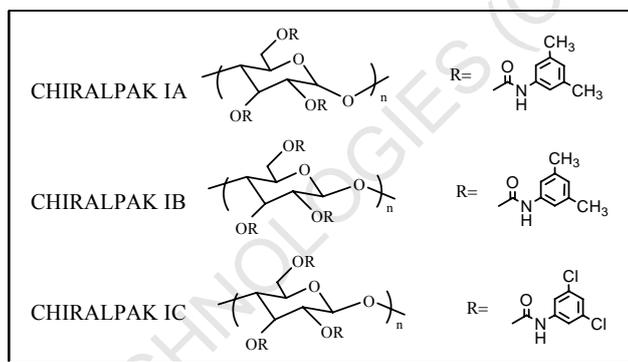


键合系手性柱

多糖涂敷型手性柱，如 CHIRALPAK[®] AD-H/CHIRALPAK[®] AS-H/CHIRALCEL[®] OD-H/CHIRALCEL[®] OJ-H等，其涂敷在硅胶表面上的各种衍生物有可能被一些有机溶剂溶解或溶胀。因此，可用作流动相组分及样品溶解液的溶剂非常有限。通过化学键合的方法将多糖衍生物固定在硅胶表面而制得的键合型手性固定相，即可克服涂敷型手性固定相的不足之处。为了满足市场的需求，大赛璐公司凭借多年的研究成果和独有的技术，已推出了新一代化学键合型手性色谱柱系列：CHIRALPAK[®] IA，CHIRALPAK[®] IB和CHIRALPAK[®] IC。

CHIRALPAK[®] IA是将淀粉-3,5-二甲苯基氨基甲酸酯键合在硅胶表面(5 μm)，相应的涂敷型色谱柱是CHIRALPAK[®] AD (CHIRALPAK[®] AD-H)；CHIRALPAK[®] IB是将纤维素-3,5-二甲苯基氨基甲酸酯键合在硅胶表面(5 μM)，相应的涂敷型色谱柱是CHIRALCEL[®] OD (CHIRALCEL[®] OD-H)；CHIRALPAK[®] IC将纤维素-3,5-二氯苯基氨基甲酸酯键合在硅胶表面(5 μM)(注意：相应的涂敷型色谱柱没有商品化)。其化学结构式如下图所示。



新一代化学键合型手性柱具有下列特点：

- 通用于所有液相色谱流动相
- 新分离选择性
- 样品溶解液没有任何限制
- 高柱效高分离性能
- 柱寿命长，可再生
- 操作方便，简单，灵活

新一代共价键合手性柱不仅可以那些常用在涂敷型手性柱上的流动相体系，如烷烃/醇类，更为重要的是还适用于诸如乙酸乙酯、四氢呋喃、甲基叔丁基醚、二氯甲烷、三氯甲烷等这些不适宜用在涂敷型手性柱上的溶剂。因此，键合型手性柱在色谱流动相优化及样品溶剂选择等方面具有独特的优越性，从而有可能使得那些在涂敷型手性柱上不能分离或者分离不够好的对映体在键合型柱上有效分开。另外，由于可以选择任何溶剂来提高样品的溶解度，因此新型手性柱在手性对映体的制备方面也有明显的优点。

值得指出的是，由于流动相中使用了某些溶剂的缘故，如当使用丙酮，乙酸乙酯，甲苯，高浓度的三氯甲烷时，有可能会干扰分析样品的紫外检测。遇到这种情况，可以通过选用别的检测器来解决检测问题，如 RI 检测器或 ELSD(蒸发光散射检测器)。

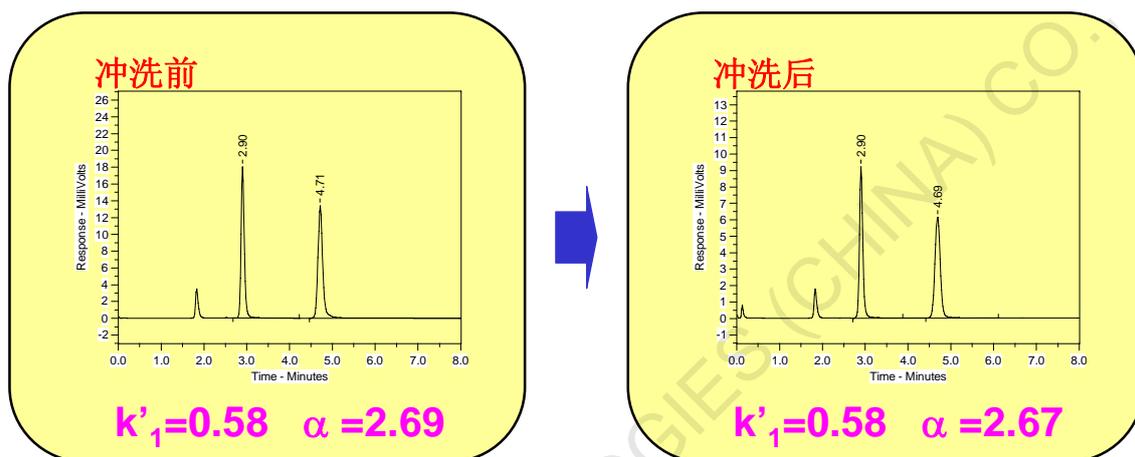
CHIRALPAK® IA

1.1 柱温、柱压及 pH 值

适宜的柱温一般为 0 °C 到 40 °C 之间；最高柱压不宜超过 100 bar；不宜使用高 pH 值的流动相。

1.2 耐溶剂试验

CHIRALPAK® IA 在经用 500ml 乙酸乙酯冲洗后，手性样品 *trans*-Stilbene oxide 的分离色谱图几乎没有变化，如下图所示。（流动相：正己烷/异丙醇=90/10；柱温：40 °C）



1.3 流动相选择

CHIRALPAK® IA 流动相选择和优化可以按照下列基本操作步骤：

- 如果待分析样品为酸性(碱性)化合物，往往要在流动相中使用酸性(碱性)添加剂。对于碱性化合物一般在流动相中加入碱性添加剂，如二乙胺，丁胺，乙醇胺等；而酸性化合物，一般加入有机酸，如三氟乙酸，乙酸，甲酸等。有机酸或有机碱的加入量一般为 0.1%，不宜超过 0.5%。
- 尽可能以表 1 中所列出的流动相为起始条件进行试分离。
- 如果样品可以分开，则在此基础上进行优化，达到最佳分离。
- 如果使用表 1 中的起始条件无效，请使用表 2 中所列出流动相。
- 如果样品可以分开，则在此基础上进行优化，达到最佳分离。
- 如果表 1 和表 2 所有的流动相体系都无效，则考虑更换其它色谱柱，如试用别的键合型手性柱或试用涂敷型手性柱。

表 1 CHIRALPAK® IA柱上常用流动相(一)

组分 B	组分 A	起始比列 (B/A)	优化范围
甲基叔丁基醚	乙醇	98/2	80/20~100/0
三氯甲烷	正己烷	60/40	25/75~100/0
二氯甲烷	正己烷	50/50	25/75~100/0
乙酸乙酯	正己烷	40/60	20/80~70/30
四氢呋喃	正己烷	30/70	10/90~50/50
1,4-二氧环乙烷	正己烷	25/75	10/90~40/60
丙酮	正己烷	25/75	10/90~40/60

表 2 CHIRALPAK® IA柱上常用流动相(二)

流动相		起始比列	优化范围
甲醇	醇	100/0	100/0~50/50
乙醇	或 乙腈	100/0	100/0~50/50
乙腈	醇	100/0	100/0~80/20
正己烷	乙醇	90/10	99/1~50/50
正己烷	异丙醇	90/10	99/1~50/50

表 1 和表 2 中列出了一些典型的流动相体系以及分离优化过程中溶剂的使用范围,以供实际应用中参考。表 2 中列出了一些常用在涂敷型多糖类手性柱上的流动相组成,如烷烃 / 醇、纯极性溶剂 (醇类和乙腈)。这些流动相同样也适用于键合型手性柱。除此之外,表 1 中还列出了一系列扩展后的流动相体系,这些溶剂体系仅适用于化学键合型手性柱。

虽然CHIRALPAK® IA柱能够使用任何溶剂作为流动相,但在分离过程中应该选择正确的流动相,才能达到满意的分离效果及适宜的分析时间。在初步选择流动相时,一般优先选用四氢呋喃、甲基叔丁基醚(MtBE)、二氯甲烷、醇以及它们和烷烃组成的混合物;当样品的溶解度在流动相中受到限制时,应优先选用那些能够明显改善其溶解度的溶剂为流动相组分。

按照溶剂的洗脱能力的差异,在选择流动相时,可以灵活应用。一般的,使用 100%的氯代烷烃、甲苯和 MtBE 作为流动相,实现手性样品的分离是有可能的;而对于 THF, 1,4-二氧六环,丙酮等溶剂,具有较强的洗脱能力,一般应混于烷烃中作为流动相组分,用于调节样品在柱上的保留。烷烃类主要包括正己烷,异己烷,正庚烷(不同的烷烃对手性分离可能有轻微的影响)。三氯甲烷和二氯甲烷的色谱行为非常相似,不过三氯甲烷的洗脱强度稍微弱些;甲苯对于某些特定的手性化合物而言,有可能在分离中显现出独特的优点。对于同一种手性化合物,使用不同的流动相,在同一柱上的色谱峰流出顺序是有可能改变的。

CHIRALPAK® IA柱也可用在反相色谱模式下分离手性化合物。当流动相由有机相与水相相互转换时，特别注意要选用一系列互溶的溶剂冲洗平衡色谱柱，且在进行色谱分析前，需要足够的平衡时间。尤其要特别指出的是，当色谱柱用于水相体系后，色谱柱固定相中的聚合物和硅胶都有可能吸附水，并且很难再被全部置换出。在有水存在的情况下(即使是微量)，可能会影响多糖衍生物的手性识别能力。因此，在使用CHIRALPAK® IA柱时，尽可能在正相色谱条件下使用。

1.4 柱清洗

当手性色谱柱使用了相当长一段时间后，尤其是使用过不同种类的溶剂或添加剂为流动相后，色谱柱的手性分离能力有可能会发生变化，其分离柱效有可能逐渐降低。当柱效明显下降或色谱峰峰形变差时，有必要对色谱柱进行清洗，使色谱柱获得再生，继续保持优良的分选性能。清洗步骤如下：

- 用乙醇以 0.5 ml/min 流速冲洗 30 min；
- 用 100%DMF (N, N-二甲基甲酰胺) 以 0.3 ml/min 流速冲洗 3 h；
- 用乙醇以 0.3 ml/min 流速冲洗 50 min；
- 重新使用前，用正己烷/乙醇(90/10,v/v)冲洗色谱柱。

如果按上述方法处理柱子后效果仍不理想，可以用 100%THF 代替 100%DMF 以 0.5 ml/min 流速冲洗 2 h，然后重复上述操作步骤。(注意：这里的流速只适用于 4.6mm 内径的色谱柱；对于其它规格的色谱柱，应根据实际柱压进行调整)

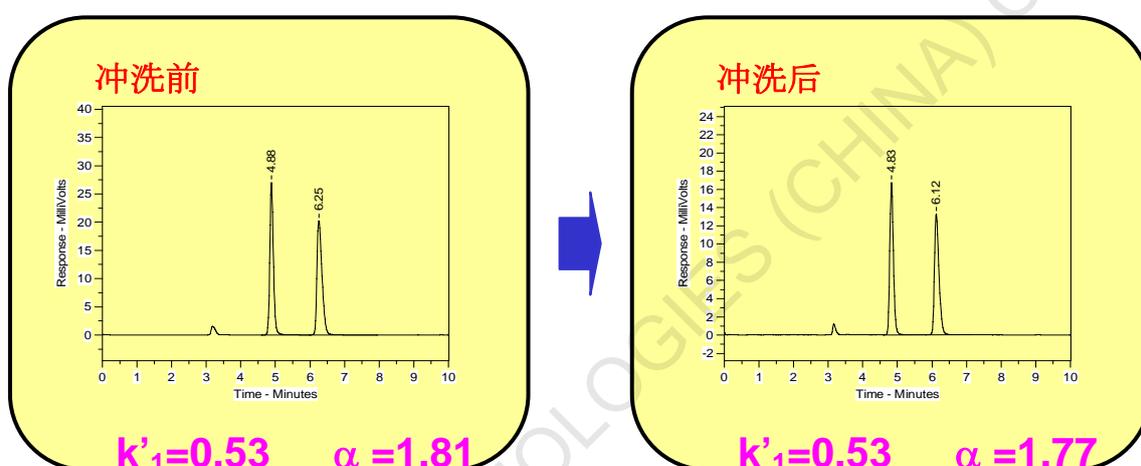
CHIRALPAK® IB柱

1.1 柱温、柱压及 pH 值

适宜的柱温一般为 0 °C 到 40 °C 之间；最高柱压不宜超过 100 bar；不宜使用高 pH 值的流动相。

1.2 耐溶剂试验

CHIRALPAK® IB柱分别经500ml丙酮, 500ml四氢呋喃, 500ml二甲基甲酰胺冲洗前后, 手性样品 *trans*-Stilbene oxide 的分离色谱图几乎没有明显的变化, 如下图所示。(流动相: 正己烷/异丙醇 =90/10; 柱温: 40° C)



1.3 流动相选择

CHIRALPAK® IB流动相选择和优化可以按照下列基本操作步骤:

a. 对于碱性或酸性样品, 在实际分离优化过程中往往需要在流动相中使用一些微量的添加剂, 如表 1 中所示。在有机碱添加剂中, EDA 是最有效的, 依次是 EtNA, BuA, DEA; 在流动相中加入少量的醇, 如 2-5%的乙醇, 往往有助于提高碱性添加剂与低极性流动相之间的互溶性。有机酸或有机碱的加入量一般为 0.1%, 不宜超过 0.5%。

表 1 CHIRALPAK® IB柱上常用的添加剂

样品种类	添加剂	添加范围
中性样品	无需添加	
碱性样品	乙二胺(EDA) 乙醇胺(EtNA) 叔丁基胺(BuA) 二乙胺(DEA)	$\leq 0.5\%$ 典型 0.1%

酸性样品	三氟乙酸 (TFA) 乙酸	≤0.5% 典型 0.1%
------	------------------	------------------

- b. 尽可能以表 2 中所列出的流动相为起始条件进行试分离。
- c. 如果样品可以分开, 则在此基础上进行优化, 达到最佳分离。
- d. 如果使用表 2 中的起始条件无效, 请使用表 3 中所列出起始流动相。
- e. 如果样品可以分开, 则在此基础上进行优化, 达到最佳分离。
- f. 如果表 2 和表 3 所有的流动相体系都无效, 则考虑更换色谱柱, 如试用别的键合型手性柱或试用涂敷型手性柱。

表 2 CHIRALPAK® IB柱上常用流动相(一)

组分 B	组分 A	起始色谱条件 (B/A)	优化范围
三氯甲烷	正己烷	50/50	25/75~100/0
甲基叔丁基醚	乙醇	98/2	80/20~100/0
乙酸乙酯	正己烷	40/60	20/80~70/30
四氢呋喃	正己烷	30/70	10/90~50/50
二氯甲烷	正己烷	40/60	20/80~100/0
甲苯	正己烷	70/30	30/70~100/0
丙酮	正己烷	25/75	10/90~50/50

表 3 CHIRALPAK® IB柱上常用流动相(二)

流动相		起始比列	优化范围
甲醇	醇	100/0	100/0~50/50
乙醇	或 乙腈	100/0	100/0~50/50
乙腈	醇	100/0	100/0~80/20
正己烷	乙醇	90/10	99/1~50/50
正己烷	异丙醇	90/10	99/1~50/50

在使用CHIRALPAK® IB柱时, 从增强手性分离因子方面考虑, 一般优先推荐使用三氯甲烷, 乙酸乙酯, 四氢呋喃, 甲基叔丁基醚和醇类(优先考虑与烷烃组合)。

在CHIRALPAK® IB柱上, 由于使用了三氯甲烷作为流动相组分从而获得手性分离的实例屡见不鲜; 在分离优化过程中, 一般可以以三氯甲烷/烷烃(50/50)为起始流动相; 对于某些强保留的手性化合物, 也可以使用 100%的三氯甲烷作为流动相; 在某些情况下, 加入少量的醇如甲醇, 则可以增强流动相的洗脱能力, 获得更为理想的分析时间。

在CHIRALPAK® IB柱上可以使用 100%的MtBE作为流动相来分离手性化合物。但MtBE的洗脱强度比较弱，加入 2%的醇，如乙醇，往往能够缩短分析时间，改善峰形，提高分离度；另外，其它的一些溶剂如甲醇、四氢呋喃、丙酮、二氧六环等，与MtBE按不同的比例混合使用，有时也能很好地改善分离效果。乙酸乙酯和四氢呋喃是比较强的洗脱溶剂，因此在使用它们作为流动相组分时，其含量不宜太高，一般以 40%乙酸乙酯/烷烃和 30%四氢呋喃/烷烃为起始流动相条件进行试分离手性化合物；对于那些在CHIRALPAK IB柱上具有很强保留的化合物，使用 70%的乙酸乙酯及 50%的四氢呋喃也是可行的；当使用 100%的乙酸乙酯或四氢呋喃为流动相时，样品往往会没有保留。

1.4 柱清洗

当手性色谱柱使用了相当长一段时间后，其分离柱效有可能随之降低。此时，有必要对色谱柱进行清洗，使色谱柱再生，继续保持优良的分​​离性能。清洗步骤如下：

- 用乙酸乙酯以 0.5 ml/min 流速冲洗 30 min；
(如果曾使用过某些流动相添加剂，冲洗时间要大于 2 h)
- 将此柱在室温下保存 2 天以上；
- 重新使用前，用正己烷/异丙醇(95/5,v/v) 以 1.0 ml/min 流速冲洗 1 h。

CHIRALPAK[®] IC柱

1.1 柱温、柱压及 pH 值

适宜的柱温一般为 0 °C 到 40 °C 之间；最高柱压不宜超过 100 bar；不宜使用高 pH 值的流动相。

1.2 流动相选择

在CHIRALPAK[®] IC柱上分离手性化合物时，可以优先选用表 1 所列出的流动相为起始条件进行分离。如果手性分离不能达到理想的效果，则可以选用表 2 中列出的流动相。如果待分析样品在表 1 中列出的这些流动相体系中的溶解度差或不溶解，可以考虑直接以表 2 中列出的流动相进行试分离。

表 1 CHIRALPAK[®] IC柱上常用流动相(一)

溶剂	烷烃 ¹ /异丙醇	烷烃 ¹ /乙醇	烷烃 ¹ /MtBE/乙醇 ²	烷烃 ¹ /THF ³
起始比例	80: 20	80: 20	0: 98: 2	70: 30
优化范围	99: 1 至 50: 50 ⁴	99: 1 至 50: 50 ⁴	80: 20: 0 至 0: 40: 60	95: 5 至 0: 100

¹烷烃可以是正己烷，2-己烷和正戊烷；使用不同的烷烃对手性分离可能有微小的影响。

²在流动相中不含烷烃的条件下，甲醇比乙醇更有效。

³就提高手性选择性而言，可以优先考虑使用二氯甲烷代替THF。使用二氯甲烷时，起始条件为烷烃/二氯甲烷/乙醇 50: 50: 2(v.v.v)；优化范围为烷烃/二氯甲烷 85: 15 至 0: 100；对于强保留样品，可以以二氯甲烷/甲醇（甲醇含量可以达到 20%）为流动相。

⁴注意柱压不要超过 100bar。

表 2 CHIRALPAK[®] IC柱上常用流动相(二)

溶剂	乙腈	乙酸乙酯 ³
流动相改性剂	醇 ¹	烷烃 ²
起始比例	100	60: 40
优化范围	100 至 0: 100	90: 10 至 0: 100

¹甲醇，乙醇和异丙醇。

²烷烃可以是正己烷，2-己烷和正戊烷；使用不同的烷烃对手性分离可能有微小的影响。

³对于强保留化合物，可以添加醇或者THF至乙酸乙酯，以提高流动相的洗脱强度。

如果手性样品是以制备为目的，或者是由于样品的溶解度所限制，建议优先选用能使样品溶解的溶剂作为流动相，然后按照表 3 来确定流动相组分和进一步优化。

Table 3 CHIRALPAK® IC柱上常用流动相(三)

溶剂	乙醇 ¹	异丙醇 ¹	二氯甲烷 ⁵	四氢呋喃	乙腈	甲基叔丁基醚	乙酸乙酯 ⁵
改性剂	烷烃 ²	烷烃 ²	烷烃 ²	烷烃 ²	甲醇 ³	甲醇 ⁴	烷烃 ²
起始比例	20: 80	20: 80	70: 30	30: 70	100: 0	98: 2	50: 50
优化范围	10: 90 至 100: 0	10: 90 至 50: 50	30: 70 至 100: 0	20: 80 至 100: 0	100: 0 至 0: 100	100: 0 至 50: 50	20: 80 至 100: 0

¹ 注意调节流速和柱温，以免柱压超过 100bar。

² 烷烃可以是正己烷，2-己烷和正戊烷；使用不同的烷烃对手性分离可能有微小的影响。

³ 流动相改性剂也可以是乙醇，异丙醇或四氢呋喃。

⁴ 对于弱保留的化合物，只要样品的溶解度许可，也可以考虑用烷烃代替甲醇。

⁵ 对于强保留的化合物，可以加入甲醇或乙醇以调节保留时间。

另外，如果待分析样品为酸性(碱性)化合物，往往要在流动相中使用酸性(碱性)添加剂。对于碱性化合物一般在流动相中加入碱性添加剂，如乙醇胺、二乙胺、丁胺等。其中，乙醇胺往往最为有效，其次是二乙胺；而酸性化合物，一般加入有机酸，如三氟乙酸，乙酸，甲酸等。有机酸或有机碱的加入量一般为 0.1%，不宜超过 0.5%。如表 4 所示。

表 4 CHIRALPAK® IC柱上常用酸碱添加剂

样品种类	添加剂种类	添加范围
中性样品	无需添加	---
碱性样品	乙醇胺(EtNA) 二乙胺(DEA) 叔丁基胺(BuA)	≤ 0.5% 典型 0.1%
酸性样品	三氟乙酸 (TFA) 乙酸 甲酸	≤ 0.5% 典型 0.1%

4.3 柱清洗

当手性色谱柱使用了相当长一段时间后，其分离性能有可能逐渐降低。当柱效明显下降或色谱峰峰形变差时，有必要对色谱柱进行清洗，使色谱柱获得再生，继续保持优良的分性能。清洗再生步骤如下：

- 用乙酸乙酯以 1.0 ml/min 的流速冲洗 30 min（如果流动相中使用过添加剂，冲洗时间应大于 2 小时）；
- 将此柱在室温下保存 2 天以上；
- 重新使用前，用正己烷/异丙醇 (90/10,v/v)以 1.0 ml/min 的流速将色谱柱冲洗 1h。

4.4 手性柱保存

手性实验完成后，需用乙醇冲洗色谱柱（注意：如果柱压比较高的话，请使用低流速），然后将色谱柱妥善保存。如果工作流动相中含有烷烃，则也可以用烷烃/异丙醇（90/10）冲洗后保存色谱柱，此方法色谱柱的保存期大约为 1 个星期。

如果使用了含有酸性或碱性添加剂的流动相，在色谱柱保存前需要用不含添加剂的相同流动相冲洗色谱柱。

（以上内容若与产品说明书有冲突，以产品说明书规定为准）

DAICEL CHIRAL TECHNOLOGIES (CHINA) CO., LTD.