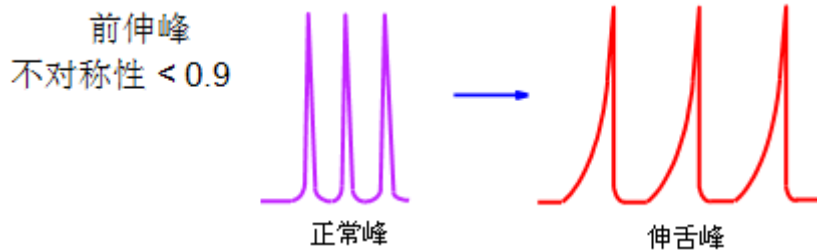


液相色谱故障排除之谱图的各种问题

A、峰拖尾

- 1、筛板阻塞
 - a、反冲色谱柱 b、更换进口筛板 c、更换色谱柱
- 2、色谱柱塌陷
 - a、填充色谱柱
- 3、干扰峰
 - a、使用更长的色谱柱 b、改变流动相或更换色谱柱
- 4、流动相 PH 选择错误
 - a、调整 PH 值。对于碱性化合物，低 PH 值更有利于得到对称峰
- 5、样品与填料表面的溶化点发生反应
 - a、加入离子对试剂或碱性挥发性修饰剂 b、更改色谱柱

B、峰前延



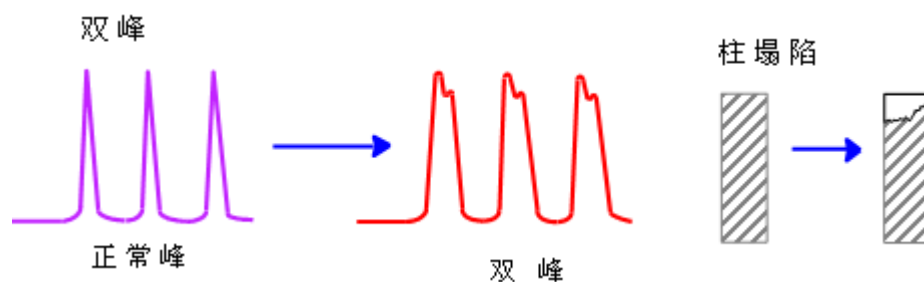
可能的原因

在大峰前，有小峰流出
柱死体积
样品溶剂不适当
过滤片部分堵塞
柱过载

- 1、柱温低
 - a、升高柱温
- 2、样品溶剂选择不恰当
 - a、使用流动相作为样品溶剂
- 3、样品过载
 - a、降低样品含量
- 4、色谱柱损坏
 - a、见 A1、A2

C、峰分叉

- 1、保护柱或分析柱污染【柱中有死体积】
 - a、取下保护柱再进行分析。如果必要更换保护柱。如果分析柱阻塞，拆下来清洗。如果问题仍然存在，可能是柱子被强保留物质污染，运用适当的再生措施。如果问题仍然存在，入口可能被阻塞，更换筛板或更换色谱柱。



2、样品溶剂不溶于流动相

a、改变样品溶剂。如果可能采取流动相作为样品溶剂。

真正的环境样品

样品的溶解性

溶剂强度

体积效应

Contaminant

微粒

强保留的组分

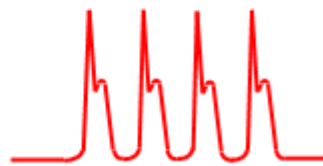
过滤样品，以确保其
不含有固体微粒

用流动相或比流动相极性
较弱的溶剂溶解样品

进样的样品
体积应尽量小



样品溶于流动相



样品不溶于流动相

D、峰变形

1、样品过载

a、减少样品载量

E、早出的峰变形

1、样品溶剂选择不恰当

a、减少进样体积 b、运用低极性样品溶剂

F、早出的峰拖尾程度大于晚出的峰

1、柱外效应

a、调整系统连接（使用更短、内径更小的管路） b、使用小体积的流通池

G、 K' 增加时，脱尾更严重

1、二级保留效应，反相模式

a、加入三乙胺（或碱性样品） b、加入乙酸（或酸性样品） c、加入盐或缓冲剂（或离子化样品）

d、更换一支柱子

2、二级保留效应，正相模式

a、加入三乙胺（或碱性样品） b、加入乙酸（或酸性样品） c、加入水（或多官能团化合物）

d、试用另一种方法

3、二级保留效应，离子对

a、加入三乙胺（或碱性样品）

H、酸性或碱性化合物的峰拖尾

1、缓冲不合适

a、使用浓度 50-100mM 的缓冲液 b、使用 P_{ka} 等于流动相 PH 值的缓冲液

I、额外的峰

1、样品中有其他组份

2、前一次进样的洗脱峰

a、增加运行时间或梯度斜率 b、提高流速

3、空位或鬼峰

a、检查流动相是否纯净 b、使用流动相作为样品溶剂 c、减少进样体积

J、保留时间波动

1、温控不当

a、调好柱温

2、流动相组分变化

a、防止变化（蒸发、反应等）

3、色谱柱没有平衡

a、在每一次运行之前给予足够的时间平衡色谱柱

K、保留时间不断变化

1、流速变化

a、重新设定流速

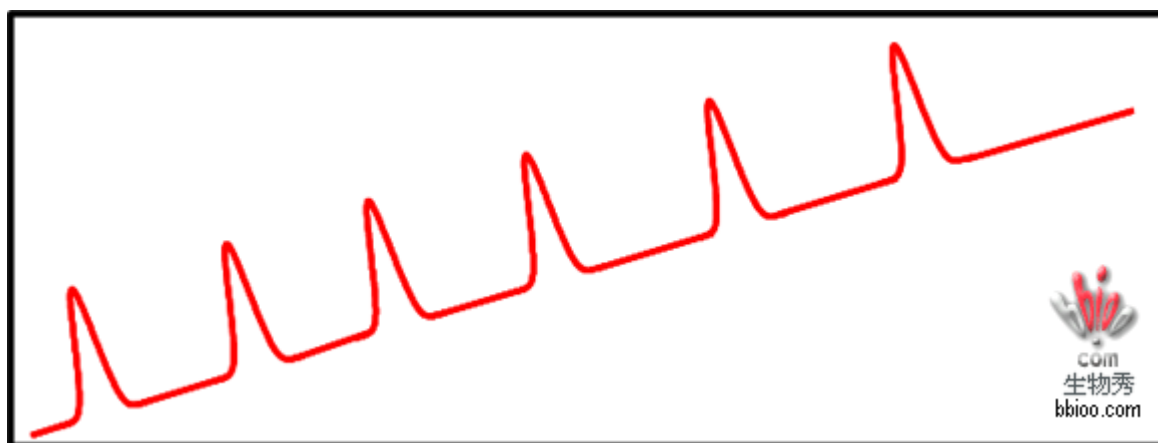
2、泵中有气泡

a、从泵中除去气泡

3、流动相选择不恰当

a、更换合适的流动相 b、选择合适的混合流动相

L、基线漂移



1、柱温波动。（即使是很小的温度变化都会引起基线的波动。通常影响示差检测器、电导检测器、较低灵敏度的紫外检测器或其它光电类检测器。）

a、控制好柱子和流动相的温度，在检测器之前使用热交换器

2、流动相不均匀。（流动相条件变化引起的基线漂移大于温度导致的漂移。）

a、使用 HPLC 级的溶剂，高纯度的盐和添加剂。流动相在使用前进行脱气，使用中用氮气。

3、流通池被污染或有气体

a、用甲醇或其他强极性溶剂冲洗流通池。如有需要，可以用 1N 的硝酸。
(不要用盐酸)

4、检测器出口阻塞。(高压造成流通池窗口破裂，产生噪音基线)

a、取出阻塞物或更换管子。参考检测器手册更换流通池窗。

5、流动相配比不当或流速变化

a、更改配比或流速。为避免这个问题可定期检查流动相组成及流速。

6、柱平衡慢，特别是流动相发生变化时

a、用中等强度的溶剂进行冲洗，更改流动相时，在分析前用 10-20 倍体积的新流动相对柱子进行冲洗。

7、流动相污染、变质或由低品质溶剂配成

a、检查流动相的组成。使用高品质的化学试剂及 HPLC 级的溶剂

8、样品中有强保留的物质(高 K' 值)以馒头峰样被洗脱出，从而表现出一个逐步升高的基线。

a、使用保护柱，如有必要，在进样之间或在分析过程中，定期用强溶剂冲洗柱子。

9、使用循环溶剂，但检测器未调整。

a、重新设定基线。当检测器动力学范围发生变化时，使用新的流动相。

10、检测器没有设定在最大吸收波长处。

a、将波长调整至最大吸收波长处

M、基线噪音(规则的)

1、在流动相、检测器或泵中有空气

a、流动相脱气。冲洗系统以除去检测器或泵中的空气。

2、漏液

a、见第三部分。检查管路接头是否松动，泵是否漏液，是否有盐析出和不正常的噪音。如有必要，更换泵密封。

3、流动相混合不完全

a、用手摇动使混合均匀或使用低粘度的溶剂

4、温度影响(柱温过高，检测器未加热)

a、减少差异或加上热交换器

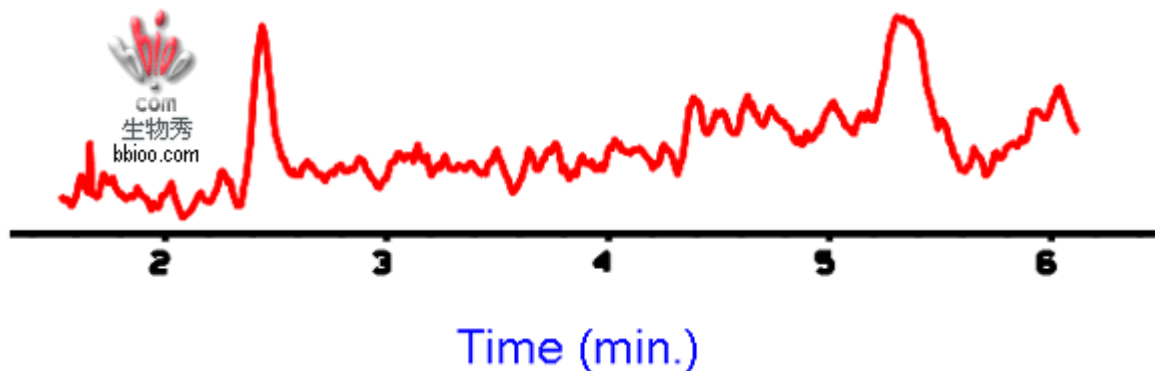
5、在同一条线上有其他电子设备

a、断开 LC、检测器和记录仪，检查干扰是否来自于外部，加以更正。

6、泵振动

a、在系统中加入脉冲阻尼器

N、基线噪音(不规则的)



- 1、漏液
 - a、见第三部分。检查接头是否松动，泵是否漏液，是否有盐析出和不正常的噪音。如有必要，更换密封。检查流通池是否漏液。
- 2、流动相污染、变质或由低质溶剂配成
 - a、检查流动相的组成。
- 3、流动相各溶剂不相溶
 - a、选择互溶的流动相
- 4、检测器/记录仪电子元件的问题
 - a、断开检测器和记录仪的电源，检查并更正。
- 5、系统内有气泡
 - a、用强极性溶液清洗系统
- 6、检测器内有气泡
 - a、清洗检测器，在检测器后面安装背景压力调节器
- 7、流通池污染（即使是极少的污染物也会产生噪音。）
 - a、用 1N 的硝酸（不能用磷酸）清洗流通池
- 8、检测器灯能量不足
 - a、更换灯
- 9、色谱柱填料流失或阻塞
 - a、更换色谱柱
- 10、流动相混合不均匀或混合器工作不正常
 - a、维修或更换混合器，在流动相不走梯度时，建议不使用泵的混合装置

O、宽峰

- 1、流动相组成变化
 - a、重新制备新的流动相
- 2、流动相流速太低
 - a、调节流速
- 3、漏液（特别是在柱子和检测器之间）
 - a、见 section 3。检查接头是否松动、泵是否漏液、是否有盐析出以及不正常的噪音。如果必要更换密封。
- 4、检测器设定不正确
 - a、调整设定
- 5、柱外效应影响
 - a、柱子过载 b、检测器对反应时间或池体积响应过大 c、柱子与检测器之间的管路太长或管路内径太大 d、记录仪响应时间太长
 - a、小体积进样（例如：10ul 而不是 100ul）以 1：10 或 1：100 的比例稀释样品 b、减少响应时间或使用更小的流通池 c、使用内径为 0.007-0.01 的短管路 d、减少响应时间
- 6、缓冲液浓度太低
 - a、增加浓度
- 7、保护柱污染或失效
 - a、更换保护柱
- 8、色谱柱污染或失效，塔板数较低
 - a、更换同样类型的色谱柱。如果新柱子可以提供对称的色谱峰，则用强溶剂冲洗旧柱子。

9、柱入口塌陷

- a、打开柱入口，填补塌陷或更换柱子

10、呈现两个或多个未被完全分离的物质的峰

- a、选择其它类型的色谱柱以改善分离效果

11、柱温过低

- a、提高柱温。除非特殊情况，温度不宜超过 75℃

12、检测器时间常数太大

- a、使用较小的时间常数

P、分离度降低

1、流动相污染或变质（引起保留时间变化）

- a、重新配置流动相

2、保护柱或分析柱阻塞

a、去掉保护柱进行分析。如果必要则更换保护柱。如果分析柱阻塞，可进行反冲。如果问题仍然存在色谱柱可能被强保留的污染物损坏，建议使用恰当的再生程序。如果问题仍然存在，进口可能阻塞了，更换入口处的筛板或更换色谱柱。

Q、所有的峰面积都太小

1、检测器衰减设定过高

- a、减少衰减的设定

2、检测器时间常数设定太大

- a、设定较小的时间常数

3、进样量太少

- a、增大进样量

R、所有的峰面积都太大

1、检测器衰减设定过低

- a、采取较大的衰减

2、进样过多

- a、减少进样量

3、记录仪连接不正确

- a、正确连接记录仪

S、高效液相色谱 HPLC 保留时间漂移的故障排除

保留时间不重现有两种不同的情况：即保留时间漂移和保留时间波动。前者是指保留时间仅沿单方向发生变化，而后者指保留时间无固定规律的波动。将这两种情况区分开来对找到问题的原因往往很有帮助。如，保留时间的漂移往往由柱老化引起；而柱老化不可能引起保留时间的无规律波动。事实上，保留时间漂移的多半原因是不同机理的色谱柱老化，如固定相流失（例如通过水解），色谱柱污染（由样品或流动相所致）等。保留时间漂移的几种最常见的原因如下：

1：色谱柱平衡

如果我们观察到保留时间漂移，首先应考虑色谱柱是否已用流动相完全平衡。通常平衡需要 10-20 个柱体积的流动相，但如果在流动相中加入少量添加剂（如离子对试剂）则需要相当长的时间来平衡色谱柱。

流动相污染也可能是原因之一。溶于流动相中的少量污染物可能慢慢富集到色谱柱上，从而造成保留时间的漂移。应注意：水是很容易污染的流动相成分。

2: 固定相稳定性

固定相的稳定性都是有限的,即使在推荐的 PH 范围内使用,固定相也会慢慢水解。例如,硅胶基质在 pH4 时水解稳定性最好。水解速度与流动相类型和配体有关。双官能团配体和三官能团配体比单官能团配体的键合相要稳定;长链键合相比短链键合相稳定;烷基键合相比氰基键合相稳定的多。

经常清洗色谱柱亦会加速色谱柱固定相的水解。其他硅胶基质键合相在水溶液环境中也可以发生水解,如氨基键合相等。

3: 色谱柱污染

保留时间漂移的另一个常见原因是色谱柱污染。HPLC 色谱柱是非常有效的吸附性过滤器,它可以过滤并吸附流动相携带的任何物质。污染源可以是:流动相本身,流动相容器,连接管、泵、进样器和仪器密封垫,以及样品等。通常通过实验可判断污染的来源。

样品中如果存在色谱柱上保留很强的组分,就可能是使保留时间漂移的潜在根源。这些根源通常是样品基质。如:配药中的赋形剂,生化样品(如血清)中的蛋白及类脂类化合物,食品样品中的淀粉,环境水样中的腐殖酸等。通常样品中的强保留组分具有较高的分子量,在此情况下,保留时间漂移的同时或其后会有反压的增加。可以通过使用固相提取(SPE)等样品前处理方法来去除样品基质的影响。

避免色谱柱污染最简单的方法是防患于未然。相比之下,找到问题的所在并设计有效的清洗步骤以去除污染物要困难的多。通常使用在给定色谱条件下的强溶剂,但并非所有污染物都可以在流动相中溶解。如 THF 可去除反相色谱柱中的许多污染物,但蛋白在 THF 中就不能溶解。DMSO 常常用于去除反相色谱柱中的蛋白。

使用保护柱是个非常有效的方法。反冲色谱柱仅是不得已时采用的办法。

4: 流动相组成

流动相组成的缓慢变化也是保留时间漂移的常见原因。如流动相中易挥发组分的挥发及循环使用流动相等。

5: 疏水坍塌

当小孔径、端基封口良好的反相填料色谱柱使用接近 100%的水为流动相时,有时会发生分离突然丧失及被分析物质保留明显降低或完全不保留的现象,这就是疏水坍塌。此现象是由流动相不浸润固定相表面而致。挽救的办法实现用含大量有机组分的流动相浸润固定相,再用高水含量的流动相进行平衡。由是色谱柱长期储存也会发生此现象。使用内嵌极性基团的反相色谱柱或非端基封口的色谱柱也可避免发生坍塌。