

# 液相色谱实用技术（二）

色谱柱的使用及保养



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# 色谱柱与仪器的联接

❁ 不同公司的色谱柱接头不同。处理不当时,会造成:

✎ 色谱峰展宽(死体积)致使柱效下降或渗漏

❁ 解决办法:

✎ 自制相应的转换接头

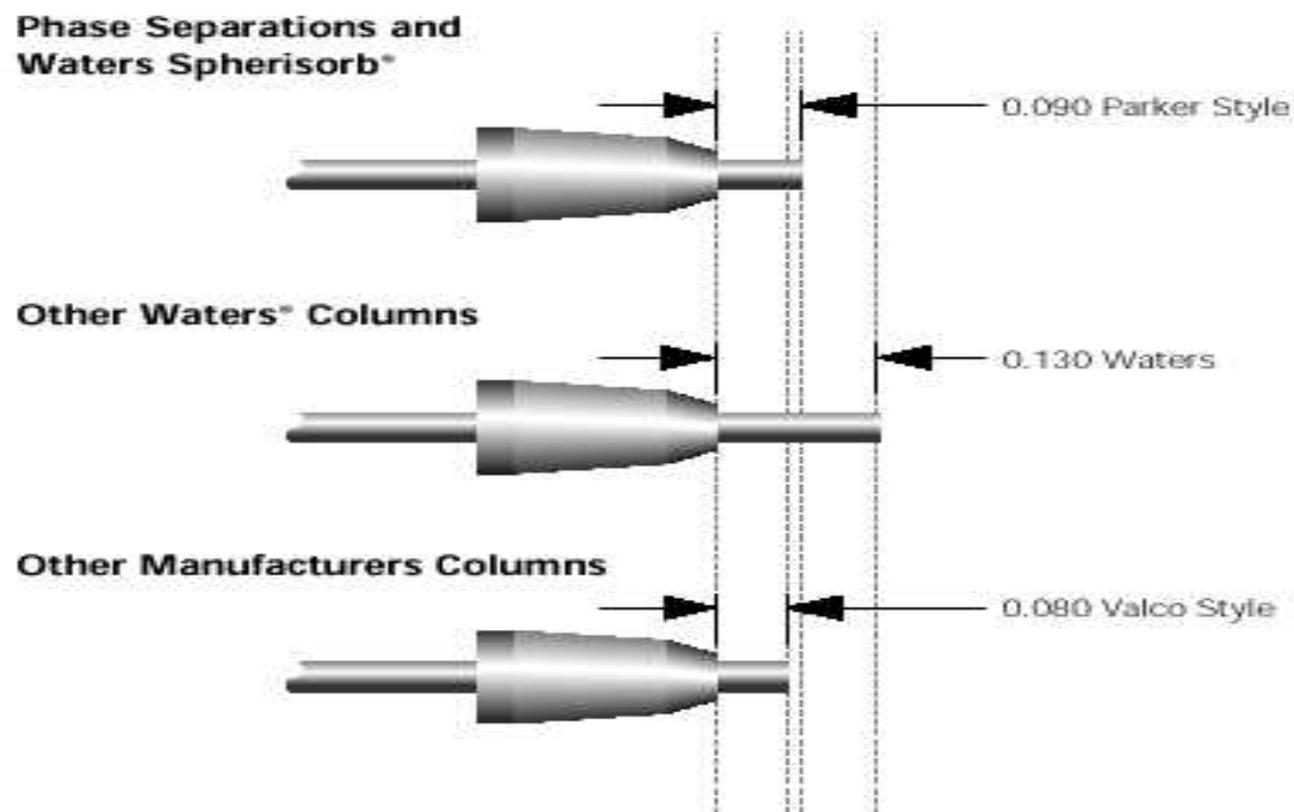
✎ 使用“通用”型接头(锥箍及螺母)

➡ 这种锥箍在不锈钢管上是活动的,即stop-depth的长度可调。因此可以换接不同的色谱系统及色谱柱。从Waters Phase Separations公司能得到一些PEEK工程塑料的接头,可用在各种类型的色谱柱上。



# 色谱柱的联接

❁ 各种锥箍和管路接头长度示意图:



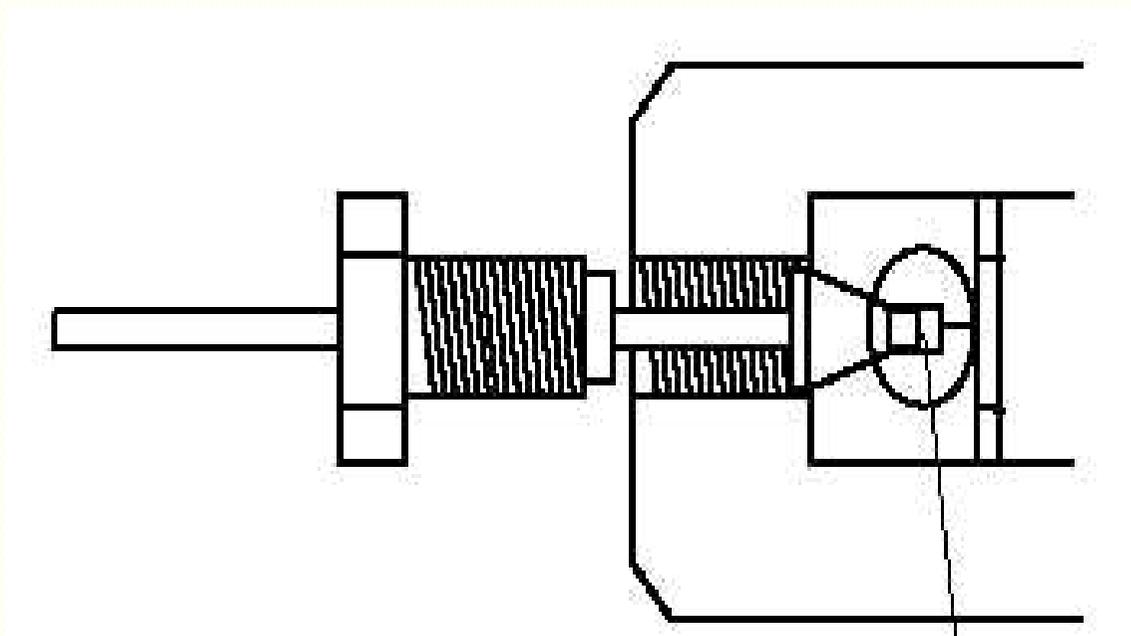
IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**



# 色谱柱的联接

❁ **Stop\_depth**长度不合适造成柱前死体积

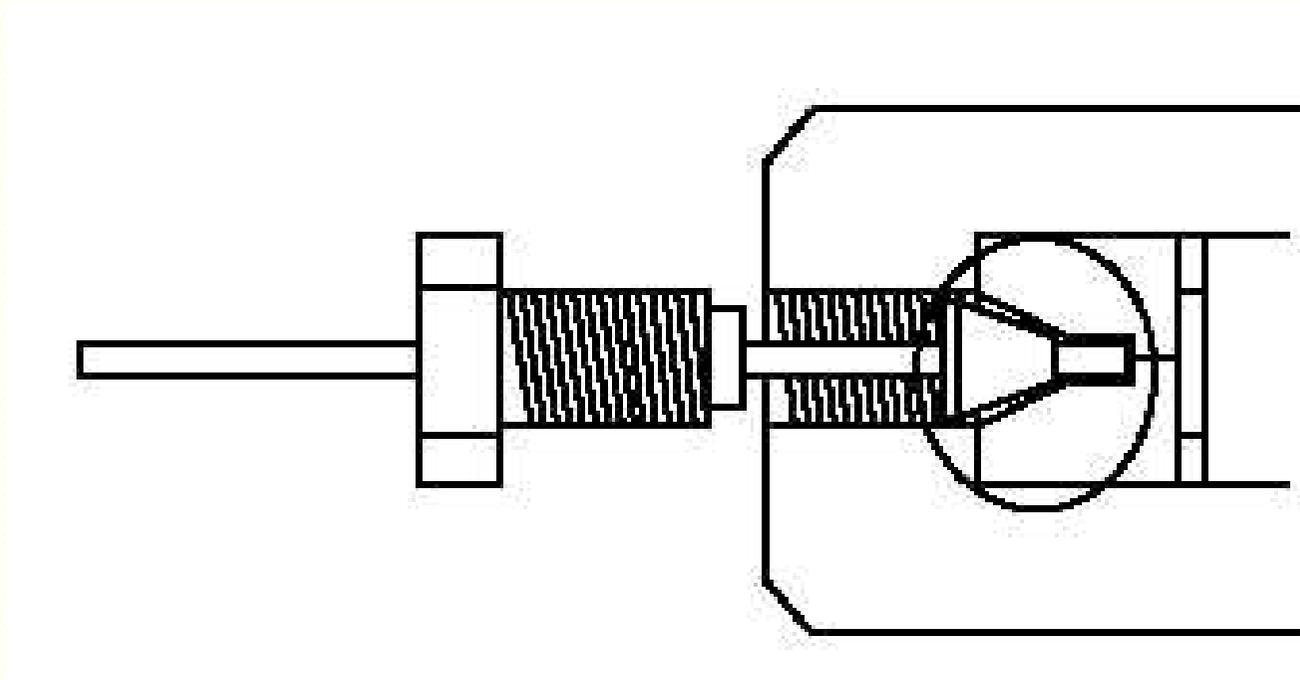


IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# 色谱柱的联接

❁ 锥箍锥度不合适造成渗漏:



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# Waters色谱柱的联接

- ❁ Waters及Phase Separations锥箍及螺母相同，但锥箍前露出的不锈钢管长度不同
  - ✍ 其长度被称为：“stop-depth”
- ❁ Waters除Spherisorb以外的各种品牌的色谱柱用的是“Waters”标准，其stop-depth的长度为0.130英寸
- ❁ Spherisorb品牌的色谱柱及Phase Separations公司的其他品牌色谱柱用的是“Parker-style”标准，其stop-depth为0.090英寸



# 测柱效-良好的色谱实验习惯

- ❁ 拿到一根新色谱柱时，先测柱效
- ❁ 保留在新色谱柱上测得的色谱图，并记录色谱测试条件
- ❁ 定期检测柱效
- ❁ 定期检测仪器的谱带展宽



# 测柱效的方法

- ❁ 色谱柱种类繁多,性能各异,测定方法亦各不相同
- ❁ **Waters**的色谱柱均附有Use and Care说明书,可按说明书所述方法测定
- ❁ 以下是**Waters**反相C18柱的测定方法:
  - ✎ 流动相:乙腈/水=60:40;流速:1ml/min
  - ✎ 样品:50mg Acenaphthene(二氢茚)溶于100ml乙腈,加入600  $\mu$ l丙酮
  - ✎ 进样量5  $\mu$ l
  - ✎ 检测波长:254nm

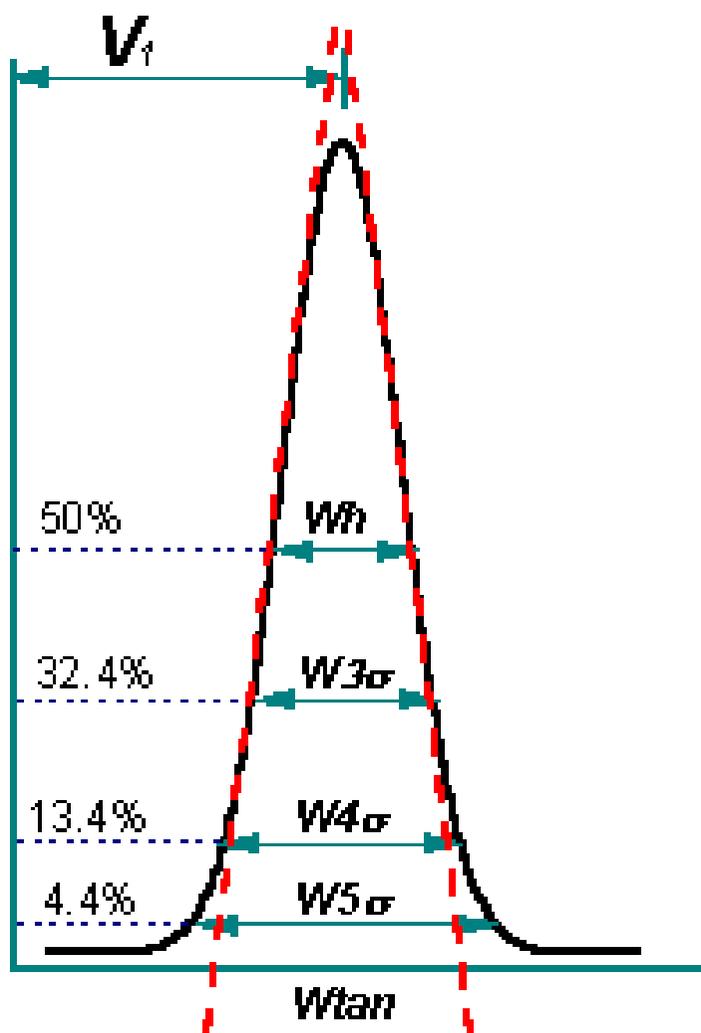


# 计算色谱柱的柱效 N

理论塔板数计算公式:

$$N = \sigma \left( \frac{V_1}{W} \right)^2$$

<u>W</u>	<u>σ</u>	<u>方法</u>
$W_{\tan}$	16	切线法
$W_h$	5.54	半峰高
$W_{3\sigma}$	9	$3\sigma$
$W_{4\sigma}$	16	$4\sigma$
$W_{5\sigma}$	25	$5\sigma$



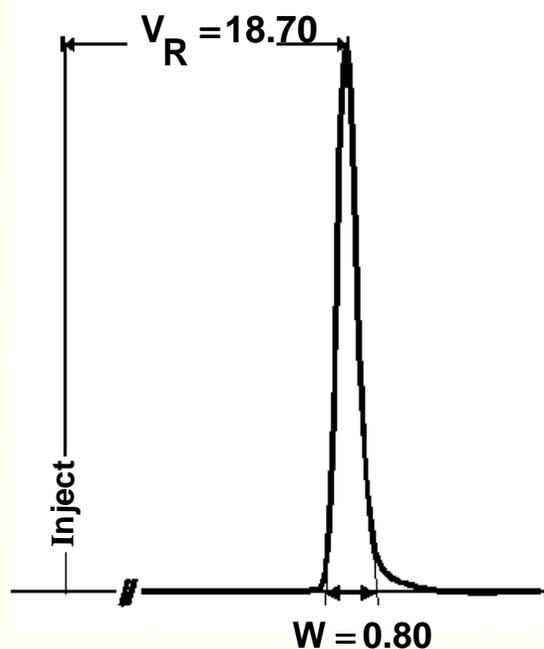
IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# 用“切线”法计算柱效

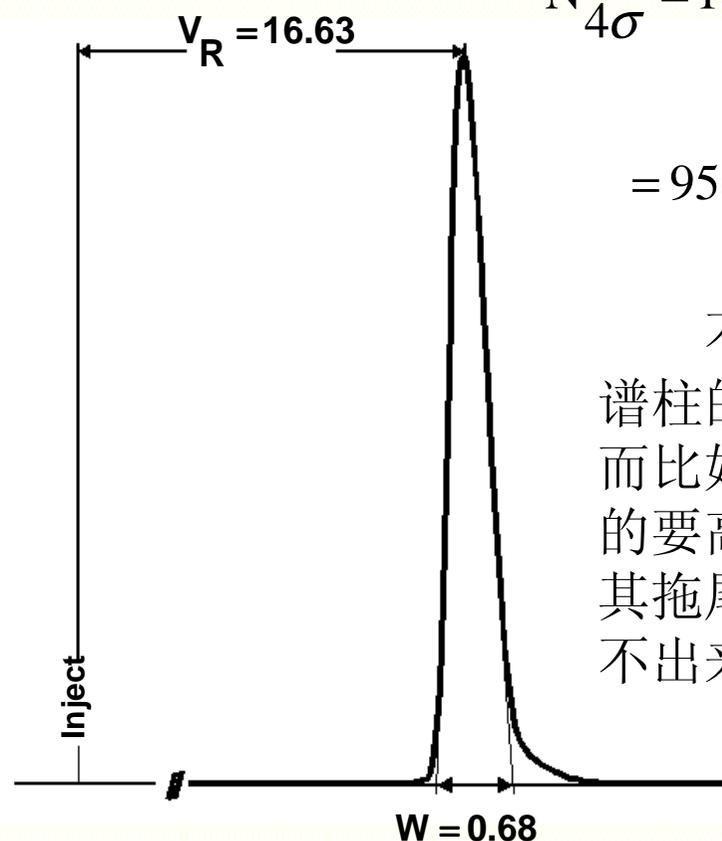
$$N_{4\sigma} = 16 \left[ \frac{18.70}{0.80} \right]^2$$

= 8742 plates



$$N_{4\sigma} = 16 \left[ \frac{16.63}{0.68} \right]^2$$

= 9569 plates



不好的色谱柱的柱效反而比好色谱柱的要高，因为其拖尾部分测不出来

IT'S ALL IMPORTANT

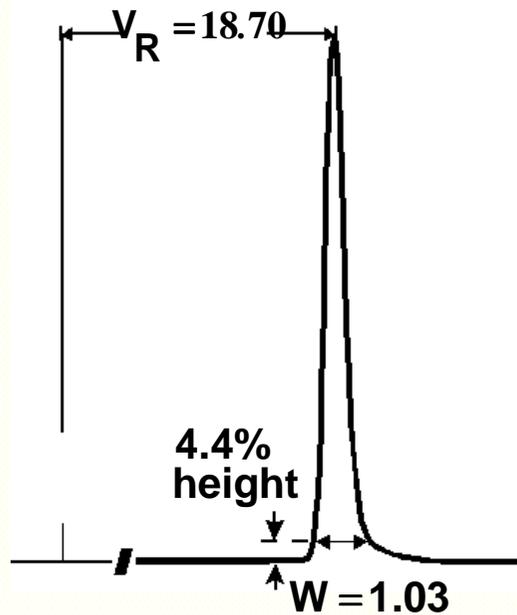
**Waters**



# 用“5σ”法计算柱效

$$N_5 = 25 \left[ \frac{18.70}{1.03} \right]^2$$

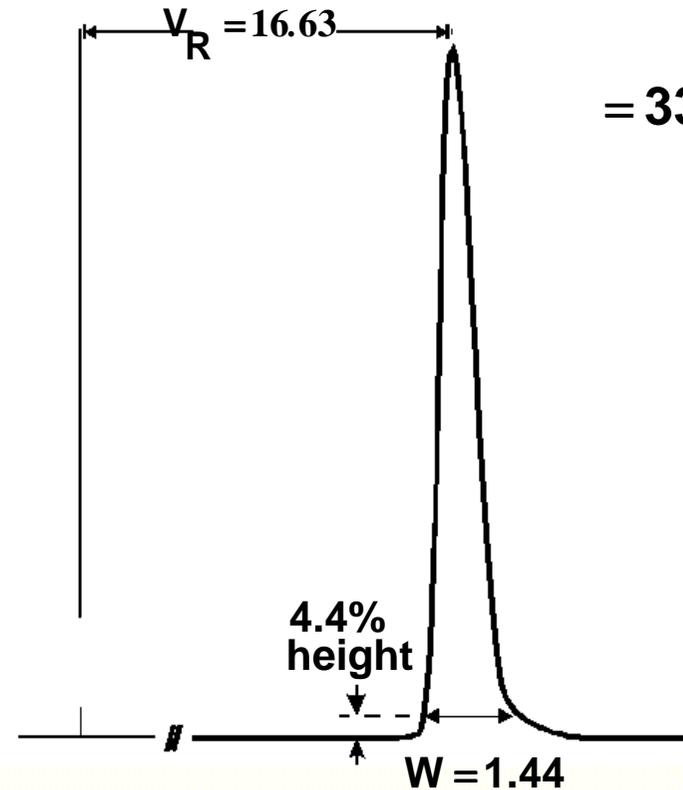
= 8240 plates



Good Column

$$N_{5\sigma} = 25 \left[ \frac{16.63}{1.44} \right]^2$$

= 3334 plates



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**



# 色谱柱的正确使用及操作

- ❁ 流动相的转换
  - ✍ 特别是GPC柱
- ❁ 流速(压力)的变化幅度
- ❁ 温度的变化幅度
- ❁ 专用色谱柱：样品及溶剂的要求

**记住：拿到一根从未用过的色谱柱时一定要先看其使用说明！**



# 正确使用色谱柱（一）

## ❁ 样品方面

- ✍ 除去微粒及杂质
- ✍ 了解样品在流动相中的溶解度
  - ➡ 如样品的溶剂不是流动相，一定要用流动相试溶解度，防止其在流动相中析出
- ✍ 了解样品与色谱柱的基质/填料是否相互作用



# 正确使用色谱柱（二）

## ❁ 流动相方面

✍ 除去微粒

✍ 纯度的要求

➡ 超纯水，梯度实验时水中有机杂质含量要低

➡ 缓冲液的pH值，在填料的允许范围内

➡ 缓冲液（盐）的浓度

➡ 溶剂：色谱纯，并与填料相匹配

➡ 溶剂中的杂质含量

✍ 流动相对样品的溶解度

➡ 有机溶剂或水的比例



# 色谱柱的在线保护装置

- ✿ 给色谱柱提供物理的保护
  - ✍ 除去样品及流动相中的颗粒
- ✿ 给色谱柱提供化学的保护
  - ✍ 防止分析柱被化学污染
- ✿ 装置
  - ✍ 在线过滤器
  - ✍ 自装填料保护柱
  - ✍ 预装保护柱



# 在线过滤器

## ❁ In-Line Filter, 部件号 WAT084560

- ✍ 防止颗粒在色谱柱头累积
- ✍ 优点：基本不影响柱效
- ✍ 在需要高柱效的分析时中常用（如：氨基酸分析）

## ❁ 可更换的消耗品

- ✍ 更换滤芯, 部件号 WAT005139 (5/pkg)
- ✍ 更换垫圈, 部件号 WAT084567 (10/pkg)



# 保护柱

❁ 可避免化学污染。多数保护柱影响到整个色谱柱的柱效，特别是在用微柱时

❁ 保护柱的种类

✍ 普通自装填料的保护柱

- ➡ Waters的部件号，WAT084550，用户自装填料
- ➡ 影响柱效同装填技术有关，柱效降低较大

✍ Guard-Pak预装保护柱

- ➡ Waters的部件号，WAT088141
- ➡ 有各种填料的预装柱供选择，使用方便。填料容积较小，会引起柱效降低



# 色谱柱的清洗

❁ 对所做的样品要有充分的了解

➡ 用对该样品洗脱能力最强的流动相清洗

❁ 硅胶柱的一般方法

➡ 先用甲醇洗去极性杂质

➡ 用干燥的二氯甲烷、正庚烷100~200ml依次活化

❁ 键合相柱(烷基)的一般方法

➡ 20倍柱体积的：甲醇-氯仿-甲醇-水依次冲洗

**记住：每种色谱柱可能有特定的方法  
一定要先看其使用说明！**



# 色谱柱的存放

- ❁ 存放前的处理
  - ✍ 除去杂质、缓冲盐
- ❁ 合适的存放溶剂
- ❁ 避免色谱柱床的干涸
- ❁ 避免机械震动
- ❁ 防止细菌生长
- ❁ 注意存放的温度



# 色谱柱的故障与异常

## ❁ 柱压过高

✍ 多少才算高？

- ➡ 不同色谱柱有差异
- ➡ 不同系统有差异
- ➡ 不同溶剂有差异

## ❁ 柱效低

❁ 重复性差

❁ 不出峰，回收率低



# 柱压过高

## ❁ 为什么柱压会过高

✍ 微粒堵塞

➡ 样品

➡ 流动相

➡ 密封垫

✍ 柱床膨胀

✍ 不可逆吸附

✍ 细菌生长



# 柱效低

## ❁ 为什么柱效低

✍ 色谱柱被污染

✍ 过滤片部分堵塞

➡ 样品、流动相或密封垫的细小颗粒造成的堵塞

✍ 色谱柱内的死体积

➡ 流动相pH值及组成不合适造成固定相流失

➡ 流速急剧变化造成固定相物理损坏

➡ 机械震动造成柱床产生裂缝

➡ 柱床收缩或干涸



# 重复性差、回收率低

## ❁ 实验的重复性差

- ✍ 色谱柱被污染
- ✍ 流动相pH值及组成不合适造成键合相流失
- ✍ 样品溶剂不同或样品本身不稳定

## ❁ 回收率低，不出峰

- ✍ “不可逆”吸附
- ✍ 固定相过强或流动相过弱
- ✍ 非特异性吸附



# 色谱柱以外的因素（一）

❁ “柱效”问题，不一定是色谱柱问题！

✍ 系统连接问题：连接不好造成死体积

- ➡ 进样器
- ➡ 检测器
- ➡ 管路，连接口
- ➡ 保护柱
- ➡ 在线过滤器堵塞

✍ 流动相问题：色谱柱未平衡好

✍ 进样量太大



# 色谱柱以外的因素（二）

❁ 柱压过高，不一定是色谱柱问题！

✎ 系统反压问题

- 阻尼器堵塞
- 进样器堵塞
- 管路或连接口堵塞
- 在线过滤器不干净
- 保护柱

✎ 压力传感器不准确

✎ 流速是否错误？



# 色谱柱以外的因素（三）

## ❁ 实验的重复性差

- ✍ 梯度实验时平衡时间不足
- ✍ 温度波动
- ✍ 流动相组成改变
- ✍ 样品溶剂不同
- ✍ 样品稳定性不好
- ✍ 方法开发不好
  - ➡ 缓冲液的pH值不合适
  - ➡ 缓冲液的缓冲能力不足



# 简单的判别方法

❁ 高的柱反压是否伴随着

✎ 保留时间变化?

✎ 峰形变坏?

✎ 分辨率变坏?

❁ 测量色谱系统的谱带展宽

✎ 典型的分析系统应远小于 100 微升

✎ 如大于此数应检查仪器系统



# 测量色谱系统的谱带展宽

- ❁ 卸下色谱柱，用UNION(两通)代替之
- ❁ 按测柱效方法，以1/10的样品浓度进样，大约2~5微升
- ❁ 用5 sigma方法测4.4%峰高处的峰宽：W
- ❁ 仪器参数：
  - ✍ 流速：1.0 ml/min
  - ✍ 纸速：20 cm/min (用记录仪时，接检测器10mV档)
  - ✍ 检测器灵敏度：0.5-1.0AUFS (用记录仪时)
  - ✍ 检测器时间常数：小于0.2

❁ 谱带展宽 (ml) =  $1000 \times W$  (cm) / 20 (记录仪)  
=  $1000 \times W$  (min) (工作站)



# 液相色谱实用技术（三）

流动相及样品的预处理



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# 液相色谱对流动相的要求

❁ 除色谱柱对流动相的要求外，还有：

- ✍ 与检测器匹配
- ✍ 脱气
- ✍ 避免卤素离子（不锈钢系统）
- ✍ 溶剂的粘度
- ✍ 防止细菌的生长



# 流动相的脱气

## ❁ 流动相脱气的目的

- ✍ 使色谱泵的输液准确
  - 输液均匀准确，并且脉动减小
  - 保留时间及色谱峰面积的重现性提高
- ✍ 提高检测的性能
  - 防止气泡引起的尖峰
  - 基线稳定，信噪比增加
  - 溶剂的紫外吸收本底降低
- ✍ 保护色谱柱
  - 减少死体积
  - 防止填料的氧化



# 流动相脱气的方法

## ❁ 加热

- 简单，如同抽真空一起使用，其效果很好。但容易造成流动相组成的变化

## ❁ 抽真空

- 同上，一般在溶剂抽滤的同时，也有脱气的效果

## ❁ 超声波

- 简单，但效果不理想。

## ❁ 通惰性气体（一般用氦气）

- 可保持连续脱气，多用于低压梯度

## ❁ 在线脱气机

- 可保持连续脱气，多用于低压梯度



# 样品的预处理

## ❁ 样品预处理的目的是

- ✍ 除去微粒
- ✍ 减少干扰杂质
- ✍ 浓缩微量的组份
- ✍ 提高检测的灵敏度及选择性
- ✍ 改善分离的效果
- ✍ 有利于保护色谱柱及仪器



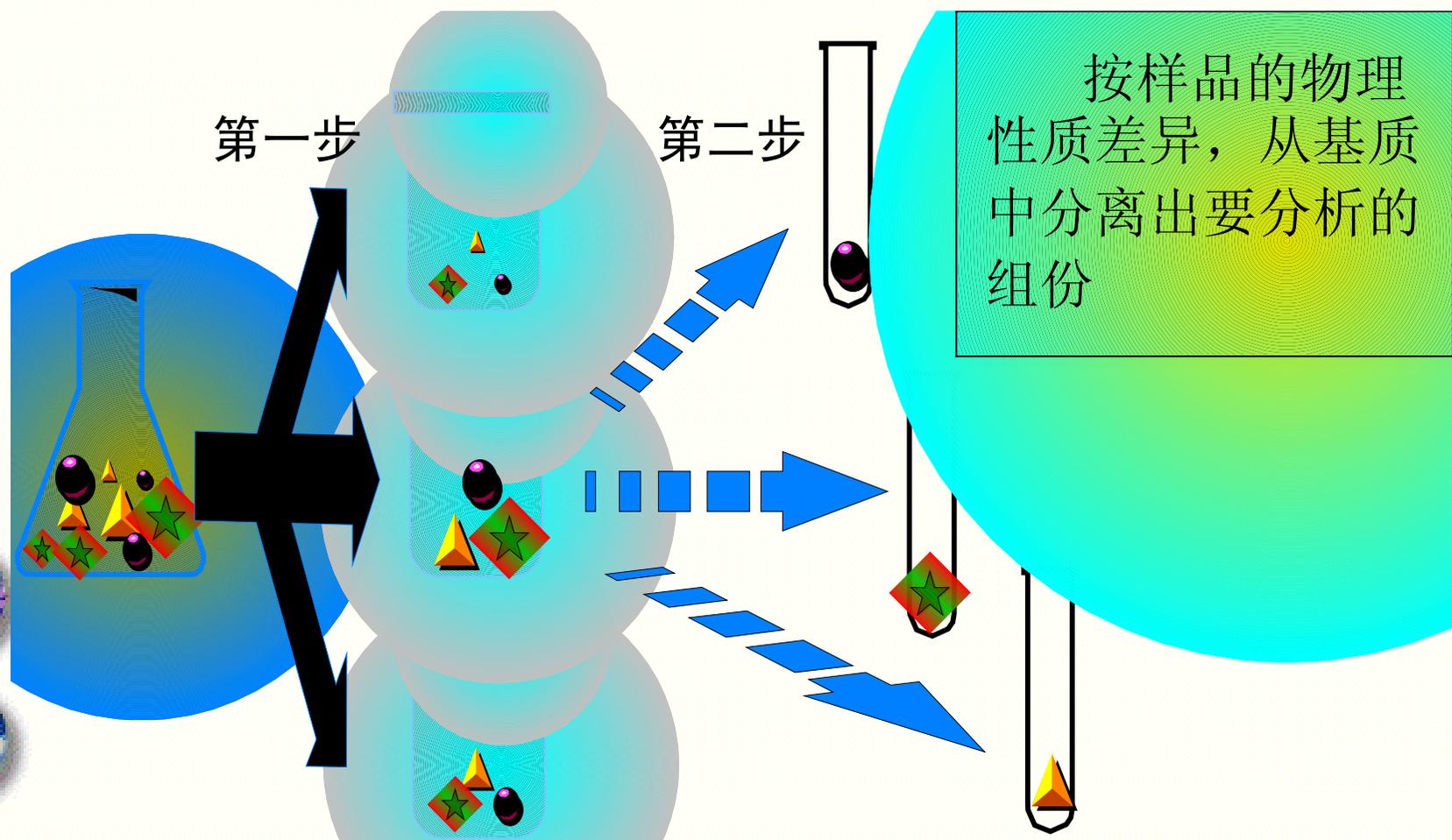
# 样品预处理的重要性

- ❁ 占样品分析时间的比例最大
  - ✍ 样品预处理所用时间远大于色谱分离的时间
- ❁ 占分析消耗总成本的比重最大
  - ✍ 消耗大量的溶剂及其它化学品
- ❁ 实验的重复性及准确性最差的环节
  - ✍ 影响实验结果好坏的最重要因素

➡ **是决定性的步骤**



# 样品预处理的过程



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# 理想的样品处理方法

## ❁ 选择性吸附

- ➔ 去除干扰物
- ➔ 在广泛极性范围内，对酸性、碱性及中性物质皆可获得高而重现性的回收率

## ❁ 容易实现自动化以获得高样品吞吐量

## ❁ 简单方法

## ❁ 容易使用，耐受性好

## ❁ 快速、经济



# 样品预处理常用的方法

- ❁ 高速离心
- ❁ 过滤、超滤
- ❁ 选择性沉淀
- ❁ 衍生反应
- ❁ 液-固萃取 / 液-液萃取

✍ Oasis™和Sep-Pak固相提取小柱

- ❁ 其他



# 去除微粒

## ❁ 过滤

### ✍ 过滤膜/过滤装置

➡ 有机(0.5  $\mu\text{m}$ )/无机(0.45  $\mu\text{m}$ )

➡ 膜片可更换

### ✍ 一次性使用的膜 “Cartridge”

➡ 使用方便简单，交叉污染小

➡ 有更小内径，可用于微量样品的处理

## ❁ 高速离心

➡ 大于：10,000rpm



# 超滤

## ❁ 机理

✍ 超滤是一种基于分子量分离的技术

## ❁ 目的

✍ 根据分子量的不同把分子、细胞及病毒等分为不同的馏份

✍ 除去小分子样品中的大分子蛋白

✍ 脱盐



# 选择性沉淀

## ❁ 常用于生化样品中除蛋白

### ✍ 有机溶剂

➡ 乙腈, 甲醇

### ✍ 强酸

➡ 三氯乙酸, 过氯酸

### ✍ 盐

➡ 50% 硫酸铵

➡ 10% TCA



# 样品衍生

## ❁ 提高检测的灵敏度

- ✎ 增加紫外基团以增强紫外检测的灵敏度
- ✎ 增加荧光基团以便使用高灵敏度荧光检测器

## ❁ 改变分离的选择性

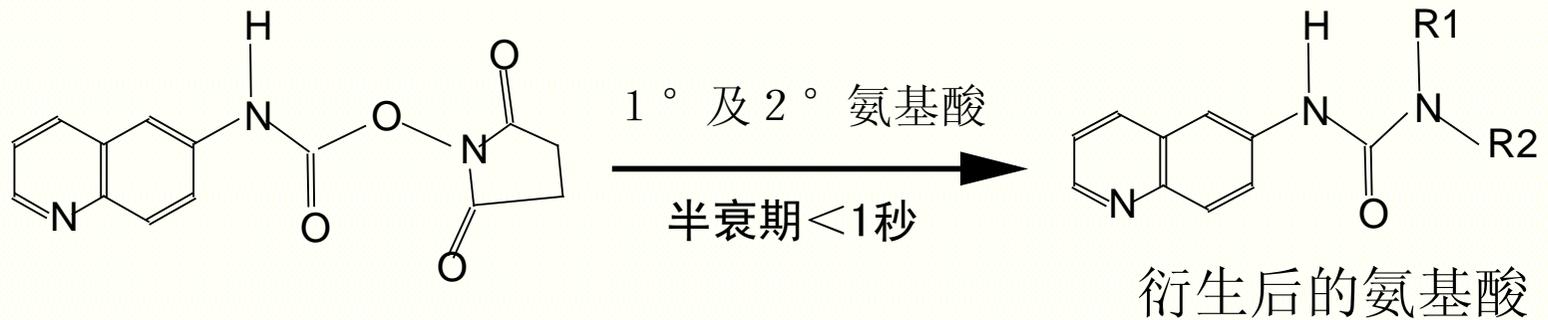
- ✎ 改变组份的基团，如：
  - ➡ 变离子型化合物为非离子型，用反相方法分离

## ❁ 典型的例子

- ✎ 氨基酸分析



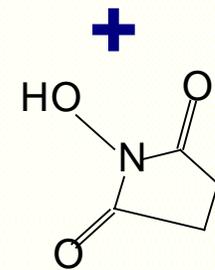
# AccQ-Tag 衍生法



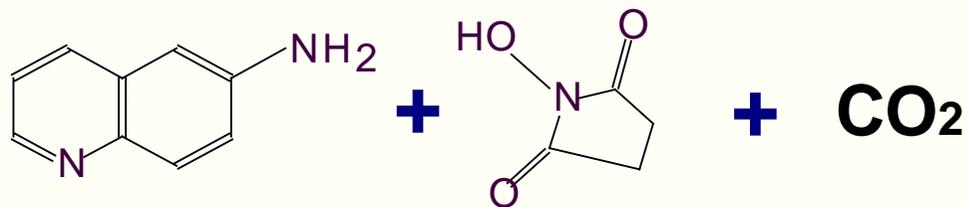
AQC衍生试剂

H<sub>2</sub>O

半衰期约15秒



N-羟基琥珀酰亚胺



6-氨基喹啉 N-羟基琥珀酰亚胺

IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# 浓缩样品

## ❁ 浓缩样品的方法

- ✍ 萃取/吹干
- ✍ 沉淀/再溶解
- ✍ 色谱法
- ✍ 液固抽提
  - Oasis™小柱
  - Sep-Pak小柱



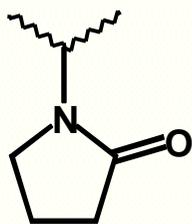
# 固相萃取（SPE）技术

- ❁ 固相萃取技术是基于同液相色谱同样技术开发的产品，分离复杂样品中的不同组份
- ❁ 固相萃取技术（SPE）的重要性
  - ✍ 实验室中60~80%的成本及工作量在样品制备上
    - 缩短样品的制备时间
    - 降低样品前处理的成本
    - 提高分析的准确性及回收率
    - 更容易自动化
    - 减少样品处理步骤
    - 降低对不稳定样品的影响
    - 提高安全性

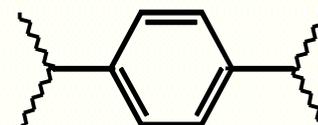


# 新一代固相提取小柱 Oasis™

- HLB亲水-亲脂平衡共聚物



亲水性单体：  
N-乙烯基吡咯烷酮



亲脂性单体：  
二乙烯基苯

## “亲水”

- 使填料具有水可浸润性质
- 降低与水的接触角

## “亲脂”

- 提供对被分析物质的反相保留能力

IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**



# Oasis™ HLB 固相提取小柱

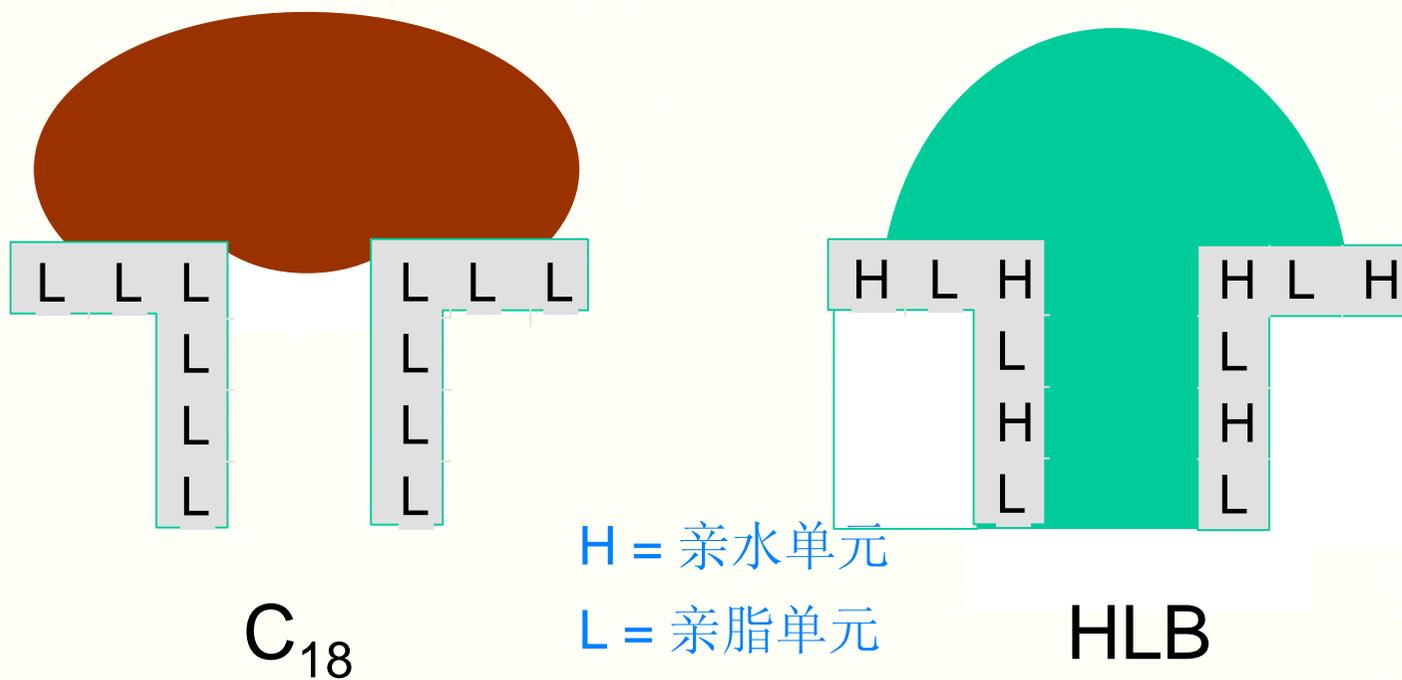
## 特征一，水湿性

- 优势：
  - ✓ 即使小柱在固相提取过程中干涸，也能吸附被分析物质
- 益处：
  - 1 即使小柱在固相提取过程中干涸，也能获得高回收率(>85%)
  - 2 提取板及小柱可获得一致的回收率(RSD's<5%)
  - 3 容易使用



# C18与Oasis™ HLB 吸附剂

## 浸润能力的比较



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# Oasis™ HLB固相提取小柱

## 特征二，通用型吸附剂

### ✓ 优势:

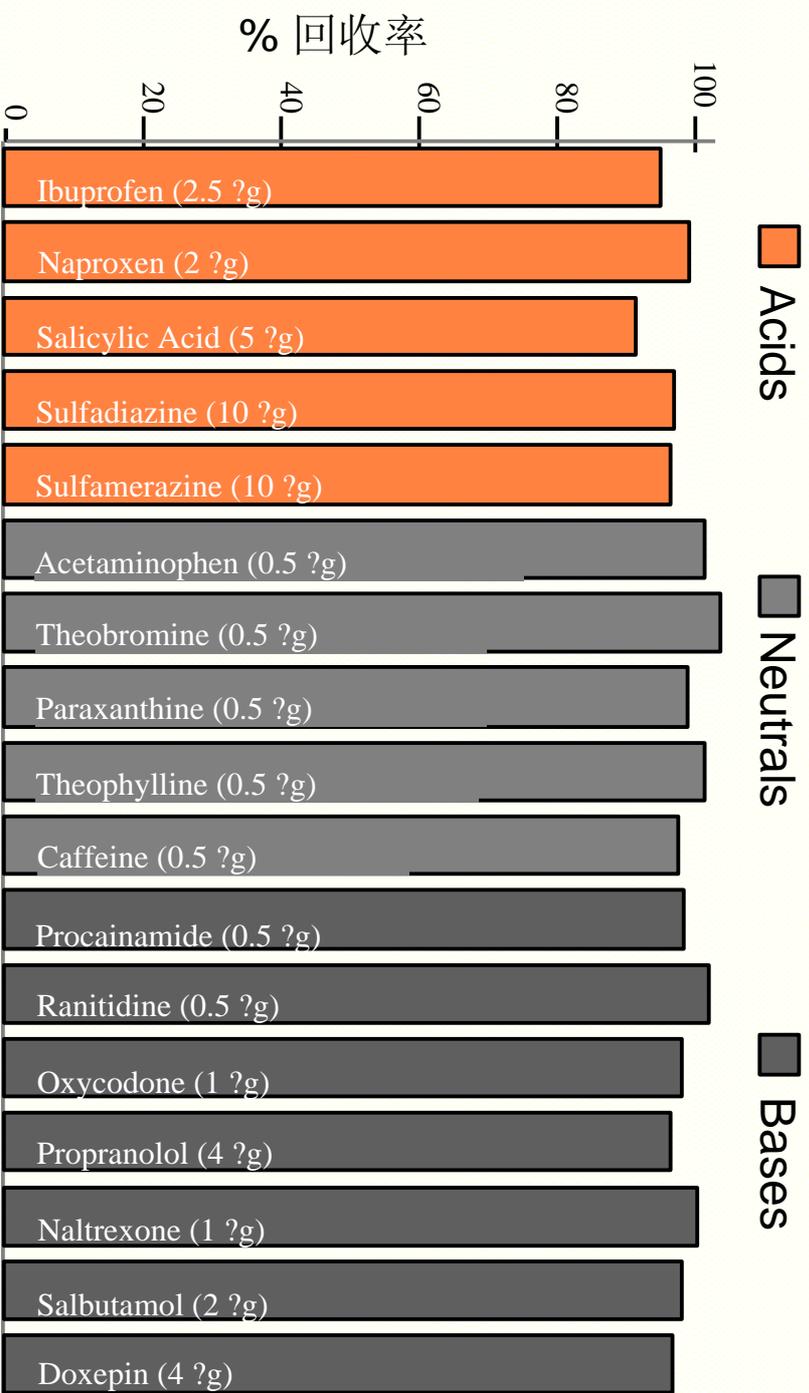
- 在很宽极性范围内保留酸性、碱性及中性化合物
- 样品不会穿透小柱

### ✓ 益处:

- 对极性化合物可获得较高回收率
- 使用同一方法，提取药物及其极性代谢产物可获得高而重现性好的回收率
- 一种吸附剂适用于大多数SPE提取过程



# 结果：通用型吸附剂



Spiked Serum on 1 cc 30 mg Oasis? HLB Cartridges



IT'S ALL IMPORTANT

Waters

# Oasis™ HLB 固相提取小柱

## 特征三，重现性

Oasis HLB吸附剂填料在Waters ISO 9002-认可的工厂中生产 — 确保重现性.

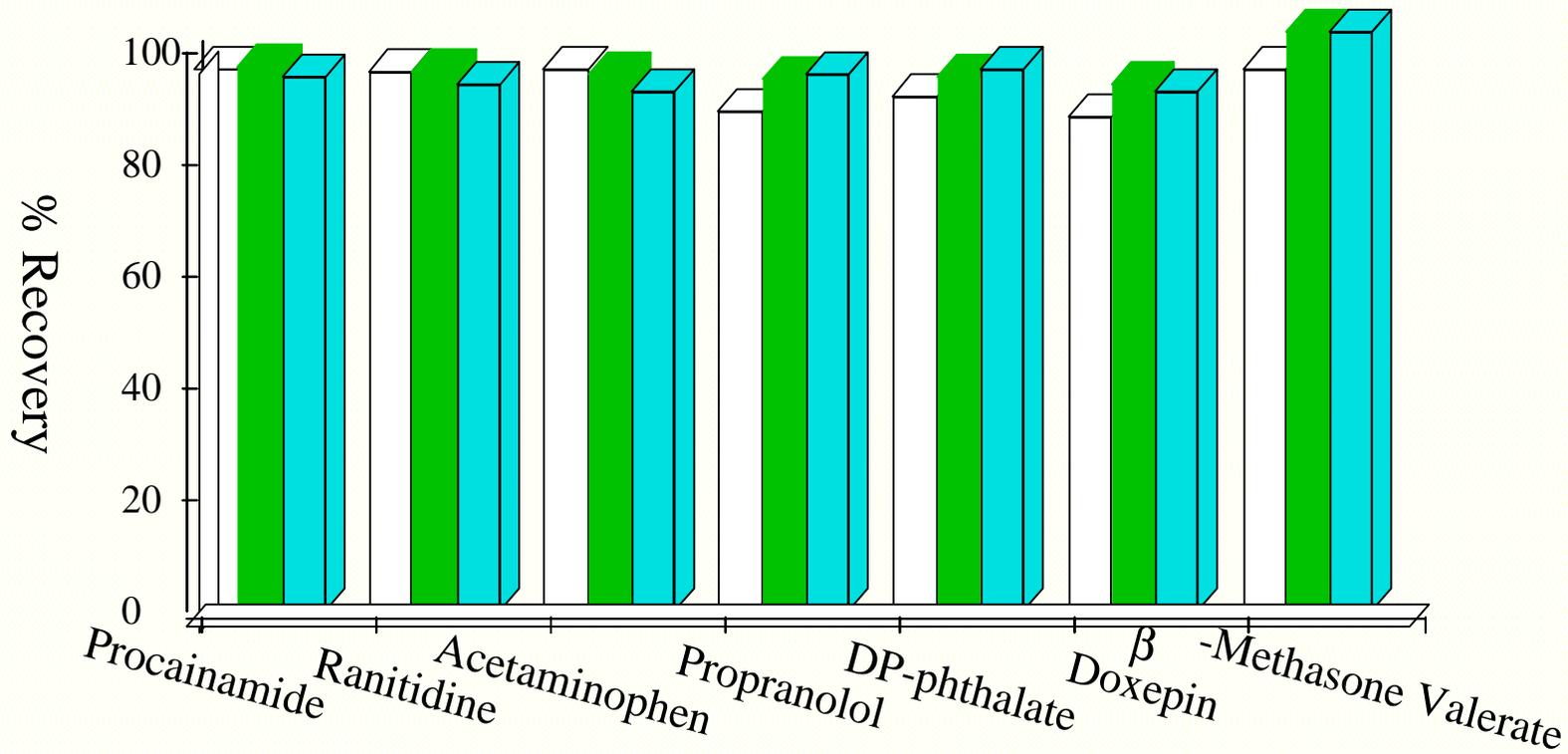
- 优势：
  - ✓ 每批吸附剂进行严格的质量控制，建立SPE填料重现性的新标准
- 益处：
  - ✓ 每盒产品附带合格证书
  - ✓ 不同批次具有重现的回收率



# Oasis 不同批次间重现性

□ Batch A    ■ Batch B    ■ Batch C

0.96%   1.21%   2.02%   3.66%   2.40%   3.06%   3.67% RSD



IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**

# Oasis小柱的使用方法

样品制备

将样品用水稀释

平衡/活化小柱

1mL甲醇/1mL水

上样

可上200 mL样品

清洗

1mL5%甲醇/水

洗脱

1mL甲醇

挥发并用流动相重组

准备进样

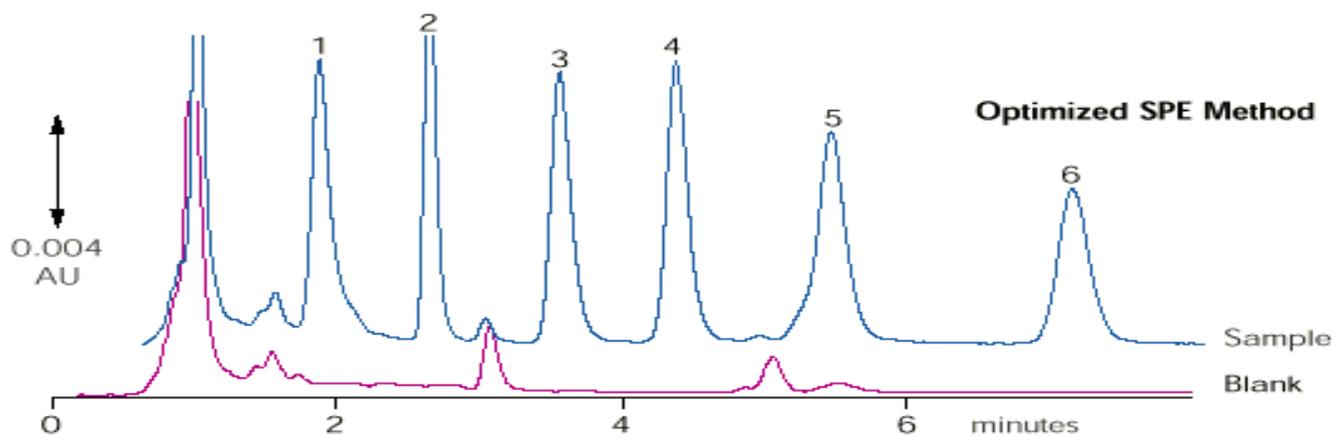
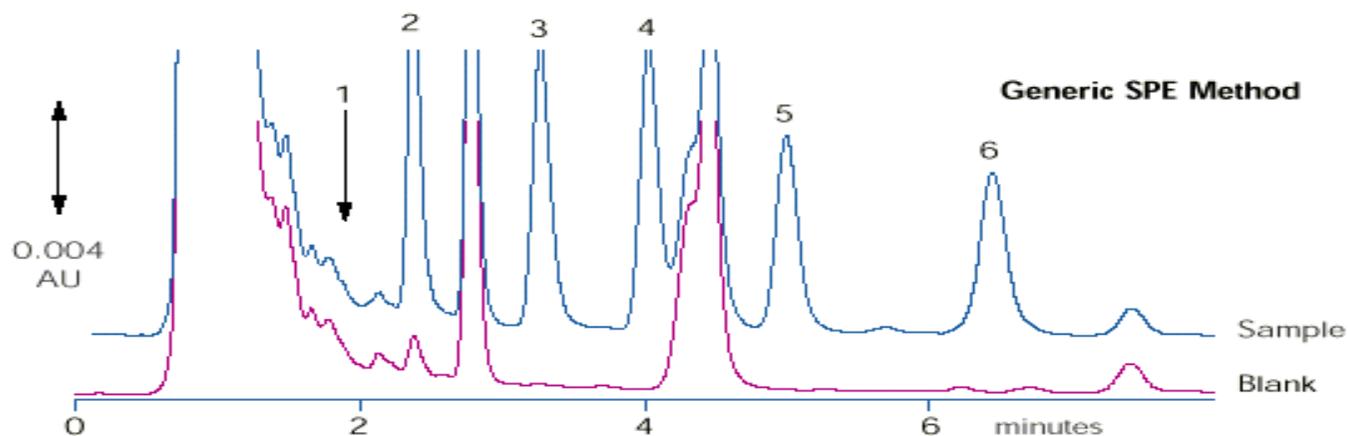
IT'S ALL IMPORTANT

**Waters**



# Oasis™ HLB : 优化的提取方法

Meeting the Background Challenge of UV Detectors:  
Analysis of Tricyclic-Antidepressants in Porcine Plasma



Column: SymmetryShield™ RP<sub>8</sub>, 3.5 μm, 4.6 x 75 mm  
Guard Column: Sentry™ Guard Column SymmetryShield™ RP<sub>8</sub>, 5 μm



# Oasis™ HLB -应用

- ❁ 各种药物提取，尤其是生理体液中的药物，  
如血浆、尿液中的药物等
- ❁ 天然产物提取
- ❁ 农业化学应用，如提取除草剂、杀虫剂等
- ❁ 环境化学应用，如提取多环芳烃等

