



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

高性能液相色谱介绍

H1186A

学员手册

手册编号 H1186-90000

美国印刷 2000 年 5 月

注意

本书内容如有改动，恕不另行通告。

安捷伦科技公司对本材料及由此引出的任何商务和特种用途不承担任何责任。

安捷伦科技公司对本手册中可能存在的错误，或因装置、性能及材料使用等有关内容而带来的意外伤害和问题不负责任。

未经安捷伦科技公司书面授权，本文中任何内容不得影印或复制，或翻译成其它程序语言。

Agilent Technologies, Inc.

11575 Great Oaks Way

Suite 100, MS 304B

Alpharetta, GA 30319

© 2000 版权所有人为安捷伦科技公司

保留所有权利

在美国印刷

目录

高效液相色谱简介	1
本章有如下内容:	2
您有一个问题要解决	3
分离技术	4
高效液相色谱与气相色谱的比较	5
样品分析	10
高效液相色谱的分离	11
色谱图	12
高效液相色谱分析参数	13
高效液相色谱的模式	14
高效液相色谱的应用	15
高效液相色谱仪 (HPLC)	17
在这个部分, 用户将学习:	18
仪器概况	19
溶剂过滤器	20
真空脱气	21
输液系统	23
输液系统	24
高压输液泵工作原理	25
输液系统组件	32
梯度系统	33
总结:	34
进样技术	35
手动进样器	36
自动进样器	38
柱温箱	41
HPLC 检测器	42
检测器性能参数	47
UV-VIS 检测器	50
荧光检测器	57
电化学检测	62
折光指数检测	72
光散射检测	74
电导检测器	78
实验室训练: 溶剂输送系统	79

在这一实验室，您要：	80
流路.....	81
故障提示和压力指示器.....	85
检查泄漏.....	86
溶剂输送系统.....	87
实验室训练：自动进样器.....	93
在这一实验室训练中，你要：	94
材料.....	95
自动进样器.....	96
使系统初始化.....	101
压力测试.....	103
检测器.....	104
更换灯	105
流通池.....	106
检查校准线.....	107
HPLC 实践.....	109
在这一节，你将学习	110
溶剂处理.....	111
流动相制备.....	115
样品制备.....	119
色谱柱的处理.....	121
系统的参数.....	129
总结.....	132
复习.....	133
色谱分离度和分离.....	135
在这一节，你将学习	136
分离度.....	137
基本分离度公式.....	140
容量.....	142
选择性.....	145
柱效.....	153
流速.....	160
柱效.....	162
柱长.....	163
总结.....	164
分离度.....	165
作业.....	166
实验室训练：HPLC 参数.....	169

在这一实验室训练中，你要：	170
材料.....	171
流动相组成.....	172
流动相组成分析.....	177
流速.....	179
数据分析.....	180
柱箱温度.....	182
温度数据分析.....	183
一般性故障排除.....	185
在这一节，你将学习：	186
要保留记录.....	187
关心照顾仪器.....	188
保留时间和峰面积.....	189
仪器的故障排除.....	190
时间常数.....	195
检测器.....	196
压力故障.....	197
基线故障.....	198
色谱柱故障.....	202
基线故障.....	207
鬼峰.....	208
峰形.....	209
测试.....	215
工作表.....	216
梯度洗脱.....	221
在这一节，你将学习.....	222
一般的洗脱问题.....	223
梯度洗脱 – 一种解决办法.....	224
梯度分析.....	226
为什么峰窄而且宽窄一样？	227
开发一个梯度洗脱的分析.....	228
改进梯度分析.....	235
梯度洗脱.....	237
特殊的考虑.....	238
实验室训练： 梯度洗脱.....	241
在这一实验室训练中，你将：	242
材料.....	243
探索性试验.....	244
步骤.....	245

分析探索运行实验	248
定性和定量分析	249
在本节，你将学习	250
定性分析	251
鉴定	252
定量分析	257
外标	264
校准	266
外标	268
归一 %	270
内标分析	271
精密度和准确度	275
色谱柱硬件和填料	277
这一节，你将学习	278
色谱柱硬件	279
色谱柱填料	282
粒度	290
色谱柱直径	296
色谱柱柱长	301
实验室训练：色谱柱硬件	303
在这一实验室训练中，你将：	304
材料	305
标准色谱柱	306
计算流速	309
色谱柱比较	310
四个主要色谱峰的数据	312
问题	314
实验室训练：色谱柱硬件（选择模拟实验）	315
这是一个利用以前采集数据文件的模拟实验。	316
材料	317
计算流速	318
色谱柱比较	319
四个主要色谱峰的数据	321
问题	323
反相色谱	325
在这一节，你将学习：	326
反相 HPLC 机理	327

反相 HPLC 的应用	328
保留次序	330
流动相	332
选择色谱柱	337
选择键合相	339
色谱柱参数	341
色谱柱键合	344
反相色谱分离离子型样品	346
在这一节，你将学习	347
弱酸的分离	348
控制 pH 的缓冲溶液	350
考虑 pH 的缓冲溶液	351
控制 pH 的缓冲溶液	352
弱碱的分离	353
分离弱酸和弱碱	357
离子对 HPLC	358
离子对 HPLC 的优化	361
实验室训练：用反相色谱分离弱离子化合物（任选实验）	362
在这一实验室训练中，你将：	363
材料	364
步骤	365
问题	366
离子交换高效液相色谱	368
在这部分，你会了解到：	369
离子交换机理	370
离子交换的应用	371
固定相	372
pH 的影响	373
流动相	374
分离	375
离子色谱	376
正相 HPLC	378
在这一节，你将学习	379
正相色谱机理	380
正相液相色谱的应用	381
保留次序	382
分离的选择性	383
固定相	386

洗脱强度.....	387
脱活剂.....	391
工作表.....	392
体积排阻色谱 (SEC).....	394
在这一节，你将学习：	395
体积排阻色谱.....	396
应用.....	397
一般应用.....	398
原理.....	399
固定相的选择.....	400
校准.....	401
GPC 计算.....	403
固定相的选择.....	404
SEC 分离度.....	405
SEC 的技巧.....	406
对系统的要求.....	407
方法的开发.....	408
在这一节，你将学习.....	409
方法开发的步骤.....	410
数据收集.....	411
固定相的选择.....	414
开始时色谱柱的选择.....	415
对仪器要考虑的事项.....	416
样品预处理.....	417
样品制备.....	420
第一次分析.....	424
优化.....	427
实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）	438
在这一实验室训练中，你将：	439
材料.....	440
方法开发的计划.....	441
开发方法的参数.....	442
校准.....	444
积分.....	446
设定信号的详细资料.....	447
建立校准表.....	448
测试校准表.....	449
未知物.....	450

附录：方法认证概论	452
引言	453
认证的方法 - 目的	454
为什么样要进行认证?	455
什么时候应当对方法进行认证/再认证?	456
什么必须进行认证?	457
规则概述	458
质量规则-地理	459
术语	460
测试/校准	462
开始方法的开发	463
如何开始	464
方法认证的策略*	465
确定方法的目的	466
关键参数	467
方法认证的参数- 方法的范畴	468
改变方法- 需要再认证	469
最低要求- 可接受的标准	470
方法认证-参数	471
设备规格- 方法要求的必备条件	472
具有合格证的材料	473
方法开发- 优化分离	474
方法开发- 文件	475
方法认证策略	476
选择性/专属性	477
理论 - 选择性/专属性	478
选择性/专属性	480
检测限	481
检测限- 定义	482
定量极限	483
定量极限- 定义	484
理论- 线性	485
准确度/精确度/精密度	487
精密度	489
耐用性	492
执行	493
使用经过认证的方法	494



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

高效液相色谱简介

本章有如下内容:

本章有如下内容:

- 高效液相色谱和气相色谱的不同之处
- 有关高效液相色谱 (HPLC) 的各组件
- 有关分离步骤
- 有关色谱图
- 最常见 HPLC 模式

您有一个问题要解决



工作中色谱工作者每天都会碰到需要开发分离技术以满足实际工作的需要。本节，色谱工作者如何判断两种分离仪器间的差异。分析需要分离一些消费品如柠檬水或谷物中的碳水化合物（如单糖）。

分离技术

分离技术

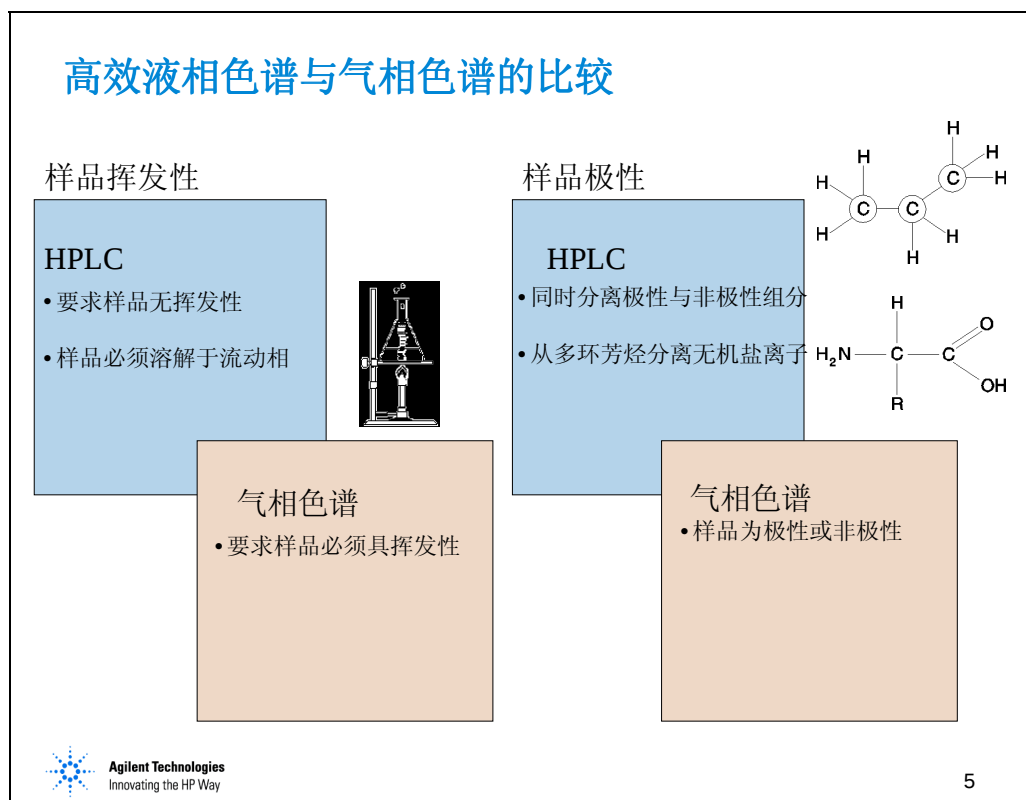
在我实验室里有两套分离技术，高效液相色谱和气相色谱，我应该采用哪一个？

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

4

现在两种主要的分离分析技术包括液相色谱和气相色谱。对于液相色谱流动相为液体，早先时候，此技术被称为高压液相色谱。这个名称的得来用于区分低压液相色谱，其采用重力或蠕动泵供给溶剂。由于出现较小的固定相微粒，需要高压迫使流动相通过填料。对于气相色谱，流动相为一种气体。气相色谱是一种较为成熟的技术，便于使用。不幸的是，已知化合物中只有约20%可以用气相色谱分离。很大程度上讲液相色谱则是一种受到广泛使用的技术，可以成功地应用到更大范围内的化合物的分离。所举事例为一些糖类的分离，通过分离结果来评价每种仪器。

高效液相色谱与气相色谱的比较

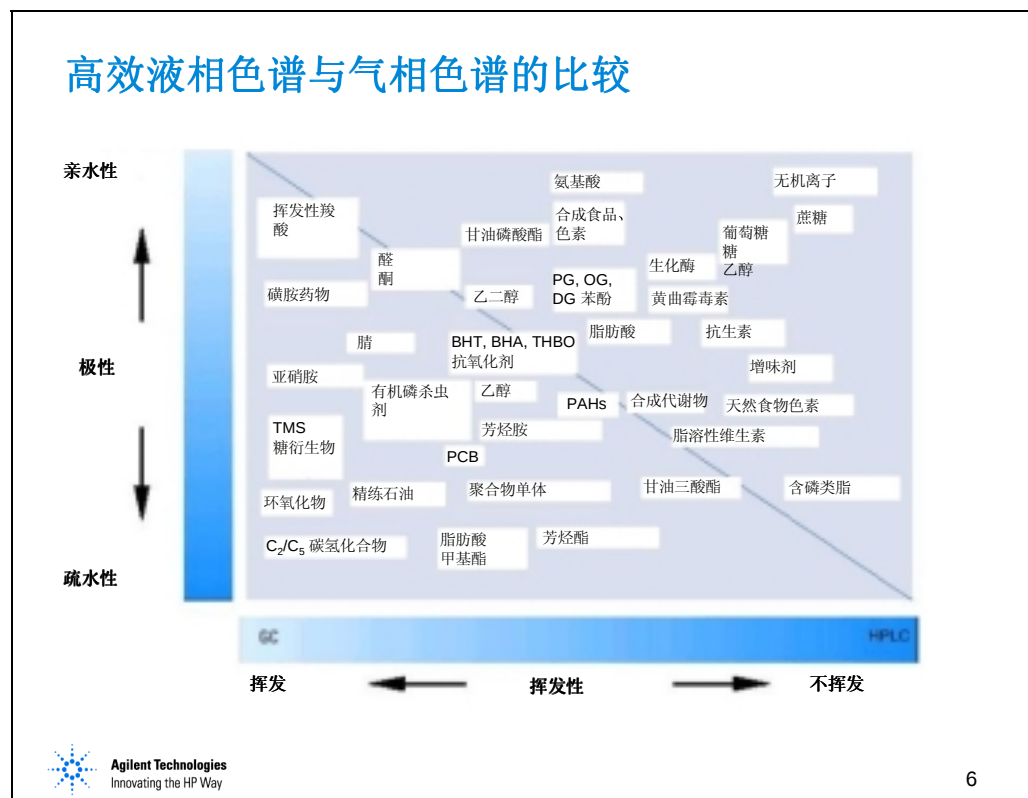


采用气相色谱分析的样品必须具有挥发性。样品组分或其衍生物必须在操作的进样口温度和柱温（高达 350°C - 450°C）下至少有几个 torr（托）的蒸汽压，一旦样品变成蒸汽状态，即被流动相（载气）带走，常用氢气或氦气作载气。非挥发性组分的衍生物也可能由气相色谱分析。但是这么作会很费时间。

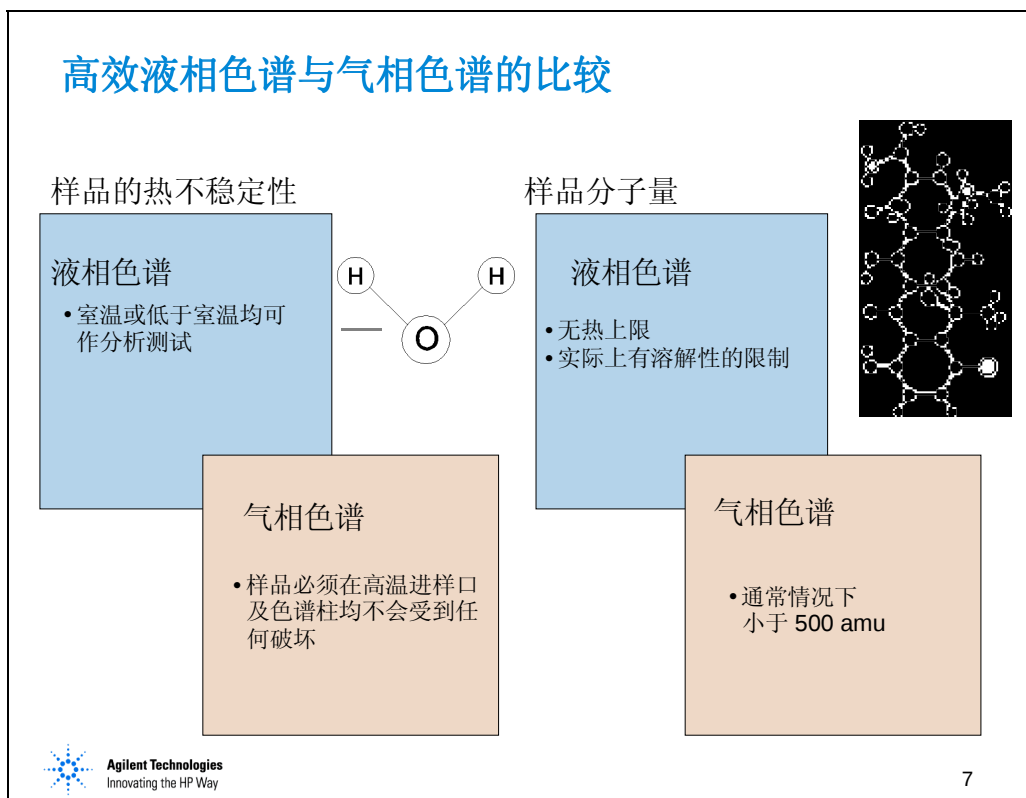
对液相色谱，样品不受任何挥发性的限制。液相色谱通常在室温或接近室温下操作。但是，所有样品必须溶解于流动相，常用的流动相为甲醇、乙腈、水、乙酸乙酯和己烷。

通常，气相色谱能分析不相互作用的非极性或中等极性组分。液相色谱能分析如高分子的芳烃、脂肪烃以及极性样品如染料等。另外，液相色谱的两种模式，离子对和离子交换，能分析离子型组分。

高效液相色谱简介
高效液相色谱与气相色谱的比较

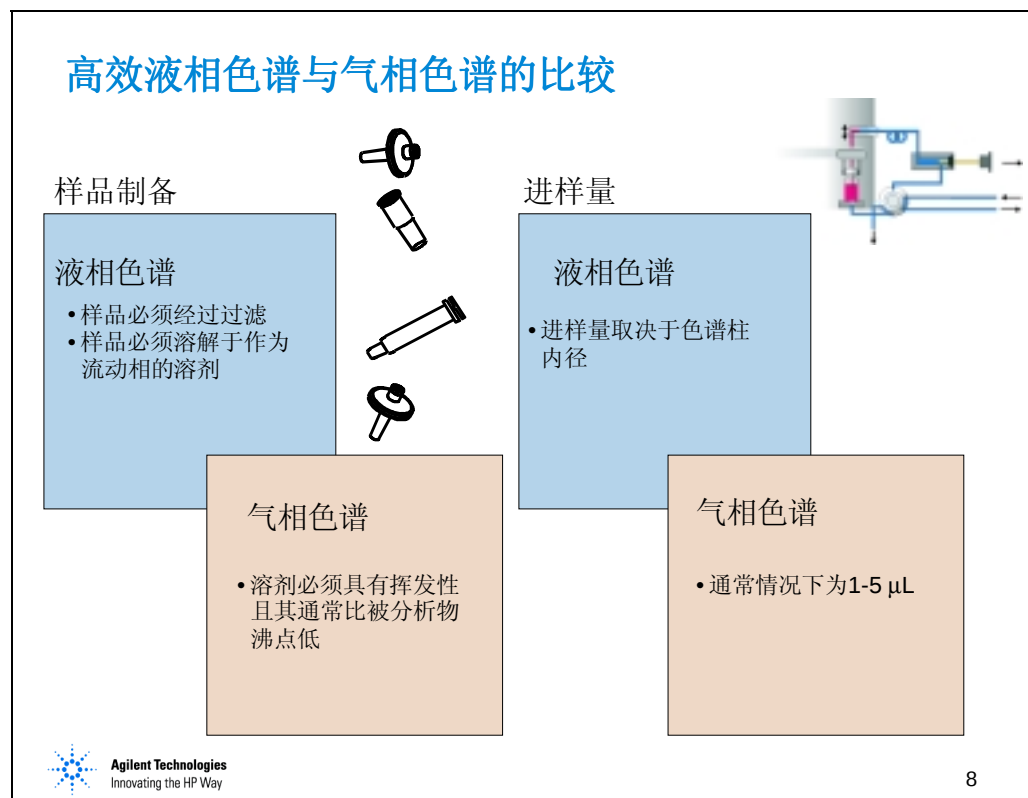


上图所示为典型的液相色谱与气相色谱对极性和挥发性组分的分析事例。应注意到适合于用气相色谱分析的组分也可用液相色谱来分析。但是，对那些非挥发性或极性不能采用气相色谱分析的样品最好采用液相色谱分析。



热不稳定组分在气相色谱的操作环境下会分解。进样口温度和柱箱温度均可能超过 350°C。相反，液相色谱操作温度为室温或接近室温，样品还可储存于经冷却的自动进样器中。

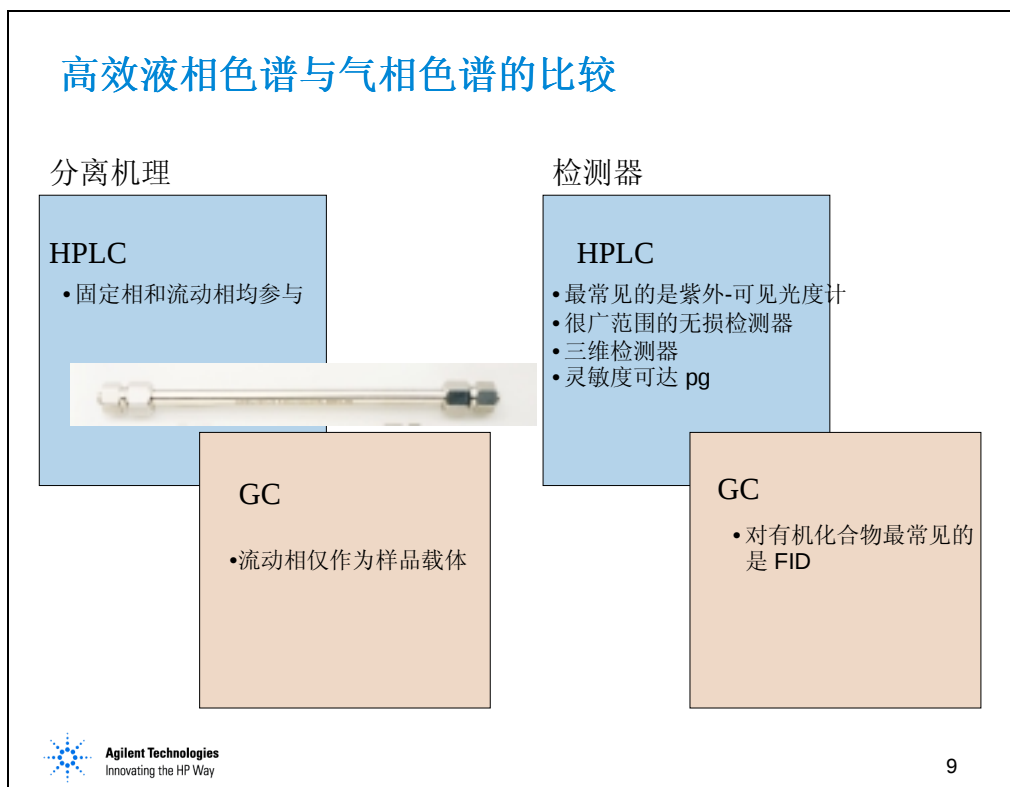
总的来讲，用气相色谱分析的组分分子量低于 500 amu。这个界限是缘于其非挥发性的限制。而液相色谱用于分析分子量极高的组分。从理论上讲，液相色谱没有分子量的限制，常用于蛋白质和聚合物的常规分析。事实上，似乎也存在分子量高限的问题，因为样品必须溶解于流动相。



样品在注入液相色谱分析前，应过滤以去除样品中的所有微粒。样品应溶解于流动相或比溶剂极性弱的溶剂以确保获得较好的色谱峰。气相色谱要求溶剂具有挥发性，气相色谱样品不应溶于水，因此经常需要采用萃取。常用的气相色谱溶剂包括异辛烷和己烷。操作时不要忘记溶剂的体积膨胀及溶剂的挥发性的影响。

液相色谱中，进样量（体积）取决于色谱柱的内径，对标准色谱柱常用进样体积为 2-50 μL 。较大的进样量，可能 2 ml 或更多，但必须注意的一点是不要因此引起色谱峰的加宽。

对液相色谱，进样量还取决于现用的固定相的量和类型。通常采用每克色谱柱填料注入 1-10 μg 样品。若被分析物的保留时间减少则可能表明色谱柱过载。



高效液相色谱里的分离装置同时包括固定相和流动相，而在气相色谱里流动相简单地载着样品通过色谱柱和检测器。例如，反相液相色谱中，流动相中的水分可能担负着推动疏水性样品进入非极性固定相并在其中保留。事实上，两相都起到分离的作用，对被分析物具有更高的选择性。同时，改变流动相组成还意味着更有效的提高两个色谱峰间的分离度。但是，气相色谱更为有效，比液相色谱更易于改进分析方法。

液相色谱和气相色谱两种分析技术都有很高的灵敏度和各种不同的检测器。检测器的选择性和灵敏度是随样品不同、方法操作条件和分析的目的而有所变化，选择检测器前也应考虑这些因素。用于气相色谱有一种较高灵敏度并通用型的检测器为火焰离子化检测器 (FID)，但这种检测器对样品是有破坏性的。气相色谱与质谱联用 (GC/MS) 技术比液相色谱与质谱联用 (LC/MS) 技术要成熟。用于确定未知物的书籍中只能查阅到 GC/MS 方面的内容而不能查阅到 LC/MS 的内容。许多液相色谱检测器如 UV-VIS (紫外-可见) 和荧光检测器就不是破坏性的，因此，分离后，被分析物可收集作进一步分析使用。最后如果制备不出足够样品量作气相色谱分析时，就用液相色谱进行分析。

样品分析

我们怎样分析样品？

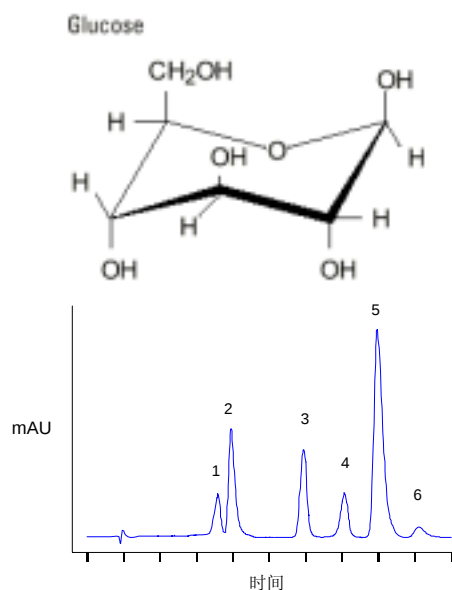
糖类

1. 果糖
2. 葡萄糖
3. 蔗糖
4. Palatinose
5. 海藻糖
6. 异麦芽糖

Zorbax NH₂ (4.6 x 250 mm)

70/30 乙腈/水

1 mL/min 检测=折射率



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

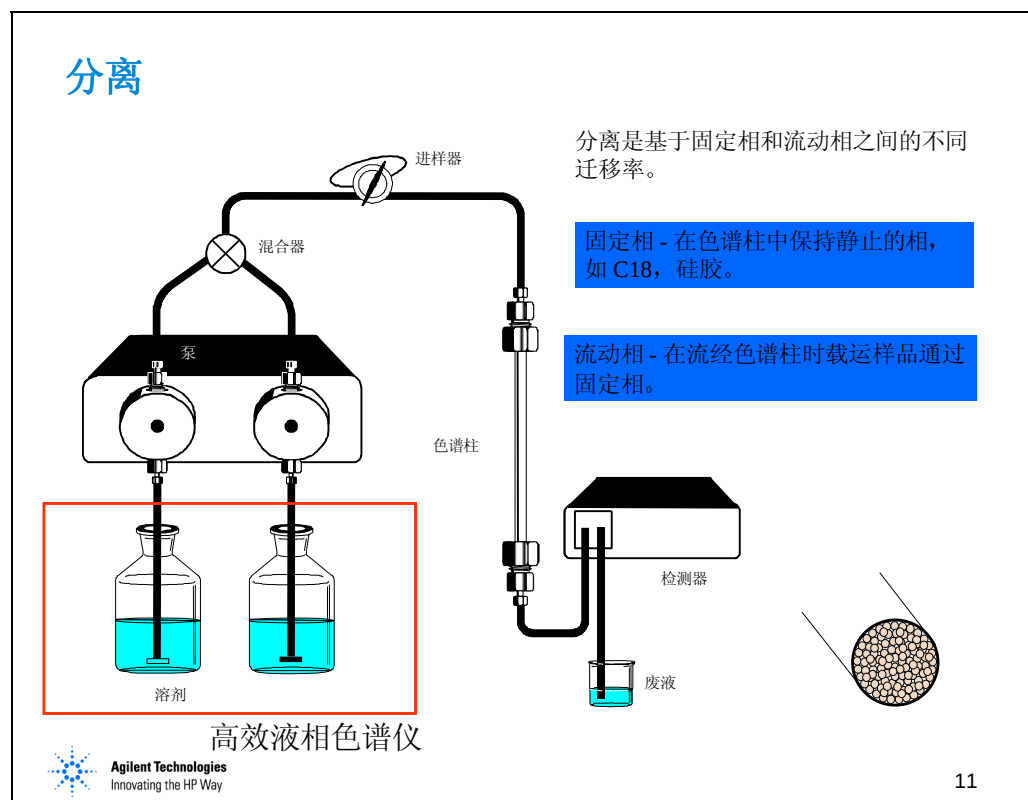
10

既然我们已经比较出液相色谱与气相色谱不同，显示出糖类的分析最好使用液相色谱。最重要的原因是糖类不挥发，除非是进行衍生化。且其具有热不稳定性在气相色谱的进样口会发生碳化作用。另外，如果样品为如柠檬水之类的消费品，样品大多数成分为水分，过滤后可直接注入液相色谱进行分析。

图示为单糖和双糖分析方法。丙胺色谱柱被规定用于分析几种含单糖的基质的正式方法，如谷物等。流动相采用 70% 乙腈及 30% 的水分。

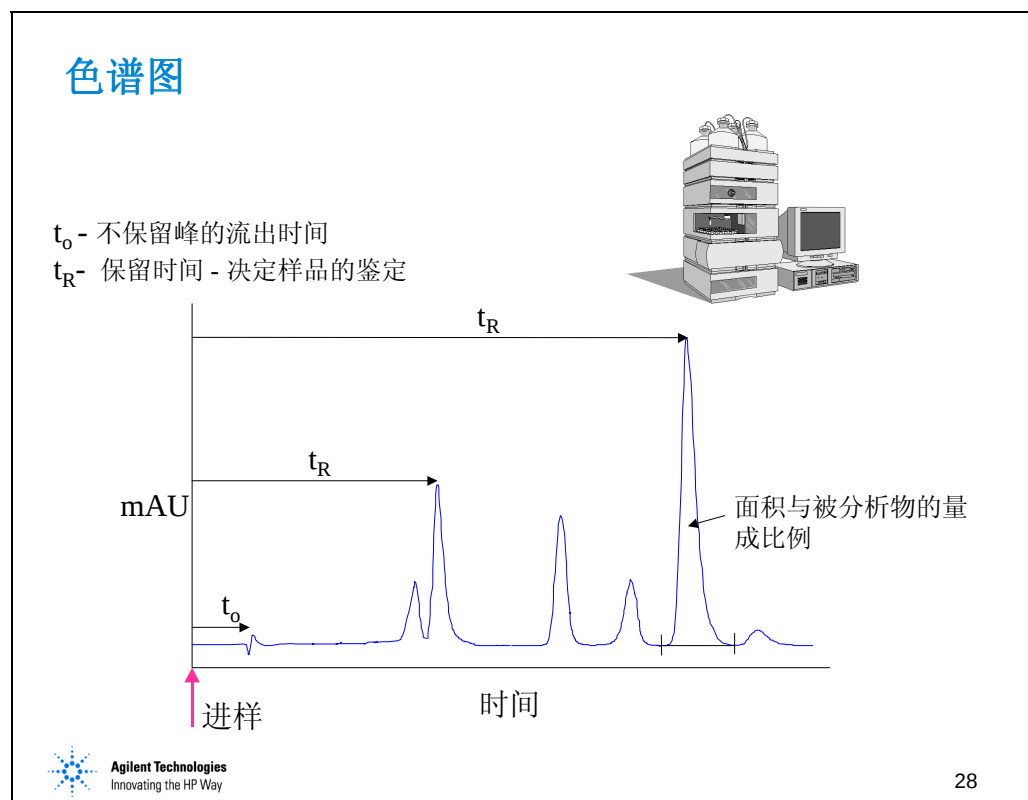
糖类没有较好的发色基团，因此，采用 UV-VIS（紫外-可见）检测器是不好的选择。折光指数检测器为液相色谱的常用检测器，可以用于检测单糖和双糖。

高效液相色谱的分离



图中为典型的高效液相色谱仪的构成。溶剂容器用于储存足够量的溶剂以满足几个小时的操作使用。不锈钢或烧结玻璃过滤器用于去除流动相的微粒以确保不损坏泵系统或色谱柱。现在，液相色谱仪都配有真空脱气装置以去除溶解在流动相中的气体（图中未显示）。泵系统用于提供准确流量的流动相并给予一定压力确保流动相连续通过紧密装填的填充柱。用自动进样器或手动注射器将样品注入色谱柱的顶部而不中断流动相的输送。色谱柱为液相色谱仪的心脏部分，样品在色谱柱里进行分离。用不锈钢多孔塞子将色谱柱固定相两端堵塞。固定相填料可能为硅胶或细小微粒形式存在的高分子。还有一种特殊的作用，如氨基或十八烷基与微粒表面发生键合作用。当样品混合物在色谱柱固定相和流动相两相间分别分布时样品则发生分离。分离后样品组分流过检测器，各个组分在此分别检测并测出结果。测试结果以二维色谱图形式记录下来并存入计算机中。

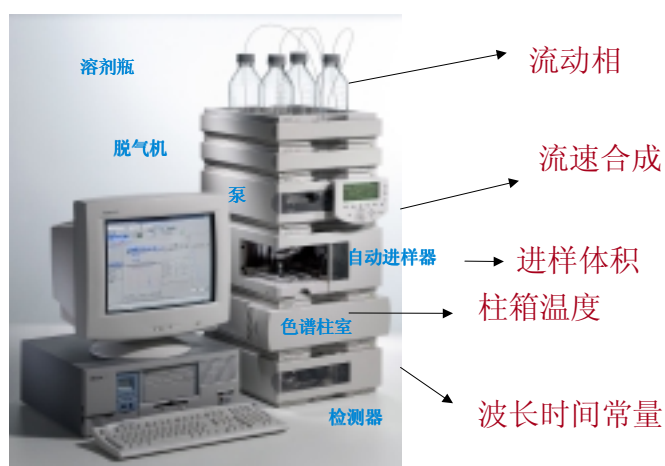
色谱图



流动相将样品组分传送至检测器，样品组分在此产生信号画出对时间的图形，这种图形即称为色谱图。典型的样品组分谱图为高斯峰。样品组分在固定相不保留，而是通过色谱柱没有相互作用被称为死时间 (t_0)。样品组分与固定相有作用在较长的时间流出色谱柱即保留时间。通过色谱峰的保留时间对样品组分定性，在同一色谱操作条件下，同样组分保留时间相同。色谱峰高度或峰面积与被分析物的量有关，组分的实际测定值可用与已知浓度标准进行比较而得出。

高效液相色谱分析参数

HPLC 分析参数



选择合适的分离参数可以控制色谱峰的分离度。根据样品分子结构来选择色谱柱固定相，而柱长则依据样品分离的难度来选择。流动相的组成应与样品和选择的固定相相一致并优化出最好的分离条件。流动相的选择还应依据检测器的参数。柱箱温度和流动速率作为次要的调节条件，更精细的调节色谱峰。进样量也是一个很重要的参数，因为这进样量会导致峰分离度降低且峰形变坏。

高效液相色谱的模式

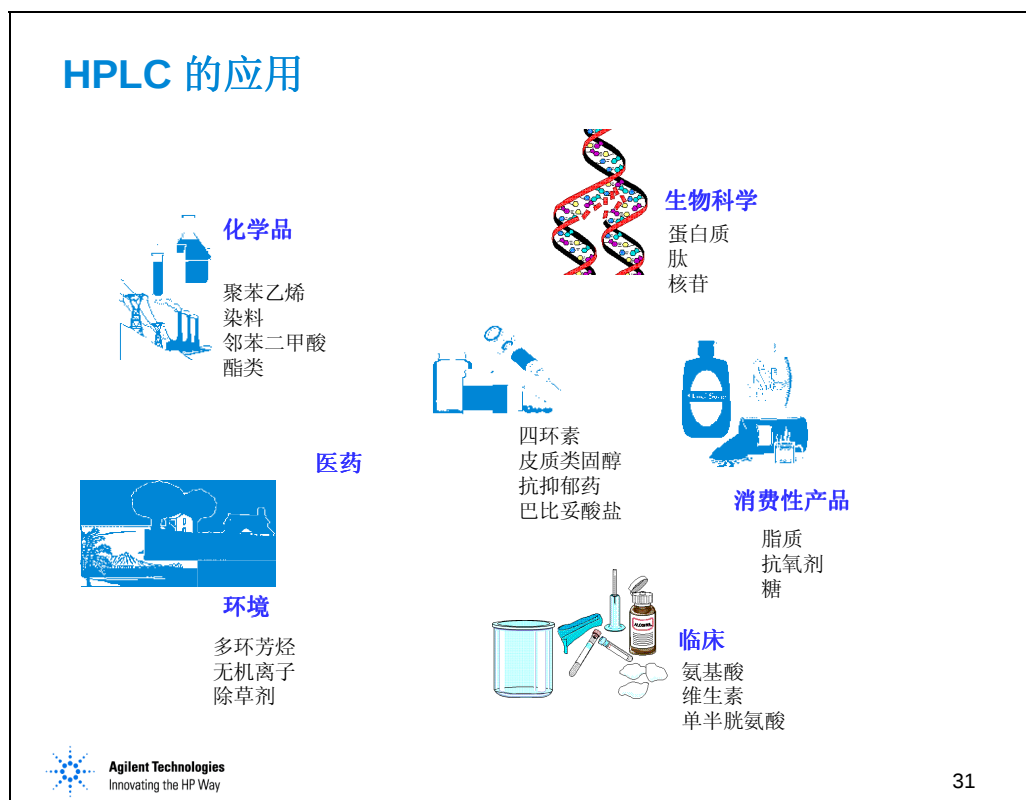
高效液相色谱的模式



化合物类型	模式	固定相	流动相
中性 弱酸 弱碱	反相	C18, C8, C4 氨基, 氨基	水/有机改性剂
离子、碱性、酸性	离子对	C-18, C-8	水/有机的离子对试剂
不溶于水的化合物	正相	硅胶、氨基、腈基、 二醇	有机物
离子型无机离子	离子交换	阴离子或阳离子交换 树脂	水/缓冲溶液 对离子
高分子量化合物 聚合物	体积排阻	聚苯乙烯 硅胶	凝胶过滤 - 水性的 凝胶渗透 - 有机的

上表中列出了五种主要的液相色谱分离技术。应用最为广泛的。模式为反相色谱，这种技术应用范围很广，包括中性、弱酸、弱碱和能与离子对试剂接合的离子。过去正相液相色谱包括裸硅胶柱和氧化铝柱都被称为吸附色谱。现在也有应用键合极性固定相。离子交换是专用于离子溶液的分离技术。体积排阻法分离大分子量的分子，是基于分子大小的分离方法。

高效液相色谱的应用



高效液相色谱对低分子量或高分子量的极性或非极性分子均能在较短的时间内获得非常好的分离效果。这也就是高效液相色谱能广泛应用于许多工厂的原因。下面列出几个工厂的应用情况。

高效液相色谱简介
高效液相色谱的应用



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

高效液相色谱仪 (HPLC)

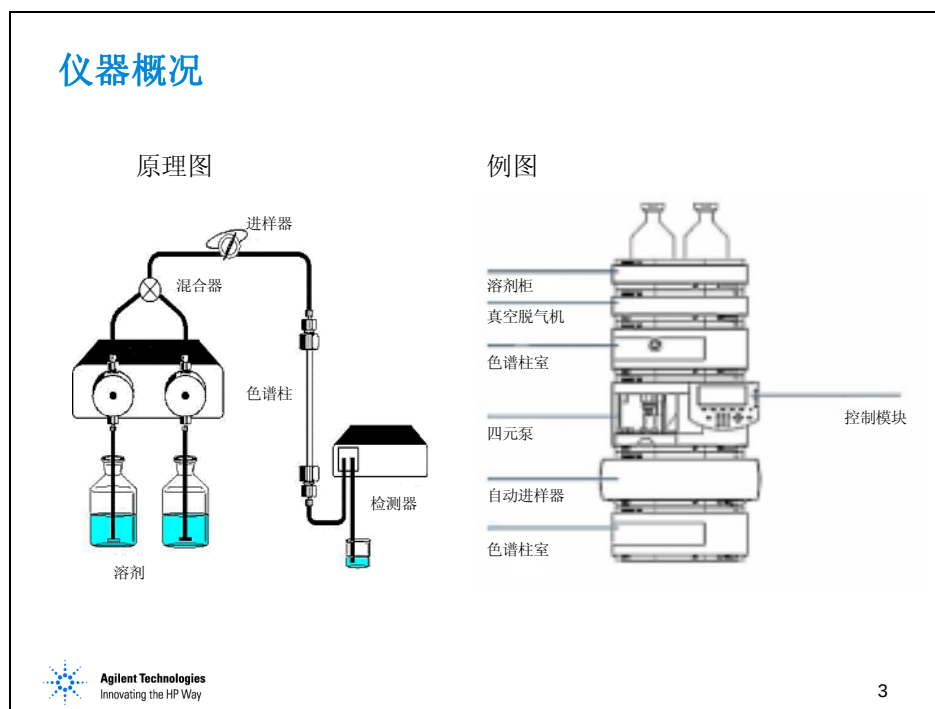
高效液相色谱仪 (HPLC)
在这个部分，用户将学习：

在这个部分，用户将学习：

在该部分，将学习：

- HPLC 溶剂输液系统.
- 自动进样器如何工作
- 通用HPLC 检测器.

仪器概况



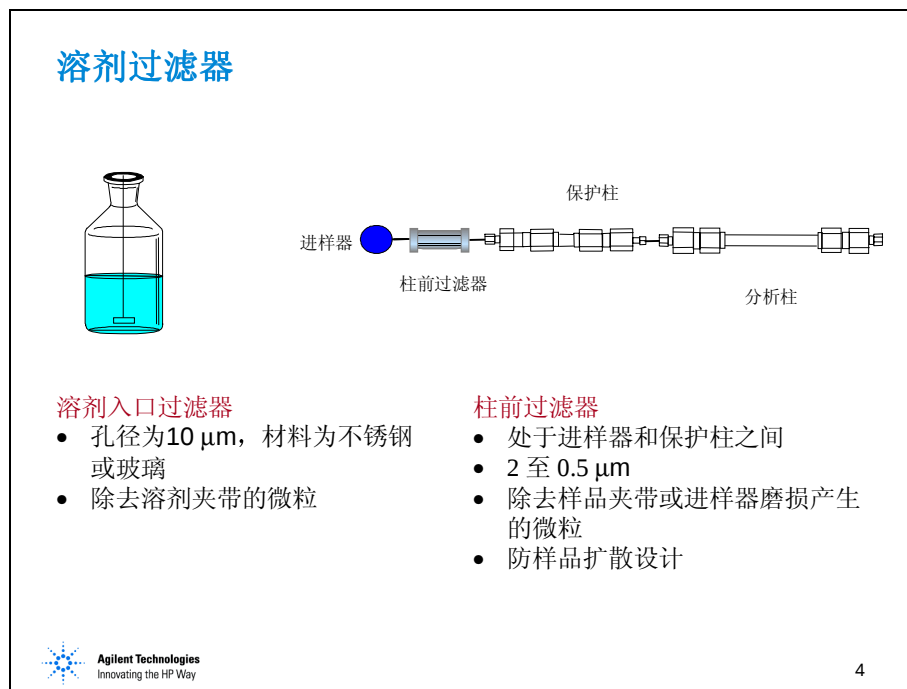
一台高效液相色谱仪由如下部件组成：

- 泵
- 进样系统
- 柱温箱
- 检测器

上图展示了典型的液相色谱的流路。仪器的各部件或组件之间用毛细管件连接。毛细管件的材料为聚合物或不锈钢。为避免生物活性物质与不锈钢结合，通常分离此类物质时使用聚合物毛细管件。

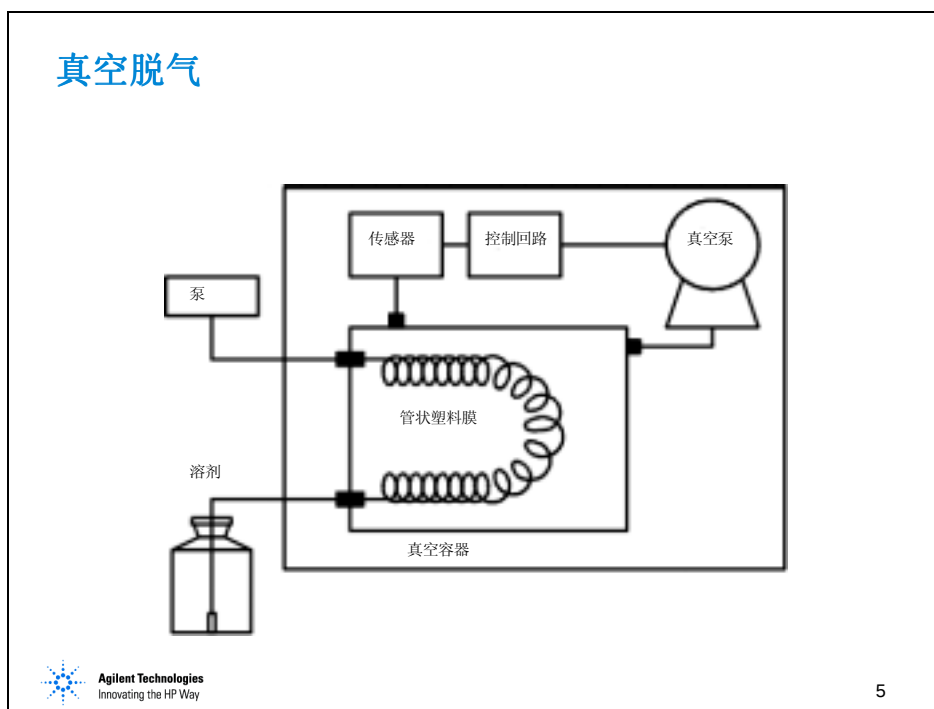
为减少多余柱体积，每个组件之间采用尽可能短的管件连接。这点对于实现高效分离十分重要！通常用“死体积”表示这类多余柱体积。

溶剂过滤器



流动相中夹带的微粒有可能会损坏输液系统。通常在流动相储罐中使用孔径为 $10\ \mu\text{m}$ 过滤器以除去流动相中夹带的微粒。溶剂入口过滤器应定期更换或清洗。如果忽视这一点，可能达不到所需的流量，从而导致流动相组成变化以及空气进入输液泵。在进样器和分析柱之间安装柱前过滤器可以除去样品中夹带的微粒和进样阀磨损产生的微粒。过滤器是一个装填了孔径为 0.5 到 $2\ \mu\text{m}$ 装在卡套里的过滤塞子。当系统压力升高需要更换过滤塞子时，该装置易于更换。

真空脱气

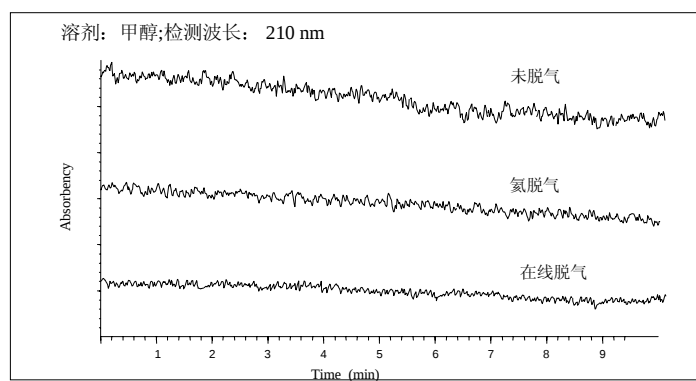


水和小分子量醇互溶时会溶解较多的气体。因此，进行 HPLC 分析时第一个重要步骤就是流动相脱气。脱气过程除去流动相中溶解的气体。流动相中夹带的气体能导致泵和检测流通池中产生气泡。流量不稳定引起保留时间不稳定和基线不稳。当使用荧光检测器时，流动相中溶解的氧气能导致荧光淬灭。

真空脱气属于在线脱气技术。溶剂在进入输液系统前通过一段放置在真空室中由半透膜制成的管道。实验证明真空脱气技术优于传统脱气技术。

高效液相色谱仪 (HPLC)
真空脱气

对检测器基线的影响



上图显示了不同脱气技术的相对效果。在线脱气是现今最有效的脱除溶解气体的手段。此外，在线脱气影响流动相中的挥发性和不挥发性组分的相对浓度。

输液系统

输液系统的功能

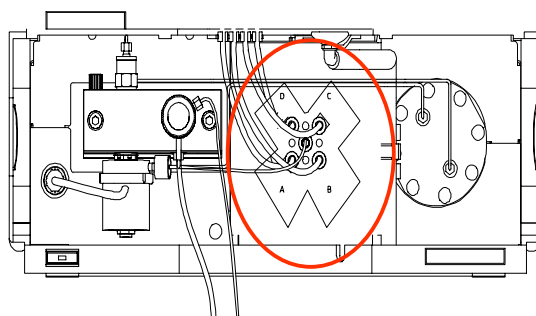
输液系统有三个基本功能：

- 使流动相流量精确和稳定
- 使流动相组成精确
- 提供足够的驱动力使流动相通过填充紧密的填充柱

输液系统的功能是使流量精确、可重现的流量和组成，它必须能推动流动相通过填料填充紧密的柱子。下一组图片将说明实现该功能的一些手段。此外，输液系统应不能产生压力脉动。通常使用阻尼单元实现该功能。

输液系统

多通道梯度阀

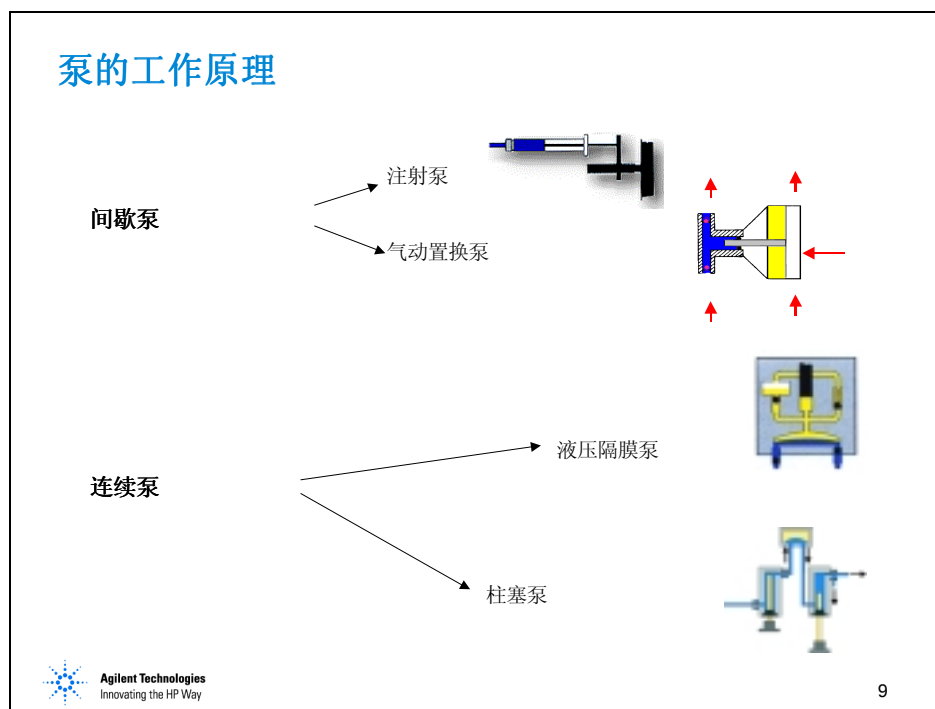


- 决定流动相组成
- 首先充满最大的溶剂塞
- 1090 PV5 型, 1050 型和 1100 型四元泵

在某些高效液相色谱仪中，流动相通道和往复柱塞泵间装有多通道梯度阀以控制流动相组成。通过控制阀位调节流动相的组成。阀口在某一通道口的停留时间长短决定了流动相的组成。在 1090 PV5，1050 型四元泵和 1100 型四元泵均装有多通道梯度泵。

通常阀的四个通道中均充满溶剂。保持正压可以防止缓冲溶液渗入无溶剂的通道。每次关机前应确定阀中的缓冲液已被冲洗出来。缓冲液析出的晶体容易损坏阀。

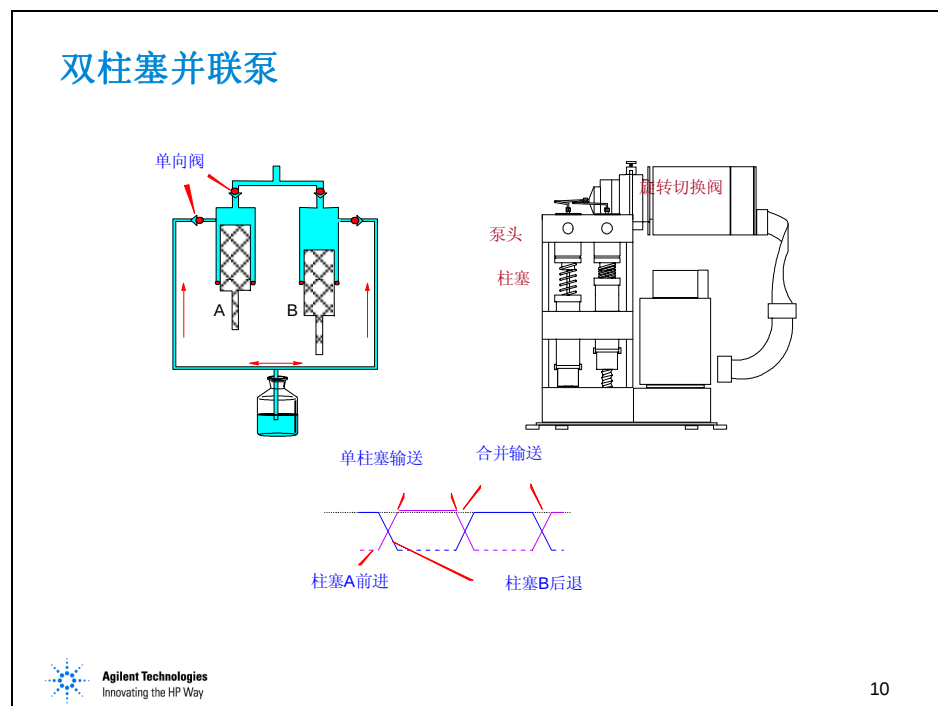
高压输液泵工作原理



通常使用的两类泵：

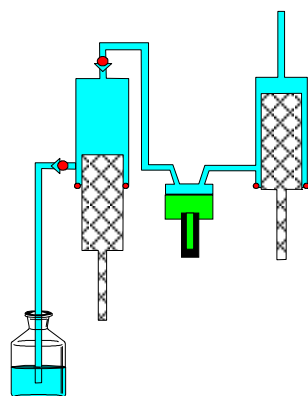
- 间歇泵：这种泵连续输送一定体积的溶剂直至溶剂耗尽。通常称此类泵为注射泵。在需要保持高精度低流量时通常使用这种泵。
- 连续泵：目前以这类泵最为常用。连续输送溶剂。往复柱塞泵和液压隔膜泵即属于此类泵。

高效液相色谱仪 (HPLC)
高压输液泵工作原理



一个双柱塞并联泵将流动相连续输入色谱柱，该泵工作时两个柱塞的相位相差 180° 。两柱塞交互工作时产生的脉动可降低总脉动。当一个柱塞工作将流动相输入色谱柱时，另一个柱塞工作将流动相吸入并充满泵腔。1090 型计量泵即属于双柱塞泵。

往复串联式泵

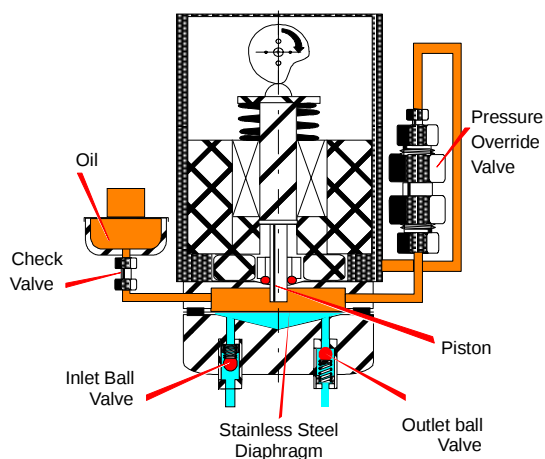


- 主泵吸液的速度为副泵的两倍
- 提供恒定的流速和溶剂通过柱子所需的压力

另一种使流动相脉动减少的方法是使用双柱塞串联泵。这种泵的主、副泵腔容积为 2: 1。当副泵将流动相输入色谱柱时，主泵吸液充满主泵腔。当副泵腔排空时，主泵不仅输液将副泵腔充满，而且也将流动相输入色谱柱。

高效液相色谱仪 (HPLC)
高压输液泵工作原理

隔膜泵

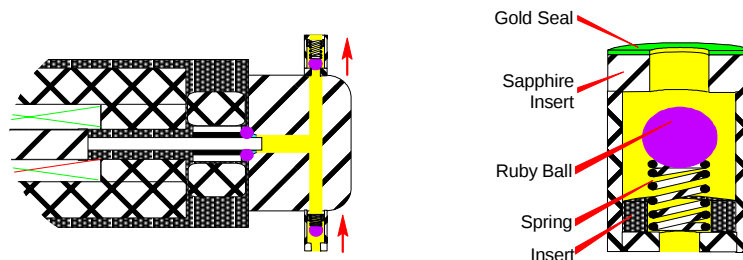


Agilent Technologies
Innovating the HP Way

12

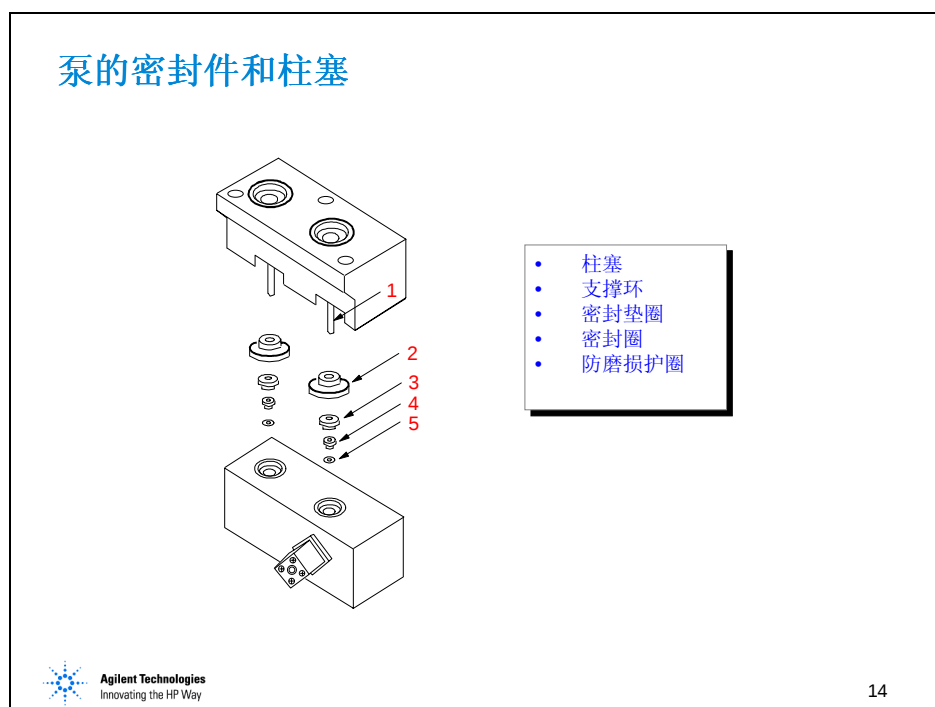
往复柱塞泵/隔膜泵具有在使用过程中使柱塞不与有害的流动相接触以及柱塞润滑较好的优点。不锈钢薄膜镀金的一侧储存油，另一侧则与流动相接触。当往复柱塞驱使油压迫隔膜时，流动相被输入色谱柱。当柱塞收回时，压力消失，则流动相进入隔膜下侧的泵腔。1090 型仪器使用这种泵，该泵可以产生足够的压力驱动流动相通过紧密装填的色谱柱。该泵的工作频率为 10Hz。

往复柱塞泵中的球阀

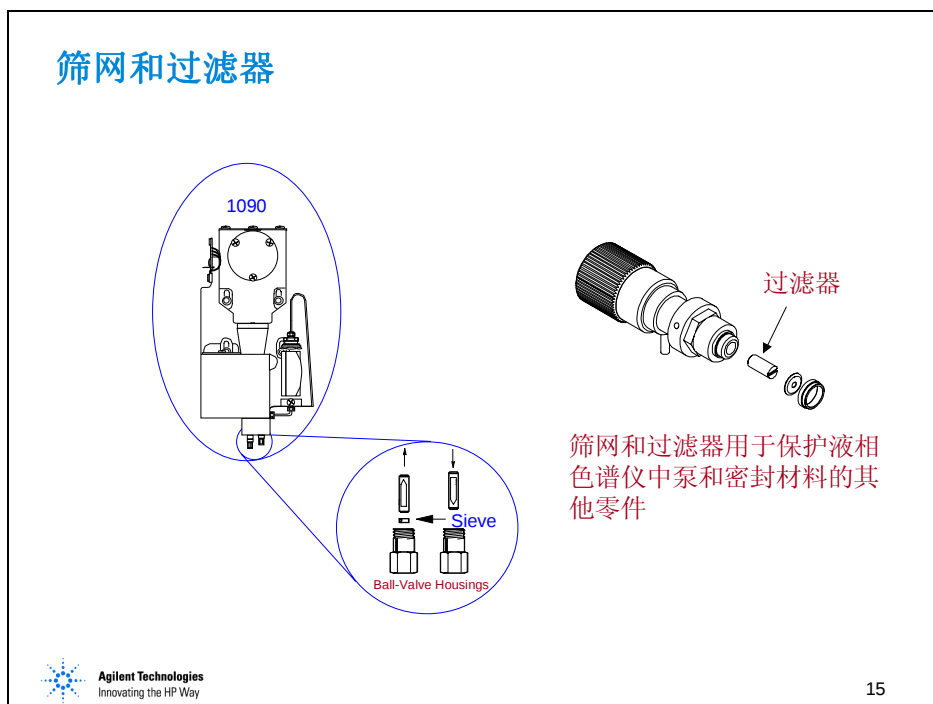


使用球阀或是逆止阀的目的是保证流动相单向流动。球阀的元素包括：一个蓝宝石的垫圈，一个红宝石的球阀和一根提供张力的弹簧。当柱塞运动从流动相储罐中吸入溶剂时，进口处的红宝石球阀被弹簧上顶，这样可以使溶剂充满溶剂室。出口处的红宝石球阀顶住垫圈，这样防止先前进入色谱柱的溶剂回流。当柱塞向前运动时，流动相推动出口处的红宝石球阀脱离垫圈。同时流动相推动进口处的红宝石球阀顶住垫圈防止流动相回流至储液容器中。

高效液相色谱仪 (HPLC)
高压输液泵工作原理



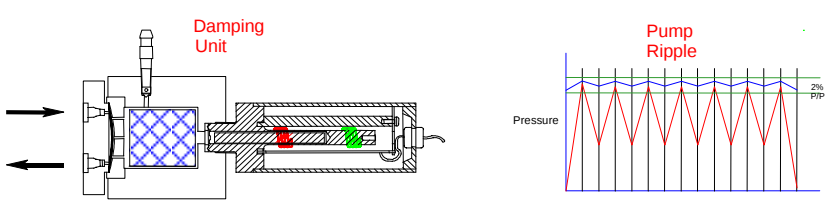
这些泵中的柱塞通常使用的材料为人造蓝宝石。必须定期检查是否有划痕。为保持保留时间和峰面积的重现性，必须定期更换柱塞的密封件。某些柱塞泵配有防磨损护圈，这样可以保护密封件并防止损坏其他零件。



大多数输液系统在进样器之前会配备一个在线过滤器或是过滤塞子。这个过滤器或是筛网可以滤去泵的密封件磨损产生的微粒，这样可以防止微粒损坏进样阀或是其它组件。必须定期更换在线过滤器。

输液系统组件

阻尼单元



The diagram illustrates the function of a damping unit in an HPLC system. On the left, a cross-sectional view of the damping unit shows a blue checkered chamber (labeled 'Damping Unit') containing a piston and a diaphragm. Arrows indicate the flow of liquid through the unit. On the right, a graph shows 'Pressure' on the y-axis and time on the x-axis. A red line represents the 'Pump Ripple', showing high-frequency, high-amplitude oscillations. A blue line represents the pressure after the damping unit, showing significantly reduced oscillations. A horizontal green line indicates the '2% PIP' (Peak-to-Peak) ripple level.

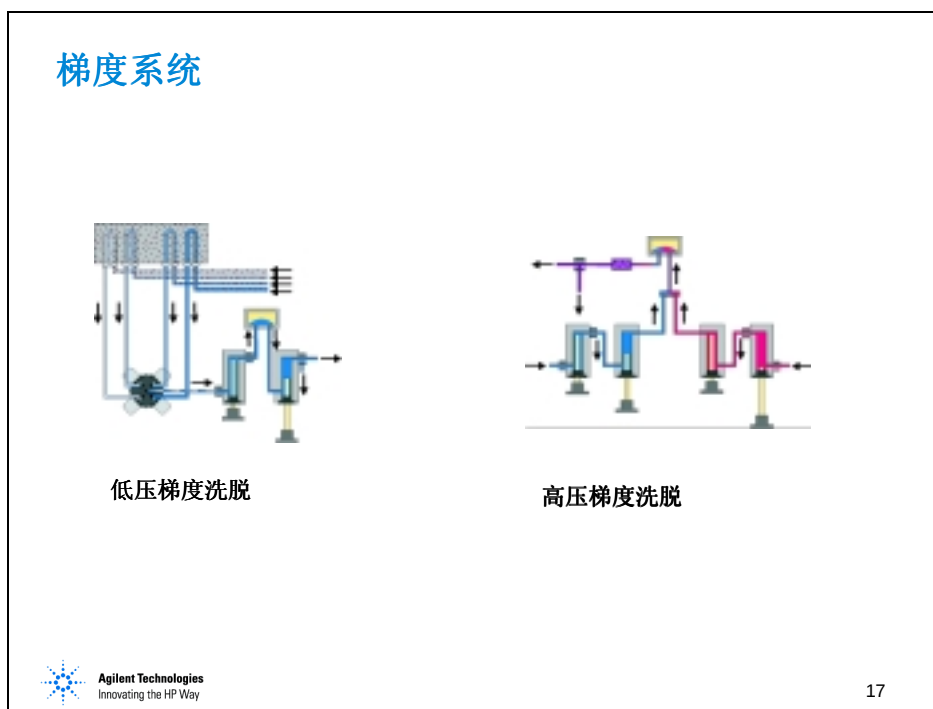
- 充满可压缩液体，用一片隔膜与流动相隔开。
- 压力波动值降至小于原值的 2%。

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

16

配备阻尼单元的目的是为了减少由于泵工作引起的压力脉动。阻尼单元由一片将流动相和可压缩液体隔开的隔膜组成。在双柱塞补偿泵中，隔膜位于主泵腔和副泵腔之间。

梯度系统



在分析过程中改变流动相组成称为梯度洗脱。通常在这个过程中溶剂洗脱强度逐渐增加。采用梯度洗脱具有以下优点：缩短分析时间，降低峰扩散，提高分离度。梯度洗脱可分为低压梯度和高压梯度，输液系统可以实现该功能。

低压梯度洗脱系统是在加压前将流动相混合。在我们所举的例子中，一个高速分配阀可以混合达四种溶剂组成流动相。如果冲程体积都经过适当调节可以实现高精度梯度洗脱。

高压梯度洗脱系统是在两台性能相同的泵后将溶剂混合，每台泵分别驱动一种溶剂。这种系统可实现高精度梯度洗脱，但是成本较低压系统高。决定这种泵实现高精度梯度洗脱的三个因素为：低的延迟体积，溶剂组成稳定性好，流速低。

总结:

总结:

总结

泵是保证 HPLC 仪器正常运行最重要的设备

HPLC 泵的性能参数:

- 流量精度
- 流量范围
- 延迟体积
- 压力脉动
- 流动相混合精度

分离效果的好坏与输液系统是否能实现精确稳定的流量有很大关系。准确的流量意味着保留时间的精确。没有可重现的流动相流量和组成, 就不能给出定量结果。

进样技术

进样器

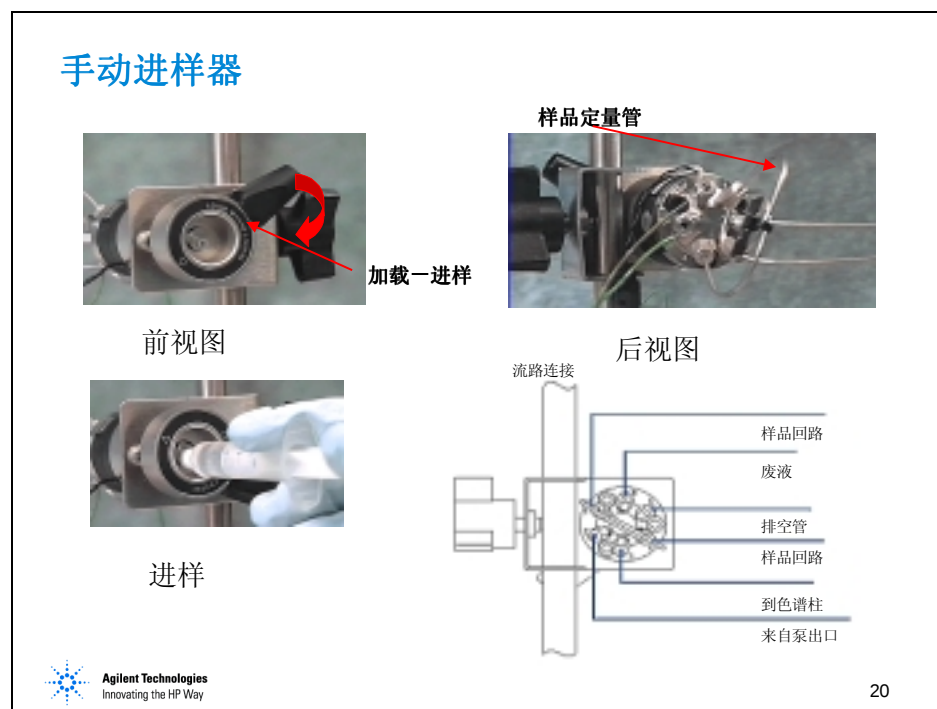
要求：

进样量重现性好

有两种主要设计部件：
自动进样器或手动进样器

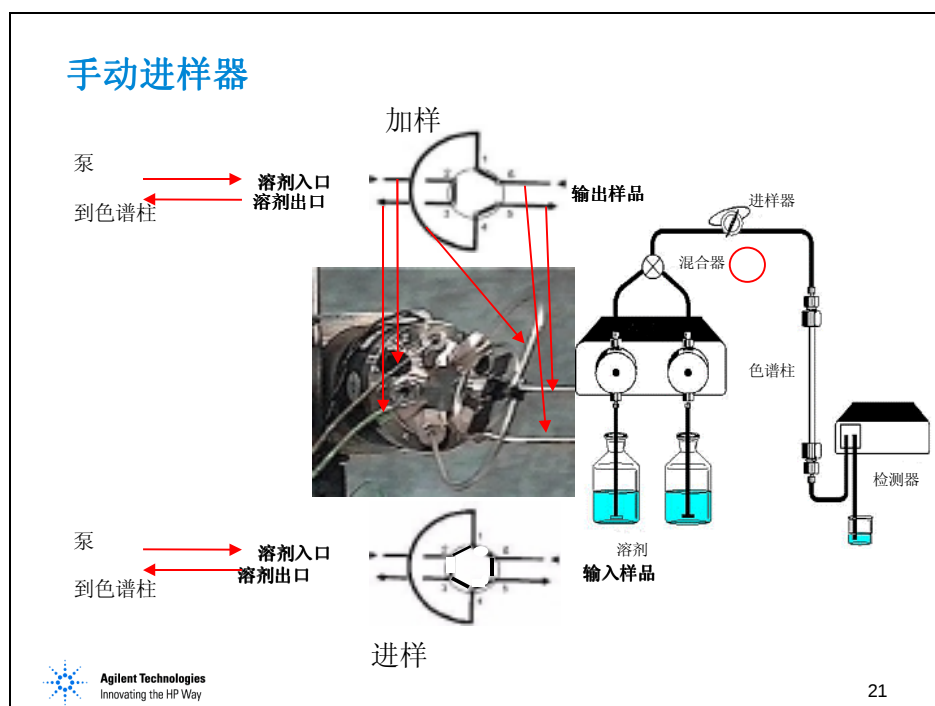
进样系统是将待分析样品引入 HPLC 色谱柱头的装置。进样时不能停止和干扰色谱柱中流动相的流动。为使 HPLC 实现定量的功能，进样器必须保证进样量精确。样品的记忆效应（样品携留）低。进样器主要有两类：一类是需要操作者在分析开始时手动进样；另一类为自动进样。现代的进样器又增加了一些功能如在线柱前衍生。进样装置具有加热或冷却功能。某些厂商也能提供抗腐蚀装置，如 1 N HCl 或 60% 甲酸溶液。

手动进样器



简单的手动进样器价格较低和操作简单，在一些实验室仍使用手动进样器。如果仪器使用不是很频繁，可以使用手动进样器。

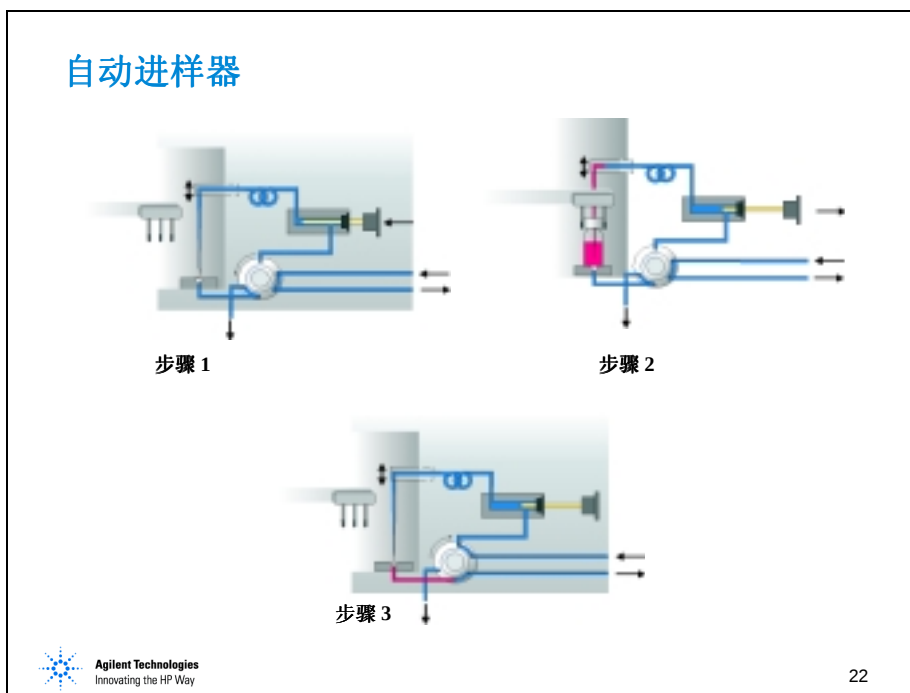
一个典型的手动进样阀有一个体积固定的样品定量管。进样时应送入 5 倍样品定量管体积的样品量，以保证样品在通路中不被稀释。使用合适的刻度精确的注射器（针头钝而平直）将样品注入进样端口。使用尖头的注射器容易划伤进样阀的转子。在常压下当样品定量管中充满样品时，将阀切换至进样位置则启动分析程序。此时样品定量管处于泵到色谱柱的流路上。泵输出的溶剂将样品定量管中的样品载入色谱柱。在运行过程中样品定量管被不断冲洗，以免一次分析和另一次分析之间的交叉污染。这种进样系统价格低。缺点在于：非自动化，注射器和定量管需手动清洗，不能自动柱前衍生，使用不方便。



上图说明了加样和进样的位置以及流路。在加样过程中，流路不通过定量管，直接从泵至色谱柱。用户必须加过量的样品，多余的样品被废弃。进样时，切换阀的位置，定量管成为流路的一部分，溶剂将样品冲至色谱柱的入口处。阀保持在进样位置，溶剂不断冲洗定量管。

每次进样后，应清洗注射器以防止分析之间的携留。在某些手动进样器中，注射器被插入进样端口。为防止样品泄漏，应定期更换聚四氟乙烯套管。进样阀的转子也需要进行定期维护。

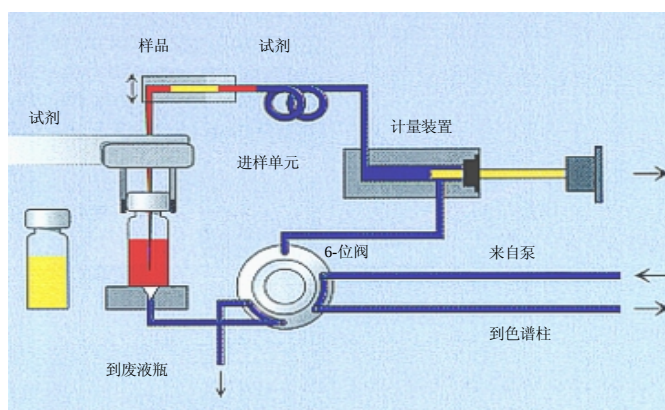
自动进样器



自动进样器中有一个与手动进样器中类似的机械驱动的六通阀。自动进样器通常使用压缩空气驱动或电力驱动。可分为定体积和不定体积两种。使用 1050 或是 1100 型仪器说明溶剂流路。进样器的计量装置可进样体积为 0.1 – 1.5 μL 。如果使用更大的定量管，进样体积可达 1.5 mL。进样前，流动相流经阀、计量装置、样品定量管、针、针座、针座毛细管，然后再次流经阀后流入色谱柱。进样后，切换阀位置则流动相可不流经进样器。进样针臂升起，样品瓶移至针下。取样针插入样品瓶，计量装置回缩取样，将样品注入取样针和定量管。在取适当体积的样品后，取样针升起，样品瓶回位。取样针插入针座，切换阀位置，使溶剂将样品载入色谱柱。

自动进样系统

自动进样前处理：

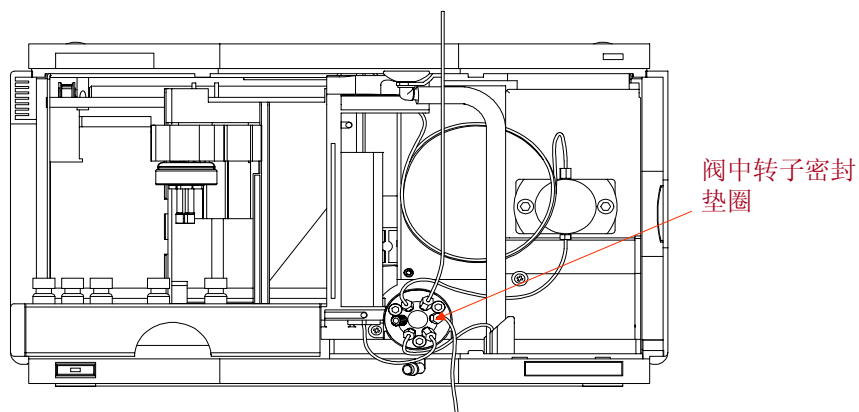


许多自动进样器系统的一个特征为可以对样品进行预处理。包括：在线柱前衍生、稀释小体积样品、加入内标。另外，用户可以增加加热装置，这样在样品衍生时可以加热样品。柱前衍生可以在某些无紫外吸收或是荧光吸收的样品分子上加入生色基团，这样可以提高检测灵敏度。

使用机械臂传输使一个样品瓶和几个反应瓶依次排列在针下。样品和衍生剂注入一段毛细管中混合并反应。计量装置的前后运动使样品与衍生剂混合，反应完成后把样品载入色谱柱。在技术资料（编号 5968-5658E）中柱前衍生的一个例子为使用 OPA（邻苯二醛）和 FMOC（9-芴甲基-氯甲酸酯）衍生氨基酸。使用 1100 系列 HPLC 仪可对蛋白质水解产物中的氨基酸进行灵敏和可靠的分析。

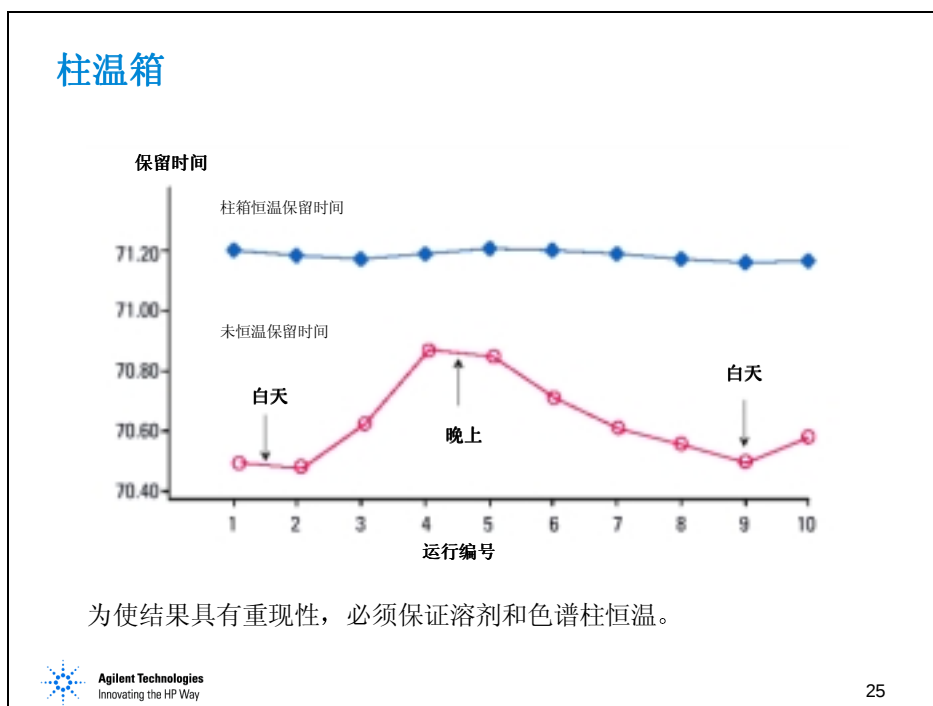
高效液相色谱仪 (HPLC)
自动进样器

转子密封垫圈



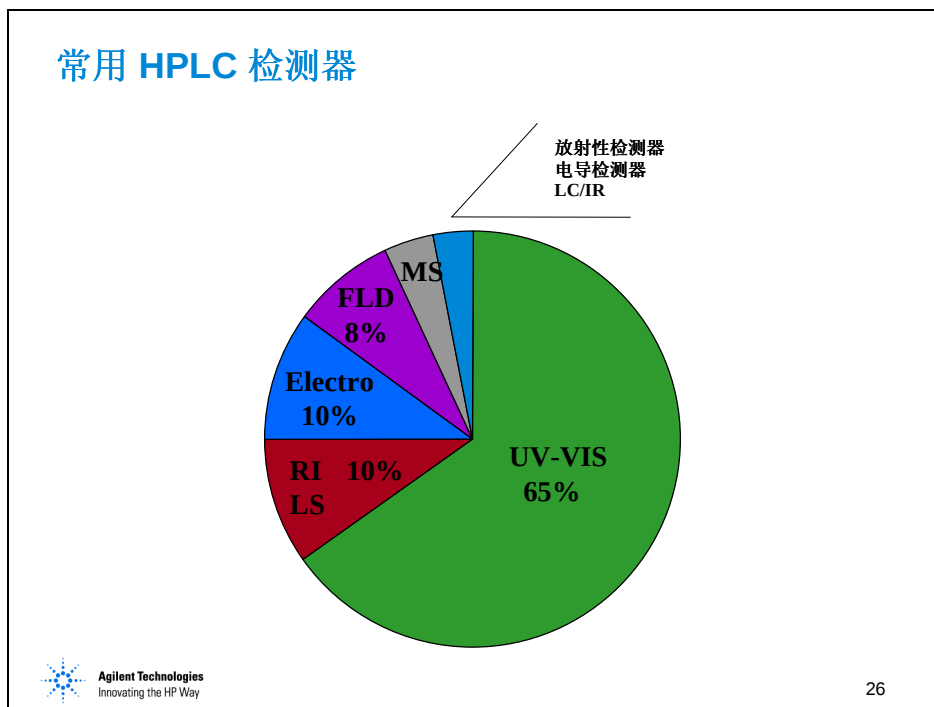
转子密封垫圈位于进样阀中。密封垫圈是一个开有流动相流路槽的圆盘。垫圈应定期更换否则会由于管道泄漏导致进样体积不能重现。

柱温箱



许多分离过程不仅受色谱柱材料和流动相影响，也受柱温影响。在这种情况下，柱温是否稳定成为洗脱顺序的决定因素。一个不受环境温度影响，使用珀尔帖 (Peltier) 控制的恒温柱箱可以确保稳定的色谱分析条件。如上散点图显示使用柱温箱和保持在室温下，24 小时内样品保留时间的周期波动状况。

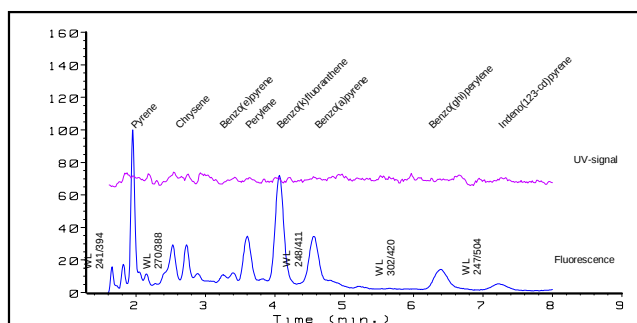
HPLC 检测器



最常用的 HPLC 检测器为紫外—可见光 (UV-VIS) 检测器。这类检测器受欢迎的原因包括其价廉，耐用，检测限低与易于使用。商品化的该类检测器包括单波长、多波长与二极管阵列三种类型。使用 UV 检测器可以用光谱确认某些分析物以及它们的代谢物和衍生物。

某些分析问题需要保证灵敏度和选择性，此时需要使用荧光、电化学或是质谱检测器。如果不能使用上述检测器或是样品浓度较高，可使用折光检测器。

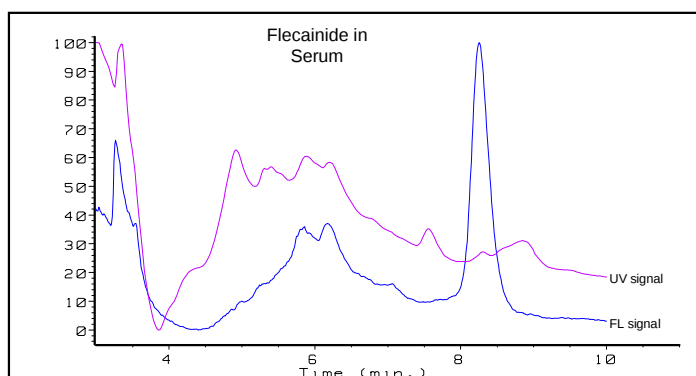
需要更多的检测器-提高灵敏度



PAH's extracted from soil;
Sup.LC-PAH 150x4.6mm;
Solv.: H₂O/CH₃OH= 10:90

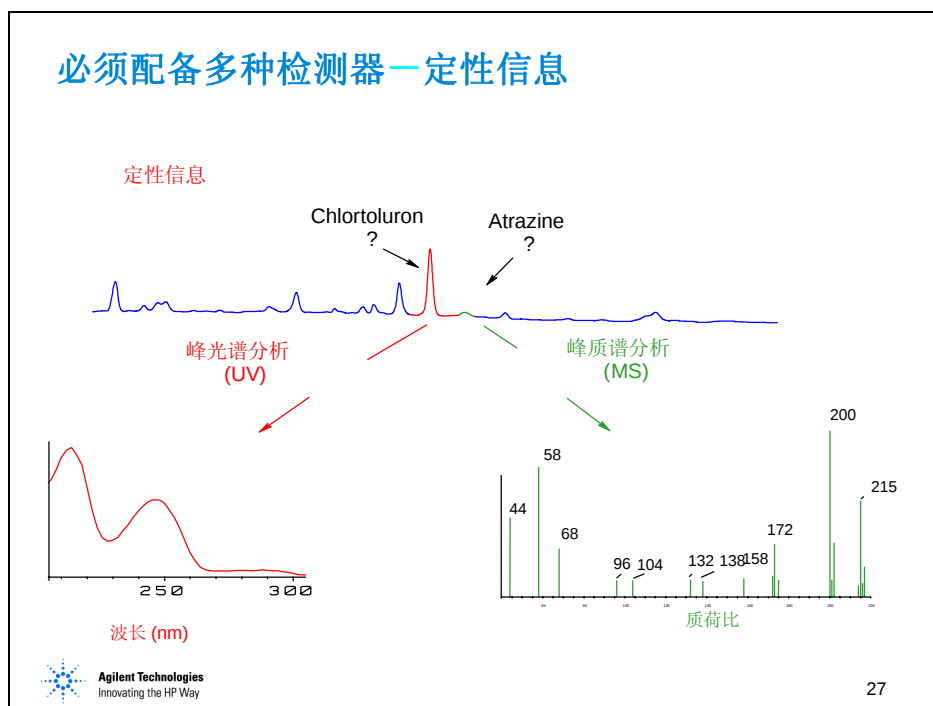
有许多种检测器适用于 HPLC。一般来说 UV - VIS 检测器是基本配置，同时也需要其它类型的检测器。一般来说 UV - VIS 检测器的灵敏度小于电化学和荧光检测器。在上面的例子中，使用 UV 检测器不能检测多环芳烃，此时可以换用荧光检测器。

必须配备多种检测器—提高选择性



Therapeutic concentration: 1.8mg/l, 20ul injected
UV and fluorescence signal

有时必须从复杂的基质中检测出痕量物质。我们定义检测系统的将某一种我们感兴趣物质从复杂的基质中检测出来的能力为选择性。对于干扰待分析物定量并与其同时洗脱物质不响应的检测器具有选择性。将 UV 检测器的波长设定与待分析物质吸收波长相适，则此时检测器具有选择性。然而使用该方法调整的检测器选择性不如荧光或电化学检测器。当使用色谱分离方法不能将待分析物与其它物质分开、且需对待分析物进行定量时，需要使用荧光、电化学或是质谱检测器。根据待分析物的性质与类别选择不同的选择性检测器。质谱检测器既可以在选择性（模拟模式）和通用检测器（扫描模式）之间切换。折光检测器属于通用型检测器。



通常可以使用某种检测器对一些未知化合物进行定性。在气相色谱分析中，可以使用质谱检测器进行定性。目前还没有例行分相用的 HPLC/MS 用以进行定性分析。二极管阵列、质谱、红外检测器已越来越广泛应用于定性分析。

高效液相色谱仪 (HPLC)
HPLC 检测器

HPLC 检测器性能参数

检测器性能参数:

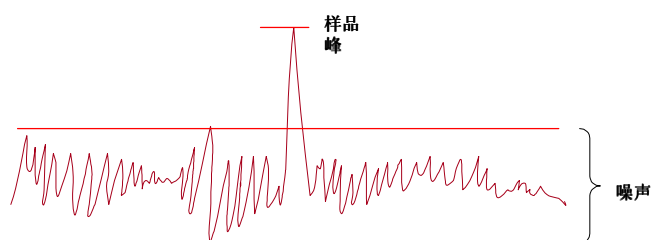
- 灵敏度 (LoD, LoQ)
- 选择性
- 线性
- 定性信息
- 可靠性
- 易用性
- 通用性

在选择 HPLC 检测器的时候，将一个方法对检测器的要求和检测器的规格和性能参数对照。可能需要同时使用 2 种串联的检测器。

检测器性能参数

LOD

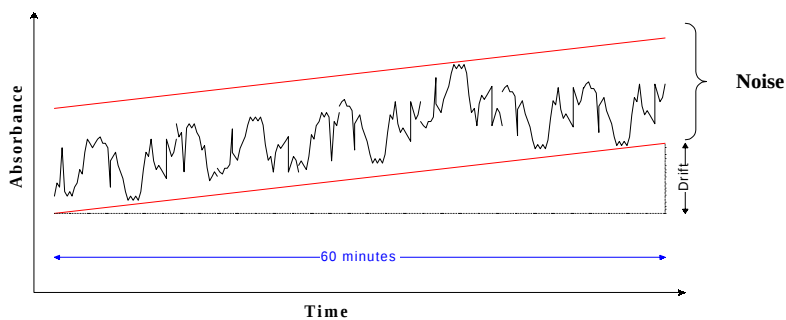
检测器的检测限可以用给定条件下的一个分析物的信噪比 (S/N) 来表征。



一个对于任何检测器都重要的参数是在一次给定的分析中对特定分析物的灵敏度。仪器区分分析物的真实响应和噪声的能力用信噪比表示。整个色谱系统，包括分析物的响应，样品的组成，流速和柱温等都会影响检测限。分析系统对一个特定的化合物的灵敏度叫做检测限。检测限的定义是能产生背景噪声的均方根的三倍的信号的样品浓度。

检测器噪声 - 漂移

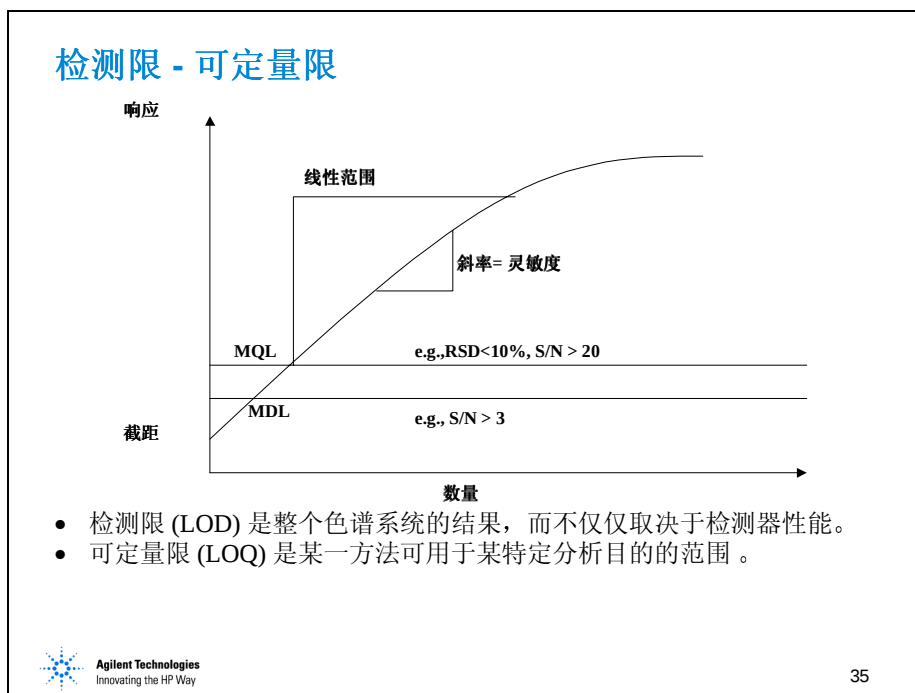
- 噪声 是检测器信号的所有随机波动的振幅。
- 漂移 是噪声包络的平均斜率，用 AU/h表示。



从一个信号的一个选定的时间范围内确定噪声的一些一般性的方法：

- 1) 噪声是漂移的线性回归的标准偏差的 6 倍。
- 2) 噪声是从峰到峰来测量的（噪声= 最大峰值 – 最小峰值）。

漂移是线性回归的斜率。噪声可以用化学工作站和系统调试报告自动计算出来。



上图中标明了检测器的四个重要的性能指标：LOD，LOQ，线性范围和灵敏度。检测限 LOD 常常定义为系统噪声水平的 2 到 3 倍。LOD 的值可以通过将一个样品直接注射到检测器得到。对于食品添加剂，比如抗氧化剂，如果能选择最佳波长以适应尽可能多的化合物的消光系数的话，LOD 可以低到 100 pg。荧光和电化学检测器能达到在非常低的皮克级。连接到 HPLC 上的质谱检测器的 LOD 取决于使用的接口的类型。带电喷雾接口的仪器可以检测到皮克级。折光检测器一般适用于大于 500 ng 的情况。

LOQ，定量限，定义为噪声水平的 10 到 20 倍。UV 检测系统可以用于最低每次注射 500 pg 的定量。

检测器响应可以用动态范围和线性动态范围表示。动态范围是可产生可被记录的测量信号（比如吸光度）的最大和最小的浓度比。然而，线性动态范围，即能产生线性的检测器信号的溶质浓度范围，更加常用。在这个范围内，将响应信号对浓度作图应该得到一条直线。整个动态范围一般只有 10 分之 1 的响应是线性的。UV 检测器的线性范围最大能有 5 个数量级。荧光和电化学检测器的线性范围只有 2 个数量级。质谱检测器的线性范围有 3 个数量级，RI 检测器的线性范围最大 4 个数量级。

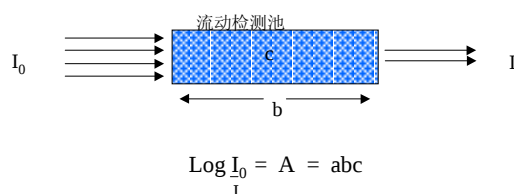
灵敏度正确地定义为校准曲线的斜率。它表明了系统能准确区实际含量的能力。斜率越小越灵敏。

上图总结了 LOD/LOQ，线性范围和灵敏度的定义。

UV-VIS 检测器

UV-VIS（紫外-可见）检测器

原理: 检测池的透光率和溶质浓度成正比，符合比尔定律。



特点: 特异性，浓度敏感性，稳定性好，有梯度洗脱的能力。

特性: UV-VIS 光谱能力（二极管阵列技术）。

UV-Vis 检测器是最常用的检测器之一。紫外可见检测器可以用于定量，因为吸光度和分析物浓度成线性关系。这种关系就是比尔定律。上图中的公式中的参数的意义分别是：

I_0 – 进入流通池以前入射光强

I – 透过流通池的光强

A – 吸光度

a – 吸光系数，表征吸收介质性质的比例常数

b – 流通池长度

c – 吸收介质的浓度

将信号强度或面积对浓度做图后，根据比尔定律，分析工作者可以做一个校准表，并确定未知物的浓度。在校准曲线的线性范围内确定分析物的浓度是可行的。

生色团的波长

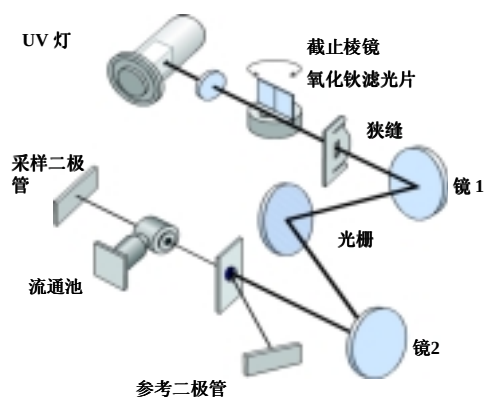
生色团	结构式	$\lambda_{\max}(\text{nm})$
胺	- NH ₂	195
乙烯	- C = C -	190
酮	: C = O	195
酯	- COOR	205
醛	- CHO	210
羧基	- COOH	200-210
硝基	- NO ₂	310
苯基		202, 255
萘基		220, 275

UV-Vis 检测器的检测波长从 210 nm 到 850 nm（使用钨灯光源）。碳碳单键和碳氢键的电子对结合紧密，激发它们需要的能量相当于波长小于 180 nm 的波长。这种类型的电子对检测是无用的。外层未分享电子可能有吸收峰，比如硫，溴和碘就有外层未分享电子。有机分子中的双键和三键电子相对容易被紫外光激发。因此，有不饱和和芳香性的化合物一般有对检测有用的吸收峰。某些官能团的大致波长范围列在上面的表中。

UV-VIS 检测器 - 设计原理

可变波长检测器

- 可单波长检测或多波长检测
- 自动采用氧化钛滤光片进行波长校准



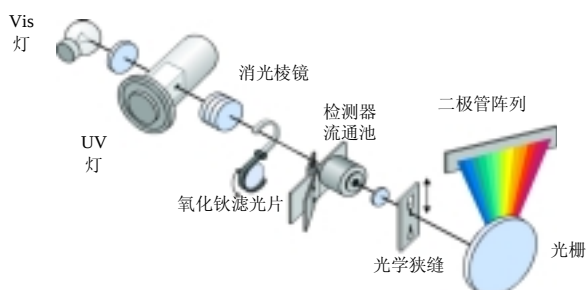
上图是传统的可变波长检测器的光路图。氘灯发出的多色光被球面镜和平面镜聚光到单色器的入口狭缝。单色器只允许很窄的波长范围的光通过出口狭缝。

从狭缝中出来的光穿过流通池，部分光被池中的溶质吸收。

样品的吸光度是通过测量未透过样品的光（空白参比）照射在光电二极管上的光强和透过样品的光强得到的。

许多多波长检测器可以时间编程，可针对一个色谱分析流程中的每个峰进行编程。为了测量一个化合物的光谱，需要停止流动相的流动，将要测量的物质保留在流通池中。然后扫描整个波长范围。

可测光谱的UV-VIS 检测器

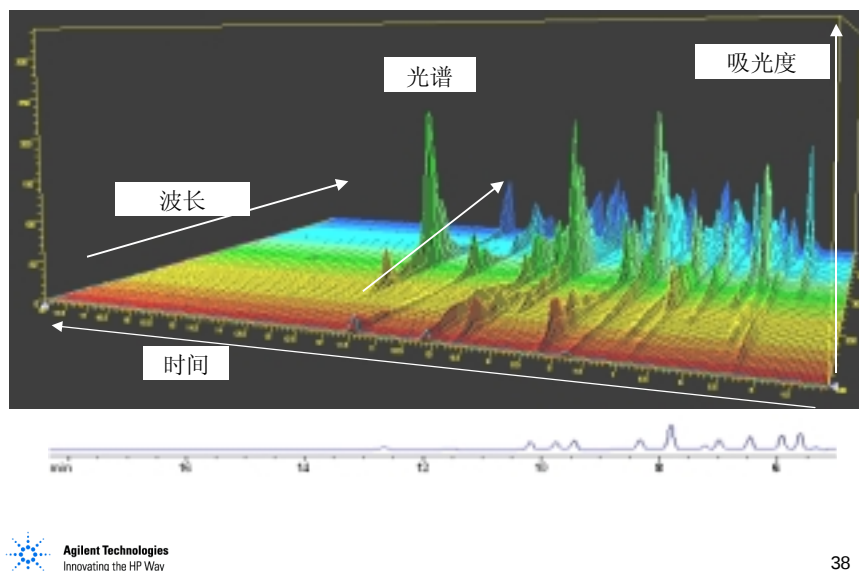


- 二极管阵列 UV-VIS 检测器允许在线测量光谱，波长范围 190 - 900 nm。
- 波长分辨率：到 1 nm。
- 用氧化钛滤波片进行波长校准。

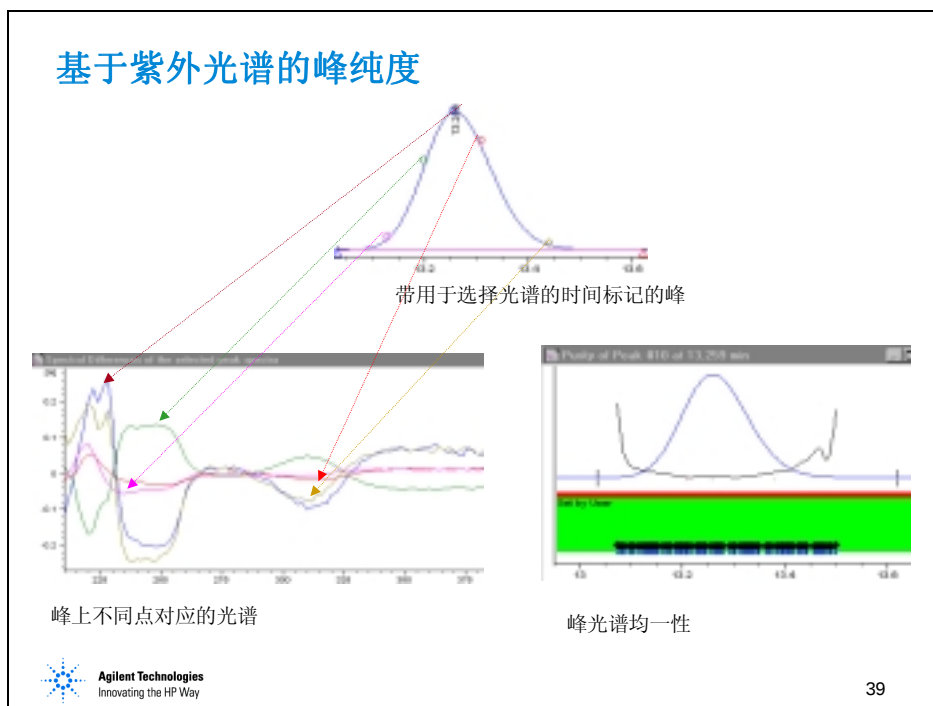
二极管阵列检测器能够提供单波长或者多波长同时检测。这种检测器还能为峰纯度分析存储光谱，检索谱图库和产生提取的信号。上面是 1100 二极管阵列的示意图。组合的钨灯和氘灯能产生 190 到 850 nm 的光。光平行穿过流通池，然后穿过一个机械控制的狭缝。光被全息光栅分成单波长的光。每个光电二极管接受一个不同的狭窄波段的光。大致每 12 毫秒采集一个完整的光谱，产生信号并存储。

在这个例子中，阵列包括 1024 个二极管，每个二极管测量一个不同的狭窄波段的光。于整个波长的范围内测量光强的变化得到了吸收光谱。入射光栅可以设定为从 1 到 16 nm 如果希望得到最高的灵敏度，狭缝宽度可以设为 16nm。如果期望得到最大光谱分辨率，就用窄的狭缝宽度。

在线光谱 - UV-VIS 检测器

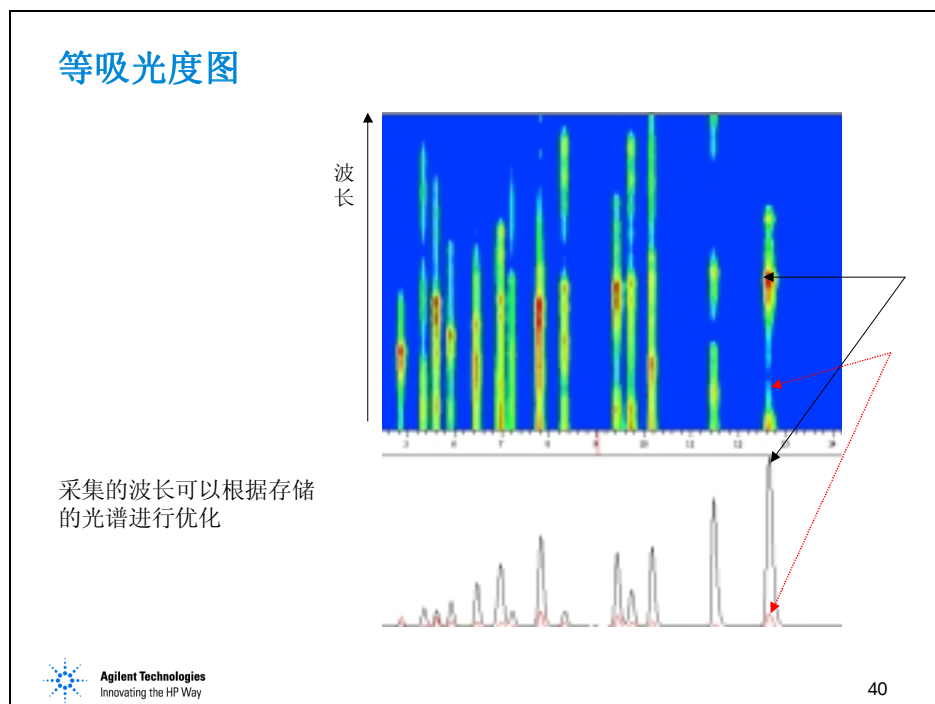


结合适当的数据评价软件的二极管阵列检测器是一种强有力的实验方法优化工具。例如，可以多波长同时监测以达到对多分析物（包括未知分析物）的最佳检测和定量。波长优化工具可以用于确定波长最大值。三维光谱是很容易得到的。二极管阵列检测器的获取和存储紫外光谱的能力使得可以生成电子光谱数据库，数据库可以用于样品中某种化合物的定性。比较一个色谱峰范围内的光谱，可以确定峰纯度。



如果分析员在峰流出的过程中收集存储了足够多的数据，数据系统可以帮助确定色谱峰是否不纯。在色谱峰流出的过程中光谱被平均。然后，色谱峰的每个光谱都和平均得到的光谱进行比较。在将谱图按照浓度标准化后，谱图的差异应当不大。如果色谱峰的谱图不同，峰中就含有不纯物。如果色谱峰在不同时间的光谱相同，那么峰可能是纯的。（注意：杂质可能不产生紫外吸收，因此如果你正在收集特定的流出组分用于别的目的，你应当考虑这种可能性。）

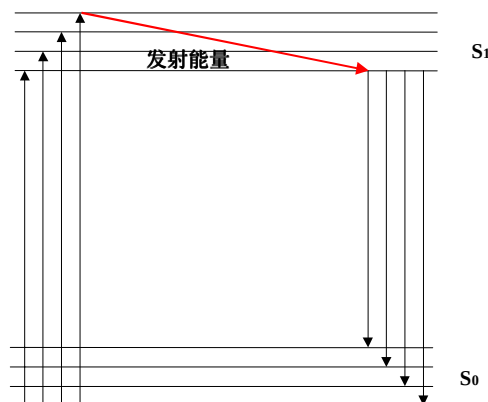
高效液相色谱仪 (HPLC)
UV-VIS 检测器



你可以从上图中看到一个等吸光度图的例子。等吸光度图提供了一个吸光度对时间和波长的数据矩阵。这种工具可以帮助分析员确定某一方法的最佳检测波长或者单个或多个色谱峰的最佳强度。

荧光检测器

荧光检测器的原理



S₀...电子的基态能级

S₁...被外来能量，比如UV光(短波长 / 激发 WL)激发后的激发态电子能级



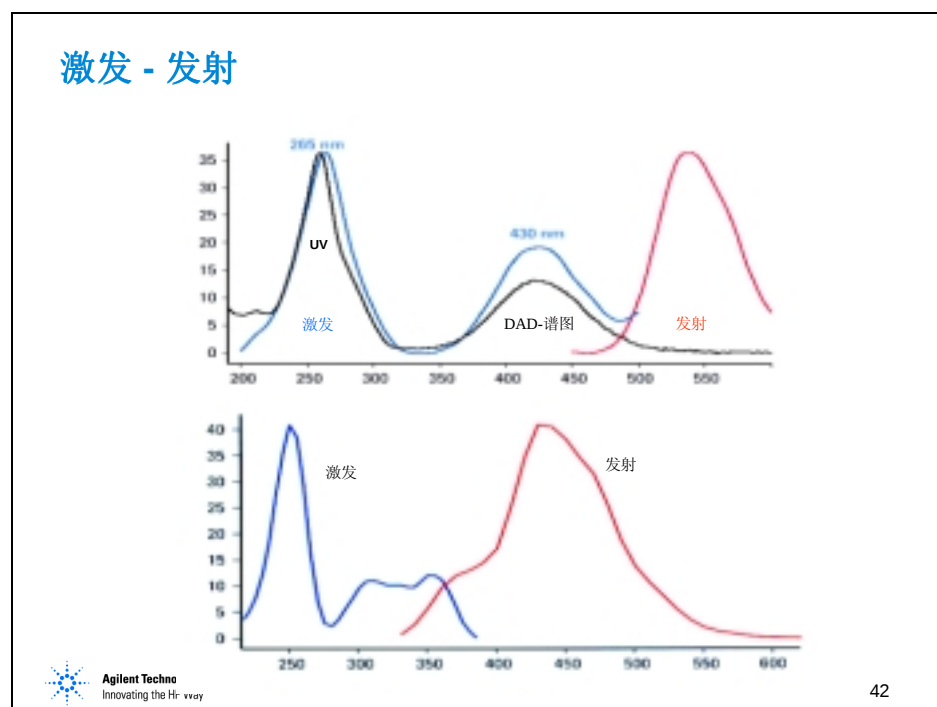
41

荧光是发光的一种特殊类型。它是特定的分子将以前在激发过程中吸收的能量释放出来的过程。发光检测器比某些检测器，比如 UV 检测器灵敏度高，因为不是每个分子都能吸收能量并且能释放能量的。激发和发射波长对一定的分子是有特异性的。

由于较低的背景噪声，荧光检测器比吸收检测器更加灵敏。大多数荧光检测器被装配在与入射光柱成一定角度（一般是直角）的方向上记录荧光。这样的装置降低了杂散的入射光作为背景信号干扰检测的可能性，保证了达到灵敏的检测水平的最大的 S/N。

只有大约百分之 10 的有机分子带有荧光基团的结构。荧光基团使得分子可以吸收一定波长范围的光。吸收光将电子激发到激发态。这个过程就象含有生色团的分子有颜色一样。荧光分子能够将吸收的能量以比吸收光的波长高于吸收光形式发射出去。

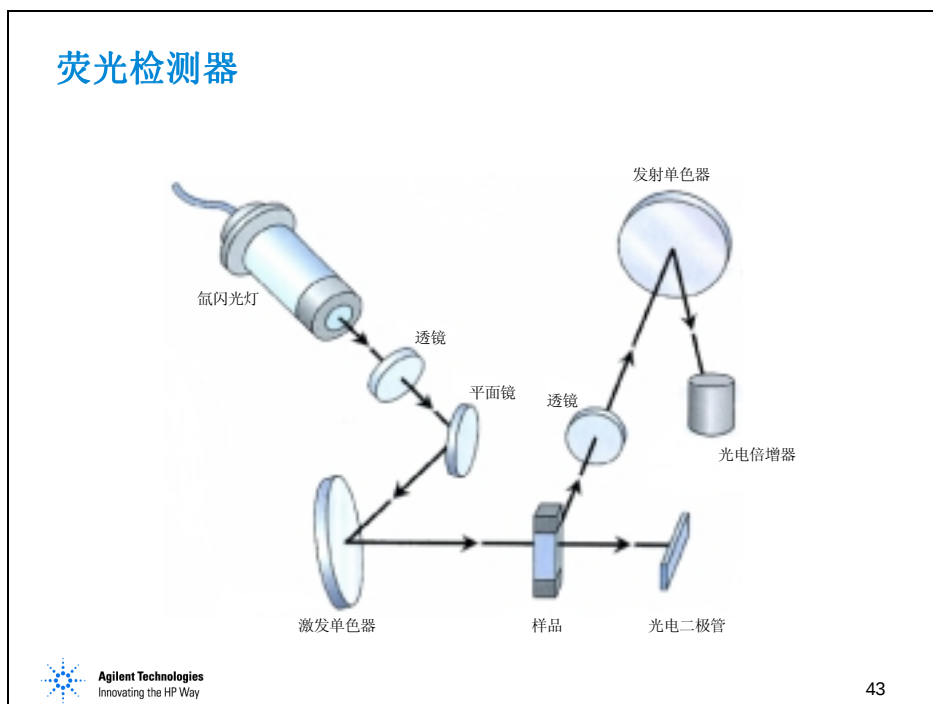
如果在改变激发波长的时候，荧光强度被记录下来，并且发射光波长固定，就得到了激发光谱。



优化检测限和灵敏度

为了优化检测限和灵敏度，分析员必须了解要分析化合物的荧光性质。可以选择合适的激发和发射波长以达到最佳的检测限和灵敏度。一般而言，不同仪器得到的荧光光谱可能有显著的不同。这取决于使用的硬件和软件。

传统的方法是从和荧光激发光谱相似的 UV 光谱中提取合适的激发波长，然后记录发射光谱。再根据获得最佳发射波长，得到激发光谱。针对每个化合物，这个过程必须要在使用荧光分光光度计或者在 HPLC 的停流条件下反复的做。一般，每个化合物都需要分别进行一次。结果，每个化合物得到一组激发和发射光谱。由于这个过程很烦琐，只有当被分析组份数目较少的时候才用这种方法。



一盏氙闪光灯提供在紫外范围内激发的最大光强。氙灯只点燃几微秒以提供光能。每次闪烁使得流通池内的样品发出荧光，在色谱图上产生一个单独的数据点。由于灯在检测器的大部分工作时间内是关闭的，它的使用寿命可以达到几百个小时。氙闪光灯无须预热以达到稳定的基线。一个全息光栅作为单色器将氙灯发出的多色光分散。需要的波长被聚光到流通池产生最佳激发。为了减少从检测器激发一侧来的杂散光，光路被装配到在与入射光柱成直角的方向记录。另外一个全息光栅作为发射单色器。这两个单色器都在可见光范围内有最佳的光通量。光电倍增管是测量低强度发射荧光的最佳选择。

由于闪光灯本身每次闪光的强度的差异，一个基于光电二极管的参考系统测量激发光的强度然后触发检测器信号的补偿系统。由于大多数最大发射高于 280 nm，一个截止滤光片（图中没画出）阻止低于这个波长的杂散光进入到发射光单色器的光路。固定的截止滤光片和一定的带宽 (20 nm) 避免了硬件的检查和包括一个带有可拆换的滤光片和狭缝的仪器所需的文档工作。

荧光检测器

激发和发射单色器能够在信号和光谱模式间切换。在信号模式，它们被移动到一个特定的位置，这个位置对应于需要的波长，这就象一个传统的检测器。由于所有的数据点都是在一个激发和发射波长处得到，这种模式提供了最低的检测限。

光谱模式用于得到多信号或者光谱信息。闪光灯的点燃与光栅及激发或者发射单色器的转动是同步的。用于光栅的马达技术是长寿命的，就象 PC 高速硬盘一般用的马达技术一样。当光栅旋转到达一个正确的位置时，氙灯被点燃，发出一个闪光。闪光持续时间小于 2 毫秒，光栅的转动花的时间少于 14 毫秒。由于单色器跟着转动，光谱模式的灵敏度损失比传统的双波长 UV 检测器少很多。

荧光检测实用入门

- 只有对稀溶液荧光是线性的。
- 由于发射光的测量是在 90 度角进行的，而且通过光栅选择一个检测波长，检测是非常灵敏的。
- 某些化合物可能淬灭荧光，造成灵敏度的降低（如 O₂）。
- 不能用在激发波长有吸收的溶剂。
- FLD 检测器或多或少的不受流速和温度改变的影响。
- 选择性检测器

荧光检测的应用范围很广。有些分析物可以衍生化用于荧光检测。

例如：氨基酸分析或者别的用邻苯二醛衍生化后的胺一些其他的衍生试剂如下所示。

官能团	试剂
-NH ₂	o-Phthalaldehyde（邻苯二醛）
-NHR	9-Fluorenylmethylchloroformate （9-芴基甲基氯代甲酸酯）
-COOH	p-Bromophenylacetyl bromide（p-溴苯基酰基溴）， 2-Naphthacetyl bromide（2-萘酰基溴）
-OH	Phenylisocyanate(苯基异氰酸)
-CHO, =C=O	2,4-Dinitrophenylhydrazine(2,4-二硝基苯肼)
-CO-COOH	2,4-Dinitrophenylhydrazine(2,4-二硝基苯肼)

电化学检测

电化学检测原理

- 这种检测技术用于可被氧化或还原的化合物

- 例如：

苯环上的羟基

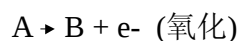
NH(x) 基

SH- 基

- 操作模式：

氧化或还原

- 电化学反应：



47

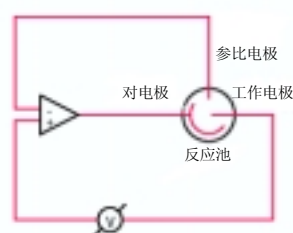
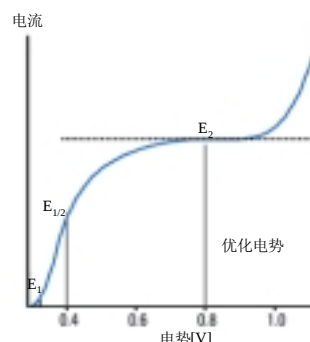
电化学检测是基于在氧化还原中的电子转移：氧化过程中分子给出电子，还原过程中分子得到电子。氧化还原在称为工作电极的表面上进行。

无论化合物被氧化或还原，以及反应的速度依赖于工作电极和包含溶质的溶液的电势差。根据能斯特方程确定的氧化还原电势和活化能的关系，可以确定反应速率。氧化还原电流正比与电极上发生的反应的数目，反应的数目又是界面附近被分析化合物的浓度的量度。

电化学检测原理

氧化方式：
电子从化合物向电极转移。
工作电极 = 阴极

还原方式：
电子从电极向化合物转移。
工作电极 = 阳极



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

46

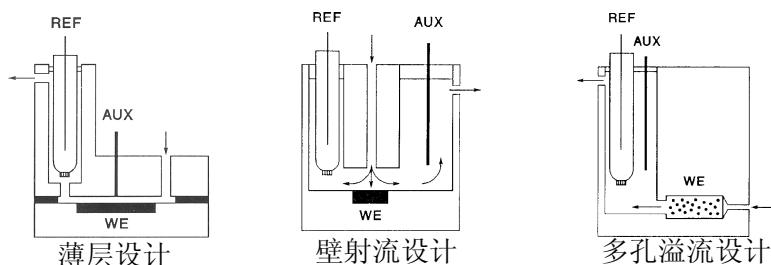
在检测过程中，使用三个电极：工作电极，电化学反应发生在该电极上；对电极，和工作电极构成电极对，所加电压为流动相和工作电极间的电势差；参比电极，对洗脱液电导率的变化进行补偿。参比电极读数反馈到对电极，以便峰洗脱过程中电流通过工作电极的时候保持恒定的电势差。

检测器的响应由电流的放大和后续的信号转换产生。应用当今先进的电子技术可以测量皮克量级甚至更小量被分析物产生的相当低的电流。尽管电化学检测器只能检测那些具有电化学活性的物质，但在分析复杂的食品样品时这种局限事实上又成为一大优点，因为它提高了检测的选择性。

为了决定最优的工作电极电势，对于每一个化合物都需要考察检测器响应（电流）和所加电势（电压）的关系，作出如上所示的电流-电压 (CV) 曲线。

在电势低于 E_1 时，因为所提供的能量的不足，氧化反应不能发生。电势增加到 $E_{1/2}$ 时，将电解一半在电极表面的分子。最大响应需要一个仅略高于 E_2 的电势。这一电势对应的电流为极限电流 (limiting current)，电压的进一步提高将会增加噪音而影响检测过程。

电化学检测器



- 金电极可用于检测烃类
- 铂电极可用于检测亚氯酸盐、亚硫酸盐、肼等
- 碳电极可用于检测酚类和胺类
- 银电极可用于检测氯化物、溴化物和氰化物

流通池的外观

文献中已经描绘了大量流通池的设计图案。大多数可以归为三种主要类型之一：薄层设计 (thin-layer design)，壁射流设计 (wall-jet design) 和多孔溢流设计 (porous flow-through design)。多孔溢流池设计和另两种有着显著的差异，这种设计保证电量检测过程中电极表面的反应产率为 100%。其它设计中使用电流检测，只有 1-10% 的效率。电流检测通常更加灵敏，相对于电量检测是首先考虑的选择。大多数电化学检测器可以使用 1 微升的流通池，非常适合于细内径的 HPLC。

电极材料

工作电极可以使用好几种材料，最常用的是玻璃化的碳。这些材料还包括金（用于测定糖类和醇类），铂（用于测定亚氯酸盐，亚硫酸盐，肼和过氧化氢），银（用于测定卤素），铜（用于测定氨基酸），汞（用于还原模式下测定硫代硫酸盐）和金汞齐（用于还原模式下测定含氮有机物）。

ECD检测的优点和局限

优点:

- 高选择性
- 高灵敏度

局限:

- 来自 HPLC 系统的金属离子 (Fe, Ni等) 都会影响检测
- 不能使用梯度法
- 受流速和温度的变化的影响
- 是一种娇气的检测器，需要时间平衡和稳定，而且需要进行专门的清洗



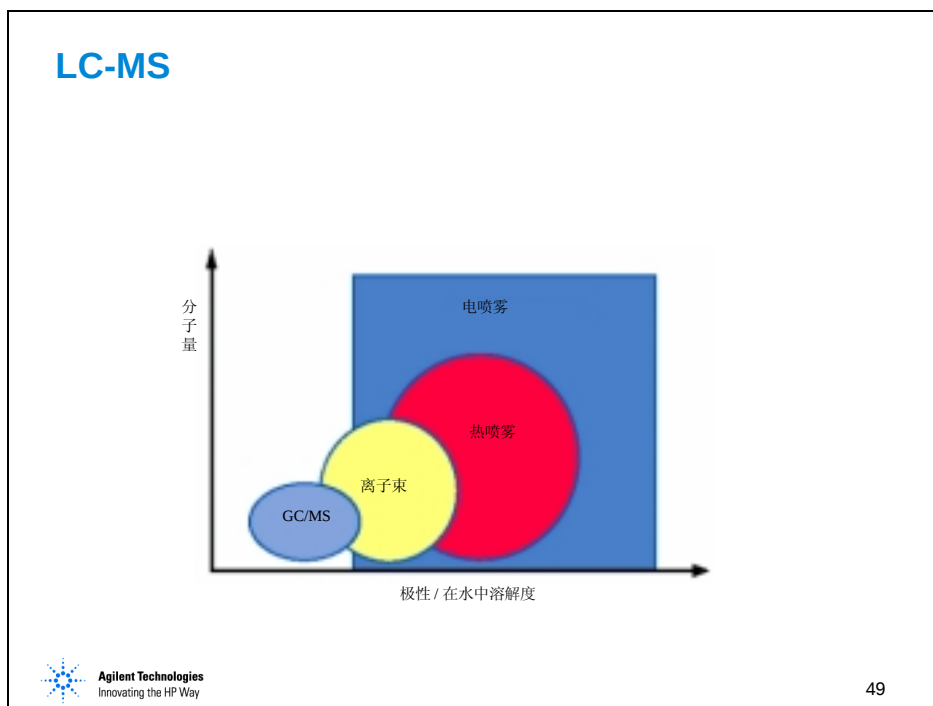
50

常规应用

直到最近，电化学技术仍被认为难于应用而且用于常规分析时不够稳定。然而，最近的一些进展使得这些检测器可以用于常规分析，例如临床研究中儿茶酚胺的分析和实验室中的常规检测。

在测定间隔中，甚至峰洗脱过程中（例如使用金电极的糖类分析）使用基于脉冲电流分析的自清洗过程可以提高稳定性。

尽管可以通过评价混合物中每一种化合物的伏安图来决定最优电势，实际上这些优化步骤可以通过使用所谓自动增量模式自动完成。HPLC 仪在一个增加的电势范围下（由起始电势、中止电势和增量参数确定）进行一系列的进样，在此过程中，漂移传感器保证在下一次分析开始时保持相同的指定阈值。



复杂样品的鉴定成为 LC 分析中的一个难题。共流出物通常可以用使用二极管阵列技术的 UV 吸收检测器来鉴定，但当光谱差异较小时这种方法就不够特异。荧光等检测技术可以提供比 UV 检测更高的特异性，但如果同时检测许多不同的化合物，这些技术同样不能提供令人满意的结果。

使用质谱检测器，可以有较大把握鉴定几个不同的分析物种类。虽然 GC/MS 对于食品分析已经是一个很完善的技术，但现在 LC/MS 在此领域仅是刚刚出现的一个有力工具。基于 GC 的分析仅适用于那些挥发性的，热稳定的化合物。然而许多化合物是不易挥发的，具有较高的极性，或者是热不稳定的。这些化合物常可以使用 LC 成功进行分离，而且改进的 LC/MS 接口的出现使得 LC/MS 更加常用。

然而质谱检测器和 GC 仪的连接要比和 LC 仪连接容易得多。此幻灯显示了 LC 和 MS 不同的操作条件。早期的研究试图使用直接的液体进样和移动带接口连接 LC 和 MS，但这些方法被证明是低效而且不可靠的。在 80 年代，热喷雾和粒子束接口改善了 LC/MS 的应用范围和可靠性。然而，低灵敏度、窄的质量和极性范围以及频繁的维护需要限制了这些接口的有效性。最近，两种大气压电离接口——电喷雾和大气压化学电离——已经几乎完全替代了热喷雾和粒子束技术。这些接口有着较宽的分析物质量和极性范围，高灵敏度，改善的可用性和较少的维护需要。合适的 LC/MS 接口的选择决定于被分析物的极性、分子量和热依赖性等因素。

大气压电离 – MS的方式

电喷雾电离:

电离过程中施加电场以产生带电的小液滴，接着在离子蒸发过程中产生被分析物离子用于MS分析。充气的雾化器允许1mL/min的流速。

大气压化学电离:

气相化学电离 (CI) 过程溶剂作为化学电离试剂使样品离子化。



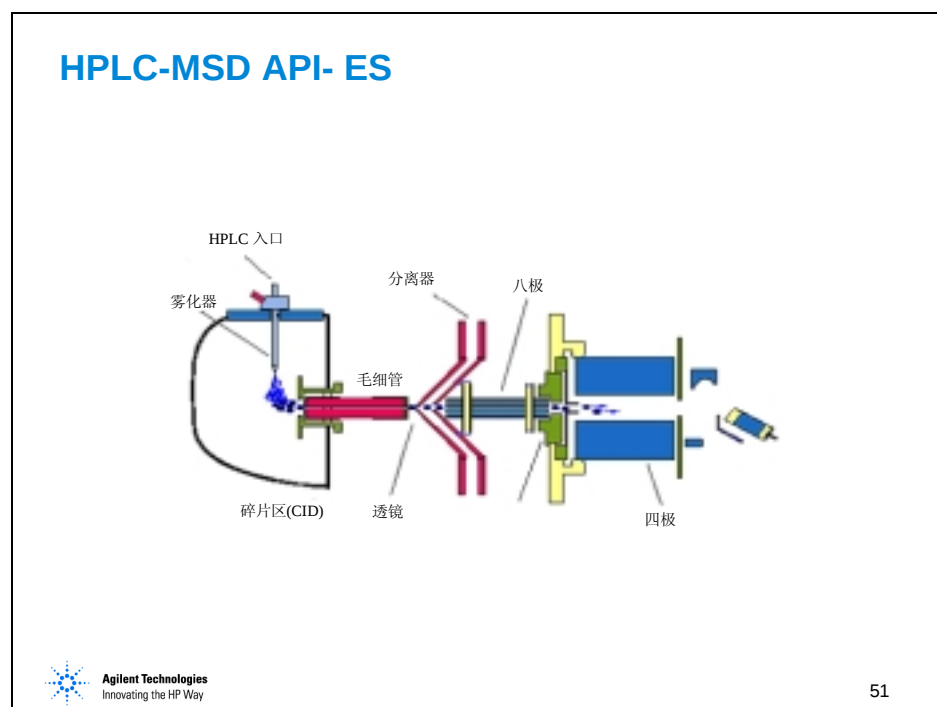
50

有两种方式的大气压电离（最流行的 LC/MS 技术）：电喷雾和大气压化学电离。这些经常补充的技术使分析大范围的样品成为可能。

电喷雾电离是一个从收缩的带电小液滴中排斥出带电离子而实现离子化的过程。当离子在洗脱液中预先形成时可以提高灵敏度。API-ES 常以压力辅助，以便可以较容易地处理较高的 LC 流速。API-ES 常用于易形成多电荷离子的样品诸如蛋白质、多肽和寡核苷酸的分析，也可以同时分析单电荷的小分子。

大气压化学电离是一个使用电晕放电使被分析物和流动相在气相中电离的大气压电离技术。因为这一技术需要一定的挥发性，因此最适合于具有中等分子量和中等极性的物质。大气压化学电离比电喷雾更适合于非极性化合物的测定。

高效液相色谱仪 (HPLC)
电化学检测



上图显示了一个 API-LC/MSD 的简图。不管离子化方式选择 APCI 还是 ES，喷雾室都有三种作用：

- 生成气溶胶进行雾化
- 离子化
- 去溶剂装置脱除溶剂

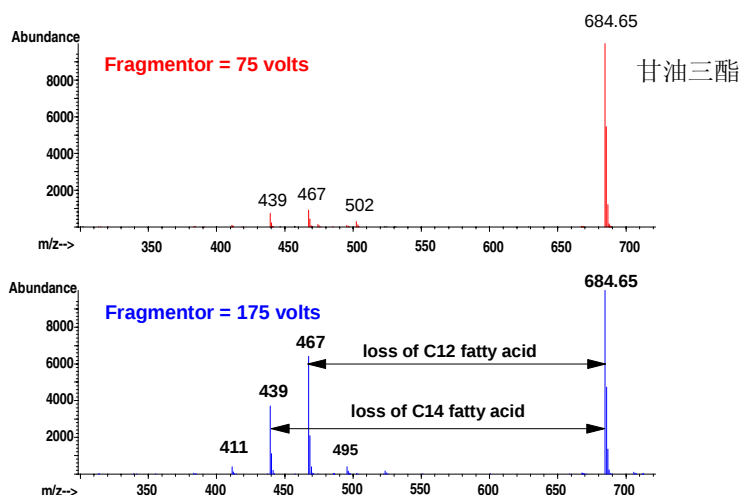
直角雾化器非常适合于处理盐类和缓冲体系。

带电离子被引入毛细管，此毛细管把大气压离子源区和高真空区分开。当离子离开毛细管时，被加速向分离器 1 移动。分离器 1 同时也起着离子透镜的作用，可以除去中性的过量气体和溶剂分子。

分离器 2 也起着聚焦离子，在离子到达四极杆高真空区前除去更多中性物质的作用。八极杆导向装置继续聚焦进入四极杆的离子。这一区域里大量中性物质被涡轮分子泵泵除。同时，八极杆还起到在进入四极杆前匀化离子的能量分布的作用。

四极杆质量过滤器每次只允许一个质荷比的离子通过。高能倍增检测器 (HED) 进行离子记数并放大信号。一旦离子被记数并放大，质谱就给出相应的记录并记录在数据系统的一个数据文件之中。

质谱的定性信息



当使用大气压电离技术分析小分子时，很多情况下质谱中主要是质子化的分子离子。上例中，苯基丁氮酮 (phenylbutazone) 的名义质量数是 308 道尔顿。质谱基峰（丰度最大的峰）是假分子离子 $[M+H]^+$ ，质荷比为 309。

有时也会产生其它的假分子离子，甚至会占优势。这主要决定于流动相，添加剂和纯度。正离子模式下常见的离子还有：

$$[M + Na]^+ = [M + 23]^+$$

$$[M + K]^+ = [M + 39]^+$$

$$[M + NH_4]^+ = [M + 18]^+$$

$$[M + X]^+ \quad \text{此处 X 为溶剂或缓冲液阳离子}$$

$$2[M + H]^+ \quad \text{高浓度下出现二聚体}$$

$$[M + H + S]^+ \quad \text{溶剂加合物}$$

负离子模式下有：

$[M - H]^-$	碱性条件
$[M + X]^-$	此处 X 为溶剂或缓冲液阴离子
$[M - H + S]^-$	溶剂加合物

样品的保存、准备、流动相和添加剂都会影响最后的结果。开发一个方法时需时刻留心这些因素。

具有多电离位点的高分子量化合物会产生大量的丰富的多电荷离子。例如一个蛋白质在酸性条件下，其结构中的精氨酸和赖氨酸片段都可以质子化。所分析的质荷比必须在四极杆质谱仪的质量范围之内。

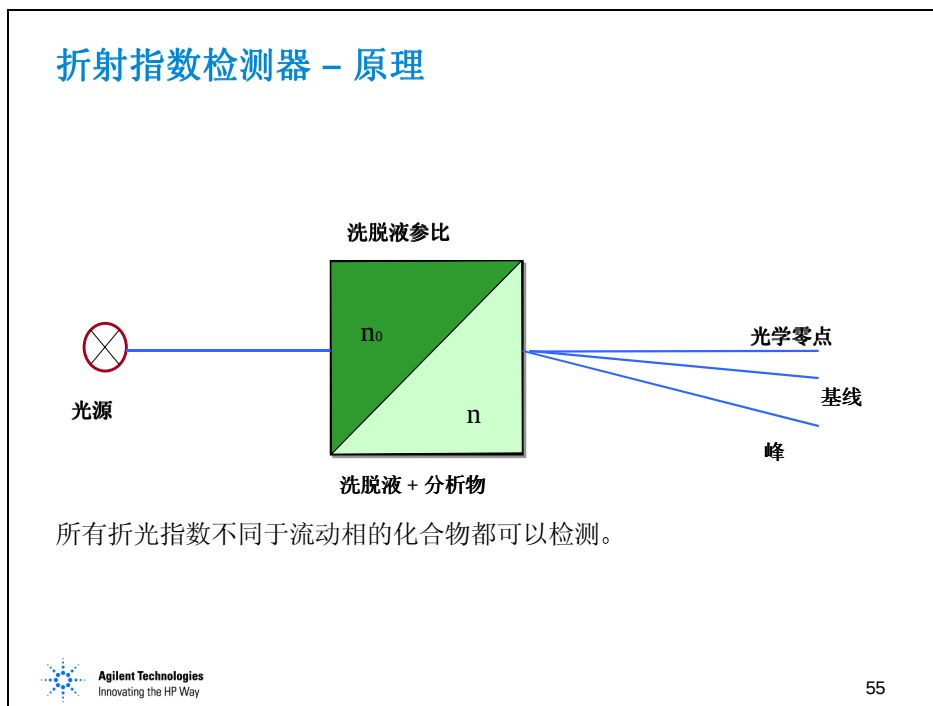
API 是一种相对温和的离子化技术，通常产生一个假分子离子。碰撞诱导离解过程（离子荷中性气体分子碰撞而导致裂解的过程）对定性分析和定量分析都是可用的。定性分析时，揭示的是分子的结构信息。存在已知离子系列时可以提高定量特性。

CID 可以通过选择离子输送毛细管出口和分离器 1 间的离子能量来控制。改变一个在控制软件中称为裂解器的参数可以改变离子能量。高的离子能量会引起更有效的碰撞，发生更多的裂解过程。低离子能量则会导致极少裂解甚至没有裂解，从而主要产生假分子离子。

CID 和化合物的种类有关。碎裂程度应通过流动注射分析实验 (FIA) 加以确定。

以上是甘油三酯的示例。在 75 伏的裂解器电压下，谱图显示的是假分子离子 $[M + NH_4]^+$ ，质荷比为 684.65。而裂解器电压提高到 175 伏的时候，甘油三酯可以由碎片离子来解析其结构信息。

折光指数检测



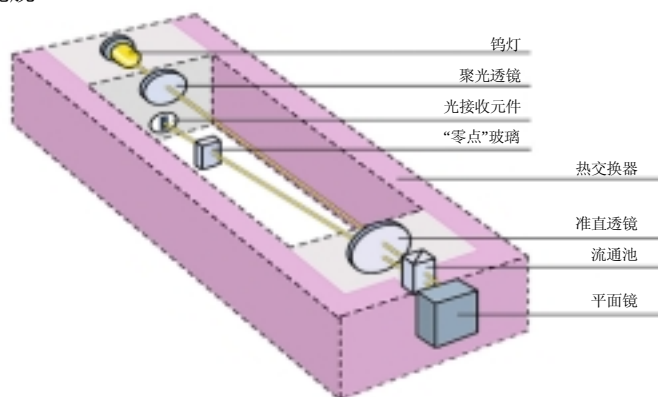
折光指数 (RI, Refractive Index) 检测器是一种非选择性检测器，或称为通用检测器。这意味着它可以用来检测几乎所有的化合物，但不适合低含量物质的检测。这种检测方法的原理仅是基于含样品的洗脱液和洗脱液二者折光指数的比较。

折光指数检测器设计

折光指数检测受以下因素影响较大：

- 压力的变化
- 温度的变化
- 流动脉冲

不能进行梯度洗脱！



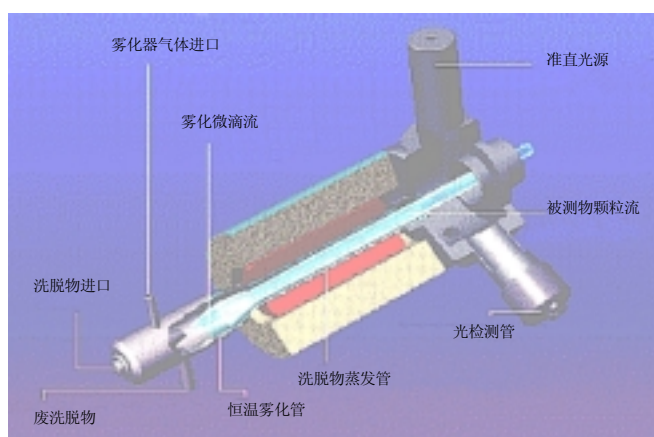
折光指数检测器基于样品池中溶液和参比池中纯流动相溶液的折光指数差异进行检测。因为洗脱液的组成在分析过程中必须保持固定，因而这种检测器不适用于梯度分析。

主要有四种类型的折光指数检测器：基于 Snell 定律的偏转，基于 Fresnel 定律的反射，干涉以及 Christiansen 效应。第一种类型的 RI 检测器使用双检测池设计，是目前最常用的 RI 检测器。

因为 RI 检测器灵敏度较低，而且会随温度的变化产生信号的漂移，所以主要用于凝胶渗透色谱法进行高分子的分析。

光散射检测

光散射检测器



电磁辐射或光通过一个包含悬浮颗粒相的介质时可以通过四种主要过程改变传输方向。它们是：

- Rayleigh 散射
- Mie 散射
- 反射
- 折射

这四种过程的重要程度决定于颗粒半径 (r) 和入射光波长 (λ) 的比。当 $r/\lambda < 5 \times 10^{-2}$ 时, Rayleigh 散射是主要的。当颗粒大于 $\lambda/20$ 的时候, 就不能再近似为点光源, 这时 Mie 散射占据主要地位。一旦颗粒大小接近入射光波长, 反射和折射将占优势。

为了判断哪一种机制占优势，必须对所涉及的颗粒大小和入射光波长的比进行估计。

$$D_0 = \frac{585\sqrt{\sigma}}{u\sqrt{\rho}} + 597 \left(\frac{\mu}{\sqrt{\sigma}} \right)^{0.45} \left(\frac{1000Q}{Q_a} \right)^{1.5} = n_a D^3 / n_a D^2$$

式中：	D0	为平均液滴直径
	na	在尺寸范围内具有直径 D 的液滴数
	σ	液体的表面张力
	ρ	液体密度
	μ	液体粘度
	u	气流和液流的相对速率
	Q	液体的体积流速
	Qa	气体的体积流速

可以通过改变气体流速、洗脱液流速、雾化器温度或者初始溶质浓度来改变颗粒大小。实验和计算表明颗粒半径大约等于或大于光的波长。这暗示反射和折射占优势。

溶质浓度和气压的变化都会影响溶质微粒的大小。这一关系决定仪器的最大灵敏度大约为 $r/\lambda = 4$

当 r/λ 比值大于 5 或者低于 2.5 的时候，检测性能显著下降。当 $r/\lambda < 2.5$ 时，Mie 散射的干扰导致测量角度的偏转光强度下降。在颗粒大小增大时，反射和折射占优势，灵敏度上升。颗粒大小的进一步增加会导致表面面积和体积的比率下降，从而引起灵敏度的下降。

直径增加时分布也随之移动，大颗粒通常可以达到中等颗粒的两倍。因此，尽管毫无疑问仍存在 Mie 散射和 Rayleigh 散射，但所观察到的现象主要源于反射和折射，这是因为大多数颗粒大于入射光的波长。

光散射检测

通过考察入射光在一个对称中心和光检测器以及光源同平面的单个球形颗粒的作用，可以更好地认识折射和反射的相对重要性。在此设置下，折射显著强于反射。大多数有机化合物具有介于 1.3 和 1.5 之间的折光指数。在这一范围内的折光指数变化不会显著影响到达检测器的光强。这解释了改变化合物时仪器灵敏度的相似性。

因此，如果在仪器操作条件下所研究的物质是非挥发性的，这种蒸发分析器就非常适合作为一种纯粹质量检测器。

操作的基本原理

上图显示了下面要讨论的主要部分。

雾化

洗脱液从蒸发室的底部进入检测器。柱出口通过一个小孔径（内径 0.25 mm）的不锈钢毛细管连接。溶剂/溶质通过加热的雾化器，与垂直方向进入的气流相遇。气体切向吹扫即将雾化的液流，使之部分成为均匀分散的小液滴，然后作为一个连续流动相进入蒸发器。大液滴或未有效雾化部分在蒸发器的入口处收集起来，并排入仪器旁的收集瓶。完全雾化的部分则进入蒸发室小孔。

蒸发作用

雾化后，雾状射流随载气进入蒸发室。在蒸发器中，溶剂从雾状射流中蒸发出来，只留下干溶质离子流。蒸发器内有一个扩散器作为有效的热交换器使离子进一步干燥。此外，扩散器还防止抛射粒子进入散射室，并对粒子流进行随机选择。

检测

从光源出射的光经准直后与气流方向成合适的角度进入仪器。对着光源的方向置有一光阱，用于捕获除去仪器本身内部反射外透过的入射光线。当纯溶剂蒸发时，只有其蒸气通过光路，散射进入光电检测器的光很少，给出一恒定的响应。当非挥发性的溶质存在时，其粒子云通过光路，使光产生散射。该散射光进入检测系统的光学窗口，由光电二极管实时地产生一个信号。检测到的光强决定于溶质浓度和溶质颗粒的尺寸分布。

因为检测过程受雾状液滴大小、蒸发速率和雾化器气体流速的影响，所以保持仪器内部和外部条件的稳定非常重要。因此，必须保证恒定的气源（体积和压力），一致的洗脱液流速和适当的排气放空速度。

电导检测器

电导检测器

示意图

应用

离子
酸
碱
盐
存在于

- ✓ 水
- ✓ 肥皂制品
- ✓ 洗涤剂
- ✓ 软饮料
- ✓ 血液
- ✓ 电镀槽
- ✓ 核燃料再处理
- ✓ 河流

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

58

电导检测器是常常用于离子色谱中的无机和有机离子的检测。这种检测器测量流动相的电导，其检测灵敏度很大程度上决定于流动相的初始电导。

其应用领域包括水中的离子分析，牙膏中的氟化物分析和电镀槽中的离子等。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：溶剂输送系统

实验室训练：溶剂输送系统
在这一实验室，您要：

在这一实验室，您要：

了解一些 HPLC 一般的维护方法，这是 1100 所使用的步骤，其特点是通用性的，适用于不同厂家各种型号的液相色谱仪。

- 查找和了解 HPLC 的功能部件
- 找到压力显示并模拟一个高压的故障
- 找到泄漏检测器并了解其功能
- 卸开泵找到其中的密封件
- 重新装好泵

流路

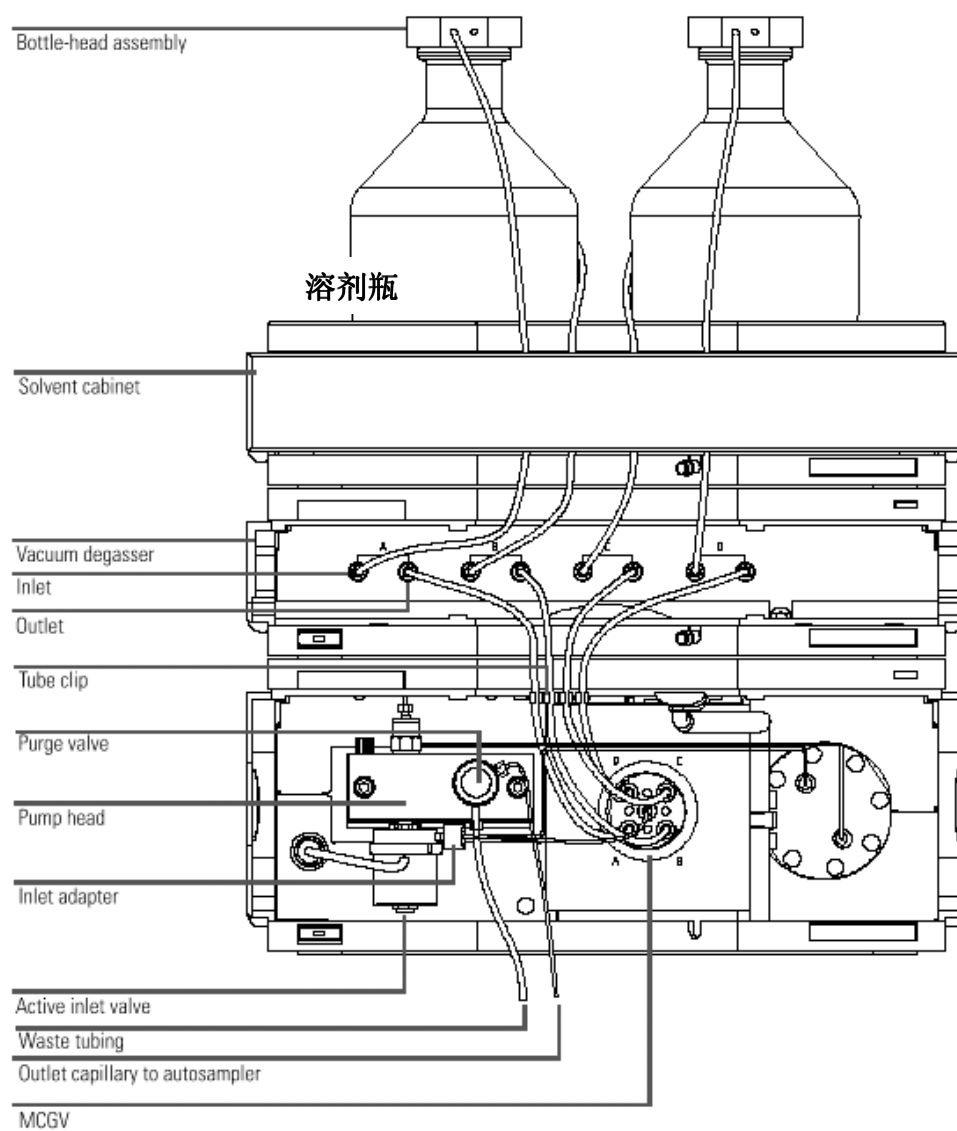
使用图表找到下面各个项目并了解其功能，开始前按下锁顶夹把仪器前面板卸下来。

如果有什么问题去问你的指导教师。

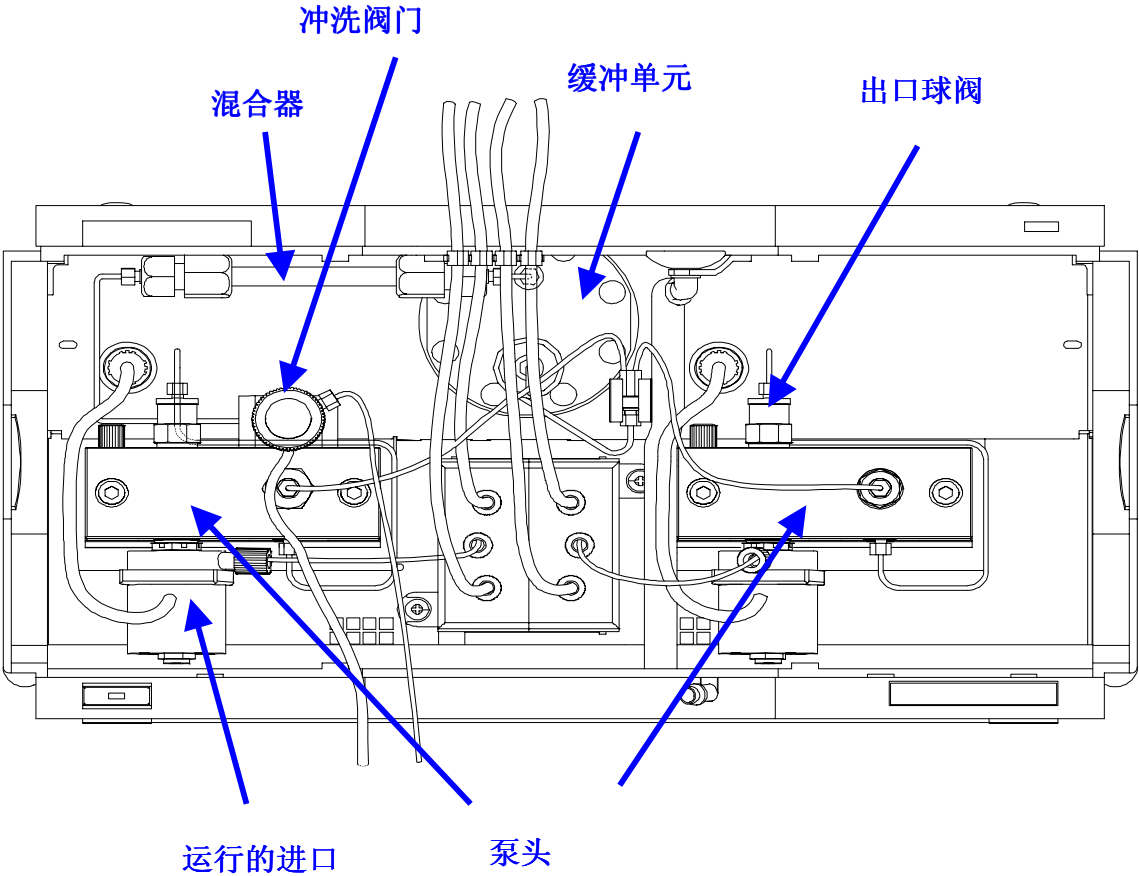
部件	功能
溶剂瓶	
溶剂进口过滤器材	
真空脱气机	
多路梯度阀门*	
运行的进口阀门	
泵头	
出口球阀	
缓冲单元	
冲洗阀门	
在自动进样器上的 Rheodyne 阀	
计量装置	
样品环	
针座	
针座毛细管	
色谱柱室	
检测器灯光	
检测器流通池	

*管理只是四元泵系统

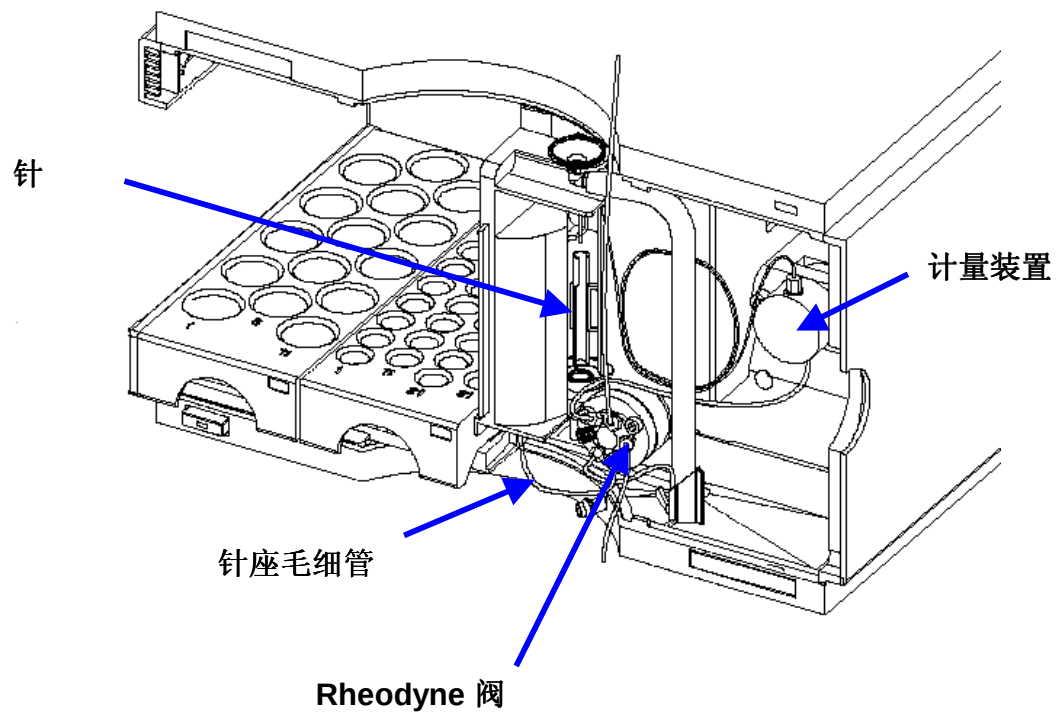
溶剂瓶，真空脱气机和四元泵



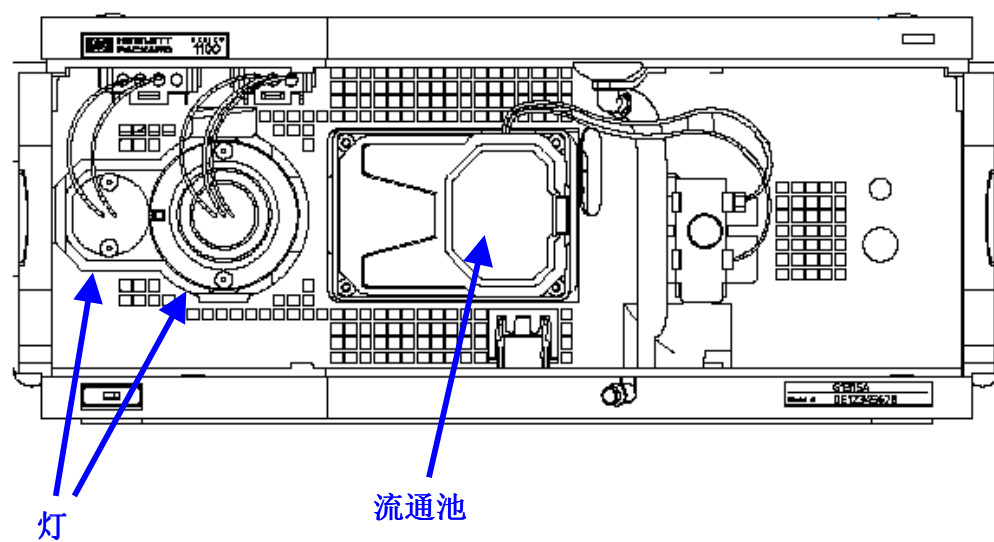
二元泵



自动进样器



检测器灯和流通池



故障提示和压力指示器

当 1100 系列部件有故障出现（堵塞，部件失效等）这一部件的 GUI（用户图形界面）上红灯亮并且运行状态窗口显示未就绪提示。发现在 GUI 工具有气泡表明有故障，要得到更多的信息打开 **Logbook（运行记录本）**

（在 **View** 下找到 **Logbooks**），在这一练习中可制造一个降低最高压力的流路故障，以便证明其特点。在正常情况下多数硅胶柱的最大压力为 400 bar。此时降低这一限度就会使仪器出现堵塞的故障，这样你会看到流路被堵塞所发生的情况。

- 1) 进入在线访问 **Method and Run Control** 的屏幕，选择 **Instrument** 菜单，然后设定泵 (**Setup Pump...**) 降低最高压力极限到 50 bar，设定流量为 1.00 mL/min. 在面板上按 **OK**。
- 2) 在 **Instrument** 菜单上选择 **System On**.稍等片刻仪器就会关闭并显示有故障，在泡泡图上红灯亮并出现有关信息。
- 3) 从 **View** 菜单上选择 **Logbook**，**Current Logbook** 在顶部显示最近的故障录入项目，显示什么信息？
- 4) 要找到更多的故障信息，双击运行记录本上的录入项，就会出现在线帮助，滚动故障列表找到上一次的故障记录，在线帮助会给诊断故障很好的启示，关闭 **Help** 和 **Logbook**。
- 5) 返回到 **Max Pressure** 设定到 400 bar 即可继续工作。

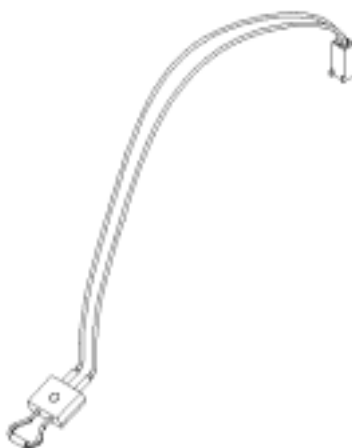
你的仪器和分析方法应习惯于在正常的压力下工作，一些 HPLC 常使用 psi 代替 bar 做压力单位。它们近似的换算大约为 15 psi/bar。一般堵塞经常发生在色谱柱的进口沙芯塞和进样器的毛细管处（进样后第一次限流）。要学习在系统运行中途如何排除高压堵塞的故障，你可能想和你的导师讨论这一问题。

检查泄漏

检查泄漏

每一个 1100 部件都配有泄漏传感器，许多液相色谱仪大都安装有这种装置，一旦泄漏传感器检测到有溶剂泄漏就会出现故障提示并关闭供液系统，泄漏传感器是一个安装在容器中的小电阻，部件设计成溶剂泄漏到此容器中，在此容器中积累了溶剂电阻的温度就会改变，从而触发了故障提示的出现，激活泄漏传感器，故障灯点亮，系统关闭。你必须使用运行记录本 (View/Logbook/System Log) 找到泄漏的地方。你要检查泄漏溶剂的容器追溯泄漏源，纠正泄漏故障。使用巴斯德吸管把容器中的溶剂吸出来，擦干传感器。泄漏传感器必须弄干，否则在泵运行 2 分钟之后又会出现泄漏故障提示。

在每个 1100 部件上找到泄漏传感器的位置。



溶剂输送系统

在这一部分你要学习实验室练习：

- 如何安装泵的密封件和查看柱塞。

所用设备和工具总览：

- 1100 系列泵，四元泵，单泵或二元泵
- 1/4" 扳手
- 4 mm 六角钥匙扳手
- PTFE 润滑剂

A. 更换泵密封件

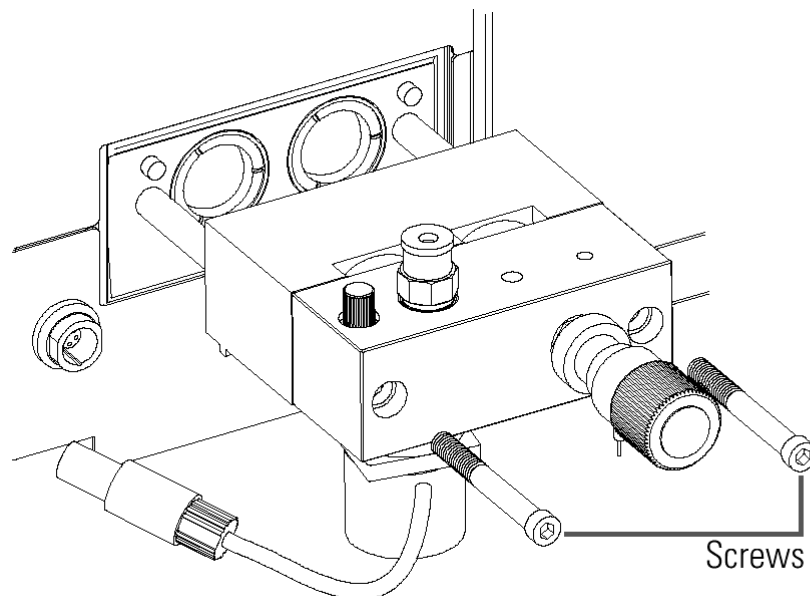
如有泄漏就要更换泵的密封件，泄漏可能看不到，保留时间或峰面积没有再现性是有故障的指示。泵压测试也会评估泵密封件的好坏，密封件的更换频率和所使用的溶剂有关，在使用缓冲液之后要冲洗泵，这样会延长密封件和柱塞的使用寿命。密封件的部件号为 5063-6589（2 /包）。磨损垫的部件号为 01018-22706（10 /包）在使用上述密封件时不再需要磨损垫。

注意： 当你使用泵头时先把新的密封件浸在 IPA 中是一个好主意。我们这里不采用这种做法，因为你不需要更换旧的密封件，除非导师要求你这样做。

- 6) 把流路关闭，**Instrument/System Off**。如果系统连接有化学工作站，关闭仪器上的化学工作站。
- 7) 关闭泵的电源（泵前面的按钮）。
- 8) 按下前面板上的锁住夹，卸下前面板。
- 9) 卸下泵头，断开所有接到泵头上的毛细管（四个），取下冲洗阀上的废液管和运行阀上的电缆，注意运行阀电缆是如何键入的。

实验室训练：溶剂输送系统
溶剂输送系统

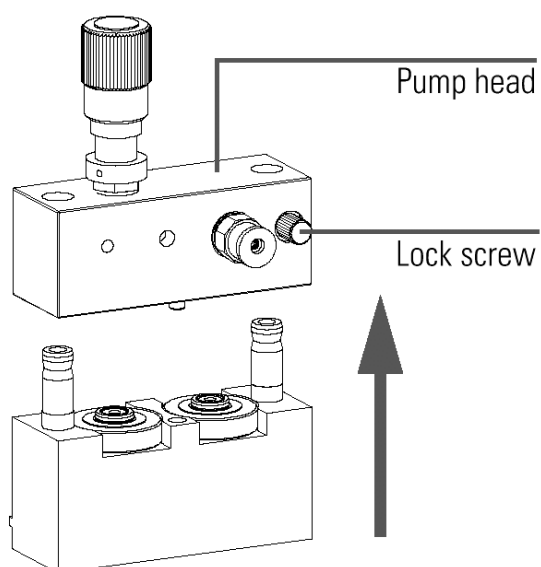
- 10) 用 4 mm 六角钥匙扳手松开并取下泵头上的两颗螺丝 (Screws)，如下所示。



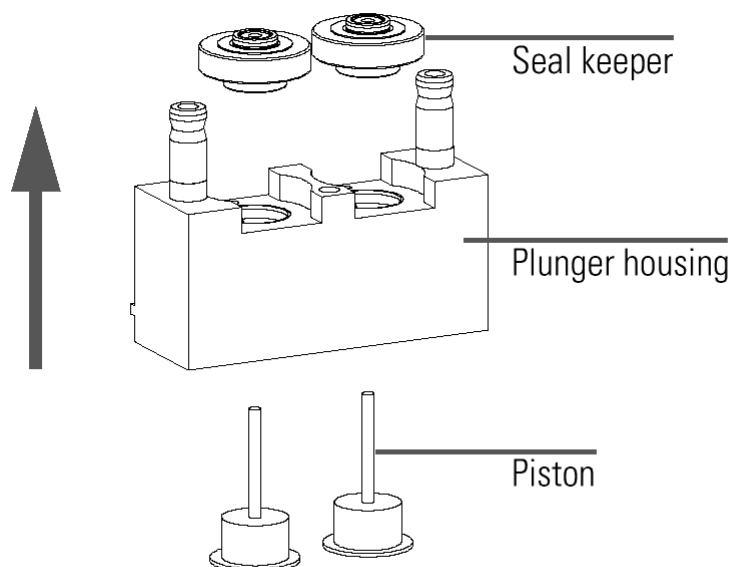
当取出泵头时用手托住它。现在你可以开始卸开泵头。

拆卸泵头

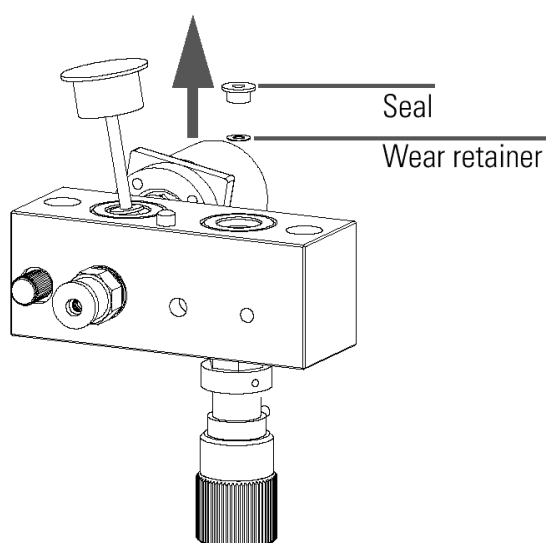
- 11) 把泵头 (Pump head) 放在一个平坦的地方，松开锁紧螺丝 (Lock screw) (旋两周)，小心地拿住下半部从泵室把泵头取出来。



- 12) 从活塞室中取出磨损垫，把活塞室与柱塞脱离开。

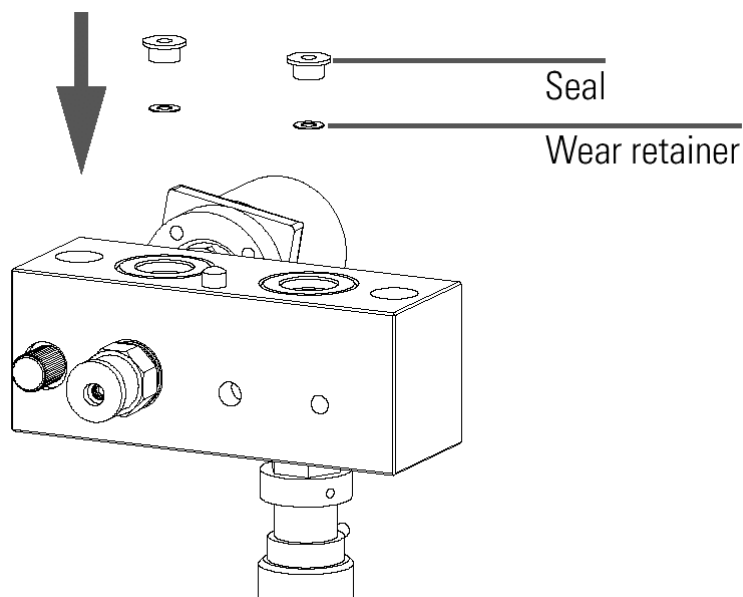


- 13) 检查密封件（它在活塞室装配件中，是黑色的），不要把它取出来，如果取出来会使其损坏（除非教师让你取出来）。读一下 4~6 步，了解在需要时如何把密封件在装进去。
- 14) 小心地把一个柱塞上的密封件取出来，如果磨损垫损坏用牙签把它取出来，如使用上述的部件号就不再需要磨损垫。现在密封件被磨损情况优于以前的。



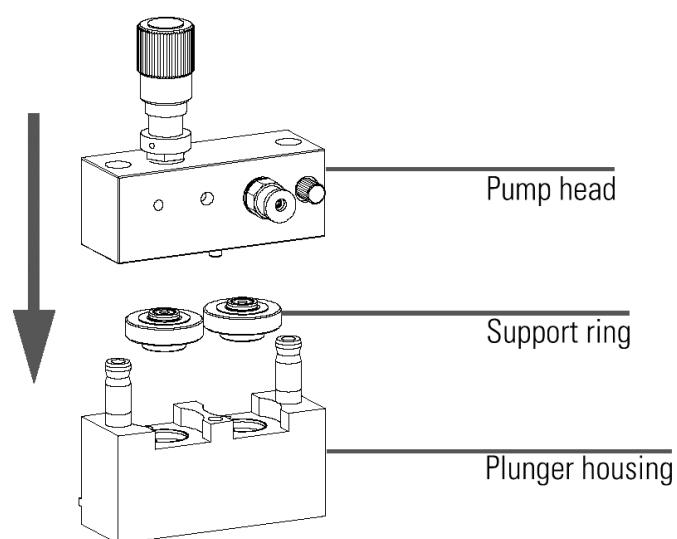
溶剂输送系统

- 15) 用无毛布擦洗泵腔，一定要把颗粒物全部清除。
- 16) 往泵头里插入一个新的密封件。如使用正确的部件号就不再需要磨损垫。

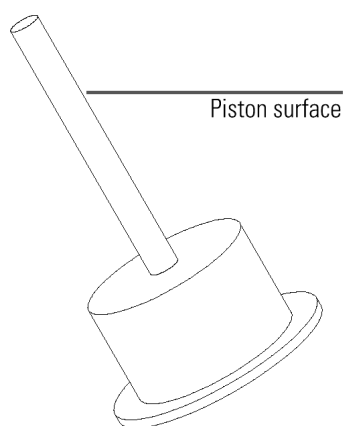


重新装配泵头

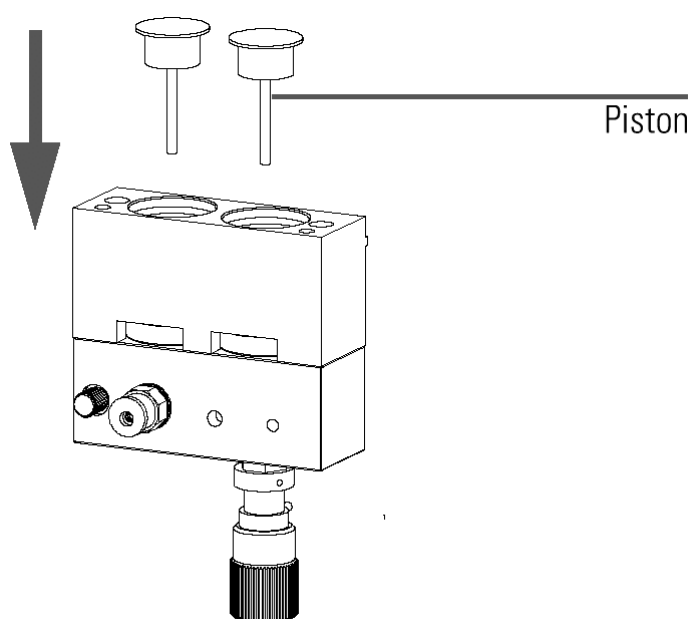
- 17) 在活塞室中装一个支撑环（未装活塞），把泵头活塞室安装在一起。



- 18) 检查柱塞表面，擦去沉积物或沉积层，可以用酒精或牙膏进行清洗。
如果有划伤处就更换柱塞。



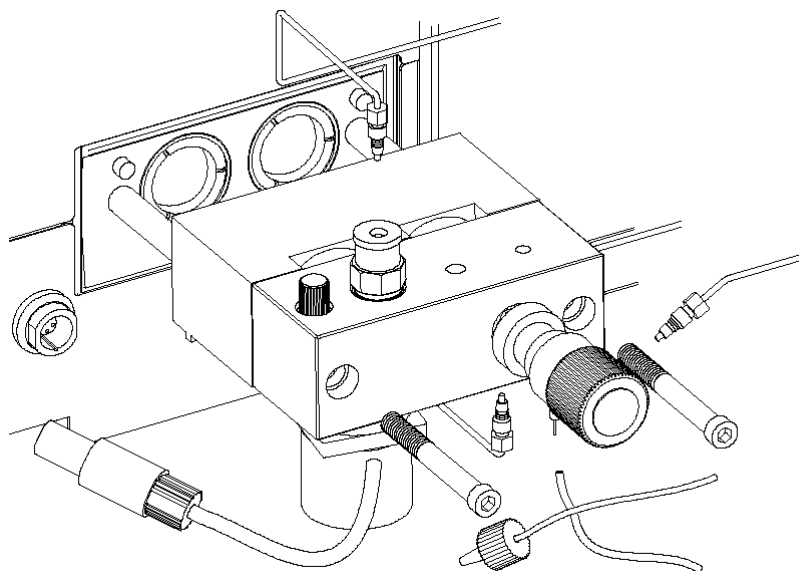
- 19) 把柱塞插入，并小心地把它压到密封件中。



- 20) 拧紧锁定螺丝。

溶剂输送系统

- 21) 把泵头组合件装到计量驱动装置里。涂少量 PTFE 润滑剂到固定螺丝和驱动装置轴的滚珠上，用转动矩逐步拧紧螺丝。



- 22) 重新把毛细管、管子和运行进口阀的电缆连接好，不要把接头拧的太紧，使用 swagelock 接头的规律是用手拧紧后再用扳手拧 $\frac{1}{4}$ 圈。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：自动进样器

实验室训练：自动进样器

在这一实验室训练中，你要：

在这一实验室训练中，你要：

了解一些 HPLC 一般的维护方法，这是 1100 所使用的步骤，其特点是通用性的，适用于不同厂家各种型号的液相色谱仪

- 卸开并找到转子的密封圈。
- 更换自动进样器的针。
- 检查检测器的校准值。
- 卸下检测器的灯。
- 卸下检测器的流通池。
- 使 HPLC 系统初始化。
- 进行泄漏检测。

材料

- 1100 系列 HPLC 装配有真空脱气机、自动进样器、泵和检测器，最好是二极管阵列检测器
- 化学工作站
- ¼” 扳手
- 2.5 mm 六角钥匙扳手
- 9/64” 六角钥匙扳手
- Pozidrive #1 螺丝刀

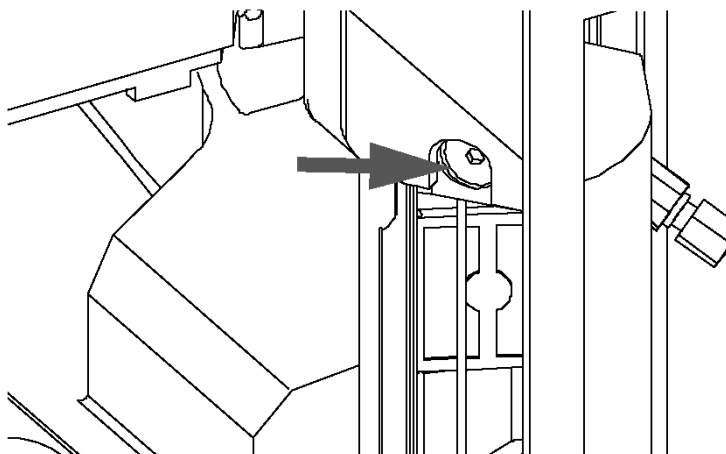
自动进样器

在仪器的寿命范围内你要注意自动进样器的一些零件，例如：针座或计量装置会泄漏，转子密封圈会造成交叉端口泄漏或针会堵塞，本节你开始学习自动进样器的知识。

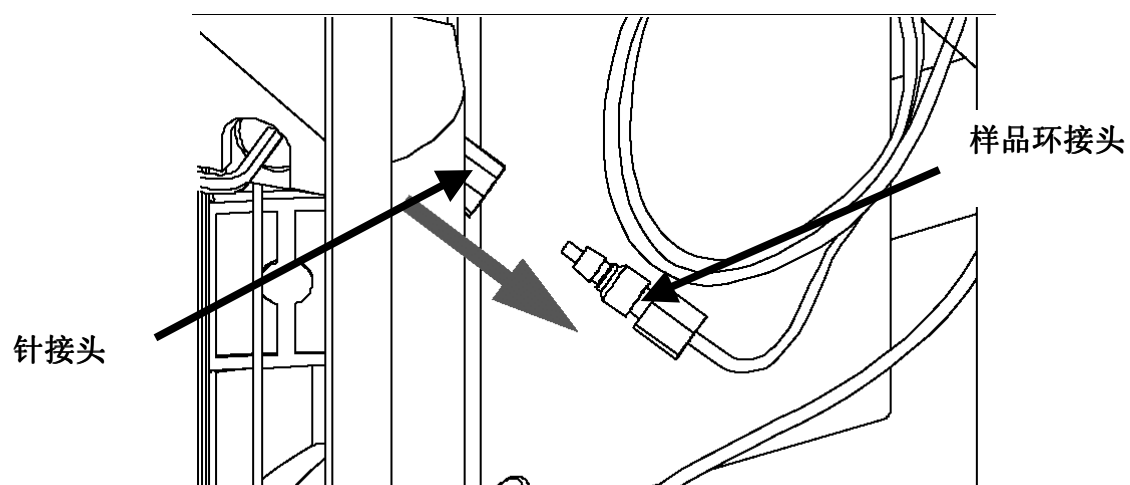
针装配件

当针被堵塞、有毛刺、不锋利或弯曲时就要更换它：

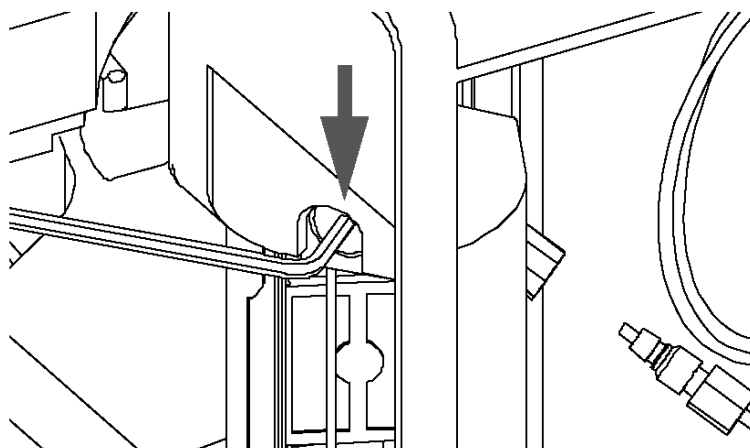
- 23) 一定要装上仪器的前盖。
- 24) 进入化学工作站的 **Diagnosis** 屏幕，从 **Maintenance** 菜单上选择 **ALS Maintenance Positions...**。
- 25) 在更换针 (Change Needle) 字段上，按 **Start**。
- 26) 卸下自动进样器前盖。
- 27) 选择针向下 (Needle Down) 按钮，一直到针的螺丝对准安全盖的孔为止。



- 28) 从针接头上把样品环接头取下来。



29) 松开安装接头并把针卸下来。



- 30) 选择 **Needle Down**。重复这一选择一直到针臂到达最低位置。
- 31) 插入一个新针，把针对准针座，然后拧紧螺丝，但是不要拆下接头。
- 32) 重新把样品环的接头接到针的接头上。
- 33) 用针向上 (**Needle Up**) 命令把针抬高到针座上面 2 mm 处。
- 34) 一定要把针对准针座，必要时把针弯一下，使其和正好对准针座。
- 35) 装好前面板。
- 36) 在维修功能上选择 **End** 命令，换针结束。

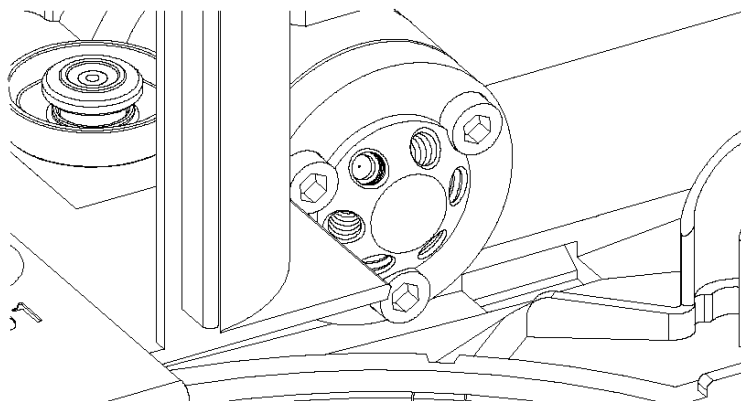
实验室训练：自动进样器
自动进样器

转子密封圈

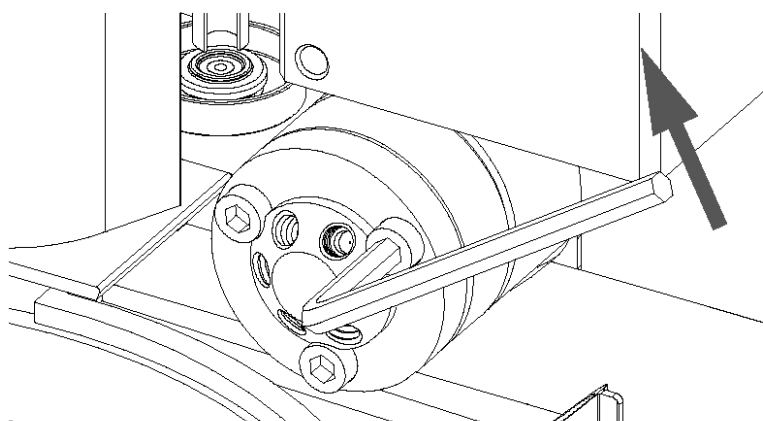
当你注意到峰面积和峰高数据不能重复时，可能需要更换转子密封圈了：

37) 移开自动进样器前面板。

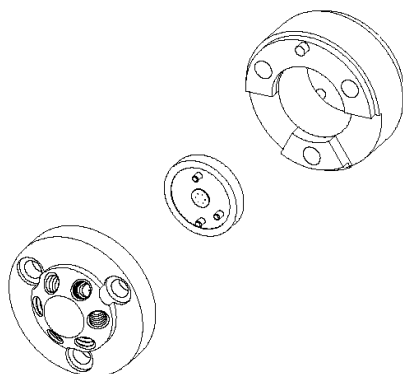
38) 从进样阀端口上卸下所有的毛细管接头。



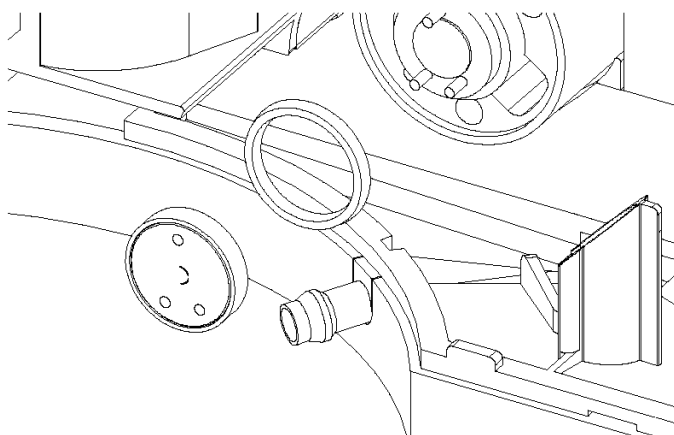
39) 每次松开每个接头的螺钉两圈，从头上卸下螺钉。



40) 取下定子头、定子面、和定子环。



41) 卸下转子密封圈（如需要剥离密封圈）。



42) 安装一个新转子密封圈（在此情况下正好放一个新的密封圈进去），一定要使金属弹簧向着绝缘密封圈对着阀体。

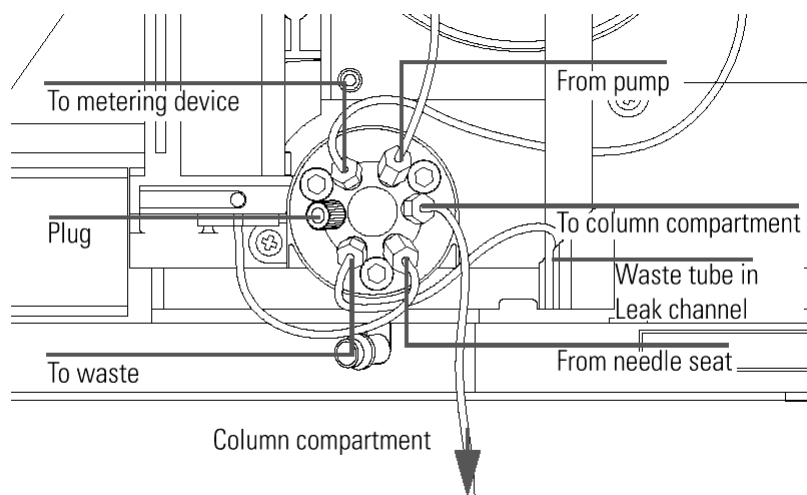
43) 安装定子环，保证机架与阀体成一平面。

44) 在定子头上放好定子面。

45) 安装定子头和定子面，拧紧螺钉，交替拧螺钉，每次拧两圈一直到拧紧为止。

46) 往阀口上重新安装泵的毛细管。

实验室训练：自动进样器
自动进样器



- 47) 把废液管装到泄漏盘的支架上。
- 48) 装好前面板。

使系统初始化

当加入新溶剂，色谱基线有噪音时，或完成了维修程序时，溶剂输送系统必须每天进行初始化。在此情况下，必须进行一定的维修。并且在运行前进行初始化。

这一步骤十分通用，应当牢记在心：

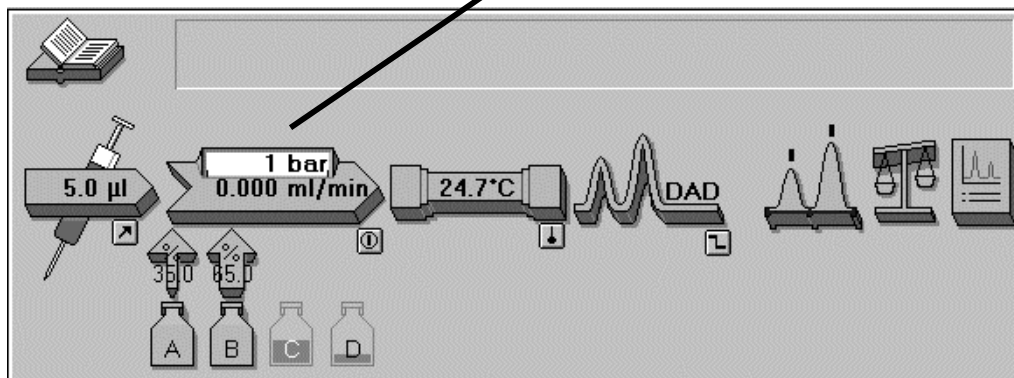
- 49) 如果装有真空泵，进行真空脱气。
- 50) 一定要把出口管连从冲洗阀接到废液瓶中。顺时针转动旋钮几圈，打开泵部件上的冲洗阀。
- 51) 为了使溶剂初始化你必须以 5 mL/min 的流速从各个通道泵入 100% 的溶剂几分钟，为完成此任务选择下列菜单的项目：**Instrument, Set up Pump...** 或在系统的对话框（见下图）中点击泵设定符号，然后点击 **Set up Pump...**。



- 52) 敲入流量 5.000 mL/min 和 %B 为 100，在仪表板上按 **OK**。

使系统初始化

- 53) 打开溶剂输送系统，你可以使用菜单上的项目：**Instrument, More Pump, Control**; 或访问下面的对话框，现在这样做。



- 54) 等待冲洗阀废液管的液体流量稳定。
- 55) 往其他通道泵入溶剂重复 3 到 6 步。
- 56) 关闭泵和冲洗阀，为下一步的应用设定成分和流量，在此情况下：流量为 1.5 mL/min，成分为 %B 0。

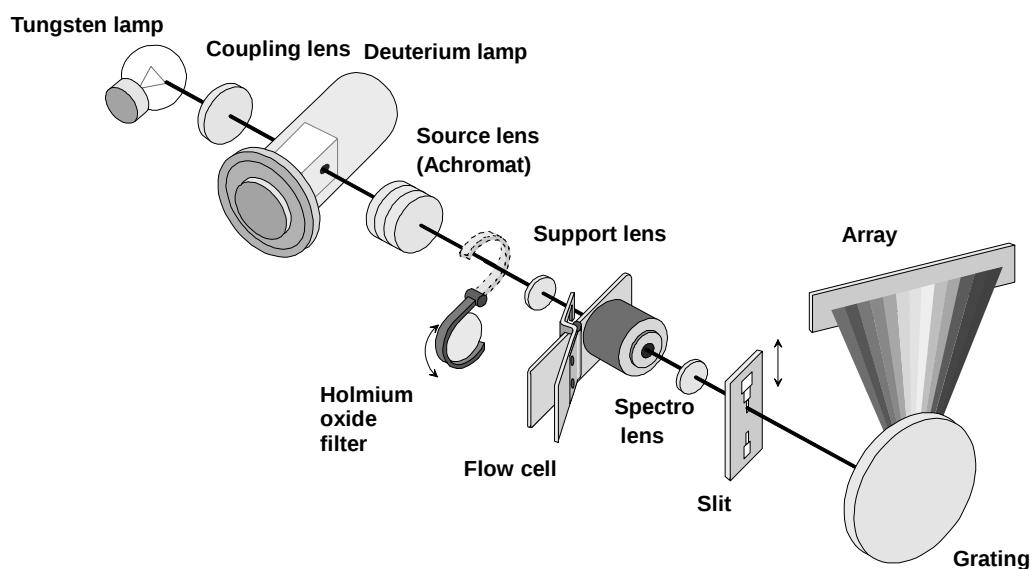
压力测试

压力测试很快，仪器设计的内置测试功能可证明系统的压力无泄漏。当你怀疑有小的泄漏或在维修流路（入泵密封圈，进样密封圈）之后，要证实压力可以达到 400 bar 无泄漏。这一测试包括显示泵在预定次序运行时的压力曲线。此压力曲线可提供系统压力的保持性，在测试压力曲线时使用异丙醇 (IPA) 做工作液，你也可以用水进行测试。

- 57) 进入 **Diagnosis** 屏幕。
- 58) 选择诊断，测试 (Diagnosis, Tests)。
- 59) 选择 **Pump** 键，然后选 **Pressure Test**。
- 60) 按 **Start** 按钮。
- 61) 在进行这一步骤前找到堵死螺帽。
- 62) 按 **Start** 并按说明书进行。
- 63) 在 3min 内压力不能降低到 390 bar 以下，如果低到 390 bar 以下测试失败，在流路上有泄漏的地方。

检测器

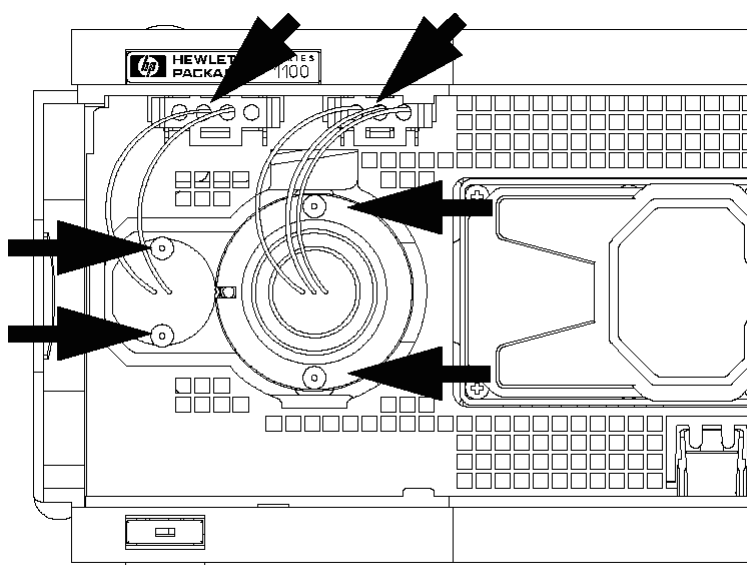
二极管阵列检测器用的是联合光源，氘-弧-放电灯用于紫外 (UV) 波段，钨灯用于可见光 (VIS) 和短波近红外波段，钨灯的灯丝影像聚焦到氘灯放电孔中，这是利用特殊的背后进入的设计，这样使两个光源光路结合在同一光轴上进入光源透镜，消色差透镜（光源透镜）形成一个单一的聚焦光束通过流通池，每个流通池室和灯用石英窗分开，可以更换或清洗它们，在光谱仪里光被全息光栅色散到二极管阵列上，这样可以同时获得全部波长的信息。



更换灯

如果检测器噪音或漂移超过你的使用要求，或灯不能点燃时，就要更换检测器的灯：

- 64) 按下前面板的释放锁定夹，取下前面板看到流通池的部位。
- 65) 把灯从接头上卸下，拧下灯的螺丝。

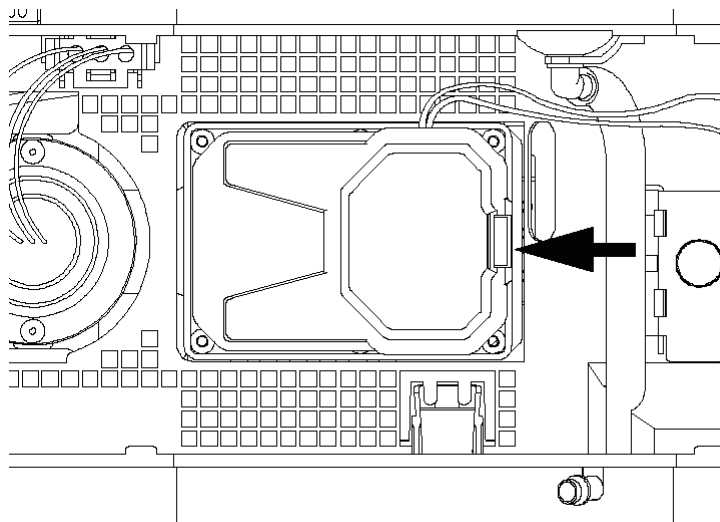


- 66) 取下灯来，手指不要碰玻璃灯泡。
- 67) 把灯放回到仪器的部件里，拧紧螺丝并把灯连接到接头上。

流通池

本节你要卸下流通池进行检查：

68) 按下释放扭，并打开流通池的门。



69) 按住流通池架把它卸下来。

70) 检查在流通池上的标签，上面标明光程长和可承受的最大压力。

71) 把流通池放回到流通池室中。

72) 装好前面板。

注意：在移动了流通池以后应该用氧化钛进行测试，流通池是光路的一部分。

流通池的维修参见检测器手册的详细说明。

检查校准线

氧化钬检测

仪器内置的氧化钬检测用三个最大的特征吸收波长，以验证波长的准确性，在开始检测时 1-nm 的狭缝自动移到光路中，为了避免溶剂吸收的影响，在流通池中装水进行测试。

氧化钬检测的评价

用仪器进行评价，自动测定最大吸收并显示，如果有一个或多个最大吸收落到限定值之外，表示检测失败。

检测失败

可能的原因：

- 在流通池中有溶剂或空气气泡。
- 校准不正确。
- 流通池脏或沾污。
- 流通池位置不正确。
- 光学部件被沾污（消色差透镜，窗口）。

建议采取的步骤：

- 流通池中一定要装水。
- 重新摆放流通池。
- 重新进行校准并进行测试。
- 进行流通池的测试，如检测失败，更换流通池的窗口。
- 用酒精和无毛布清洗光学部件。

进行光强测试，检查校准值和灯的光强：

73) 进入 **Diagnosis** 屏幕。

实验室训练：自动进样器

检查校准线

- 74) 选择诊断 (Diagnosis)，测试 (Tests)。
- 75) 选择检测器键，然后选择 DAD Holmium 测试。
- 76) 按启动扭，并按说明书进行。
- 77) 进行 DAD 光强测试，看看你的仪器如何？



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

HPLC 实践

在这一节，你将学习

在这一节，你将学习：

为进样如何设定HPLC系统，包括：

- 溶剂处理
- 流动相制备
- HPLC 初始化
- 色谱柱处理 - 平衡
- 系统性能检查

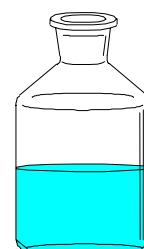
在这一组实验，你们要讨论如何设定一个 HPLC 系统。

溶剂处理

溶剂处理

溶剂特性 (规格):

- 纯度
- 粘度
- 折光指数
- 沸点
- 毒性
- UV 透过度/UV-截止波长
- 溶解性



3

一个严格的分析对溶剂的选择有下面的要求:

纯度

溶剂的纯度十分重要，因为它影响分析的总灵敏度，总是要使用高纯溶剂，如 HPLC 级别的溶剂或更好一些，要事先进行过滤和纯化，使其 UV 吸收最小。对 HPLC/MS 分析要求更高一些，梯度洗脱级溶剂（哪里可得到）保证不会在以 UV 作检测器的梯度洗脱时出现鬼峰，要记住每天要更换水或含水流动相。

粘度

你必须考虑所用流动相的粘度，较低粘度的流动相得到窄的色谱峰，例如，乙腈常常选为 HPLC 的流动相，就是因为它不仅有好的保留性能同时它的粘度也比甲醇和异丙醇低。

HPLC 实践

溶剂处理

折光指数

这一参数在使用折光检测器时很重要，要得到比较小的检测限，就要使流动相的折光指数和样品组分的折光指数有很大的差别。

沸点

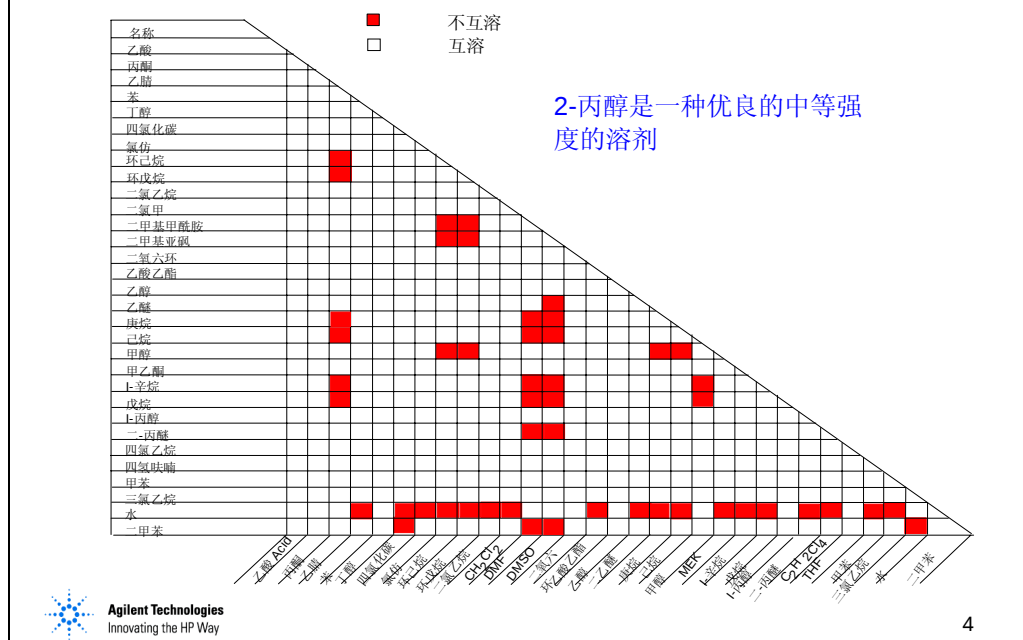
在考虑要回收被分离的样品时，流动相溶剂的沸点就很重要，特别是在制备型 HPLC 时，低沸点的溶剂容易从样品里除去。

毒性

目前，人们都十分注意在实验室里化学品对人体的健康和安全的問題，MSDS 是广泛接受的指标，应考虑在实验室中化学品对人体带来危害和安全的问题，要知道买到的四氢呋喃可以是稳定的流动相，也可能是不稳定的流动相，稳定的四氢呋喃流动相在典型的 UV 波长范围（用作检测的波长范围）有很强的吸收，不稳定的四氢呋喃在完全挥发时有很强的爆炸危险性，这种四氢呋喃当在没有氮气保护下存放时也很容易分解。

溶剂的混溶性和透明度将在下一页讨论。

溶剂的互溶性



并非所有通用的 HPLC 溶剂都可以混溶，如果混合不能混溶的溶剂，会出现各种问题，如基线不稳定，压力波动，压力增高。如果你不肯定在你的 HPLC 里最后一次使用了什么溶剂，就用异丙醇冲洗流路系统，这一溶剂可以和决大多数 HPLC 溶剂混溶。要从正相分离模式转换为反相分离模式，加一个毛细管到色谱柱的位置，用异丙醇冲洗色谱仪流路系统，然后用反相溶剂冲洗，进行分析。

溶剂 UV-截止波长/透过度

溶剂	UV截止波长 (nm)
乙腈	190
水	190
环己烷	195
己烷	200
甲醇	210
乙醇	210
乙醚	220
二氯甲烷	220
氯仿	240
四氯化碳	265
四氢呋喃	280 (220)
甲苯	285

UV 截止波长是是吸收等于1时的波长,测量池为1 cm, 用空气作参比.

当使用 UV 检测器时，千万不要使用低于或接近于截止吸收波长的溶剂，否则会造成不可接受的基线噪音，使你的检测限受到限制。例如。你要检测的化合物是 220 nm, 你就应当选择乙腈而不是甲醇，因为乙腈的截止吸收波长低于甲醇，这样会得到较低的检测限。对不同的检测器要考虑其他的因素。例如，使用质谱检测器时必须考虑流动相分子量和添加剂。

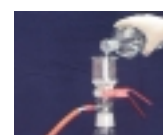
流动相制备

准备流动相



主要步骤:

- 每种溶剂量取适当体积
- 混合溶剂
- 加入缓冲液和添加剂*
- 过滤流动相
- 去除流动相中气体



6

流动相的制备可以分为下面三个大的步骤:

- 混合
- 过滤
- 脱气

大多数流动相至少是两种溶剂的混合物，它们还可能含有缓冲剂和添加剂，当使用缓冲溶液进行梯度洗脱时，一定在梯度的全程内缓冲剂要全部溶解在流动相中，以防由于缓冲剂的沉淀造成灾难性的堵塞。

例子:

溶剂 A: 50mM 磷酸钠, pH = 3.0 水溶液

溶剂 B: 甲醇

HPLC 实践

流动相制备

方法要求梯度从 95% A 到 95% B，也就是说在梯度进行到最后时混合物中含 5% 缓冲水溶液和 95% 的甲醇。一定要保证这一缓冲水溶液在有机溶剂中不会沉淀，要证明是这样，取 5 mL 缓冲溶液倒入 95 mL 甲醇中，看它是否出沉淀。

混合

把流动相的每种组分单独量取，然后进行混合。

过滤

为了保护 HPLC 和色谱柱不被颗粒物堵塞，厂家建议你在使用流动相之前要过滤流动相，这一工作很容易完成，从 HPLC 供应商的产品目录里选择购买真空过滤装置过滤流动相，在过滤以前要把所有的缓冲溶液和添加剂都加进去，用真空的抽力把溶剂通过滤膜，用镊子处理过滤器，保证过滤装置永远是干净的。尼龙 66 是含水流动相很好的过滤膜，而 PTFE 是多数有机溶剂优良的过滤膜，无机膜有抗大多数 HPLC 溶剂的能力，要知道太氟隆过滤膜不能用于水，由于这种材料是非极性的。典型的孔径是 4.5 微米。

脱气

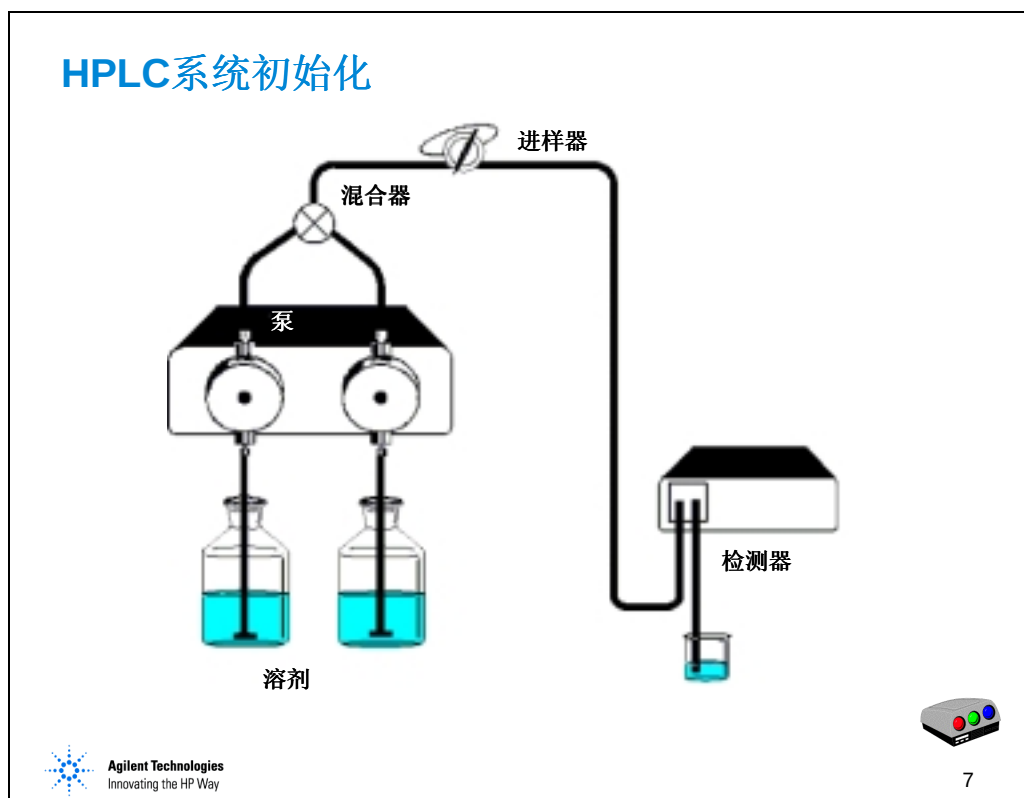
当溶剂混合以后流动相必须脱气，水和低分子醇类可以溶解较多的空气，除去流动相中的气体可以避免在泵（气穴现象）和检测器中生成气泡。溶解的氧会使荧光检测淬灭，所以脱气在这样的分析中尤其重要。有几种常用的脱气方法：

- 真空脱气-真空脱气是从流动相中除去气体最好的方法，流动相在进入泵的途中经过真空腔，在真空腔中气体经气体渗透螺管被抽走，这一方法除去可充分地脱气之外，还有适时脱气和经济的优点（不需要氦气）。
- 通氦气-氦，它在 HPLC 流动相中溶解度很低，可以把流动相中氮、氧等气去掉。
- 超声脱气-把流动相容器放在超声浴中，进行 5 min/L 的脱气。

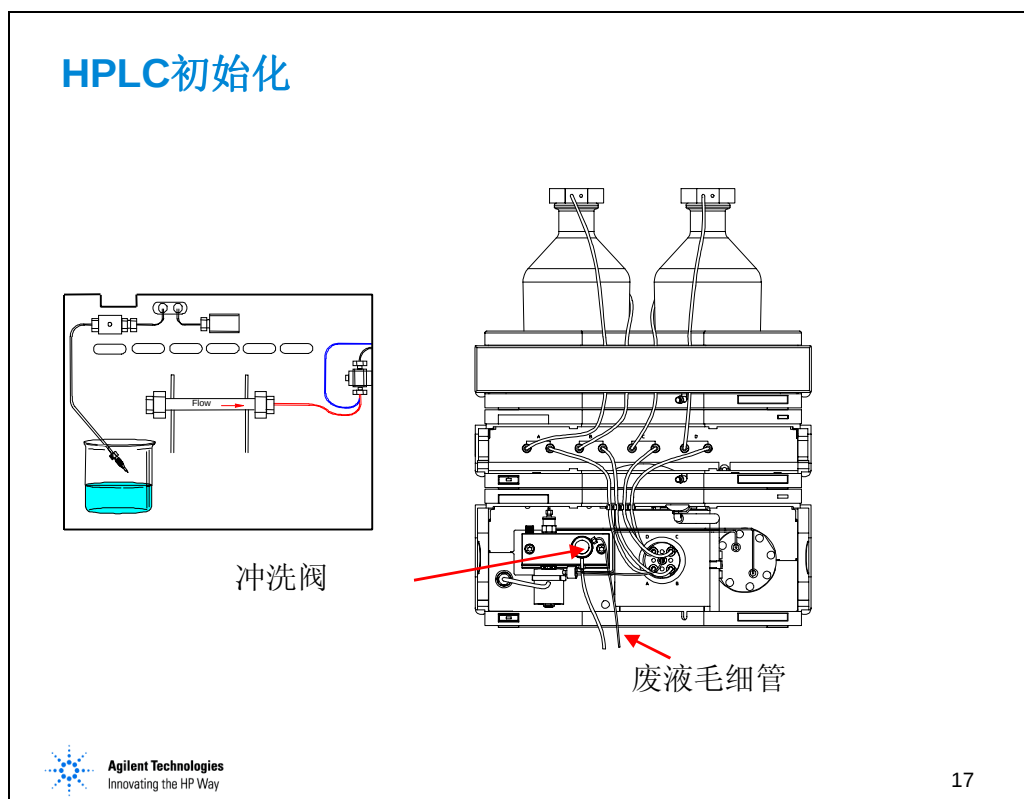
在线真空脱气和通氦脱气的效率高于超声脱气和离线真空脱气。

注意：不推荐煮沸预先混合好的溶剂，许多挥发性组分会很快地损失掉，组分的变化是不可预知的。

HPLC系统初始化



当液相色谱仪不用时，空气常常会扩散到流路系统中，所以要使液相色谱仪初始化，即用 100% 成分流动相以高流速通过各个流路通道，一直到压力和流速稳定。流动相把所有窝藏在通道里的空气都赶出去。初始化每天要进行，当更换流动相时，或在维修之后进行初始化会使峰面积和保留时间提高其重复性。



使用 1090 液相色谱仪时, 要把毛细管到色谱柱的连接管卸下来, 在初始化之前, 把毛细管末端放在烧杯中。对 1050 液相色谱仪和 1100 液相色谱仪, 可以打开冲洗阀, 把流路通道接到废液瓶中。多数色谱柱都不能忍受初始化时的高流速的冲刷。

样品制备

样品制备

最低限度 - 过滤样品:

- 尼龙 - 有亲水性, 用于水和溶剂为基的样品, 耐高压和加热到121°C, pH 范围 3-12, 不得有浓酸。
- PTFE- 一种疏水膜, 有强抗溶剂、酸、碱性。这一过滤膜一般用于非水样品, pH范围 1-14。
- 醋酸纤维素-是水性生物样品的良好过滤材料, 对蛋白质保留作用小, pH范围 4-8。
- PVDF- 对许多溶剂有抗拒性, 具有低结合蛋白质的性能, pH范围2-12。
- 超滤膜- 对生物样品有分子截止作用。
- 硝基纤维素-对蛋白质有高保留作用。
- 固相萃取。

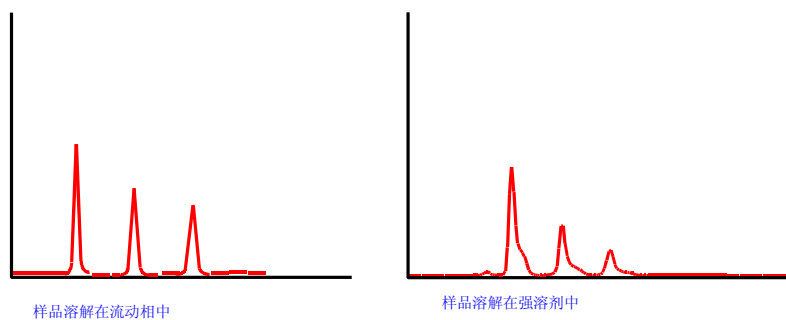


18

样品在进样前必须过滤, 样品中的颗粒物会造成毛细管、特别是进样点和色谱柱进口塞子处的堵塞。许多 HPLC 供应商提供各种过滤材料, 品种决定于应用和流动相。上面表中所列产品为你提供一个起码的过滤材料。不要忘记固相萃取是除去强保留样品组分很有用的方法, 这些强保留样品组分会损坏你的分析色谱柱, 固相萃取还可以用于分离和浓缩一部分特定的样品组分。

样品制备

- 把样品溶解在流动相或比流动相弱的溶剂中。
- 样品体积仅可能的小。



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

19

理想的情况下为了获得最好的结果，应该把样品溶于流动相或比流动相弱的溶剂中，如果把样品溶解在比流动相强的溶剂中，同时又注射大量的样品，就会使色谱峰加宽并开始出现双叉峰。进样量要尽可能的小，以免由于样品体积过载而降低分离度，进样的体积的极限决定于色谱柱的内径，例如，2.1 mm i.d. 的色谱柱只能进样 5 μL 或低于 5 μL 。

色谱柱的处理

色谱柱存放

- 避免强力挤压色谱柱
- 把两端封住以免固定相干燥
- 存储色谱柱要好好用适当溶剂冲洗
- 记录色谱柱的历史



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

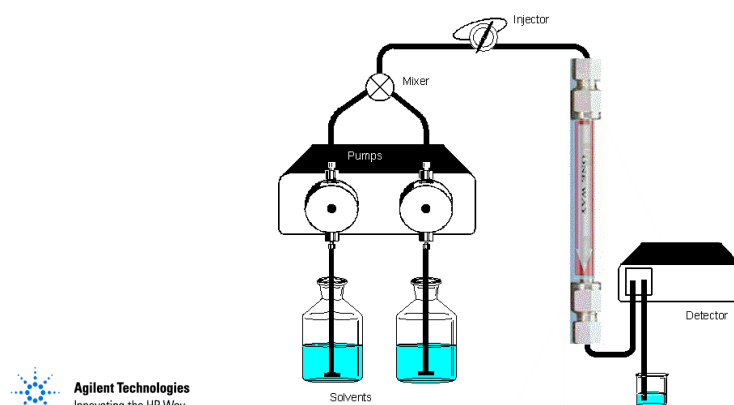
20

HPLC 色谱柱在适当的条件下可以保存很长时间，用适当溶剂冲洗色谱柱可以除去其中的缓冲溶液和添加剂。在保存色谱柱时要在其中充满厂家建议的溶剂，硅胶基的键合相色谱柱在保存时至少要有 10% 甲醇，如在纯水中保存色谱柱会使微生物生长，损坏色谱柱。色谱柱要避免任何物理的挤压和碰撞，如下落和弯曲。

色谱柱的安装



- 每支色谱柱要有一个固定的流动方向!
- 流动方向用箭头方向表示.
- 不要改变流动的方向, 这样就会降低柱性能.

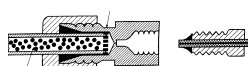


21

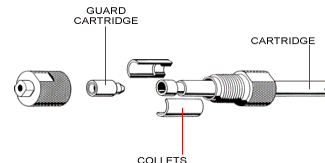
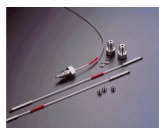
在仪器充分地用分析溶剂初始化之后, 可以把 HPLC 色谱柱装上, 要安装色谱柱首先要注意上面的箭头, 把箭头的方向顺着流路的方向, 箭头的方向也是固定相装填的方向, 方向颠倒会降低色谱柱的性能。

色谱柱安装

需要什么:

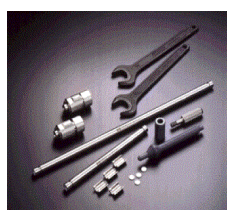


正确的接头避免将来泄漏。



保护柱保护主体柱

正确的工具



22

可以使用各种接头，开始一看他们都差不多，一定要把接头的型号和色谱柱匹配，例如，一支 Zorbax 色谱柱用 Swagelock 接头，而一支 Waters 公司的色谱柱要使用 Waters 公司的接头。

可能要使用保护柱，保护柱的用途是避免分析柱受压力冲击、样品中强保留物质污染、和颗粒物的堵塞。你可以买一支短柱或是一个过滤用小柱装在色谱柱卡套中，两种类型的色谱柱有和分析柱相同的固定相、内经和颗粒度。

色谱柱安装的内容.

实际提示:

- 用手拧紧
- 用扳手再拧1/4 圈

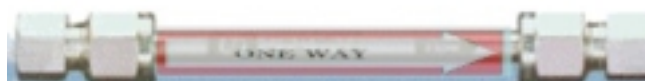


把接头装在色谱柱里用手以顺时针方向拧紧，用手拧紧时感觉到拧不动了，最后用扳手再拧 $\frac{1}{4}$ 圈加以调整。拧得太紧会损坏接头。

色谱柱平衡

用流动相平衡

- 不要用压力冲击色谱柱.
- 对反相柱用5-10 个柱体积流动相进行平衡.
- 确保重复性结果.



24

在你要进行分析之前，必须把色谱柱用流动相进行平衡，反相色谱柱使用简单的流动相，不要加缓冲溶液和添加剂，只要有 5 –10 个柱体积的流动相就可以平衡了。在有些应用中要更长的时间，一个未经平衡的色谱柱会使保留时间重复性不好，另外未经平衡的色谱柱的征兆是压力不稳、基线漂移。在开始进行分析时最好是逐步地提高色谱柱压力。1100 液相色谱仪在启动之后用程序逐步提高色谱柱的压力，你也能够用程序较慢地把流速升高。

例子:

一支 100 x 4 mm 色谱柱装有 5 μm 多孔固定相 C18，按下面的方法平衡：

色谱柱体积是 $100\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 3.14\text{ mm} \times 1\text{cm}^3/1000\text{ mm}^3 = 1.256\text{ mL}$

70 - 80% 的柱体积是充满液体 ~1 mL

所以以 1 mL/min 的流速你需要 5 – 10 min 来平衡色谱柱

注意：这只是一个简单的例子，平衡的时间对正相色谱柱或离子色谱柱要长很多，色谱柱平衡真正的测试是保留时间的重复性。

色谱柱检查

- 新色谱柱应该提供性能证明书!
- 每一次使用后应当有档案说明, 包括:
 - 反压
 - 流动相
 - 温度
 - 样品类型
 - 存储条件 (溶剂)

在此基础上色谱柱可用一定的混合物进行检查.



25

一支新的色谱柱装箱时带有性能测试记录, 常常在测试的条件中有色谱柱的压力。色谱工作者在他的建议中应当提出一个可靠的测试混合物, 用于区分是方法的问题还是仪器或色谱柱的故障, 包括一个弱酸和弱碱可以测试反相柱的酸性。

例子:

邻苯二甲酸二甲酯, 邻苯二甲酸二乙酯, 联苯, 和 *o*-三联苯溶于甲醇中, (这一混合物可以买到, 部件号 01080-68704) 作测试物。这四个化合物可以用乙腈/水或甲醇/水作流动相 (65/35), 你可以得到四个分离很好的色谱峰。

记录下面的参数:

- 难分离峰物质对的分离度
- 色谱峰性能—拖尾和塔板数
- 色谱柱死体积
- 在指定流速下的压力, 温度, 和所用流动相的组成

记录下所有的结果并存储作为色谱柱的历史档案，这样你可以在方法开发的早期预防可能出现的色谱柱故障。

色谱柱的照顾和处理

- 使用后用选择的溶剂洗涤，从柱子上把强保留物质冲洗掉。
- 不要在100%的水中存放色谱柱，微生物会生长堵塞色谱柱。
- 如果你想恢复色谱柱的性能，不能打开色谱柱重新装填料。
- 在最佳流速下使用色谱柱-避免使用过高的流速。
- 不能在高温下操作硅胶或键合相以扩展它的周期。
- 对色谱柱要保持流动相的pH 在适当的范围内。



26

好的色谱柱实际应用可以保持你色谱柱的寿命，一定要把溶剂和样品进行过滤，除去颗粒物，在进样前用固相萃取方法把强保留性样品组分除去。保存色谱柱时把两端密封好，柱内有适当的溶剂，硅胶基色谱柱只能在 pH 2 到 8 之间使用，柱温不得超过 80°C。色谱柱在使用之后把缓冲溶液和添加剂冲洗出去，在适当的流动相中存放色谱柱，最好是使用厂家在装箱时使用的溶剂。

- 不要打开色谱柱，这样你会打乱了固定相、降低柱效。
- 避免挤压色谱柱，如压力脉冲，大的 pH 变化。
- 在最佳的流速下使用色谱柱。
- 避免有气泡和使用脏的溶剂。

提 示：使用独立的 HPLC 泵进行色谱柱的净化，这样既节约时间又方便。

系统的参数

对系统的检查- 定期检查

原则:

HPLC系统 (包括色谱柱) 可以通过规定的测试样品和方法进行检查.

系统检查的准备:

- HPLC系统用流动相初始化.
- 平衡色谱柱.
- 检测器得到稳定的响应.
- 没有泄漏.
- 准备往系统进样



27

对系统进行检查之前确定下面的事项:

- HPLC 系统进行初始化
- 安装色谱柱并进行平衡
- 检测器就绪并有稳定的信号
- 色谱柱箱已平衡保持在适当的温度

检查系统的目的是在特定的条件下测试 HPLC 的总体性能（方法）。

实际步骤是:

- 用已知测试混合物或控制样品进行几次分析， ≥ 3 进样。
- 把测试结果与预期的合格标准进行比较。
- 如果结果在规定的范围之内，这一系统就可以进行分析了。

HPLC 实践 系统的参数

这是许多质量控制实验室所用的方法。

典型的性能标准包括：

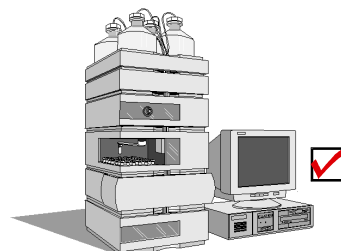
- 选定峰的分离度
- 选定峰的定量响应值
- 选定峰的保留时间
- 色谱峰的性能参数
- 色谱峰的对称性
- 理论塔板数
- 峰面积和峰高的重复性

这些参数反映系统的性能。

系统的检查- 常规检查内容.

对测试样品的要求:

- 样品是很好检定过的.
- 检测器响应已知.
- 样品包含多组分.



测试计划:

用规定的测试方法进行样品测试. 把得到的结果和预期结果进行比较.
如果结果在规定的范围之内, 系统就绪可以使用.

这一试验不能相等与 OQ 测试或PV测试!!



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

28

- OQ – 操作鉴定 (Operational Qualification)
- PV – 性能认证 (Performance Verification)

总结

总结

- 制备流动相
- HPLC系统初始化
- 安装色谱柱
- 调谐检测器 (对UV检测器至少要预热20min)
- 平衡色谱柱
- 制备样品
- 记录检测器响应值-稳定的响应值
- 使用测试样品和方法进行系统的检查
- 把结果和预期值进行比较 (限定值)
- 把结果归档 (控制图表)
- 如果可以的话记录任何失灵/故障
- 如果系统检查合格，然后 **你就准备进样分析**



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

29

复习

复习

1. 当你发现基线出现周期性波动时，进行一个常规分析，压力忽上忽下变动，故障在哪里？如何排除？

复习

2. 你要在实验室的仪器上进行一个反相色谱分析，前一个操作人员没有记录在此仪器上使用的是哪种溶剂，你就在溶剂瓶A中装上水开泵进行实验，结果基线不稳定，在此困难的情况下你认为是什么原因。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

色谱分离度和分离

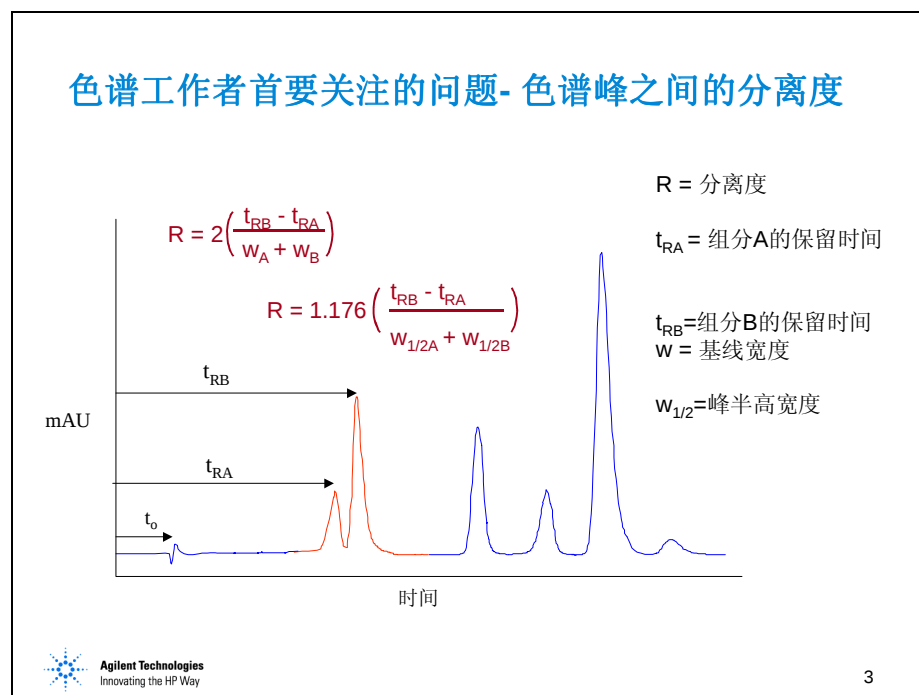
在这一节，你将学习

在这一节，你将学习：

- 影响样品化合物之间分离度的因素是什么.
- 容量因子（保留因子），选择性，和柱效如何影响分离度.
- 如何改进分离.

分离度

色谱工作者首要关注的问题- 色谱峰之间的分离度

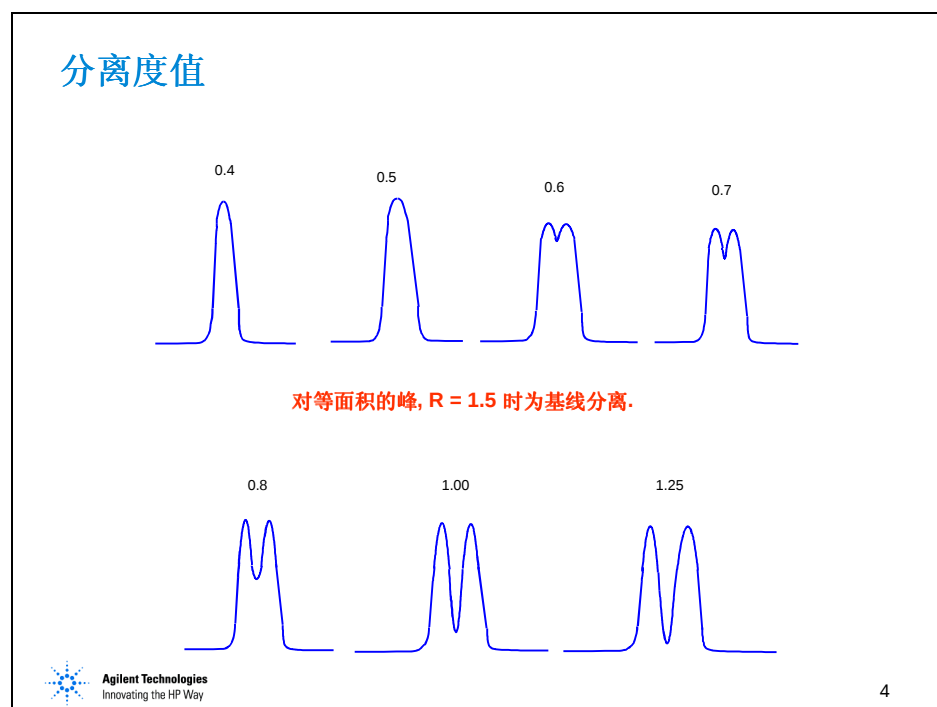


色谱工作者首要关注的问题是样品中重要色谱峰之间的分离度，另外一个关注的问题是完成任务所需尽可能少的时间。在这一讨论中你会学习到什么参数会影响到你所分离色谱峰之间的分离度。

二峰之间的分离度可以用上述公式进行定量计算，第一个公式使用色谱峰的基线宽度，这一宽度可以在色谱峰每一边做切线相交于基线而求得，第二个公式使用峰半高宽度，这一数值可以从大多数色谱数据处理系统的积分或定量分析报告中得到。

二峰间的分离度数值为 1.5 时接近等于基线分离。

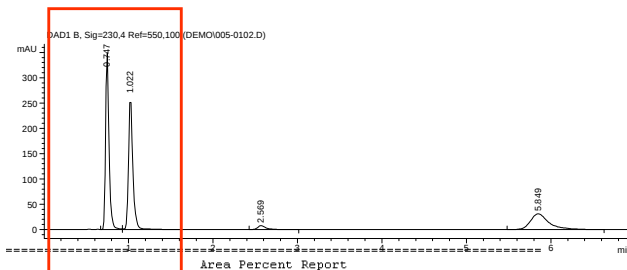
色谱分离度和分离度



如上所述，分离度为 1.5 时是说明达到基线分离，分离度为 1.25 时，每个峰的峰纯度为 99.4%，可以进行准确的定量分析。

当分离度为 1.5 或更高时，无论使用峰高或峰面积都容易进行定量分析。任何一个分离，其分离度为 1.5 或更高时，无论使用峰高或峰面积都容易进行定量分析。你所开发的分离方法都要更高的分离度吗？如果你要开发一个很耐用的方法，其分离度应当在 1.7 到 2 之间。但是要记住分离度越高所用的分析时间越长。作为一个色谱工作者要对耐用的方法平衡其分析时间和其它参数之间的要求。

计算第一和第二个色谱峰的分度



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday, July 09, 1999 2:36:23 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: DAD1 B, Sig=230,4 Ref=550,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	0.747	VV	0.0431	985.98547	40.7097	dimethylphthalate
2	1.022	VB	0.0985	916.51312	37.8413	diethylphthalate
3	2.569	BB	0.1000	51.33152	2.1194	biphenyl
4	5.849	BV	0.2247	468.16312	19.3297	o-terphenyl

Totals : 2421.99323



答案_____

5

使用上面一页的公式和报告，计算色谱图上第一、二个色谱峰的分度。

基本分离度公式

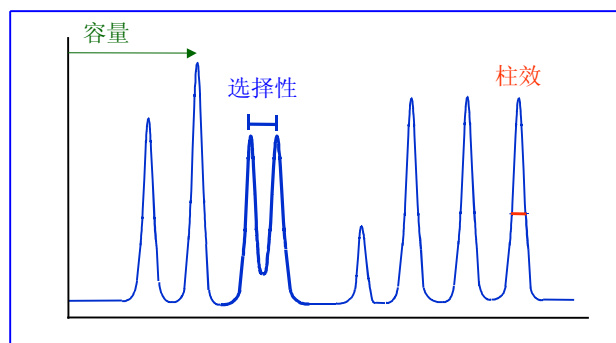
等度洗脱的基本分离度方程

$$R = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{柱效}} \times \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{选择性}} \times \underbrace{\frac{k'}{1 + k'}}_{\text{容量}}$$

N: 总的理论塔板数; 柱效
k': 容量因子 (保留因子), 峰保留函数
α: 峰的相对分离程度; 选择性函数

你作为一个色谱工作者如何控制色谱峰之间的分离度？有三个因素控制两个色谱峰之间的分离度的大小、柱效、容量和选择性。上面的公式表示每一个成分在决定二峰分离度中所起的作用。

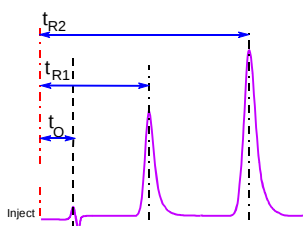
分离度因子



容量或保留值参数反映样品分子和固定相及流动相之间作用力。选择性参数是说明色谱系统区分两个或多个化合物的能力。最后一个参数。柱效，和分离峰的宽度有关，很明显要达到一定的分离度，宽色谱峰要比窄色谱峰需要更大的分离选择性。

容量

容量-保留

$$R = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{柱效}} \times \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{选择性}} \times \underbrace{\frac{k'}{1 + k'}}_{\text{容量}}$$


- 容量因子 (保留因子) 是特定化合物在一定的流动相组分、温度和色谱柱类型条件下的特征值.
- 容量因子消除了色谱柱尺寸和流速的影响.
- 容量因子等于样品在固定相中的摩尔数除以它在流动相中的摩尔数.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

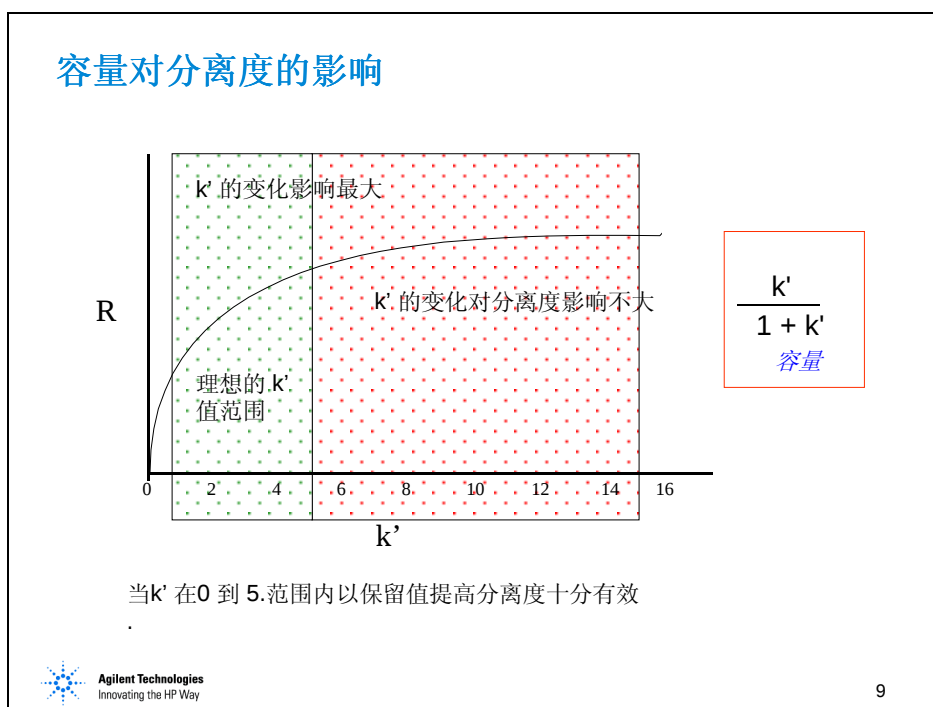
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

8

容量因子是样品分子在色谱柱上保留性能的度量，它表示为样品组分的洗脱时间和色谱柱死时间之比，分子和流动相一起穿过色谱柱除非它和固定相作用，一个和固定相绝对没有亲和力分子将会以一个柱体积的量和流动相一起流出色谱柱，并且按上面的公式计算其 k' 值为 0。一个高的 k' 值表明样品在固定相上的保留能力很强，在和固定相作用时消耗了很多时间，当 k' 提高时也提高了峰与峰之间的分离度。

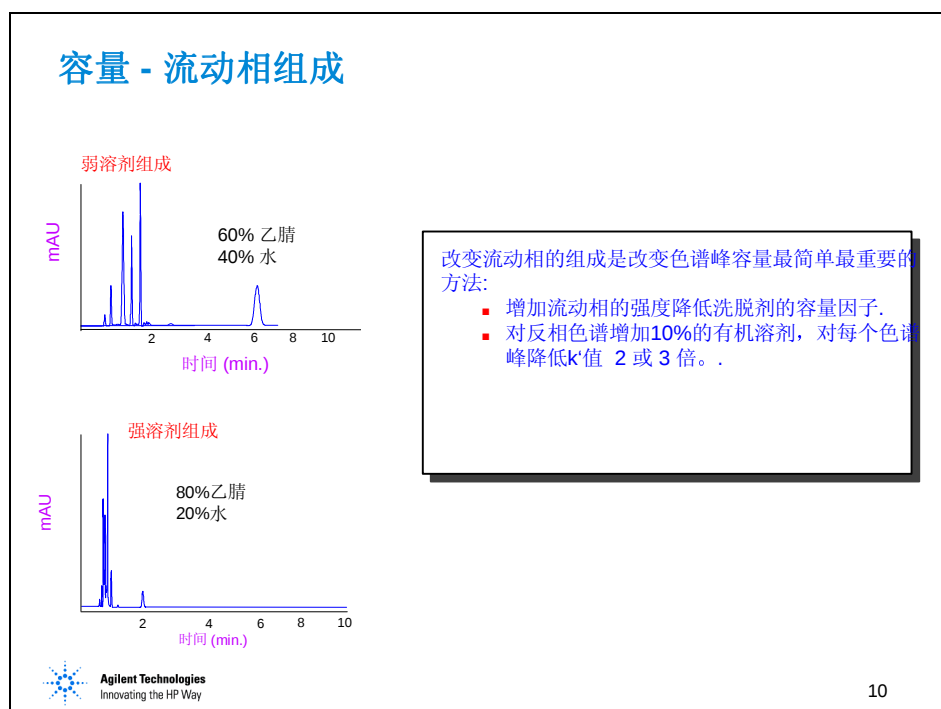
改变样品组分和固定相作用的主要方法是改变流动相的组成，同时也改变了 k' 值。

k' 值在 HPLC 中的一个实际用途是进行定性分析，在分析鉴定色谱峰时， k' 值比保留时间更可靠。在进行计算时要考虑一次分析和下一次分析中流动相流速的变动和色谱柱的尺寸。



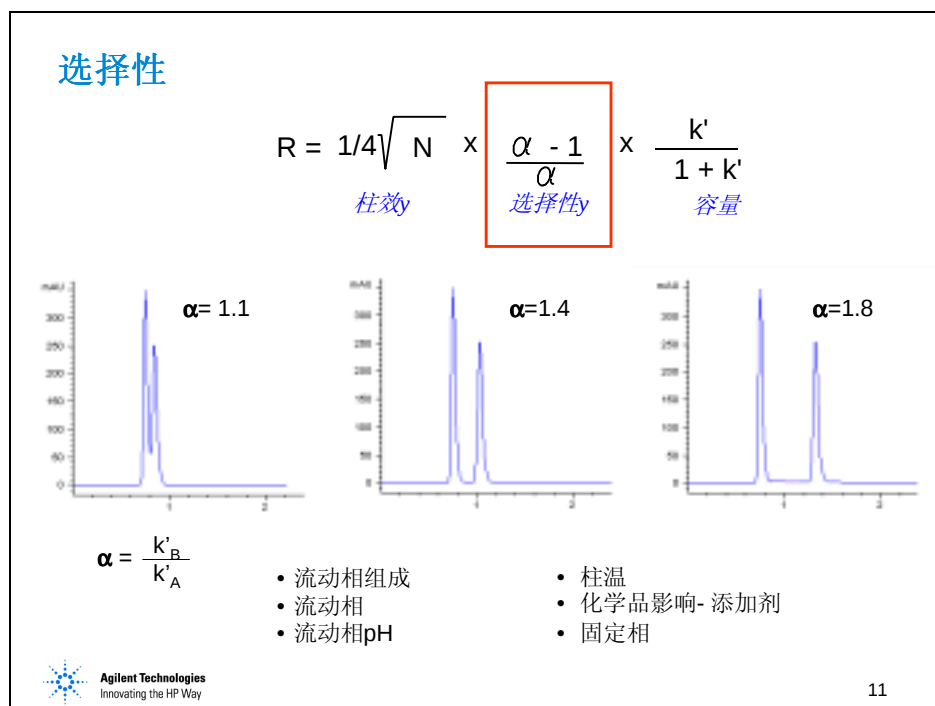
上图证明在分离度公式中容量因子和分离度之间的关系，要说明的是当 k' 在 1 到 5 之间可以得到最大的分离度值，一般上说 k' 值小于 1 时结果不可靠，因为样品组分可能和其他样品组分一起流出。此外，保留值为零的组分其分离度也是零。

这一图证明上述 k' 大于 5 时，增加保留值不会使分离度有明显的增加，另外保留值太大要浪费宝贵的分析时间，反而会使峰高降低，因而峰宽要增加。对于复杂混合物其 k' 值可加宽到 $2 \leq k' \leq 10$ 。如果还没有达到样品组分所需要的分离度， k' 值可以大于 10，你会发现提高选择性或柱效有助于你的分离。



要记住控制样品分子容量和保留值最有效的方法是增加或降低溶剂的强度。这里的例子是反像液相色谱，固定是非极性的 C18，增加流动相的极性样品的保留值更高、流出来更要慢一些。减少水含量从而降低流动相的极性，使样品分子更快的洗脱出来。实际上，流动相中有机组分增加 10% 组分的 k' 值降低 2 或 3 倍。改变流动相的组成是最有力的分离工具。

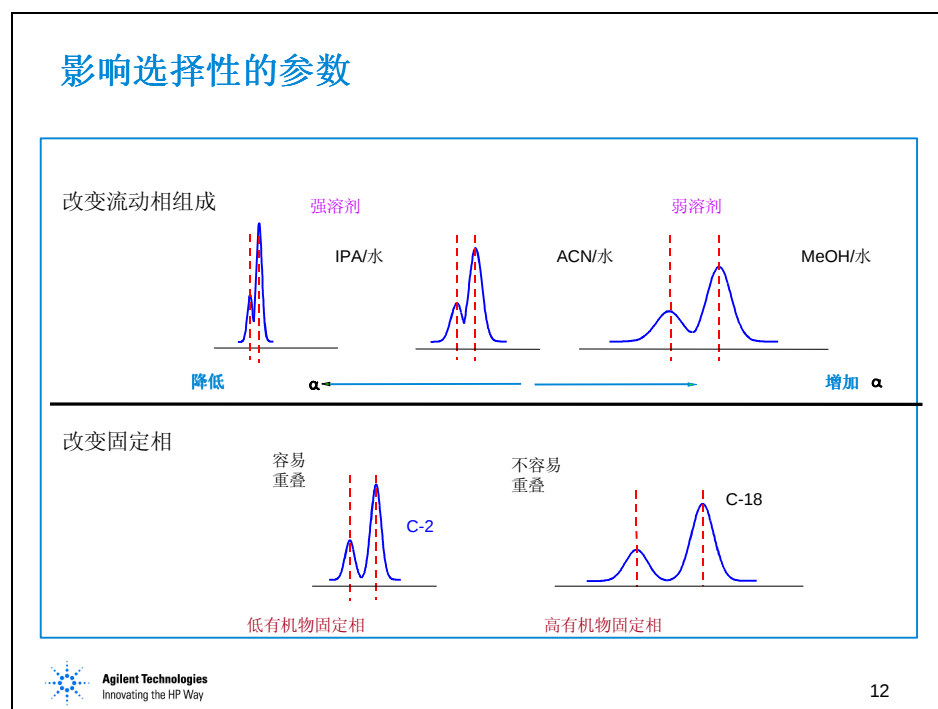
选择性



选择性是固定相区分两个被分离样品组分的能力，用容量因子之比进行计算，它是两个被分离色谱峰顶点距离的量度。如果选择性是 1 这两个组分完全不能分离。选择性数值越高分离越好。

由于选择性决定于被分析物的物理和化学结构、流动相和固定相。流动相组成、pH、色谱柱温度、流动相添加剂、和固定相都会影响分离度公式中的选择性一项，这一点并不奇怪。

色谱分离度和分离 选择性

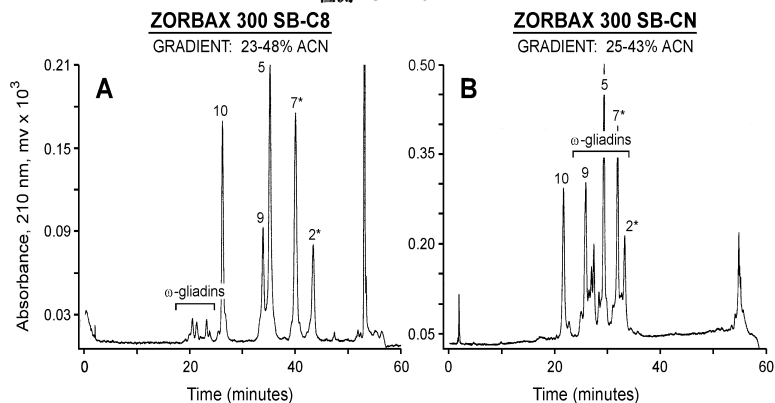


色谱选择性

即使在相同的洗脱强度下，不同的流动相组成实际上也将会导致两个色谱峰顶点的距离。在改变固定相也许可以实现选择性的巨大改变，这个例子说明在 C-8 和 C-18 色谱柱的选择性是不同的。虽然两种色谱柱都是在硅胶上键合的直链烷烃，人们会发现固定相含碳量高时选择性要强。

改变固定相提高小麦蛋白中 ω -小麦醇溶蛋白的分离度

条件: ZORBAX 300SB, 4.6 mm ID x 150mm; 线性梯度, 在 60 min 内 23 - 48% B
A= 0.1% TFA 水溶液; B= 0.1% TFA 乙腈溶液; 温度: 50° C; 流速: 1 mL/min;
检测: UV-210 nm



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

Marchylo, B.A., D.W. Hatcher, J.E. Kruger, and J.J. Kirkland.
Cereal Chemists, Inc., 69 (1992) 371-378.

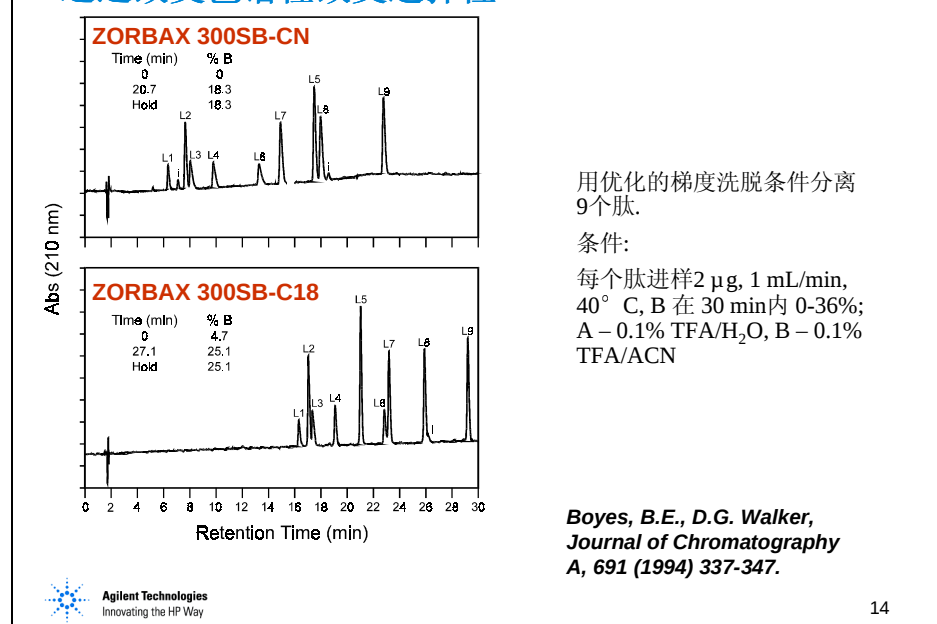
13

这是另外一个选择性的例子，在这一例子里是分离一组 ω -小麦醇溶蛋白，在 300SB-C8 上比在 300SB-CN 上可以和其他蛋白质更好地分离。

改变选择性的重要方法是改变固定相，典型情况是改变峰间距离而且常常也改变了流出次序。在这一例子里是在 300SB-C8 柱上一组 ω -小麦醇溶蛋白要比在 300SB-CN 柱上得到更好的分离。

色谱分离度和分离 选择性

通过改变色谱柱改变选择性



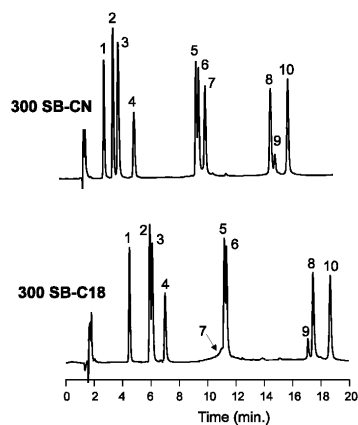
在这一例子里更换键合固定相改进选择性，对每一种固定相在探索性试验中优化梯度洗脱，氰基柱表现出一些改进分离度的结果，如可以改进 L6/L7 和在 L1 和 L2 之间的杂质以及 L8 后的杂质。总起来讲，使用 300SB-CN 柱可以获得最好的分离。

此例说明短链键合固定相的威力，在开发方法中要充分利用这种固定相。这一张幻灯片表明更换固定相可以改善 α^* ，对每一种固定相开始进行探索性试验并用 Dry Lab 软件进行优化，氰基固定相显示出对某些样品分离度的改进，例如提高了 L6/L7 的分离度，改进了 L1 及 L2 之间杂质的分离度和 L8 之后的杂质的分离度。总起来讲，300SB-CN 色谱柱可以得到最好的分离。

这说明使用短链固定相的作用，在开发方法时常常没有充分利用。这一短链固定相色谱柱未充分利用是由于常常不够稳定。稳定键合(StableBond)化学可以让我们勇敢地使用短链固定相色谱柱到 60°C。

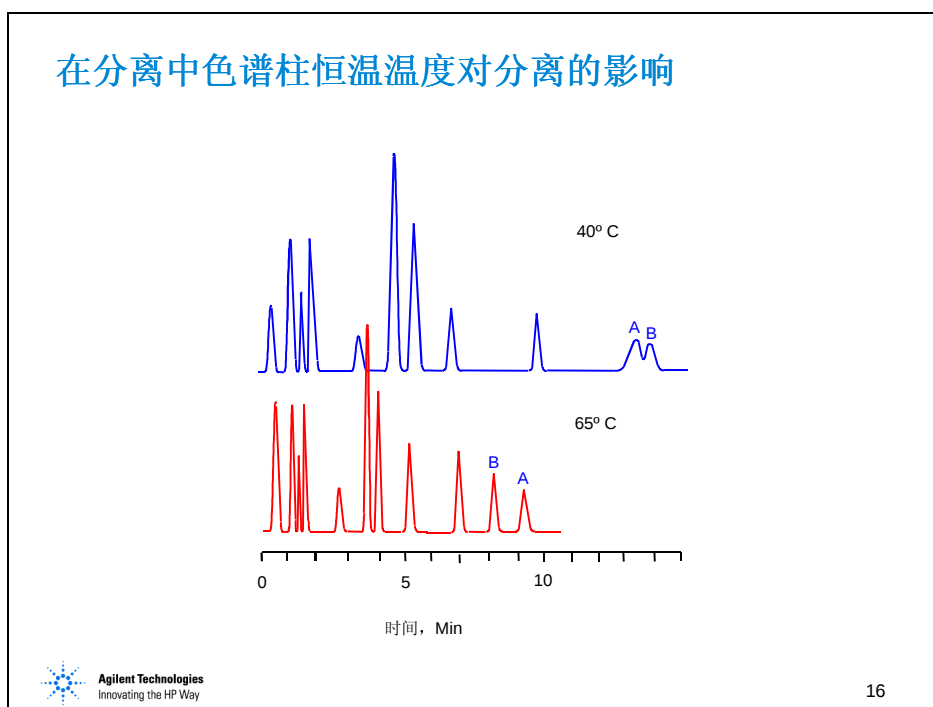
改变固定相

1. Met Enkephalin
2. Leu Enkephalin
3. Angiotensin II
4. Neurotensin
5. Insulin (BOV)
6. Insulin B chain
7. Cytochrome C
8. Myoglobin
9. Calmodulin
10. Carbonic Anhydrase



ZORBAX® 300 SB-CN, SB-C1, SB-C8, SB-C18
(4.6 x 150 mm, PN: 863995.905, 863995.909, 863995.906, 863995.902)
Mobile Phase: 15-53% in 20 min.
A: 5/95 ACN/Water with 0.10% TFA (v/v%) B: 95/5 ACN/Water with 0.085% TFA (v/v%)
Injection 10µL, 2-4µg protein (in 5M Guanidine HCl pH 7.0), 1.0mL/min., 25° C, Detect. UV(215 nm)
Contributed by Loretta A. Sandstad

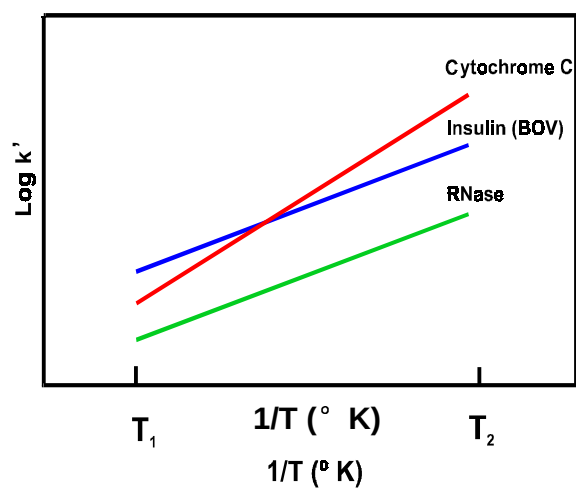
反相 HPLC 继续是分析蛋白质和肽时选用的技术，这种分离所用的流动相一般含有乙腈和三氟乙酸的水性缓冲溶液，常常和不同固定相结合来改变样品之间的选择性。



可以改变柱温使色谱柱的选择性有所变化，但是这一变化不像改变流动相或固定相那样明显，增加柱温可以提高柱效、降低被分析样品的保留时间，有时，就像这里的例子那样，改变柱温会使色谱峰流出次序发生变化，当样品分子形状和大小不同时会发生这种现象，当样品分子在 HPLC 流动相中有部分离解时也会有这种现象出现，离解的程度受温度的影响。

除去分离情况的改善之外，利用柱箱温度可以使保留时间的重复性有所提高。

调节色谱柱温度

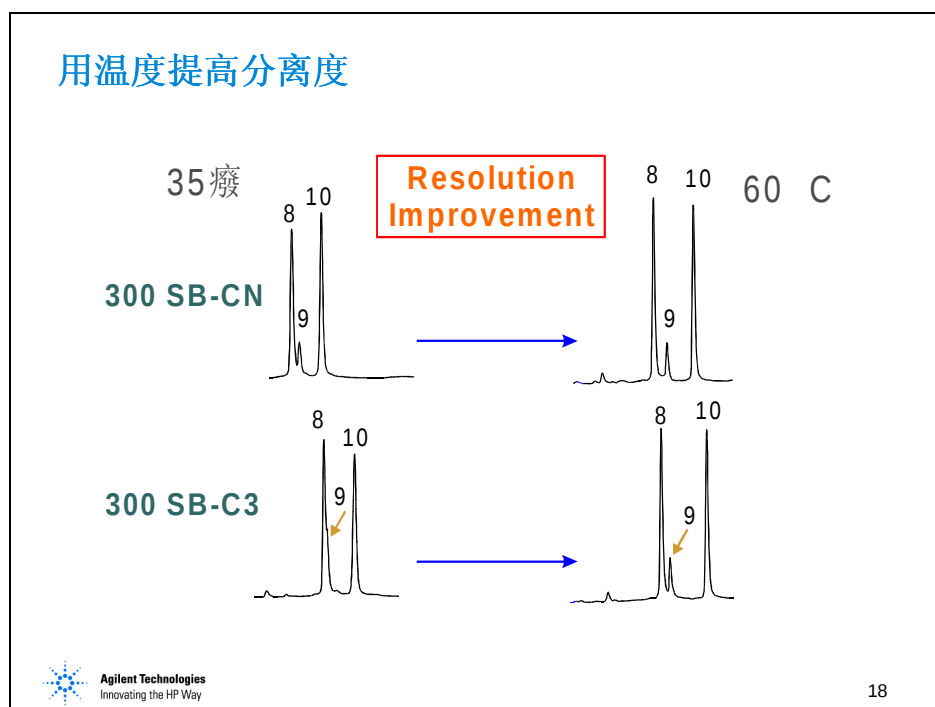


Agilent Technologies
Innovating the HP Way

17

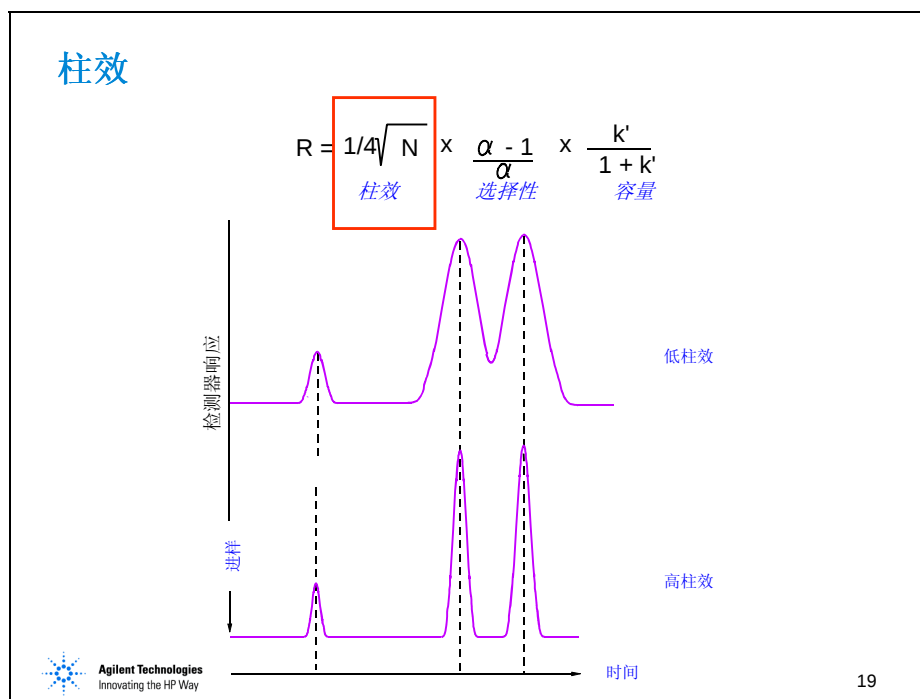
提高温度并不总是会改善分离度，这是由于改变选择性和选择性的方向（即不管哪些峰靠近或离开）无从预料。要说明的是细胞色素 C 和胰岛素在某一温度下不能分离，而比此温度高或低却可以得到分离。

色谱分离度和分离
选择性



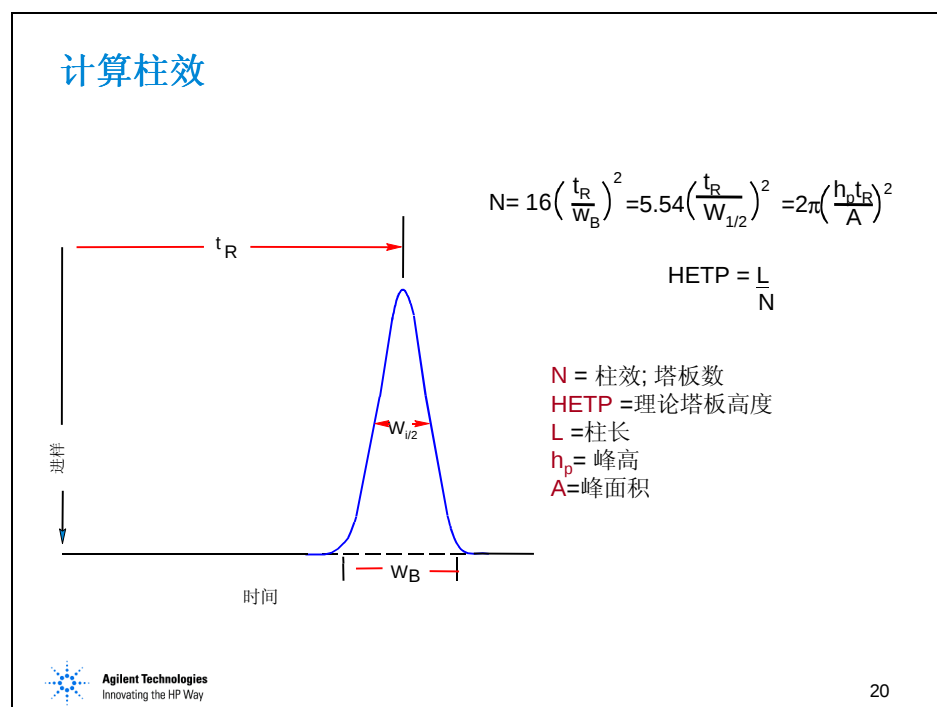
这个例子也证明增加温度可以改进蛋白质的分离度，要说明的是这里使用的是短链固定相，而且是利用了 StableBond 化学技术才可以把温度提高到 60°C。色谱峰的柱效也由于温度的提高而提高，在这一温度之后柱效不再提高甚至略有下降。

柱效



从上面介绍的色谱图可以很容易地看出，色谱峰的宽度或分散性是分离度极为重要组成部分，在理想的色谱系统中色谱峰应该像一条垂直线一样，实际上，由于分散性存在，色谱峰就成为高斯曲线的形状。柱效，N 或塔板数是色谱峰通过色谱柱之后对峰展宽的量度。

色谱分离度和分离 柱效

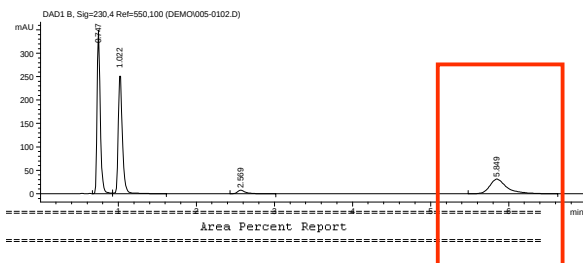


柱效常常是指塔板数，这种表征方法是 **Martin** 和 **Synge** 提出来的，他们把被分析物在两相之间的平衡和分馏理论联系在一起，使用这种方法把色谱柱分为若干理论塔板数，样品组分在柱内每一个塔板的固定相和流动相之间进行一次平衡，所以色谱柱的塔板数越多平衡的次数也越多，分离的机会也越多。理论塔板高度越小分离度越好。

上面列出了计算柱效的公式，他们是从分配理论和随机统计学推倒出来的，对 4.6 x 100 mm 装 5 μm 填料的色谱柱典型柱效在 5000 到 8000 塔板数之间，自然，色谱峰的塔板数越高分散性越小。

理论塔板数常用于对给定方法的色谱柱确定其柱效，方法的开发者要决定当色谱柱的柱效降低到某一预定数值之后就不能再用，这时就要更换新的色谱柱了。

计算柱效



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Friday, July 09, 1999 2:36:23 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

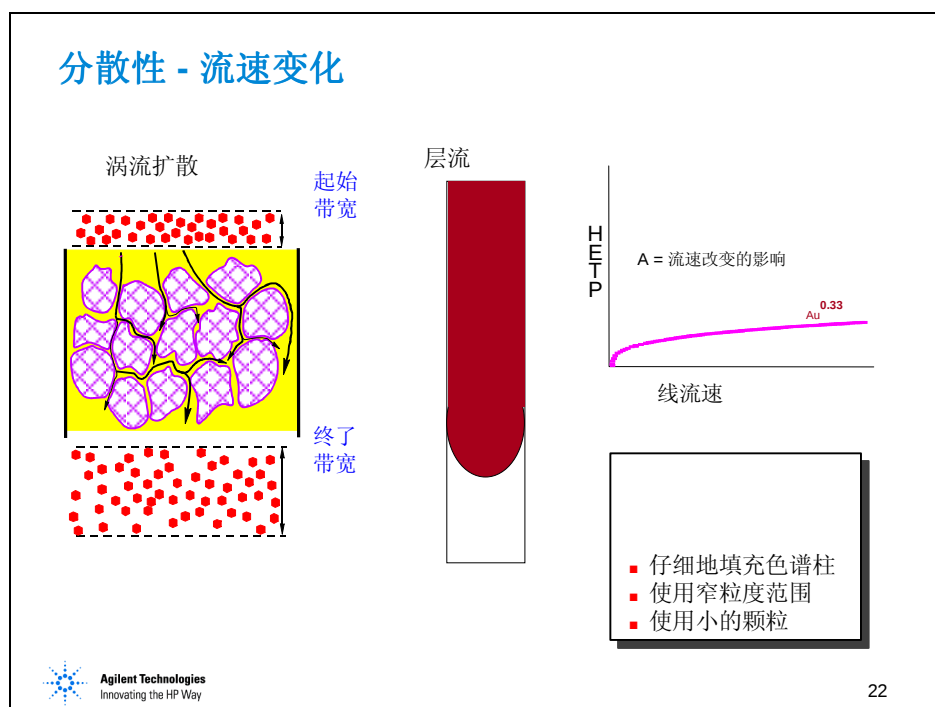
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,4 Ref=550,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	0.747	VV	0.0431	985.98547	40.7097	dimethylphthalate
2	1.022	VB	0.0985	916.51312	37.8413	diethylphthalate
3	2.569	EB	0.1000	51.33152	2.1194	biphenyl
4	5.849	BV	0.2247	468.16312	19.3297	o-terphenyl

Totals : 2421.99323

答案 _____

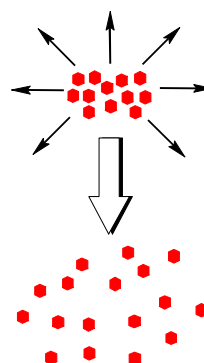
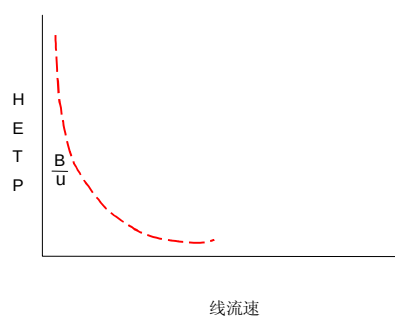
计算方框内色谱峰的柱效，你认为这一色谱柱是新的吗？



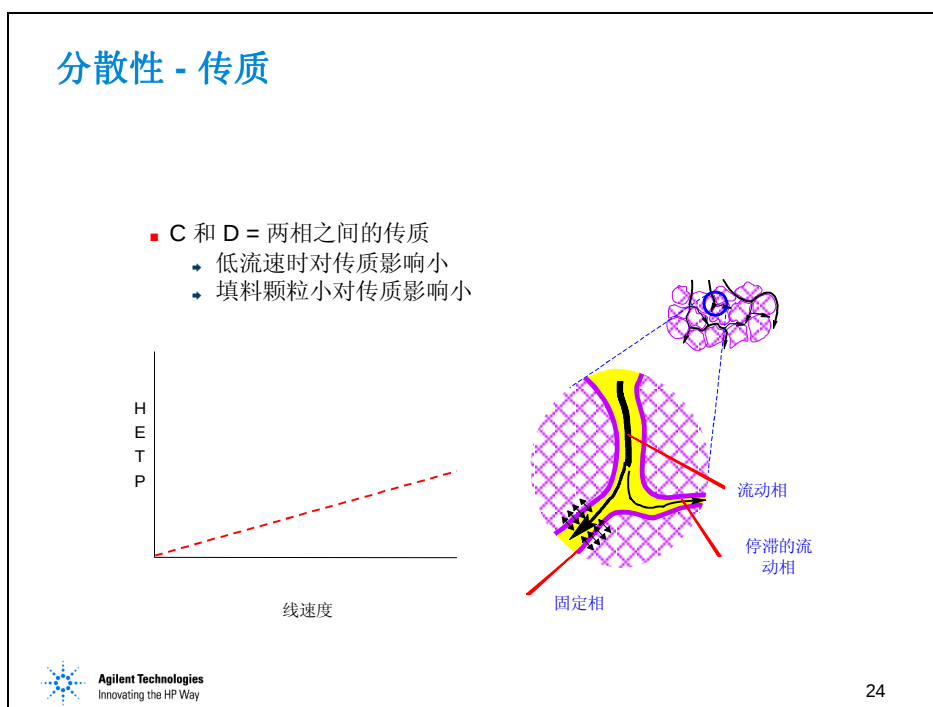
有一些因素影响色谱的分散性从而降低柱效，流速的变化对分散性有影响，涡流扩散项使流路曲折，要绕着固定相填料流动。层流造成分散是因为分子在管中心的流速高于在管壁的流速，在此情况下的管壁是颗粒与颗粒之间的通道，要减小这一项引起的分散性就要仔细地装填色谱柱，使用小颗粒和粒度范围小的填料。你可以选择色谱柱厂家和粒度以尽可能地减小这一项的影响。

分散性- 纵向扩散

- 对LC影响小
- 流速小时影响大



影响分散性的另外一个因素是纵向扩散，这是平常所说的在流动相中溶质分子的扩散，被分析物会从浓度高的区域向浓度低的区域运动，你在一杯水中滴入一滴食物色素就可以观察到这种现象，过一会儿整个杯子的液体都染上色素的颜色。HPLC 中只有在线流速小时这一项才明显。



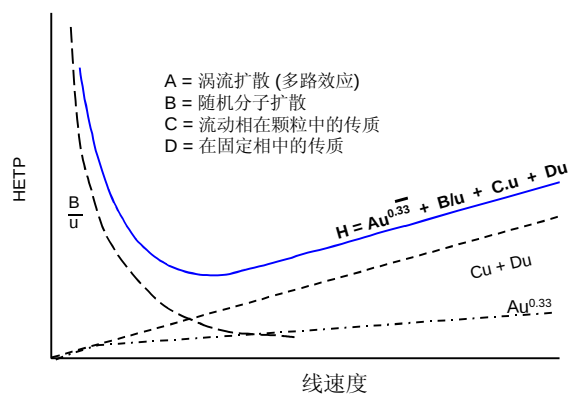
在高的线流速下对传质有很大的影响，分散性很大主要是由于样品分子进入固定相定相孔中所引起，一旦进入孔中它们就必须从孔中扩散出来，同时其他未进入孔中样品的分子离开进入孔中的分子流出色谱柱，这一过程造成了色谱峰的展宽，这就是 C 项，溶剂粘度低从孔中扩散出来就快。

另外一个要考虑的传质因素是 D，是样品分子和固定相作用和扩散到固定相中的速度有关，样品和固定相作用，是临时停留在它里面，由于在这一停留的时间的不同造成了分散性。

为了减小 C 和 D 的影响，选择小颗粒的填料，使其孔深不厉害，为此设计了其他类型的填料，如薄壳型填料，这种填料有坚实的内核，但是这类填料没有得到推广，原因是它的颗粒大，作用的表面积小。灌注色谱填料有流通孔和较浅的滞留孔，这种色谱柱在 LC/MS 和制备型 HPLC 中得到应用。

分散性 - 整体作用

改进的VanDeemter 方程



这三项是加和性的，它们结合在一起就成为上述的曲线，这一方程式是由原始的 VanDeemter 方程改进而得到的，实线是描述理论板高和线速度之间的关系，简单地说这一曲线告诉我们，一个分析用色谱柱有一个最佳的流速，即对应于线流速曲线最低点的柱效，在这一流速下其柱效最高，HETP 值最小。典型情况下，人们在高于曲线最低点的流速下工作。

此后，你会学习到固定相填料粒度如何影响这一曲线。

流速

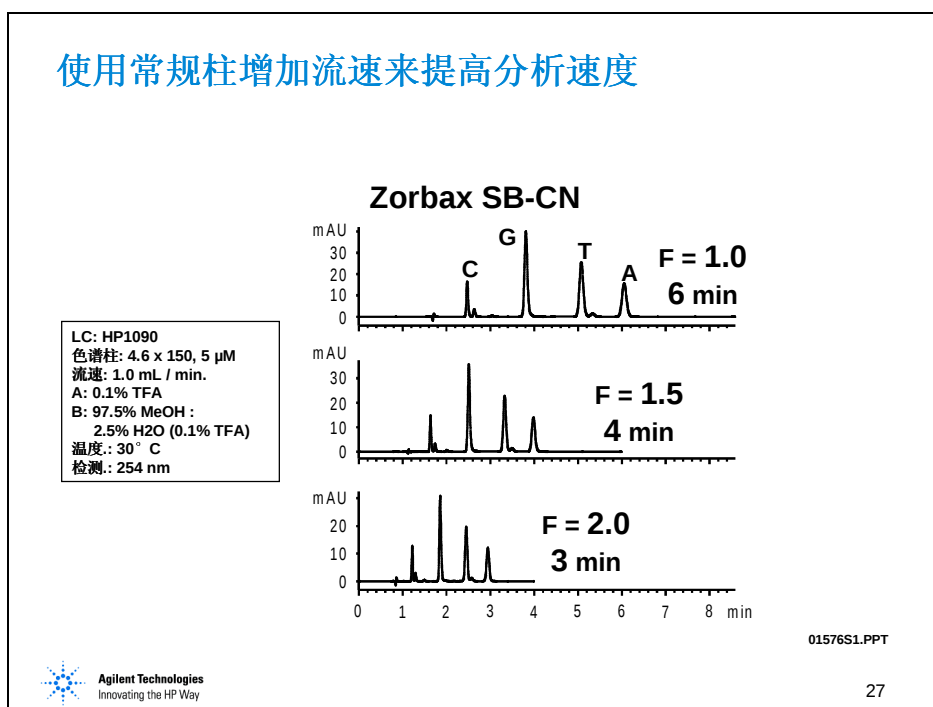
典型的流速

mm i.d.(5um 颗粒)	m L/m in
4.6	1-2
3.0	0.4-0.8
2.1	0.2-0.4
1.0	0.05-0.09

$$\text{流速}_2 = \left(\frac{\text{i.d.}_2}{\text{i.d.}_1} \right)^2 \text{流速}_1$$

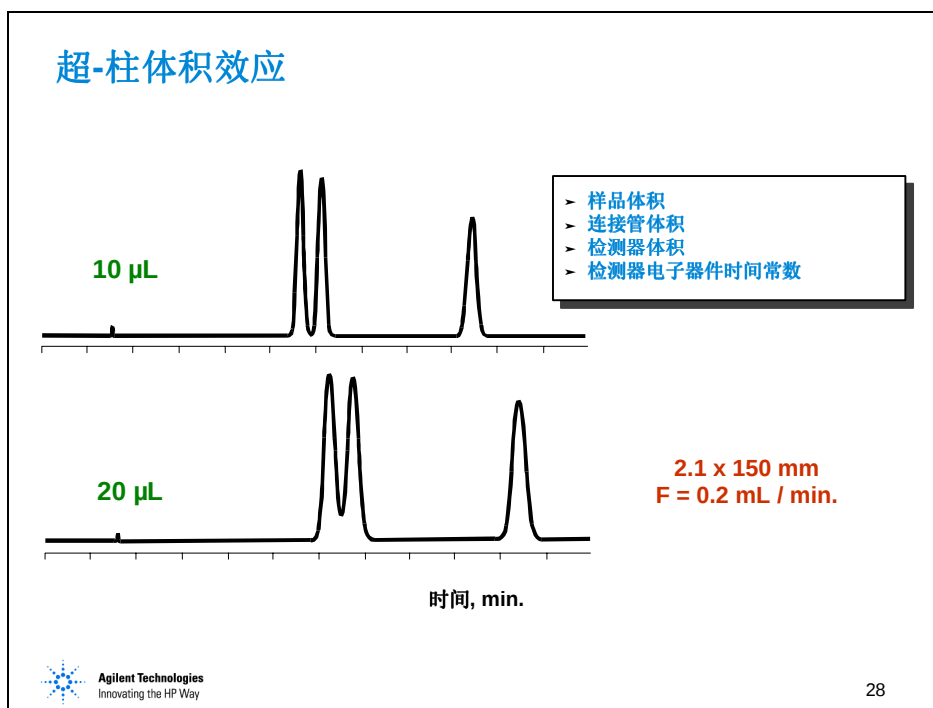
一般情况下流速决定于色谱柱内径，流速是一个实验变量，对分离度影响很小，用来做精细调节色谱图。

使用常规柱增加流速来提高分析速度



现在许多色谱工作者的兴趣在于优化分析时间，所以他们以高于常规使用的流速进行分析，高流速会提高分析速度，增加分析数量，这一技术使用到系统的最高压力和分离度达不到要求时为止，要知道对 4.6 mm i.d. 的色谱柱流速高于 3 mL/min 会冲刷填料，降低色谱柱寿命。

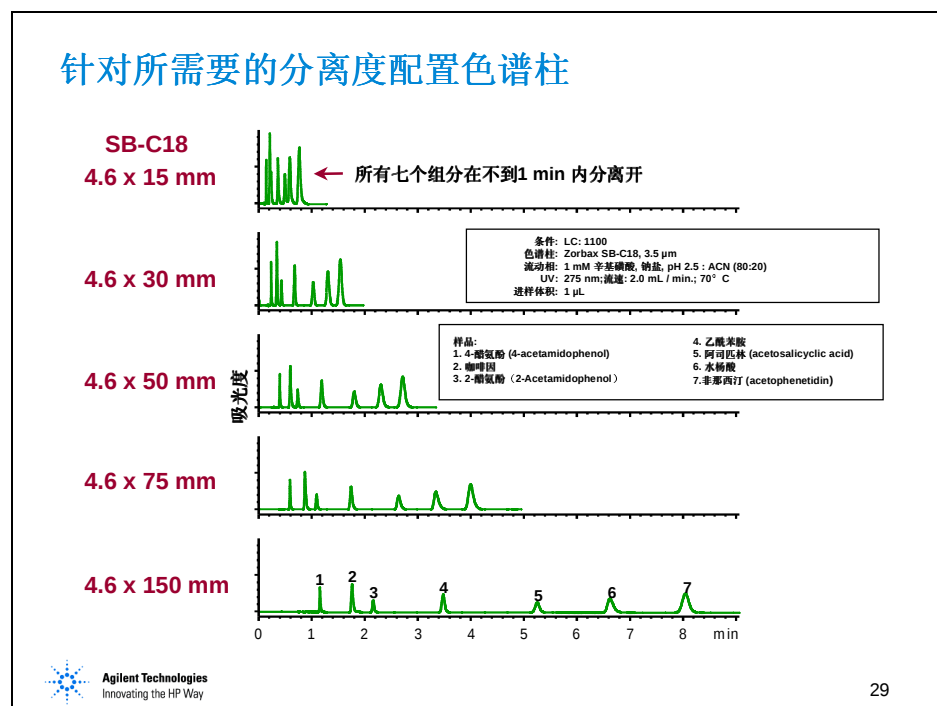
柱效



上面讨论的是在色谱柱在发生的峰展宽，还有其他因素可以造成色谱峰的分散性，这是由于色谱柱外的因素造成的，把它叫做超柱效应。连接管是造成超柱效应的一个因素，在一个设计很好的 HPLC 系统，这一超柱效应造成的分散性与柱内造成的分散性相比可以忽略不计，色谱工作者必须尽力把液相色谱仪进样口到检测器到管道的长度和直径减小，一台低分散性的 HPLC 所用管道应为 0.12 mm i.d.，也要使检测器流通池的体积减到最小，也要小心地使 HPLC 的接头匹配，在流路中有任何小洞都会造成色谱峰的展宽。此外也要仔细地设定检测器的时间常数。

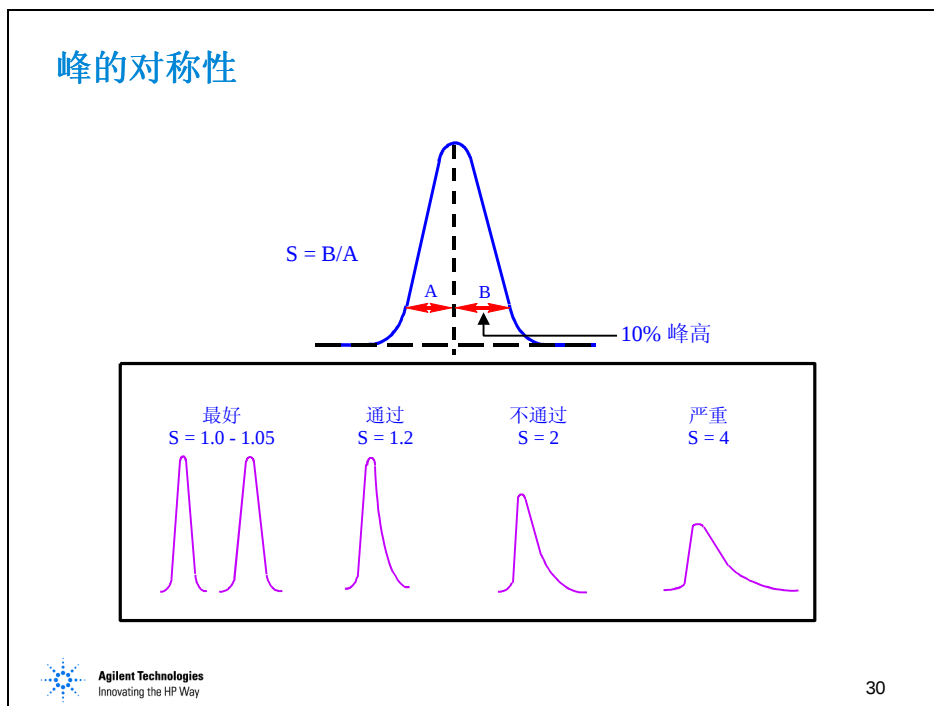
如果超柱效应太高，那么分离度就会由于在分离度公式中的 N 项减小而降低，主要是降低了塔板数。这里，超柱体积只增加 10 微升，开始的两个峰就分不开了。

柱长



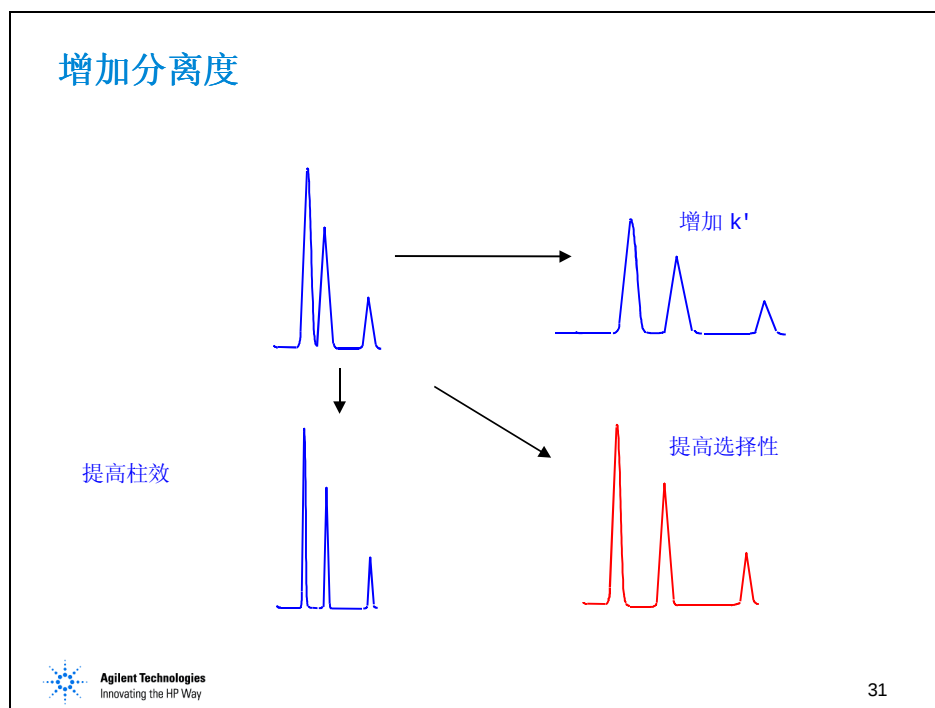
从分离度的公式中可以看到，增加柱长由于提高了柱效也就增加了分离度。为了提高分析速度，要记住如果分离度有富裕的话，你可以使用短色谱柱加速分析。

总结



在理想的情况下，色谱峰应该是高斯峰或对称峰，但是由于超柱效应、样品在固定相上的吸附或色谱柱床不正常，使色谱峰出现拖尾。可以使用不对称公式计算色谱峰的不对称度，上面所列公式是在分析中所用公式的一种，和柱效的公式一样，方法认证人员可以决定当不对称度超过某一数值时这一方法无效。一般当不对称度是 3 或更高时就不适合于积分和定量分析。

分离度



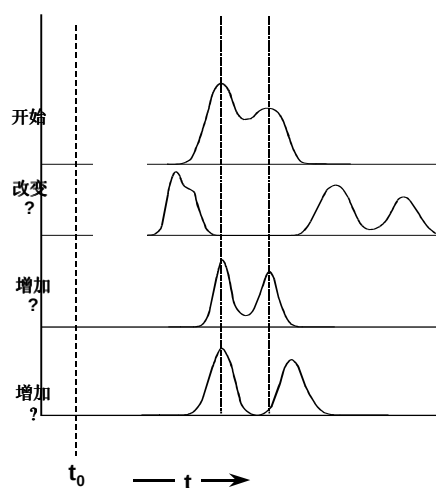
总起来讲，影响色谱峰之间分离度的因素有三个，它们是容量，柱效和选择性。提高柱效、 N 、色谱峰尖锐。主要是色谱柱长度、类型、和颗粒度大小控制这一因素。增加容量， k' ，是使色谱峰的保留时间长一些还是短一些，主要是流动相和温度控制这一因素。提高选择性， α ，是使色谱彼此靠近一些还是距离远一些，主要是键合相、流动相和温度控制这一因素。

作业

作业

说明在各个情况下分离度公式中
哪些项目改变了： N , k' , 或 α 。

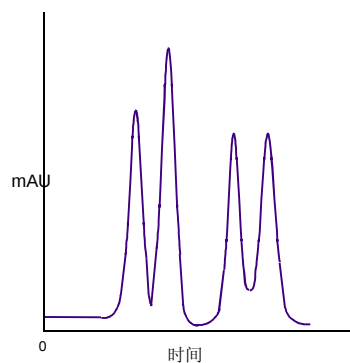
在各个情况下，要改变哪些参数
(如：流动相组成) 可提高起始
的分离情况？



回答上面右图中的两个问题。

从原始分离中提高 N 使色谱峰变窄，保留时间一样，主要由色谱柱柱长和填料颗粒度来控制。提高 k' 意味着增加或缩短保留时间，主要由流动相和温度控制，图中所示一对色谱峰在改变流动相中有机溶剂时保留时间增加或缩短，增加 α' 意味着提高选择性，或使色谱峰彼此靠近或离开，主要由键合相、流动相和温度来控制。

作业



在100 x 4.6 mm i.d., 10 μ m, C-8 色谱柱上进行分析，
流速为2 mL/min，流动相是70/30 IPA/水。

列表说明提高分离度的途径。

回答上面的问题。

作业

- 列出增加样品组分保留值的三个途径。
- 列出降低色谱峰宽四个途径。
- 下列哪些参数影响柱效？
 - 洗脱强度
 - 流动相粘度
 - 固定相颗粒大小
 - 柱长
 - 柱温
 - 超柱效应

回答上述问题：

1.

2.

3.



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：HPLC 参数

实验室训练：HPLC 参数

在这一实验室训练中，你要：

在这一实验室训练中，你要：

- 探究分离度和流动相组成之间的关系。
- 测定怎样的流速会影响你的分析。
- 利用柱温改变分离程度。
- 测量峰的对称性。

材料

- 一支 SB-C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 微米的色谱柱, 部件号 863953-902。
- 测试混合物, 部件号 01080-68704, 加入死体积标记物。
- 通道 A 为 HPLC 级别的水, 通道 B 为 HPLC 级别的乙腈。
- 一台通电的带所有部件的 1100 液相色谱仪。
- 一台 HPLC 化学工作站, 配备光度检测器部件。

流动相组成

在本节的实验训练中，你将测定怎样的流动相组成会影响分离。

- 78) 把这次要进行的试验样品瓶放到自动进样器的 10 号位置。
- 79) 把溶剂输送系统初始化，如需要指导可参考实验室的仪器说明书。
- 80) 查看色谱柱并记录以下的柱性能：

色谱柱固定相

柱内径

柱长

所安装的色谱柱为填充 3.5 微米填料的反相 HPLC 色谱柱。

- 81) 进入化学工作站的 **Method and Run Control** 屏幕
- 82) 到 **Method** 菜单，然后到 **Load Method**。
- 83) 调用默认方法，**def_lc.m** 作为创建方法起始点，然后点击 **OK**。
- 84) 从 **Method** 菜单上选择 **Edit Entire Method**，只选择
Instrument/Acquisition，Data Analysis，和 Run Time Checklist 进行编辑，在此窗口上点击 **OK**。
- 85) 按下面的窗口填写溶剂输送系统的参数。

Setup Pump : Instrument 1

Control
Flow: 2.000 ml/min
StopTime: no Limit min
PostTime: Off min

Solvent A
10.0 %

Solvent B
90.0 %

Pressure Limits
Max: 400 bar
Min: 0 bar

Timetable

Time	%B	Flow	Max. Press.
------	----	------	-------------

Insert
Append
Cut
Copy
Paste

Display:
Timetable

OK Cancel Help

在此窗口上点击 **OK**。

我们开始使用最强的流动相，90% 的乙腈。

你预计会发生怎样的情况？

86) 你可以进 2.0 μ L 的标准样。在设定进样器 (Setup Injector) 窗口上点击 **OK**。

87) 设定柱箱温度为 40°C，在此窗口上点击 **OK**。

88) 按下面的屏幕填写 DAD Signals，点击 **OK**。

注 意：如果你使用 VWD，选择波长为 260 nm。

实验室训练: HPLC 参数
流动相组成

DAD Signals : Instrument 1

Signals

	Store	Sample.Bw	Reference.Bw	
A:	☒	260	20	360 100 nm
B:	☐	254	16	360 100 nm
C:	☐	210	8	360 100 nm
D:	☐	230	16	360 100 nm
E:	☐	280	16	360 100 nm

Spectrum

Store: **None**

Range: **190** to **800** nm

Step: **2.0** nm

Threshold: **1.000** mAU

Time

Stoptime: **as Pump** **no Limit** min

Posttime: **Off** min

Required Lamps

☒ UV ☐ Vis

Peakwidth (Responsetime)

> 0.1 min (2 s)

Autobalance

☒ Prerun ☐ Postrun

Slit

4 nm

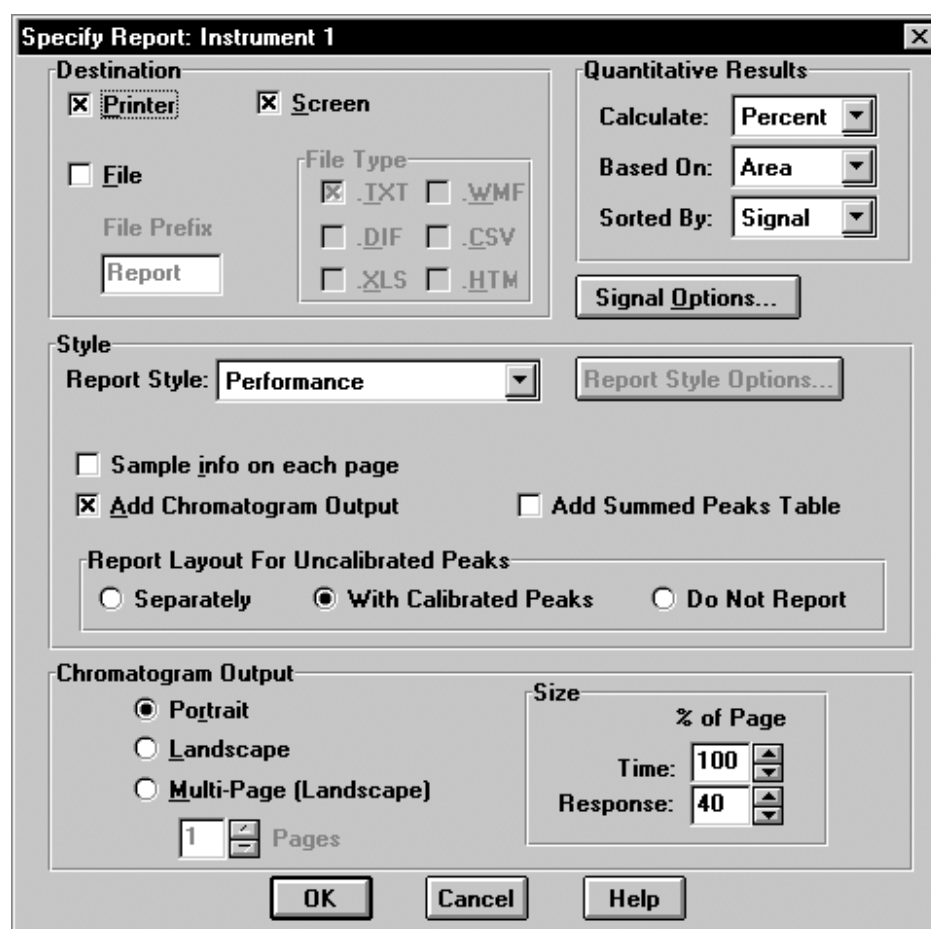
Margin for negative Absorbance

100 mAU

Timetable ... Total Lines: 0

OK Cancel Help

- 89) 在此详细的信号窗口 (Signal Details) 选择波长, 260, 20, 360, 100 并把它加到方法中 (**Add to Method**) 在此窗口点击 **OK**。
- 90) 在默认的积分事件上点击 **OK**。
- 91) 选择下面的报告说明, 在此窗口点击 **OK**:



- 92) 在对话框中选择设定范围，点击 **OK**。
- 93) 在 Run Time Checklist，选择 **Data Acquisition** 和 **Standard Data Analysis**。用数据文件存储方法的拷贝件。
- 94) 从 **Method** 菜单上选择 **Save Method As....** 把方法命名为 **mobile.m**。
- 95) 从 **Instrument** 菜单上选择 **System On**。让色谱柱平衡并让检测器预热几分钟。
- 96) 进入 **View** 菜单选择 **Online Signals**，Signal Window 1。一旦窗口有显示就选择 **Change**。
- 97) 在 x-轴范围填写 20 min，选择绘制 0 线框。

流动相组成

- 98) 点击一个可使用的信号, 然后点击 **Add** 进入这个被选择的信号框。
- 99) 设定 y-轴的范围到 100 mAU 并把补偿设为 10%, 在此窗口点击 **OK**。
- 100) 一旦达到一个稳定的基线和压力, 降到 **RunControl** 菜单并选择 **Sample Info....**。
- 101) 填写操作者姓名 (Operator Name), 文件名 Filename (100.d), 子目录 (你的名字), 样品瓶号 (10), 样品名 (test mix) 和任何注释。
- 102) 在此窗口点击 **OK**。
- 103) 在 **Mobile Phase Composition Analysis** 下的表中记录测得的压力。
- 104) 用 **Start** 工具或从化学工作站菜单上按 **Run Method**. 开始方法的运行。
- 105) 当色谱峰出来以后停止运行, 分析报告会自动打印出来。
- 106) 从打印机上取下分析报告以备进行评估。

流动相组成的数据

- 107) 从 **Instrument** 菜单上选择 **Setup Pump** 菜单项目。
- 108) 改变流动相组成为 **80% B**。
- 109) 重新使色谱柱平衡, 记录压力。
- 110) 从 **RunControl** 菜单上选择 **Sample Info...** 进入数据文件给它一个新的名字 (80.d)。
- 111) 重新进样并得到分析报告。
- 112) 在 **60% B** 情况下重复进样。
- 113) 在下一页上回答问题。

流动相组成分析

利用打印出来的分析报告填写下面表中内容， t_0 是第一个峰。

数据 结果	柱压力	t_0	t_3	t_4	峰宽 $_{1/2}$ 峰 3	峰宽 $_{1/2}$ 峰 4	面积 峰 4
90% B							
80% B							
60% B							

数据 结果 t_R	k' 峰 3	k' 峰 4	选择性 α	柱效 N	分离度 峰 3, 4
90% B					
80% B					
60% B					

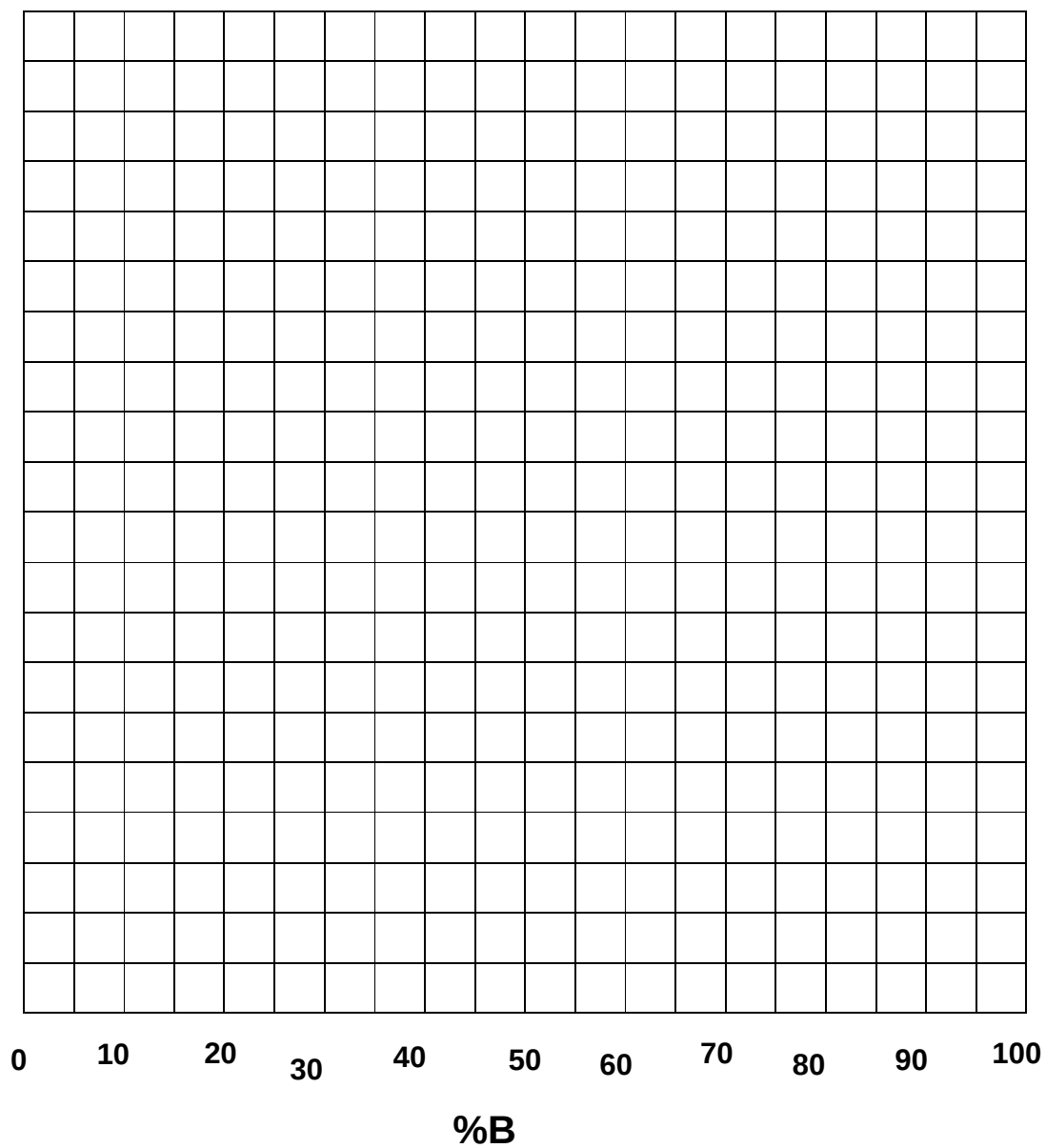
114) 说明柱压如何随流动相的组成变化而改变。

115) 当有机物含量减少，水含量增加时分离度发生怎样的变化？

实验室训练: HPLC 参数
流动相组成分析

116) 画出每个化合物的结果。

分离度



117) 分离度和 %B 之间有何关系?

流速

118) 你现在可以在不同的流速下进样，用下列参数开始试验：

流速： 2 mL/min

% B 65%

其他参数和上面一样。

119) 进行分析，收集分析结果。

120) 在 0.2, 0.6, 1.0, 和 2.5 mL/min 流速下进行分析。

数据分析

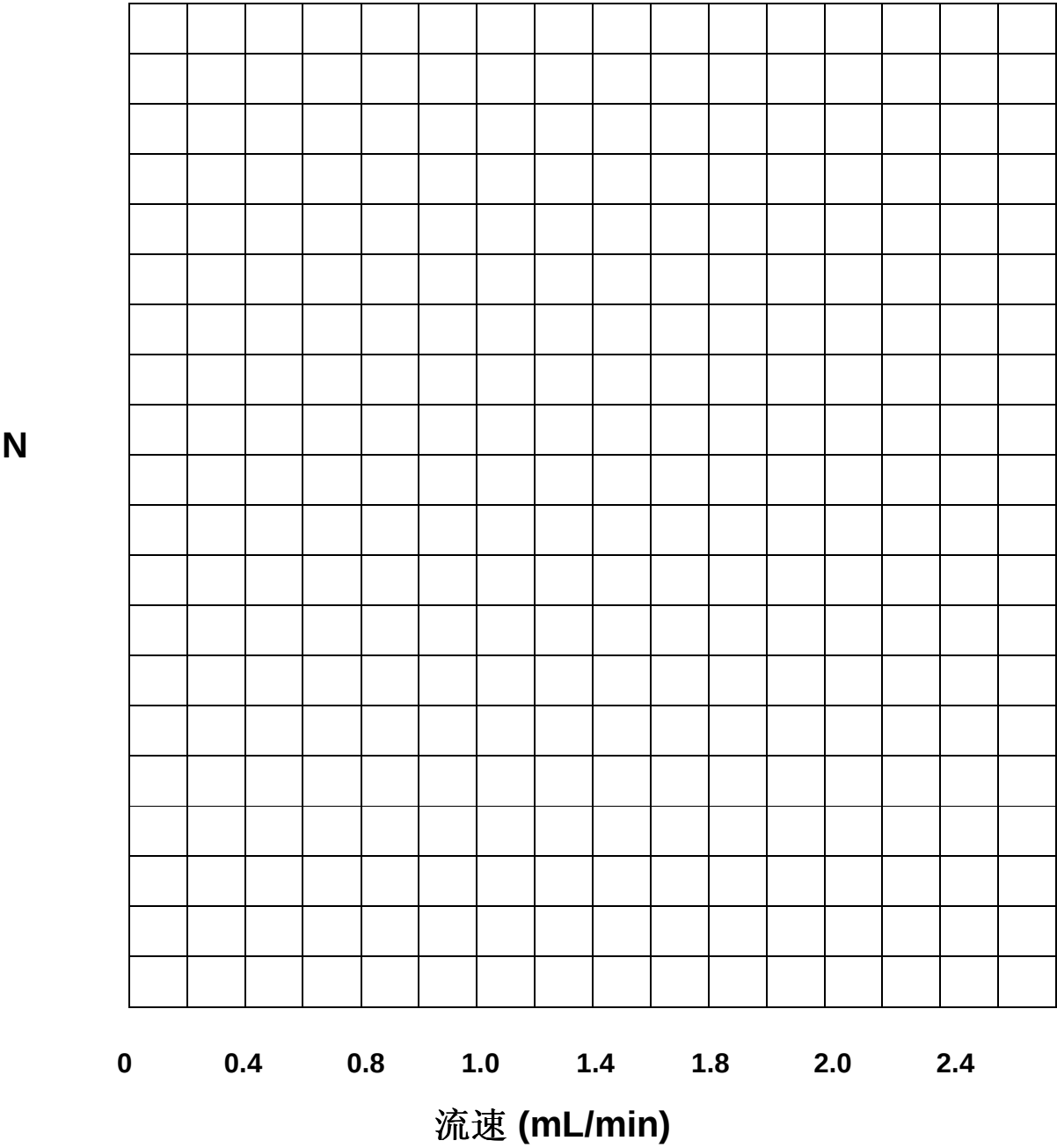
填写下表并回答问题。

数据 结果	柱压	t_0	t_3	t_4	峰宽 $_{1/2}$ 峰 3	峰宽 $_{1/2}$ 峰 4	面积 峰 4
0.2 mL/min							
0.6 mL/min							
1.0 mL/min							
2.5 mL/min							

数据 结果	k' 峰 3	k' 峰 4	选择性 α	柱效 N	分离度 峰 3, 4
0.2 mL/min					
0.6 mL/min					
1.0 mL/min					
2.5 mL/min					

121) 峰面积随流速的变化情况如何? 如果你的泵系统保持不稳定会如何呢?

122) 用得到的数据绘制图表:



123) 用怎样的流速可以得到最大的柱效。

124) 在高流速下柱效损失多少?

柱箱温度

125) 你现在使用不同的柱温进样，用下列参数开始进行试验：

流速：	2 mL/min
% B	65%
温度	40°C

126) 其他分析参数与上面的试验相同。

127) 在这些条件下已经分析过的样品，把得到数据填入前面表中要求的信息，否则你就重新进样收集数据。

128) 进行 60°C 和 70°C 下的分析，要达到规定的温度需要等待一些时间，进行完最后一个实验，一定要把柱箱温度调回到 40°C。

温度数据分析

把要求的数据填写到下面的表格中。

数据 结果	柱压 e	t_0	t_3	t_4	峰宽 $_{1/2}$ 峰 3	峰宽 $_{1/2}$ 峰 4	面积 峰 4
40°C							
60°C							
70°C							

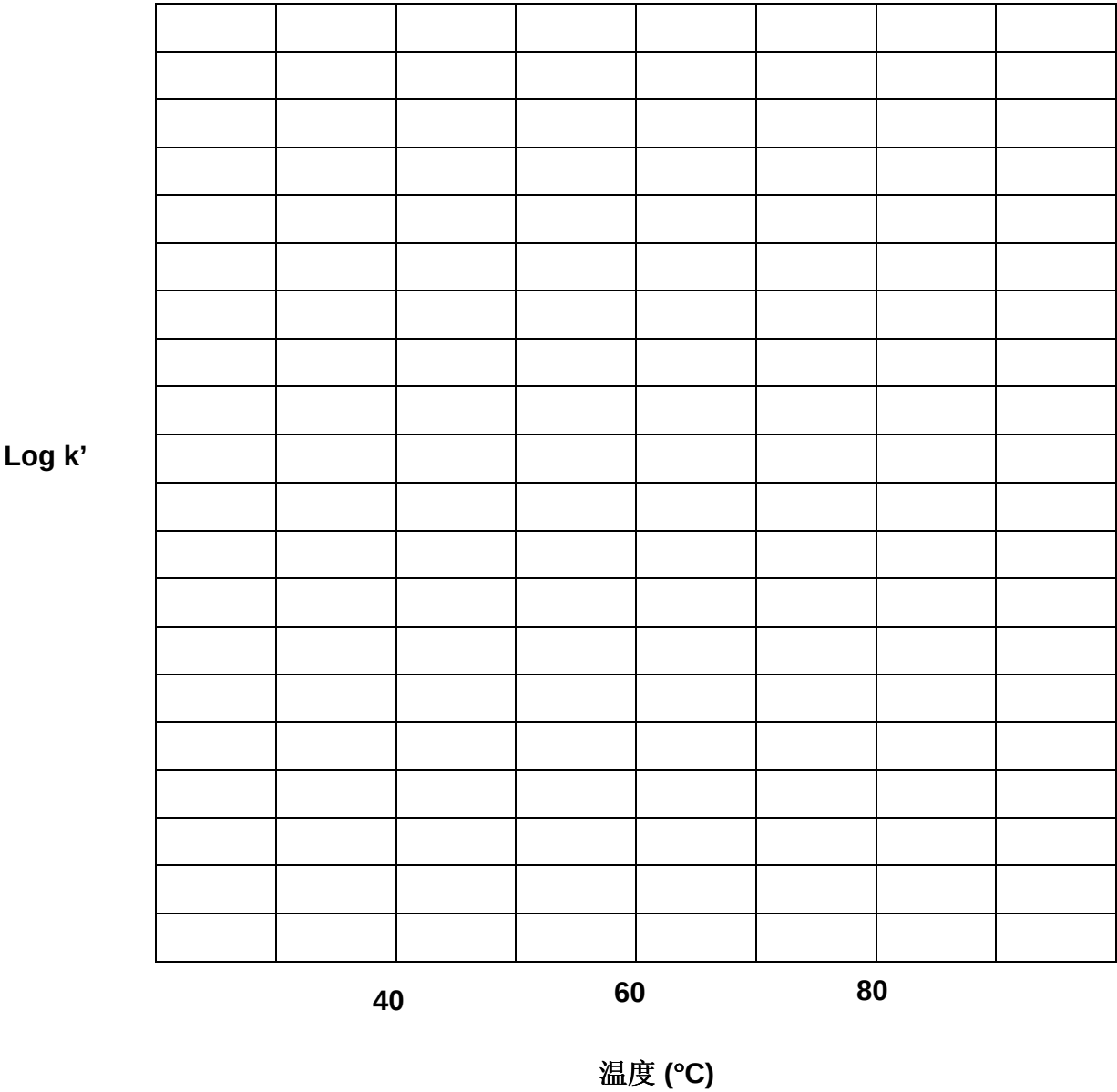
数据 结果	k' 峰 3	k' 峰 4	选择性 α	柱效 N	分离度 峰 3, 4
40°C					
60°C					
70°C					

129) 当柱温增加时柱效有何变化?

130) 当柱温增加时分离度有何变化?

实验室训练：HPLC 参数
温度数据分析

131) 绘制两个样品化合物 $\log k'$ 对柱温的变化曲线。



132) 你所画的两个曲线的斜率一样么？这说明了什么？



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

一般性故障排除



在这一节，你将学习：

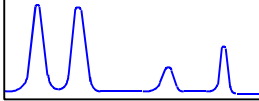
在这一节，你将学习：

- 溶剂输送系统，进样系统，和检测系统硬件的基本故障排除.
- 如何排除基线性能的故障.
- 有关一般性故障.
- 峰形引起的故障.

要保留记录

要保留记录

标准色谱图



记录
完成分析的维修数据

运行记录本

Date	Logbook Service
11/2/94	check
12/1/94	valves
	pump
12/4/94	seals
	new
	column

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

HPLC 色谱柱的测试

对新拿到的色谱柱进行等度洗脱的记录:

- 记录理论塔板数, N , 同时有:
 - 色谱柱的长度和直径
 - 化合物的和 k' 值
 - 流动相和固定相
 - 流动相流速
 - 样品量
 - 温度
- 峰对称性.
- 包括, 酚和胺} 为测试抗酸、碱性.
- 记录:
 - 柱压
 - 完成分析
 - 维修数据

HPLC 仪器维修记录应当逐年积累, 以便容易及时地进行维修, 从这一记录你可以可靠地进行预防性维护, 如泵和球阀的更换。色谱工作者应当安排一个可靠的测试混合物, 用来区分是仪器的故障还是方法的问题。包括弱酸和弱碱能够测试反相色谱柱酸性。

关心照顾仪器

关心照顾HPLC 避免出现故障

pH范围

- 仪器 pH 范围 2.3 - 9.5
- 扩展 pH范围 2.3 - 12.5

腐蚀不锈钢

- 盐酸
- 无机酸和强酸
- 碱金属卤化物 (氯化钠, 碘化锂)
- 四氯化碳和2-异丙醇或THF
- 络合剂 (EDTA, 柠檬酸, 乙酸)

侵蚀石英和vespel

- 碱性溶液, pH>11

使用上述物质时HPLC要经常性维护, 如果使用, HPLC的泵和其他部件在完成实验后要彻底冲洗.

HPLC 仪器制造厂家指定了他们仪器可以使用的流动相的 pH 范围, 这一范围是对仪器而言的, 当需要使用碱性的 pH 时, 有扩展 pH 范围的工具箱, 使用表中所列的流动相添加剂时不需要频繁的维护, 在 HPLC 中使用这些添加剂或流动相时, 一定要在关机以前冲洗流路。

保留时间和峰面积

保留时间和峰面积的重复性

可能造成保留时间的故障:

- 流动相组成变化
- 溶剂输送系统故障
- 色谱柱平衡问题
- 色谱柱故障
- 色谱柱箱温度

峰保留时间精密度:

⇒ 有柱箱: $\leq 0.3\%$

⇒ 无柱箱: $\leq 0.7\%$

峰面积精密度: $\leq 1.5\%$

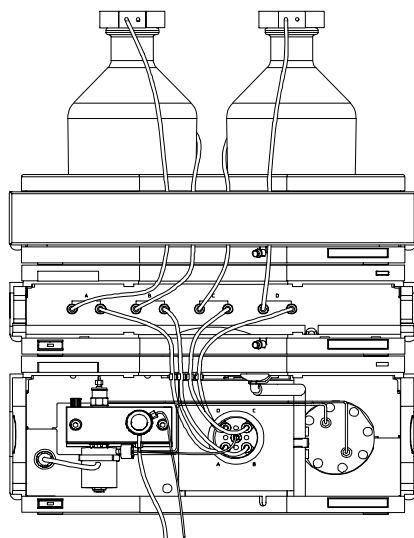
可能造成峰面积问题的原因:

- 进样器故障
- 泵流路故障
- 检测器平衡故障

一个了解泵性能的常用方法是检查色谱峰的保留时间和峰面积的重复性。上面所示为 1090 液相色谱仪典型的相对标准偏差。如果开始进行一个已知的分析，其标准偏差高于此正常数值，泵就需要维修了。

仪器的故障排除

一般泵故障



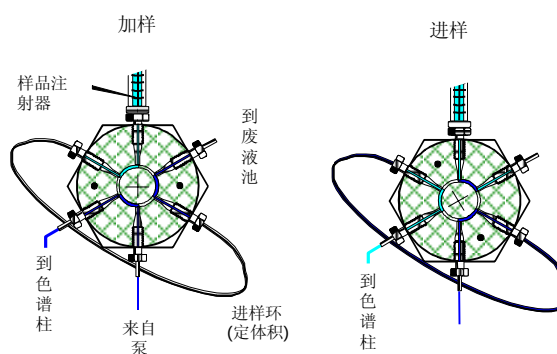
- 夹带空气
 - 流动相脱气
 - 使泵初始化
- 阀
- 密封件
- 活塞
- 泄漏

最常见的有关泵的故障有定期的基线波动，这是由于泵中有气泡所致，这一故障只要把流动相脱气、重新启动泵就可以很快地解决。其他泵故障包括计量泵的密封圈漏液，活塞划痕，球形阀损坏，以及线内过滤器堵塞。

手动进样阀

- 色谱柱故障
- 不合适的注射体积或型号
- 阀堵塞
- 进样口泄漏
- 样品携留
- 交叉口泄漏

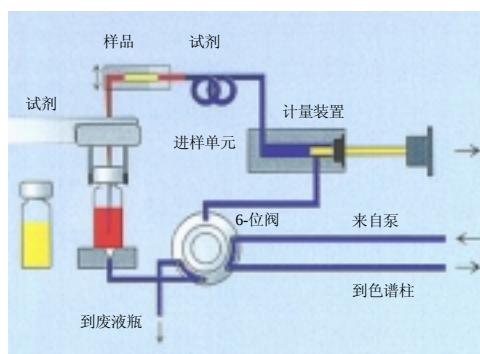
手动进样阀- 六通固定进样环



由于使用手动进样阀而造成了一些常见的故障，堵塞是常见的问题，除非操作者在使用完之后仔细地冲洗样品环，样品在可能发生携带效应，除非在两次进样之间冲洗样品环，必须以 5 倍的样品环体积注入手动进样阀，以便不在样品中造成浓度梯度。时间长了，在进样阀的转子密封圈上会出现交叉口的泄漏，当出现这样的泄漏时，峰高或峰面积会不一致，为此转子密封圈必须更换。气相色谱进样针（有锋利的尖）一定不能用于 LC 的进样，因为它会划伤转子密封圈。

一般性故障排除
仪器的故障排除

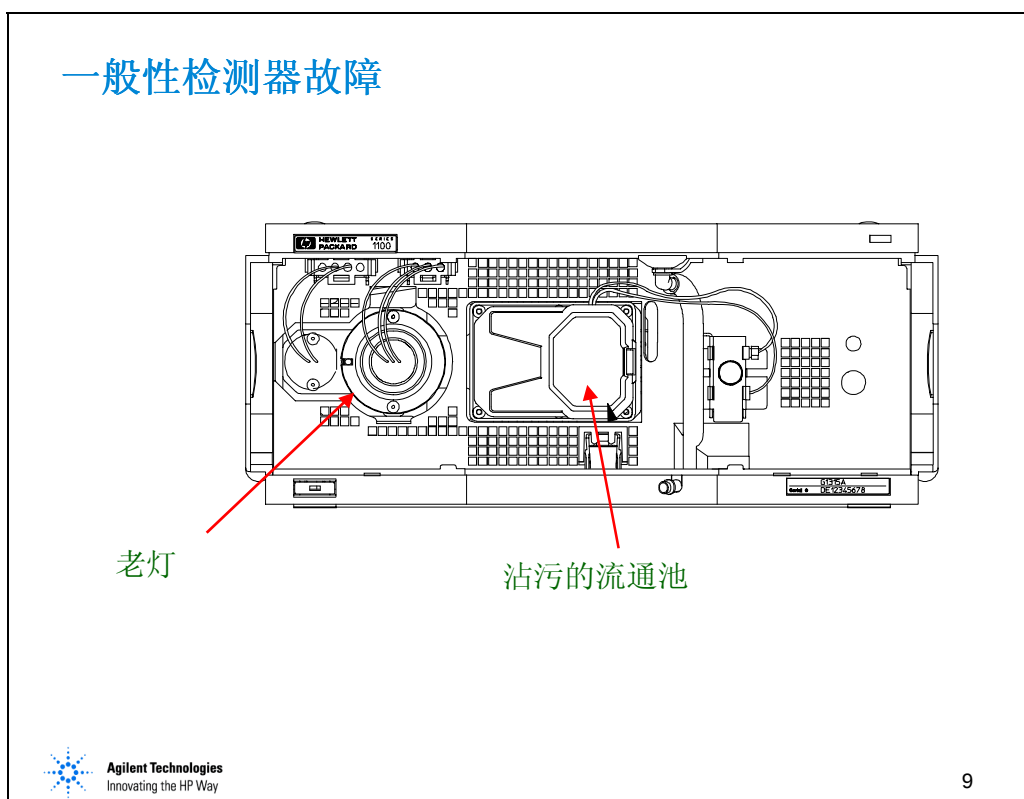
自动进样器



- | 故障: | 排除: |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">■ 有关样品<ul style="list-style-type: none">• 在未预先充样时针和管道被堵塞• 当样品瓶中有密度梯度时, 峰重复性差■ 针<ul style="list-style-type: none">• 由于隔垫造成的堵针• 针弯曲 | <ul style="list-style-type: none">■ 需要时更换针座■ 需要时更换针■ 需要时更换自动进样器中的转子或密封圈 |

自动进样器的一般性维护包括更换针和针座, 更换阀上的转子密封圈, 更换注射器的密封垫。一定要把样品进行过滤以免堵塞针和毛细管, 关于注射器的冲洗是各个仪器都会有的要求。

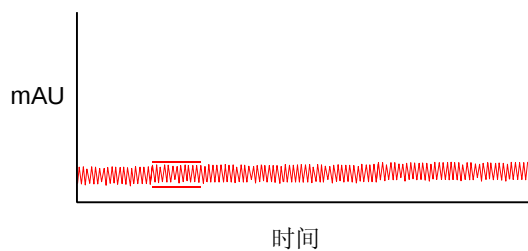
一般性检测器故障



关于 UV 检测器的一般性维护有两个问题，第一是灯会随时间变化而老化，在某一个时间它会不能点燃，由于其老化而辐射光强减弱，此时你会在基线上看到更多的噪音，进行测试，测定灯的输出。另外一个大的故障是流通池沾污，某些样品会粘附在流通池窗口上，结果基线噪音增加，检测限上升，此时要清洗或更换流通池。

检测器性能

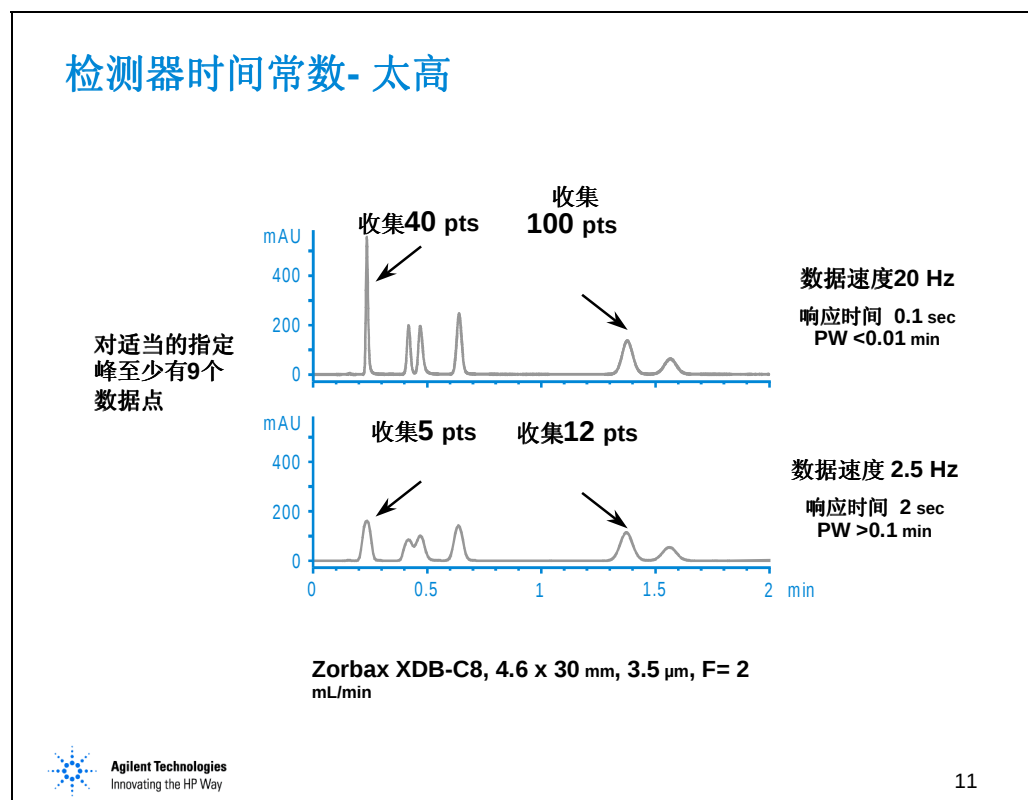
用于参考的基线噪音测定



以mAU或RI单位记录基线宽度，用于以后的比较.

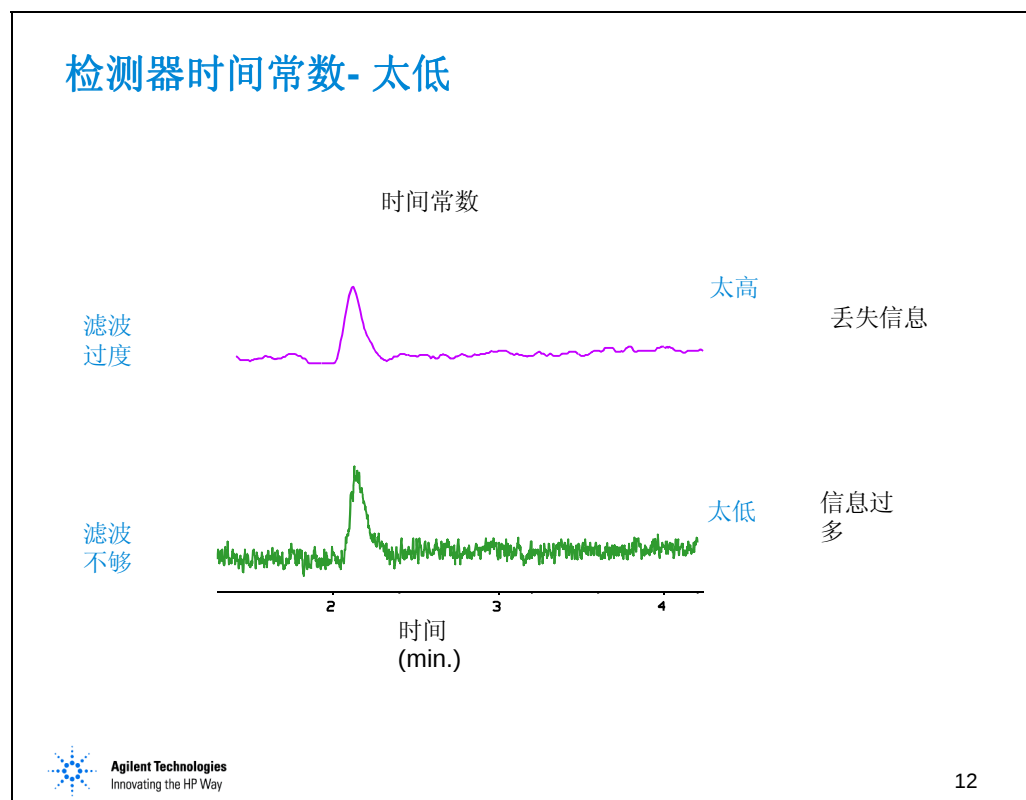
为了随时记载检测器的性能，你要记录基线的相对标准偏差，基线噪音超过标准值说明灯老化了，流通池脏了，或出现其他故障了。

时间常数



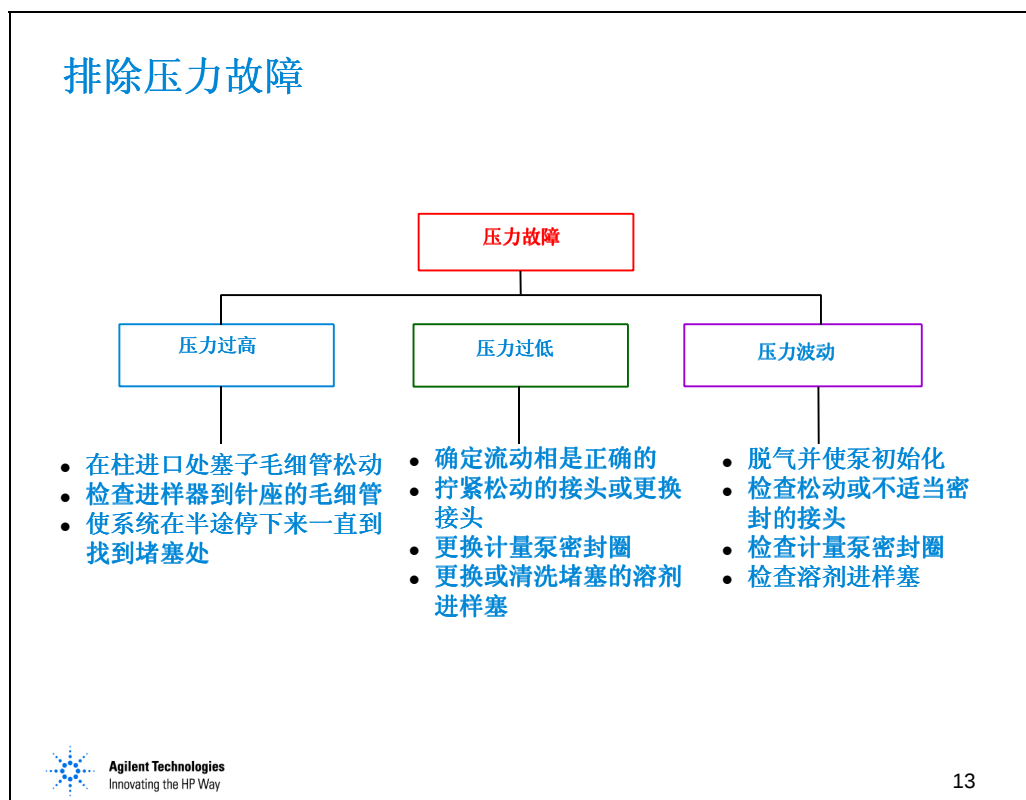
必须适当设定检测器的时间常数，否则会有一两个故障出现，如果检测器的时间常数设定太高，就不能收集足够的数据点，因而不能充分地确定色谱图峰的形状，峰间的分离度受到影响，峰面积测定不准，也会影响定量分析的结果。

检测器



如果检测器的时间常数太慢，那么会收集到过多的噪音信号，因为求信号的平均值太少。

压力故障

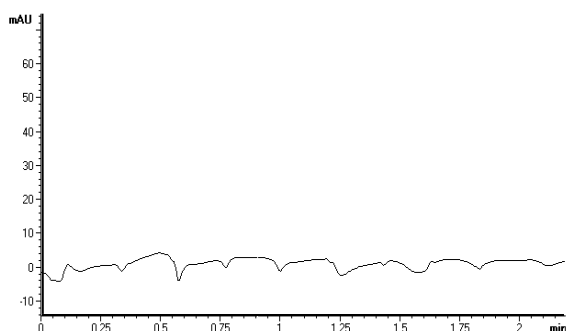


当系统压力超过最高压力时液相色谱仪会停机。系统的高压常常是由于色谱柱进口塞子、在进样器后面安装的过滤器、或保护柱的进口塞子（是进口管线的第二步）堵塞所造成。第二个可能造成堵塞的地方是针座毛细管，它是进样后的第一个限流器。如果没有发现堵塞，然后系统地拆卸流路系统，或者是接头或者是计量泵密封圈有故障。溶剂进口的塞子也会出现这样的故障。当溶剂进口的塞子堵塞就不会有足够量的溶剂从溶剂储液瓶中流出来，这样会导致压力比正常情况有所降低，因而保留时间波动。系统压力的波动是由于泄漏、溶剂进口的塞子被堵、或泵中有空气所造成。

基线故障

基线波动

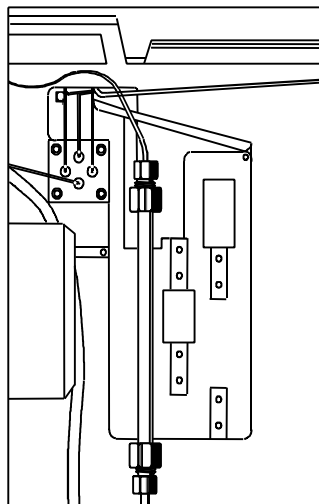
故障:
色谱仪基线波动.



- 故障来自检测器还是泵?
- 你怎样说明?

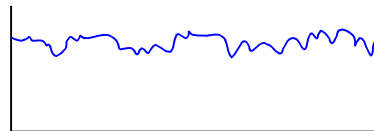
有许多原因会造成基线噪音和漂移值的增加，第一个要做的是排除检测器和泵系统的原因，这一工作很容易完成，打开检测器和泵监测色谱图的信号，然后关闭泵，看看噪音还有吗？如果没有噪音了，说明故障来自泵或分析方法。如果还有噪音可能来自检测器，上面的色谱图是由于泵中有空气所造成。

混合故障



静态混合器

故障:



故障:

一种UV-吸收的流动相和非UV吸收的流动相动态混合

有UV-吸收的残余流动相

泵噪音引起.

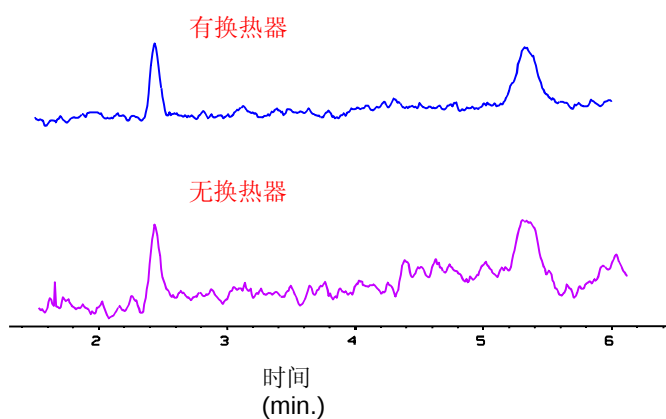
解决办法:

增加一个混合器. 缺点是死体积增加.

当一种高 UV - 吸收的流动相和 UV 透过的流动相混合时会造成基线噪音，基线噪音来自不恰当的混合，当两个流动相有些不混溶时也会出现类似的问题，如 TFA 和水/乙腈的混合物。增加静态混合器混合地就会好一些，可降低噪音，但增加静态混合器会增加延迟体积，这一点也是要考虑的。

检测器 - 热交换器

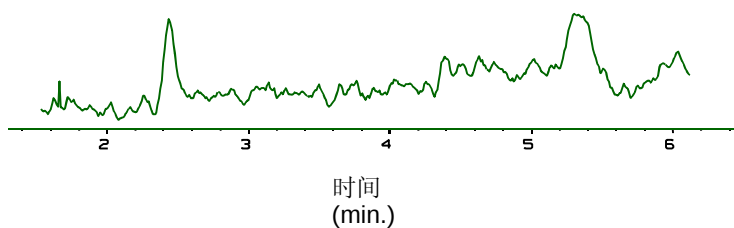
保证流通池恒温提高检测器性能.



当使用高柱温时会引起过高的基线噪音，这是由于高温下色谱柱的流速高所引起，当流动相没有达到温度平衡点之前就进入检测器流通池会引起噪音。当折光检测器在流动相冷却时造成折光指数的变化，因而出现噪音。

在检测器流通池之前装一个换热器可矫正这一类型的噪音，换热器是一个简单的装在金属块中的毛细管。

基线噪音



可能的原因:

- 流通池脏
- 检测器灯坏
- 泵出现周期性的脉冲
- 检测器的温度影响
- 空气泡进入检测器

回答问题:

- 你改变了流动相成分吗?
- 你改变了波长吗?
- 你的仪器最后一次使用什么流动相?
- 你有混溶性的问题吗?
- 你的溶剂脏了吗?

一般检测器故障包括灵敏度低、漂移、和高频率噪音。造成灵敏度低的原因有溶剂不干净、流通池脏、检测波长或检测器灯不合适等。当色谱柱还没有平衡好，或灯还没有预热到足够的时间，就会引起漂移。电源电压故障会导致高频噪音。

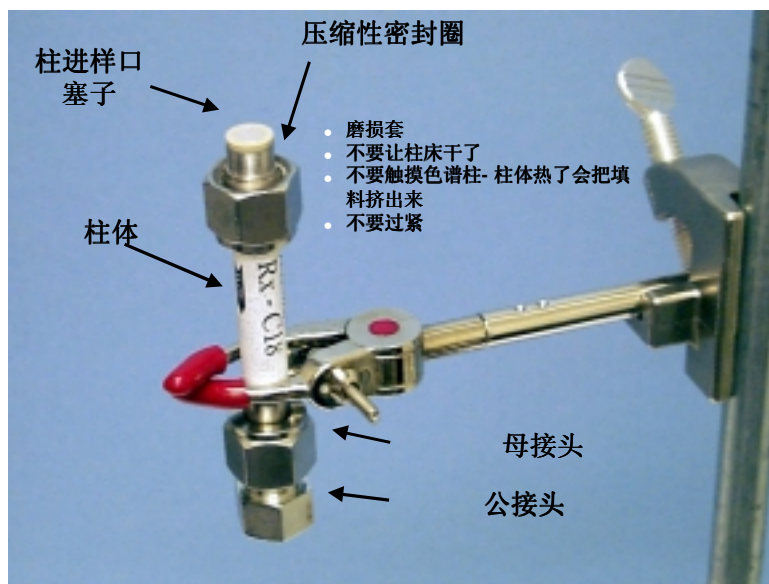
色谱柱故障

色谱柱维修/再生 - 物理性堵塞

- 装上市谱柱/不装色谱柱时检查柱压降.
- 如果柱两端反压高, 把色谱柱倒过来用流动相冲洗10-20个柱体积, 再测试反压.
- 如果有沉淀, (即聚集的蛋白质, 细胞物质, 聚合物) 用适当可溶解的溶剂清洗堵塞物, 如0.1% TFA / 80% 乙腈, 6M 胍, HCl, THF, HFIP.
- 如果不成功, 更换塞子.

最常见的色谱柱故障是柱压增加, 这是由于色谱柱进口塞子或线内过滤器被堵塞所引起, 如果要查找是否是色谱柱堵塞, 更换色谱柱或换成一支毛细管进行试验, 如果压力降下来了, 说明是色谱柱堵塞了, 堵塞的原因可能是有颗粒物留在塞子里, 或是在固定相中吸附了某些物质。

进样口塞子

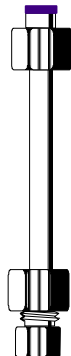


如果你确定是塞子的问题，有两种选择，更换色谱柱或更换塞子。要说明的是，如果更换塞子就会降低柱效，因色谱柱床要受到破坏。如果你决定要更换塞子，把色谱柱放在一个合适的地方，如上图所示，在拆卸色谱柱时戴上手套。

一般性故障排除
色谱柱故障

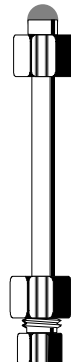
更换柱塞子

老塞子



小心地卸下柱塞子。
做流动相匀浆。
用一个 Pasteur 管, 把固
定相堆放到柱顶部

新塞子



装一个新的塞子到
堆放固定相柱的顶
部, 重新装上柱接
头

取下旧的塞子扔掉, 制备固定相匀浆, 固定相型号要和色谱柱中的一样, 用一个 Pasteur 管在色谱柱顶部把固定相匀浆倒入堆积到头部, 如图所示, 在隆起的顶部放一个塞子装上接头, 小心地拧上接头, 不要太紧。

色谱柱维修/再生 - 用化学方法改变色谱柱

- 由于键合相的水解或硅胶溶解使柱填料的改变是不可逆的.
- 由于污染而造成柱填料的改变一般是可逆的, 可用适当的溶剂冲洗掉.
- 梯度洗脱方式 (水 -> 强溶剂) 常常十分有效.
- 低pH流动相, 如. 0.1% TFA 或 0.01M H₃PO₄, 很有效.
- 提高温度也有帮助 (60-80° C).

有时色谱柱由于吸附了样品就像一个捕集器一样, 此时有可能通过适当的冲洗方法使色谱柱再生, 最容易的方法是使用梯度洗脱, 由弱到强进行几分钟的洗脱。对蛋白质沉淀使用像 6 M 胍的盐酸盐溶液, 胍的异氰酸盐或尿素进行冲洗, 如为一些填料 (XDB, 有机聚合物) 使用高 pH 的水/有机混合溶剂是有帮助的, 例如 0.01 M NaOH 在 50% 异丙醇/水中, 尽量减少和硅胶接触的时间 (15-30 min)。对其他反相和正相填料按下面的步骤冲洗。

反相固定相

- 75 mL 水+ 4 x 200 µl 进样 DMSO
- 75 mL 甲醇
- 75 mL 氯仿
- 75 mL 甲醇

一般性故障排除

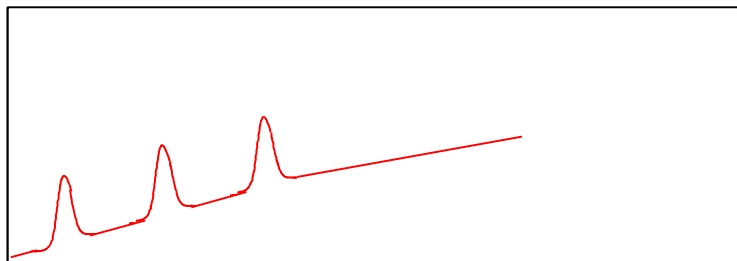
色谱柱故障

硅胶

- 75 mL THF
- 75 mL 甲醇
- 75 mL 水 2% 乙酸
- 75 mL 水 2% 吡啶
- 75 mL THF
- 75 mL 二氯甲烷

基线故障

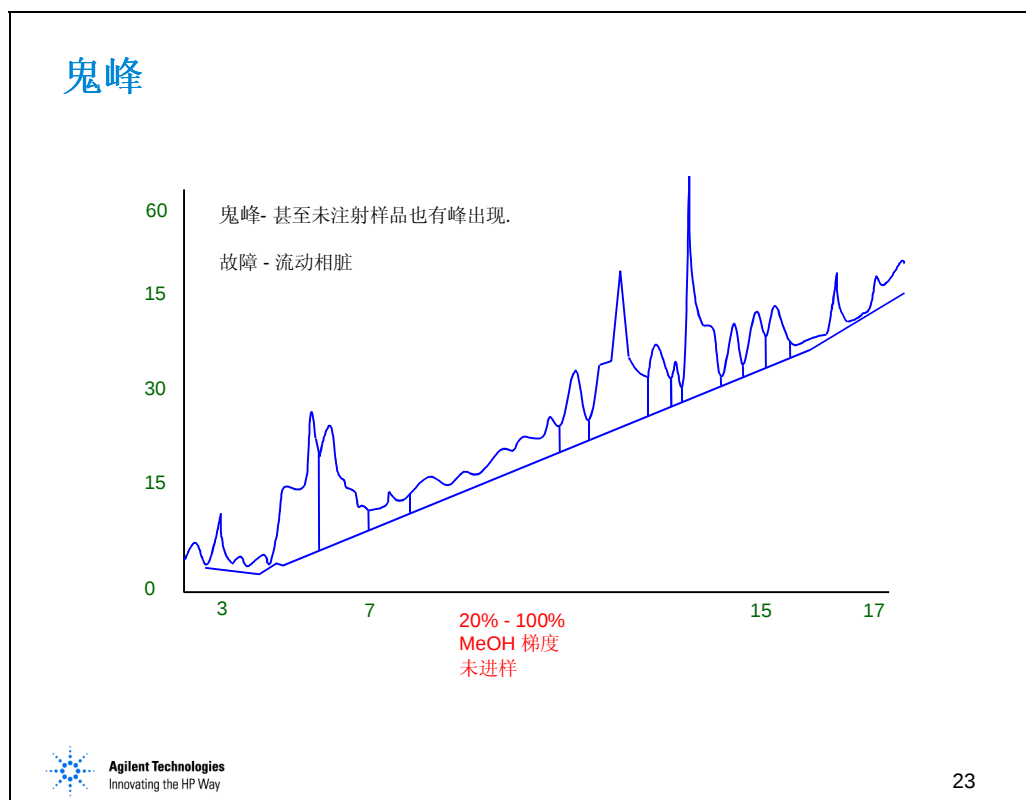
基线漂移



- 梯度洗脱
- 温度不稳定 (示差折光检测器)
- 流动相污染
- 流动相在柱中没有平衡
- 系统有污染物流失

在进行梯度洗脱分析时基线漂移是经常出现的问题，这是由于改变了流动相的组成。另外，基线漂移是说明色谱柱正在平衡，或检测器正在预热。污染也是要考虑的因素。

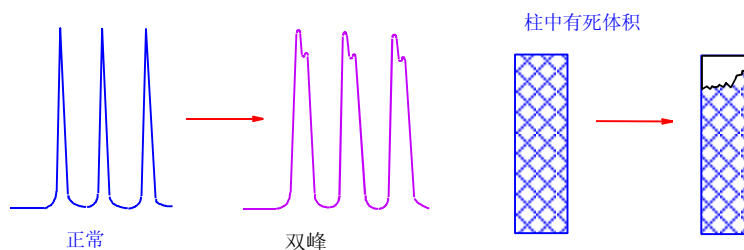
鬼峰



如果在梯度分析时出现鬼峰（不是由样品产生的色谱峰），其原因常常是由于流动相中带入少量杂质，特别是水中的杂质。在梯度分析开始时水中的杂质粘附在色谱柱上，并进行富集，在梯度进行中当溶剂强度增加时，杂质被洗脱出来形成不希望有的色谱峰。

峰形

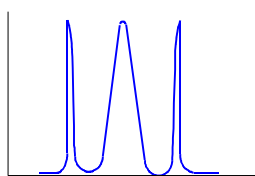
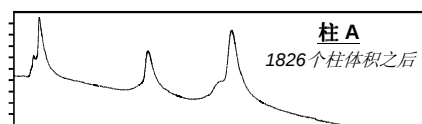
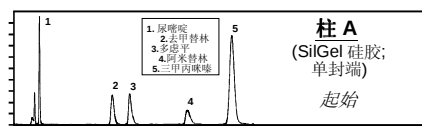
峰形- 双峰



- 柱中有死体积
- 塞子部分被堵
- 只有一个双峰- 共流出化合物

如果在你的色谱图上所有的峰都出现双叉峰，常常是由于色谱柱和仪器的问题，当硅胶溶解了，填料就会在色谱柱中形成空缺，色谱柱死体积会造成不好的色谱峰，包括拖尾和双叉峰。对细内径和微柱进口塞子堵塞，在压力上没有大的变化，但会形成双叉峰。如果是个别色谱峰出现双叉峰可能是由于共流出峰所致。

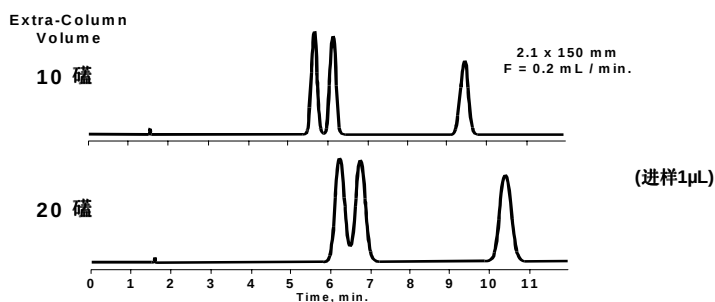
峰形- 加宽峰



- 所有的峰加宽
 - 柱效降低
 - 柱死体积
 - 进样量大
 - 流动相粘度高.
- 某些峰加宽
 - 前一个样品的洗脱峰
 - 分子量大
 - 样品 - 蛋白质或聚合物

当 HPLC 色谱柱老化了，色谱峰会变宽，当分离度达不到要求时色谱柱就不能再用了。其他导致色谱峰变宽的原因有流动相的粘度高和进样量大。如果是某一个色谱峰变宽可能是以前进样的洗脱峰。

超柱体积效应

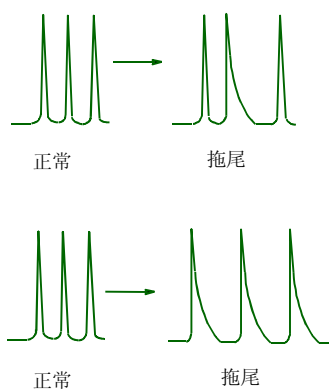


- 在进样器和色谱柱以及色谱柱和检测器之间使用短而细的管子。
- 所有的管件一定要使用匹配的接头。
- 使用小体积的检测池。
- 进样体积要小。

过度的超柱体积会造成分离度的下降，超柱效应造成的分散性是由于管件太长太粗所致，当流通池体积过大时也会造成过大的超柱分散性，进样量大也会造成分离度下降。最大的进样体积决定于色谱柱的内径。

峰形- 拖尾

对称性 > 1.2

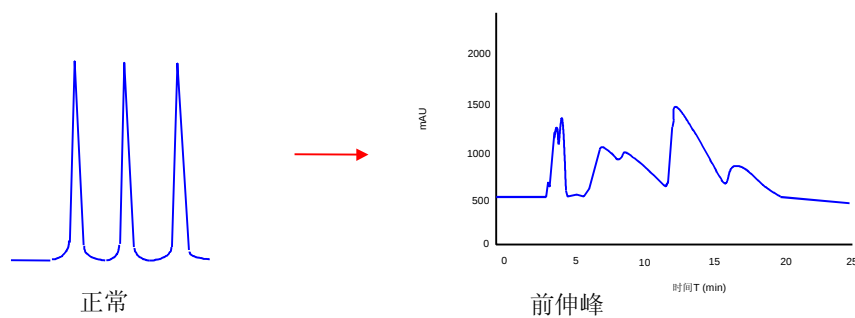


原因:

- 一些峰拖尾
 - 次要的 - 保留效应
 - 残留硅醇基作用
 - 在大峰上有小峰洗脱出来
- 所有的峰拖尾
 - 超柱效应
 - 在柱进口处污染物增加
 - 重金属
 - 色谱柱不好

在反相色谱中弱酸和弱碱与残留硅醇基的作用会造成色谱峰的拖尾，调节适当的 pH 或添加一个改性剂阻止弱碱的拖尾，可以控制不好的峰形，如添加三乙胺抑制弱碱的拖尾。如果所有的峰都拖尾就是色谱柱变坏或超柱效应造成的。

色谱峰形- 前伸峰



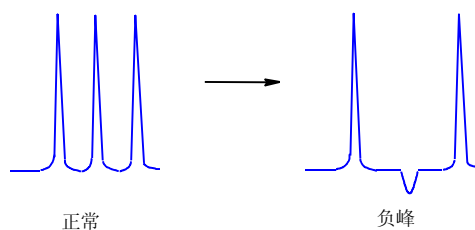
对称性 < 0.9

原因:

- 柱过载
- 小峰在大峰前洗脱出来

多数峰出现前伸峰是由于质量过载引起的，除去影响峰形外色谱峰过载还会使保留时间向前移，一个小峰正好在大峰前的共流出色谱峰也会造成前伸峰。

色谱峰形-负峰



原因:

- 样品的吸光度小于流动相.
- 当样品溶剂通过色谱柱时平衡的扰动.
- 对示差折光检测器来说是正常的.

负峰并非常常会出现，当使用 UV 检测器时样品的吸光度低于流动相的吸光度会出现负峰。当样品溶剂通过检测器时也会看到负峰，使用折光检测器时出现负峰是正常现象。

测试

OQ/PV 测试参数

检漏

温度的稳定性和准确度

基线噪音/漂移

峰面积和保留时间的精密度

波长的准确度

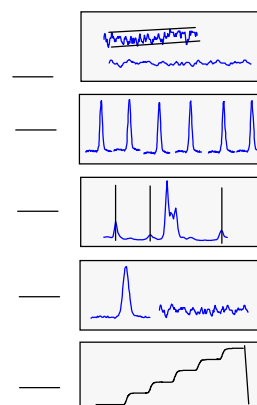
检测器线性

自动进样器的携留

自动进样器的线性

成分准确度/精密度

成分的波动性



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

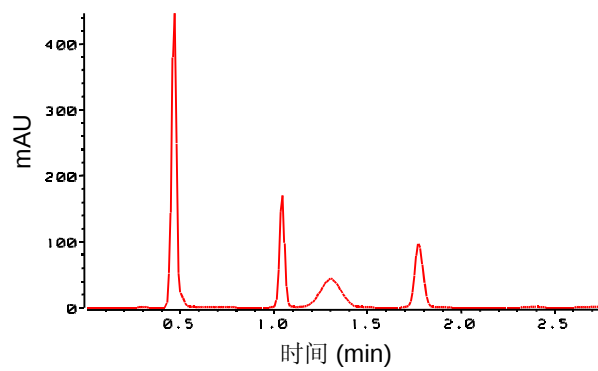
30

如果你有一台 1100 HPLC，有几个在色谱仪中内置的测试方法，用这些方法可以帮助你分析仪器系统的性能。它们需要已知性能的标准物质，这些标准物质是可以买到的。另外一种办法是研究每种方法的目的，并提出自己的在性质上类似的方法。

工作表

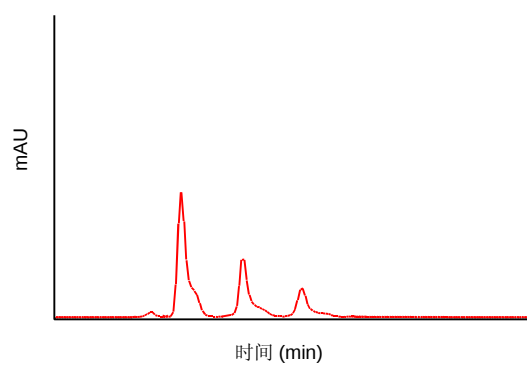
作业

- 对下面不理想的色谱图有什么可能的原因.



作业

- 对下面不理想的色谱图有什么可能的原因.



作业

提出下列故障的原因:

- 流速正常, 检查阀也工作正常, 但是在梯度洗脱中早洗脱出来的峰保留时间重复性不好.
- 基线很不规律- 总噪音水平高.
- 基线有系统周期性噪音.

作业

提出下列故障的原因:

- 用UV检测器,峰高重复性好,但是峰面积和保留时间重复性不好.
- 峰高和峰面积重复性不好,但是保留时间重复性好.
- 重复性好,测试混合物看起来也好,但是有些样品峰加宽并且拖尾.

一般性故障排除
工作表



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

梯度洗脱

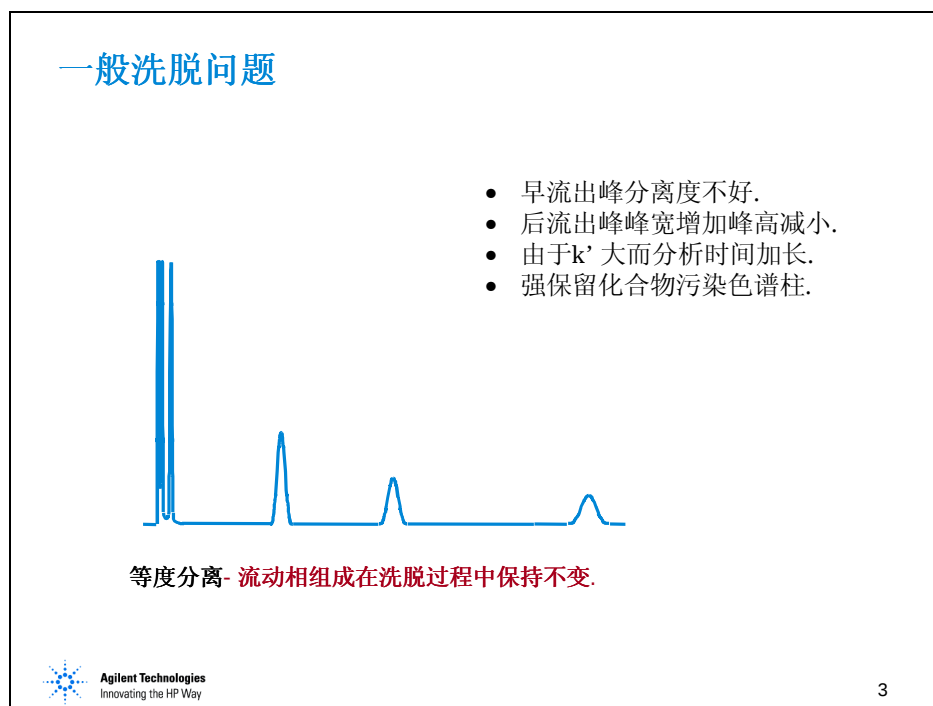


在这一节，你将学习

在这一节，你将学习：

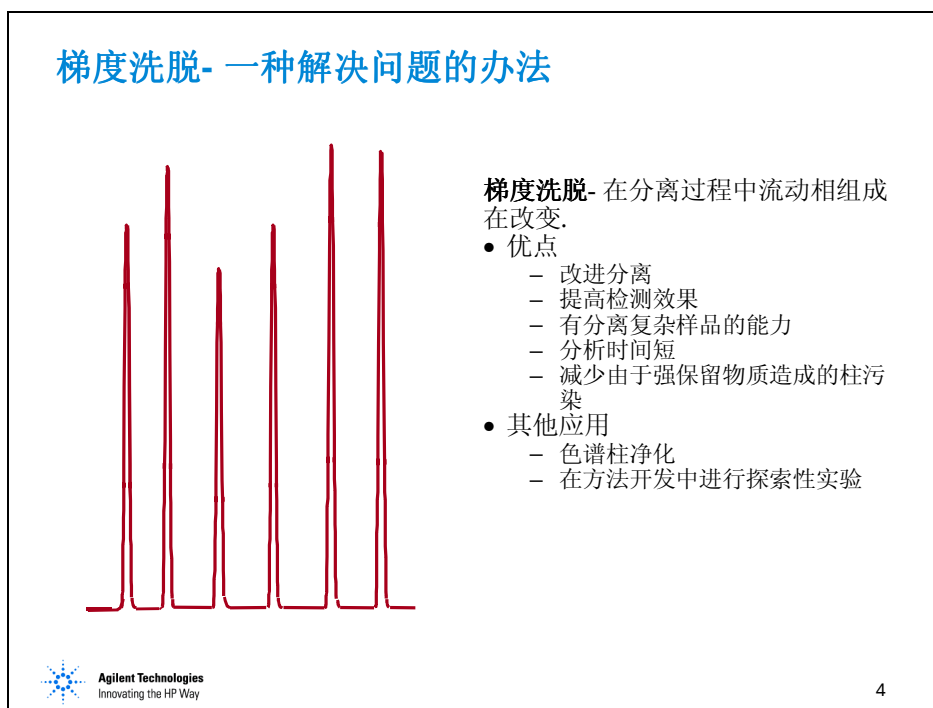
- 有关梯度洗脱过程及其优点.
- 如何优化梯度分离.
- 有关制定梯度分离要考虑的实际问题.

一般的洗脱问题



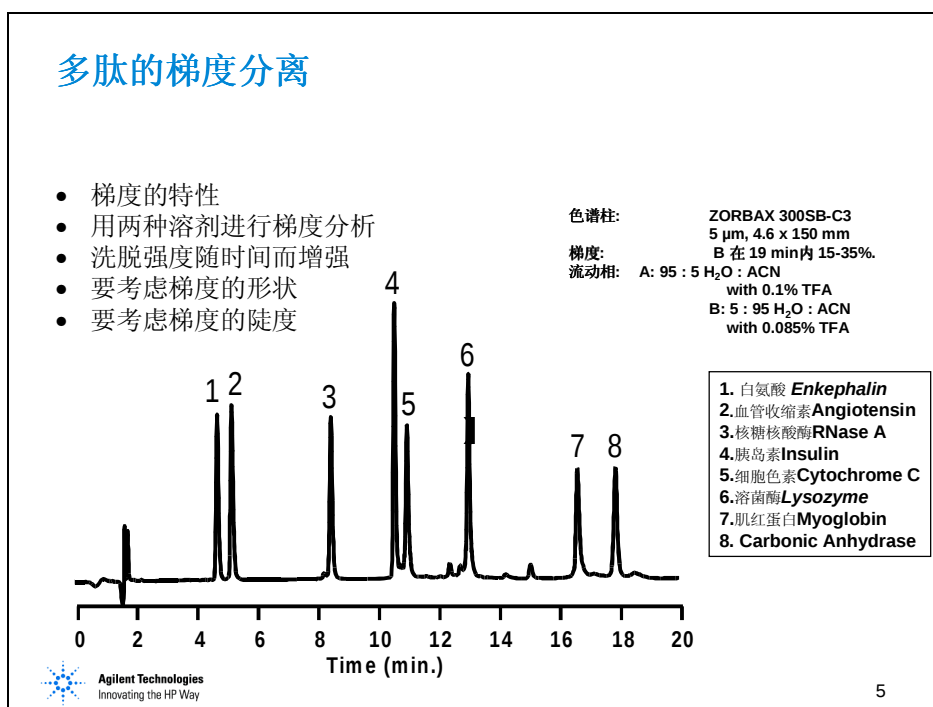
在使用单一流动相进行等度分析时，被测物在很宽的 k' 值范围进行洗脱，早洗脱出来的色谱峰可能分离不完全，后出来的色谱峰会加宽不易检测，一些组分会污染色谱柱，因为它的保留时间很长，当化合物在结构和极性上不同， k' 差别很大时，常常分析时间很长。

梯度洗脱 - 一种解决办法



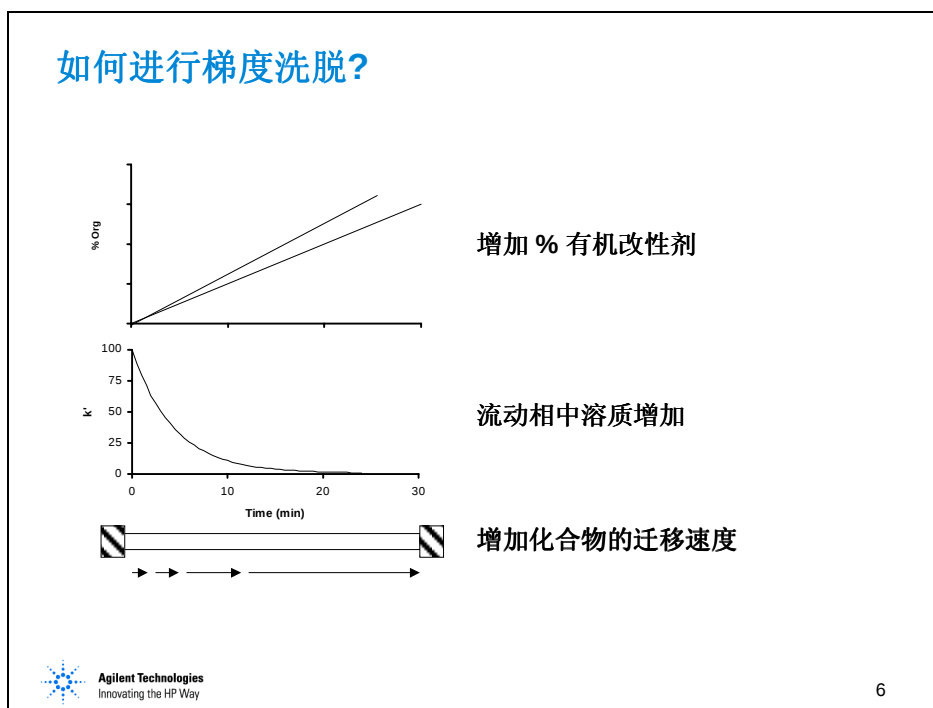
梯度洗脱可以解决一般的洗脱问题，当使用一个梯度洗脱程序时，选择开始的溶剂强度能够分离先流出来的色谱峰，洗脱强度按预先确定的方式逐渐增加，以便使其他的色谱峰以最佳的分离度流出色谱柱，这样既增加了峰高又缩短了分析时间，分离度可以精确地控制，保留性强的物质每次分析都可以从色谱柱中洗脱出来，梯度洗脱很适合于反相色谱和键合强极性固定相的正相色谱以及离子交换色谱中使用。

在探索性试验中使用长时间的慢速梯度洗脱，实用于等度和梯度洗脱方法的开发。



上例是用反相梯度洗脱分离多肽的色谱，一般情况下使用两种溶剂，瓶 A 和瓶 B，溶剂瓶 A 一般装极性弱的溶剂，在本例中是 95% 水/ 5% 乙腈含 0.1% 的 TFA，溶剂瓶 B 一般为极性强的溶剂，5% 水/95% 乙腈含 0.085% 的 TFA。洗脱强度常常随时间而增加，像上面的情况梯度从 15% B 开始经过 19min 到结束时为 35% B。为直线梯度，其变化速度为 1.05% 每分钟。

梯度分析



梯度洗脱最多用于反相色谱和离子交换色谱，反相色谱如下例。

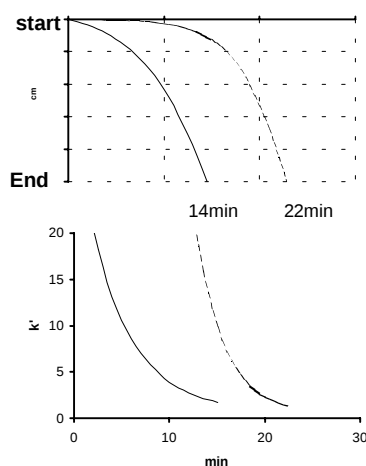
梯度是逐渐地增加有机溶剂的含量。因此化合物是在流动相和固定相之间的分配逐步变化，当有机溶剂的量增加时化合物在有机溶剂中的时间多，化合物的线速度增加，就会加速通过色谱柱，当化合物流出色谱柱时其速度常接近于流动相的速度。

往往是柱长增加一倍流出时间不一定加倍，一辆静止的赛车跑 200 m 所用的时间并不等于同一赛车跑 100 m 所用时间的 2 倍。

可以用梯度洗脱让一个化合物有固定的 k' 值， k' 是分配系数在洗脱过程中逐渐改变，用公式 $k' = (t_r - t_0)/t_0$ 来计算 k' 值只是在等度洗脱时才可用。

为什么峰窄而且宽窄一样？

为什么峰变窄并且峰宽一样？



- 两个化合物加速通过色谱柱。
- 它们的疏水性十分不同. 保留时间为14 和 22 min.
- 从色谱柱洗脱时分配系数小（即速度快）而且二者近似.
- 有机改性剂含量较高时易形成拖尾. 峰尾流出速度高于峰的中心，因而峰可以聚焦.

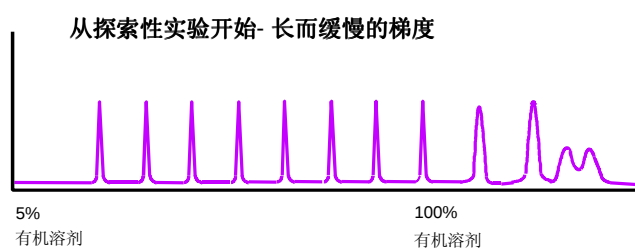
在等度洗脱时峰明显加宽，峰宽随保留时间增加而增加，在梯度洗脱中峰很窄而且宽窄几乎一样，峰形窄的主要原因是峰离开色谱柱时的速度，在进行梯度洗脱时所有组分都加速离开色谱柱，因而其流出速度快，在每个化合物之间的保留时间不同是因为有机改性剂的百分含量对每个化合物开始加速时的不同，所有化合物在离开色谱柱时其速度近似相等。

注意：计算塔板数的公式是假设速度是常数，所以它不能用于梯度洗脱。

另外一个次要的使峰聚焦的原是因为在有机溶剂浓度不同时色谱峰会前伸、后拖，在色谱尾巴流出时流动相中的有机溶剂量高于峰顶时的量，峰前沿正好与此相反，这样就使峰聚焦，在梯度洗脱时不对称峰很少见，实际上在梯度洗脱时具有更好的检测限（假设梯度不会造成特殊的噪音和漂移）。

开发一个梯度洗脱的分析

梯度方法的开发- 优化溶剂梯度



你必须决定:

- 有机溶剂
- 开始时的成分
- 梯度时间
- 梯度的陡度
- 梯度形状
- 流速
- 色谱柱长度
- 色谱柱再平衡时间

为开发梯度洗脱方法通常是进行探索性实验，探索性实验是使用线性梯度，设定一个时间范围，从 5-10% B 到 100% B 进行梯度洗脱实验，一旦在 100% B 的洗脱强度下保持几分钟，肯定所有的组分都洗脱出来。对反相梯度洗脱一般都选择水和乙腈做洗脱剂，用测定结果检验洗脱强度是否合适，如果一些组分是在到达 100% B 时才洗脱出来，就选择更强一些的洗脱剂组合进行实验，考察色谱图用以选择适当的开始梯度和梯度曲线类型。方法开发使用这样的梯度洗脱办法要优于等度洗脱办法。你不仅要看到早流出色谱柱的组分，还要注意在给定等度洗脱强度条件下保留在柱中的组分。

如果你发现在 15% 梯度内所有的组分都洗脱出来，使用等度分析是合适的，这样可以节省时间，等度分析不需要色谱柱的再平衡。

计算探索性实验的梯度时间

$$\bar{k} = \frac{t_G F}{1.15 S \Delta \Phi V_m}$$

$\Delta \Phi$ = 有机组分体积的变化
 S = 用强溶剂和样品测定出来的常数
 F = 流速
 t_G = 梯度时间 (min.)
 V_m = 色谱柱死体积

$\bar{k}$ - 梯度保留- 迁移到色谱柱一半处被测定物的 k' 值

理论梯度时间

梯度时间变长不一定会提高分离度

$$t_g = k(1.15 S \Delta \Phi V_m) / F$$

$$t_g = 5 * 1.15 * 4 * 0.95 * 1.058 / 1 = 23 \text{ minutes}$$

$\bar{k} = 5$ 对平均分离

$S = 4$ 对小的分子

$\Delta \Phi$ (5% - 100%) $95/100=0.95$

$V_m = 1.058 \text{ mL}$ (实验测定时用 4.6×10^3)

$F = 1 \text{ mL/min}$



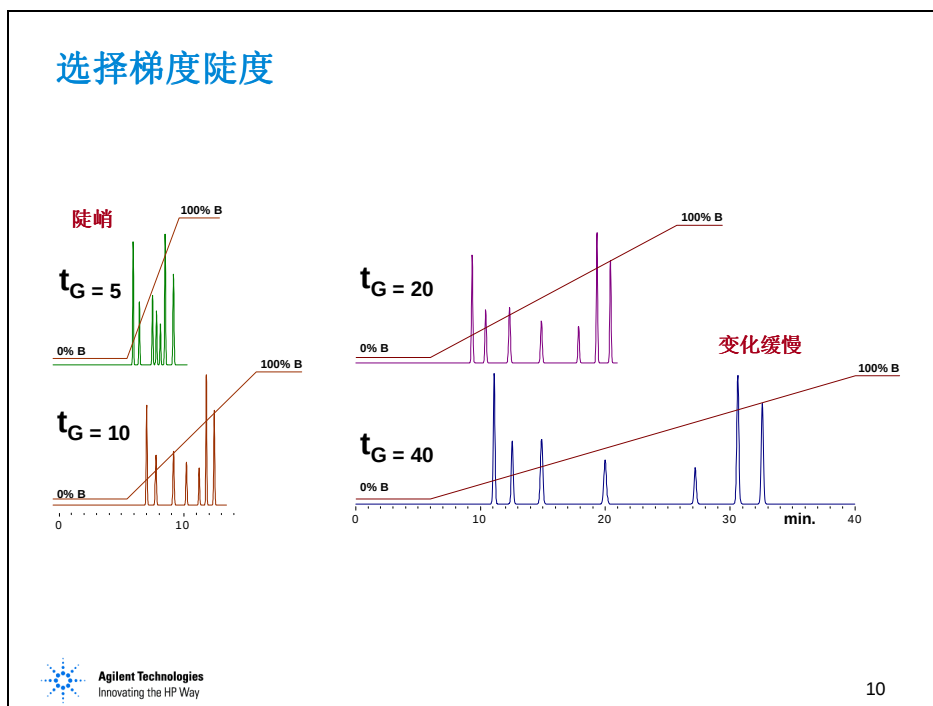
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

9

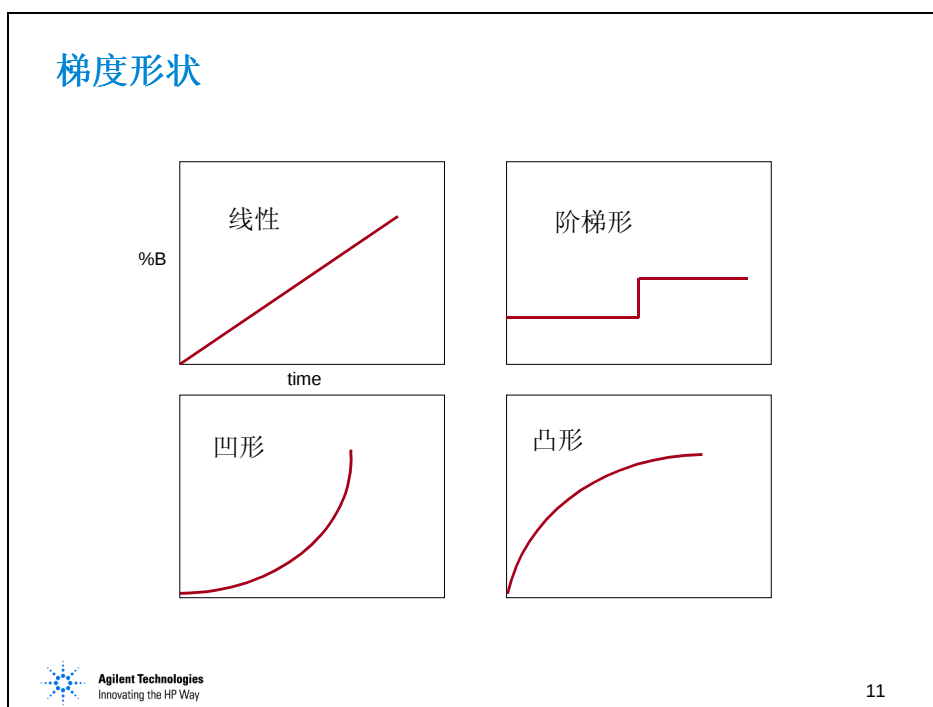
上述公式可以用来预估梯度时间，如果梯度洗脱时间比预估的时间长就不会对分离度有很大的影响，计算公式所用术语的定义如上所示，这一公式似乎让人有些糊涂，因为它的关系看来和等度分析的有些相反，第一个公式是重新排列的，从而引导出对给定流速和色谱柱死体积条件下的梯度洗脱时间，死体积可以用公式 $V_M=0.5Ld^2$ 进行计算，在此式中 L 是柱长， d 是柱直径。为了更精确的测定，往色谱柱中注射一个不被保留的化合物来测定死时间。

对小分子 S 值 (< 500 Da) 的范围从 2 到 5，对分子量大的物质如蛋白质梯度洗脱时间需要要长一些，对这样一些样品的 S 值可从 50 到 100。

梯度洗脱
开发一个梯度洗脱的分析

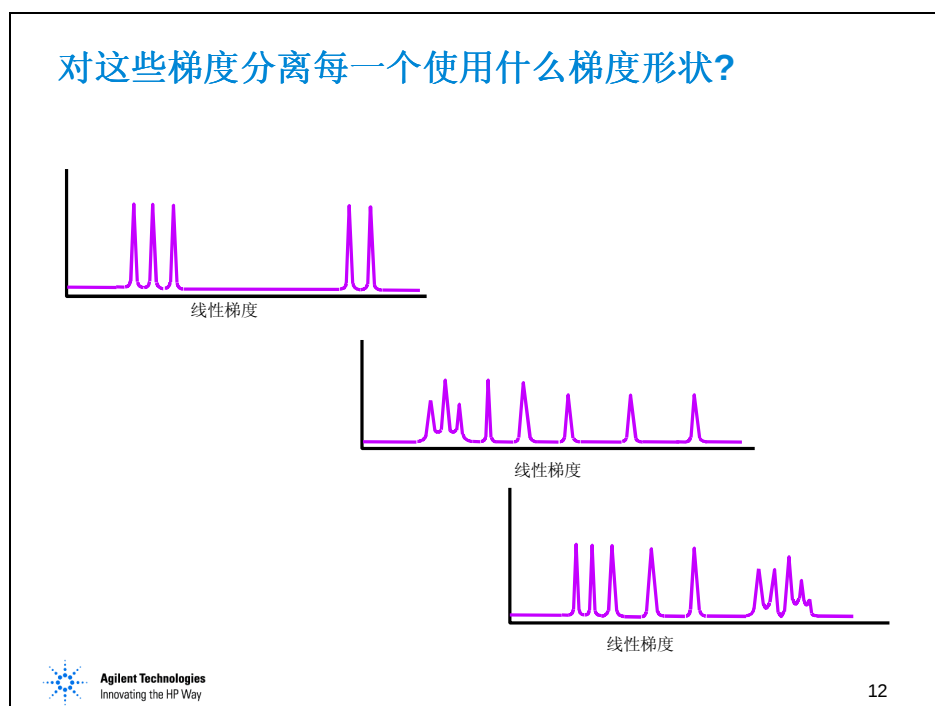


另外一个要考虑的因素是梯度洗脱曲线的陡度，在所有上述的例子中，梯度范围都保持为常数，从 0% - 100% B，但是在每个成功的分析中梯度洗脱时间比较长。在第一个例子中梯度变化是 20%/min，最后一个例子只有 2.5%/min，调节梯度洗脱的陡度使色谱图有很大的变化。

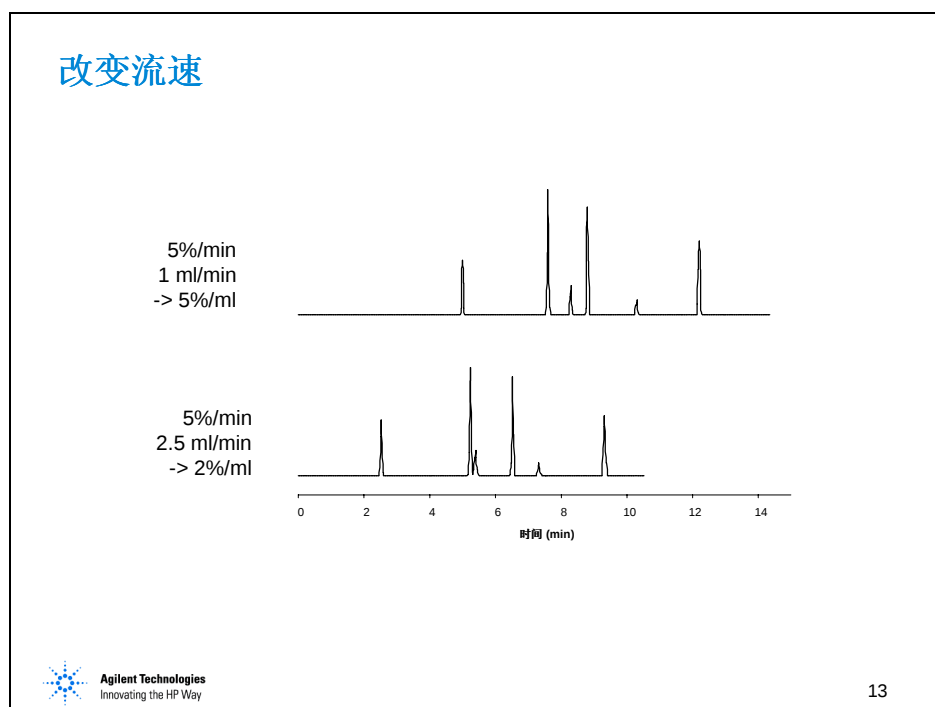


梯度洗脱曲线不一定必须是直线型的，恰当地确梯度洗脱曲线有助于改善分离，可以按需要调节 梯度洗脱曲线的陡度，为你的分析设计一个短的线性线段来靠近你所需要的曲线形状。如果后流出峰的分离度低于早流出峰可以使用凸形曲线的梯度洗脱，而凹形的梯度洗脱曲线适合于早流出峰比晚流出峰需要更高的分离度时使用，在分析色谱图上峰与峰之间有空隙时，并且需要快速和高重复性的分析时则应使用阶梯型梯度洗脱曲线。

梯度洗脱
开发一个梯度洗脱的分析



考查上面的探索性分析实验，作为一个分析人员你对每一个设想要改进的梯度洗脱分析要使用那一种梯度曲线？

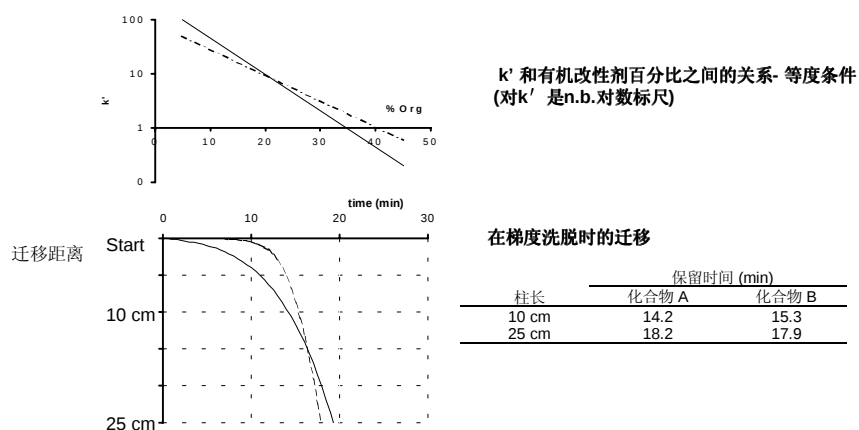


通常梯度的斜率用“%/min”来表示，但是对一个给定的色谱柱尺寸更正确地表示为“%/ml”。使化合物通过色谱柱的是流量而不是时间，增加流速就意味着降低梯度洗脱的斜率即提高分离度，在典型的情况下反之亦然。塔板数随流速的改变将抵消上面的作用，综合效应要看具体情况而定，但是峰间距离的改变要受到梯度曲线形状改变的影响。

洗脱时间对流速不太敏感，用一个简单的例子极容易说明这一点：一个分子它在有机改性剂低于 30% 时不能移动，但是当高于 30% 时以流动相的速度移动，梯度在 20 min 时到达 30%，在 1 ml/min 的流速下此化物流出时间为 22 min，也就是在 20min 时它未移动，在 2 min 内通过色谱柱，把流速提高到 2 ml/min 后将导致 21 min 的洗脱体积。

梯度洗脱 开发一个梯度洗脱的分析

洗脱次序倒置- 一种梯度洗脱的现象



看上面的图，分配系数和有机改性剂的百分比之间的关系与分子的性质有关，这一情况实际上会导致一个化合物在梯度洗脱中赶上另外一个化合物，一个类似的情况是在一个 1/4 -英里竞赛中由于汽车发动机性能的不同，在 半途超过另外一个赛手，这可以用上面第二个图加以说明。

大的分子（如蛋白质）趋向于具有陡度大的 k' 曲线。

色谱柱长改变时色谱带中间的间隙会改变，注意上面的图中 10 cm 和 25 cm 长的色谱柱的洗脱时间，注意到洗脱时间随柱长的改变并不显著。

改进梯度分析

用 $\bar{k}$ 来提高分离度- 平均保留值的关系

$$\bar{k} = \frac{t_G F}{1.15 S \Delta \Phi V_m}$$

$\Delta \Phi$ = 有机组分体积的变化
 S = 用强溶剂和样品化合物的常数
 F = 流速
 t_G = 梯度时间 (min.)
 V_m = 色谱柱死体积

$1 / \bar{k}$ = 梯度陡度

因而, 所有这些都增加 $\bar{k}$ e :

1. 较长的梯度时间 t_G
2. 较短的色谱柱 V_m
3. 较高的流速 F
4. 较小的有机溶剂范围 $\Delta \Phi$

增加 $\bar{k}$ 可以或不可以提高分离度



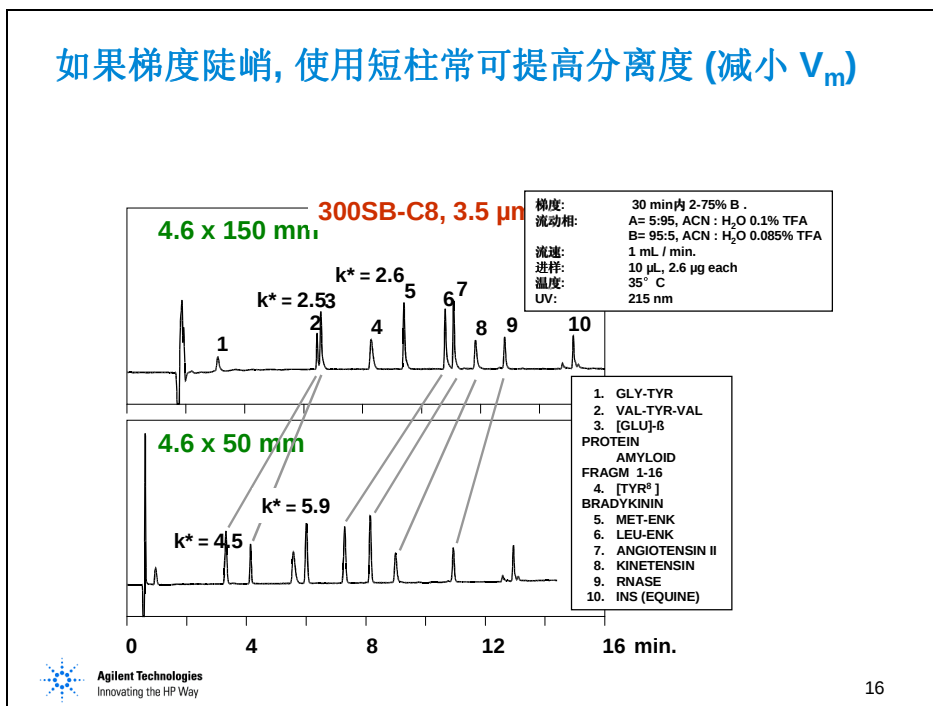
15

再回到梯度保留公式有关提高梯度分离的问题, 在梯度洗脱中分离度在很大的程度上决定于梯度保留, 改变梯度保留会改变色谱带的距离, 因而可以大大地改变你的色谱分离。使梯度洗脱的陡度平坦或陡峭可以改变梯度洗脱时间, 可以预测对梯度保留和分离度的影响。改变 F 或 V_M 可以预测对保留值以及 N (柱效) 的影响, 所以分离度是不确定的。增加流速会使梯度保留增加, 但是也降低了柱效 (N), 综合效应会造成提高或降低分离度。在梯度洗脱中改变流速就像在等度洗脱中改变有机改性剂的 % 一样, 能改变峰的流出顺序。

从上面的讨论你会了解到梯度洗脱不像等度洗脱那样, 流速、柱长、和梯度的陡度的改变都可以用做改进分离的手段。

梯度洗脱
改进梯度分析

如果梯度陡峭, 使用短柱常可提高分离度 (减小 V_m)



上面介绍的例子是说明在梯度保留公式中 V_M 项改变的情况, 开始时梯度洗脱分离是使用 4.6 x 150-mm 的色谱柱, 在第二个例子里把柱长降低到 50 mm。

梯度洗脱

合适的柱长应该是多少？

在允许的时间间隔里最大的分离：

- 短的时间间隔= 短柱和高流速
- 长的时间间隔=长柱和正常流速

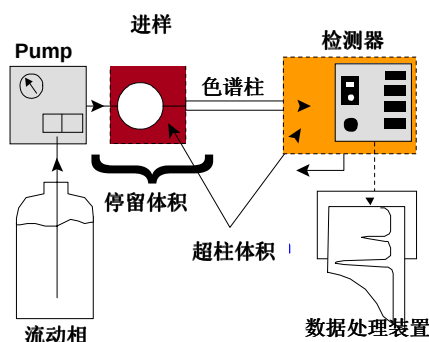
流速、柱长、和时间的交替变化，梯度洗脱类似于等度洗脱分析。当分离时间是至关重要的问题时，就使用短色谱柱 (5-15cm) 和高流速。当分离度是关键时明智的方法是在正常流速下使用长色谱柱。

当化合物需要使用陡峭的流速曲线时（如蛋白质）不宜使用长色谱柱，这类化合物很快地达到（加速度为几个厘米以后） $k' = 0$ ，即不和固定相作用。

当使用陡峭的梯度洗脱曲线时，在离开色谱柱以前，当化合物达到 $k' = 0$ （无色谱分离作用）时，反而需要使用长的色谱柱，色谱柱的最后一段增加了峰的扩展作用。

特殊的考虑

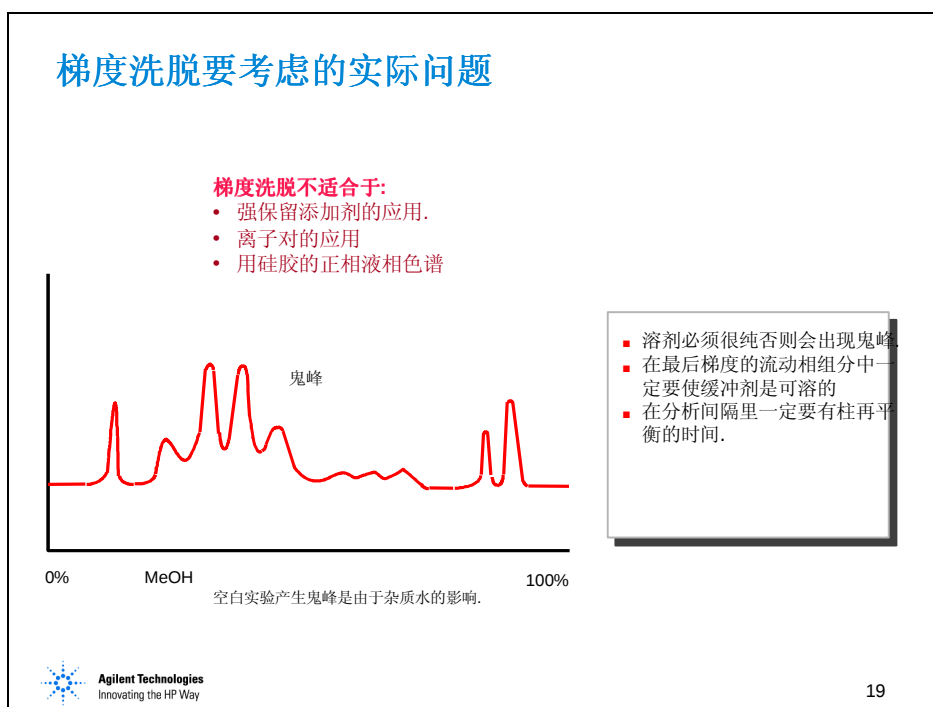
仪器对梯度性能的作用



- 停留体积= 形成梯度到柱头的体积.
- 增加起始的浓度缩短分离时间, 但是使分离更依赖仪器, 因为在实施梯度以前要受到停留体积和等度分离阶段的影响.

在开发一个梯度洗脱分离方法时色谱分析人员一定要考虑其他人员会使用不同的仪器进行这一分析, 不同的 HPLC 仪器会有不同的停留体积, 停留体积是连接管和梯度形成部件到达色谱柱柱头部件之间的体积。一台色谱仪得到的色谱图和另外一台色谱仪得到的色谱图可能十分不同, 这是由于停留体积的不同所致。具有很小死体积的系统可以在很短的时间里使溶剂到达色谱柱, 一个具有较高停留体积 (延迟体积) 的系统将会导致在色谱柱中梯度洗脱强度的延期。

可以使用丙酮测试仪器系统的的停留体积及其进行梯度洗脱的相关能力。使用溶剂瓶 A 和 B, 往其中装入甲醇, 在瓶 B 中加 0.2% 的丙酮, 从 0 到 100% B 进行梯度洗脱, 考查一下这一实验的流出曲线。



有关在梯度洗脱中要考虑的一些实际问题已经在上面做了介绍，首先，由于长色谱柱的平衡时间很长，用于强保留性化合物如三乙胺是不合适的，基于同样的理由也不宜把梯度洗脱用于离子对色谱。正相 HPLC 也不宜使用未涂渍硅胶色谱柱，平衡时间长会导致保留值不准确。

在梯度洗脱中所用溶剂一定要很纯，水的质量更为重要，当流动相组分极性弱时杂质会保留在柱中，而在洗脱剂强度提高时杂质峰出现在色谱图里，上面所列色谱图显示出真实样品中的鬼峰，进行空白实验时当洗脱剂强度提高时杂质峰出现。

为了避免在仪器里出现沉淀，一定要测试缓冲溶液。保证最后流动相的组成是全部溶解的，最后为了提高保留值的精密度，在每次色谱分析之间一定要有适当的再-平衡时间。

梯度洗脱
特殊的考虑



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：梯度洗脱

实验室训练：梯度洗脱

在这一实验室训练中，你将：

在这一实验室训练中，你将：

- 以起初的探索分析决定适当的分析时间。
- 为梯度分析进行探索性分析。
- 为两个峰达到至少 1.25 的分离度开发一个梯度分析方法。

材料

- 一支 SB-C18，4.6 x 150 mm，3.5 微米的色谱柱，部件号为 863953-902。
- 梯度测试混合物。
- 通道 A 为 HPLC 级别的水，通道 B 为 HPLC 级别的乙腈。
- 多种混合的 HPLC 级别的溶剂，甲醇，四氢呋喃，异丙醇（光学纯）。
- 一台通电的带所有部件的 1100 液相色谱仪。
- 一台 HPLC 化学工作站，配备光度检测器部件。

探索性试验

探索性试验是一种通用性梯度方法，是开发方法的工具，这是一种慢速、小梯度的方法，可以让你看到样品中的色谱峰，然后用逻辑的方法来调节你的梯度。

133) 进行探索性试验使用下面的条件：

流速 1.5 mL/min

开始 % B 5% 乙腈

开始 % A 95% 水

V_M 的估算 $0.5(150)(4.6)^2 = 1.587 \text{ mm}^3 = 1.587 \text{ cm}^3 = 1.587 \text{ mL}$

用下面的公式估算 梯度分析所需的时间

$$T_g \cong (S \times k' \times V_M \times \Delta\Phi) / F$$

式中 T_g = 梯度所需时间

S = 3 to 5 对小的分子，取 4

$k' = 5$, 可得到最好结果

V_M = 四体积, $V_M = 0.5Ld^2$, 式中 L =柱长 d = 柱径

$\Delta\Phi$ = (最后%B – 开始% B) /100

F = 流速

计算探索试验的分析时间。

步骤

- 134) 安装 4.6 x 150 mm, C-18 色谱柱, 装填 3.5 微米的填料。
- 135) 在样品架位置 1 中插入梯度测试混合物。
- 136) 进入到 Method 和 Run Contro 的屏幕。
- 137) 从仪器菜单上选择 **Set up Pump** (设定泵)。
- 138) 使用流速为 2.00 mL/min 和 100% B, 清洗色谱柱 5 min。
- 139) 调用默认方法 def_lc.m 作为建立方法的起始点 **Method, Load Method.**
- 140) 从 **Method** 菜单上选择 **Edit Entire Method**。只选择 **Instrument/Acquisition** 和 **Run Time Checklist** 选项进行编辑, 在此面板按 **OK**。
- 141) 填写溶剂输送系统的参数, 嵌入 (Insert) 探索分析梯度。出现以下设定泵的窗口。

Setup Pump : Instrument 1

Control

Flow: 1.500 ml/min

StopTime: 25.00 min

PostTime: Off min

Solvent A

95.0 % Water

Solvent B

5.0 % Acetonitrile

Pressure Limits

Max: 400 bar

Min: 15 bar

Timetable

	Time	%B	Flow	Max. Press.
1	20.00	100.0		
2	25.00	100.0		

Insert

Append

Cut

Copy

Paste

Display: Timetable

OK Cancel Help

步骤

142) 注意你要保持% B 为 100% 5 min，以便确定在此条件下所有的东西都被洗脱出去。在此窗口点击 **OK**。

143) 你按标准进样，注射样品 5.0 μL 。在设定进样器面板上按 **OK**。

144) 柱箱温度设定为 40°C，在此窗口点击 **OK**。

145) 填写下面的 DAD 信号，在此面板上按 **OK**。

注意：如果使用 VWD，选择波长为 260 nm。

Store	Sample, Bw	Reference, Bw
A: ☒	260 20	360 100 nm
B: ☐	254 16	360 100 nm
C: ☐	210 8	360 100 nm
D: ☐	230 16	360 100 nm
E: ☐	280 16	360 100 nm

Spectrum
 Store: All in peak
 Range: 190 to 800 nm
 Step: 2.0 nm
 Threshold: 1.000 mAU

Time
 Stoptime: as Pump no Limit min
 Posttime: Off min

Required Lamps
☒ UV ☒ Vis

Peakwidth (Responsetime)
 > 0.1 min [2 s]

Autobalance
☒ Prerun ☐ Postrun

Slit
 4 nm

Margin for negative Absorbance
 100 mAU

Timetable ... Total Lines: 0
 OK Cancel Help

146) 在 **Run Time Checklist** 只上选择 **Data Acquisition**。

147) 从 **Method** 菜单选择 **Save Method As....** 为方法命名 scout.m。

148) 从 **Instrument** 菜单上选择 **System On**。让色谱柱平衡几分钟。

149) 进入 **View** 菜单并选择 **Online Signals**，Signal Window 1。一旦 Online Signals 窗口显示就选择 **Change**。

150) 在 x-轴上的范围填写 20 min。选择绘制 0 线对话框。

151) 选择一个有用的信号点击，然后到 **Add to the Selected Signals** 对话框。

152) 设定 y-轴范围为 100 mAU 和补偿为 10%。在此窗口点击 **OK**。

- 153) 一旦达到稳定的基线和压力，拉下 **RunControl** 菜单并选择 **Sample Info...**。
- 154) 填写操作人名字，文件名 (scout.d)，子目录（你的名字），样品瓶号 (1)，样品名 (gradient) 和任何注释。
- 155) 用 **Start** 工具或从化学工作站菜单上按 **Run Method**，开始方法的运行。
- 156) 当完成运行时，点击 GUI pump 使泵关闭。

分析探索运行实验

- 157) 进入 **Data Analysis** 屏幕。
- 158) 选择文件 (Select File)，调用信号 (Load Signal)。
- 159) 选择你的数据文件并调用信号。
- 160) 首先，确定是否乙腈是梯度分析足够强的溶剂。是否所有的峰是在 20 min 之前洗脱出来，或者一些峰是在 20 到 25 min 之间流出？
- 161) 检查在色谱开始时消耗的时间，利用保留时间计算洗脱出第一个峰时所消耗的 % B 量和 $\Delta\% B/\text{min}$ ，例如第一个峰在 6 min 时流出：

$$5\% + (6 \times 95\%/20\text{min}) = 33.5\% B$$

这一数值将成为开始时 % B 的新组成，计算你运行分析的数值。.

- 162) 确定把所有色谱峰洗脱出来时最后的梯度组成，再进样。
- 163) 确定如何的梯度速率进行操作可以改进分离度和分析速度。你也可以一阶梯度改换为多阶梯度。
- 164) 现在你会有一个计划，在注射样品考察你改进了的梯度分析如何。一定要注意在每次试验运行之前要有一定的梯度平衡时间。
- 165) 可以进一步改进梯度以便使两个相邻峰之间的最小分离度达到 1.25。你导师给你一个时间限制，可以利用液相色谱参数改进你的分析。把你的色谱图和分析记录打印出来交给你的教师。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

定性和定量分析

定性和定量分析
在本节，你将学习

在本节，你将学习

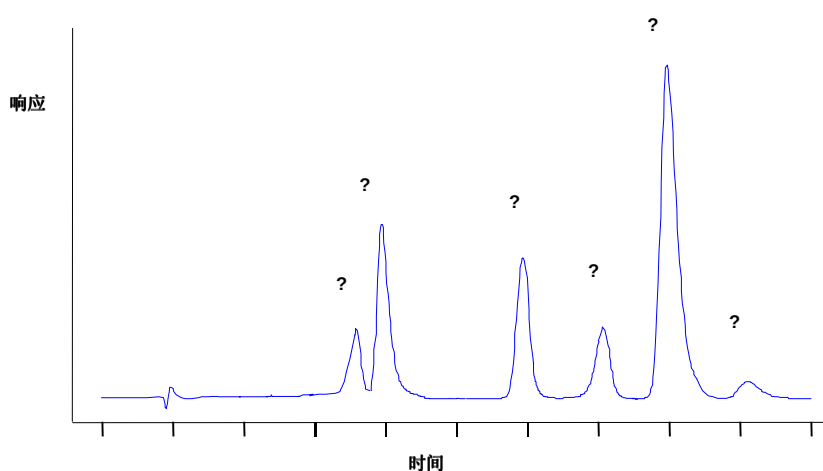
这一节，你将学习：

- 定性分析原理.
- 定量分析原理.

定性分析

定性分析

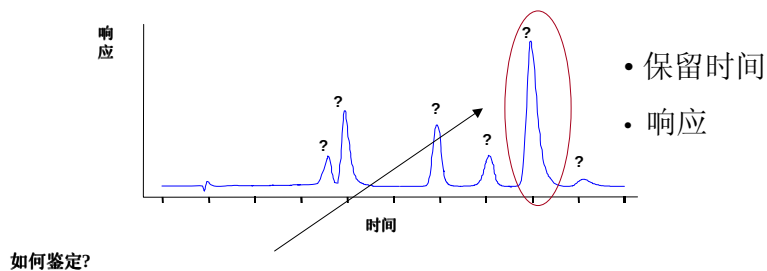
定性分析的目的是鉴定样品混合物中的一个化合物。



定性分析可分为两种分离情况，其一是你已经知道样品中含有什么成分，只是需要知道它们色谱峰的归属，另外一种情况是你要对所有的未知物进行鉴定。对于色谱峰已经知道是什么的情况下，只要简单地把样品和标准物在相同的色谱条件下比较它们色谱峰的保留时间即可，如果样品成分完全不知到就要借助于其他手段的帮助，你可以把各个色谱峰的流出物用馏分收集器收集起来，然后把分离开的样品用其他仪器如 IR, NMR 或 MS, 进行脱机鉴定，也许你幸运地有联机鉴定仪器如质谱可以进行联机定性分析。

鉴定

定性分析- 鉴定



HPLC 的被测样品可通过保留时间和响应特征进行鉴定。

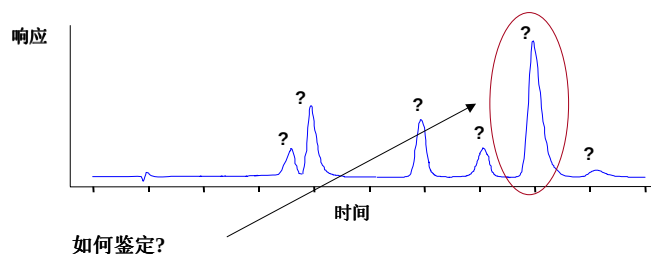
响应特征决定于检测器:

- 选择性检测器 (MS, ECD, DAD, FLD)
- 非-选择性检测器 (IR, 光散射检测器, UV-可见光检测器)

如果在样品中的混合物组成是知道的，其目的是要鉴定这些化合物，那么可以在相同的条件下分析参考化合物，比较它们的 k' 值。

使用特殊的检测方法如荧光鉴定或 UV-VIS 二极管阵列鉴定，利用光谱的功能很容易鉴定出这些化合物。

定性分析- 鉴定



实用方法:

- 在相同的分离条件下对一个未知物峰（化合物） $R_t(k')$ 和一个参考化合物峰 $R_t(k')$ 进行比较. 改变条件（固定相或流动相）再进样比较两个样品（未知物和参考物质）的 $R_t(k')$.
- 使用选择性检测器比较其结果（质谱，UV-光谱），并比较它们（化合物）的 R_t .

实用的方法

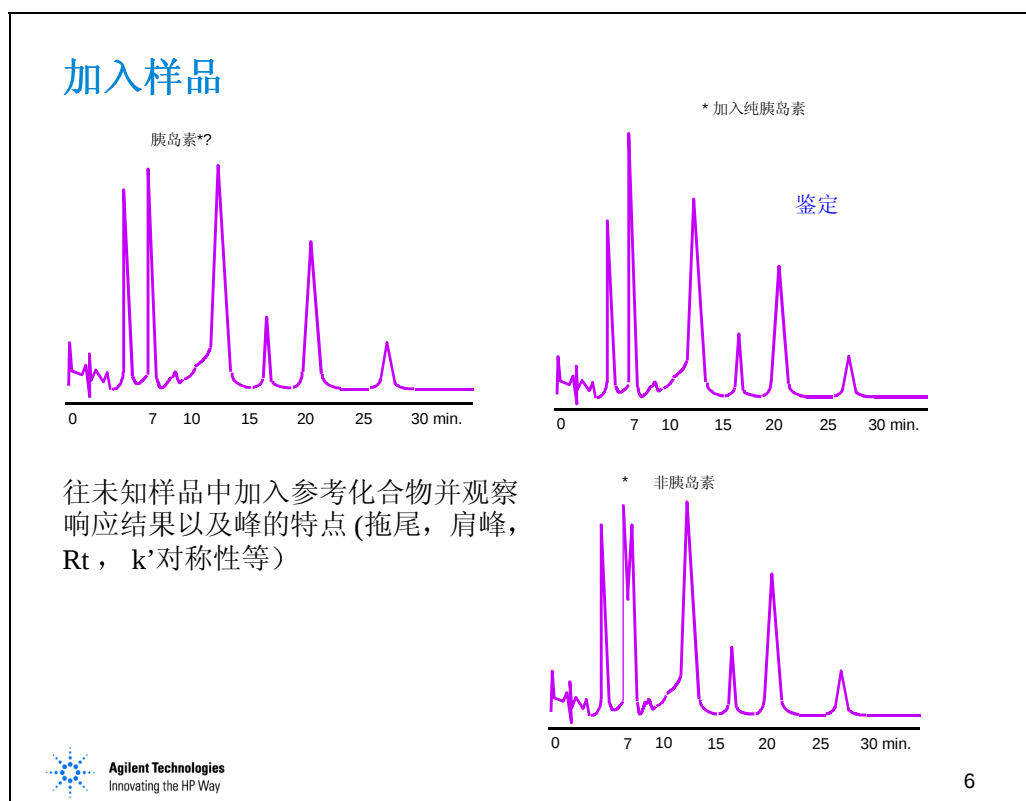
开始在一定的条件下进行分析，然后改变分离条件或分离模式。

例子

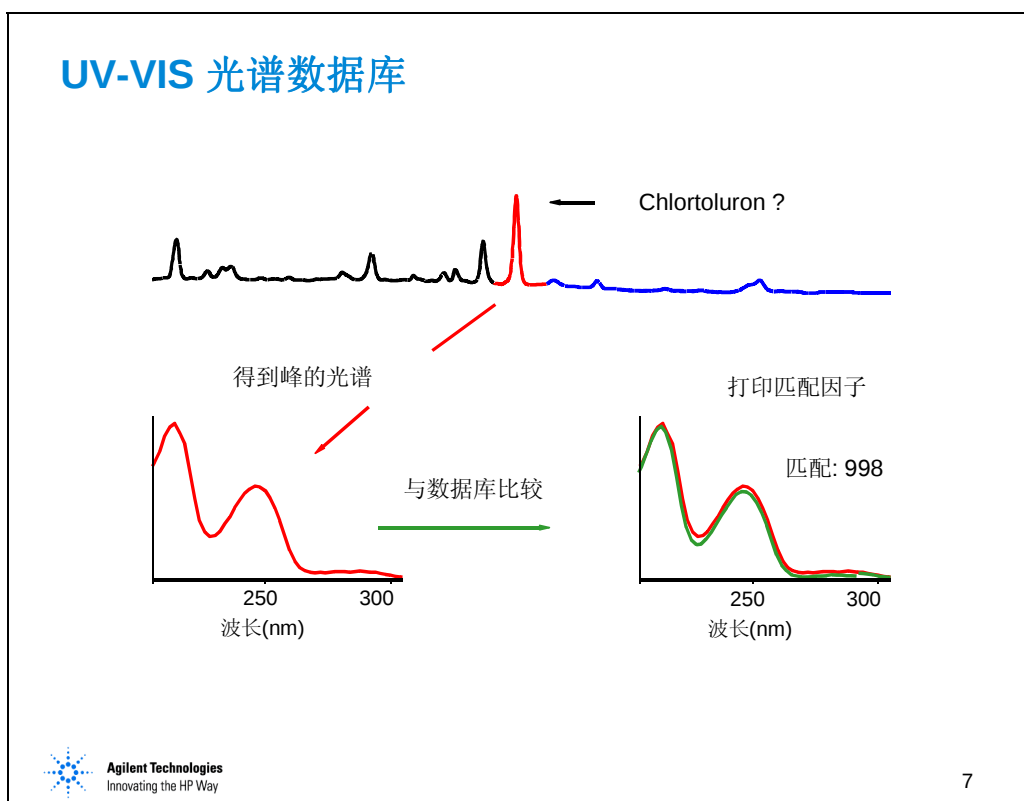
首先用反相的分离模式进行，第二个分离模式可以用正相、体积排阻、或另外一种反相模式，两种分离模式得到的结果，提供不同的特征信息（极性，尺寸）。

你的 HPLC 必须适当地保持这一类型的分析。

定性和定量分析
鉴定

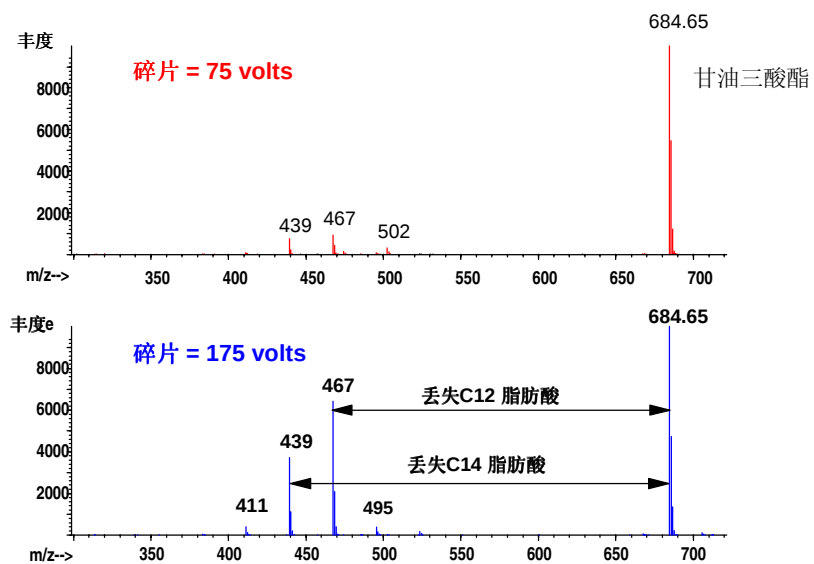


这一张幻灯片是说明把未知混合物加入到一个标准样品中, 用以鉴定出其中一个样品的组成, 分析人员想知道在色谱峰里是否有胰岛素存在, 把未知混合物加入到一个标准胰岛素的样品中, 重新进样分析, 如果色谱峰增大了即表明是胰岛素, 如果是一个新的色谱峰或者在要鉴定峰上有一个肩峰, 说明它不是胰岛素。



只用保留时间进行峰的鉴定是不可靠的，为了帮助鉴定可以建立一个光谱数据库，采集未知物的色谱和光谱数据系统，分析结束后，在色谱峰的区域进行积分，然后对化合物进行鉴定，即和数据库光盘中标标准物的光谱和保留时间进行比较，如果程序发现了正的匹配，它就打印出化合物的名称和匹配因子，并用一种统计方法进行比较。

小分子- CID离子源

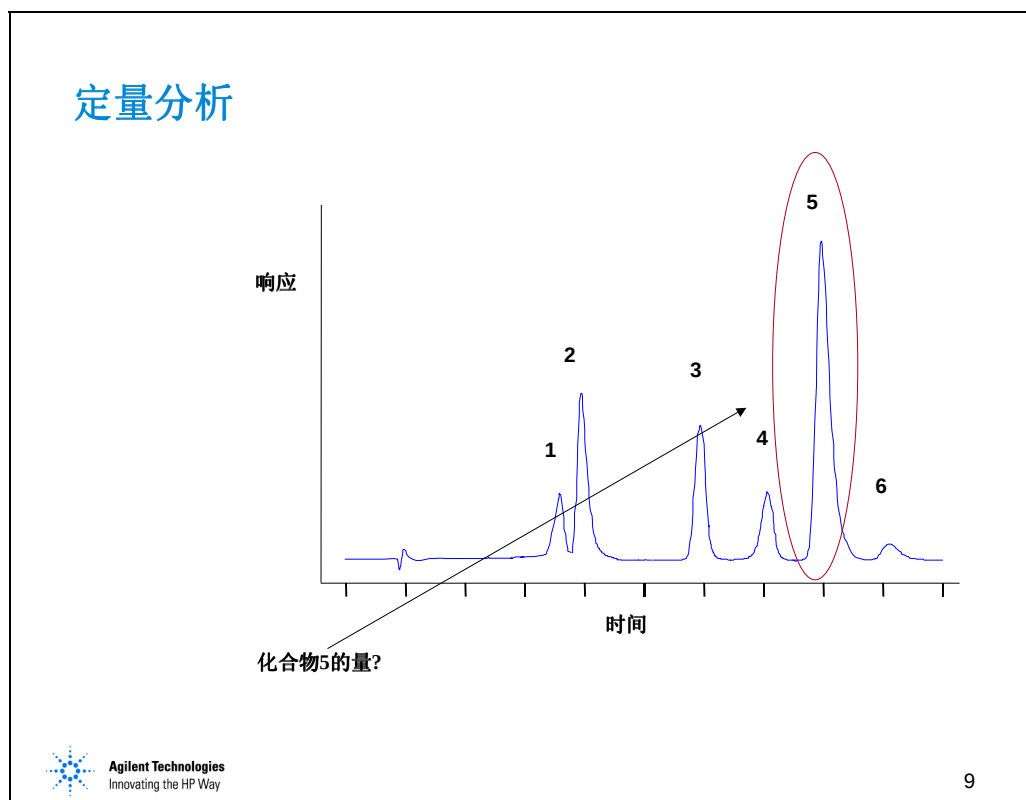


Agilent Technologies
Innovating the HP Way

8

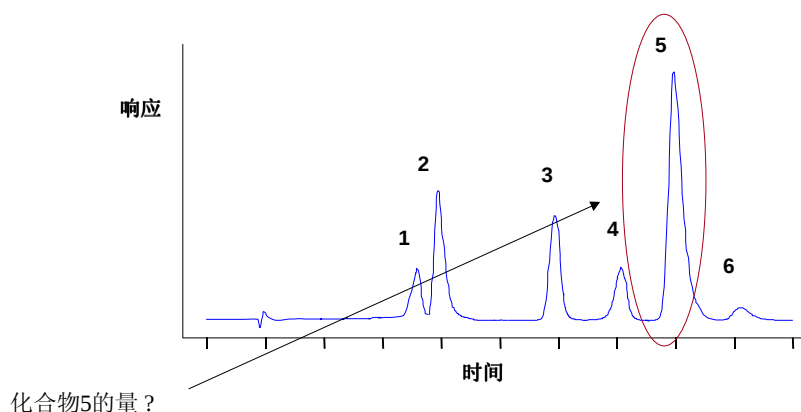
和质谱在线联用是一种十分有用的测定未知物的方法，使用大气压下电离技术可得到分子质量和一些结构的信息，用碰撞诱导电离可以采集二次质谱。

定量分析



定量分析

定量分析的目的是基于色谱的结果测定化合物的量。



什么是定量分析？

一个色谱峰积分和鉴定之后，下一步就是要进行定量分析，定量分析是用峰高或峰面积测定样品中被测化合物的浓度。

定量分析包括许多步序，要点如下：

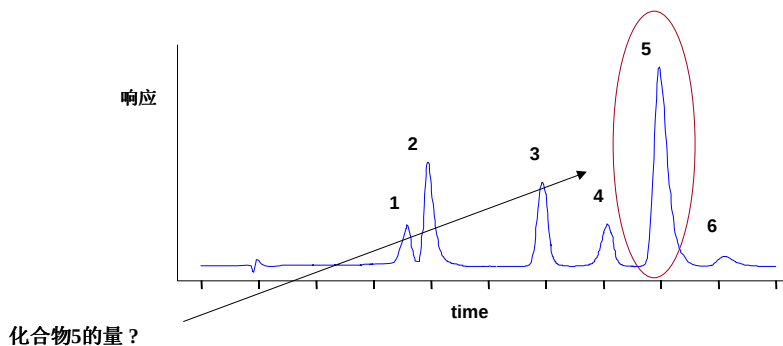
- 知道所分析的化合物是什么。
- 建立一个包含要进行定量分析化合物样品的分析方法。
- 分析一个样品或含有已知浓度的一些样品，或分析要获得已知浓度下响应值化合物的一些样品。

如果你的检测器响应是非线性的，你可以分析一些具有不同浓度的有关化合物样品，这一过程叫做多-标准校准：

- 分析一个含有未知浓度化合物的样品，以便得到由于未知浓度的存在而得到的响应值。
- 比较未知浓度响应和已知浓度的响应，从而测得存在化合物的含量。

为了得到未知样品和已知样品响应的有效比较，数据的采集和处理必须是在相同的条件下进行。

定量分析



用于定量分析峰的特征:

- 峰高
- 峰面积

对定量分析用色谱峰的要求:

- 分离好的色谱峰 (分离度)
- 化合物的响应值在检测器的线性范围内
- 不是肩峰, 拖尾峰 (前伸峰), 峰性能好.



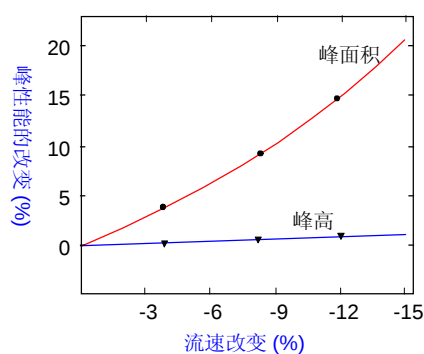
11

无论是峰高或峰面积都可用于定量分析。

定量分析的准确度在很大的程度上受峰分离度的影响, 分离好的色谱峰可以很好地积分, 因为它不受其他峰高或峰面积的影响, 峰对称性也是获得好定量结果的性能特征, 峰对称性超过 3 不能完全积分。

肩峰或拖尾峰/前伸峰可能是两个不能分离化合物的结果。

峰高或峰面积的计算



- 峰高不受流速的影响
- 峰面积用于有严重拖尾峰的定量.
- 两种方法对不重复的进样体积都不精确.

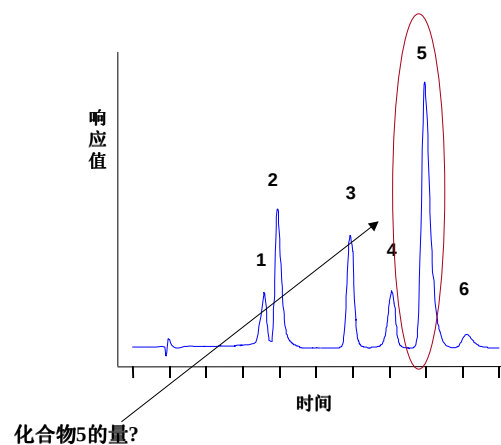
对多数 HPLC 分析，虽然是用峰面积做出校准表，但是大多数情况下是使用峰高得到等效的结果。峰面积特别有用是因为 HPLC 峰可能拖尾，但是有些情况下利用峰高计算得到更好的结果，对痕量分析，要测定化合物的峰面积很小时，就用峰高进行计算。

上述图表说明这一事实，色谱峰的峰面积在流速改变时会改变，你要知道如果泵系统维护不好就会使流量不稳定，从而使峰面积精密度下降，所以要经常维护泵的密封件，检查阀和过滤装置，一定要让泵处于最好的状态，没有溶解的气体。

定量分析

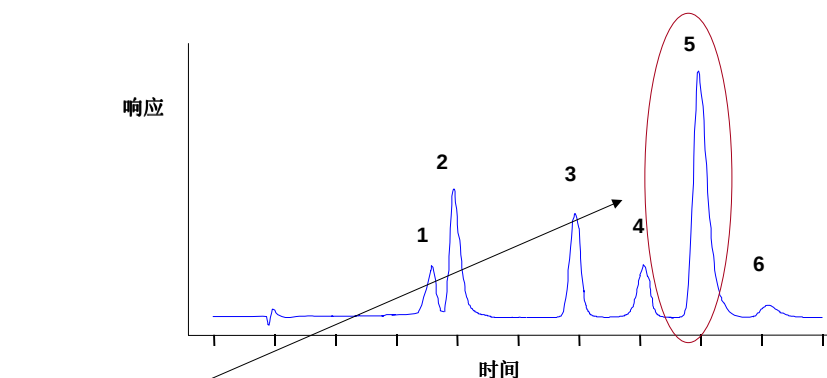
定量分析用三种原理:

- 外标校准
- 内标校准
- 标准加入
- 面积 %
- 归一%



定量分析的类型决定于分析方法的目的是，每个定量分析方法都有优点和缺点。

峰面积/峰高% 计算



化合物5的量？

把所有要测定化合物的峰面积/峰高100%加在一起然后计算 x%.



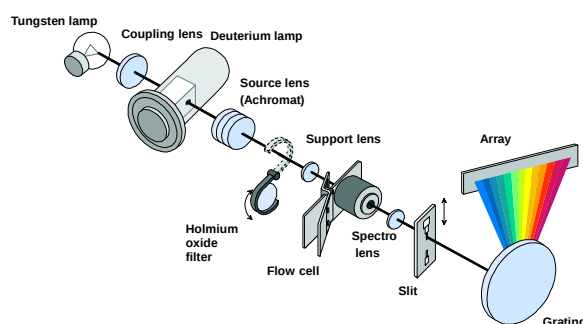
14

峰面积 % 和峰高 %

峰面积 % 计算步骤是在分析中得到每个色谱峰的峰面积除以所有色谱峰的峰面积的百分比，峰面积 % 不需要事先进行校准，也不依赖于进样量（只要在检测器的线性范围内），不要使用校正因子。如果所有化合物都流出物色谱柱，它们的校正因子又相等，那么峰面积 % 就提供一种测定各个化合物相对含量的适宜方法。峰面积 % 常用于关心定性分析结果的场合，得到的信息用以建立其他校准步骤使用的校准表。

峰高 % 的计算步骤是在分析中得到每个色谱峰高除以所有色谱峰峰高的百分比。

比尔定律和定量分析



$$\log \frac{I_0}{I} = A = abc$$

I_0 = 入射光的辐射强度

I = 透过光的辐射强度

A = 吸光度

a = 摩尔吸光度

b = 光程长

c = 溶液浓度

吸光度和浓度之间的线性关系用于准确的定量分析。

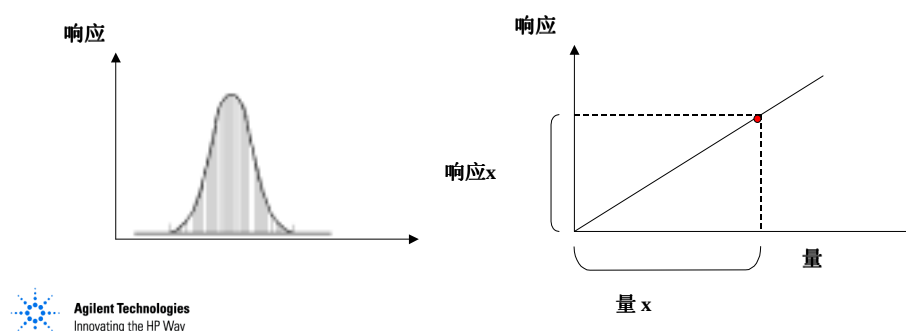
在 HPLC 中最多使用的检测器之一是 UV 吸收检测器，不管信号是来自固定波长、可变波长或二极管阵列检测器，都可以进行定量分析，因为样品组分的吸收按照 Beer 定律其含量和浓度成正比关系，这一线性关系可以让你用已知浓度的标准化合物建立一个校准曲线。

外标

定量分析 - 外标

原理:

- 用高性能的参考化合物制备已知量（浓度）的标准溶液.
- 测定其响应值（峰面积，峰高).
- 画响应值和已知量之间的对应曲线.



16

ESTD 方法是基本的定量分析步骤，即在相同的条件下进行标准和未知物的分析。

把未知物样品的结果和标准样品的结果进行比较，计算未知物的含量。

ESTD 方法使用绝对响应因子。响应因子由校准得到然后储存起来，在以后的样品分析中使用响应因子计算组分含量，从而得到样品中要测定成分的量。

在这一计算中必须遵守一个规定，即每次分析的进样量必须相同和重复。因为在样品中没有标准物来校正进样量和样品制备的偏差。

校准曲线

一个校准曲线是从一个或多个校准样品得到的含量和响应值之间关系的线性图。

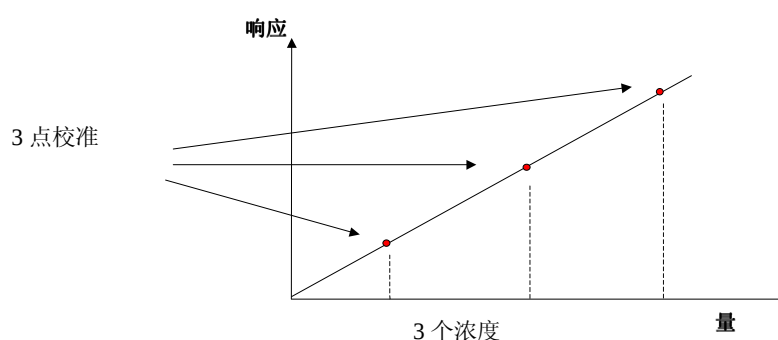
正常情况下，取校准样品的若干分之一进样，得到一个信号值，用此测定得到的响应值来计算峰高或峰面积。

对校准曲线图要提供 *相关系数*，相关系数是回归系数平方根，是校准曲线和各个数据点之间的符合程度的量度。

校准

外标校准

最低要用三个点来证明校准曲线是线性的



$$Amount_{(Sample)} = Response_x \times RF_x \times M \times D$$

假定当不能确定一个组分具有线性响应时，或为了确认校准在线性范围之内，就进行多点校准，每一个校准点相对应一个特定的组分浓度，制备校准样品时每个组分的浓度应该和预测未知物组分的浓度范围相适应，这样可以使检测器浓度响应值的变化在相应的计算响应因子范围之内。

这一多点校准曲线有三点，和原始值相适应，通过原始数据进行线性适应的方法类似于单点校准方法，假定检测器的浓度响应是线性的，两种校准类型的差别是线性符合程度，通过几个点（每个点对应一个标准）的测定找到检测器响应的斜率。

未知定量分析

未知样品是一个含有未知含量化合物的样品，对这一样品进行含量测定。要测定出此样品中含有多少要测定化合物的量，你必须：

- 建立所测化合物的校准曲线，
- 取若干分之一的未知样品，严格按进行校准样品的条件进行分析，
- 从信号的响应值进行测定，信号的响应值是由化合物的未知量产生的峰面积或峰高，以及
- 使用校准曲线来计算未知样品中化合物的含量。

外标

定量分析 - 多点校准

多点校准曲线保证响应值与所注射的样品量成比例关系。

影响参数:

- 背景响应 (空白)
- 检测器的线性范围
- 峰的积分

多点校准的特点

- LOD (检测限) S/N比 ~ 3:1
- LOQ (定量限) S/N 比 ~ 20:1
- 曲线函数- 线性/二次方程, 等.



18

重要的校准的参数

一个含有复杂基体的样品（如环境、生物样品）可能显示出基体的响应，为了测定基体样品的响应，使用不含被测组分的基体在相同的条件下测定其响应值，这一所谓空白色谱图的处理和测定 LoD 的开始一点是一样的。

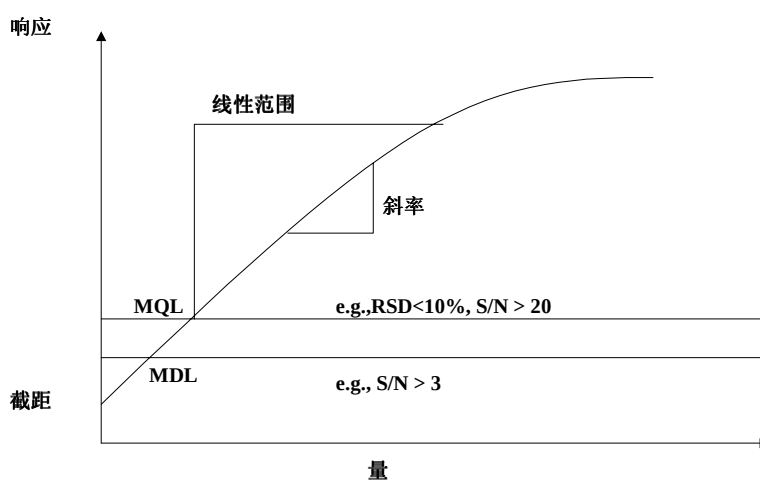
LoD 是定义为 S/N，空白色谱的峰高和噪音的峰高的比值。

LoQ 是定义为信噪比 S/N，但是没有迫切的需要，其原因是可接受的 LoQ 的极限 (RSD %) 比 LoD 的范围要小。

你也应当测定校准曲线的线性范围。

线性范围的定义如上，LoQ 到定量分析方法线性范围的最后一点。

多点校准总结



上面的图说明 LoD 和 LoQ 与线性范围及截距的总结，截距是基线响应值造成的结果。

归一 %

归一% 校准

$$Norm\% = \frac{Rf_x \times Area}{\sum Rf \times Areas} \times 100$$

要求:

所有组分必须洗脱出来并被检测

$$Rf = \frac{Amount}{Response}$$



归一 % 计算

在归一化方法中使用峰面积（或峰高）的响应因子，以便抵消不同样品组分在检测器上有不同响应值的影响。

归一 % 报告的计算是和 ESTD 报告一样，所不同的是有一个附加的步骤，即计算化合物相对含量而不是其绝对量。

归一 % 报告具有峰面积 % 和峰高 % 一样的优点，任何影响总峰面积的变化都会影响每个峰浓度的计算，归一化报告必须要使所有的峰都洗脱/迁移出来并能进行积分才可以使用，如果从归一化报告中排除选择的色谱峰将会改变样品的结果。

用以计算 x 组分归一 % 的公式如上所示。

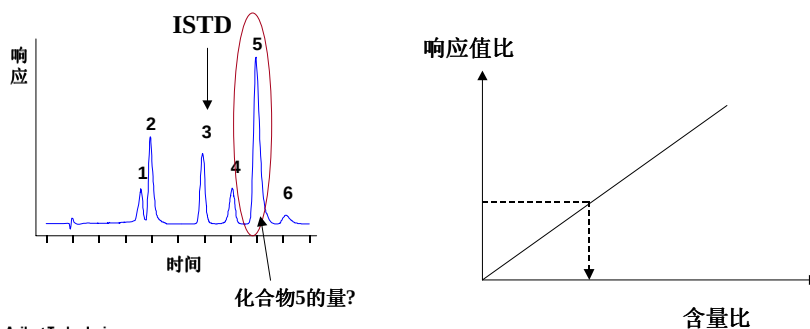
内标分析

定量分析 - 内标

原理:

内标是一种高性能化合物，样品中不含有这种化合物，把已知浓度的内标加入到标准溶液和样品中。

- 计算ISTD和被测化合物的响应值的比.
- 把响应值的比对含量比做图.



21

ISTD 校准

ISTD 步骤消除了 ESTD 方法的缺点，这是由于加入了已知量用做归一化因子的组分，把这一物质，内标，加入到校准和未知样品中。

用做内标的物质其性质要类似于被校准的化合物，即在化学和保留性质上有相似性，但是它们在色谱和电色谱性能上有区别。

如果 ISTD 方法用于非线性特性关系进行校准，必须注意，由计算原理引出的误差导致系统的误差。在多点校准中，ISTD 化合物的量必须保持恒定，即如果化合物是非线性的校准，对所有的标准都是一样的。

在内标分析中，被测组分的量和内标化合物的量和二者色谱峰的响应值之比成一定的关系。

定量分析 - 内标

对内标化合物的要求:

- 化学和物理性质必须接近于被测定物质.
- 这一化合物必须性能好而且稳定 (纯度等).
- 这一化合物必须在色谱图上和其它化合物很好地分开.

在 HPLC 中，选择适当的内标物常常是很难的，最好的内标物是结构类似于未知物的化合物，所以内标物也具有类似的检测器和萃取/样品制备特性，内标物必须易于得到并且要和其他色谱峰分开。

内标的计算

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{\text{ISTD}}}$$

$$\text{Amount of } x = (\text{Response Ratio} \times \text{RF}_x) \times (\text{Amount ISTD}) \times M \times D$$

RF_x = 化合物 x 的响应因子

M = 附加因子 (化合物纯度等)

D = 稀释因子



23

校准

166) 校准曲线的各个点是由计算一个含量的比值和对每一个在校准表中选择特定峰标准响应值之比来构成。

含量的比值是化合物的量除以在这一标准里内标物的量。

响应值之比是化合物的峰面积除以在这一标准里内标物的峰面积或峰高。

167) 通过校准点的计算得到曲线的公式。

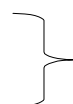
未知样品

168) 在未知样品中化合物的响应值除以在未知物样品中内标物的响应值，就得到未知物响应之比。

169) 使用和上述第二步公式相适应的曲线以及样品中 ISTD 的实际含量来计算一个未知物的含量比。

定量分析的质量标准

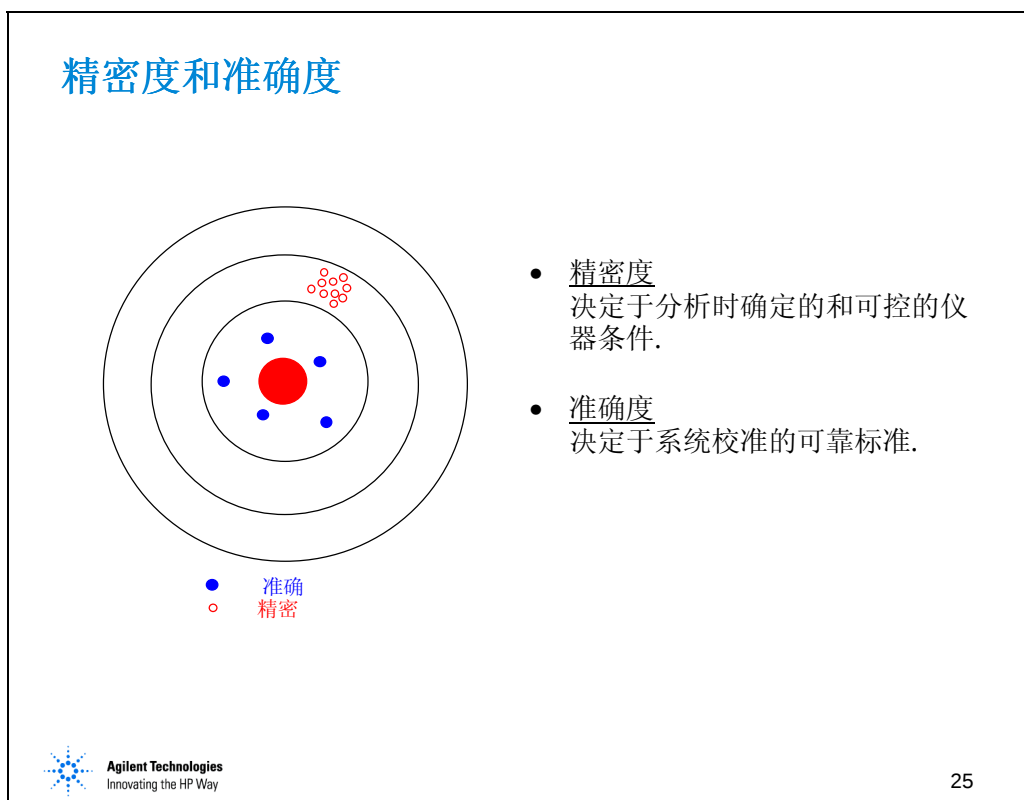
- 准确的结果
- 精密的结果
- 稳定
- 确定的 LOD
- 确定的 LOQ
- 确定的定量范围



与方法的目的有关

分析内标的含量标准类似于外标分析。

精密度和准确度



图中的圆靶恰好是区分精密度和准确度的绝好示例，实心镖要比空心镖有更好的准确度，因为它更接近于靶心，在我们分析样品的情况下，与真值接近时就有更好的准确度，红的实心镖其精密度更好一些，因为它们各个点彼此靠近，测量可能不够准确但其精密度很好。

在你的 HPLC 中，准确度差不好是和标准物的配制或分析方法本身的效率有关。精密度不好常常是和仪器的性能有关，如果你发现你的分析方法精密度不好，可能是你的 HPLC 仪器需要进行正常维修的时间到了。

定性和定量分析
精密度和准确度



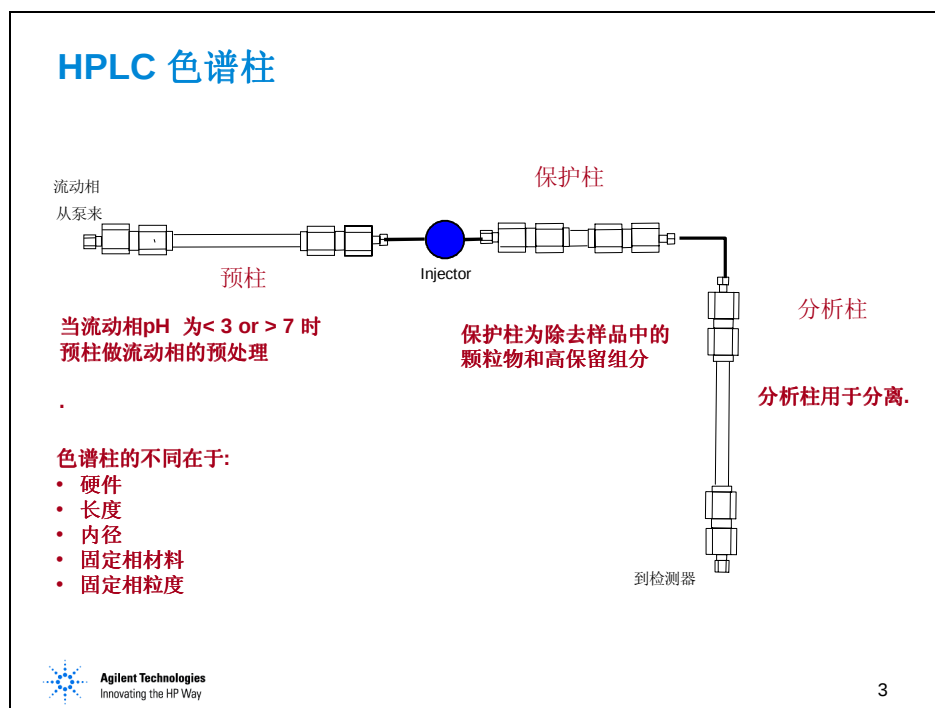
色谱柱硬件和填料

这一节，你将学习

在这一节，你将学习：

- HPLC色谱柱的不同用途.
- 关于柱硬件.
- 关于柱填料.
- 如何选择适当的颗粒直径.
- 如何选择适当的色谱柱内径.
- 如何选择正确的柱长.

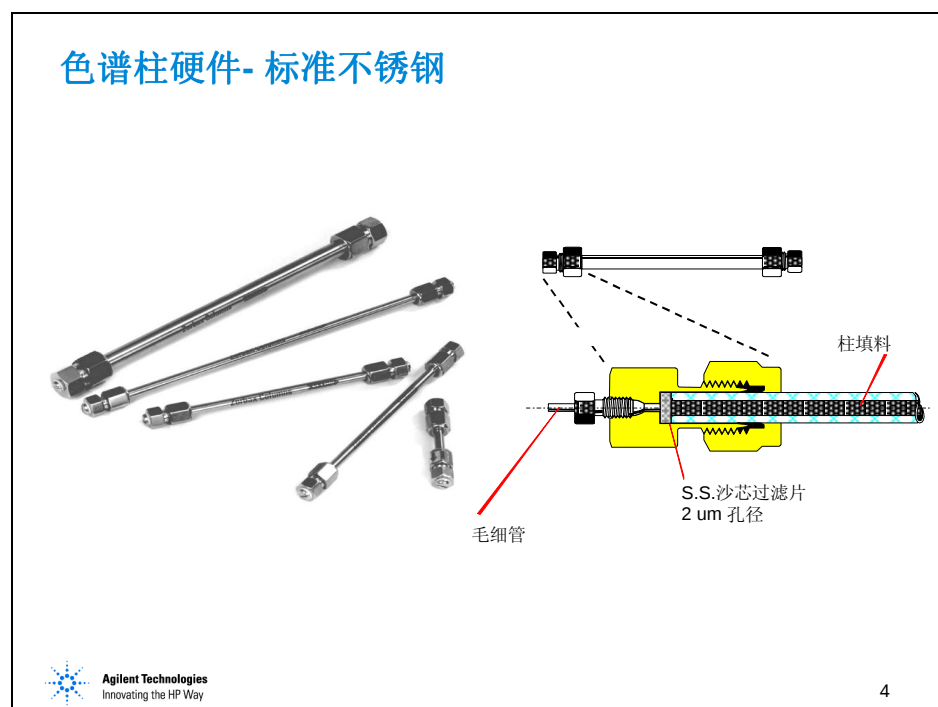
色谱柱硬件



高效液相色谱的色谱柱是 HPLC 的心脏，样品组分的分离是在这一色谱柱上实现的，最常使用的 HPLC 色谱柱长 200 到 300 mm，其内径为 4-5 mm。近年人们对降低柱内径和柱长以及装填较小的填料的兴趣日益增长。

为了保护分析色谱柱要使用保护柱，保护柱避免昂贵的分析柱受到杂质和颗粒物的损坏，任何强保留性的样品组分会滞留在分析柱中，如有保护柱就会捕集这些有害物质，保护柱所装的固定相和分析柱一样，它们的柱径和填料粒度和分析柱一样，但是柱长很短，保护柱置于进样口和分析柱之间。为了避免有任何额外的死体积，选择过滤小柱作保护柱，这种小柱能够调节保护柱和分析柱在一个色谱柱固定装置上，要定期更换保护柱，即当系统由于堵塞或色谱峰由于强保留组分而峰形变坏时要更换保护柱。

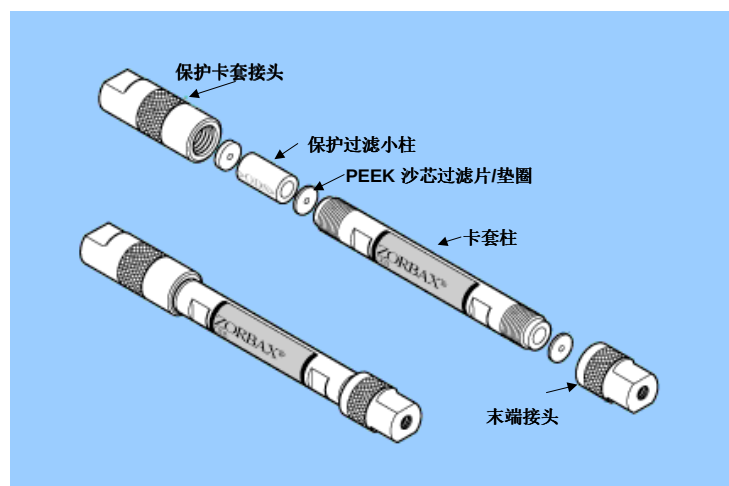
一个预柱不像普通的保护柱，它是在保护柱和分析柱之前用于平衡流动相之用，对以硅胶为基的分析柱寿命可以延长，硅胶易于在极端 pH、高离子强度、流动相极性下被溶解。预柱在此条件下会以硅酸饱和流动相，预柱是放在进样器之前。



最常用的 HPLC 色谱柱硬件是由 316 -号铬-镍-钼不锈钢制成，这种钢管经过精密钻孔和抛光，色谱柱的两端用多孔沙芯塞堵住，多孔沙芯塞的孔径根据载体的颗粒直径不同而不同，沙芯塞装在色谱柱接头一端，色谱柱对大多数溶剂和添加剂有化学惰性，但对氯离子例外，氯离子会在色谱柱表面形成疤痕，色谱柱可以承受典型的 HPLC 压力。

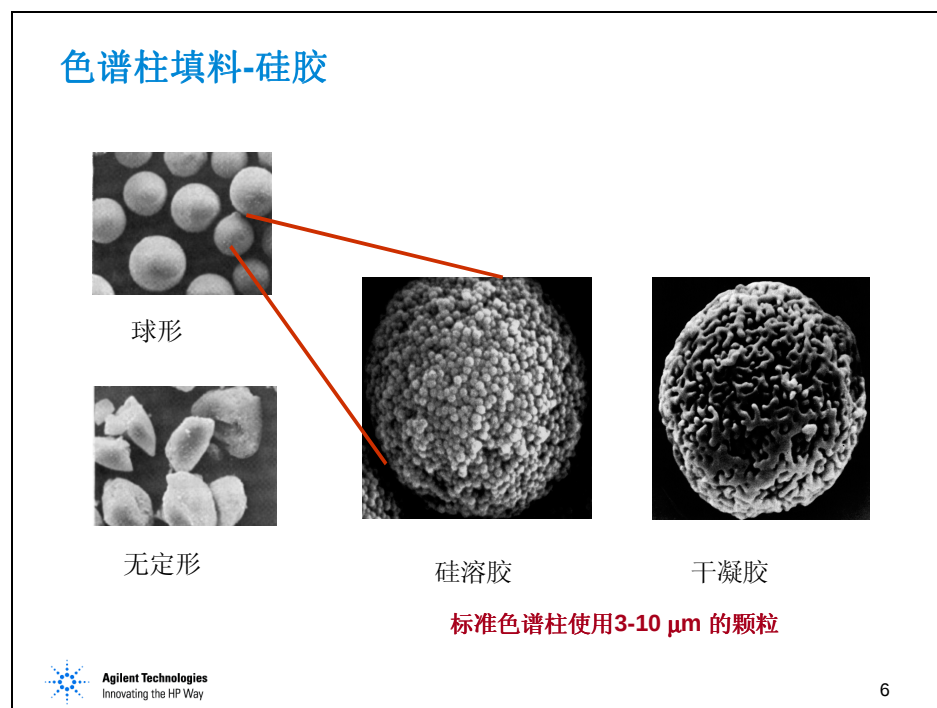
要意识到不是所有色谱柱端的接头是相同的，所以要选择适当的毛细管接头做柱端接头，例如使用 Swagelock 接头。

色谱柱硬件- 卡套色谱柱



卡套色谱柱应用很普遍，因为它价格低廉易于更换，卡套色谱柱装在色谱柱套管接头中，更换带过滤小柱的色谱柱时不要使用工具在几秒内就可以完成，常常可以把分析柱和保护柱同时装入色谱柱套管接头里，这样一来安排避免了由于连接管造成的附加死体积，虽然开始买卡套和卡套接头时要多花一些费用，但实际上卡套一般比标准的不锈钢色谱柱便宜，每次只需要更换卡套，所以总费用还是节省的，对高流量、且需塔板数不超过几千个时建议使用卡套色谱柱。

色谱柱填料



一般把多孔硅胶用做 HPLC 吸附色谱的载体，并且把硅胶用于多种化学修饰固定相的基体，用于反相色谱、正相色谱、离子色谱、手性色谱、体积排阻色谱等方面，硅胶的化学组成是 $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ，硅胶纯度能影响填料的色谱性能。

上图所示为两种类型的颗粒，硅溶胶和干凝胶（硅胶），Zorbax Rx-Sil 填料有硅溶胶，小的无孔颗粒聚集为 3-10 μm 颗粒，在甲醛里和加热的情况下这些颗粒熔和在一起，它们成为熔和在一起坚硬的球形颗粒，硅溶胶一般具有较低的表面积、多孔性、和表面活性。有数据显示硅溶胶在 pH 7 以上时溶解性低于硅胶。

另外一种常见的颗粒是硅胶（干凝胶），硅溶胶在进行热处理时形成刚性的多孔硅胶，这类颗粒具有高的比表面和多孔性，在 pH 7 和 pH 7 以上时，易溶于流动相中。

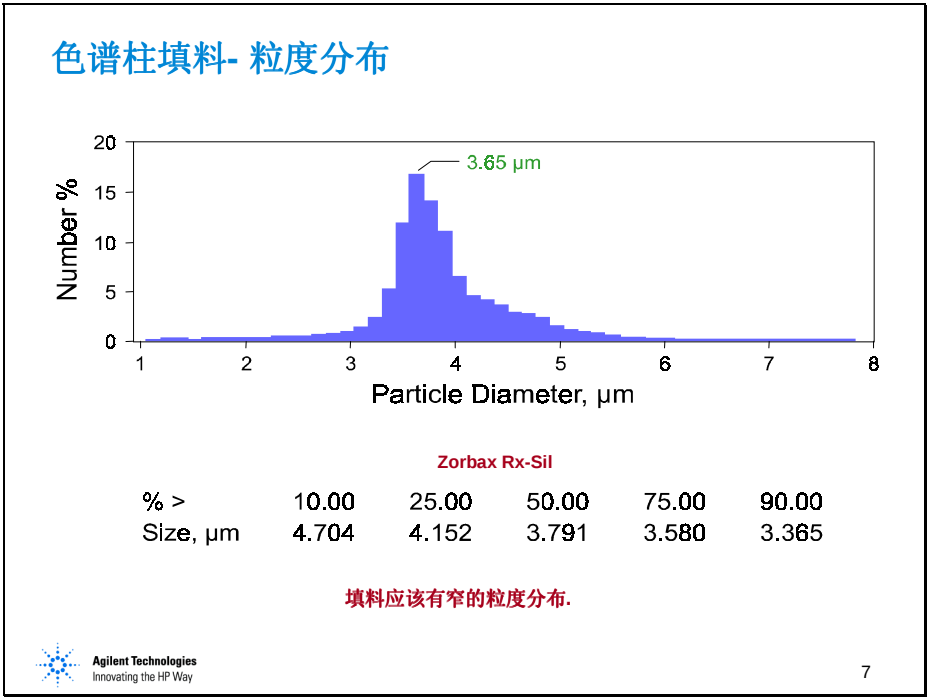
各个厂家生产的硅胶其形状、表面积、孔径和表面化学性质各有不同。

硅胶有两种基本的形状，无定形和球形，研磨的硅胶干凝胶经筛分之后得到适当大小粒度和分布的无定形产品，虽然无定形硅胶便宜一些，但是它的柱

效不如球形硅胶，而且它易于产生粉末堵塞色谱柱的出口过滤沙芯塞，球形硅胶颗粒一般要好一些。

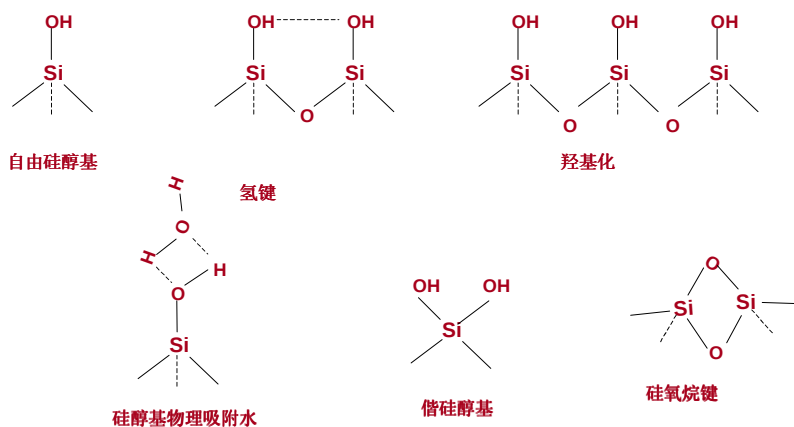
分析用色谱柱的填料颗粒直径从 3 到 10 μm ，大颗粒会使色谱峰加宽分离性能不好，而小颗粒填料柱压高，常用的颗粒尺寸为 3.5 – 5 μm 。

色谱柱硬件和填料
色谱柱填料



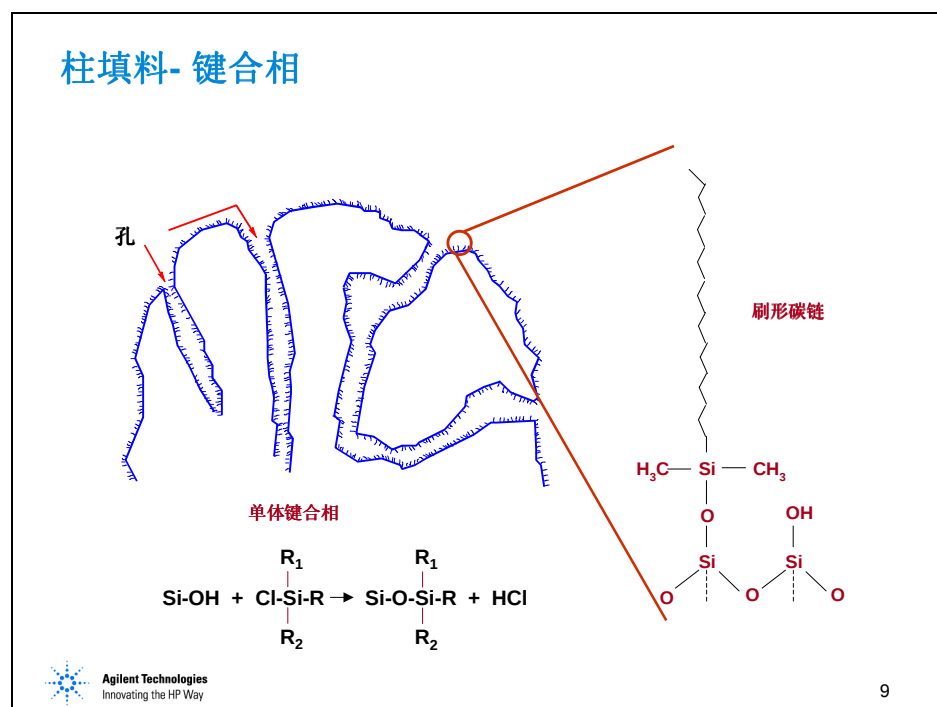
除去颗粒直径外，颗粒大小的分布也是填料的重要性能，大多数 HPLC 填料的粒度分布近似为平均粒径的正态分布，此分布越窄越好，其色谱柱性能也越好，如果对填料的粒度分布不加严格控制，大颗粒会降低柱效，细的粉末会堵塞 $2\ \mu\text{m}$ 的沙芯过滤塞。

色谱柱填料- 硅胶的表面



硅胶表面覆盖了硅醇基和硅氧键，这些基团可以和一些分子反应成为吸附色谱保留性能的基础，这样的表面化学性质可作为化学键合的反应点。

自由硅醇基不同于水化的或氢键结合的硅醇基，它可以和碱性样品化合物产生拖尾的色谱峰，硅氧烷键为硅胶颗粒提供一个刚性载体。



把氯硅烷和硅胶表面上的硅醇基反应可以生成多种有用的固定相，氯硅烷可以是一、二、三氯代硅烷，一氯代硅烷可以生成单体填料，它的柱效很高，但是保留性能不如二、三氯代硅烷制得的强，这些键合相叫做聚合键合相。

键合相由于改变了表面性质所以很有吸引力，因为它可以改变色谱柱的选择性，同时它也隔离了流动相和硅胶骨架的接触，也遮盖了硅醇基避免和样品化合物的接触，改变了它的活性，键合相在 pH 2 和以下是不稳定。

选择单体或聚合相，键合类型 (Si-R, Si-O-R, Si-O-Si-R)，键合完全程度以及其它化学键合的处理，都会使同一种键合相产生十分不同的固定相效果。

最常用的键合固定相是十八烷基硅胶，C18，如上所示，近乎 80% HPLC 使用这一类固定相。

柱填料- 通用键合相

反相HPLC

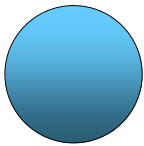
- C18 } 最通用的HPLC柱
- C8 }
- C4 } 蛋白质分离
- C1 }
- 苯基 弱偶极- 诱导偶极
 与极性被分析物作用

反相或正相HPLC

- CN 中等极性
- NH₂

正相HPLC

- 二醇 分离各种极性的化合物



$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{-O-Si- R} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

离子交换

DEAE (二乙胺基乙醇)
QAE (季铵胺乙基quaternaryaminoethyl)
羧甲基Carboxymethyl

体积排阻色谱

甘油基丙基Glycerylpropyl

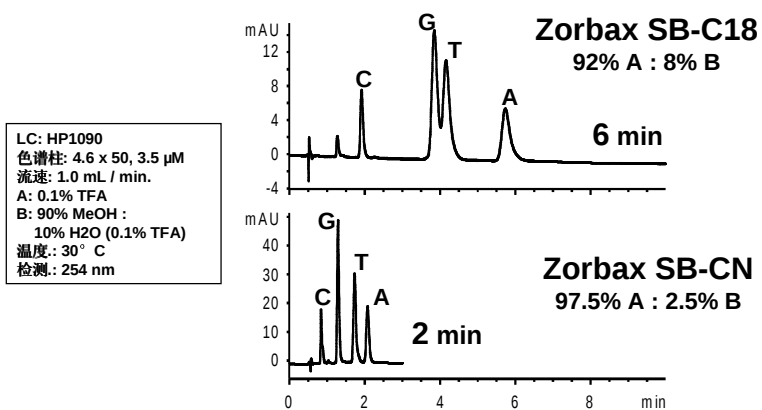


Agilent Technologies
Innovating the HP Way

10

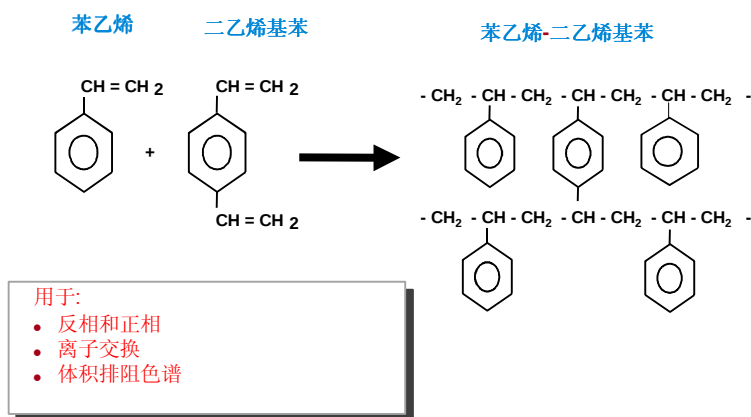
上面列出一些常用的键合固定相，注意键合固定相有很大的差别，不仅是极性，分离机理和分离模式也有所不同。

柱填料- 使用优化键合相提高脱氧核苷酸的分析速度



上面的例子说明适当地选择键合相可以整个改进分离的选择性。

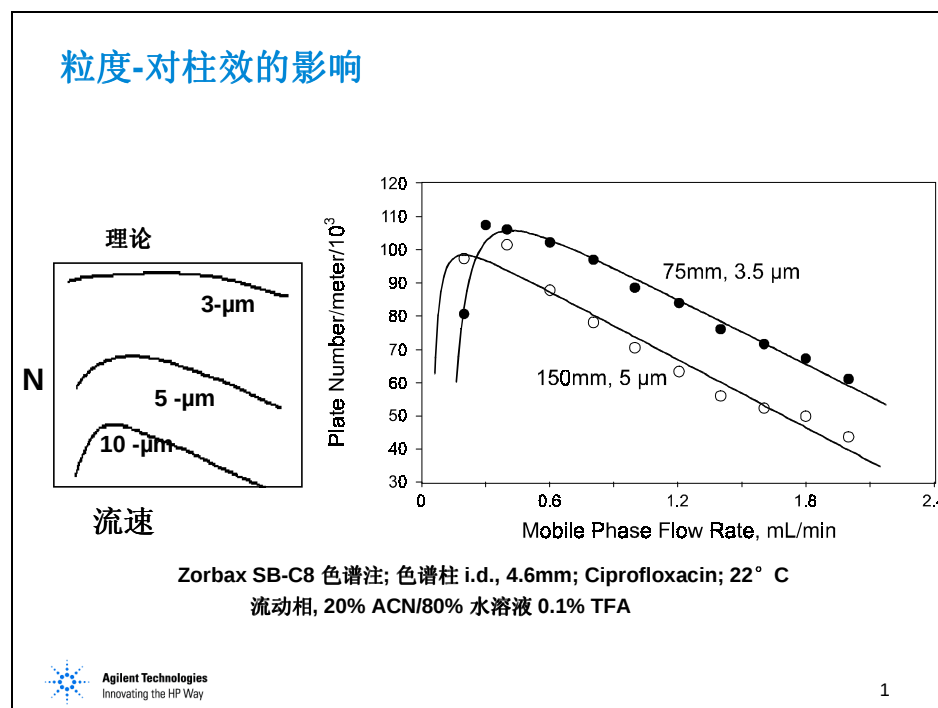
填料- 聚合物载体



聚合物载体如聚合苯乙烯-二乙烯基苯是常用的 HPLC 载体，特别是离子交换，体积排阻色谱中的应用，从苯乙烯和二乙烯基苯进行交联共聚，得到交联聚苯乙烯，二乙烯基苯的量决定胶的交联程度和刚度，聚合苯乙烯-二乙烯基苯有很高的硬度，可承受压力到 5000 psi.，这一固定相有很强的疏水性，它不必衍生化就可以作为耐 pH 的反相固定相，pH 范围在 1-13。不幸的是它没有像硅胶那样的高柱效，因而它的应用受到限制。在反相模式下如使用 THF/ 乙腈做流动相其峰形会有所改善，使用这一流动相就是说对苯乙烯-二乙烯基苯的芳香环进行了脱活。

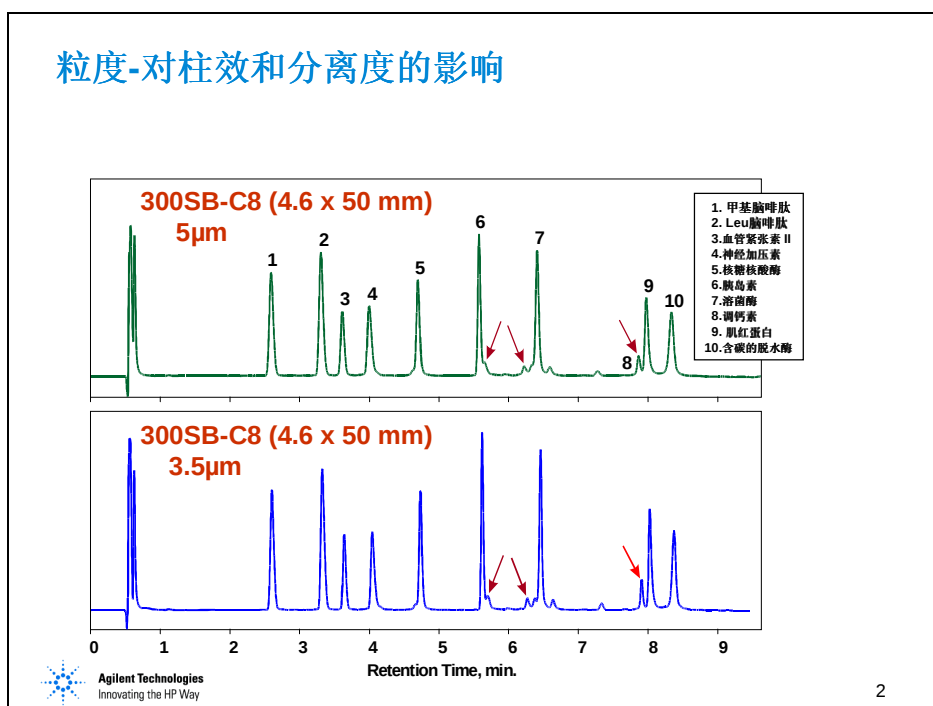
聚合苯乙烯-二乙烯基苯最常用于体积排阻色谱和离子交换高效液相色谱，经过化学改性可以得到所需要的固定相。

粒度



色谱柱参数中一个最重要的参数是选择固定相的粒度，从上图中你可以看到在任何流速下较小粒度的固定相会得到高的柱效，高柱效会转化为高分离度，为什么不能使用最小粒度的填料？答案是柱压太大，较小粒度导致较高的反压。

因为较小粒度的固定相改进了柱效，有两类应用的结果。首先，使用小粒度的固定相并保持原有的流速，这样在使用短色谱柱时也可以提高分离度。第二，在短色谱柱中装小粒度的固定相并使用高流速，这类色谱柱大家知道是快速，或高速色谱柱，可在中等柱效下的高产率分析中应用。



在这一例子里，方法的参数保持不便，只改变固定相的粒度，从 5 µm 降到 3 µm，注意在分离度上有一些的改进，改进不太大，但是从大峰上分离污染物却有明显的改进。

5- μm 和3.5- μm 色谱柱的近似的塔板数 (N) 和死体积 (Vm)

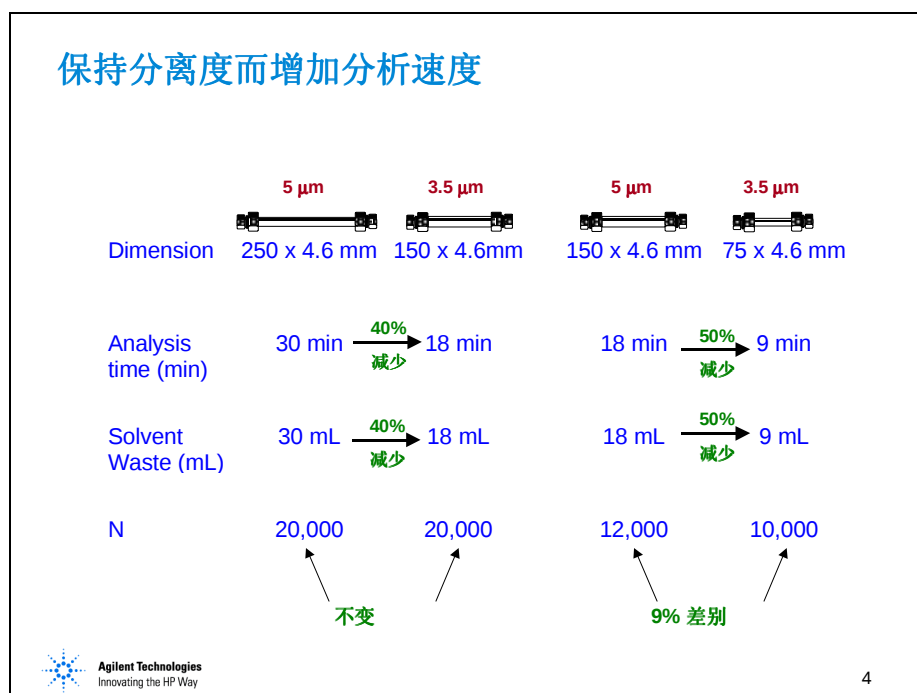
缩短柱长(N↓) 同时减小粒度 (N↓) 能:

- 保持分离度
- 缩短分析时间
- 减少溶剂用量

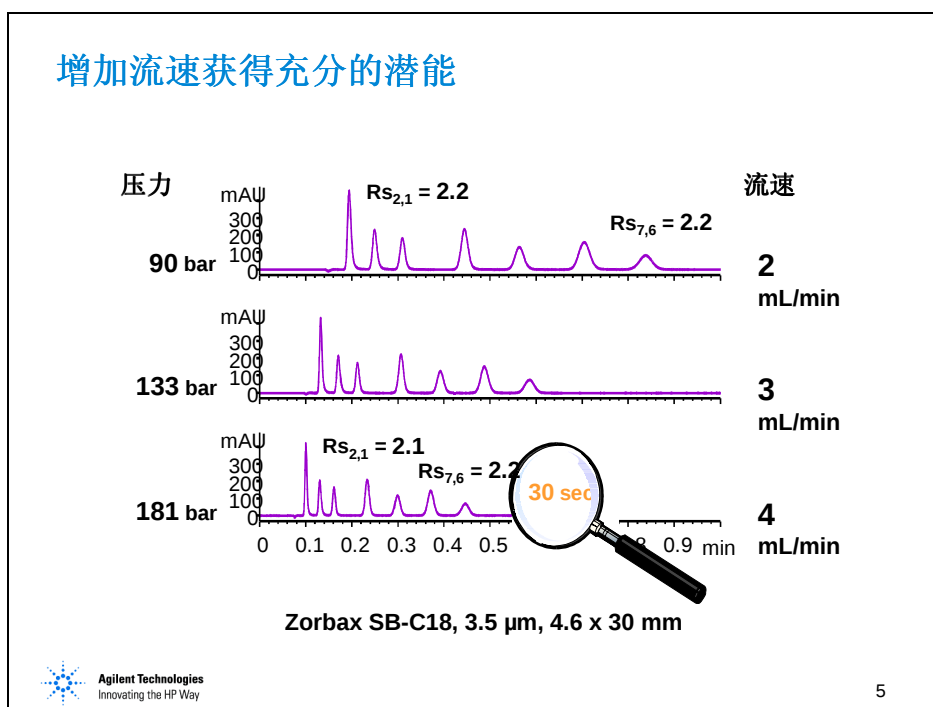
Column Size	Particle Size	Plate Number (N)	Void Volume (Vm)
4.6 x 250 mm	5- μm	20,000	2.5 mL
4.6 x 150 mm	5- μm	12,000	1.5 mL
4.6 x 150 mm	3.5- μm Rapid Resolution	20,000	1.5 mL
4.6 x 75 mm	3.5- μm Rapid Resolution	10,000	0.75 mL
4.6 x 50 mm	3.5- μm Rapid Resolution	6,000	0.5 mL
4.6 x 30 mm	3.5- μm Rapid Resolution	3,600	0.3 mL
4.6 x 15 mm	3.5- μm Rapid Resolution	2,000	0.15 mL

上面的图表说明减小颗粒度即使缩短柱长仍可以保持原有的柱效，4.6 x 250 mm，5 μm 色谱柱和 4.6 x150 mm，3.5 μm 色谱柱都具有 20,000 塔板数，其优点是降低分析时间节约溶剂。

注 意：3.5 μm 颗粒度的填料 可以使用 2 μm 的沙芯过滤塞，这一过滤塞比使用 0.5 μm 过滤塞的优点是不易被小颗粒杂质堵塞。

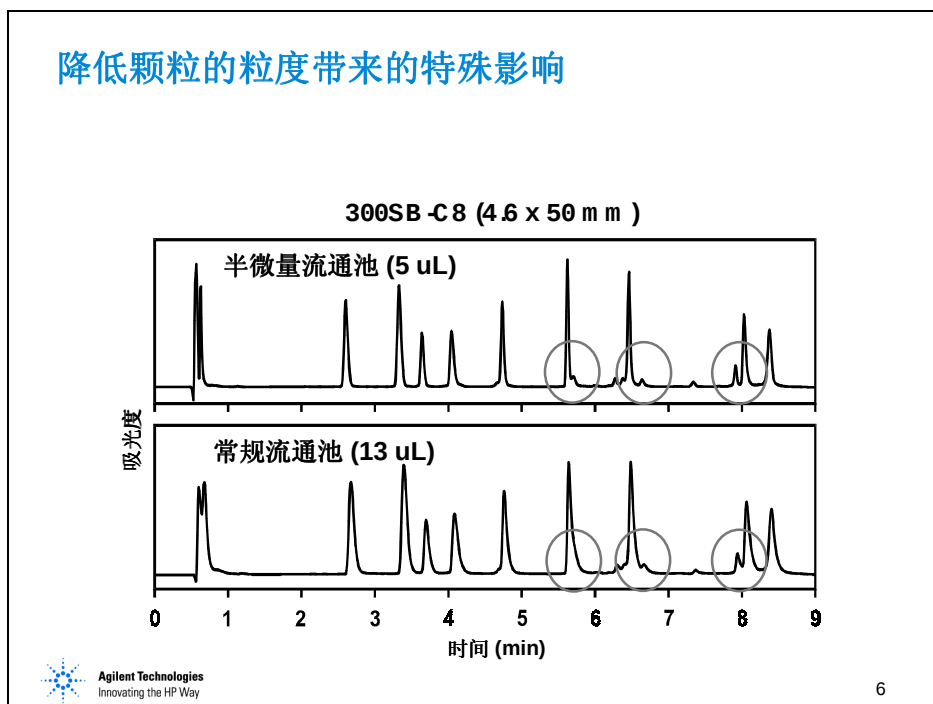


上图概要的说明使用相同的方法，降低填料颗粒度和柱长，缩短分析时间和节约溶剂的情况。



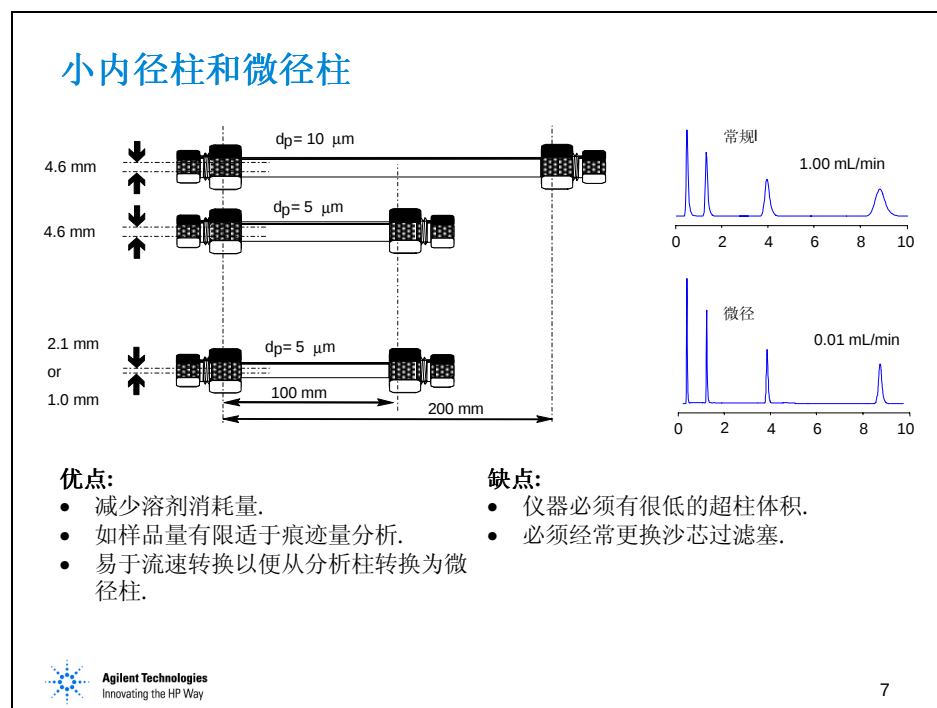
由于使用较小粒度的填料使柱效明显提高，有可能提高分析的流速而得到同样的塔板数，因而保持应有的分离度。这种高速、快速色谱柱，急速色谱柱，或快速分离色谱柱可以在你的实验室大为提高分析产率。要注意的是把流速从 2 mL/min 提高到 4 mL/min，分离度不会明显降低。在下面一个图看出，提高流速就会增加色谱柱的柱压，柱压增加、磨擦力也增加，因而会在柱内产生大量热，从而使固定相比较快地降解。

降低颗粒的粒度带来的特殊影响



使用小颗粒填料短色谱柱的一个优点是可以降低分散性（减小峰的加宽），峰容积决定于色谱柱和仪器，色谱柱由于扩散过程和传质阻力而造成峰的分散，进样体积本身也对峰扩散有影响，仪器造成的峰扩散是样品从进样器到检测器出口各部分的体积所引起，要肯定的是液相色谱仪的管道短而细 0.12mm i.d.，具有合适的接头，和低扩散的流通池。上述的样品你可以看到，从色谱柱得到了分离度又由于使用了常规的流通池而丢失掉，有幸的是半微量和微量流通池很普遍，1100 系列 HPLC 的半微量流通池就是一个选择。

色谱柱直径



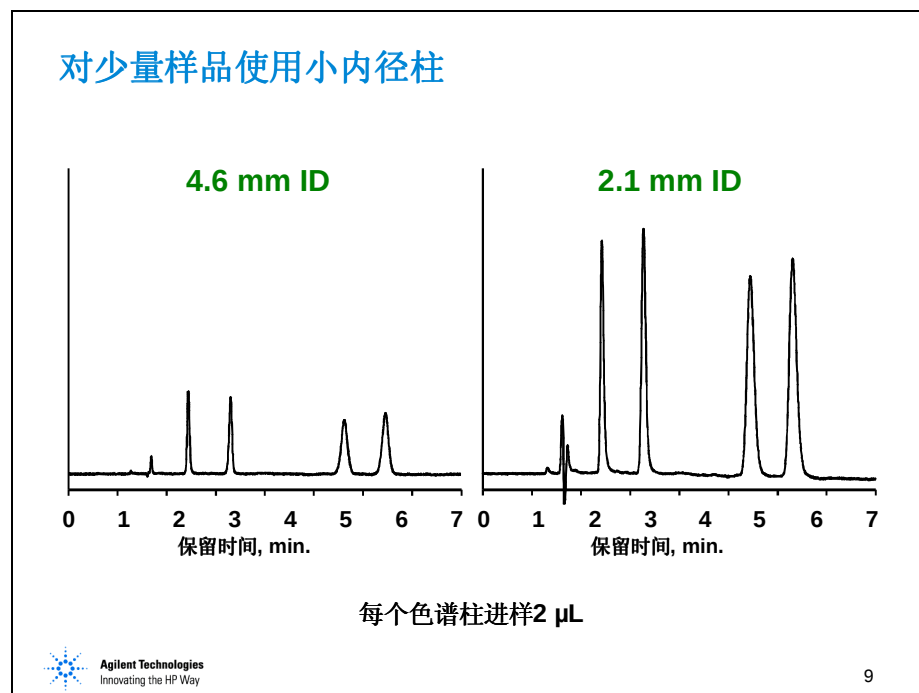
常规 HPLC 色谱柱的直径是 4.6 mm，填料颗粒为 5 μm ，在色谱柱内的峰扩散可由减小 HPLC 色谱柱的内径而降低，例如，把内径由 4 mm 降低到 2 mm，结果峰容积会减小 4 倍，如保持线流速不变，所有其他参数如柱效、反压、和分析时间都会受到柱内径减小的影响。细内径柱 (2.1 mm i.d.) 或微径柱 (1.0 mm i.d. 或更细一些) 要比标准色谱柱具有降低检测灵敏度和减少溶剂用量的特点，此外，使用这类色谱柱和较低的流速适合于 HPLC 和其他仪器的联用技术。细内径柱用于有限的样品有特别的优点，一个 4.6 mm i.d. 的色谱柱上的方法，可以使用简单的办法把流速转换为小内径柱上的方法，小内径柱的缺点是要求有小死体积的仪器和柱内沙芯过滤塞容易堵塞。

典型的流速

Column i.d. (5 μ m Particles)	Flow mL/min
4.6	1 – 2
3.0	0.4 - 0.8
2.1	0.2 – 0.4
1.0	0.05 – 0.09

$$\text{Flow Rate}_{\text{new column}} = \left(\frac{\text{i.d.}_{\text{new column}}}{\text{i.d.}_{\text{original column}}} \right)^2 \text{Flow Rate}_{\text{original column}}$$

装填 5 μ m 填料的 4.6 mm i.d. 色谱柱在流速为 1.5 mL/min 时可得到最高的塔板数，具有不同内径色谱柱要保持具有同样的流速，以横截面比（或柱径的平方）来调节流速，如上图所示。这样，对 2.1 mm 内径的色谱柱装填 5 μ m 填料，其相应于 1.5 mL/min 的流速为 312 μ L/min，这相当于 4.6 mm i.d. 色谱柱流速的 20%，全部分析时间为 5 min。2.1 mm i.d. 色谱柱只需要 1.5 mL，而 4.6 mm i.d. 色谱柱需要 7.5 mL。这样一来就可少使用溶剂和处理溶剂。

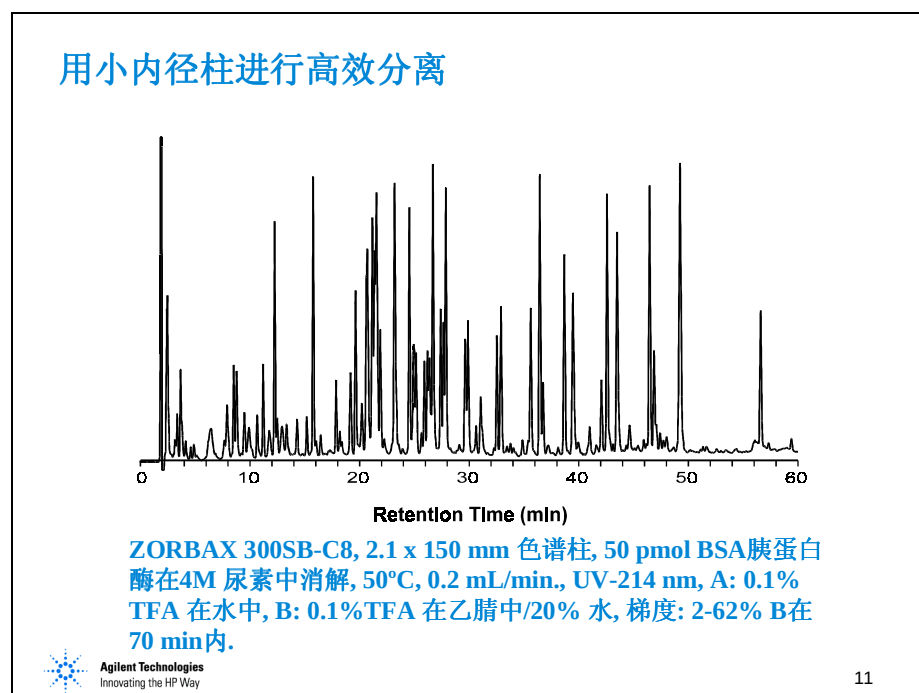


小内径色谱柱减少组分的峰体积就意味着流出的组分更为集中（峰高增加），这一应用只有当样品体积不变和超柱效应引起的峰扩散可以忽略时才正确。比尔定律说：检测器的吸光度信号与化合物在流动相中的浓度成比例关系，所以小内径色谱柱由于浓度增加，可以产生较强的信号，实际上浓度的增加与柱内径的平方成正比关系，同样柱长和相同填料粒度的 2.1 mm 内径色谱柱其信号强度是 4.6 mm 内径色谱柱的 4.8 倍。

保留值和 V_M 降低 峰容积就降低

柱尺寸	死体积 (mL)	峰容积 (μ L)		
		k=1	k=3	k=5
4.6 x 150 mm 1.0mL/min	1.50	114	229	343
3.0 x 150 mm 0.4mL/min	0.64	46	92	137
2.1 x 150 mm 0.2mL/min	0.28	23	46	69

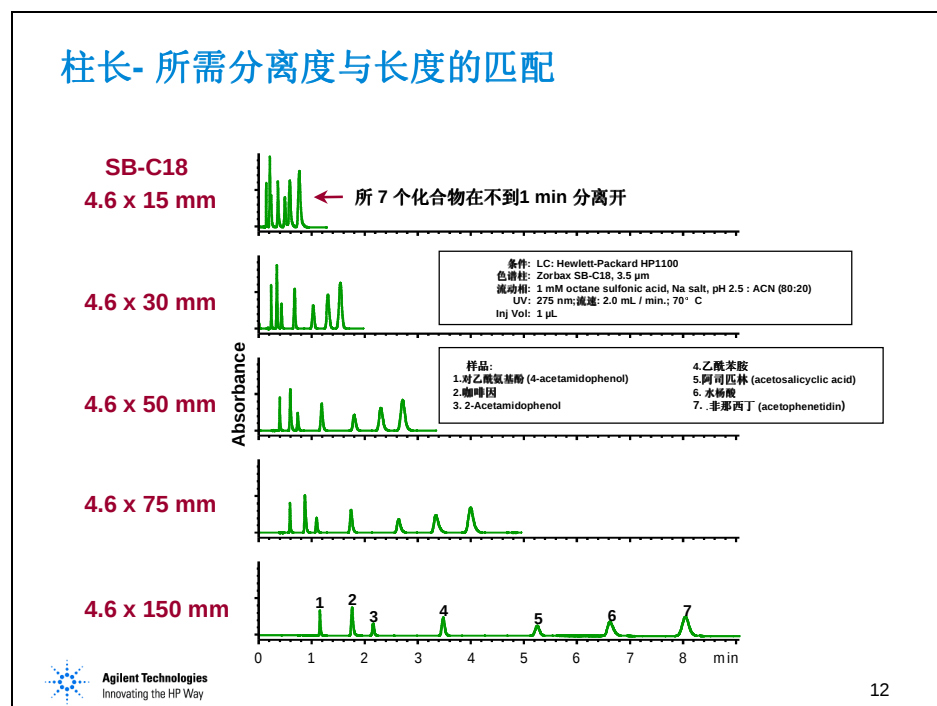
上面的数据说明从小内径色谱柱洗脱出来的色谱峰其容积很小、峰扩散也很小，因此被稀释的程度很小。



尽管小内径色谱柱减少了峰容积，但是不会影响分离度，所以使用小内径色谱柱可以得到令人满意的分离。纯蛋白质的制备常常是十分费时和费钱的，样品量可能很少，使用小内径色谱柱可以很小的检测限进行小样品量的分离，这是由于从色谱柱中洗脱出来的峰容积很小。上图的分离超过 100 个峰，内径色谱柱比 4.6 mm i.d. 色谱柱的检测量多 5 倍。用小内径色谱柱 50 皮摩尔的峰高相当于标准色谱柱上 250 皮摩尔的峰高。

尽管分析时间长一些，但流动相消耗量很少，所以 HPLC 设备能够在 一个溶剂瓶上在无人管理的情况下工作更长的时间。

色谱柱柱长



选择适当的柱长用以控制柱效和分离度，柱效随柱长增加而按比例地提高，色谱柱越短分析速度越快，所以选择你需要的色谱柱柱长，不必要使用更长的色谱柱。

色谱柱硬件和填料
色谱柱柱长



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：色谱柱硬件

实验室训练：色谱柱硬件

在这一实验室训练中，你将：

在这一实验室训练中，你将：

- 把标准色谱柱的方法转换为细内径和小颗粒填料色谱柱的方法。
- 测试细内径和小颗粒填料色谱柱，和标准色谱柱的结果进行比较。

材料

- 一支 SB-C18, 4.6 x 150 mm, 5 微米色谱柱, 部件号为 883975-902。
- 一支 SB-C18 4.6 x 150 mm, 3.5 微米色谱柱, 部件号为 863953-902。
- 一支 SB-C18 2.1 x 150 mm, 5 微米色谱柱, 部件号为 883700-922。
- 测试混合物部件号为 01080-68704, 按 1:3 容积比稀释。
- 通道 A 为 HPLC 级别的水, 通道 B 为 HPLC 级别的乙腈。
- 一台通电的带所有部件的 1100 液相色谱仪。
- 一台 HPLC 化学工作站, 配备光度检测器部件。

注 意：在试验过程中可以和其他小组交换色谱柱。

标准色谱柱

170) 安装 4.6 x 150 mm，C-18 色谱柱装有 5 微米的填料。

171) 在样品瓶位置 1 上插入测试混合物。

172) 进入 **Method and Run Control** 屏幕。

173) 调用默认方法 **def_lc.m** 作为建立方法的起始点 (Method, Load Method)。从 **Method** 菜单上选择 **Edit Entire Method...** 或选择全部的 Edit 方法工具。



174) 只选择 Instrument/Acquisition 和 Run Time Checklist 选项进行编辑，在此面板上点击 **OK**。

175) 填写下面的溶剂输送系统参数，然后继续填写进样参数：

Setup Pump : Instrument 1

Control

Flow: 2.000 ml/min

StopTime: 5.50 min

PostTime: Off min

Solvent A

30.0 %

Solvent B

70.0 %

Pressure Limits

Max: 400 bar

Min: 15 bar

Timetable

Time	%B	Flow	Max. Press.
------	----	------	-------------

Buttons: Insert, Append, Cut, Copy, Paste

Display: Timetable

Buttons: OK, Cancel, Help

Setup Injector : Instrument 1

Injection

☒ Standard Injection Injection Volume: 50 µl
☐ Injection with Needle Wash Wash Vial: 0
☐ Use Injector Program Total Lines: 0 [Edit ...](#)

[OK](#) [Cancel](#) [Help](#) [More >>](#)

176) 像下图那样填写 DAD 信号和柱箱参数，点击 **OK**。

DAD Signals : Instrument 1

Signals

	Store	Sample,Bw	Reference,Bw	
A:	☒	230 80	450 100	nm
B:	☐	254 16	360 100	nm
C:	☐	210 8	360 100	nm
D:	☐	230 16	360 100	nm
E:	☐	280 16	360 100	nm

Spectrum

Store: None
 Range: 190 to 400 nm
 Step: 2.0 nm
 Threshold: 1.000 mAU

Time

Stoptime: as Pump 5.50 min
 Posttime: Off min

Required Lamps

☒ UV ☐ Vis

Peakwidth (Responsetime)

> 0.1 min [2 s]

Autobalance

☒ Prerun
☐ Postrun

Slit

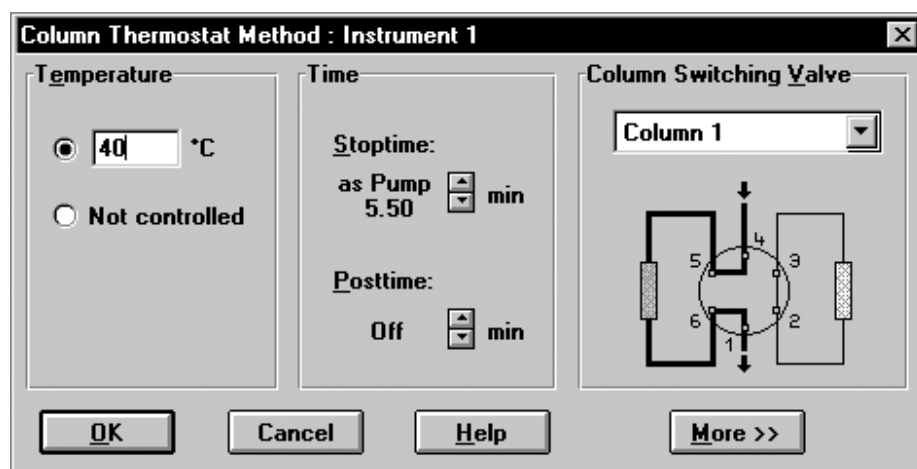
4 nm

Margin for negative Absorbance

100 mAU

[Timetable ...](#) Total Lines: 0
[OK](#) [Cancel](#) [Help](#)

实验室训练：色谱柱硬件
标准色谱柱



- 177) 在 Run Time Checklist 上只选择 **Data Acquisition**。
- 178) 从 **Method** 菜单上选择 **Save Method As...** 给方法命名为 **standard.m**。
- 179) 从 **Instrument** 菜单上选择 **System On**，让色谱柱平衡几分钟。
- 180) 进入 **View** 菜单并选择 **Online Signals, Signal Window 1**。一旦在 Online Signals 窗口有显示，就选择 **Change**。
- 181) 在 x-轴的范围选择 10 min，选择绘制选择绘制 0 线框。
- 182) 点击一个可使用的信号，然后点击 **Add** 进入这个被选择的信号框。
- 183) 设定 y-轴的范围到 100 mAU 并把补偿设为 10%，在此窗口点击 **OK**。
- 184) 一旦达到一个稳定的基线和压力，降到 **RunControl** 菜单并选择 **Sample Info....**。
- 185) 填写操作者姓名 (Operator Name)，文件名 Filename (standard.d)，子目录（你的名字），样品瓶号 (1)，样品名 (standard column) 和任何注释。
- 186) 用 **Start** 工具或从 **RunControl** 菜单上按 **Run Method** 开始方法的运行。
- 187) 当运行完成后把系统关闭 (**System Off**) 这一控制键在 **Instrument** 菜单上。
- 188) 现在你得到了标准色谱柱上测得的数据，你可以把这些数据与在细内径柱和小颗粒填料柱上得到的数据进行比较。

计算流速

189) 首先，计算从标准分析柱转换为细内径柱所需要的流速，使用下面的公式，标准分析柱的直径为 4.6 mm，填料颗粒为 5 微米，细内径柱直径为 2.1 mm，填料颗粒为 5 微米，小颗粒填料柱为粒径为 3.5 微米。

$$\text{标准柱 X } \frac{(\text{小内径柱})^2}{(\text{标准柱内径})^2} = \text{小内径柱流量}$$

小内径柱流速=_____

190) 现在，计算可用于小内径柱的流速。

$$\text{标准柱流速 X } \frac{\text{标准柱颗粒直径}}{\text{小颗粒填料直径}} = \text{流速}$$

小颗粒填料流速=_____

色谱柱比较

191) 找到并安装细内径柱或小颗粒填料柱。

192) 利用计算出来的正确流速，其它参数不变，设定采样参数，每次运行使用新的据文件名，进行分析。

数据比较

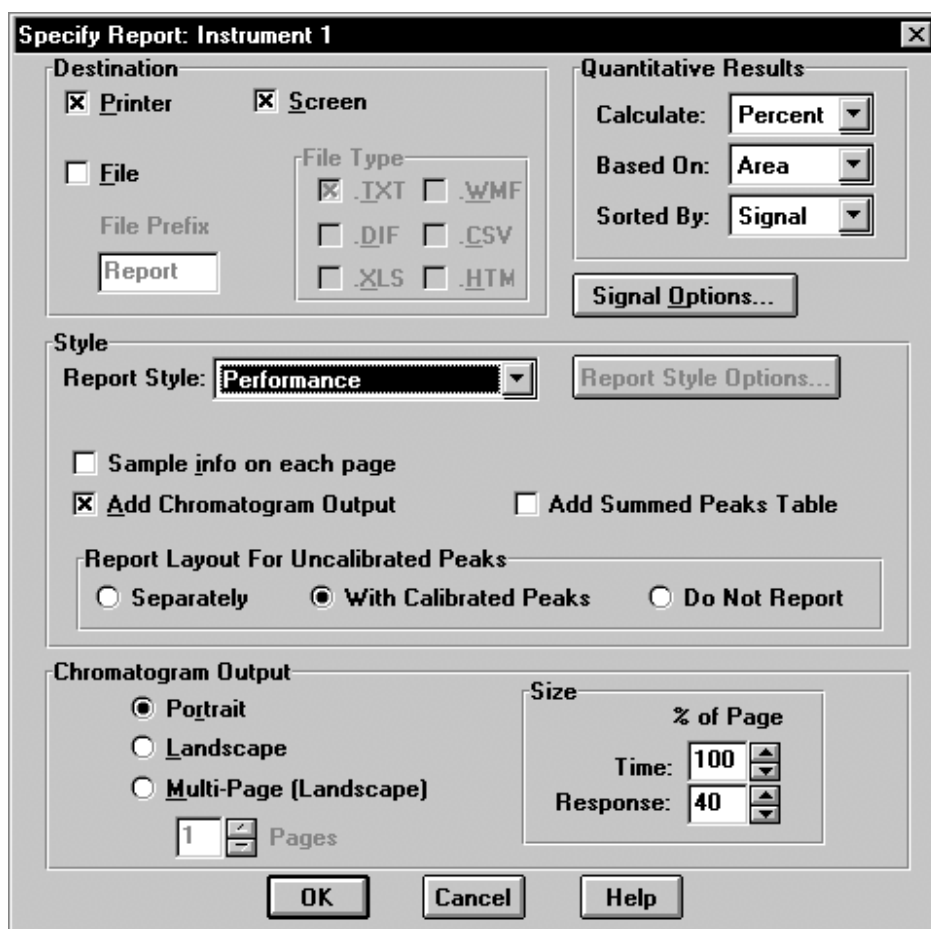
193) 进入 **Data Analysis** 屏幕。

194) 从 **File** 菜单上选择 **Load Signal**。

195) 找到 **Standard.d** 的文件，点击 **OK**。

196) 进入 **Report** 菜单上选择 **Specify Report**。

197) 选择下面的参数：



The image shows a software dialog box titled "Specify Report: Instrument 1". It contains several sections for configuring report output:

- Destination:** Includes checkboxes for ☒ **Printer** and ☒ **Screen**. There is also an unchecked ☐ **File** option with a **File Prefix** field containing the text "Report". A **File Type** section lists options: ☒ **.TXT**, ☐ **.WMF**, ☐ **.DIF**, ☐ **.CSV**, ☐ **.XLS**, and ☐ **.HTM**.
- Quantitative Results:** Includes dropdown menus for **Calculate:** (set to "Percent"), **Based On:** (set to "Area"), and **Sorted By:** (set to "Signal"). A **Signal Options...** button is also present.
- Style:** Includes a **Report Style:** dropdown menu set to "Performance" and a **Report Style Options...** button.
- Report Layout For Uncalibrated Peaks:** Includes checkboxes for ☐ **Sample info on each page**, ☒ **Add Chromatogram Output**, and ☐ **Add Summed Peaks Table**.
- Report Layout For Uncalibrated Peaks:** Includes radio buttons for ☐ **Separately**, ☒ **With Calibrated Peaks**, and ☐ **Do Not Report**.
- Chromatogram Output:** Includes radio buttons for ☒ **Portrait**, ☐ **Landscape**, and ☐ **Multi-Page (Landscape)**. There is also a **Pages** field with the value "1".
- Size:** A sub-section with a **% of Page** label and two spinners: **Time:** set to 100 and **Response:** set to 40.

At the bottom of the dialog are three buttons: **OK**, **Cancel**, and **Help**.

- 198) 从 **Report** 菜单选择 **Print Report**。
- 199) 在实验室训练末尾的表上记录峰高和峰面积。
- 200) 使用上面的说明打印其他数据文件的报告，填写峰高和峰面积。
- 201) 进入 **File** 菜单并选择 **Overlay Signal**。选择一个未曾调用的数据文件，用最后的文件重复操作。
- 202) 选择 **File**、**Print**、**Selected Window**。一个重叠的色谱图就会送入打印机中。

四个主要色谱峰的数据

峰高

	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准， 5µm, 4.6 i.d. 150mm 长				
细内径， 2.1 mm i.d., 150 mm 长， 5 µm				
小颗粒填料 柱，4.6 mm i.d. 3.5µm, 150 mm 长				

峰面积

色谱柱	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准				
细内径				
小颗粒 填料柱				

塔板数

色谱柱	峰 4
标准	
细内径	
小颗粒填料柱	

四个色谱峰的保留时间

色谱柱	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准				
细内径				
小颗粒 填料柱				

最后一个峰的分离度

色谱柱	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准				
细内径				
小颗粒 填料柱				

问题

从你的数据能得出何种一般性的结论？



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：色谱柱硬件 (选择模拟实验)

实验室训练：色谱柱硬件
(选择模拟实验)

这是一个利用以前采集数据文件的模拟实验。

这是一个利用以前采集数据文件的模拟实验。

在此实验室你将：

- 把标准色谱柱的方法转换为细内径和小颗粒填料色谱柱的方法。
- 测试细内径和小颗粒填料色谱柱，和标准色谱柱的结果进行比较。

材料

数据文件: *5micron.d*, *particle.d*, *narrowb.d*, 和 *short.d*。

使用下列方法收集数据文件:

- 对 5 微米, 4.6 mm i.d. x 150 mm 色谱柱, 流速 = 2.00 ml/min
- 停止时间 = 5.50 min
- 溶剂= 30% 水/ 70% 乙腈
- 标准进样 5 μ L
- DAD 230 nm, 80 nm 参比 450 nm, 100 nm
- 柱温= 40°C

计算流速

203) 首先，计算从标准分析柱转换为细内径柱所需要的流速，使用下面的公式，标准分析柱的直径为 4.6 mm，填料颗粒为 5 微米，流速为 2.00 mL/min。细内径柱直径为 2.1 mm，填料颗粒为 5 微米，小颗粒填料柱为粒径为 3.5 微米：

$$\text{标准柱 X } \frac{(\text{小内径柱})^2}{(\text{标准柱内径})^2} = \text{小内径柱流量}$$

小内径柱流速=_____

204) 现在，计算可用于小颗粒填料柱的流速：

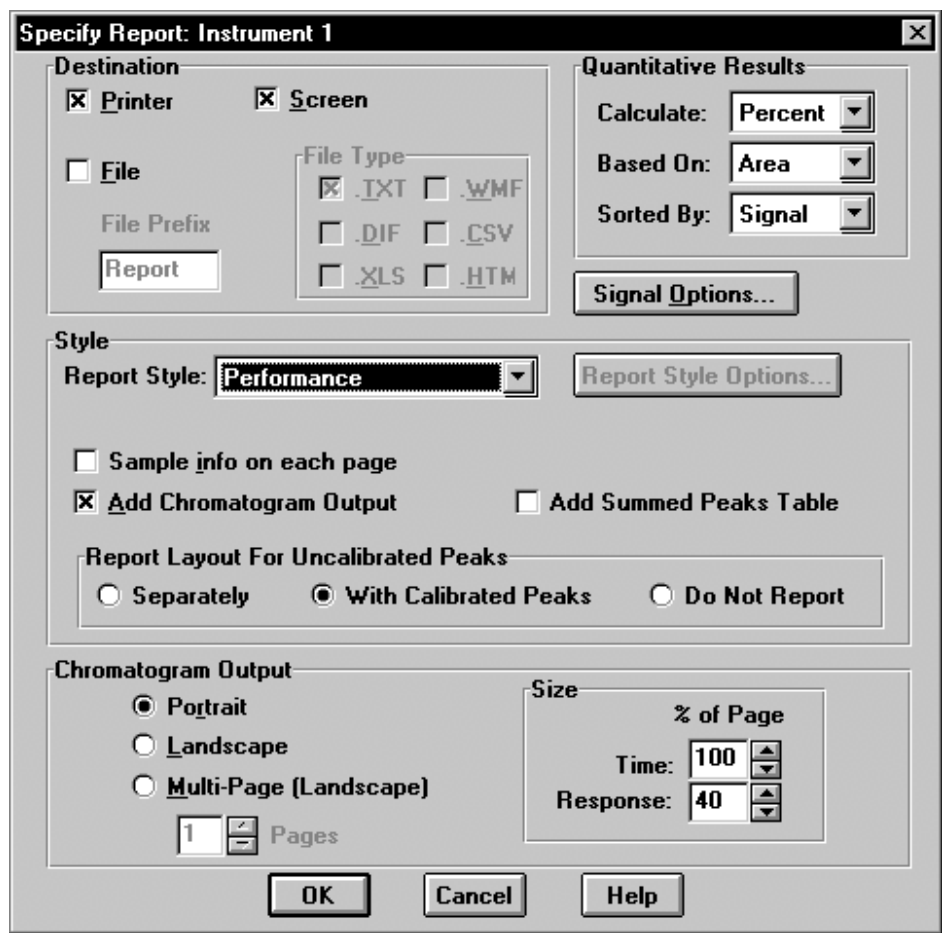
$$\text{标准柱流速 X } \frac{\text{标准柱颗粒直径}}{\text{小颗粒填料直径}} = \text{流速}$$

小颗粒填料流速=_____

色谱柱比较

数据比较

- 205) 进入 **Data Analysis** 屏幕。
- 206) 从 **File** 菜单上选择 **Load Signal**。
- 207) 找到 **Standard.d** 的文件，点击 **OK**。这是为 5 μ m 填料 4.6 mm i.d. 150 mm 长标准色谱柱的数据文件。
- 208) 进入 **Report** 菜单上选择 **Specify Report**。
- 209) 选择下面的参数：



The image shows a software dialog box titled "Specify Report: Instrument 1". It contains several sections for configuring report output:

- Destination:** Checkboxes for ☒ **Printer** and ☒ **Screen**. There is also an unchecked ☐ **File** option with a **File Prefix** text box containing "Report".
- File Type:** A group box containing checkboxes for ☒ **.TXT**, ☐ **.WMF**, ☐ **.DIF**, ☐ **.CSV**, ☐ **.XLS**, and ☐ **.HTM**.
- Quantitative Results:** Three dropdown menus: **Calculate:** set to "Percent", **Based On:** set to "Area", and **Sorted By:** set to "Signal". A **Signal Options...** button is below.
- Style:** A **Report Style:** dropdown menu set to "Performance", with a **Report Style Options...** button.
- Options:** ☐ **Sample info on each page**, ☒ **Add Chromatogram Output**, and ☐ **Add Summed Peaks Table**.
- Report Layout For Uncalibrated Peaks:** Radio buttons for ☐ **Separately**, ☒ **With Calibrated Peaks**, and ☐ **Do Not Report**.
- Chromatogram Output:** Radio buttons for ☒ **Portrait**, ☐ **Landscape**, and ☐ **Multi-Page (Landscape)**. Below is a "1" in a box followed by "Pages".
- Size:** A sub-section with "Time:" set to "100" and "Response:" set to "40", both with up/down arrow controls, under the heading "% of Page".

At the bottom are **OK**, **Cancel**, and **Help** buttons.

- 210) 从 **Report** 菜单选择 **Print Report**。
- 211) 在实验室训练末尾的表上记录所需要的数据。

实验室训练：色谱柱硬件

(选择模拟实验)

色谱柱比较

212) 使用上面的说明打印其他数据文件的报告，填写所需要的数据。

- Smallb.d (2.1 mm i.d. 色谱柱, 5 μm 填料)
- Particle.d (3.5 μm 填料, 4.6 mm i.d. 和 150 长)
- Short.d (3.5 μm 填料, 4.6 mm i.d. 和 75 mm 长)

213) 进入 **File** 菜单并选择 **Overlay Signal** 覆盖所有的数据文件。

214) 选择 **File, Print, Selected Window** 一个重叠的色谱图就会送入打印机中。

四个主要色谱峰的数据

峰高

	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准, 5µm, 4.6 i.d. 150 mm 长				
细内径, 2.1 mm i.d., 150 mm 长, 5 µm n				
4.6 mm i.d., 3.5µm, 150 mm 长				
小颗粒填料 短柱, 75 mm 长				

峰面积

色谱柱	峰 1	峰 k 2	峰 3	峰 4
标准				
细内径				
小颗粒柱				
短柱				

实验室训练：色谱柱硬件
(选择模拟实验)
四个主要色谱峰的数据
塔半数

色谱柱	峰 4
标准	
细内径	
小颗粒柱	
短柱	

四个色谱峰的保留时间

色谱柱	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准				
细内径				
小颗粒柱				
短柱				

最后一个峰的分离度

色谱柱	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
标准				
细内径				
小颗粒柱				
短柱				

问题

从你的数据能得出何种一般性的结论？

实验室训练：色谱柱硬件
(选择模拟实验)
问题



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

反相色谱



在这一节，你将学习：

在这一节，你将学习：

- 反相色谱的机理.
- 反相HPLC的用途
- 反相色谱柱的保留性能.
- 如何选择反相HPLC的流动相.
- 如何选择反相HPLC色谱柱

反相 HPLC 机理

反相色谱的定义和分离机理

固定相的极性低于流动相。

分配机理

- **固定相**
 - 十八烷基硅烷基
 - 辛烷基硅烷基
 - 氰基
 - 氨基
 - C4
- **流动相**
 - 水
 - 有机溶剂
 - 缓冲剂
 - 改性剂

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

3

HPLC 的反相模式的特点是流动相的极性比固定相的极性强，这正和正相色谱相反（正相色谱是第一个 LC），正相色谱固定相的极性强于流动相，所以就造出反相色谱一词来。

在反相 HPLC 中，固定相是典型的疏水性键合相，如十八烷基硅基 C-18，其他常用的反相色谱固定相有辛烷基硅基 (C-8)，丁基 (C-4)，苯基，氰基和氨基。通常是把非极性基团键合到硅胶上，聚合物固定相也用于苛刻的 pH 条件下的反相色谱。

流动相常含有水和有机改性剂用以分离中性化合物。当样品中含有弱酸、弱碱、强酸、强碱时就需要缓冲溶液和其他添加剂，以便改善其保留性能和峰形，虽然水是常用的流动相组分使其极性强于固定相，但是非极性流动相也用在完全不溶于水的样品如甘油三酸酯的分析中。

经典的反相色谱分离机理是分配作用，样品分子在流动相和固定相之间进行分配，每分配一次就是一个理论塔板，如果所研究的分子在水/有机流动相中不溶解，那么它就在固定相中停留较多的时间，由于固定相表面是不均一的，所以这一机理不完全，显然和残留硅醇基的特殊作用是存在的。

反相 HPLC 的应用

反相HPLC的应用

反相色谱是下列问题的首选方法:

- 分子量低于2000的中性极性和非极性化合物.
- 同系物和苯系物.
- 弱酸和弱碱.
- 强酸和强碱 (离子对HPLC).
- 肽和蛋白质.

难以分离:

- 胺类
- 水溶性化合物



4

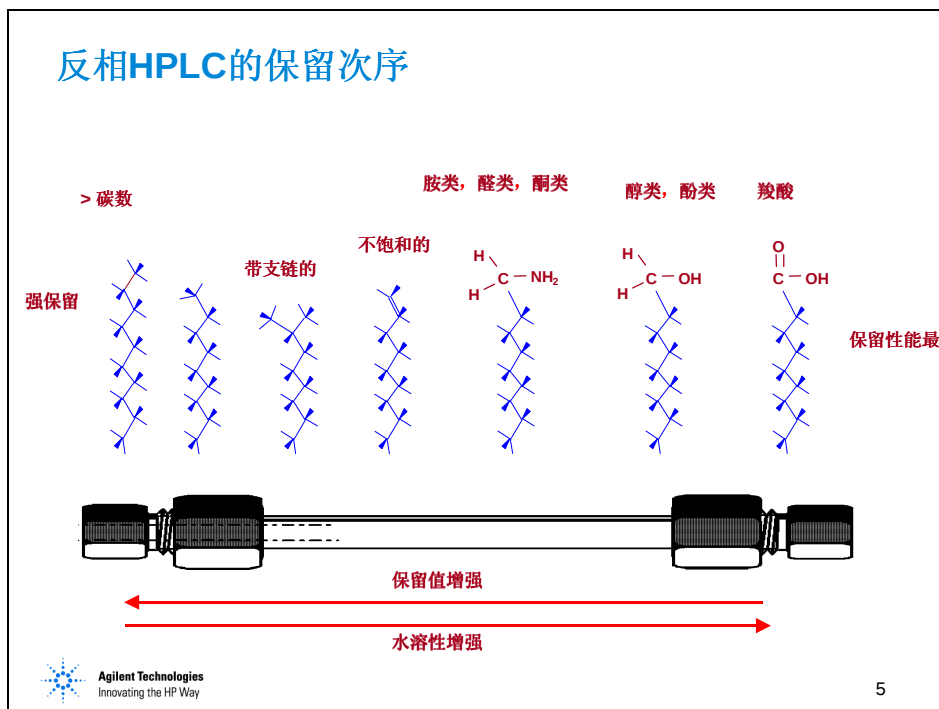
反相 HPLC 是用通用固定相分离小分子最常使用的液相色谱方法。除去个别例外，C-18 是开发分析方法时手选的色谱柱。反相色谱可以成功地分离极性和非极性、分子量小于 2000 的中性分子。甚至同系物和苯同系物刻有达到基线分离，同系物之间只差一个碳其保留值就不同。

反相 HPLC 可以扩展到分离弱酸和弱碱，这要在流动相中添加改性剂和缓冲剂，以便控制样品分子的离解或抑制硅醇基。强酸和强碱利用反相色谱的同系方法，离子对色谱进行分析，在离子对色谱中要加入添加剂和样品生成中性化合物进行分离。

反相 HPLC 使用短链烷基固定相分离肽和蛋白质是一个好的选择。

在分离胺时要谨慎从事，但是如果加入添加剂、控制 pH 或使用特殊处理的色谱柱很容易进行分析的。非水反相 HPLC 可以分离特别疏水的样品。

保留次序



样品分子的结构会为你提供一个洗脱次序的线索，洗脱次序受分子在水中溶解度和含碳含量的控制，观察到的控制样品洗脱次序有：

215) 在水中溶解度越小保留值越大。

216) 分子中碳数多保留值就增加。

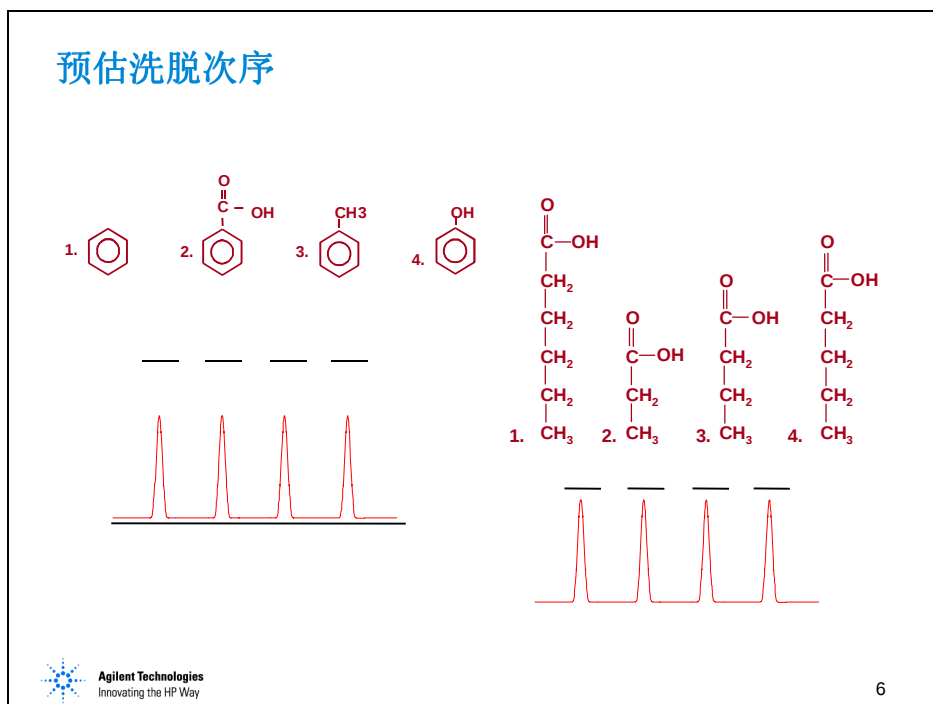
217) 支链化合物的保留值低于其正构异构体。

218) 不饱和化合物保留值降低。

219) 一般的流出次序为：

脂肪族 > 诱导偶极 > 永久偶极 > 弱碱 > 弱酸 > 强酸。

离子型化合物一般以色谱柱死体积状态流出。



估计样品分子的流出次序。

流动相

反相HPLC 所用溶剂

- 水/缓冲剂
- 水
- 甲醇
- 乙腈
- 异丙醇
- 四氢呋喃

洗脱强度



反相色谱的流动相常含有水和缓冲溶液和能与水混溶的有机溶剂，水或水/缓冲溶液是最弱的流动相，在分离中性化合物时不需要添加缓冲溶液，有机溶剂强度比水大，在流动相中增加有机溶剂的量将会使样品更快地洗脱出色谱柱，流动相中增加水的含量会增加样品的保留时间，改变流动相中的有机组分会改变其选择性，因而也改变样品的洗脱次序。

反相HPLC 的最佳有机溶剂？

- 与水混溶
- 低粘度
- 低UV-检测
- 溶解性好
- 化学惰性

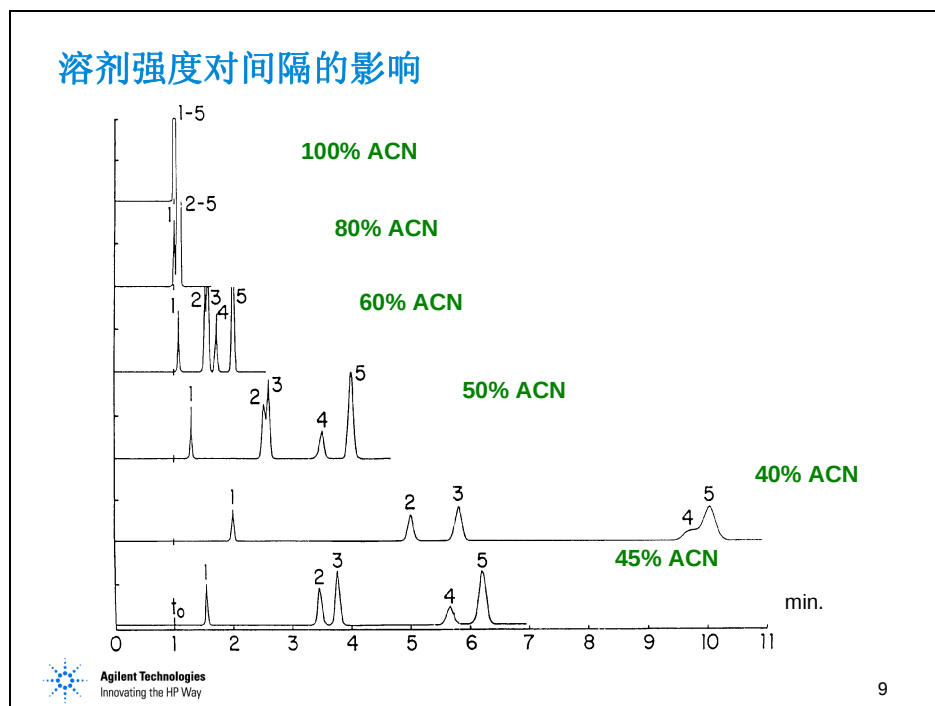
... 乙腈是最好的选择



8

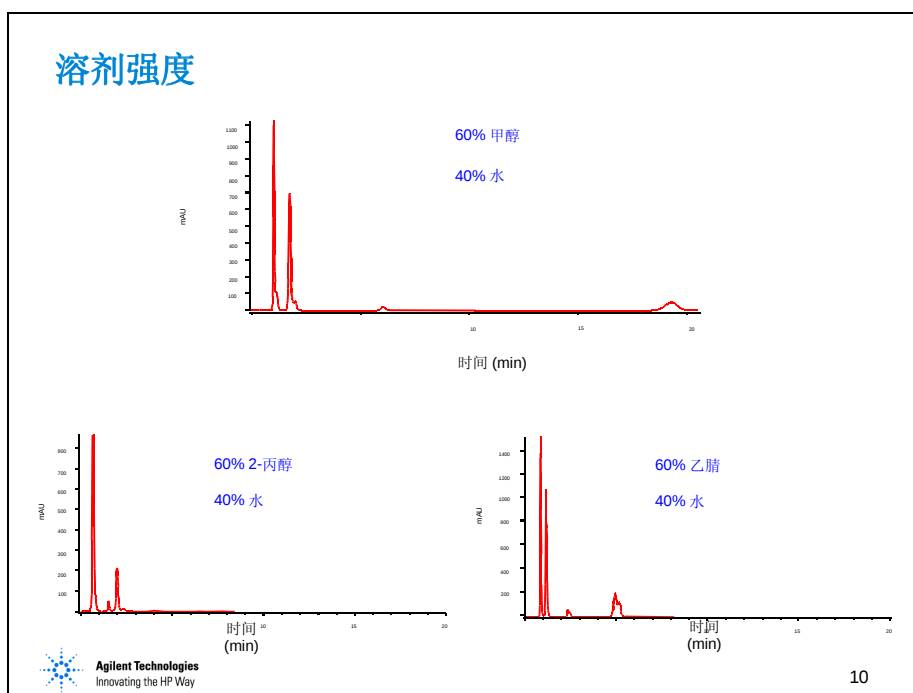
对你的反相色谱要如何选择流动相？首先在选择有机溶剂时要能和水混溶。下一页列出的有机溶剂都是可溶于水的。第二，低粘度的流动相有利于减少扩散，这一典型的规律异丙醇是例外，它的粘度很高。溶剂要能够长时间稳定，这一严格的规律四氢呋喃是例外，它暴露在空气中很快地降解，其他两个常用流动相溶剂是甲醇和乙腈。这两个溶剂常具有十分优良的保留特性。但是，乙腈的粘度低并且 UV- 吸收截止波长也低，甲醇的 UV- 吸收截止波长是 210 nm，而乙腈的截止波长是 190 nm。基于这一原因，在开发一个反相色谱时，多从乙腈作流动相开始。

反相色谱
流动相



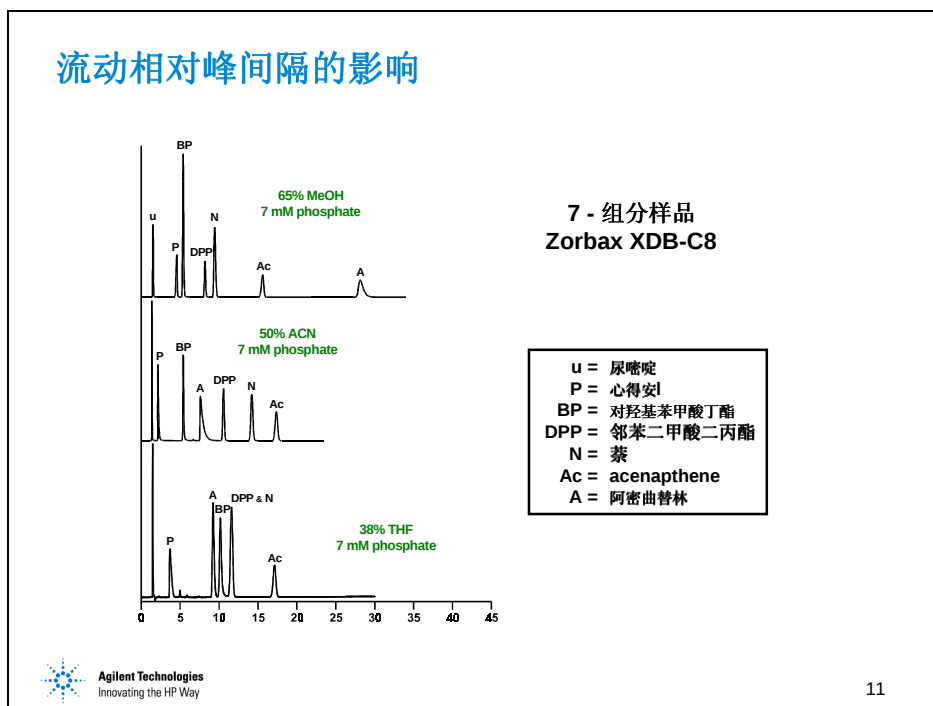
为了开发一个分析中性样品组分的反相色谱方法从进样 100% 有机溶剂开始，从 100% 强有机溶剂开始，确定保留性强的组分都能洗脱出色谱柱。以 20% 到 5% 逐渐降低有机溶剂一直达到所要分离的程度，以较小幅度调节流动相组分。要记住流动相组分是达到分离最有力的手段。

代替逐步变化流动相组成的方法是用梯度洗脱探索性实验开发分析方法。



在这一幻灯片上，你可以看到在流动相中同样的有机物浓度，而组分不同时
会改变其保留性能，甲醇是最弱的有机溶剂，其后是乙腈，和异丙醇。

反相色谱
流动相



常常，改变流动相的有机组分会改变其选择性从而提高分离度，如果你对分离还不够满意，你可以试验乙腈和水，甲醇和水，或四氢呋喃和水。另外一个途径是混合乙腈和四氢呋喃，四氢呋喃可以促进直链和环状化合物的分离，它也可以促进带甲氧基化合物的分离，乙腈可以增进酯类化合物的分离。

选择色谱柱

反相色谱柱的选择

当选择反相色谱柱时问自己这些问题...

- 键合相类填料
- 球形或无定形颗粒
- 色谱柱硬件
- 柱直径
- 颗粒度
- 柱长
- 孔径和孔容
- 表面积
- 键合相密度
- 单体或聚合填料
- 封端或其他处理



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

12

你决定使用反相色谱进行你的分离，那么你找到一本可用的产品目录来选择反相色谱柱，那末你可能会不知道如何是好。

首先和最为重要的选择是键合型填料，C-18 是最普通的选择，因为它的稳定性好、保留值高，有一个通则是碳链越短保留值越低，碳链很短的填料用于蛋白质和生物大分子的分离。当样品有不同的极性官能团时应使用氰基柱。

很多 HPLC 的填料是使用球形基质的，因为这种基质稳定性好、柱效高。无定形颗粒会造成高的反压同时也不够稳定。

在考虑色谱柱硬件时要顾及这一分析是否要长时间工作，是否需要有多数色谱柱更换，费用要考虑吗？如果要考虑费用，就要使用卡套色谱柱，在长时间分析时卡套色谱柱比较便宜。如果你需要得到最高的柱效以满足分离的需要，就要选择常规色谱柱硬件。

下面一个要问自己的问题是我的样品有限制么，如果是这样，就要选择小内径或微径色谱柱，还要肯定你所使用的仪器是否具有低扩散的性能。

选择色谱柱

在考虑颗粒直径时要选择 $3.5 - 5\ \mu\text{m}$ 的填料，这是一个在柱长和降低颗粒度有矛盾时的一种最佳折衷方案。要避免使用 $0.5\ \mu\text{m}$ 色谱柱沙芯过滤塞，要使用 $2\ \mu\text{m}$ 沙芯过滤塞。如果你需要快速分离并不需要高柱效，你可以试验使用装填 $3\ \mu\text{m}$ 填料很短的色谱柱。

许多进行开发的方法使用 15 到 25 cm 长的色谱柱，如果分析不需要这样长的色谱柱，这样使用能完成任务所需的柱长，这样可以节约时间。

选择填料的孔径决定于样品的分子，填料的孔径必须比样品分子至少大三倍，这样说就意味着对小分子至少要使用 $70 - 120\ \text{\AA}$ 孔径的填料，对大的分子要选择 $300\ \text{\AA}$ 孔径的填料。孔容是样品容量和载体强度的标志。孔容越大样品的容量越高，但是它容易碎裂。

表面积越大你的色谱柱保留值会越高，碳含量是指每单位填料载体上碳原子所含的百分比，推测起来碳含量越高保留值越大。

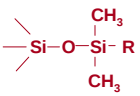
键合密度是一个重要的参数，它说明填料的疏水性如何，如果色谱柱的键合密度是 $3\ \mu\text{mole}/\text{m}^2$ 那么填料的大部分被覆盖，只有很少游离的硅醇基可以发生作用，但是，如果你希望有 特殊的作用力去改变其选择性，所以要选择低键合密度的色谱柱。

有关单体和聚合填料和封端问题将在下一页讨论。

选择键合相

反相色谱柱

硅胶



聚合物基



$\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$	C-18, 保留性最强, 疏水, 刚性柱的选择
R = $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	C-8, 刚性, 保留性比C18小
$(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	C-3, C-4, 肽, 稳定性差一些, 保留性差一些
CN or $(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	氰基, 刚性很强, 最常用的极性反相色谱填料
NH_2 or $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	对混合功能团的好固定相, 胺, 弱阴离子交换剂, 糖色谱柱
	选择性差别
聚苯乙烯-二乙烯基苯 pH 1 - 13, 稳定, 柱效低	



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

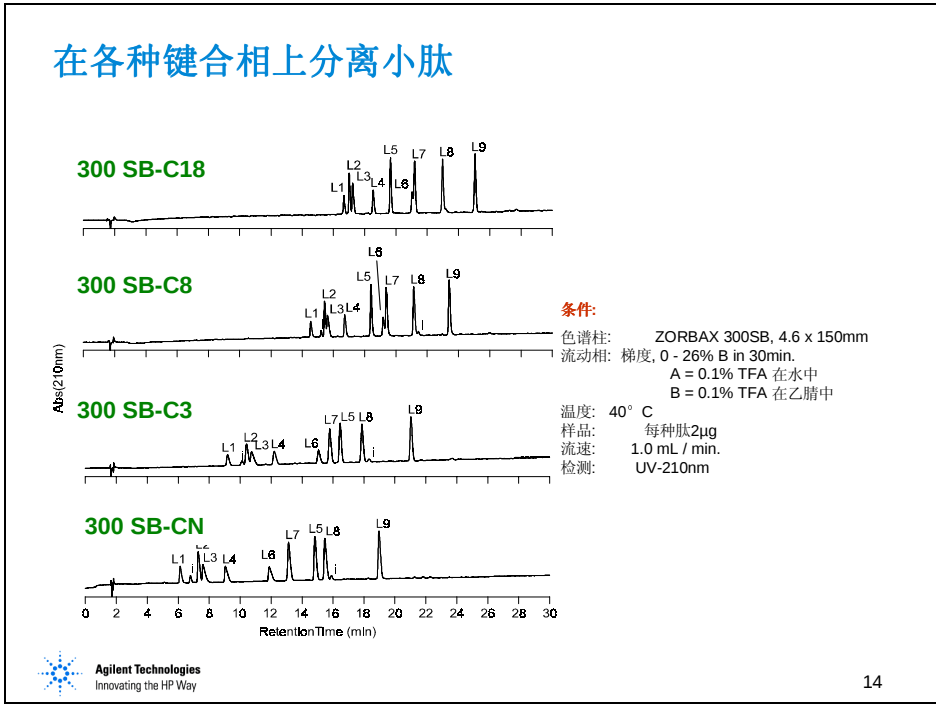
13

在反相色谱柱中键合相填料有明显的差别, 到目前为止, 最常用的反相色谱固定相是十八烷基键合硅胶, C-18, 它是一种耐用和保留性能强的固定相, C-8 类似于 C-18 只是保留值小一些, 偶尔出现 C-18 和 C-8 的保留次序有所不同, 但并非总是如此, 短链烃 C-3, C-4, 不如前者稳定, 但是常用于肽和蛋白质的分析。

苯基、氰基、和氨基柱与 C-18 相比, 彼此之间具有不同的选择性。氰基柱对不同极性基团的化合物很有用, 是很耐用的色谱柱。氨基柱不够稳定, 传统上它是分离碳水化合物或“糖”的色谱柱。苯基柱的极性强于 C-18 或 C-8, π -电子云提供了和芳香族化合物作用的条件。

以聚合物为基的色谱柱人们知道它在宽的 pH 范围内能保持稳定, 但是它的柱效不如以硅胶为基的色谱柱。

反相色谱
选择键合相



上面的色谱图证明不同的反相色谱柱在选择性和保留性能上有差别。

色谱柱参数

柱参数举例

Column Designation	Silica Support ^b				
	Surface Type	Silica Type ^b	Surface Area, m ² /g	Pore Diameter, Å	Porosity, cm ³ /mL
Hypersil BDS-C8	A	SolGel	170	130	0.65
Inertsil-C8	B	SilGel	320	150	NA ^c
Supelcosil ABZ+	A	SolGel	175	120	0.60
Symmetry-C8	B	SilGel	340	100	0.84
YMC-Basic	B	SilGel	325	120	1.0
Zorbax XDB-C8	B	SolGel	180	80	0.50

a 来字商品文献或厂家的数据

b 参见教科书上的硅胶规格

c NA = 没有数据



15

你会在色谱柱商品目录上发现一些典型参数，溶胶-凝胶 (Sol Gels) 是由硅溶胶凝聚而成的。类型 B 硅胶大家知道它具有结合的或键合的硅醇基，硅胶或类型 A 的硅胶大家知道它具有更多的残余硅醇基。

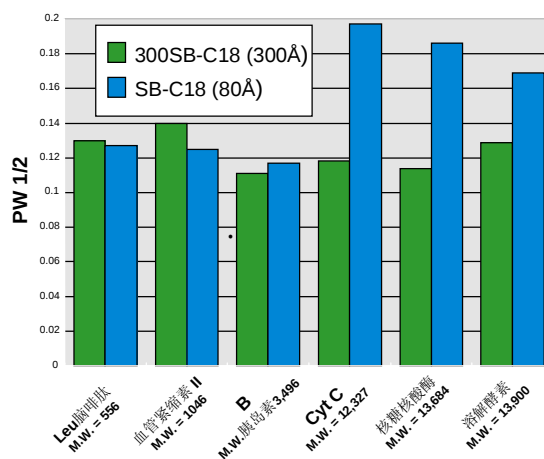
比表面是指颗粒外表面和内孔的表面积，换言之它是分子可以接触到颗粒表面的面积。对键合相你会发现在填料表面积大小不同时，其选择性也不同。你也会发现比表面积大的填料要用较长的平衡时间，有表面积的键合相有不需测定柱容量。

孔径的选择直接与样品分子大小有关，大的孔径可以使样品分子进入键合固定相，在孔中会产生最大的分离能力，对小的分子选择 150 Å 或更大一些的孔径，对分子量大于 2000 amu 的分子选择 300 Å 或更大一些的孔径的填料。

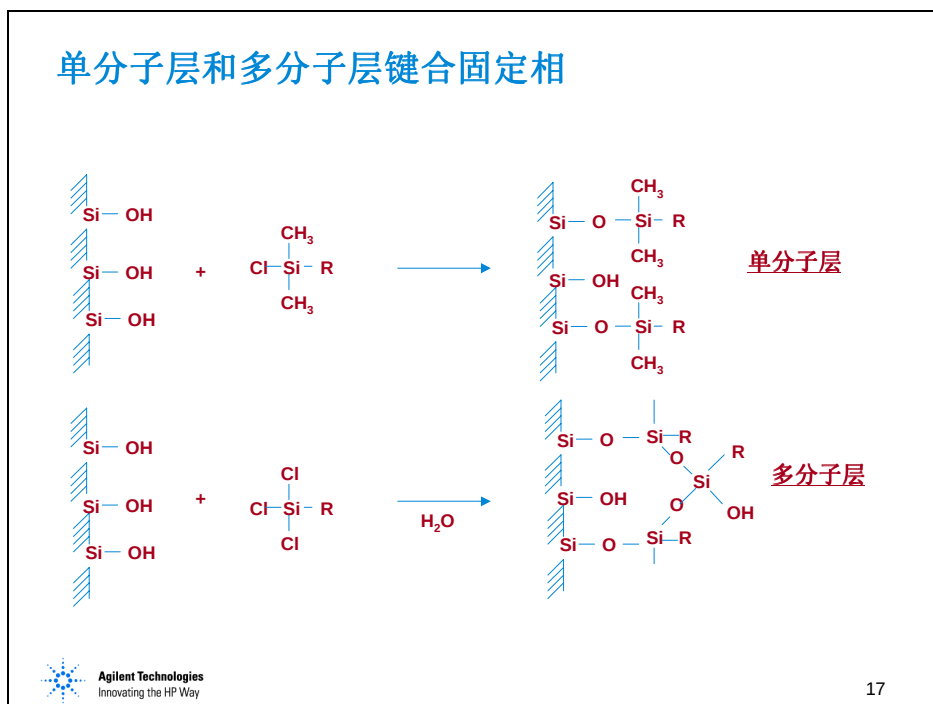
多孔性与孔径和孔的数目有关，多孔性越大固定相越不稳定，体积排阻色谱柱具有高的多孔性，因而它的压力极限也较低。

孔径和分子大小对峰宽的影响

分子量 > 4,000 选择大的孔径。



上面的数据说明对较大分子，填料孔径的选择很重要，当孔径接近于分子本身的尺寸时，分子的扩散就受到限制。

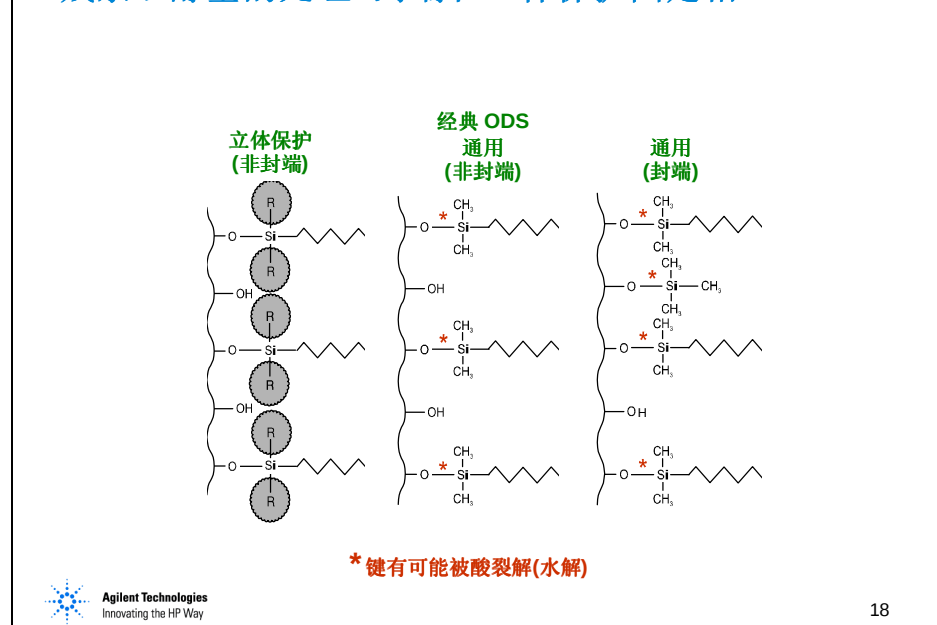


往硅胶表面键合固定相的方法有两种。单分子填料是在一个点上键合固定相，如上所示，用一氯硅烷形成单点键合的固定相，其结果形成熟知的刷型单分子层固定相，设想每个接枝在硅胶表面上的刷子毛垂直于它的表面。另外一种类型的固定相是聚合型填料，这类固定相是使用二-或三氯硅烷和硅胶进行反应，这样就形成了多分子层的表面。

单分子填料重复性好柱效高，多层分子填料在酸性条件下更为稳定，而柱效要差一些。你所选择的填料类型其选择性也有差别。

色谱柱键合

残余硅醇基的处理- 封端和立体保护固定相



18

一经把键合固定相装到色谱柱里，厂家还可以进行补充的键合步骤，如上所示使三种截然不同的色谱柱，虽然它们在开始时都是单分子填料。

右边是通常使用的常规填料，由于立体效应不可能使所有的硅醇基形成键合的功能团，在硅胶上残留的硅醇基可以和极性化合物作用，其保留时间要比非极性化合物长，碱性化合物更有特别的作用力，于是就形成拖尾。

在起初的键合反应之后再用短链烃与残留的硅醇基进行反应，这样一来制造的色谱柱叫做封端色谱柱，这一处理减少了极性和碱性化合物的拖尾。如果你要分析碱性化合物或需要获得更好的反相色谱效果，就要选择封端的色谱柱。如果你要分离选择性不同的极性化合物就选择未封端的色谱柱。

第三种类型的键合固定相在图的左边，它是进行立体化保护性处理的固定相，其侧链的立体特性可以阻止任何分子和残留的硅醇基进行反应。另外一个优点是保护硅胶上残留的硅醇基和酸性流动相分子接触。大家都知道酸性流动相对硅醇基键合相有水解作用，这一庞大的硅烷可以是 C-18 上的二异丁基，或 C8，C3，CN，和苯基上的二异丙基，这一类型的色谱柱如 Zorbax 稳定的键合相色谱柱。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

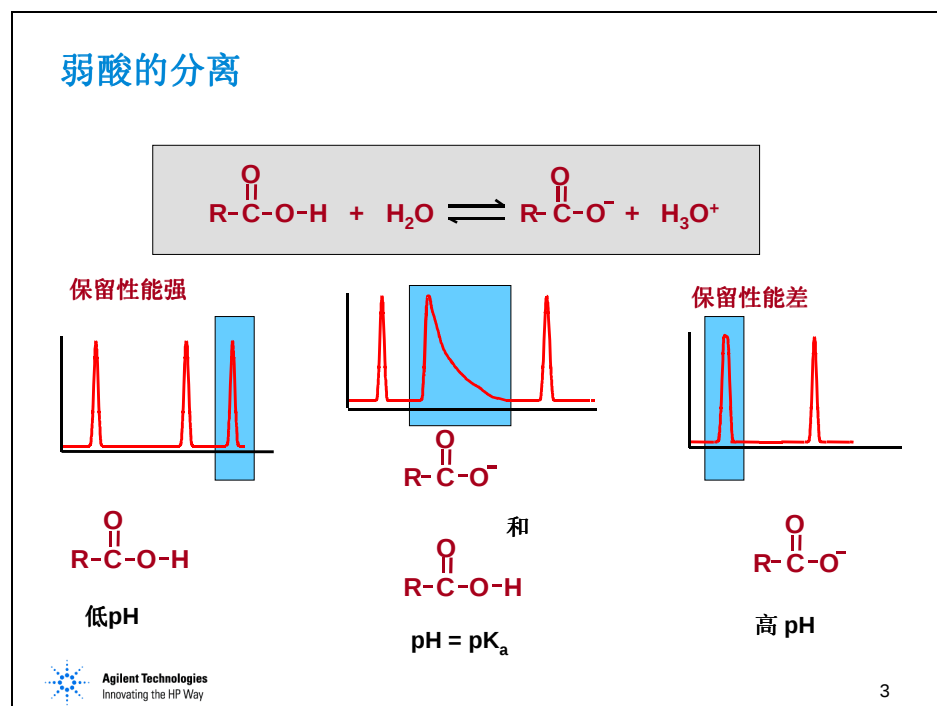
反相色谱分离离子型样品

在这一节，你将学习

在这一节，你将学习：

- 使用离子抑制技术如何控制弱酸样品的保留时间.
- 如何更容易地分离弱碱.
- 如何分离弱酸、弱碱和中性混合物.
- 如何用离子对HPLC分离强酸和强碱.

弱酸的分离



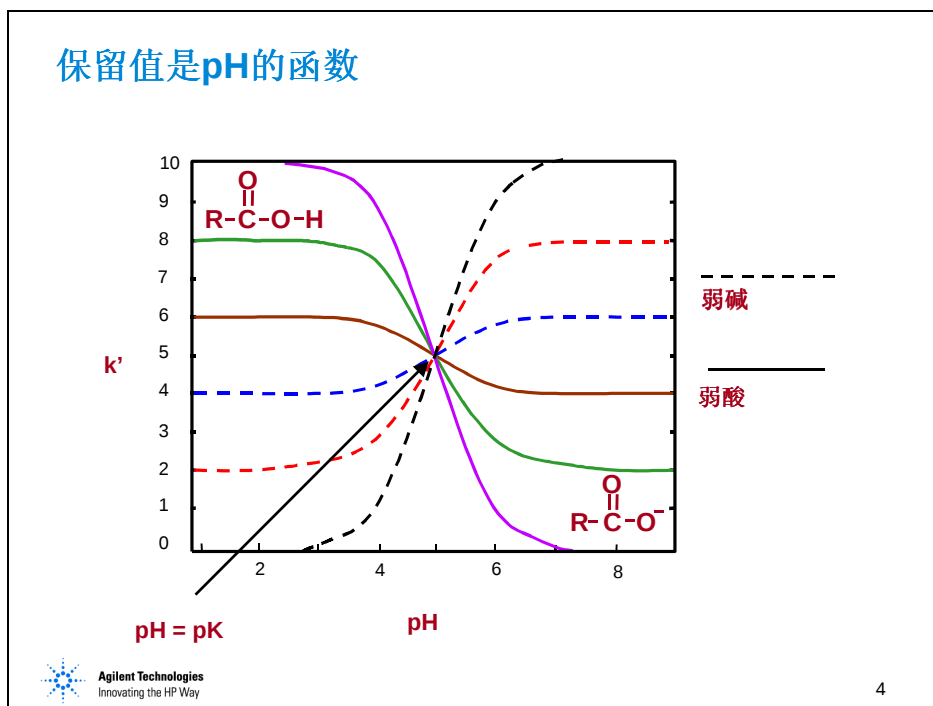
到现在为止讨论集中在反相 HPLC 分离中性化合物上，反相 HPLC 也是分离离子型样品极好的方法。

在溶液中的弱酸可以中性或离子形式存在，在离解时成为负离子，在高 pH 介质中分子呈负离子状态，在此状态下分子主要为亲水性，所以分子的保留值很低，对某些分子在此情况下可以说完全没有保留作用。

当流动相的 pH 降低到样品的 pK 时，分子就同时存在中性和离子两种形态，流动相的 pH 接近于样品的 pK 时，估计色谱峰会变宽而且峰形难看，当流动相的 pH 比 pK 低 1.5 到 2 个单位时，分子呈中性，在此情况下分子的疏水性强，保留值最大。

一般上，色谱工作者把流动相的 pH 调节到使分子呈中性，使其保留值达到最大而且保留时间的精密度高，所以色谱工作者把流动相的 pH 调节到比弱酸的 pK 值低 2 pH 单位，这一技术叫做离子抑制方法。

但是，你必须记住对以硅胶为基的键合固定相的安全操作范围是 pH 2 到 8，在极端 pH 条件下色谱柱的使用寿命会受到威胁。



这一张图说明弱酸或弱碱如何随流动相的 pH 变化保留值的改变。要注意在 pH 接近弱酸或弱碱的 pK 值时变化最厉害，这就是说 pH 稍有变化，保留值就会有很大改变。如果在靠近弱酸或弱碱 pK 值处保留时间的重复性就不好，峰形也变坏。

离解的酸从色谱柱中很快地流出，与离解的酸不同，质子化的碱保留时间很长而且峰性不好，这是由于和残余硅醇基作用的缘故，但是碱性化合物不能总是在离子抑制条件下进行分离，分析工作者必须提高 pH 使分子呈中性，但是在高 pH 下的流动相会损坏硅胶基质的色谱柱，硅胶在 pH 8 以上很容易溶解。但是有一些硅胶基的色谱柱在此条件下性能比一般硅胶基色谱柱要稳定。以聚合物为基的色谱柱是另外一种抗高 pH 介质的固定相。使用预柱使流动相使被溶解的硅胶得到预饱和，以便减少对色谱柱的损坏。

控制 pH 的缓冲溶液

缓冲溶液

缓冲溶液	pK _a	缓冲范围	缓冲溶液	pK _a	缓冲范围
磷酸盐			甲酸盐	3.8	2.8 – 4.8
pK ₁	2.1	1.1 – 3.1	乙酸盐	4.8	3.8 – 5.8
pK ₂	7.2	6.2 – 8.2	Tris (羟乙基氨基甲烷)	8.3	7.3 – 9.3
pK ₃	12.3	11.3 – 13.3	氨	9.2	8.2 – 10.2
柠檬酸盐			硼酸盐	9.2	8.2 – 10.2
pK ₁	3.1	2.1 – 4.1	吡咯烷	10.5	9.5 – 11.5
pK ₂	4.7	3.7 – 5.7			
pK ₃	5.4	4.4 – 6.4			

其他常用流动相添加剂

- 乙酸
- 磷酸
- 硫酸
- 三氟乙酸 (TFA)

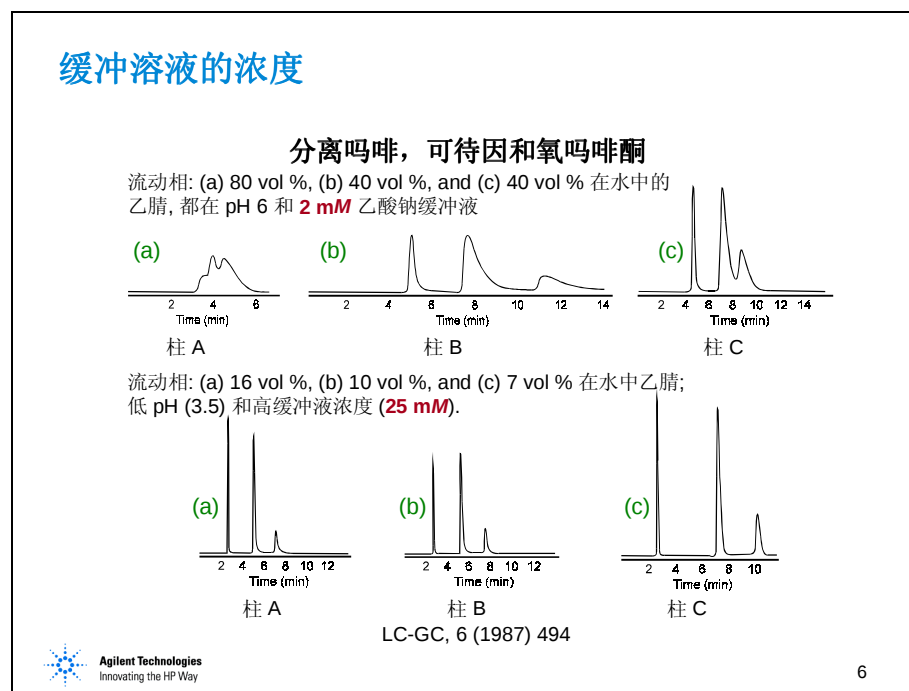


5

为了控制弱酸和弱碱的保留时间，流动相的 pH 必须严格控制，必须要选择适当缓冲溶液体系并精心地制备缓冲溶液，上表列出一些 HPLC 常用的缓冲溶液，一种特殊的缓冲溶液只在一定的 pH 范围是稳定的。

缓冲溶液要有足够的浓度，但不要过度，一般 HPLC 的缓冲溶液浓度范围在 25 到 100 mM，应当使用质量最好的试剂制备缓冲溶液，使用经过校准的 pH 计滴定缓冲溶液到指定的 pH，或者使用制备的缓冲溶液。要把缓冲溶液进行过滤除去任何颗粒物质。要把缓冲溶液冷冻保存，或在使用时再制备，因为许多缓冲溶液会促进细菌的生长。

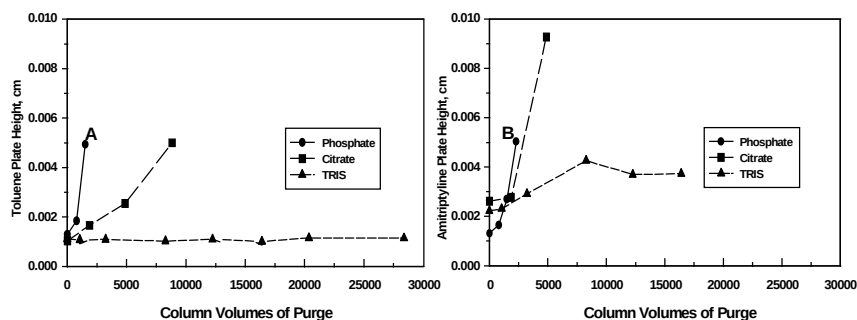
考虑 pH 的缓冲溶液



缓冲溶液只有在一定的浓度下才能很好的工作，在上面的例子里，缓冲溶液的浓度不合适，注意色谱峰形变宽，保留时间不稳定。在下面的例子里，使用了合适的缓冲溶液浓度，色谱峰形有所改善。典型的缓冲溶液浓度范围是 25 到 100 mM。

控制 pH 的缓冲溶液

缓冲溶液类型对色谱柱稳定性的影响



色谱柱: 4.6 x 150 mm Zorbax XDB-C8; 冲洗: 20% ACN/80% 0.25 M 缓冲液, pH 7, 1.0 mL/min; Test: 60% ACN/40% 0.01 M 磷酸钠缓冲溶液, pH 7.0, 1.5 mL / min; 22° C



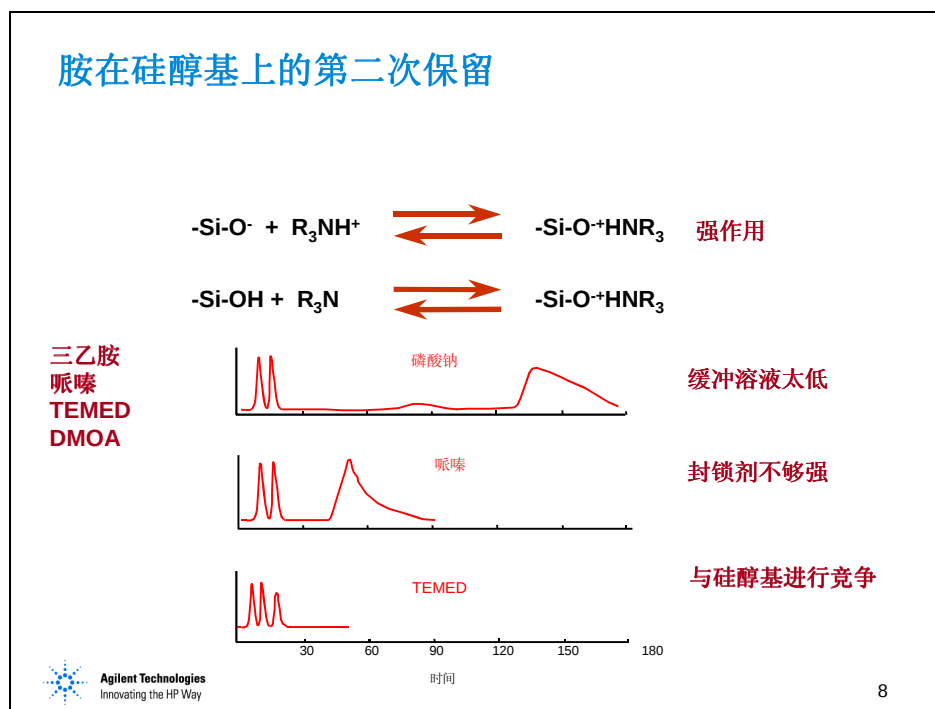
7

上述数据说明缓冲溶液的选择能影响色谱柱填料的寿命, 虽然柠檬酸盐缓冲溶液对色谱柱寿命要好于磷酸盐, 但是柠檬酸盐对仪器的不锈钢零件有腐蚀作用。

要记住在不用仪器时一定要把缓冲溶液从色谱柱和仪器中冲洗出去, 当流动相中含有缓冲溶液时停流是极坏的条件, 高温下使色谱柱和其他仪器部件暴露在流动相和添加剂中, 也会加速它们的损坏。

含盐缓冲溶液的流动相千万不要让它在泵系统中蒸发干, 这样会损坏比例阀、泵的密封件、活塞。引入新的流动相会使其永久性的堵塞。缓冲溶液不可能再溶解和沉淀。

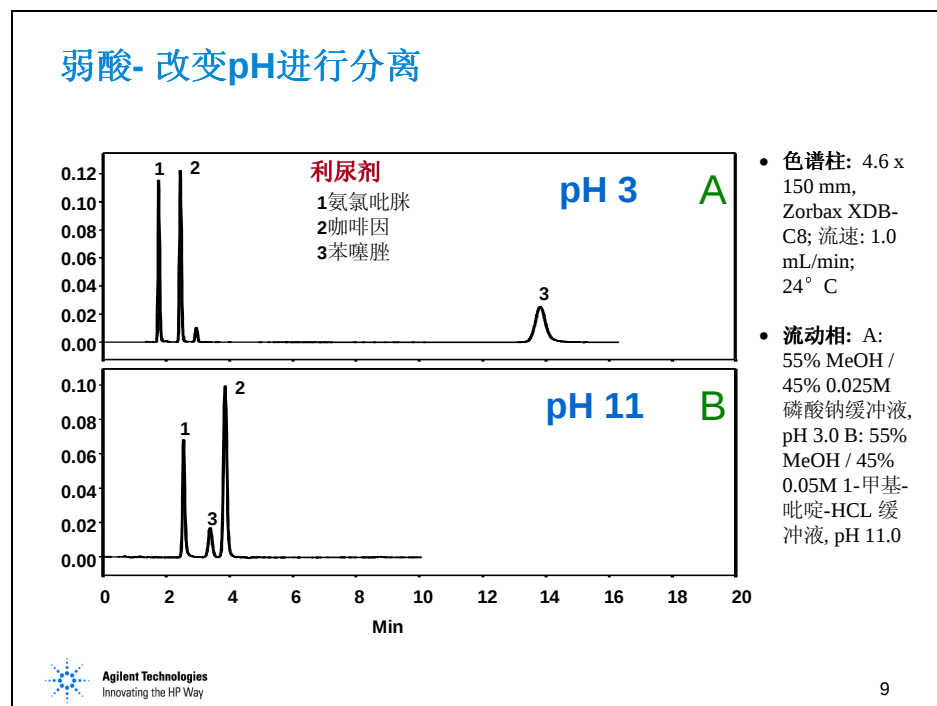
弱碱的分离



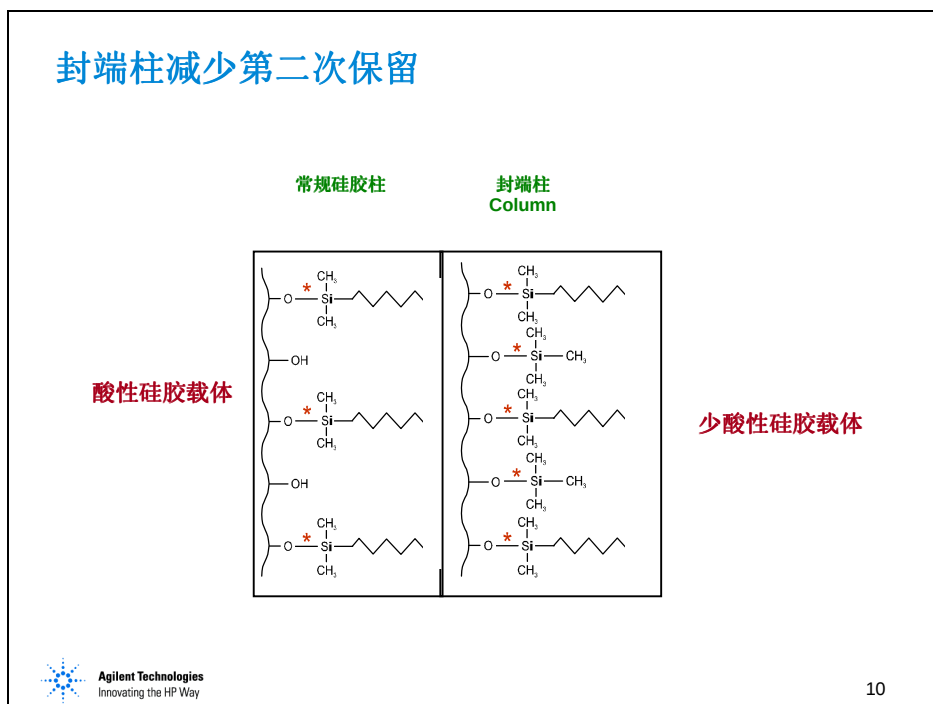
在固定相表面上的游离硅醇基造成不希望有的和碱的第二次作用，顶部的色谱图说明弱碱与游离硅醇基典型的作用，样品有很强的保留作用，峰形也不好。如果加入一个比样品更容易和游离硅醇基作用的化合物，就可以消除硅醇基-碱的作用，常用的这类改性剂是三乙胺 (TEA)，TEA 叫做动态封端试剂或保护试剂，典型的情况下加入 10 – 30 mM 的量就可以减轻或消除这种作用。

在上面的例子里，第一个图的流动相中只简单地含有磷酸钠，第二个图用哌嗪做封端试剂，但是它的作用不明显，在第三种情况下使用 TEMED (N,N,N',N'-四甲基乙二胺) 做保护试剂，得到好的结果，但是 TEA 是更常用的这类试剂。

反相色谱分离离子型样品
弱碱的分离



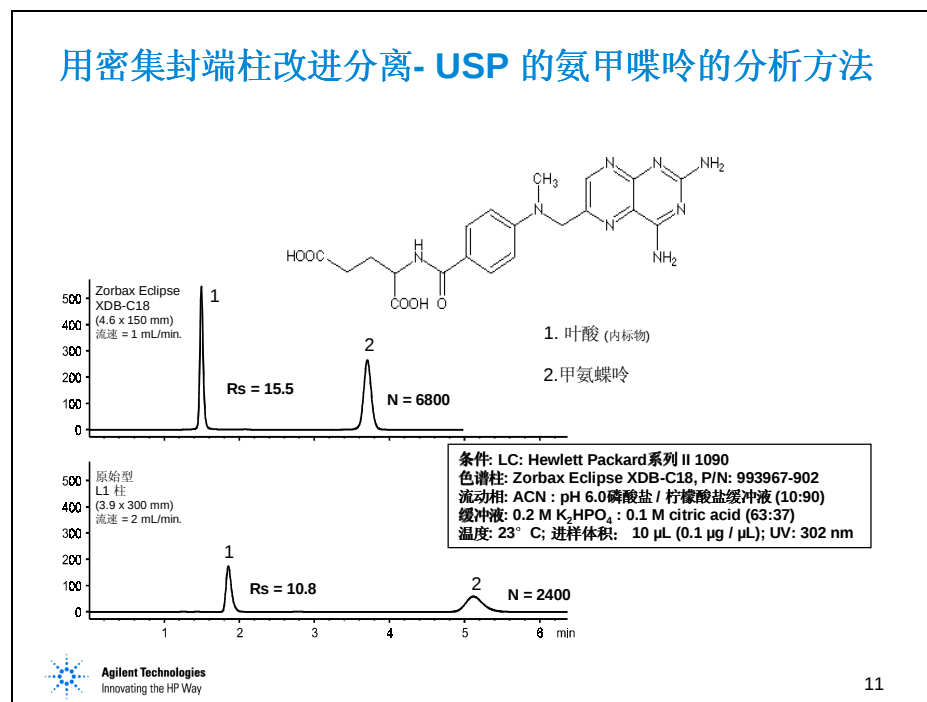
上面的例子提高流动相的 pH 到某一程度时, 碱不再能质子化, 减弱了碱和游离硅醇基的作用。要说明的是对多数色谱柱并不推荐这样做, 在 pH 高到 8 以上时会溶解硅胶而损坏硅胶基的色谱柱, 往流动相中加入三乙胺或使用封端色谱柱则是明智之举。



上图左边是通用的键合相硅胶色谱柱，由于立体效应并非所有在硅胶上的硅醇基都会形成键合基团，在固定相表面上的游离硅醇基常常和样品分子产生不希望有的相互作用，在一些情况下这一附加的分离机制有加以利用的优点，一个含有游离硅醇基的 C18 色谱柱比没有游离硅醇基的 C18 柱具有不同的选择性。在另外的环境下，特别是对碱性和高极性化合物的情况，样品会吸附在游离硅醇基上，造成峰性不好和保留时间增加，柱与柱之间的保留值的重复性不好。

游离硅醇基可以和小的增水性分子键合得到中和，三甲基硅烷常和游离硅醇基键合，但用这一方式解决问题的趋势有所下降，因为三甲基硅烷容易水解。

反相色谱分离离子型样品
弱碱的分离



上面两个色谱图证明在不同的硅胶基 C-18 色谱柱上对碱性分子的作用是不同的，底部的色谱图使用了未经封端的色谱柱，上面的色谱图是用密集键合和二次封端色谱柱得到的，这样处理的色谱柱减少了游离硅醇基，因而也就减少了拖尾和保留值。

分离弱酸和弱碱

分离弱离子化化合物的试验条件

分离参数	开始的选择
色谱柱	
尺寸	15 (或 25) x 0.46 cm.
颗粒度	5 或 3.5 μm
键合相	C18 或 C8
流动相	
溶剂 A 和 B	水缓冲溶液/ACN
% B	变数 ($k = 0.5 - 20$)
缓冲溶液	25 mM 磷酸钾, $\text{pH} \leq 3$
添加剂	25 – 50 mM TEA 或 TEA 乙酸盐, 如需要
流速	1 – 2 mL/min.
温度	40°C
样品量	
体积	$\leq 50\mu\text{L}$
质量	$< 25\mu\text{g}$



12

上面总结了分离含有弱酸和弱碱样品的条件，流动相和添加剂不会影响中性化合物。

离子对 HPLC

用离子对反相HPLC分离强酸和强碱

键合相

离子对试剂

Sample

分离碱使用:

- 烷基磺酸盐
- 三氟乙酸 (TFA)
- 七氟丁酸 (HFTBA)
- 己磺酸

分离酸使用:

- 烷基三乙基季铵盐 (TEA)
- 磷酸四甲基铵盐 (TMA)
- 磷酸四丁基铵盐 (TBA)
- 乙酸三乙基铵盐 (TEAA)
- 壬胺

 Agilent Technologies
Innovating the HP Way

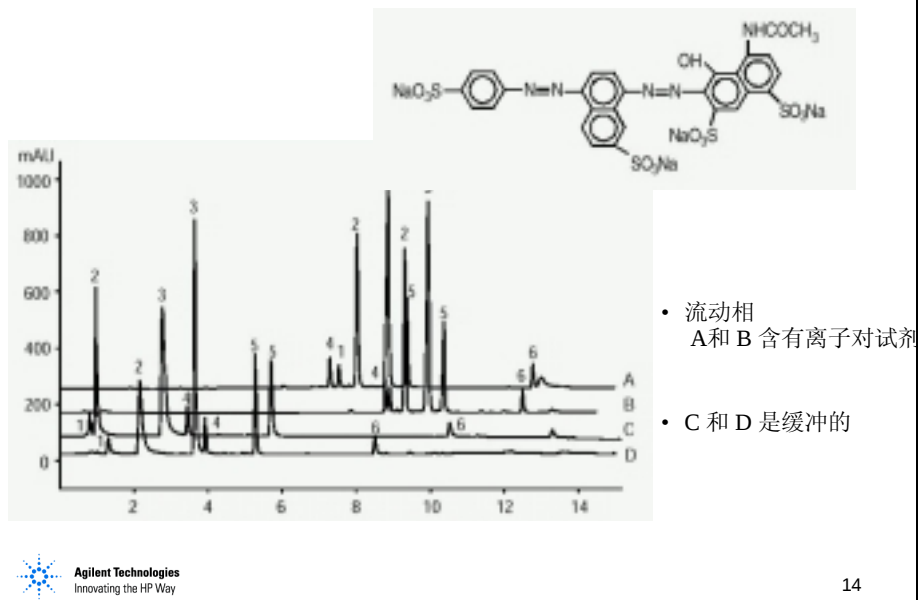
13

你可以使用离子对 HPLC 分离强酸和强碱，这一方法叫做离子对色谱或对离子色谱 (PIC)，在离子对色谱中是把离子对试剂加入到流动相中，离子对试剂既有一个疏水性的尾巴又有一个带电的功能团，疏水性的尾巴可以和 C18 固定相作用，分子中的离子性部分指向亲水性的流动相，样品和缓冲溶液分子以离子交换型机理竞争带电荷的基团，加入离子对试剂增加保留值，保留值增加的程度取决于离子对试剂的疏水性和浓度。

当有足够的离子对试剂存在时，并且流动相的 pH 能保持样品分子呈离子状态，保留机制就成为离子交换模式，在中等浓度时保留机制就成为反相和离子交换方式。

离子对色谱十分有效，所以是分离离子型样品的较好选择，这一方法优于离子交换色谱。

用离子对反相HPLC分析阴离子



上面的例子是使用离子对色谱、反相色谱在脱活的色谱柱上分析合成染料的情况，所选分离机理是让高极性染料减小拖尾，染料结构举例如上。

在开发方法时，评价了四种不同的流动相，两种流动相是简单的缓冲溶液体系（C 和 D），另外两种流动相包括离子对试剂（A 和 B）。

流动相 C 和 D（只有流动相）对带有磺酸基的化合物显示有拖尾，使用离子对试剂的流动相 A 和 B，分离带有各种不同化学结构的染料，其拖尾很小或没有拖尾。

条件

色谱：125 x 3 mm Hypersil BDS, 3 μm

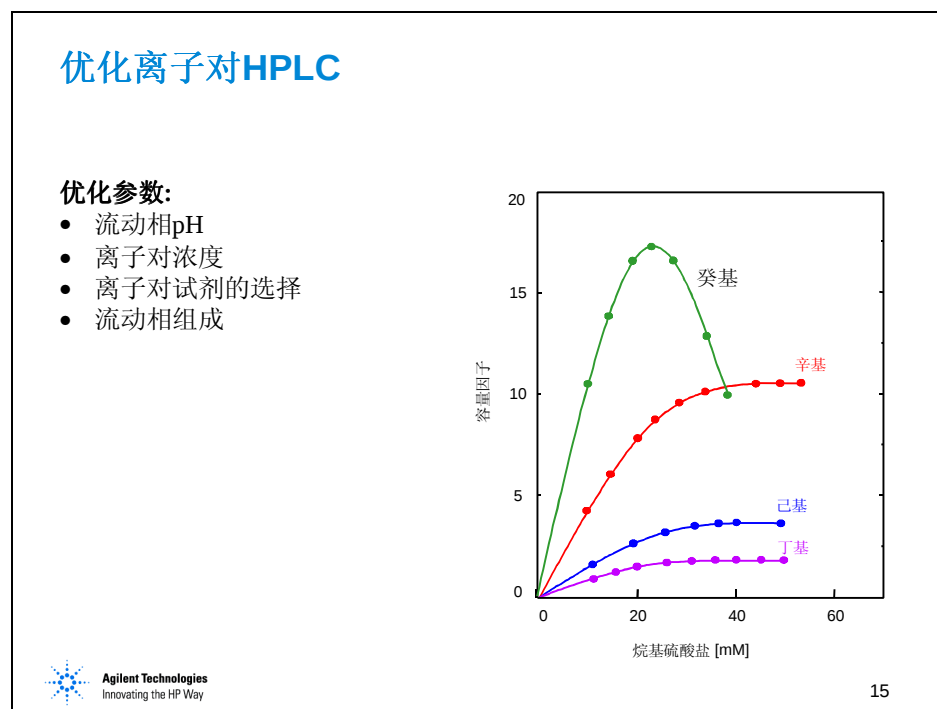
反相色谱分离离子型样品
离子对 HPLC

流动相

- A
A = 0.01 M NaH_2PO_4 + 0.001M 四丁基二氢磷酸盐
pH 4.2, B = 乙腈
梯度
- B
A = 0.01 M NaH_2PO_4 + 0.001 M 四丁基二氢磷酸盐
pH 4.8, B = a 乙腈
梯度
- C
A = 0.01 M 乙酸铵, pH = 4.9, B = 乙腈
梯度
- D
A = 0.01 M NaH_2PO_4 , pH = 4.3
B = 乙腈
梯度

详细内容，参见 Agilent Technologies 出版物号 12-5964-3559E。

离子对 HPLC 的优化



当开发一个离子对色谱时，你首先要考虑的是离子对试剂，在离子对试剂上疏水性链的长度控制保留值的大小，但是对洗脱次序很少有影响。

对样品上具有相反的电荷时，离子对试剂的浓度越高典型情况下样品的保留值也越高，其浓度可到约 50 mM，在高浓度的离子对试剂情况下中性样品会减小其保留时间，这是由于接近固定的机会相受到限制。

改变有机组分会使选择性有所变化，由于其溶解度的关系甲醇常用做离子对色谱的溶剂。

离子对色谱的分离对温度的敏感性要高于反相液相色谱，离子对色谱的平衡时间长，要用 20 个体积色谱柱的容积。常常很难把色谱柱中的离子对试剂完全冲洗掉，所以有许多建议指出一旦色谱柱用做离子对色谱，就要一直用为离子对色谱的模式，高分子量的离子对试剂很难从色谱柱中完全除去。

使用封端的色谱柱以便消除残余硅醇基的影响。

离子对试剂中的杂质会影响基线的不稳定。过量的离子对试剂流出会导致出现假峰。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：用反相色谱分离弱离子化 合物（任选实验）

实验室训练：用反相色谱分离弱离子化合物（任选实验）
在这一实验室训练中，你将：

在这一实验室训练中，你将：

- 改变流动相的 pH 研究它对弱酸、弱碱和中性化合物分离的影响。

实验室训练：用反相色谱分离弱离子化合物（任选实验）

材料

材料

- 一支 Hypersil ODS 4.6 x 100 mm，5 微米的色谱柱，部件号为 79916OD-554 或 SB-C18，4.6 x 150 mm，3.5 微米柱，部件号为 863953-902。
- 苯胺，苯甲醛，苯甲酸混合物。
- 标准—三个标准中的两个。
- 通道 B 为 HPLC 级别的乙腈。
- 一般实验室都会有的四种缓冲液，pH 4.0，pH 4.7，pH 5.5，和 pH 4.0 + TEA。
- 一台通电的带所有部件的 1100 液相色谱仪。
- 一台 HPLC 化学工作站，配备光度检测器部件。

步骤

220) 找到样品和标准。

221) 为你的分析设定下列条件：

流速：	1.0 mL/min
%B	65% 水相缓冲液/35% 乙腈
柱箱	40°C
停止时间	不限制（当色谱峰洗脱出来之后）
进样体积	5.0 μ L
检测器	260,20 450,100

222) 启动泵并让色谱柱平衡几分钟，用缓冲水溶液平衡需要较长的平衡时间。适当的平衡会保证获得好的结果。

223) 在分析条件下注射每一种单独的溶质，然后注射混合样，记录峰形、保留时间、和流出次序。

224) 用四种流动相重复上述的步骤，要肯定在进样之前你已经充分地冲洗过，最后用含 TEA pH 4.0 的缓冲溶液冲洗。

225) 在完成所有的分析之后，要用 HPLC 级别的水冲洗色谱柱，然后用 50/50 水/乙腈溶液冲洗色谱柱。

实验室训练：用反相色谱分离弱离子化合物（任选实验）
问题

问题

226) 当改变 pH 时色谱的流出次序如何？

227) 流动相的 pH 会影响弱酸的分离吗？

228) 在分析时碱对分析有何影响？解释其原因。

实验室训练：用反相色谱分离弱离子化合物（任选实验）
问题



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

离子交换高效液相色谱

在这部分，你会了解到：

在这部分，你将学习到：

- 离子交换分离的机理
- 如何选择离子交换固定相
- 流动相的 pH 如何影响分离
- 影响离子交换分离的因素
- 离子交换色谱基础知识

离子交换机理

离子交换机理

机理:

- 样品离子可逆结合到带电载体上。

固定相:

- 磺酸盐 (SCX)
- 季胺盐 (SAX)
- 羧甲基 (WCX)
- 二乙氨基乙基 (WAX)

流动相:

- 缓冲液
- 反离子
- 有机改性剂

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

3

离子交换液相色谱是针对有机和无机离子的分离技术。固定相是表面键合带电官能团的坚固的高分子或者硅胶。其机理和吸附色谱类似。样品离子和反离子竞争结合固定相上的带电位点。样品离子必须将反离子替换下来才能与带电位点结合。当反离子浓度低的时候，样品的保留小。随着反离子浓度的增加，样品的保留降低。

离子交换树脂有阴离子型和阳离子型两种。阴离子交换树脂中有连接到硅胶或者高分子骨架上的带正电的基团。阳离子交换树脂有带负电的基团。

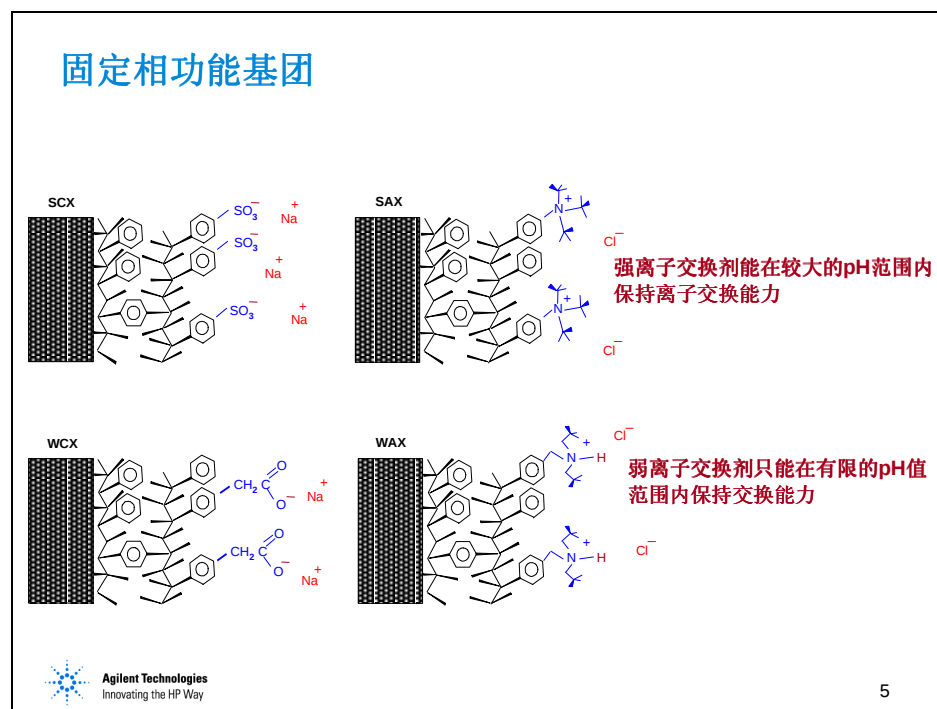
离子交换的应用

离子交换的应用

- 用于分离带电分子: 从小分子到蛋白质.
 - 铵和小分子量的胺
 - 季铵化合物
 - 卤氧化物
 - 弱有机酸
 - 硅酸盐
 - 脂肪族和芳香磺酸
 - 糖类
 - 氨基酸
 - 蛋白质
- 离子色谱可以分析和检测:
 - 痕量离子, 比如: F⁻, Br⁻, Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, HPO₄⁻², SO₄⁻², Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg⁺², Ca⁺², Sr⁺², Ba⁺²

离子交换色谱是分离无机离子（离子色谱）和有机离子的一种重要的 HPLC 技术。在生物科学中的应用包括氨基酸，肽，蛋白质，核苷与核苷酸的分离。离子交换也用于消费品工业，用于酒类，软饮料和面包添加剂的分析。化学工业使用此技术用于从电镀槽到烟道气脱硫液的分析。采用这种方法的关键是样品必须能够在溶液中离子化。每次分离只能是针对阴离子或者阳离子的，而不能同时分离阴阳离子。

固定相



离子交换树脂可以分成 4 类:

229) 强阳离子交换树脂

230) 弱阳离子交换树脂

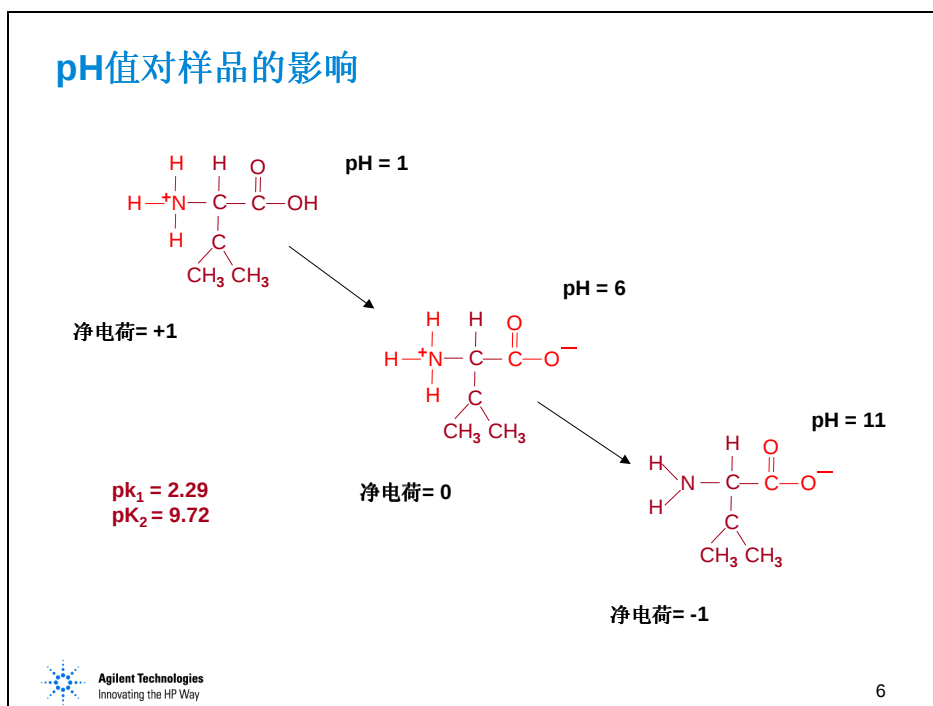
231) 强阴离子交换树脂

232) 弱阴离子交换树脂

强阳离子和阴离子交换树脂能够在很大的 pH 值范围内保持它们的电性，因此能在很大的 pH 值范围内保持分离能力。弱阳离子和阴离子交换树脂只能在很窄的 pH 范围内保持分离能力。因此，一般用强阳离子和阴离子交换树脂。但是，在强样品阴离子或阳离子的情况下，弱离子交换树脂可能更有用。由于在强离子交换树脂上的强酸强碱的保留很强，洗脱困难。弱离子交换树脂的 pH 敏感性可以帮助样品的洗脱。

带电官能团可以接到硅胶或者硬的高分子上。高分子的优点是耐久性好。它们能经受得起很高的 pH 值范围和更高的离子强度。硅胶的优点是耐有机改性剂，收缩溶胀小，高容量，可以做成各种孔径。

pH 的影响



选择流动相的合适 pH 不仅能保持固定相的电性，而且能促使样品离子带正确的电性。上图的例子说明了带有酸性和碱性位点的样品随着流动相的 pH 改变而改变分子的总电性。在低 pH，pH 等于 1 时，这种氨基酸，缬氨酸分子带一个正电荷。在很低 pH 下，它可以在阳离子交换树脂上分离。由于在这个 pH 下，甚至强阳离子交换剂也不带电性，所以这种方法不可行。在 pH 为 6 时，分子带的总电荷为 0。这时，样品不适合用离子交换分析。在 pH 为 11 时，样品分子总电荷为 -1。这时，样品可以在强阴离子交换柱上分离。

流动相

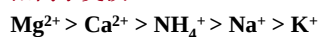
离子交换流动相

水性缓冲剂与/或 盐 - 任何常用的 HPLC 缓冲剂 (5mM 到 200 mM)

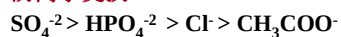
Strong Anion Exchanger	pH < 9	盐 (0 to 1M)
Weak Anion Exchanger	pH < 6	具有完全的交换能力的pH值
Strong Cation Exchanger	pH > 3	
Weak Cation Exchanger	pH > 8	

反离子

阳离子交换



阴离子交换



分离参数:

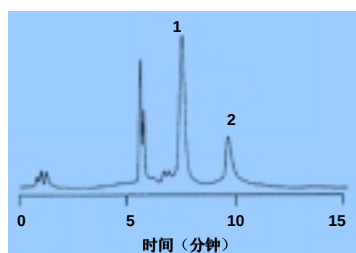
- 流动相 pH
- 反离子的选择
- 反离子的浓度 (离子强度)
- 有机改性剂
- 流速
- 温度

离子交换在水性缓冲流动相中进行。前面已经讨论过了流动相的 pH 对固定相和样品离子的影响。为了得到合适的流动相 pH，必须要选择缓冲剂。常用的缓冲剂包括磷酸盐，乙酸盐，柠檬酸盐，甲酸盐，MES，bis-tris，PIPES，BES MOPS HEPES，tris，氨水，硼酸盐和二乙基胺。反离子可以来源于缓冲剂或者是加入流动相的盐，比如 NaCl。NaCl 常用于蛋白质的分析。增加离子强度可减小样品离子的保留。

改变流动相 pH，反离子和反离子浓度能改变选择性。加入有机改性剂能降低样品和固定相（骨架）的相互作用。对于 4.6 mm 直径的柱的典型流速是 1.0 mL/min。温度对离子交换色谱的影响比其他模式大。

分离

蛋白质的强阴离子交换分离

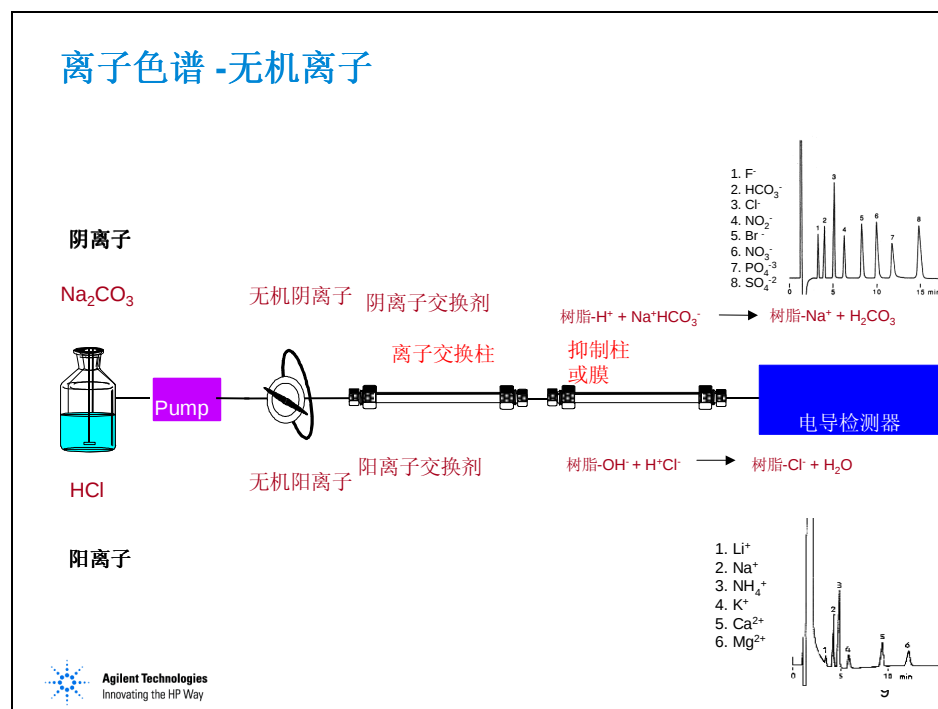


- 改变离子强度控制洗脱
- 一般采用梯度洗脱

条件:
色谱柱: ZORBAX Bio-SAX, 6.2 x 80 mm
流动相: 梯度: 0 到 100% B 20 分
A = 0.02 M BIS - TRIS, pH 7.0,
B = A + 1.0 M NaCl
流速: 2 毫升/分
温度: 室温
检测器: UV - 280 nm
样品: 20 毫升鼠腹水
峰:
1. IgG
2. Albumin

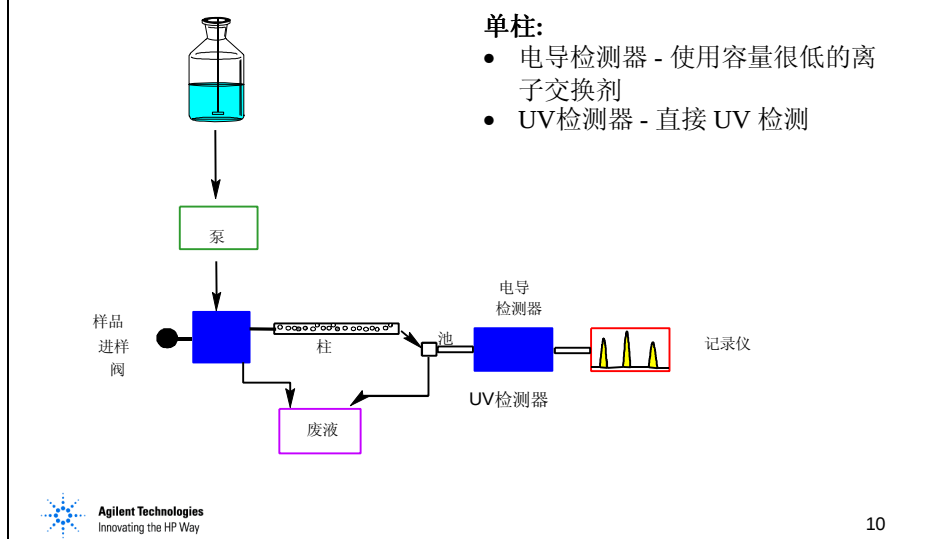
上面的例子是用阴离子 HPLC 分离蛋白质。蛋白质在离子交换 HPLC 的分析条件下一般不会变质，因此是一种很好的蛋白质分析技术。大多数的离子交换分离和上面的例子一样是梯度洗脱的。反离子浓度，pH 或强度在分析过程中可变。大多数分离是开始采用较稀的反离子流动相，然后逐渐增加反离子浓度。

离子色谱



无机离子也可以在离子交换色谱上分离。它的应用很广泛，这里仅举几个例子：饮料，废水，牙膏中的氟化物，食物中的硝酸盐，土壤中的离子等。无机离子不能直接用 UV-Vis 分光光度计检测。一般用电导检测器检测。从前面的讨论中，你可能得出结论：很多离子交换流动相也是高导电性的。因此，电导检测器对样品离子的检测将不太灵敏。有关这个问题，可以在离子交换柱后安装一个抑制柱或者膜。抑制柱将高导电性的流动相离子变成弱导电性或者不导电的粒子。因此，利于样品离子的检测。抑制柱在使用一次后必须再生。

离子色谱 - 单柱



有些离子色谱不需要抑制柱或者膜。在单柱离子色谱中，要选择含有很低的电导的离子。而且，要给检测器以电子补偿。这种方法的检测限比抑制法低。

最近几年受到广泛关注的一种技术是直接 UV 检测。流动相含有高 UV 吸收的试剂。离子经过检测器的时候，吸收值降低，产生一个孔或者负峰。这种技术灵敏度高。间接 UV 检测试剂盒可以从一些供应商买到。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

正相 HPLC



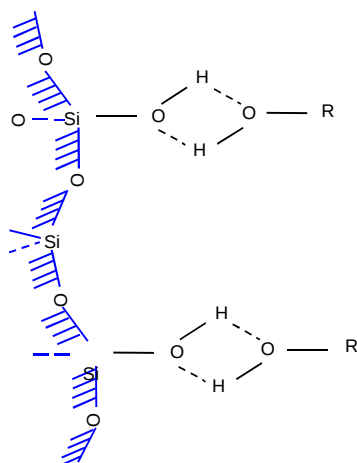
在这一节，你将学习

在这一节，你将学习：

- 正相分离机理和应用。
- 正相色谱的流出顺序。
- 如何选择正相色谱柱。
- 如何选择正相色谱流动相。

正相色谱机理

吸附色谱-正相



机理:

- H-键
- 偶极-偶极
- π -络合键
- 溶质置换溶剂

固定相:

- 硅胶
- 氰基键合固定相
- 氨基键合固定相

流动相:

- 有机溶剂

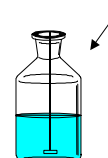
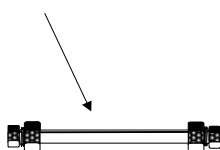
正相液相色谱是首先研究的色谱方法，从此就叫做正相色谱，茨维特在碳酸钙固定相上分离植物色素，用石油醚做流动相。按定义的正相 HPLC 其固定相的极性大于流动相，典型的固定相包括硅胶和氰基、二醇基、氨基键合固定相。典型的流动相是有机溶剂如己烷和乙酸乙酯。

分离机理是以极性作用为基础，样品分子的极性功能团与固定相上的极性功能团作用，在裸硅胶上的极性功能团是硅醇基，开始时溶剂分子占据着固定相的作用点，如果样品分子的吸附力强，它就会置换溶剂分子或多个溶剂分子，而立体效应或样品分子阻挡固定相的通道会控制被吸附物再进入的空间。这一保留机理叫做定域化，正是用这一概念来解释裸硅胶有分离结构异构体的能力。

正相液相色谱的应用

正相HPLC

固定相的极性高于流动相

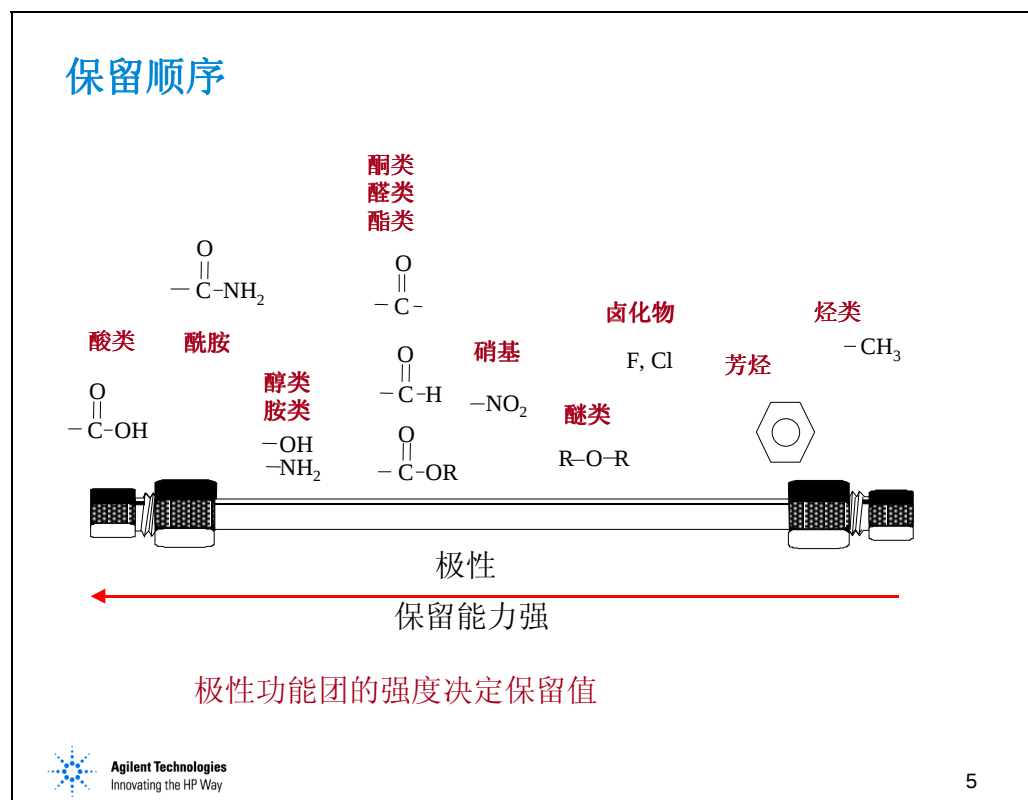


正相HPLC 可以很好地分离:

- 异构体混合物。
- 不能溶于有机溶剂/水中的流动相。
- 中等到中间极性的化合物。

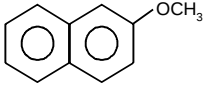
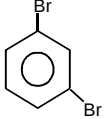
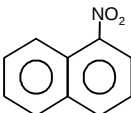
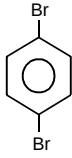
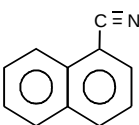
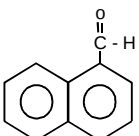
正相 HPLC 用于分离含有极性功能团不同的化合物，特别适合于分离中等极性的化合物，但是，正相色谱缺少反相色谱所具有的分离同系物的选择性。正相液相色谱也用于完全溶于水的化合物，裸硅胶柱特别适合于分离结构异构体。

保留次序



在正相色谱柱上的保留次序和反相色谱相反。正相色谱固定相对某些类型、极性基团的定向性有很强的选择性，在图表中列出一般的洗脱次序，往分子上增加较强的极性基团就会增加其保留值。

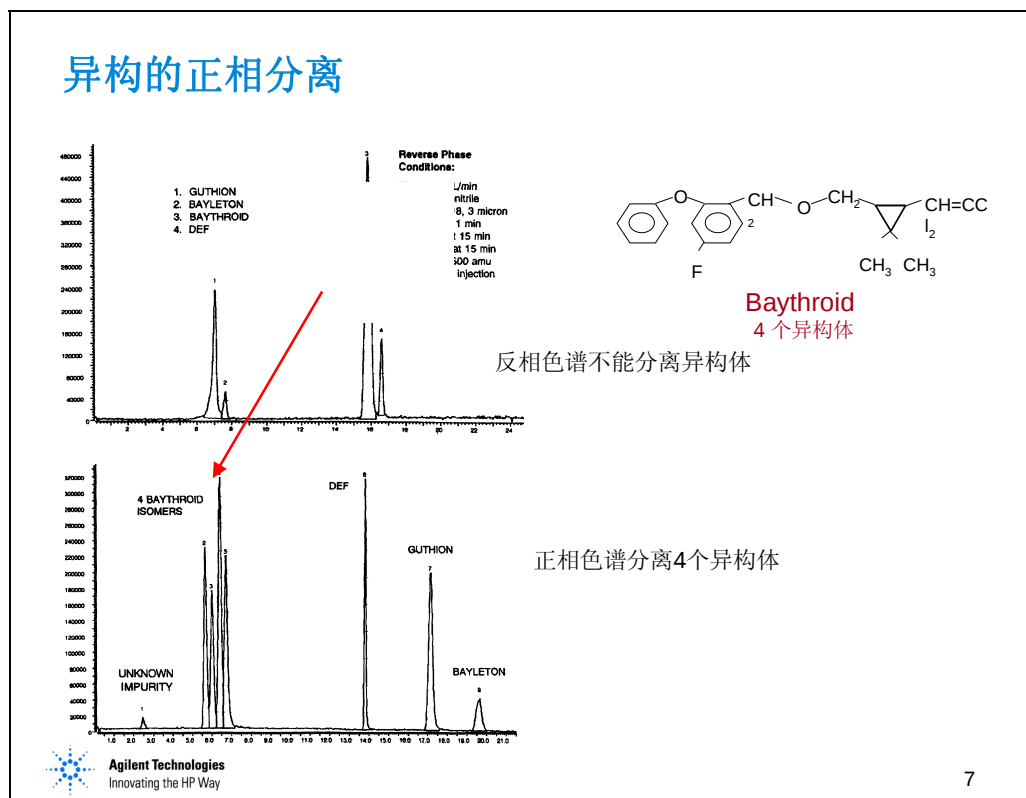
分离的选择性

分离选择性			
功能基	k'	异构体	k'
	0.6		3.8
	1.8		6.9
	2.7		
	5.5		
 Agilent Technologies Innovating the HP Way		6	

上面的数据说明正相色谱对极性功能团有很强的选择性，左边分子的差别是极性功能团，其 k' 值范围在 0.6 到 5.5。右边的例子是说明在裸硅胶上对结构异构体的选择性，只是极性基团在分子位置上的不同，一个是对位而另一个是间位，对结构异构体的选择性主要限制于硅胶柱。

正相 HPLC
分离的选择性

异构的正相分离



这个例子说明在裸硅胶上对结构异构体的特殊选择性，有四个 Baythroid 的异构体，在苯环上氟的位置不同，第一张图是用反相色谱以下面的条件进行试探性分析：

流速：0.4 mL/min

水/乙腈

色谱柱：C-18，3 微米

45%水，1 min

90% ACN at 15 min

100% ACN at 15 min

扫描 50 to 500 amu

20 μ L 进样

注意这些异构体在反相色谱上是分不开的，在正相色谱模式下用硅胶柱以下列的条件可以把异构体分离开：

2.1 x 250 mm 硅胶，5 μm

Zorbax-Sil

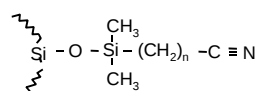
A=25% 乙醇在异辛烷中

B=0.5% 乙醇在氯丁烷中

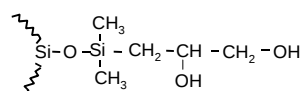
硅胶柱可以分离所有四个异构体。

固定相

固定相



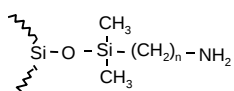
开发正相色谱方法的首选.



极性很强



分离异构体最好



可更换的选择性

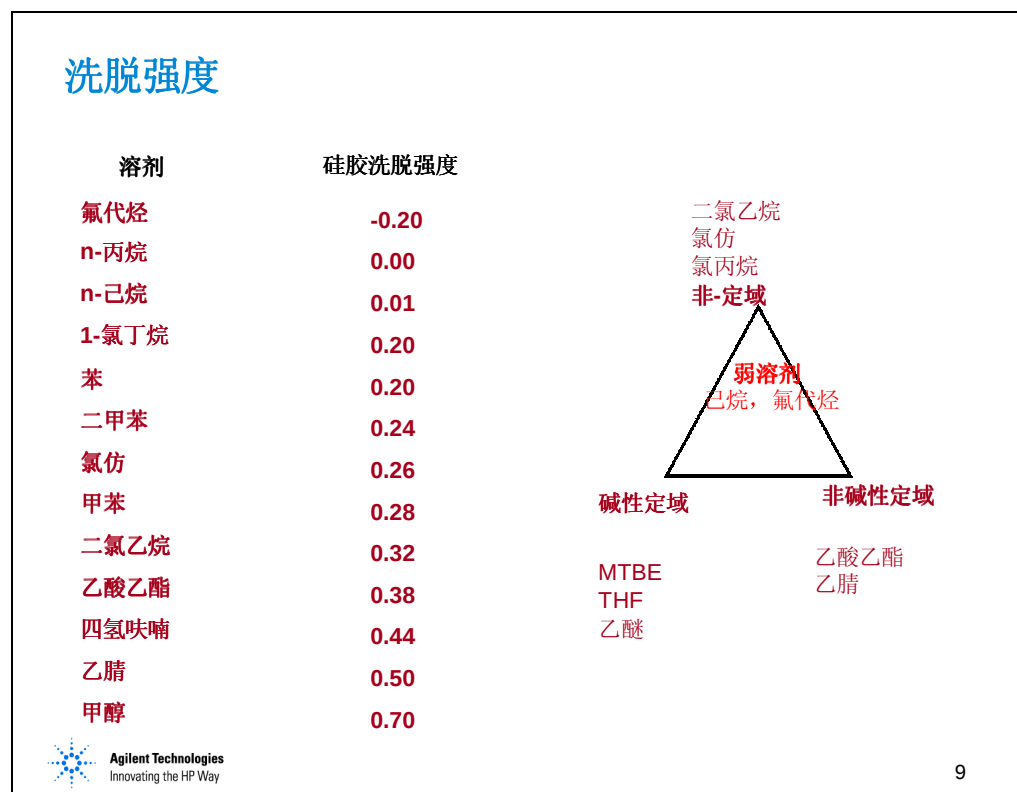
键合相的优点:

- 不必控制水
- 可以梯度洗脱
- 柱平衡快
- 极性选择性广泛
- 容量大
- 未键合硅胶上峰无拖尾



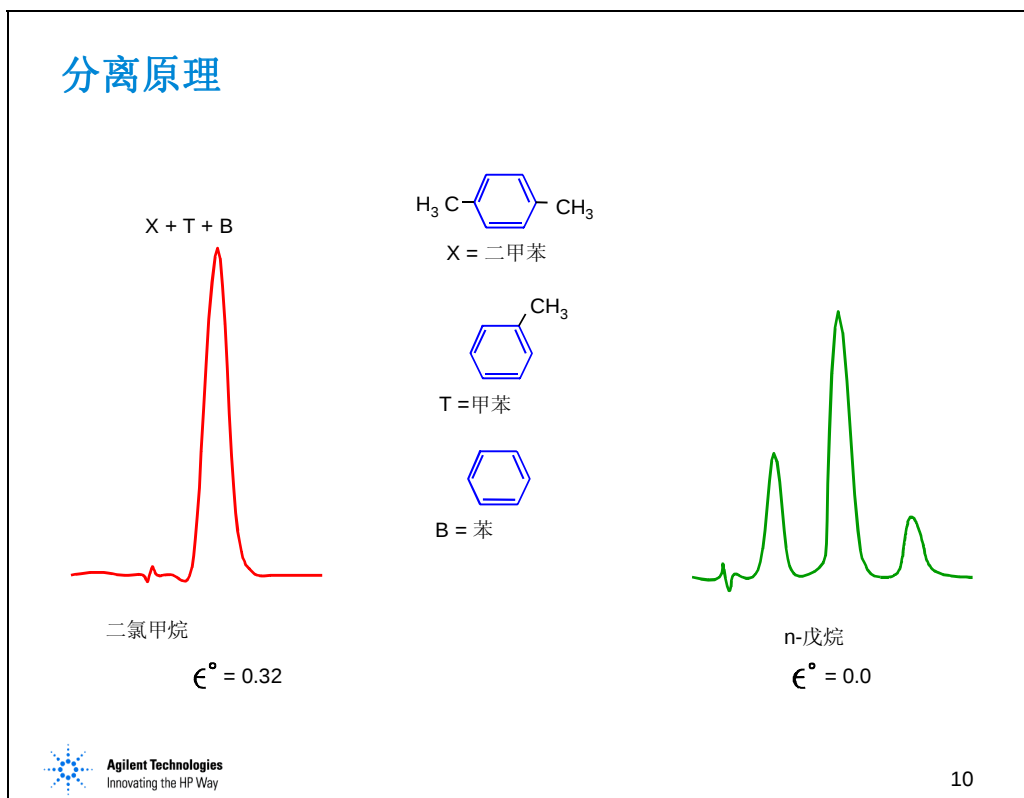
HPLC 中应用键合相要比硅胶有一些优点, 首先, 平衡时间比硅胶快, 因而可以进行梯度洗脱。第二, 应用广泛, 对各种极性化合物有好的选择性, 而且它比硅胶柱对样品有较高的容量。流动相中的水含量不一定象硅胶柱那样要严格地控制, (后面要进一步讲)。所有这些优点说明在开始使用正相色谱开发一个分析方法时要使用键合相色谱柱, 特别要使用氰基柱, 因为它具有中等极性和好的稳定性。二醇基柱的极性很强, 类似于硅胶柱。但是和胺基柱一样不够稳定。如果在键合相色谱柱上的选择性不合适, 然后再使用硅胶柱, 但是建议使用裸硅胶柱分离结构异构体。

洗脱强度



上面是普通正相色谱的溶剂及其洗脱强度，所示数据是溶剂在裸硅胶柱上的结果，在键合相上的数据参见一些书籍，如 Snyder, Glajch, 和 Kirkland 的著作 *Practice of HPLC Method Development*。弱的溶剂如氟代烃和正构烷烃具有负的或低的洗脱强度值。强的溶剂可分为三组：非定域，碱性定域和非碱性定域。在开发正相色谱方法的开始时要选择弱溶剂，如己烷或 1, 1, 2 - 三氟 1, 2, 2 - 三氯乙烷，和一种强一些的溶剂，如二氯甲烷或乙酸乙酯，然后把流动相由强到弱地改变。要注意保留值不是象反相色谱那样，随流动相组成以线性方式变化的。如果组成的混合溶剂选择性不正确，就把其中一个组分换成另外一组更强一些的溶剂进行实验，你甚至可以使用所有三个组中的强溶剂和弱溶剂进行配合，以便达到所需要的选择性。

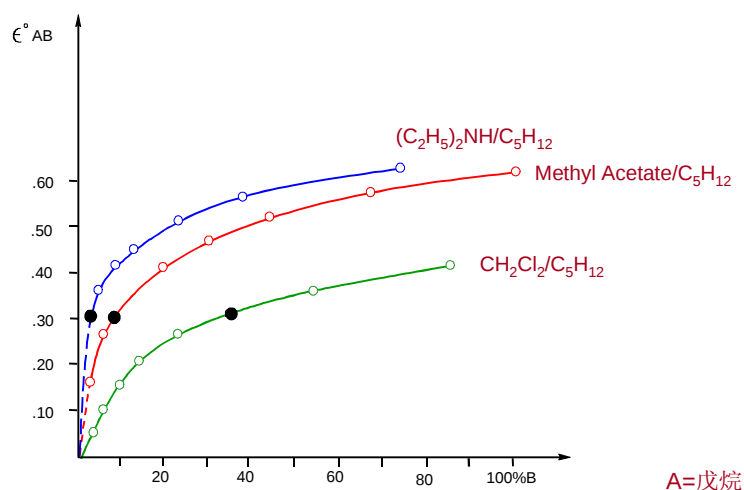
分离原理



此例是说明正相色谱分离机理的性质，三个样品组分是二甲苯 (0.24)，甲苯 (0.28)，和苯 (0.20)，二氯甲烷的强度比三个样品都高，它的洗脱强度是 0.32，所以三个样品都没有足够的强度能从吸附点上把二氯甲烷置换出来。所以所有的样品都以死体积的保留值一起被洗脱出来。当把流动相换成正戊烷时，样品的洗脱强度高于流动相，样品就有了保留作用。

等洗脱强度

为改变选择性, 设法使用混合等溶剂强度的溶剂.



前面, 指出在正相色谱中你可以试验不同的溶剂来改变选择性, 有许多图表可以帮助你选择溶剂, 上面你看到一例, 也许你会发现在你的样品中所有的组分在使用 92% 正戊烷和 8% 乙酸甲酯时以正确的 k' 值范围被洗脱出来, 但是有些色谱峰没有很好的分开, 你可以在教科书或论文中的图表找到相同强度的溶剂组合, 在此情况下你可以试验一下 62% 正戊烷和 38% 的二氯乙烷。参见 Snyder and Kirkland 所著 *Introduction to Modern Liquid Chromatography*。

对各种化合物类型的溶剂强度

化合物类型	干溶剂	50% H ₂ O 饱和溶剂
芳烃	0.05 -0.25	-0.2-0.25
卤化物	0.0-0.3	-0.2-0.1
硫醇	0.0	-0.2
醚	0.1	0.0
硝基化合物, 酯 亚硝酸酯, 羰基化合物	0.2-0.3	0.1
醇	0.3	0.2
酚	0.3	0.2
胺	0.2-0.6	0.0-0.4
酸	0.4	0.3
酰胺	0.4-0.6	0.3-0.5

一些研究者曾发表过一些数据，用以分离给定类型化合物所需要的近似洗脱强度，上面就是一个例子。下一页讨论干溶剂和 50% 水饱和流动相的分离情况。

脱活剂

脱活剂 - 用于硅胶柱



未键合硅胶柱有以下的问题:

- 保留值有变异
- 峰脱尾
- 平衡时间长

原因:

- 在硅胶上有强吸附活化点

解决办法:

- 往流动相中加入少量极性溶剂
如水或乙腈
- 创造更为均匀的表面

方法:

50% 水饱和方法

- 混合流动相
- 分为相等的两部分
- 在分子筛上存放溶剂
- 制备一个用水饱和的成分
- 混合1: 1干的用水饱和的溶剂

- 混合 0.1-1%水与可以和水混溶的溶剂

- 在己烷、戊烷、庚烷中加0.05%乙腈.

用中等极性的溶剂冲洗色谱柱，避免延长平衡时间



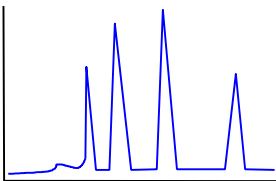
13

裸硅胶柱具有一些键合相色谱柱没有的问题，包括峰拖尾、保留时间重复性不好、和平衡时间长等。这些问题都是由硅醇基造成的，而它的影响程度又和固定相的表面及溶剂中的微量水分有关，微量水分的含量是难以控制的，在不同的时间有不同的水分含量，可以从玻璃表面和空气中吸收水分，微量水分会强烈地吸附于硅醇基上，如果你要控制含水量就能控制这一强烈吸附点的相对覆盖率，从而降低它的影响。

Snyder and Kirkland 曾发表了使用硅胶柱所用溶剂的 50% 水饱和和流动相的方法，这一方法是首先混合溶剂，把此溶剂等分为两分，把一部分溶剂保存在分子筛上使其干燥，并把另一半与水混合，把两部分溶剂以 1 比 1 进行混合，就行成了 50% 水饱和的流动相，如果硅胶柱所用的溶剂全是这样配制的，平衡时间就会缩短，保留时间的准确度也会提高。还有其他的方法，包括在能与水混溶的溶剂中混入一定量的水分。不能与水混溶的溶剂如己烷、戊烷、和庚烷可以与 0.05 的乙腈混合也能起到相同的作用，为了节省时间，你可以使用一个新的瓶子装干燥的溶剂。

工作表

工作图



5% 四氢呋喃
95%异辛烷

邻苯二甲酸二丁酯
邻苯二甲酸二甲酯
邻苯二甲酸二壬酯
邻苯二甲酸二乙酯

- 你估计在正相色谱柱上邻苯二甲酸二酯以什么顺序洗脱出来?
- 如果把流动相的成分变为5% 甲苯, 95% 异辛烷, 你估计色谱图应该是什么样子?

回答上述问题。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

体积排阻色谱 (SEC)

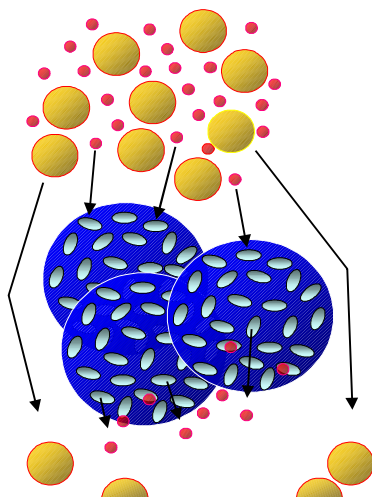
在这一节，你将学习：

本节，你将学习：

- 有关体积排阻色谱的各种应用。
- 有关它的分离机理。.
- 优化提示。

体积排阻色谱

体积排阻色谱的原理



机理:

- 分子大小决定流出顺序。

固定相:

- 具有一定孔径的交联凝胶。
- 一定不能和样品作用。

流动相:

- 水做溶剂-凝胶过滤。
- 有机溶剂-凝胶渗透。

GPC 分离机理

体积排阻色谱 (SEC) 是最容易预测和最容易理解的 HPLC 模式，这一方法也叫做**凝胶渗透色谱 (GPC)** 和**凝胶过滤色谱 (GFC)**，是那一种，决定于应用领域和所使用的流动相。

GPC 使用聚合物胶做固定相，用以分离有机分子如聚合物，它是按分子大小进行分离的。如果聚合物只溶解在如四氢呋喃的有机物中，其溶剂一般是非极性的。

GFC 使用以硅胶为基的填料做固定相，主要用于生物化学，流动相是水溶性缓冲溶液。

化合物的分离是基于分子的大小，固定相是具有一定孔径的刚性、半刚性的颗粒（有机或无机），为了上述目的假设它们是圆锥形的，实际上它们是无定形的。

应用

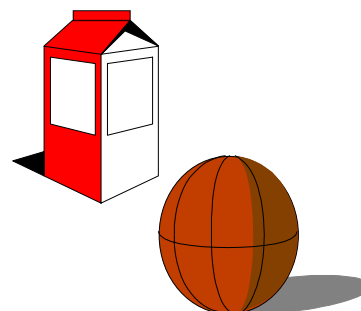
应用

凝胶渗透:

- 日用品, 增浓剂
- 化妆品, 稳定剂,
- 医药处方, 药物释放控制剂
- 建筑材料, 涂料, 混凝土添加剂
- 汽油, 添加剂
- 汽车轮胎, , 橡胶配方改进剂
- 印刷品, 调色工艺
- 电路板, 平板印刷树脂

凝胶过滤:

- 肽
- 蛋白质
- 酶
- 核酸
- 类脂物



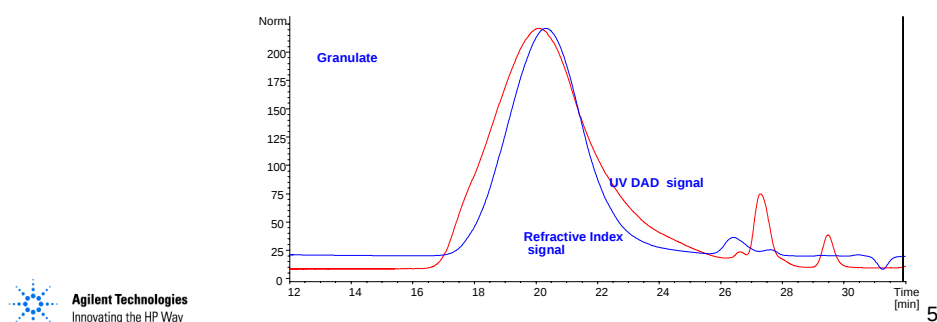
4

GPC 是一种常规方法, 常常用作可靠和廉价的分子量表征方法, 这一方法主要用于聚合物制造业的质量控制和其他许多领域, 这些领域把聚合物作为它们最终产品的一部分, 由于它用在生物大分子和合成高聚物中使用, 所以在工业中得到广泛的应用, 分离可在水相中进行, 也可以在有机固定相和使用适当的溶剂进行分离。

一般应用

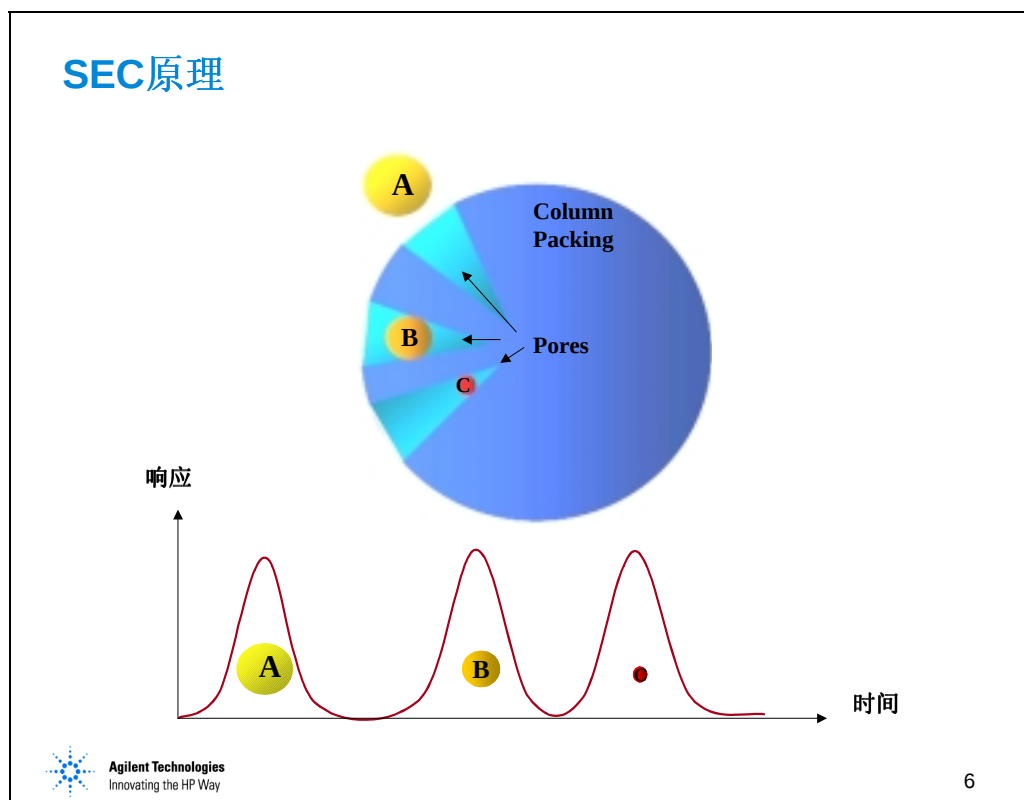
体积排阻色谱的一般应用

- 大多用于聚合物的平均分子量或分子量分布的测定。
- 为复杂样品提供“指纹图”，有助于区别“好”与“坏”。
- 样品净化方法。
- 生物分子的定性和定量分析。
- 小分子的分离。



体积排阻色谱有许多用途，把被测物和标准物的洗脱体积进行比较可以测定其分子量，工厂常常把体积排阻色谱的色谱图形用做 QA/QC（质量评价/质量控制）。体积排阻色谱也用做样品的净化，用以除去不需要的小分子和大分子。在生物科学领域常使用 GFC 进行定性分析和定量分析。虽然体积排阻色谱一般用做分子量大于 2000D 的物质，现在也可以把它用于小分子的分离。

原理



现在研究一个含有三个不同分子量样品的混合物，其中 A 是分子量最大的，C 是最小的。

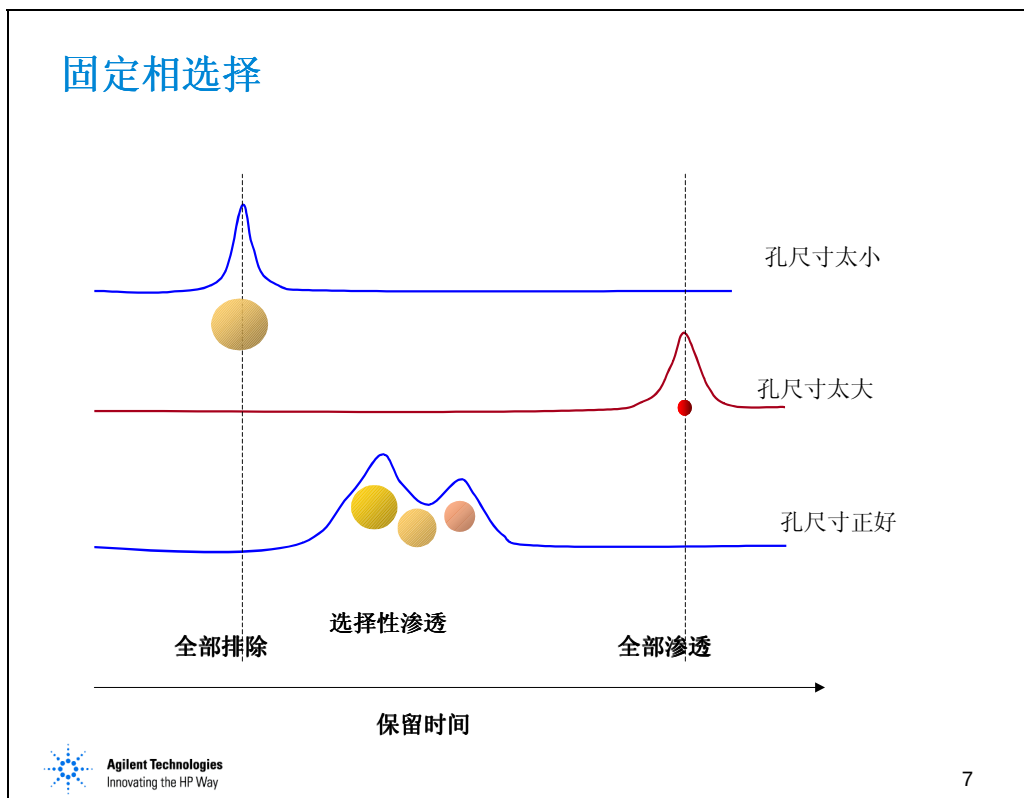
组分 A，不能适应任何一个填料的孔径，它最先被洗脱出来，这些分子完全被排斥，它们的保留体积叫做全排斥体积，是填料胶的特征（参数）。

组分 B，适应填料的中等孔径，所以它移动要慢一些，在 A 之后流出。

组分 C，可以渗透到所有填料的孔径，一直到末端的孔，所以在固定相中消耗了较多的时间，最后才被洗脱出来。

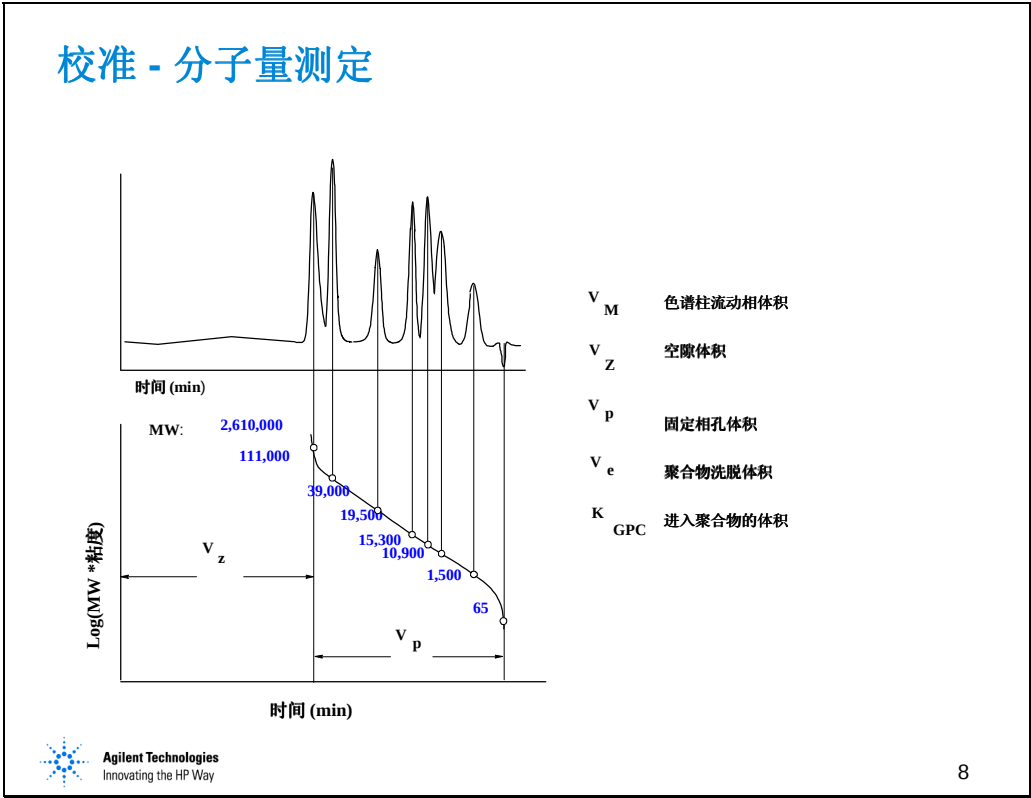
所有比 C 还小的分子以一定的保留体积流出色谱柱，这一保留体积叫做全渗透体积，所以实际的分析时间在全排斥体积和全渗透体积之间。

固定相的选择



如前所述，分离是和样品分子的大小有关，这就是说在保留体积和样品分子量之间或者假设在流速恒定条件下，保留时间和样品分子量之间存在一定的关系。

校准



在保留体积和分子量之间的关系可以用校准曲线表示。

测定分子量的步骤如下：

- 233) 用已知分子量的样品进行色谱分析（含有不同标准的混合物）。
- 234) 使用测得的数据建立一个校准表，并表示为校准曲线。
- 235) 进行样品的分析，可以计算分子量的分布。

色谱条件

和正相色谱一样，色谱柱的板高随填料颗粒直径增加而增加，这就是说使用很小颗粒的填料对分离大分子样品是有利的，这些填料应是全多孔的。

GPC 或 GFC 使用主要以聚苯乙烯为基础的半刚性胶和以硅胶为基础的刚性胶。

体积排阻色谱 (SEC)

校准

在大多数 GPC 中能使用聚苯乙烯填料和大多数非极性有机溶剂，如 THF（但是不使用丙酮、醇和水），在大多数情况下厂家提供一个可以使用的溶剂名单。

无梯度洗脱的功能，所以不能使用梯度洗脱，因为在 SEC 中没有吸附或分配的作用。

要知道一个很重要的问题是分子由于其环境的变化会改变它的大小，也就是说在一种特定的溶剂中可以适合聚苯乙烯的孔径，而溶解在不同的洗脱剂中时，却不能进入聚苯乙烯同样的孔径。

所以知道分子的绝对半径并不重要，知道分子在溶液中的流体力学半径：在溶液中的分子的尺寸很重要。

不仅是分子的大小而且它的几何形状也很重要，因为一个同样分子量的分子他的枝链很不相同，会导致色谱结果对方程式中已知或假设分子形状的依赖性。

GPC 计算

GPC 计算

$$\bar{M}_n = \frac{\sum \text{Area}_i}{\sum (\text{Area}_i / M)_i}$$

Number average molecular weight

$$\bar{M}_z = \frac{\sum (\text{Area}_i \times M_i^2)}{\sum (\text{Area}_i \times M)_i}$$

Z- average molecular weight

$$\bar{M}_w = \frac{\sum (\text{Area}_i \times M)_i}{\sum \text{Area}_i}$$

Weight average molecular weight

$$\bar{M}_v = \frac{\sum (\text{Area}_i \times M_i^{1/h})}{\sum \text{Area}_i}$$

Viscosity average molecular weight

$$D = M_w / M_n$$

Polydispersity

$$W_i = \frac{\text{Area}_i / \text{Slope}_i}{\sum (\text{Area}_i / \text{Slope}_i)}$$

Molecular weight distribution



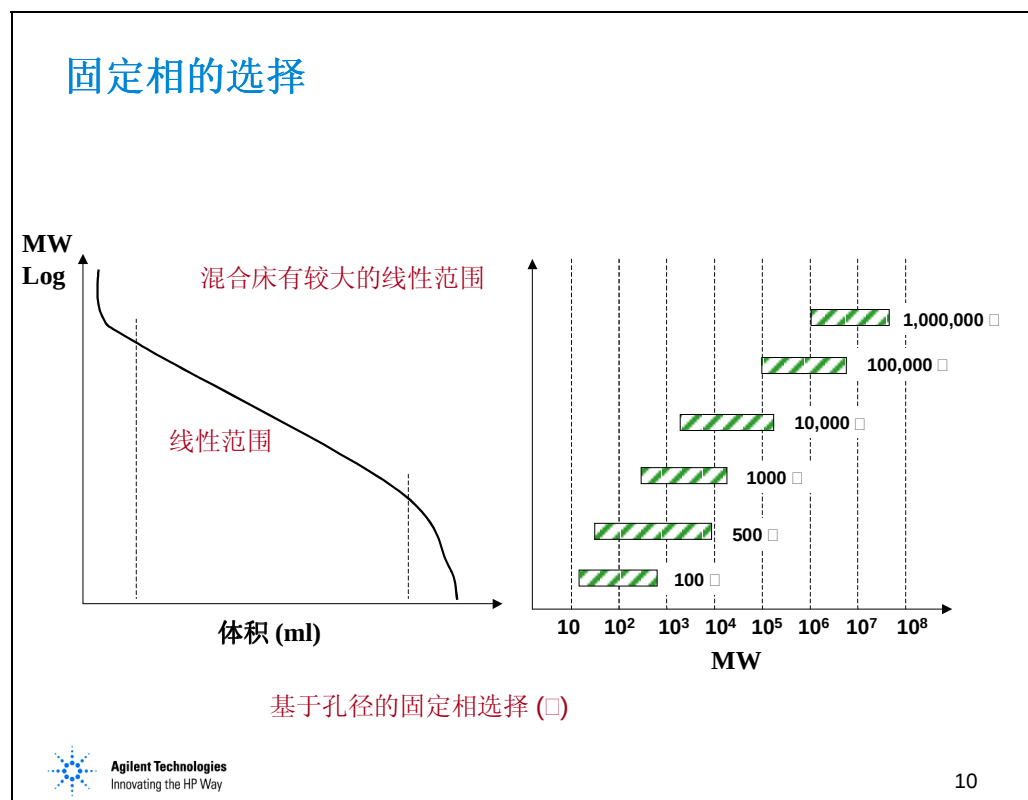
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

9

上面你会发现一些 GPC 的典型计算方法，在 GPC 分析可进行聚合物的平均分子量和分子量分布的测定，为聚合物的表征像强度和流动性提供重要的信息。

Ref.: Wu, *Handbook on Size Exclusion Chromatography*, 1997
Marcel Dekker (Ed.), New York

固定相的选择



所选择的色谱柱应具有较宽的使用线性，如果必须要扩展其线性，即样品的分子量超过其线性范围，可以把不同的色谱柱串联起来，或使用双模式（混合床）色谱柱（含有两种不同大小粒度的色谱柱）。

通过优化温度来优化分离过程，因为温度强烈地影响流动相的粘度和流动相对样品的溶解度。这对分子量大的分子十分重要，典型的检测器是 UV 检测器和 RI 检测器，UV 检测器要比 RI 检测器有更强的选择性。

SEC 分离度

优化 GPC 分离度

分离度公式:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_2}{1 + k_1}$$

柱效 选择性 容量

- 降低流速
增加柱长
- 无分配作用,但是适当的孔径有影响
- 在固定相上无保留作用

有一点要特别说明的是在 SEC 中基线分离是很重要的,但只有分子量差别至少为 10% 时才能使两个化合物的分离达到基线分离。要达到最大的分离度你要关注一下分离度的公式。在 SEC 中,我们不能依靠样品和固定相之间的作用进行分离,实际上不应该和固定相有任何作用,所以也不能依靠这一作用来提高其分离作用,只能靠选择孔径大小来略加影响其选择性。第一重要的是柱效,为了提高柱效只能减小柱流速和增加柱长,可以使用较长的色谱柱或把色谱柱串联起来使用,增加柱长的缺点是提高了柱压力和加长了分析时间,柱填料必须有足够的强度以免在高压下坍塌。

SEC 的技巧

体积排阻色谱提示

- 大体积进样会降低分离度，保持样品体积为峰体积的5-10%。
- 流速改变 0.5% 使MW 改变0.7% 。
- 改变1°使MW 改变0.1% 。
- 两个柱体积内可完成分析。
- 被测物的粘度不应大于二倍溶剂的粘度。
- 降低流速可提高柱性能（也避免让大分子聚合物逃开）。
- 有必要使用多柱分析,便于分析小的分子。
- 要使相邻化合物能够分离，它们的MW必须相差至少 10%。



上面所示是一些尺寸排阻分析的技巧。

对系统的要求

对GPC系统的要求

- 硬件
 - 泵流量精确，保留时间RT的精度 要 $< 0.1\%$
 - 在线脱气
 - 色谱柱要恒温溶剂要预热
 - 检测器的噪音和漂移要最小
 - 系统有长时间的再现性
 - 自动进样器维护率要低
- 软件
 - 容易用于例行分析
 - 可以使用标准的HPLC 软件
 - 与GPC 标准相适应, e.g. ISO/EN/DIN
 - 适应于常规的校准
 - 有自动和相互的数据分析和做报告的功能
 - 用户要求的报告形式 (%质量, MW 分布, 图, 计算结果)

为了获得可靠的 GPC 结果，保留时间的精密度必须优于 0.1%。这一要求在泵系统和（如果有足够的溶剂）和在线的脱气系统是可以达到的。要有恒温的色谱柱柱箱并使溶剂预热，优化 GPC 色谱柱（典型的 I.D. 大于 4.0 mm，流速 1-2 ml/min）的恒温，就可以达到这一要求。这样可以减小色谱柱内部的温度梯度，检测器的基线也要稳定，这就说明检测器的噪音和漂移要很低。最后整个系统需要有很长时间的稳定性，以便可能对峰形在一周、一月，甚至一年里进行比较。

最后 GPC 是一种常规的高样品容量的方法，在硬件上要使用一种提高重复性低消耗费用的自动进样器，从软件上讲必须要容易使用，这就像常规 HPLC 软件包依赖一个标准方法那样，并具有 GPC 数据分析的运算方法。这一方法只需要增加一些训练内容就可以了。遵循国家和国际标准应当贯彻避免额外的运转。按照分析的要求可以使用不同的校准标准和步骤（如窄的，宽的，或通用的）。由于用户有不同的需求，需要一种融合自动化和交互进行数据分析和写出报告的设备。

方法的开发
对系统的要求



方法的开发

在这一节，你将学习

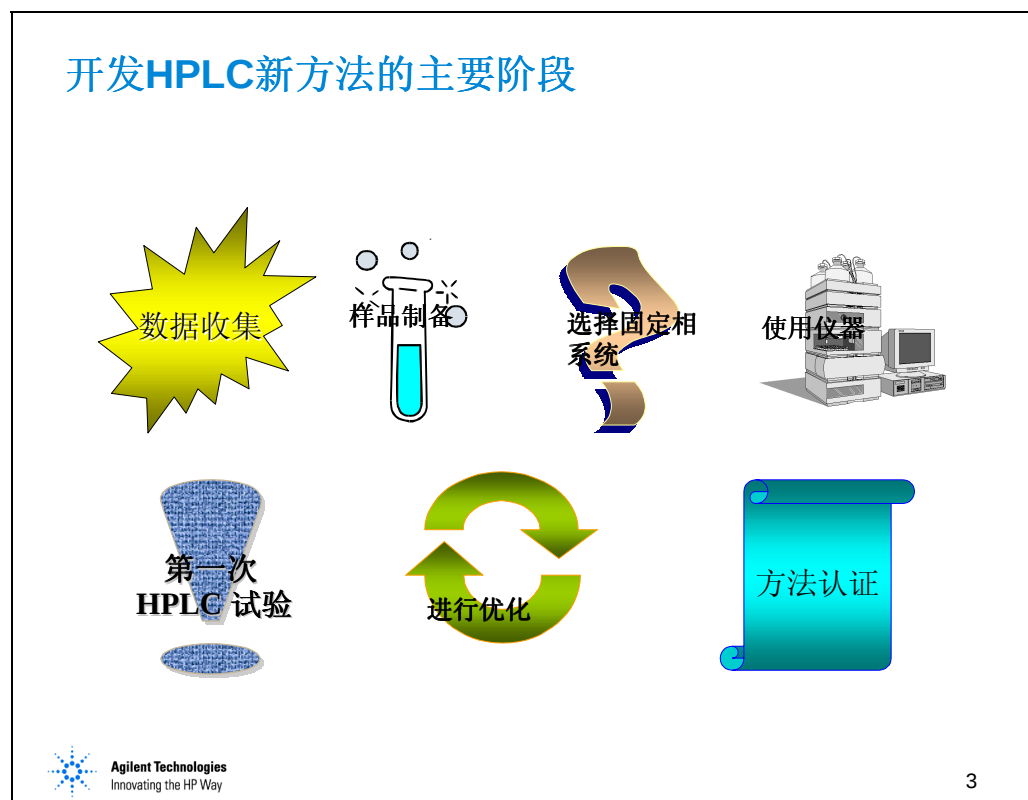
在这一节，你将学习：

如何在总体结构上开发一个HPLC方法：

- 收集数据
- 选择固定相
- 制备样品
- 进行分析
- 优化

在这一节，你们将讨论方法开发的原理，并观察分析巴比妥酸盐样品的系统的结果。

方法开发的步骤



方法的开发分七个大的步骤，第一步是数据的收集，所有有关样品和分析目的方面有用的资料都要收集，依靠这些资料来决定固定相的选择和样品制备方法。要考虑对仪器的要求以及使 HPLC 系统装配符合分析的要求。在此基础上进行优化之后，做第一次分析试验，最后，要对方法进行认证。

数据收集

收集有关样品的资料

- 溶解度
- 检测的可能性
- 离子的特性
- 摩尔质量
- 样品的数据/ 基体

定性分析:

- 标准化合物
- 空白基体

定量分析:

- 预计的检测限
- 预期的定量限
- 内标化合物?
- 标准化合物
- 空白基体



4

有关化合物的溶解度— 他们必须在流动相中可以溶解，所有方法开发的步骤中数据收集也许是最重要的一步，你得到的数据越多成功地开发一个分析方法的机会也越多，在实际开发中你必须确定下面的项目：

- 样品组分的结构和分子量。
- 离子性或非离子型特点。
- 样品组分的溶解度—它们必须能溶解在你所选定的溶剂中。
- 检测性能预估和检测器特点—这一化合物在 UV 上是否有吸收,是否需要样品进行衍生。
- 样品的基体。
- 是否需要开发定量分析方法，还是只需要定性分析方法？

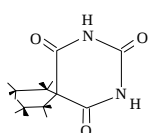
方法的开发

数据收集

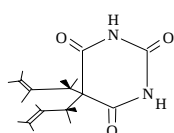
- 需要把一部分样品单独离析出来吗？
- 有多少样品。
- 要使用几种 HPLC 的模式？

数据收集

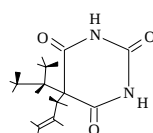
巴比妥酸盐



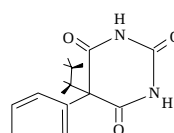
Mephobarbital
MW = 234.23



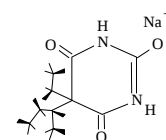
Allobarbitol
MW = 208.21



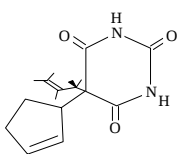
Aprobarbital
MW = 210.23



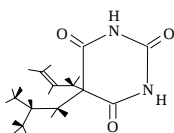
Phenobarbital
MW = 232.23



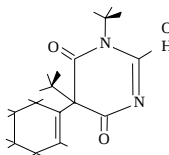
Butobarbital
MW = 234.23



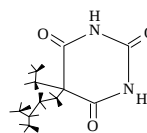
Cyclopentobarbital
MW = 234.24



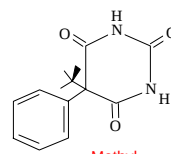
Butalbital
MW = 224.25



Hexobarbital
MW = 236.26



Amobarbital
MW = 226.27



Methyl-
Phenobarbital
MW = 209.24



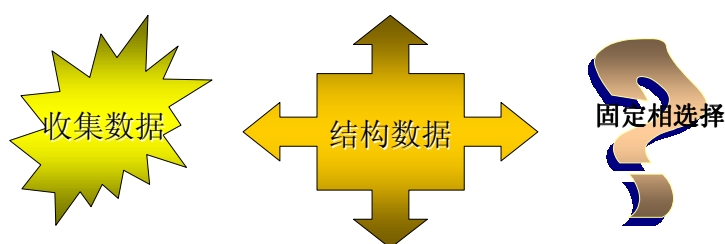
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

5

这张幻灯片是介绍一个分离巴比妥酸盐的例子，研究上面提出的巴比妥酸盐的结构，其结构的共同特点是什么？它们彼此之间结构的差别是什么？它们各自的分子量是多少？

固定相的选择

哪些化合物参数能用于分离？



- 分子大小的差别/MW > 2000
- 离子性分子
- 极性差别
- 同系物/苯系物
- 中性，酸性，碱性混合物，
- 生物分子
- 立体异构体
- 手性化合物
- 凝胶渗透/凝胶过滤
- 离子对/离子交换
- 吸附/反相Reversed phase
- 反相
- 反相
- 亲和/HIC/GF/RP
- 吸附
- 手性色谱

问自己下面的问题来决定固定相，样品的分子量大于或小于 2000 amu？除非分子量差别至少为 10% 否则不能用体积排阻色谱分离，如果你的样品分子量大于 2000 那么就可以使用体积排阻色谱。

样品能离解吗？如果在溶液中是离子，是强酸或强碱，那么就可以选择使用离子对或离子色谱。

在分子上的功能团极性有差别吗？首先设法使用反相色谱，如果反相色谱不行，或样品不溶解在流动相中，试验用正相键合相色谱柱进行分离。

分子上的含碳功能团有差别吗？如果有差别正好可以使用反相色谱。

样品是否弱酸、弱碱还是中性混合物？如果是的话用反相色谱在流动相中加入改性剂是最佳的方案。

如果你要分离的是生物分子，是否要恢复其中蛋白质的活性？如果是这样，就需要使用 HIC（疏水作用色谱）或凝胶过滤色谱（没有有机改性剂），反相色谱也是一种有用的分离技术，亲和色谱有很高的专属性。

开始时色谱柱的选择

选择开始的色谱柱

选择色谱柱:

- 固定相
- 直径
- 长度
- 颗粒大小
- 孔径大小



对平均难度的分离对象所用的典型起始色谱柱:

4.0 - 4.6 x 150-250 mm, 3.5 - 5 μm 颗粒 80-120 nm 孔径 (小分子)



7

在你开始进行色谱柱选择时你不仅要决定固定相，而且也要选择色谱柱的参数，柱内经很重要，对典型的分析色谱柱柱径为 4.0 到 4.6 mm.，如果你的样品量少要选择细内径色谱柱，当回收样品很重时，做制备色谱就要选择大内径的色谱柱。

如果你已经知道是组分 > 15 的复杂样品时，就用 250 mm 长的色谱柱开始进行研究，如果是简单组分的分析就使用短色谱柱，最后，如果你要进行快速分析节约时间就要使用短的色谱柱。

典型情况下，选择 3.5 – 5.0 微米颗粒的填料，要进行快速 HPLC 分离你可以选择 3.0 微米颗粒的色谱柱，但是它的分离能力将受到长度的限制。

对仪器要考虑的事项

对仪器要考虑的事项

泵

- 等度或梯度
- 流速和所需的成分精密度
- 流速范围 (分析或制备)

连接管

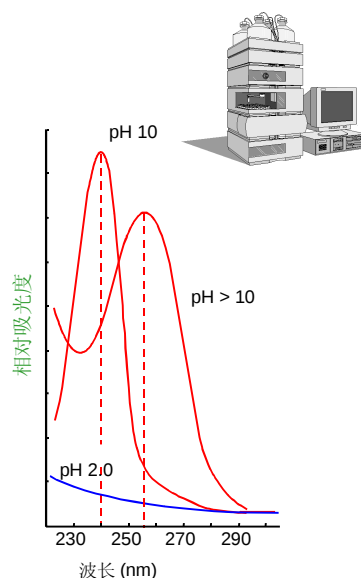
- 金属或特殊材料
- 低分散性

柱箱或切换阀

检测器

- 灵敏性
- 选择性
- 定性分析

回收率



要说明的是UV 特性随流动相pH变化而改

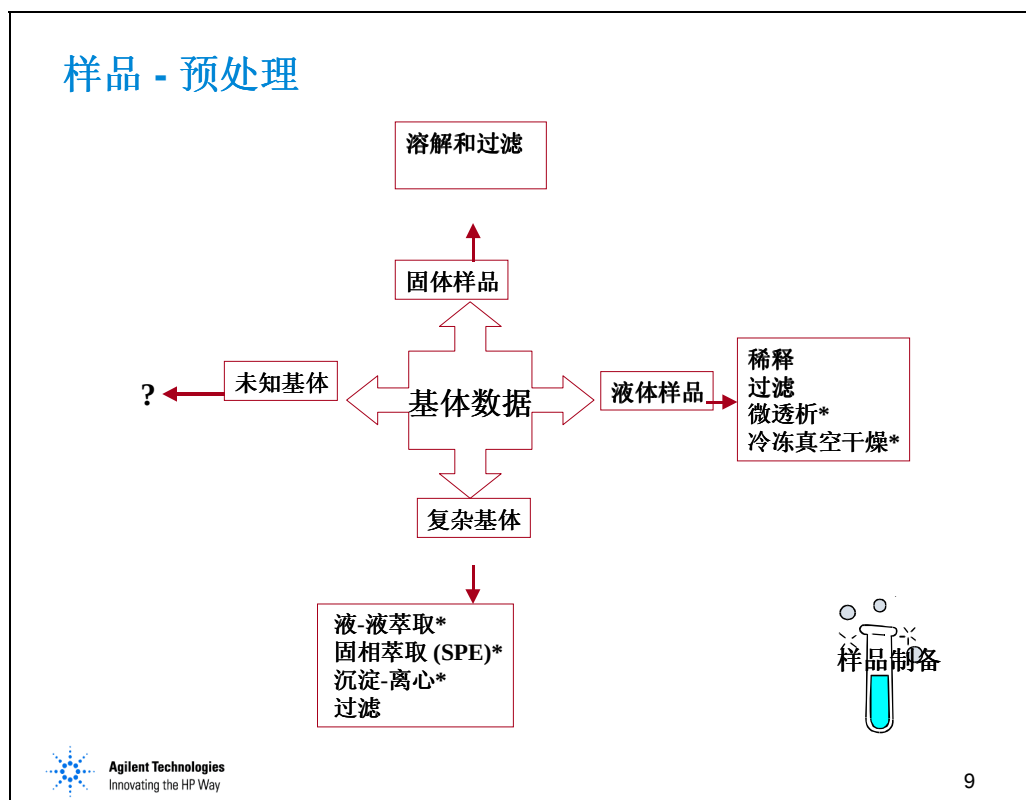
你的分析目的会对仪器提出要求，也许你要为其他实验室使用不同的 HPLC 仪器开发一个 QA/QC 方法，因为延迟体积不同，不宜开发梯度分析方法。如果样品复杂，你可能要求仪器有高精密度的流量控制和能够进行高重复性、复杂梯度曲线的梯度洗脱，你要求有制备分离的功能吗？如果需要，输液泵就要有大于 5 mL/min 的流量。

你要分离蛋白质吗？如果需要，就要使用 PEEK 管件的 HPLC，如果你的样品量少是否就要使用细内径柱或微径柱？对这样的方法就需要 HPLC 仪器具备低分散性的连接管和小体积的检测器流通池。

你是否需要高精密度的保留时间用于定性分析？如果需要，就要有色谱柱柱箱，你是否需要柱箱提供的特殊的选择性？对复杂的分析需要使用切换阀，包括样品净化和中心切割。

检测器是一个要特别考虑的重要问题，你首先要确定所需要的检测限，此外你必须要确定要求检测器有怎样的特性，是否需要除去保留时间以外的定性分析鉴定功能？如果是这样，那你就需要使用 LC/MS，你需要低的检测限吗？你就必须使用荧光检测器或电化学检测器。

样品预处理



在进样之前所有的样品必须以某种方式进性处理，最简单的处理是对样品进行过滤，HPLC 提供一个过滤各种样品用的产品目录，并有对你所分析样品该选择什么样过滤材料的说明。

如果你要分析的样品是固体，那你就把它溶解在某种溶剂中就可以了。对液体样品，用流动相或使用比预期要用的流动相强度弱的溶剂进行稀释。对复杂的基体，在上色谱柱分离以前要进行净化，常用的方法是液-液萃取和固相萃取。

样品预处理

样品预处理的目的是为进样而净化样品。

完成此目的的途径:

- **过滤** - 用不同孔径的过滤材料。

提示: 化合物可能吸附在过滤材料上而影响定量结果。

- **离心** - 除去样品中的颗粒物。



10

样品过滤是样品处理绝对的最低要求，如果你要进行定量分析，要确定样品的回收率是否合适。

离心方法能把可溶性样品组分从不溶解样品组成中分离出来。

样品处理- 固相萃取 (SPE)

SPE 的目的是从基体化合物中分离被分析物。

液体通过固相, (LC 原理) 选择性地出去被分析物或基体化合物

.

用不同的溶剂洗脱被分析物或基体, 留下其中的一种。



11

固相萃取操作原理和液相色谱相同, 一个 SPE 小柱装有固定相的小管子, 一种方法是在小柱上把样品用适当的溶剂和杂质分离开, 把杂质从小柱上冲洗出去, 然后在使用另外一种溶剂把所要研究的组分从小柱上洗脱出来。

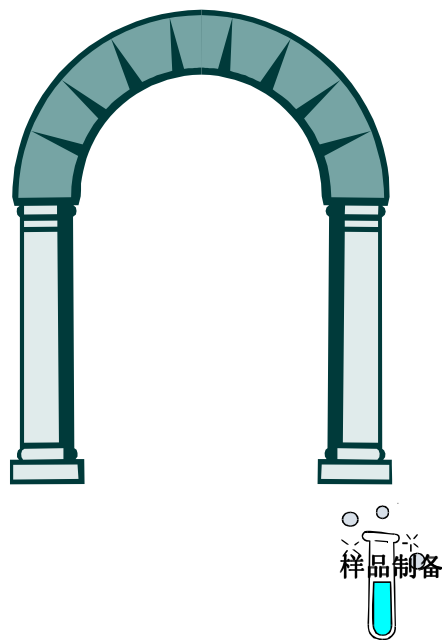
样品也可以在固相萃取小柱进行浓缩, 然后再把它洗脱出来。

样品制备

样品处理- 固相萃取 (SPE)

SPE 步骤:

- 冲洗萃取用小柱
- 加样
- 冲洗
- 洗脱
- 收集
- 浓缩
- 过滤



为了使用 SPE 小柱，执行下面的步骤：

236) 按厂家的建议冲洗固相萃取小柱。

237) 往小柱中加样。

238) 加入适当溶剂把样品的大部分基体冲洗出去。

239) 加入第二次溶剂洗脱出要分析的样品化合物。

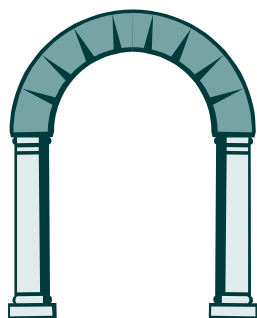
240) 收集洗脱溶剂。

241) 除去溶剂使样品组分浓缩。

242) 进样分析。

样品处理- 液-液萃取

使用两种互不混溶的溶剂分离样品化合物.
靠溶解度的不同而得到分离.



13

液-液萃取是一种廉价的分离和纯化样品的方法，要分析的溶质分配在互不混溶的溶剂中，在两相中的分配量决定于它们在两种溶剂中的溶解度，常常一种溶剂是水，另一种溶剂是有机溶剂。无机物、离子、和极性化合物溶解在水相，非极性有机物将分配在有机相。要小心不要形成乳状液，加入盐可以破坏乳状液，一定要仔细处理分离好的样品。

样品处理- 稀释- 蒸发

- 稀释
用可混溶的强度小于流动相的溶剂稀释样品, 或用流动相稀释样品.
- 蒸发
用惰性气体鼓泡或用真空蒸发溶剂.



14

常常使用适当的溶剂来稀释液体样品到适当的浓度、过滤然后直接进样。稀释所用溶剂应弱于或等于 HPLC 方法的流动相强度, 如果这一溶剂比较强, 色谱峰形会变坏, 尤其是进样体积大于 25 μL 时更容易使峰形变坏。

为了浓缩样品, 可把惰性气体通入样品进行鼓泡, 一定要注意不要使气体通入太快, 否则不仅挥发了溶剂, 样品也可能损失。

样品处理- 微透析 - 冷冻真空干燥

透析:

- 把一个半透膜置于样品溶液和大体积水性溶剂之间.
- 靠浓度差样品化合物从一种液体进入另外一种液体。.

冷冻真空干燥:

- 把水性样品冷冻, 在真空下把水升华.



15

生物样品经常使用透析的方法。这一方法是放置一个半透膜于样品和大量水性溶剂之间，可扩散组分通过半透膜进入到水相，扩散过来的量正比与它的浓度，但也决定于样品的成分。

低温冷冻干燥包括把水溶液样品进行冷冻，然后在真空下升华，低温冷冻干燥对不挥发性样品很使用，但是无机无物会浓缩。

第一次分析

准备第一次分析

选择流动相

选择方法构架:

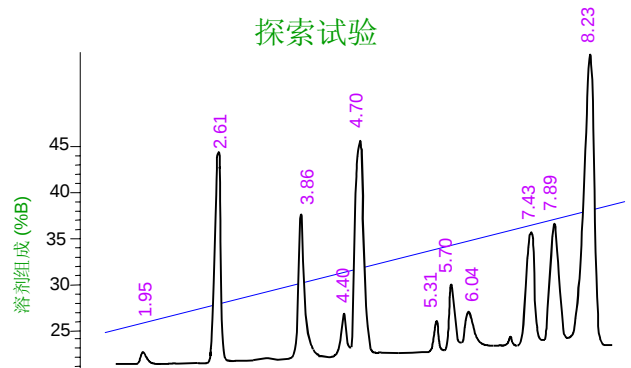
- 预先研究
- 开始用强洗脱剂等度洗脱，每次降低一些洗脱剂强度
- 梯度探索性试验
- 制备标准样
- 过滤你的样品
- 安装色谱柱
- 冲洗色谱柱-老化
- 平衡检测器
- 进样
- 观察结果



一旦把样品制备好了，你就可以准备进行第一次色谱试验了。设法使制备的样品中各个组分都能在检测器的线性范围内，如果你知道在样品中含有可离解的化合物，看这一节后面介绍的有关方法开发的流速图表。安装色谱柱并进行老化。

你决定是否使用等度或探索性试验开发这一分析方法，等度方法是开始使用100%的强溶剂进样洗脱，典型情况下你只会看到一个峰，把强溶剂减少到90%再进样，继续减少流动相中的强溶剂含量，当你找到了最好的总溶剂强度时，再以更小的间隔改进流动相的成分。另外一种方法是以探索性梯度洗脱的方式进行，你可以用探索性梯度洗脱的方式开发等度或梯度洗脱的方法。

第一个分离步骤



第一次First
HPLC 试验

色谱柱: C18, 4.6 x 200 mm, 5 μ m 颗粒
流速: 2.00 mL/min
溶剂 A: 水
溶剂 B: 乙腈
柱温: 40° C



17

在这一个例子里，第一步用探索性试验方法分析巴比妥酸盐，探索性试验是用 5% 到 100% 乙腈来进行，如上图所示，乙腈含量在 28% 到 38% 之间，所有的色谱峰全部洗脱出来，要注意的是色谱柱和流动相都是选用反相色谱分析中性化合物的条件来进行的，选择了 4.6 x 200mm 的色谱柱。

第一个结果

第一次试验的结果可能是:

没有峰/响应

- 浓度太低
- 检测类型不对

进样高浓度样品或不经
色谱柱进少量样品

正响应

是
否

检查 HPLC 系统

不好的分离峰

改变流动相

优化系统

第一次 HPLC
试验



18

在第一次实验中你碰到了什么问题，其中检测不到色谱峰或没有保留值，如果你没有找到你要分析化合物的色谱峰，就注射一个浓度大一些的样品，如果还没有找到你要检测的样品，就把色谱柱卸下来进样，现在看到有色谱峰出来吗？如果还没有色谱峰出来，就要检查是否是你的检测器有问题了，检查你制备样品的方法，最后你必须检查 HPLC，看它的模式是否正确。

如果在反相条件下保留值很小，在样品溶液中可能有离子，改变 pH 或加入离子对试剂。

优化

优化综论

优化必须系统, 就是说每一个参数必须一步一步改变.

每一次试验只能改变一个参数!!

目的是在较短的时间里得到最好的分离.

- 优化溶剂强度
- 流速
- 温度
- 柱长
- 固定相*



一旦完成了第一次试验, 进一步就要优化溶剂的强度, 如果色谱峰分离不好就要设法使用不同的溶剂组合改变其选择性, 这一试验成功了就优化其他的 HPLC 参数, 如流速和温度。

如果色谱峰分离很好了, 你可以换上短的色谱柱来缩短分析时间。如果分离不好就换上长一些的色谱柱或改变固定相。

等度或梯度分离？



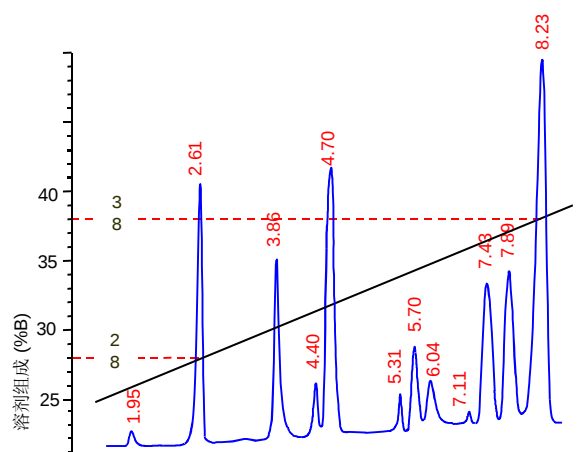
如果从第一个峰到末一个峰%B的变化 < 15%B，那么就用等度洗脱，这样节省时间

第一个峰= 28%

末一个峰= 38%

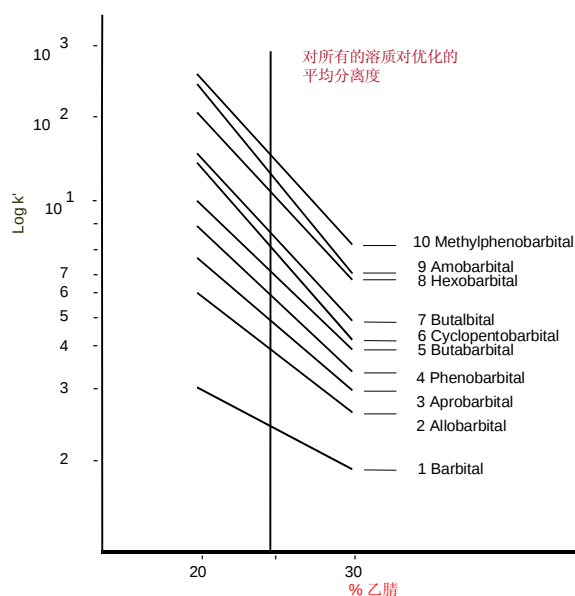
变化 = 10%

可能使用水/乙腈
的等度洗脱



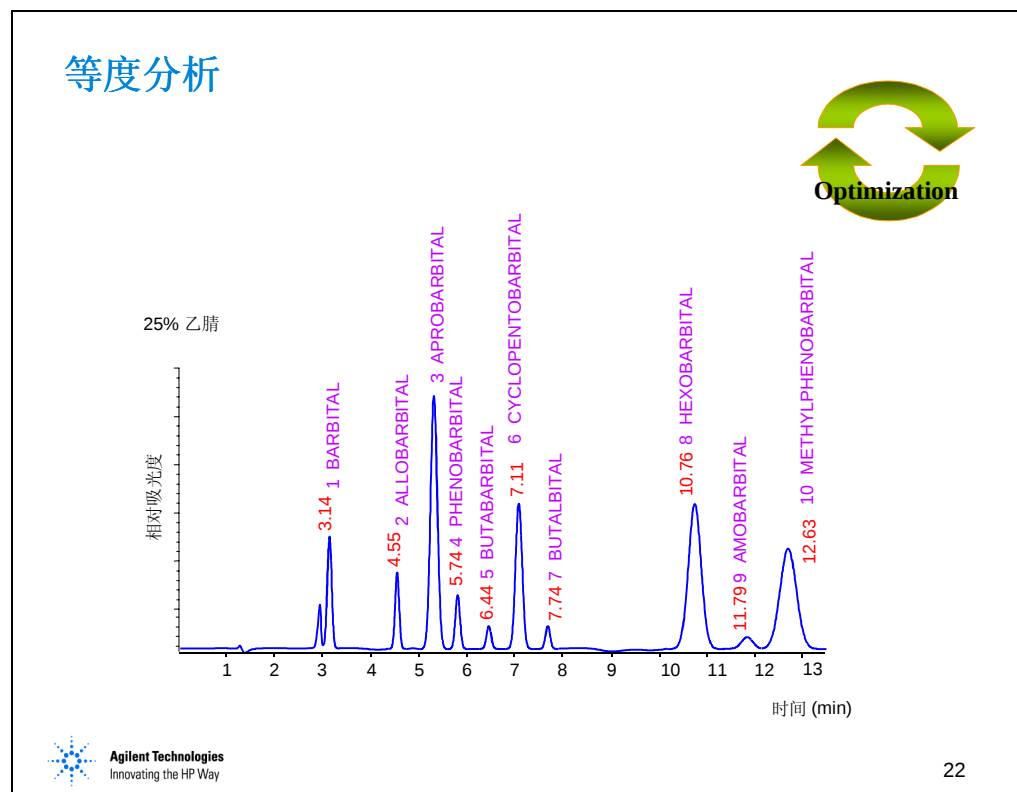
所有巴比妥酸盐在流动相 % B 组分（有机物）为 10% 时全部洗脱出来。如果以小于 15% B 组分，流动相可以把第一个峰到末一个峰洗脱出来，就可以等度洗脱方法完成此分析任务。使用梯度方法在每次分析之间一定要进行再平衡，这样会增加总的分析时间，所以碰到上述情况就可以选择等度洗脱方法。

等度方法的优化

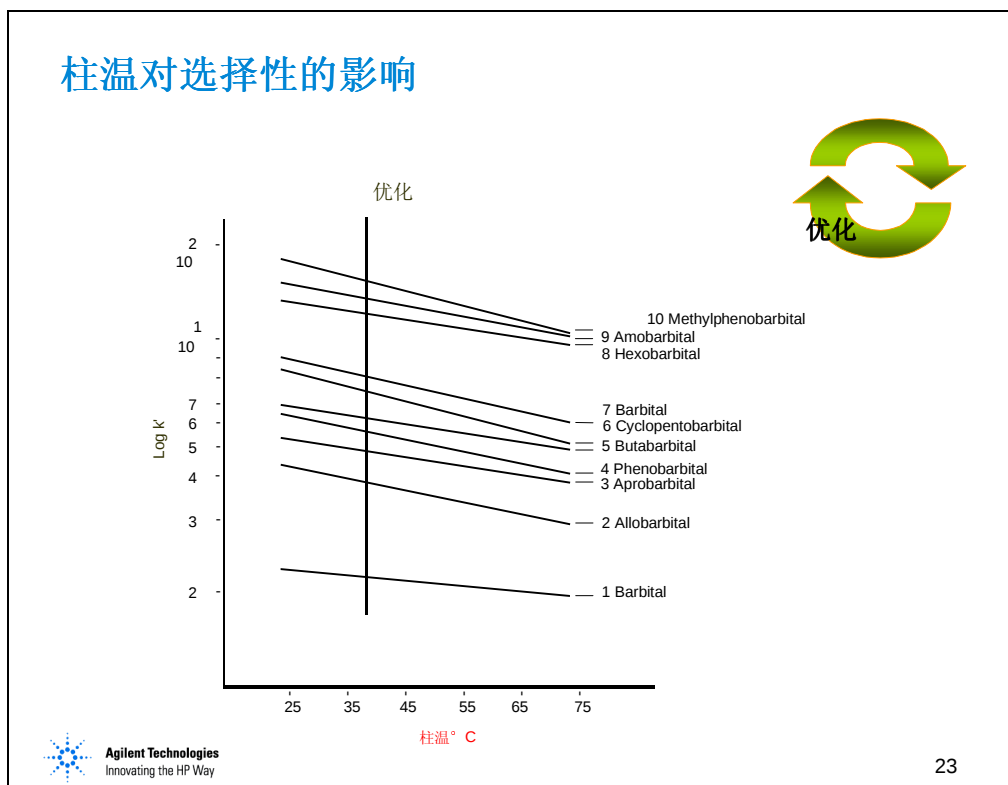


有一个方便的办法可以确定等度洗脱所用流动相组成，就是在两次不同的流
运相组成下，运行两次不同的 HPLC 分析。在上例中，巴比妥酸盐 20%，
乙腈 30%。将每一化合物的 $\log k'$ 对流动相组成作图，对每一组分两个点可
以决定一条直线。直线中间的、对应最佳分离的流动相组成就是最佳分离度
的流动相组成。市场上一些方法开发软件包就用到此技巧。

方法的开发
优化

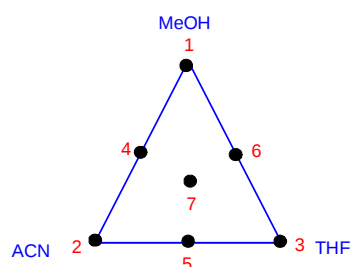


从两个实验的结果看使用 25% 的乙腈，再进行样品的实验时就使用这一条件，其他的参数保持不变。

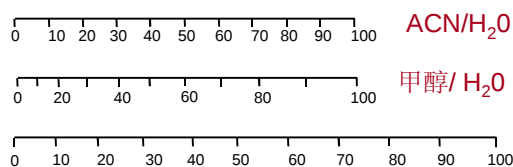


一旦确定了合适的流动相组成，你可以优化第二个参数流速了，用 25% 的乙腈再进行两次试验，一次在 25 °C 另一次在 75 °C，把得到的结果画图，要注意每次结果得到曲线的斜率都不同，这就说明温度不同时对峰间距离有很大的影响，甚至使峰颠倒，在此情况下，最好的测定温度是 40°C，要记住高温下会缩短色谱柱寿命，这是由于在高温下会使填料分解，硅胶柱不得在高于 80°C 柱温下操作。

优化流动相- 难分离物质



- 从甲醇/水优化溶剂组成，这样可使所有的峰在合理的 k' 范围内洗脱出来.
- 下一次进样选择等强度的ACN/水溶剂.
- 用THF/水流动相重复实验.
- 后面的四次进样按已经讲过的方法使用混合等强度的流动相进行.



对很复杂的样品你可能要试验其他的流动相组合，在前面的实验里你已经确定 25% 乙腈是最好的流动相组成，在这一前提下选择同样洗脱强度的其他适当的溶剂如甲醇再进行试验，在一般 HPLC 教科书中可以找到等强度溶剂的图表，如果在这三种溶剂中改变组成不能奏效时，就使用上述三角图中描述的 4-7 的实验。

三种流动相的比较



	25% 乙腈	38% 甲醇	21% 异丙醇
2 Allobarbitol		2	2
3 Aprobarbitol		3	4
4 Phenobarbitol		4	3
5 Butabarbitol		5	5
6 Cyclopentobarbitol		6	6
7 Butalbital		7	7
8 Hexobarbitol		8	9
9 Amobarbitol		9	10
10 Methylphenobarbitol		10	8



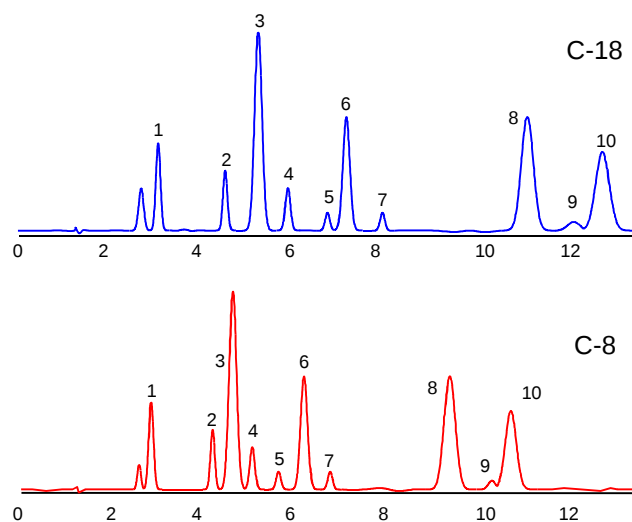
洗脱顺序

选择性

25

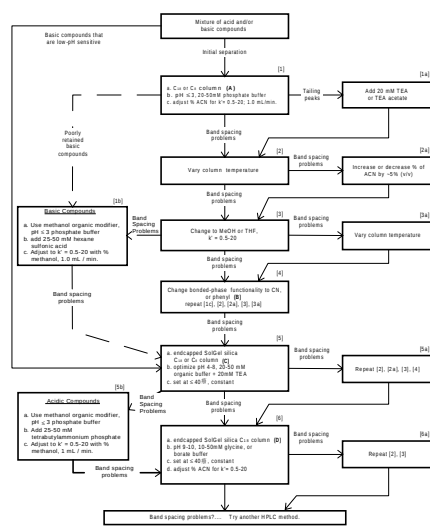
在巴比妥酸盐的例子中，试验的洗脱剂甲醇和异丙醇有同样的强度，在第二栏中的数字是两个峰之间的选择性，你要选择哪一个溶剂呢？

固定相的优化



在这个例子里，开发方法人员决定分离度达到足够的要求了，但是分析速度慢，他想使用 C-8 和梯度洗脱也许能在两分钟内完成分离，另外一个办法就是试验缩短柱长。

对反相HPLC分离离子型化合物方法开发的策略



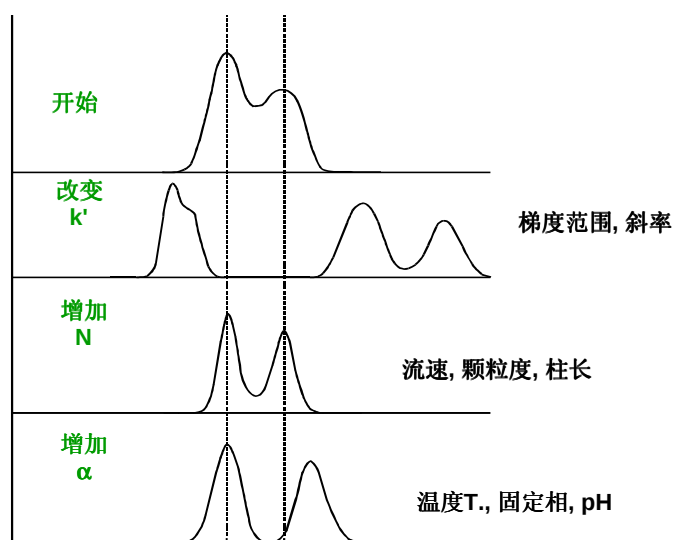
Agilent Technologies
Innovating the HP Way

Adapted with permission from: J. J. Kirkland, LC-SC, 1412390486

27

上面的例子你会了解如何开发一个使用反相色谱分析离子型样品的方法，这一流程图在下一固定相还要重复使用它，你要充分地学习它。

决定于 k' , N , 和 α 的分离度



上面的图将帮助你回忆哪些参数改变会达到你所需要的分离结果。

系统的方法开发

- 选择起始的色谱柱 (直径, 长度, 颗粒度- 4.6 x 250 mm, 5 μ m)
 - 使用适中的孔径
 - 起始试验使用低pH 通用的流动相条件
- 优化 k' (保留值)
 - 梯度范围, 时间, 斜率
 - 流动相-小变化
- 优化回收率
 - 样品的溶解性
 - 温度影响
 - 键合相影响
 - 有机改剂
- 优化 μ (选择性)
 - 温度
 - 键合相
 - pH (最后的手段)
- 优化 N (色谱柱条件)
 - 流速
 - 长度
 - 颗粒度

上图将提醒您改变哪个参数可以达到想要的分离结果。



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

实验室训练：开发一个定量分析饮料中 咖啡因的方法（任选实验）

实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）
在这一实验室训练中，你将：

在这一实验室训练中，你将：

- 开发一个饮料中分离咖啡因的分析方法。
- 为方法建立一个校准表。
- 分析饮料。

实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）

材料

材料

- 一支 SB-C18，4.6 x 150 mm，3.5 μ m 填料的色谱柱，部件号为 863953-902。
- 含咖啡因的饮料。
- 咖啡因标准。
- 通道 B 中为 HPLC 级别的乙腈。
- 通道 A 中为 HPLC 级别的水。
- 一台通电的带所有部件的 1100 液相色谱仪。
- 一台 HPLC 化学工作站，配备光度检测器部件。

方法开发的计划

开发一个方法可展开如下面的内容：

- 243) 收集有关要分析样品的数据。
- 244) 收集有关分析所需要的数据 LOD, LOQ, 样品号等。
- 245) 选择仪器。
- 246) 选择模式和开始使用的色谱柱。
- 247) 选择开始使用的流动相。
- 248) 制定样品预处理的方案。
- 249) 制定开始分离的步骤。
- 250) 优化 HPLC 参数。
- 251) 进行标准样的分析。
- 252) 进行混合样的分析。
- 253) 加入样品基体寻找大致的浓度范围。
- 254) 用标准样以 50%含量增加或减少形成一定含量的样品，制作有三个点的校准曲线。
- 255) 进行线性范围研究。
- 256) 测定检测限。
- 257) 测定定量分析检测限
- 258) 用已知样多次进样测定分析偏差。
- 259) 不同的分析人员使用同一方法进行考核。
- 260) 第一个分析人员，不同的仪器。

由于时间限制我们不能进行所有这些步骤，但是我们要进行相关性靠近的实验。

开发方法的参数

开发方法的参数

你的目的是要开发一个饮料中定量分析咖啡因的方法（即可乐，咖啡或茶），按下面的步骤进行：

261) 拿到测试样品和标准。

262) 建立一个标准的探索性试验（参考梯度实验课），使用下列的通用参数：

- 1.00 mL/min
- 10/90 乙腈/水 到 100% a 乙腈
- 样体积 5 μ L
- 柱温 40°C
- 波长 样品信号 250, 40 参考 360,100
- 存储所有的光谱，190-800 nm，峰宽 > 0.05

每一次进样，一定要给一个专用的数据文件名。

263) 注射一个含咖啡因的饮料。

264) 通过探索性试验确定一个**等度**分析的适当条件。在此条件下对色谱柱进行平衡。此后每次进样都用等度进行分析。

265) 注射饮料测试你的条件。

266) 注射咖啡因标准样。

267) 进入 **Data Analysis** 窗口。

268) 调用咖啡因标准样分析实验程序和测定的保留时间。

269) 把保留时间记录在这里：_____。

270) 调用样品分析实验程序。

271) 从 **Spectra** 菜单选择 **3D Plot**。

272) 在 3D 窗口下观察色谱图。

273) 进入 **Spectra** 菜单并选择 **Isoabsorbance Plot**。

274) 用水平标尺寻找最适和色谱图的波长，涂黑之后优化色谱图。

275) 把最合适的波长记录在这里。_____。

276) 这里记录在关键色谱峰之间的分离度。

277) 记录色谱峰之间的分离度：_____

最小 k' 值：_____

速度重要吗？_____

最大压力？_____

在完成优化实验之后存储等度分析方法为：**methdev.m**。

一定要在方法中有分析时间（不要设定为无限）而且在 Run Time Checklisand 中要选中数据采集。

实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）
校准

校准

278) 从 Method 和 Run Control 窗口选择 **Sequence** 菜单，然后选 **Sequence Parameters**。选择下面的参数：

Sequence Parameters: Instrument 1

Operator Name: Your Name

Data File

☒ **Auto** ☐ **Prefix/Counter**

Prefix: SIG1 Counter: 0001

Subdirectory: YOURNAME

Path: C:\HPCHEM\1\DATA\

Bar Code Reader

☐ **Use In Sequence**

On a bar code mismatch

☐ **Inject anyway**

☒ **Don't inject**

Part of methods to run

According to Runtime Checklist

☐ **Use Sequence Table Information**

WaitTime: min

(after loading a new method)

Shutdown

☒ **Post-Sequence Cmd / Macro**

STANDBY

nRdy Timeout: 10 min

Sequence Comment:

OK Cancel Help

实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）

校准

279) 从 **Sequence** 菜单选择 **Sequence Table** 并填写以下的参数，一定要确定把你的样品瓶放在自动进样器适当的位置。

Sequence Table: Instrument 1

Currently Running

Line: Method: Vial: Inj:

Sample Info for Vial 12:

Line	Vial	Sample Name	Method Name	Inj/Vial	Sample Type	Cal Level	Update RF	Update RT	Interval	Sample Amount
1	10	low caffeine	METHDEV	1	Sample					
2	11	medium caffeine	METHDEV	1	Sample					
3	12	high caffeine	METHDEV	1	Sample					

Insert Cut Copy Paste Append Line

Insert Vial Range... Run Sequence Read Bar Code

OK Cancel Help

Determines how the calibration table response factors will be updated

280) 从 **Instrument** 菜单选择 **System On**。让系统平衡几分钟。

281) 从 **Run Control** 菜单选择 **Start Sequence**。

当实验结束时你做一个三水平的校准曲线并估算它的相关系数。

积分

积分

在这一节里你将优化分析过程进行积分，并把它存储在方法中。

282) 进入到 **Data Analysis** 窗口。

283) 从 **File** 菜单上选择 **Load Signal...**。找到低含量标准的数据文件并调用，这一数据文件是使用默认的积分方法进行初始积分。

284) 在调用了数据文件之后，进入到 **Integration** 菜单并选择 **Auto Integrate**。进入到 **Integration** 菜单并选择 **Integration Results**。一旦显示积分结果就送到打印机里，关闭 (**Close**) 此窗口。

285) 检查这一积分值，如果积分值看起来不合适，请教你的导师帮助你如何优化积分的方法。

286) 如果对积分值满意就用 **File/Save/Method** 把这一方法存储起来。

设定信号的详细资料

信号详细资料的对话框描述方法在运行中对信号的评估，如果在现行数据文件中能找到的所有已定义信号未进入列表框中，就不能被积分或进入报告。每当找不到已定义的信号时，系统就会从数据文件中调用所有可用的信号并应用在报告中。

从 **Calibration** 菜单上选择 **Signal Details**，拉下 Available Signals 菜单并选择 DAD 采集信号，你要核对 DAD 的参数框，现在选择 **Add to Method** 按钮。

建立校准表

建立校准表

你已经调用并对第一个标准样进行了积分，建立校准表的第一步是要选择校准的设定值。

从 **Data Analysis 窗口**：

- 287) 在 Calibration 菜单上选择 Calibration Settings。
- 288) 在校准表的题目上填写名称如 Class。
- 289) 你要从数据文件中使用样品数据。
- 290) 在数量单位上输入 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 291) 在 Default RT Windows 应设定为 5%。
- 292) 为计算未校准峰选择峰号 No。
- 293) 在 Calibration 菜单下选择 New Calibration Table...。
- 294) 选择自动设定 (Select Automatic Setup) Level 1. 插入默认值 500 在此面板上点击 **OK**。
- 295) 这时出现校准表，你可以用它来校准咖啡因的峰。
- 296) 点击 Compound 栏并敲入 Caffeine，给出许多可供选择的面积值，在 Amt [$\mu\text{g/ml}$] 栏的数值为 500。滚动到右边并把它作为参考峰，如果你看不到参考峰的选项，那你现在是在校准表的总览部分，这一部分在屏幕右上角的下拉框中。
- 297) 现在调用中等含量的标准样，选择最近的数据文件，使用积分事件就会自动进行积分。
- 298) 在 Calibration 菜单上选择 Add Level 或从现在的色谱图工具上选择 Add new level，此时 Level 2 出现，在此框上点击 **OK**。
- 299) 只在数量字段填写数值，在 level 2，咖啡因是 $250 \mu\text{g/mL}$ 。
- 300) 此时调用第三个标准样，选择 Add Level，这一数据文件是 level 3。
- 301) 第三个标准样的量是 $50 \mu\text{g/mL}$ 。
- 302) 你可以在色谱峰上点击，查看右下角处的校准曲线，你可以从这一屏幕右上角处的 Overview 框选择 Peak Details 来改变曲线的适应性，现在校准表包括曲线类型和原始色谱柱。

测试校准表

303) 调用中间含量的标准样品数据文件，进入 **Report** 菜单，然后进入 **Specify Report...** 或选择 **Specify Report Calculation** 和 **Print Style** 工具。

304) 选择下列项目：



目的地= 打印机和屏幕

计算 = ESTD

计量基础 = 峰面积

报告类型= 详细报告

选择色谱图输出。

305) 在报告说明上点击 **OK** 并存储在你的方法中。

306) 从 **Report** 菜单上选择 **Print Report** 或选择 **Identify Peaks, calculate Results & print Report** 工具。



307) 如果你满意这一报告形式就把它存储在你的方法中。

308) 检查相关系数和结果，如果满意就继续往下进行。

实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）
未知物

未知物

按照上述情况设定一个次序，但这一次是分析教师给你的样品，你要检测它是可口可乐，百事可乐，咖啡，茶或其他饮料。

实验室训练：开发一个定量分析饮料中咖啡因的方法（任选实验）
未知物



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

附录：方法认证概论

引言

认证 - 介绍

什么是认证？

认证是评估产品或分析方法的程序，以保证符合产品或方法的要求。



完成这一过程的必要条件是完备的功能和合格的仪器（硬件和固件）、计算机（硬件和软件）以及经过认证的分析方法。当已经选定设备和特定的方法并且二者已经被认证，用于这一方法的设备在样品分析之前和分析之间经过对系统适应性的仔细考核。

(ISO 8402:1994)

认证 –用实验和客观证据对要完成的预期用途的特殊要求进行验证。

认证的方法 - 目的

方法认证 - 目标

方法认证的目的是提供一个此方法具有所要求的准确度和精密度的证明。



化验方法要求测定各种产品中关键的成分和稳定性，进行配方研究、开发和生产中，为保证产品的可靠性，很大程度地依赖于分析数据。

所以建立一个尽可能好的方法是至关重要的，所选择的方法要足够的准确，以便在测试样品时得到可信的数据。

为研究产品配方的分析方法包含一个萃取步骤（萃取是从测试样品中分离出要分析的组分），和一个测定样品中这一组分的分析步骤。

这一套方法是假定分析方法在进行认证前已经建立。

在**开发方法**过程中分析人员要对操作条件进行优化，如浓缩方法、萃取步骤、色谱柱填料、色谱柱长、流速、波长、时间和温度等，并研究一些关键参数可能带来的偏差，因而要能预测精密度的变化，并在修正方法中使影响精密度的因素减到最小，在编写方法说明书时要措词严谨并提出适当的注意事项。

那末认证是为建立一个这样的方法，即这一方法在开发时就要能适应以认证为目的所限定的要求。

为什么样要进行认证？

认证 - 介绍

为什么要认证？

为了保证程序/设备/软件/分析方法具有所要求的准确度和精密度。



认证方法的目的是提供一个证明此方法所得到的结果是可信的证据



认证实际上并没有什么新的东西，它一直用于分析仪器和方法的开发，使用统计学的方法证明设备和分析方法的功能、可靠性、精密度。现有的认证步骤是编制有效的认证计划和所有测试实验的文件。

分析方法的传递（原因之一）如果把分析方法从一个实验室传递到另外一个实验室，设备的认证也是很重要的，例如：把一个 HPLC 梯度洗脱的方法传递出去，梯度延迟体积对保留时间有很大的影响，而且分离的选择性更为重要。

所以认证提供一个证据，即在规定的极限内改变方法的关键参数不会影响到这一方法的失效。

什么时候应当对方法进行认证/再认证？

认证的方法

何时方法要认证/再认证？

认证：

- 方法应用到例行分析之前
- 经过认证的方法，当其条件改变时，如仪器特性改变、样品基体改变、样品浓度改变和被测物改变时要进行认。

再认证：

- 只要方法改变，和其改变超过原始方法的范围。



分析方法在用于例行分析之前和方法参数改变之后要进行认证。

什么时候要求对方法进行认证？

一个经常问的问题是：

“把方法改变多少才需要进行再认证？”

一个检查员的回答是：

“无论怎样的改变，必须被证明它明能按规定继续工作。”

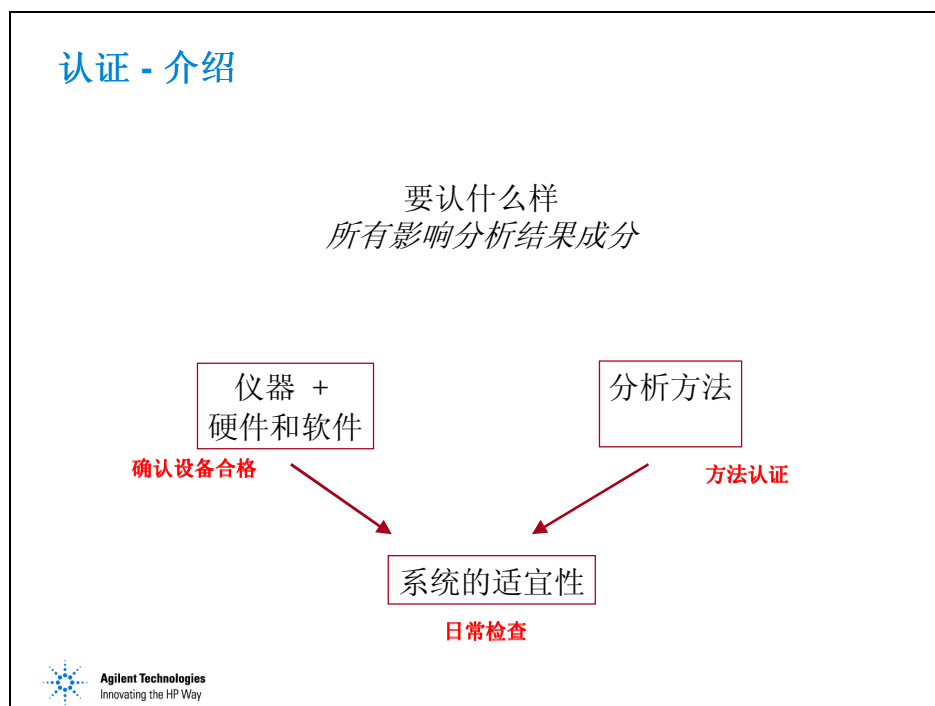
肖等曾说：

(Eur.J.Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 1991,16(4),249-255)

“..对分析方法的任何修改必须对测定步骤进行认证。”

如果新改变的参数数值是在方法认证过程中耐久性测试所允许的范围内，就不需要对方法进行再认证，如果不在所允许的范围内就要进行再认证。

什么必须进行认证？



仪器硬件 在进行例行分析之前，在修理和一定的时间间隔之后要认证，计算机系统在开发一个程序中间和结束时以及在软件升级之后应该进行认证。

计算机系统 带有复杂软件的计算机系统常常在多年之后才开发出来，严格地说在最后的测试阶段并没有对产品或系统进行质量测试，在开发程序过程中为保证质量，发展了 *寿命周期概念 (life cycle concept)*，把这一概念用于认证的解说，认证的完全概念是结合验证开发工作的成果和最终生产系统的正式测试。

警告：如果分析人员增加一个宏或改变软件，这一软件必须进行认证。

分析方法 在进行例行分析之前和改变方法参数之后必须进行认证。

分析系统 在进行例行分析之前和使用中间必须对系统进行适应性测试，特别是一天和一天之间的差异。

规则概述

规章导则 - 概论

对不同的分析目的，世界各地分析领域的规章导则各有不同。
下面是一部分为分析方法认证使用的导则：

ISO/IEC Guide 25
ICH
U.S. EPA
U.S. FDA
USP
cGMP



ISO/IEC 标准 EN 45000 系列的导则 25 包括一章“认证方法”

ICH “分析步骤认证”：定义和术语，日内瓦 (1996)

U.S. EPA 为资源保护和防御活动 (RCRA) 计划制定的方法开发和方法认证导则 (Guidance for method development and method validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Programme, Washington, D.C. (1995))

U.S. FDA 技术评论导论：色谱方法认证 (Technical review guide: Validation of chromatographic methods)

药物评估和研究 (Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD., USA (1993))

USP 综合章 1225，简要方法认证，美国药典 23，国家处方 18 (Validation of compendial methods, United States Pharmacopoeia, National Formulary 18, Rockville, MD., USA, The United States Pharmacopoeia Convention, Inc., pp. 1982-1984 (1995))

质量规则-地理

质量规程标准 - 地理

ICH 是国际人用药物注册技术协调联合会

这一联合会把来自欧洲、日本和美国的专家对有关导则进行讨论和协商.

术语

规章 - 术语

GLP (Good Laboratory Practice) 优良实验室实践
GMP (Good Manufacturing Practice) 优良制造实践
cGMP current Good Manufacturing Practice 当今优良制造实践
ISO (International Organization for Standardization) 9000 series are well known quality standards
(国际标准化组织) 9000系列是著名的质量标准
USP US Pharmacopoeia Validation of compendial methods (23) 1982-1984美国药典简要方法认证
(23)
UKAS United Kingdom Accreditation Service 英国鉴定服务部
IEC (International Electrotechnical Commission) 国际电工协会
ICH (International Conference on Harmonization) validation of analytical procedures: definitions
and terminology (1996国际协调联合会) 分析方法认证：定义和术语
EURACHEM/WELAC (Western European laboratory Accreditation Conference) 西欧实验室鉴定联
合会
LGC Laboratory of the Government Chemist 政府化学家实验室
CITAC Co-operational on International Traceability in Analytical Chemistry 分析化学国际追溯合
作组织



GLP 需要：

- 药物开发的非临床安全研究。
- 农药开发。
- 有毒化学品开发。
- 食物控制。
- 爆炸危险品的测试。

GLP 不需要：

- 基础研究
- 新分析方法开发研究
- 用于商业食品的化学测试

GLP - ISO 9000

GLP 要求的目的是保证公众的安全和坚持国家的规章制度。

GLP 对机构的要求是执行和记录研究用于人类将要得到许可的药物、食品和化学品的毒性。

ISO 9000 是对质量管理体系广泛使用的标准。

ISO 9000 具有广泛性，可用于各种产品，涉及任何产品，包括制造业和购销业。

实验室资格鉴定标准

ISO/IEC 导则 25 是对校准和测试实验室能力的通用要求。

EN45001：欧洲标准遵照 ISO 25 的要求。对测试实验室总的标准。

NAMAS MIO 英国标准 UK 遵照 ISO 25 的要求。

鉴定合格标准：校准和测试能力的通用标准。

测试/校准

合格检查/校准/测试/认证/确认

Qualification (合格检查)：保证任何设备可以正确的工作以便得到预期的结果。(DQ,IQ,OQ,PQ)设计-, 安装-, 操作-, 的合格检查

Calibration (校准)：在特定的条件下建立的一套操作组合，测量仪器给出的测定值和相应标准值之间的关系。

Testing (测试)：误差的识别（真值和预期结果的差值）

Validation (认证)：认证是评估产品和分析方法是否符合产品和分析方法要求的程序

Verification (确认)：用检验和结果来证实符合特定的要求



“认证和测试不是一回事。”

测试的定义是在一个系统里对误差的鉴定（预期结果和实际结果的差别）。

认证是以客观证据提供可信度高的证明，证明一个特定的方法可以可靠地生产出某种产品，它是符合预定的规格和质量要求的。

(U.S: FDA, 认证的总则, Rockville, MD., USA, 药物评估和研究中心 (CDER) (May 1987))

开始方法的开发

针对方法认证如何开始一个方法的开发



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

如何开始

计划说明：

从一开始就启动一个方法的建立和认证。

确定一个工作的详细计划是有实效性的方法。

计划举例：

- 确定方法的应用、目的和范围。
- 确定性能参数和可接受的标准。
- 检验和设备相关的性能特征。
- 有合格证的材料（如标准和试剂）。
- 开发方法。
- 制定方法文件（要点）。
- 制定认证方案。
- 确定认证实验。
- 进行预认证实验。
- 如果需要调整方法参数和/或可接受的标准。
- 完成全部的内部（外部）认证。
- 为完成用于例行分析方法来开发 SOPs。
- 确定再认证的标准。
- 为了使方法在例行分析中应用，确定系统适应性测试和/或分析质量控制 (AQC) 检查的类型和频率。
- 在认证报告中编制认证实验和报告。

必须很好的编制每一步的文件，这样有利于将来的使用。

方法认证的策略*

Validation

方法认证的策略

QC

- 确定方法的应用，目的和范畴
- 确定性能参数和验收标准
- 验证设备和方法其他步骤的相关性能特征
- 验证材料是否合格（如：标准样品和试剂）
- 开发和优化方法（分离）
- 方法验证（标准参数）
- 为认证制定认证文件和操作步骤
- 确定认证实验
- 进行预认证实验
- 进行全部的内部（外部）认证实验
- 为了执行例行分析开发SOPs
- 确定再认证的标准
- 确定例行分析所需的系统适应性测试和/或分析质量控制(AQC)类型和频率
- 在认证报告中编制认证实验和结果



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

为了获得极为准确的结果，必须考虑所有的变量，包括取样步骤，样品制备，色谱分离，检测和数据评估，要使用相同的基质加入要测定的组分。建议所用的步骤必须经受严格的认证过程。分析方法的有效性只能用实验室研究来证明。所有的认证实验用于编制有关方法认证的要求和结论，并编写在报告中。

参考：Interpharm Press, Inc. "Validation and Qualification in Analytical Laboratories"（分析实验室的认证和资格认可），Ludwig Huber, 1998
ISBN:1-57491-080-9

确定方法的目的

确定方法的范畴和目的

方法目的事例包括：

- 定性测试
- 杂质含量定量测试
- 主组分定量
- 杂质含量控制的极限
- 主组分和痕迹量组分的定量分析
- 微量组分定性
- 微量组分定量
- 样品中要测定组分活性物质和降解杂质的定量测试
- 样品中要测定组分和降解杂质的选定成分的定量测试



为了给方法一个明确的描述必须确定方法的目的和范围。

一个明确的定义直接影响下一步确定性能参数和可接受的标准。

在这一阶段要回答的重要问题：

- 要分析什么？
- 基体是什么？
- 预料有什么性能？
- 要使用什么技术？
- 方法的目的是什么？
- 方法的范畴是什么？

（要分析什么东西-其浓度如何-其基体是什么）

关键参数

什么是方法的关键参数？

要回答这些问题需使用下面的定义：

- 如何确定所测化合物是正确的（专属性/选择性）
- 如何确定结果是准确的（准确度）
- 如何确定定量范围是正确的（线性）
- 检测限是否可以接受（检测限）
- 定量准确的限度-最低和最高值（定量极限和工作极限）
- 在不同的实验室使用该方法时结果的准确度如何（再现性）
- 在同一实验室使用该方法时结果的准确度如何（重现性）
- 在使用不同设备时该方法所得结果的准确度如何
- 或不同实验人员所得结果的准确度如何（人间准确度）

方法认证的参数– 方法的范畴

所认证的参数 -方法的范畴

	Major Compounds Quantitative	Major Compounds and Traces- Quantitative	Traces Qualitative	Traces Quantitative
Specificity	yes	yes	yes	yes
Linearity	yes	yes	no	yes
Accuracy	yes	yes	no	yes
Precision	yes	yes	no	yes
Range	yes	yes	no	no
Minimum detection limit	no	no	yes	no
Minimum quantitation limit	no	yes	no	yes
Ruggedness/ Robustness	yes	yes	no	yes



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

改变方法- 需要再认证

修改了的色谱方法所需的数据基础

Analytical Parameter	Sample Preparation (1)	Chromatographic System Components (2)	Chromatographic Conditions (3)
Precision of the system	!	Yes	!
Precision of the method	Yes	Yes	*
Accuracy	Yes	*	Yes
LOD	Yes	*	*
LOQ	Yes	*	*
Specificity	Yes	*	Yes
Range	Yes	*	Yes
Linearity	Yes	*	Yes
Ruggedness	Yes	*	Yes



系统适应性测试的一部分

* 也许需要，这决定于特殊测试的性质

309) 包括改变萃取溶剂和条件。

310) 包括改变检测器流通池的几何形状，检测器类型，自动进样器。

311) 包括色谱柱（厂家，填料几何形状）流速…。

最低要求– 可接受的标准

最低要求-验收标准

- 确定最低要求和主要验收标准：
- 专属性
- 准确度
- 精密度
- 线性
- 最小检测量 (MDL)
- 最小定量极限 (MQL)
- 定量范围
- 耐用性/耐久性
- 稳定性



最低要求和可接受的标准：

必须确定每个需要参数的可接受的极限–与方法的目的和范畴有关。

注 意： 在第一次认证之后或在方法开发之后，未能达到方法所要求的某些限定，因此就要对方法进行修定或改变，或者修改限定值。

！ 如果改变了限定值你必须确保此方法仍可以适应规定的使用要求。！

方法认证-参数

方法认证的参数

- 选择性/ 专属性 (1,2)
- 线性 (1,2)
- 最小检测限 (LoD) (1,2)
- 定量极限 (LoQ) (1,2)
- 范围 (1,2)
- 准确度 (1,2)
- 精密度 (1,2)
 - 重复性Repeatability (1)
 - 中间准确性Intermediate Precision (1)
 - 再现性Reproducibility (3)
- 耐用性Robustness (2,3)
- 耐久性Ruggedness (2)
 - 1)包括在 ICH
 - 2)包括在USP
 - 3)包括在ICH 中，但不要求

设备规格 – 方法要求的必备条件

设备规格 - 方法要求

- 验证设备规格 - 要完全符合方法的要求：
- 验证材料合格 (e.g. 标样和试剂)
- 验证所有开发的分离方法符合 必要条件：
 - 基体的性质
 - 样品制备步骤 - IStd (内标) or EStd (外标)



所用设备应当支持你方法的性能标准。

举例：

如果方法重复性可接受的标准是 $\% \text{RSD} \leq 1.0$

但是自动进样器可提供的进样重复性为 $\% \text{RSD} \leq 1.5$ ，这一设备就不能使用。

- 为了开发一个定量分析方法，对参考标准和所有预期的主体化合物等考察证明其合格是十分重要的。

具有合格证的材料

化学标样- 参考标样

- ISO/ICE 导则 33
 - 参考物质(RM)
 - 被鉴定参考物质 (CRM)
 - NIST (National Institute of Standard and Technology)
 - 标准参考物质 (SRM)
 - 外部参考物质 (ERM)
 - 内部参考物质 (IRM)
 - IUPAC (Analytical Chemistry Section)
 - 第一标准 (鉴定)
 - 第二标准 (验证)
 - 工作标准 (使用人制备)
- Bureau Communautaire de Reference (BCR)*
United States EPA
Japan NIMC national Institute of Materials and Chemical Research
CITI Japanese Chemicals Inspection and testing Institute
LGC Laboratory of the Government Chemist



参考物质十分重要，因为要用他们来校准仪器，参考物质的准确度决定着分析方法的准确度。所以它在控制项目的验证和处理上很有意义。

所以参考物质的处理和编制文件是十分重要的。

- **第一标准** (被 NIST/BCR 鉴定)
- **第二标准** 溯源到的第一标准，厂家用相互独立的方法鉴定此标准。
- **工作标准** 由使用者制备，溯源到的第一/第二标准，或用相互独立的方法鉴定此标准。

方法开发 – 优化分离

方法开发- 方法认证

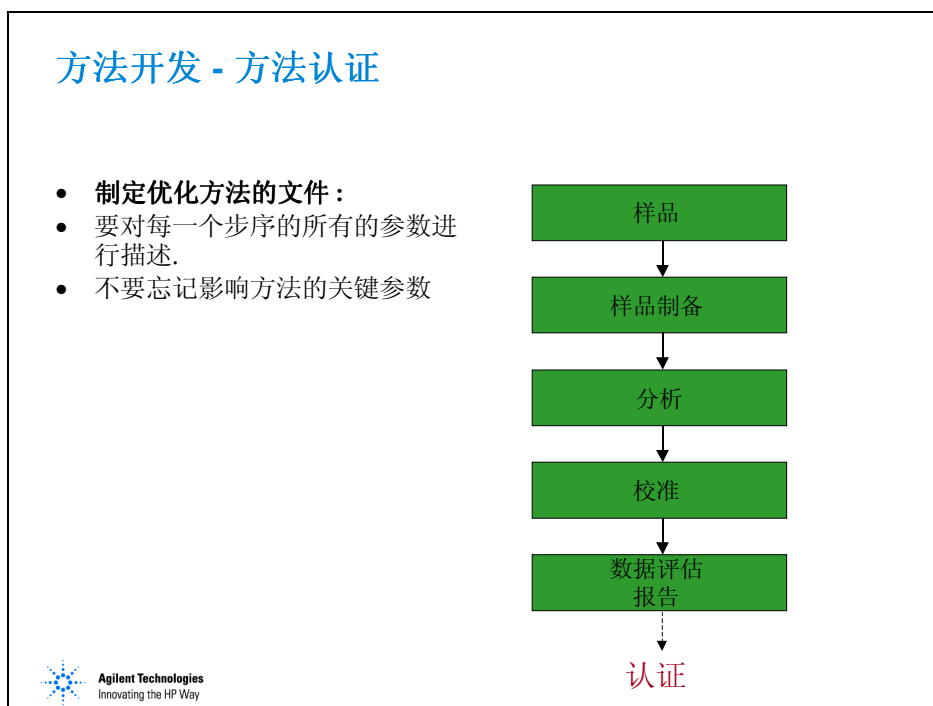
- 用测试混合物（包括所有样品的主要组成）开发和优化分离方法：
- 要证明样品中有关化合物得到很好的分离。
- 要评估有关化合物的回收率（测定值对已知值比较）。

注意：不要忘记方法优化步骤中的要求！



计划中的这一步骤集中于开发一个方法并进行优化。
在这一步计划中对所有关键参数应当验证并了解它对分析的影响。
对将来的使用应当进行验证。

方法开发 – 文件



写一个方法的文件并非易事，一个好的文件应当提供完全的资料，这是其他使用者所希望的。

要明确所有的技术术语。

检验一个方法文件很有用的途经是把此文件送给另外一个分析人员，他可以根据所叙述的方法正确地进行实验。

这一方法会清楚地了解这一文件中有那些弱点。

方法认证策略

方法认证策略 -方法认证步骤总结报告

- 确定方法的应用，目的和范畴
- 确定性能参数和验收标准
- 验证设备 的相关性能特性
- 验证材料是否合格（如：标样和试剂）
- 开发和优化方法（分离）
- 方法验证（标准参数）
- 制定方法文件（标准参数）
- 为认证制定认证文件或操作步骤
- 确定认证实验
- 进行预认证实验
- 进行全部的内部（外部）认证实验
- 为了执行例行分析开发SOPs
- 确定再认证的标准
- 确定例行分析所需的系统适应性测试和/或分析质量控制(AQC)类型和频率
- 在认证报告中编制认证实验和结果



这一步和开发方法有关，总结如下。

选择性/专属性

选择性/专属性



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

理论 - 选择性/专属性

选择性/专属性

专属性（选择性）：

- 在含有干扰物质时有能力测定被分析物。
- 典型情况下包括杂质，降解物，样品基体等等。
- (ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95)



专属性 可定义为分析方法可以区分被测物和测试样品中存在的其他物质（例如赋形剂，分解产物）的能力，从线性和准确度的检查可以推断出一些有关信息，但是为了保证此方法可以区分分解产物，需要对分解了的样品和分解产物进行研究。

选择性/专属性

- ICH
 - 专属性：这一术语用于只对单一被分析物有响应的方法
 - 选择性：这一术语用于多个被分析物有响应的方法。
- USP
 - 选择性：一个选择性的方法是指当样品基体中含有干扰物和降解物时能够准确测定被分析物的能力。



选择性（专属性）

选择性和**专属性**两个术语常常交换使用，但是**专属性**是指单独对某一被测化合物有响应的方法。

选择性是指对一些化合物有响应的方法，但是这些化合物可能或不可能被区分，如果其响应可以和其他响应区分开，这个方法就是有选择性的。

因为只有很少的方法只对一种被测物有响应，所以选择性一词常常更为合适。

USP 专著中把**选择性**定义为：当样品基体中存在干扰物时，分析方法有准确测定某一被测物的能力，这些干扰物可能是合成前体，赋形剂，和已知的（或可能的）降解产物。液相色谱的选择性来源于色谱柱的选择，色谱条件如流动相成分、柱温、和检测器波长等的选择。考核分析方法是否有选择性，是分析比较含有杂质样品和未含有杂质样品的分析结果。

选择性/专属性

选择性/专属性

含意:

- 定性分析: 确定被分析物的特性.
- 纯度测试: 确保所有进行的分析步骤可以准确地测出样品中的杂质含量.
- 化验 (含量,有效成分) : 能够提供 样品中准确含量或有效成分.



有不少方法可以确认选择性:

*Karnes** 建议一个极为简单的测试色谱选择性的方法是对生物基体没有响应。

一个很好的实践经验是在预计的被测物大峰保留时间窗口中检测不同来源的空白样品。同一作者也建议第二个方法: 检查校准曲线是否显著偏离原点。

检测限

最低检测限



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

检测限- 定义

检测限

- 某一分析步骤的检测限是指可以检测出样品中的最低含量，但无须知道其确切值。
- 典型的数值是其噪音水平的三倍量。
- 建议使用不同的设备进行检测，在靠近LoD处进行检测。

信噪比 (S/N)

$$S/N = \frac{\text{信号大小}}{N \text{ (RMS)*}}$$

*)

N (RMS) 是峰与峰噪音的
1/5



注意：

检测器的性能大大影响 LoD。

检测器的噪音是一个检测器的性能标准，它对 LoD 有影响。

定量极限

定量极限 (LoQ)



Agilent Technologies
Innovating the HP Way

在定量极限以下结果就不可信了。

定量极限是在这一进样量下可以获得色谱峰面积（等效与数量）精确、可靠的结果，其峰高应为噪音基线的 10~20 倍。

定量极限 – 定义

定量极限

- 某一分析步骤的**定量极限**是这一方法以适当的准确度和精度可以定量测定的最小含量。
- **定量极限**是在样品基体中可以测定出最低含量的参数，并特别用于杂质和/或降解产物的分析。

理论- 线性

线性

一个分析步骤的**线性**是所得到的结果与样品中被测化合物浓度（数量）成比例关系（在一定的范围内）的能力。



大多数配方产品的检验方法是基于把含有已知化合物浓度的溶液（分析标准溶液）中组分的响应值和从样品的萃取物（同样的溶液）的响应值进行比较，二者所用溶剂必须相同。所配标准溶液的浓度大致与被测样品溶液的浓度相同。实际上样品中被测物的浓度并非和预计的一样，例如样品溶液的**响应值**只有标准的一半，在此情况下，在一定的范围内建立一个标准样和被测样的响应值成比例相互关系是十分重要的。这一参数叫做被分析样品**响应值的线性**。

溶液必须单独配制！

在配方成分中存在的被测物线性，是往相同于配方量的空白对照剂中（即考虑到被测物的空白对照剂）逐步加入被测物的量进行测定，这一含有空白对照剂的混合物像样品一样地进行处理，测定形成溶液的响应值。

理论- 线性

每一个所研究对象的线性范围决定于被分析样品的性质以及它在配方中的功能，例如对活化剂和防腐剂在从 0 到 150% 预计的结果范围内至少要有五个点。对残余溶剂，杂质和分解产物在所建议的规格限度内至少要包括 0 到 150% 线性。

准确度/精确度/精密度

准确度 - 精确度 (偏差) - 精密度

一个分析步骤的**准确度** (Accuracy*) 表示与真值的靠近程度。



精密度 (Precision*) 是与彼此测定结果靠近程度的度量。

精确度 (Trueness (偏差)*) 是表示一组结果的平均值与真值靠近的程度。

“测量不确定度”是准确度和精密度及精确度的一种结合表示方法。

* EURACHEM Guide “The fitness for Purpose of Analytic Methods” Edition 1.0 - 1998



一个方法结果的**精确度**或**偏差**和结果的**精密度**会影响**准确度**，准确度表示结果与真值靠近的程度。

准确度是一个结果的性质，它具有偏移和精密度的成分（当使用到一组结果时）(ISO 5725 或 ISO 3534)。

精确度是表示一大组结果的平均值与可接受的参考值之间靠近的程度。

偏差是一个方法的系统误差。

精确度和**精密度**的实际测定：

- 用已知参考物质（标准）对方法进行测定得到的平均结果进行比较
- 对**精密度**的测定是一组平均结果的 RSD

附录：方法认证概论

准确度/精确度/精密度

参考标准：

一个理想的情况是把国际鉴定过的参考物质加入到样品基体中进行测定。

如果在实验室没有可用的高性能稳定的参考物质，可以使用两种（互相独立）的方法对同一样品进行结果的比对，测定其精确度（偏差）。

精密度

精密度

一个分析步骤的精密度表示在规定的条件下从同一族样品中多次取样获得的一系列测量值之间的一致程度（分散度）。

精密度有三个水平：

- 重复性
- 中间精密度
- 再现性

应该用均匀权威性样品测定精密度。

但是，如果不能这样做，就用人工合成样品或样品溶液进行测定。



重复性 在一个实验室由一个操作人员使用一台仪器在相对短的时间间隔内进行分析得到的结果。

ICH 要求在 100% 测试目标浓度重复 6 次，或在全部工作区间（三个浓度/三次重复）进行 9 次重复实验得到的 % RSD。

中间精密度 Intermediate precision (ICH) 一个测试过程的长期变动性，不同的分析人员/用不同的色谱柱或试剂在同一实验室在几个星期之内完成方法的测试。

必须提供 % RSD。

再现性 (ICH) 的定义是使用同一方法在不同的实验室里进行实验得到的精密度，检验这一方法在不同实验室的工作情况。

必须提供 % RSD。

精密度

注意：

保留时间和峰面积或峰高的**精密度**是分离系统重要的标准。保留时间的精密度所以重要是因为保留时间是鉴定峰的主要方法，它也是 LC 泵和色谱柱性能和鉴别的重要标准。

峰面积的**精密度**所以重要是因为在定量分析中要用它计算被测物的含量。它也是 LC 进样系统极为重要的性能标准。精密度应该至少用五次重复的色谱图进行测定，对生物样品至少要用低、中、高浓度进行测定，需要在分别的日子进行重复实验，以便计算日内和日间的精密度。

精密度 (续)

一个分析步骤的精密度常常使用偏差、标准偏差、或一系列测量的变异系数来表示。

- 重复性
在短时间间隔内以相同的操作条件下测定的结果表示精密度。
- 中间精密度
在不同天数、不同分析工作者，不同设备等条件下表示实验室之间的偏差。
- 再现性
表示在实验室之间（协作研究，常常用于方法的标准化）的精密度，也用于不同地区方法的比较。

耐用性

耐用性

一个分析方法的**耐用性**是表示在正常的使用情况下，不受微小但是有意改变方法参数，影响结果的量度和可靠性的指示。

USP 把**耐用性**定义为在不同条件下，实验室与实验室之间，分析人员与分析人员之间得到结果的再现程度。



耐用性测试是考查操作和环境条件对分析结果的影响，它是在不同的测试条件下分析同一样品得到结果的变化程度。

一个耐用的方法具有抗滥用的缓冲能力，这种抗滥用的能力是指能够在不够精心操作、技术有所变动、设备有所差异的情况下进行实验。一个分析方法的耐用性测定是用同一批均匀的溶液在不同的实验室、不同的分析人员、在不同的操作和环境条件下（这些条件虽有些差别但是是在方法规定的参数范围之内）进行测定（实验室内测试）。为测定实验室内方法耐用性，测定是在现实的情况下改变一些色谱参数，如流速、柱温、检测波长、或流动相成分后，对定量结果的影响。如果这些参数的影响不超出在方法允许的规定范围，就说明这一方法的耐用性合格。

执行

被认证方法的执行

例子：在例行分析实验室执行被认证的方法

- 分析人员一定要很好地理解分析方法的关键因素.
- 必须提供一个好的认证步骤和分析方法的文件.
- 在方法开发人员和操作人员之间必须进行很好的交流.
- 需要在这一实验室的环境条件下验证这一方法.
- 必须进把操作实验室得到的结果和性能标准进行核对.



分析人员只有了解了这一性能标准并且得到确切的证明之后这一方法才能使用。

使用经过认证的方法

使用被认证的方法

- 要经常按系统稳定性规定的测试方法核对方法的性能标准
- 使用控制图表来测定方法的变化是有益的
- 把首先使用方法的情况反馈给方法开发人员是有益的
- 如果方法规定的范围有所改变就必须进行再认证