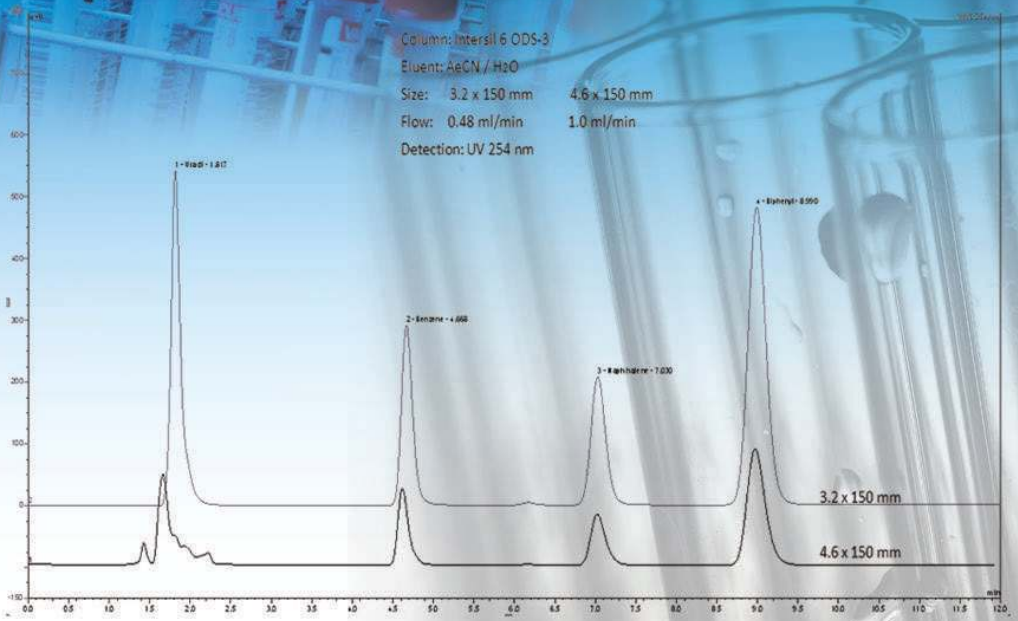
Aug. 2011

RPLC 逆相層析法摘要

Reverse Phase Liquid Chromatography

編者: 吳 健 三



目　　次

1. HPLC 分離模式……...P.1
2. RPLC-材料的作成……..……..P.5
3. RPLC-疏水性作用……..……..P.7
4. RPLC-分配係數……..P.17
5. RPLC-移動相溶洗力……..P.19
6. RPLC-移動相酸鹼 v.s 滯留……....P.22
7. RPLC-移動相調和酸、鹽類的運用……..P.30
8. RPLC-C18(ODS)AQ 適應全水相移動相……..P.41
9. RPLC-移動相的載送溶洗……..P.46
10. RPLC-隅對離子層析法……..P.56
11. 對應層析管柱內徑之最適當流速……P.65
12. 快速 UHPLC 分析…… ..……...P.70
13. 層析管柱之圖峰意義及計算式……P.73
14. RPLC 層析管柱的清洗、再生與測試……..P.78
15. RPLC 層析管柱移動相的轉換與平衡……..P.82
16. HPLC Solvent Index……P.86

HPLC 分離模式

依選用不同充填材料的層析管柱及移動相，HPLC 的分離模式說明於下:

I.) **Adsorption Chromatography** - 吸附層析法

矽膠 (Silica) 或矽膠再化學鍵結比矽膠(-Si-OH)更極性官能基的 -CN, -DIOL, -NH2 等，或矽膠再化學鍵結更**非**極性 -C18, C8, Ph, C6, C4, C2, C1 等官能基，乃至於 Polystyrene (PS) / Divinylbenzene (DVB)等聚合高分子材料作成層管柱，備與分析物進行**吸附(Adsorption)** 作用，當分析物和管柱內材料作用中，持續地，被移動相溶洗**脫附 (Desorption)**出而完成分離者，稱之為**吸附層析法**(Adsorption Chromatography) 。

若以分析物，充填材料，移動相溶洗的“極性”(Polarity) 觀點而言，**吸附層析法**，可區分為 **Normal Phase (正相) 及 Reverse Phase (逆相)** 層析法。

***Normal Phase Liquid Chromatography (NPLC)**

正相層析法 (NPLC)，層析管柱的充填材料例如矽膠，其作用官能基為具“極性”***矽醇基*(-Si-OH)**，或矽膠再化學鍵結比***矽醇基***-Si-OH 更極性 -CN, -DIOL, -NH2 等官能基，而移動相溶洗是“非極性”溶媒 n-Hexane。分析物群中，具極性分析物將比非極性分析物，與極性充填材料，更具吸附作用，而有適當的滯留。

***Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC)**

逆相層析法 (RPLC) 則相反，即層析管柱充填材料為矽膠再化學鍵結“非極性”-C18, C8, Ph, C4, C2, C1 等官能基本質為“疏水性”，而移動相是“極性”溶媒例如: H2O, 酸鹼 Buffer 或 MeOH, AeCN…的調和。分析物群中，具非極性分析物比之極性分析物，與非極性充填材料，更具吸附作用，而有適當滯留。

II.) **Ion Exchange Chromatography (IEC) -** 離子交換層析法

層析管柱充填材料具帶電荷離子型的官能基 R-SO3- 或 R-N+ ，待與相反電荷離子性官能基分析物，隨行離子交換作用。具強電荷分析物，就是有更高離子交換作用力者，將會是更長的滯留。而移動相更須具適當 pH 值及鹽類濃度，始得完成適當的分離，此為帶電荷解離性有機分析物的分離模式。

III.) **Size Exclusion Chromatography (SEC) -** 分子排除式層析法

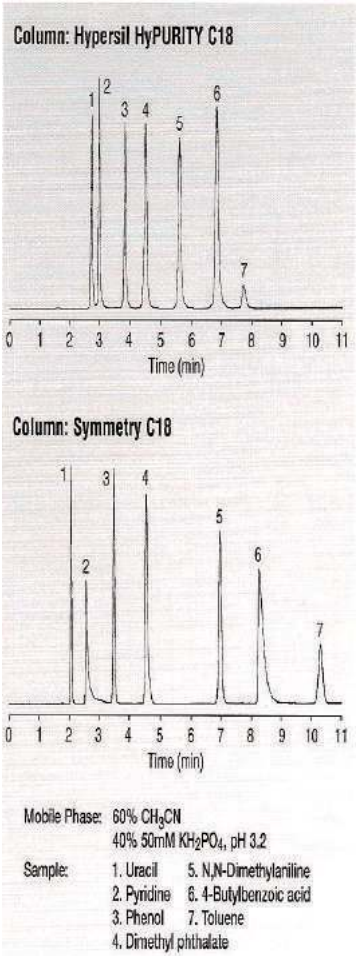
層析管柱充填精確產製“孔徑”，例如 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 10,000, 100,000, 1,000,000 Angstrom (Å) 的材料。在分析物不得與充填材料有任何親和的作用限制之下，僅以材料“孔徑”篩選分析物群中的大、中、小不同尺寸的分子。大尺寸分子無法滲入“孔徑”者，直接被移動相溶洗出，與“孔徑”近似的中分子尺寸則作選擇性“孔徑”的滲入，繼之被移動相溶洗出，而小尺寸分子者則完全滲入“孔徑”內，則更遲緩被移動相溶洗出。如此大、中、小尺寸分子依序於分子篩選作工之下，大、中、小尺寸分子依序被移動相排除溶洗的分離模式。依充填材料特質、SEC 包含 Gel Filtration Chromatography (GFC) 及 Gel Permeation Chromatography (GPC) 的分離模式。

逆相層析法有何利點、方便性而廣受 HPLC 分析者所喜好選用?

自 1930 年，萌芽了 LC 的分離應用，迄今 LC 分析技術的蓬勃發展下，RPLC (Reverse Phase Liquid Chromatography)明顯地，比 NPLC (Normal Phase Liquid Chromatography)，IEC (Ion Exchange Liquid Chromatography)及 SEC (Size Exclusion Liquid Chromatography)，更受歡迎而廣泛地用於 HPLC 的分離檢測應用，其利點、方便性如下說明:

*RPLC 具多元非極性官能基的矽膠化學鍵結-C18, C18-AR, C18-PFP, C8, Ph, C4, C2, C1，特為廣泛應用層面。

*RPLC 具廣泛移動相組成的調和，參考 HPLC 溶劑極性表，起自非極性的 n-Hexane 繼之稍非極性的 Dichloromethane (DCM) 略極性的 Tetrahydrofuran (THF)，接著具極性的 Acetonitrile (AeCN)、Methanol (MeOH)，或是解離性更極性的 H2O，再調和酸、鹽類 (Buffer) 皆適用為 RPLC 移動相。



兩支不同廠牌的 C18 的不同表現

*RPLC 適用一定組成移動相的操作 (Isocratic Elution)及變換組成比例梯度移動相(Gradient Elution) 的操作。

*RPLC 具卓越安定性 (Stable)及再現性 (Reproducible) 。

諸多商用 RPLC 材料，雖然同樣標示 C18 層析管柱，但是由於不同廠牌的 C18 物性、化性的差別，兩種不同廠牌 C18 的層析管柱，在相同分析條件下會呈現兩種截然不同的分離圖譜，請參照前頁圖示-**兩支不同廠牌的 C18 的不同表現**。

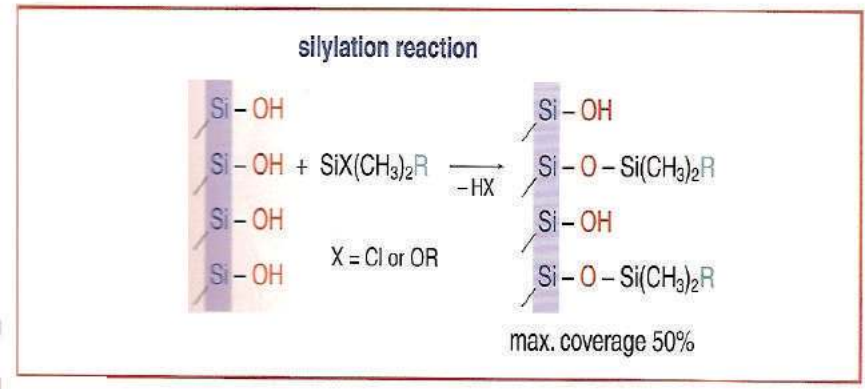
如果能夠就基礎材料"矽膠"、鍵結於矽膠上官能基的物化性的探索，將會清楚地瞭解為何在相同分析條件下、兩種不同的 C18 會有兩種不同的分離結果。

***基礎矽膠，如何?**

1.)純度: 99.9% , 99.99% , 99.999%.....越高純度則優
2.)重金屬: Na^{+}, K^{+}, Mg^{++}, Ca^{++}……..越低重金屬含量則優
3.)孔徑: 50, 80, 100, 150, 200, 300 Å ……以利分析物分子滲透排除
4.)表面積: 150, 350 , 450 m2/g……..…較大表面積、更具吸附性

RPLC 材料作成--矽膠官能基的化學再鍵結 (Silylation Reaction)

矽膠(-Si-OH)本質具極性。而商用 C18…是於矽膠-Si-OH 第一階段(Silylation)先作化學鍵結-R 非極性 C18, 或 C8, Ph, C4, C2, C1 等官能基。該 C18 官能基鍵結量約佔矽膠全量的 **5% 至 23%** 不等、稱做 **Carbon Content (總碳量)** 。接著第二階段、就剩餘極性矽醇基(-Si-OH) 的終結處理 **(End Capping)**，也就是儘量作成越少殘存極性矽醇基(-Si-OH)的 C18 材料。請參照如下圖示:



矽膠(Silica Gel)化學鍵結非極性 C18 官能基，而 C18 化學名稱是 **O**cta**D**ecyl**S**ilane 簡稱為 **ODS**。因此 C18 材料也就是 ODS 材料，C18 層析管柱也就是 ODS 層析管柱，反之亦是。同樣的 Octyl 既 C8，Phenyl 既 Ph，Butyl 既 C4，Dimethyl 既 C2，Methyl 既 C1 稱之。

認識充填材料“孔徑” (Pore Size)

孔徑單位: 1Å (Angstrom) = 0.1 nm (nano-meter)

矽膠為基礎充填材料，常見孔徑為 50 Å, 60 Å, 80 Å, 90 Å, 100 Å, 120 Å, 150 Å, 200 Å, 300 Å, 500 Å 及 1000 Å。

全孔性矽膠 (Totally Porous Silica) 的表面積(Surface Area)有助於進行吸附作用。孔徑越細小者，孔性越多，則有更高的“表面積”。將擁有更高吸附作用性。請參考 Inertsil SIL 如下表所載:

品名	孔徑	表面積	粒徑
Inertsil SIL-100	100 Å	450 m2/g	2, 3, 5um
Inertsil SIL-150	150 Å	320 m2/g	3, 5um
Inertsil WP 300 SIL	300 Å	150 m2/g	5um

孔徑 100 Å 的矽膠為傳統藥物分析的基本選擇。依經驗，孔徑 100 Å 矽膠材料，適用 ＜2,000 以內分子量的藥物應用分析。

分析物群中分子量差異大，例如含有分子量分別為 150 Da 及 1,000 Da，固然 100 Å 孔徑矽膠材料適用分析，但是孔徑 150 Å 或 200Å 矽膠材料可能更適用大小分子選擇性分離應用。

分析物群，例如: Peptides 可達 5,000 Da，甚至更高分子量達數萬 Da，有如 Polypeptide， Protein 者，選擇 300 Å，甚至於選用較大孔徑 500 Å 矽膠材料，將更有利於該數萬 Da 分析物作滲入或半滲入孔徑內進行吸附，篩選作用而完成分離者。

逆相層析法 - Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC)

疏水性作用(Non - Polar Hydrophobic Interaction)

逆相層析法的 C18, C8, Ph, C4, C2, C1 官能基為非極性，所作成的層析管柱，適用移動相的調和，始自非極性的 n-Hexane，繼之稍非極性的 Dichloromethane (DCM)，略極性的 Tetrahydrofuran (THF)，接著具極性的 Acetonitrile (AeCN)、Methanol (MeOH)，或是解離性，更極性的 H2O，再調和酸、鹽類等 Buffer，皆適用為 RPLC 移動相。

矽膠化學鍵結 C18 (ODS)等非極性官能基，於層析管柱中，等候和移動相載送來分析群進行(Partition)“分配”吸附作用。分析物群，若是比較非極性分析物，將會比極性分析物，更“分配”(Partition) 吸附作用於 C18(ODS)官能基。如此，具極性分析物，較少“分配”(Partition) 吸附作用於 C18(ODS)官能基，將被移動相先溶洗脫附出，而得“極性物”先於“非極性物”分離順序的層析圖譜(Chromatogram)。

疏水性作用重要內涵:

*分析物之間的極性的差別及接受移動相不同程度的溶洗，促使分析物於 -C18(ODS)非極性官能基的不同程度的“分配” Partition 差別作用，是 RPLC 層析分離的主要考量。

*層析圖峰的順序 (Elution Order)，分析物群極性物圖峰或較小分子必然是在非極性或較大分子圖峰之前。

試以 GLpak Inertsil ODS-4 5um, 4.6 x 150mm 實驗例說明於下:

Inertsil 5 ODS-4 粒徑 (Particle Size) : 5um
孔徑 (Pore Size) : 100 Å
孔量 (Pore Volume) : 1.05 ml/g
比表面積 (Surface Area) : 450 m2/g
總碳量 (Carbon Content) : 11%
終結處理 (End Capping) : 卓越矽膠表面殘存矽醇基 -Si-OH- (Silanol Group) 的終結處理(End Capping), 亦稱鹼不活性處理 (**Base Deactivated)** 。

流速: 1.0 ml/min, 室溫 檢測: UV 254nm

測試物:
100ml 甲醇 溶有 Uracil, 10mg., Benzene, 20mg., Naphthalene, 50mg., Biphenyl, 10mg

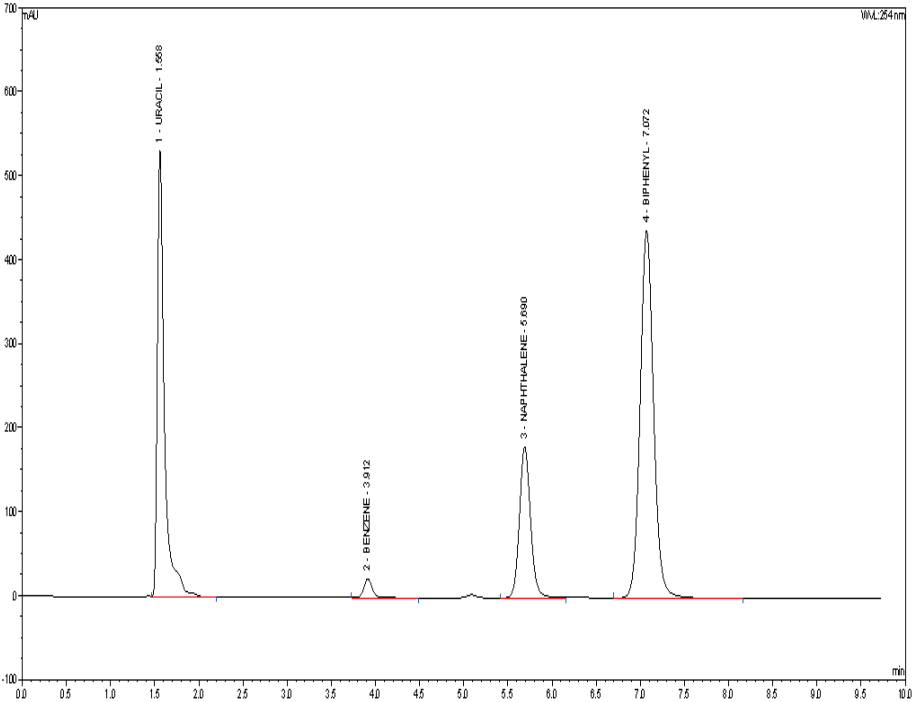
注入量: 3 ul 既測試物含量為
Uracil 0.3ug, Benzene 0.6ug, Naphthalene 1.5ug, Biphenyl 0.3ug

應用性: Inertsil 5 ODS-4 符合藥典 USP L1 要求的應用層析管柱。

實驗例:

疏水性作用的滯留暨移動相溶洗

1.) 移動相為 AeCN / H2O = 70 / 30 溶洗的實測圖譜於下:



就 **總碳量(Carbon Content) 為 11%**，移動相為 AeCN / H2O = 70 / 30，流速 1.0ml/min 時，各分析物於 Inertsil 5 ODS-4 4.6 x 150mm 層析管柱測試滯留時間 (Retention, Rt.) 為:

分析物-Uracil	Rt. = 1.558 min
分析物-Benzene	Rt. = 3.912 min
分析物-Naphthalene	Rt. = 5.690 min
分析物-Biphenyl	Rt. = 7.072 min

RPLC 層析管柱的 C18 (ODS) 具更**高總碳量**者，將更具滯留性。

Inertsil 5 ODS-4 4.6 x 150mm 層析管柱具 **11% 總碳量**(Carbon Content) 。由於市面上商用 C18 (ODS) 層析管柱可能是 **5% 至 23%** 不等的 **總碳量**。總碳量越高的 C18 (ODS) 更具滯留性。若選用比 Inertsil 5 ODS-4 11%更高總碳量的 C18 (ODS)層析管，於上述相同移動相之實驗條**件下**，所測得各分析物之 Rt 將更為延後。 反之，若採用了比 Inertsil 5 ODS4 11% 更少總碳量的 C18 (ODS)層析管柱，相同移動相之實驗條件下，所測得各分析物之 Rt 將更為縮短前移。

分析物滯留 - Uracil $C_8H_{10}N_4O_2$

Uracil 是典型有機氨鹼物，極性高。當注入分析，由於極性高，幾乎沒有與 C18 (ODS)官能基的“分配”(Partition) 吸附作用，無所滯留。旋即迅速被移動相載送流通層析管柱，通達檢測器 flow cell，於 UV 254nm 波長檢測，而得 Rt = 1.558min 的未滯留圖峰 (non-retained peak)，又稱 solvent peak。

由於流速設定為 1.0 ml/min，Rt = 1.558min 說明了該分析系統中沒有滯留作用的空間容積 Vo 為 1.558ml。 Vo 容積空間，既系統固定的空間容積 (Dead Volume) 。 是層析圖譜 (Chromatogram) 各個圖峰 (peak)相關理論板數、分離性、容積因素.....諸多積分計算用的一個重要參數。

分析物滯留 - Benzene C_6H_6

苯(C_6H_6)具各六個碳氫，是典型非極性有機碳氫化合物。當注入分析物，被 AeCN / H2O = 70/30 移動相載送，接觸層析管柱內材料非極性 C18 (ODS)官能基且與移動相之間，進行”分配” (Partition)作用有所滯留，繼之被該移動相溶洗出，而得圖峰滯留時間 Rt = 3.912min。

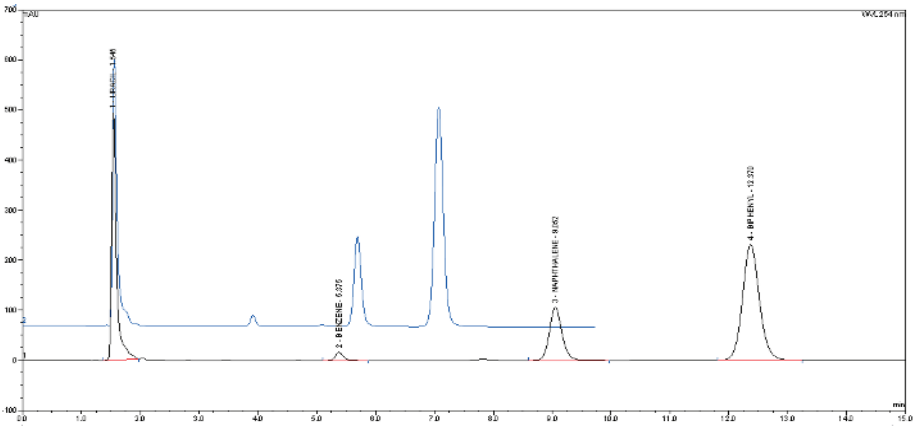
分析物滯留 - Naphthalene $C_{10}H_8$

具十碳八氫兩個連結苯環有機碳氫化合物 ($C_{10}H_8$)，比之 Benzene 多了四碳二氫而**更是非極性**，同分析條件下，得更遲後滯留時間為 Rt = 5.690min。

分析物滯留 - Biphenyl $C_{12}H_{10}$

具十二碳十氫兩對連苯環 ($C_{12}H_{10}$)，比之 Naphthalene $C_{10}H_8$ 更是非極性，同分析條件下，而得更延後圖峰，滯留時間為 Rt = 7.072min。

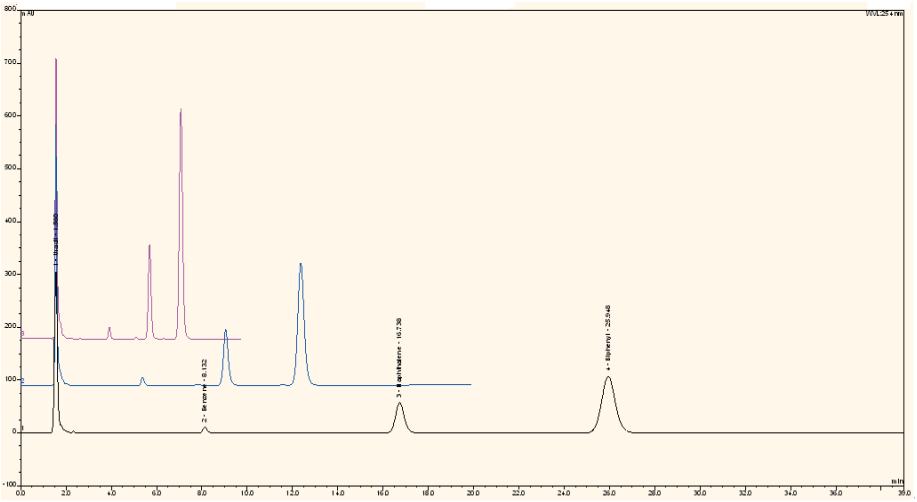
2.) 移動相為 AeCN / H2O = 60 / 40 溶洗的實測圖譜:



延用 Inertsil 5 ODS-4, 5um 4.6 x 150mm 層析管柱，移動相由 AeCN / H2O = 70 / 30 改為 AeCN / H2O = 60 / 40 時，**降低有機相溶洗**，則圖峰滯留時間延後，如下表所示

分析物-Uracil	Rt. = 1.545 min
分析物-Benzene	Rt. = 5.375 min
分析物-Naphthalene	Rt. = 9.052 min
分析物-Biphenyl	Rt. = 12.370 min

3.) 移動相為 AeCN / H2O = 50 / 50 溶洗的實測圖譜:



延用 Inertsil 5 ODS-4, 5um 4.6 x 150mm 層析管柱，移動相由 AeCN / H2O = 60 / 40 改為 AeCN / H2O = 50 / 50 時，**再降低有機相溶洗**，則圖峰滯留時間更加延後，如下述

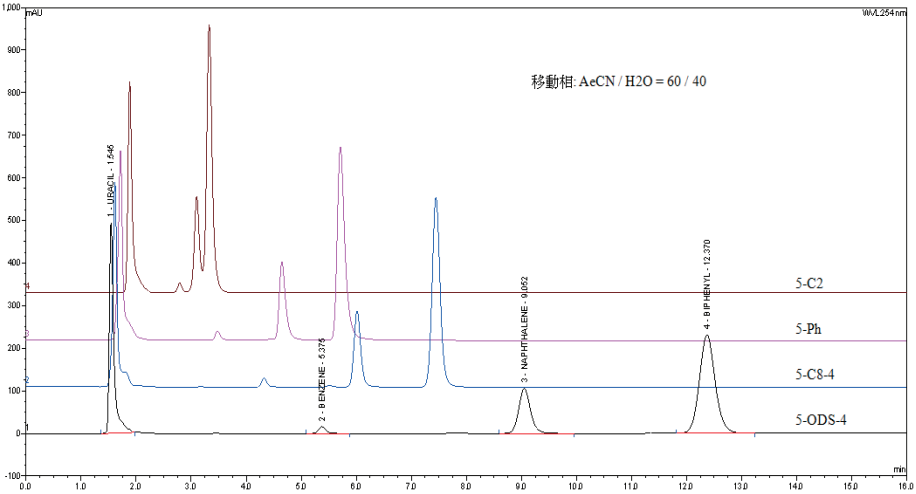
分析物-Uracil	Rt. = 1.560 min
分析物-Benzene	Rt. = 8.132 min
分析物-Naphthalene	Rt. = 16.738 min
分析物-Biphenyl	Rt. = 25.945min

經由上述實驗的瞭解:

RPLC 的操作，當移動相的溶洗，提升 “有機相”既溶洗力增強，既提升 AeCN 比例時，滯留時間縮短而圖峰前移。反之，降低“有機相”，既提升水相 (H2O)比例，則降低溶洗力，整體圖峰後移，分析滯留時間延後。

非極性官能基分配吸附作用力為 C18 > C8 > Ph > C4 > C2 > C1

上述實驗是選用 C18 (ODS)層析管柱的例子所作的說明。而逆相層析管柱、官能基之非極性 “分配” (Partition) 吸附作用力，為 C18 (ODS) > C8 > PH > C4 > C2 > C1。因此若改用更小非極性，例如 C8 官能基層析管柱，相同條件下，將比 C18 (ODS) 層析管柱整體滯留時間(Rt)，更為縮短的層析圖譜。請參考如下圖示不同 RPLC 材料不同滯留性之比較圖譜 :-
5 ODS-4 > 5C8-4 > 5Ph > 5C2。



RPLC 非極性官能基滯留性為 C18 > C8 > Ph > C4 > C2 > C1

定性分析

HPLC 的分析，憑藉著已知分析物為參考品 (Reference Chemicals) 如同前述的分析條件，測試而得時間為單位的滯留圖峰。於 AeCN/H2O = 70/30, 60/40, 50/50 不同移動相的溶洗，測得未滯留 Uracil 圖峰，及適當滯留所分離出 Benzene, Naphthalene 及 Biphenyl。僅將相關滯留(RT)、面積(Area)，Response Factor : 注入分析量/面積、簡記 RF 於下:

移動相 AeCN/H2O=70/30 的溶洗測試:

	RT(min)	面積(Area)	注入量(μg)	RF
Benzene	3.912	2.4850	0.3	0.1213
Naphthalene	5.690	26.2004	1.5	0.05735
Biphenyl	7.072	77.1490	0.3	0.003889

移動相 AeCN/H2O=60/40 溶洗測試:

	RT(min)	面積(Area)	注入量(μg)	RF
Benzene	5.375	2.4738	0.3	0.1207
Naphthalene	9.052	26.2759	1.5	0.05708
Biphenyl	12.370	76.8717	0.3	0.003907

移動相 AeCN/H2O=50/50 溶洗測試:

	RT(min)	面積(Area)	注入量(μg)	RF
Benzene	8.132	2.5099	0.3	0.1195
Naphthalene	16.738	26.2351	1.5	0.05718
Biphenyl	25.948	77.0551	0.3	0.003893

測試物: 100ml 甲醇溶有
Uracil, 10mg., Benzene, 20mg., Naphthalene, 50mg., Biphenyl, 10mg。

注入量: 3 ul 既測試物含量為
(Uracil 0.3ug, Benzene 0.6ug, Naphthalene 1.5ug, Biphenyl 0.3ug)

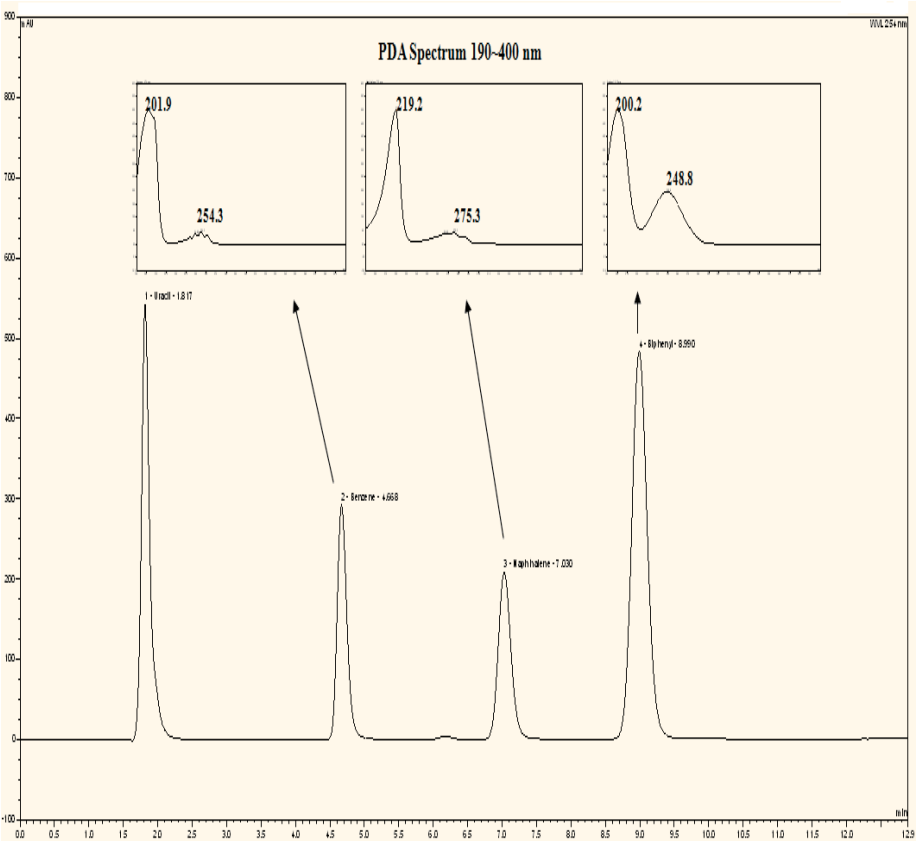
常用 UV/Vis 檢測器可用波長範圍為 190-800nm，當隨時選用一個波長作檢測時，例如上述實驗選擇 UV254nm 作檢測，得到 Uracil, Benzene, Naphthalene, Biphenyl 的時間 (RT) 與面積 (Area) 的層析圖譜 (Chromatogram)，借由時間 (RT) 的比對可作“定性”的分析工作。

定性 鑑別

通常 HPLC Photo Diode Array Detector (PDA)為 UV/Vis:190-800nm 全波長檢測器。除了具一般 UV/Vis 檢測性，它另有針對各分析物於 UV/Vis 全波長掃描記憶存檔的功能。由於分析物呈現於 190 - 800nm 全波長的吸光圖譜 (Spectrum) 各有其獨特,具區別性特點。當有了標準品的 Benzene, Naphthalene, Biphenyl 的記憶存檔的 UV/Vis 吸光圖譜 (Spectrum)，於未知物分析的相同 RT 分析物，再進行比對標準品吸光圖譜的附合性，更有助於未知分析物的定性鑑別。有如指紋比對，用以確定不具夾雜干擾物，成功分離的圖峰是 PDA 之獨特定性鑑別應用功能。

滯留物於 PDA 的 UV 190 – 400nm 波長測試記憶掃瞄 Spectrum。Benzene 具主高 201.9nm 次高 254.3nm, Naphthalene 具主高 219.2nm 次高 275.3nm, Biphenyl 具主高 200.2nm 次高 248.8nm 的 Spectrum。就此三個測試物的 Spectrum 可看出相當大區別性，若將三個測試物的 Spectrum 存檔，作為而後未知物分析呈現和三個測試物相同滯留 (Rt)，有如指紋比對一般，有助於分析未知物的定性鑑別，如下圖示。

代表性層析圖峰 vs 紫外光掃描光譜



定量分析

參數 RF: Response Factor 計算式為**注入分析量 (ug) /面積 (Area)** 。用以作為分析未知物之計算依據。於而後，同條件未知物的分析，相同 RT 作為定性的認知，所得面積(Area) x RF 的數據，即是未知分析物的(ug)定量分析的數據。

Partition Coefficient （Kow） – 分配係數

Partition Coefficient (Kow)，為分析物溶存於 Octanol 與 Water 平衡液的疏、親水測試，用以瞭聊解分析物溶存於有機 Octanol 疏水頃向或溶存於水相 H2O 的親水頃向。

疏、親水性: Log P

目前已知化合物的 Kow 值，約小自 10^{-3} 乃至於高達 10^{7}。

Kow 值為 $10^{-3} \sim 10^{7}$，若以 Log 對數標示，Log P $= \log_{10} 10^{-3} \sim \log_{10} 10^{7}$ 即 Log P = -3 ~ 7。

分析物 - 有機化合物 Log P 值小於 1 者，被認為是傾向親水解離型 Hydrophilic 極性化合物。有機化合物 Log P 值大於 1 者，被認為是傾向親油 lipophilic 非極性化合物。

經查化學參考書得悉 Uracil Log P = 0.87, Benzene Log P = 2.13, Naphthalene Log P = 3.30 及 Biphenyl Log P =3.98, 高 Log P 更具非極性的分析物與 -C18 (ODS)官能基更強的"分配"Partition 的吸附作用，也就是說 Log P 值越高者，越是延後滯留的圖峰。由此，溶洗順序為 Uracil 先於 Benzene 先於 Naphthalene 先於 Biphenyl。如果分析物加入了更非極性，例如: Anthracene Log P = 4.45，其圖峰將更延後。

總之，若能查得分析物之 Log P 值，於逆相層析法 RPLC 的分析準備工作，有助於推估分析物溶洗圖峰的先後順序。

Log P　v.s. 分離順序 (Log P 值小者，先於 Log P 值大者的分離順序)

實例

層析管:　Vercopak Inertsil 5 C8　3.2 x 250mm

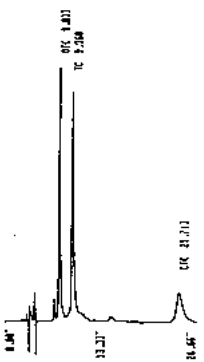
移動相:　17% AeCN and 10mM KH_2PO_4 in D.I.H2O

pH = 2.2 by H3PO4

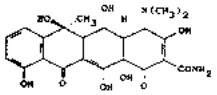
流　速:　0.4 ml/min

壓　力:　80 kg/cm2

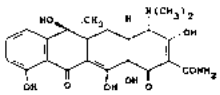
偵檢器:　UV 370nm



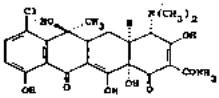
OTC:Oxytetracycline



TC:Tetracycline



CTC:Chlortetracycline



圖峰順序

1.

2.

3.

RPLC 移動相溶洗力

H2O 調和 MeOH, AeCN, THF 之溶洗力

$MeOH/H_2O$	$AeCN/H_2O$	THF/H_2O
0/0	0/0	0/0
10/90	5/95	4/96
20/80	14/86	10/90
30/70	22/78	17/83
40/60	32/68	23/77
50/50	40/60	30/70
60/40	50/50	37/63
70/30	60/40	45/55
80/20	73/27	53/47
90/10	86/14	63/37
100/0	92/8	72/28

溶劑非極性: THF > AeCN > MeOH。

於逆相層析法作為移動相調和時，溶洗力是 THF > AeCN > MeOH。

THF / H2O = 37 / 63，溶洗力相當於 AeCN / H2O = 50 / 50，相當於 MeOH / H2O = 60 / 40 的溶洗力。至於其它不同比例之溶洗力，請參照上表。

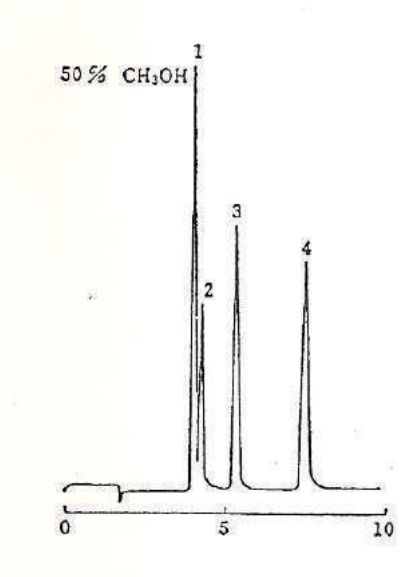
由於 THF 較 MeOH, EtOH, IPA 或 AeCN，屬於更非極性高溶洗溶劑，有些分析物受了非極性 THF 高溶解性影響，因而溶洗出圖峰順序所改變，請參照次頁圖示說明之。

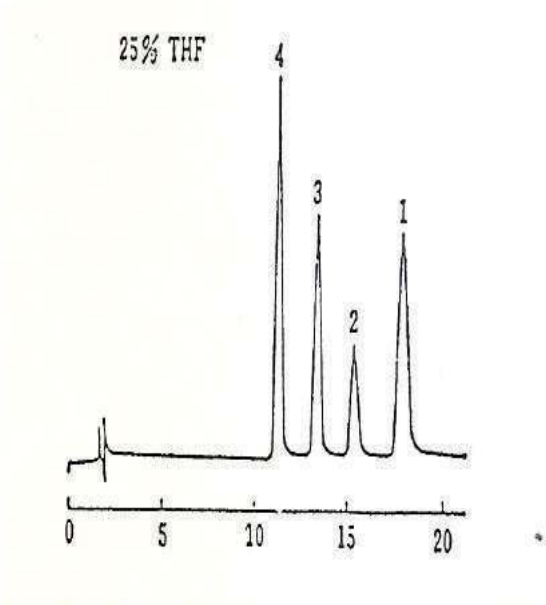
實驗參考

層析管柱: 矽膠鍵結 C18 (ODS)

分析物: 1.) p-Nitrophenol 2.) p-Dinitrobenzene

3.) Nitrobenzene 4.) Methyl Benzoate





移動相: THF / H2O = 25 / 75

分析物溶解於 THF

為 4 > 3 > 2 > 1，

造就 4, 3, 2, 1 圖峰順序

動相: MeOH / 移 H2O= 50 / 50

分析物溶解於甲醇

為 1 > 2 > 3 > 4，

造就 1, 2, 3, 4 圖峰順序

溶劑效應

水調和有機相，視分析物於該有機相的溶解性，適當 MeOH、AeCN 或 THF 的調變混合，具促進分離效應。請參照下述圖示說明。

實驗參考

層析管柱: 矽膠鍵結 C18(ODS)

分析物: 1.) Benzyl Alcohol　2.) Phenol　3.) 3-Phenyl Propanol　4.) 3.4-Dimethyl Phenol　5.) Benzene　6.) Dimethyl Phthalate

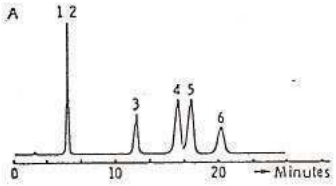


圖 A

MeOH / H2O = 50 /50，為典型 RPLC 移動相，分析物 1, 2 於 MeOH 溶解性近似，因而同時被溶洗出，未能分離。

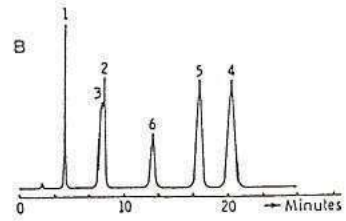


圖 B

移動相改為 THF / H2O = 30 / 70 時，分析物 2 較不溶於 THF 因而後移，甚至與分析 3 同位子，而分析物 6 比 5, 4 更溶於 THF 因而 6 先於 5, 4 被溶洗出。

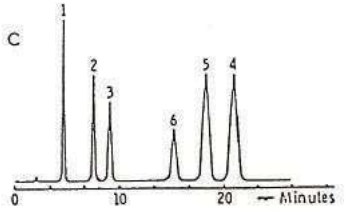
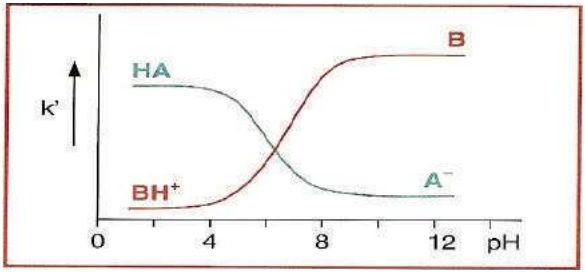


圖 C

移動相修正為 MeOH / THF / H2O = 35 / 10 / 15 時，分析物 1, 2, 3, 6, 5, 4 成功地被分離出

RPLC 移動相酸鹼 pH 值 vs 滯留 (Retention)

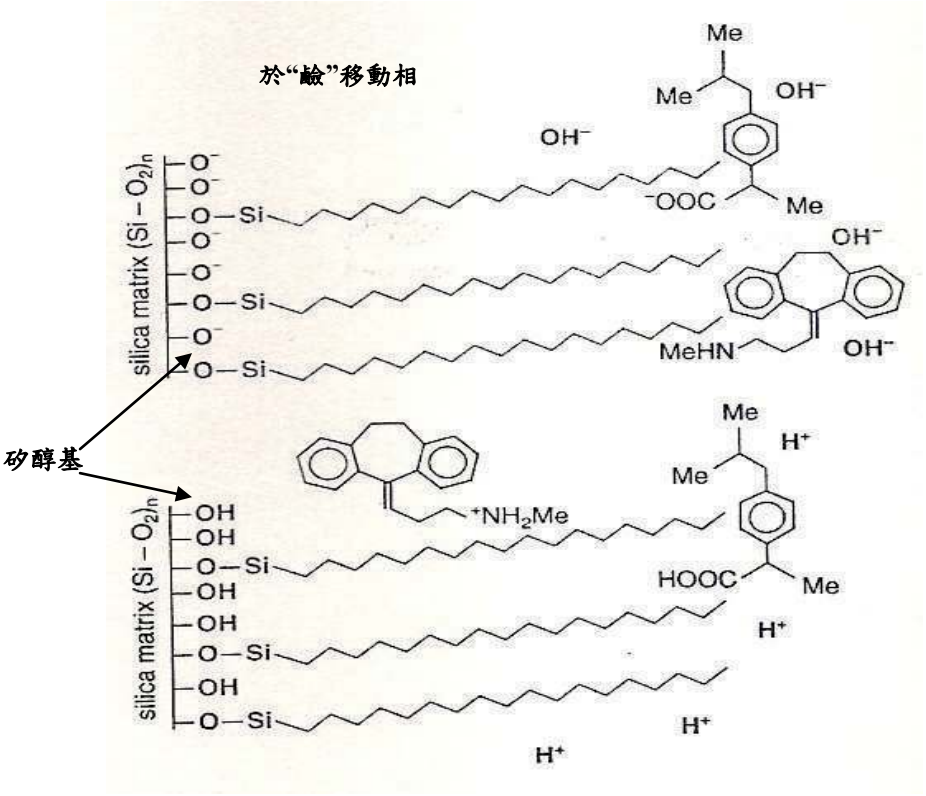
受到移動相 pH = 1 ~ 14 的影響，酸(HA)或鹼(BH)分析物的極性隨之產生變化，滯留性隨之改變，繼之再依 “RPLC 疏水性作用”的分離機制分離之。分析物群可以是中性、酸或鹼有機化合物。當**中性分析物**於移動相調和 pH = 1 ~ 14 時，中性分析物“極性”不受移動相酸鹼影響，仍就按前述“極性”差別，移動相“溶洗”的**疏水性作用的分離機制**分離之。而酸或鹼分析物，受到 pH = 1 ~ 14 的影響，該分析物的極性將隨之改變。當分析物的極性隨之改變之後，再按 RPLC “極性”差別，移動相“溶洗”的疏水性作用的分離機制進行分離。



K’ = Capacity Factor (容積因數) - 滯留性參數

參考以上圖示，酸有機化合物 HA 於較低 pH 的移動相時，呈現非解離型即非極性分子型 HA，其 K’ = Capacity Factor (容積因數) -滯留性參數則提高，滯留性增多。反之，HA 於較高 pH 的移動相時，呈現解離型的 A^- 極性物， K’ 滯留性參數則減少，滯留性反之降低。

鹼有機化合物 B 於較低 pH 的移動相時，呈現解離型的 BH^+ 極性物，K’ 滯留性參數則降低，滯留性減少。反之 B 於較高 pH 的移動相，呈現非解離型，即非極性分子型 B，滯留性參數則提高，滯留性增多，滯留性高。



參照上圖，矽膠（Silica Gel）化學鍵結 C18（ODS）官能基，由於 C18（ODS）官能基立體阻礙的影響，既使加以終結處理"矽醇基"，矽膠表面仍然殘存有些微的矽醇基，它會受移動相酸鹼的影響。

於 "酸"移動相時矽醇基為非解離型-SiOH。 於趨近中性或 "鹼"移動相時，矽醇基-SiOH 則趨向解離型-SiO^-H^+。

當矽醇基於鹼性移動相傾向解離型 -SiO^-，此時分析物 RCOOH 酸基傾向解離型 R-COO^-，而分析物鹼基維持非解離型 R-NHMe。

當矽醇基於酸性移動相，傾向非解離型 -SiOH， 此時分析物酸基 R-COO^- + H^+ -->傾向非解離型 RCOOH，而分析物鹼基則呈現更解離型 R-NHMe + H^+ --> RN^+H_2Me。

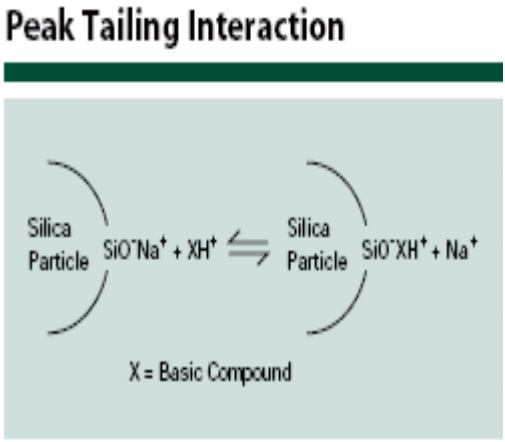
殘存矽醇基 -SiOH 於鹼性移動相所呈現的解離型 SiO^-，易於與帶正電荷的有機氨鹼分析物 (R-N^+H) 的吸附作用，影響甚至於導致於該有機氨鹼分析物的“拖尾圖峰 (Tailing peak)”。

殘存矽醇基 -SiOH 於酸性移動相時，仍呈現非解離型的 -SiOH，而不會吸附有機氨鹼分析物 (R-N^+H) 因而也不會影響有機氨鹼分析物的圖峰“拖尾”。

HPLC 移動相調和酸、鹽，防止拖尾圖峰的說明

商用 RPLC C18 (ODS) 材料，針對殘存矽醇基 -Si-OH (Silanol Group) 皆有妥善的終結處理(End Capping)，另稱 Base Deactivated Phase。

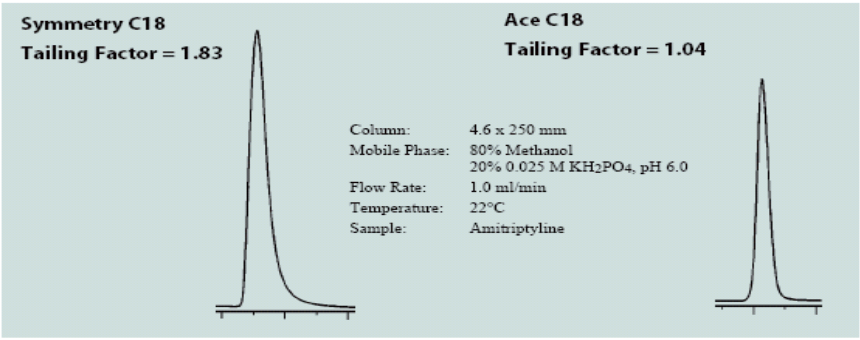
參照右圖，由於各廠牌終結處理方式的不同，既使終結處理之後，仍殘存有或多或少矽醇基-Si-OH。若是仍有相當多的殘存矽醇基，則該矽醇基 -Si-OH 提供了離子交換基-SiO^-，加上原矽膠 (Silica) 若含有些微重金屬，例如: Na^+…易於和 -SiO^-形成 -SiO^-Na^+ 更促進 -SiO^- 交換作用力。如此，-SiO^- 極性官能基的呈現，是與非極性-C18 官能基，有所矛盾，因此卓越優秀的 C18 (ODS) 材料，必須是甚少殘存矽醇基 (Silanol Group)。置言之，越少殘存矽醇基的 C18 (ODS) 材料，將是 RPLC 越是優秀的 C18 (ODS)材料。



殘存 -Si-OH 的具酸 -SiO^-，它非常容易與有機氨鹼物(R-N^+)的作用，這也就是容易造成該有機氨鹼物的“拖尾”圖峰 (Tailing peak)。

為了防止此類拖尾圖峰的形成，請謹慎選購卓越終結處理的 RPLC C18 (ODS) Column。請參考次頁圖例。

Columns With Extremely Low Silanol Activity Can Provide Acceptable Peak Shape for Even Difficult Basic Compounds



矽醇基-Si-OH 終結處理欠佳的 C18 (ODS)材料

卓越優秀矽醇基-Si-OH 終結處理的 C18 (ODS)材料

亦或參考下述防止有機氨鹼分析物圖峰“拖尾”的措施 :

1.)移動相調酸

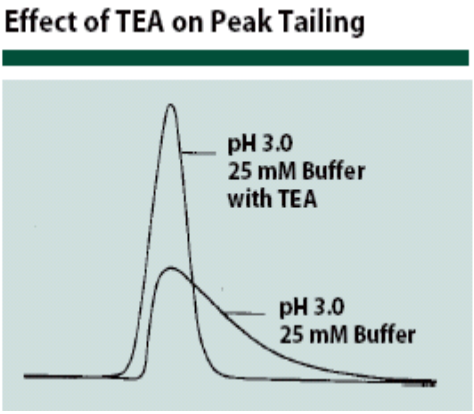
*調和 1% 醋酸，但不適用低於 UV220nm 以下波長的檢測
*調和 0.1% 蟻酸或 0.1% 三氟醋酸，適用至 UV210nm 波長的檢測
*調和 0.1% 磷酸，適用低至 UV195nm 波長的檢測

當移動相調和 pH ≦ 3.0 的“酸”，矽醇基-Si-OH 維持 Silanol (-Si-OH) 原型，不具解離的-SiO^-，減少對有機氨鹼物的吸附作用，不致於形成拖尾圖峰。

就分析物而言，如果是有機的酸 R-COOH 於調酸移動相時，保持非解離型 R-COOH，具更作用於 -C18 (ODS) 官能基而更有滯留性。反之，如果是有機的氨鹼 R-NH2，於調酸移動相時，促進 R-NH2 為極性 $R\text{-}NH3^{+}$ ，具解離性，則減少與-C18 官能基的作用，而降低滯留。

2.) 另則，移動相調和 5mM ~ 20mM 的醋酸鹽或磷酸鹽，適當調和 pH≦ 4.5，以防止矽醇基-Si-OH 的呈現解離型 $-SiO^{-}$ ，而降低分析物拖尾圖峰形成的機會。

3.) 或者，移動相試調和 2 - 5mM TEA (Triethylamine)，其功能為 TEA 的 R-N+ 帶正電荷官能基將爭先與解離性 $-SiO^{-}$ 帶負電荷官能基作用，具終結該 Silanol ($-SiO^{-}$) group 的活性，而降低分析物拖尾圖峰形成的機會。請參照如下圖示。



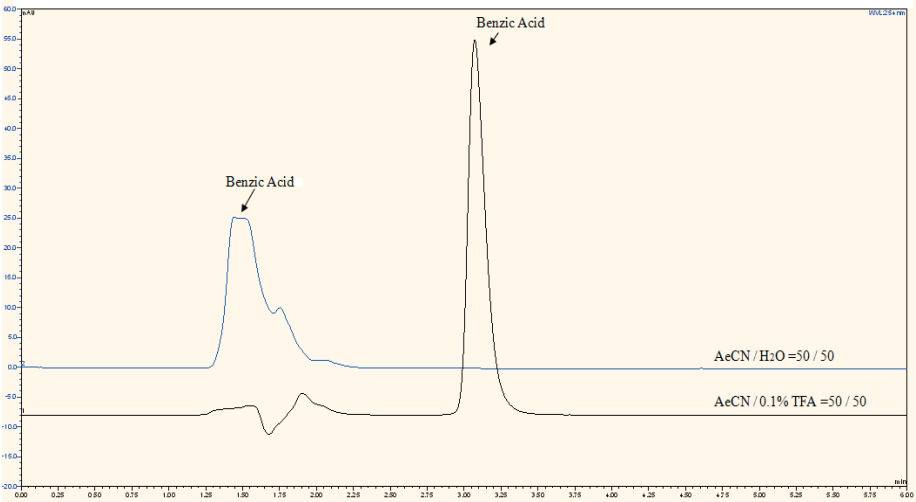
RPLC 抑制“酸”有機分析物的不解離效應 (Ion Suppression)

以層析管 Inertsil 5 ODS-4 4.6x150mm 為實驗例:

Benzoic Acid 於 H2O / AeCN = 50 / 50 移動相為解離型極性高分析物 $RCOO^- + H^+$，注入 Benzoic Acid 分析幾乎未有滯量，既被移動相溶洗出呈現欠佳不良圖峰。

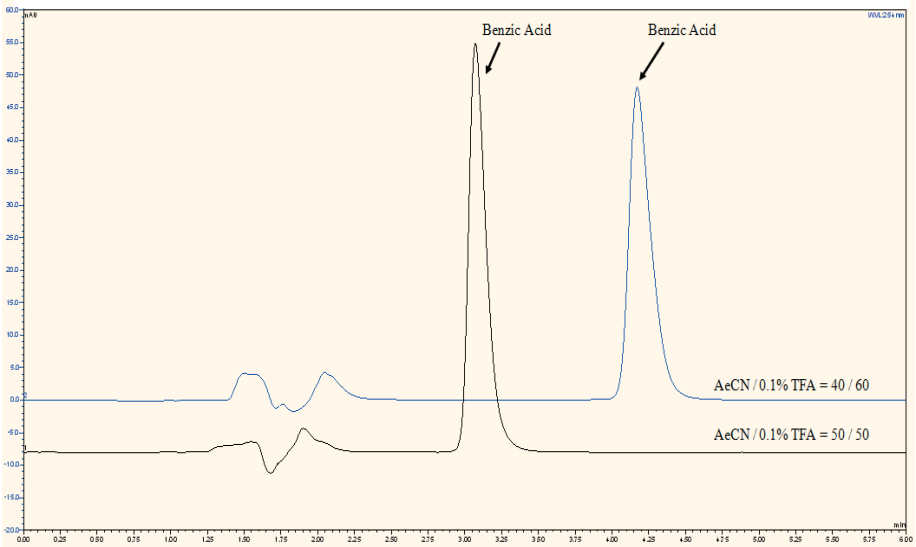
Benzoic Acid 於 0.1% TFA in H2O /AeCN = 50 / 50 移動相的測試時，Benzoic Acid 受 0.1% TFA 酸抑制成不解離，既 $RCOO^- + H^+ \rightarrow RCOOH$ 形成比較非極性型分析物，與-C18 (ODS)官能基不僅有適當作用滯留，且 Rt 延後，而呈現優良圖峰。

兩比對層析圖譜 (Overlaid Chromatogram) 如下圖所示。



當測試物 Benzoic Acid 受 0.1% TFA 的抑制成為較非極性型分析物之後，再按 RPLC 疏水性作用，乃至於移動相溶洗效應為分離機制。

Benzoic Acid 於相同 0.1% TFA 但是不同 AeCN 比例時的移動相溶洗，高 AeCN 比例溶洗強，則滯留時間縮短，低 AeCN 比例融洗弱，則滯留時間延後，請參考如下圖例。



HPLC, LC-MS 移動相調和酸，鹽類（Buffer）的運用

本文譯自英國 ACE HPLC Column 公司，由 LC Trouble Shooting 大師 Dr. John Dolan 執筆的一篇 "A Guide To HPLC and LC-MS Buffer Selection"

移動相為何需要調控 PH:

逆相層析法 Reverse-Phase HPLC 簡稱 **RP-HPLC** 的分析。當分析物若是具"解離性（Ionizable analytes）"，為使其安定則移動相 pH 的調控，將是一項重要的舉動。分析物具"解離性"往往是含有"酸"或"鹼"官能基，因而需要酸鹼鹽類調和，適當調控 pH，以獲有確實穩定 PH 值的移動相。

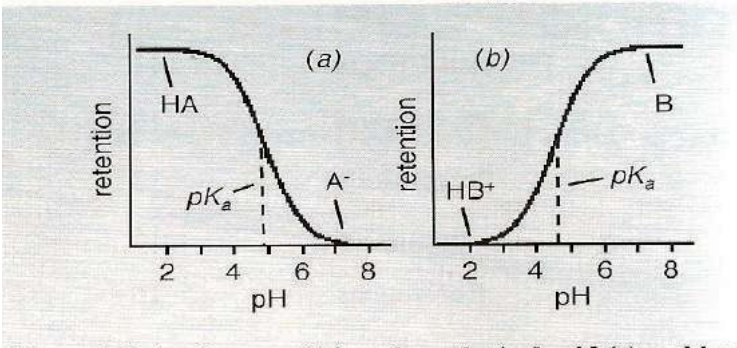


Figure 1. Retention vs. pH for a hypothetical acid (a) and base (b).

"解離性分析物"（Ionizable Analytes）會有一個解離係數 pKa。當具"酸"分析物於小於該 pKa 的兩個 PH 移動相時，將呈現"非解離型（non-ionized）分析物"若是大於 pKa 值的兩個 pH 移動相時，將呈現幾乎完全"解離型"分析物(>99% ionized)。反之，具"鹼"分析物，於低於該 pKa 之移相時，則呈現"解離型"，於高於該 pKa 之移動相時，則呈現"非解離型"。而 RP-HPLC 的分離內容，其基本意涵是分析物於移動相中呈現較"非極性型"時，則更具滯留性（Retention）。如此，在較低 pH 的移動相，"酸"分析物，將更具滯留性。反之較高 pH 移動相，

“鹼”分析物則更具滯留性。請參考 **Figure 1** 虛擬 HA 酸、B 鹼、對應 pH 變化的滯留性。如 **Figure 1** 所示，觀查該滯留曲線，當移動相的 pH 接近於 pKa 時，只要微小 pH 的改變，分析物滯留性則會有相當的變化。請參考如下 **Figure 2a 圖示**，移動相微小 0.1pH 的改變，即影響 peak 3 (4-chloroaniline), peak 4 (3-aminobenzonitrile) 的 Rs = 1.4，提升到 Rs = 3.0 的變化。再請參考 **Figure 2b** 的具“酸”(Salicylic acid)、中性 (Phenancetin) 及具“鹼”(Methylamphetamine) 的例子，於移動相的 pH = 5 時，三者之滯留性相當，當移動相 pH = 3 時，具“酸”分析物明顯地受到影響而提高滯留性，當 pH≧6 時，具“鹼”分析物，明顯地受到影響而更加增高滯留性。

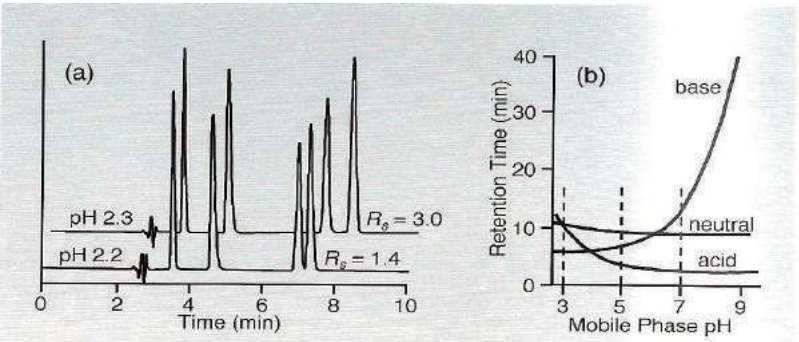


Figure 2. The effect of small changes in mobile phase pH on the separation.
(a) Basic analytes: p-anisidine, m-toluidine, 4-chloroaniline, 3-aminobenzonitrile (in retention order); 27:73 methanol/phosphate buffer.
(b) Acid: salicylic acid; base: methylamphetamine; neutral: phenacetin.

移動相 pH 考量之外，更須注意層析管柱材料的 pH 適用性。一般而言，矽膠或矽膠再鍵結其它官能基的材料僅適用於 2 < pH < 8。當移動相 pH 小於 2 時，所鍵結官能基易於被水解斷裂。當 pH 大於 8 時，矽膠之 -Si-O-Si- 骨幹易於被溶解受到傷害。高純度的矽膠比之低純度矽膠更耐高 pH 的操作。而矽膠表面仍有殘存解離性矽醇基 (-Si-OH)的影響。早期，商用所得的比較不純的矽膠稱之為 Type-A Silica，該矽醇基之 pKa 為

PH 4-5 之間，因此移動相 pH 大於 6 時，該矽醇基(Si-O$^-$H$^+$)則呈現“解離性”的(-SiO$^-$ H$^+$)易與氨鹼物作陽離子交換作用，這也就是吸附氨鹼分析物使之拖尾的原因。之後的發展，商用得有更純的矽膠，稱之為 Type-B Silica 具 pKa > 7。該 Silica 具 pKa > 7。如此，矽醇基(Si-O$^-$H$^+$)解離機會非常少。而少有吸附氨鹼物而至拖尾現象。**Figure 3** 說明高純度矽膠呈現尖銳圖峰、低純度矽膠，因為殘存矽醇基的吸附作用，使得氨鹼物，則呈現不良圖峰的比較。

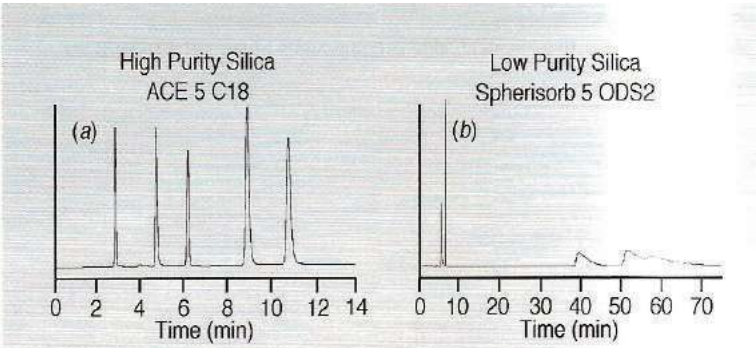


Figure 3. The effectiveness of high purity silica in reduction of silanol tailing of bases.
Components: norephedrine, nortriptyline, toluene (neutral), imipramine, amitriptyline.
Conditions: 250 x 4.6mm, 5μm columns; 80:20 methanol/25 mM phosphate (pH 6.0); 1.00mL/min

實用觀:

依據以上的說明，於 RP-HPLC 方法開發之啟始移動相的 pH 為 2-3 是一個好的開始，因為移動相 pH = 2-3 多數有機的酸將被抑制而不解離，呈非極性更有滯留性，就矽膠殘存的矽醇基，同樣地被抑制而成為不解離的 -SiOH 減少對氨鹼分析物的吸附作用。

PH 調控:

解離性分析物的滯留，深受移動相 pH 影響。因此移動相得調和適當“鹽類”(Buffer)，再調和適當酸鹼用以控制 PH。請參考 **Table 1**，移動相常用之鹽類。HPLC 配合 UV 作檢測，最常用鹽類為磷酸鹽及醋酸鹽。因為兩者皆適用至低波長 UV220nm，特別是須低於 UV220nm 之檢測，磷酸鹽則更適合。

Table 1. pK_a Values of Common Mobile Phase Additives[1]

pK_a (25°C)	compound
0.3	trifluoroacetic acid[2]
2.15	phosphoric acid (pK_1)
3.13	citric acid (pK_1)
3.75	formic acid
4.76	acetic acid
4.76	citric acid (pK_2)
4.86	propionic acid
6.35	carbonic acid (pK_1)
6.40	citric acid (pK_3)
7.20	phosphoric acid (pK_2)
8.06	tris
9.23	boric acid
9.25	ammonia
9.78	glycine (pK_2)
10.33	carbonic acid (pK_2)
10.72	triethylamine
11.27	pyrrolidine[3]
12.33	phosphoric acid (pK_3)

[1] data of [1]; [2] Merck Index; [3] CRC Handbook of Chemistry and Physics

如下頁 **Table 2** 所示，磷酸鹽具三個 pKa 值，適用三個 Buffering 的範圍: 1.1

< pH < 3.1、6.2 < pH < 8.2 及 11.3 < pH < 13.3。實用時，選取 2.0 < pH < 3.1，至於 pH 3.1 ~ 6.2，剛好可以醋酸鹽調和之。因此就矽膠的層析管 (Silica-based column)適用 2 < pH < 8，磷酸鹽及醋酸鹽為適用 Buffer。

Citrate Buffer 具三個 pKa 適用 2.1< pH < 6.4，然而 Citrate 於 UV 低波長吸光性強，無法作低於 UV220nm 的檢測分析。

Table 2. Common HPLC Buffers

buffer	pH range	LC-MS compatible
phosphate (pK_1)	1.1 – 3.1	X
phosphate (pK_2)	6.2 – 8.2	X
phosphate (pK_3)	11.3 – 13.3	X
acetate[1]	3.8 – 5.8	YES
citrate (pK_1)	2.1 – 4.1	X
citrate (pK_2)	3.7 – 5.7	X
citrate (pK_3)	4.4 – 6.4	X
trifluoroacetic acid (0.1%)	2.0	YES
phosphoric acid (0.1%)	2.0	X
formic acid (0.1%)	2.7	YES
ammonium formate	2.7 – 4.7	YES
ammonium bicarbonate	6.6 – 8.6	YES
borate	8.3 -10.3	YES

[1] suitable for LC-MS as ammonium acetate

LC-MS 適用鹽類:

當質譜儀(Mass Spectrometer)作為 HPLC 的偵檢器時，必須選用 **"可揮發性"**鹽類，從上 **Table 2** 看出傳統常用之磷酸鹽，不具揮發性而不適用。醋酸氨(Ammonium Acetate)具揮發性而可用於 3.8 < pH < 5.8，而 2.7 < pH < 3.7 則甲酸氨(Ammonium Formate)適用之，6.6 < pH < 8.6 則碳酸氫氨(Ammonium Bicarbonate)適用之。

只選用低 pH:

由上 **Table 2** 可以看出，若只須選用低 pH，則 0.1%磷酸(Phosphoric Acid) 適用。另者，移動相的調和 0.1%三氟醋酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA)，可作成 pH≒2 頗受 LC-MS 使用者的喜愛。選用 TFA 另具“離子隅對試劑”功能，而常被用來分析 Protein, Peptide 的應用，**值得注意的是 LC-MS 操作使用 TFA 會降低 MS 的解離化功能，而影響其感度變低，逐漸地 0.1% 甲酸 (Formic acid) pH≒2.7 取代了 TFA 於 LC-MS 的分析。**

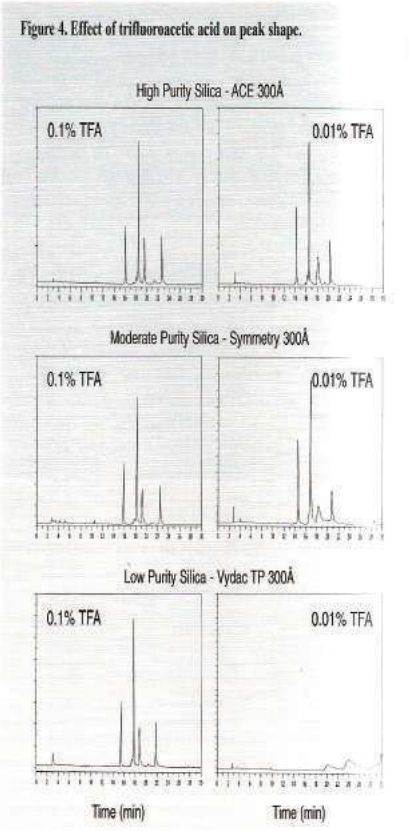
或須高 pH:

前曾述及當 pH 高於 8 會融溶“矽膠”的骨幹造成傷害，因此 pH 高於 8 的移動相，則不建議使用。若必須使用高 pH 移動相以增進分離效應者，須選用耐高 pH 的層析管。一般的認知，矽膠具高純度、高品質的官能基化學鍵結及完善矽醇基的終結處理，都是降低或減少被融溶，即降低對層析管材質的傷害。或是少用“磷酸鹽”因為高 pH 會促進矽膠的融溶。或是有機相改用 Pyrrolidone 可防止在高 PH 的融溶。即使是如此的注意使用，一旦常用於高 pH 移動相，層析管壽命會受影響的。

須調和鹽類的濃度:

移動相調和鹽類在於提供適切的 pH，若僅為 pH 需求，則些許少量即可。多數注入分析的量，大約是在 ng/ml 至 ug/ml 範圍，如此即使注入了 100ul 作分析，也不過是數百 ng 的量，只要些許於 pKa 值的一個 pH 變化量的鹽類即夠充分。

層析管材料被鹽類充分佈滿也是 Buffer 量的考量，然而，越是更純的矽膠，越是毋須高 Buffer 量的使用。這一點，可由右圖 **Figure 4**，不同 TFA 使用量的移動相所獲得不同的圖峰型，**Figure 4** 左邊的三種層析管，使用了 0.1% TFA 之圖峰型優良。若降低為 0.01% TFA 時，有的圖峰則變得不成峰型。



雖然大家都選用高純度 Type B Silica，但是矽醇基終結處理的不同，而有所差別。也就說明了 0.1% TFA 大約是 **5-10mM 量即是適和 Buffer 用量**。另者考量，溶解分析物之 pH，儘量接近移動相 pH，以求取注入分析快速與移動相的平衡。如此，也是減少移動相的 Buffer 用量。

<u>鹽類的溶解性:</u>

前節提到 Buffer 的用量，現在則問到底可用到多高 Buffer 用量?**答案是不得讓鹽類自移動相結晶析出沈澱為原則**。因為一旦移動相產生“鹽類析出結晶現象”沈積於層析管，則層析管會受損，沈積於 Pump 或相關管路…則另須清理。實務上，鹽類是最不溶於 THF，稍不溶於 AeCN，而稍好些而可適當溶於 MeOH。這可由下頁 **Table 3** 看出，磷酸鉀鹽於 pH = 7.2 不溶於 MeOH, AeCN 及 THF，於 80% MeOH 時，它的溶解量為 15mM，於 80% AeCN 時，它的溶解量則降為 5mM，於 80% THF 時，它幾乎不溶

(<5mM)。因此不論是 Isocratic 操作或 Gradient 操作，必須注意移動相有機溶媒的比例量，以避免“鹽類”的結晶析出。

Table 3. Solubility of Potassium Phosphate, pH 7.0, in Common HPLC Solvents[1]

%B	MeOH	ACN	THF
50[2]	>50 mM	>50 mM	25 mM
60	>50	45	15
70	35	20	10
80	15	5	<5
90	5	0	0

[1] data of [2]; [2] >50 mM in all solvents at lower %B

Table 3 指的是移動相的大量的調和，若是 LC 儀器，不論在線上高壓式溶媒梯度混合，或是在低壓式溶媒梯度混合，得更特別注意。例如一瓶 A 為 25mM 鹽類與一瓶 B 為 100% AeCN，設定混合為 A/B = 40/60 比例，而得到 10mM buffer 及 60% AeCN 當混合移動相，這一比例，當 A / B 兩相瞬間接觸時即可能產生結晶析出的沈澱，這就是 LC 操作的問題源之一。如 **Table 4** 磷酸氨鹽比之磷酸鉀鹽更能夠溶解於 AeCN 而醋酸鹽比磷酸鹽更能溶於 AeCN 或是鉀鹽比之鈉鹽更易溶解。

移動相、鹽類的配製與調和:

Table 4. Solubility of Various Buffers in Acetonitrile[1]

%B	ammonium acetate pH 5.0	ammonium phosphate pH 3.0	potassium phosphate pH 3.0	ammonium phosphate pH 7.0	potassium phosphate pH 7.0
60[2]	>50 mM	>50 mM	>50 mM	50 mM	45 mM
70	>50	>50	>50	25	20
80	>50	35	20	5	0
90	25	5	0	0	0

[1] data of [2]; [2] >50 mM in all solvents at lower %B

一定有機相、鹽類比例之移動相，可借由人工預配、過濾、除氣，置於一個儲存容器後，由 Pump 供輸進行 HPLC 分析。另者，可借由 LC 儀器的混合，即一瓶適當鹽類濃度及一瓶 100%有機相的混合，或是備妥一瓶固定濃度鹽類，與另一瓶有機相預為配合相同濃度鹽類的混合供輸。若是須要梯度變化操作，更須由 LC 儀器線上執行梯度的混合。**當 LC 儀器執行鹽類與有機相的兩相混合，會有潛在的兩液混合產生結晶析出沈澱問題**。例如前述人工容易配製 10mM Potassium Phosphate, pH=7.0 Buffer in 60% AeCN 移動相，若改以 LC 儀器線上混合 25mM Potassium Phosphate 與 100% AeCN 設定為 40/60 比例操作，當兩液接觸的瞬間，即可能發生“結晶析出”的沈澱問題。如果改配製一瓶第一液低溶洗之 10mM Potassium Phosphate Buffer，配製另一瓶第二液高溶洗之 70% AeCN，30% (33mM Potassium Phosphate) in H2O，也就是 70% AeCN, 10mM Potassium Phosphate，不論自低溶洗的第一液，梯度混合第二液鹽類一直是 10mM 而有機相可梯度混合達 60%，都不致於會有“結晶析出”的問題。

Buffer 的配製指引，詳細可查詢參考書，例如:L.R.Snyder, J.J. Kirkland and J.L. Glajch 著 Practical HPLC Method Development, 2nd ed, Wiley-Intersuence, New York (1997)

移動相作鹽類的 PH 調整，得在 Buffer 先適當調妥 pH 之後，再與有機相的混合，請勿 Buffer 與有機相混合成移動相後而作 pH 的調整。

<u>留意事項:</u>

RP-HPLC 為達成優良分析結果，有些預防措施須預為留意。所須鹽類、試劑、水…等絕對是要符合 HPLC 級要求。如下 **Figure 5** 所示，兩次不同時間使用了不同品牌鹽類、不同品牌 AeCN ，相同用水，而配製了低

溶洗第一液及高溶洗第二液移動相，經由沒有注入樣品作分析只執行梯度操作(Blank Gradient)而得到 **a**、**b** 兩個分離圖譜，說明了 **a** 圖譜比之 **b** 圖譜顯現了可能是鹽類 AeCN 帶來的不純物的 peak。至於基線漂移是在更低 UV 波長，例如<220nm，則更為明顯。選用更純 HPLC 級鹽類、試劑、有機溶媒是基本要求。

鹽類(Buffer)溶液，往往是細菌生長的媒介物，建議鹽類溶液的保存期為一週時間，至於 LC-MS 的鹽類溶液，例如是 Ammonium Bicarbonate 易於受揮發、存放時間變化的改變，建議當日用當日配製為宜。

當使用了鹽類溶液 LC 儀器分析畢，毋將鹽類溶液留置 LC 系統即關機離去。必須以 MeOH / H2O=50/50 流洗 LC 儀器，並作適當層析管柱的清洗。

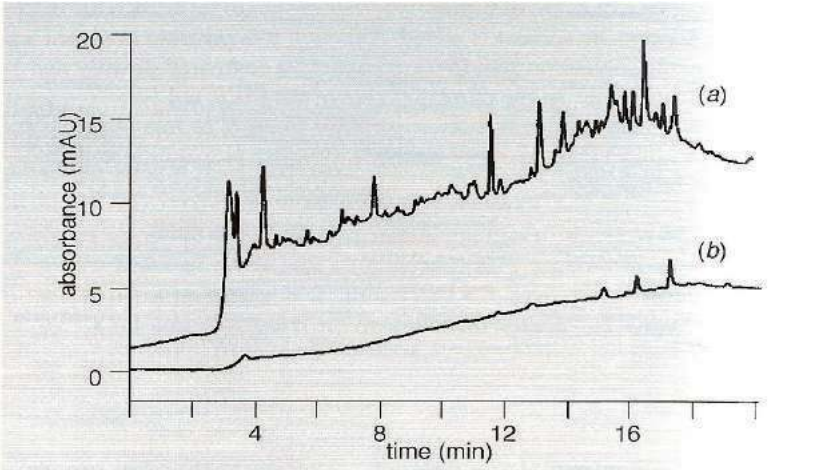


Figure 5. Effect of pH-probe contamination of buffer.
Blank gradients with (a) buffer prepared in contact with pH probe; (b) no contact with probe. Adapted from [8].

結語:

*鹽類於 RP-HPLC 是用來調控解離性分析物(Ionizable compounds)的滯留性(Retention)，通常是用來抑制解離性分析物，使之趨向更非極性而有最適當的滯留，這個用意，指的是“酸”分析物，低於該 pKa 值的兩個 pH，或是“鹼”分析物，高於該 pKa 值的兩個 pH 為最適宜 pH 之滯留性。

*有效的鹽類調和為分析物 pKa 之± 1 pH，請參考 Table 1 及 Table 2 加以運用

*以 LC-UV 分析，磷酸鹽及醋酸鹽是 RP-HPLC 層析管柱 2 < pH < 8 最適用鹽類

*以 LC-MS 分析，必選揮發性鹽類限 Formate, Acetate, Ammonia and Bicarbonate 的使用

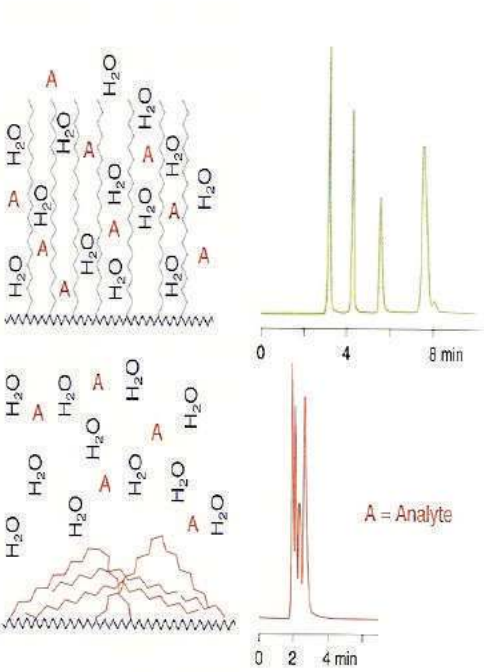
*很多 LC-UV, LC-MS 分析，於低 pH 的運用時，0.1% Phosphoric 適用 LC-UV，Formic acid 適用 LC-MS，一般控制矽醇基(Si-OH)活性，使之不趨向解離，則 5~10mM 鹽類濃度，即夠充分應用。

*LC 儀器混合時，單瓶鹽類溶液不建議高於 25mM 濃度，以免與 100% AeCN 混合，瞬間產生結晶析出問題。

*分析畢，鹽類溶液必須被清洗。

RPLC C18 (ODS)-AQ 適應全水相移動相 (Aqueous Eluents)

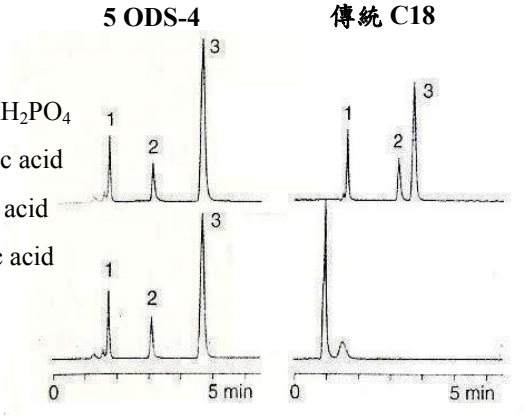
矽膠所鍵結 OctaDecylSilane C18 (ODS) 官能基為非極性，它可溶於 MeOH, AeCN…等有機溶媒。當 C18 (ODS) 被鍵結於矽膠表面，流通含 MeOH, AeCN…等有機性移動相，該-C18 (ODS) phase 自 Si-O-Si 骨幹伸展出 **“刷子狀”-$C_{18}H_{37}$** (如圖所示)，等候移動相載送來分析物進行“分配” partition 作用滯留分離機制。當移動相逐漸提高水相比例時，C18 (ODS) phase 與高水相比例移動相互溶性逐漸變差些，直到>95%水的移動相，甚至全水相時，該 C18 (ODS) phase 則不溶存於該全水相，而鬆垮，無法備與分析物進行 partition”分配”作用滯留機制如圖所示。一般傳統 C18 (ODS)層析管柱,於高於 95%的水相或全水相移動相的分析數據可能比較欠可靠難有再現性。為解決此缺憾，於低有機相、高水相，甚至是全水相，能有再現性而可靠的分析數據，而有 C18 (ODS) AQ(Aqueous)適用全水相層析管柱的上市。



目前適應高水相移動相產品，是在 C18(ODS)前另加“多重親水 OH 基”，再鍵結於矽膠表面者，即 Si-O-Si-PG-$C_{18}H_{37}$ Embed Polar Group 方式者。另者，於矽膠鍵結 C18 (ODS)後，再以“親水基”作“親水性終結處理”，成為真正適用 100% 全水相，即 Hydrophilic Endcapping 方式者。

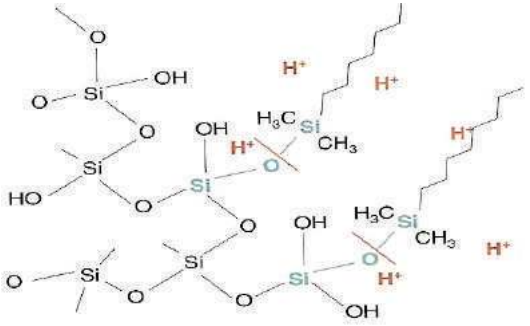
Inertsil 5 ODS-4

適用有機性移動相，鹽類，全水相層析管柱的測試例如下:

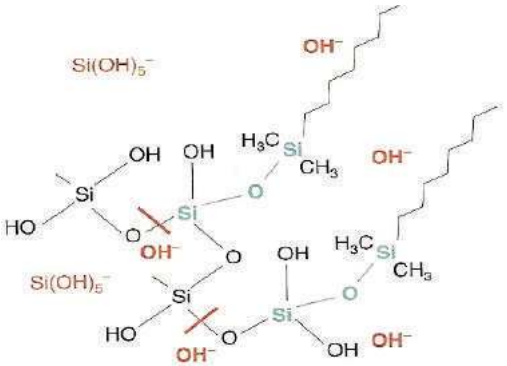


RPLC 材料 C18 (ODS), C8…適用移動相之 PH 值為何 ？

矽膠化學鍵結 C18 (ODS), C8, 或 Ph, C4, C2, C1…假使移動相低於 PH 2.0，所鍵結 C18 (ODS), C8, Ph, C4, C2, C1 該 Siloxane bonds 容易被水解，受傷害斷裂，而損失了所鍵結的 C18 (ODS), C8, Ph, C4, C2, C1 官能基如下圖 紅切割線 所示:



矽膠化學鍵結 C18 (ODS), C8, 或 Ph, C4, C2, C1 官能基，若是處於 PH 大於 7.8 以上鹼性移動相，矽膠 -Si-O-Si 骨架，容易受到傷害而有斷裂之虞。如下圖 紅切割線 所示:



傳統 RPLC C18 (ODS), C8, 或 PH, C4, C2, C1 適用移動相之 PH 值為 2 – 7.8，超過此 PH 值，若 <2 或 >7.8 移動相，相對地傷害該材料，減少 RPLC 層析管柱使用壽命。

有適用廣範圍 PH 移動相之矽膠化學鍵結 C18 (ODS), C8…?

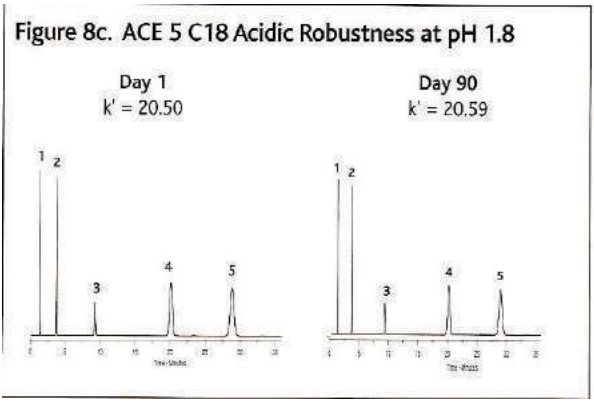
不過，由於化學鍵結技術的精進，確有廠商製造出廣泛圍適用: PH = 1-12 的 C18 (ODS)材料，但是，這必須由製造廠商的技術說明，提出在高 PH 值 = 12 或是低 PH 值=1.8 的耐用壽命測試。請參考如下圖例說明:

商用 C18 (ODS)酸鹼測試例

測試分析物: 1. Uracil 2. Dimethyl Phthalate

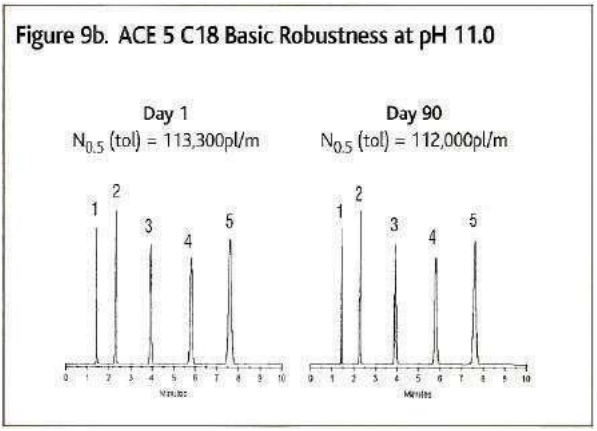
3. Toluene 4.Biphenyl 5. Phenanthrene

(I) 測試移動相: 50 / 50 = AeCN / 0.1% TFA in H2O, pH=1.8



Ace 5 C18 層析管柱，於 pH=1.8，第一天測試之 K’=20.50，經過 90 天的操作，仍然維持 K’=20.59 具卓越耐酸移動相。

(II) 測試移動相: 50/50 = AeCN / 25mM Pyrrolidine in H2O, pH=11



Ace 5 C18 層析管柱，於 pH=11，第一天測試獲有理論板 N=113,300 /米，經過 90 天的連續操作，再測試，仍然 N = 112,000 /米的優越理論板數，具卓越耐鹼移動相。

RPLC 移動相的載送與溶洗

當分析物群，被注入分析，受移動相的溶融載送進入層析管柱與內部材料的接觸，分析物群之各個分析物分別與管柱中材料的-C18(ODS)官能基進行 Partition 吸附作用。繼之，再被移動相溶洗出。由於極性分析物比非極性分析物較少與 -C18 (ODS) 官能基的 Partition 吸附作用，旋既快速被移動相溶洗出，而成為極性分析物先於非極性分析物的分離順序圖譜。

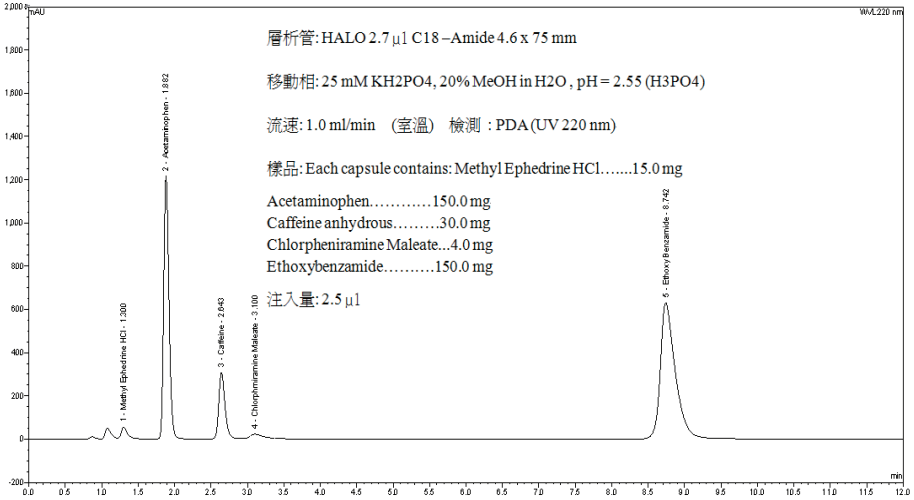
一定比例組成的移動相溶洗 - Isocratic Elution

分析物群中之各個分析物，相互之間的極性有著確實而明顯的差別時，或是同族群分析物，通常一定組成比例移動相的載送溶洗，即足以完成分離工作。舉感冒藥含 Methyl Ephedrine HCl, Acetaminophen, Caffeine, Chlorpheniramine Maleate, Salicylamide, Ethoxybenzamide 的分析為例，試以 HALO 2.7um C18-Amide 4.6 x 75mm 於一定組成比例移動相的載送溶洗，即足以完成分離工作。

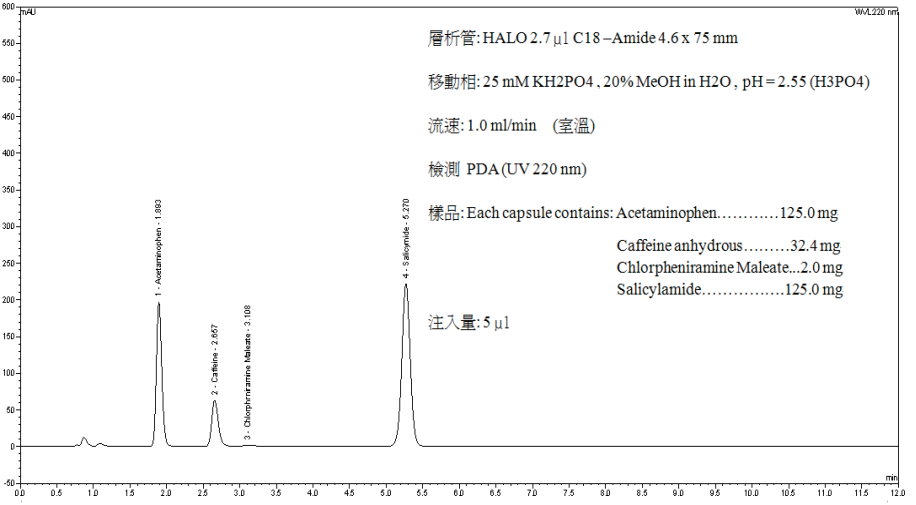
一定組成比例移動相的載送溶洗 (Isocratic Elution)分析例

1.) HALO 2.7um C18-Amide 比之 C18 (ODS) Phase 具更弱非極性滯留，而 C18-Amide 基(-CONH-)又具極性物親和性，使得-C18-Amide 特有適用的感冒藥分析應用，請參照如下的兩個實驗例。

分析 Acetaminophen, Caffeine, Chlorpheniramine Maleate, Ethoxybenzamide

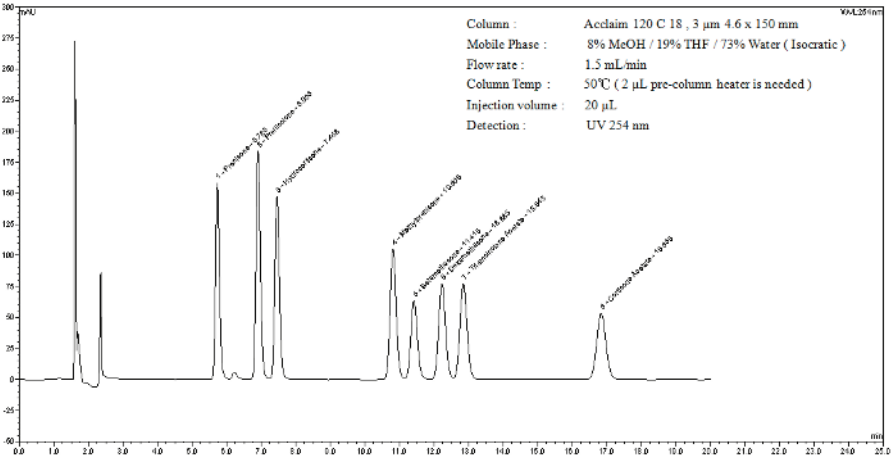


分析 Acetaminophen, Caffeine, Chlorpheniramine Maleate, Salicylamide



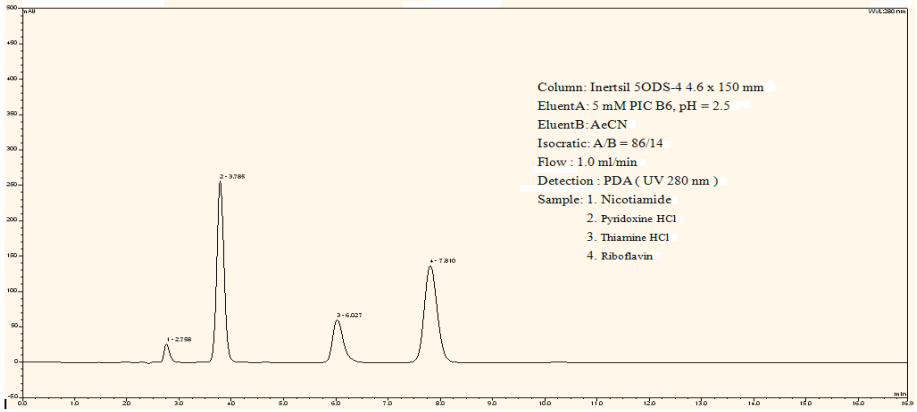
2.) 8 – Steroids 分析例

代表性於 Acclaim C18 層析管柱的三相 MeOH / THF / H2O = 8 / 19 / 73 一定組成比例移動相的載送溶洗，完成 Prenisone, Prenisolone, Hydrocotisone, Methylprenisone, Betamethasone, Dexamethasone, Triamcinolone, Cotisone 的分離檢測。



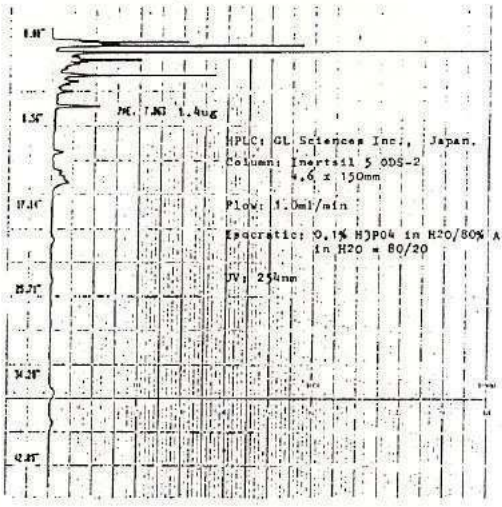
3). 口服液維他命分析例:

5mM PIC B6, pH = 2.5 / AeCN = 86 / 14 一定組成比例移動相的載送溶洗，完成 Nicotiamide, Pyridoxine, Thiamine, Riboflavin 的分離檢測



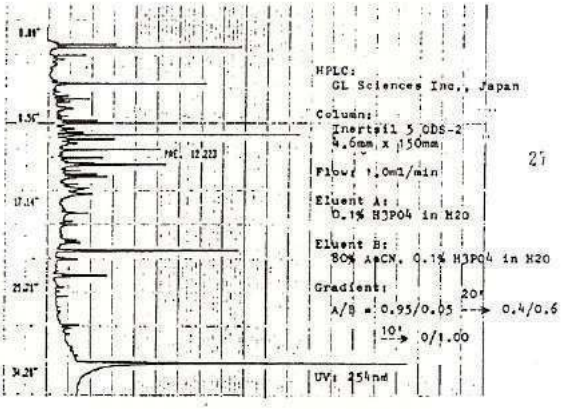
增變溶媒，增進分離效應的梯度操作 - Gradient Elution

若是成份複雜的分析物、極性、非極性差別大者，往往一定比例組成之移動相只能溶洗出部份分析物。無法將分析物群全部予以溶洗出。



圖一

舉“芍藥”為例、其萃取液成份複雜、具極性、非極性差別性。於移動相: 20 / 80 = (80% AeCN in H_2O) / (0.1% H_3PO_4 in H2O) 的一定溶洗實驗例，指標物 Paenoflorin 於 RT = 7.863 成功地被溶洗分離出。但是，限於移動相為固定比例組成溶洗，仍然有分析物無法被溶洗出，殘存層析管柱中，此種狀況稱之為分析物於層析管的殘留(Residue Effect) ，



圖二

請參考右圖一所示。

前述分析物於層析管柱的殘留，為 Isocratic Elution 操作所無法避免的，這也就是層析管柱須要作“清洗”甚至“再生”的原因。

為避免形成層析管柱的殘留效應，於 LC 儀器執行 Gradient Elution - 梯度增變溶媒的溶洗操作，持續提供第二高溶洗移動相，繼續進行分離兼清洗層析管柱。

請參照前頁右圖二實驗例

Eluent A: 0.1% H3PO4 in H2O
(不含有機相低溶洗第一移動相)。

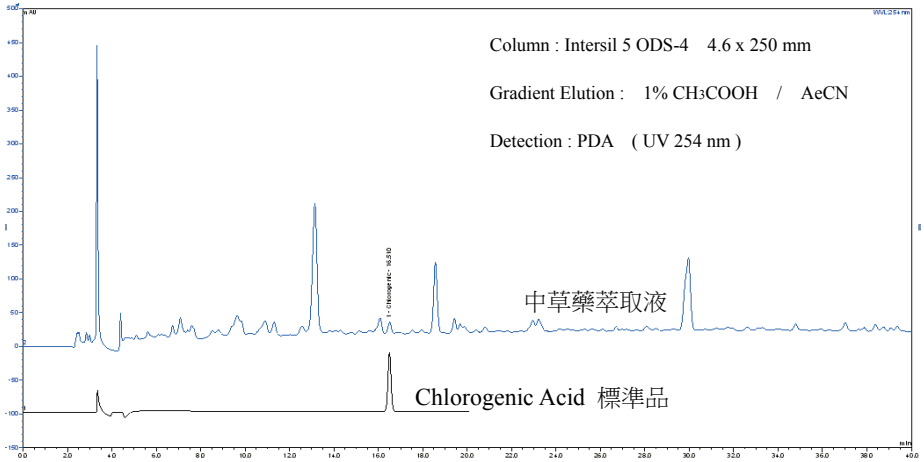
Eluent B: 80% AeCN, 0.1% H3PO4 in H2O
(含高比例有機相高溶洗第二移動相)。

設定流速 1.0ml/min，Gradient 梯度條件 %A / % B = 95 / 5 -> 20 min -> 40 / 60 -> 30min --> 0 /100，於開始第一移動相低有機相的低溶洗，依時間設定逐漸增變高溶洗的操作，指標物 Paenoflorin 於 RT=12.223 被溶洗分離出，而且比目標物更非極性，甚至更延後之成份，則被第二移動相高有機相的高溶洗，繼續溶洗出。

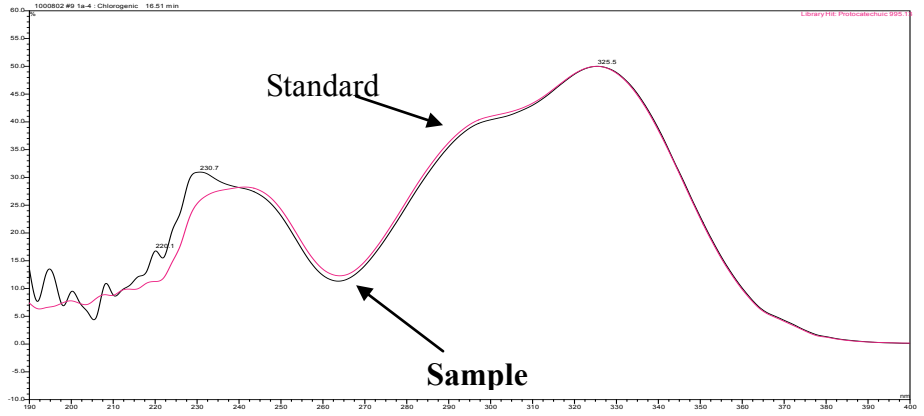
另舉中草藥萃取液，以 Chlorogenic acid 為指標物，經由細膩梯度分離，於 UV254nm 的檢測例。藉由 Chlorogenic Acid 參考品於 PDA 全波長檢測，記憶 190-800nm 吸光圖譜(Spectrum)存檔之，而後的樣品分析，將樣品中的 Chlorogenic Acid 的 Spectrum 存檔之。再與參考品 Chlorogenic Acid 的 Spectrum 兩相比對達>99.5%相似度，更說明樣品中被分離出所檢測之 Chlorogenic Acid 單一圖峰的乾淨性，即 Peak Purity 與參考品吻合度高達

>99.5%，驗證該圖峰分離的成功性，請參考如下圖示。

中草藥萃取液含 Chlorogenic Acid 兩液梯度分析例，如下圖示。



樣品中分離出 Chlorogenic Acid 與標準品吸光 Spectrum 之比對圖符合性達> 99.5%，如下圖示。



另舉 ”黃芩” 含 Baicalin, Baicalein, Wogonin 分析例於下:

實驗參考:

層析管: Vercopak Inertsil 5 ODS-2 4.6mm x150mm

移動相: A. 0.1% H_3PO_4 in D.I.H_2O

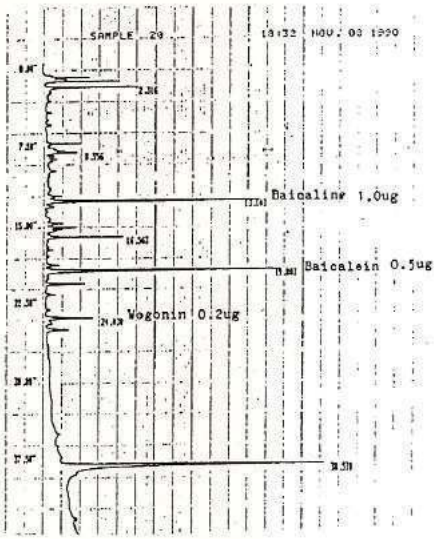
B. 80%AeCN in D.I. H_2O

流　速: 1.0ml/min

Gradient: A/B = 80/20→45min→0/100

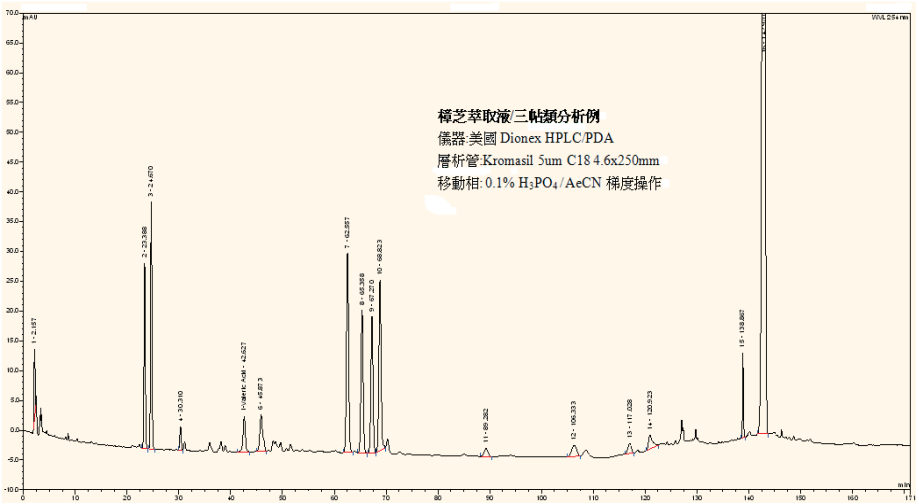
檢測器: UV254nm

分析物:黃芩(指標物 Baicalin, Baicalein, Wogonin)



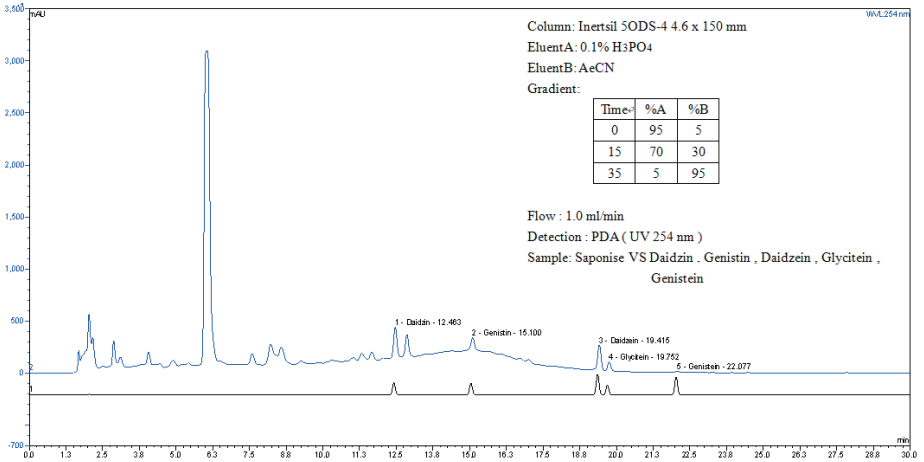
天然物、中草藥萃取液等成份複雜、極性差別懸殊。 於 RPLC 分離檢測的分析時，宜採行 Gradient Elution 梯度操作，不但是提升分離效應，更是減少分析物殘存層析管的殘留影響。

樟芝萃取液 - 典型 RPLC 兩液梯度分離檢測應用例



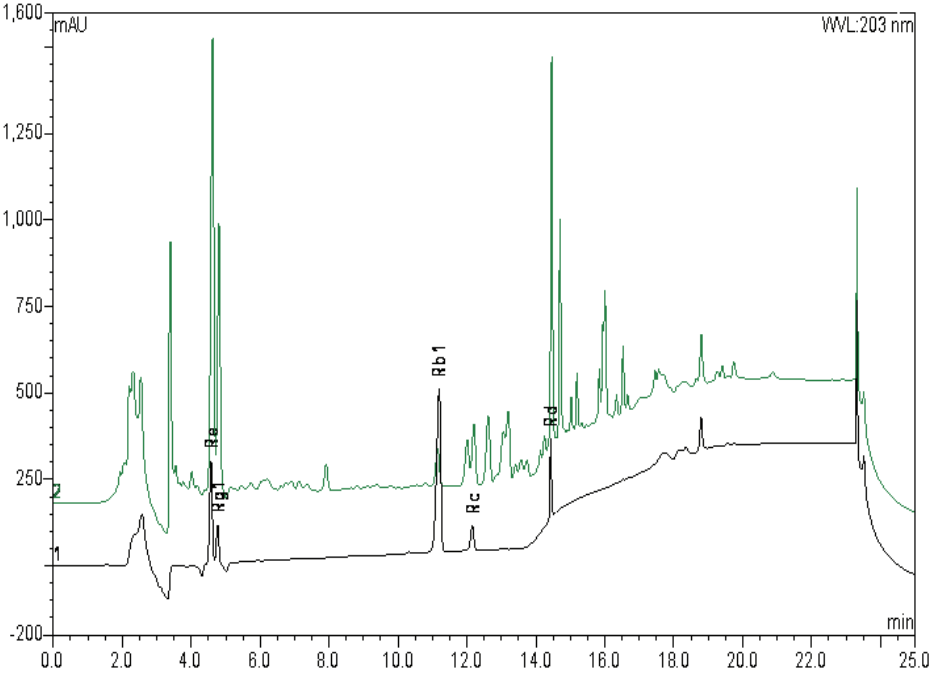
大豆 Saponise - 典型 RPLC 兩液梯度分離檢測應用例

RPLC 移動相於 0.1% H3PO4 / AeCN 兩液梯度分離檢測的操作，可以開發建立 Daidzin, Genistin, Daidzein, Glycitein 及 Genistein 的定性及定量分析。請參考大豆 Saponise 以及標準品比對圖譜如下圖示。



Gradient Elution 的基線漂移?

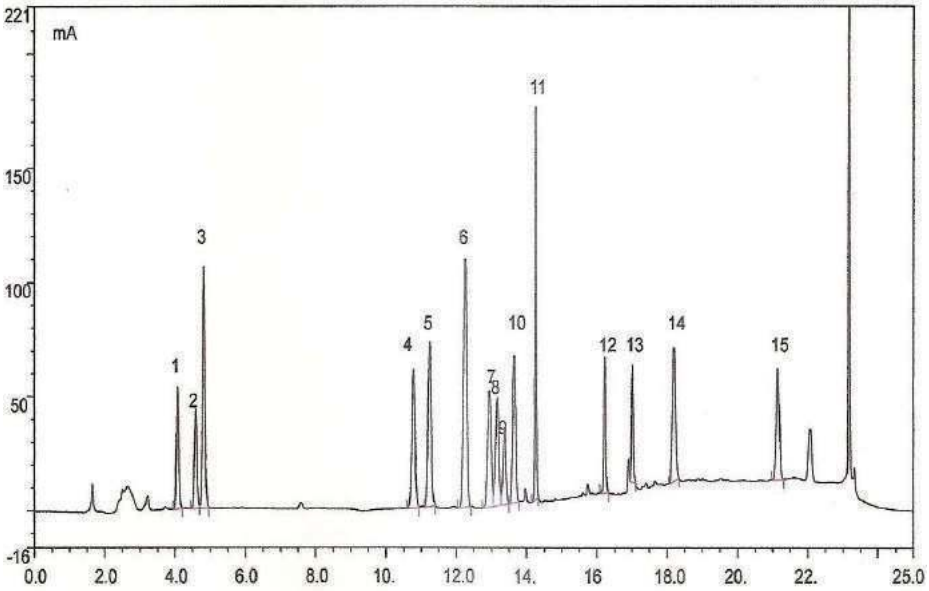
移動相調和有機溶媒 MeOH, AeCN 或 Buffer 時，各有其針對檢測器所選用波長 “UV 光量吸收性” (UV Absorbance) 。若以 H2O 調和 AeCN 的梯度增變量操作，當梯度第二液 AeCN 增量時，若有不純雜物針對選用檢測 UV 波長光量吸收性逐漸增加，基線既逐漸出現上漂。請參照下圖。



參照上圖。本實驗為“人蔘”萃取液，以標準品 Ginsenoside Re, Rg1, Rb1, Rc, Rd，採用 Acclaim 5 C18 4.6x250mm 層析管柱執行 H2O/AeCN 梯度操作於 PDA (UV203nm) 檢測之。低波長 UV203nm 具強光量檢測性，對於 H2O 乾淨性，AeCN 溶媒之純度，更為敏感。本實例於 14.0min 之後基線上漂，

起因於所採用的 AeCN 溶媒，純淨度不夠。當 AeCN 於梯度增量時，該 AeCN 或是所含不純性物質，隨 AeCN 的增量，就 UV203nm 低檢測波長的吸光性明顯增加，基線即隨著上漂。至 25.0min 結束分析恢復至啟始 H2O / AeCN 梯度移動相的基線。

該基線上漂，若改用更純淨 HPLC 級光譜級 AeCN 作為梯度的第二高溶洗移動相，則改善基線漂移，成為比較平穩的基線，如下圖示。



偶對離子層析法 (Ion Pair Chromatography)

通常，酸或鹼有機化合物極性高，難有於-C18(ODS)官能基的作用，而少有滯留。對於酸或鹼極性高的有機化合物，若能夠提供對應之鹼或酸有機化合物，與之作酸鹼、或鹼酸對隅作用，使之降低極性，成為較非極性型分析物，既可按前述 RPLC 逆相層析法，差別“極性”和“移動相溶洗”的疏水性作用的分離機制進行分離。 Ion Pair Chromatography (IPC)是針對極性高的酸或鹼有機分析物，與鹼或酸的對隅試劑，隅合成比較非極性型的分析物，於-C18(ODS)有適當滯留作用而完成分離檢測。

1.) “氨鹼”有機物的分析

針對 “氨鹼”有機分析物，有以下幾種常用的“酸”的有機隅對試劑 (Ion Pair Reagent) :

PIC C5 (PIC B5)	Sodium 1-Pentansulfonate	$CH_3(CH_2)_4SO_3Na$
PIC C6 (PIC B6)	Sodium 1-Hexamesulfonate	$CH_3(CH_2)_5SO_3Na$
PIC C7 (PIC B7)	Sodium 1-Heptanesulfonate	$CH_3(CH_2)_6SO_3Na$
PIC C8 (PIC B8)	Sodium 1-Octanesulfonate	$CH_3(CH_2)_7SO_3Na$
PICC12 (PIC B12)	Sodium 1-Doduylsulfonate	$CH_3(CH_2)_{11}SO_3Na$

隅對 (Ion Pairing) :

$CH_3(CH_2)_5SO_3^-$ (極性) + RN^+H_3 (極性) → $CH_3(CH_2)_5SO_3^-N^+H_3R$ (非極性)

作用說明 :

層析管 Si-C18 (ODS) 材料和移動相所含有隅對試劑 $CH_3(CH_2)_5SO_3^-$須先“平衡”並佈滿形成待和“氨鹼”有機分析物作用層面 **Si-C18** ~ **$CH_3(CH_2)_5SO_3^-$** 如下 :

$$Si\text{-}C18 + CH_3(CH_2)_5SO_3^- \rightarrow \textbf{Si-C18}\sim \textbf{CH}_3\textbf{(CH}_2\textbf{)}_5\textbf{SO}_3^-$$

當分析物 R1-N^+ , R2-N^+ 被注入分析，旋即被移動相載送至作用層面 **Si-C18~$CH_3(CH_2)_5SO_3^-$**，依 Partition, Ion Pair, Ion Exchange, Ion Interaction 分離機制如下所示 :

$$Si\text{-}C18 \sim CH_3(CH_2)_5SO_3^- + R_1N^+ \rightarrow Si\text{-}C18 \sim CH_3(CH_2)_5SO_3^- \sim N^+R_1$$
$$Si\text{-}C18 \sim CH_3(CH_2)_5SO_3^- + R_2N^+ \rightarrow Si\text{-}C18 \sim CH_3(CH_2)_5SO_3^- \sim N^+R_2$$

短暫的隅合成比較非極性型 $CH_3(CH_2)_5SO_3^-$ ~ N^+R_1 及 $CH_3(CH_2)_5SO_3^-$ ~ N^+R_2 的分析物，由於 R_1, R_2 的分子大小或極性差別，例如比較非極性或較大分子 R_2 者，將會與 Si-C18 層面有更強的滯留作用，承受後來移動相的溶洗時，$CH_3(CH_2)_5SO_3^-$ ~ N^+R_2 將更遲後被溶洗出，造就 $CH_3(CH_2)_5SO_3^-$ ~ N^+R_1 先於 $CH_3(CH_2)_5SO_3^-$ ~ N^+R_2 的圖峰順序，既 R_1N^+先於 R_2N^+被分離檢測圖峰。

實驗例:

層析管: Inertsil 5 ODS-4 4.6x150mm

移動相 A: PIC Buffer 如下載記

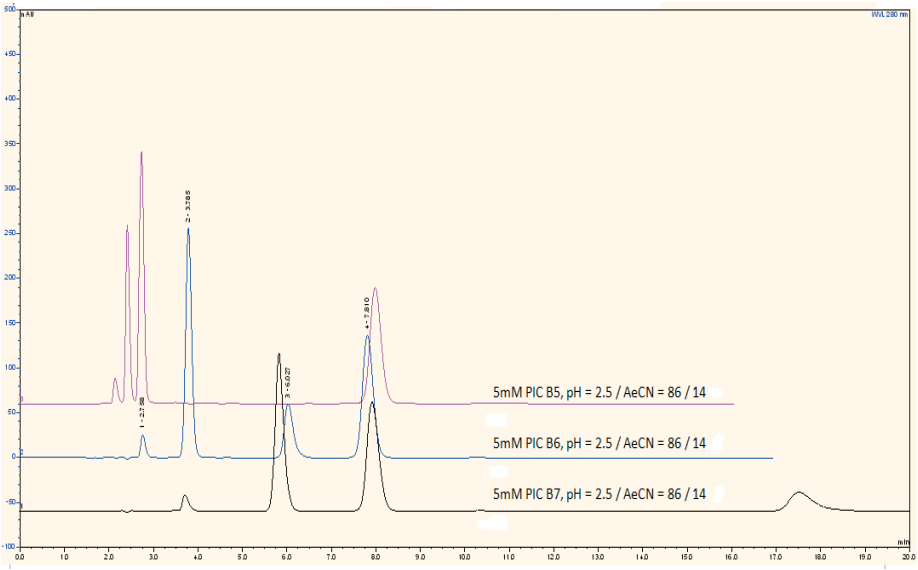
移動相 B: AeCN

流速: 1.0 m l/ min (室溫)

檢測: PDA (UV280nm)

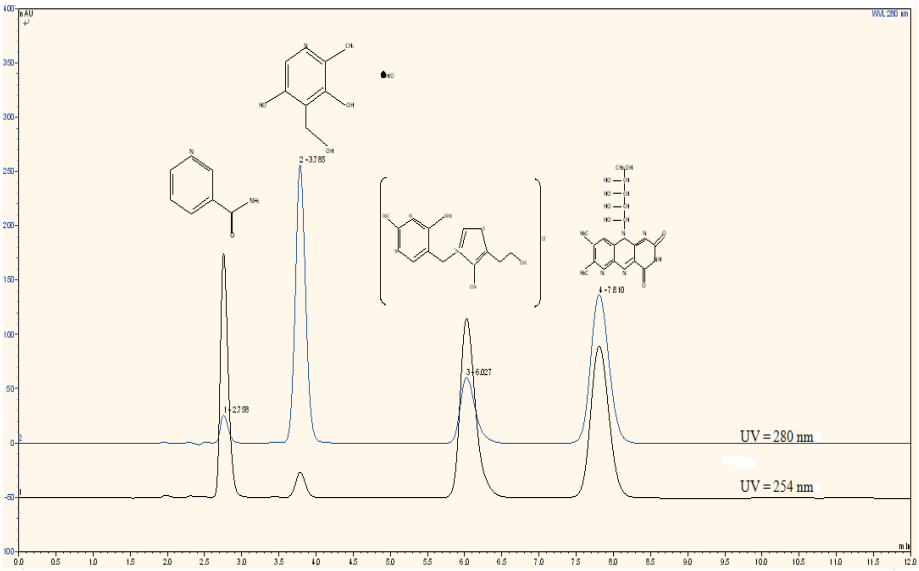
測試物: Nicotiamide (B3), Pyridoxine HCl (B6), Thiamine HCl (B1), Riboflavin (B2)

鹼有機化合物，Nicotiamide, Pyridoxine HCl, Thiamine HCl 及 Riboflavin 是典型維他命劑。分別試以 1.) 5mM PIC B5, PH = 2.5., 2.) 5mM PIC B6, PH = 2.5.,及 3.) 5mM PIC B7, PH = 2.5 分別與 AeCN，於 A/B = 86/14 一定溶洗移動相，試作 UV 280nm 檢測之層析圖譜。測試結果如下圖所示

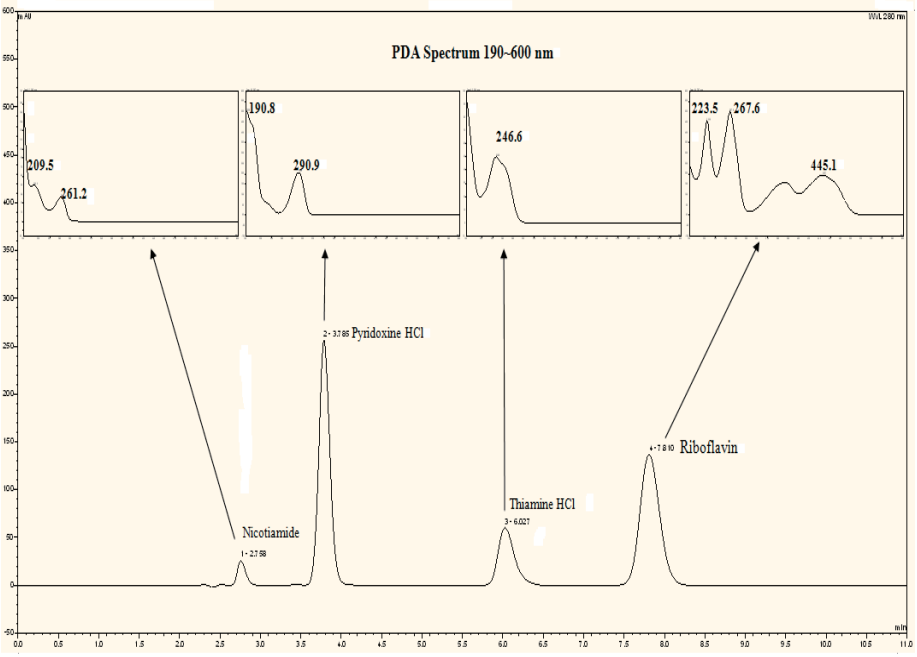


由比對圖得悉，比之 PIC B5 或 PIC B7 的 Buffer 和 AeCN 溶洗條件，**PIC B6 為 Buffer 者**，該四種維他命劑測試物之圖峰分佈，最為適當理想。

由於 PDA 具 190-800nm 全波長檢測性，僅將 UV254nm 及 UV280nm 之檢測比對層析圖譜試作比較，得悉 Nicotiamide 於 UV254nm 檢測性優於 UV280nm，反之，Pyridoxine HCL 於 UV280nm 檢測性優於 UV254nm，至於 Thiamine HCL 及 Riboflavin 於 UV254nm 或 UV280nm 之檢測差別性比較不明顯，如下圖所示

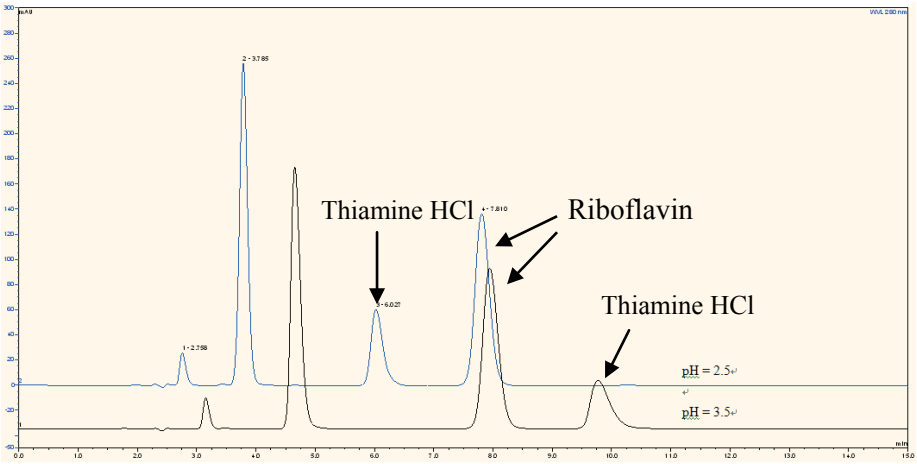


再就 Nicotiamide, Pyridoxine HCL, Thiamine HCL, Riboflavin 於 PDA 的 UV/Vis 全波長的掃描，記憶 Spectrum 如下圖。經觀查，Nicotiamide 之次高吸收波長為 261.2nm，佐證於 254nm 檢測性優於 280nm 的檢測。Pyridoxine HCL 之次高吸收波長為 290.9nm，佐證於 280nm 檢測性優於 254nm。Thiamine HCL 的次高吸收波長為 246.6nm，因此於 254nm 的檢測性優於 280nm。至於 Riboflavin 於 254nm 或 280nm 沒有明顯差別檢測性，倒是於可見光 445.3nm 具獨特吸光波長，這一點有益於定性鑑別分析。



PH 的影響

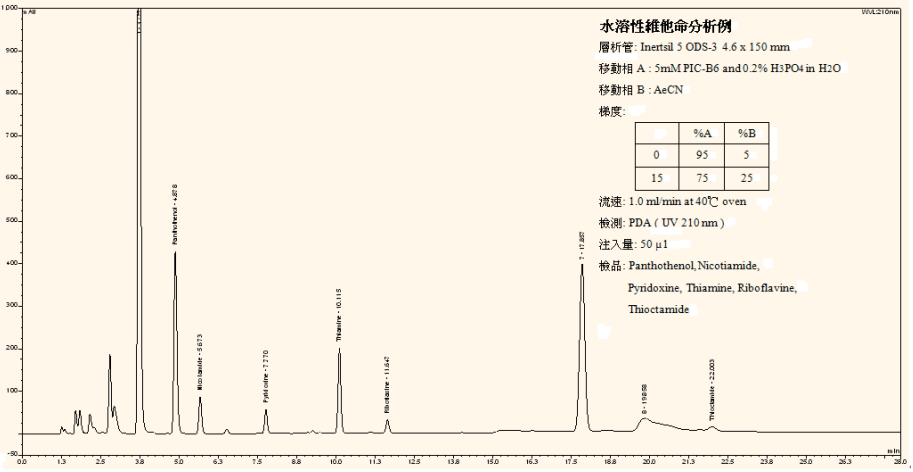
同樣地選用 PIC B6 與 AeCN 的 Isocratic Elution 操作，**只是 PIC B6, PH=2.5 及 PH=3.5 的改變**。Thiamine HCL 受到 PH 改變的影響是 PH = 2.5 時，Thiamin 先於 Riboflavin，反之 PH = 3.5 時，Riboflavin 之滯留圖峰，則先於 Thiamine HCL，如下圖所示。



Gradient Elution – 梯度溶洗

若是成份複雜的分析物，極性、非極性明顯差別者，於前例一定比例組成之移動相 14% AeCN / 5mM PIC B6, pH = 2.5，只能溶洗出 Riboflavin, 而未能溶洗出 Thioctamide.也就是說，固定比例組成之移動相 (Isocratic Elution) 往往只能溶洗出部份分析物。為分離檢測含有 Thioctamide 之維他命劑型，則建議採用梯度溶洗操作 (Gradient Elution) 。

市面上常見口服液含有維他命:
Pantothenol, Nicotiamide , Pyridoxine HCl ,
Thiamine HCl , Riboflavin, Thioctamide 梯度溶洗分析例，如下圖示。



2.) 酸"有機物的分析

針對 "酸" 有機分析物，有以下幾種常用的"氨鹼"的有機隅對試劑 (Ion Pair Reagent) :

Tri-n-Hexylamine　　Tri-n-Octylamine

Tetra-n-Butyl Ammonium Hydroxide (TBA – OH)

Tetra-n-Butyl Ammonium Bromide (TBA – Br)

Tetra-n-Butyl Ammonium Phosphate (TBA – Phosphate)

Tetra-n-Butyl Ammonium Hydrogen Sulfide (TBA – HS)

偶對:

$RCOO^- H^+$ (極性) + $TBA^+ OH^-$ (極性) → $RCOO^- TBA^+$ (非極性) + H2O

作用說明:

層析管 Si-C18 (ODS) 材料和移動相所含有隅對試劑 TBA^+ 須先"平衡" 並佈滿形成待和"氨鹼"有機分析物作用層面 Si-C18 ~ TBA^+如下 :

$$Si\text{-}C18 \quad + \quad TBA^+ \quad \rightarrow \quad Si\text{-}C18 \sim TBA^+$$

當分析物 R_1COO^- 、 R_2COO^- 被注入分析，旋即被移動相載送至作用層面 Si-C18 ~ TBA^+，依 Partition, Ion Pair, Ion Exchange, Ion Interaction 分離機制如下所示 :

$$Si\text{-}C18 \sim TBA^+ \quad + \quad R_1COO^- \quad \rightarrow \quad Si\text{-}C18 \sim TBA^+ \sim R_1COO^-$$

$$Si\text{-}C18 \sim TBA^+ \quad + \quad R_2COO^- \quad \rightarrow \quad Si\text{-}C18 \sim TBA^+ \sim R_2COO^-$$

短暫的隅合成比較非極性型 Si-C18 ~ TBA^+ ~ R_1COO^- 及 Si-C18 ~ TBA^+ ~ R_2COO^-的分析物，由於 R_1, R_2 的分子大小或極性差別，例如比較非極性或較大分子 R_2 者，將會與 Si-C18 層面有更強的滯留作用，承受後來移動

相的溶洗時，Si-C18 ~ TBA^+ ~ R_2COO^- 將更遲後被溶洗出，造就 Si-C18 ~ TBA^+ ~ R_1COO^- 先於 Si-C18 ~ TBA^+ ~ R_2COO^- 的圖峰順序，既 R_1COO^- 先於 R_2COO^- 分離檢測圖峰順序。

實驗例：

層析管: Inertsil 5 ODS-4 4.6x150mm

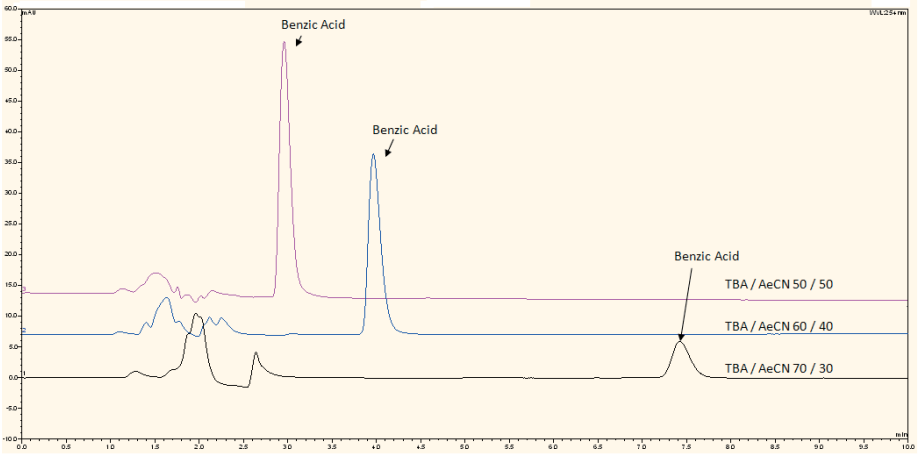
移動相 A: 5mM TetraButyl Ammonium Bromide (TBA-Br) in H2O, pH = 5.3

移動相 B: AeCN 流速: 1.0ml / min (室溫)

檢測: PDA (UV254nm)

測試物 Benzoic Acid

試以測試物 Benzoic Acid 受制於 TBA+隅合成為較非極性型，於 C18(ODS) 的滯留作用，繼之承受不同比例 AeCN 的溶洗之比較圖譜，如下圖所示。



偶對離子層析法 (Ion-Pair Chromatography)

摘述主要的變化參數及有關效應如下:

變化參數	效應
1.偶對離子型式(Type of Counterion) 例如: $(C_4H_9)_4N^+$, $CH_3C_5H_{10}SO_3^-$	分析物群，容易與偶對離子形成對偶離子(Ion Pair)者，則滯留時間趨長。
2.對偶離子的大小尺寸 $CH_3C_4H_8SO_3^-$ (PIC B5) $CH_3C_5H_{10}SO_3^-$ (PIC B6)	對偶離子的尺寸趨大時，將增長滯留時間。例如採用 PIC C6 將比 PIC C5 滯留時間更長。
3.對偶離子的濃度 2 mM – 5 mM	增高偶對離子的濃度將增長滯留間。當濃度增高到某一程度，則不再增長滯留時間。
4.pH 值及緩衝液 (Buffer)	一般而言，改變 pH 值或利用緩衝液(Buffer)用以促使分析物離子化頃向，則增長滯留時間。
5.有機相的調和種類	使用越疏水性的有機相，將縮短滯留時間，例如:AeCN 溶洗力大於 MeOH
6.有機相的調和濃度	有機相濃度增高，將縮短滯留時間。
7.溫度	增高溫度，將縮短滯留時間。
8.固定相 (Stationary Phase) C18 (ODS), C8, Ph, C4, C2, C1	固定相疏水性高，增長滯留時間。例如 C18(ODS)比 C8(Octyl)滯留時間更長。

對應層析管柱內徑之最佳流速

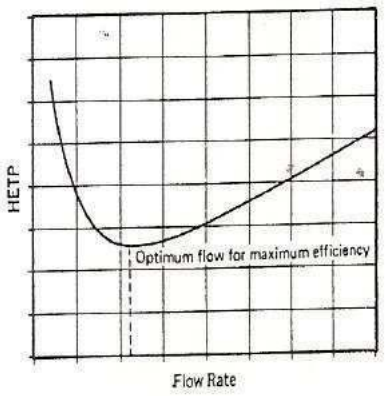
Van DEEMTER Plot

Number of Theoretical Plates - 層析管柱的理論板數 (**N**)，有多種運算公式。不同運算公式所得 N 值結果不同。常用的是以圖峰半高寬($W_{1/2}$)為參數的 **ASTM** 運算公式 $N = 5.54 \times (T/W_{1/2})^2$，或是以圖峰底部寬(W)為參數的 **USP** 運算公式為 $N = 16 \times (T/W)^2$。

HETP (Height Equivalent To A Theoretical Plate)，兩理論板數之間的間距 -以層析管柱的長度 (L) 除以理論板數(N)計算之為 HETP 值。

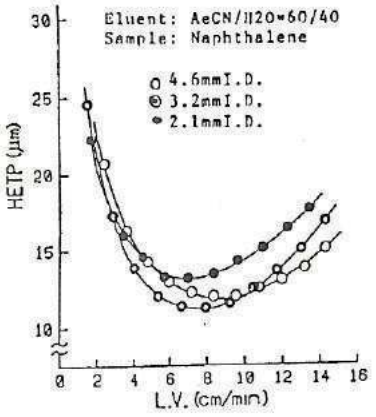
一支 Inertsil 5 ODS- 4.6x150mm 層析管柱的理論板數 N=12,500 時，換算其 HETP 值 (150mm / 12500 = 0.012mm) 為 HETP = 0.012mm 即 0.012mm 的微細間距即有一個理論板。**理論板數值(N)越高或 HETP 值越小都是用了說明層析管柱的分離效能的良莠。**

同一分析條件，不同流速的測定，會有相對不同的理論板數 N，若採用 N 的數值，為縱座標對應 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6,1.8, 2.0ml/min 不同流速為橫座標，由於兩者數值差異懸殊，恐不易作成理想座標圖示，如果改以 HETP 值，對應於流速，則易於作好縱橫座標圖。



試以小流速逐漸增大流速的試作，將會測得層析管柱一系列的 N 值，依循運算所得之最高 N 值也就是最小 HETP 值。若以各個流速為橫座標，相對地標出 HETP 值為直座標，曲線上會有最低的一點，既最小 HETP 值的對應流速，此曲線圖示稱之為 **Van DEEMTER Plot** 如前頁圖示。

對應於分析型 4.6mm, 3.2mm, 2.1mm 不同內徑的層析管柱，調整不同流速，經由實作而得，於不同內徑的層析管柱，每一分鐘移動約 6cm 距離的線速度的流速時，而有共同最小 HETP 的現象，有如右圖所示。



如此，試作對應於內徑 4.6mm, 4.0mm, 3.2mm, 2.1mm 分析型層析管柱之最佳操作流速如下表所示:

內徑 cm r	移動線速度 cm/min $V/\pi(r/2)^2$	最佳流速 ml/min V
0.46 (4.6mm)	6.02	1.00
0.40 (4.0mm)	5.97	0.75
0.32 (3.2mm)	5.96	0.48
0.21 (2.1mm)	5.78	0.20

實驗例:

層析管: Vercopak Inertsil 6 ODS-3

移動相: AeCN / H2O = 70 / 30

尺寸: 4.6x150 mm 3.2x150 mm

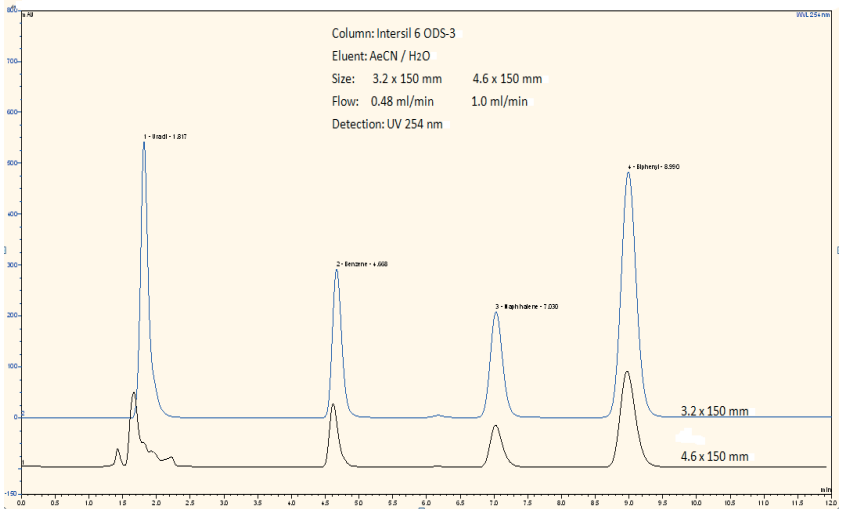
流速: 1.0 ml/min 0.44 ml/min

檢測: UV254nm

測試物: Uracil, Bezene, Naphthalene, Biphenyl

由於內徑更細 3.2x150mm 較少管柱內的擴散性，因此所測試結果，面積/高度值優於 4.6x150m 層析管的測試，請參照如下數據及圖示:

	4.6x150mm		3.2x150mm	
	Area	Height	Area	Height
Benzene	19.6310 /	124.069	47.8309 /	291.631
Naphthalene	18.0326 /	82.672	44.7750 /	207.729
Biphenyl	50.7988 /	188.755	126.5240 /	482.441



分析型，越是細小層析管柱內徑，不但節省移動相消耗，也提升感度

依據 Van DEEMTER Plot，選用細小分析型層析管柱內徑的分析，很明顯地，可以節省移動相的消耗，除了經濟，節省成本，更有環保概念。選用更細小層析管柱內徑，相對地，提升檢測感度，請參考下表：

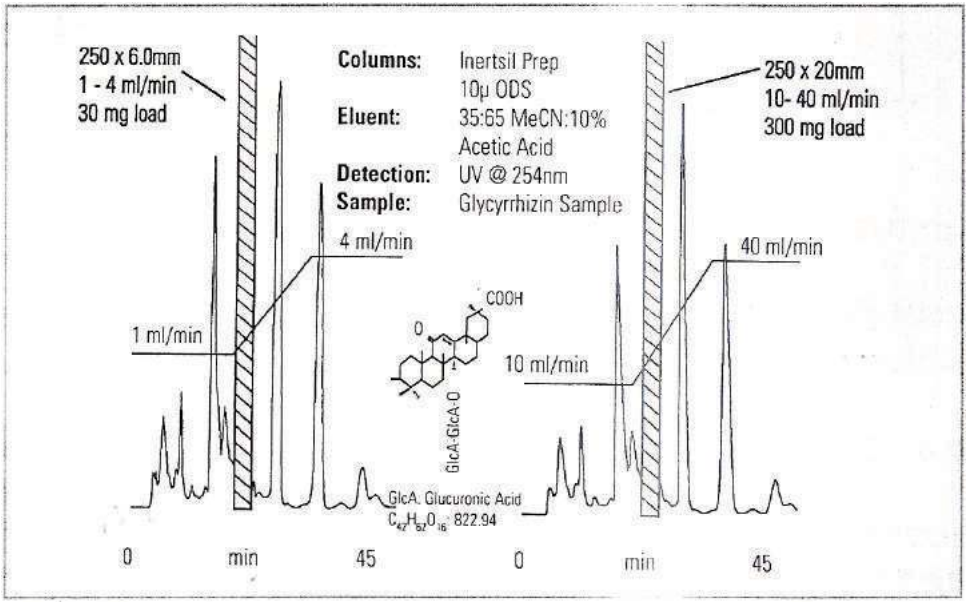
內徑 mm	流速 ml/min	移動相節省	感度提升
4.6	1.0	---	---
4.0	0.8	20%	1.3
3.0	0.5	50%	2.4
2.0	0.2	80%	5.3

純化收集型 Preparative 層析管柱 -- 檢品收集量 v.s 流速

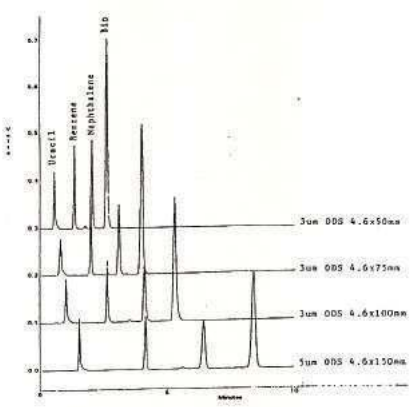
就分析型 4.6 x 250mm 層析管柱所開發建立的分析方法，既可放大至較粗內徑收集型層析管柱進行 Semi-Preparative，針對適當分析物群進行純化收集。 常見 Semi-Prep 純化收集型層析管柱之內徑為 6.0mm, 7.5mm, 10.7mm, 15mm 或 20mm 同樣依據移動相的移動速率為 6.0 cm/min 的最優對應流速之準則，可得 Semi-Prep 純化收集型層析管柱之最佳流速及檢品收集量，請參照下表：

內徑 mm	移動線速度 cm/min	最佳流速 ml/min	樣品收集量
6.0	6.0	1.70	ug
7.5	6.0	2.65	ug
10.7	6.0	5.50	數 ug
15.0	6.0	10.50	數拾 ug
20.0	6.0	19.00	數拾 ug - mg

分析型 6.0 x 250mm 層析管柱放大至 20 x 250mm 收集型層析管柱進行純化收集(Semi-Preparative) 的實例，如下圖所示：

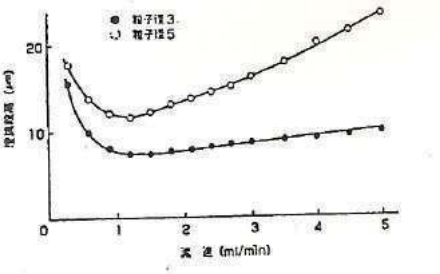


快速 UHPLC 分析



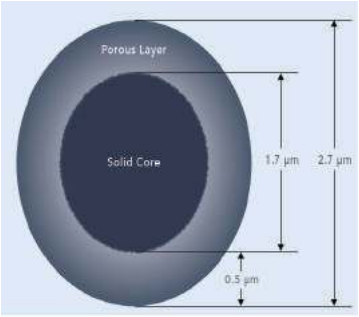
愈細小粒徑材料，具更優分離效能 –

試舉 3um C18 (ODS)及 5um C18 (ODS)分析例，愈細小粒徑材料之層析管柱，將更具優越圖峰尖銳性，及特優分離效應如右圖所示。

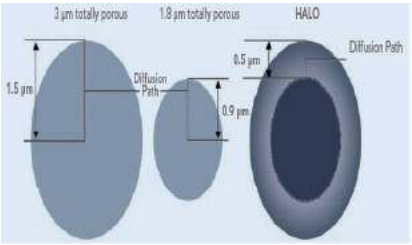


試以 3um C18 (ODS)與 5um C18 (ODS)作成 Van DEEMTER Plot 曲線之比較，當流速始於 0.5ml/min 增高至 1.0ml/min 甚至 2ml/min, 3ml/min, 4ml/min, 5ml/min 的流速時，3um C18 (ODS)作成 Van DEEMTER Plot 之曲線，並未相對地隨操作流速的提升而增大 HETP 值，既提高流速並不減縮分離效能，比之於 5um C18 (ODS)作成 Van DEEMTER Plot 之曲線，3um C18 (ODS)作成 Van DEEMTER Plot 之曲線較平穩 而不失分離效應，即 3um C18 (ODS) 於 1.0ml/min, 2.0ml/min, 3.0 ml/min ……更高流速的移動相操作，仍維持卓越分離效能，而被 稱之為 “快速分析”層析管柱的應用。或更小粒如 2.5um, 2.0um, 1.7um 皆屬於快速 UHPLC 分析應用層析管柱。

HALO Fused-Core Particle 2.7um for UHPLC



HALO Fused-Core Particle 具 1.7um 實心體融溶 0.5um 已化學鍵結 C18 的矽膠層，合併成為 2.7um 的 HALO Fused-Core 2.7um C18 材料，與傳統全孔性截然不同的矽膠體材料，如左圖所示。

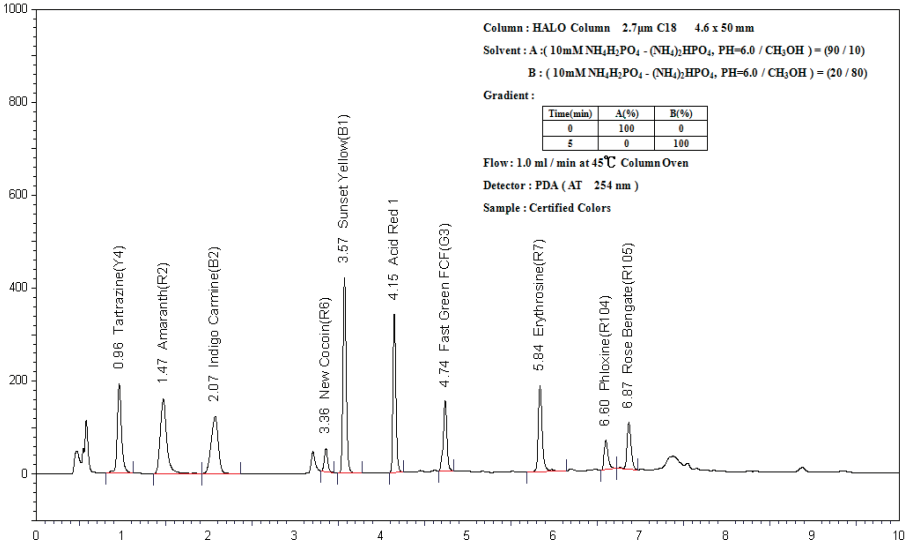


HALO Fused-Core Particle 僅有 0.5um 的微少擴散通路(Diffusion Path) 遠少於 1.8um 全孔性矽膠粒徑的 0.9um 擴散通路及 3um 全孔性矽膠粒徑的 1.5um 擴散通路，也因為如此更少有擴散性，HALO 2.7um C18 更具卓越分離效能。

HALO Fused-Core 2.7um C18　卓越快速分析應用。

傳統 HPLC 的十種合用色素分析，於一般-C18 (ODS) 4.6 x 250mm 層析管柱，移動相為 MeOH / Phosphate Buffer，1.0ml/min 流速的梯度操作，約須時 40~60 分始能完成分析。

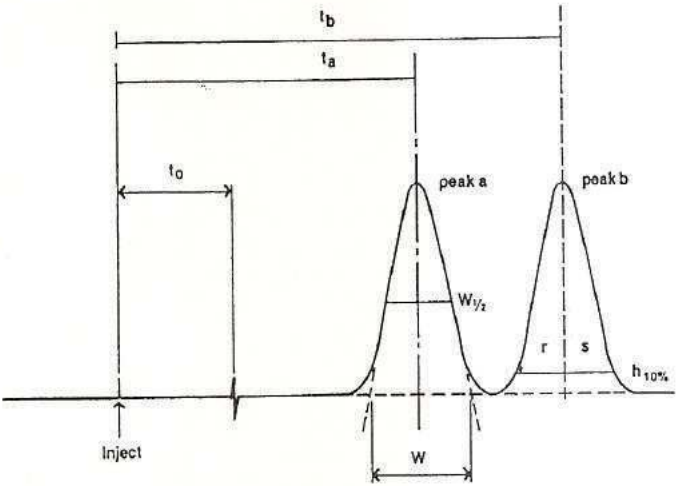
若試以 **HALO 2.7um C18 4.6x50mm** 快速分析層析管柱，按傳統 MeOH / Phoshate Buffer 移動相及 1.0ml/min 流速的梯度操作，於 8 分鐘之內，即可完成 Tartazine, Amaranth, Indigo Carmine, New Cocoin, Sunset Yellow, Acid Red, Fast Green FCF, Enythrorine, Phloxine, Rose, Bengate 等十種合用色素的分離檢測，請參照如下圖示:



當選用越小粒徑材料的層析管柱，藉以提升分離效率，或是提升操作流速，進行 UHPLC 快速分析時，儀器系統壓力則隨之增大。傳統 LC 儀器承受操作壓力，大約是 6,000psi (約 400 Kg)，當今最新 UHPLC 儀器，甚或高達 18,000psi (約 1200Kg) 。須求 UHPLC，不論是儀器硬體的改善或提升高效能快速層析管柱的應用，將是一項新的應用領域。

層析管柱之圖峰意義及有關計算式

層析圖譜 (Chromatogram)的每一個圖峰(Peak)，它可以用來表示某一物群的成份及該成份的濃度或含量，而其圖峰即是典型的一種累積統計曲線圖，如下圖:



t_o = 未滯留或最先流出的時間或距離

t_a = 分析物 a 的滯留時間或距離

t_b = 分析物 b 的滯留時間或距離

$W_{1/2}$ = 圖峰半高的寬(時間或距離)

W = 圖峰底部的寬(時間或距離)

$h_{10\%}$ = 圖峰底部其上 10 %的高度

S = 圖峰之最高值，垂直線的右半部的時間或距離

r = 圖峰之最高值，垂直線的左半部的時間或距離

(1) 理論板數 (Number of Theoretical Plate, N)

層析管柱的理論分離板數，常被用來參考該層析管的分離能力的良莠。理論板數越高，表示具有較高分離效能。理論板數之計算有多種公式可循。僅舉 ASTM 圖峰半高及 USP 底部寬的時間或距離兩個計算例參考之，以前頁代表性 Peak A 為例:

$$N = 5.54\left(\frac{t_a}{W_{1/2}}\right)^2$$ 或 $$N = 16\left(\frac{t_a}{W}\right)^2$$

ASTM 計算式　　USP 計算式

(2) 兩理論板間的間距 HETP (Height Equivalent To Theoretical Plate):

$$HETP = \frac{L}{N}$$

L :層析管長度

N :理論分離板數值

(3)容積因數 (Capacity Factor = K')

$$K'_a = \frac{t_a - t_o}{t_o}$$ (以 Peak A 為例)　　$$K'_b = \frac{t_b - t_o}{t_o}$$ (以 Peak B 為例)

(4)選擇係數 (Selectivity = α)

$$\alpha = \frac{K'_b}{K'_a}$$

(5)解析值 Rs (Resolution)

$$R_s = \frac{2(t_b - t_a)}{w_b + w_a}$$

即兩個圖峰在基準線(Baseline)上能有完全的分離時，則其 Rs 值必須大於 1.50。

(6)圖峰對稱性 (Asymmetry)

$$h_{10\%} = \frac{s}{r}$$

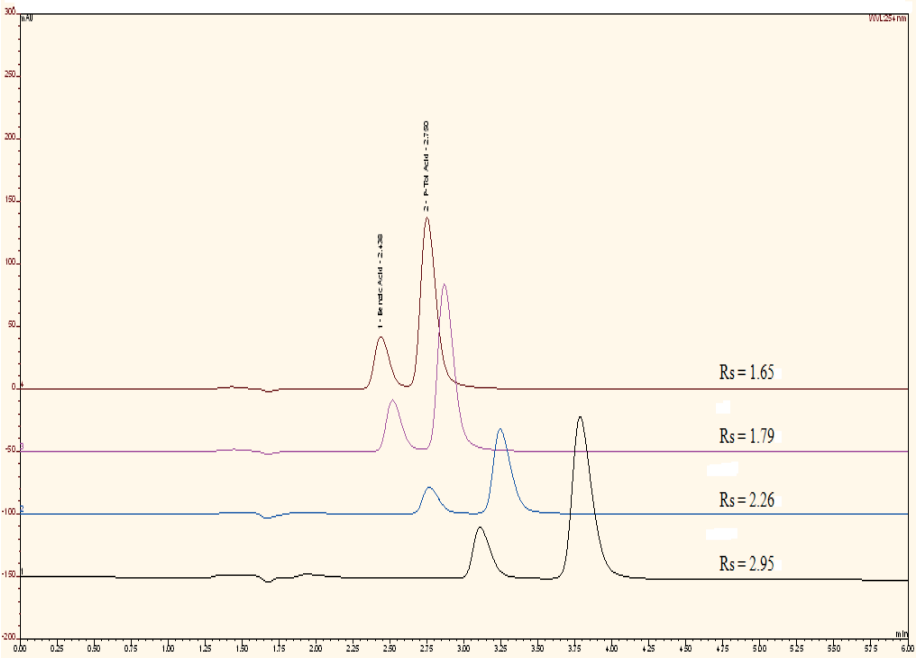
Rs 層析圖譜 (Resolution)的考量

就層析圖谱（Chromatogram）而言，Rs 分離率數值越大，分離性越優秀。當兩個分析物檢測面積近似，大約在 1:1 比例時，兩圖峰的分離率 Rs 得大於 1.5，才能達成基線上的分離。

Peak area ratio					
Rs	1:1	1:3	1:10	1:30	1:100
0.8	5.9%	5.0%	%	%	%
1.0	2.3	2.6	2.7	2.9	-
1.2	0.83	1.1	1.4	1.6	1.8
1.4	0.26	0.41	0.49	0.71	0.92
1.6	0.069	0.10	0.16	0.22	0.33
1.8	0.016	0.022	0.032	0.050	0.086
2.0	0.003	0.005	0.009	0.013	0.021
2.2	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003

重疊機率百分比

參考上表，可以看出兩分析物面積在 1:1 比例下，分離率 Rs = 1.4 兩分析物圖峰仍可能有 0.26%重疊的機率。分離率 Rs = 1.6 仍有 0.069% 圖峰重疊的可能。因此兩分析物在 1:1 比例之下，至少得作成 Rs = 2.2 或更大 Rs 值，兩圖峰的面積才不致於有重疊的可能。此說明也佐證**藥典**所列分析規範要求，為求成功而可靠的分離性，要求兩分析物分離率必須是 **Rs ≧ 3.0**，不同 Rs 的比較如下圖所示。



試舉 Benzoic Acid 及 p-Toluic Acid 的分離，當兩分析物圖峰之面積比擴大為 1:3，1:10，1:30，1:50 甚或是 1:100 時，比例差距越大，則所須分離率 Rs，將被要求得更高。

RPLC 層析管柱的清洗與再生

最後分析用的移相是 MeOH / H2O (或 AeCN / H2O)的清洗:

流洗 120ml MeOH ，取下 Column，兩端 Plug 塞住，保存之。

最後分析用的移相是含酸、鹽類的清洗:

舉最後分析用的移相 25%AeCN, 0.1% H3PO4, 20mM KH2PO4 in H2O 為例，則調和不含酸、鹽，只是有機相與 H2O，即 25% AeCN in H2O 為洗液，流洗 150ml 之後，再流洗 100ml MeOH，取下 Column，兩端 Plug 塞住，保存之。

最後分析用的移動相是含有“IPC 鹽類”的清洗:

以 Ion Pair Reagent PIC B6 或是 TBA Bromide, Hydroxide, Hydrogen Sulfide 以及 Phosphate Buffer, 例如是 20% MeOH, 5mM PIC B6, 30mM NaH2PO4 in H2O, PH = 3.5 則調和洗液為 40% AeCN in H2O，流洗 150ml, 之後，再流洗 100ml MeOH，取下 Column 兩端 plug 塞住，保存之。

清洗層析管柱中材料可能吸附而殘存的較大分子，高非極性分析物:

上述清洗至 MeOH，洗畢繼之流洗約 40ml 的 AeCN，接著，將層析管“反向”，視可能殘留物既逆洗約 50 - 100ml 的 THF，或是 Ethyl Acetate ，Dichloromethane， Aectone，再恢復“正向”，流洗約 100ml MeOH，再以 MeOH 或 AeCN / H_2O = 70 / 30 為保存液。

清洗層析管柱中材料可能吸附殘存的蛋白質(Proteins / Peptides):

移動相調和 TFA，執行 A 液 0.05% TFA in H_2O，B 液 0.05% TFA in AeCN 為洗液進行梯度 %A / %B = 75/25--> 20min--> 0/100--> 45min--> 0/100 增變溶洗。通常經由兩三次梯度流洗，足以洗淨層析管柱中材料可能吸附殘存的蛋白質。

RPLC 層析管柱的再生

調配不含酸、鹽類如原分析的有機相與 H2O 比例的 MeOH / H2O 或 AeCN / H2O 為洗液至少流洗 150ml、

若欲清洗"金屬離子"、則流洗 20 / 80 = AeCN / 0.005M EDTA Disodium in H2O 約 150ml，再流洗 MeOH / H2O= 50 / 50 約 60ml、接著流洗 MeOH 約 100ml、

再逆相流洗 AeCN / THF 或 Ethyl Acetate, Acetone = 50 / 50 約 150ml、

回順相流洗 MeOH 約 100ml，再以 100%MeOH 或 AeCN/H_2O = 70/30 為保存液。

RPLC 層析管柱的測試

實驗參考:

測試液:100ml 甲醇溶有 10mg Uracil, 50mg Benzene, 50mg Naphthalene, 15mg Biphenyl，

注入量: 5 - 20ul。 (依 UV 檢測器感度可增減測試物的含量）

何時須作測試?

1.) 購進新 Column 的品保驗證

2.) 瞭解理論板數、分離率、拖尾系數…等作 Column 管理、方法開發系統適合性 (System Suitability)的建立。

3.) 隨時就 Column 分離性能有所質疑

4.) 經由清洗或再生過後

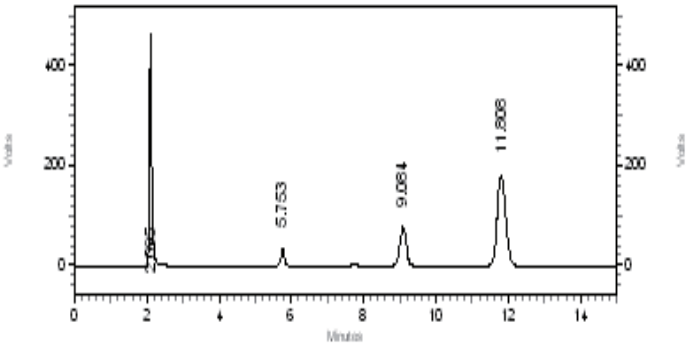
5.) 請參考如下測試例

所有層析管柱測試報告，不但是須要件件存檔參考，就該層析管柱的使用狀況，例如注入分析物、品名、次數，流通移動相內容及移動相體積種量，操作時間，乃至於清洗或再生工作，皆須仔細記錄存檔，以確實作好層析管柱的管理工作。

VERCOPAK

HPLC分離管柱測試報告書

VERCOPAK NO : 168--XX--YY
COLUMN : 100 - 5 C18 (ODS)
SIZE : 4.6 x 150mm
ELUENT : AeCN / H20 = 70 /30
FLOW : 1.0 ml/min
PRESSURE : 680 Psi
DETECTOR : UV 254nm



Detector 1
Results

名稱	時間	半高寬	理論板數	容積因素	分離率	對稱
Uracil	2.09	0.06	7102	-0.00	0.00	1.39
Benzene	5.75	0.12	13086	1.75	24.40	1.07
Naphthalene	9.08	0.19	12375	3.34	12.66	1.05
Biphenyl	11.81	0.26	11855	4.64	7.18	1.05

RPLC 層析管柱移動相的轉換與平衡

舉分析型層析管柱 4.6 x 250mm，其內容積計算式 $V = \pi r^2 L$。經計算而得分析型 4.6 x 250mm 層析管柱之內容積為 **4.2ml**。

1.) 當選用分析型 C18 (ODS) 4.6 x 250mm 層析管柱準備分析，儀器係統換上新的 MeOH / H2O, AeCN / H2O… 等不具酸，鹽類移動相時，約須 10 倍該層析管柱內容量 - 即 10 x 4.2 約 42ml 的流通量，用以作成換新移動相及徹底完成新移動相的平衡，準備為隨後 HPLC 可靠的定性定量分析。

2.) 若換新有機相 / **(H2O +酸)** 移動相時，約須 15 倍該層析管柱內容量即 15 x 4.2 約 60ml 作為移動相轉換及平衡新移動相的流通量。

3.) 若換新有機相 / **(H2O + 酸 + 鹽類)** 移動相時，約須 20 倍該層析管柱內容量即 20 x 4.2 約 80ml 作為移動相轉換及平衡新移動相的流通量。若是調和“離子隅對試劑” Ion Pairing Reagent，可能須要多些流通量，才能符合完整移動相轉換與新移動相平衡的需求。

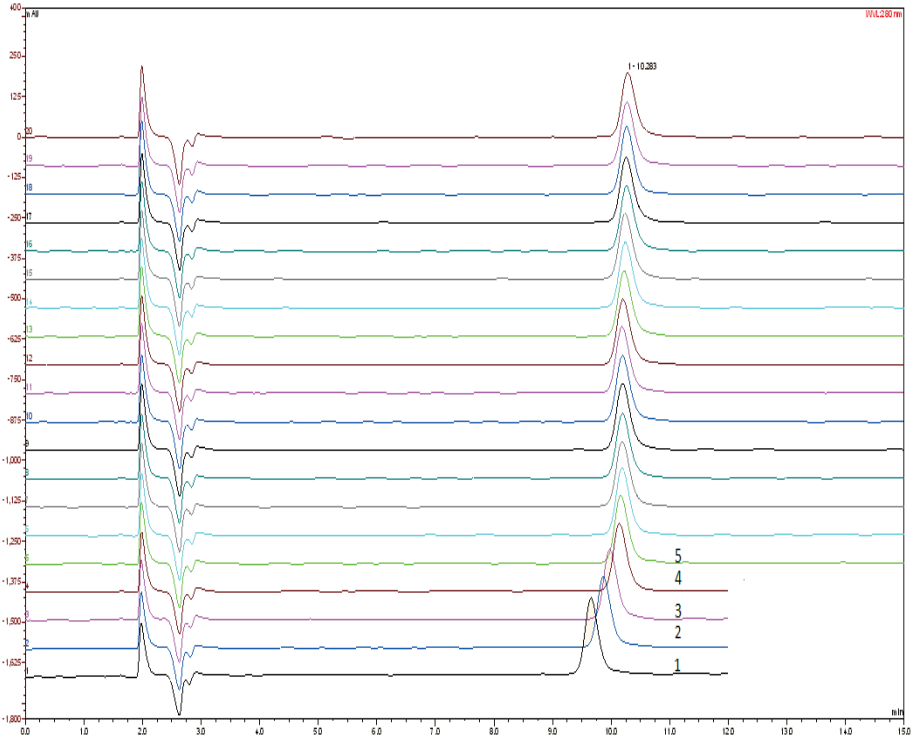
當換上新的移動相擬進行分析工作，若未能耐心等候“層析管完成轉相及所須徹底平衡需求”，即試作注入分析，將會體驗到以下的情況:

1.) 基線上下任移漂動，或逐漸規則性上揚或下移
2.) 注入分析觀查到滯留時間(RT)規則性往前縮移，或往後延遲
3.) 所得圖峰，難有 Area, Height 的再現性

只要層析管柱被徹底轉相成為新的移動相，既可進行 LC 可靠的分析。

試舉 Emedastine Difumarate 準備進行分析移動相平衡與轉換作法參考:

層析管柱 Inertsil 5 C8-4 4.6x150mm 之最終保存液為 70 / 30 = AeCN / H2O。分析用移動相為 17 / 83 = AeCN / Phosphate Buffer (PPB) 。 該 Inertsil 5 C8-4 4.6x150mm 先以移動相 17 / 83 = AeCN / PPB 流通約 30 分鐘，即流通約 30ml 移動相，接著設定 Run Time:15 分鐘的 20 個樣品分析程式。注入分析的第一針至第五針，由於分析移動相只有 17%低 AeC 仍然在逐漸稀釋原高 70%AeCN 的轉換平衡中，溶洗 Emedastine Difumarate 逐降，因此 RT 逐漸規律性延後。直到第六針之後的分析，移動相完成轉換才是 Emedastine Difumarate 安全可靠的分析數據，請參考如下圖示。



層析管柱內徑 v.s. 相關連管內徑

LC 具分析及純化收集的應用。不同的應用，各有不同的層析管柱內徑的選擇。為避免於流路中的擴散 (Difussion)效應，分析及純化收集型 LC 系統相關連管皆為外徑 1/16”不銹鋼 (SS)，或 PEEK。請參照下表:
按分析及純化收集型的層析管柱內徑暨對應流速選用適當內徑的 1/16”不銹鋼(SS)，PEEK 搭配使用。

層析管內徑 (mm)	流速 (ml/min)	配合“連管”內徑
2.0	0.2	1/16”OD, 0.13mm
3.0	0.5	1/16”OD, 0.18mm
4.0	0.8	1/16”OD, 0.25mm
4.6	1.0	1/16”OD, 0.25mm
7.5	2.65	1/16”OD, 0.25mm
10.7	5.5	1/16”OD, 0.5 mm
15.0	10.5	1/16”OD, 0.8 mm
22.2	19.0	1/16”OD, 0.8 mm

層析管柱高壓力說明

水與高粘度有機相調和之移動相，壓力越高。粘性 IPA > EtOH > MeOH > AeCN，所調和移動相的壓力 IPA / H2O > EtOH / H2O > MeOH / H2O > AeCN / H2O。管柱材料粒徑小者，壓力越高 1.7um > 2.0um > 3um > 5um > 7um > 10um。含鹽類移動相，調和“有機相”時，注意高有機相比例會使鹽類結晶析出沈積而顯高壓力,例如 20mM 以上濃度磷酸鹽調和至 70% 以上 AeCN，則容易由於鹽類結晶析出，使得層析管柱顯現高壓力。

層析管柱”逐漸”增高壓力說明

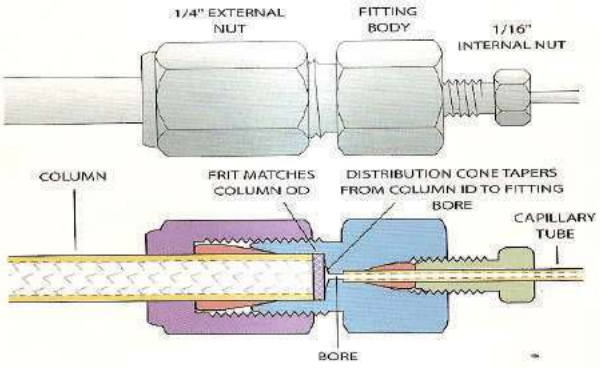
層析管柱 (保護管柱)，入(出)口端各有 2um 濾片、移動相或注入 Sample，夾雜有大於 2um 雜粒子，杜塞於該“濾片”使得注入分析，逐漸顯現增高的壓力。

補救之道: (1)更換濾片

(2)層析管柱逆洗

(3)加強移動相的過濾、Sample 的過濾或離心處理。

層析管柱內材料粒子有一定的孔徑 (Pore Size:100Å, 120Å, 300Å) 及粒子之間的空隙 (void volume) 。假使分析物群，有某些分子，或高非極性物，通過入口端 2um 孔徑濾片後、若無法被該移動相溶洗出者，將逐漸沈積層析管柱內材料粒子之間的孔隙或被吸附住層析管柱內材料粒子孔徑層面上，累積堵塞而顯現逐漸增高的壓力。建議試作補救之道:以高溶洗移動相:Acetone / H_2O = 25 / 75, THF / H_2O = 50 / 50, IPA / AeCN = 25 / 75 逆洗層析管柱。



External column end fitting
1/4" to 1/16", 4.6 mm column ID, with removable frit
(ECEF414.6F)

HPLC SOLVENT INDEX

Solvent 溶媒(極性度順序)	Polarity E^0(A1203) 極性度	Viscosity CP(20^0) 黏度	Refraction Index (n) 屈折率	UV cutoff (nm)
Flroroalkanes	-0.25	-----	1.250	-----
n-Pentane	0.00	0.23	1.358	210
Hexane *	0.00	-----	1.375	210
Isooctane *	0.01	-----	1.404	210
Petroleum ether	0.01	0.30	-----	210
n-Decane	0.04	0.92	1.412	-----
Cyclohexane	0.04	1.00	1.427	210
Cyclopentane	0.05	0.47	1.406	210
Diisobutylene	0.06	-----	1.411	210
1-Pentene	0.08	-----	1.371	-----
Carbon disulfide	0.15	0.37	1.626	380
Carbon tetrachloride	0.18	0.97	1.466	265
Amyl chloride	0.26	0.43	1.413	225
Butyl Chloride *	0.26	----	1.436	220
Xylene	0.26	0.62-0.81	1.500	290
i-Propyl ether *	0.28	0.37	1.363	220
i-Propyl chloride	0.29	0.33	1.378	225
Toluene	0.29	0.59	1.496	285
n-Propyl chloride	0.30	0.35	1.389	225
Chlorobenzene	0.30	0.80	1.525	-----
Benzene	0.32	0.65	1.501	280
Ethyl bromide	0.37	-----	1.424	-----
Ethyl ether	0.38	0.23	1.353	220
Ethyl sulfide	0.38	0.45	1.442	290
Chloroform *	0.40	0.57	1.443	245
Methylene chloride	0.42	0.44	1.424	245
Methyl-I-butylketone	0.43	-----	1.394	330
Tetrahydrofuran *	0.45	-----	1.408	220
Ethylene dichloride	0.49	0.79	1.445	230
Methylethylketone	0.51	-----	1.381	330
1-Nitropropane	0.53	-----	1.400	380
Acetone	0.56	0.32	1.359	330
Dioxane *	0.56	1.54	1.422	220
Ethyl acetate	0.58	0.45	1.370	260

*紫外線吸收偵檢器最常用的溶媒

HPLC SOLVENT INDEX

Solvent 溶媒(極性度順序)	Polarity E^{o} (A1203) 極性度	Viscosity CP (20^{oo}) 黏度	Refraction Index (n) 屈折率	UV cutoff (nm)
Methyl acetate	0.60	0.37	1.362	260
Amyl alcohol *	0.61	4.10	1.410	210
Dimethyl sulfoxide	0.62	2.24	-----	-----
Aniline	0.62	4.40	1.586	-----
Diethylamine	0.63	0.38	1.387	275
Nitromethane	0.64	0.67	1.394	380
Acetonitrile *	0.65	0.37	1.344	210
Pyridine	0.71	0.94	1.510	305
Bytyl cellosolve	0.74	-----	-----	220
i-and n-propanol *	0.82	2.30	1.380	210
Ethanol	0.88	1.20	1.361	210
Methanol	0.95	0.60	1.329	210
Ethylene glycol	1.11	19.90	1.427	210
Aectic Acid	Large	1.26	1.372	-----
Water	Larger	-----	1.333	-----
Buffer solutions	Very Large	-----	-----	-----

*紫外線吸收偵檢器最常用的溶媒

編輯本冊的參考書籍資料:

1. Contemporary Practice of Chromatography
   ---by Collin F. Poole and Sheila A. Schuette

2. Data for Biochemical Research
   ---by R.M.C. Dawson., Daphne C,Elliott., W.H.Elliotte.,K.M.Jones.

3. HPLC Instrumentation & Applications
   ---by International Scientific Communication Inc.,

4. 日本 GL Sciences Inc.,公司技術資料
   ＊実験高速液体クロマトグライフィー
   波多野　花井俊彦　共着
   ＊クロマトグライフィー分離システム考え方、選び方
   原昭二，森定雄，花井俊彦 編著

5. 英國 ACE HPLC Column 技術叢書

6. 美國 HALO Fused-Core 2.7um UHPLC Column 技術叢書

7. 本公司編輯:
   a.) VERCOPAK HPLC 分離管使用參考資料
   b.) 高效能液相層析儀，分析應用參考資料 Volume I & II
   c.) 卓越的 Inertsil ODS HPLC 分離管

編 後 記:

繼1991年印行初版及2003年的第二版“高效液相層析儀-實務篇”(Practice on High Performance Liquid Chromatography)，我們很榮幸地於2006年開始代理經銷美國 Dionex HPLC 儀器業務，於是公司內原HPLC工作室之設備,即增設一部Dionex 3000 Ultimate LC 儀器 - Quaternary LC / PDA with Chromeloen Data Management Control Software。由於該 Dionex HPLC 儀器的自動化軟體操控的方便性，細膩梯度的可靠與再現性，PDA 高感測性，承受日以繼夜使用的耐操性，基於這些 LC 儀器優點，它讓我們的應用團隊，就 LC 方法開發的建立，LC 分析方法驗證，層析管柱的使用爭議等相關 LC 的應用，發揮得淋漓盡緻。特別是在 Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC)逆相層析法，自傳統 LC 的分析型 (Analytical)，純化收集型 (Preparative) 層析管柱應用，以至於 UHPLC 快速 LC 分析應用，不僅有所涉獵且逐章載記、收集編輯成為本冊，期以與 LC 業界，經驗分享，作好 LC 分析的準備與執行工作，有所助益，是以為禱。

編著者:吳 健 三
謹誌於建宏層析企業股份有限公司
2011 年 8 月

HPLC 工作室一隅

建宏層析企業股份有限公司
台北市內湖區港墘路221巷19號5樓
Tel:02-26578289 Fax:02-26578389
E-mail:vercopak@vercopak.com.tw
http://www.vercopak.com.tw

RPLC逆相層析法摘要

編 著 者: 吳 健 三
出 版 者: 建宏層析企業股份有限公司
地　　址: 台北市內湖區港墘路221巷19號5樓
電　　話: 02-2657-8289
發 行 日: 2011年8月