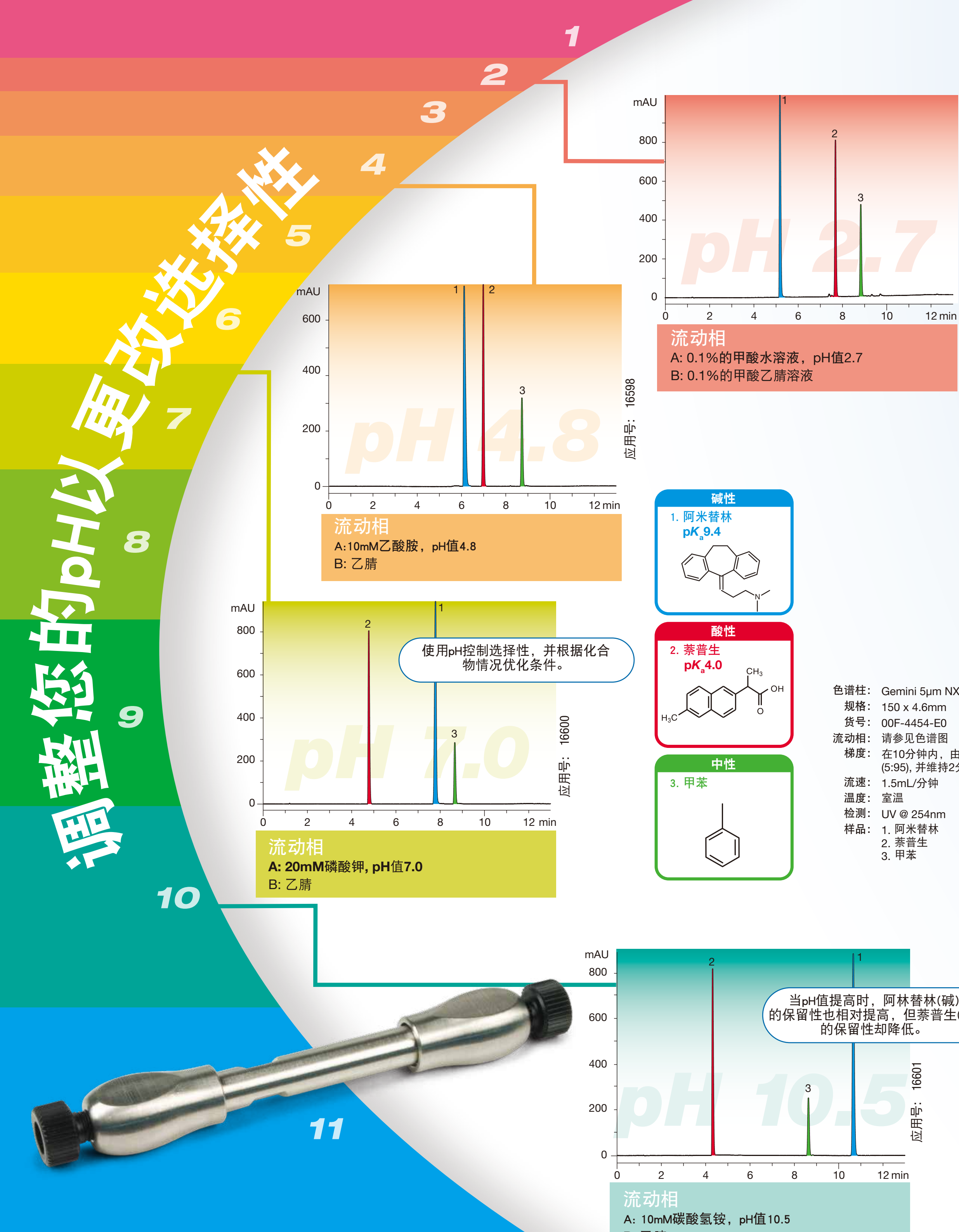
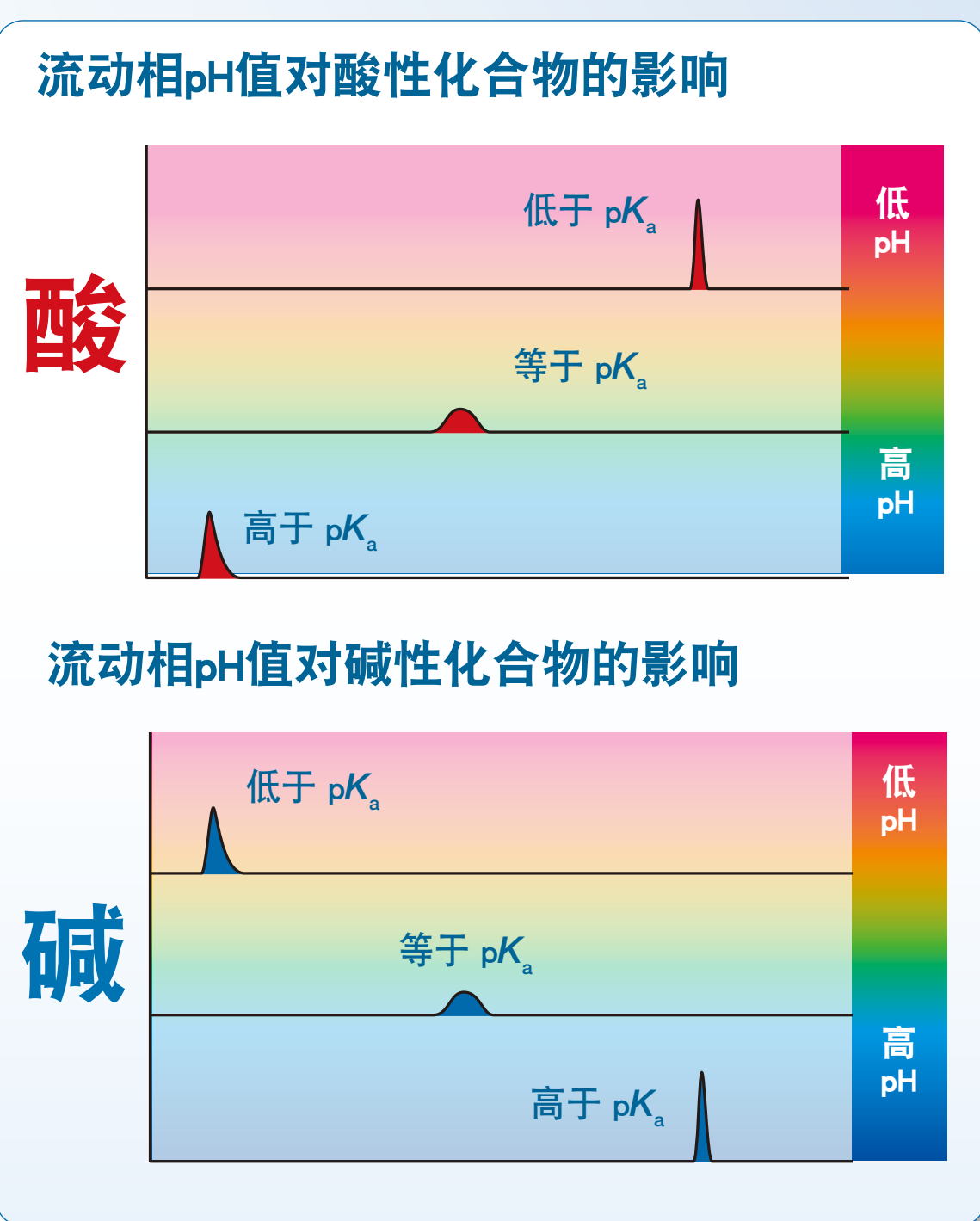




pH HPLC 方法开发

- ### 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
		1.5
		2.0
		4.7
		5.3
		7.0
		9.8
		10.0
		10.6
		10.7

我们尽可能的提供可靠的数据。其它官能团可能显著地影响官能团的 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 [†]	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: [†] Practical HPLC Method Development; L.R. Snyder, JJ Kirkland, and JJ Glajch, Wiley Interscience, 1997, and Introduction to Protein and Peptide HPLC; TP Bradshaw, Phenomenex, 1998.
[‡] 常用缓冲液为阳离子。
[‡] 低浓度三氟乙酸可以使用于LC/MS应用, 但有可能影响灵敏度。



- 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

