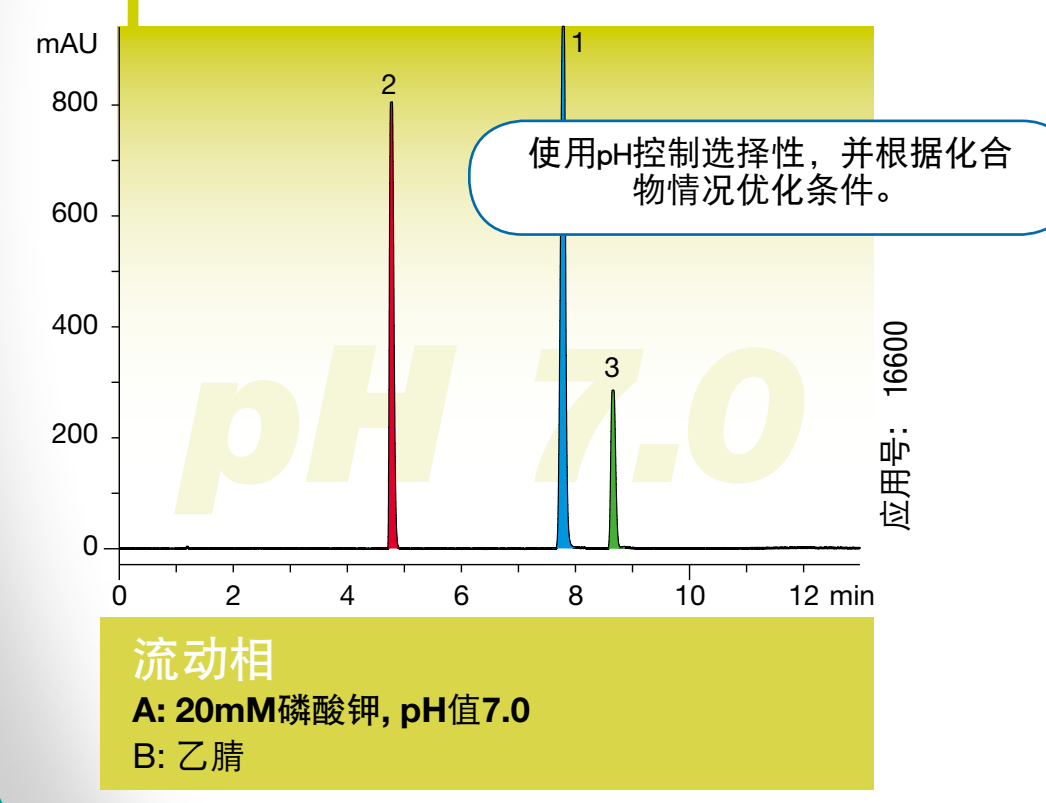
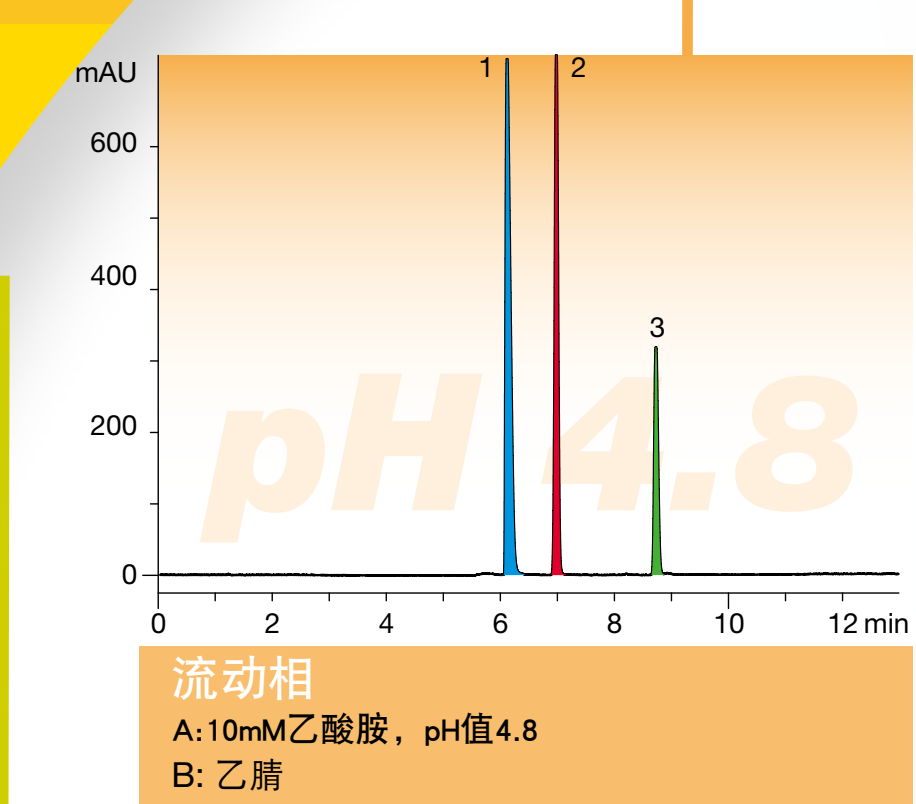
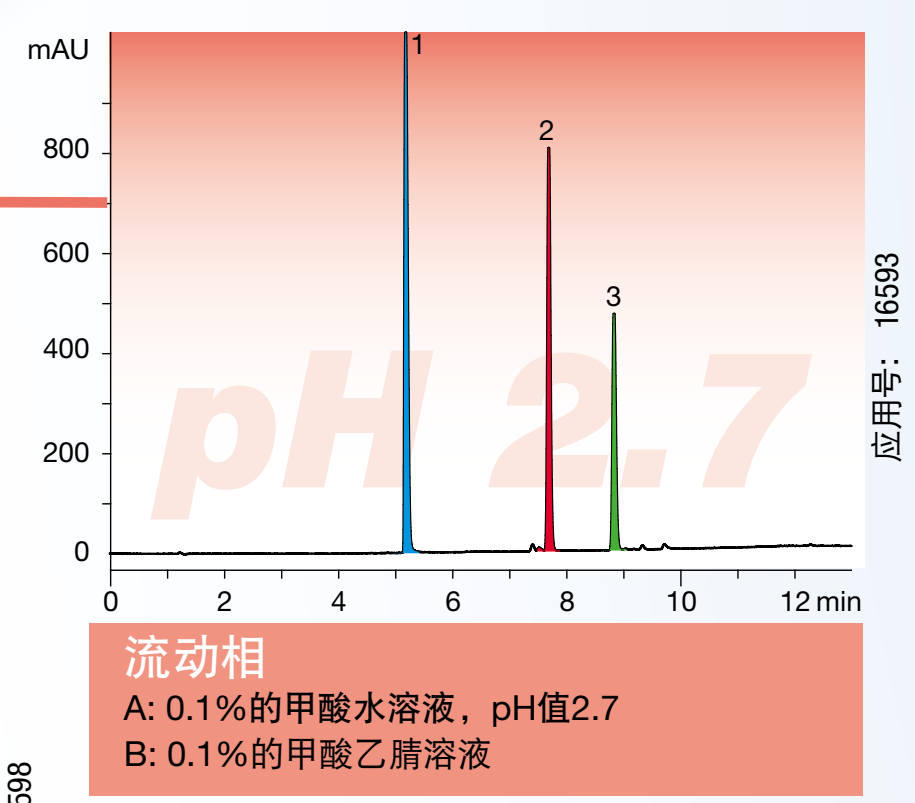


# pH HPLC 方法开发

调整您的pH以更改选择性

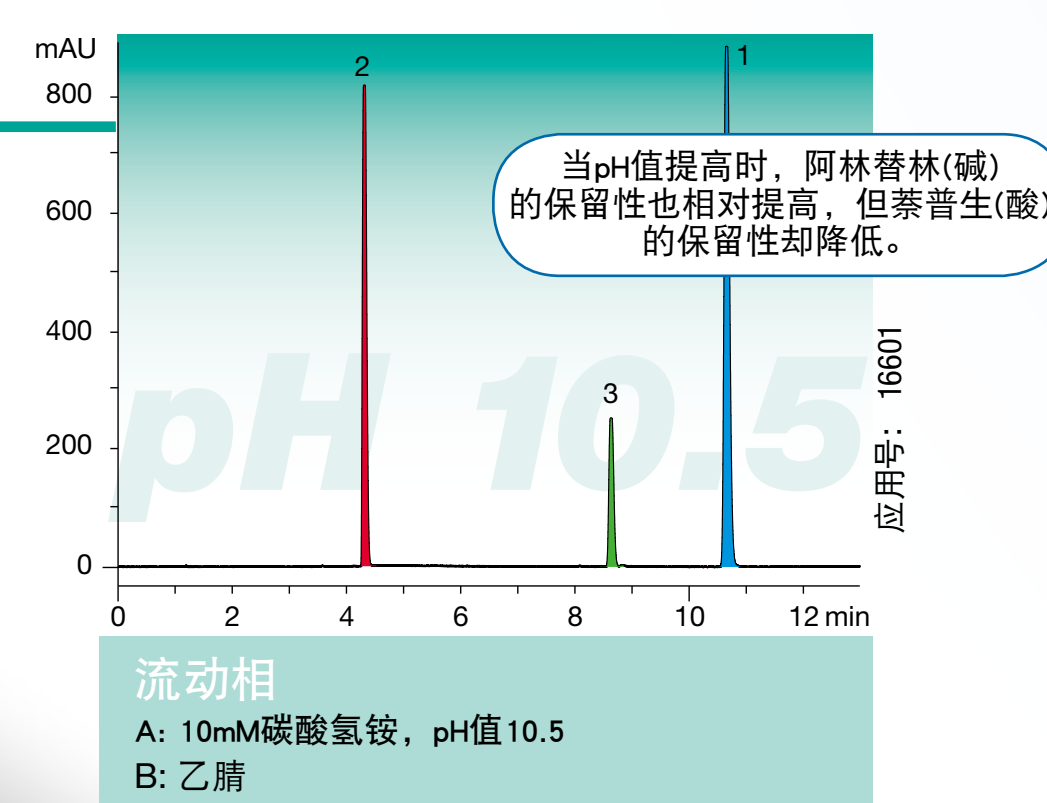


**碱性**  
1. 阿米替林  
 $pK_a$  9.4

**酸性**  
2. 萘普生  
 $pK_a$  4.0

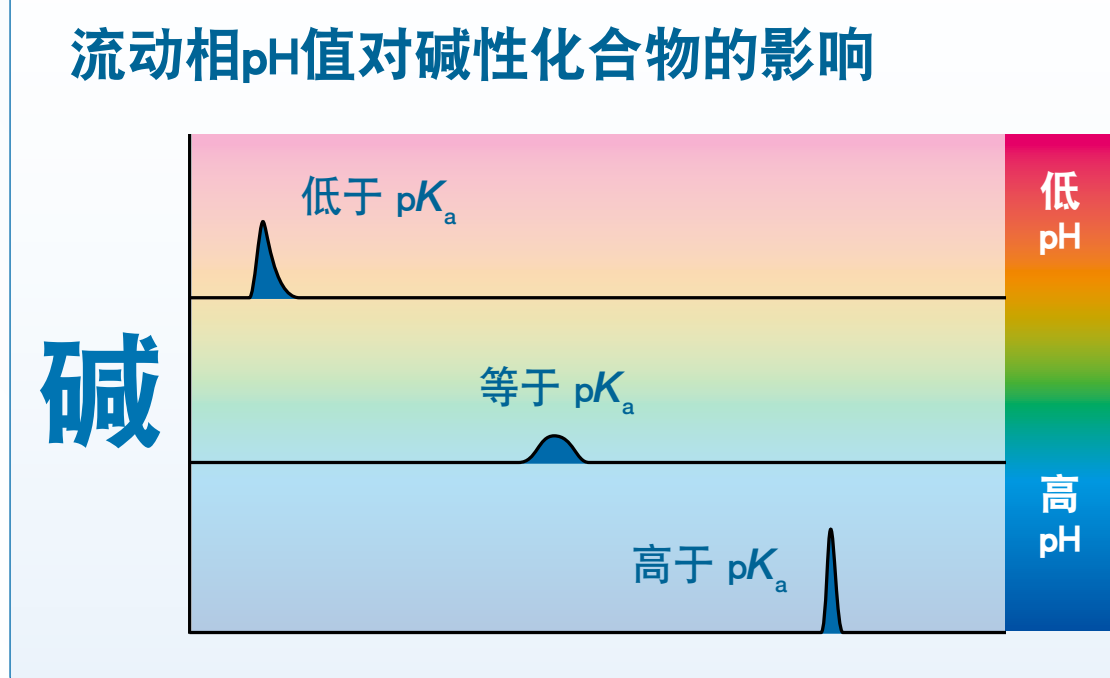
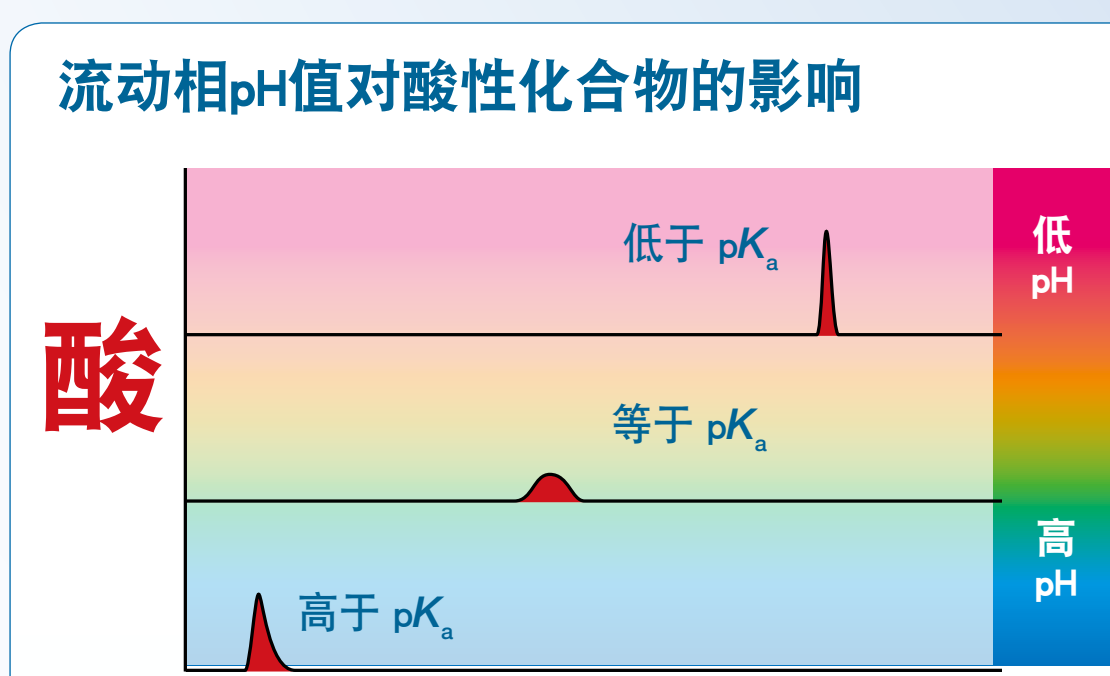
**中性**  
3. 甲苯

色谱柱: Gemini 5 $\mu$ m NX-C18  
规格: 150 x 4.6mm  
货号: 00F-4454-E0  
流动相: 请参见色谱图  
梯度: 在10分钟内, 由A/B(95:5)至(5:95), 并维持2分钟  
流速: 1.5mL/分钟  
温度: 室温  
检测: UV @ 254nm  
样品: 1. 阿米替林  
2. 萘普生  
3. 甲苯



### 方法开发技巧

- 对于反相色谱, 分析物应该维持中性
- 对酸性或碱性化合物, 将流动相pH维持在高于或低于分析物 $pK_a$ 的两个pH单位值
- 为了延长色谱柱寿命, 使用浓度小于20mM的缓冲液
- 保持在所用缓冲液所给予的缓冲范围内进行操作



### 不同官能团的保留性

分析物所带的官能团会影响反相色谱柱的保留性。不论官能团是质子化或去质子化, 通常都会影响化合物色谱图; 而更改分离的pH值往往会造成洗脱配置的改变。一般而言, 酸性官能团通常在pH低于 $pK_a$ 值有较高的保留性, 如果pH高于 $pK_a$ 值, 保留性会变得较低。碱性化合物有相反的现象: 碱性官能团通常在pH低于 $pK_a$ 值有较低的保留性, 而较高的保留性及较佳的峰形则出现在pH高于 $pK_a$ 的时候。

质子化官能团	去质子化官能团	近似 $pK_a$
<chem>OP(=O)(O)O</chem>	<chem>OP(=O)(O)[O-]</chem>	1.5
<chem>OS(=O)(O)O</chem>	<chem>OS(=O)(O)[O-]</chem>	2.0
<chem>OC(=O)O</chem>	<chem>OC(=O)[O-]</chem>	4.7
<chem>C1=CC=NC=C1</chem>	<chem>C1=CC=NC=C1</chem>	5.3
<chem>C1=CN=CN=C1</chem>	<chem>C1=CN=CN=C1</chem>	7.0
<chem>CN(C)C</chem>	<chem>CN(C)C</chem>	9.8
<chem>Oc1ccccc1</chem>	<chem>[O-]c1ccccc1</chem>	10.0
<chem>C[NH3+]</chem>	<chem>CN</chem>	10.6
<chem>CN(C)C</chem>	<chem>CN(C)C</chem>	10.7

我们尽可能的提供可靠的数据, 其它官能团可能显著影响官能团的 $pK_a$ 。  
资料来源: Introduction to Organic Chemistry - Streitwieser and Heathcock, MacMillan Publishing, 1981.

### 方法开发的缓冲液选择

除了有机溶剂外, 缓冲液的选择是HPLC方法开发中重要的参数。选择合适的缓冲液有几个标准。首先是选择拥有和操作环境pH相似 $pK_a$ 的缓冲液。其它的标准, 比如离子强度、离子对性质和质谱的相容性, 也应该在选择流动相改性剂前考虑。

缓冲液 <sup>1</sup>	$pK_a$	缓冲范围 (pH)	质谱相容性
三氟乙酸	< 2	< 2.5	•+
磷酸 ( $pK_1$ )	2.1	1.1 - 3.1	
柠檬酸 ( $pK_1$ )	3.1	2.1 - 4.1	
甲酸	3.8	2.8 - 4.8	•
柠檬酸 ( $pK_2$ )	4.7	3.7 - 5.7	
醋酸	4.8	3.8 - 5.8	•
柠檬酸 ( $pK_3$ )	5.4	4.4 - 6.4	
碳酸盐 ( $pK_1$ )	6.4	5.4 - 7.4	•
磷酸盐 ( $pK_2$ )	7.2	6.2 - 8.2	
三乙醇胺	7.8	6.8 - 8.8	•
三羧甲基氨基甲烷	8.3	7.3 - 9.3	
二乙醇胺	8.9	7.9 - 9.9	•
氨水	9.2	8.2 - 10.2	•
乙醇胺	9.5	8.5 - 10.5	•
碳酸盐 ( $pK_2$ )	10.3	9.3 - 11.3	•
二乙胺	10.5	9.5 - 11.5	•
三乙胺	11.0	10.0 - 12.0	•
吡啶	11.1	10.1 - 12.1	
磷酸盐 ( $pK_3$ )	12.3	11.3 - 13.3	

资料来源: <sup>1</sup> Practical HPLC Method Development, L.R. Snyder, J.J. Kirkland, and J. Glajch, Wiley Interscience, 1997, and Introduction to Protein and Peptide HPLC, TP Bradshaw, Phenomenex, 1998.  
\* 常用缓冲液列表  
+ 低浓度三氟乙酸可以用于LC-MS应用, 但有可能影响灵敏度。

Agela Technologies  
Phenomenex 在中国子公司  
天津博纳艾杰尔科技有限公司  
天津开发区西区南大街179号 (300462)  
电话: 022-25321032  
传真: 022-25321033  
技术支持专线: 400-806-8099  
邮箱: crinfo@phenomenex.com



- pH 1-12 下操作稳定
- 高柱效
- 耐用和可重现的结果
- 在极端的酸碱条件下仍有较长的寿命

www.phenomenex.com/gemini



Agela Technologies 天津博纳艾杰尔科技有限公司  
天津开发区西区南大街179号 (300462)  
电话: 022-25321032  
传真: 022-25321033  
技术支持专线: 400-806-8099  
邮箱: crinfo@phenomenex.com

PC09030816\_cn