

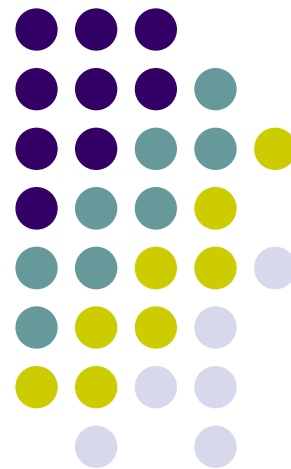
谱图分析和常见问题处理

高效液相色谱

(High performance Liquid
Chromatography, HPLC)

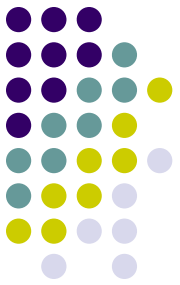
严冬青

2024年9月





- 一、色谱数据处理
- 二、色谱图
- 三、色谱图名词术语
- 四、异常峰分析
- 五、流动相的选择



一. 色谱数据处理

- 色谱数据处理是通过ADC转换器, 把模拟信号转换成数字信号, 然后采用色谱软件处理给出色谱图等信息。



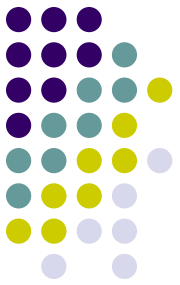
色谱仪信号输出图

● 数据处理原理

- 峰的检测
- 数据采集
- 基线校正和重叠峰的分离

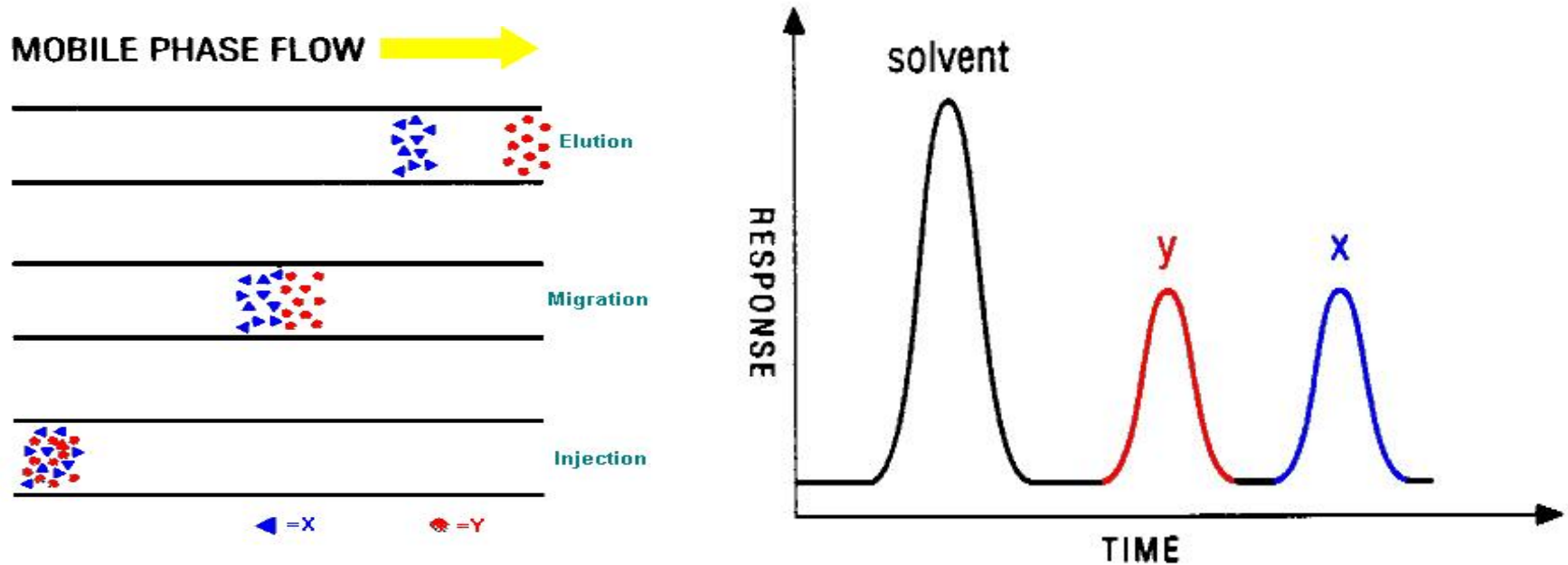
● 数据处理方法

- 自动处理
- 人工修正

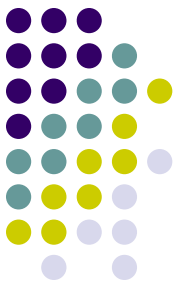


二. 色谱图 (Chromatogram)

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

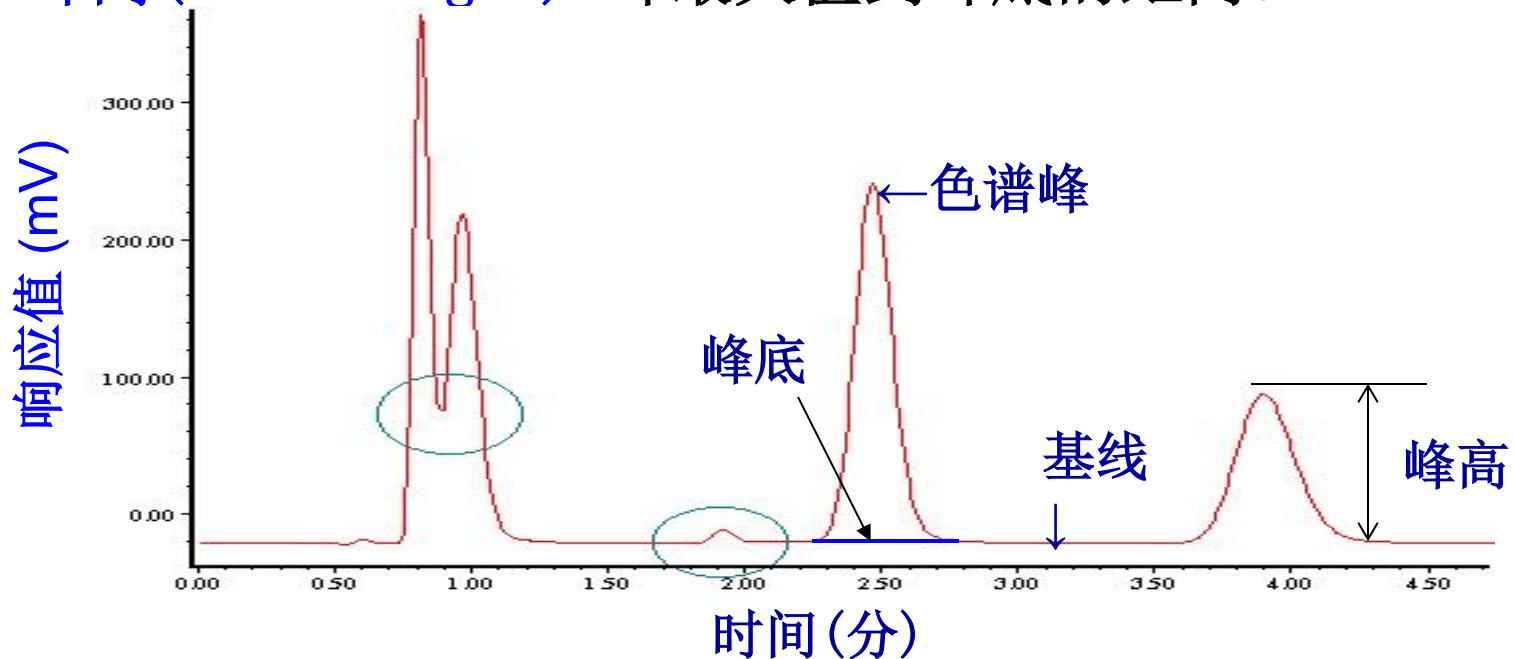


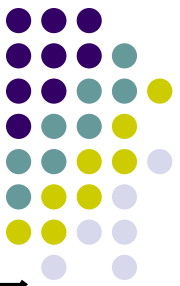
样品组分分离示意图



三. 色谱图名词术语(1)

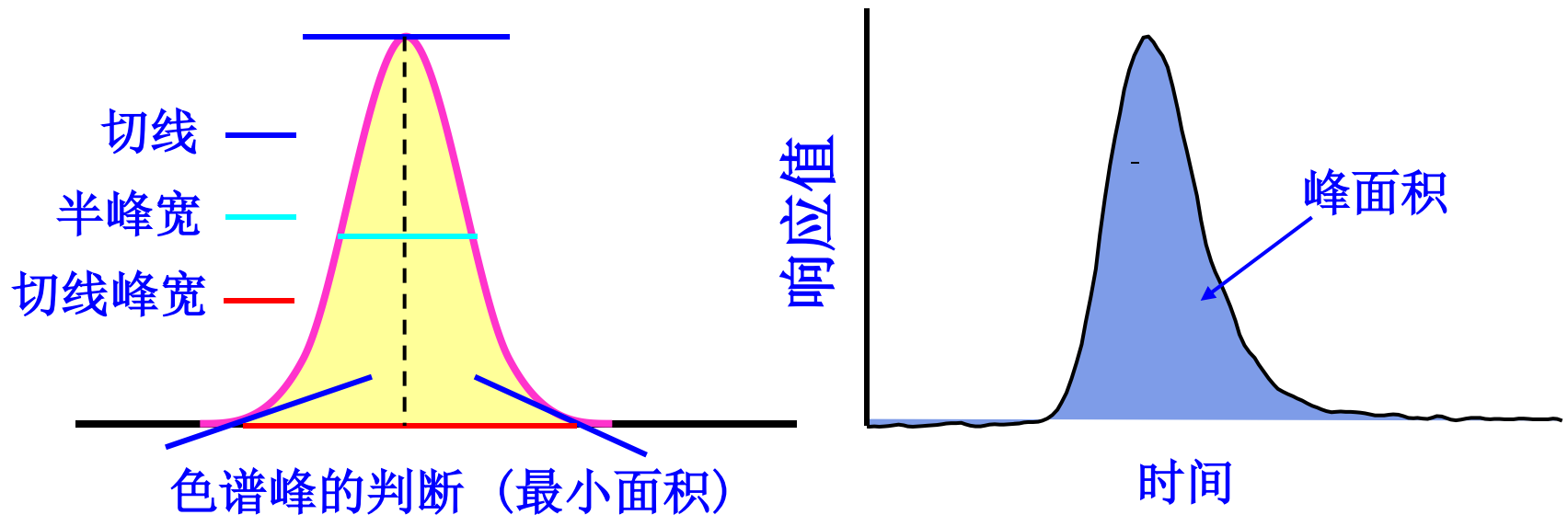
- 色谱峰(Peak): 色谱柱流出组分通过检测器时产生的响应信号。
- 峰底(Peak Base): 峰的起点与终点之间连接的直线。
- 峰高(Peak Height): 峰最大值到峰底的距离。



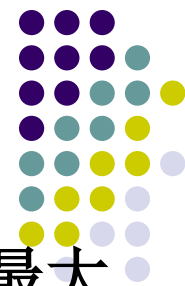


三. 色谱图名词术语(2)

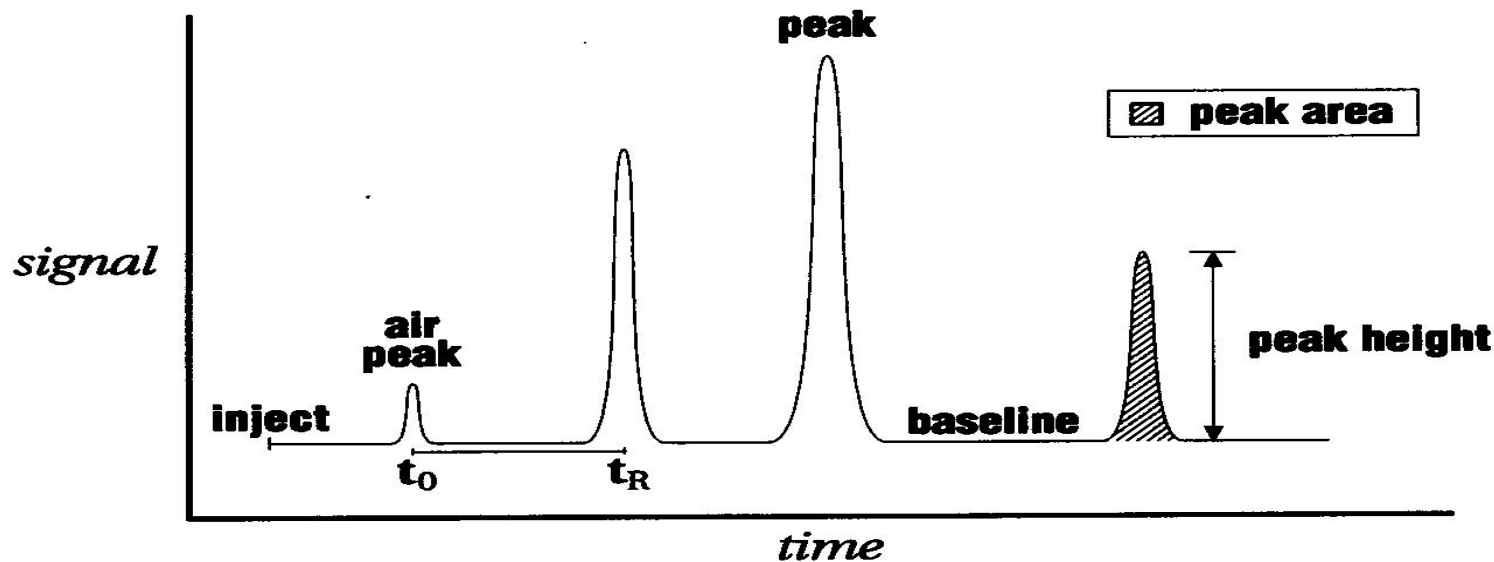
- 切线峰宽 (**Peak Width**, 峰宽): 在峰两侧拐点处所作切线与峰底相交两点之间的距离。
- 半峰宽 (**Peak Width at Half Height**): 通过峰高的中点作平行于峰底的直线, 此直线与峰两侧相交两点之间的距离。
- 峰面积 (**Peak Area**): 峰与峰底之间的面积, 又称响应值。

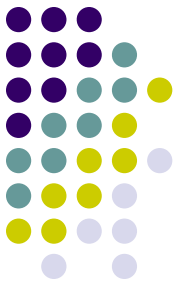


三. 液相色谱图名词术语 (3)



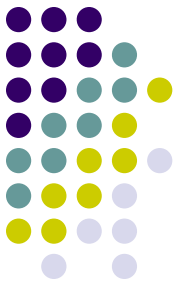
- 保留时间 (T_R) (Retention time): 组分从进样到出峰最大值所需的时间。
- 死时间 (t_0) (Dead time): 不被固定相滞留组分的出峰时间. (其测定通常使用不被柱子保留而又有紫外吸收的惰性物质, 例如: 正相色谱常用四氯化碳, 反相色谱常用甲醇、尿嘧啶、 NaNO_3 等)。
- 调整保留时间: $t_R' = t_R - t_0$





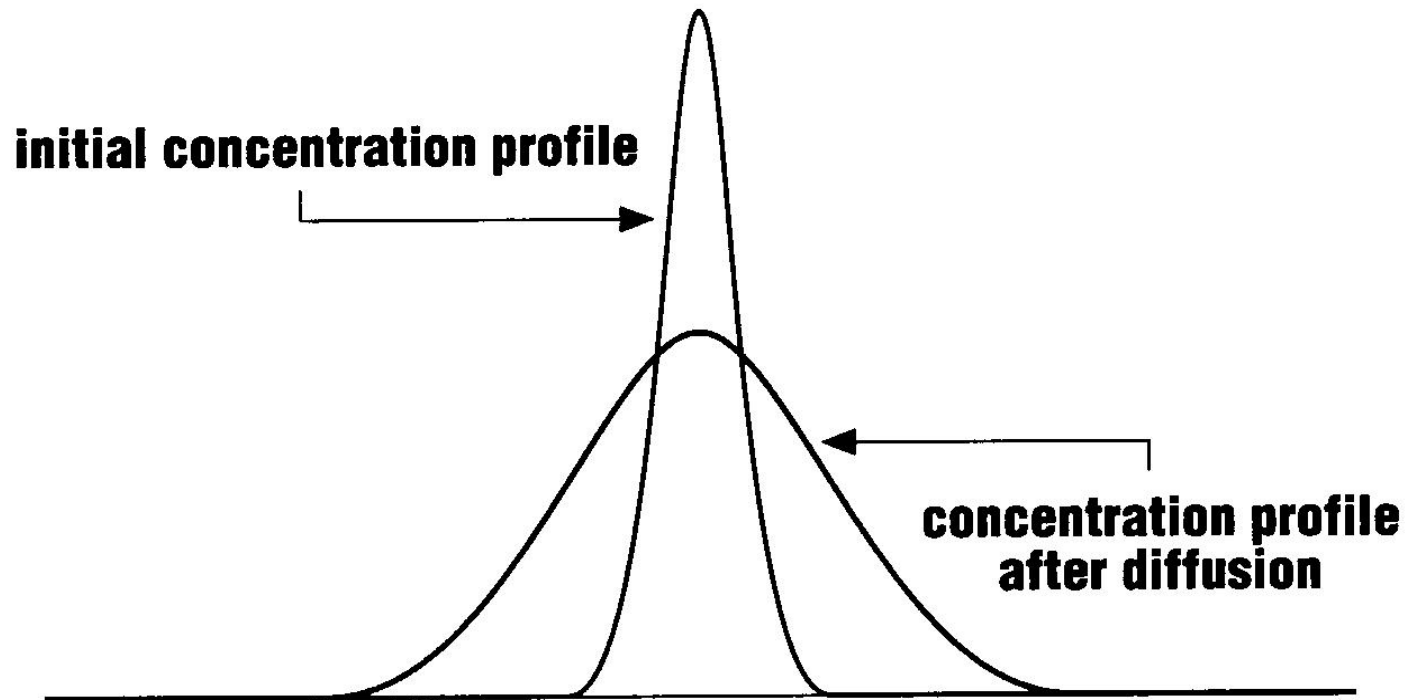
三. 液相色谱图名词术语(4)

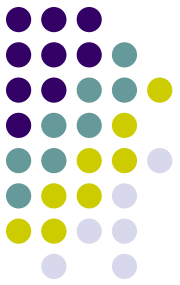
- 保留体积(V_R) (Retention volume): 组分从进样到出现峰最大值所需的流动相体积。
- 死体积(V_0) (Dead volume): 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值所需的流动相体积。
- 调整保留体积: $V_{R'} = V_R - V_0 = t_{R'} \cdot F_C$
- F_C : 流动相的流速 mL/min。



三. 液相色谱图名词术语(5)

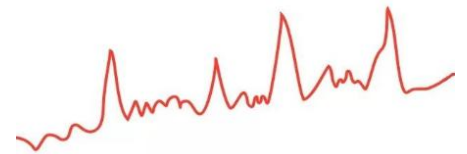
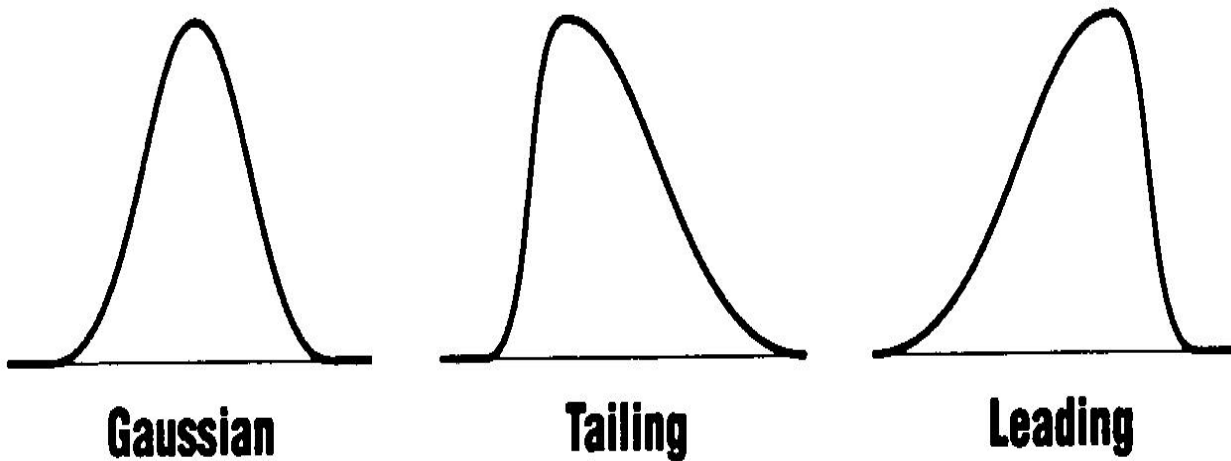
- **谱带扩展 (Band Broadening)**: 由于纵向扩散, 传质阻力等因素的影响, 使组分在色谱柱内移动过程中谱带宽度增加的现象.

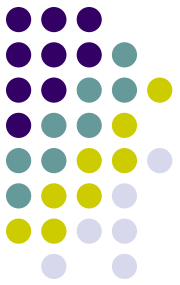




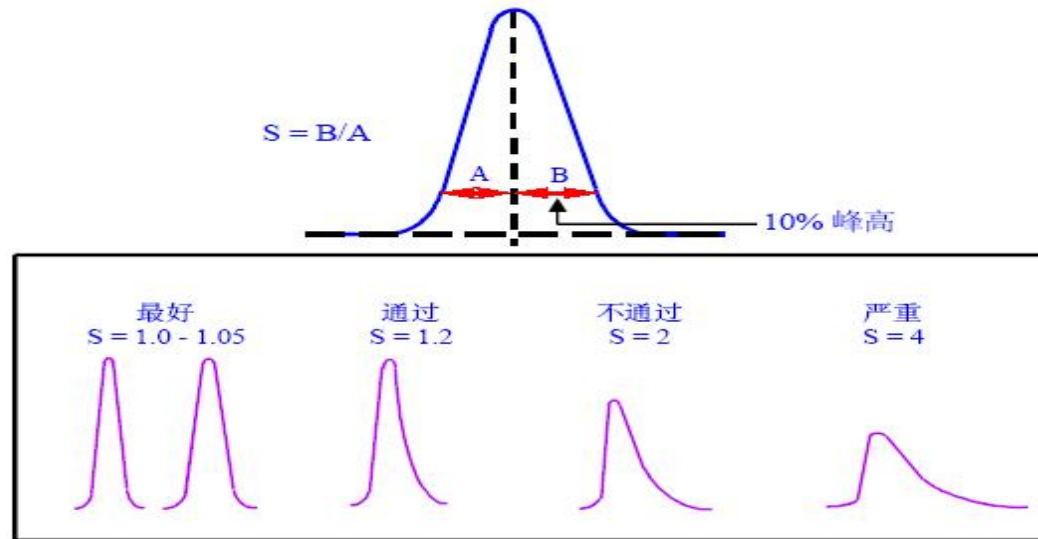
三. 液相色谱图名词术语 (6)

- 拖尾峰(Tailing Peak): 后沿较前沿平缓的不对称峰.
- 前伸峰(Leading Peak): 前沿较后沿平缓的不对称峰.
- 鬼峰(Ghost Peak): 并非由试样所产生的峰, 亦称假峰.

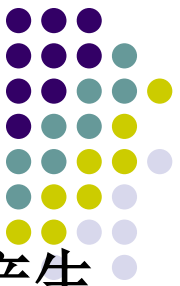




峰的对称性

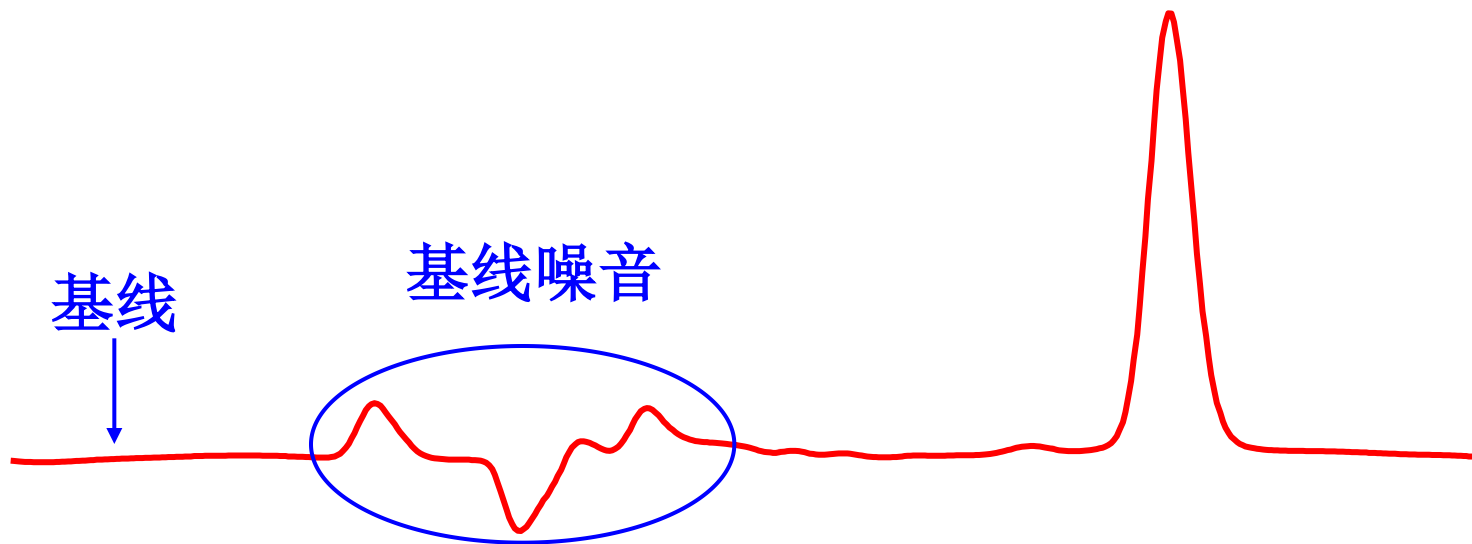


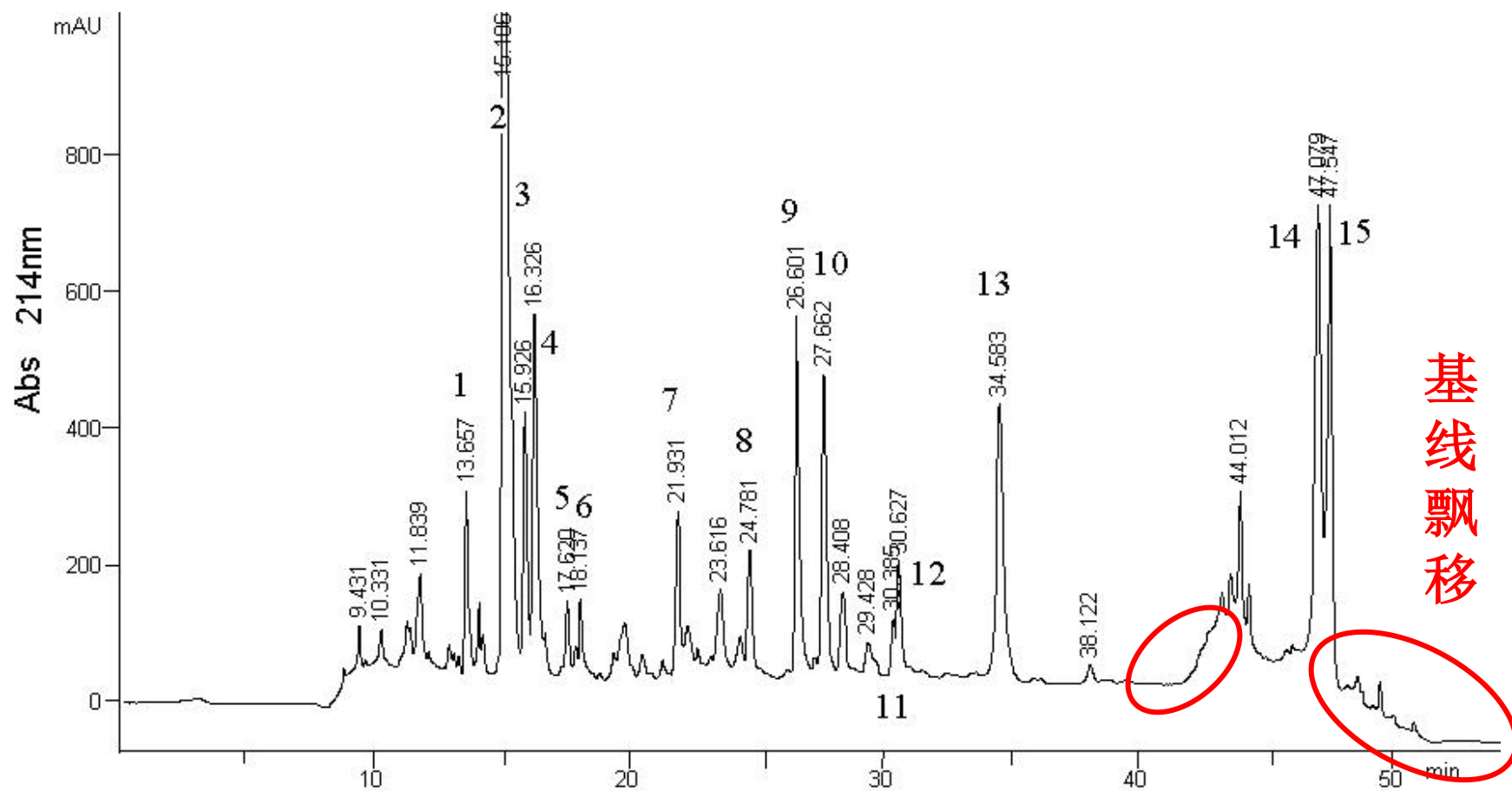
在理想的情况下，色谱峰应该是高斯峰或对称峰，但是由于超柱效应、样品在固定相上的吸附或色谱柱床不正常，使色谱峰出现拖尾。可以使用不对称公式计算色谱峰的不对称度。一般当**不对称度是3或更高时**就不适合于积分和定量分析。

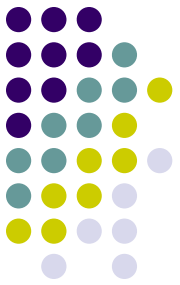


三. 液相色谱图名词术语 (7)

- **基线 (Baseline)**: 在正常操作条件下, 仅由流动相所产生的响应信号.
- **基线噪声 (Baseline Noise)**: 由各种因素所引起的基线波动.
- **基线漂移 (Baseline Drift)**: 基线随时间定向的缓慢变化.



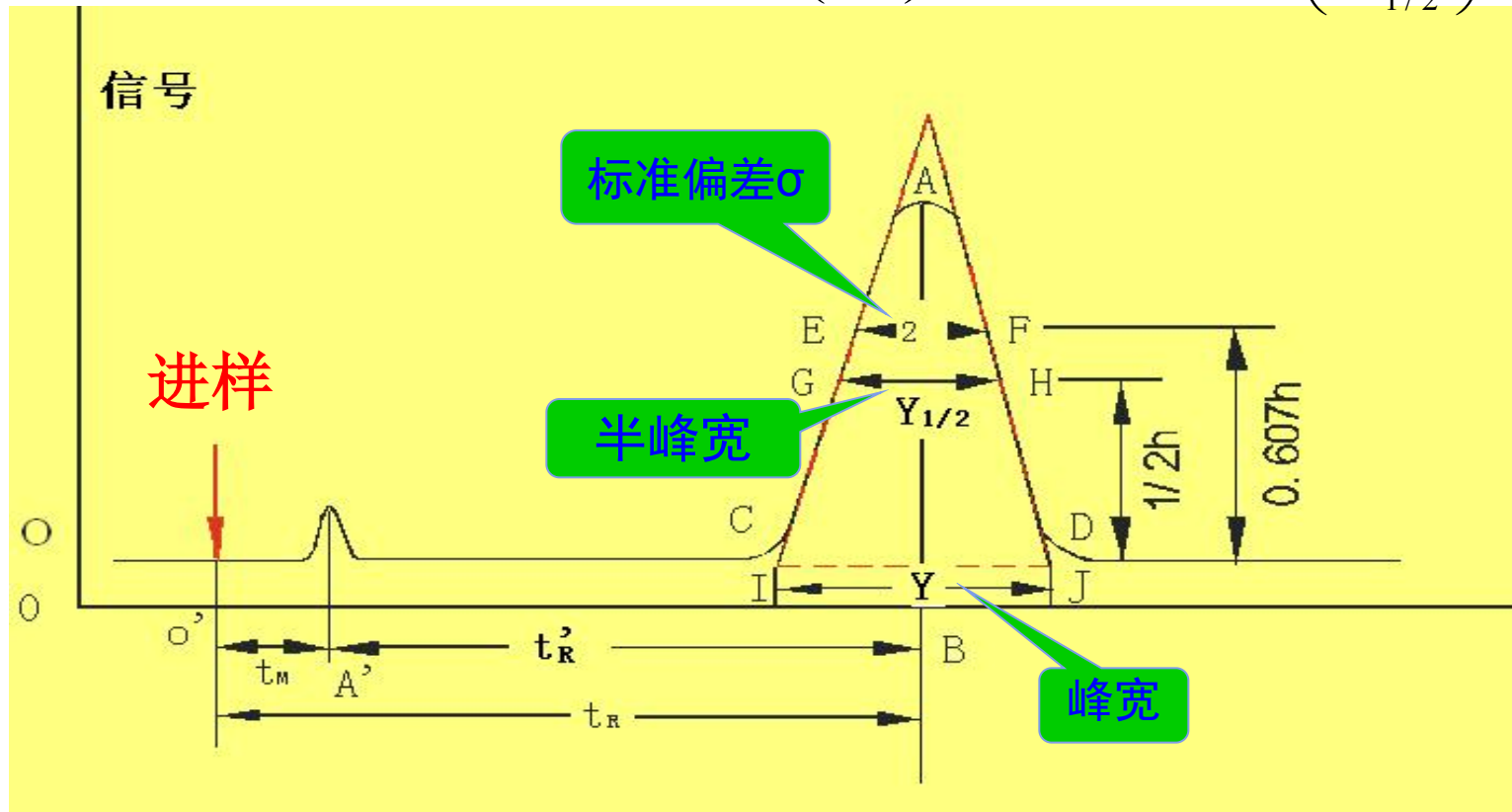


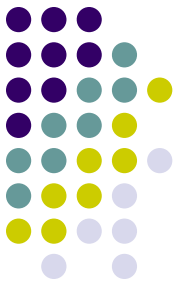


三. 液相色谱图名词术语(8)

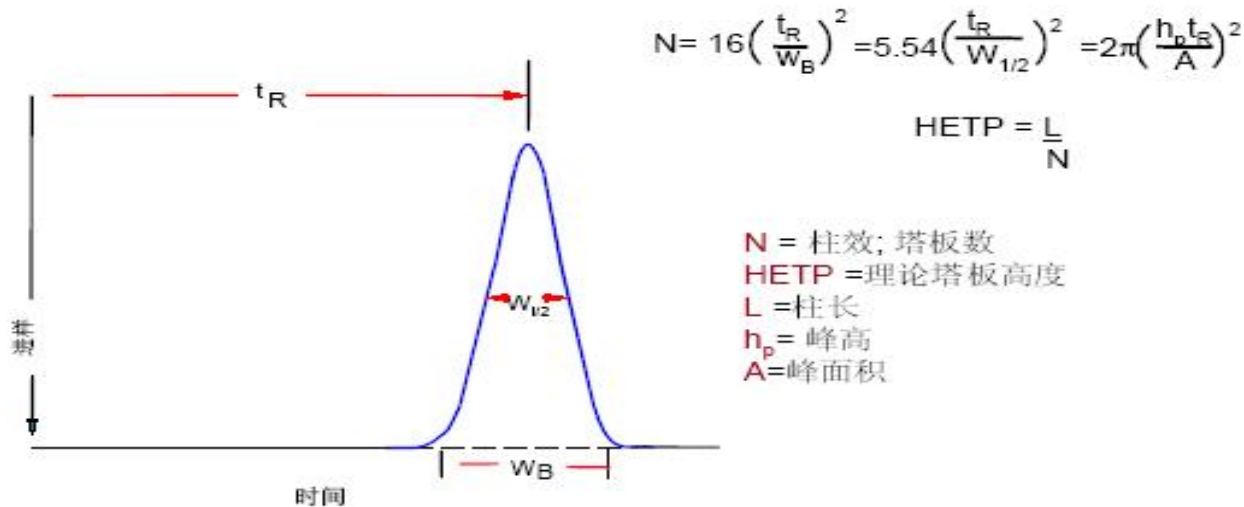
- 标准偏差(σ) (Standard deviation): 0.607倍峰高处峰宽的一半, 为便于测量, 改用**半峰宽**表示。目的是为了计算柱效率(柱效)。

- **柱效** (理论塔板数) : $N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$ 或 $N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$





计算柱效



柱效常常是指塔板数，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。



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

缩短柱长(N $\downarrow$) 同时减小粒度 (N $\downarrow$) 能:

- 保持分离度
- 缩短分析时间
- 减少溶剂用量

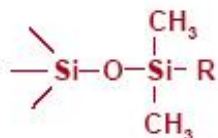
Column Size	Particle Size	Plate Number (N)	Void Volume (V_m)
4.6 x 250 mm	5- μm	20,000	2.5 mL
4.6 x 150 mm	5- μm	12,000	1.5 mL
4.6 x 150 mm	3.5- μm Rapid Resolution	20,000	1.5 mL
4.6 x 75 mm	3.5- μm Rapid Resolution	10,000	0.75 mL
4.6 x 50 mm	3.5- μm Rapid Resolution	6,000	0.5 mL
4.6 x 30 mm	3.5- μm 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，4.6x250 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。

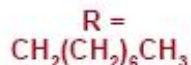
反相色谱柱



硅胶



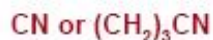
C-18, 保留性最强, 疏水, 刚性柱的选择



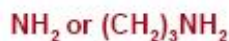
C-8, 刚性, 保留性比C18小



C-3, C-4, 肽, 稳定性差一些, 保留性差一些



氰基, 刚性很强, 最常用的极性反相色谱填料



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

聚合物基

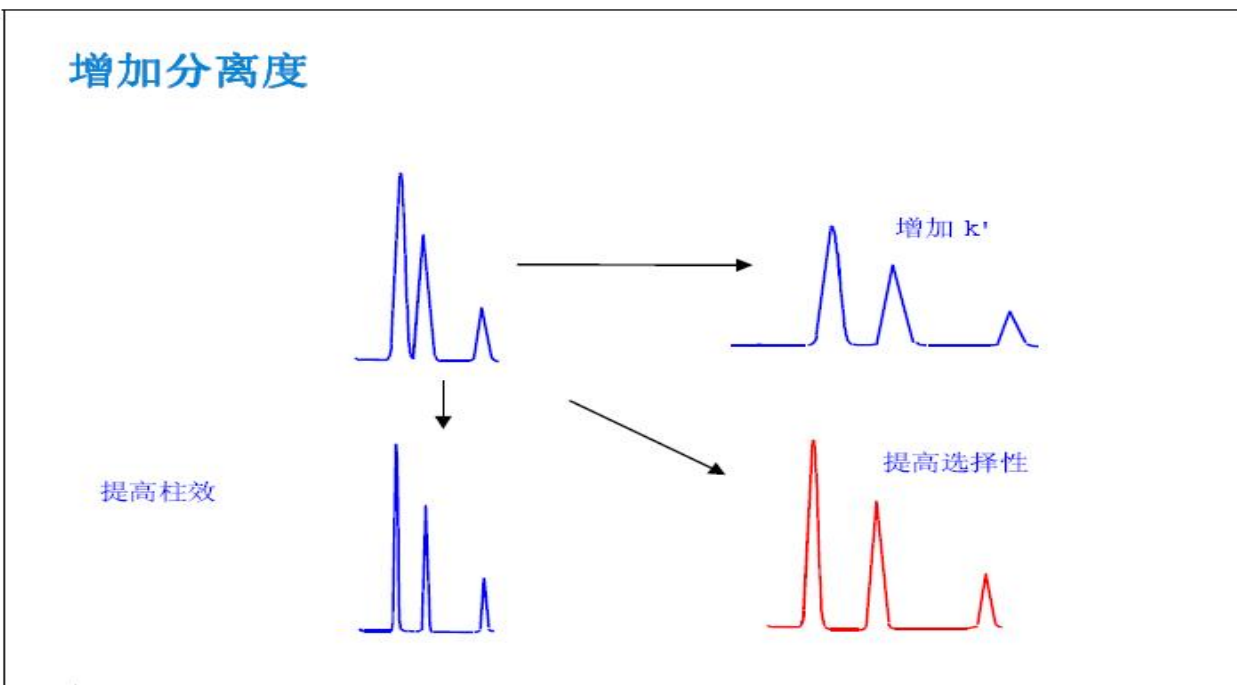
聚苯乙烯-二乙烯基苯 pH 1 - 13, 稳定, 柱效低

在反相色谱柱中键合相填料有明显的差别, 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。

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。氰基柱可以分离不同极性基团的化合物, 是比较耐用的色谱柱。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。苯基柱的极性强度于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在较宽的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。

分离度

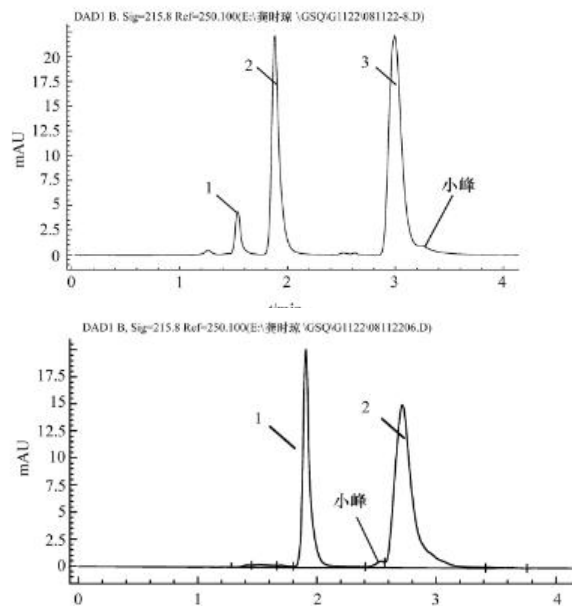


总体来讲，影响色谱峰之间分离度的因素有三个：柱容量、柱效和选择性。

- 1) 提高柱效色谱峰尖锐，色谱柱的长度、类型、颗粒度大小控制这一因素。
- 2) 增加柱容量使色谱峰的保留时间长一些，流动相和温度控制这一因素。
- 3) 提高选择性使色谱峰彼此距离远一些，键合相、流动相和温度控制这一因素。



四. 异常峰分析



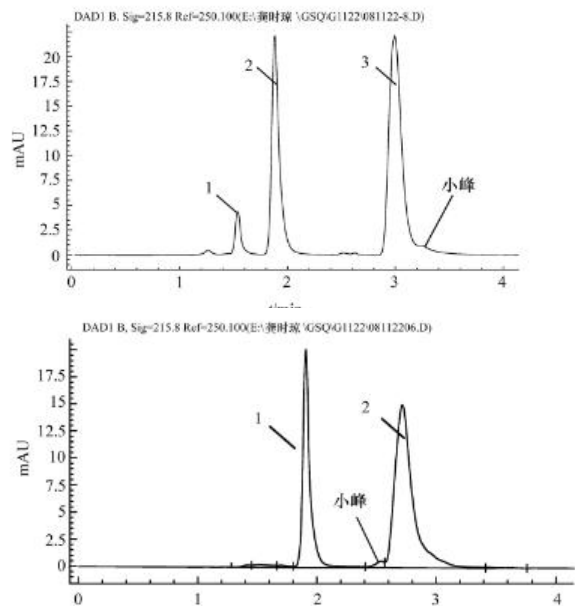
4-1 峰前或峰后有峰

(1) **样品不纯**。可改变不同的流动相和色谱柱，对样品进行分离比较，选择合适的分离条件。

(2) **分析柱或保护柱柱头塌陷**。此情况较常见，可更换分析柱或保护柱后对峰形进行比较。柱头塌陷时往往所有的峰都会出现峰分裂。对色谱柱再生和清洗可以改善分离效果。

(3) **色谱柱柱容量下降**。当长时间使用后，有一些强保留组分吸附在柱子中，不大的进样量往往就会出现峰分裂。用强洗脱能力的溶剂清洗色谱柱，或更换色谱柱可使问题得到改善。

四. 异常峰分析



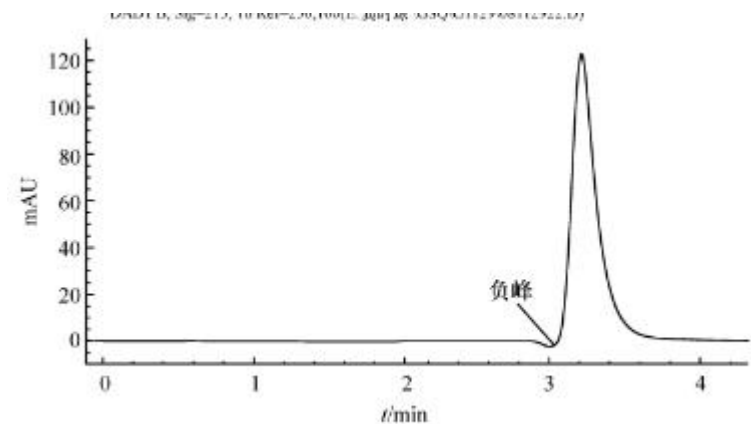
4-1 峰前或峰后有峰

(4) **样品溶剂与流动相不匹配或进样体积过大**。当样品溶剂比流动相极性大时，有时即使进样体积很小，也容易出现峰变形和裂分现象。建议用流动相溶解样品。

(5) **流动相不恰当**。此情况较罕见，有些样品在特定的色谱条件下可能存在结构的动态平衡，而出双峰，这种双峰是无法分离完全的，改变色谱条件尤其是pH值会使峰形正常。

(6) **样品分解**。不稳定的样品在色谱分离过程中变成其他物质而出现双峰。这时需改变样品处理方法或色谱分离条件。

● 四. 异常峰分析

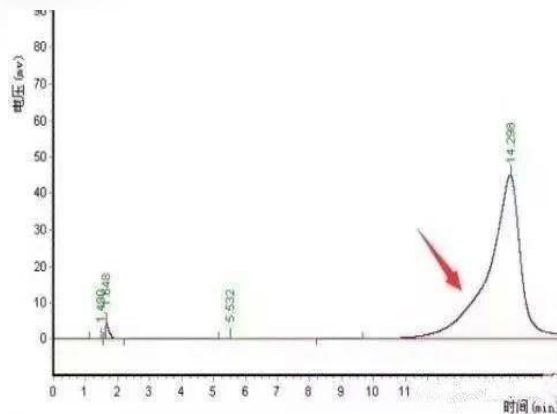


4-2 出现负峰

- (1) 样品组分的吸收低于流动相。可改变流动相或改变检测波长。
- (2) 进样过程中进入空气。进行排气处理，直到基线平稳再进样。
- (3) 配制样品的溶液与流动相不一样。重新配制样品，用与流动相一样的溶剂配制或稀释样品。

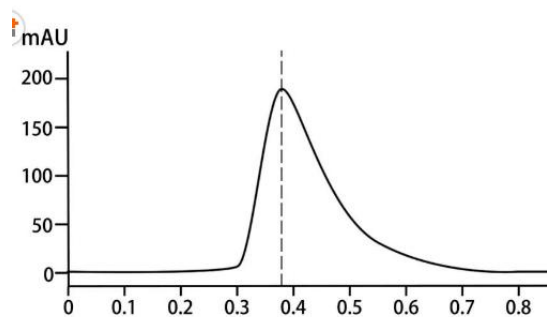


四. 异常峰分析



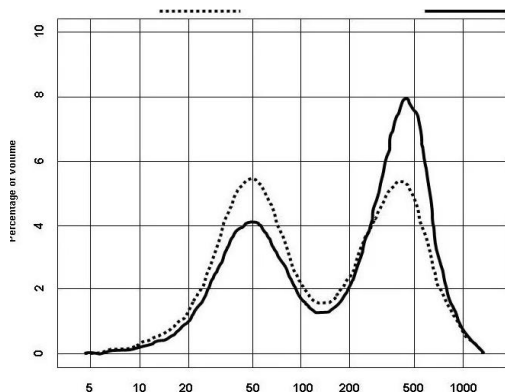
- 前伸:**
- 1) 流动相选择不合适, 选择合适的流动相 ;
 - 2) 样品过载, 降低进样量 ;
 - 3) 柱温太低, 升高柱温 ;
 - 4) 色谱柱损坏, 更换色谱柱 ;

- 拖尾:**
- 1) 干扰峰, 优化条件分离 ;
 - 2) 色谱柱塌陷, 更换色谱柱 ;
 - 3) 流动相pH不合适, 调节pH值 ;
 - 4) 管路没有接好, 存在较大的死体积, 可以重新接一下。



4-3 前伸峰和拖尾峰

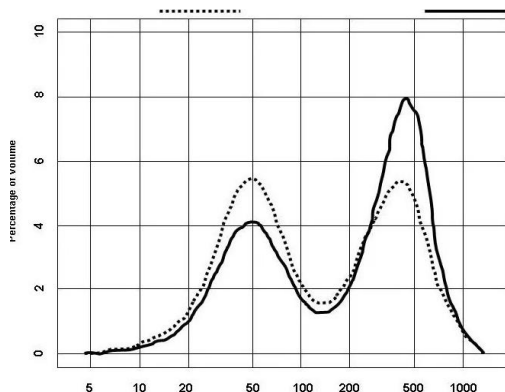
四. 异常峰分析



4-4 双峰

(1) **色谱柱**。如果发现每个色谱峰都是双峰（出峰越快，双峰的可能性会减少），尤其采用单一纯物质时，可以肯定色谱柱出现问题（柱头受损或柱头固定相变脏或流失）。如果进样量少，原来色谱柱正常，色谱峰的形状多为一大峰带一小峰，不一定拖尾，一般考虑是柱头受堵，将色谱柱反过来接，用流动相冲洗、酸洗或其它溶剂冲洗，将堵在柱头的残留物冲掉，再反过来，一般情况下就好了。

● 四. 异常峰分析

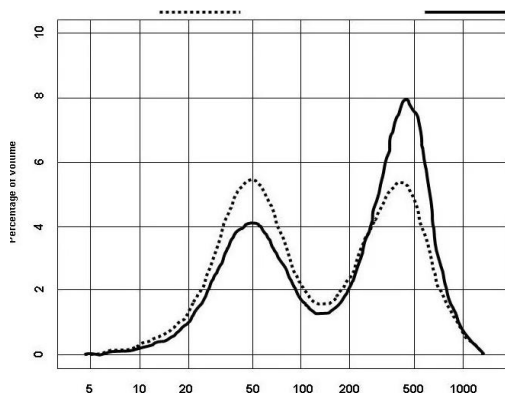


4-4 双峰

(2) **溶剂极性**及**进样量**。样品的最佳的溶解方法是用流动相溶解，但是很多情况是不一致的。当用极性较大的溶剂（如纯甲醇、纯乙腈，纯乙醇）溶解样品、分析体系中以水为主、样品进样量大（如20 μ L）时，单一的纯物质可能会出双峰且拖尾，保留时间会提前（相对进样量少而言），将进样量减少一半以上，峰型将变为正常。这是样品的溶剂与流动相极性相差太大，而流动相来不及将其稀释达到平衡造成的。

当进样量不一定大但绝对量很大时，色谱图上的双峰紧靠在一起，基本上齐高，不拖尾（如果出峰很快，也可能是色谱柱问题）。将样品稀释再进样就可以了，色谱柱过载造成的。

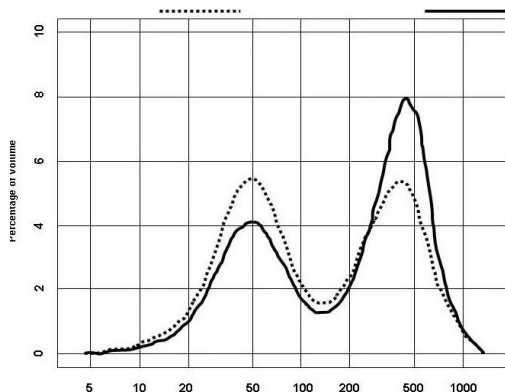
● 四. 异常峰分析



4-4 双峰

(3) **样品特性**。有些样品存在互变异构现象，而这种互变异构体无法分开，而是以一个动态平衡存在。在色谱分析时，在特定的条件下，一种物质将出现双峰，双峰靠的很近，基本齐高，不拖尾，条件稍一变化，尤其pH，双峰现象将消失，如红霉素等。

● 四. 异常峰分析

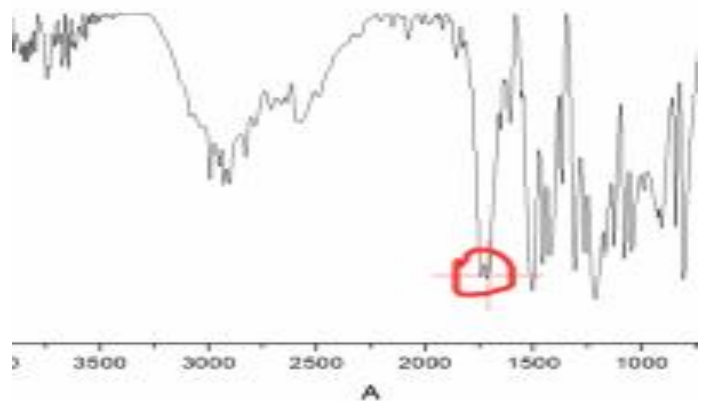
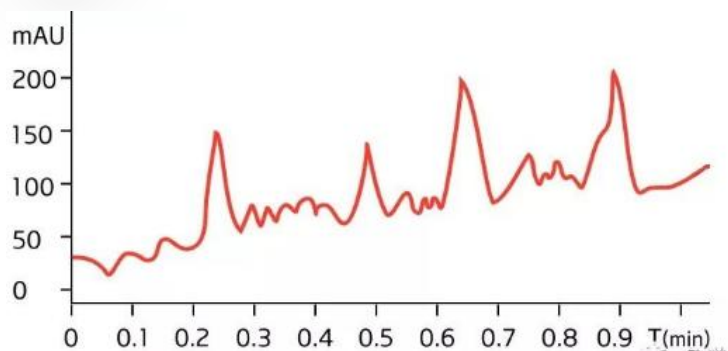


4-4 双峰

(4) **仪器参数**。如果数据记录仪上的记录间隔时间缩短，一个峰将变为二个峰或更多，这时需要将间隔时间设置稍长。

还有一种情况，参比波长设置过小，本来一个峰会变成对称的两个峰，这时要将参比波长设置更大，或者取消。

● 四. 异常峰分析



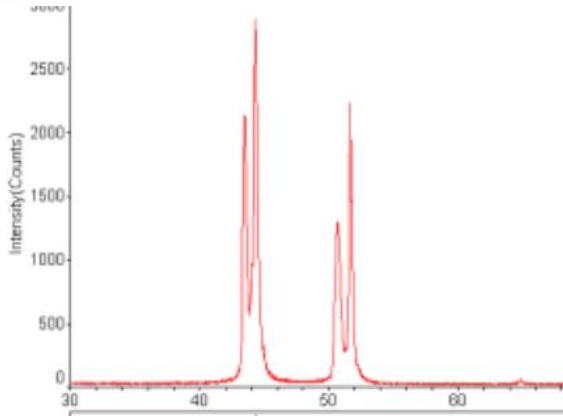
4-5 鬼峰、倒峰和未出峰

- 1) 系统未进样(漏液、样品不溶解)；
- 2) 样品没有处理好(破坏，衍生化等)；
- 3) 检测器紫外灯不灵敏；
- 4) 进样阀、仪器管路中残余物质；
- 5) 流动相污染。





● 四. 异常峰分析



- 1) 样品基质复杂——柱污染或部分阻塞滤片；
- 2) 流动相 $\text{pH} \geq 8$ ——由于硅胶溶解导致柱塌陷(除非使用专门的柱子)；
- 3) 溶剂比流动相的强度大——可能产生裂峰或宽峰, 由样品量决定 (溶剂化效应)。

4-6 分裂峰



五. 流动相的选择



分析样品的组成及性质

- 1) 样品的相对分子质量：分子量大的样品选择梯度洗脱效果较好。
- 2) 样品的溶解度：非极性样品选择正相色谱，极性样品选择反相色谱。
- 3) 样品的酸碱性：当样品中有酸或碱性物质时，加入酸、碱或缓冲液作为离子抑制剂来抑制被测物解离。起到抑制流动相pH，提高保留时间的重现性，改善峰型等作用。
- 4) 样品的稳定性：样品在流动相中是否稳定存在决定了样品的分离情况。



五. 流动相的选择



示例：用ODS-C18色谱柱分析间苯三酚时，用水-有机相作为流动相，间苯三酚的峰有严重拖尾现象，峰型较差，选用乙腈-磷酸盐缓冲溶液（6:94）时主峰与杂质峰完全分离，且峰型良好。

原因：间苯三酚为弱酸性物质，在水-有机相系统中呈解离状态，加入缓冲液抑制剂其解离，起到改善峰型的作用。

分析样品的组成及性质



五. 流动相的选择



有机溶剂的种类和配比决定流动相的极性，即洗脱能力。

- 1) 较常用的有机溶剂是甲醇和乙腈，当单独使用甲醇和乙腈都不能满足要求时，就可以考虑混合使用。
- 2) 初始分离条件中，一般有机溶剂的比例定位80%，然后逐渐减少有机相的比例，直到样品保留时间在合理的范围内。

有机溶剂对分离的影响



五. 流动相的选择



缓冲盐对分离的影响

缓冲盐的种类、**pH**值和浓度直接影响缓冲盐的离子强度，流动相的离子强度对可解离化合物的色谱峰型具有显著影响。

- 1) 选用pKa值与流动相pH值相越接近的缓冲盐，其离子强度越强，易得到较好的峰型。甲酸的pKa值为3.7，乙酸的pKa值为4.7。
- 2) 流动相pH值高于或低于被分析物两个pH值单位时，有助于获得尖锐的峰型，化合物99%以一种形式存在。
- 3) 缓冲盐浓度越大，其离子强度越强，对峰型的改善越明显。



2024



谢谢观看

Thanks for your
attention!

