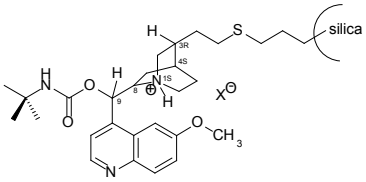
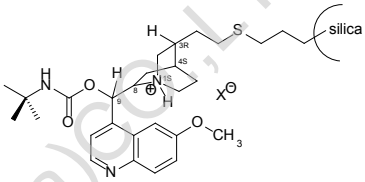
DAICEL
The Best Solution for You

CHIRALPAK® QN-AX & QD-AX
色谱柱使用手册

请在使用前仔细阅读本《使用手册》

色谱柱描述

项目	CHIRALPAK® QN-AX	CHIRALPAK® QD-AX
填料	硅胶表面共价键合 O-9-(叔丁基氨基甲酰) 奎宁  (8S,9R)	硅胶表面共价键合 O-9-(叔丁基氨基甲酰) 奎尼丁  (8R,9S)
粒径	5 µm	
接口	Waters type	
出厂保存溶剂	100% 甲醇	

所有色谱柱在出厂前都经过检测。检测条件、结果及批号请查阅《出厂检测报告》。

本使用手册不适用于其他的大赛璐手性柱

操作条件

流动相方向	色谱柱标签上的指示
压力限制①②	低于 150 Bar (~2100 psi) 可延长色谱柱使用寿命 请根据色谱柱规格来调节流速，柱压不要超过 180 Bar (~2500 psi)
柱温	0 ~ 40 ℃

☞ 说明：HPLC 规格的压力内操作，色谱柱填料稳定。
给定柱温下，柱后压与流速是线性关系。
对于一些难分离的对映体，推荐使用更长的色谱柱。

① 推荐值可延长色谱柱使用寿命，但色谱柱耐受至 100Bar 的压力。

② 柱后压是指由色谱柱本身引起的压力。其值为（液相体系+色谱柱）总压与液相体系（不接色谱柱时）压力之差。

- 为延长柱子使用寿命，强烈建议使用保护柱。
- 样品需用流动相来溶解，并经 0.5µm 滤膜过滤。
- 流动相（尤其是反相）需经合适的滤膜过滤。

操作过程

CHIRALPAK® QN-AX 和 CHIRALPAK® QD-AX 是具有手性选择性的弱阴离子交换型 HPLC 色谱柱，很适合分离酸性手性化合物，其选择性取决于两个具有互补性的奎宁（QN）和奎尼定（QD）衍生物结构。基于其类似对映体的关系，所以这两支柱子对手性对映异构体的洗脱顺序相反。

两款色谱柱可使用极性模式（非水模式，在有机溶剂里加入有机酸碱作缓冲对）或反相模式。CHIRALPAK® QN-AX 和 CHIRALPAK® QD-AX 主要用于手性酸在 HPLC 上的手性分离，对那些含有羧基、磷酸基、亚磷酸基或磺酸基的手性化合物有显著的手性拆分能力。也可以分离弱酸性化合物，如酚类（香豆素）等。

Daicel Chiral Technologies (China) Co., Ltd.

两款色谱柱可使用所有常规的 HPLC 溶剂（如甲醇、乙腈、四氢呋喃，二氧六环和氯仿），pH 范围是 2-8。在水相-有机相模式中，常用的缓冲溶液是乙酸缓冲液、甲酸缓冲液、柠檬酸缓冲液和磷酸缓冲液。用 LC-MS 检测酸性手性化合物时，可选择一些适用的流动相或缓冲盐溶液（例如乙酸铵、甲酸铵）。

此外，CHIRALPAK® QN-AX 和 CHIRALPAK® QD-AX 也可用于分析碱性或中性化合物，但通常使用正相（NP）模式或高比例水相的反相（RP）模式。在使用正相模式时，CHIRALPAK® QN-AX 和 CHIRALPAK® QD-AX 的色谱行为表现即普通的 Pirkle 型手性柱。

色谱柱保养/维护

在首次分析前，用甲醇+1%乙酸（v/v）冲洗 20 倍柱体积（150×4.6mm i.d.规格为 30ml），然后用首次分析所用的流动相平衡 20 倍柱体积。

☞ ***色谱柱的冲洗与再生***

- 在使用了对填料有强亲和力的反离子试剂（如柠檬酸盐、磷酸盐）之后，或带多电荷的样品在弱的反离子流动相中无法洗脱而残留在柱子上时，建议用**甲醇/三乙胺（TEA）（100:2, v/v）**冲洗柱子 30 分钟，然后才可切换成对填料亲和作用较弱的流动相（如乙酸盐）。柱子用甲醇/三乙胺冲洗后，需用甲醇/水（50:50，v/v）或乙腈/水（50:50，v/v）冲洗，之后再换新的流动相或保存柱子。
- 如果一些强疏水性杂质因强疏水作用残留在柱子上时，可用**乙腈/乙酸（100:1，v/v）或四氢呋喃（THF）、二氧六环（dioxane）和二甲基亚砜（DMSO）**进行冲洗。之后用甲醇/水（50:50，v/v）或乙腈/水（50:50，v/v）冲洗，再换新的流动相或保存柱子。

色谱柱保存

- 柱子使用完以后需用甲醇/水（50:50，v/v）冲洗 5-10 分钟；或者用纯甲醇（或乙腈）冲洗过夜（特别是在使用了磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液之后）。
- 如使用了高浓度的盐溶液，必须先用有机相/水的混合溶液冲洗柱子，以免在切换到纯有机溶剂时导致盐析出。
- 长期保存，需用纯甲醇或乙腈冲洗 20 倍柱体积；也可以是甲醇 /水（50:50，v/v）保存，或者乙腈/水（50:50，v/v）。可置于室温下保存。

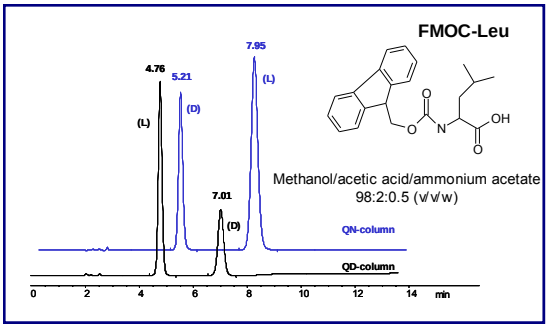
严格按照《使用手册》使用色谱柱，可延长色谱柱使用寿命。

方法开发策略

请按手性化合物的类型选择合适的分离模式：

- **酸性**手性化合物：使用极性模式或反相模式（表 1 和 2）。
- 手性**磺酸**类、**磷酸**类、**亚磷酸**类、**二元酸**或**多元酸**：使用反相模式（在极性模式中保留过强）（表 2）。
- **两性**手性化合物：使用反相模式，pH 范围可增加至 pH8，流速降低，例如，分析柱用 0.5ml/min（表 2）。
- **中性**或**碱性**化合物：使用正相模式，甚至可以用含水量高一些的反相流动相。

酸性化合物-极性模式（PO）*(表 1)*



1） 起始筛选流动相：甲醇/乙酸/乙酸铵（98:2:0.5, v/v/w）
流速：1.0ml/min （微径柱流速设 0.1ml/min），温度：25℃

2） 可将上述的甲醇换成甲醇/乙腈（50:50，v/v）。如分离度过大，增加甲醇的比例。对 N 上衍生的氨基酸，甲醇的分离效果好；对芳基羧酸类化合物，乙腈的分离效果好；对羟基羧酸类化合物，甲醇/乙腈的分离效果好。

⇨如有分离迹象，可确定两构型的洗脱顺序。根据分析要求再决定选择 CHIRALPAK® QN-AX 或 CHIRALPAK® QD-AX，大部分情况下，这两支柱子表现相反的洗脱顺序。

3） 已达到**基线分离**，但**保留时间太长**的，先将有合适的手性选择性的流动相组成确定下来，然后尝试以下优化策略来调整保留

Daicel Chiral Technologies (China) CO., LTD.

时间:

a. *增加流动相中缓冲液浓度：*酸-碱的比例不变，改变竞争性酸（反离子）在流动相中的浓度，对手性选择没有影响或影响甚微。但因其改变了离子交换能力，从而影响化合物的保留。增加反离子的浓度可减弱化合物的保留。例如，使用甲醇/乙酸/乙酸铵（98:4:1，v/v/w）或甲醇/乙酸/三乙胺（100:3:1，v/v/v）（或甲醇/乙酸/浓氨水（100:3:0.7，v/v/v））

b. *改变反离子（竞争性酸）的种类：*改变缓冲液的种类，对化合物的保留有很大影响，同时也会影响手性选择。如保留时间太长，可将乙酸盐缓冲对换成洗脱能力更强的甲酸盐缓冲液（例如，甲醇/甲酸/三乙胺（100:1:3，v/v/v）或甲醇/甲酸/浓氨水（100:1:1.5，v/v/v））。

c. *改变酸-碱的比例（表观 pH 或 pHa）:*改变酸-碱比例（例如乙酸-三乙胺或乙酸-浓氨水），表观 pH 值就会改变，从而影响保留时间和选择性。增加过量的酸会延长保留时间。依据选择性确定最佳浓度，其主要取决于样品本身的结构。例如，调节三乙胺或浓氨水的量，在最佳流动相组成下比较 pHa5，pHa6，pHa7 的分离效果，然后确定酸-碱比例（建议的酸-碱比例如表所示）。

酸-碱比例
（举例）

	pHa＜6	pHa≈6	pHa≈6.5	pHa＞7
乙酸/三乙胺	2:0.2	3:1 2:0.6 1:0.3	2:1.6 1:0.8	2:3 1:1.5
乙酸/氨水	2:0.2	3:0.7 2:0.5 1:0.2	2:1.2 1:0.5	2:2 1:1
甲酸/三乙胺	0.5:0.5	1:3 0.5:1.5	1:3.5	1:4 0.5:1.8
甲酸/氨水	0.5:0.3	1:1.5 0.5:0.8	0.5:1	0.5:1.5

起始条件

d. *改变流速：*在基线分离的前提下，可将流速增大至 1.5ml/min（微径柱为 0.3ml/min），如出峰仍很晚，就需要通过增加反离子的浓度或改变缓冲液的种类来继续调节保留时间。

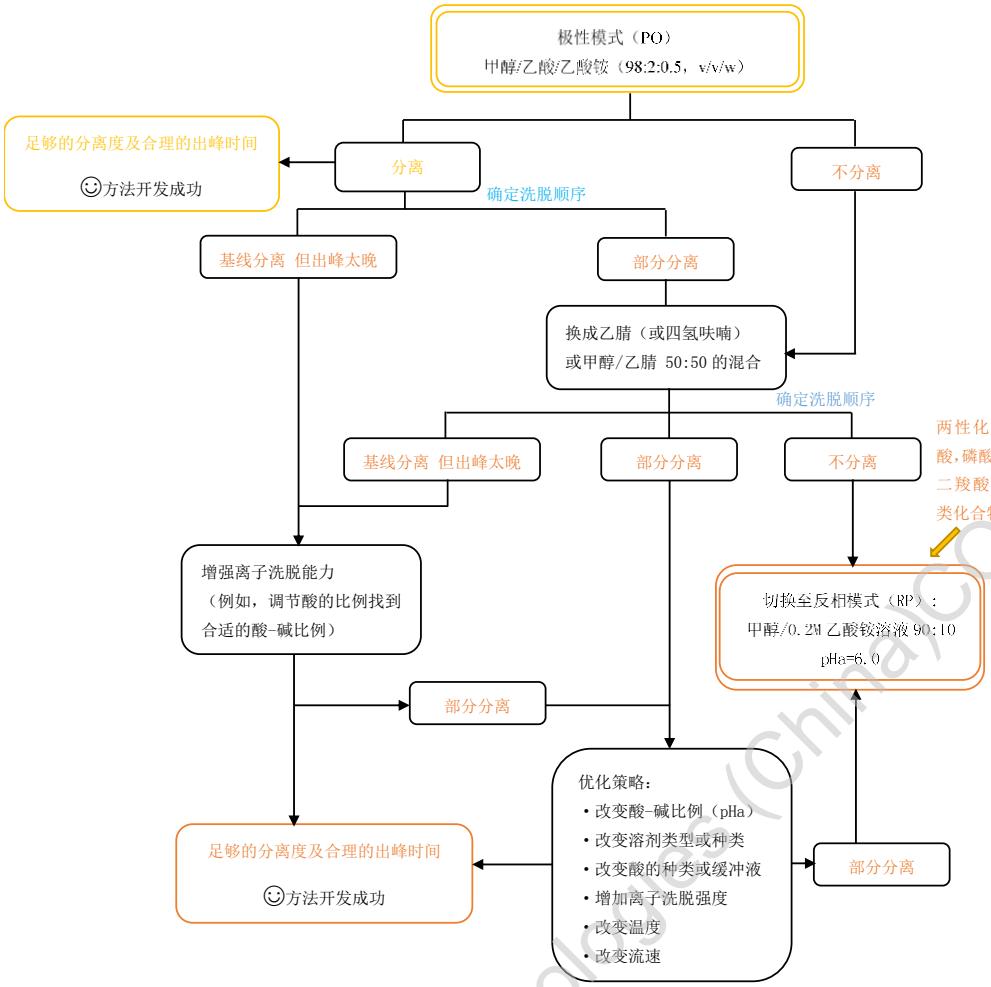
e. *提高温度：*除少数化合物外，通常提高温度能使出峰提前，但同时会减弱手性选择性。如在 25℃时出峰很晚，可将温度提高至 30℃（最高位 40℃）。

f. *改变共离子：*用三乙胺或氨水调节 pH，两者会有些微差别。

4） 如使用甲醇作流动相仅仅达到**部分分离**，则尝试甲醇/乙腈这样的混合流动相（或其他溶剂如四氢呋喃）。改变缓冲对类型、共离子、流速、温度对接近基线分离的情况比较有效。如无改善，请切换到反相模式。

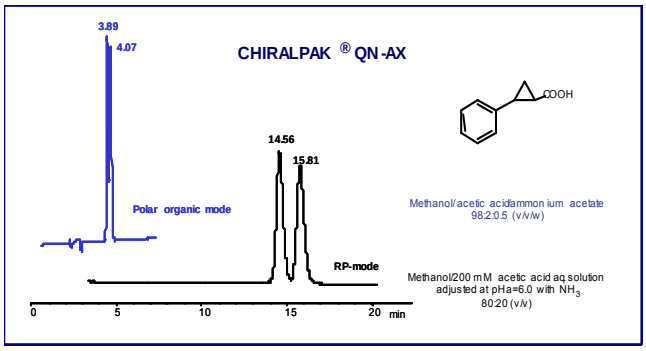
5） 如在初始的甲醇流动相中**无任何分离**迹象，尝试乙腈或甲醇/乙腈流动相，以及上述缓冲液的优化，或切换到反相模式。

Daicel Chiral Technologies (China) CO., LTD



影响洗脱时间的因素（举例）

使保留时间延长	使保留时间提前
⬇ 反离子浓度	⬆ 反离子浓度
酸-碱比例：⬇碱性（极性模式）	酸-碱比例：⬆碱性（极性模式）
⬇将 pHa 值从 6 降低至 5（反相模式） 最低可至 2，视样品 pKa 而定	⬆将 pHa 值从 6 升高至 8（反相模式）
⬇ 有机相比例	⬆ 有机相比例
⬇ 流速	⬆ 流速
改变酸的种类 保留能力：乙酸＞丁二酸≥甲酸＞羟基乙酸＞丙二酸（极性模式）	
改变缓冲液的种类 保留能力：乙酸盐＞甲酸盐＞磷酸盐＞柠檬酸盐（反相模式）	



General conditions: CHIRALPAK® QN-AX and QD-AX, 150 x 4.6 mm, Flow rate: 1 ml/min, 25 ℃

酸性化合物-反相模式（RP）*(表 2)*

1) 起始筛选流动相：甲醇/0.2M 乙酸水溶液（90:10, v/v）（用浓氨水将该流动相 pHa 调至 6.0）
流速：1.0ml/min （微径柱流速设 0.1ml/min），温度：25℃
如果该化合物之前尝试过极性模式，比较下来与乙腈混合作流动相效果好，则用此作为有机相继续优化其他。
⇨如有分离迹象，可确定两构型的**洗脱顺序**。根据分析要求再决定选择 CHIRALPAK® QN-AX 或 CHIRALPAK® QD-AX，大部分情况下，这两支柱子表现相反的洗脱顺序。

Daicel Chiral Technologies (China) CO., LTD.

2) 如已达到**基线分离**，但**保留时间太长**，先先将有合适的手性选择性的流动相组成确定下来，然后尝试以下优化策略来调整保留时间：

a. 增加缓冲液的浓度： 使出峰提前。例如，甲醇/0.5M 乙酸水溶液（90:10，v/v）（用浓氨水将该流动相 pHa 调至 6.0）。多电荷化合物要在合适的时间内出峰，至少用浓度为 0.5M 或 1M 的乙酸铵溶液。对磷酸或次磷酸化合物，用 20-50mM 磷酸盐缓冲液（pH6），对峰形和保留时间更好。使用磷酸盐溶液时，建议增大水相的比例，以免盐在水相-有机相体系中析。

b. 改变反离子（竞争性酸）的种类： 如最佳 pH 值低于 4，将乙酸盐换成甲酸盐。如换成磷酸盐或柠檬酸盐，洗脱能力更强，但同时手性选择也减弱了。仅当使用高浓度的乙酸盐或甲酸盐溶液出峰时间仍很晚时，可尝试以上提到的缓冲盐溶液。例如对一些磷酸类和二、三羧酸类化合物。使用了柠檬酸盐等其他对填料有强亲和力的缓冲盐溶液后，建议用甲醇/三乙胺（TEA）（100:2, v/v）冲洗柱子 20 分钟，再用甲醇/水（50:50，v/v）冲洗 30 分钟，然后切换其他流动相。

c. 增加有机相的比例： 有机相比例（90%-95%）。有机相组成同样可参考极性模式所用的组成。

d. 改变 pHa 值: 对羧酸类化合物，最适 pH 值大多在 pH5-6 之间，强酸性化合物选择更低的 pH。相反的，两性化合物要选择较高的 pH（允许的 pH 范围是 2-8）。升高 pHa 值，对于 pHa 6-7 范围，保留时间提前，且基本上不影响手性选择；对于 pHa 7-8 范围内，选择性因子 α 会大大减小（例，用三乙胺或浓氨水调节 pHa 值，在最佳流动相组成下比较 pHa5，6 和 7 的分离效果）。含磷酸、磺酸等强酸性的化合物，以及两性化合物，最佳 pH 值不确定，其范围在 pH2-8 之间。

e. 改变流速： 在基线分离的前提下，根据流动相的黏度，在 180Bar 的限制值内，增大流速使出峰提前，如出峰仍很晚，就需要通过增加反离子的浓度或改变缓冲液种类来继续调节出峰时间。减小流速会提高理论塔板数。

f. 升高温度： 除少数化合物外，通常升高温度能使出峰提前，但同时会减弱手性选择性。如在 25℃时出峰很晚，可将温度升高至 30℃（最高位 40℃）。

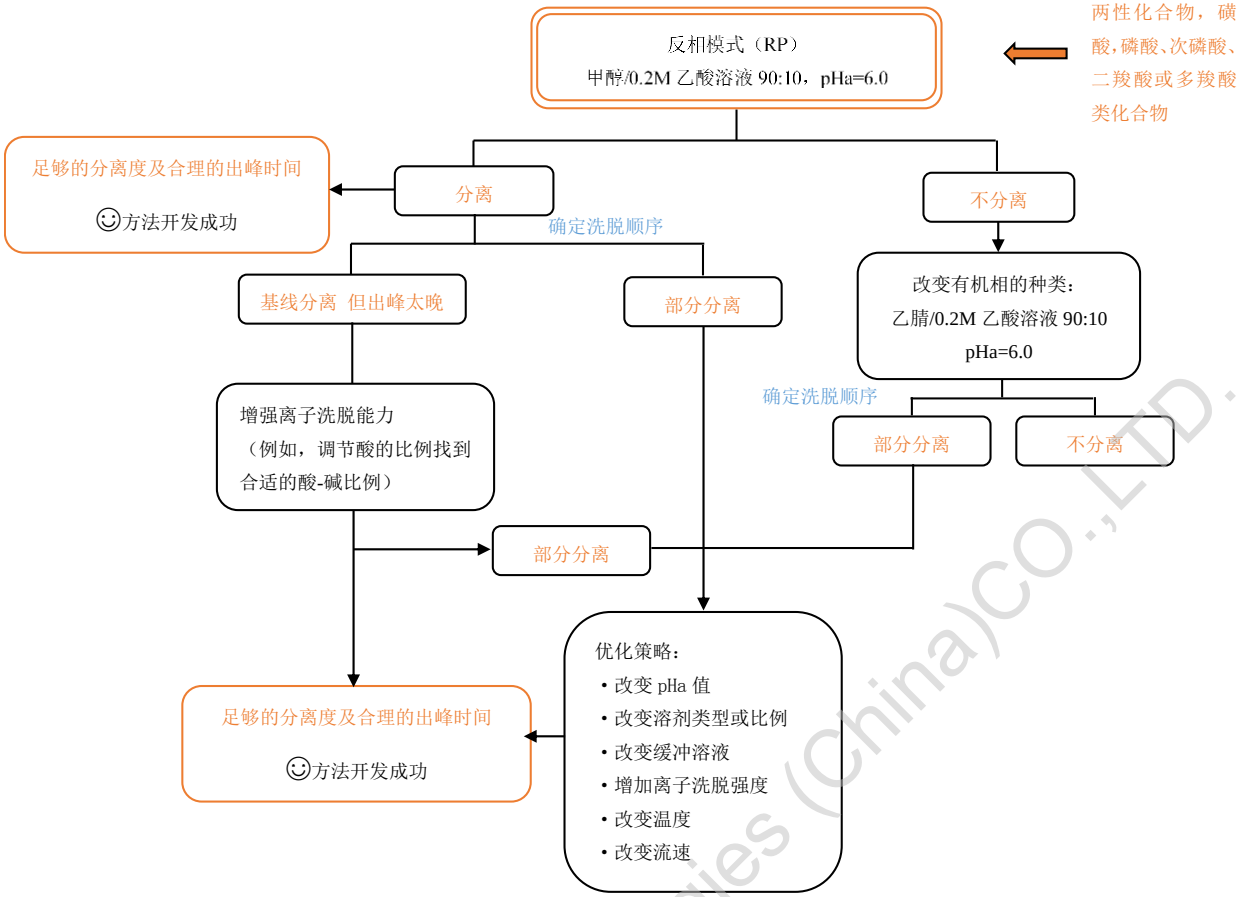
g. 改变共离子： 用三乙胺或浓氨水调节 pH，两者会有微小的差别。

3) 如使用初始流动相（甲醇或乙腈）/水相（90:10）**无分离**迹象或仅**部分分离**，解决方法是：

a. *出峰时间很早*: 如果 k＜1，减小反离子的浓度使 k 值在 2-5，然后继续优化其他参数（见上）。或者，也可以降低有机相的比例（例如，至 80%和 70%）。

b. *出峰时间合适（1≤k＜10）：* 尝试降低有机相的比例（例如，至 80%和 70%）。如达到基线分离，再按照“2）”部分的指导优化出峰时间。如接近基线分离，可将流速从 1.0ml/min 降到 0.5ml/min 或者降低温度。如达到基线分离，但因此使出峰时间变得很晚，可增大流动相中反离子的浓度来进一步调整出峰时间。

Daicel Chiral Technologies (China) CO., LTD.



中性或碱性化合物-正相模式（NP）

在切换到正相模式之前，柱子必须用甲醇/水混合溶剂彻底置换之前的体系，然后用甲醇/三乙胺（100:2，v/v）冲洗（30 分钟），最后用兼溶于正相溶剂的异丙醇进行冲洗置换。

1) 起始筛选条件：正己烷/异丙醇（90:10，v/v）。如出峰时间早，可将极性溶剂相减小至 1%（例如，对芳香醇类）。如出峰时间晚，将异丙醇增加到 30%。
2) 如无分离迹象，可更换极性溶剂种类。例如，将异丙醇换成乙醇、二氯甲烷、二氧六环等。也可以使用 100%极性溶剂作流动相，可能也有分离度。
3) 如拖尾，例如，对碱性化合物，可在流动相中加 0.1%三乙胺（TEA）或其他碱性添加剂。

中性或碱性化合物-反相模式（RP）

在实际尝试中，如发现中性或碱性化合物在水相-有机相条件下比正相条件分离效果更好，也可以使用反相模式来分离。目前已有一些成功分离的案例。

1) 起始筛选：走一个 30 分钟的水-乙腈梯度，乙腈的比例从 5%线性地升至 100%，主要目的是得到一个合适的有机相比例用于之后的等度洗脱。
2) 走水-乙腈适宜比例的等度条件，使容量因子 k 值在 5-10 之间。
3) 如无分离迹象或分离度很小，乙腈换成甲醇，重复以上步骤。
4) 如出峰时间早或者开始有分离迹象，把流速降低。
5) 对可解离的化合物，例如手性碱，需要使用缓冲液，并优化溶液的 pH 值。pH 值越高，保留时间越长。
6) 如无分离迹象或分离度很小，建议使用正相模式继续优。

Daicel Chiral Technologies (China) CO., LTD.

换算表

- 色谱柱内径/流速

柱内径(mm)	2.1	3.0	4.6	10	21	30
流速(ml/min)	0.21	0.43	1.0	4.7	21	43

- 压力

MPa	bar	kg/cm^2	psi
1	10	10.197	145.038
0.1	1	1.020	14.504
9.807×10^{-2}	0.981	1	14.223
6.895×10^{-3}	6.895×10^{-2}	7.031×10^{-2}	1

严格按照《使用手册》使用色谱柱，可延长色谱柱使用寿命。

本《使用手册》不适用于其他的大赛璐手性柱

若您在手性柱使用中有任何疑问，
请联系大赛璐药物手性技术（上海）有限公司（chiral@dctc.daicel.com）。

CHIRALCEL®，CHIRALPAK®，CROWNPAK®和 DAICEL DCpak®是
大赛璐公司（DAICEL CORPORATION）的注册商标。

Daicel Chiral Technologies (China) CO., LTD.