Phenyl-Hexyl
Nucleoshell PFP	Macherey-Nagel	90	130	3	Accucore PFP
Nucleosil™ 100 C18	Macherey-Nagel	100	350	17	Synchronis C18
Nucleosil 100 C18 AB	Macherey-Nagel	100	350	24	Synchronis C18
Nucleosil 100 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Macherey-Nagel	100	350	–	Synchronis Phenyl
Nucleosil 100 C8	Macherey-Nagel	100	350	9	Synchronis C8
Nucleosil 100 CN	Macherey-Nagel	100	350	–	Hypersil GOLD CN
Nucleosil 100 N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Macherey-Nagel	100	350	–	Hypersil SAX
Nucleosil 100 NH <sub>2</sub>	Macherey-Nagel	100	350	4	Synchronis Amino
Nucleosil 100 OH	Macherey-Nagel	100	350	–	BETASIL Diol
Nucleosil 100 SA	Macherey-Nagel	100	350	7	BioBasic SCX
Nucleosil 100 SB	Macherey-Nagel	100	350	10	Hypersil GOLD SAX
Nucleosil 300 C18	Macherey-Nagel	300	100	7	BioBasic 18
Nucleosil 300 C4	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic 4
Nucleosil 300 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic Phenyl
Nucleosil 300 C8	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic 8
Nucleosil 300 CN	Macherey-Nagel	300	100	–	BioBasic CN
Pinnacle™ C1	Restek	120	170	2	Hypersil SAS
Pinnacle C18	Restek	120	170	10	Hypersil GOLD
Pinnacle C4	Restek	120	170	4	Hypersil GOLD C4
Pinnacle CN	Restek	120	170	5	Hypersil GOLD CN
Pinnacle DB C18	Restek	140	–	11	Hypersil GOLD
Pinnacle DB C18 1.9 μm	Restek	140	–	11	Hypersil GOLD (1.9 μm)
Pinnacle DB C8	Restek	140	–	6	Hypersil GOLD C8
Pinnacle DB Cyano	Restek	140	–	4	Hypersil GOLD CN
Pinnacle DB Phenyl	Restek	140	–	5	Hypersil GOLD Phenyl
Pinnacle IBD	Restek	120	170	–	Hypersil GOLD
Pinnacle NH <sub>2</sub>	Restek	120	170	2	Hypersil GOLD Amino
Pinnacle Phenyl	Restek	120	170	5	Hypersil GOLD Phenyl
Pinnacle SAX	Restek	120	170	3	Hypersil GOLD SAX
Pinnacle Silica	Restek	120	170	–	Hypersil GOLD Silica
Pinnacle Ultra C18	Restek	100	–	20	Synchronis C18
Pinnacle Wide Pore C4	Restek	300	–	2	BioBasic 4
Poroshell™ 120 EC-C18	Agilent	120	120	8	Accucore C18
Poroshell 120 EC-C8	Agilent	120	120	5	Accucore C8
Poroshell 120 SB-C18	Agilent	120	120	7.5	Accucore C18
Poroshell 120 SB-Aq	Agilent	120	130	–	Accucore aQ



## 根据厂商选择 LC 色谱柱 (续)

固定相	制造商	孔径 (Å)	表面积 (m <sup>2</sup> /g)	%碳	推荐 Thermo Scientific 替代产品
Poroshell 120 Phenyl-Hexyl	Agilent	120	130	9	Accucore Phenyl-Hexyl
Poroshell 120 Bonus-RP	Agilent	120	130	9.5	Accucore Polar Premium
Poroshell SB-C18	Agilent	300	45	2.8	Accucore 150-C18
Poroshell Extend-C18	Agilent	300	45	4	Accucore 150-C18
Poroshell 300 SB-C8	Agilent	300	45	1.5	Accucore 150-C4
Poroshell 300 SB-C3	Agilent	300	45	1.1	Accucore 150-C4
Primesep™	SielC	–	–	–	Acclaim 混合机制色谱柱
Prodigy™ C8	Phenomenex	150	310	13	Syncronis C8
Prodigy ODS2	Phenomenex	150	310	18	Syncronis C18
Prodigy ODS-3	Phenomenex	100	450	16	Syncronis C18
Prodigy ODS-3V	Phenomenex	100	450	16	Hypersil GOLD
Prodigy Phenyl-3	Phenomenex	100	450	10	Syncronis Phenyl
Purospher™ RP-18	Merck	60	500	–	Hypersil GOLD
Purospher STAR-8e	Merck	120	300	–	Hypersil GOLD C8
Purospher STAR RP-18e	Merck	120	300	–	Hypersil GOLD
Waters™ Spherisorb™ C1	Waters	80	200	2	Hypersil SAS
Waters Spherisorb C6	Waters	80	200	5	BETASIL C6
Waters Spherisorb C8	Waters	80	200	6	Hypersil GOLD C8
Waters Spherisorb CN	Waters	80	200	3	Hypersil GOLD CN
Waters Spherisorb NH2	Waters	80	200	2	Hypersil APS-2
Waters Spherisorb ODS1	Waters	80	200	6	Hypersil GOLD
Waters Spherisorb ODS2	Waters	80	200	12	Hypersil GOLD
Waters Spherisorb ODSB	Waters	80	200	12	Hypersil GOLD
Waters Spherisorb Phenyl	Waters	80	200	3	Hypersil GOLD Phenyl
Waters Spherisorb SAX	Waters	80	200	–	Hypersil SAX
Waters Spherisorb SCX	Waters	80	200	–	BioBasic SCX
Waters Spherisorb W (硅胶)	Waters	80	200	–	Hypersil GOLD Silica
SunFire™ C18	Waters	90	340	16	Syncronis C18
SunFire C8	Waters	90	340	16	Syncronis C8
SunShell™ C18	ChromaNik	90	150	7	Accucore C18
SunShell C8	ChromaNik	90	150	4.5	Accucore C8
SunShell PFP	ChromaNik	90	150	4.5	Accucore PFP
Supelcosil™ LC-1	Supelco	120	170	–	Hypersil SAS
Supelcosil LC-18	Supelco	120	170	11	Hypersil GOLD
Supelcosil LC-18DB	Supelco	120	170	11	Hypersil GOLD
Supelcosil LC-8	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD C8
Supelcosil LC-CN	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD CN
Supelcosil LC-NH <sub>2</sub>	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD Amino
Supelcosil LC-Si	Supelco	120	170	–	Hypersil GOLD Silica
Symmetry™ C18	Waters	100	335	19	Syncronis C18
Symmetry C8	Waters	100	335	12	Syncronis C8
Synergi™ Hydro-RP	Phenomenex	80	475	19	Syncronis aQ
TSKgel™ G2000SW (incl XL)	Tosoh	125	–	–	BioBasic SEC 120
TSKgel Octyl-80TS	Tosoh	80	200	11	Hypersil GOLD C8
TSKgel ODS-120A	Tosoh	120	200	22	Hypersil GOLD
TSKgel ODS-120T	Tosoh	120	200	22	Syncronis C18
TSKgel ODS-80TM	Tosoh	80	200	15	Hypersil GOLD
TSKgel Super Octyl	Tosoh	110	–	5	Hypersil GOLD C8
TSKgel Super ODS	Tosoh	110	–	8	Hypersil GOLD
TSKgel Super Phenyl	Tosoh	110	–	3	Hypersil GOLD Phenyl
TSKgel SuperSW3000	Tosoh	250	–	–	BioBasic SEC 300

## 根据厂商选择 LC 色谱柱 (续)

固定相	制造商	孔径 (Å)	表面积 (m <sup>2</sup> /g)	%碳	推荐 Thermo Scientific 替代产品
Vydac™ 201SP C18	Grace	90	–	–	Hypersil GOLD
Vydac 201SP Selectapore 90M C18	Grace	90	250	–	Hypersil GOLD
Vydac 201TP C18	Grace	300	–	–	BioBasic 18
Vydac 202TP C18	Grace	300	–	–	BioBasic 18
Vydac 208TP C8	Grace	300	–	–	BioBasic 8
Vydac 214TP	Grace	300	–	–	BioBasic 4
Vydac 218TP	Grace	300	–	–	BioBasic 18
Vydac 218WP Selectapore 300M C18	Grace	300	70	–	BioBasic 18
XBridge™ C18	Waters	–	–	–	Hypersil GOLD
XBridge C8	Waters	–	–	–	Hypersil GOLD C8
XBridge HILIC	Waters	130	185	–	Hypersil GOLD Silica
XBridge Phenyl	Waters	–	–	–	Hypersil GOLD Phenyl
XTerra™ MS C18	Waters	125	180	16	Hypersil GOLD
XTerra MS C8	Waters	125	180	12	Hypersil GOLD C8
YMCbasic™	YMC	–	–	–	Hypersil GOLD C8
YMC-Pack™ C4	YMC	120	300	7	HyPURITY C4
YMC-Pack C8	YMC	120	300	10	Acclaim C8
YMC-Pack CN	YMC	120	300	7	Hypersil GOLD CN
YMC-Pack Diol	YMC	120	300	–	BETASIL Diol
YMC-Pack NH <sub>2</sub>	YMC	120	–	–	Hypersil GOLD Amino
YMC-Pack ODS AQ	YMC	120	300	16	Synconis aQ
YMC-Pack ODS-A	YMC	120	300	17	Synconis C18
YMC-Pack ODS-A	YMC	300	150	6	BioBasic 18
YMC-Pack Phenyl	YMC	120	300	9	Synconis Phenyl
YMC-Pack Pro C18	YMC	120	350	16	Synconis C18
YMC-Pack Silica	YMC	120	–	–	Synconis Silica
YMC-Pack TMS (C1)	YMC	120	300	4	BETASIL C1
Zorbax™ Eclipse XDB C18	Agilent	80	180	10	Hypersil GOLD
Zorbax Eclipse XDB C8	Agilent	80	180	8	Hypersil GOLD C8
Zorbax Eclipse XDB Phenyl	Agilent	80	180	8	Hypersil GOLD Phenyl
Zorbax Eclipse Plus C18	Agilent	95	160	8	Hypersil GOLD
Zorbax Eclipse Plus C8	Agilent	95	160	6	Hypersil GOLD C8
Zorbax RRHT Eclipse Plus C18	Agilent	95	160	8	Hypersil GOLD (1.9 μm)
Zorbax RRHT Eclipse Plus C8	Agilent	95	160	6	Hypersil GOLD C8 (1.9 μm)
Zorbax RRHT Eclipse XDB-C18	Agilent	80	180	10	Hypersil GOLD (1.9 μm)
Zorbax RRHT Eclipse XDB-C8	Agilent	80	180	7.5	Hypersil GOLD C8 (1.9 μm)
Zorbax RRHT SB-CN	Agilent	80	180	4	Hypersil GOLD CN (1.9 μm)
Zorbax SB Aq	Agilent	80	180	–	Hypersil GOLD aQ
Zorbax SB C18	Agilent	80	180	10	Hypersil GOLD
Zorbax SB C18	Agilent	300	45	3	BioBasic 18
Zorbax SB C8	Agilent	80	180	6	Hypersil GOLD C8
Zorbax SB C8	Agilent	300	45	2	BioBasic 8
Zorbax SB CN	Agilent	80	180	4	Hypersil GOLD CN
Zorbax SB Phenyl	Agilent	80	180	6	Hypersil GOLD Phenyl

# 快速 LC 原理

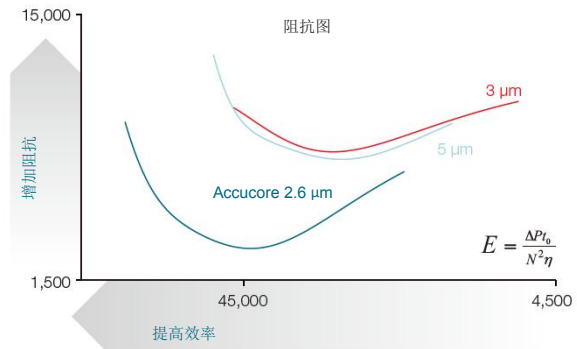
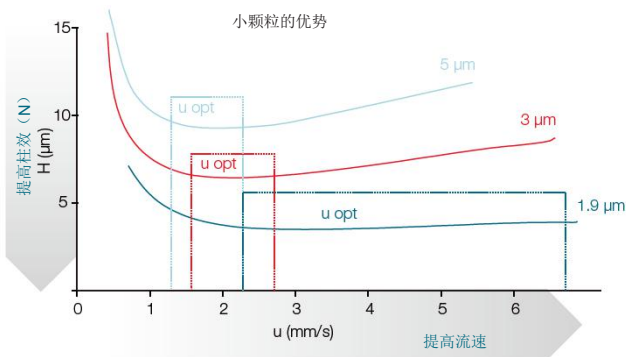
## 粒径和类型的影响

众所周知，填料粒径较小的色谱柱在较宽的流速范围内会比粒径较大的色谱柱产生更高的柱效，如下图所示。

小粒径颗粒的替代方法是 Accucore HPLC 色谱柱中使用的实心核增强型技术。如以下阻抗图所示，与填充 5 μm 或 3 μm 颗粒的色谱柱相比，Accucore 色谱柱在更短的时间内产生更高的柱效，且在低背压下产生更高的柱效。

$$E = \frac{\Delta P t_0}{N^2 \eta}$$

- E 阻抗
- ΔP 背压
- t<sub>0</sub> 未保留峰的保留时间
- N 柱效
- η 流动相粘度



## 速度和分离度

通用色谱分离度公式表明，分离度与柱效成正比。较宽流速范围内较高的柱效意味着可以使用更短的色谱柱和/或更快的流速来提高分离速度，而不影响分离度。

根据分离度公式还可知，各种不同的键合相（提供不同的选择性）是提高分离度的有效方法。

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(a-1)}{a} \sqrt{N} \frac{k'}{1+k'}$$

- a 选择性
- N 柱效
- k' 容量因子

## 峰容量

高效色谱柱可作为加快分析的替代方法，其提供的出色分离度还可通过增加峰容量（指定梯度时间内可分离的峰数）来改善复杂分离。

$$n_c = 1 + \left(\frac{t_g}{W}\right)$$

- n<sub>c</sub> 峰容量
- t<sub>g</sub> 梯度时间
- W 峰宽（10% 高度）

## 灵敏度

根据以下公式可知，通过增加峰浓度来增加检测器的信噪比可以提高高效分离的灵敏度。

$$C_{max} \propto \frac{\sqrt{N} V_i}{L d_c^2 (1+k')}$$

- C<sub>max</sub> 峰浓度
- N 柱效
- V<sub>i</sub> 进样量
- L 柱长
- d<sub>c</sub> 柱内径
- k' 容量因子

## 微型化

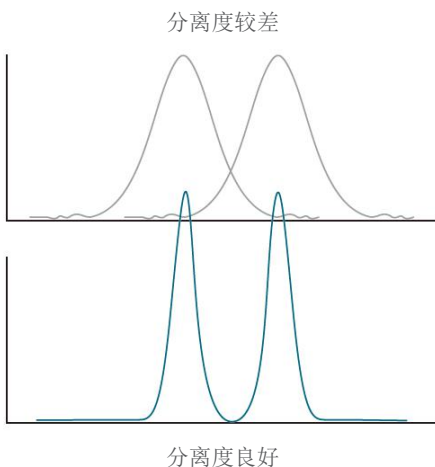
通过灵敏度公式还可知，使用较短的色谱柱（更重要的是使用较窄的柱内径）可以提高峰浓度。

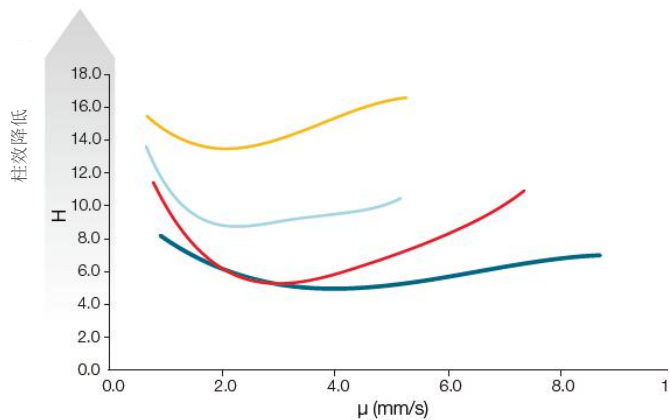
将方法转移到不同柱管上使用时，必须调整以下参数：

- 流速
- 进样量
- 梯度曲线

## 优化

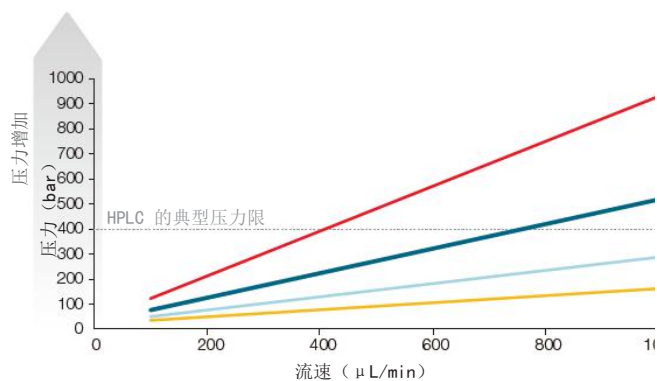
为了保持高柱效、分离度和灵敏度，应对所使用的 HPLC 系统进行优化，减少导致峰扩展的因素。





全多孔, 5  $\mu\text{m}$   
 全多孔, 3  $\mu\text{m}$   
 全多孔, <2  $\mu\text{m}$   
 Accucore RP-MS 2.6  $\mu\text{m}$

Accucore HPLC 色谱柱比 5  $\mu\text{m}$  和 3  $\mu\text{m}$  色谱柱柱效更高。



全多孔, 5  $\mu\text{m}$   
 全多孔, 3  $\mu\text{m}$   
 全多孔, <2  $\mu\text{m}$   
 Accucore RP-MS 2.6  $\mu\text{m}$

色谱柱规格: 100 x 2.1mm

Accucore HPLC 色谱柱在没有过高背压的情况下实现了这一柱效

#### Accucore 2.6 $\mu\text{m}$ HPLC 色谱柱最佳色谱条件和额定值

色谱柱内径 (mm)	最佳流速	最大进样量	背压额定值	温度额定值
2.1	400 $\mu\text{L}/\text{min}$	1 $\mu\text{L}$	1000 bar	70 $^{\circ}\text{C}$
3.0	800 $\mu\text{L}/\text{min}$	3 $\mu\text{L}$	1000 bar	70 $^{\circ}\text{C}$
4.6	1800 $\mu\text{L}/\text{min}$	5 $\mu\text{L}$	1000 bar	70 $^{\circ}\text{C}$



# LC 技术信息

## 方法转移至 Accucore 2.6 $\mu\text{m}$ 色谱柱

含 2.6  $\mu\text{m}$  粒径的固体实心颗粒，粒径分布非常窄；Accucore HPLC 色谱柱可实现高速、高分离度分离，背压明显低于 2  $\mu\text{m}$  以下的全多孔颗粒色谱柱。

将方法从常规 HPLC 转移到固体实心色谱柱上时，可以根据分析需求采取几种方法。如果保留色谱柱尺寸，改变颗粒特征、设计和粒径，那么可以提高柱效，从而提高灵敏度、分离度和峰容量。第二种方法是同时改变颗粒特征和色谱柱尺寸，从而进一步缩短分析时间，提高灵敏度。

了解一些实际计算有助于实现正确缩放，并维持原始方法和转移方法一致的测定曲线。当使用填充 2  $\mu\text{m}$  以下全多孔颗粒（例如 Hypersil GOLD 1.9  $\mu\text{m}$  和 Synchronis 1.7  $\mu\text{m}$ ）的色谱柱将常规 HPLC 分析方法转换为 UHPLC 方法时，可以使用相同的方法。

将方法转移到不同粒径的较短色谱柱上时，有三个主要步骤：缩放流速、调节进样量以及调节梯度曲线。详述如下。\*

### 1. 缩放流速

为了在转移方法时保持等效分离，重要的是使原始方法和新方法之间的线速度保持恒定。线速度与流速、柱内径和粒径有关。可以推导出一个简单的公式来计算新方法所需的流速 ( $F_2$ )。同时，针对粒度进行了标准化，如下所示。

$$F_2 = F_1 \times (d_{c2}^2 / d_{c1}^2) \times (d_{p1} / d_{p2})$$

$F_1$  – 原始流速 (mL/min)

$d_{c1}$  – 原始柱内径 (mm)

$d_{p1}$  – 原始柱粒径 ( $\mu\text{m}$ )

$d_{c2}$  – 新柱内径 (mm)

$d_{p2}$  – 新柱粒径 ( $\mu\text{m}$ )

### 2. 调节进样量

由于通常将 3  $\mu\text{m}$  以下固体实心柱的方法转移到较小体积的色谱柱上，因此相同进样量将占据大部分新色谱柱，从而可能导致谱带展宽或色谱柱过载。因此，缩小进样量以匹配色谱柱体积的变化非常重要。可以使用一个简单的公式来计算新方法的进样量 ( $V_{i2}$ )。

$$V_{i2} = V_{i1} \times (d_{c2}^2 \times L_2 / d_{c1}^2 \times L_1)$$

$V_{i1}$  – 原始进样量 ( $\mu\text{L}$ )

$d_{c1}$  – 原始柱内径 (mm)

$L_1$  – 原始柱长 (mm)

$V_{i2}$  – 新进样量 ( $\mu\text{L}$ )

$d_{c2}$  – 新柱内径 (mm)

$L_2$  – 新柱长 (mm)

### 3. 调节梯度

梯度转移需要计算原始方法各个时间段（时间间隔）使用的流动相柱体积数，确保新色谱柱的新计算梯度使用相同量的柱体积。

梯度上的每个时间段都应执行以下计算，包括色谱柱重新平衡。涉及的参数包括色谱柱空隙体积 ( $V_c$ ，使用下述公式进行计算)、原始方法中的流速和新方法中的流速（使用上述步骤 1 进行计算）以及原始方法中的时间段。

$$t_{g2} = t_{g1} \times (V_{c2} / V_{c1}) \times (F_1 / F_2)$$

$t_{g1}$  – 原始梯度中的时间段 (min)

$t_{g2}$  – 新梯度中的时间段 (min)

$V_{c1}$  – 原始色谱柱空隙体积 (mL)

$V_{c2}$  – 新色谱柱空隙体积 (mL)

$F_1$  – 原始流速 (mL/min)

$F_2$  – 新流速 (mL/min)

色谱柱空隙体积是指固定相未占据的体积（约为色谱柱体积的 68%）：

$$V_c = 0.68 \times p \times r^2 \times L$$

$V_c$  – 柱体积 (mL)

$L$  – 柱长 (cm)

$r$  – 柱半径 (cm)

下表说明了按照上述步骤 1-3 转移方法的示例：

色谱柱: Fully porous 5 $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm		色谱柱: Accucore RP-MS 2.6 $\mu\text{m}$ , 100 x 2.1 mm		色谱柱: Accucore RP-MS 2.6 $\mu\text{m}$ , 50 x 2.1 mm	
流速 (mL/min)	1.00	流速 (mL/min)	0.4	流速 (mL/min)	0.4
进样量 ( $\mu\text{L}$ )	1	进样量 ( $\mu\text{L}$ )	1.4	进样量 ( $\mu\text{L}$ )	0.7
梯度时间 (min)	%B	梯度时间 (min)	%B	梯度时间 (min)	%B
0.0	35.0	0.0	35.0	0.0	35.0
10.0	60.0	3.5	60.0	1.7	60.0
11.0	35.0	3.8	35.0	1.9	35.0
17.0	35.0	6.0	35.0	3.0	35.0
背压	59	背压	218	背压	120
分辨率	2.6	分辨率	2.5	分辨率	1.5
运行时间 (min)	17.0	运行时间 (min)	6.0	运行时间 (min)	3.0
溶剂用量 (mL)	17	溶剂用量 (mL)	2.4	溶剂用量 (mL)	1.2

从 HPLC (150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  色谱柱) 到 Accucore (100 x 2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$  和 50 x 2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$  色谱柱) 的方法转移条件。

### 系统注意事项

为了使用快速色谱法获得最佳数据，至关重要是优化 LC 仪器系统，使其在这些条件下运行。运行分析时，所有系统组件都应考虑在内。必须尽可能缩小系统体积（连接管的内径和长度、进样体积、UV 中的流通池体积），仔细选择检测器时间常数和采样速率。运行快速梯度时，需要尽可能降低泵的驻留体积。

### 尽可能减小系统体积

系统体积过大会导致谱带展宽，对色谱性能产生不利影响。这可能是由色谱柱、自动进样器、将色谱柱连接至进样器和检测器以及检测器流通池内部的管路引起的。柱外效应对于按比例缩小进行分离（因柱体积减小）和低保留峰来说变得更加重要。低保留峰具有较低的峰体积，这对于尽可能减少柱外分散来说至关重要。

### 检测器采样速率

基于 1.9  $\mu\text{m}$  颗粒，可以优化操作参数以进行快速分析。使色谱法变窄，可以为 1-2 秒或更短。重要的是，必须以足够快的速度扫描检测器（无论是 UV 还是 MS），获得最佳峰识别度，否则会影响分离度、柱效和分析准确性。

### 驻留体积

当使用快速梯度运行高速分析时，HPLC 泵的驻留体积至关重要，尤其当使用小颗粒填充柱进行高通量分离时。这是因为泵驻留体积会影响梯度到达柱头所需的时间。当考虑使用 0.4 mL/min 流速和 1 min 快速梯度方法时，理论梯度立即到达色谱柱。驻留体积为 65  $\mu\text{L}$  的泵将在 9.75 s 内使梯度到达色谱柱。驻留体积为 800  $\mu\text{L}$  的传统四元泵需要 2 min 才能使梯度到达色谱柱。当运行快速梯度时，该泵速度太慢，有必要在梯度结束时引入等度以洗脱分析物。





# 缩小方法

## 缩小 HPLC 或 LC-MS 方法的理由

在某些应用中，需要按比例缩小方法而不是将方法转移到 UHPLC。可能是为了：

- 尽可能提高小样品量样品的检测灵敏度
- 使流速与 MS 检测电离技术兼容
- 减少溶剂消耗，降低成本

## 将方法转移到较窄的色谱柱上

将方法从 UV 转移到 MS 检测上时，或只有极少量样品时（例如药物发现或蛋白质组学分析），可能需要通过减小柱内径来减小分离规模。在第一种情况下，电离技术或离子源设计决定了最佳流速范围（参见上表），在后一种情况下，由于溶质在更集中的色谱带中洗脱，因此方法的灵敏度最高。

如果所有其他方法参数（柱长和粒径、色谱柱化学填料、流动相组成、梯度范围和时间、分离温度）保持不变，改用较窄的色谱柱时，仅需调整流速即可。

$$F_2 = F_1 \times (d_{c2}/d_{c1})^2$$

$F_1$  – 原始流速（降低）

$F_2$  – 新流速

$d_{c1}$  – 原始柱内径

$d_{c2}$  – 新柱内径

适用于等度和梯度方法。新方法色谱图应具有相同分离度和运行时间。保留时间和分离度的微小变化通常是由系统驻留时间引起的（讨论如下所述）。

## 分析型、窄孔、毛细管和纳米孔色谱柱的典型流速（5 μm 粒径）

柱内径 (mm)	流速范围 (μL/min)	最佳流速 <sup>1</sup> (μL/min)	推荐进样量 <sup>2</sup> (μL)	API 离子源
4.6	1000 – 1500	1250	30	APCI 或 High flow ESI
3.0	400 – 600	500	10	APCI 或 High flow ESI
2.1	200 – 300	250	5	APCI 或 Micro-ESI
1.0	40 – 60	50	1	Micro-ESI
0.5	10 – 25	12	0.35	Micro-ESI
0.32	4 – 10	5	0.15	Micro-ESI
0.18	1 – 3	2	0.05	Micro-ESI
0.1	0.4 – 1	0.5	0.015	Nanospray
0.075	0.2 – 0.5	0.3	0.01	Nanospray

1. 推荐提供良好的柱效和适度的压力。较高的流速可能导致出现色谱柱空隙。建议使用较低的流速清洗柱床或更换溶剂。

2. 基于与流动相相同的样品溶剂的可忽略效率损失和等度洗脱进行评估。在梯度条件下或使用较弱的样品溶剂时，可以引入较大的体积。

## 将方法转移到较窄的色谱柱上

在梯度洗脱中，减少方法循环时间的最简单方法是缩短柱长。如果所有其他方法参数（柱内径和粒径、色谱柱化学填料、流动相组成、梯度范围、流速、分离温度）保持不变，那么唯一的要求是使用以下公式更改梯度时间，其中梯度时间的缩短与柱体积的减少相同。

$$t_{g1}/V_{c1} = t_{g2}/V_{c2}$$

$t_{g1}$  – 原始方法中的梯度时间 (min)

$t_{g2}$  – 新方法中的梯度时间 (min)

$V_{c1}$  – 原始柱体积 (mL)

$V_{c2}$  – 新柱体积 (mL)

使用以下参数评估柱体积  $V_c$  (mL)：

$$V_c = 0.68 \times \pi \times r^2 \times L$$

$V_c$  – 柱体积 (mL)

$L$  – 柱长 (cm)

$r$  – 柱半径 (cm)

## 驻留体积

当按比例缩小方法时，驻留体积与将方法转移至 UHPLC 同等重要。当在低流速下使用窄柱时，驻留体积对分离的影响更为明显。例如，如果系统的驻留体积为 2.0 mL，4.6 mm 内径色谱柱以 1 mL/min 的速度运行时，梯度需要 2 min 才能到达柱头。但是，如果使用 2.1 mm 内径色谱柱和 0.4 mL/min 的流速，那么梯度需要 5 min 才能到达色谱柱。当使用小体积色谱柱进行高通量梯度分离时，驻留体积会增加运行时间，导致运行之间的重新平衡时间延长。

可通过以下方法尽可能减少这些影响：

- 选择使用梯度延迟体积较小的泵（例如，Thermo Scientific Accela 高速液相色谱系统的延迟体积仅为 65 μL）；
- 延迟进样，直到梯度到达柱头为止；
- 提高泵流速，并在到达色谱柱之前分流。

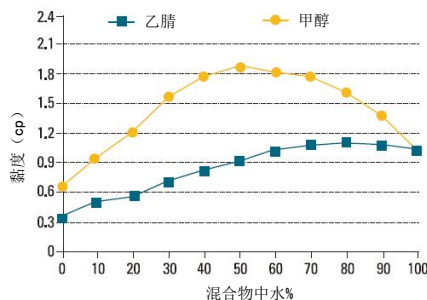
# 放大方法

## 放大 HPLC 方法的理由

- 增加方法容量
- 分离和纯化目标化合物
- 提高样品通量

分析方法可能需要按比例放大至制备规模，才能分离和纯化混合物中的化合物。在为您的制备应用选择最佳色谱柱和填料时，需考虑介质的选择性和载量以及色谱柱尺寸，以最快或最经济地获得所需结果。我们在生产和销售高品质制备型硅胶和键合相方面享有很高的声誉，便于提供与我们流行的分析用硅胶产品系列（如 Thermo Scientific Hypersil 相）相同的性能和重现性。

当转移小粒径填料分析柱方法时，按比例放大方法最容易，该填料与较大粒径制备型填料具有相同的选择性。领先的 Thermo Scientific 相系列产品提供多种尺寸，便于补充实验室规模操作并帮助将方法扩大至制备型色谱上。Scout 色谱柱（通常为 250 x 4.6 mm，含目标填料）也可用于分离。一旦在较小的色谱柱上确定了方法，就可以使用缩放系数了。



流动相粘度随组成发生变化

## 放大至制备型色谱柱

仅当改变柱内径时，才需要按比例缩放流速和柱载量。流速缩放允许峰保留时间在不同柱内径之间保持相对恒定。流经色谱柱的典型溶剂流速取决于柱内径和柱填料的粒径。该缩放比例还可以用于评估指定色谱柱的负载量。假设柱长是一个常数，可以通过以下公式计算缩放比例：

$$\text{缩放系数} = d_{c2}^2 / d_{c1}^2$$

$d_{c1}$  – 原始柱内径 (mm)

$d_{c2}$  – 新柱内径 (mm)

可以使用该系数计算新的大内径色谱柱所需的柱载量和流速。

## 柱背压

色谱柱背压受柱长、内径、介质粒径、温度、溶剂性质和溶剂流速的影响。也可能受所使用梯度的影响，其中压力可能随溶剂组成而变化。可通过以下公式计算色谱柱或小柱的典型工作背压：

$$\text{压力 (atm)} = \frac{2.1 \times \Phi \times L \times h}{d_p^2 \times d^2}$$

$\Phi$  = 柱阻抗

(4.6 mm ID 色谱柱为 1000)

$L$  = 柱长 (mm)

$d_p$  = 粒径 ( $\mu\text{m}$ )

$d$  = 柱直径 (mm)

$h$  = 流动性粘度 (厘泊)

流动相粘度随组成而变化。上述示图显示了水粘度如何随添加甲醇或乙腈而变化。就所使用的色谱仪器而言，这种可变性是尽可能提高通量的关键因素。



## 选择基质

选择制备分离所需的基质很重要。选择粒径分布窄的基质为高效色谱柱提供较低的后压，因为没有“细粉”阻塞玻璃料或阻碍流动。Thermo Scientific 制备柱中显而易见的现象是，孔径分布狭窄的均匀球形颗粒提供了可重现的性能和更长的柱寿命。多种粒径基质为选择性可控的放大应用提供了多种选择。我们为制备型基质提供了多种粒径选择，可根据您的应用量身定制。

## 高负载和高保留—HyperPrep HS

具有较大表面积的材料可以提供更高的负载量。必须充分考虑各种因素来尽可能提高表面积，尤其是颗粒孔径和孔体积。孔体积太大会影响柱床的稳定性和坚固性，孔径太小会影响传质，降低柱效。高表面积可提高极性化合物的保留能力。较高的碳载量可提高相的坚固和稳定性。有关 Thermo Scientific HyperPrep 色谱柱和基质的更多信息，请联系技术支持获取。

## 峰形—Hypersil GOLD 基质

研究证实，分析型 HPLC 使用基于高纯硅胶的填料可改善峰形。我们高度开发且可重现的生产工艺可确保我们领先的分析品牌 Hypersil GOLD 基质提供适用于制备型 LC 的多种粒径，而不影响性能。

## 极性化合物和异构体—Hypercarb 色谱柱，Hypersil GOLD aQ

通常，在分离极性非常强的化合物时，实现足够的保留可能是一种挑战。我们能够提供多种选择来克服这一常见问题：Hypersil GOLD aQ 上的极性封端提供了受控的相互作用机制，通过该机制保留中等极性化合物。Hypersil GOLD AX 可在 HILIC 模式下用于保留极性化合物。Hypercarb 色谱柱在反相 LC 中为 C18 提供了真正的正交选择性，可用于保留高极性化合物。Hypercarb 色谱柱还可用于分离关系非常紧密的化合物，包括几何异构体和位置异构体。

## 多肽和蛋白质 - BioBasic 和 Hypersil GOLD 基质

在分析多肽时，正确选择填料变得越来越重要。在确定用于分析多肽混合物的填料孔径时，必须考虑多肽的分子量和疏水性。我们提供的多种硅胶产品可使用 100-300Å 孔径范围内的填料获得最佳色谱分离。一般原则是，使用较小孔体积的基质（例如 Hypersil GOLD 介质）分析 2000 道尔顿以下分子量的亲水性多肽。高于该分子量时，进入小孔的通道会受到限制，分离效率降低。对于分子量大于 2000 的疏水性多肽，建议使用 300Å 基质，例如 Thermo Scientific BioBasic。若要分离小型或亲水性多肽，则使用 100Å 材料（例如 HyperPrep HS）获得更好的分离度。



# HPLC 定义和公式

## 背压

流动相泵送至色谱柱所需的压力。通过以下公式可知，其与流动相粘度 ( $\eta$ )、流速 ( $F$ )、柱长 ( $L$ )、直径 ( $d_c$ ) 以及粒径 ( $d_p$ ) 有关:

$$\text{压降 (psi)} = \frac{250 L \eta F}{d_p^2 d_c^2}$$

$L$  = 柱长 (cm)

$\eta$  = 粘度

$F$  = 流速 (mL/min)

$d_p$  = 粒径 ( $\mu\text{m}$ )

$d_c$  = 柱内径 (cm)

## 容量因子 ( $k$ )

表示分析物相对于未保留峰的保留程度，其中  $t_R$  是样品峰的保留时间， $t_0$  是未保留峰的保留时间。容量因子将有助于确定保留偏移是由色谱柱 (容量因子随保留时间而变化) 还是系统 (容量因子随保留时间保持恒定) 引起的。

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

## 柱效 ( $N$ )

也就是理论塔板数。通过各种方法测定的峰带扩展，其中一些方法可以非常灵敏地检测峰不对称性。此处显示最常见的，最先显示对峰形最灵敏的那些:

**5-Sigma**       $N = 25(t_R/W)^2$   
                   $W = 4.4\%$  峰高处的峰宽

**4-Sigma**       $N = 16(t_R/W)^2$   
**或切向峰**     $W = 13.4\%$  峰高处的切向峰宽

**半峰高**       $N = 5.54(t_R/W)^2$   
                   $W = 50\%$  峰高处的峰宽

## 洗脱体积 ( $V_R$ )

指将溶质从色谱柱上洗脱下来所需的流动相体积 (从最高浓度峰尖处)。

$$V_R = F \cdot t_R$$

其中  $F$  是流速 (单位为体积/时间)， $t_R$  是目标峰的保留时间。

## HETP

高度等同于理论板。根据蒸馏理论的残留: 衡量柱效的方法。对于填料为  $5 \mu\text{m}$  颗粒并且填充良好的典型 HPLC 色谱柱，HETP (或  $H$ ) 值通常在  $0.01$ - $0.03 \text{ mm}$  之间。

$$\text{HETP} = L/N$$

其中  $L$  是柱长 (mm)， $N$  是理论塔板数。

## 线速度

通过柱截面归一化流速。线速度会影响色谱柱性能，并与柱压直接相关。可通过以下公式测定，其中  $L$  是柱长， $t_0$  是未保留峰的保留时间:

$$\mu = \frac{L}{t_0}$$

## 分离度 ( $R_s$ )

色谱柱分离色谱峰的能力。可以通过增加柱长、减小粒径、调节温度、更换洗脱液或固定相来提高分离度。

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

也可以用两个峰的顶点间距除以峰的切线宽度平均值来表示:

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{0.5(W_1 + W_2)}$$

## 选择性 ( $\alpha$ )

它是一个热力学因子，是指通过固定相和流动相组成固定的两种物质的相对保留量。其中  $k_1$  和  $k_2$  是各自的容量因子。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

## 拖尾因子 ( $T$ )

是指峰对称性的测量值，通过以下公式计算，其中  $W_{0.05}$  是  $5\%$  高度时的峰宽， $f$  是从峰尖到  $5\%$  高度时的顶点距离。理想情况下，峰形应为高斯分布或完全对称。

$$T = W_{0.05}/2f$$

## 范德姆特方程

用于解释色谱中谱带展宽的方程。该方程表示理论板的高度等效值 ( $H$ )，含有三项。 $A$  为描述涡流扩散，它允许溶质在穿过不同粒径大小时遵循不同的路径。

$B$  是指流经色谱柱时溶质的分子扩散或纵向扩散作用。 $C$  是指传质作用，它允许溶质在固定相和流动相之间进行有限传质。 $u$  是流动相流经色谱柱的线速度。

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

## 选择正确的缓冲液

通用缓冲液系统表中列出了部分通用缓冲液及其相应 pH 值。最常见的 HPLC 缓冲液或许是某种形式的磷酸。请注意，当在不同 pH 值下引入样品时，真正的缓冲液应具有耐受 pH 改变的能力，并且缓冲液的容量仅在酸或碱的 pK 值下为 100%。pH 值为 4 时，磷酸盐是一种较弱的缓冲液，如果引入更多的酸或碱性样品，磷酸盐将迅速偏向其中一个 pKa 值。

通常，应在缓冲液 pKa 值的  $\pm 1$  pH 单位内运行分析，以较好地控制流动相的 pH 值。HPLC 的适当缓冲液浓度通常为 10-100 毫摩尔水平，具体取决于样品的大小和性质以及色谱柱填料。相比传统填料，基于高纯硅胶且键合牢固的固定相（例如 Hypersil GOLD 系列）通常与稀缓冲液的兼容性更大。

当需要控制在较低 pH（2-3）值下时，通常使用磷酸盐或极性更强的有机酸，例如 TFA 或乙酸。如果希望将 pH 值控制在 4-5，则应考虑使用有机酸缓冲液（例如乙酸盐或柠檬酸盐）代替磷酸盐。

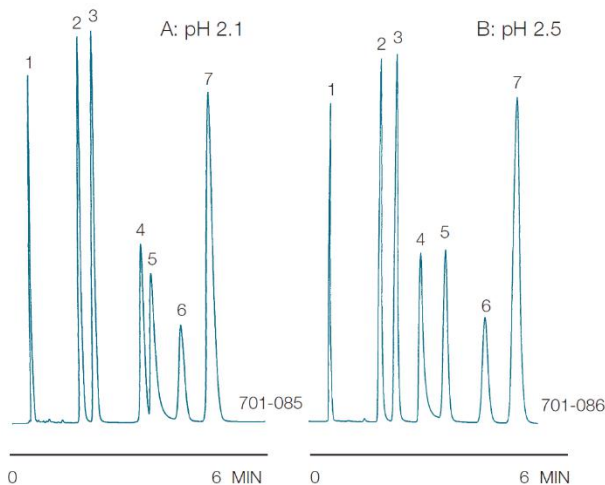
右图显示了选择适合 pH 值进行分离的重要性。由于测量误差、泵的混合复杂性或大气中水在流动相中的吸附等原因，即使 pH 值发生微小变化，如果没有添加适合的缓冲液，也会导致方法改变。

选择缓冲液和有机改性剂混合物时应格外小心，确保两者的溶液均不会产生固体盐（固体盐可能导致堵塞和系统污染）。

使用后应及时冲洗分析柱和仪器中的缓冲液，避免缓冲盐沉积在精致玻璃料等上。

### 常用缓冲液系统

缓冲液	pK <sub>a</sub>	pH 使用范围	MS 兼容性	
TFA	0.30		是	
磷酸盐	pK <sub>1</sub>	2.1	1.1 – 3.1	否
	pK <sub>2</sub>	7.2	6.2 – 8.2	否
	pK <sub>3</sub>	12.3	11.3 – 13.3	否
柠檬酸盐	pK <sub>1</sub>	3.1	2.1 – 4.1	否
	pK <sub>2</sub>	4.7	3.7 – 5.7	否
	pK <sub>3</sub>	5.4	4.4 – 6.4	否
甲酸盐	3.8	2.8 – 4.8	是	
甲羟孕酮	4.8	3.8 – 5.8	是	
Tris Base (Trizma, THAM)	8.3	7.3 – 9.3	是	
氨	9.2	8.2 – 10.2	是	
硼酸盐	9.2	8.2 – 10.2	否	
二乙胺	10.5	9.5 – 11.5	是	
碳酸盐	pK <sub>1</sub>	6.4	5.4 – 7.4	是
	pK <sub>2</sub>	10.3	9.3 – 11.3	是
三乙醇胺	7.80		是	



BETASIL C18, 5 $\mu$ m, 50 x 4.6 mm	
部件号:	70105-054630
洗脱液:	50% ACN / 50% 25 mm KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 在指示 pH 值下
流速:	0.8mL/min
检测器:	UV @ 220nm
样品:	1. 尿嘧啶 2. 托美丁 3. 萘普生 4. 非诺洛芬 5. 二氟尼柳 6. 吡哌美辛 7. 布洛芬

pH 值的微小变化对轻度电离化合物分离的影响

## LC-MS 分析的缓冲液选择

缓冲液的选择将取决于所用分析物类别和仪器。理想情况下，LC-MS 分析应使用挥发性缓冲剂，避免在离子源上形成污染性沉积物。应避免使用无机酸、非挥发性缓冲液和离子对试剂。典型的 LC/MS 缓冲液包括：

- 乙酸铵/甲酸酯/碳酸氢铵 (<50 mm)
- 甲酸/乙酸 (0.01 – 1% v/v)
- 三氟乙酸 (<0.1% v/v)
- 三烷基胺 (<0.1% v/v) 和氨水型碱
- TRIS
- BIS-TRIS 丙烷

**注意：** LC-MS 仪器 Thermo Scientific Surveyor MSQ LC-MS 等均具有自清洁机制，可减少常规使用过程中在离子源上形成无机缓冲盐沉积物的可能性。但仍应注意切勿过度污染仪器离子源，否则将影响操作。

# 流动相的制备

制备适合的流动性对于分析来说至关重要，可节省大量时间来解决杂峰、基线噪声等问题。

## 质量

所有试剂和溶剂均应具有最高品质。HPLC 级试剂的成本可能会比低级试剂稍高，但纯度差异明显。HPLC 级试剂不含杂质，不会在色谱图基线上产生伪峰，而较低级试剂含痕量杂质，可能产生伪基线峰。因此，应确保缓冲液制备中使用的水为最高纯度的水。去离子水通常含有微量有机化合物，不建议用于 HPLC 分析。通过将去离子水流过离子交换床，制备超纯 HPLC 水（电阻率为 18mW）。现代净水仪器通过这一机制生产大量品质适合的水。也可以优先考虑从溶剂供应商处购买 HPLC 级水。

重要提示：切勿将 HPLC 级水存储在塑料容器中。塑料中的添加剂可能会浸入水中并导致污染。应始终将 HPLC 级水存储在玻璃容器中。

## 缓冲液

所有缓冲液都应在使用当天制备，以确保缓冲液的 pH 值不受长时间保存的影响，并且不存在微生物生长。pH 值的变化和微生物生长会影响色谱分析。

如果使用存储缓冲液，请留意它们的使用期限。有关缓冲液保质期的更多指南，请参阅药典专论或类似资料。

缓冲剂可以含焦亚硫酸钠等稳定剂。这些稳定剂通常会影响缓冲液的光学和色谱行为，因此通常购买不含稳定剂的试剂。固体试剂容器反复使用易受污染。因此，我们建议购买低容量试剂。

## 过滤

理想情况下，所有 HPLC 溶剂使用前都应通过 0.45 μm 过滤器过滤，去除可能引起堵塞的颗粒物。过滤后，溶剂应储存在加盖容器中，防止灰尘等再次污染。

过滤 HPLC 溶剂将有利于色谱分离并避免 HPLC 系统磨损。泵柱塞、密封件和止回阀的性能会更好，使用寿命也将尽可能延长。

## 脱气

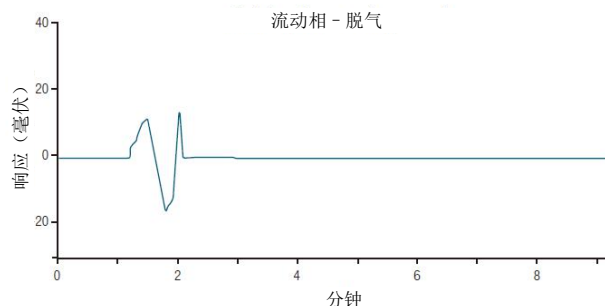
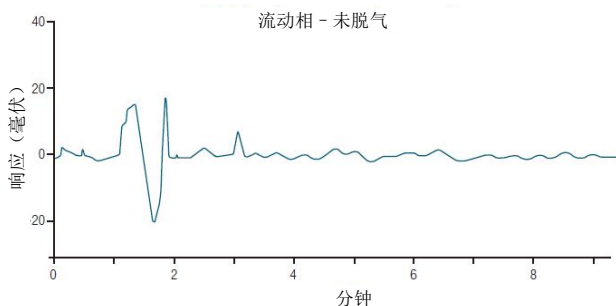
将新鲜制备的流动相泵送至 HPLC 系统之前，应先彻底脱气，去除其中溶解的气体。已溶解气体可通过以下方法从溶液中去除：

- 用氦气起泡
- 超声处理
- 真空过滤

如果未对流动相脱气，低压检测器池可能形成气泡，导致系统不稳定、伪基线峰等问题。

最有效的脱气方式是用氦气或其他低溶解度气体起泡。如果可以使用这种方法，我们建议在整个分析过程中以极低的水平对流动相进行连续脱气。从而在整个分析时间内抑制气体的再吸附。

**注：**确保溶剂瓶含有连接大气的通风口，防止溶剂瓶内部压力积聚。



流动相中气体的基线噪声

# 溶剂性质（相对于硅胶）和溶混性

## 溶剂性质和溶混性

溶剂强度	极性指数	UV 截止波长 (nm)	折射率	黏度 (cP, 20°C)	沸点 (°C)	水溶性 (W/W%)	溶剂
0.01	0.1	215	1.391	0.50	89	0.0002	异辛烷
0.04	0.0	200	1.410	0.92	174	0.01	正癸烷
0.05	0.1	200	1.407	0.44	49	0.01	环戊烷
0.1	1.0	220	1.402	0.45	70	0.11	1-氯丁烷
0.21	2.1	220	1.397	0.64	142	0.19	正丁醚
0.28	2.4	220	1.398	0.37	39	0.52	异丙醚
0.42	3.1	233	1.424	0.44	40	1.6	二氧甲烷
0.43	4.2	304	1.435	0.51	112	-	甲基丁基酮
0.47	4.7	320	1.451	2.00	156	-	环己酮
0.56	5.5	210	1.472	1.72	125	可混溶	甲氧乙醇
0.6	4.5	290	1.362	0.37	57	-	醋酸甲酯
0.64	6.0	300	1.344	0.67	103	2.1	硝基甲烷
0.65	6.5	288	1.438	0.84	166	可混溶	N, N-二甲基酰胺
0.69	6.0	235	1.477	1.65	162	-	N-甲基酰胺
1.11	6.9	210	1.432	1.93	198	可混溶	乙二醇
2	6.0	250	1.372	1.26	110	可混溶	醋酸
0.56	5.1	300	1.359	0.36	55	可混溶	丙酮
0.35	5.8	190	1.344	0.33	32	可混溶	乙醇
-	2.7	238	1.501	0.65	80	0.18	苯
0.39	3.8	215	1.399	2.93	117	7.8	正丁醇
-	4.0	254	1.304	0.73	126	0.43	乙酸丁酯
-	1.6	269	1.460	0.97	77	0.0	四氯化碳
0.4	4.1	245	1.446	0.57	81	0.815	氯仿
0.04	0.2	200	1.427	1.00	31	0.01	环己烷
-	3.5	228	1.445	0.79	83	0.81	1,2-二氯乙烷
-	3.1	233	1.424	0.44	41	1.3	二氧甲烷
0.64	6.4	268	1.431	0.92	153	可混溶	N, N-二甲基酰胺
0.62	7.2	268	1.476	2.24	182	可混溶	二甲亚砜
0.56	4.8	215	1.422	1.37	101	可混溶	二氧六环
0.66	4.3	210	1.361	1.20	73	可混溶	乙醇
0.58	4.4	256	1.372	0.45	77	8.7	乙酸乙酯
-	2.8	218	1.352	0.23	34	5.89	乙醚
0.01	0.1	200	1.388	0.40	89	0.0004	正庚烷
0.01	0.1	200	1.375	0.31	89	1.0072	正己烷
0.95	5.1	205	1.329	0.55	85	可混溶	甲醇
0.35	2.5	210	1.359	0.27	55	4.8	甲基叔丁基醚
0.51	4.7	329	1.379	0.43	80	24	甲基乙基酮
-	0.0	130	1.338	0.23	35	0.004	戊烷
0.82	4.0	210	1.385	2.30	97	可混溶	正丙醇
0.92	3.9	206	1.378	2.40	32	可混溶	异丙醇
-	2.2	220	1.368	0.37	60	-	二异丙醚
0.45	4.0	212	1.407	0.56	53	可混溶	四氢呋喃
0.29	2.4	284	1.496	0.59	111	0.05	甲苯
-	1.0	273	1.477	0.57	37	0.11	三氯乙烷
2	10.2	190	1.000	1.00	100	-	水
0.26	2.5	200	1.416	0.61	144	0.018	邻二甲苯

数据来源:

CRC 化学与物理手册-第 73 版  
默克索引-第 12 版  
高纯溶剂指南, Burdick & Jackson Laboratories, Inc.  
HPLC 溶剂指南, 第二版, Paul C Sadek  
HPLC 色谱柱、理论、技术与实践, Uwe D Neue  
Fisher 溶剂表

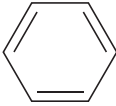
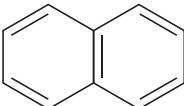
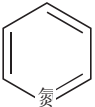
互不相容

正方形阴影“不混溶”是指  
溶剂混合物以一定的比例混  
合将产生两相

二甲苯
水
三氯乙烷
甲苯
四氢呋喃
二异丙醚
异丙醇
正丙醇
戊烷
甲基乙基酮
甲基叔丁基醚
甲醇
己烷
庚烷
乙醚
乙酸乙酯
乙醇
二氧六环
二甲亚砜
二甲基酰胺
二氧甲烷
1,2-二氯乙烷
环己烷
氯仿
四氯化碳
乙酸丁酯
正丁醇
苯
乙腈
丙酮
醋酸

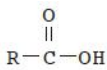
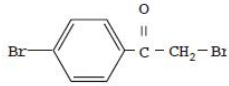

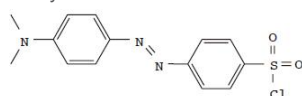
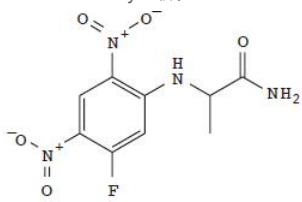
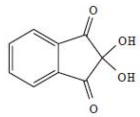
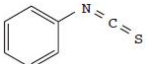
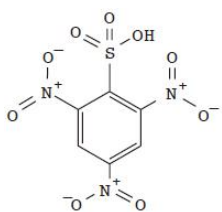
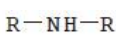
## 发色团检测波长

发色团是吸光基团，用于检测分析物。它们具有一个或多个检测波长，每个检测波长都具有与其相关的摩尔吸光率。下表可用作常见发色团的指南，并不详尽。

发色团		max (nm)	emax (L/m/cm)	
乙炔化物	-C≡C-	175 – 180	6,000	
醛类	-CHO	210	强	
		280 – 300	11 – 18	
胺	-NH <sub>2</sub>	195	2,800	
Azidin	> C=N-	190	5,000	
偶氮	-N=N-	285 – 400	3 – 25	
苯		184	46,700	
		202	6,900	
		255	170	
羧基	-COOH	200 – 210	50 – 70	
酯类	-COOR	205	50	
醚	-O-	185	1,000	
乙烯	-C=C-	190	8,000	
酮	> C=O	195	1,000	
		270 – 285	18 – 30	
萘		220	112,000	
		275	175	
		312	5,600	
硝酸盐	-ONO <sub>2</sub>	270	12	
		-(C=C) <sub>2</sub> acyclic	210 – 230	21,000
		-(C=C) <sub>3</sub>	260	35,000
		C=C-C=C	219	6,500
		C=C-C=N	220	23,000
		C=C-C=O	210 – 250	10,000 – 20,000
		C=C-NO <sub>2</sub>	300 – 350	弱
腈	-C≡N	160	-	
		-ONO	220 – 230	1,000 – 2,000
			300 – 400	10
硝基	-NO <sub>2</sub>	210	强	
亚硝基	-N=O	302	100	
肟	-NOH	190	5,000	
吡啶		174	80,000	
		195	6,000	
		251	1,700	
砒	-SO <sub>2</sub> -	180	极强	
二甲亚砒	> S-O	210	1,500	
硫醚	-S-	194	4,600	
		215	1,600	
硫醇	-SH	195	1,400	



# HPLC 衍生化试剂

官能团	描述	检测器*	备注
羧酸 	对溴苯甲酸酯 	UV	使用乙腈制备 1.0 mmol/ml 对溴苯甲酰溴和 0.005 mmol/ml 冠醚；预柱；纳摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}^{1-7}$
伯胺 	Dabsyl Chloride 	Vis	4-N,N-二甲基氨基偶氮苯-4'-磺酰氯 (dabsyl chloride)；预柱；纳摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 436 \text{ nm}^{8-14}$
	FDAA, Marfey 试剂 	UV	1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺 (FDAA)；预柱；纳摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$ 。适用于氨基酸手性分离。 <sup>15, 28-29</sup>
	茚三酮 	Vis	柱后；纳摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}^{22}$
	PITC 	UV	苯异硫氰酸酯 (PITC)；预柱；皮摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}^{23-24}$
	TNBSA 	EC, UV	2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBSA)；柱前或柱后；纳摩尔检测水平 (配置 EC 和 UV, GC -0.85V)； $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}^{25-26}$
仲胺 	茚三酮 (见上述结构)	Vis	柱后；纳摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}^{22}$
	PITC (见上述结构)	UV	苯异硫氰酸酯 (PITC)；预柱；皮摩尔检测水平： $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}^{23-24}$

\*EC = 电化学；F = 荧光；UV = 紫外线；Vis = 可见光。

## 参考文献

- Durst, H.D., et al. (1975). Anal. Chem. 47, 1797.
- Borch, R.F., et al. (1975). Anal. Chem. 47, 2437.
- Grushka, E. et al. (1975). J. Chromatogr. 112, 673.
- Fitzpatrick, F.A. (1976). Anal. Chem. 48, 499.
- Nagels, L., et al. (1980). J. Chromatogr. 190, 411.
- Ahmed, M.S., et al. (1980). J. Chromatogr. 192, 387.
- Pierce Technical Bulletin: Preparation of Phenacyl and p-Bromophenacyl Derivatives for HPLC.
- Stocchi, V., et al. (1985). J. Chromatogr. 349, 77-82.
- Chang, J.Y., et al. (1981). Biochem. J. 199, 547-555.
- Chang, J.Y., et al. (1982). Biochem. J. 203, 803-806.
- Vendrell, J., et al. (1986). J. Chromatogr. 358, 401-413.
- Chang, J.Y., et al. (1984). J. Chromatogr. 295, 193-200.
- Lin J.K., et al. (1980). Anal. Chem. 52, 630-635.
- Chang, J.Y., et al. (1981). FEBS Letters 132, 117-120.
- Marfey, P. (1984). Carlsberg Res. Co mm. 49, 591-596.
- Jones, B.N. and Gilligan, J.P. (1983). Amer. Biotech. Lab. 12, 46-51.
- Fiedler, H.P., et al. (1986). J. Chromatogr. 353, 201-206.
- Fried, V.A., et al. (1985). Anal. Biochem. 146, 271-276.
- Jones, B.N., et al. (1983). J. Chromatogr. 266, 471-482.
- Seaver, S.S., et al. (Sept./Oct. 1984). Biotechniques 254-260.
- Böhlen, P., et al. (1979). Anal. Biochem. 94, 313-321.
- Stein, W.H. and Moore, S. (1949). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bio. 14, 179.
- Heinrickson, R.L. and Meredith, S.C. (1984). Anal. Biochem. 137, 65-74.
- Scholze, H. (1985). J. Chromatogr. 350, 453-460.
- Caudill, W.L., et al. (1982). J. Chromatogr. 227, 331.
- Caudill, W.L., et al. (1982). Bioanalytical System's Current Separations 4(4), 59.
- Andrews, J.L., et al. (1982). Arch. Biochem Biophys. 214, 386-396.
- Aberhart, D.J., et al. (1985). Anal. Biochem. 151, 88-91.
- Szokan, G., et al. (1988). J. Chromatogr. 444, 115-122.

## 氨基酸分析开发

通过离子交换色谱法对氨基酸分析的改进涉及分析系统和仪器。通过改变缓冲液 pH 值或离子强度，开发了用于将氨基酸置换成离散条带的系统。这些缓冲液系统与蛋白质水解产物或生理液中发现的氨基酸的单色谱柱或双色谱柱分析兼容。缓冲液系统由使用的抗衡离子（钠或锂）和引入树脂的缓冲液变化方法（阶梯变化或梯度洗脱）决定。<sup>9-15</sup> 最常用的柠檬酸盐缓冲液适用于 pH 7 以下的溶液。<sup>16</sup> 使用柠檬酸或碱金属盐制得。

然而，对于高灵敏度工作来说，柠檬酸是造成氨基酸污染的重要因素。因此，为了实现一致性分析，必须使用高纯试剂制备缓冲液。

离子交换的替代方法可用于分离氨基酸。由于氨基酸分析是可用基本蛋白质化学分析工具之一，因此需要更快速、灵敏的分离和定量方法。<sup>17</sup> 目前，已经开发了几种反相 HPLC 柱前衍生方法。

在这些方法中，应用最广泛的两种方法涉及在 HPLC 分析之前形成氨基酸的 Dansyl<sup>18-19</sup> 或邻苯二甲醛（OPA）<sup>20-24</sup> 衍生物。与柱后衍生技术相比，这两种方法都提供了更高的灵敏度和更短的分析时间。其他方法还包括：使用异硫氰酸苯酯（PITC）进行氨基酸定量衍生化；使用 HPLC 分离和定量得到的苯硫羰基衍生物。这些衍生物足够稳定，可以消除在线衍生。





# 样品制备和水解

蛋白质提取和纯化为氨基酸含量测定提供了重要作用。提取和纯化方法基于它们的一种或多种物理特性（例如溶解度、分子量大小、电荷、极性和特定共价或非共价相互作用）。

## 蛋白质和多肽常用分离技术包括：

- 反相 HPLC
- 聚丙烯酰胺凝胶电泳
- 凝胶过滤
- 离子交换色谱法
- 亲和色谱法
- 下表详细列出了多肽混合物的分离方法。<sup>25</sup>

## 水解

大多数蛋白质样品需要先进行化学处理，才能对氨基酸进行分析。蛋白质和多肽样品必须经过水解才能从肽键中游离出氨基酸。酸（通常为 HCl）是最广泛用于蛋白质水解的试剂。

简化的水解方法包括将蛋白质与过量的 HCl 回流，然后真空去除多余的酸。<sup>26</sup> 最后，将冻干的蛋白质悬浮于恒沸的 6 N HCl 中，并引入水解管中。将试管浸入干冰和丙酮中冷冻样品。密封前，将管抽真空，避免形成半胱氨酸、蛋氨酸亚砷和氯酪氨酸<sup>27</sup>。

该方法可尽可能减少还原 S-羧甲基半胱氨酸的分解，并可用于分析 S-羧甲基化蛋白。按照 Moore 和 Stein 的方法，在 110°C（精确控温）下进行 20-70 小时的水解。<sup>28</sup> 水解后，旋蒸去除残留 HCl。将残留物溶于水并调节至适当 pH 值以备色谱柱上样。<sup>28</sup>

## 多肽混合物分离方法。

技术	多肽分子的属性
离心	溶解度
体积排阻色谱	分子大小
离子交换色谱法	电荷，受极性影响
纸电泳	电荷和分子大小
纸色谱	极性
薄层电泳	电荷和分子大小
薄层色谱	极性
聚丙烯酰胺凝胶电泳	电荷和分子大小
高效液相色谱 (HPLC)	极性
气相色谱法	衍生物的挥发性
逆流萃取	极性；特定相互作用（有时）
亲和色谱法	特定相互作用
共价色谱法或不可逆结合	二硫键形成；高丝氨酸内酯的反应性

## 参考文献

1. Braconnot, H. (1820). *Ann.Chem. Phys.* 13, 113.
2. Mulder, G.J. (1848). *J. Prakt. Chem.*38, 294.
3. Kjeldahl, J.G.C.T. (1883). *Z. Anal. Chem.*22, 366.
4. Rattenbury, J.M. (1981). *Amino Acid Analysis*, Eilow Horwood, publisher, Chicester, England, Chapter 1.
5. Martin, A.J.P. and Syngé, R.L.M. (1941).*Biochem. J.* 35, 1358.
6. Elsdén, S.R. and Syngé, R.L.M. (1944).*Proc.Biochem.Soc.*IX.
7. Syngé, R.L.M. (1944).*Biochem.J.* 38, 285.
8. Stein, W.H. and Moore, S. (1949). *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*14, 179.
9. Liao, T.H., et al. (1973).*Anal.Chem.*45, 2286.
10. Hare, P.E. (1972). *Space Life Sciences* 3, 354.
11. Dus, K., et al. (1966).*Anal.Biochem.*14, 41.
12. Thomson, A.R. and Miles, B.J. (1964). *Nature* 203, 483.
13. Robinson, G.W. (1975).*J. Chromatogr.*3, 416.
14. Benson, J.V. (1972).*Anal.Biochem.*50, 477.
15. Benson, J.V. and Patterson, J.A. (1965).*Anal.Chem.*37, 1108.
16. Bates, R.G. and Pinching, G.D. (1949). *J. Amer. Chem.Soc.*71, 1274.
17. Jones, B.N. and Gilligan, J.P. (1983). *American Biotech. Lab.* December, 46-51.
18. Weidmeier, V.T., et al. (1982).*J. Chromatogr.* 231, 410-417
19. DeJong, C., et al. (1982).*J. Chromatogr.*241, 345-359.
20. Lindroth, P. and Mopper, K. (1979). *Anal.Chem.*51, 1667-1674.
21. Jones, B.N., et al.(1981). *J. Liq. Chromatogr.* 4, 565-586.
22. Turnell, D.C. and Cooper, J.D.H. (1982). *Clin. Chem.*28, 527-531.
23. Umagat, H., et al. (1982).*J. Chromatogr.*241, 324-334.
24. Jones, B.N. and Gilligan, J.P. (1983).*J. Chromatogr.*266, 471-482.
25. Allen, G. (1981). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, T.S. Work and R.H. Burdon, Eds., Elsevier/North-Holland, Biomedical Press.
26. Moore, S. and Stein, W.H. (1963). *Meth. Enzymol* 6, 819.
27. Eveleigh, J.W. and Winter, G.D. (1970). *Protein Sequence Determination*, S.B. Needleman, Ed. Springer-Verlag, pp. 92-95.
28. Moore and Stein, op. cit.

我们为您提供众多样品制备、色谱柱和样品瓶产品，帮助您获得重现性结果



未找到您所需要的吗？我们很乐意与您探讨您的特定需求。若要定制产品，请联系您的本地销售代表。

更多详细信息，请访问：  
[thermofisher.com/lccolumns](https://thermofisher.com/lccolumns)