

液相色谱讲座

华东理工大学分析测试中心
施超欧

一 色谱的由来及发展

- 1903年3月21日，俄国植物化学家茨维特(Twseet)在华沙的自然科学学会生物学会会议上，提出了“一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用”论文。
- 他首先将植物的石油醚提取物放入装有碳酸钙的玻璃管的上端，然后用石油醚淋洗，结果在玻璃管中不同的色素按吸附顺序呈现出不同的色带。1906年，发表另一篇论文将其色带命名为“色谱”。
- 色谱——chromatography（色带的图）



- (a) 茨维特的层析法；
(b) 茨维特的色谱图；
- 1—白色吸附剂；
 - 2—黄色（叶黄素 β）；
 - 3—墨绿色（叶绿素）；
 - 4—浅绿色；
 - 5—黄色（叶黄素 α' 和 α''）；
 - 6—白色吸附剂；
 - 7—橙黄色（叶黄素 α）

色谱的发展

- 俄国科学家：M. S. Tswett
- 正式命名“色谱”的文献



"... the preparation obtained I name a chromatogram and the method proposed chromatography ..."
"... it is obvious that the adsorption phenomena described are characteristic not only of chlorophyll pigments; it is evident that different coloured and colourless compounds follow the same regularities."

M. S. Tswett (1906)

M.S. Tswett. Adsorption Analyse und Chromatographische Methode. Anwendung an die Chemie des Chlorophylls (1906)

- 20世纪20年代，许多植物化学家开始采用色谱方法对植物提取物进行分离，色谱方法才被广泛的应用。
- 自20世纪40年代以来，以Martin (1910~2002)为首的化学家，建立了一套色谱的基础理论，使色谱的方法从传统的经验方法总结归纳为一种理论方法——色谱塔板理论。



- 1938年，Izmailv等发表了薄层色谱法论文。
- 1944年，Consden等发表了纸色谱法论文。
- 1952年，James用气相色谱法分离了低沸点的脂肪酸，奠定了气相色谱的基础，60年代基本成熟。
- 1959年，出现商品化的GPC。
- 1960年后，经stahl等的努力，薄层色谱法得到了广泛的应用。

- 但20世纪60年代以来，大量有机化合物相对分子质量大，而且熔点、沸点高，在高温下易分解的物质，用气相色谱作为分析方法已不能满足分析测试的要求。
- 于是，人们重新考虑采用液相色谱，并进一步提高传统的液相色谱的分离效率。因此，液相色谱成为一种分析工具即高效液相色谱（HPLC）。由于高效液相色谱采用紫外可见光度检测，而大多数有机物均有紫外可见吸收，因此HPLC可以对大量有机化合物进行分析。它在有机分析中得到广泛应用，

- 20世纪70年代以后，气相色谱和高效液相色谱，逐步成为各行各业必不可少的分析工具，广泛应用于各个生产领域。随着环境科学的发展，不仅需要大量有机物质进行分离和检测，而且也要求对大量无机离子进行分离和分析。
- 1975年，美国Dow化学公司的H.Small等人首先提出的离子色谱的概念，在分离柱后加一个抑制柱，同年商品化的离子色谱仪问世。
- 1979年，美国依阿华州立大学J.S.Fritz等人提出的非抑制型离子色谱仪，即采用低交换容量的离子交换树脂制成色谱柱，采用弱酸及其盐类作为淋洗液对不同离子进行淋洗，在控制一定pH值的条件下，背景电导比较低，可以不加抑制器直接电导检测。

- 20世纪80年代以后，一种新型的色谱技术—毛细管电泳技术随之出现。毛细管电泳分离效率高、取样量少，与传统的色谱分析相比更为优越，这些优点使毛细管电泳的研究成为色谱技术又一新的热点。
- 20世纪90年代以后，ELSD一种新型的检测器出现，改变了弱紫外吸收物质的梯度检测难题。
- 20世纪90年代中期以后，用于HPLC的MS检测器开始普及，使液相进入定性的时代。（APCI，ESI）
- 多维色谱技术的出现为蛋白质基因组学的发展起到了重要的作用。

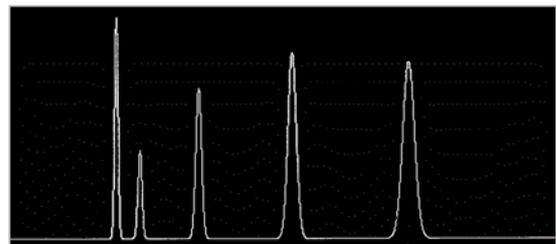
- 进入21世纪，HPLC在多个方面取得突破：
- Merck商品化的一体化柱，给人们一种全新的色谱柱概念。
- 2004年，Waters提出了UPLC的新概念，超高压液相色谱。借助小颗粒的填料，特殊化的设计，实现超高效和快速、高通量的分析。
- 2004年10月13日，ESA公司向外界宣布了一项高效液相色谱的最新技术突破，Corona™带电气溶胶检测器（CAD）诞生，新一代的通用型检测器。
- 2005年，岛津发布了第一个基于Web的HPLC系统。
- HPLC向高通量、高灵敏、网络化、小型化发展。

二 高效液相色谱基本概念

- 什么是高效液相色谱
- High Performance Liquid Chromatography
 - 高效液相色谱法，简称：HPLC
- 是一种区别于经典液相色谱；基于仪器方法的高效分离手段：
 - 高性能的色谱柱，高精度、耐高压的输液泵以及高灵敏度的检测器……
- 广泛应用于各个领域：
 - 医药 / 环保 / 石化 / 生命科学 / 食品及农业……
- 在技术，理论及应用上仍处于发展阶段

色谱图：HPLC图形结果（Chromatogram）

色谱图即色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图，其纵坐标为信号强度，横坐标为保留时间。



保留时间 (分)

液相色谱图相关术语

- 色谱峰 — Peak
 - 色谱柱流出组分通过检测器时产生的响应信号的微分曲线
- 峰底 — Peak Base
 - 峰的起点与终点之间连接的直线
- 峰高 — Peak Height
 - 峰最大值到峰底的距离
- 峰宽 — Peak Width
 - 在峰两侧拐点处所作切线与峰底相交两点之间的距离
- 半(高)峰宽 — Peak Width at Half Height
 - 通过峰高的中点作平行于峰底的直线, 其与峰两侧相交两点之间的距离

液相色谱图相关术语

- 峰面积 — Peak Area
 - 峰与峰底之间的面积, 又称响应值
- 标准偏差; σ — Standard Error
 - 0.607倍峰高处所对应峰宽的一半
- 拖尾峰 — Tailing Peak
 - 后沿较前沿平缓的不对称峰
- 前伸峰 — Leading Peak
 - 前沿较后沿平缓的不对称峰
- 鬼峰 — Ghost Peak
 - 并非由试样所产生的峰; 亦称假峰

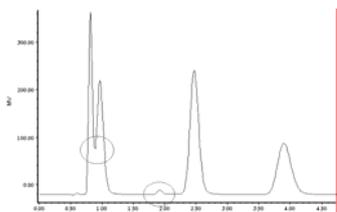
液相色谱图相关术语

- 基线 — Baseline
 - 在正常操作条件下, 仅由流动相所产生的响应信号的曲线
- 基线飘移 — Baseline Drift
 - 基线随时间定向的缓慢变化
- 基线噪声; N — Baseline Noise
 - 由各种因素所引起的基线波动
- 谱带扩展 — Band Broadening
 - 由于纵向扩散, 传质阻力等因素的影响, 使组分在色谱柱内移动过程中谱带宽度增加的现象

液相色谱图相关术语

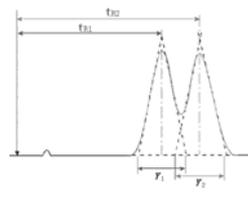
- 死时间, t_0 — Dead time
 - 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值所需的时间
- 保留时间, t_R — Retention time
 - 组分从进样到出现峰最大值所需的时间
- 死体积, V_0 — Dead volume
 - 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值所需的流动相体积
- 保留体积, V_R — Retention volume
 - 组分从进样到出现峰最大值所需的流动相体积

评价液相色谱方法的标准



问题: 什么样的分离结果是好的? 分离度? 灵敏度?

色谱分离基本方程



$$R = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

- R: 分离度
- t_R : 保留时间
- t_0 : 死时间
- W: 峰底宽度

不同R值的峰重叠情况示意图

R>1.5可以得到基线分离
 分离度R反映的是相邻两个峰的分开程度
 R太小，两个峰无法彻底分离
 R太大，分离时间过长，工作效率低下
 一般要求R>1.5，也可遵循行业特殊规定

色谱分离基本方程

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{1+k} \right)$$

根据该公式优化试验条件，提高分离度R。
 从数学推导来看，分别增大n，α，k值，都可以提高分离度。

•分离选择性 (α) 对分离度 (R) 的影响

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

如果t=1min
 α = 1.64/1.58 = 1.04 α = 1.15/0.85 = 1.35 α = 0.95/0.63 = 1.50

改变分离选择性 α 的方法

- 改用不同的流动相
- 改变流动相的组成
- 改变流动相pH值
- 改变柱温
- 应用特殊的化学效应
- 改变固定相

α 并非必须大于1.5!
 尽量优化前几种实验条件提高α值，
 避免改变固定相（买新柱子），以便降低成本

•柱效 (n) 对分离度 (R) 的影响

以上两张谱图k，α 值完全相同，仅仅由于柱效高低不同使得它们具有不同的分离度。
 直观的看，峰的尖锐程度代表了柱效高低，峰越尖锐，其柱效越高，通常使用理论塔板数 (n) 的大小衡量柱效的高低

理论塔板数和理论塔板高度的计算方法

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

理论塔板数
 理论塔板高度HETP=L/n

理论塔板数n越大，柱效越高；理论塔板数HETP越效，柱效越高

•容量因子 (k) 对分离度 (R) 的影响

•容量因子 $k = K \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_R}{t_M}$

•容量因子越大，分离度越大。

| | | | | | | | | |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| k | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | ∞ |
| k/k+1 | 0.50 | 0.75 | 0.83 | 0.88 | 0.90 | 0.92 | 0.93 | 1.00 |

•但当容量因子大于10，k/(k+1)的改变不大，而分析时间将大大延长。因此，k的最佳范围是1<k<20。

改变容量因子的方法有：
 •改变柱温
 •改变柱死体积，其中死体积对k/(k+1)的影响很大。
 •改变流动相的配比是最简便、最有效的方法
 •梯度洗提

三、色谱定性与定量方法

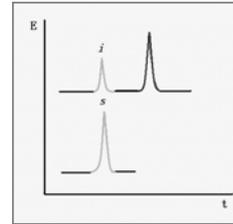
1 色谱定性分析

(1) 纯物对照定性

各物质在一定的色谱条件下均有确定不变的保留值，因此**保留值可作为定性指标**。

实现方法

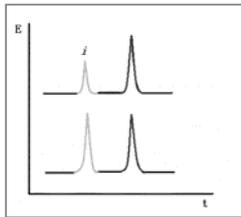
➤ 利用保留时间和保留体积定性



➤ 用相对保留值定性

$$r_{i,s} = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rs}} = \frac{V'_{Ri}}{V'_{Rs}}$$

➤ 用已知物增加峰高法定性



- 应用范围：适用于简单混合物，对该样品已有了解并具有纯物质的情况。
- 优点：应用简便，不需要其他仪器。
- 缺点：定性结果的可信度不高。
 - 提高可信度的方法：双柱、双体系定性

(2) 与其它仪器或化学方法联合定性

➤ 混合物经色谱分离后，将各组分直接由**接口**导入其它仪器中进行定性。常用的联用方法有：**LC-FTIR、LC-MS.....**

其它仪器相当于**色谱仪的检测器**。

- 使用范围：复杂样品的定性。
- 优点：不需要标准物，定性结果可信度高，操作方便。
- 缺点：需要特殊仪器或设备。

2 色谱定量分析

(1) 色谱定量基础

色谱定量分析是基于被测物质的量与峰面积成正比。在一定色谱条件下有：

$$m_i = f_i' A_i, \text{ 其中 } f_i' \text{ 是绝对质量校正因子, } A_i \text{ 是峰面积.}$$

(2) 定量要解决的问题

- 峰面积的测量和计算
- 校正因子的测量与计算
- 色谱定量方法及其应用

• 峰面积的测量与计算

- 积分仪或色谱工作站
简便、速度快，精度高，可达**0.2-2%**，对小峰及不对称峰的结果准确，是色谱发展趋势。
- 手动测量与计算

➢ 峰高乘半峰宽法：适于对称峰 $A = 1.065 \cdot h \cdot 2Y_{1/2}$

➢ 峰高乘峰底宽度法：适于矮宽峰 $A = 1.0204 \cdot h \cdot Y$

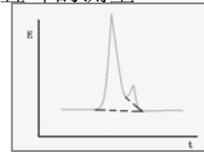
➢ 峰高乘平均峰宽法：适于不对称峰

$$A = h \cdot \left(\frac{Y_{0.15} + Y_{0.85}}{2} \right)$$

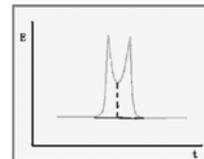
➢ 峰高乘保留值法：适于狭窄峰，快速简便，常用于工厂控制分析。 $A = h \cdot t_R$

■ 重叠峰的测量

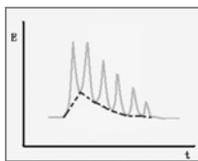
➢ 切线分峰



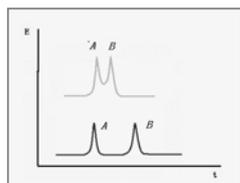
➢ 垂线分峰



➢ 连线分峰



➢ 计算机拟合分峰



• 校正因子的测量与计算

- 相对校正因子
由于绝对校正因子与仪器的灵敏度有关，又由于灵敏度与实验条件相关，且每一检测器的灵敏度都是不同的，它不容易测量准确，亦无通用性，所以实际工作中使用**相对校正因子**。

> 质量校正因子 $f_m = \frac{f_{i,m}}{f_{s,m}} = \frac{A_s m_i}{A_i m_s}$ 被测组分的质量
 > 摩尔校正因子 $f_M = \frac{f_{i,M}}{f_{s,M}} = \frac{A_s m_i M_s}{A_i m_s M_i}$ 标准物质量
 > 相对响应值 $S'_i = \frac{1}{f_i}$ 分子量

• 定量方法

- 校正归一化法 —— 含归一化
- 内标法 —— 含内标标准曲线法
- 外标法 —— 含单点校正

■ 校正归一化法

> 推导:

$$C_i \% = \frac{m_i}{m} \times 100 = \frac{m_i}{m_1 + m_2 + \dots + m_n} \times 100$$

$$= \frac{A_i f_i}{A_1 f_1 + A_2 f_2 + \dots + A_n f_n} \times 100$$

$$C_i \% = \frac{f_i A_i}{\sum f_i A_i} \times 100 \%$$

> 应用范围: 当试样中各组分都能流出色谱柱, 且在检测器上均有响应, 各组分峰没有重叠时, 可用此法。

> 优点: 简便、准确, 当操作条件如进样量等变化时, 对定量结果影响很小, 该法适合于常量物质的定量。

> 缺点: 对该法的苛刻要求限制了它的使用。

> 面积归一化法

若各组分的定量校正因子相近或相同, 则上式可简化为:

$$C_i \% = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100\%$$

■ 内标法

> 推导

将一定量的纯物质作为内标物, 加入到准确称量的试样中。

$$\frac{m_i}{m_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s}$$

$$C_i \% = \frac{m_i}{m} \times 100 = \frac{f_i A_i \cdot m_s}{f_s A_s \cdot m} \cdot \frac{1}{m} \times 100 = \frac{A_i}{A_s} \cdot \frac{m_s}{m} \cdot f_{i,s} \times 100$$

单点校正

- **适用范围:** 当只需测定试样中某几个组分, 且试样中所有组分不能全部出峰时可用。
- **优点:** 受操作条件的影响较小, 定量结果较准确, 使用上不象归一化法那样受到限制, 此法适合于微量物质的分析。
- **缺点:** 每次分析必须准确称量被测物和内标物, 不适合于快速分析。

➤ 内标标准曲线法 (多点校正内标法)

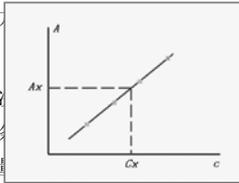
$f_{i,s}m_s/m$ 为常数K, 此时 $C_i\%=K\cdot(A_i/A_s)$, 以 $C_i\%$ 对 A_i/A_s 作标准曲线。

优点: 不必测校正因子, 消除了某些操作条件的影响, 方法简便, 适合液体试样的常规分析。。

■ 外标法 (标准曲线法)

➤ 用于常规分析

- **优点:** 操作简单, 计算方便。
- **缺点:** 结果的准确度取决于进样量的重现性和操作条件的稳定性。该法必须定量进样。



➤ 单点校正

当被测试样中各组分的浓度变化范围不大时 而用单点校正法。

即配制一个与被测组分含量十分接近的标准溶液, 定量进样, 计算被测物的含量。

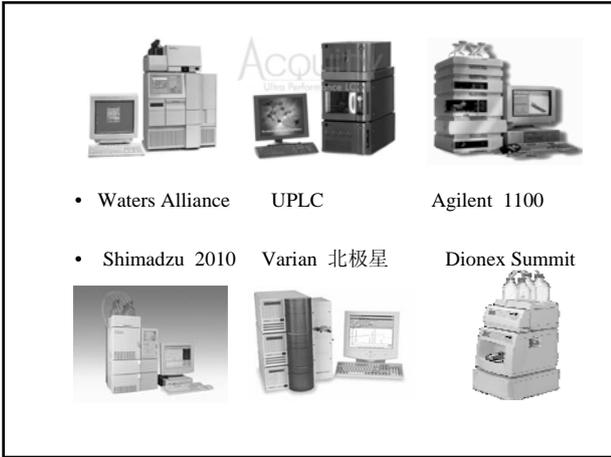
$$C_i\% = \frac{A_i}{A_s} \cdot C_s \times 100\%$$

(3) 定量中的误差问题

- 样品的代表性 (样品的前处理)
- 进样系统的影响
- 柱系统的影响
- 测量误差
- 定量结果的误差分析

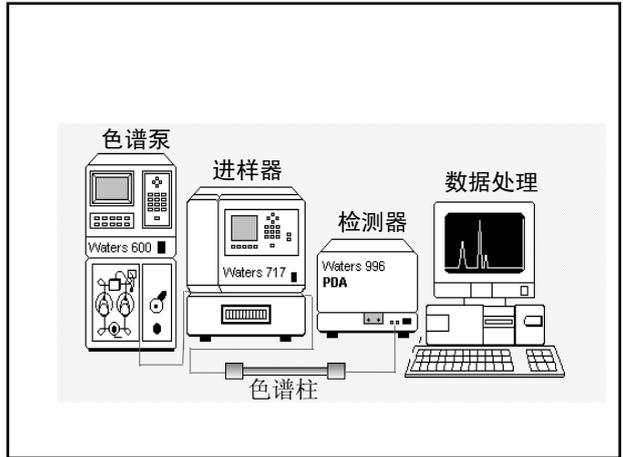
四 液相色谱仪的基本结构特点及其组成

- 1 液相色谱仪的主要厂家 (国外)
- Waters (www.waters.com, www.watreschina.com)
- Agilent (www.agilent.com.cn))
- Shimadzu (www.shimadzu.com.cn))
- Hitachi (www.hitachi-hitec.com)
- Alltech (www.alltechweb.com, www.alltech.net.cn)
- Perkin Elmer (www.perkinelmer.com)
- Varian (www.varianinc.com)
- Dionex (www.dionex.com.cn))
- SSI
- Jasco
- Gilson
- Bio-rad

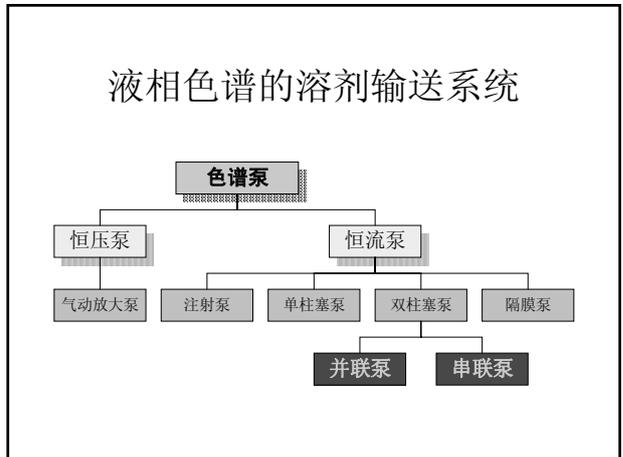


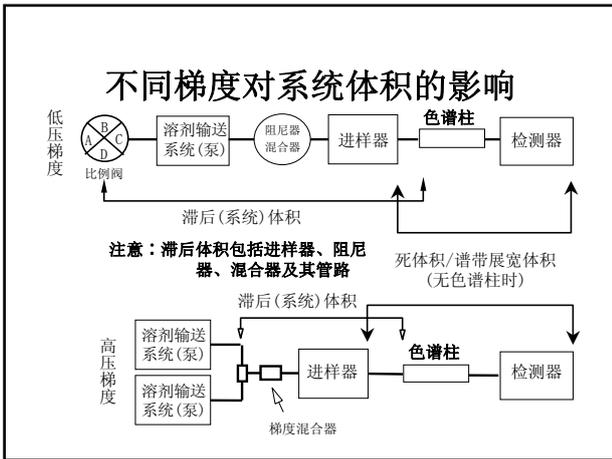
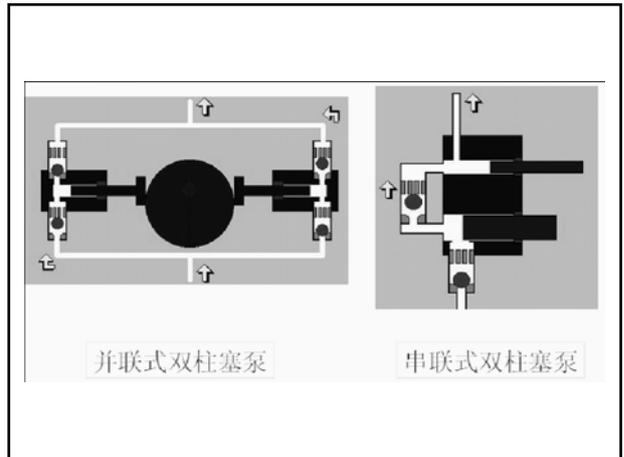
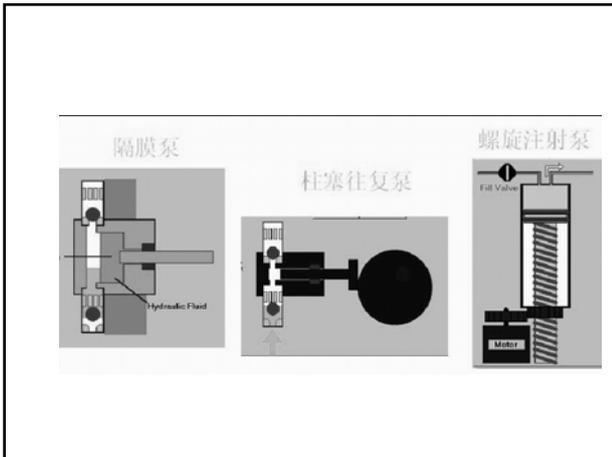
- 液相色谱仪的主要厂家（国内）
- 大连依利特（www.elitehplc.com）
- 浙江福立
- 北分
- 历元
- 大连江申
- 上海伍丰

- ### 2 液相色谱仪的组成
- 输液系统
 - 进样系统
 - 分离系统
 - 控温系统
 - 检测系统
 - 样品收集系统
 - 数据处理系统



- ### 2.1 输液系统
- 流路—单泵、双泵、三元泵、四元泵、多泵
 - 压力—低压、中压、高压、超高压
 - 控制方式—恒流、恒压
 - 流动相—等度、梯度
 - 混合方式—低压、高压
 - 流量—分析泵、半制备泵、制备泵
 - 材质—金属泵、非金属泵（peek）





泵运行的一般方式

- 1 液相色谱一般为金属泵，精度高，耐磨，peek泵一般用于离子色谱（兼容反相，不能用于正相）。
- 2 分析型泵流量在0.01-10.0ml/min，标准为1.0ml/min，不建议在较高的压力下用大流量。
- 3 如果采用比例阀切换流动相、流动相为低压混合，一般需在线脱气才能运行（有多种方式）。最常见的为四元比例阀。
单泵、双泵采用高压混合，不易产生气泡。精度比例阀高，因此目前也有四元高压混合的泵，如SSI、Dionex，可以以二元、四元的方式组合。
多元泵（流路）用于组合研究的高档色谱仪。

- 4 HPLC一般运行的压力在几十到几百大气压；压力越低对泵和色谱柱有利。低压色谱一般用于生化分析。
Waters最新的UPLC，可以在上千kg/cm²下运行。
- 5 对于简单的样品，多采用等度分析。但对于复杂样品一般采用梯度方式，必须采用二元以上的泵体系。
- 6 一般运行为恒流方式，很少为恒压。
- 7 低压混合一般需在线脱气，否则极易出气泡。高压混合不易出气泡。

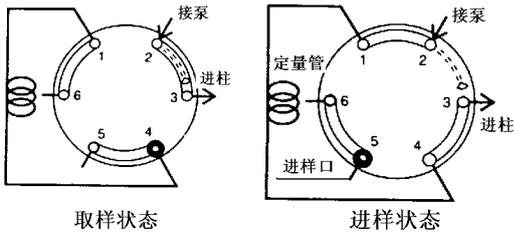
常见HPLC泵指标

- 1. 流量范围：0.001-9.999mL/min，设定步长0.001 mL/min；
- 2. 准确度：±2%；
- 3. 流量精度：RSD<0.3% RSD<0.5%；
- 4. 压力范围：40MPa(0.001-4.999mL/min)，20Mpa(5.000-9.999mL/min)；
- 5. 压力线性和准确性；
- 6. 压力脉动：压力脉动不大于0.2MPa(流量为1ml/min，压力8.5MPa条件下)；
- 7. 泵密封性：压力为40MPa，时间10min，压降不大于0.5MPa；

2.2 进样系统

- 1 手动—高压六通进样阀—目前，全世界新的高效液相色谱仪大都选配了Rheodyne公司的高压六通进样阀。除了Rheodyne公司外，Valco公司也生产与销售高压六通进样阀。早期非常有名的进样阀是Waters的U6K可变速进样器。
- 7725i是目前手动中最常见的一种，有不同规格的进样环，最大可至5ml。
- 进样注射器为平头，不同于气相色谱。
- 2 自动（电动、气动）—其阀同手动基本一致。特点是可自动连续进样、可自动调节进样量、进样重复性好、适合大批量样品的分析，而且还可以稀释、添加标准、重复进样、衍生等。

手动进样阀



取样时，流动相直接进柱，进样口与定量管连接，样品充满定量管后，多余样品从6流出。

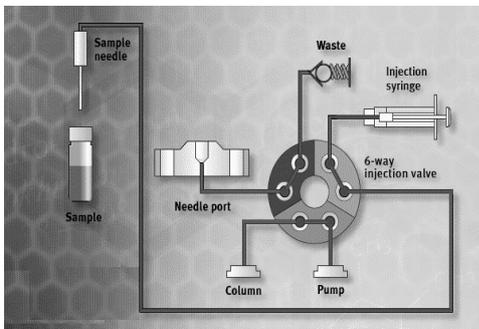
进样时，泵将流动相压入定量管，将样品全部进入色谱柱分析。

自动进样器

- 可以用全自动或半自动的方式进多个样品
- 一般的设计用Rheodyne阀，气阀驱动

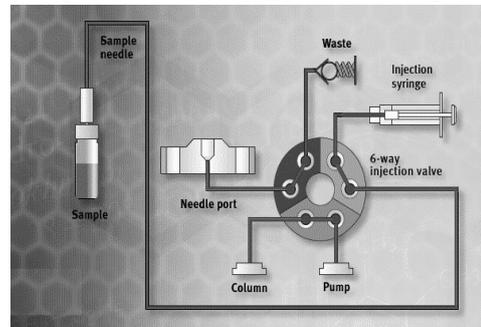


High-Pressure-Loop Injection Principle



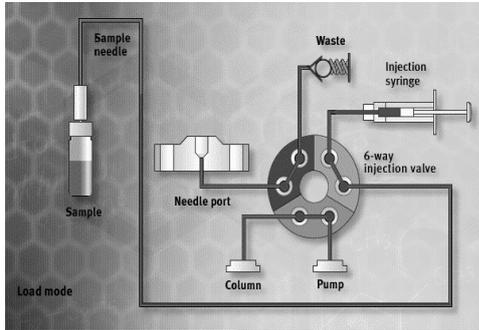
The sample is placed under the needle

High-Pressure-Loop Injection Principle



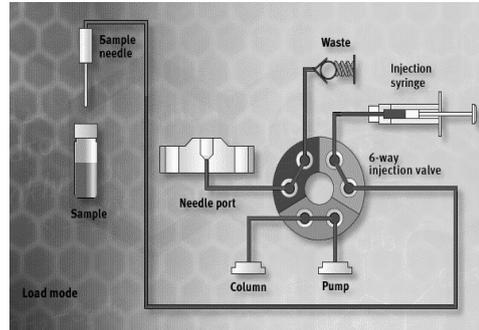
The needle descends through the septum

High-Pressure-Loop Injection Principle



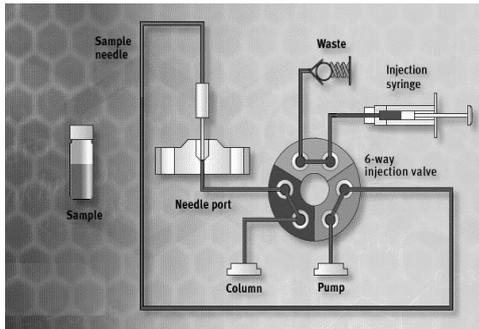
The syringe draws in the required volume

High-Pressure-Loop Injection Principle



The needle retracts

High-Pressure-Loop Injection Principle



...and descends to become part of the flow path.

2.3 分离系统

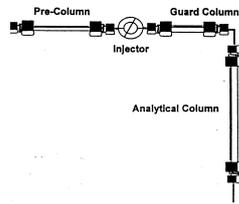
- 色谱柱是HPLC的分离的关键，色谱柱有很多类型。
- 1 柱管—玻璃、PEEK、不锈钢
玻璃柱—低压分离，填料自己填装，常用于生化；或早期的柱子；离子色谱也有这种规格。
PEEK—主要用于离子色谱柱。
不锈钢—大多采用这种类型，耐压，不宜变形。
- 2 类型—保护柱、分离柱、卡套柱等。
保护柱—加在分离柱前、与分离柱类型相同。
卡套柱—MERCK出的一种柱子，成本比较低。

- 3 规格大小—LC-MS柱、常规分析柱、制备柱等
LC-MS柱—细口径(2.1、3.2mm)、填料颗粒细(3.5um或更细)、长度短(5-10cm)、流量小(0.1-0.5ml/min)
常规分析柱—口径在3.9-7.8mm(3.9、4.0、4.6、5、7.8等)、填料颗粒在5-15um、长度10-30cm、流量在1.0-5.0ml/min，使用最普遍。
制备柱—孔径大10mm到几百厘米，填料颗粒在5-50um或更粗，长度几十厘米到几米或更高、流量从十几ml/min到几百升/min甚至更高。

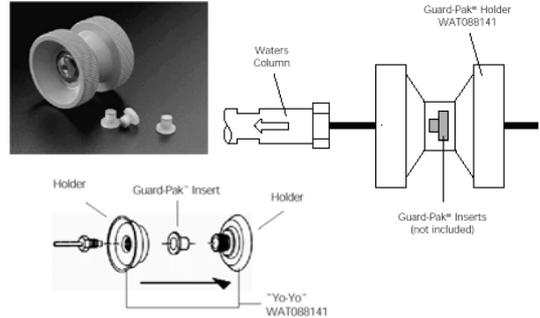
- 4 填料—金属氧化物(Al_2O_3 等)、硅胶(SiO_2)、聚合物(聚合的苯乙烯乙烯苯等)、杂交柱(Xetra)、整体化柱(chromolith)。
- 5 分离类型—正相、反相、离子交换、离子排斥、亲和、排阻等。

色谱柱的保护

保护柱防止流动相及样品中杂质对色谱柱的损害。



可换芯式保护柱



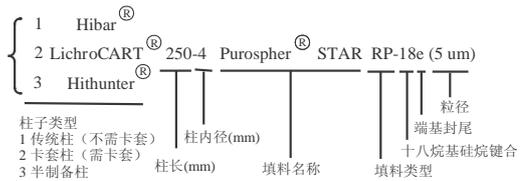
色谱柱的保护

ODS柱的使用注意点:

- 1) 柱压低于150kgf/cm²
- 2) 柱温在40℃左右, 最高使用温度为50℃
- 3) 缓冲液PH使用范围为2~7

- *硅胶在PH为3~4时稳定性最好
- *碱浓度越低, 流动相含水量越低, 硅胶越稳定。

色谱柱标签的识别



- 其Hibar®、LichroCART®、Hithunter®表示柱子的类型, 但大多数色谱柱厂家一般没有单独这样标识, 用其它表示来代替。
- 250-4表示柱子的长度为250mm、内径为4mm, 是色谱柱的主要参数, 每根色谱柱上都有。
- Purospher®STAR表示填料的品种, 一般专业色谱柱厂家有很多不同名称的品种。
- RP-18e表示填料的类型为反相的C18, 末端封尾, 不同类型的填料有不同的表示方法, 是色谱柱的重要参数; 有的厂家为区别封尾和不封尾的柱子加上e或其它标识来区别, 但新型的色谱柱多为封尾, 不加其它标识。

- (5 μm)表示填料颗粒的大小, 填料还有一个重要参数是孔径, 分析柱在60-120Å之间, 而蛋白质分析的硅胶柱多为300Å。在一些色谱柱的标识中, 这二个参数常常与柱子填料的类型混在一起表示, 如5C18表示颗粒为5 μm的C18柱。Si60表示孔径为60Å的硅胶柱。
- 有些色谱柱上还有一些数字, 如批号、货号、柱子编号等可以查询到色谱柱的出厂日期等, 但用处并不是很大。在色谱柱上有时还有厂家地址, 名称等。
- 每根色谱柱都有流动相流向的标志, 如果没有明显的方向标志, 则流动相的流向从左向右, 沿着文字的阅读方向。
- 色谱柱上最主要几个标识是填料名称、填料类型、柱子规格。

常见色谱柱的类型

- 专业的液相色谱仪厂家都有色谱柱生产，除此外还有很多专业的色谱柱厂家。
- C18—又称ODS柱，使用最普遍、规格多，适合大多数化合物的分析，市场上品种繁多，值得注意的是同样的C18柱，得到的结果可能非常不一致，尤其是极性或离子化合物。流动相为甲醇（乙腈）水系统。
- C8—类同于C18柱，保留能力比C18差。
- C4, C2, C1—反相，用于一些特定的化合物分析，寿命较短。
- NH₂—既能用于反相又可用于正相，常用于小分子的糖分析。

- C₆H₅—苯基柱，适合芳香族化合物的分离。
- CN—既能用于反相又可用于正相，用于某些杂环化合物的分离。
- OH—二醇基柱，一般用于正相分离，保留能力比Si强。
- Si—硅胶柱，典型的正相柱，适合非极性化合物的分离，流动相多为非极性的溶剂。
- SAX—强碱性阴离子交换柱，硅胶基质，pH在3-7.5，用于阴离子化合物的分离，如苯(萘)磺酸类、羧酸类。
- SCX—强酸性阴离子交换柱，硅胶基质，用于阳离子化合物的分离，如嘌呤、嘧啶类。
- WAX—弱碱性阴离子交换柱，硅胶基质，用于特定的化合物或生化分析。
- WCX—强酸性阴离子交换柱，硅胶基质，用于特定的化合物或生化分析。

- 氨基酸柱—专门用于氨基酸分析的C18柱。
- 其它特定的反相柱如C16、紫杉醇柱等。
- 离子交换柱—聚合物基质，一般为苯乙烯二乙烯苯聚合的柱子，pH范围在0-14，适合在强酸强碱条件下分析，但柱效低于C18柱。而且价格高。
离子色谱柱大多数为离子交换柱；聚合物柱子对蛋白不易变性，常用于生化分析蛋白质等。
- 离子排斥柱—聚合物基质，一般为苯乙烯二乙烯苯聚合的柱子，pH范围在0-14，如有机酸柱。
- 手性柱—用于特定的手性化合物的分类，多为正相，适用范围窄，专一性强。
- Hilic柱—反反相色谱柱
- 大多数反相的色谱柱填料在60-120 Å，分析的分子量小于2000，300 Å以上分析蛋白等大分子。

常见的色谱柱品牌

- 目前国内用的较多品牌的有
- Zorbax、Symmetry、LiChrosorb、μBondpak、Nova-Pak、Partisil、Ultrasphere、Resolve、Xetra、kromasil、Diamonsil、Lichrospher、shim-pack、chromotith、luna、Purspher®STAR、cosmosil

2.4 控温系统

- 控温系统大多数并不是HPLC的必备条件，凝胶系统一般是要求控温的，采用示差检测最好配置控温箱，离子色谱也同样。
- 有些仪器除了加热的控温系统外，还自带低温冰箱。
- 液相色谱常规分析的柱温在20-60度。
- 不同温度对样品的保留时间有很大的影响。

柱温箱：

柱温控制的优点：

- 分析结果重现性好
- 提高柱效
- 降低柱压
- 保证检测稳定性

2.5 检测系统

- 检测器类型多，有很多分类方法：
- 通用型检测器
- 示差折光型检测器，电容检测器，蒸发光检测器等
- 选择型检测器
- 紫外-可见波长检测器，荧光检测器，电化学检测器等

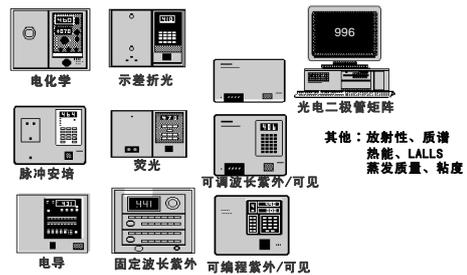
HPLC检测器基本要求和特点

- 灵敏度高 ($10^{-6}g$)、线性范围宽、通用
- 响应快、响应值不受温度及流动相影响
- 噪音低、漂移小
- 死体积小，以保持高的分离效能
- 对样品无破坏性
- 定性定量信息
- 稳定、可靠、重现性好
- 方便，便宜
- 目前没有一种检测器能满足上述要求

检测器评价的几个参数

- 1 噪声—没有溶质通过检测器时，检测器输出的信号变化，分为短噪声和长噪声。
- 2 漂移—基线随时间的增加朝单一方向的偏离。
- 3 灵敏度—一定量的物质通过检测器时所给的信号大小。
- 4 检测限—响应值为2(3)倍噪音时所需的样品量-信噪比。
- 5 线形范围—检测信号与被测物质量呈线形的范围。
- 6 最小检测量和最低检测浓度—产生的信号等于2(3)倍噪音时的进样量。

检测器的种类

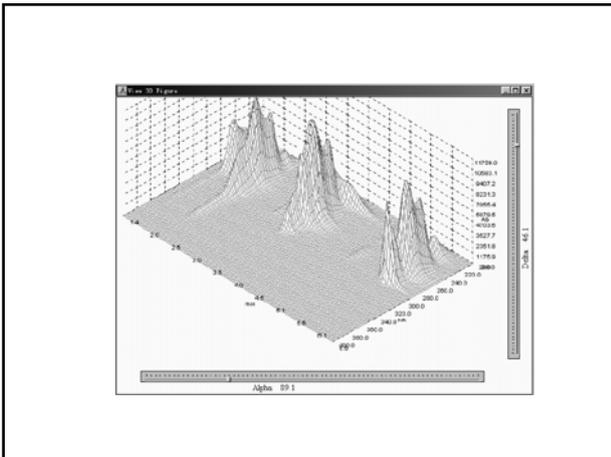


1 紫外可见检测器 (UV-VIS)

- 紫外检测器有很多类型，早期的单紫外 (254nm)，以及插片式的固定多波长。
- 目前一般大多采用多波长的紫外可见检测器，检测波长在190nm—900nm。紫外区采用氘灯、可见区采用钨灯。
- 目前最多见到可以同时设定4个波长检测，并有停泵扫描功能。

2 光电二极管阵列检测器

- 1975年首次报道了光电二极管阵列检测器。
- 1982年，HP公司推出了第一个SH商品化的HP1040A。
- 简称PDA、PDAD、DAD等
- 可同时得到多个波长的色谱图
- 可计算得到最大吸收波长
- 可以得到时间-波长-吸收值为坐标的三维图形
- 可以对峰进行纯度检验和紫外定性。



3 荧光检测器

- 灵敏度极高
- 选择性好
- 线性范围宽
- 外界条件及流动相影响小
- 应用范围窄
- 背景荧光和淬灭荧光等干扰
- 激发波长 发射波长

4 示差检测器

- 目前最常用的通用型检测器。
- 总体性能检测器
- 浓度敏感性检测器
- 中等灵敏度
- 对压力和温度的变化很敏感
- 流动相流速影响检测信号（流通池的几何形状、大小及材料、检测器的光路系统）

5 电化学检测器

- 测量溶液整体性质（通用性强）
- 电导检测器和电容检测器
- 测量溶质组分性质（灵敏度和选择性好）
- 安培、极谱、库仑、电位检测器

5.1 安培检测器

- 优点
- 灵敏度高、选择性好、线性范围宽
- 结构简单、检测池体积小
- 局限性
- 流动相必须有导电性
- 信号随流动相流速、温度、pH值等变化敏感
- 流动相中氧干扰
- 电极寿命
 - 可分为直流安培、脉冲安培、积分安培

5.2 电导检测器

- 离子色谱法最主要检测器
- 测定多种阴阳离子的灵敏检测器
- 检测信号是离子电导与流动相电导之差、负值。
- 抑制柱降低本底电导。
- 温度对信号的影响比较大
- 可分为抑制电导和非抑制电导二种类型

- 5.3 库仑检测器
 库仑阵列检测器
- 5.4 电势检测器
- 5.5 极谱检测器
- 5.6 介电常数检测器

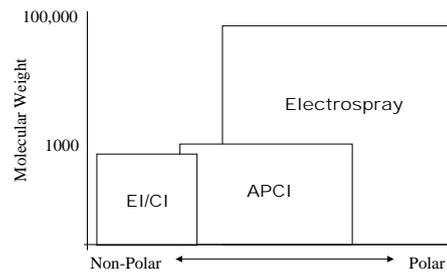
6 蒸发光散射检测器

- 是90年代开始在全国普及，作为新一代通用检测器的逐步替代示差检测器。
- 优点：
 - 通用型质量检测器
 - 灵敏度高于RI
 - 可以进行梯度洗脱
 - 可作为SEC和SFC色谱/细内径LC检测器
 - 可测定磷脂、皂甙、糖类、聚合物、树脂
- 限制：
 - 受样品组分和流动相的挥发性的影响，不能完全替代示差检测器

7 质谱检测器

- 70年代末出现最早的质谱检测器，80年代后期电喷雾技术的发展LC-MS技术开始成熟。
- 1992年，ESI（大气压电喷雾）
- 1993年，APCI技术的出现（大气压化学电离）为小及中等分子量有机物，药物及代谢物分析提供了帮助。
- 目前质谱检测器应用越来越多。
- LC-MS：结合HPLC对复杂基体化合物的高分离能力与MS的独特选择性、灵敏度、分子量及结构信息与一体
- 困难在于LC-MS压力匹配问题、流量匹配问题、难挥发溶剂的排除问题

离子化的模式?



LC-MS能够提供的质谱信息

- 化合物分子量（误差0.001%）
- 未知化合物碎片结构
- 信息可用于无共价键、无官能团化合物的检测
- 完整谱图和多重扫描方式分析谱图：
- 色谱图、总离子流色谱图、质谱图、质量碎片图谱、质量色谱图

2.6 样品收集系统

- 作为分析型的HPLC一般没有制备系统，如果制备MG级的样品还是可以的。
- 但如果制备几十MG，一般分析柱是难以承受了，必须要大口径的色谱柱，大的进样体积及大的流量。
- 制备克级的样品需用专门的制备色谱仪。专门的样品自动收集系统以及溶剂回收系统。

不同制备规模的色谱柱

少量制备，
色谱柱直径10-40mm



中试规模制备
色谱柱直径50-150mm

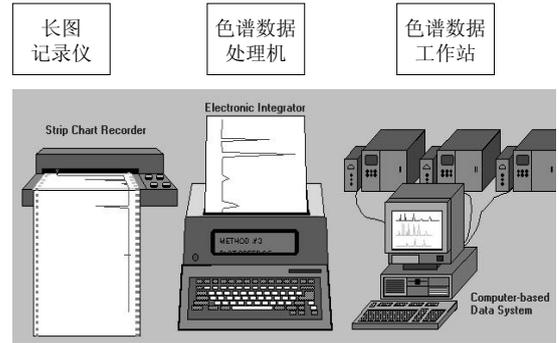


生产规模制备
色谱柱直径100-800mm

2.7 数据处理系统

- 早期采用记录仪，面积采用重量法来测定，准确度差，结果不能长期保存。
- 数据处理机将数据处理功能固化到硬件上，准确度大大提高，但修改参数麻烦，不能长时间保存图谱。
- 早期的计算机采用各自的专用操作系统和软件，系统价格贵、不通用。
- 近十年来，随着计算机运行速度的大大提高以及PC的大量应用，目前数据采集和处理完全可用普通微机代替，无需早期的专用计算机。

- 不同色谱仪的数据结果也有行业标准，如AIA、CSV等格式或采用TXT格式对二维数据处理。
- 有的色谱工作站可以兼容其它公司的仪器，并进行控制。
- 目前也有通用的色谱工作站，采用标准的接口方式，（带TTL等）。

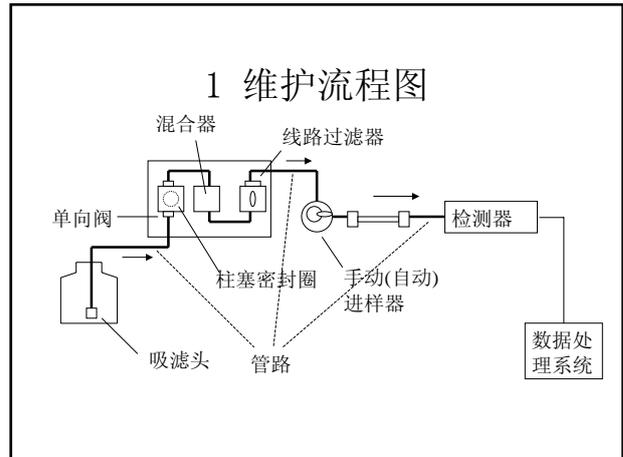


五 液相色谱仪的 日常维护及保养

仪器保养的目的及基本要素

- 1 保持色谱仪运行正常,时常注意仪器运行状态,有状况及时排除。
- 2 及时详细记录各种现象, 有案可查。
- 3 避免带病运行, 以防缩短仪器寿命。
- 4 主要是泵、色谱柱、管路等的维护。
- 5 定期有计划地进行仪器保养维护、以延长消耗品的寿命。

- HPLC的日常操作条件:
- 温度: 10 ~ 30℃;
- 相对湿度<80%; 最好是恒温、恒湿,
- 远离高电磁干扰、高振动设备,有良好的通风设施。

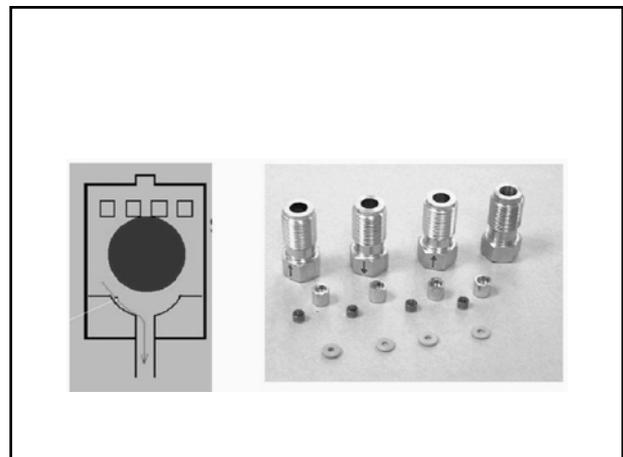
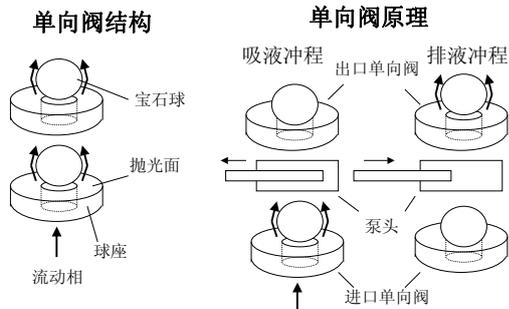


2 输液系统的维护

- (1) 吸滤头
- 材料: 不锈钢烧结, 陶瓷等, 孔径10um
- 故障: 堵塞, 流路不畅, 水相滤头容易产生
- 表现: 管路中不断有气泡生成, 而且容易造成流量不准, 严重的话压力波动。
- 原因: 水中细菌、流动相中颗粒、空气中灰尘等。

措施: 用5%稀硝酸, 超声波清洗,
再用蒸馏水清洗, 最好一个月洗一次。
平时可以时常用水超声, 流动相最好过滤。
水最好用纯度高的, 而且不能长时间使用, 尤其天气温度高时, 水中非常容易长霉。

(2) 泵



2.1 单向阀

故障：宝石球或塑料垫片受污受损，有杂物，导致密封性不好，或宝石球被卡在球座上。

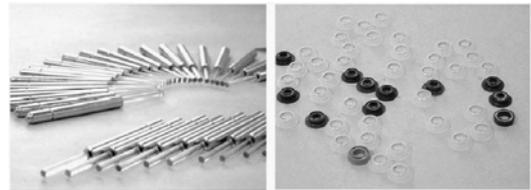
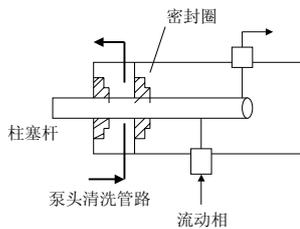
表现：系统压力波动大，流量不稳，基线波动，或产生大量气泡。

原因：长时间使用磨损，未及时维护更换。

措施：

- 打开排液阀，以异丙醇为流动相输液
- 拆下单向阀，放入异丙醇中，超声波清洗
- 如果宝石球磨损，更换
- 拆开清洗时，注意方向和位置
- 如果卡住，摇晃无声音，敲击桌面，再听，有声音即可，一般无须拆开。

2.2 柱塞杆及柱塞杆密封圈



故障：密封圈磨损导致密封不良

现象：系统压力波动大或漏液

措施：更换密封圈，清洗柱塞杆

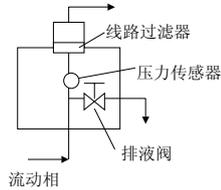
原因：流动相中颗粒、尤其是长时间用盐溶液

注意点：

- 1) 流动相输送量达120L时，应更换密封圈
- 2) 正常使用情况下，一年须更换一次
- 3) 更换前，新密封圈用异丙醇 浸泡15 min
- 3) 拆卸泵头前，柱塞杆复位（P-SET），
- 4) 柱塞杆一般使用寿命较长，可连续使用5年以上，而密封圈较短，装上后不能拆下来，容易变形。

2.3 线路过滤器

- 整个流路有多个，不同仪器结构和数量不同。



故障：堵塞

现象：系统压力波动大或压力偏高，拆开后有黑色污染物

措施：5%稀硝酸，超声波清洗，一般半年清洗一次。

判断依据：关闭排液阀，断开出口管路，设定流速1mL/min，如压力>3kgf/cm²，则堵塞。

2.4 混合器

不同仪器混合器的位置和结构都不一样

故障：堵塞

现象：系统压力波动大或压力偏高，基线不稳，拆开接头处有白色颗粒或有黑色污染物。

措施：5%稀硝酸，超声波清洗。

判断依据：关闭排液阀，断开出口管路，设定流速1mL/min，如压力>3kgf/cm²，则堵塞，判断基本同流路过滤器。

2.5 管路

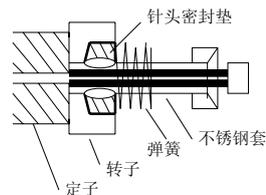
- 现象：管路堵塞比较容易发现，造成系统压力不稳，尤其含盐流动相切换时，速度过快将造成盐析出，堵在管路的接头处。其次是含颗粒样品进样后造成管路堵塞。
- 措施：断开连接管路，确定堵塞位置，拆下管路，加稀酸，超声波清洗。或者反接管路冲洗
- 如果堵在管路中间，则可能报废。

HPLC常用连接管

- 1/16"O.D. X 0.04" I.D.
- 1/16"O.D. X 0.03" I.D.
- 1/16"O.D. X 0.02" I.D.
- 1/16"O.D. X 0.01" I.D.

3 进样系统的维护

手动进样器



操作注意点:

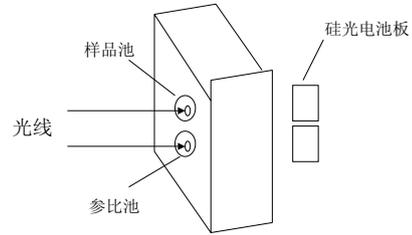
- 1) 插针应插到底
- 2) 不使用时将针头留在进样器内
- 3) 进样应使用液相色谱专用平头进样针，有些国产进样针针头较细，易引起残留。

清洗:

- 4) 样品分析后应及时清洗，防止样品对下次分析的残留，清洗应使用专用针口清洗器。
- 5) 每次分析前应清洗进样针，如有针尾的黑色污垢，可用碱(表面活性剂)清洗，再用水洗。

4 检测系统的维护

紫外检测器



(1) 紫外检测器

故障: 样品池受污

表现: 样品池和参比池能量相差较大，基线不稳

检查方法: 设定250nm波长，通甲醇或水，查看 SMPL EN和 REF EN，如两者相差较大，则样品池受污。(对于岛津仪器)

措施: 用针筒注入异丙醇，清洗样品池；如污染严重，拆开样品池，将透镜等放入异丙醇中超声波清洗。

(2) 氙灯

更换氙灯 (紫外检测器)

• 判断氙灯能量:

设定220nm波长，检查参比池能量，如能量

低于800，需更换氙灯。(岛津仪器)

一般仪器上有灯使用的时间，可以参考。

5 数据处理系统

- 目前由于计算机发展快，基本上使用色谱工作站，但有少数的数据处理机。
- 仪器的计算机最好专用，加装防毒系统，并及时升级。

六 高效液相色谱仪器故障的诊断与维修

引自《色谱通讯》2005色谱年会特刊

压力篇

| | 现象 | 判断 | 故障排除 |
|---------|------------|--------------|-----------|
| 压力无 | 面版灯不亮 | 电源不通 | 检查电源 |
| | | 电源接头松脱 | 插紧电源接头 |
| | 泵头漏液 | 接口太松 | 拧紧泵头螺丝 |
| | 无液体流出 | 泵清洗管路没关 | 拧紧泵清洗管路 |
| | | 空气进入泵头 | 排气 |
| | | 吸滤头严重堵塞, 抽不动 | 更换或清洗吸滤头 |
| | 色谱柱接口漏液 | 没接好色谱柱或保护柱 | 拧紧色谱柱或保护柱 |
| 压力表没有反应 | 压力传感器失灵或表坏 | 更换或维修 | |

| | | | |
|---------|---------|----------------|--------------|
| 压力高 | 接柱子压力高 | 泵流速设定不准, 偏高 | 校正后并维修 |
| | | 流动相不互溶 | 使用恰当流动相 |
| | | 样品与流动相不互溶 | 稀释或改变流动相 |
| | | 柱温太低 | 升高温度 |
| | 流动相有沉淀 | 色谱柱或保护柱柱压太高 | 换柱 |
| | | 缓冲结晶盐沉淀 | 冲洗, 更换流动相 |
| | 不接柱子压力高 | 流路过滤系统阻塞 | 清洗或更换 |
| | | 连接管路阻塞 | 冲洗, 必要时更换 |
| | | 进样阀系统阻塞 | 冲洗进样器, 必要时拆洗 |
| | | 进样阀旋转不到位 | 正确旋转 |
| 检测器池子阻塞 | | 清洗检测池 | |
| 其它 | | 压力传感器失灵或指针没有调零 | 更换或维修 |

| | | | |
|-----|--------|------------|-----------|
| 压力低 | 接柱子压力低 | 泵流量不准, 偏低 | 校正后维修 |
| | | 色谱柱漏穿失效 | 更换恰当的色谱柱 |
| | | 柱温过高 | 降低柱温 |
| | | 泵系统漏液 | 检查漏液位置并维修 |
| | | 管路接头与柱没有拧紧 | 拧紧接头 |
| | 其它 | 进样阀密封垫磨损漏液 | 更换垫片 |

| | | | |
|--------------|----------------|-----------------|--------------|
| 压力不稳 | 压力变化重现 | 采用梯度 | 所引起的压力是正常 |
| | 泵或系统内有气泡 | 溶剂脱气不适当, 或流动相走空 | 排气泡, 溶剂需脱气 |
| | 压力波动 | 溶剂混合器故障 | 清洗或更换混合器 |
| | 漏液 | 连接口太松 | 拧紧接口 |
| | 泵内有声音 | 泵单向阀宝石球卡壳 | 重新安装或换单向阀 |
| | | 泵单向阀密封不严 | 修理或更换单向阀 |
| | 压力变化无规律 | 色谱柱(保护柱)进口有异物 | 反冲或拆开色谱柱清洗筛板 |
| | | 进样阀内有异物 | 反冲或拆开清洗 |
| | | 检测器池子不畅, 有颗粒 | 清洗检测池 |
| 管路流动不畅, 有盐析出 | | 超声清洗或更换 | |
| | 压力传感器不稳定或指针有问题 | | 更换或维修 |

色谱峰篇

| 现象 | 判断 | 故障排除 |
|-----|------------------------------------|---------------|
| 前沿峰 | 柱头出现空洞 | 更换色谱柱 |
| | 保护柱失效 | 换柱芯 |
| | 进样体积太大或样品浓度太高, 在反相中, 样品溶剂极性大大超过流动相 | 降低进样体积或降低样品浓度 |

| | | |
|---------|------------|----------------|
| 拖尾峰 | 柱性能下降 | 更换色谱柱 |
| | 保护柱失效 | 换柱芯 |
| | 色谱柱或保护柱被污染 | 清洗柱或保护柱, 必要时更换 |
| | 色谱柱选择不当 | 选择恰当的色谱柱 |
| | 流动相选择不当 | 选择恰当的流动相比例 |
| | 样品过载 | 减少进样浓度或体积 |
| | 流动相没平衡 | 平衡后再进样 |
| | 泵流量不稳定 | 维修或更换 |
| | 进样系统有死角 | 维修或更换 |
| 温度过低或过高 | 控制合适的温度 | |

| | | |
|--------|-------------------|-----------------|
| 宽峰 | 柱性能下降 | 更换色谱柱 |
| | 保护柱失效 | 换柱芯 |
| | 色谱柱或保护柱被污染 | 清洗柱或保护柱，必要时更换 |
| | 色谱柱选择不当 | 选择恰当的色谱柱 |
| | 流动相选择不当（如缓冲液浓度过低） | 选择恰当的流动相 |
| | 流动相流速太低 | 调节流速 |
| | 出现两个或多个未被完全分离的物质峰 | 选择其它色谱条件以改善分离效果 |
| | 样品过量，但响应很低 | 改变检测器参数或更换检测器 |
| | 漏液 | 检查漏液位置并维修 |
| | 检测器时间常数太大 | 使用较小的时间常数 |
| | 进样器问题 | 检查进样器 |
| | 温度过低或过高 | 使用柱温箱，控制合适的温度 |
| | 系统死体积太大（如管路太长等） | 检查系统，更换或缩短管路等 |
| | 连接管路孔径不匹配 | 更换合适的管路 |
| | 流动相没平衡 | 平衡后再进样 |
| 泵流量不稳定 | 维修或更换 | |

| | | |
|----|---------------|----------------|
| 裂峰 | 柱性能下降 | 更换色谱柱 |
| | 保护柱失效 | 换柱芯 |
| | 色谱柱或保护柱被污染 | 清洗柱或保护柱，必要时更换 |
| | 进样体积太大或样品浓度太高 | 降低进样体积或降低样品浓度 |
| | 样品溶剂不溶于流动相 | 改变溶剂或采用流动相溶解样品 |
| | 紫外检测器参比波长设置不对 | 不设置参比波长试试 |
| | 流动相选择不当 | 改变流动相或添加改性剂 |
| | 流动相没平衡 | 平衡后再进样 |
| | 流动相pH选择不当 | 改变pH |
| | 温度过低或过高 | 使用柱温箱，控制合适的温度 |
| | 特殊样品，存在异构互变现象 | 改变分析体系，抑制互变 |
| | 检测器时间常数太小 | 使用较大的时间常数 |

| 现象 | 判断 | 故障排除 |
|----|----------------------|----------------|
| 无峰 | 检测器参数设置错误 | 设置正确的检测器参数 |
| | 检测器类型选择错误 | 选择其它类型检测器 |
| | 检测器与数据处理装置链接故障 | 检查并正确链接 |
| | 自动进样器故障 | 检查进样器 |
| | 无样品 | 加样品 |
| | 样品降解 | 检查样品配制过程，更换样品 |
| | 进样器管路连接错误 | 重新连接 |
| | 手动进样注射位置不对（在inject档） | 转到Load |
| | 流动相比例不对，留在柱子中 | 改变流动相比例和组成或换柱子 |

| | | |
|--------------|-------------------|---------------|
| 负峰（全部） | 连接数据处理系统信号线接反 | 正确连接 |
| | 记录仪或检测器信号极性相反 | 改变极性设置 |
| | 检测器参数设置有问题 | 改变参数 |
| | 流动相本底高 | 检查流动相组成 |
| 负峰（出现一个或几个峰） | 离子对分离体系对峰的影响 | 在流动相中溶解样品 |
| | 样品中存在比流动相背景吸收低的物质 | 改变流动相组成或检测器参数 |
| | 使用的流动相本底吸收高 | 使用流动相稀释样品 |
| | 进样系统峰 | 不影响结果 |

| | | |
|----|-----------------|-----------------------------|
| 鬼峰 | 检测器污染 | 清洗检测器 |
| | 管路污染 | 冲洗 |
| | 流动相中含有稳定剂或稳定剂变化 | 使用无防腐溶剂 |
| | 流动相被污染 | 清洗溶剂贮液瓶，清洗容器入口过滤器，使用HPLC级试剂 |
| | 柱被污染 | 清洗柱或更换柱 |
| | 六通阀污染 | 清洗检测器 |
| | 管路存在气泡 | 流动相脱气 |
| | 流动相中含有稳定剂或稳定剂变化 | 使用无防腐溶剂 |
| | 注射器脏（上次分析样品残留） | 清洗注射器 |
| | 紫外（荧光）检测器灯能量不够 | 换灯 |
| | 梯度分析中出现的鬼峰 | 换纯度更高的流动相试剂和超纯水 |
| | 流动相变换 | 稳定后进样 |

| | | |
|----|----------------|---------------|
| 肩峰 | 色谱柱或保护柱柱头受损或阻塞 | 反相清洗或换柱 |
| | 样品溶剂极性太大 | 减少进样量或降低极性 |
| | 进样量过多 | 减少进样量 |
| | 出现未被完全分离的物质峰 | 改变分离条件或换柱使之分离 |
| | 样品溶剂与流动相不互溶 | 改变溶剂或流动相 |
| | 系统流动相没有平衡 | 平衡后进样 |

| | | |
|-----------|----------------|--------------------------|
| 保留时间变化不重复 | 系统不稳或未达到平衡 | 分析之前应有足够的时间使系统平衡 |
| | 温度波动大 | 使用柱温箱, 将系统置于恒温, 空气对流小的环境 |
| | 柱被污染 | 冲洗柱或更换柱 |
| | 进样体积太大或样品浓度太高 | 减小进样体积 |
| | 样品溶液pH与流动相差太大 | 用合适的pH溶液溶解样品 |
| | 样品溶液极性太大 | 用流动相溶解或减少进样量 |
| | 流动相pH不合适 | 改变pH 1-2个单位 |
| | 梯度混合器有故障 | 维修或更换 |
| | 流动相中有气泡 | 排气 |
| | 系统压力不稳 | 检查单向阀密封性或是否有气泡或其它 |
| | 溶剂吸滤头阻塞, 溶剂抽不动 | 超声清洗或更换 |

| | | |
|----------|-----------------------|--|
| 保留时间不断变化 | 柱被污染 | 冲洗柱或更换柱 |
| | 流动相被污染 | 清洗溶剂贮液瓶、清洗溶剂吸滤头、使用HPLC级试剂 |
| | 系统泄露 | 检查并进行维修 |
| | 流速变化 | 重新设定或更换柱 |
| | 系统没达到平衡 | 分析之前应有足够的时间使系统平衡 |
| | 流动相脱气不够充分 | 清洗溶剂贮液瓶、清洗溶剂吸滤头 |
| | 室温变化 | 使用柱温箱、将系统置于恒温、空气对流小的环境 |
| | 梯度混合器有故障 | 维修或更换 |
| | 使用离子对试剂 | 平衡时间延长1-2倍 |
| | 缓冲液浓度太低, 水相比例低, pH不合适 | 提高缓冲液浓度, 或先用高比例缓冲液平衡, 再回到设定比例; 改变缓冲液pH |
| | 系统压力不稳 | 检查单向阀密封性或是否有气泡或其它 |

| | | |
|------|--------------|---|
| 基线漂移 | 室温不稳 | 使用柱温箱、将系统置于恒温、空气对流小的环境 |
| | 流动相污染或分解 | 清洗溶剂贮液瓶、清洗容器入口过滤器、使用HPLC级试剂 |
| | 流动相脱气不充分 | 脱气重新平衡系统 |
| | 系统不稳或没有达到平衡 | 分析之前应有足够的时间使系统平衡 |
| | 流动相比不当或流速不合适 | 更改配比或流速 |
| | 柱被污染 | 冲洗柱或更换柱 |
| | 固定相流失 | 为说明问题存在, 用一段连接管路代替色谱柱, 通流动相检测基线 |
| | 检测池被污染或有气体 | 用甲醇或其他强极性的溶剂冲洗流通池 |
| | 测定波长选择有误 | 使用分光光度计说明背景吸收, 如背景值高, 说明流动相含紫外吸收化合物导致基线漂移。使用的流动相应选择在紫外截止波长以外, 或更换溶剂 |
| | 系统泄露 | 检查并进行维修 |
| | 样品中有强保留的物质 | 用强度适合的溶剂清洗色谱柱 |
| | 仪器氙灯平衡时间不够 | 平衡时间延长 |

| | | |
|-------|-------------|-----------------------------|
| 无规则噪音 | 系统不稳或没有达到平衡 | 分析之前应有足够的时间使系统平衡 |
| | 系统泄露 | 检查并进行维修 |
| | 流动相污染或分解 | 清洗溶剂贮液瓶、清洗溶剂入口过滤器、使用HPLC级试剂 |
| | 柱被污染 | 冲洗柱或更换柱 |
| | 色谱柱填料流失或阻塞 | 更换色谱柱 |
| | 系统内有气泡 | 用强极性的溶剂清洗系统 |
| | 检测器内有气泡 | 清洗检测器, 在检测器后面安装背景压力调节器 |
| | 检测器灯能量不足 | 更换灯 |

| | | |
|-------|---------------|--------------------------------|
| 有规则噪音 | 流动相、检测器或泵内有气泡 | 流动相脱气, 冲洗系统除去检测器或泵内的空气 |
| | 室温不稳 | 稳定环境温度, 使用柱温箱、将系统置于恒温、空气对流小的环境 |
| | 流动相回收使用 | 除非特殊需要不使用回收溶剂 |
| | 泵混合器混合不均匀 | 维修或更换 |
| | 泵振动 | 在系统中假如脉冲阻尼器 |
| | 在同一水平上有其他设备 | 关掉仪器, 检查干扰是否来自于外部 |
| | 泵入口管路松或阻塞 | 检查泵入口管 |
| | 泵压力有周期波动 | 检查泵各部位 |

| 数据篇 | | | |
|-------|-----------------|--|-----------------------|
| 定量结果 | 现象 | 判断 | 故障排除 |
| 精密程度低 | 样品预处理时样品降解或混入杂质 | | 用标准品对照、检查样品处理过程, 换新样品 |
| | 保留时间改变, 峰形不正常 | | 见“峰形不正常的故障排除方法” |
| | 检测器响应故障 | | 检查检测器 |
| | 峰积分不正确 | | 重新设置参数 |
| | 进样问题 (对外标法) | (1) 满刻度进样体积至少是定量管体积的三倍以上, 注意气泡; (2) 部分定量管进样, 进样量需少于定量管体积的50%; (3) 手动进样确保进样操作重复性, 不建议多人操作; (4) 如使用自动进样要确保正确的进样体积, 进样量不能过少, 样品瓶有足够的样品, 系统不泄露; | |

| | | |
|------|-----------------|-----------------------|
| 定量结果 | 峰积分不正确 | 见“精密度降低”的故障排除方法 |
| | 进样问题 | 见“精密度降低”的故障排除方法 |
| | 样品预处理时样品降解或混入杂质 | 用标准品对照、检查样品处理过程, 换新样品 |
| | 样品蒸发或溶剂挥发 | 样品密封保存在适当的温度下 |
| | 样品前处理不当 | 检查样品的处理过程 |
| | 内标物配置不当 | 配置新的内标物 |

| | | |
|-------|------------------|-----------------------|
| 峰不能辨别 | 保留时间改变 | 见“保留时间变化”的故障排除 |
| | 数据处理装置的参数不正确 | 适当输入参数, 进标准样, 提高精密度 |
| 定性结果 | 峰形变宽, 拖尾, 出现裂峰等 | 见色谱峰相关故障排除 |
| | 保留时间漂移 | 见“保留时间变化”的故障排除 |
| | 流动相比比例不对或色谱柱选择不当 | 更改流动相比比例或色谱柱 |
| | 紫外波长选择错误或样品无响应 | 更换波长或检测器 |
| 无峰鬼峰 | 数据处理装置的参数不正确 | 重新适当输入参数, 进标准样, 提高准确度 |
| | 见“鬼峰”可能的原因 | 见“鬼峰”的故障排除方法 |

七 实用HPLC方法的建立

- 1 前言
- 2 HPLC方法建立的步骤
 - 2.1 了解样品的有关情况
 - 2.2 明确分析目的
 - 2.3 样品的预处理与检测
 - 2.4 HPLC分析模式的选择
- 2.5 色谱条件
- 2.6 方法的优化, 及色谱现象的解析和处理
- 2.7 定性和定量方法的建立及论证

- 3 色谱条件的选择
 - 3.1 流动相的选择
 - 3.2 检测器的选择
 - 3.3 样品的溶解及预处理
 - 3.4 样品的进样量
 - 3.5 色谱柱的选择及保护与再生
 - 3.6 泵的选择
 - 3.7 色谱工作站
- 4 分析方法建立的实例
 - 4.1 等度分析
 - 4.2 梯度方法的建立
 - 4.3 色谱柱及pH的影响

5 色谱分析中各种图谱现象的判断

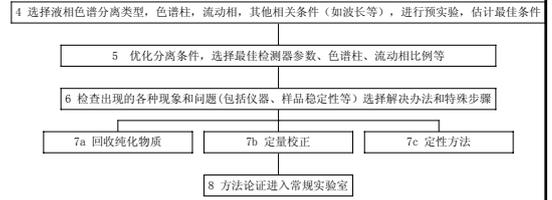
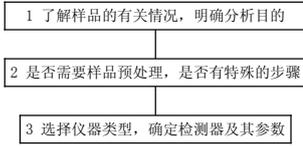
- 5.1 基线噪音的产生和处理
- 5.2 基线漂移(上漂和下漂)
- 5.3 倒峰的产生和消除
- 5.4 鬼峰的产生和消除
- 5.5 峰前移和退后的判断
- 5.6 前沿峰和拖尾峰的判断
- 5.7 色谱双峰的判断
- 5.8 色谱峰变胖的判断和处理

1 前言

- HPLC作为色谱的一个重要分支, 在色谱分析中占有重要的地位, 将逐步取代气相色谱成为最重要的色谱分析手段。
- HPLC技术的发展和科技的进步, 使得HPLC广泛应用到各个领域。
- HPLC实验技术是一个实验性很强的操作技能, 现行的各类书籍并不能包罗一切知识, 实践经验非常重要。
- HPLC技能是一个综合性的技能, 需日积月累, 厚积薄发, 非一日之功。

出的来, 跑的快, 分的开

2 HPLC方法建立的步骤



2.1 了解样品的有关情况

- 首先应对样品有足够的了解，并明确分析目的（同一样品，不同的测试要求，其方法也可能不一致）。
- 样品的重要性质包括：
 - 所含化合物的数目；
 - 化学结构（官能团）；
 - 分子量；
 - pKa值；
 - UV光谱图；
 - 被测组分在样品中的浓度范围；
 - 样品的溶解度、沸点及其稳定性；
 - 可能存在的干扰物质及样品的复杂程度等。

- 1 分析大分子、小分子还是生物分子
- 一般常规的HPLC分析分子量2000以下，大分子一般采用凝胶色谱、生物大分子采用不能变性的色谱体系。
- 2 样品是混合物、天然物质还是基本是单一物质。
- 如果是天然物质，一般分离完全采用梯度体系。混合物中是否有结构类似的异构体，组分复杂的还是采用梯度，是否是系列反应的产物。
- 3 测定是主成分、还是少量成分或痕量成分。
- 主含量的测定一般比较容易；但少量要考虑分离完全的问题；痕量成分则要考虑检测器的类型，采用何种提取方法和检测的灵敏度等。

- 4 分离化合物是极性、弱极性、非极性还是离子化合物、两性化合物。
- 非极性化合物以正相体系较多，如果溶于反相体系的溶剂，可采用反相体系。
- 弱极性、极性化合物采用反相较为方便，可在流动相中添加改性剂，调节合适的pH。
- 离子化合物可以采用反相，调节pH；或者添加离子对试剂；也可采用离子交换。
- 两性化合物中水溶性差的可采用反相；但在反相出峰快的则考虑离子交换；也可考虑衍生后测定。
- 对于极性的糖类物质，可用NH₂柱，有条件的用聚合物的糖柱。多糖类的则采用凝胶系统。
- 大分子的极性化合物、离子化合物，往往采用特定的色谱柱，多为聚合物柱子。
- 手性化合物，则用手性流动性或者采用手性柱。

- 5 样品的溶解度、沸点
- 样品在不同溶剂中的溶解度，对色谱条件的选择非常重要，测定其溶解的性能，则可以判断其化合物可能的类型。
- 非极性样品不溶于水，但溶于有机溶剂。如果只能溶于非极性溶剂，一般建议做正相。溶于极性溶剂，以反相为上策。
- 极性和离子化合物一般都溶于水，但在不同pH下区别可能很大。
- 极性化合物在水和极性溶剂中都有一定的溶解度。
- 从溶解度可以判断出采用何种体系为佳。
- 易挥发性的低沸点的物质在ELSD中难以检测。
- 有存在特例。

- 6 样品的稳定性
- 如果样品存在水解、光解、醇解、氧化、分解则测定时需注意。
- 对光敏感物质，用棕色瓶，避光保存，不宜存放，随配随做。
- 易水解的物质、要选择合适的溶解溶剂。
- 有些样品可能存在醇解，流动相不能用甲醇，而要用乙腈。
- 易氧化的物质，溶解时可考虑加抗氧化剂，调节pH，如PAP的测定。胺类化合物。
- 产品不稳定的化合物，分析越快越好。

- 7 化合物的化学结构（官能团）
- 常见的基本结构是苯环、杂环、多环芳烃。基团有COOH、OH、NH₂、SO₃H、Cl (Br)、CHO、CO、CH₃、C₂H₅、N=NH、SO、SO₂、-O-等。
- 亲水性的基团在反相中出峰时间前移，疏水性的基团出峰后移。
- 从存在的结构可以判断出其在溶剂中的溶解度。
- 8 化合物的pK 值
- 知道pK值，有助于方法的建立，尤其流动相pH的选择。
- pK的差异是官能团造成的。

- 9 UV光谱图
- 知道其吸收波长的曲线有助于检测，如果有DAD则关系不大。多组分的样品，宜多选几个波长。
- 同一样品在不同的流动相及pH最大波长可能不一致。
- 有双键共轭的结构紫外吸收较大，单键的则在低紫外区有一定的吸收
- 10 样品的复杂层度
- 梯度方法分析
- 预处理,分成几个部分分析
- 痕量物质的富集
- 总之，充分了解了被分离样品的性质，将可能提供一个参考的分析条件，缩短分析时间和分析难度。

2.2 明确分析目的

- 1 定量分析？检出某种物质？未知物的确定？纯化制备？光谱鉴定？
- 2 是否将所有组分分开，定性？一种条件有困难？分组分析？
- 3 定量分析的准确度和精密度？（主成分在1~2%）
- 4 不同样品基质对分离的影响（如原料药、粗品、精品、残留、环境样品等）
- 5 分析的工作量，少数还是大量？时间和效率与分离的选择。
- 6 实验室的条件，如HPLC仪器的配置和档次；色谱柱系统；是否有恒温；是否可以做梯度；分析成本；实验室人员的操作技能；方法的移植等等。

2.3 样品的预处理与检测

- 样品来源的形式
- 1 可直接进样的溶液（注意是否与流动相匹配）
- 2 需稀释、pH缓冲、加内标或其它操作
- 3 固体样品—选择合适的溶剂
- 4 需提取分离的样品
- 5 预处理，除去干扰物尤其对仪器和柱子有损害的物质。
- 总之，将样品溶于合适的溶液；或者用合适的溶液提取出来、或者分离处理对测定有干扰的物质，在处理中应注意被测组分的稳定性和提取率。

2.4 HPLC分析模式

- 按照样品的特性分为以下二类：
- A 一般样品（<2000DW）可采用基本标准的方法。
- （中性的、离子的）一反相、离子对、非水反相、正相、离子交换。
- B 特殊样品
- 无机离子、异构体、对映体、生物样品、肽类、核苷酸、大分子、蛋白质、核酸、糖类，合成聚合物。

2.5 色谱条件

- 色谱条件主要包括以下几个方面：
- 流动相的组成及流速、温度等。
- 色谱柱的类型
- 样品处理方法
- 检测器的确定和参数
- 数据处理
- 方法的稳定性及其它

2.6 方法的优化，及色谱现象的解析和处理

- 优化包括合理缩短分析时间、提高灵敏度、分离度，成本优化，方法的稳定性，
- 对出现的各种色谱现象，包括仪器和样品的稳定性等提出切实可行的办法。
- 建立合理的数据处理方法等。

2.7 定性和定量方法的建立及论证

- 对方法的检测限、灵敏度、定量重复性、偏差、回收率、样品的稳定性、方法的稳定性、线性关系等求证。建立可靠的稳定的分析方法。

3 色谱条件的选择

- 3.1 流动相的选择
- 3.1.1 流动相的试剂类型
- 以常见的HPLC为例，正相、反向、离子对。
- 正相的试剂有正己烷、环己烷、正庚烷、戊烷、二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、二氧六圆，也可加一些极性试剂如乙酸、乙醇、异丙醇、四氢呋喃等
- 注意：这些有机试剂的纯度非常重要，一是含水的问题，（水的含量将影响保留时间，重复性差）二是其中芳香环杂质对紫外检测的干扰，国产分析纯的试剂一般质量很差，不能直接用于低波长的紫外检测，需重新处理（用硅胶柱过滤其杂质）。最好采用色谱纯的试剂，但成本很高。

- 离子对试剂
- 对强碱性和酸性的离子化合物，除了采用离子交换色谱外，也可在流动相中添加离子对试剂，用C18柱进行分离。
- 离子对试剂可分为两大类酸性和碱性
- 分离多羧基、磺酸基的化合物一般添加长链的胺盐，如四丁基氢氧化胺、四丁基溴化胺、四丁基氯化胺等。
- 还可以添加Na2SO4等无机盐，调节合适的pH。
- 分离碱性的胺类化合物，一般添加八烷基磺酸钠，十二烷基磺酸钠等。

- 反相色谱试剂
- 有机试剂最主要的是甲醇、乙腈、其他的有四氢呋喃、异丙醇，乙醇、二氧六圆很少见到。
- 甲醇优质的分析醇基本可以满足分析，乙腈必须是色谱纯（示差、蒸发光散射？可以用分析纯），四氢呋喃应用新的，建议为色谱纯，也可以自己蒸馏处理。分析纯的THF少量的添加在高波长勉强可以。
- 水理论上要求超纯水，但在实际中，我们认为HPLC—MS（飞行时间质谱）和HPLC—ELSD必须用超纯水。其它的用纯水和蒸馏水及类似水质也可以，用优质的桶装蒸馏水、纯水是能满足分析要求的。去离子水勉强可以，不能在低波长下使用。

- 酸，可添加一定量的无机酸和有机酸。
- 无机酸有H₃PO₄、H₂SO₄、HClO₄，HCl中Cl对不锈钢管路有腐蚀作用，HNO₃有氧化性很少见到。一般浓度在0.1%，pH在2-3之间。
- 有机酸有甲酸、乙酸、三氟醋酸、柠檬酸等。
- 弱酸浓度在0.5-10%。三氟乙酸是强酸用量同无机酸。
- 加酸的作用一是在低pH下，抑制被弱酸性物质的电离；延长保留时间抑制拖尾。二是调节流动相的pH，起到缓冲作用。
- 注意：流动相的pH一般不能低于2，否则将缩短色谱柱的寿命。

- 无机盐和有机盐
- 种类很多，常用的是钾盐和钠盐。磷酸盐、硫酸盐醋酸盐。
- Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂SO₄, NaAC, 柠檬酸钠, EDTA钠。
- 胺类试剂
- 三乙胺、二乙胺、NH₄OH等，
- 类似离子对的作用，在C18中，并能抑制峰的拖尾。其次调节流动相的pH。
- 流动相的选择原则是，非极性的一般有机溶剂和水能解决。极性样品，要添加改性剂，并控制pH值。离子样品，C18柱用离子对试剂，也可控制pH值来处理，或者用离子交换树脂。

- 3.1.2 流动相的平衡
- 甲醇水系统一般比较容易，30分钟内完全可以，短柱时间比较快。
- 如果流动相添加离子对试剂，在实际操作中，建议先用一定比例的水平衡，15分钟以上，再换成加离子对试剂的流动相，开始有机相比例可以低些，初步平衡后，调到合适的浓度。
- 如果加酸，相对平衡时间比较快，直接上一般问题不大。
- 如果是改性剂，pH缓冲液，平衡时间取决于缓冲液的浓度和pH值，先用水平衡一段时间，再换上缓冲液，浓度低的和pH近中性的时间就比较长，浓度大的时间相对短些。盐的浓度一般在0.01-0.05M之间，过高的盐浓度，在有机相高、温度低时易析出，堵塞柱子。
- 分析完后，先用含水流动相洗去无机盐，再用有机溶剂。

3.2 检测器的选择

- 目前HPLC的检测器有UV、DAD、ELSD、RI、FS、PAD、ED、MS (APCI、ESI)。
- 使用最多的是UV，主要因为大部分的物质在紫外可见区200-700，有较强的吸收，一般合成的化合物（含苯环最多）大多数有紫外吸收。
- 紫外检测器有单波长和多波长之分，最低可到190nm，高可达900nm，
- 多波长检测器可同时选定几个波长测定
- 注意不同物质其紫外吸收曲线不一，灵敏度差异极大，同一物质不同的流动相吸收曲线也不一致。

- 紫外检测器是使用最多的一种，关键是波长的选择。其一般的规律如下：
- 如果分子足够大，在紫外区总有一定的吸收。对于小分子，小于2000，从分子结构中可以判断其最大的吸收波长，也可计算得到。
- 典型的含苯结构的化合物在254nm，具有共轭结构。一般有几个环，就有几个吸收峰。如果存在对称结构，最大波长往往在230nm以下。
- 嘧啶环，杂环类似苯环结构。
- 含COOH、C=S、C=C都有红移现象，如果共轭则更明显。一般选择210-230nm。
- 染料其最大波长在可见光区，低紫外吸收反而小，一般从颜色可以判断出。

- DAD—二极管阵列检测器（512，1024）其特点是能进行光谱扫描，能得到三维的色谱图。
- 其作用除了紫外的功能外（灵敏度低于紫外），并能得到分离物质的紫外光谱图，对被分离物质光谱图的比较鉴别峰的纯度，有一定的选择性。
- 其最大的优点是，在分析时，可避免因波长选择的关系，漏掉了一些色谱峰，得到未知物的最大吸收波长。
- 但检测器的价格比UV高。

- 示差检测器
- 质量型检测器，主要用于非紫外吸收的物质的检测，如糖、酯类等。
- 灵敏度比紫外低一个数量级，对所有物质响应。对温度敏感，仪器平衡时间长，不能梯度分析。

- ELSD检测器是90年代后期才普及的一种质量型检测器，主要是替代RI检测器，其优点是对所有不挥发性的物质有相应，同其质量有关，往往呈非线性关系。可进行梯度分析，对不挥发的、紫外吸收很小的物质效果尤其好。
- 但其缺点是，挥发性的物质损失而检测不到、极易氧化的物质变质。流动相要求高，不能含有不挥发的盐类，因此流动相有较大的限制。
- ELSD目前主要有Alltech 2000 (500)，PL1000，DDL31 和SEDEX55，65，75等，有分流和不分流两大类。

- 荧光检测器
- 荧光检测器是一种专属性检测器，有荧光的物质响应，灵敏度度高，一般多用于多环芳烃的分析。其主要参数是激发波长和发射波长，发射波长大于激发波长，其激发波长的确定可通过紫外扫描得到。
- 电化学检测器
- 可分为直流安培、脉冲安培和电导，安培用于电活性物质的检测，电导用于测定离子。

- 质谱检测器
- HPLC中的质谱检测器同GC中不同，主要有APCI和ESI二种，每种有正离子和负离子二种模式。正离子一般以加Na、加钾或加氢方式出现。
- 其它类型的检测器

3.3 样品的溶解及预处理

- 样品的类型前面已经提到，并作了分类。对于复杂的样品，根据分析的要求和对象，必须有合理的提取方法，溶剂萃取、索氏提取、过层析柱、超声萃取、皂化、衍生等，这里不一一谈了。
- 对于直接可以溶解进样的样品，这里需要注意以下几点：
- 被测样品的成分必须全部溶解，除非特意处理。
- 样品溶解的原则是相似相溶，首选流动相，如直接不行，或溶解度低，可先用其他溶剂溶解，再用流动相稀释。
- 在特殊的情况下，可用流动相互溶的溶剂溶解样品，并进样，但注意二者极性的差异。否则将得到错误的分析结果。
- 易氧化分解的物质,配后立即分析。

3.4 样品的进样量

- 如果是含量的定量分析，有自动进样器最好，手动进样的操作要求高，生手往往做的精度差。要达到足够的精度，进样量为定量管的4倍体积以上，快速转动后停留一段时间，注意排液管的方向。如果样品溶剂与流动相不一致，极性大时，进样体积不要太大，极易出双峰和前沿峰。
- 面积归一化法，建议进样量不要太大，尤其在低波长分析时，防止溶剂进样峰的干扰，尤其样品溶剂与流动相相差很大时，进样体积必须很小。

3.5 色谱柱的选择及保护与再生

- 3.51 色谱柱的选择
- 首选C18, 或C8, 以15cm为佳, 可解决80%的样品分析, 柱效应大于50000。如有条件采用进口色谱柱。特殊样品用特定的柱子。
- 不同柱子其保留性差异很大, 相同条件, 不同柱子比例会不一样。
- 碱性化合物用BDS柱, 糖用NH2柱。
- 不同色谱柱, 其合适的pH范围不一, 一般在2.5-7.5之间, 有的色谱柱比较耐碱, kromasii可以到10, 而杂化xterra 在1-12, XDB在 pH 3-11。
- 一体化的柱子也比较耐碱。
- 现在新型色谱柱不断出现, 虽是C18类型, 但差异会很大。

- 3.52 色谱柱的保护、平衡和保存
- 纯样品分析不加保护柱也许可以, 复杂和天然样品必须加上保护柱(有各种类型), 延长分析柱的寿命。
- 色谱柱的平衡在流动相中已经提到了, 注意流动相的pH值, 过低和过高将损伤柱子。当有机相比例很高时, 盐浓度不能太高, 否则温度低的话, 盐析出将引起柱子和管路的堵塞, 压力大增。
- 含盐的流动相在分析完后, 应用水洗去盐, 再换成有机溶剂。
- 色谱柱的保存, 参照说明书, 反相柱一般在甲醇或乙腈中。

- 3.53 色谱柱的清洗
- 用比你的流动相更强的溶剂冲洗
- 为了增加强度选择反相溶剂
- 对于分析柱每种溶剂至少用25 ml 冲洗
- 没有缓冲盐的流动相
- 100% Methanol 甲醇
- 100% Acetonitrile 乙腈
- 75% Acetonitrile :25% Isopropanol
- 75乙腈 : 25%异丙醇
- 100% Isopropanol 异丙醇
- 100% Methylene Chloride★ 二氯甲烷
- 100% Hexane ★ 己烷
- 当用己烷载二氯甲烷柱子时, 必须先用异丙醇冲洗, 然后再用你的反相流动相

- 3.54 色谱柱的维修-物理阻塞
- 在安装之前前后测试压力差
- 如果柱压太高,反装色谱柱,并用10-20倍体积的流动相冲洗色谱柱,监测压力变化。
- 若出现沉淀,(如:蛋白凝聚、细胞物、聚合物)设法用相应的可溶性溶剂, 如0.1%TFA / 80%乙腈, 6M盐酸胍、THF等)
- 若还无效, 更换过滤片

- 3.55 色谱柱修复和再生 --化学变化-I
- 由于键合相的水解或硅胶的溶解而造成的色谱柱填料的变化是不可逆的。
- 由于污染而产生的色谱柱变化可以通过适当的清洗使之修复。
- 梯度洗脱的方式(水->强有机溶剂) 通常最有效。
- 低pH 流动相, 如 0.1% TFA or 0.01M H3PO4, 也是有效的。
- 升高温度 (60-80℃)

- 色谱柱的修复和再生 --化学变化 -II
- Example:
4.6 mm ID x 15 cm Zorbax 300SB-C18
Flow rate: 1 mL / min; Temp: ~80℃
A: 0.1% TFA in water
B: 0.1% TFA in acetonitrile
100% A for 30 min.; 0-100% B over 30 min.;
Hold 100% B for 30 min., Return to 100% A in 5 min.
Repeat 3 times.
- 6M盐酸胍、异硫氰酸胍、尿素等溶液可用于清除蛋白质的沉积。
- XDB, 有机聚合物等填料可使用高pH 水溶液 /有机溶液, 如:
- 0.01M NaOH 50% 异丙醇 /水溶液, 硅胶基质应尽量减少接触时间 (15-30 min)。

- 3.56 色谱柱使用的几个注意点使用保护柱
- 样品和流动相过滤
- 柱子反做(当正做实在不行时)
- 当柱压明显升高时, 对柱头塞板清洗及更换部分填料。
- 少使用离子对试剂
- 色谱柱避免强酸强碱接触, 选择合适保存条件。
- 分析时, 避免长时间色谱柱进大量气泡, 长时间不用, 经常保存流动相过, 防止柱子干掉。

3.6 泵的选择

- 泵可分为单泵、双泵和四元泵。方法建立建议用双泵或四元泵。
- 泵也可分为高压混合和低压混合。四元泵是低压混合。
- 高压混合不易出气泡, 低压混合应严格脱气, 最好用在线脱气机。
- 为避免气泡产生, 可在柱后接反压柱。
- 分析完后, 避免盐类在管路中过夜。
- 泵的运行压力建议不超过极限值的50—60%。

3.7 色谱工作站

- 如有可能, 建议采用原装色谱工作站。有的单位因经费紧张, 采用国产工作站, 这也可以的。
- 国内工作站种类很多, 但技术支持都比较弱。
- 研究、方法开发的单位还是采用原装工作站比较好, 并注意及时升级。

4 分析方法建立的实例

4.1 等度分析

色谱柱: C18, 4mm×30mm

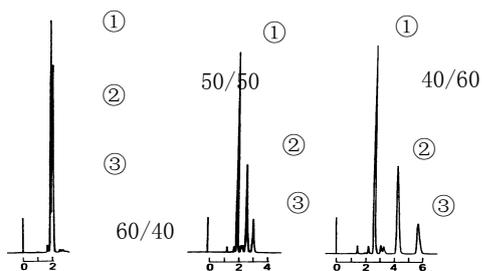
→ 流动相: 乙腈/水, 不同的溶剂强度, 60/40、50/50、40/60, 由强渐弱

→ 流速: 2ml/min

☞ 样品:

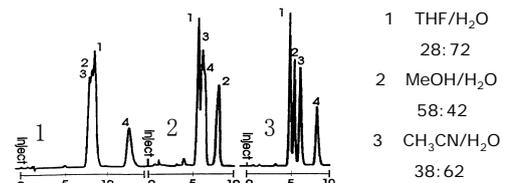
- ① 对羟基苯甲酸甲酯(Methyl Paraben)
- ② 对羟基苯甲酸丙酯(Propyl Paraben)
- ③ 对羟基苯甲酸丁酯(Butyl Paraben)

改变容量因子 K'



改变选择性: α

- 通过改变流动相改变选择性
- 同样强度的不同溶剂



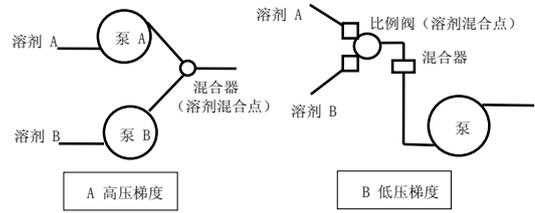
- 改变色谱柱

4.2 梯度方法的建立

- 梯度洗脱的特点
- 优点
 - 单位时间的分离能力增加
 - 检测灵敏度提高
- 缺点
 - 仪器设备要求高
 - 不适合某些检测方式
 - 柱需再生
 - 定量分析的重复性较低
 - 分析时间长

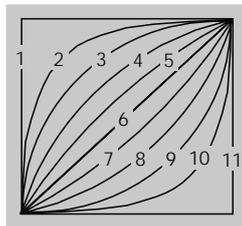
梯度的洗脱方式

- 高压梯度及低压梯度

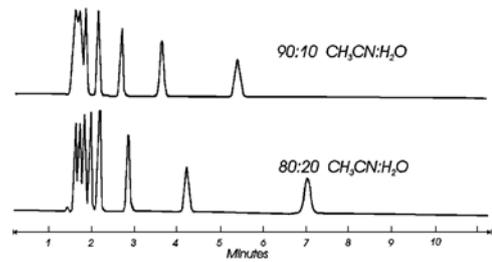


梯度洗脱的可变参数

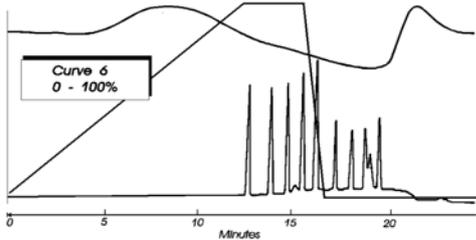
- A及B(可能还有C和D液)的成分和化学特性
- 梯度的陡度
- 梯度的变化形状



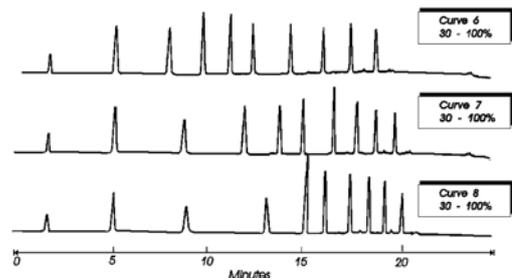
如不用梯度：分离不理想



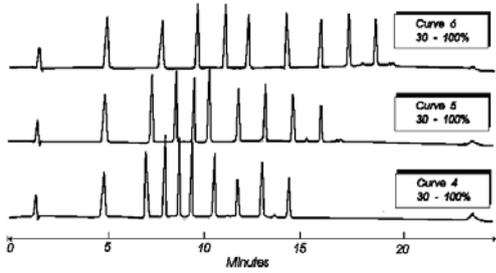
梯度条件的优化



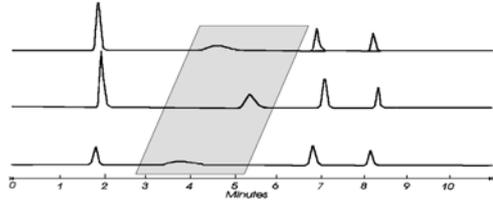
梯度曲线的变化：凹线



梯度曲线的变化：凸线

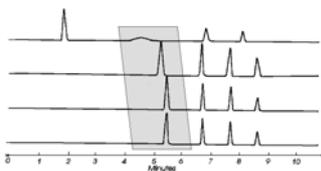


梯度平衡时间的影响（一）



10分钟的梯度，6分钟的平衡时间色谱图不重复

梯度平衡时间的影响（二）



平衡时间：6分钟

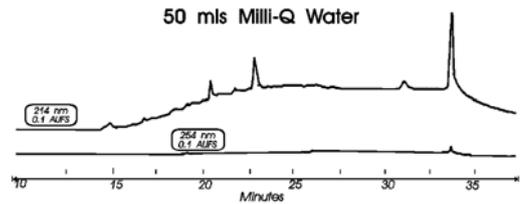
平衡时间：7分钟

平衡时间：8分钟

平衡时间：9分钟

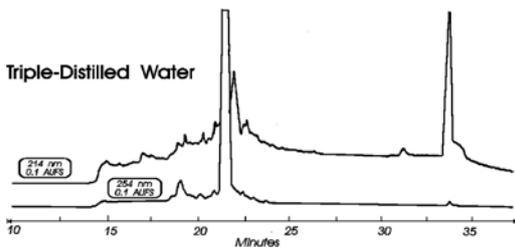
平衡时间从6到7分钟，第一个峰的保留时间有明显的变化，说明6到7分钟的平衡时间不足，而8到9分钟变化不大因而大于这个时间时，平衡充足。

有机污染物的影响（一）



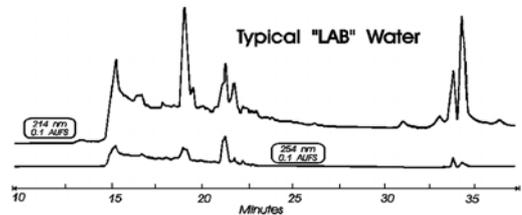
50ml超纯水的有机物污染状态

有机污染物的影响（二）



“三蒸水”有大量的有机污染物不适合梯度分析

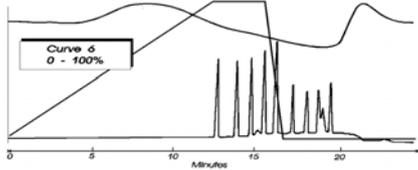
有机污染物的影响（三）



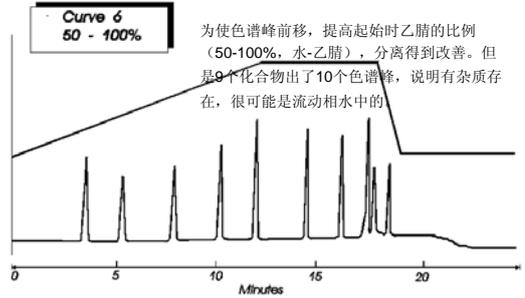
典型的“实验室水”有大量的有机污染物不适合高灵敏度梯度分析

梯度方法开发实例 - 第一步

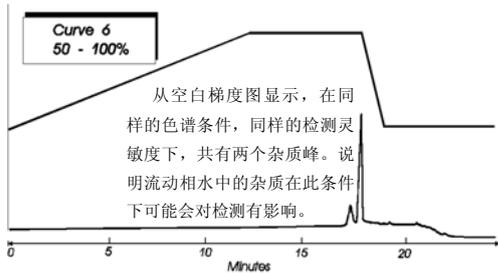
- 开发一个有9个烷基苯酮化合物的梯度方法，用C18柱，在最初条件下(0-100% 水-乙腈)，分离不理想。整个色谱峰组保留时间太长，分离度也不好



梯度方法开发实例 - 第二步

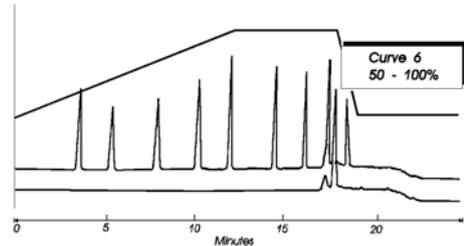


梯度方法开发实例 - 第三步



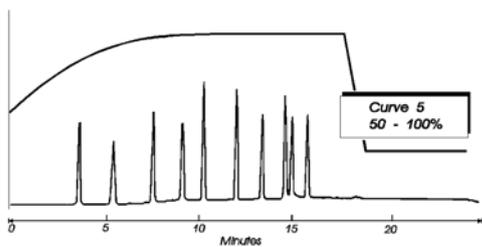
梯度方法开发实例 - 第四步

空白梯度图同样品的色谱图进行对照后，我们看到杂质（共两个峰）中的第一个小峰对第8个色谱峰有干扰，会使其定量分析结果不准确。



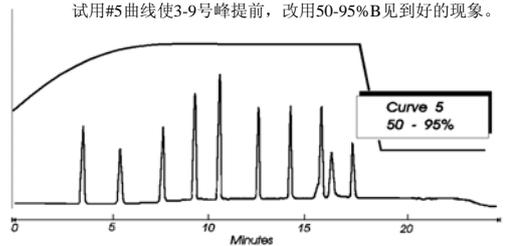
梯度方法开发实例 - 第五步

根据“梯度曲线下的面积越大，洗脱能力越强”的规律，试用#5曲线使3-9号峰提前(曲线5，50-100%B)，但是小峰仍没有分出来。



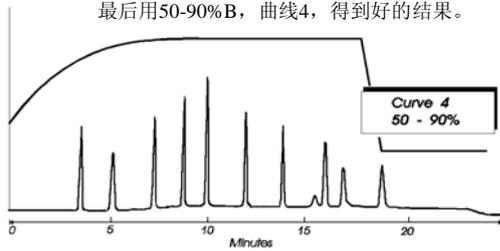
梯度方法开发实例 - 第六步

根据“梯度曲线下的面积越大，洗脱能力越强”的规律，试用#5曲线使3-9号峰提前，改用50-95%B见到好的现象。

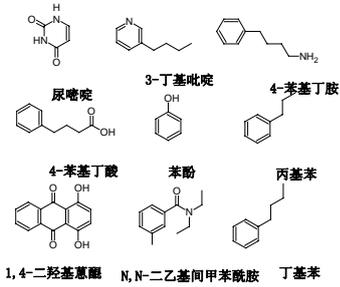


梯度方法开发实例 - 第七步

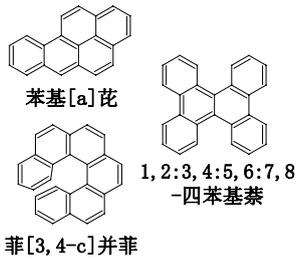
最后用50-90%B, 曲线4, 得到好的结果。



4.3 色谱柱及pH的影响



* 4-Phenylbutylamine was not used for testing at pH 2.5
 ** 4-Phenylbutyric acid was not used for testing at pH 7

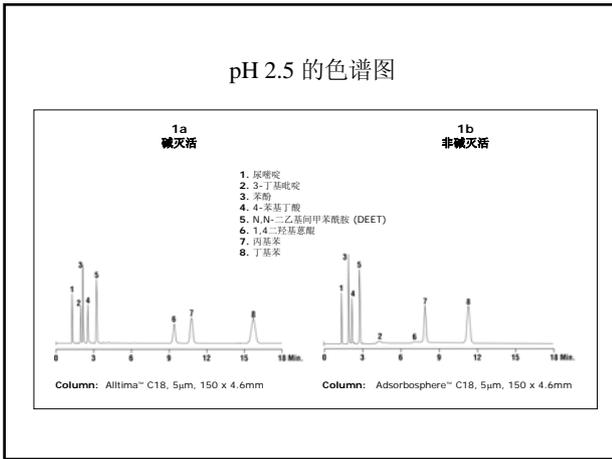


- HPLC 条件- 试验 1
- 流动相: 乙腈: 20mM 磷酸钾缓冲液 pH 2.5 (65:35)
- 流速: 1.0mL/min
- 柱温: 30° C
- 紫外检测器: 254nm
- 进样量: 10μL
- 样品 (mg/mL): 尿嘧啶 (0.025), 3-丁基吡啶 (0.067), 苯酚 (0.90), 4-苯基丁酸 (2.1), N,N-二乙基间甲苯酰胺 (0.66), 1,4-二羟基萘 (0.20), 丙基苯 (5.0), 丁基苯 (6.7) 用流动相溶解

- HPLC 条件- 试验 2
- 流动相: 乙腈: 20mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0 (65:35)
- 流速: 1.0mL/min
- 柱温: 30° C
- 紫外检测器: 254nm
- 进样体积: 10μL
- 样品 (mg/mL): 尿嘧啶 (0.05), 3-丁基吡啶 (0.02), 苯酚 (1.0), 4-苯基丁酸 (4.0), N,N-二乙基间甲苯酰胺 (1.0), 1,4-二羟基萘 (0.20), 丙基苯 (4.0), 丁基苯 (4.0) 用流动相溶解

- HPLC 条件 - 试验3**
- 流动相: 乙腈: H2O (85:15)
 - 流速: 2.0mL/min
 - 柱温: 25° C
 - 紫外检测器: 254nm
 - 进样体积: 10μL
 - 样品: 苯[a]芘, 1, 2:3, 4:5, 6:7, 8-四苯基萘, 菲[3, 4-c]并菲, 丙酮

pH 2.5 的色谱图



pH 7 的色谱图

