

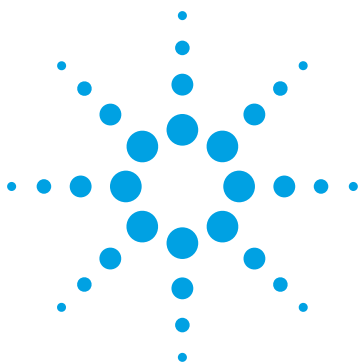


液相色谱手册

液相色谱柱与方法开发指南



Agilent Technologies



液相色谱手册

液相色谱柱与方法开发指南



Agilent Technologies

目录

前言

色谱的基本概念

柱效 (N)

保留因子 (k)

选择性或分离因子(α)

分离度 (R_s)

压力

van Deemter 曲线

梯度方程

液相色谱仪基本原理

泵 — 液相色谱系统的“心脏”

- 压力范围
- Agilent 1200 Infinity 系列泵的能力范围
- 溶剂混合
- 延迟体积
- 柱外体积

自动进样器 — 操纵工作流程自动化体系的“大脑”

- 固定样品环和流通式自动进样器
- 进样精度和准确度
- 灵活性和样品容量
- 进样周期
- 交叉污染
- 新型进样方法和自动化

柱温箱 — 产生热量的“肌肉”

检测器 — “感知器官”

检测器灵敏度

- 线性范围
- 数据采集速率

5 HPLC 柱的选择 28

6 HPLC 模式 29

6 色谱柱选择的基本信息：常规柱 30

7 • 高效液相色谱 (HPLC) 柱 31

8 • UHPLC 柱 32

8 • 表面多孔填料柱 32

9 • LC/MS 柱 33

10 • 凝胶渗透色谱 (GPC) 柱、体积排阻色
11 谱柱 (SEC) 柱和凝胶过滤色谱 (GFC) 柱 34

11 • 生物表征柱 34

13 色谱柱特性 35

14 • 硅胶 35

14 • 键合相 35

15 • 聚合物 35

16 • 孔径 36

18 • 粒径 36

18 • 色谱柱规格 37

卡套柱系统 38

性能的关键： 色谱柱的配置和设置 41

减少柱外体积的重要性 42

实现完美的接头连接 43

接头连接要求 43

不可调金属接头 43

可调手紧式接头 45

Agilent A-Line 接头 45

200 次重复连接后的稳定性 47

与不同品牌色谱柱的兼容性 47

进样量 47

设置数据采集速率	48	• 流动相改性剂问题排查	76
驻留体积及其对色谱的影响	49	• 问题排查实例：基线漂移	76
• 测量系统的驻留体积	51	• 问题排查实例：高 pH 造成的峰展宽	
• 评估驻留体积的影响	53	和峰分裂	78
• 驻留体积与分析时间	54	• 问题排查实例：流动相改性剂和选择性	78
螯合物	54	• 轻松、可靠的 pH 测试	79
pH 和流动相改性剂	55	优化反相色谱条件	80
梯度操作	56	• 等度优化	81
优化色谱柱的再平衡	57	• 梯度优化	84
色谱柱老化	59	用于反相色谱的聚合物色谱柱	86
• 键合相流失	59	反相色谱的等度方法开发“上手”步骤指南	87
清洗反相硅胶柱	59	从常规柱向高效柱进行方法转移的技巧	89
清洗正相硅胶柱	61	自动化方法开发工具	91
清洗反相聚合物柱	61	其它 HPLC 模式的方法开发	93
方法开发	62	• HILIC	93
方法开发：从何处入手	63	• 正相色谱	95
• 模式选择	63	• 离子交换色谱	97
• 选择色谱柱和填料规格	66	• 凝胶渗透色谱/体积排阻色谱	98
• 选择固定相	67	液质联用仪基本原理	99
反相色谱的方法开发	67	什么是 LC/MS?	99
反相色谱固定相的选择	67	LC/MS 可提供哪些信息?	100
反相色谱流动相的选择	70	液质联用仪的类型	101
• 流动相操作	70	• 单四极杆仪器	101
• 流动相和流动相改性剂问题排查	70	• 三重四极杆仪器	101
• 流动相混合	71	• 飞行时间和四极杆飞行时间仪器	101
• 流动相脱气	71	匀场离子淌度系统	102
用流动相改性剂控制 pH	71	MS/MS — 碎裂化合物，获得额外的特异性	102
• UV 检测器常用的缓冲液	73	化合物的电离	103
• LC/MS 的考虑因素	74	• 电喷雾电离	103

转下页

• 大气压化学电离	103	• 提高方法的耐用性	121
• 大气压光电离	103	• 有关驻留体积的提示	122
利用 LC/MS 开发方法的技巧	104	快速故障排查指南	123
• ESI-MS 的溶剂选择	104	有效排查故障的要点	123
• APCI-MS 和 APPI-MS 的溶剂选择	105	有用的参考资料	129
• 离子对色谱与质谱联用系统的溶剂选择	105	美国药典指定填料	129
样品前处理	106	溶剂相溶性	135
• 基质组分	106	流动相改性剂的 UV 截止波长	138
• 浓度问题	106	固相萃取吸附剂	139
关于离子抑制的注意事项	106	SPE 吸附剂条件	140
使用配备高效色谱柱的 LC/MS 时的注意事项	107	其它推荐的读物	141
• 灵敏度的提升	107	其它安捷伦资源	141
• 质谱扫描速率	108	词汇表	142
• 系统扩散	108	索引	169
LC/MS 软件	109	安捷伦液相色谱色谱柱	175
• 扫描类型 — 比较 TIC、EIC 和 SIM	109	安捷伦毛细管和接头	181
• 个人化合物数据库与谱库	110	安捷伦液相色谱仪器用灯	186
色谱结果的保护	112	安捷伦溶剂安全盖	188
可扩展性	113	安捷伦在线过滤器	190
使用高纯度级别溶剂的重要性	116	Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱产品组合	191
UHPLC 的特殊考虑	116	采用智能化系统模拟技术 (ISET) 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱	192
在线过滤器	117	备注	194
• 低体积在线过滤器	117		
保护柱	118		
溶剂饱和柱	118		
色谱柱入口筛板	118		
色谱柱保护和保存	118		
• 最大限度地延长柱寿命	118		
• 保存注意事项	120		
• 疏通色谱柱	120		
色谱柱变坏时的快速检查	120		
确保方法在全球范围内都重现	121		

前言

从何说起呢？液相色谱是一个庞大而复杂的话题，但也是一个我们永不会失去兴趣的话题。

遍及世界各地的色谱工作者正在使用 HPLC 技术，确保我们食物和水的安全、开发挽救生命的药物、保护我们的环境、保卫公共健康，而这仅仅是其应用的一角。您对色谱技术了解得越多，您能应用这一神奇技术所能做的工作就越多。

如今，有更多的色谱柱和填料供您选择，以适应日益广泛的应用需求。安捷伦现在有 2000 多种色谱柱可供选择，覆盖了最广泛的应用和条件。这就增加了根据您的需要选择最适用色谱柱的机会。

帮助您得到最好的液相色谱结果是我们承诺的一部分，因此，我们编制了这本液相色谱柱选择手册，其中包含了大量的提示和技巧，让您的工作更轻松、更高效。另外，我们还以 40 多年积累的经验为基础，为您提供色谱柱和接头日常使用中常见的问题提供建议。本指南涵盖了液相色谱中的主要色谱柱，重点是反相高效液相色谱。

如何使用本指南：

- 为便于查询，各章节有不同颜色标记
- 附加的词汇表非常全面。虽然限于篇幅，我们没能收录本书中的每个词汇术语，但仍不失为良好的资源
- 虽然本书也涉及了其它技术，但重点是反相 HPLC

色谱的基本概念

我们都还记得在学校里学习数学的感觉，总是想知道怎么把它用到实际生活中去。科学家们要比专业人员学习更多的数学，本章将告诉我们其中的原因。

这里，我们将简要概述一下色谱概念所涉及的公式和理论。对这些概念的理解将帮助您获得最好的结果，并在遇到问题时进行排查。

我们将从以下的性能基本概念开始：

- 柱效
- 保留
- 选择性
- 分离度
- 压力

这些都是理解如何优化结果、成功开发方法的关键。

我们还将探讨一些较复杂的概念：

- van Deemter 曲线
- 梯度方程

这两项内容对方法开发也很重要。

柱效 (N)

柱效用于比较不同色谱柱的性能。柱效可能是描述色谱柱性能引用频率最高的参数，以理论塔板数 N 表示。

柱效 保留时间 峰底宽

$$N = 16 (t_R / w_t)^2$$

方程 1. 柱效方程

保留时间 半峰宽

$$N = 5.54 (t_R / w_{1/2})^2$$

方程 2. 计算柱效的变换方程

塔板数高的色谱柱柱效更高。理论塔板数高的色谱柱与理论塔板数低的色谱柱相比，在给定保留时间内的色谱峰更窄。

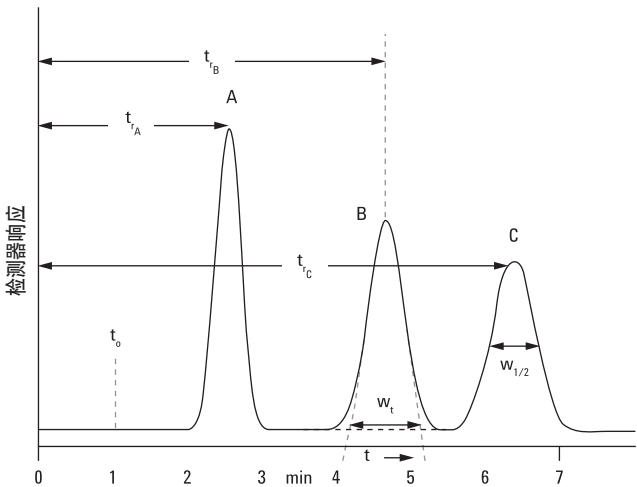


图 1. 柱效的色谱示意图

柱效
 $N = 16 (t_R / w_t)^2$
对于色谱峰 B, $16 (4.5 \text{ 分钟} / 0.9 \text{ 分钟})^2 = 400$
塔板数
 $k = (t_R - t_0) / t_0$

保留
 $k_A = (2.5 - 1) / 1 = 1.5$
 $k_B = (4.6 - 1) / 1 = 3.6$
 $k_C = (6.2 - 1) / 1 = 5.2$

选择性 (C-B)
 $\alpha = k_2 / k_1$
 $\alpha = k_C / k_B = 5.2 / 3.6 = 1.44$
 $\alpha = 1.44$

选择性 (B-A)
 $\alpha = k_2 / k_1$
 $\alpha = k_B / k_A = 3.6 / 1.5 = 2.4$
 $\alpha = 2.4$

如果我们在约 4σ 峰宽处做切线，并测量 t_w 距离，就可以用方程 1 计算色谱峰 B 的理论塔板数， $N = 16 (t_R/t_w)^2$ 。有时， 4σ 峰宽很难测量（如，基线噪音较大时），可以使用变换方程（方程 2），测量半峰宽 $(w_{1/2}): N = 5.54 (t_R/w_{1/2})^2$ 。

高柱效的好处很大，即使选择性较低也可以分离窄峰。柱效受柱参数（内径、柱长、粒度）、洗脱液类型（特别是粘度）、流速或平均线速度的影响。柱效还受化合物及其保留的影响。常使用每米理论塔板数 (N/m) 进行色谱柱的比较，但需要在相同的色谱温度条件和峰保留 (k) 下进行。对于 α 较小的固定相，柱效对分离更为重要。

保留因子 (k)

过去称为容量因子或 k' (k 值)，保留因子是指样品组分停留在固定相中相对其驻留在流动相中的时间之比。用保留时间除以峰不保留时间 (t_0) 进行计算。

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

↑ 样品峰的保留时间
↑ t_0
↑ 峰不保留时间

↑
保留因子

方程 3. 保留因子方程

选择性或分离因子 (α)

分离因子是对两个色谱峰之间时间或距离的最大测量值。如果 $\alpha = 1$ ，则两个色谱峰具有相同的保留时间并共洗脱。

$$\alpha = k_2 / k_1$$

↑ 选择性因子
↑ 第一个峰的保留因子
↑ 第二个峰的保留因子

方程 4. 选择性方程

选择性因子的定义是容量因子之比。在图 1 中，您会看到，峰 A 和峰 B 之间的选择性比峰 B 和峰 C 的选择性更好。图中提供了计算说明。

改变流动相或固定相都可以改变选择性。温度也是调节选择性的一个因素。

分离度 (R_s)

分离度代表色谱柱分离目标峰的能力，因此，分离度越高，两峰之间越容易得到基线分离。从方程 5 中可以看出，分离度与柱效、选择性和保留值相关。可以通过改善这些因素来提高分离度。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k}{(k+1)}$$

方程 5. 分离度方程

在图 2 中，我们可以看到每个参数在分离过程中的不同作用。所有这些参数都呈效应递减趋势。即取值越大，对分离度的影响就越小。

如果将柱长加倍，将得到更多的理论塔板数，但分离时间也将延长 2 倍，而分离度只能得到 2 的平方根即 1.4 倍的提高。

如果要对色谱峰进行定量，那么分离度最小应等于 1。分离度要达到 0.6，才能分辨两个等高峰间的峰谷。如需建立耐用方法，理想分离度值一般应大于等于 1.7。基线分离并确保最准确定量结果的分离度应为 1.6。

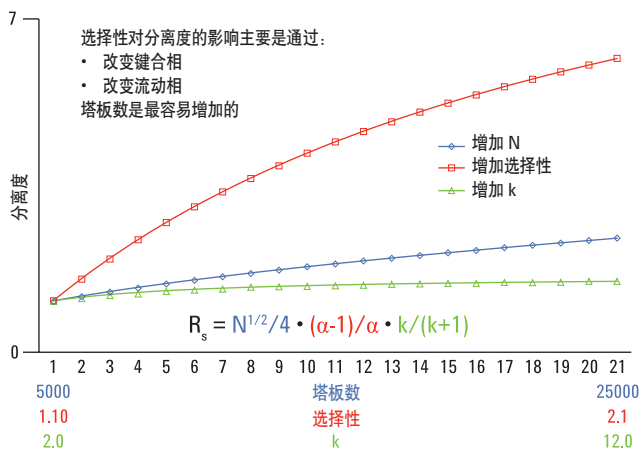


图 2. 分离度为选择性、柱效和保留值的函数

压力

压力方程（方程 6）包含影响系统压力的 5 个重要参数：溶剂粘度 (η)、流速 (F)、柱长 (L)、色谱柱半径 (r) 和填料粒径 (d_p)。熟悉压力方程将能很好地理解这些重要参数对系统压力的影响。

压力的改变

粘度的改变

流速

柱长

$$\Delta P = \frac{\eta F L}{K^0 \pi r^2 d_p^2}$$

柱渗透性

柱半径

粒径

方程 6. 压力方程

从公式中可以看出，粒径 (d_p) 稍微降低就会对反压造成明显影响。

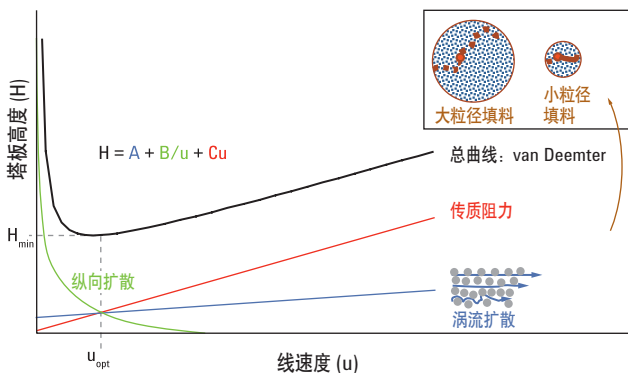
van Deemter 曲线

van Deemter 方程是将柱效作为线速度 (u) 或流速的函数对柱效 (用 H 表示, 见方程 7) 进行评价。 H 称为塔板高度, 或理论塔板高度, 用柱长 (L) 除以理论塔板数进行计算。我们的目标是得到小塔板高度。可以通过使用较小填料色谱柱、优化线速度, 以及使用低粘度流动相, 更有效地实现这一目标。随着粒径减小, 优化线速度将增大。

$$H = A + B/u + Cu$$

$$H = L/N$$

方程 7. van Deemter 方程



塔板高度越小, 塔板数越大, 色谱分离度将越大

图 3. van Deemter 方程图示

我们经常通过绘制 van Deemter 曲线评价不同色谱柱的性能, 并理解如何根据方法进行线速度的优化 (u_{opt})。

梯度方程

当样品中存在各种类型的组分时, 我们很难用等度洗脱 (即, 恒定流动相组成) 在适当时间内让所有组分都得到分离。梯度洗脱是一个随时间提高流动相强度的过程, 最终使分析速度更快、峰形和定量结果更好。通过梯度洗脱, 峰宽通常将更窄, 并保持恒定 (有关梯度洗脱的更多信息, 请参见第 55 页)。

梯度方程 (方程 8) 显示了影响分析的关键因素, 如果忽视它们, 可能会给色谱分离带来问题。该方程显示了流速 (F)、梯度时间 (t_G)、梯度范围 ($\Delta\Phi$) 和柱体积 (V_M) 对保留因子的影响。切记, 为保持保留因子恒定, 如需改变分母则需按比例改变分子, 反之亦然。

增加保留因子 k (或 k^* , 在梯度中) 是提高分离度的简便途径, 但如图 2 所示, 它并不如增加柱效和选择性更有效。如通过延长梯度时间增加保留因子, 将使分析时间延长, 如方程 8 所示。

$$k^* = \frac{t_G F}{S \Delta\Phi V_m}$$

梯度保留值 k^* 由梯度时间 t_G 、流速 F 、常数 S 、B 溶剂体积变化 $\Delta\Phi$ 和色谱柱死体积 V_m 决定。

方程 8. 梯度方程

在梯度方程中, S 为常数, 与所分离的分子大小有关。小分子的 S 值约为 4 到 6, 多肽和蛋白质的 S 介于 10 到 1000 之间。

现在, 经常使用不同尺寸的色谱柱, 或使其更短 (例如, 为实现更高通量), 或使用窄内径柱 (如, 用于质谱检测)。必须按比例缩短梯度时间 (t_G) 或减小流速 (F), 以补偿柱体积的减少。使用相同色谱柱时, 如果想保持相同的梯度斜率和 k^* 值, 则需在梯度时间 (t_G) 内按比例调整梯度组成 ($\Delta\Phi$) 改变速率或流速 (F)。

使用安捷伦方法转移软件是将方法转移到不同规格色谱柱时的绝佳方法。登录 www.agilent.com 输入“液相色谱方法转移器 (LC Method Translator)”搜索得到方法转移器。

液相色谱仪基本原理

HPLC 或 UHPLC 分离分析物混合物和检测各种化合物采用的典型液相色谱系统由四个核心组件组成。

本章将介绍这些组件，并着重介绍它们最重要且最关键的方面。在操作或选择液相色谱系统时对这些方面的慎重考量，有助于我们获得稳定一致的结果和实现效率最大化。

典型液相色谱系统中的每个组件或模块在分离和检测过程中都各自发挥着它们独有的功能，而这些功能都同等重要。为了描述这些功能，我们将按照系统流路的顺序（从泵到进样器和色谱柱，再到检测器）进行介绍，见图 4。

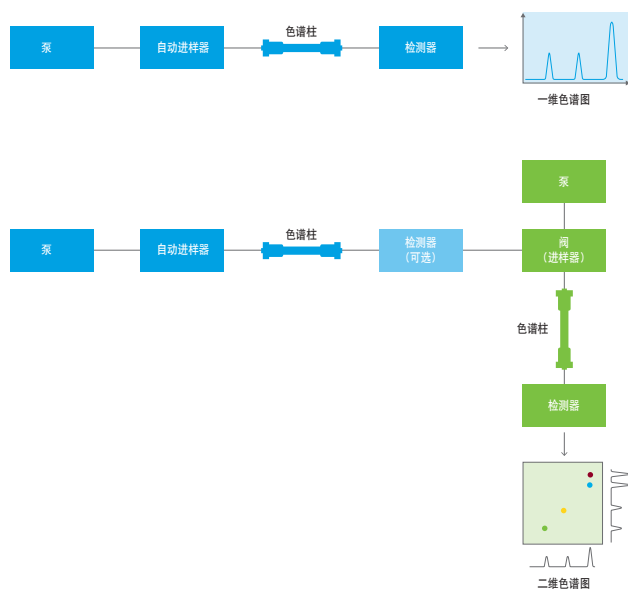


图 4. 典型现代液相色谱系统的组件

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统

新型 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统代表 UHPLC 的未来，其拥有安捷伦提供的无与伦比的可靠性和稳定性，采用了突破性技术，能够最大程度地提高您的业务效率。

- **分析效率最大化：**无可比拟的分离和检测性能，可提供最高质量的分析数据，让您对结果充满信心
- **仪器效率最大化：**最高的样品容量、最快的进样周期以及前所未有的可用性 — 使仪器在任何应用中均可实现最高通量

泵 — 液相色谱系统的“心脏”

在将流动相送入系统之前，泵将以恒定的比例（等度）或变化的比例（梯度）混合溶剂。在梯度模式下，泵逐渐提升流动相中第二种组分所占的百分比。我们将流动相的第二种组分称为溶剂 B，它的洗脱强度比流动相的第一种组分（溶剂 A）更高。许多泵还设有脱气单元，用于去除溶解在溶剂中的空气。溶剂脱气有助于减少检测器基线波动（例如基线漂移和噪音）。

压力范围

HPLC 和 UHPLC 的泵输送流动相，使其通过装填有固定相的色谱柱。泵必须在 50 bar 至 1300 bar 的高压下输送流动相才能克服色谱柱中的固定相产生的阻力。

标准 HPLC 色谱柱一般装填 5 μm 硅胶基质颗粒。对于 50 mm 至 300 mm 长、内径为 4.6 mm 的标准 HPLC 色谱柱而言，采用能够在 400 bar 的压力下输送液流的泵通常就已足够。相比之下，现代 UHPLC 所用的色谱柱颗粒可达到 2 μm 以下。采用小粒径的全多孔颗粒（小于 2 μm ）且内径较小（小于 2.1 mm）、柱长较长（例如 300 mm）的色谱柱要求泵具有 1000 bar 或更高的输送压力。分析型液相色谱应用常用的典型流速介于 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 10 mL/min 之间。我们根据泵的能力范围（定义为流速和耐压能力的组合）对其进行分类。

Agilent 1200 Infinity 系列泵的能力范围

Agilent 1290 Infinity II 高速泵在高达 2 mL/min 的流速下可耐压 1300 bar，在高达 5 mL/min 的流速下可耐压 800 bar，见图 5。

表 1 展示了各种泵适用的色谱柱类型。

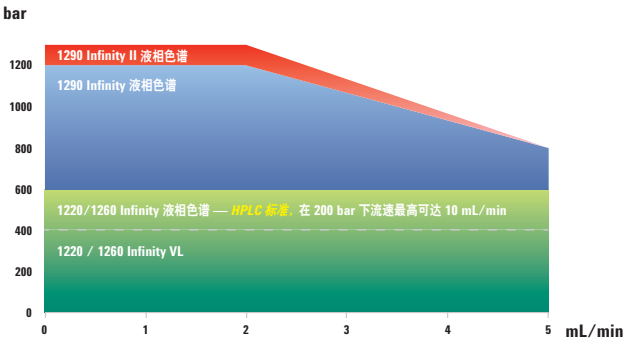


图 5. 典型现代液相色谱系统组件

色谱柱类型 颗粒	HPLC 3 - 5 µm	HPLC 表面多孔	UHPLC < 2 µm (STM)						UHPLC 表面多孔	
色谱柱柱长/mm	50 - 300	50 - 250	Short 30 - 50			Long 100 - 150			30 - 150	
色谱柱内径/mm	3.0 - 4.6	3.0 - 4.6	2.1	3.0	4.6	2.1	3.0	4.6	2.1	3.0 - 4.6
最大压力/bar	400	400	1200	1200	600	1200	1200	600	600	600
安捷伦色谱柱类型	多种	Poroshell 120 4 µm	RRHD	RRHD	RRHT	RRHD	RRHD	RRHT	Poroshell 120 2.7 µm	Poroshell 120 2.7 µm
1290 高速泵 - 1300 bar										
1290 全能泵 - 1300 bar										
1260 Bin/600 bar						2)				
1260Q/1220G - 600 bar			1)			2)			1)	
常规液相色谱 400 bar			2)	2)		2)	2)		3)	3)

图示说明

最好	1) 由于延迟体积的原因
良好	2) 由于延迟体积和压力的原因
可接受	3) 由于压力的原因
不适用	STM 短型: 亚 2 µm 颗粒, 长 30 - 50 mm STM 长型: 亚 2 µm 颗粒, 长 100 - 150 mm HPLC: 3 - 5 µm 颗粒

表 1. 色谱柱填料应用条件指南

溶剂混合

除了输送流动相，泵还必须以高准确度和高精度混合溶剂。泵必须能够为等度洗脱提供比例精确、恒定的溶剂，还必须能够将两种或更多种溶剂混合成为比例随时间变化的溶剂梯度。泵精确混合溶剂和提供可重现流速的能力决定了泵的保留时间重现性。保留时间是液相色谱的基本参数之一，它能指示采用特定的色谱柱和流动相组合进行分离时，物质的保留特性。我们通常使用两种不同类型的泵，根据泵混合溶剂的方式来区分它们。

四元泵在低压下混合溶剂。最多四条溶剂管线通向多通道阀，按预设的比例进行混合。采用这种方式，泵能够形成二元、三元和四元梯度。溶剂混合在泵的低压侧进行，见图 6。对溶剂进行适当的脱气对于防止溶剂配比和混合过程中形成气泡至关重要。通常，泵利用内置单元或外部单元对溶剂进行脱气，然后利用高压泵腔将混合好的溶剂（流动相）输送至进样器。

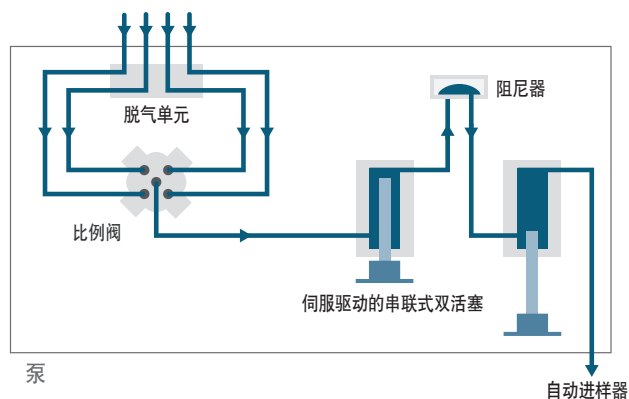


图 6. 用于低压梯度混合的溶剂输送系统的示意图，显示了脱气单元、比例阀和泵腔

二元泵在泵的高压侧混合溶剂，通常只能混合两种溶剂。二元泵的主要优势在于，当溶剂组分之一所占的比例较小时，它能够更准确、更精密地混合溶剂。此类混合可在溶剂梯度开始和结束时提供高精度的溶剂组成，见图 7。高压混合二元泵的另一个优势是延迟体积较小。我们将延迟体积定义为混合点到色谱柱梯度起始处之间的流动相体积。缩小延迟体积有利于加快运行速度和缩短分析时间。对于高压混合而言，脱气不再是一个问题，因为溶剂在混合时处于加压状态。

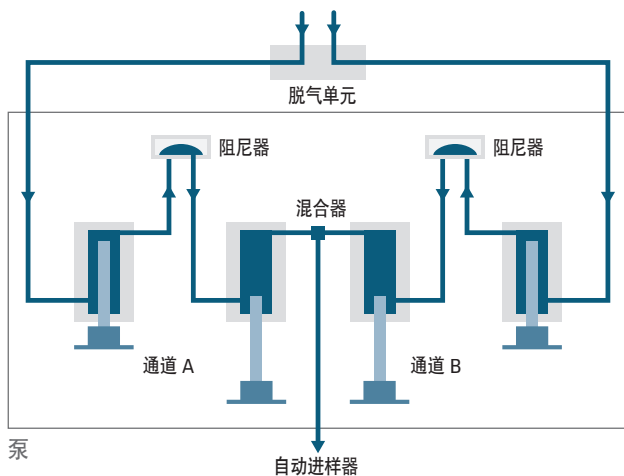


图 7. 用于高压梯度混合的溶剂输送系统的示意图，显示了用于生成二元洗脱液梯度的两个溶剂通道

与二元泵相比，四元泵更灵活，因为它们不仅能提供二元梯度，还能提供三元和四元梯度。另外，四元泵还能向流动相中在线混入添加剂。低压混合泵的价格通常较低，因为它们只有一个泵，而高压混合则需要两个泵，见表 2。

	等度泵	四元泵	二元泵
溶剂	1	4	2
混合	不混合	低压混合	高压混合
梯度	无梯度，仅等度	二元、三元和四元梯度	仅二元梯度
延迟体积	无梯度，无延迟体积	延迟体积较大	延迟体积较小
脱气机		必须脱气	建议脱气
梯度混合性能	无	梯度中心处性能良好， 梯度两端性能较差 (1290 Infinity II 全能泵除外)	性能极佳

表 2. 液相色谱泵的不同混合原理比较

延迟体积

我们将延迟体积或滞后体积定义为流动相混合点到色谱柱柱头之间的系统体积。延迟体积会显著影响分析速度。会影响延迟体积的主要系统组件包括样品混合器和阻尼器、连接毛细管、进样器的液压容积和热交换器的体积。因此，泵和进样器的设计会极大影响分析速度。现代 UHPLC 泵经过专门设计，力求在不影响混合性能的前提下最大程度减小延迟体积。

Agilent 1290 Infinity II 全能泵和高速泵的延迟体积

Agilent 1290 Infinity II 全能泵与市面上的其他四元泵均不同。此款泵的混合性能与高压混合泵相当，而且在较低和较高的溶剂比例下均能形成高重现性的梯度。相比之下，Agilent 1290 Infinity II 高速泵具有极低的延迟体积，有利于缩短运行时间。

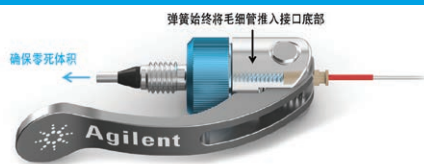
Agilent 1290 Infinity II 泵采用的新技术可最大程度减小延迟体积。Agilent Jet Weaver 和 Inlet Weaver 混合器可确保有效混合小体积溶剂，Agilent 1290 Infinity II 全能泵和高速泵则采用了主动阻尼技术，在混合过程中将流动相的压缩特性也考虑在内。这种可实现皮升水平精密计量的主动阻尼技术取代了物理阻尼器。

柱外体积

我们将柱外体积定义为进样点与检测器出口之间的系统体积。导致柱外体积产生的主要因素包括毛细管、热交换器、连接件和接头，以及检测器流通池。如果柱外体积过大，会导致样品扩散和分析物谱带展宽，进而导致分离度下降和灵敏度降低。使用毛细管柱接头或者在系统中安装色谱柱时尤其需要注意。接头使用不当常常会导致意料之外且通常不易被察觉的死体积，这可能会严重影响分离效果。使用小内径（2.1 mm 或更小）的色谱柱进行等度分离时，必须慎重考虑柱外体积和毛细管的内径。

Agilent A-line Quick Connect 快速连接色谱柱接头

采用精心设计的系统以及用户友好的接头（例如 Agilent A-line Quick Connect 快速连接色谱柱接头），可基本上消除死体积，让液相色谱分析更加稳定，并且不受用户操作水平的影响。



自动进样器 — 操纵工作流程自动化体系的“大脑”

自动液体进样器（又称自动进样器）现在已经取代了手动进样器，因为它们能够在无需用户干预的前提下以高准确度和高精度进样多个样品。分析型自动进样器（例如那些用于 HPLC 的进样器）可进样的样品体积通常在 100 nL 至 100 μ L 之间。通过一些改动，我们可以提高这些自动进样器可进样的样品量，从而将它们应用于高度稀释的样品或半制备分析。在 UHPLC 分析中，自动进样器注入的样品量通常较少，因为此类系统采用小内径色谱柱，为了实现良好的分离，必须避免色谱柱过载。

固定样品环和流通式自动进样器

自动进样器可采用两种不同的设计方案：固定样品环和流通式自动进样器。在固定样品环设计中，样品被吸入或推入一个样品环中，然后该样品环被切换到样品流路中，见图 8。

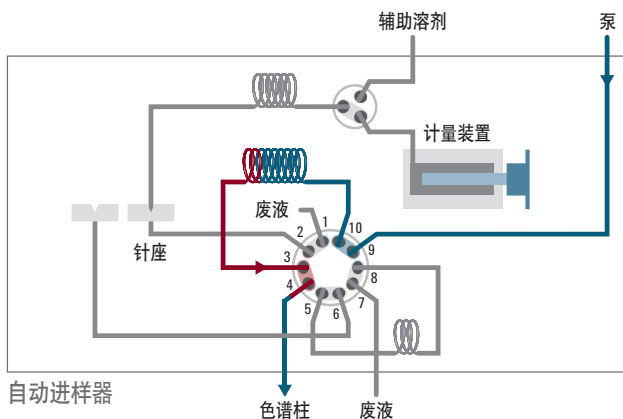


图 8. 采用固定样品环设计的自动进样器，图中所示为样品环被切换到样品流路中的状态

在流通式自动进样器中，流动相将通过样品环以及计量装置和进样针。流通式设计的主要优势在于其进样量范围更灵活，见图 9。在固定样品环设计中，用户通常必须使样品环过载才能达到最高的重现性。用户也可以部分填充样品环，但是这种方法的重现性较差。如果用户需要使用固定样品环自动进样器注入较小或较大体积的样品，通常必须更换样品环。

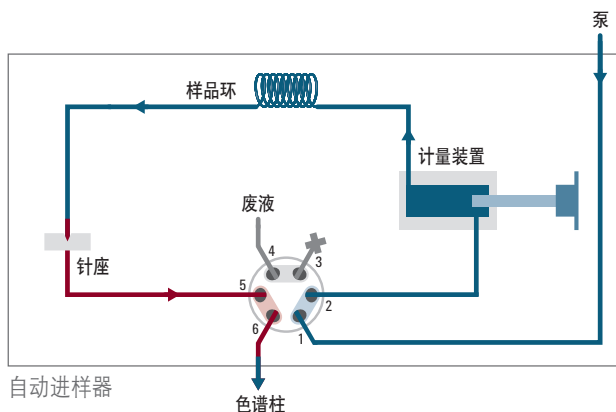


图 9. 采用流通式设计的自动进样器，显示液流如何将样品输入色谱柱中

流通式设计的另一个优势是交叉污染较低。交叉污染是指前一次分析的样品组分出现在下一次运行的色谱图中的现象。这是由于某些组分粘附到了系统表面、管线、接头或色谱柱材料上，并在下一次分析中被洗脱下来。在流通式自动进样器设计中，整个梯度将会冲洗自动进样器的所有液压部件。这样可确保在色谱运行过程中高效地清洁计量装置、样品环和进样针的内表面。表 3 总结了固定样品环和流通式自动进样器之间的差异。

	固定样品环自动进样器	流通式自动进样器
原理	样品环被切入和切出溶剂流	样品环、进样针和计量装置被切入和切出溶剂流
样品浪费	高，因为样品环须过量填充	无
不更换硬件前提下的进样量灵活性	低，可以部分填充样品环，但精度较低	高
进样量线性	差，因为必须使用不同的样品环	极佳
延迟体积	低	高
交叉污染	中等	低，因为在梯度运行过程中将冲洗所有的流路部件

表 3. 固定样品环和流通式自动进样器对比

在 HPLC 或 UHPLC 应用中，为了获得高质量的结果，我们必须考虑多个关键的自动进样器参数。后面的章节将介绍这些参数。

进样精度和准确度

要在运行之间获得良好的定量重现性，进样精度至关重要。进样精度是指自动进样器在多次运行中保持相同进样量的能力。另一方面，进样准确度则描述了自动进样器达到预设的进样量绝对值的能力。现代 UHPLC 仪器的进样精度通常可达到小于 0.15% RSD。

灵活性和样品容量

如今，实验室在提高样品通量和降低总成本方面面临着极大的压力。另外，UHPLC 仪器也越来越多地应用于多用户环境，或是在高通量模式下运行。由于自动进样器是样品的入口端，因此该模块需要使用灵活的样品容器以支持不同的工作流程，还要避免造成干扰或产生重组样品的需求。用于此类环境的自动进样器必须能够支持多种形式的样品容器。另一方面，通常需要采用大型进样器装置来满足高容量要求，由于占用的台面空间较大，通常会导致成本升高。

Agilent 1200 Infinity 系列自动进样器

Agilent Infinity 系列的大多数自动进样器均采用流通式设计，具有卓越的灵活性。新型 Agilent 1290 Infinity II Multisampler 的完美设计仅占用极小的台面空间，同时很好地解决了灵活性和高样品容量问题。用户可使用不同的样品抽屉，并且可对样品抽屉进行配置和更改以满足用户的当前需求。Agilent 1290 Infinity II Multisampler 的样品容量已进行优化设计，使用 384 孔微量滴定板时，通过单模块堆叠即可实现 6000 个样品以上的容量。



进样周期

进样周期是液相色谱分析中容易被忽视的一个参数。现在，借助新型 UHPLC 仪器和亚 2 μm 颗粒色谱柱技术，运行时间可缩短为 1 分钟以下，甚至仅 30 秒，而且不会影响分离度。从前一次运行结束到吸取样品并最终进样开始下一次运行所需的时间已接近甚至超出上述运行时间。受高载样量的限制以及鉴于快速获得结果的需要，我们必须将非生产性的额外时间降至最低。新型自动进样器设计在前一次运行过程中即开始下一次进样操作，并将这种运行方式与快速自动装置相结合，能够很好地满足上述要求。这样可最大程度减少运行的额外时间，将其缩短至 10 秒以下。

交叉污染

近年来，液相色谱的检测限已经大幅降低（尤其是与高端质谱检测相结合时）。甚至浓度极低的杂质也可轻松检出。要想达到极低的检测限，必须使用纯净的溶剂和洁净的仪器。前一次分析中分离和检测的化合物不应出现在下一次或后续的分析中，否则会影响样品序列的结果和定量分析。自动进样器必须精心设计，力求最大程度减少交叉污染。在自动进样器中，进样针和针座之间的接口至关重要。粘着力强的化合物容易吸附到这些部件的表面，而除去这些痕量的化合物可能是一项繁琐的工作。必须对材料表面进行设计，消除它们与非极性分析物之间的相互作用。连接部件时应非常小心，以避免任何死体积（即使非常小），以及避免产生任何划痕或磨损，防止其造成机械影响。

使用强溶剂进行进样针清洗程序通常有助于大幅减少交叉污染。大多数现代自动进样器均配备有内置的进样针清洗站，用于在吸入样品并将其转移到进样口之前对进样针的外表面进行清洗。如果不进行适当清洗，进样针的外表面将成为交叉污染的主要来源。

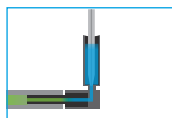
利用 Agilent 1200 Infinity 系列 Multisampler 消除交叉污染

新型 Agilent 1200 Infinity 系列 Multisampler 具有更先进的交叉污染消除功能。该系列的自动进样器可配置多重清洗功能，该功能不仅能够清洁进样针的外表面，还能有效反冲针座（交叉污染的第二大主要来源），可选择的外部清洗溶剂多达三种。利用多重清洗功能，洗必泰的交叉污染值可降低至 10 ppm 以下，这使得 Multisampler 成为了高端三重四极杆质谱仪的理想之选。



清洗进样针内部

应用流通式原理充分清洗进样针内部，确保洗脱液的一致性。



清洗进样针外部

可设置进样针外的清洗程序，提供多达 3 种外部清洗溶剂供您选择。



主动式针座反冲

可选择 3 种外部溶剂反冲针座。

新型进样方法和自动化

自动进样器不仅能够用作简单的进样装置，用于在无用户干预的情况下引入样品，它们还具有处理和制备样品、或者执行并行任务以节省时间等多种功能。另外，现代自动进样器都采用针对许多经验不足的用户而设计的防呆界面组合，让这些用户只需提交样品即可完成分析，它们同时也是智能的样品组织器，能够根据企业优先级来安排连续分析运行。

自动进样器还可帮助您对独立操作进行编程。利用该功能，您可以混合样品、添加内标或执行稀释步骤。例如，在氨基酸分析中，您可以利用自动进样器直接进行自动衍生化。

Agilent 1200 Infinity 系列 Multisampler 的双针头功能

将进样器的功能扩展到简单进样功能之外的另一个例子是 1200 Infinity 系列 Multisampler 全新的双针头功能。两个进样针样品环组件能够以多种不同方式使用。在两个经过校准且具有类似容量的进样针之间切换还有助于进一步提高通量。第二个进样针在前一次运行还在进行的过程中即可开始进样针清洗和样品吸入操作，如此一来，前一次运行完成之后即可立即进样。或者，两个进样针可配备不同尺寸的样品环，从而交替地执行小体积进样（用于 UHPLC 分析）和大体积进样（用于传统方法或富集分析），而不会由于延迟体积较大而影响分析速度。利用双针头配置，用户还能在特定工作流程中为特定样品或标样保留一个进样针，从根本上消除产生交叉污染的可能性。

柱温箱 — 产生热量的“肌肉”

柱温箱是液相色谱系统中一个经常被低估的组件，但事实上该模块对于确保分离柱运行环境的稳定性和获得可重现的结果而言至关重要。当实验室的室温在一天之中会发生变化或者需要将方法从一个场所转移至另一个场所时，稳定的环境尤其重要。温度会影响保留因子 k ，还会影响样品的分离度。温度还是方法开发过程要使用的参数之一。

柱温箱可以是简单的柱温箱，或者是能够将色谱柱周围加热到预设温度（通常高达 80 °C）的加热器。现代柱温箱配备有溶剂热交换器，还可将溶剂加热到预设温度。进行方法开发时，我们可以使用帕尔帖型柱温箱，因为此类装置能够更快速地改变温度，而温度是开发色谱方法时可以改变的参数之一。另外，帕尔帖型柱温箱不仅能够加热溶剂和色谱柱环境，还能冷却色谱柱或维持定义的室温左右的稳定温度。大多数应用都在约 40 °C 下进行分离。在较高的温度下，保留时间将缩短，可实现更快速的洗脱。在较低的温度下，保留时间通常会增加，在反相分离中尤其如此。

UHPLC 应用通常采用较高的温度，目的是降低溶剂粘度以及降低由小颗粒和高流速引起的背压。因此，用于 UHPLC 的柱温箱通常需加热至高达 100 °C 或更高的温度。

柱温箱是一个需要用户频繁干预的液相色谱模块。用户需要不同的选择性或需要达到更出色的分离度时，必须连接或移除色谱柱。柱温箱通常还可容纳多根色谱柱和/或阀，以支持自动化的方法开发、色谱柱切换、富集或交替色谱柱再生等功能。为确保柱温箱便于用户操作，以及避免安装色谱柱时出错（如产生死体积或导致泄漏），易用性具有重要的意义。

Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱的灵活性和易用性

Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱让用户在几秒钟内即可轻松安装色谱柱、热交换器和带有多根毛细管的阀。Agilent A-line Quick Connect 快速连接色谱柱接头避免了在色谱柱连接中意外引入微小泄漏点的可能性。



检测器 — “感知器官”

液相色谱系统中可整合各种类型的检测器。最常用的检测器类型是光吸收型检测器、荧光检测器、示差折光检测器、蒸发光散射检测器和质谱检测器。本章将重点介绍光吸收型检测器，因为超过三分之二的液相色谱系统都采用此类检测器。

不同类型的检测器在灵敏度、选择性和线性范围方面各有差异。灵敏度定义了检测器可检出的最低化合物浓度。选择性决定了检测器对特定化合物的特异性。线性范围是特定化合物的一个浓度范围，在该范围内检测器可提供线性的响应信号。

检测器还分为破坏性检测器和无损检测器。紫外吸收检测器、荧光检测器和示差折光检测器属于无损检测器。通过检测池的化合物将保持其完整性，并且可以进行回收。相反，蒸发光散射检测器和质谱检测器则属于破坏性检测器，因为化合物在检测过程中将被破坏。

通过紫外吸收光度法进行定量分析的基础是朗伯-比尔定律。吸光度 A 是通过洗脱介质前后的光强度对数之比，它与吸光化合物的浓度 C 、光程 d 和摩尔吸光系数 ϵ 的乘积成正比。

$$I/I_0 = A = \epsilon cd$$

现代 HPLC 和 UHPLC 中应用最广泛的检测器类型是基于对紫外线 (UV) 和可见光的吸收。此类检测器对许多化合物具有较高的灵敏度，但前提是化合物必须能够吸收 190 nm 至 600 nm 范围内的紫外或可见光。

光吸收型检测器可采用两种光学技术。第一种是采用直接光学元件，具有目标波长的光将通过检测池，然后由单个光电二极管捕获产生的光线。配备直接光学元件的光吸收型检测器被称为固定波长检测器，见图 10。第二种是采用反向光学元件，波长在 190 nm 至 600 nm 内的所有光线都将通过流通池。产生的光线将由光栅分离为其组成波长，然后由光电二极管阵列采集所得的光谱信息。配备反向光学元件和光电二极管阵列的光吸收型检测器被称为二极管阵列检测器，见图 11。二极管阵列检测器不仅能够在多个波长下进行检测，还能生成 UV 光谱用于明确鉴定特定的化合物。

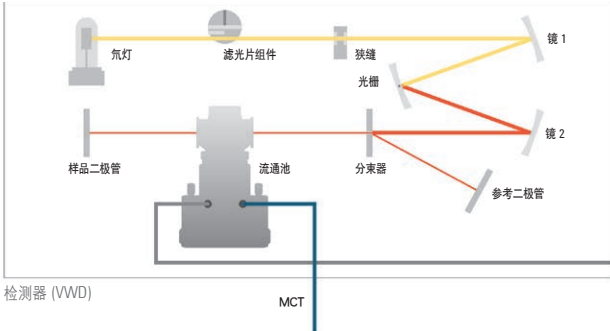


图 10. 配备直接光学元件的可变波长检测器的检测原理

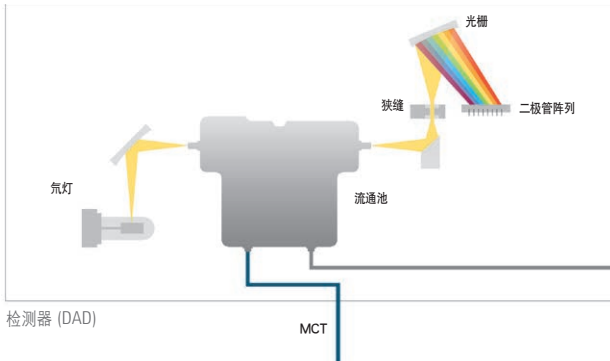


图 11. 配备反向光学元件的二极管阵列检测器的检测原理

检测器灵敏度

检测限 (LOD) 是指信号能够与检测器噪音区分的最低化合物浓度，见图 12。LOD 取决于信号高度和检测器噪音，并且根据其比值进行计算： $H_{\text{信号}} = 3 h_{\text{噪音}}$ 。

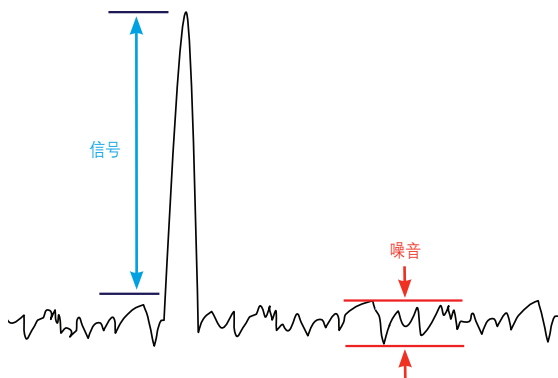


图 12. 配备直接光学元件的可变波长检测器的检测原理

在 UV 检测中，信号高度取决于化合物特有的吸光系数、光程、峰扩散和检测波长。检测器噪音取决于许多因素，例如，光强度、泵脉动、电子元件噪音、数据采集速率、RI 效应、温度、流速和流通池设计。

增加光程而保持流通池内部体积不变，同时尽可能保持最低水平的检测器噪音，可获得最高的灵敏度。与老式流通池（检测池的流路通常采用锥形设计）相比，现代检测器配备的流通池已经能够实现全内反射。

线性范围

当您需要在较宽的浓度范围内进行定量分析时，检测器的线性范围非常重要。当目标化合物具有显著不同的浓度和 UV 响应时，线性范围也非常重要。在分析含有大量主要组分和微量杂质的样品时可能会遇到上述情况。对于此类样品，我们必须同时采集所有化合物的定量信息。

目前的液相色谱 UV 检测器具有 4 到 5 个数量级的线性范围。使用可在单次分析中定量分析低浓度和高浓度化合物的检测方案可显著扩展这一线性范围。该方法有助于同时定量分析主要组分、微量组分及其杂质（如固定剂量复方药）。由于无需进行系列稀释和多次运行，可节省大量时间和成本。

数据采集速率

数据采集速率是检测器每秒能够采集的数据点的数量。常规 UV 检测器的数据采集速率高达 20 Hz，足以用于标准 HPLC 分析，但 UHPLC 分析要求更高的数据采集速率，因为它需要在快速运行中对窄峰进行精确的定量分析。

配备最大光强流通池的安捷伦二极管阵列检测器

安捷伦最大光强高灵敏度流通池采用了光流导技术，尽管光程达 60 mm，但扩散体积仅为 4 μL ，见图 13。Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器采用了这种流通池，因此其灵敏度比之前的检测器高出 10 倍，见图 14。Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器的另一个功能是能够以 240 Hz 的速率采集数据，可确保在仅耗时几秒的快速运行中获得出色的定量结果。安捷伦高动态范围检测解决方案显著扩展了线性检测范围，见图 15。通过结合分别具有短光程和长光程的两个检测器，该解决方案通过单次分析即可同时定量分析低浓度和高浓度样品组分。

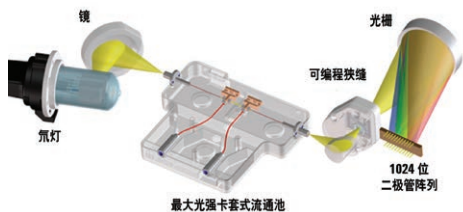


图 13. 配备最大光强流通池的 1260/1290 Infinity DAD 中的光流导

灵敏度比之前的型号高 n 倍

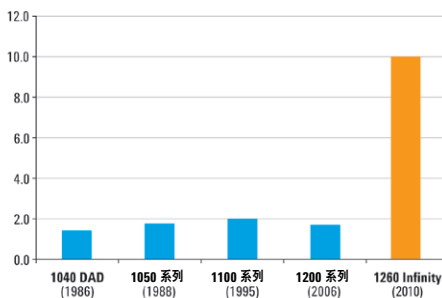


图 14. DAD 检测灵敏度的发展史。1260/1290 Infinity DAD 的问世将灵敏度提高了 10 倍以上

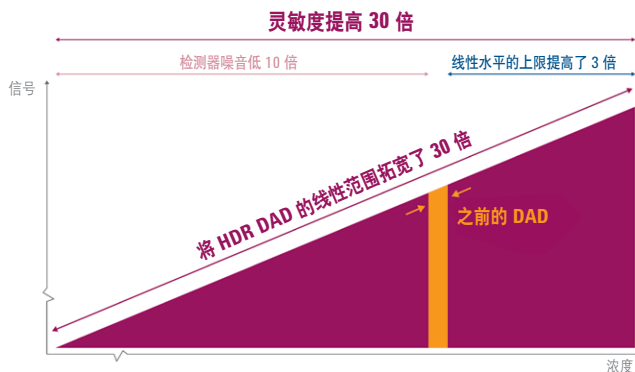


图 15. 利用 1200 Infinity 系列 DAD-HDR 解决方案扩展线性范围

HPLC 柱的选择

色谱柱的选择一半是科学，一半是艺术。我们之所以这么说，是因为这里有一些确定的明了标准：与应用相适合的色谱柱固定相、与系统压力限相适应的规格等等

在多数情况下，预定义方法可能规定了特定的固定相或色谱柱规格，所以，选择色谱柱必须符合这些规格，确保来自可靠的高质量色谱柱供应商（我们推荐安捷伦，您也可以选择别的品牌）。

此外，方法开发可能更有技巧，在这个过程中要测试各种固定相和流动相的性能，以获得符合您应用需求的选择性。

本节首先要回顾一些基本概念：

- HPLC 模式
- 常见的 HPLC 柱填料

接下来，我们再来专门讨论现在最常用的主要色谱柱类型及其特点：

- HPLC 柱
- UHPLC 柱
- 表面多孔填料柱
- LC/MS 柱
- 凝胶渗透色谱 (GPC) 柱、体积排阻色谱 (SEC) 柱和凝胶过滤色谱 (GFC) 柱
- 生物表征色谱柱

我们还将解释一些关键柱参数的重要性：

- 填料 – 硅胶、键合相、聚合物
- 孔径
- 粒径
- 柱规格

在本节的最后，我们将对现有卡套式色谱柱进行概要介绍，包括保护柱、半制备柱，以及制备和生产柱。

本节资料应与包含更多色谱柱固定相和选择性信息的方法开发一节（第 61 页）中色谱柱选择部分结合使用。

HPLC 模式

在开始评估色谱柱之前，最重要的工作是要确定 HPLC 模式。目前有很多常用的 HPLC 模式或技术：

- 反相
- HILIC
- 正相
- 离子交换
- 体积排阻

调查显示，一般而言 95% 的色谱工作者都在其工作中使用反相色谱，基于这一原因，本手册将把这项技术作为重点。除此之外，本手册也会涉及其它的技术，指出其主要差别，并介绍获取更多信息的来源。

如需了解各种模式之间差异的更多信息，请参见第 62–64 页。

色谱柱选择的基本信息：常规柱

液相色谱柱采用不锈钢或聚合物制成，也有极为罕见的玻璃柱，柱中填充键合硅胶或聚合物填料。有多种尺寸规格可供选择，以适应色谱工作者及其使用的不同需求。从用于高通量 LC/MS 的短柱、窄径柱，到 50 mm 内径的制备柱，制备柱填充内径最大可达 600 mm，适用于小规模制备、放大和生产。色谱柱规格影响着灵敏度和柱效，决定着柱载样量。例如，小内径色谱柱与大内径柱相比，提高了灵敏度，但降低了载样量。

现代不锈钢分析柱（1 到 4.6 mm 内径，20 到 250 mm 柱长）使用非常低或零死体积的接头。色谱柱填料被柱两端的不锈钢筛板挡住。

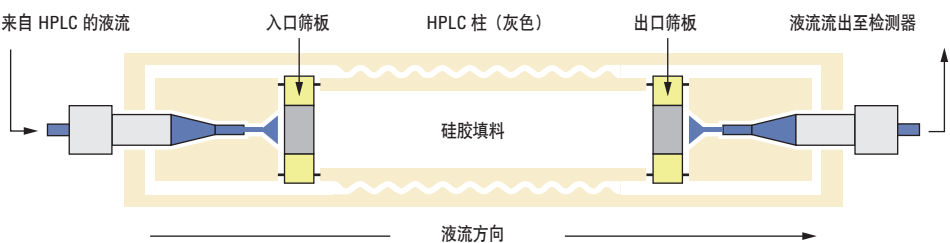


图 16. 色谱柱示意图

色谱柱 结构材料	色谱柱类型	色谱柱内径 (mm)	填料类型	填料粒径 (μm)	应用
HPLC					
不锈钢	分析柱	4.0-4.6	硅胶，聚合物	1.8-10	传统定量分析
	分析型溶剂节省柱	3	硅胶	1.8-5	降低溶剂消耗
	分析型窄径柱	2.0-2.1	硅胶	1.8-5	降低溶剂消耗
	分析型微径柱	1	硅胶，聚合物	3-5	提高灵敏度，可分析 ng 到 μg 的样品
	分析型毛细管柱	0.3-0.5	硅胶，聚合物	3-5	可分析 pg 到 ng 的样品
	分析型纳升柱	0.075-0.1	硅胶，聚合物	3	可分析 < 1 pg 的样品
	制备或半制备柱	9.4-50	硅胶，聚合物	5-50	样品纯化

表 4. 液相色谱柱的一些性能指标 转下页

色谱柱 结构材料	色谱柱类型	色谱柱内径 (mm)	填料类型	填料粒径 (µm)	应用
LC/MS UHPLC/MS					
不锈钢	分析柱	3	硅胶	1.8-5	与安捷伦 MS 流量匹配的良好选择
	分析型窄径柱和微径柱	1-2.1	硅胶, 聚合物	1.8-10	需要更高选择性或需要特殊检测器时
石英	分析型毛细管柱	0.3-0.5	硅胶, 聚合物	1.8-10	使用 MS 检测器
UHPLC					
不锈钢	分析柱	4.6	Silica	1.8-2.7	用于所有快速和高分离度的分析应用
	分析型溶剂节省柱	3	Silica	1.8-2.7	
	分析型窄径柱	2.1	Silica	1.8-2.7	
制备柱					
不锈钢	制备柱	10-100	聚合物	10-50	化合物分离
生产柱					
不锈钢	生产柱	10 cm 到 100 cm	聚合物	10-50	化合物生产

注: 某些生物 HPLC 柱提供 PEEK 管线, 确保样品流路中无金属。

使用 ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) 1.8 μm 色谱柱以及 Poroshell 120 2.7 μm 色谱柱, 压力上限可达 600 bar。使用 ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 色谱柱, 1.8 μm, 压力上限可达 1300 bar。

高效液相色谱 (HPLC) 柱

硅胶是正相 HPLC 常用的固定相, 也是许多化学键合固定相的支持剂。硅胶表面覆盖着强极性的硅醇基, 在非极性流动相中与样品分子发生相互作用, 也可以作为化学键合的反应位点。正相 HPLC 适用于在水中不溶解的分析物和有机正相溶剂, 与反相 HPLC 中常用的某些缓冲液相比, 对质谱更为“友好”。但是, 这种技术有时保留时间的重现性较差, 因为水或质子有机溶剂 (含有氢氧键或氮氢键) 改变了硅胶的水合状态。反相 HPLC 中就不会发生这种问题, 因此成为了主要的 HPLC 技术。在反相色谱系统中, 硅胶颗粒被化学改性为非极性或疏水性, 流动相采用极性液体。

UHPLC 柱

超高压液相色谱 (UHPLC) 一般指在超过 400 bar (6000 psi) 压力 (这一压力是过去几十年来常见的最大系统操作压力) 下操作的液相色谱。通常, UHPLC 柱装填小粒径填料 ($< 3 \mu\text{m}$), 与常规 HPLC 柱填充的 3 到 $5 \mu\text{m}$ 填料相比, 在速度、分离度和柱效方面有很大优势。但是, 从压力方程 (第 9 页的方程 6) 可以看出, 填料粒径越小, 流动相通过色谱柱所需要的反压就越大, 因此, UHPLC 柱采用了在 400 bar (6000 psi) 以上压力下工作的设计。

安捷伦为 UHPLC 提供了三种类型的色谱柱: 在 600 bar 以内操作的 ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) $1.8 \mu\text{m}$ 粒径柱、填充 $2.7 \mu\text{m}$ 表面多孔填料的 Poroshell 120 柱 (也可以在 600 bar 以内操作) 和 ZORBAX 超高压快速高分辨率 (RRHD) $1.8 \mu\text{m}$ 柱, 在 1300 bar 下稳定。UHPLC 可以得到非常快的分离速度。一般情况下, 10 分钟之内完成的 UHPLC 分离为快速, 1 分钟内完成的分离常称为超快速。

另一方面, 使用 $1.8 \mu\text{m}$ 填料 UHPLC 柱, 提高了柱效和峰容量。分析柱最长 150 mm, 内径最大 4.6 mm。现在可以获得差不多 300% 的峰容量, 这对于改善从新药发现到食品安全和环境应用 (如农药筛查) 中的许多复杂分离非常有用。



ZORBAX 超高压快速高分辨率 (RRHD) 柱

表面多孔填料柱

近来表面多孔填料 (SPP) 柱在小粒径填料中比早先的“薄壳型”填料柱更受青睐。如图 17 所示, Agilent Poroshell 120 $2.7 \mu\text{m}$ 填料包括一个实心核 (直径 $1.7 \mu\text{m}$) 和覆盖在外的多孔硅胶层 (厚 $0.5 \mu\text{m}$)。

Poroshell 120 与常规全多孔柱相比, 能够为色谱工作者提供方法开发的明显优势。由于扩散仅发生在多孔外壳, 而实心核没有, 所以与同样粒径的全多孔填料相比, 柱效有所提高。事实上, $2.7 \mu\text{m}$ SPP 可提供能与 $1.8 \mu\text{m}$ 全多孔颗粒色谱柱媲美的柱效, 而 $4 \mu\text{m}$ SPP 的柱效大约是全多孔 $5 \mu\text{m}$ 颗粒色谱柱的两倍。由于压力间接地与粒径成比例, 因此粒径较大的 $2.7 \mu\text{m}$ SPP 色谱柱产生的压力远低于 $2 \mu\text{m}$ 色谱柱, 让色谱工作者能够提高流速并加快分析速度, 同时获得出色的分离度。Poroshell 120 柱装配 $2 \mu\text{m}$ 筛板, 这一点非常重要, 这样使其对于较脏的样品具有更高的耐受性, 而不会像装配更小筛板的色谱柱那样容易堵塞样品过滤。

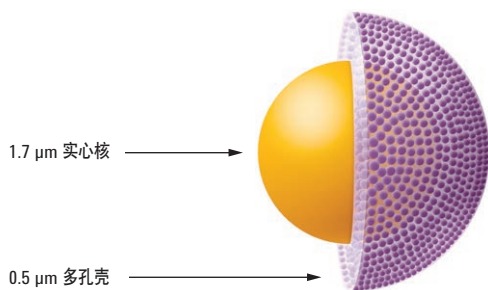
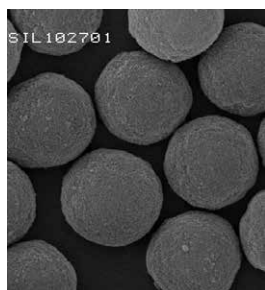


图 17. Poroshell 120 2.7 μm 填料

生物分子（例如蛋白质和肽）的分离具有一定的挑战性，因为它们扩散较慢，所以我们通常都必须保持较低的流速以防止峰展宽。安捷伦提供多种基于表面多孔颗粒的色谱柱。

- Poroshell 300: 5 μm 颗粒, 0.25 μm 多孔层, 300Å 孔径
- AdvanceBio RP-mAb: 3.5 μm 颗粒, 0.25 μm 多孔层, 450Å 孔径
- AdvanceBio 肽谱分析色谱柱: 2.7 μm 颗粒, 0.5 μm 多孔层, 120Å 孔径
- AdvanceBio 糖谱分析色谱柱: 2.7 μm 颗粒, 0.5 μm 多孔层, 120Å 孔径
- AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱: 2.7 μm 颗粒, 0.5 μm 多孔层, 100Å 孔径

该技术缩短了扩散距离，能够对 500 Da 至 1000 kDa 的生物分子进行快速 HPLC 分离

LC/MS 柱

根据不同的样品类型，有许多种色谱柱适用于 LC/MS。对于简单的分析样品，使用短柱（高分离度）可以缩短分析时间，实现高通量 LC/MS。如果需要更高分离度，则可使用较长的色谱柱。

流速也是影响色谱柱选择的因素。LC/MS 系统一般操作流速范围为 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 到 1 mL/min 。因而，要进行高灵敏度、快速分析，宜选择较小内径柱，如安捷伦的溶剂节省柱（3.0 mm 内径）、窄径柱（2.1 mm 内径）和毛细管柱与纳流柱（见第 29 页，表 4）。



Agilent 6400 系列三重四极杆液质联用系统

键合相的最好选择是高效并封端的 C18 键合相，在宽 pH 范围内稳定，与 LC/MS 使用的挥发性流动相添加剂（包括甲酸和乙酸）兼容。

Agilent 6400 系列三重四极杆液质联用系统是药物 ADME/DMPK 研究、生物标记物验证、临床研究、食品安全、法医学、毒理学以及环境分析的定量领域的可靠选择。

凝胶渗透色谱 (GPC) 柱、体积排阻色谱柱 (SEC) 柱和凝胶过滤色谱 (GFC) 柱

以分子大小为基础的分离通常采用体积排阻色谱 (SEC) 进行。这种色谱类型在分离聚合物，包括生物聚合物时使用。通常用来表征聚合物分子量及分子量分布。色谱柱一般采用不锈钢，填充凝胶，交联键合聚合物或孔径经过严格控制的硅胶颗粒。分离机理与其他色谱类型不同，溶质颗粒与固定相间不应有化学相互作用，而是依据分子在溶液中的大小而进行的。我们用凝胶渗透色谱 (GPC) 描述有机聚合物（如塑料）在有机溶剂中的分离，而使用水相 SEC 描述主要使用水相流动相对水溶性有机聚合物（如聚乙烯醇）和水溶性生物聚合物（如蛋白质、核酸和多糖）进行的分离。凝胶过滤色谱 (GFC) 以前用来描述生物聚合物（如蛋白质）在低压下的分离。



GPC/SEC 仪器、色谱柱和标准品

我们向您推荐 GPC/SEC 的综合指南，安捷伦的凝胶渗透色谱和体积排阻色谱说明（出版号 5990-6969EN）。

生物表征柱

生物色谱柱，或生物柱，是分离生物化合物（如蛋白质和多肽、寡核苷酸和多聚核苷酸，以及其它生物分子和复合物，包括病毒颗粒）的色谱柱。生物柱在设计上大大减少或消除了样品与填料之间的不可逆或非特异性结合，并保留了其生物功能（酶活性）。通常，在生物柱上样品不能与活性金属接触。因此生物柱可以用聚合物（如 PEEK）、石英和玻璃内衬不锈钢或外镀金属部件制成，以使色谱柱具有生物兼容性。



生物色谱柱系列

色谱柱特性

硅胶

硅胶是理想的色谱填料，数十年来是键合相 HPLC 柱的主要基础填料。硅胶为刚性颗粒，可抵抗液流造成的挤压，当填料粒径在 5 μm 或更低时，需要加更高压力的情况下显得尤为重要。其极大的比表面积能够满足 HPLC 和 UHPLC 所需的吸附容量，填料表面的硅羟基或 Si-OH 基团是功能性碳链的理想键合位点。

毫不奇怪，用作柱填料的硅胶颗粒有各种粒径、纯度和酸性。最现代的填料是 B 型硅胶，痕量金属含量极低，比以前的 A 型硅胶酸性更低。低酸性硅胶意味着碱性分析物与硅胶表面硅羟基的相互作用更小，有助于改善峰形。用高纯度硅胶制成的色谱柱，是目前色谱工作者最常选择的柱子。

键合相

反相色谱最常用的键合相是 C18（十八烷基硅烷化，ODS）。这只是硅胶颗粒表面众多连接烷烃或碳链类型的一种。其它常用的线性烷烃硅烷化固定相选择还有 C8 和 C4。苯基，包括苯基-己基与联苯和 AQ、CN 以及 PFP 固定相，能够提供与直链烷烃固定相明显不同的选择性，以实现成功分离。还有不断增加的针对某些高水相流动相、或其它应用的键合相选择。

一般来说，较大的溶质，如蛋白质，最好用键合到大孔硅胶（孔径：300Å）的短链反相柱（C3、CN、二醇）分离。多肽和小分子用长链柱（C8、C18）分离。但在许多情况下，这种规律并不适用。因此，最好在开始时选择处于疏水谱中间位置的固定相（如 C8），然后根据初步分离结果和样品的溶解性，再采用疏水性更强或亲水性更强固定相。

还可以考虑其它选择，如离子交换、凝胶过滤/体积排阻或 HILIC 色谱。我们将在后面第 92–97 页讨论这些内容。

聚合物

当需要在非常低和高的 pH 下使用色谱柱时，除了硅胶基质填料还可以选择聚合物填料。聚合物填料是小规模色谱分析的理想选择，特别是 LC/MS，因为其化学性质稳定，不会出现可溶性物质或发生沉淀。例如，RLRP-S 柱中所用的反相球形聚合物填料，是以带天然疏水性表面的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物为基质的。用聚合物颗粒作为反相色谱填料不需要键合相。对这种刚性的多孔颗粒可以进行涂层和衍生化，加上各种功能基，包括弱和强阳离子和阴离子交换剂。

孔径

孔径的选择取决于待分析组分的分子量。对于小分子的反相分离，选择小孔径 (60-120Å) 填料柱。对于小分子和多肽，使用 80-150Å，对于聚合多肽和多数蛋白质选择 200-450Å 和 1000Å，对于分子量很高的蛋白和疫苗选择 4000Å。

对于 GPC/SEC 分离，分离的分子量范围一般会 and 孔径信息一起给出，以便选择合适的色谱柱。这些信息与色谱柱选择一起列于表中。

粒径

HPLC 柱在很长的一段时期内都采用 5 μm 作为标准粒径，直到二十世纪九十年代中期 3.5 μm 粒径柱才在方法开发中得以广泛使用。近来，随着对更快速度和/或更高分离度需求的增加，色谱工作者开始使用填充亚 2-3 μm 粒径填料，包括安捷伦生产的 1.8 μm 填料。使用这些填料可在更短的色谱柱上获得更快的高分离度分离。3.5 μm 粒径柱是在常规操作压力下操作的，可以在所有液相色谱仪上使用，包括 400 bar 操作压力上限的仪器。1.8 μm 短柱 (50 mm 及更短) 可以在优化的标准液相色谱仪上使用，而长柱则需要更高压力的液相色谱仪 (如，快速分离液相色谱或 UHPLCs)，在 600 到 1300 bar 压力范围下操作。近来，我们开发了更新的技术 (如表面多孔填料)，性能类似于亚 2 μm 柱，但产生的反压较低，从而使其能够在常规 HPLC 上使用 (表面多孔填料，见第 31 页)。

如果色谱柱的填料粒径减小一半，塔板数将增加一倍 (假设柱长保持不变)。但如果粒径减半，柱反压则将增大 4 倍 ($\sim 1/d_p^2$)。如果柱长加倍，塔板数和分析时间也会加倍。随着柱长增加，反压将呈线性增加。例如，一根填充 3.5 μm 填料的 2.1 x 100 mm 柱，理论塔板数大约为 12000-14000，这一柱效足以使许多样品得到分离。如果将粒径从 3.5 μm 减小到 1.8 μm，同样是 2.1 x 100 mm 柱，其柱效将增加一倍，约为 24000 理论塔板数。但是，该色谱柱产生的反压将比填充 3.5 μm 填料的柱子大 4 倍。

我们通常并不需要 24000 塔板数的色谱柱，所以，可以把柱长减半到 50 mm，得到期望的 12000 塔板数柱效。用这种较短的色谱柱，分析时间将缩短一半，反压也仅为 3.5 μm 填料粒径 100 mm 色谱柱的两倍。

色谱柱规格

多年来，用于分析方法开发推荐最多的色谱柱规格都是 5 μm 填料粒径的 4.6 x 150 mm 或 4.6 x 100 mm 色谱柱。如果需要更高的分离度，则推荐使用 4.6 x 250 mm 色谱柱。但现在随着色谱柱选择范围的扩大，我们推荐使用 3.5 μm 4.6 x 100 mm 色谱柱，或 2.7 μm 表面多孔填料色谱柱作为分析方法开发的起点。

在方法开发过程中，色谱柱内径（如 2.1 或 3.0 mm）的选择也要适应应用目标（如灵敏度、溶剂消耗）或与某些仪器类型相兼容（毛细管、纳流或制备柱）。

当需要提高灵敏度或样品量极为有限时，使用纳流柱、毛细管柱或微径柱。

- 样品量低于 1 pg 时，使用纳流柱，流速为 nL/min
- 样品量在 pg 到 ng 范围内时，使用毛细管柱，流速为 4 μL/min 左右
- 样品量为 ng 到 μg 时，使用微径柱，流速一般为 40 μL/min 左右

应用目标	柱内径(mm)
极高灵敏度、LC/MS、多肽和蛋白质	0.1, 0.075
极高灵敏度、样品量有限、LC/MS、多肽和蛋白质	0.3, 0.5
高灵敏度、样品量有限、LC/MS	1.0
节省溶剂；特殊的低体积仪器	2.1
特殊检测器，如 MS	2.1
高灵敏度、样品量有限	2.1
节省溶剂；标准 HPLC 仪器、LC/MS	3.0
标准分离	4.6
小规模 (mg) 制备性分离	9.4
中等规模制备分离（100 mg 到 g）或半制备	21.2
大规模实验室制备性分离（最多 100 g）	30, 50
中试和生产	100 mm 到 1 m

表 5. 应用与柱内径

在需要建立常规方法时，应考虑将柱尺寸降至分析方法和仪器可容许的最小规格；较小的色谱柱通常价格比较便宜，溶剂消耗也较少。在某些例子中，如果柱尺寸减小一半，灵敏度将提高 4 到 5 倍（假设进样质量保持不变）。例如，在优化的液相色谱上，使用 2.1 mm 内径柱进样时，色谱峰的峰高将比使用 4.6 mm 内径柱及同样进样量时提高 3 到 5 倍。如果仪器针对低体积柱进行了优化，只要保持流量线速度不变，减少色谱柱直径不会对柱效、理论塔板数、反压带来明显影响。

用不同的方法开发柱数据，可以很容易计算出较短色谱柱是否能得到与长柱同样的结果。通过简单计算得出的结论将为您节省大量时间。可以使用安捷伦的方法转换软件（登录 www.chem.agilent.com，搜索 *LC 方法转换软件*）帮助您完成计算。

卡套柱系统

卡套柱芯是安装在已有的柱硬件上，所以卡套系统具有经济、灵活的特点。分析系统的卡套式柱芯是预填充的，而制备和半制备应用则可以用购买的散装填料填充。

柱芯类型	特点	优点
分析柱和分析/保护柱组合		
安捷伦 HPLC 卡套式柱芯	可倒装柱端接头，添加保护柱	经济
		延长了柱寿命
		可快速更换色谱柱
		可使用 2, 3, 4 和 4.6 mm 柱芯
ChromSep：包含柱套、分析柱芯和保护柱的独立系统	卡套柱芯的两端都有独特的滤垫和筛板	有助于防止阻塞
	有各种柱长和内径组合	模块式灵活性
	有各种填料的柱芯和保护柱	经济
	无需特殊工具	使用方便
ZORBAX 快速分离和快速分离高通量卡套柱：1.8 和 3.5 μm 填料的独立系统	适用于高通量 LC/MS、LC/MS/MS 和组合分离	适用于各种分析类型
	填充 Eclipse XDB，pH 范围 2-9	适用于各种分析类型
	填充 StableBond，低 pH 条件下使用	低流失
	单支销售或三支套装	适用于各种分析类型
保护柱		
ZORBAX 卡套型保护柱：独立式	高效、独立、低死体积柱芯	密封耐压高达 340 bar
	设计独特的高聚物柱芯，在与金属表面连接时无渗漏	无需垫圈
	接头可重复使用	适合与 1/16 英寸 LC 接头连接

表 6. 卡套系统

转下页

柱芯类型	特点	优点
半制备保护柱		
ZORBAX 半制备保护柱的卡套：独立式	简单、低死体积组件	密封耐压高达 2000 psi (135 bar, 13.5 MPa)
	设计独特的聚苯基砵管线，在与金属表面连接时无渗漏	无需垫圈
	可重复使用的接头	适合连接至 1/16 英寸 LC 接头
ZORBAX 和 Agilent Prep 卡套型制备柱与保护柱：独立式和内置式选件	简单、低死体积组件	延长了柱寿命
	可重复使用的接头	可快速更换色谱柱
	用于内部和外部保护柱的硬件选件	可与 21.2 和 30 mm 内径柱配合使用
制备		
轴向压缩制备柱和装柱机：能提供动态轴向压缩和静态“锁定”轴向压缩的独立系统	适用于实验室级和生产级纯化，有三种高质量和高容量的柱规格可供选择，内径最高可达 24 英寸	很方便地从克级放大到几公斤级
	移动式装柱机	可在各处使用
	使用压缩空气	在危险环境下安全使用
	几分钟内快速安装和卸载	效率最高
Dynamax 制备卡套柱和保护柱：独立的动态轴向压缩系统	模块式设计，接头可重复使用	降低了硬件成本
	10, 21.4 和 41.4 mm 内径	便于放大
	一体式保护柱选件	延长了复杂样品制备的柱寿命
生产		
聚合物型 PLRP-S, PL-SAX 和 PL-SCX	各种孔径和粒径，得到高样品通量	提高效率
	良好的化学和热稳定性可实现适当净化	延长柱寿命
	适合生产过程硬件的稳定填充方法	提高填充柱性能

柱型	保护柱卡套	内径 (mm)	固定相
柱芯/保护柱芯系统兼容性指南*			
卡套柱卡套 5021-1845	保护柱芯（一体化系统） 卡套 5021-1845	2.0 3.0 4.0 4.6	Asahipak LiChrospher Nucleosil Purospher Superspher ZORBAX
标准接头	保护柱（独立）	2.1	ZORBAX
	卡套	3.0	
	820888-901	4.6	
快速分离柱卡套 820555-901	无保护柱卡套	4.6	ZORBAX
半制备柱	半制备保护柱（独立）卡套 840140-901	9.4	ZORBAX
PrepHT（无图片）	保护柱芯 820444-901	21.2	ZORBAX Agilent Prep

* 独立保护柱芯可用于安捷伦提供的所有卡套柱和标准接头色谱柱。

表 7. 卡套柱/保护柱卡套系统兼容性指南

性能的关键： 色谱柱的配置和设置

在许多关于色谱的论著中论述的“性能的关键”比我们这里所涉及的要得多。

我们的目的是强调常被忽视或容易造成混淆的几个方面。

让我们从系统和“机理”问题开始：

- 减少柱外体积
- 进行良好的连接
- 进样
- 理解并测量系统延迟体积
- 为获得高效柱设置数据采集速率

接下来，我们再把话题转向色谱分析和方法开发过程中需要做的其他一些工作：

- 了解螯合化合物
- pH 的影响
- 使用梯度洗脱
- 优化色谱柱的再平衡

在本节的最后，我们还将了解一下在应用过程中您可能需要做的几项工作：

- 色谱柱老化
- 色谱柱清洗 – 反相（硅胶基质与聚合物固定相）和正相

减少柱外体积的重要性

柱外体积是指“额外”或“外部”（相对于色谱柱）体积，是系统的一部分，尤其是各 LC 部件、色谱柱之间的连接管线体积、进样体积和流通池体积。

色谱柱越大，柱体积 (V_m) 就越大，减少柱外体积的重要性就越显得没那么高。但是，如果您使用的是较小的高效柱，如 Poroshell 120 和亚-2 μm 粒径柱，您就要尽可能地减少柱外体积，以免其影响您的色谱结果。不必要的柱外体积可能导致柱效损失，有时还会造成拖尾。

下面的例子就显示了柱外体积的影响（图 18）。只有 10 μL 柱外体积时，用 4.6 x 30 mm 小柱得到了良好分离。使用同样的柱子，加上一段管线，形成 50 μL 的柱外体积，对两张色谱图的前三个峰进行比较可以看出，色谱峰变宽、分离度降低。在向系统中添加体积不明的管线时，这种情况经常发生。添加一段太长的管线，或内径较大的短管时，会使高效柱的分离变差。所以，了解您所使用管线的内径和增加了多少体积非常重要。另外，如果您使用的是较小体积的色谱柱，需要使用微量或半微量流通池。标准流通池会增大柱外体积。

原则上，系统的最大柱外体积（管线体积、进样体积和检测器体积）不应超过柱体积的 10%。

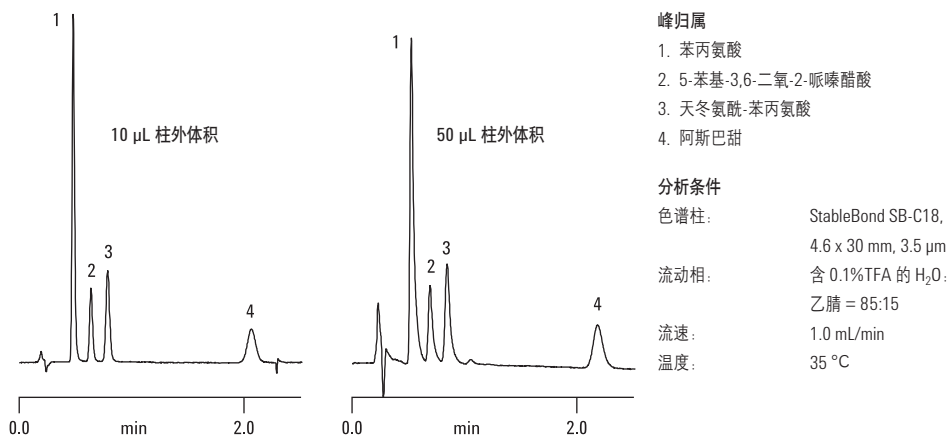


图 18. 管线体积对色谱性能的影响

安捷伦销售的毛细管套装，包含各种规格的毛细管管线和 Swagelok 接头，您可以根据最小的合适长度配备连接和管线体积。管线带有彩色标记，以区分管线内径。在您改用高效色谱柱时，要用窄内径红色管线 (0.12 mm 内径) 进行连接，而不能用常规 HPLC 仪器上常用的 0.17 mm 内径绿色管线。

实现完美的接头连接

使用 HPLC 和 UHPLC 的色谱工作者常常面临峰拖尾、峰展宽、峰分叉以及交叉污染等问题的挑战。引起这些问题的一个常见原因是管线连接不当，这一原因通常容易被忽视，因此在故障排除方面需要花费大量时间。管线连接中的死体积或微漏可能严重影响色谱分析的性能和重现性，采用现代 UHPLC 和快速液相色谱柱时尤其如此。

接头连接要求

接头连接对分析物的峰形具有重要影响。理想的接头连接应具备以下特性：

- 管线与接口之间无死体积
- 在超高压和高温下始终避免泄漏
- 优异的长期使用稳定性，防止管线滑动
- 简便易用

不可调金属接头

UHPLC 中最常用的接头为 2 件式或 3 件式不可调金属接头，其组装后即处于不可调的固定状态 [3]。由于不同的色谱柱硬件制造商采用不同的色谱柱末端接头设计（图 19），因此每个品牌的色谱柱都需要各自装配一组管线和接头。这样可确保杆长（stem length，即密封垫圈底部与管线末端之间的距离）实现完全匹配（图 20）。

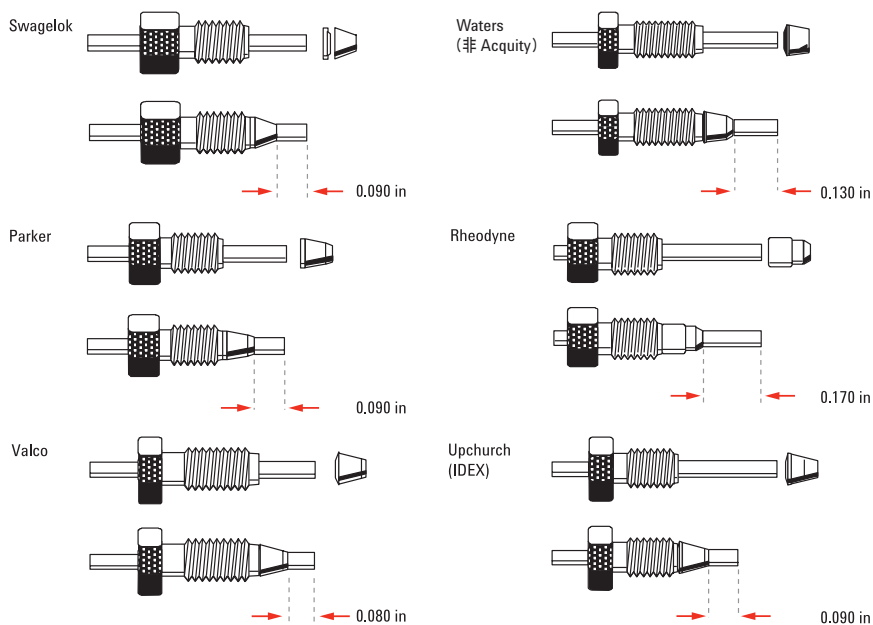
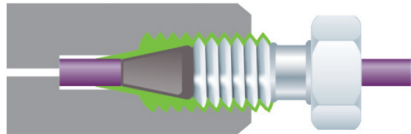


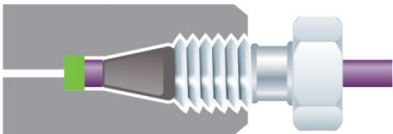
图 19. HPLC 中使用的色谱柱接头

如果杆长过短，将产生死体积，从而导致峰形变差、分离度下降以及交叉污染（图 20）。如果杆长过长，则密封垫圈不能正确就位并容易发生泄漏（图 20）。此外，使用扳手时传统接头和密封垫圈通常被拧得过紧，导致接头永久性卡在色谱柱中。

A: 杆长过长 → 泄漏



B: 杆长过短 → 死体积



C: 正确安装的管线，无死体积

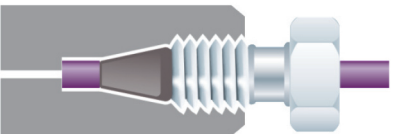


图 20. 接头连接正确与错误方式对比

可调手紧式接头

为解决传统接头的问题，我们开发出了可与不同色谱柱兼容的可调手紧式接头。这些接头通常配备聚合物（如 PEEK）密封垫圈，而密封垫圈不会永久性连接至管线，因此接头可以重复使用。然而，许多此类接头仍有诸多弊端，例如：

- 不借助工具无法获得 1300 bar 的超高压
- 需要遵循严格的精确扭矩或转向角范围操作指南以免拧得过紧
- 每次重新连接后都需要检查是否存在泄漏
- 经常需要重新拧紧接头
- 如果聚合物密封垫圈未能充分夹紧管线，后者可能在超高压或压力循环中从接头处滑落，产生死体积

Agilent A-Line 接头

Agilent A-Line UHPLC 接头克服了这些缺陷，实现了可重现的无泄漏色谱柱连接。A-Line 接头包括两种类型。A-Line Quick Connect 快速连接接头（图 21A）适用于色谱柱连接，能够在 1300 bar 下实现密封连接，且无需使用扳手。A-Line Quick Turn 接头（图 21B）适用于各种流路连接，包括色谱柱入口/出口、阀及其他连接。这种接头通过手拧即可在高达 600 bar 的压力下保持密封（取决于用户和连接位置），采用扳手则可达到 1300 bar。

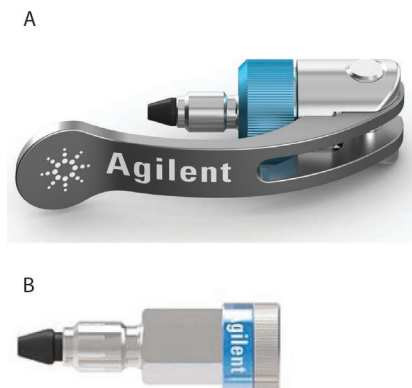


图 21. Agilent A-Line 接头
A. Quick Connect 快速连接接头，B. Quick Turn 接头

两类接头均采用创新的内置弹簧式设计（图 22），确保始终将管线推入接口底部，可实现可重现的零死体积连接，从而获得一致的色谱性能。通过弹簧即可调节杆长，因此这两类接头均可兼容所有类型的液相色谱柱。此外，A-Line Quick Connect 快速连接接头采用独特的压杆驱动设计，使弹簧组件（包括压杆）施加恒定压力将密封垫圈压到管线上，以避免管线滑动。无需使用任何工具，只需施加很小的力即可拧紧接头以用于 1300 bar (18850 psi) 压力之下。用户只需用手拧紧螺帽直至感觉到阻力，然后按下压杆即可（图 23）。

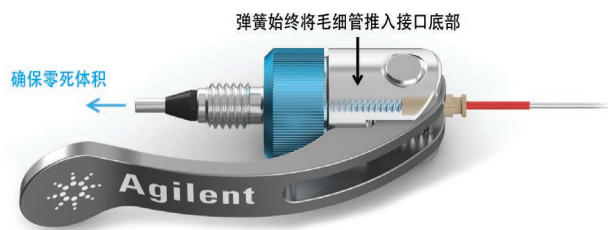


图 22. Agilent A-Line 接头独特的内置弹簧式设计

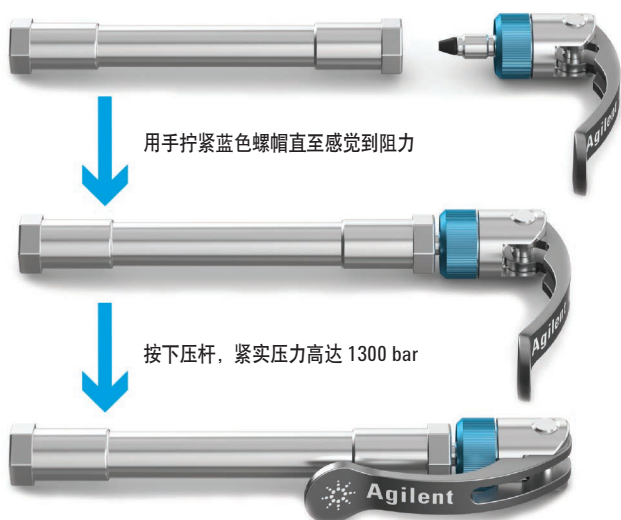


图 23. Agilent A-Line Quick Connect 快速连接接头的安装

200 次重复连接后的稳定性

为评估 Agilent A-Line

Quick Connect 快速连接接头的重复使用性和稳定性，我们将该接头断开并重新连接了 200 次。该接头连接在经过 200 次重新连接后仍未产生死体积和泄漏。

与不同品牌色谱柱的兼容性

不同色谱柱制造商的接头连接设计各不相同，接头的杆长不当将导致泄漏或峰形不佳。为评估 Agilent A-Line 接头对不同品牌色谱柱的兼容性，

如需了解更多有关在实际操作中如何进行连接的技巧，请查看“液相色谱故障排除”系列以获取详细信息：www.agilent.com/chem/liquidtroubleshooting，您还可查看“峰展宽视频”。有关 Agilent A-Line 的更多信息，请访问：www.agilent.com/chem/a-line。

进样量

进样量对于分析结果而言非常重要。如果进样量过大，色谱柱可能会过载，从而导致峰展宽，常见的结果是伸舌峰，在某些情况下也可能引起峰拖尾。

图 24 展示了采用 1 μ L、2 μ L、5 μ L 和 10 μ L 进样量得到的分析结果，我们可以看到色谱峰随着进样量的增加而变宽。

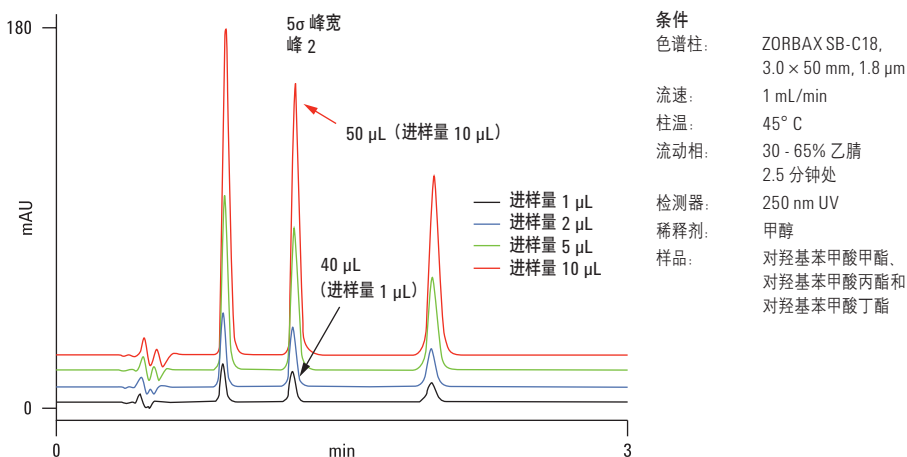


图 24. 载样量比较

确定进样量之后，还需确保进样溶剂与流动相足够相近，以减少谱带展宽或分叉。

进样溶剂和体积都对峰形有影响。在这个例子（图 25）中，甲醇溶剂中苯甲酸酯样品进样 5 μL ，显示已开始出现峰带变宽的现象了。反相柱规格为 3 \times 50 mm，仪器采用低扩散配置。进样 10 μL ，峰形已经明显不对称了。在反相 LC 中，如使用 100% 有机溶剂或 100% 强溶剂（本例中为甲醇），大体积进样时，将使色谱峰过早洗脱出色谱柱，导致峰变形。如需解决这个问题可以对分析物进行蒸发浓缩，从而减少进样体积。或者进样溶剂改为用水稀释，与流动相更为兼容，即使进样体积较大也不会出现峰变形。

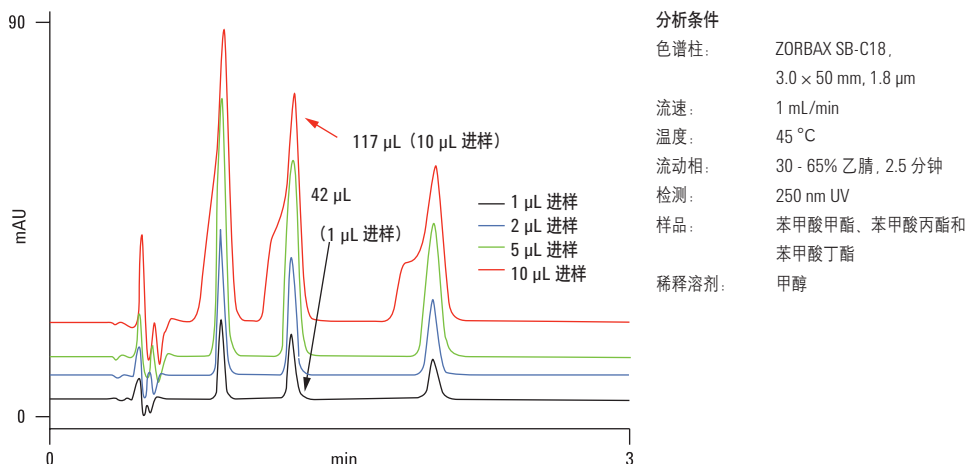


图 25. 溶剂效应：使用强稀释溶剂，1-10 μL 进样

设置数据采集速率

使用小体积色谱柱时，数据采集速率是“人为”峰展宽的常见原因。对于快速洗脱的色谱峰，要确保在色谱峰上收集到足够的数据点，数据系统才能准确测定出峰宽、峰面积和保留时间。如果得到的数据点太少（如，低数据采集速率），色谱峰就会显得比其实际要宽。您应该检查数据采集速率，确保其设置正确，以优化色谱结果。图 26 说明了数据采集速率的影响。

如果您对现在的色谱柱和梯度条件使用安捷伦方法转移器，转移器将估算出您所用条件下的期望峰宽值 (5σ)。这一信息对初始方法设置会有帮助。

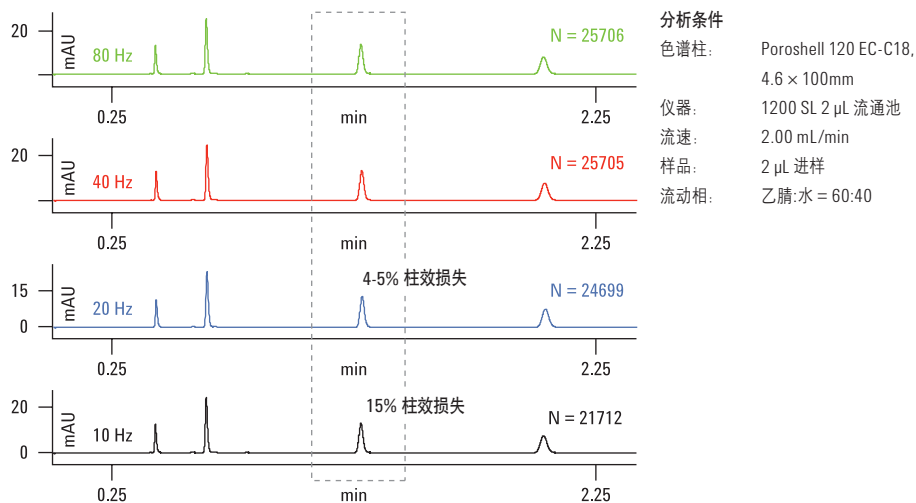


图 26. 不同数据采集速率对 Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm 上峰柱效影响的比较

这里，我们测定了柱效，可以看出，柱效随采集速率的增大而增加。

可以通过将检测器设置和/或时间常数调节到不影响信噪比的最快数值，对数据采集速率进行优化。用化学工作站中的峰宽控制可为您的分析选择峰宽或响应时间。化学工作站软件中峰宽的定义是，半峰高处的宽度。将峰宽设置为样品中色谱峰所期望的最窄值。可以不用更快的响应时间，以免导致基线噪音增大。

驻留体积及其对色谱的影响

低压混合系统的驻留体积等于从比例阀经泵和其它系统组件到柱头的体积总和（见图 27）。高压混合系统的驻留体积等于从各溶剂首次接触，经两个计量泵再到柱头的体积总和（见图 28）。

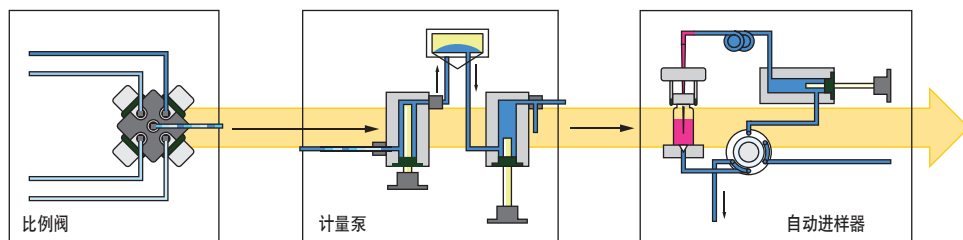


图 27. 驻留体积：低压混合四元泵

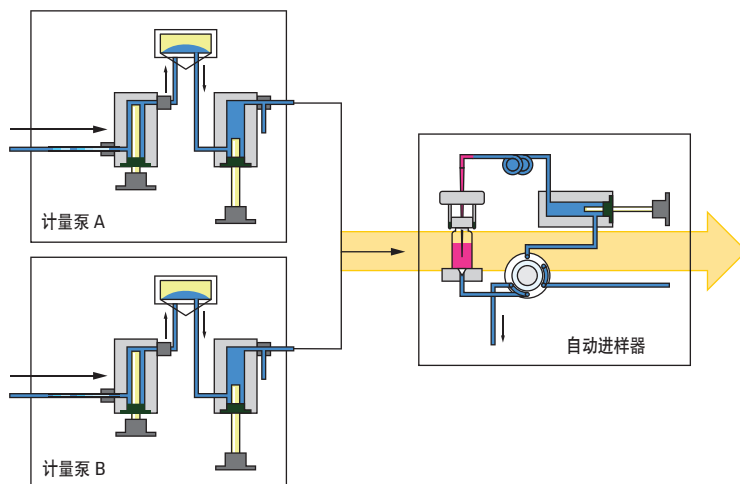


图 28. 驻留体积：高压混合二元泵

在梯度分离中，驻留体积使梯度开始时出现一段等度时间，相当于驻留体积除以流速。驻留体积太大的仪器不能进行窄径梯度分离。

使用窄径柱时，仪器配置至关重要。进行窄径（2.1 mm 内径）和微径（1 mm 和 < 1 mm 内径）柱优化时，必须使驻留体积和柱外体积最小化。

图 29 中的色谱图例说明了驻留体积对分析结果的影响。请注意，前面的洗脱峰较宽。问题在于驻留体积使前面的峰出峰较晚，基本上是被等梯度洗脱的。如果这种情况影响了分离或检测，就需要减少驻留体积或使用另外的系统。

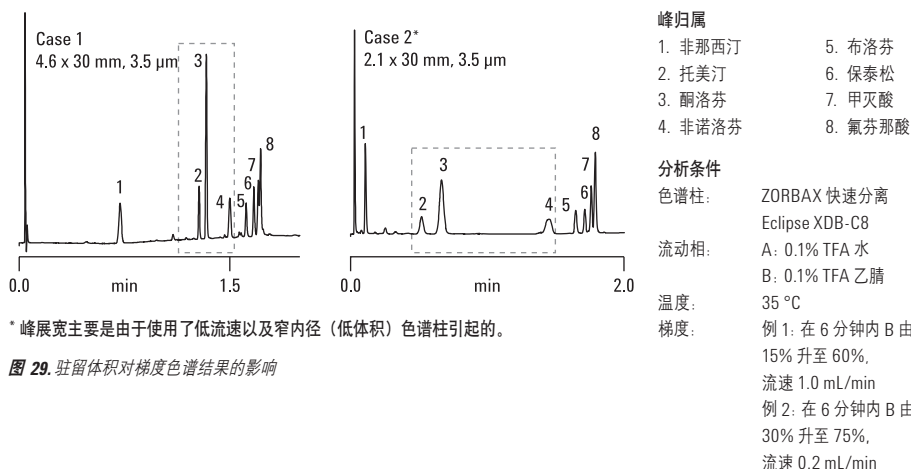


图 29. 驻留体积对梯度色谱结果的影响

测量系统的驻留体积

首先将色谱柱替换为一段短 HPLC 不锈钢管线。流动相组成如下：A-水（无 UV 吸收），B-0.2% 丙酮的水溶液（有 UV 吸收）。检测波长 265 nm。以 1mL/min 的流速运行梯度，B 在 10 分钟的时间内由 0 升至 100%。记录后打印出梯度曲线（如图 30）。

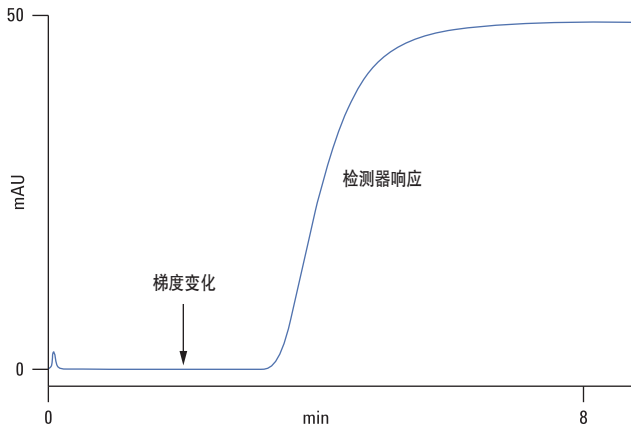


图 30. 计算驻留（延迟）体积，步骤 1

用尺子在纸上，或在 PowerPoint 中插入线段，在平行于 x 或 y 轴的下列点上划线：

1. 流动相中含 90% B 的零信号点
2. 100% B 的最稳定信号点
3. 在 2.0 分钟处做垂线，图形如图 31 所示

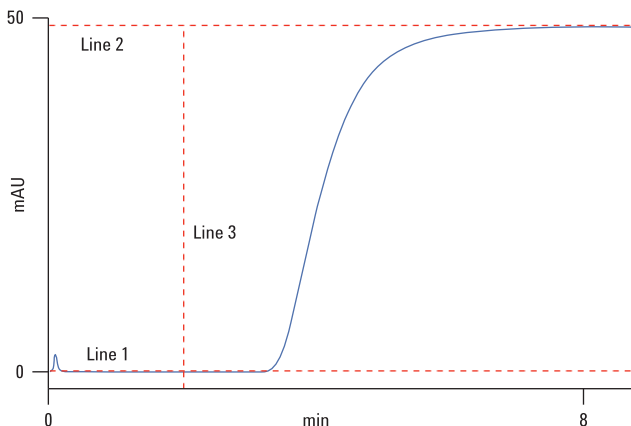


图 31. 计算驻留（延迟）体积，步骤 2

三条线段添加完毕后，再添加两条线段。计算梯度步骤 50% 处的响应值，本例中为 24.5 mAU，在图上划一条水平线。然后再划一条垂线，与 50% 响应线及所见的检测器信号相交。新图形见图 32。

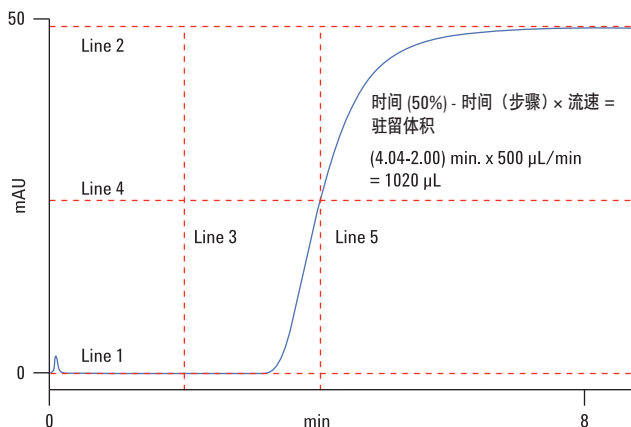


图 32. 计算驻留（延迟）体积，步骤 3

沿 x 轴至 50% B 垂线处（在此处的响应是 50%），确定时间，并尽可能准确。假设流速为 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，时间如有 0.1 分钟的误差，估算出的延迟体积将会有 50 μL 的误差。在本例中，我们估算 50% 响应的时间为 4.04 分钟。

计算驻留体积的简单公式是，时间 (50%) - 时间 (步骤) \times 流速 = 驻留体积，在本例中，(4.04 - 2.00) 分钟 \times 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ = 1020 μL 。

这一测量是在 Agilent 1200 RRLC 系统 (1200 SL) 上完成的，用一根内径为 0.062 mm (0.0025 英寸) 的 100 cm PEEK 限流器使反压达到 340 bar，以水作为流量输送压缩性补偿的特殊溶剂。该系统包括标准混合器和脉冲阻尼器，以及自动进样器，采用普通通路（而不是旁路模式），再连接上述的限流器和 3 mm $2\mu\text{L}$ 流通池。

评估驻留体积的影响

在不同驻留体积的仪器上运行同一方法，可以得到不同的结果，如图 33 所示。

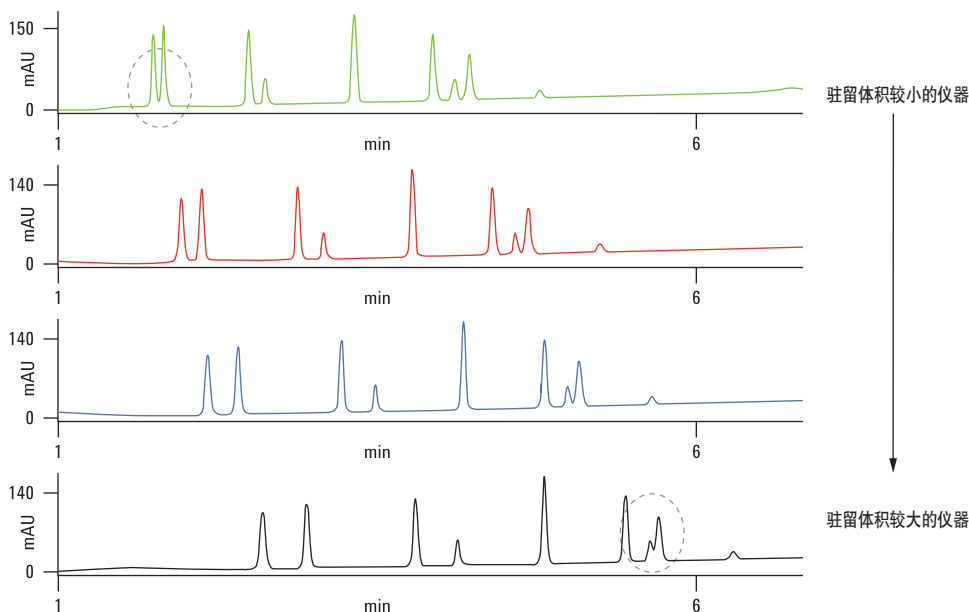


图 33. 驻留体积和分离度

在这一例子中，驻留体积最小和最大的系统都没有得到好的结果。这个方法很可能是在驻留体积处于中等范围的仪器上开发的。

要了解驻留体积对您的梯度分离有什么影响，可以在梯度运行初期延长或缩短等度运行时间以进行观察。

要在驻留体积较小的系统上模拟较大驻留体积，可在梯度程序初始时设置一段等度时间，相当于两个驻留体积之差（用 mL 表示）除以流速（以 mL/min 表示）。

要模拟较小的驻留体积，必须修改进样器程序，使进样延迟时间等于相同的驻留时间。有些仪器有这种功能，而其它的则没有。

如果要把方法转移到另一实验室的不同仪器上，记录方法开发所用仪器的驻留体积，以及驻留体积对分离有何影响非常重要。

驻留体积与分析时间

驻留体积还包括进样器体积，所以，将进样器的内体积和周围的连接管线降至最低非常重要。大多数安捷伦自动进样器都提供了旁路模式选项，或带有自动延迟体积减少 (ADVR) 功能，在样品从样品定量环中冲出后，将进样器切换回上样位置。根据您选择的进样器，最多可将系统中的体积减少 300 μL 。标准的安捷伦 1200SL 或 1260 Infinity 二元梯度仪器的起始延迟体积大约为 1100 μL ，通过更换较小内径管线、使用自动进样器旁路功能、并拆除混合器和阻尼器，可减少至 280 μL 左右。

可以通过重叠进样缩短快速梯度分离的分析时间。在重叠进样中，自动进样器在之前的分析过程中吸取样品，一旦系统准备就绪即可进样。这一功能可以将每次分析的时间缩短 30 秒左右。如果您正在进行的是快速梯度组合化学分析，则最多可节省 1/3 的分析时间。

如果您要用非常小的色谱柱（如毛细管和微径柱）进行大量梯度分析，280 μL 的延迟体积就显得太高了。这时就极有必要使用安捷伦毛细管液相色谱仪配合这些色谱柱了。

不要忘记，使柱外体积最低和选择适当的样品进样稀释剂同样重要。这有助于最大限度地减少峰展宽和分离度的降低。

另外，正如我们先前讨论过的一样，还要确保正确设置检测器响应时间，在快速洗脱峰上获得足够的数据点（后面还要讨论这个问题）。否则，可能会出现变形的人为宽峰。

螯合物

某些分析物具有易于与金属进行螯合的结构。筛板或柱壁上的金属可能与其发生相互作用，形成螯合物。用磷酸冲洗有助于解决这一问题。

这里介绍一种判断是否存在金属问题的好办法。带有孤对电子的化合物，加一个金属离子可以形成环状结构，这可能导致不重复保留或产生峰形问题（图 34）。

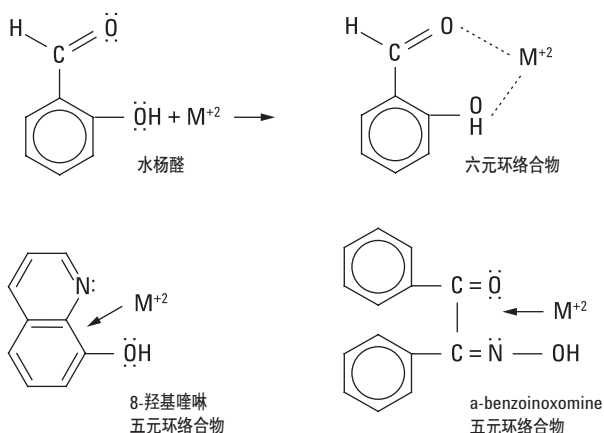


图 34. 评估化合物是否有螯合问题

在本例中，磷酸冲洗有益于解决这一问题。注意，在“前面”的色谱图中，化合物 2 拖尾因子较高（图 35）。经过酸洗后，我们得到了一个较尖锐的色谱峰，化合物 2 的拖尾因子得到了改善。ZORBAX StableBond 柱可以接受 1% 的磷酸冲洗，因为该色谱柱采用了在酸性条件下稳定的设计。如果您使用的是 Eclipse-XDB、Eclipse Plus，或其它为中等 pH 范围而设计的封端柱，酸浓度应减为 0.5%。

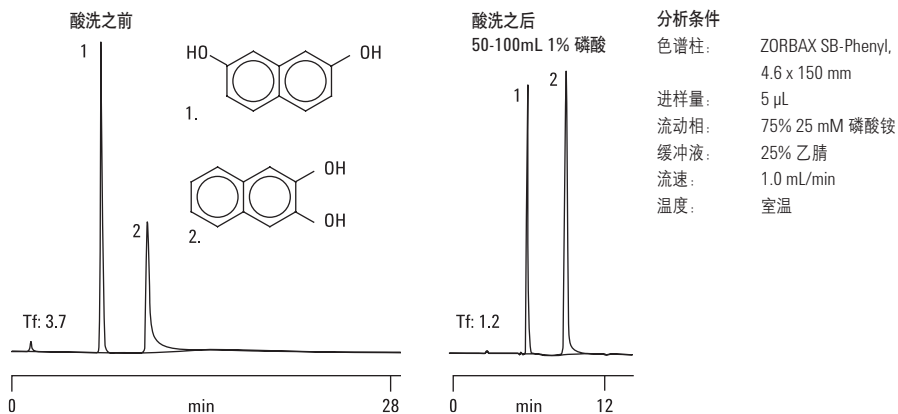


图 35. 用磷酸冲洗恢复产生螯合化合物的柱性能

pH 和流动相改性剂

流动相的 pH 和样品会对方法开发产生很大影响（如需了解更多信息可参见“流动相操作”和“方法开发”等章节）。应尽可能避免使用极端 pH — 不论是过高或过低 — 因为在这种极端条件下工作将缩短色谱柱的寿命。

检查一下您所用色谱柱的推荐 pH 范围，以确定最佳 pH 范围。大多数分离在 pH 2 到 8 之间进行。酸性和碱性（可离子化）分析物的保留对 pH 非常敏感，常随 pH 改变而发生显著变化。评估分离的最佳 pH 是方法开发的重要内容，详见方法开发一节。

梯度操作

样品越复杂，使用梯度洗脱方法的可能性就越大。梯度洗脱对极性差异大或高分子量的化合物（如多肽和蛋白质）非常有用。

虽然等度洗脱方法使用方便，但由于峰宽随保留时间延长而增大，后洗脱的峰会变宽。梯度洗脱缩短了后洗脱峰的保留时间，可以解决这个问题。梯度洗脱的优点包括，由于梯度压缩效应得到窄峰、由于不断增加色谱柱洗脱溶剂的强度，从而降低了污染物的堆积。

图 36 显示了等度与梯度洗脱方法的比较。使用等度洗脱分离时，用 70 分钟也没有将 8 种除草剂化合物完全分开，并且组分 1 和组分 2 共洗脱。降低有机相比例可以分离峰 1 和峰 2，但保留时间无法接受，并且峰 8 的检出限也无法接受。使用 20-60% 的梯度，在 30 分钟内即可分离全部 8 个组分，并具有相等的检测限。如果提高起始梯度洗脱液的有机相百分比，分析时间还可以进一步缩短。如，可以进行有机相 25 - 65% 的梯度洗脱。

反相色谱的梯度分离可以用 2 到 4 种流动相组分完成。在二元梯度中为 A 和 B。A 溶剂较弱（常为水或缓冲溶液），使分析物缓慢地从色谱柱上洗脱下来。B 溶剂较强，使分析物的洗脱速度更快。B 是可与水混溶的有机溶剂，如乙腈 (ACN)、甲醇 (MeOH)、四氢呋喃 (THF)，或异丙醇 (IPA)。梯度洗脱方法开发应从测试开始。

以下是建立梯度洗脱方法的关键步骤：

1. 先进行测试，在一定时间内有机相的浓度从 5 - 10% 之间线性梯度变化至 100%。如果缓冲液与溶剂 B 不互溶的话，梯度中有机相的浓度上限为 70%
2. 用最后的比例持续洗脱一段时间，确保所有样品组分都已洗出
3. 查看色谱图，以确定恰当的起始梯度组成和梯度曲线

大多数梯度洗脱分离都是用线性梯度完成的，即有机相组成的变化速率保持恒定。但也可以用其它类型的梯度。例如，根据所需要的分离和保留时间，某些梯度程序在不同时间的斜率不同，或 A 和 B 的相对浓度发生急剧变化。

如需了解更多梯度洗脱的内容和实例，请参见方法开发一节。

如需缩短分离时间、改善色谱峰形的检测，应保持梯度简单（使用较短的梯度时间）并使用较短的色谱柱 (50-75 mm)。

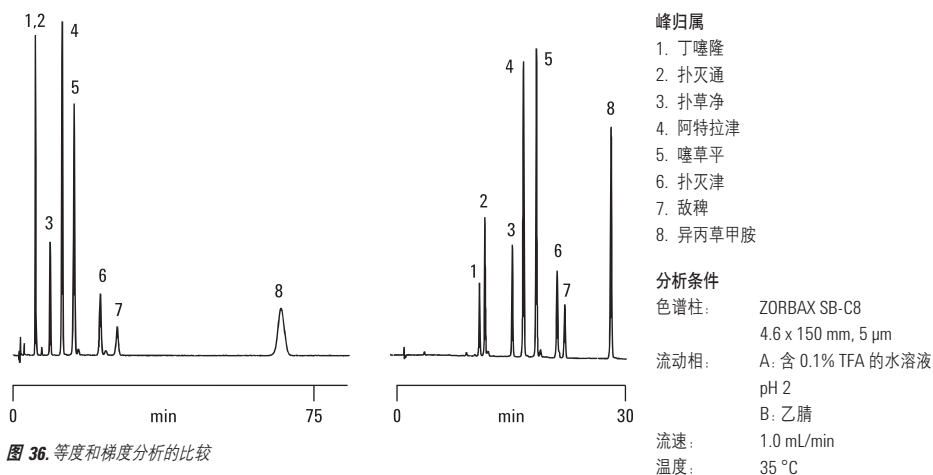


图 36. 等度和梯度分析的比较

优化色谱柱的再平衡

在方法开发或转换过程中，要保证足够的色谱柱平衡时间，保留时间才可重现。从葡萄汁的梯度分析分离（图 37）中可以看出，色谱柱死体积和色谱柱的再平衡消耗的时间。

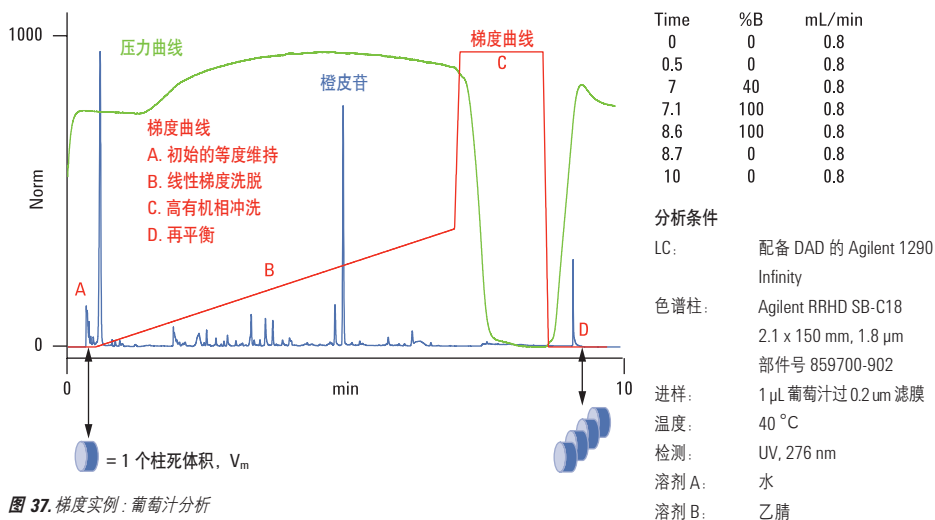


图 37. 梯度实例：葡萄汁分析

这是在前面的梯度运行后，回到初始流动相条件所用的时间。在本例中，再平衡时间为 1.4 分钟，相当于该柱的 4 个柱体积。

找出色谱图中基线第一次波动的时间，将这段时间（以 min 表示）乘以流速（以 mL/min 表示），即为死体积的 mL 数。也可以用安捷伦方法转换器计算死体积。

依据经验来看，在方法开发过程中，需要用 10 个柱体积进行平衡，但对于已建立的方法，平衡时间可以估算并缩短，如，在本例中为 4 个柱体积。平衡时间的最小值是经过反复摸索确定的，通过重复运行梯度并记录保留的改变。如果经过多次进样结果都能重复，如图 38，平衡时间就足够了。

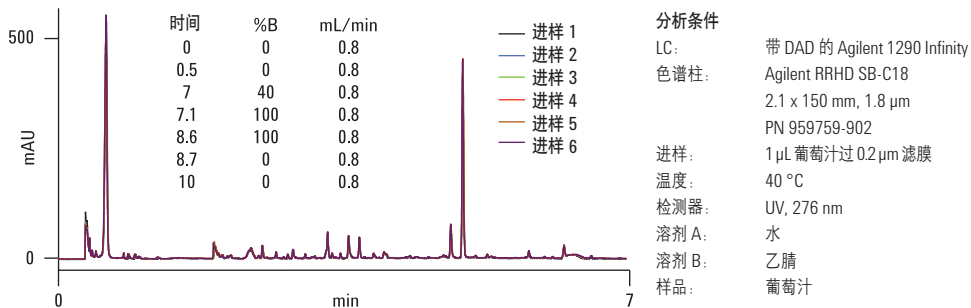


图 38. 确认色谱平衡重叠图

为什么要反复实验不断摸索呢？

- 固定相通过再平衡回到起始条件的速度不同。快慢程度取决于所用的流动相溶剂、缓冲液和梯度范围。这就是方法开发时建议使用 10 个柱体积的原因，这样可以确保固定相已达到再平衡，能够进行下一次运行。只要能够完成您所需要的分离，都可以考虑缩短再平衡的时间
- 由于平衡体积包括仪器的驻留体积，而该体积可能随仪器的不同而不同。驻留体积对等梯度方法的保留没有影响，但在梯度方法中，却对保留有显著影响。如果您不清楚系统的驻留体积，则可能会出现严重问题，因为您的驻留体积可能比柱体积还大。如果您要将梯度方法从一台仪器转移到另一台仪器上，由于两个系统的驻留体积不同，保留时间则会发生偏移。流路体积越相近，保留时间的吻合程度就越高

提示：可以通过观察在线信号窗的压力曲线变化进行确认。压力随流动相组成变化而变化。当压力曲线回到初始值时，色谱柱差不多就达到再平衡了。

提示：您需要了解您系统的驻留时间！方法见 50 页。查看您的系统说明书或向安捷伦技术支持寻求帮助。见本书中安捷伦资源一节。

色谱柱老化

在您使用色谱柱时，会用它分析各种目标物、使用各种流动相并分离不同的样品基质，经过长时间的使用，色谱柱会受到这些物质的影响发生一些微妙的变化，从而引起保留的改变。在使用新色谱柱时保留其测试样品色谱图非常重要，在使用一段时间后进行比较，就能发现性能上的变化。如果分离度下降导致不能进行良好定量，这根色谱柱就应该丢弃并更换了。

键合相流失

虽然色谱柱污染是硅胶基色谱柱性能下降的最常见原因之一，但随时间推移发生的键合相流失也会改变保留。如果在流动相中使用了某种不兼容溶剂，键合相可能从硅胶基体上脱离下来，导致分离度和保留时间的改变，并增加了峰拖尾。在 pH 2 以下键合相的流失最为严重。可以通过使用稳定键合相色谱柱减小这种影响，或在 pH 2 到 pH 7 之间 60 °C 以下操作。在高 pH 条件下，硅胶基质将发生溶解，从而导致填料流失，形成空洞、峰形变差。如果一定要在 pH 值大于 9 的条件下进行分析，应确保使用适合这种工作条件的特殊键合相色谱柱或可以轻松耐受高 pH 流动相的聚合物类色谱柱。

如需确定色谱柱是否已损坏，应该监测并观察其容量因子、选择性和拖尾因子的变化。这同时也有助于您预测何时需要更换色谱柱。

清洗反相硅胶柱

有时，可以通过清洗色谱柱缓解柱压高或峰拖尾问题。在清洗色谱柱之前，我们建议断开色谱柱与检测器的连接，让清洗溶剂流入烧杯或其它容器中。在某些情况下，可反冲色谱柱进行清洗。使污染物从柱中流出。在进行此项操作前，应向色谱柱厂商咨询，或查阅色谱柱所附说明书。

清洗色谱柱需要使用比流动相更强的溶剂。清洗分析柱时，每种溶剂至少应使用 10 个柱体积（见图 39）。清洗反相柱的步骤如下。清洗完成后，按厂商建议的液流方向装回色谱柱。

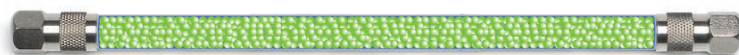
柱压过高问题可能不是柱阻塞造成的，而是系统中的密封垫损坏，以及颗粒沉积在线滤头上造成的，在清洗色谱柱前，应尝试更换在线滤头。

不要试图更换色谱柱的进样口筛板。因为现在填充色谱柱采用的是高效工艺，这样做可能为色谱柱带来不可恢复的损坏。



$$\text{柱管体积} = \pi r^2 L$$

$$\text{柱管体积} = \pi (0.23)^2 (15) = 2.49 \text{ cm}^3 = 2.5 \text{ mL}$$



$$2.5\text{mL} \times -65\% (\text{没有装填的柱体积}) = 1.5 \text{ mL} = 1 \text{ 个柱体积}$$

图 39. 计算柱体积

提示：为避免沉淀，如果系统中不含非挥发性缓冲液，在纯有机溶剂进入系统之前，首先用不含缓冲液的水相流动相进行冲洗。

反冲或清洗色谱柱的步骤：

1. 断开色谱柱与检测器的连接，将管线留在色谱柱末端，将其放入接收液体的烧杯中
2. 先用不含缓冲液盐的流动相冲洗（水/有机相）
3. 然后用 100% 有机相（甲醇和乙腈）冲洗
4. 检查压力是否回归正常，如果没有，再进行下一步操作
5. 丢弃色谱柱或考虑用更强的条件清洗：75% 乙腈/25% 异丙醇
6. 100% 异丙醇
7. 100% 二氯甲烷 *
8. 100% 己烷*

* 无论是使用己烷还是二氯甲烷，使用之前或恢复使用反相流动相之前必须用异丙醇进行冲洗。

缓冲液盐可能发生沉淀并造成色谱柱内反压。发生这种情况时，应用热水缓慢通入色谱柱，以去除沉淀。

含丙醇的冲洗溶液因粘度增大将产生更高的操作压力。在清洗过程中需要降低流速，以保持安全的操作压力。

清洗正相硅胶柱

对于正相色谱柱只能使用有机溶剂，如果您的色谱柱是传统的分析型 4.6 x 250 mm 色谱柱，那么每种溶剂至少需要用 50 mL（相当于 20 个柱体积）。尝试下列强度递增的溶剂进行清洗：

1. 50% 甲醇:50% 氯仿
2. 100% 醋酸乙酯

清洗正相模式色谱柱还取决于样品类型。如果用这些溶剂的清洗效果不佳，请与安捷伦联系，以便我们可以根据您的应用和样品基质推荐更有效的溶剂。

清洗反相聚合物柱

当使用聚合物类反相柱时，我们强烈建议流动相中最少含有 1% 的有机改性剂。长期使用 100% 水相洗脱液后再使用有机流动相时可能影响柱效，同时也不能用 100% 的水相缓冲液“冲洗”色谱柱。可以进行反向冲洗，如果起始压力高，可降低流速。下面是反相聚合物柱的清洗步骤：

1. 使用当前流动相运行清洗梯度，再用高比例有机溶剂 (95%) 清洗数个柱体积。重复 2 到 3 次。由于缓冲液可能在高有机相中发生沉淀，因此如果您的流动相含缓冲液，有机相比例不要超过 70%，或者在清洗之前用不含缓冲液的流动相将缓冲液清洗掉
2. 尝试使用较高强度的有机改性剂，如 TFA，去除发生疏水键合的污染物
3. 有时用含 1.0% TFA 的水/乙腈 (v/v) 可以去除多肽或蛋白污染物
4. 用强酸和强碱（包括 1 M 氢氧化钠）适当清洗而不会发生热降解

提示：过滤样品将增加色谱柱的使用寿命，也可减少仪器磨损。

方法开发

如果您还没有建立 HPLC 方法，要进行稳定而重复的分析，就需要进行方法开发了。具备进行成功方法开发的技能，对解决将来可能遇到的复杂分析极有帮助。

在本章中，首先我们将向您介绍对所有 HPLC 模式都适用的概要性的内容：

- 方法开发的关键步骤
- 模式选择
- 色谱柱填料和规格
- 固定相的选择

接下来，我们将着重介绍反相方法的开发：

- 反相色谱固定相的选择
- 反相色谱流动相的选择
- 流动相操作要点
- 涉及流动相和流动相改性剂的故障排查实例
- 用流动相改性剂控制 pH
- 与 pH 相关的故障排查实例
- 聚合物色谱柱的反相方法开发
- 将常规柱上的现有方法转移到表面多孔填料柱的要点
- 方法开发的步骤指南
- 自动化方法开发

本章的最后，我们还将讨论其它 HPLC 模式的方法开发：

- HILIC
- 正相色谱
- 离子交换色谱
- 凝胶渗透/体积排阻色谱
- LC/MS

方法开发：从何处入手

方法开发的总体目标是在尽可能短的时间内优化目标物的分离度。当您开始考虑进行方法开发时，最好先回顾一下分离度的关键影响因素。可以复习色谱基本概念一章（第 5-11 页）。

典型的方法开发流程包含以下步骤，同时也是本章内容的主线：

1. 选择分离模式
2. 选择色谱柱和填料规格
3. 选择固定相填料
4. 选择流动相溶剂
5. 如果分离模式需要，调节流动相的 pH
6. 进行等度或梯度初步实验，以确定边界条件
7. 优化实验条件

模式选择

您应该做的第一件事就是选择 HPLC 模式。通常分离模式是由以下因素决定的：目标物的类型和溶解度、目标物分子量 (MW)、样品基质以及可使用的固定相和色谱柱。图 40 和 41 根据化合物分子量和将使用的溶剂，列出了评价分离模式最佳选择的步骤。

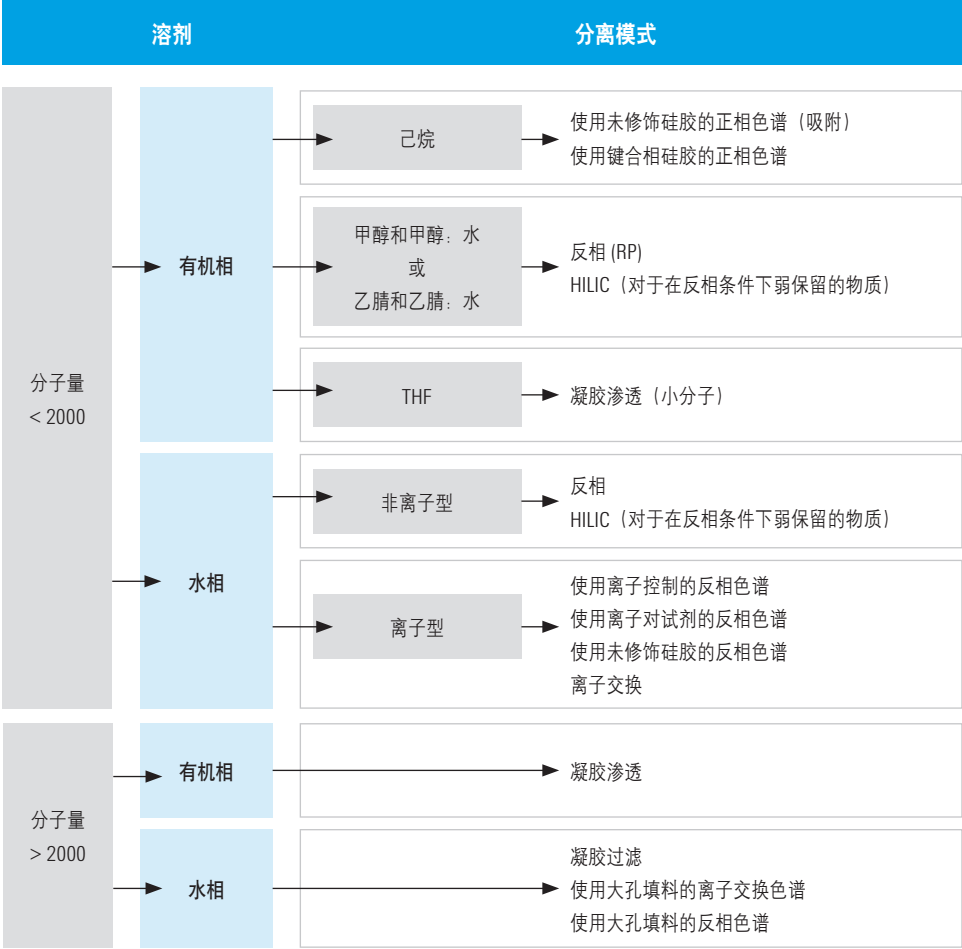


图 40. 按溶剂和分离模式选择 LC 和 LC/MS 色谱柱

分子大小	溶剂	化合物类型	分离机制
小	水相/有机相	脂类	银离子络合
		多环芳烃	反相 C18
		有机酸	配位相互所用反相离子对
		单糖和二糖	配位相互所用
			正相氨基
			离子交换
		低聚糖	配位相互作用和离子交换
		糖醇	配位相互所用
		正相	正相氨基/氰基/二醇
		碱性、极性	极性反相 C8 或 C18 或 HILIC
			反相 C18 离子抑制
		氢键结合	反相 C8 或 C18
		位置异构体	反相 C8
		芳香族化合物或结构相似物	反相苯基/苯基-己基/二苯基
		强极性	反相其它或 HILIC
		极端条件	反相聚合物
	有机相	非极性	正相 Si
		极性	正相氨基/氰基/二醇

图 41. 按分析物和分离机制选择 LC 和 LC/MS 色谱柱

有时，一组特定分析物可以用一种以上的模式分离。例如，离子型化合物可以用树脂或硅胶基色谱柱进行离子交换色谱分离，也可以用反相柱进行反相离子对分配色谱分离。

许多色谱工作者都是以反相 HPLC 开始分离，因为反相色谱已发表了许多应用文章可供参考。用反相色谱可以分析非极性、非离子型、离子型和极性化合物，选择适当的流动相和分析条件，有时整个分析都可以仅用这一种模式完成。继反相色谱之后，我们还将在本章的最后讨论其它分离模式。

选择色谱柱和填料规格

图 42 显示了评价色谱柱固定相和色谱柱规格时考虑的部分参数。要进行高通量分析，小粒径短柱（如亚 $2\ \mu\text{m}$ ）是最佳选择。如果您要对包含多种组分的样品进行复杂的分离，可以选择填充小粒径填料的长柱，切记，这种色谱柱的操作压力可能会显著增加。如果您要进行质谱分析，窄内径柱（如 $2.1\ \text{mm}$ 内径）是最佳选择，因为与质谱检测器联用需要较低流速。制备色谱常使用填充较大粒径填料（ 5 或 $10\ \mu\text{m}$ ）的大内径柱。对于这种色谱柱，高流速正好与制备柱的流量需求相匹配。

填料的孔径非常重要，因为待测分子必须与多孔结构“相匹配”，才能与固定相发生相互作用。较小孔径的填料（孔径 80 到 120\AA ）最适合分离分子量 2000 以下的小分子。对于分子量超过 2000 的较大分子，需要使用较大孔填料；例如，分离蛋白质的常用孔径是 300\AA 。

对大多数分离来说，都可以使用不锈钢柱硬件。但是，如果您要分析的是可能与金属表面发生相互作用的敏感分子，如某些类型的生物分子，则需要使用 PEEK 或玻璃内衬不锈钢等柱材料。对于痕量阳离子的分离，PEEK 柱的惰性最高。请注意，PEEK 柱的压力上限为 $400\ \text{bar}$ 。

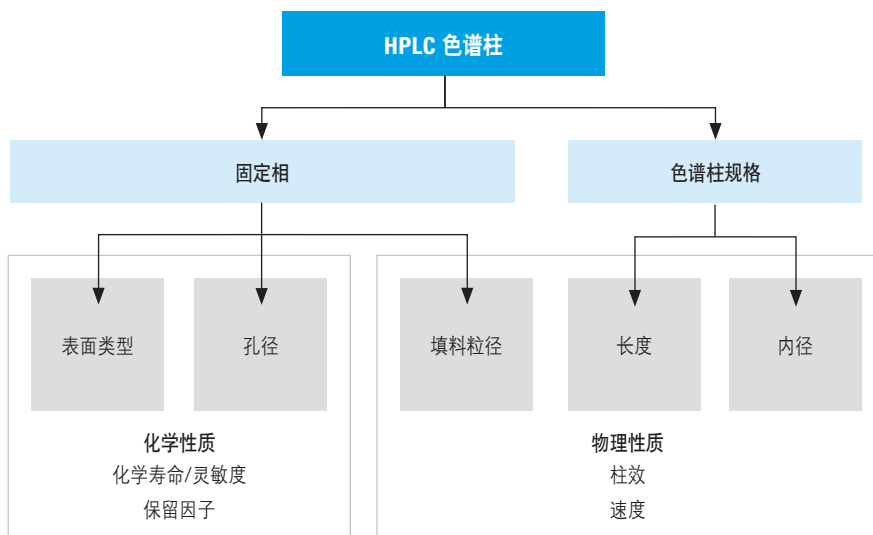


图 42. 部分色谱柱及固定相影响

选择固定相

有包含各种分离模式的多种固定相可供选择。许多色谱工作者都以最通用的十八烷基硅烷化 (C18) 固定相开始进行反相色谱分离，尤其是对小分子的分离。下面我们将着重讨论反相分离的问题，本章后面部分再涉及其它分离模式。

反相色谱的方法开发

反相色谱是到目前为止最通用的 HPLC 方法——大约占有所有方法的 60%，将近 95% 的色谱工作者都在使用。

在反相色谱中，分析物在极性流动相和非极性固定相之间分配——与正相色谱相反。通常，分析物与疏水固定相之间发生非极性、非特异性相互作用，即，样品分配入固定相。我们使用 C18、C8、苯基或 C3 等固定相，产生极性差异和/或基于分子芳香结构的差异。

极性较强的分析物比非极性分析物在反相固定相中的保留弱。保留与分析物的疏水性基本上成正比。具有大疏水基团和带较长烷基链的同系物，比结构中带极性基团的分子（如氨基、羟基）保留更强。如果有一系列脂肪酸，如 C12、C14、C16 和 C18，则 C12 保留最弱，C18 保留最强。

流动相主要由两部分组成：

1. 水，可含缓冲液，或用酸或碱调节 pH
2. 可与水混溶的有机溶剂

反相色谱有多种用途，有时在同一色谱分析中就可以分离非极性、极性、可离子化的和离子型分子。一般来说，对于可离子化的化合物，为了增加保留和改善峰形，我们会在流动相中加入改性剂，以抑制离子化，减弱其极性，使其保留更强。

反相色谱固定相的选择

下面我们要讨论如何开发反相方法。图 43 显示了如何根据特定分析物的分子量选择合适固定相的一般流程。首先，必须选择孔径，以确保目标分子能够进入填料，在孔隙中与疏水固定相发生相互作用。然后，选择固定相，多数情况下是从 C18 固定相开始。根据方法的最终目标不同，可以选择常规分析柱，如果需要高通量分析，可以选择“快速分析”反相色谱柱。

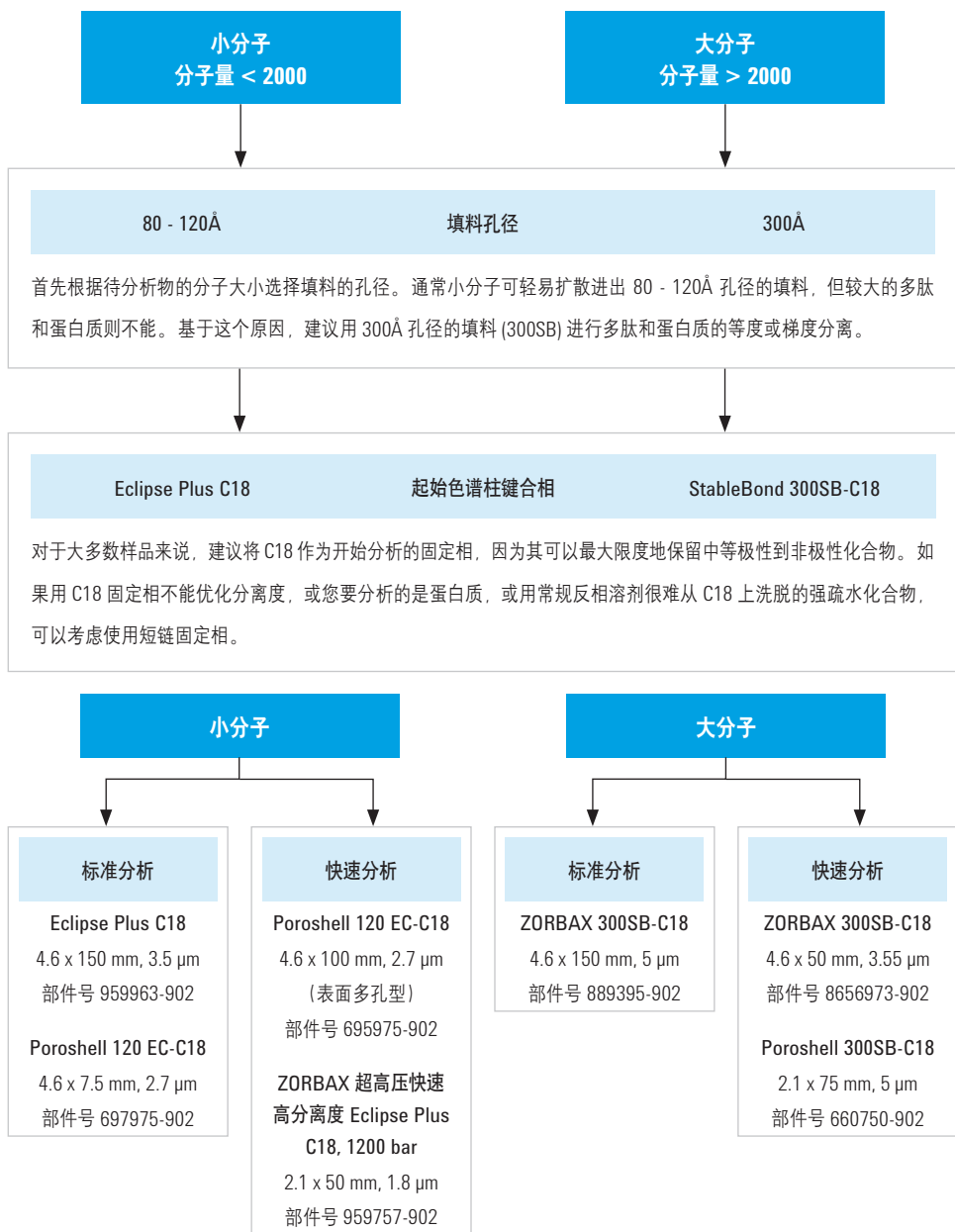


图 43. 反相色谱：固定相选择概览

大多数色谱工作者是从 C18 固定相开始，但如图 44 所示，如果 C18 不能进行有效分离，其它固定相也可以提供不同的选择性。在本例中，我们在含不同亚 2 μm 填料的快速分离高通量短柱上分离了心血管药物，使用含 70% 磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) 和 30% 乙腈的等度缓冲流动相。

虽然，所有色谱柱都使样品中的 5 种药物得到了完全或部分分离，但 SB-CN 柱不仅分离度足够，而且分离速度最快。

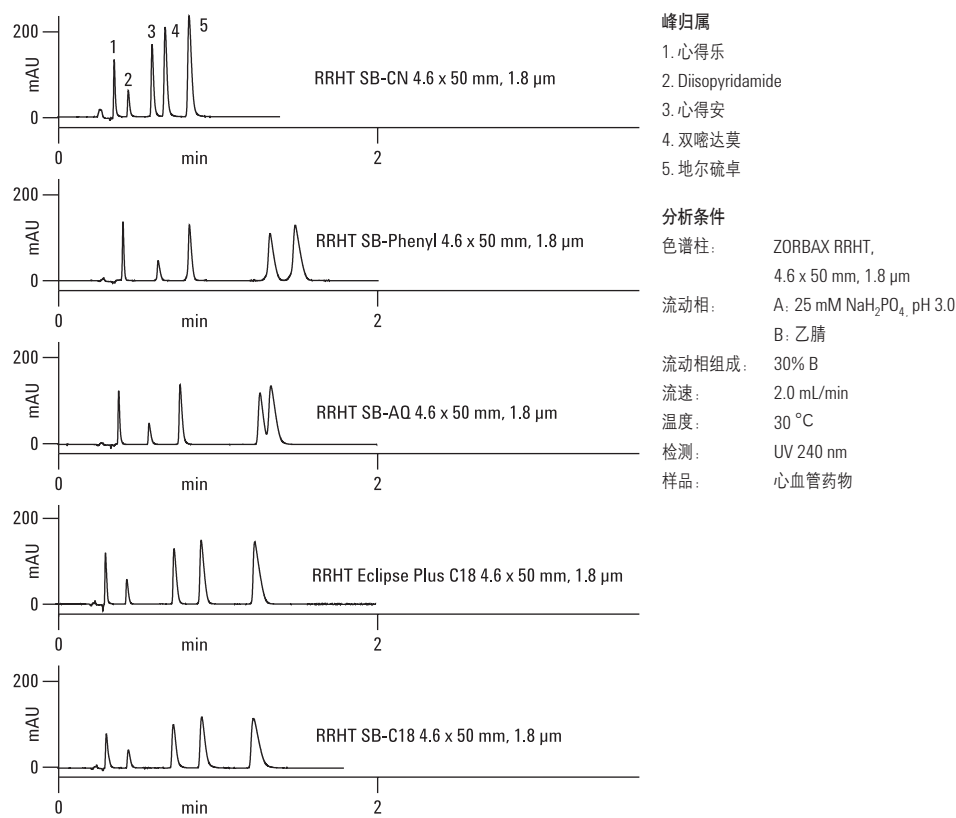


图 44. 反相色谱中键合相的选择性差异

原则上，应该选择符合样品需求的固定相。疏水性小分子应首选较长链烷烃键合相，如 C18。如果在 C18 固定相上保留过强，再选择较短链的 C8 或 C3 固定相。C8 固定相与 C18 具有相似的选择性，但保留稍弱。对于疏水性很强的分子，最好使用短链固定相，如 C3。如果待分析物分子具有芳香结构，在烷烃固定相上不能完全分离，可以使用芳香键合相，如苯基或二苯基。在本例中，目标分析物具有强极性，在一般的反相色谱填料上不保留或保留很弱，可以考虑换一种 HPLC 分离模式，用亲水相互作用色谱 (HILIC) (参见 92 页的 HILIC 部分)。如果在方法开发过程中，必须使用高 pH 条件，就要选择为高 pH 下操作而设计的固定相，如 Extend-C18，或聚合物固定相，如 PLRP-S。短链固定相在高 pH 值下不稳定，可能发生硅胶溶解。

反相色谱流动相的选择

一般来说，反相 LC 的流动相包括水和作为改性剂的乙腈或甲醇。不太常用的改性剂还有四氢呋喃 (THF) 和异丙醇。我们建议一定要使用色谱级以上的溶剂和改性剂。对于 UHPLC，安捷伦建议只使用 LC/MS 级以上的溶剂。选择性差异和样品的保留都会因流动相不同而明显改变。样品溶解度也很可能不同，需要使用特殊的溶剂或多种溶剂。

在反相色谱中，流动相中水相的 pH 和离子强度在开发对条件微小变化不敏感的耐用方法中非常重要。对于离子型化合物，典型样品的保留随 pH 改变而明显变化。在这类反相系统中，控制 pH 对于保留和选择性的稳定非常重要。通常在 pH 2 到 4 条件下，保留时间对 pH 的微小改变稳定性最高，因此建议将这一 pH 范围作为大多数样品方法开发的起始 pH，包括碱性化合物和一般的弱酸。考虑到重现性，所用的 pH 应高于或低于待分离溶质 pK_a 或 pK_b 上下一个 pH 单位。

您可能不清楚分析物的 pK_a ，因此，测试一种以上流动相 pH 可提供最好结果。大多数反相柱都可以在 pH 2-8 条件下使用，为您的分离选择最佳流动相 pH 提供了较宽的范围。请注意，测定流动相 pH 时，要在水相与有机改性剂混合之前在水相中进行测定，以确保得到准确而可重复的结果。

流动相操作

当您开始启用刚从包装盒中取出的新柱时，只能使用与柱内装运溶剂兼容的溶剂。为防止缓冲液在色谱柱内沉淀，反相操作时不能将缓冲液泵入用 100% 有机溶剂装运的色谱柱。我们的建议是，先用不含缓冲液的流动相平衡色谱柱，然后再用含缓冲液的流动相平衡。氰基和氨基柱都可以使用正相溶剂，也可以使用反相溶剂，因此，在平衡前需要检查您的溶剂是否与装运溶剂混溶。如果想把一根正相柱变为反相柱，要先用彼此混溶的溶剂冲洗，如异丙醇。然后再用您的流动相平衡。溶剂的混溶性图表见有用的参考资料一章。

请注意，流动相是可能使 HPLC 柱产生问题的潜在来源。为避免这些问题，请查看 134 页参考资料一章中的常用溶剂性质及混溶性信息。

流动相和流动相改性剂问题排查

在图 45 的实例中，开始在一根较旧的色谱柱（柱 1）上进行分析，性能尚可。但色谱操作者改用一根新柱（柱 2）进行分离，关键组分的分离度明显变差，于是便认为新柱“较差”。当色谱操作者用新配制的流动相缓冲液进行分析时，分离度又恢复了正常，见右侧的色谱图。在本例中，问题就出在溶剂瓶中“坏了”的 TFA 或磷酸上。这些溶剂使用了一段时间后，已产生了变化或被污染。在下一章中，我们还将讨论更多使用缓冲液或流动相改性剂方面的问题。

使用与流动相相同的溶剂进行样品配置非常重要。从 30 页的例子中可以看出，当进样溶剂比流动相强时，可能出现峰变宽或分裂。

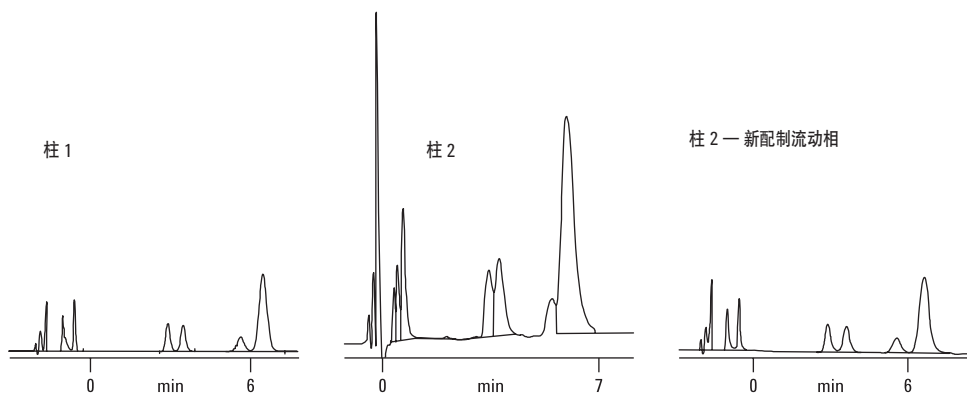


图 45. 流动相的变化可能对结果有显著影响

流动相混合

有时，流动相会因为实验室中的混合方式而不同。例如，如果要配制甲醇/水 = 50/50 的混合溶剂，应先量取各自的体积，分别置于洁净的玻璃容器中，然后再将其混合，因为甲醇和水混合溶剂的总体积大于各自体积之和。如果在同一个容器中混合，混合溶剂的总体积就会不同。因此，这两份以不同方式配制的流动相组成存在差异。

流动相脱气

流动相脱气也很重要。在流路中，溶解在溶剂中的气体可能逸出，形成气泡，并有可能干扰泵或检测器的性能。

幸运的是，现在大多数液相色谱系统都配备在线脱气机，但如果脱气机被设为旁路，没有脱气机或不能正常工作，一定要通氮气，或用其它方法脱气。

用流动相改性剂控制 pH

流动相 pH 对色谱分离的影响有多种方式。根据您所分析的化合物，pH 可能影响选择性、峰形和保留。如果是非极性较强或中性的化合物，pH 对分离度和保留的影响一般不明显。

图 46 显示了一个 pH 是如何影响分离度的简单实例。左侧，是一个分别在 pH 3 和 7 条件下分离的非极性样品的例子。请注意，两张色谱图没有区别。

可以看出，中间的极性化合物在 C18 柱上保留较弱。请注意，pH 对两个化合物的保留时间和峰形几乎没有影响。

如果是可离子化的化合物，如酸或碱，可以看出保留因子和选择性随 pH 改变变化非常明显。请看右侧中苯甲酸和苯酞苯胺的例子，保留因子随 pH 改变而变化。苯酞苯胺是中性化合物，保留几乎不变，而苯甲酸的保留在 pH 从 3 变为 7 时变化非常明显。在 pH 7 条件下，大大高于苯甲酸的 pK_a ，苯甲酸是以阴离子的形式存在。这种偏离子形态与水相流动相的亲水性较好，比 pH 3 时从色谱柱中洗脱更快，在 pH 3 条件下，其主要是以离子抑制形式存在。

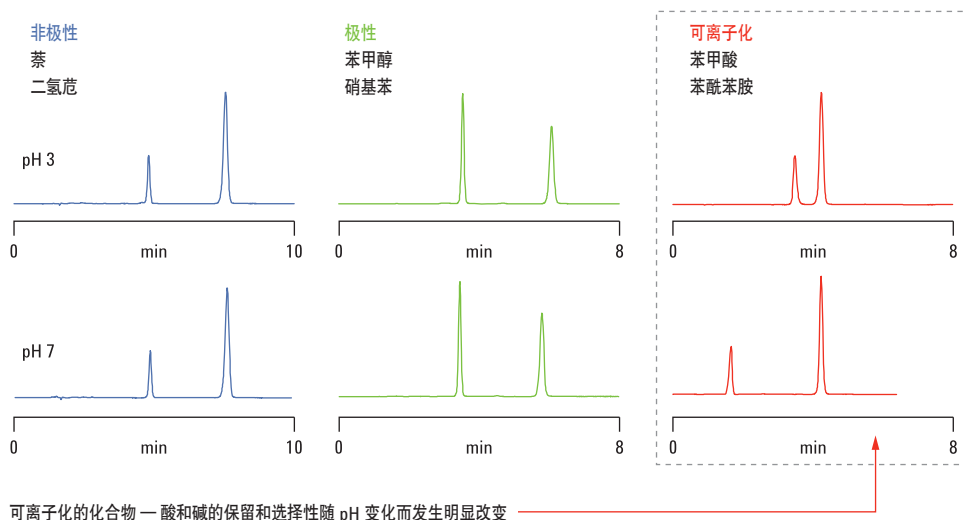


图 46. pH 与分离度

在开发可离子化分析物的分析方法时，重要的是要清楚非离子化形态的分析物比离子化形态的分析物保留更好。

如果是酸性分析物，应选择低 pH 缓冲液流动相，以防止分析物离子化。了解分析物的 pK_a ，才能够有效地选择流动相 pH。缓冲范围应在其缓冲液离子 pK 值的 ± 1 pH 单位，使流动相的优化具有一定的灵活性。例如，醋酸盐的 pK_a 为 4.8，缓冲范围从 pH 3.8-5.8。甲酸盐的酸性较大，缓冲范围为 pH 2.8-4.8。如果您的酸性分析物在低 pH 下不能发生离子化，还可以选择其它缓冲液。如需了解有关缓冲液的更多信息，可参见 137 页上的图表。

对于碱性化合物而言，在高 pH 条件下才能得到其非离子化形态，但这对色谱柱不利。但许多碱性化合物在低 pH 条件下的保留就已经足够了。因此，虽然非离子化形态能得到更高的保留，但这与所有的碱性化合物并不是实用和必要的。

*一般而言，“非离子化”一词可与“离子抑制”一词互换

另一个影响酸性和碱性化合物保留的问题是在中性 pH 条件下硅胶表面的硅醇基可能发生离子化。通常，这些硅醇基都发生去质子化，带负电荷。从而使带正电荷的碱性离子保留更强。这会导致离子交换相互作用，一种次级相互作用。由于与反相柱之间发生了相互作用而不是分配，导致峰展宽或峰拖尾。这种情况在低 pH 条件下不会发生，这也是反相色谱中酸性流动相更适合分离离子型化合物的另一个原因。

缓冲液选择要点：

- 成功的 HPLC 分离不必完全抑制离子化 — 通常，在流动相缓冲容量足够的情况下，90% 的抑制即可
- 流动相的缓冲容量与配制的摩尔浓度，以及洗脱液的 pH 与缓冲离子 pK 的接近程度有关
- 通常在高于或低于缓冲离子 pK 1 个 pH 单位内，可以起到缓冲效果。常用缓冲液 pK 和 pH 范围参见参考资料一章第 110 页上的图表
- 色谱操作者也可以选择非缓冲的流动相进行 pH 调节。这对于酸性分析物而言也不是不常用的，用单一的酸溶液进行色谱分离，酸的浓度应足以使 pH 比需要值低得多
- 对于碱性物质的分离，选择是比较有限的。TEA（三乙胺）不能完全溶于水，而且 pK (11) 很高，氨本身可以完全溶于水，但对大多数色谱柱来说 pK 值过高

UV 检测器常用的缓冲液

缓冲液的选择对检测方式有很大影响。对于使用 UV 检测器的色谱操作者来说，在目标波长下缓冲液应完全透光。缓冲液的 UV 截止波长最好低于 220 nm。许多常用的缓冲液都符合 UV 透光率的要求，尤其是色谱级或以上的缓冲液。例如，磷酸及其盐类具有良好的低 UV 透光率，和乙腈一起，成为许多方法开发工作者的首选。对碱的分离，可以选择 TEA-磷酸盐。磷酸盐在有机相比比例高的溶剂中溶解度较低，针对这一缺陷，建议磷酸盐缓冲液与有机溶剂混合时，有机相不要超过 70%。所幸这些需要离子化控制的化合物通常极性都较强，不需要用高比例有机溶剂对其进行洗脱，甚至在其离子抑制状态。醋酸盐正如甲酸盐和 TEA 一样，在 240 nm 以下波长都有 UV 背景吸收，很难在 210 nm 以下达到有效使用浓度。由于方法开发工作者都依赖于 UV 检测，通常是从低 UV 波长开始获取 2D 通道和 3D 光谱图，所以乙腈/磷酸盐组合可以满足方法开发的许多需要。

提示：在参考资料一章，第 137 页，我们用列出了常用流动相改性剂的 UV 截止表。随着波长降低，逐渐接近改性剂的 UV 截止波长，您将会发现检测方面的问题。

LC/MS 的考虑因素

当使用质谱检测器，LC/MS 离子源时，极其重要的一点是流动相中不能含非挥发性物质，有时甚至样品中也不能有，这样做是因为某些物质会在离子源中变干，可以防止流动相雾化时污染离子源。例如，溶剂前沿中有一定量样品基质中的无机盐，可能进入离子源。由于用 LC/UV 进行的方法开发可能以后还需要应用于 LC/MS，所以许多工作者不再使用磷酸、磷酸盐、不挥发的反离子，以及在离子源中可造成离子抑制的挥发性改性剂（TFA 和 TEA 就是最常见的例子）。

因此，如今的趋势是使用甲酸盐和醋酸盐，及其挥发性铵盐，成为主要的离子改性剂。虽然它们能完全溶解于有机溶剂，具有挥发性和高色谱级或质谱级纯度，但却不能在低波长下使用光学检测器（UV 或二极管阵列 UV）。改性剂必须加入水相和有机相中，有机相中改性剂的浓度略低（通常为水相中浓度的 85%），因为有机溶剂的吸收性质不同。另外，ELSD（蒸发光散射检测器）也需要完全挥发的流动相，可以代替 UV 和/或 RID（示差折光检测器）进行许多分析，不再使用常用的前-MS 改性剂。

浓缩试剂	分子量 ¹	密度	大致强度 ²	摩尔浓度 (M)	当量浓度 (N)	配制 1000 mL 溶液需要的体积 ³ (mL)	
						1 M	1 N
醋酸 (CH ₃ COOH)	60.062	1.05	99.8%	17.4	17.4	57.5	57.5
甲酸 (HCOOH)	46.026	1.13	90%	23.6	23.6	42.5	42.5
氢氧化铵 (NH ₄ OH)	35.046	0.90	56.5% ⁴	14.5	14.5	69	69

- 1. 基于原子量表 (32 °C = 12)
- 2. 代表值，w/w%.
- 3. 精确到 0.5 mL
- 4. 相当于 28.0% w/w NH₃

表 8. 用于 LC/MS 的流动相改性剂



图 47. 注射式过滤器

有关 pH 的几点注意事项：

- 离子抑制形态下的分析物具有更好的保留（例如，低 pH 下的酸和高 pH 下的碱）
- 在中性和较高 pH 下，硅胶上的硅醇基发生离子化，增加了碱性分析物的保留（例如，可能发生离子交换相互作用）
- 在方法开发过程中，可选择流动相 pH 对保留和选择性进行优化
- 为延长柱寿命，避免使用极端 pH 值——极高或极低。可以使用缓冲液帮助调节 pH 值。缓冲液可以保持 pH 不变，提高重现性
- 选择流动相改性剂时，一定要考虑检测器。与 UV 检测器匹配良好的改性剂不一定与 MS 检测器兼容
- Eclipse Plus 可在宽 pH 范围 (pH 2-9) 内使用
- 其它选择包括，高 pH (Poroshell HPH, Extend-C18, 聚合物型固定相) 和低 pH (StableBond 和聚合物型固定相)

当混合醋酸三乙胺或磷酸三乙胺时，应先加入磷酸盐或醋酸盐，然后再加入三乙胺，因为纯三乙胺可能不溶于水。

混合缓冲液的良好习惯：

1. 使用正常工作的 pH 计。按照目标 pH 值校正 pH 计。用 pH 计对 pH 进行可靠的测量非常重要
2. 确保试剂尽可能新鲜
3. 先把固体溶解在非常接近终体积的液体中。调节 pH 到目标值后，再添加液体使溶液达到目标体积
4. pH 调节应在加入有机溶剂之前的水相中进行，加入有机溶剂后再测 pH 不可靠
5. 缓冲液配制完成后，在 HPLC 系统上使用之前要进行过滤，去除水或盐中可能存在的颗粒。大多数 HPLC 应用都使用 0.45 μm 滤膜，UHPLC 则使用 0.22 μm 滤膜

提示：某些盐，如醋酸铵和甲酸铵，吸湿性较强，如果将其长期放在试剂架上，开瓶并使用较长时间后，将吸收水分。所以，在方法开始时最好实验确定这些盐的不同摩尔浓度，确保方法对这类不可避免的波动具有足够的耐受性。

流动相改性剂问题排查

可尝试改变流动相 pH 以确定峰形或保留的问题是否是次级相互作用造成的。添加三氟醋酸 (TFA) 会有帮助, 但请记住, 混合溶剂中多加任何成分都可能增加出错机率。在添加前应先尝试使用低 pH。使用 pH 改性流动相出发点的关键是“保持简单”。

大家喜欢用乙腈的原因之一是乙腈具有低 UV 截止波长 — 190 nm — 而甲醇是 205 nm, THF 是 212 nm。实际上 THF 在 215 nm 处已具有较强的吸收, 很难在梯度中使用。(注意, 不含氧的新鲜 THF 很好, 但很难保持。开瓶一段 UV 吸收极易升高)。根据您采用的梯度范围, THF 的吸收波动可能高达 2 AU。但在较高的波长下, 如 254 nm, 将不会发生这一问题。

认真考虑溶剂的选择和改性剂非常重要。1% 醋酸的 UV 截止波长是 230 nm, 0.1% TFA 是 205 nm。更多信息可参见第 5 页的色谱基本概念。

过去, 许多色谱操作者都使用磷酸盐缓冲液或稀磷酸。无论在酸性还是在中性 pH 条件下, 都有非常好的 UV 透光率。但是磷酸盐可能发生溶解度问题, 而且是非挥发性的, 因此并不适合在质谱中使用。使用磷酸盐缓冲液时应避免浓度超过 25-50 mM, 特别是在有机相比例较高的流动相中, 否则可能发生沉淀。

在流动相 A 和 B 中最好含有同样浓度的缓冲液或改性剂。换言之, 在梯度洗脱过程中, 只有有机相溶剂浓度发生改变才能得到最好的色谱结果。当然, 也有例外。有时您可能不需要使用缓冲液, 磷酸就足够了。

问题排查实例: 基线漂移

对某些流动相来说, 改性剂在水中的吸收与在乙腈中不同, 当进行梯度洗脱时可能出现漂移 (图 48), TFA 就是这种情况。使用 TFA 时, 可尝试在溶剂 A 中使用 0.1% TFA, 而在溶剂 B 中使用 0.09% 左右的 TFA。

在图 49 中, 流动相 A 和 B 中都含有 0.1% TFA 时, 用 215 nm 检测, 进行梯度洗脱时基线向上漂移。如果降低 B 中的 TFA 浓度, 如 0.09%, 可以使基线平稳, 从而解决了这一问题。使用较高波长, 如 254 nm, 也可以解决这个问题, 但基于检测能力方面的原因, 有时不能采用。

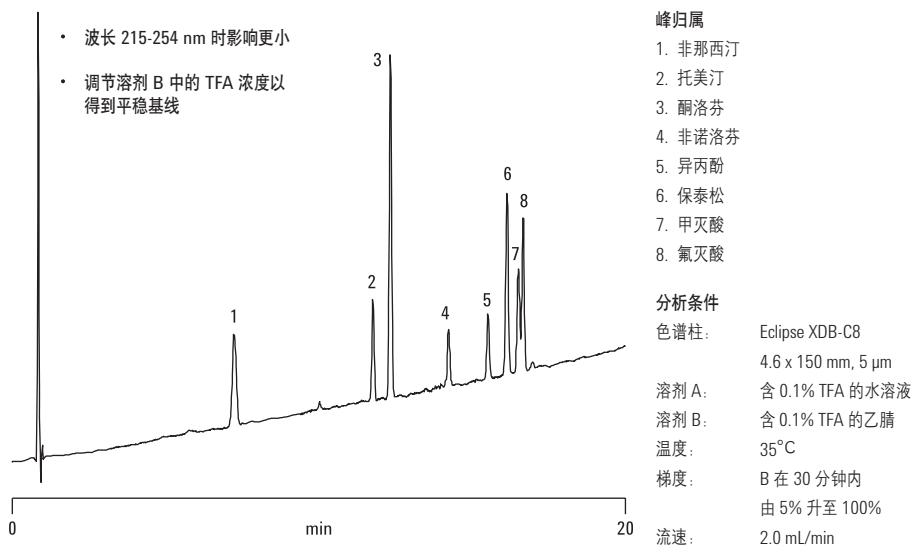


图 48. TFA 对基线的影响

这张色谱图（图 49）显示的是我们期望的状态 — 良好平稳的基线。注意，这是与图 48 中实例不同的分析。

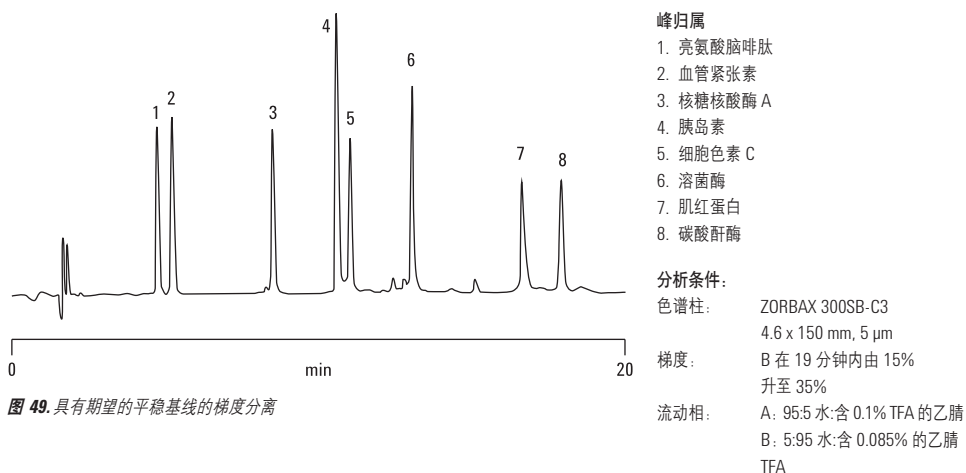


图 49. 具有期望的平稳基线的梯度分离

这里显示的是对不同分子量的多肽/蛋白进行的典型梯度洗脱。我们在流动相 A 中加入了 0.1% TFA，B 中加入了 0.085%。结果得到了平稳的基线，不仅结果更好，而且有助于积分。

在基线漂移可以忽略不计的情况下，如果色谱峰大小合适，就可以进行精确积分了。

问题排查实例：高 pH 造成的峰展宽和峰分裂

在图 50 中，可以看到用 ZORBAX StableBond 柱（不是为在高 pH 下使用而设计的）得到的两个截然不同的结果。色谱操作者配制了含 0.2% TEA 的流动相，但却忘记了将 pH 调低，因此其流动相实际上 pH 高达 11。他开始过夜连续运行直到第二天，进样 30 次后得到右侧的色谱图。pH 11 使硅胶发生溶解，并形成死体积，从而造成灾难性的峰展宽。只能换新柱了。

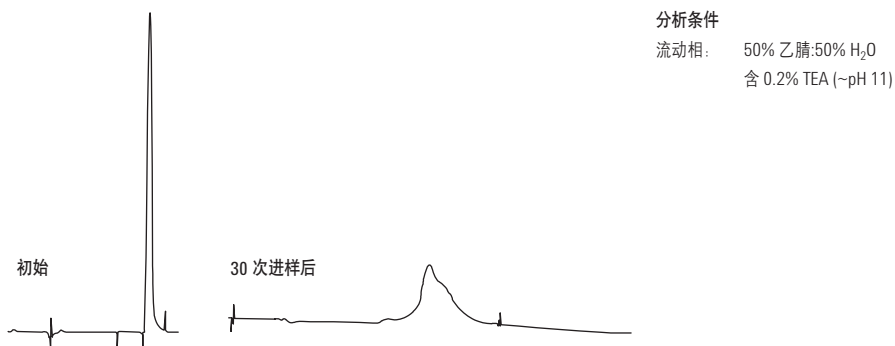


图 50. 在高 pH 下使用硅胶柱的后果

因此，由于 pH 对保留和柱均一性都有很大影响，应该将其作为方法开发的重要参数。我们建议使用缓冲液，以控制 pH 值并使其保持稳定。

问题排查实例：流动相改性剂和选择性

选择流动相改性剂或缓冲液时，要确保其处于缓冲范围内。应查看缓冲液的有效范围，然后应用这一范围——通常，比缓冲液的 pK 值高或低 1 个 pH 单位。典型缓冲范围见参考资料后的图表。

让我们来看一些低 pH 下方法开发的实例（图 51）。该例使用 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱，在低 pH 条件下进行分离。我们可以使用缓冲液也可以用弱酸溶液作为流动相，同时我们可以通过调节有机相的百分比调节色谱峰保留。

中性 pH (~4-7) 具有更好的选择性，可能与您的样品兼容性更强。中性 pH 条件下的方法开发过程与低 pH 相同。Eclipse Plus 柱在中性 pH 下具有卓越性能。如果需要改善选择性的话也可以使用其他键合相。

Eclipse Plus 柱是方法开发的理想选择。它拥有 pH 2-9 这一极宽的 pH 范围，适用于在低和中性 pH 范围内进行方法开发。可提供良好的峰形和柱效。

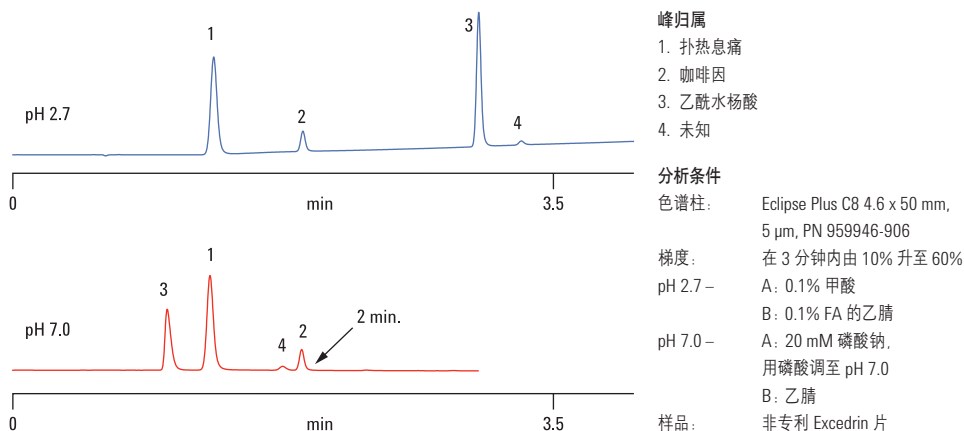


图 51. pH 2 和 pH 7 条件下的选择性具有很大差异

如果您在中性 pH 范围内仍不能得到满意的分离度，还可以考虑尝试更高 pH。这是因为有时在低 pH 和中性 pH 条件下的分离效果不佳，不能得到您希望的保留。在高 pH 条件下对碱性化合物进行离子抑制形态下的分析，可以增加其保留还可以提高选择性。

ZORBAX Extend-C18 是一款双配位色谱柱，能够耐受严苛的高流动相 pH 条件，Poroshell HPH-C18 和 HPH-C8 化学键合相是使用专利工艺对 Poroshell 120 填料颗粒进行化学改性而制得，提高了它们的 pH 稳定性。ZORBAX 和 Poroshell 色谱柱均可用于 pH 高达 11 的条件，Poroshell HPH 还具有出色的使用寿命。和在低 pH 下进行方法开发一样，可以调节有机改性剂浓度对分离度进行优化。下面我们将更为深入地讨论我们提出的反相色谱方法开发流程。

低 pH < 3	中性 pH 7	高 pH > 9
A 区	B 区	C 区
方法开发从低 pH 开始，此时反相 HPLC 柱上的硅醇基发生质子化，通过消除硅醇基/碱的相互作用最大限度地减少了峰拖尾现象	在至少高于或低于其 pK_a 1 个 pH 单位的条件下进行方法开发，这样可以把 pH 略有变化时对保留的影响降至最低	碱性化合物可能以其游离碱的形态存在
在低 pH 条件下，碱性化合物带正电荷，其保留可能减弱	在 pH 4 到 5 以上时，部分硅胶表面 $SiOH$ 基团变为 SiO^- ，导致峰拖尾的相互作用可能存在	可能增加碱性化合物的保留和分离度
酸性化合物发生质子化，保留增加	选择设计良好的封端色谱柱，用 TEA（三乙胺）等添加剂或使用“极性-交联”键合相，可最大限度地减少相互作用	在这一区域保留基本不变，可开发耐用的方法
pH 略有变化时保留时间通常很稳定，可以开发耐用的方法	通过采用创新的键合化学、坚实封端，并使用酸性更低的高纯度硅胶，降低了金属含量 (Rx-SiL)，避免了硅胶的断裂	通过采用创新的双配位柱化学、坚实封端、使用 Rx-SiL，并优化流动相，避免了硅胶的断裂
挥发性流动相添加剂，如甲酸或 TFA，常用于 pH 条件的 LC/MS 分析		氢氧化铵是高 pH 下良好的挥发性流动相改性剂

表 9. 使用硅胶柱在不同 pH 条件下的方法开发

优化反相色谱条件

在确定了色谱柱规格、合适的固定相柱填料、流动相溶剂和改性剂后，即可开始优化方法。方法的优化是根据最终目标决定的。如果要开发质量控制方法，您可能会需要像等度分离这种可变因素较少的方法。如果目标是得到最高分离度，节省分析时间并不是首要问题，可以选择长柱使所有组分都得到最大分离度。如果分离速度很重要，则应使用短柱和高流速。对于含许多保留不同的目标化合物的复杂样品，用等度分离可能不能解决问题，应开发并优化梯度方法。

下面我们要讨论两种方法的条件优化：

- 1. 等度（流动相组成不变）
- 2. 梯度（流动相强度随时间变化）

在我们的讨论中，主要涉及二元溶剂系统，但同样的方法也可以用于三元或四元流动相系统中。我们按约定俗成将水相溶剂和反相色谱中较弱的溶剂称为流动相“A”，“B”溶剂是有相组成较高和较强的溶剂。在反相色谱模式中，当增加B的百分比时，通常保留将减少。请注意，在还没有开发出样品的实际分析方法前，大部分人开发 HPLC 方法都是采用“反复实验”的方法，即，尝试各种不同流动相条件，以找出最佳条件。

等度优化

等度优化的一般方法是不断改变流动相强度 (% B)，直到获得适当的保留范围。这种方法有时也称为“溶剂筛查”。对于简单的分离， k 值应在 1 到 10 之间。如果 k 值太低（比如， < 1 ），早洗脱的色谱峰可能不发生保留峰或融入基质组分，因此对其进行定量将非常困难而且不可重复。另外，低 k 值峰受柱外效应影响很大，可能会使峰展宽。如果 k 值太大（比如， > 10 ），分析时间将变得过长，检测限会因峰展宽而提高。

对于反相色谱中的等度方法开发是从流动相有机改性剂最高比例开始，然后逐渐降低。在降低流动相强度之前，先要确定所有组分都已从柱中洗出。如果组分保留在色谱柱中，以后可能在 B 相比比例较低的流动相中洗脱，成为无法解释的“鬼峰”。通常，流动相以 $\pm 10\%$ （如，90% B、80% B、70% B 等）或 $\pm 20\%$ 的幅度改变。利用一些现代软件（如，ChromSword 的 ChromSword，ACD 的 AutoChrom），显示保留变化曲线，系统进行自动调节，更快得到优化条件。当接近最佳等度条件时，进行手动调节，幅度应减为 5% 或 3%。

请注意，如果流动相“A”中含高浓度缓冲液（比如，大于 25 mM），则不能使用 100% 的 B，因为当两种溶剂系统开始混合，随着 B 相百分比的减少，可能发生沉淀。

一旦建立优化条件，如果目标还没有得到完全分离，则需继续提高选择性 (α)。如需分离两个相邻的色谱峰会涉及到许多实验参数的调节。温度可以作为一个变量。大多数现代仪器都具有某种类型的柱温控制器，大部分反相柱可以承受高达 60 °C 的温度，有些甚至更高。一般来说，升高温度可以缩短所有峰的保留时间，但对有些峰的影响可能与对其它峰不同，从而导致选择性发生变化。

其它用于改变选择性的变量如下：

1. pH（对于可离子化的化合物）
2. 缓冲液（离子）强度
3. 缓冲液类型（比如，磷酸盐、醋酸盐或甲酸盐，取决于需要的 pH 范围）
4. 流动相有机改性剂（比如，从乙腈变为甲醇或两者的混合液；可使用三元和四元流动相混合溶剂）
5. 流速（一般而言，由于提高了柱效，较低的流速可能对分离略有改善，但也有例外——见下面的提示）
6. 离子对试剂浓度（如果使用离子对 RPC）

如果调节这些参数还不能改善分离，那么最好的解决办法就是改变色谱柱或固定相。更长的色谱柱具有更多塔板数，因此有助于分离，但切记，分离度只能增加长度的平方根。柱长加倍使分析时间和溶剂消耗加倍，而灵敏度降低，但只能使分离度提高约 40%。改用较小粒度色谱柱也能增加塔板数，但柱压上升 $1/d_p^2$ 。使用新的固定相（如 C18 换成苯基柱）需要进行一套新的溶剂筛选实验，耗费更多时间，但可能得到最佳的分离结果。但需要额外购买具有不同固定相的反相柱。

随着粒径变小，最佳流速升高，用亚 2 μm 色谱柱时，流速可以比用常规柱优化分离时使用的流速更高。

让我们来看一个优化 5 组分简单样品最佳等度分离条件的筛选实验。图 52 显示了三张以 10% 幅度递增的色谱图——分别为 40%、30% 和 20% 有机相。高百分比有机相洗脱过快，在死体积内洗脱（未显示），而有机相低于 20% 则太费时（未显示）。30% 有机相时，5 个组分分离良好，且分析可迅速完成。如果需要，可在 30% 左右进行 1-2% 有机相比例的微调，以进一步优化分离。这些步骤未在这里显示。请注意进行这些实验时，所有其它条件不变，仅改变有机相百分比进行该等度方法优化即可。使用 Eclipse Plus C18 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 柱，所有实验均可快速进行，方法开发筛选过程高效率完成。

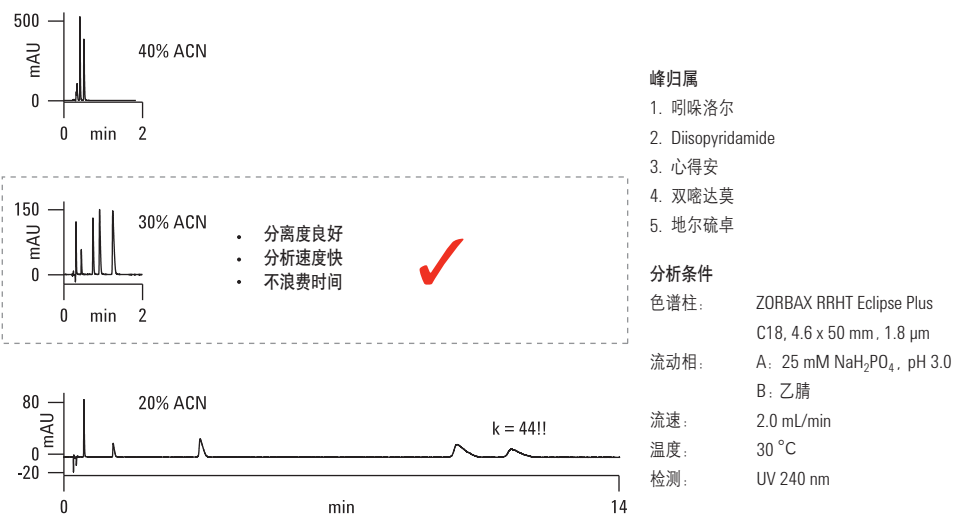


图 52. 通过调节有机改性剂比例对等度方法进行优化的实例

为了进一步说明优化得到更高分离度的方法，图 53 显示了使用不同固定相的对比。每一根色谱柱上都使用相同的最佳流动相，只是键合相不同。这个例子中，在传统的 C18 柱上没有得到最佳分离度，而改变固定相则达到了目的。这种方法有时称为“固定相筛选”，可以用一种或更多不同固定相完成。许多实验室都用液相色谱仪和 LC/MS 系统通过这种方式进行“无人值守”的方法开发，流动相不变，通过色谱柱选择阀，以等度或梯度洗脱开发或优化不同固定相的分离。

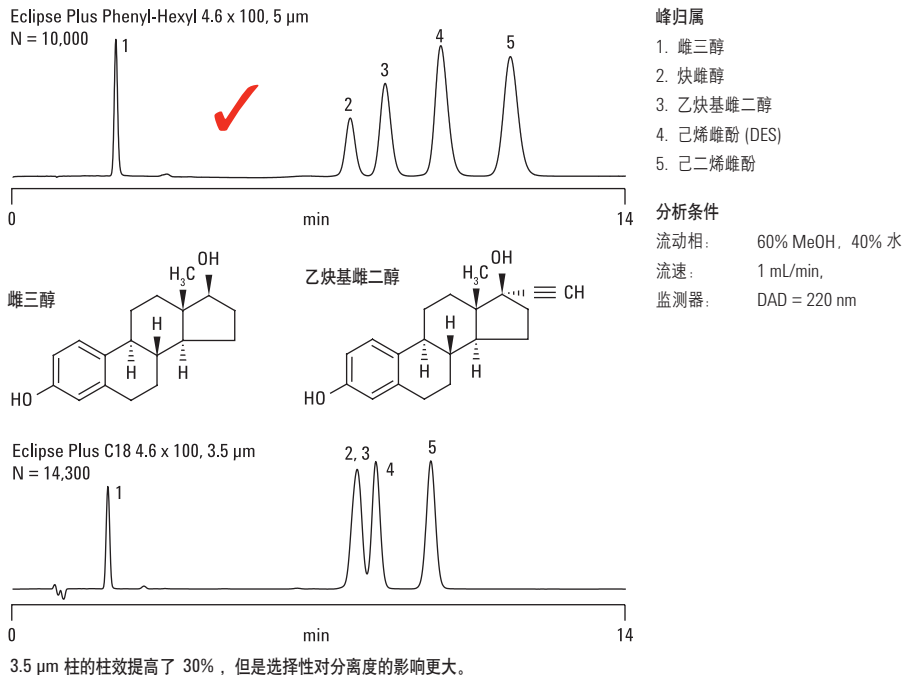


图 53. 等梯度方法的选择性筛选

梯度优化

对于含各种组分的样品混合物来说，选择单一流动相组分可能得不到满意的解决方案（比如，一般洗脱问题）。例如，某些样品组分，如强极性分析物，可能很快从反相柱上被洗脱下来，而疏水性组分可能在疏水性的 C8 或 C18 上吸附非常强，洗脱不下来。对这一问题的解决方案是随时间改变流动相组成（梯度洗脱）。在绝大多数例子中，初始流动相非常弱（比如，含水量高），随着时间的推移，有机溶剂的百分比通常是以线性形式增加（图 54）。

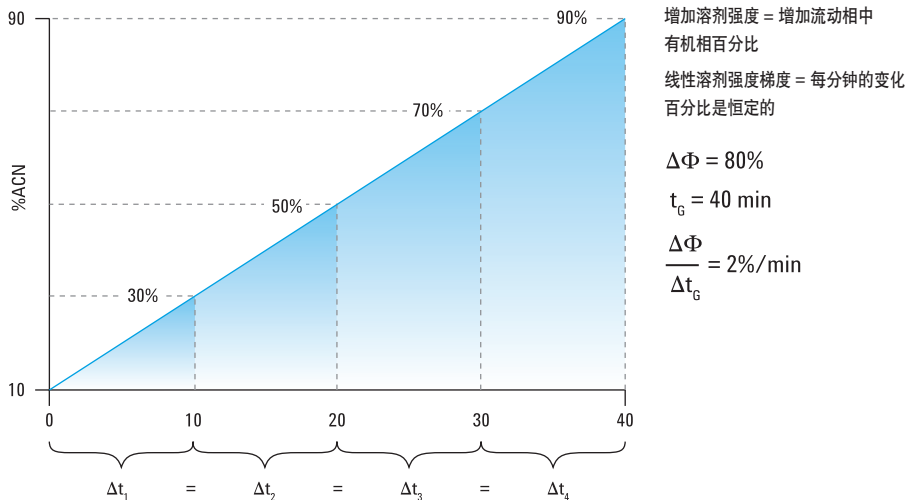


图 54. 梯度洗脱：在本例中，乙腈每十分钟升高 20%

两种情况下要使用梯度洗脱的方法开发过程。一种是用梯度预测反相分离的最佳起始等度条件。大多数方法开发软件（如，DryLab、ChromSword、AutoChrom）都具有这项功能，最少进行两次梯度分离，然后预测出最佳等度条件。接下来就可以用这些条件进一步进行等度分离优化了。

第二种情况是开发梯度方法，并使用了宽范围的快速梯度（比如，10 分钟内 B 由 5% 变到 95%），确定目标化合物的最佳梯度范围。实际上，某些软件系统可以通过色谱数据系统/控制器之间的相互作用来设置最佳梯度，对分离进行优化。但是，手动操作也可以完成同样的工作，找到目标峰洗脱的流动相比例，然后通过下一次梯度，调节 k^* （梯度等于 k ）范围，让梯度分离在合理的时间内完成。

然后，与等度优化一样，当分离时间合理后进行选择性的确定。

我们以一种相对复杂的含 10 种磺胺药物的混合物为例，简述优化过程，见图 55–57。首先，运行一个相对快速的宽范围梯度，如图 55 所示。这里我们运行的梯度是 B 在 20 分钟内从 8% 变到 90%，使用 250 mm 色谱柱。从这张初始色谱图上，我们可以得到以下信息。首先，12.5 分钟后再无色谱峰，说明 90% B 太强。还可以看出，峰 5 和峰 6、峰 7 和峰 8 这两对色谱峰没有分开。

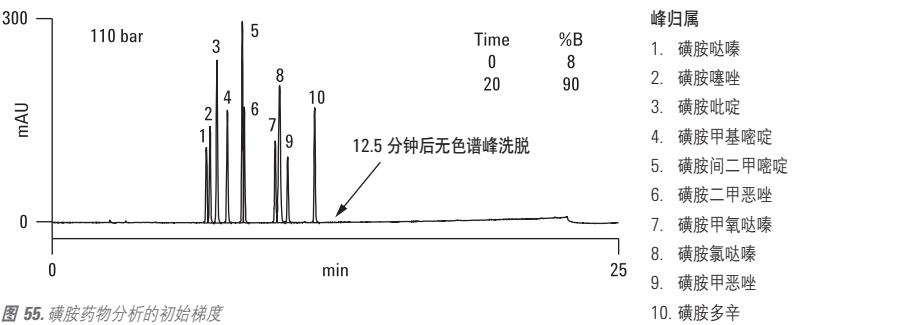


图 55. 磺胺药物分析的初始梯度

下一个步骤是缩小有机相范围，延长梯度时间，以增加梯度保留， k^* ，得到的优化分离结果见图 56。我们还采取了几个中间步骤（未显示）优化该梯度。剩下的事情就是调节梯度时间和 B 相百分比，直到获得最佳分离。

此时，10 种化合物都得到了基线分离，但分析时间是 30 分钟。考虑到柱规格和流速，我们可以对梯度方法进一步优化。切记，调节柱规格和流速时，需要对梯度进行相应调节，我们已在第一章，即 10 页讨论过。

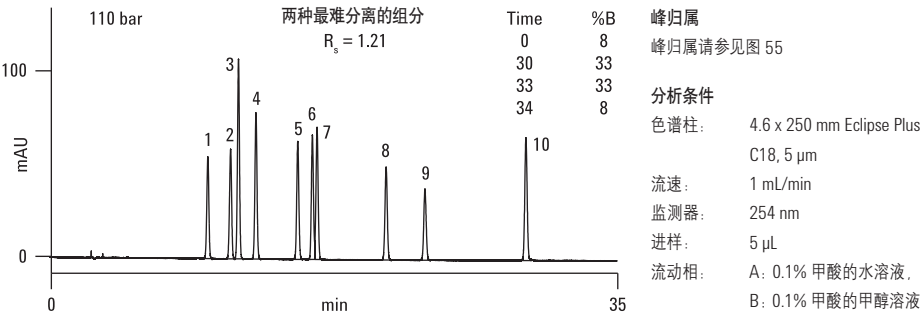


图 56. 对 250 mm 柱的梯度优化

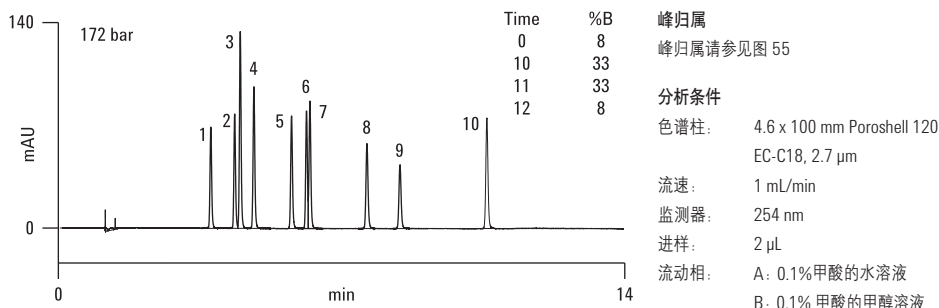


图 57. 从 250 mm 到 100 mm Poroshell 120 柱所进行的进样体积和梯度调节

本例中，我们使用的是 Poroshell 120 柱，柱长 100 mm，分析时间缩短到十几分钟，仍有良好的分离度。如果进一步优化流速，分析时间还可以再缩短。

用于反相色谱的聚合物色谱柱

聚合物柱在分析“复杂”样品时具有明显优势。其化学稳定性高并能在极端 pH 保持稳定。这类色谱柱由于其聚合物特性，没有反应位点，在极端 pH 环境下固定相不会发生溶解。

用聚合物柱进行反相梯度分离的一个良好起点是使用乙腈/水+ 0.1% TFA 流动相筛选梯度，比如，乙腈从 5% 升至 95%。然后再根据分析物的洗脱情况对梯度进行调节，改善所有组分的分离度。

聚合物填料可以使用酸性、中性和碱性洗脱液。例如，可以用乙腈洗脱剂在四种不同 pH 条件下筛选合成多肽的分离条件，包括 0.1% TFA、20 mM 醋酸铵 (pH 5.5)、20 mM 醋酸铵 (pH 9.5) 和 20 mM 氢氧化铵 (pH 10.5)。对于更复杂的样品，由于溶解度不够或共洗脱等问题，可能很难得到希望的纯度或回收率，或者都无法得到。多肽上的净电荷取决于缓冲液的 pH，在其等电点 (pI) 时净电荷为零。因此，在反相 HPLC 中，改变 pH 可改变样品及相关组分的净电荷，从而改变分离的保留和选择性。

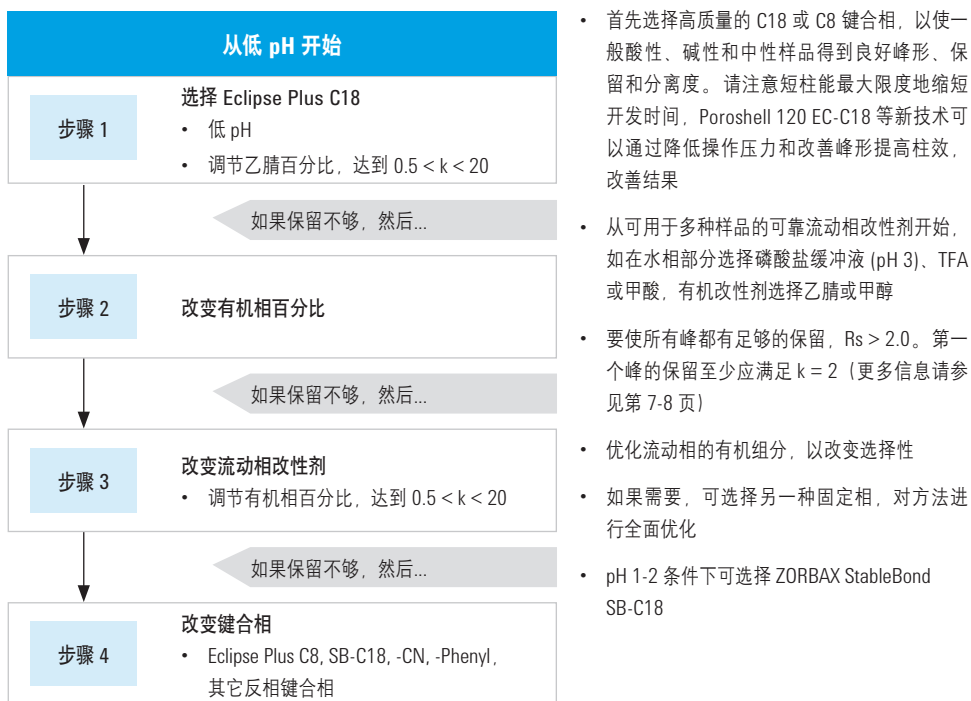
反相色谱的等度方法开发“上手”步骤指南

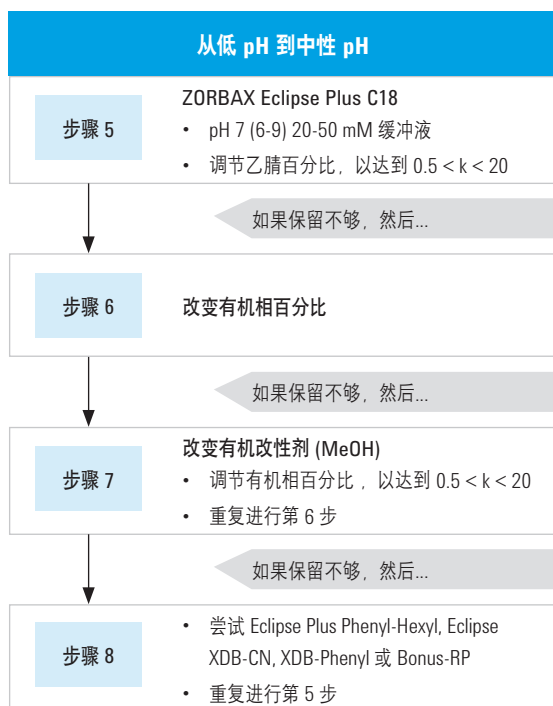
方法开发过程最常用的是“上手”法。图 58 列出了用这一方法进行方法开发的流程。在本方案中，可遵循首选的方法开发流程，选择合适的色谱柱或键合相。通过调节 pH 或尝试不同的有机改性剂对流动相进行改变。

也可以使用方法开发软件，进行一些实验性操作，对最佳方法进行预测。

可以选择用手动或自动方式对多种色谱柱或流动相进行评价。在本方案中，可以将几根不同色谱柱与不同流动相结合在一起，尝试不同组合。

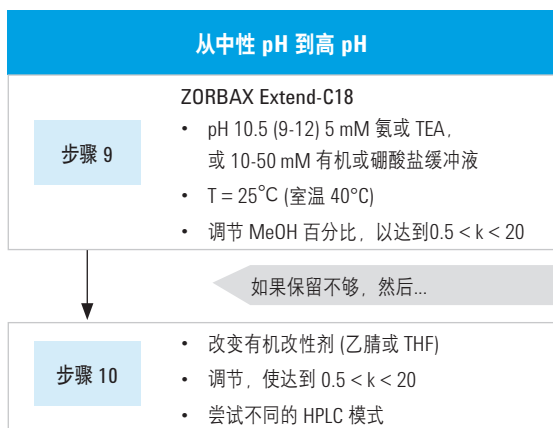
提示：ZORBAX Eclipse Plus 柱具有良好的耐用性和灵活性，可在宽 pH 范围内使用。





中性 pH 可提供更好的选择性:

- 可能与样品更加兼容
- 在中性 pH 条件下方法开发的过程与低 pH 相同
- ZORBAX Eclipse Plus 和 Poroshell 120 柱在中性 pH 下具有卓越性能
- 如果需要改善选择性, 也应考虑改变键合相, 同时选择适当的缓冲液 (在中性 pH 下使用醋酸铵或甲酸铵, 而在低 pH 下使用的是磷酸盐缓冲液、磷酸、甲酸或 TFA)



选择高 pH 的理由:

- 分析不带电荷的碱性化合物, 以增加其保留
- 提高选择性

图 58. 方法开发流程图

在高 pH 下使用缓冲液时应注意: 缓冲液可能吸收 CO_2 , 因碳酸盐的加入使 pH 发生变化 (取决于缓冲容量)。防止这一现象出现的唯一办法是给流动相瓶加盖, 使其隔绝空气, 或使用烧碱石棉捕集器。

从常规柱向高效柱进行方法转移的技巧

使用 UHPLC/快速 LC 和高效柱将帮助您提高分析速度和分离度。根据您使用的仪器配置，要使这类色谱柱最大限度地发挥作用，还需要对您所用的仪器进行一些调节。

Poroshell 120 柱填料外径为 2.7 μm ，是一种具有实心核和多孔外壳的表面多孔型填料。由于分析物在多孔外壳内外扩散速度更快，并具有非常均匀的填充柱床，所以这种色谱柱能在 2.7 μm 填料的柱压下提供与亚 2 μm 填料相媲美的柱效。最高耐压可达 600 bar，因此，Poroshell 120 柱可用于优化 UHPLC 性能。而亚 2 μm 柱则可以在高达 1300 bar 的压力下使用。

由于具有高柱效，洗脱速度相当快，峰形也很窄。现代 HPLC 仪器和数据系统可以应用这类填料的优势，但要注意，仪器配置对获得最佳结果非常重要。

这类色谱柱的选择性与其它相似固定相极为类似，所以可以很方便地进行方法转移，以获得优异的结果。您仅需注意的是如何对常规液相色谱仪进行优化。

方法转移步骤：

- **查阅仪器附带的说明书和仪器性能指标** – 确定仪器已针对高效色谱柱进行了配置。如果尚未进行配置，继续下一步
- **优化数据采集速率（采用快速响应时间的检测器采集频率至少 40 Hz）** – 使用 Poroshell 120 柱和更高流速，得到类似于亚 2 μm 柱所得的窄峰。将检测器设为最快采集速率，然后设为第二快采集速率，比较二者的分离度是否不同。更多信息参见第 47 页
- **使用半微量或微量流通池** – 安捷伦 1200 的标准流通池体积为 10 mm/13 μL （注意，并非所有检测器都用相同的流通池）。这可能会降低使用 Poroshell 120 柱所获得的性能。建议使用更小体积的流通池，如半微量（6 mm/5 μL ）或微量（3 mm/2 μL ）流通池，以获得最佳性能。通常，流通池越小，光程越短，可能降低 UV 方法的灵敏度。注意，某些低体积流通池就是通过缩短光程实现的，这将降低绝对峰高
- **最大限度减少仪器管线体积** – 用红色（0.12 mm 内径）管线代替绿色管线（0.17 mm 内径），因为可以使样品流经体积减少一半。这样就能降低柱外体积和峰带变宽。确保连接尽可能短（更多信息请参见第 40 页）。以下是 3 到 4 处可能需要您更换管线的地方，请注意所需要的连接管线长度：
 - 自动进样器针座
 - 自动进样器到柱温箱 – 或 “TCC”
 - TCC 到色谱柱
 - 色谱柱到流通池，包括一体式流通池入口毛细管的内径

如果您的方法不用升高柱温，可以采用快捷连接，自动进样器直接连接色谱柱，然后从色谱柱连接流通池，减少了柱外体积。根据分析化合物的具体情况，如果不控制温度，这种操作可能出现问题。所有特殊毛细管都可以按需要的长度单独从安捷伦订购。

- **注意接头连接** – 安捷伦建议使用带前后垫圈的 Swagelok 接头，该接头可使整个 LC 系统的密封性能最佳（在仪器连接处使用，比如，阀和加热器等）。在最高操作压力 600 bar 时，我们强烈推荐使用 A-line 接头。与 Poroshell 120 柱连接时使用这种接头（部件号 5042-8957）。更多接头的相关信息请参见第 27 页
- **优化流速** – 使用 Poroshell 120 柱时，如果您使用的柱内径为 2.1 mm，建议初始流速为 0.42 mL/min，对于 3.0 mm 内径的 Poroshell 120 柱，我们建议初始流速为 0.85 mL/min，对于 4.6 mm 内径色谱柱，我们建议初始流速为 2 mL/min

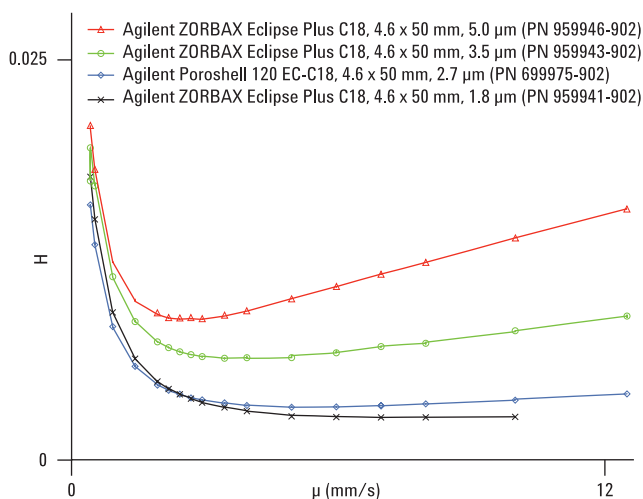


图 59. van Deemter 曲线重叠图: Poroshell 120 的最佳流速比 5 或 3.5 μm 柱更快

- **按比例调整梯度曲线和进样体积** – 如果用梯度洗脱优化色谱结果，您应确保针对新的较小色谱柱按比例正确调整梯度曲线和进样体积，以便进行快速方法转移并避免过载。安捷伦网站可提供免费的方法转移软件，帮助您选择正确条件（参见 140 页上的“其它安捷伦资源”）。对于等度和梯度洗脱，应确保按比例调整后的进样体积与整个色谱柱体积相匹配
- **最大限度地减少样品进样的柱扩散** – 应使用与流动相溶剂强度相当或更弱的进样溶剂，特别是在使用等度方法时。这对任何色谱柱都是良好的通行做法，对高效柱尤为重要

相关的步骤视频，请访问 www.agilent.com/chem/poroshell120video

自动化方法开发工具

许多实验室仍在使用手动或“上手”方法开发方法。但自动化方法有很多优势，有助于让 LC 方法开发更加轻松。新的方法开发软件，如安捷伦 1200 Infinity 系列多方法解决方案，为自动方法开发过程的许多步骤提供了特殊硬件和专用的软件解决方案。



Agilent 1200 Infinity 系列多方法解决方案

The 1290 Infinity II LC 的流量和压力范围较宽。再加上较小的梯度延迟体积，有利于开发其它 HPLC 或 UHPLC 系统的方法。根据分离的复杂性，可在软件输入不同需要以支持不同的实验设置。新软件，如安捷伦化学工作站方法筛选向导，可提供工具用于设定序列和全部方法，以便色谱柱、溶剂、梯度和温度多维筛选实验的完成。

Agilent 1290 Infinity II 最多可使用三个 TCC 模块，而无需考虑系统使用的是 1260 Infinity 还是 1290 Infinity 模块。快速更换阀可让用户方便地操作毛细管接头，有助于直接安装和维护。

系统概况

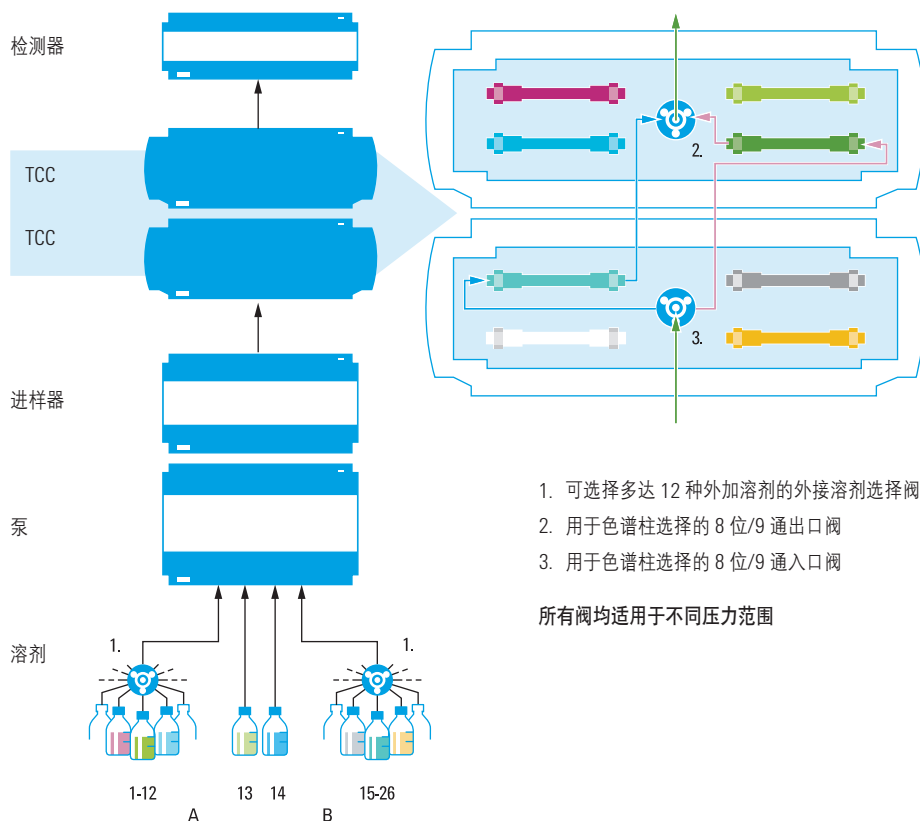


图 60. 灵活的自动化方法开发

用一个或两个外接 12 通道选择阀可以扩展溶剂数量。用户可以从计算机屏幕上的列表中选择其溶剂，实现自动化。用阀安装辅助程序和管线工具包可实现有条不紊的优化设置。使用系统中的二元泵，可实现多达 169 种二元溶剂组合。四元泵可多达 193 种组合。安装 8 根色谱柱时，可全自动筛选 1000 多种独特的分离条件。在安捷伦系统上可以使用各种规格的分析柱。

提示：如需了解自动化方法开发解决方案的更多信息，请在安捷伦网站上搜寻出版物 5990-6226EN。

其它 HPLC 模式的方法开发

HILIC

亲水相互作用液相色谱 (HILIC) – 有时也被称为“水相正相” (ANP) – 是一项已发展了数十年的技术。由于这项技术能够对反相柱上不保留或保留较差的极性化合物进行分析, 近年来又重新受到了重视。而且, 这项技术很容易与 MS 和 MS/MS 检测技术兼容。当 HILIC 分离使用高有机相流动相时, 与水相缓冲系统相比由于具有较低的离子抑制, 从而提高了 MS 灵敏度。

HILIC 使用极性固定相, 如硅胶、氨基、混合模式、两性离子等, 以及水溶性的、非极性流动相, 由少量水 (至少 2.5% 体积比) 和高比例有机相组成。

在 HILIC 方法中, 亲水、极性和带电荷化合物比疏水、中性化合物更容易保留。与反相液相色谱完全相反。

在流动相中加水会降低保留。HILIC 与正相色谱相比, 能得到强极性溶质的良好峰形。是反相色谱的补充方法, 由于保留了亲水性化合物, 因此常使洗脱顺序倒置。

开发 HILIC 方法时, 需要优化下列参数:

- 固定相
- 有机溶剂浓度
- 缓冲液类型
- 缓冲液 (盐) 浓度
- pH
- 温度

HILIC 方法中常用的色谱柱:

- 硅胶柱
- 氨基柱
- 混合型柱 (烷基-二醇、烷基-羧基、C18-酰胺、芳香-氰基、烷基-羟基、C18- SCX 和聚羟乙基天冬酰胺)
- 氢化物衍生氢化物柱
- 两性柱 (如, 四烷基铵-磺酸)
- 专利固定相柱

在图 61-63 中显示了两 种药物的分离 — 雷尼替丁和帕罗西汀 — 使用反相色谱, 然后用 HILIC 方法, 以及 MS 数据。结果显示了 HILIC 模式的主要优势。在 HILIC 中雷尼替丁保留更强, MS 灵敏度更高。

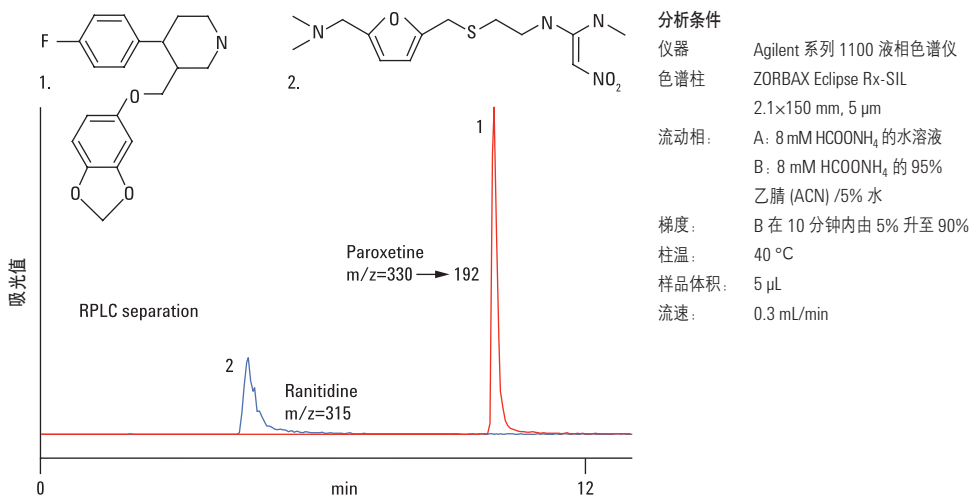


图 61. 在 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱上对帕罗西汀和雷尼替丁进行的 LC/MS/MS 分离 (反相 HPLC 模式)

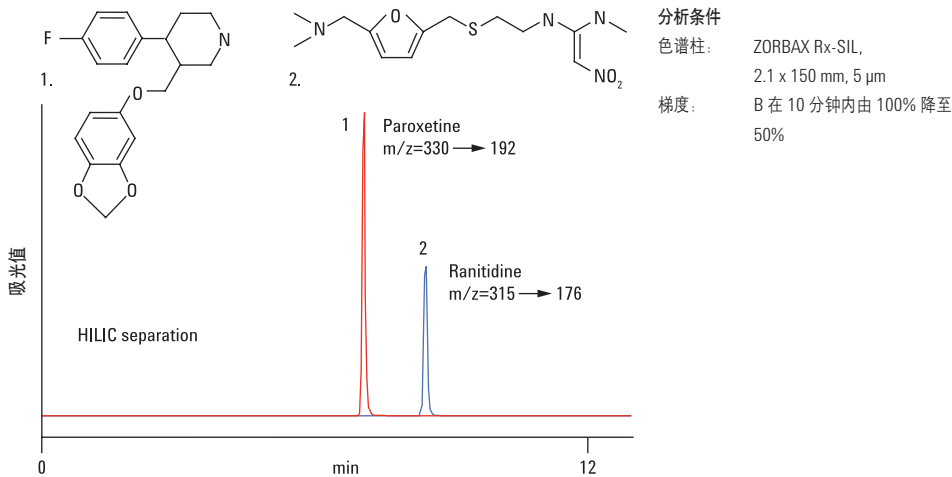


图 62. 在 ZORBAX Rx-Sil 柱上对帕罗西汀和雷尼替丁进行的 LC/MS/MS 分离 (HILIC 模式) – 100 ppb 水平

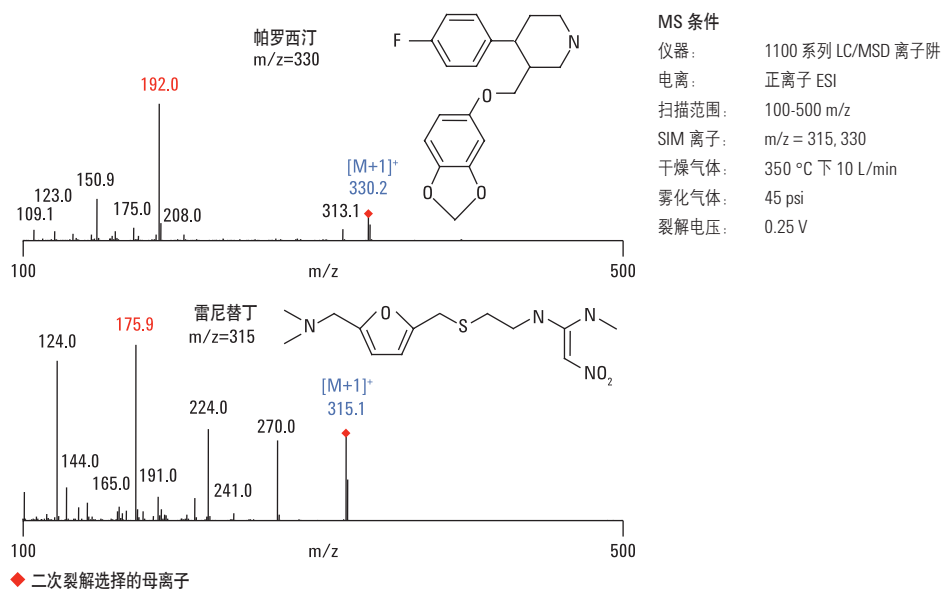


图 63. 药物标准品的 MS/MS 图谱

正相色谱

正相或吸附色谱的出现早于反相色谱。“正”的叫法源自其原本概念，即，固定相为极性、流动相为非极性、极性化合物保留更强。

在正相色谱中，使用硅胶或另一种极性固定相，如短链氨基或二醇。流动相为非极性——通常为烃类、二氯甲烷、乙酸乙酯，或另一种水溶性的溶剂。在正相色谱中，极性组分保留更强。随流动相极性增大极性组分保留减弱。使用的流动相极性越强，分析物的洗脱越快。在硅胶柱上进行正相梯度分离时，可以从己烷等非极性溶剂开始，然后逐渐加入极性溶剂，如乙酸乙酯，比如，乙酸乙酯从 5% 到 95%。根据目标物的洗脱位置，可以调节梯度以改善所有组分的分离。有时加入一定量的水或少量异丙醇，可以调节硅胶填料的表面活性。键合相色谱柱可能不需要水的存在，并常使用醇类作为改性剂。如果检测器为 UV 或荧光检测器，可参考溶剂 UV 截止波长表。在本书参考章节，第 137 页上，可以查到某些最常用溶剂的 UV 截止波长。

我们使用正相色谱的原因之一是使更多的极性化合物得到保留。也可以用这种模式洗脱在反相色谱中高度保留的疏水化合物。

正相色谱有许多用途，适合分离几何异构体和位置异构体，可得到比反相色谱更高的分辨率。当我们没有水溶性的溶剂时，可以使用正相色谱。也可以用于制备分离，流动相不含水，易于蒸发。

总结：正相

- 柱填料为极性：硅胶（最强）>氨基>二醇>氰基（最弱）
- 流动相为非极性：己烷、异辛烷、二氯甲烷、乙酸乙酯等
- 极性化合物保留更强
- 随流动相极性增大保留减弱

选择正相的目的：

- 分离高度保留的疏水样品
- 分离异构体
- 样品进样溶剂为非极性和/或非水溶性的
- 使用非极性溶剂进行回收

离子交换色谱

离子交换色谱可以分离离子型化合物和可离子化的化合物。在这种模式中，我们使用带有离子型官能团的填料，其所带电荷与分析物相反。在强阳离子交换 (SCX) 色谱中，我们要分析带正电荷的分子或阳离子，因此使用的是阴离子型或带负电荷的固定相。如果我们要分析带负电荷的分子或阴离子，应使用阳离子型或带正电荷的固定相。

在离子交换色谱中，流动相通常含水量较高，并含有缓冲液或盐。通过连续或阶梯梯度增加离子强度（盐浓度）进行洗脱。常用于对生物大分子的分离，也用于小分子的分离，如氨基酸、无机阳离子和阴离子，以及氨类或羧酸等可离子化的化合物。

在图 64 的实例中，我们分离了蛋白质，由于其具有两种离子官能团（即能带正电荷又能带负电荷），肯定带电荷。根据其所带的净电荷，蛋白质和多肽可以用阳离子交换柱或阴离子交换柱进行分离。

离子交换色谱小结：

- 柱填料含离子基团（如，磷酸盐、四烷基铵）
- 流动相为水相缓冲液（如，磷酸盐、甲酸盐、TRIS 等）
- 比反相色谱用得少
- 与离子对色谱相似（更多信息请参见词汇表）

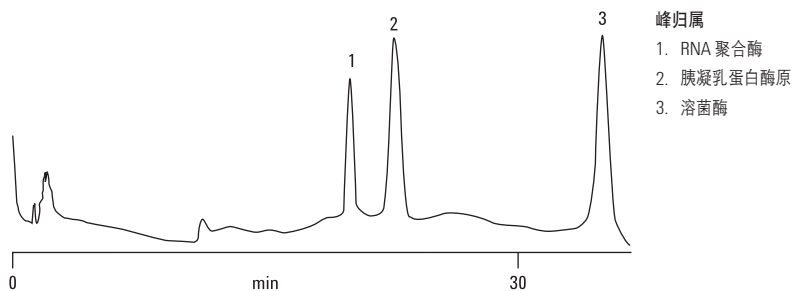


图 64. 用强阳离子交换柱 ($-SO_3^-$) 分离碱性蛋白

凝胶渗透色谱/体积排阻色谱

在 GPC/SEC 中，样品分子与填料之间不存在相互作用，并通过扩散进入多孔聚合物基质或硅胶基质的孔隙中。根据分子的体积大小和相应填料孔隙大小进行分离。体积比填料孔隙大的分子不能扩散进入填料，而体积比填料孔隙小的分子则可以进入填料，因此样品得到分离。与反相色谱不同的是，大分子先洗脱出来，小分子后洗脱出来。

通常，较大分子被排阻在孔隙之外，从而快速从色谱柱中洗脱出来，为完全排阻体积。最小的分子可以渗透入色谱柱的所有孔隙，最后洗脱出来，为完全渗透体积。其它所有分子在这两者之间按分子大小洗脱出来。如果要测定单个组分的分子量 (MW) 或整体分布，需要先用已知分子量的标样以洗脱体积对 $\log MW$ 建立校正曲线。然后，在与标样相同的条件下分析聚合物样品，即可测定该聚合物的分子量和分子量分布。

主要选用流动相溶解分析物。

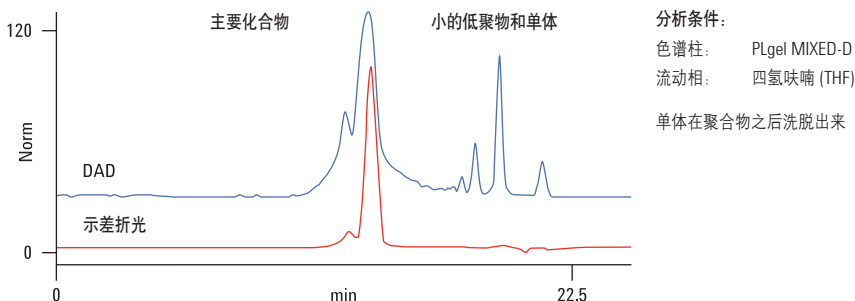


图 65. 用非水相 GPC/SEC 柱分离聚丁二烯的凝胶渗透色谱图

GPC/SEC 小结:

- 两种模式：非水相 GPC 和水相 SEC（也称凝胶过滤色谱，或 GFC）
- 在体积排阻色谱中，样品分子与填料之间无相互作用，并通过扩散进入多孔聚合物基质的孔隙中。根据分子的体积大小和相应填料孔隙大小进行分离。在不同溶剂或流动相中可能得到不同的流体动力学半径
- 主要选用流动相溶解分析物
- 主要用于聚合物表征、聚合物分子量测定和蛋白质分离



GPC box 色谱柱

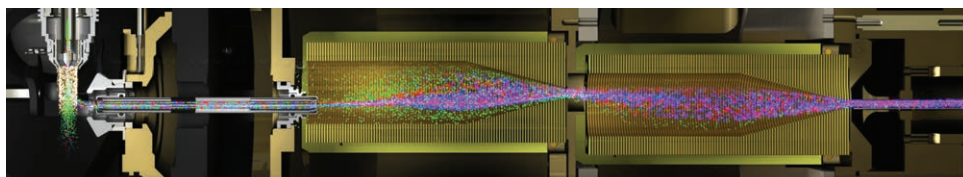
液质联用仪基本原理

哪种仪器的化合物分析能力能够超越液相色谱？
接下来我们就将为您介绍。

什么是 LC/MS？

将液相色谱 (LC) 与质谱 (MS) 的分离能力相结合，用于分析复杂样品中的单一化合物或多种组分的仪器被称为液质联用仪 (LC/MS)。符号 LC/MS 代表两种不同分离技术的结合，先通过液相色谱进行分离，然后再按化合物的质量（或更精确地，按质荷比 (m/z)）对其进行分离。为了使该技术具有分析实用性，在液相中分离出的组分必须通过电离过程转换为带电的离子形态。该过程在质谱仪的离子源中进行，它是连接液相色谱仪和质谱仪的接口。一般来说，LC/MS 的灵敏度比 UV 检测更高，其选择性和特异性也更加出色。

在过去几十年中，LC/MS 的应用大幅增长。技术的进步使得 LC/MS 越来越简单易用，可轻松添加到任何实验室。电离技术的改进拓宽了 LC/MS 可分析的化合物范围。如今，LC/MS 已成为了诸多领域（例如药代动力学、法医学、毒理学和蛋白质组学等）的标准分析工具。液质联用仪现在几乎已经应用到了每一个需要进行化学分析的行业中；制药、食品安全、环境、化学和能源领域的实验室都部署了 LC/MS 以应对分析挑战。



基本样品电离之后被转移到检测器中

LC/MS 可提供哪些信息？

LC/MS 分析所产生的数据为多维数据。根据组分在各种溶剂和色谱柱条件下的液相色谱保留特性及其在气相中的质荷比进行分离和检测。最高级别的结果是总离子流色谱图 (TIC)。TIC 展示的是色谱运行过程中检测到的离子的总强度。TIC 中的每个采样点都可进行进一步分析，因为每个点都与特定的质谱图相关联。质谱图可显示某个色谱保留时间处出现了哪些质量数的离子，以及它们相应的强度。

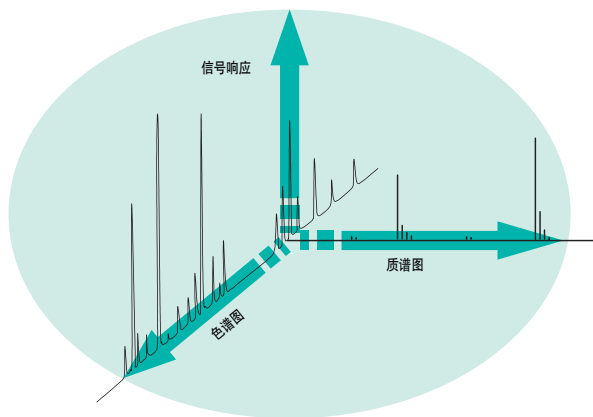


图 66. 聚丁二烯聚合物在非水性 GPC/SEC 色谱柱上分离得到的凝胶渗透色谱图

质谱峰的分辨率和准确度是质谱仪的重要性能标准。对于能够以大约 ± 0.1 Da 的准确度识别质量的仪器，我们称其具有标称质量准确度或单位质量准确度。此类仪器通常是基于四极杆的仪器，例如单四极杆或三重四极杆质谱仪。具有标称质量准确度的质谱仪与液相色谱仪联用通常已经足够用于多种应用。

高分辨率精确质量质谱仪能够更精确地测量离子的质荷比，准确度可达 ± 0.1 mDa。质量准确度的提升大大提高了化合物鉴定的可信度。另外，更高的质量分辨能力还能以足够的精度测量化合物的同位素，有助于对化合物分子量和结构表征结果进行额外的验证。此类仪器基于飞行时间 (TOF) 技术或离子阱。

液质联用仪记录不断增加的化合物丰度的能力被称为线性动态范围。线性范围对于实现准确测量而言非常重要，在对样品中的化合物进行定量分析时尤其如此。

液质联用仪的类型

液质联用仪有多种类型，它们分别采用不同的技术，具有不同的分析能力和性能水平。

单四极杆仪器

单四极杆液质联用仪可提供具有标称质量准确度的数据，并且通常是实验室初次引入液质联用仪作为与液相色谱仪联用的检测器时的首选。单四极杆仪器利用四极杆质量过滤器测定样品所产生的离子的 m/z ，还能扫描一定范围内的质量进行筛选分析，或者选择具有特定 m/z 值的特定离子进行目标分析。此类液质联用仪采用先进的仪器设计并且易于操作，因此非常适用于常规的质量分析。

三重四极杆仪器

三重四极杆液质联用仪是应用最广泛的类型，有时也被称为串联质谱仪，因为同一台仪器配备有两个质量过滤器。这种设计可通过分离母离子、碎裂母离子然后分析所得的碎片离子来生成 MS/MS 数据。多反应监测 (MRM) 是实验设置中最常用的三重四极杆仪器类型，因为它能够提供极高的灵敏度，重现性高，并具有出色的选择性。

飞行时间和四极杆飞行时间仪器

飞行时间和三重四极杆飞行时间液质联用仪的原理是：对于动能一定的离子，其飞行时间会根据其质量和电荷数的不同而有所差异。精确测量而得的飞行时间可用于准确测定样品中存在的离子的质荷比。此类仪器可提供高质谱分辨率，且测量的质量准确度在 5 ppm 以内。在碎片离子进入飞行管进行分析之前，四极杆飞行时间仪器还能通过分离和碎裂母离子提供 MS/MS 数据。

Agilent 6000 系列液质联用解决方案

安捷伦提供可改善定量和定性分析可信度的全套液质联用解决方案，涵盖这几页所述的所有类型的系统。右侧展示了外观不同的三重四极杆系统以及 Q-TOF 系统。



Agilent 6100 系列单四极杆液质联用系统



Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统



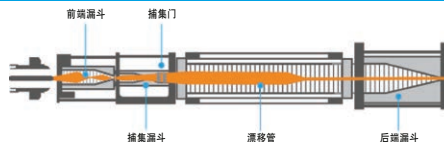
Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 液质联用系统

匀场离子淌度系统

匀场离子淌度系统兼具离子淌度和质谱的分离能力。该技术可直接准确测量碰撞截面，从而提供额外的分离维度。它还能保留分子构象的结构特征，扩展了对复杂样品的覆盖率。

安捷伦离子淌度质谱

Agilent 6560 IMS-Q-TOF 液质联用仪能够在没有同类型校准标准品的情况下，实现高性能的离子淌度分析和精密、准确的碰撞截面 (CCS) 测量。



MS/MS — 碎裂化合物，获得额外的特异性

某些液质联用仪会有意碎裂母分子，然后根据碎片离子的质量获取关于化合物结构组成的信息。施加相同的碰撞能量时，化合物将可重现地碎裂。因此，通过研究完整质量数和生成的不同碎片离子的质量数，我们可以查找特定的化合物。该技术提升了化合物鉴定的特异性，通常被称为 LC/MS-MS，表示分析时要进行多个阶段的质量分析。

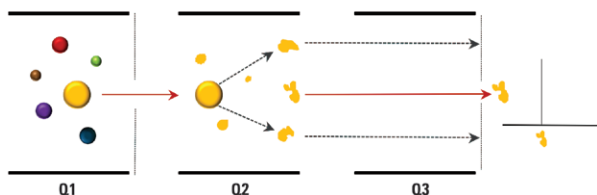


图 67. 聚丁二烯聚合物在非水性 GPC/SEC 色谱柱上分离得到的凝胶渗透色谱图

三重四极杆仪器使用一个四极杆来分离初始离子或母离子，然后在另一个区域中碎裂该离子，接下来再分析第三个四极杆中生成的碎片离子。使用这些仪器时，我们通过被称为多反应监测 (MRM) 的实验来采集数据。MRM 实验主要监测第一个四极杆中的母离子，以及第三个四极杆中的一种或多种碎片离子（或子离子）。碎裂过程可快速完成，因此可同时监测多个 MRM。该方法常用于农药、食品和毒理学分析，这些分析可能涉及多个不同的目标化合物。MRM 实验的重现性很高，并且可达到极高的灵敏度。动态 MRM (dMRM) 是一种更先进的 MRM，它能确保在单次 LC/MS 分析中对多种分析物（200 多种化合物）进行高灵敏度的定量分析。

某些精确质量液质联用系统也能执行 MS/MS 级别的实验。此类仪器包括四极杆飞行时间仪器和某些离子阱仪器。它们可提供给定化合物的精确质量、同位素信息和碎片离子信息，具有 LC/MS 所能达到的最高特异性。

化合物的电离

为了进行分析，所有质谱仪都要求化合物处于气相状态并且带有电荷。因此，必须通过某种方法将液态的中性分子转换为气态的离子。可采用多种不同的技术进行电离。

电喷雾电离

电喷雾电离 (ESI) 是如今应用最广泛的 LC/MS 电离技术。它是一种软电离技术，有助于保留被电离分子的结构。它能够分析范围极宽的化合物，包括完整蛋白质和寡核苷酸等大分子以及热不稳定化合物。

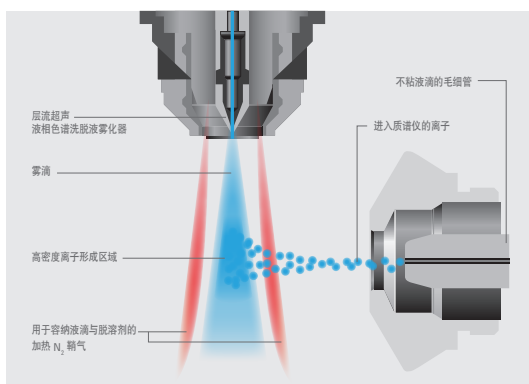


图 68. 安捷伦喷射流 ESI 离子源

大气压化学电离

大气压化学电离 (APCI) 技术使用高度带电荷的探头电离中性化合物，进而生成离子。它适用于偏非极性的化合物，如类固醇、芳香结构和某些脂类。

大气压光电离

大气压光电离 (APPI) 技术利用高强度灯产生的光子使样品电离，生成离子。高度非极性的化合物适合采用 APPI 进行电离。

安捷伦离子源

采用以上三种关键技术还有多种其他类型的电离技术。安捷伦喷射流离子源是一种高度增强版的电喷雾离子源，它利用额外的加热气源来改善蒸发并协助 LC/MS 入口前方的离子聚焦。安捷伦组合离子源可同时使用 ESI 和 APCI 进行电离，拓宽了单个样品中所能电离的化合物范围。纳流电喷雾离子源和 Chip Cube 离子源可用于纳流 HPLC 应用，使用极少的溶剂即可提高信号强度。

利用 LC/MS 开发方法的技巧

ESI-MS 的溶剂选择

LC/UV 流动相通常采用能够在 MS 离子源中积聚的非挥发性缓冲液配制。换用具有相同 pH 的挥发性缓冲液通常是一种简单的方法。理想的 ESI-MS 缓冲液浓度应低于 25 mM，最理想的情况下应低于 10 mM。流速通常也应保持较低水平，一般而言应低于 0.5 mL/min。但如果采用安捷伦喷射流热梯度聚焦技术，可采用 5 μ L/min 至最高 2 mL/min 范围内的流速。通常应避免使用金属离子缓冲液，因为它们会干扰电离过程。

例如，用甲酸盐缓冲液替代磷酸盐缓冲液同样能将流动相的 pH 调节为 3，而且与质谱仪配合良好。由于质谱检测需要形成离子，因此应当利用流动相使分析物带上电荷。这意味着流动相 pH 和样品的 pKa 信息至关重要，为了获得稳定的方法，pH 应当与分析物的 pKa 相差 1 至 2 个单位。选择可生成带正电荷或带负电荷的分析物的流动相将有利于提高灵敏度。较低的 pH 通常用于碱性化合物的离子化。对于酸性化合物，我们需要更仔细地选择流动相 pH，因为它们的 pKa 值很有可能在 pH 2 至 5 的范围内。酸性流动相通常更适用于正离子模式电离，并且应含有 0.1% 至 1% 的甲酸、0.1% 至 1% 的乙酸和 0.05% 至 0.2% 的三氟乙酸 (TFA)。TFA 会引起离子抑制，但如果样品浓度足够高，也可以使用 TFA。碱性流动相通常更适用于负离子模式电离。氢氧化铵、三乙胺、二乙胺、哌啶和碳酸氢铵常被用于负 ESI 模式。

当中性化合物与缓冲液中的乙酸根或铵根离子络合时，也可对其进行分析。向电喷雾探头施加电压可形成离子，而选择合适的流动相形成预离子化的分子能够显著促进离子形成，从而改善灵敏度。

对于有机流动相组分，通常优选乙腈而不是甲醇。尽管甲醇也可用于 LC/MS，但是乙腈-水混合物的粘度和表面张力比甲醇-水混合物更低。较低的粘度有利于在离子源中形成更小的液滴，使其更易于蒸发。

这些可兼容质谱的流动相适用于反相、HILIC 和正相色谱。

图 69 所示的例子在使用 EIS 分析茶叶的方法中应用了若干种可兼容 LC/MS 的流动相，旨在对它们进行筛选。无论使用哪种流动相，选择性和峰形均保持一致。因此，我们根据分析物的信号强度来选择最佳流动相。使用乙酸铵缓冲液和三氟乙酸流动相时，出现了明显的离子抑制效应。两个最有力的竞争者是甲酸和乙酸，其中甲酸产生的信号略强一点。将灵敏度最高的乙酸流动相与灵敏度最低的乙酸铵流动相比，使用乙酸时的灵敏度比使用乙酸铵时的灵敏度高五倍。

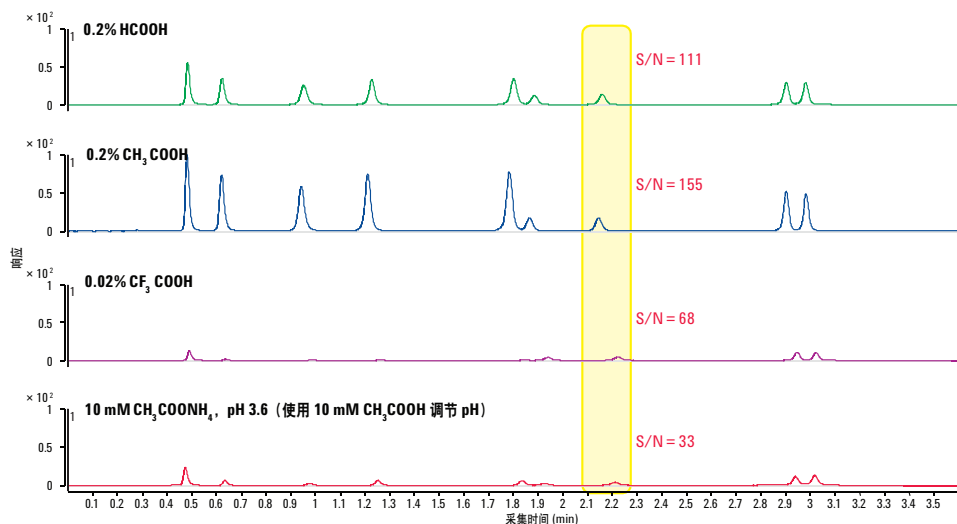


图 69. 筛选可兼容 LC/MS 的流动相用于采用 ESI 和 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱的茶叶分析法

APCI-MS 和 APPI-MS 的溶剂选择

APCI 和 APPI 通常用于 ESI-MS 无法充分电离的弱极性分子。某些液相色谱流动相（如乙腈）可能不适用于此类离子源，甲醇是分析时可以尝试的首选溶剂。与 ESI 类似，APCI 和 APPI 不兼容非挥发性缓冲液。然而，与 ESI 不同的是，APCI 和 APPI 可采用更宽范围的缓冲液浓度（最高可达 100 mM），以及更高的流速（最高可达 1.5 mL/min）。当采用 0.75 mL/min 以上的流速时，APCI 和 APPI 的灵敏度比 ESI 更高，而且噪音更低。出于安全考虑，应避免使用高度易燃的溶剂。

离子对色谱与质谱联用系统的溶剂选择

使用离子对色谱和液质联用系统时，流动相中必须包含非挥发性离子对试剂，如烷基磺酸盐或四烷基铵盐。常用的流动相包括七氟丁酸 (HFBA) 和三丁胺 (TBA)。离子对试剂可能会干扰电离过程，如果这种干扰会影响分析结果，那么可以转而使用 HILIC 进行色谱分析。

样品前处理

如前文所述，适当选择流动相缓冲液和 pH 对于获得稳定、灵敏的质谱性能至关重要。样品前处理对于成功实施 HPLC-UV-MS 分析也非常重要，样品前处理不当可能导致离子信号抑制或干扰。在进行 ESI-MS 分析之前需要考虑的主要因素是基质组分和浓度问题。

基质组分

盐类会抑制电离过程，表面活性剂会干扰蒸发过程，而高分析物浓度会导致检测器饱和。一些可清除基质效应、盐类和表面活性剂效应的典型技术包括超滤、溶剂萃取或脱盐、液液萃取、固相萃取 (SPE)、免疫亲和、柱上浓缩和色谱柱切换 (LC/LC)。如果无法避免盐类和表面活性剂，可使用色谱法（使用短色谱柱即可）或截止过滤器将其去除。

浓度问题

为了解决浓度问题，应使用液相色谱方法中一开始就存在的溶剂组分对样品进行稀释。

关于离子抑制的注意事项

离子抑制是目标化合物离子化效率下降对 LC/MS 检测器造成的不良结果。产生信号抑制的原因可能是流动相或样品基质中的组分与分析物产生了竞争，或是抑制了分析物的离子化。尽管引起离子抑制效应的确切化学和物理原因尚不明确，但我们仍然应该尽可能地避免目标分析物与其他潜在的抑制物质发生共洗脱。在 LC/MS 分析之前对复杂样品进行色谱分离是避免离子抑制效应的一种有效方法。另外，稀释样品和降低流速也可减少电离过程中会产生抑制效应的物质的数量。

使用配备高效色谱柱的 LC/MS 时的注意事项

灵敏度的提升

LC/MS 是一种灵敏的技术，非常适合分析低浓度化合物。将 LC/MS 与高效 UHPLC 色谱柱联用能够进一步提升灵敏度。图 70 显示了吗啡代谢物 (M3G, M6G) 的分析结果，与传统 5 μm 色谱柱相比，高效亚 2 μm UHPLC 色谱柱生成了更高、更尖锐的峰。这些分析采用的方法参数（包括固定相化学性质）均相同，唯一的变量是粒径。M3G 和 M6G 为同量异位物质，因此在同一质量数 (m/z 462) 处被检出。将这些 EIC 调整为相同的刻度之后，我们不仅能够更明显地看出小粒径色谱柱带来的峰宽改善，还能看到峰高的差异。比较灵敏度最低的 M6G 峰的信噪比之后我们发现，与传统 5 μm 色谱柱相比，高效亚 2 μm UHPLC 色谱柱能够将质谱灵敏度提高五倍。

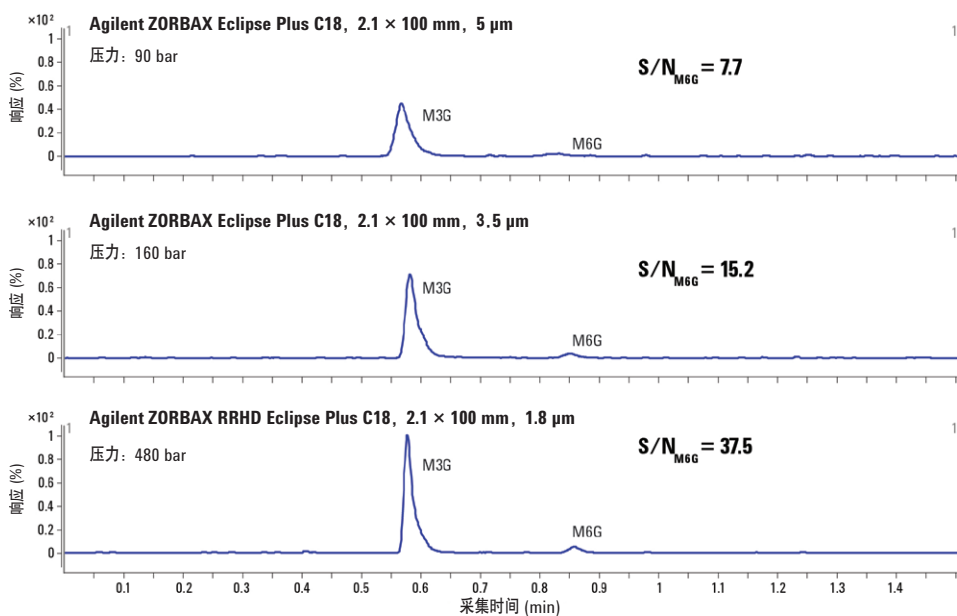


图 70. 吗啡代谢物的分析结果，表明使用填充亚 2 μm 颗粒的高效 UHPLC 色谱柱能够提高灵敏度

质谱扫描速率

为了充分利用液质联用系统，我们必须仔细优化各个方法参数。使用高效色谱柱时，通过适当设置较快的数据采集速率以采集足可覆盖整个窄峰的数据点对于生成可靠的结果至关重要。图 71 显示了快速分离茶叶中的 10 种常见儿茶酚的结果。图中显示了各种数据采集速率对色谱分析（包括 UV、MS 扫描、MS SIM 和 MS/MS 检测模式）质量的影响。在所有模式下都可以看到相同的特征。质谱仪的数据采集速率超出了该快速分析所需的采集速率，以致于过快的数据采集速率采集了过多的数据点，给分析带来了负面影响。最快的数据采集速率生成了最窄的峰，然而，最快的数据采集速率产生的基线噪音也最多，导致信噪比下降。如果分析而言灵敏度是最重要因素，则应当使用稍低的数据采集速率，尽管这意味着峰宽会略有增加。

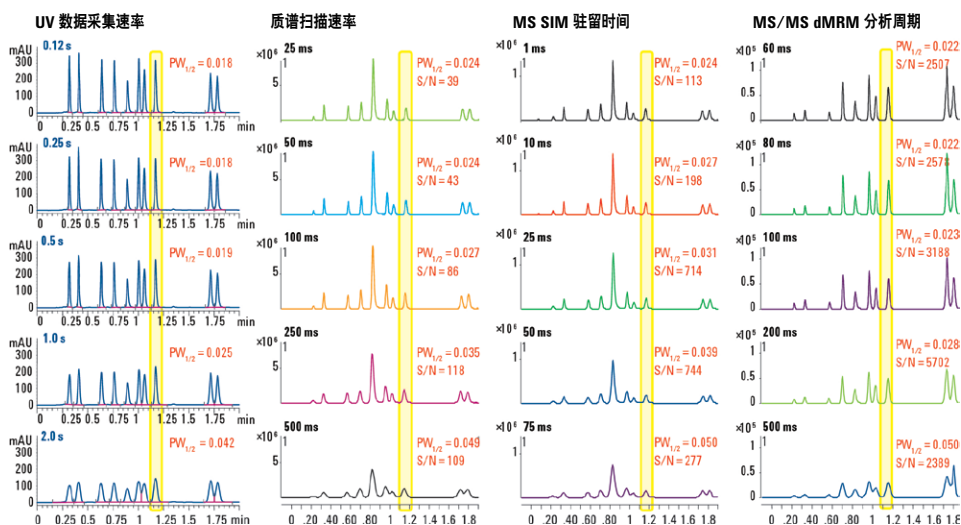


图 71. 使用 Agilent ZORBAX RRHD SB-C18 色谱柱分析茶叶中常见的 10 种儿茶酚

系统扩散

为了实现理想的 LC/MS 分析，除了优化方法参数之外，还应考虑仪器硬件。系统柱外体积会显著影响小体积高效色谱柱（如内径 2.1 mm 的亚 2 μ m 色谱柱）的分离效果。图 72 显示了咖啡因及其代谢物的 LC/MS/MS 分析结果，分析时分别使用的是配备 0.12 mm 内径毛细管的标准液相色谱仪以及配备 0.075 mm 内径短毛细管的低扩散优化仪器。低扩散液质联用系统所得的色谱峰明显更高、更窄。由于低扩散系统的样品流路体积更小，因此其保留时间略有缩短。提取 MRM 色谱图突出显示了通过最大程度减小 LC/MS 分析的系统扩散来优化 UHPLC 色谱柱性能的重要性。尽管质谱一般都能分离共洗脱峰，但在本例中，M6G 和 M3G 为同量异位物质，而且具有相同的定量和定性离子对，因此我们需要使其实现色谱基线分离。将柱外体积减小 60% 能够将这两个峰的分离度提高 37%，并且将灵敏度提高 30%。

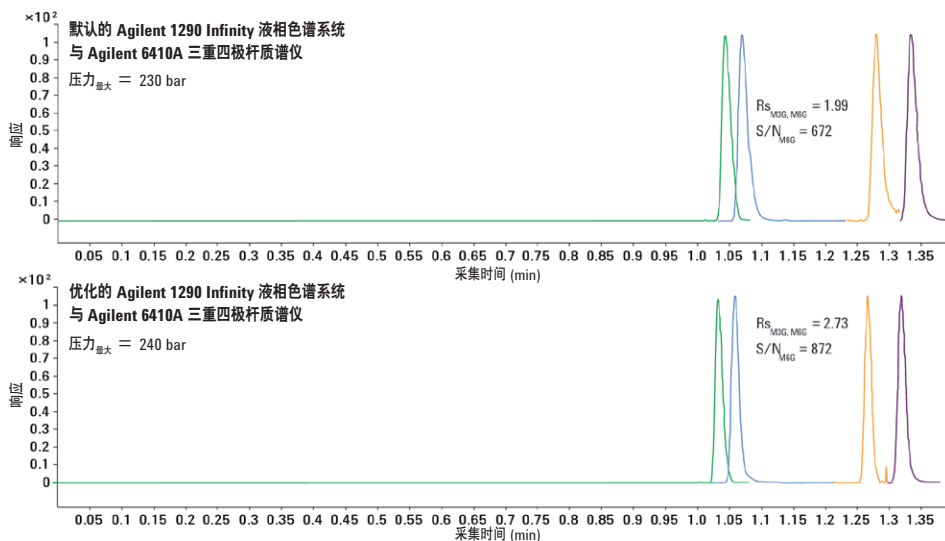


图 72. 使用标准及优化的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱对吗啡及其代谢物进行 LC/MS/MS 分析的结果比较。标准 1290 Infinity 液相色谱配置 0.12 mm 内径的毛细管，而经过优化的超低扩散 1290 Infinity 液相色谱配置 0.075 mm 内径的短毛细管，将柱外体积减小了 60%

分流阀 — 用法和价值

所有安捷伦液质联用仪均配备分流阀。液相色谱流动相在到达离子源之前将通过分流阀。不应使流动相绕过分流阀直接到达雾化器，因为该阀具有非常重要的作用。当运行的 LC/MS 方法洗脱大量的非目标化合物时，您可以将这些化合物引入废液瓶。分析人员不希望这些化合物进入离子源，将它们引至废液瓶可降低离子源需要清洁的频率。此外，分析人员可能不需要采集这些化合物的质谱数据，此时可关闭“保存谱图”功能以节省磁盘空间。这些功能位于软件的时间段选项卡中。

LC/MS 软件

扫描类型 — 比较 TIC、EIC 和 SIM

总离子流色谱图 (TIC) 将扫描仪器范围内用户所选的整个分子量范围。如果化合物的分子量已知，可使用提取离子色谱图 (EIC) 从复杂的 TIC 色谱图中分离出特定的分析物，得到仅含特定分子量的离子的简化色谱图。图 73 显示了在 0.4 分钟内快速分离 15 种镇痛化化合物的结果。分析设置了足够快的质谱扫描速率，目的是采集足以覆盖这些窄峰的数据点（即使是存在共洗脱峰的情况下），以确保得到可靠的数据。上方的 TIC 中有多个部分共洗脱峰（特别是托美汀周围），以红色箭头标出。由于各化合物是通过其独有的质量数进行鉴定的，因此分析人员可通过 EIC 单独查看各种组分，如下方色谱图中仅针对托美汀的 EIC (m/z 257) 所示。通过单独查看 EIC，分析人员能够轻松地对任何化合物进行积分和定量分析。

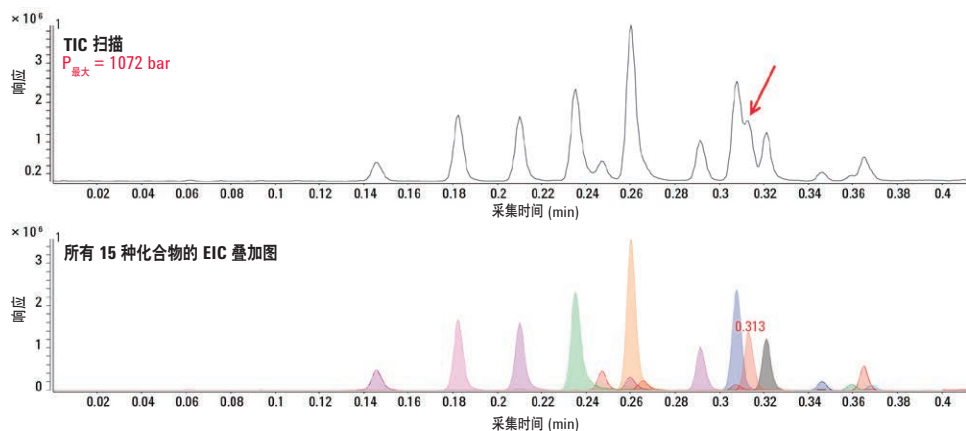


图 73. 使用填充 $1.8\ \mu\text{m}$ 颗粒的 Agilent ZORBAXRRHD Eclipse Plus C18 色谱柱在 0.4 分钟内快速分离 15 种镇痛化合物的结果

TIC 模式在分析复杂样品时（尤其是可能存在未知物时）很有用。当方法以某种已知的分析物为目标时，我们可以将 LC/MS 设置为选择离子监测 (SIM) 模式，该模式仅采集目标分析物的数据，可得到类似于 EIC 的色谱图。SIM 模式可同时监测多种离子，并且数据可显示为复合色谱图或单独 EIC。在 SIM 模式下使用 LC/MS 的优势与通过 TIC 模式提取 EIC 相反，SIM 模式能够为用户提供针对目标分析物的更高的灵敏度。

个人化合物数据库与谱库

在执行非目标筛查时，化合物鉴定给我们带来了一定的挑战。我们可通过购买标样建立谱图来协助化合物的鉴定。然而，许多实验室缺少购买和测试新标样的资源或时间。个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 能够利用精确质量 MS/MS 谱库更可靠地鉴定目标化合物，以及更灵活地创建可定制的 PCD 和 PCDL。

第三方 PCDL 的实例包括 METLIN 代谢组学数据库以及由 Broecker、Herre 和 Pragst 发布的法医和毒理学 PCD/PCDL。安捷伦还与研究人员合作开发有用的 PCDL 用于热点污染物（如真菌毒素和化学合成毒品）的检测。



图 74. MassHunter 定性分析软件，常用的 MassHunter 工作站软件套装中的组件，其使用精确质量、保留时间、同位素模式和 MS/MS 数据实现高可信度的代谢物鉴定

色谱结果的保护

重现性是色谱最重要的性质之一。要获得良好的重现性首先要有高质量的色谱柱和耐用的 HPLC 方法。

有一些能帮助您提高重现性，并延长柱寿命的方法。

在本章中，我们将按工作流程的顺序对这些方法进行讨论：

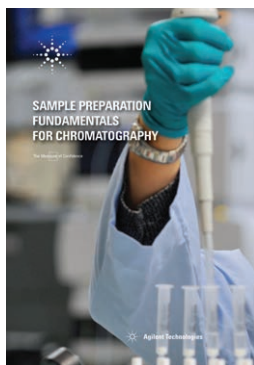
- 可扩展性
- 使用高纯度溶剂
- UHPLC 溶剂的特殊注意事项
- 在线滤头
- 入口筛板
- 保护柱
- 溶剂饱和柱

然后，我们将讨论如何保护色谱柱：

- 最大限度地延长柱寿命
- 疏通色谱柱
- 色谱柱受损的警告信号

我们将用几个字来概括当在实验室间进行转移时如何进行保护：

- 确保方法在世界范围的重现性
- 批间保留或选择性的变化



如需获取安捷伦样品前处理手册 (5991-3326CHCN) 的副本，请访问 www.agilent.com/chem/sampleprepbook

如需了解安捷伦样品前处理产品系列的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/sampleprep

可扩展性

过去 5 到 7 年以来，随着越来越多的用户开始在分析方法中应用表面多孔色谱柱 (SPP)，这类色谱柱发展非常迅猛。许多用户都体会到了此类色谱柱与传统全多孔色谱柱相比的优势。在开发新方法时，人们更倾向于采用 SPP 色谱柱，因为它们的普适性已经超越了亚 2 μm 色谱柱。SPP 色谱柱的这种优势得益于其高稳定性、高效、低背压的特点。然而，也有许多用户选择使用现代 2.7 μm SPP 色谱柱，原因是考虑到此类色谱柱相比传统 5 μm 填料色谱柱的柱压更高。

安捷伦最近推出了 Poroshell 120 4 μm 色谱柱系列。该系列产品丰富了 Poroshell 120 平台，为色谱工作者和方法开发人员提供了可扩展的解决方案。这一平台扩展最初包括 EC-C18、EC-C8、Phenyl-Hexyl、PFP 和 HILIC 化学键合相，让用户能够非常轻松地开始应用 Poroshell 120 系列产品。4 μm Poroshell 120 色谱柱的柱压仅为 2.7 μm Poroshell 120 色谱柱的 50%，效率却几乎是传统全多孔色谱柱的两倍，对于想要适当提升分析性能的用户而言，在方法中应用 4 μm Poroshell 120 色谱柱是一个简单有效的解决方案。

将方法转换至 Poroshell 120 系列相比而言更加直观简便的关键在于转换过程非常简单，可扩展性和方法转换的简便性是关键所在。Poroshell 120 的固定相化学组成可扩展为其他 ZORBAX 固定相化学组成，因此从原来的全多孔 5 μm 色谱柱进行方法转换的过程尤为直观。图 75 展示了 Eclipse Plus C18 与 Poroshell 120 EC-C18 相比的可扩展性。

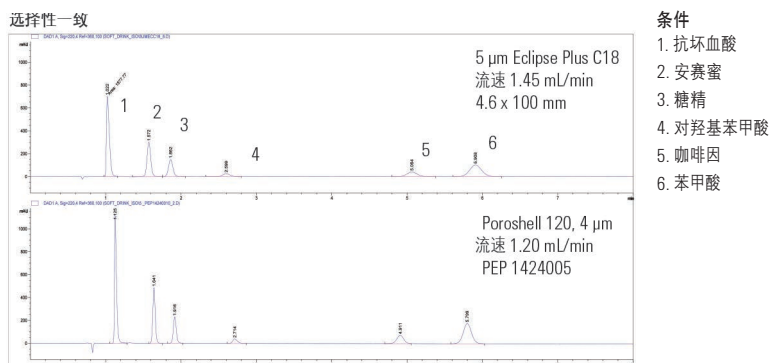
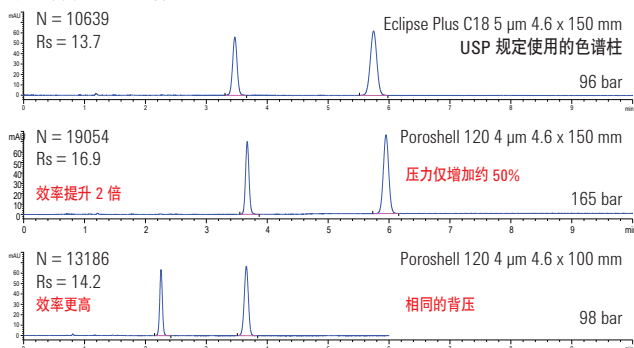


图 75. 从 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5 μm 色谱柱 (上图) 到 Poroshell 120, 4 μm (下图) 的可扩展性
(0.2% 甲酸, 甲醇 35%, 两种色谱柱均为 4.6 x 100 mm, 流速: Eclipse Plus 1.45 mL/min, Poroshell 120 1.2 mL/min)

这表明方法转换的简便性得到了极大提升，我们可将现有的方法从原来的 Eclipse Plus 系列色谱柱轻松转换至更加现代化、性能更出色的 Poroshell 120 系列。

进行方法转换时，从一种固定相到另一种固定相的可扩展性固然重要，粒径之间的可扩展性也不容小觑。分析方法在机构中乃至全球各地进行转换时，可能需要在各种不同的仪器上运行。因此，色谱工作者通常都需要确保某种色谱柱固定相有多种粒径可选。Poroshell 120 化学键合相提供 2.7 μm 和 4 μm 规格供用户选择，不同粒径之间可轻松实现扩展，从而增强了 Poroshell 120 系列的灵活性。实例见图 76。

采用传统方法分析萘普生



条件

流动相: 50:49:1 MeCH:H₂O: 乙酸

流速: 1.2 mL/min

1. 萘普生

2. 丁酰苯

图 76. Agilent Poroshell 120, 4 μ m 可随时替换传统的 5 μ m 色谱柱

采用本方法对萘普生进行 USP 分析时，过去通常使用 5 μ m 全多孔色谱柱。但在本例中，我们使用 4.6 x 150 mm 5 μ m 的 C18 代表传统方法。使用 5 μ m Eclipse Plus C18 色谱柱进行分析时，您可以看到所有的方法要求均轻松满足，将方法转换到 4 μ m Poroshell 120 EC-C18 色谱柱时，不仅维持了原来的选择性，还将效率提升了近 2 倍。因此，我们使用稍短的色谱柱即可实现更快的分析。4 μ m Poroshell 120 色谱柱的分析速度虽然不如 2.7 μ m Poroshell 120 色谱柱，但它仅采用 2.6 或 2.7 μ m 表面多孔色谱柱约 50% 的背压，可实现比 5 μ m 色谱柱更高的分离度和效率。

图 77 展示了使用 2.7 μ m 和 4 μ m Poroshell 120 色谱柱代替 5 μ m 色谱柱进行分析的另一个例子 — 这个例子分析了牛奶中的喹诺酮类物质。

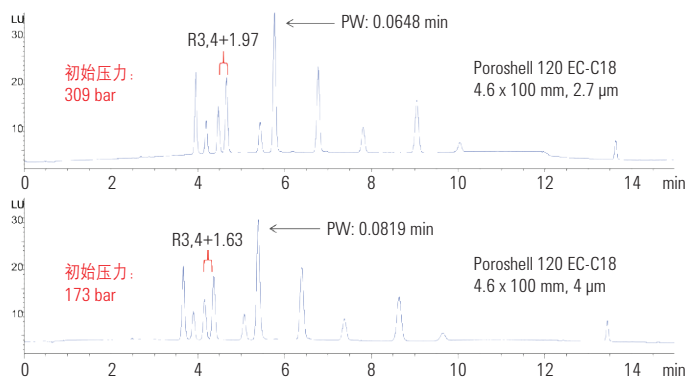


图 77. 使用 Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4 μm 和 2.7 μm 色谱柱分析牛奶中的喹诺酮类物质

采用这种梯度和方法, 2.7 μm 和 4 μm Poroshell 120 色谱柱之间的可扩展性是可预见的。此外, 对于这一特定的分析, 我们可以看到 2.7 μm Poroshell 120 色谱柱增大了峰宽和分离度, 但 4 μm 色谱柱的背压更低。

可扩展性对于提升方法开发的灵活性而言非常重要。色谱柱产品系列稳定、可预见的可扩展性有助于我们在不同粒径的色谱柱之间无缝地进行方法转换, 同时在适用的系统中维持最佳的性能。对于未经优化的旧系统, Poroshell 120 4 μm 是提高分离性能的理想解决方案, 而且方法可在未来轻松转换至 Poroshell 120 2.7 μm 色谱柱, 性能和选择性均可预测, 能够将方法优化和方法转换的难度降至最低。

使用高纯度级别溶剂的重要性

一般来讲，HPLC 应用中只应使用色谱级及以上级别的溶剂。过滤所有缓冲液，最好使用 0.22 μm 滤膜，特别是对于 UHPLC 应用，标准 HPLC 应用可使用 0.45 μm 滤膜。色谱级及以上的有机溶剂一般不需要过滤，如果过滤使用的滤膜和玻璃容器不是色谱级的，过滤反而可能带来污染物。

记住，要适当冲洗色谱柱。一天分析结束时，将缓冲液从系统中冲洗出去，使其处于水/有机流动相环境。使用与样品溶剂相溶的流动相（参见本指南封底的参考流程）。如果流动相 A 只用水或最多含 5% 的乙醇，将其留在系统中较长一段时间后，将会长菌。

这将带来压力问题，并很难去除，因此，一定要确保每天或至少每两天新配缓冲液。

UHPLC 的特殊考虑

由于高效柱中填料粒径太小，色谱柱两端需要用更小的筛板阻挡它们。同时筛板也能起到阻止颗粒物进入系统的作用，避免引起压力升高。所以，对于更高压力的 UHPLC 应用而言，防止污染物进入系统变得更为重要。

安捷伦建议在 UHPLC 应用中只使用认证的色谱/质谱级溶剂。一定要检查溶剂供应商是否提供以下证书：

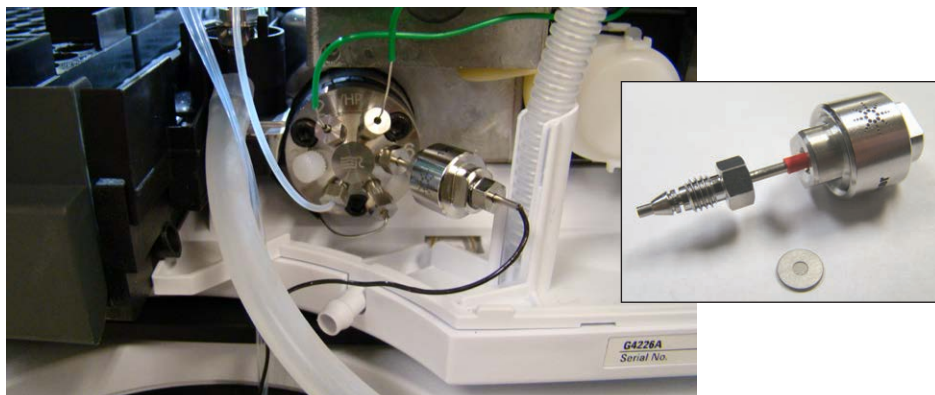
- 低溶剂和金属杂质，以减少对痕量或未知样品的干扰
- 痕量金属指标极低 – 不超过 5 ppb
- 正离子模式和负离子模式性能指标
- LC-MS 测试和其它 QC 测试（QC 测试项目越多，溶剂越好！）

溶剂和缓冲液使用提示：

- 过滤水性流动相（包括缓冲液）。0.45 μm 用于标准 HPLC, 0.2 μm 用于 UHPLC
- 使用缓冲液会增加色谱柱堵塞的风险。务必确保缓冲液浓度不会导致溶剂中的缓冲盐析出
- 制备流动相时，一定要始终严格遵循操作程序，比如溶剂的加入顺序
- 水性流动相会生长藻类和细菌，尤其当 pH 在 4-8 范围时。定期更换缓冲液（建议每 2 天更换一次），始终使用干净的器皿
- 使用棕色瓶盛装水性流动相

在线过滤器

在自动进样器和色谱柱之间安装在线过滤器。可以捕集颗粒物，防止其流入柱头，阻塞筛板。如果您使用的是 3.5 μm 柱，应配置 2 μm 筛板。1.8 μm 柱使用 0.5 μm 筛板。



安装在 1290 Infinity 液相色谱上的 1290 在线过滤器

低体积在线过滤器

过滤器可用于所有色谱柱，以保护色谱柱不被颗粒物堵塞。在线过滤器通过防止颗粒物（来自未过滤的样品和洗脱液，或两者）堵塞柱筛板而延长分析柱寿命。使用保护柱可能影响柱体积极低和粒径极小色谱柱的柱效。对于这些色谱柱，强烈建议使用低体积在线过滤器。

Agilent 1290 Infinity LC (PN 5067-4638) 的在线过滤器含为低交叉污染而设计的 0.3 μm 滤膜。可以在高达 1300 bar 压力下使用，死体积 1.3 μL 。该过滤器也可用于 Agilent 1260 和 1220 Infinity LC，以及 1200 RRCL。

保护柱

脏样品多次进样到不带保护柱的分析柱上时，会缩短分析柱的寿命。根据进样次数和样品类型，色谱工作者可选择经济的保护柱。

在分析柱之前的溶剂流路中配置一根保护柱。

保护柱避免了由颗粒物和强吸附物质造成的损坏。为保持对样品杂质有足够的容量，应选择内径与色谱柱内径相似的保护柱。理想情况下，保护柱的填料应与分析柱相同，从而使分析柱的色谱性能不发生改变。保护柱参与分离，因此在方法开发时就应在线安装保护柱。

判断何时更换保护柱可能比较困难，最好根据经验。如果说作为粗略判断标准的话，那么塔板数、压力或分离度的改变超过 10%，就需要更换保护柱了。您需要根据应用类型对更换保护柱的频率做出判断。尽早更换保护柱总比晚更换好。



UHPLC 的快速保护柱保护分析柱

溶剂饱和柱

如果您使用的是极端流动相条件，如在 pH 7，温度在 40 °C 以上，以及缓冲盐浓度超过 50 mM 时，可以使用溶剂或硅胶饱和柱对分析柱进行保护。溶剂饱和柱安装于泵和进样器之间，流动相流过时释放硅胶，在这一过程中使流动相饱和。这样可以防止分析柱中的硅胶溶解，延长柱寿命。溶剂饱和柱会增加驻留体积，对梯度有延迟作用，使用梯度时这是个缺点。在方法转换过程中应将这一增加的驻留体积考虑在内，以确保重现性。

色谱柱入口筛板

如果没有保护柱或在线柱前过滤器，在使用 HPLC 柱时，分析柱可能发生堵塞。由于现在使用的是高效装柱工艺，不建议更换色谱柱入口筛板，在许多色谱柱上也不可能更换。如果更换筛板，可能影响柱效。

色谱柱保护和保存

最大限度地延长柱寿命

现代色谱柱都很耐用，采用的设计在常用色谱条件下都可长期使用。在其性能指标范围内操作可最大限度地延长柱寿命。在确定最终方法时一定要再查验一下这些性能指标。

提示	附加信息
使用保护柱和/或 0.5 µm 在线过滤器	参见第 117 页保护柱章节
经常用强溶剂冲洗色谱柱	使用 100% B 溶剂。如果怀疑压力升高，使用更强溶剂。 参见第 58 页的色谱柱清洗指南
对“脏”样品进行预处理，最大限度减少强保留组分和颗粒	使用固相萃取、液-液萃取、用 0.45 µm 滤膜（UHPLC 用 0.22 µm 滤膜）过滤样品，或高速离心
按照色谱柱生产商的温度上限指标进行操作	许多新方法都要求较高温度，某些色谱柱可以承受高温，理想情况下，应在温度上限指标之下操作色谱柱
在压力上限之下使用色谱柱	选择使压力低于压力上限的流速，最低 10%
按标注方向操作色谱柱，查阅色谱柱说明书或咨询厂商，以确定色谱柱是否可以反冲	如果您有问题，一定要询问厂商
使用 pH 2-7 的流动相，可最大限度地延长柱寿命	如果您需要在超过此 pH 范围的条件下工作，可使用 StableBond 柱（用于低 pH 条件）或为高 pH 而设计的色谱柱（如，Eclipse Extend-C18）或聚合物色谱柱
使用新鲜溶剂，以防止细菌生长	为防止细菌生长，可配制流动相贮备液，并将其保存在冰箱中，需要时每天使用。用叠氮钠也可以防止细菌生长，但其具有致癌性，须小心使用
贮存色谱柱时，应先冲出盐和缓冲液。柱内只保留纯乙腈，或纯水与乙腈 50/50 混合溶剂	这样可以防止缓冲盐在柱内沉淀。乙腈是色谱柱保存的良好溶剂，因为水和醇类流动相可能提高固定相水解速率
使用高温时一定要逐渐升高柱温，而且仅在用流动相洗脱时进行	分析完成后，让流动相继续洗脱，直到回到室温
色谱柱接入仪器时，两端接头不要拧得过紧。使用短柄扳手，以防两端接头过紧	由于色谱柱的柱端螺母为 3/8 英寸，应使用 3/8 英寸短扳手将色谱柱接入仪器，不要将柱端接头拧得过紧

表 10. 延长柱寿命的提示

保存注意事项

为防止金属腐蚀，应避免将色谱柱长期保存在含卤素溶剂中（如，丁酰氯、二氯甲烷等）。如果使用了含缓冲液的流动相，应使用 20 到 30 倍柱体积的乙腈和水冲洗色谱柱，然后用同样体积的纯有机溶剂冲洗。缓冲液残留在色谱柱内，将促使细菌生长，使色谱柱或筛板堵塞，或导致鬼峰的出现。可以用大多数其他溶剂保存未键合的硅胶柱。但不能保存在容易发生降解的溶剂中，如，THF、TEA 或 TFA。

如需过夜保存，不要将色谱柱停止运行，您可以使流动相流经色谱柱，保持流速在 0.1 到 0.2 mL/min。这样还可以缩短第二天的平衡时间。如需长期保存，应使用厂商推荐的溶剂，通常是新柱装运时所用的溶剂。

疏通色谱柱

如果反压升高，您怀疑发生了色谱柱堵塞时，可以进行反冲。断开色谱柱与检测器之间的连接，将流动相从反方向泵入色谱柱（如果厂商说明这样操作没有问题的话）。如需了解清洗色谱柱的更多信息，请参见第 60 页。

色谱柱变坏时的快速检查

除了保存色谱柱刚刚使用时的柱性能测试色谱图（见第 122 页）外，您还可以根据色谱的基本概念，以评估色谱柱是否需要更换：

参数	警告信号
理论塔板数，N（柱效）	长时间使用造成的色谱柱空洞和污染将降低柱效。峰展宽是柱效降低的信号。通过监测 N，可以检测出这些问题。更多信息请参见第 6 页
保留因子，k	保留因子与流速和柱尺寸无关。k 值改变说明可能由于未洗脱化合物出现了键合相流失或柱污染等问题。该值也可能与流动相的变化相关，造成色谱柱出问题的假象。详见第 7 页
选择性因子，α	选择性因子的偏移与 k 一起，是键合相流失、柱污染或流动相条件改变的另一个标志，详见第 7 页
拖尾因子，Tf	拖尾因子是用来说明峰对称性的。拖尾因子增大说明色谱柱出现了空洞问题，但也可能是键合相流失造成极性溶质和硅醇基位点相互作用的结果
柱反压，P	柱压升高通常是颗粒堵塞色谱柱入口筛板造成的。但柱填料塌陷所引起的色谱柱空洞也可以引起压力的较大波动，详见第 9 页

表 11. 有助于监测柱性能的参数

确保方法在全球范围内都重现

如果色谱柱的使用背景不同那么它们的保留就很可能不一样，如果在方法开发时使用的色谱柱被另一根色谱柱代替，那么将会产生不同的结果。这是由于第二根色谱柱可能没有经历过与第一根柱相似的使用背景。

在开发方法的过程中，可能存在平衡不足或不一致的情况，又没有给重复实验的其他工作人员明确的提示。每个工作人员平衡其色谱柱的时间可能不同，很可能使结果产生波动。当采用与方法开发人员相同的方式平衡色谱柱后，将得到相同的结果。

引起保留改变的其它因素包括，由于方法可能不耐用，导致色谱柱/流动相组合不好；流动相、流速以及其它仪器参数发生改变；以及色谱柱之间柱床体积略有不同等。

提高方法的耐用性

不同批次的色谱柱可能对特定化合物的分析结果产生波动。不同批次的试剂也可能存在影响色谱结果的变化。开发方法时，良好的习惯做法是对多个批次*进行分析，并评估分析条件是否可以承受不同批次的微小变化。生产厂商都试图确保不同批次之间的重复性，但差异的存在不可避免。谨慎的方法开发将有助于避免将来出现的相关问题。

评估批次之间的变化时，首先要确定您已经解决了柱与柱之间的问题。然后再考核方法的耐用性。如果您分析的是可离子化的化合物，要确定您使用了缓冲液，其 pH 不能接近分析物的 pK_a 。另外，要检查样品和色谱柱对 pH 的敏感性，以及次级相互作用。如果您已确定存在 pH 敏感性的问题，可能需要对方法进行重新评价。

在本例中（图 78），批次之间的变化与 pH 有关。方法用批次 1 在 pH 4.5 条件下开发。回想一下前面讲过的内容，硅醇基对 pH 4.5 左右的碱性化合物具有活性（详见第 70 页上的 pH 与方法）。您可以看到两个碱性化合物都具有良好峰形。使用批次 2 时，碱性化合物 2 发生明显偏移，峰形不再尖锐。可以通过加入 TEA 或降低 pH 解决这个问题。在本例中，采用降低 pH 的方法。在 pH 3 条件下，批次 1 的选择性发生了改变，但仍可以得到良好的基线分离。另外，在 pH 3 条件下，批次 1 和批次 2 的重复性很好。在这个特例中，峰 4 降低，但由于样品降解造成的。

* 安捷伦拥有 200 多种便捷的一体式工具包，三批独立方法验证色谱柱让您唾手可得。

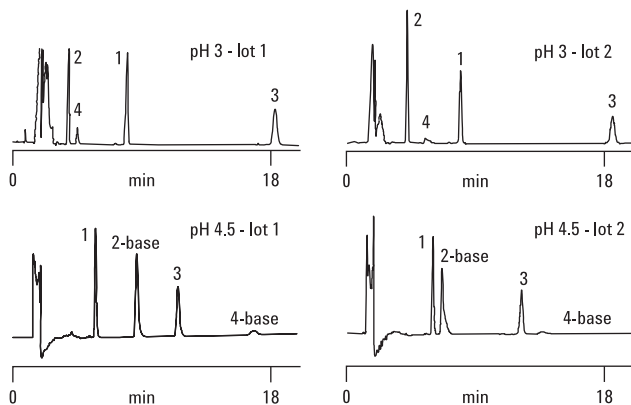


图 78. pH 水平所引起的批次之间的保留变化

批次之间保留变化小结：

- 消除引起柱间选择性改变的全部因素
- 重新评估方法耐用性，并修改方法
- 测定 pH 敏感性，并再次修改方法
- 将不同的选择性变化分类，并联系生产厂商

有关驻留体积的提示

驻留体积与实验室之间的方法转移密切相关（如需了解驻留体积的更多信息可参见第 48 页）。如果一个实验室中使用的 HPLC 仪器与另一个实验室仪器的驻留体积不同，即使两个实验室使用相同的方法，运行结果也很有可能不完全相同。这种不匹配的原因就在于在两种（或更多）流动相混合形成梯度后，经仪器管路到达柱头的时间不同。因此，分析物进样后，将通过不同的流动相组成（时间的函数）进行分离，其保留和分离度都可能受到影响。所以，应对驻留体积较小的仪器增加体积来调整驻留体积。或者，减少驻留体积大的仪器的管线内径和长度，使其与驻留体积小的仪器相匹配。另一个“办法”是在方法中设置一段梯度延迟，对流路系统中不同的驻留时间进行补偿。但是，某些认证方法可能不允许分析中使用这种改变。

快速故障排查指南

我们知道这是怎么回事。您需要一次读完整本书，但谁有这么长时间？

您可能在遇到问题时，才来读这本书。我们有一张快速指南表，其中包含了我们的技术支持团队从行业中色谱工作人员那里了解到的最常见问题，帮助您快速确定可能的原因，并提供省时的技巧用以找到问题所在。更多有关特定问题的细节信息，可参考本指南的其它部分。

有效排查故障的要点

要记住一条原则，您事先需要知道正常情况是什么样，那么您才能判断是否出了问题。实验室中应该做到以下两点，对故障排查会很有帮助：

- **每根新柱都要保留一张测试样品的色谱图** – 从查看随色谱柱一起提供的测试色谱图开始。多数情况下，测试样品都是很容易找到的化学药品，或在实验室中常用，或可以从化学试剂供应商处买到。配制测试样品（各组分的起始浓度 0.1 mg/mL 是一个良好的选择），在您的仪器上用新柱对其分析，然后进行比较。最初的测试样品进样将有助于确定，是否存在妨碍您获得最佳结果的系统问题。有些人更愿意用他们自己的样品或标准品，因为测试混标可能与他们的应用无关。最好使用等度条件，因为有时梯度会“压缩”峰而掩盖不良柱效，使这些峰人为地显得尖锐。一段时间后，将您自己的测试色谱图与这张最初的色谱图进行比较，可以帮助您判断柱效是否降低，或是否有影响柱效的其它变化。用第 5 到 11 页中讨论的公式对柱效、选择性、分离度和压力等参数进行定量分析也是个办法。通过色谱柱的性能对比，可以开始分辨问题的来源。制造厂商的仪器针对测试色谱柱进行了优化以获得最佳的色谱柱性能。因此实际塔板数会比制造厂商提供的测试色谱图的数字要低
- **保留优化仪器的系统图** – 安装仪器并优化方法时，详细记录您的仪器是如何叠放的，所有附件的部件号和所有连接管线的长度，以及所有电子连接。如果有问题时这张图可作为便捷的参考，用以确保配置没有改变，从而改变的是结果或仪器性能

问题	可能的原因	解决办法
压力		
高反压（如需更多信息请参见第 9 页上的压力方程）	色谱柱入口筛板堵塞	反冲色谱柱（见 58 页）
	色谱柱堵塞（化学污染）	用溶剂清洗色谱柱，如果不能改善则更换色谱柱。
	色谱柱粒径太小	参考色谱柱的选择（见 12 页）
	在线过滤器或保护柱堵塞	检查在线过滤器的滤头，必要时更换
	管线堵塞	拆卸管线以便确证，必要时更换
	聚合物色谱柱： 溶剂改变导致溶胀	咨询厂商，了解溶剂兼容性信息
	流动相粘度过高	使用粘度较低的溶剂，或升高温度
	盐/缓冲液沉淀	确保流动相与缓冲液的兼容性
压力波动	泵中有气泡	溶剂脱气（见 70 页）；溶剂中充氦气或使用在线脱气机
	单向阀或密封垫渗漏	更换或清洗单向阀；更换泵密封垫
压力下降或 低压	泵流量不够	放空流动相容器，更换容器中的进样口在线过滤头；检查管线是否被挤压；检查流量设置；全系统检漏
	泵单向阀或密封垫渗漏	更换或清洗单向阀；更换泵密封垫；检查是否有盐析出残留
	泵内有气泡	溶剂脱气；检查溶剂瓶到泵的管路是否阻塞；更换进样口在线滤头
峰形		
无峰	仪器问题	确定所有 HPLC 组件都已开启并运行；检查检测器出口管路是否有液体流出；进样不保留化合物以确保系统适用性；提高溶剂强度或使用梯度洗脱
	流动相或固定相组合错误	
意外峰 或“鬼”峰	在之前分析中未洗脱的分析物	使用快速梯度，如在 10 到 15 分钟的时间内乙腈由 10% 升至 90%，弄清样品中的组分数量及其相对保留。从强流动相开始，如 75% 甲醇和/或更高流速，让组分更快流出色谱柱
	流动相污染	只使用高纯度色谱级及以上的（LC/MS 或梯度级）溶剂。使用内部纯水系统的高纯水。水相流动相中使用 TFA，有机流动相溶剂中使用较低浓度的 TFA（即，水中含 0.1% TFA/乙腈中含 0.086% TFA）；使用更长的检测波长，这样 TFA 的吸收较弱（见 75 页）
	样品制备/样品制备污染	使用降低污染的常用样品制备方法—过滤、SPE、液液萃取、离心等

表 12. 快速故障排查技巧

转下页

问题	可能的原因	解决办法
峰形，续		
意外峰，或“鬼”峰，续	系统污染	<p>进样样品溶剂，确保样品溶剂没有问题；在多次运行过程中进行空白进样，证明没有交叉污染引起的鬼峰</p> <p>从流路中拆除自动进样器，运行空白程序，检查鬼峰是否消失。如果消失，清洗自动进样器。如果没有，再检查流路中的其它系统组件，以查找来源</p>
	色谱柱污染 (注：较少引起鬼峰)	反冲色谱柱（如果可以反冲的话，查看厂商的信息）；清洗色谱柱（见 58 页）
前伸峰	色谱柱沟流	更换色谱柱，使用保护柱
	色谱柱过载	使用更高容量的色谱柱（增加柱长或内径）；减少样品量
拖尾峰	硅醇基相互作用 (硅胶类色谱柱)	使用封端或专用柱；增大缓冲液浓度；降低流动相 pH 以抑制硅醇基相互作用；使用竞争碱；采用改变极性相互作用的衍生化解决方案；如果没有效果，尝试反向运行色谱柱；如果结果改善，则说明很可能是柱污染所致；清洗或更换色谱柱
	柱外效应	检查系统，各部件的连接管线是否过长，并更换为较短管线；如果使用的是高效柱，将内径 0.18 mm 的绿色管线换成内径 0.12 mm 的红色管线
	色谱柱在高温下降解 (硅胶基色谱柱)	将温度降低到 40 °C 以下，特别是使用高 pH 流动相时；使用高温兼容色谱柱，如立体保护的硅胶柱、混合型柱、聚合物柱、氧化铝柱等
	色谱柱在高 pH 下降解 (硅胶类色谱柱)	使用特别适合在较高 pH 下操作的高覆盖率或双交联固定相（比如，ZORBAX Extend-C18），或使用聚合物、混合型或氧化铝反相柱
	色谱柱空洞	反方向运行；如果所有峰的峰形都差或出现双峰，说明可能存在色谱柱空洞；弃用色谱柱
	干扰共洗脱峰	调节流动相以改善选择性（见 69 页）或选择新的固定相，改善样品净化
	干扰组分	通过样品制备净化样品；改变流动相或固定相以调节选择性
峰裂分/双峰	干扰组分	<p>如果怀疑该组分来自以前的进样，分析后用强溶剂冲洗色谱柱；在梯度中增加强溶剂浓度；延长洗脱时间</p>

转下页

问题	可能的原因	解决办法
峰形，续		
峰分裂/双峰， 续	色谱柱筛板部分堵塞	反冲色谱柱（如果可以反冲的话）（见 58 页）；在进样器和色谱柱之间使用 0.2 μm 或 0.5 μm (UHPLC) 在线过滤器；过滤样品使用保护柱（见 117 页）
	色谱柱空洞	更换色谱柱；以后使用保护柱以保护分析柱（见 117 页）；使用较少凝聚的流动相条件
	进样溶剂效应	使用流动相或较弱的进样溶剂（见 46 - 47 页）
	样品体积过载	使用较小的样品进样体积（见 46 页）
	样品溶剂与流动相不兼容	使用流动相或与进样溶剂相容的较弱溶剂
	进样器转子损坏	更换进样器转子
峰展宽/宽峰	接头/连接不合适	确保您的接头正确安装（见 45 页）
	系统中的管线外体积	确保管线细并尽量短，避免柱外体积（见 41 页）
	进样体积过大	降低进样体积（见 46 页）
	系统设置 (比如，数据采集速率过低)	检查数据采集速率。调节检测器设置和/或时间常数，在不降低信噪比的情况下用最快的采集速率（见 47 页）
	样品稀释度过高	降低稀释强度（见 47 页）
	对于梯度洗脱：驻留体积	降低初始梯度浓度，以进行峰浓缩，或者在样品进样前使用进样器程序开始梯度（见 49 页）。注意峰是在梯度阶段被洗脱出来而不是等度洗脱的
保留		
保留时间漂移	色谱柱逐渐陈旧	与测试色谱图（见 122 页）进行比较，发现色谱柱的变化；使用保护柱以延长柱寿命
	色谱柱规格和流速变化	确保您的方法参数根据流速和柱规格的变化（见 36 - 37 页）而调节。这对于梯度洗脱尤为重要
	对您的分析物而言色谱柱/流动相的搭配不对（对于键合相保留太低，pH 过于接近 pK_a ，色谱柱的 pH 范围与流动相的不兼容等）	您的流动相很可能不能保持一致。确保您每次使用的流动相都是一样的 — 缓冲液和溶剂应该分别用于干净的玻璃器皿测量，然后混合；流动相脱气；更换老化流动相（见 79 - 82 页）
	对于流动相：色谱柱的再平衡时间不够	对您柱的死体积和系统的驻留体积进行测量，以便优化平衡时间和方法（见 56 和 83 页）

转下页

问题	可能的原因	解决办法
保留，续		
保留时间缩短	色谱柱填料的活性位点	使用流动相改性剂，竞争碱（碱性化合物，如三乙胺）或增加缓冲液强度，使用高覆盖率的柱填料
	样品过载	减少样品量或使用较大内径或更长的色谱柱
	键合相或硅胶基流失	使用 pH 2 到 8 之间的流动相；使用高 pH 或低 pH 专用硅胶柱，聚合物柱或其它高/低 pH 柱
	色谱柱老化	使用保护柱，或高稳定性键合相聚合物、混合型或高稳定性柱（如，氧化锆、钛、石墨碳）
保留时间延长	流速降低	检查并重新设置流速；检查泵是否有气泡；检查泵密封垫是否渗漏，以及单向阀和其它系统渗漏
	流动相组成改变	补足溶剂瓶；确保梯度系统比例正确；预混合流动相进行等梯度洗脱（见 69 页）
	键合相流失	对于常用硅胶型色谱柱，要保持流动相 pH 在 2-8 之间；对于极高 pH (> 10) 或极低 pH (< 2) 的工作，使用高稳定性固定相，聚合物或高稳定性固定相柱
基线		
基线漂移	对于梯度洗脱：流动相 A 或 B 的吸收不同	对于负漂移：使用无 UV 吸收的流动相溶剂；使用色谱级流动相溶剂；把流动相 A 中的 UV 吸收添加剂加至流动相 B 中，用于平衡/补偿漂移
		对于正漂移：使用分析物仍有吸收的更高 UV 吸收检测器波长；使用无 UV 吸收的流动相溶剂；减少流动相 B 中 UV 吸收化合物的量，用以平衡/补偿漂移（见 75 页）
	波动 — 室温变化	隔离色谱柱或使用柱温箱；遮蔽示差折光检测器或使其隔绝空气流
	正向 — LC/MS，固定相流失	使用低流失、MS 兼容或高稳定性固定相色谱柱
	正向 — MS 污染	清洗质谱接口，避免使用 THF 和含卤素溶剂，使用 PEEK 管线柱
	色谱柱污染（色谱柱流失）	用强溶剂冲洗色谱柱；改善样品净化；使用/更换保护柱；更换分析柱
	对于持续性问题：检查检测器光源或流通池	
	更换 UV 灯；清洁并冲洗流通池	

转下页

问题	可能的原因	解决办法
基线，续		
基线漂移，续	梯度或等度：缺乏溶剂混合	使用适当混合装置；通过将一种含 UV 吸收的化合物加入溶剂并监测 UV 吸收检测器的输出，检查比例阀精密度
	梯度或等度比例 — 比例阀故障	清洗并更换比例阀；部分地预混合溶剂（如，A 中含 5% B，和/或反之亦然）
	偶然尖峰 — 外部电信号干扰	LC 系统使用稳压器/恒电压电源；检查是否有局部干扰源，如，循环炉，使用独立电流
	周期性 — 泵脉冲	维修或更换阻尼器；排除泵中的空气；清洁或更换单向阀；流动相脱气
	随机 — 积聚污染	用强溶剂（见 58 页）冲洗或反冲色谱柱（如果可以反冲的话）；净化样品；使用色谱级溶剂
	尖刺峰 — 检测器中的气泡	流动相脱气（见 70 页）；检测器出口处使用反压限流器；确保所有接头都紧密无渗漏（见 44 页）

有用的参考资料

这里还有一个您随身携带这本书的理由

我们列出了一些对方法开发有用的表格：

- 美国药典指定填料
- 溶剂性质表，包括极性指数值和 UV 截止波长
- 溶剂相溶性表
- 常用流动相改性剂的 UV 截止波长
- 固相萃取 (SPE) 填料概况
- SPE 吸附剂使用条件

美国药典指定填料

美国药典 (USP) 指定色谱柱填料，而不是生产厂家。在大多数规定中，都列出了几种不同类型的色谱柱，具有不同粒径、不同填料颗粒形状，可能还有碳载量或比表面积。在这些例子中，USP 色谱柱性能指标相当宽泛，几种柱类型都能符合其基本性能指标。例如，L1 性能指标要求十八烷基硅烷化键合到多孔硅胶、陶瓷微粒（直径 1.5 到 10 μm ）或整体柱上。

许多商品化的色谱柱都符合这些基本性能指标，但可能采用不同类型的填料，包括全多孔型、表面多孔型和整体型。但是，并非所有 C18 柱都相同，实际上只有有限的几种 C18 柱能够进行要求的分离。为了提高柱效和分离度，我们推荐球形、全多孔或表面多孔 1.5-3.5 μm 直径填料。USP 特意让您能灵活决定能满足需要的最好色谱柱（表 11）。

美国药典指定填料 (12/2010)

USP 方法	USP 填料	色谱柱	粒径 (μm)	孔径 (Å)
L1	十八烷基硅烷化学键合到多孔硅胶、陶瓷微粒（直径 1.5 到 10 μm）或整体柱上	Poroshell 120 EC-C18	2.7	120
		Poroshell 120 SB-C18	2.7	120
		Poroshell HPH-C18	2.7	100
		ZORBAX Eclipse Plus C18	1.8, 3.5, 5	95
		ZORBAX Eclipse XDB-C18	1.8, 3.5, 5, 7	80
		ZORBAX SB-C18	1.8, 3.5, 5, 7	80, 300
		ZORBAX Rx-C18	3.5, 5	80
		ZORBAX Extend-C18	1.8, 3.5, 5, 7	80, 300
		ZORBAX ODS	3.5, 5, 7	70
		ZORBAX ODS Classic	5	70
		ZORBAX 300SB-C18		
		ZORBAX 300 Extend C18		
		AdvanceBio 肽谱分析色谱柱		
		AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱		
		Pursuit XRs C18	3, 5, 10	100
		Pursuit C18	3, 5, 10	200
		Polaris C18-A	3, 5, 10	180
		Polaris C18-Ether	3, 5	200
		SepTech ST60 C18	10	60
		SepTech ST150 C18	10	150
L3	5 到 10 μm 直径多孔硅胶颗粒，或整体硅胶柱	ZORBAX SIL	5	70
		ZORBAX Rx-Sil	3.5, 5	80, 300
		Pursuit XRs Si	3, 5, 10	100
		Polaris Si-A	5, 10	180

表 13. 美国药典指定的填料和安捷伦色谱柱

转下页

美国药典指定填料 (12/2010)

USP 方法	USP 填料	色谱柱	粒径 (μm)	孔径 (Å)
L7	辛基硅烷化学键合到 1.5 到 10 μm 直径的全多孔硅胶颗粒或整体硅胶柱上	Poroshell 120 EC-C8	2.7	120
		Poroshell 120 SB-C8	2.7	120
		Poroshell HPH-C8	2.7	100
		ZORBAX Eclipse Plus C8	1.8, 3.5, 5	95
		ZORBAX Eclipse XDB-C8	1.8, 3.5, 5, 7	80
		ZORBAX SB-C8	1.8, 3.5, 5, 7	80, 300
		ZORBAX Rx-C8	1.8, 3.5, 5, 7	80
		ZORBAX C8	5	70
		Pursuit XRs C8	3, 5, 10	100
		Pursuit C8	3, 5, 10	200
		Polaris C8-A	3, 5	180
		Polaris C8-Ether	3, 5	200
		ZORBAX 300SB-C8		
		AdvanceBio RP-mAb SB-C8		
L8	氨基硅烷单分子层形式化学键合到全多孔硅胶载体上, 粒径为 3 到 10 μm	ZORBAX NH2	5	70
		Polaris NH2	5	180
L9	具有化学键合的、强酸性阳离子交换涂层的 3 到 10 μm 不规则全多孔硅胶	ZORBAX SCX	5 球形	300
L10	腈基化学键合到多孔硅胶颗粒, 粒径为 3 到 10 μm	ZORBAX CN	5	70
		ZORBAX SB-CN	3.5, 5, 7	80, 300
		ZORBAX 300SB-CN		
		ZORBAX Eclipse XDB-CN	3.5, 5	80
		Poroshell 120 EC-CN	2.7	120
L11	苯基化学键合到多孔硅胶颗粒, 粒径为 1.5 到 10 μm	ZORBAX Eclipse XDB 苯基	5	70
		ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基	1.8, 3.5, 5	95
		ZORBAX SB 苯基	3.5	80
		ZORBAX 300 二苯基	1.8	300
		Poroshell 120 苯基-己基	2.7	120
		Pursuit XRs 二苯基	3, 5, 10	100
		Pursuit 二苯基	3, 5, 10	200

转下页

美国药典指定填料 (12/2010)

USP 方法	USP 填料	色谱柱	粒径 (μm)	孔径 (Å)
L13	三甲基硅烷化学键合到多孔硅胶颗粒, 粒径 3 到 10 μm	ZORBAX TMS	5	70
L14	具有化学键合的、强碱性季铵盐阴离子交换涂层的硅胶, 粒径为 5 到 10 μm	ZORBAX SAX	5	70
		IonoSpher A	5	120
L17	以氢形式存在的磺化交联的聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物组成的强阳离子交换树脂, 粒径为 7 到 11 μm	Hi-Plex H	8	N/A
		Bio SCX NP10		
L19	以钙形式存在的磺化交联的苯乙烯-二乙烯基苯共聚物组成的强阳离子交换树脂, 粒径为 9 μm	Hi-Plex Ca	8	N/A
		Hi-Plex Ca (Duo)	8	N/A
L20	二羟基丙烷化学键合到多孔硅胶颗粒上, 粒径为 3 到 10 μm	LiChrospher Diol	5	N/A
L21	刚性球形聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物, 粒径为 5 到 10 μm	PLRP-S	3, 5, 8, 10, 10-15, 15-20, 50	100
		PLRP-S	3, 5, 8, 10, 10-15, 15-20, 50	300
		PLRP-S	5, 8, 10, 30, 50	1000
		PLRP-S	5, 8, 10, 30, 50	4000
		PLgel	3, 5, 10, 20	50, 100, 500, 103, 104, 105, 106, MIXED
L22	由具有磺酸基的多孔聚苯乙烯凝胶制成的阳离子交换树脂, 粒径约为 10 μm	Hi-Plex H	8	N/A

转下页

美国药典指定填料 (12/2010)

USP 方法	USP 填料	色谱柱	粒径 (μm)	孔径 (Å)
L25	填料具有分离分子量范围 1000 到 5000 道尔顿化合物的能力 (按照使用环氧乙烷所测定), 适用于中性、含阴离子和阳离子型水溶性聚合物。填料以聚甲基丙烯酸酯树脂为载体, 交联聚羟基醚 (表面含一些羧基官能团)	PL aquagel-OH	5, 8	30
L26	AdvanceBio RP-mAb C4			
L33	具有分离 4000 到 500000 da 分子量范围蛋白质的能力。为球形硅胶基, 经处理后可提供 pH 稳定性	ZORBAX GF-250	4	150
		Bio SEC-3	3	100, 150, 300
		Bio SEC-5	5	100, 150, 300, 500, 1000, 2000
		ProSEC	5	300
L34	以铅形式存在的磺化交联的苯乙烯-二乙烯基苯共聚物组成的强阳离子交换树脂, 粒径为 9 μm	Hi-Plex Pb	8	N/A
L35	氧化锆稳定化的球形硅胶材料, 具有亲水性 (二醇类) 分子单层键合固定相, 孔径 150Å	ZORBAX GF-250	4	150
		ZORBAX GF-450	6	300
L43	五氟苯酚基化学键合到硅胶填料颗粒上, 粒径为 5 到 10 μm	Pursuit PFP	3, 5	200
		Poroshell 120 PFP	2.7	120
L45	β-环糊精键合到多孔硅胶颗粒上, 粒径 5 到 10 μm	ChiraDex Chiral	5	100
L50	具有反相保留和强阴离子交换功能的多功能树脂。该树脂由乙烯基苯与 55% 的二乙烯基苯交联而成的共聚物, 粒径 3 到 15 μm, 比表面积不小于 350 m ² /g。基质是具有季胺官能团涂层的乳胶填料颗粒。乳胶颗粒由含聚苯乙烯交联二乙烯基苯交联而成	ZORBAX 300SCX	5	300

转下页

美国药典指定填料 (12/2010)

USP 方法	USP 填料	色谱柱	粒径 (μm)	孔径 (Å)
L52	由具有磺丙基的多孔硅胶制成的弱阳离子交换树脂, 粒径为 5 到 10 μm	IonSpher C	5	120
L53	由使用二乙烯基苯 55% 交联的乙基乙烯基苯共聚物组成的弱阳离子交换树脂, 粒径 3 到 15 μm。基质表面接羧酸和/或磷酸功能基化单体。容量不低于 400 μEq/柱	Bio SAX	3, 5, 10	300
L56	丙基硅烷化学键合到全多孔硅胶颗粒上, 粒径 3 到 10 μm	ZORBAX SB-C3	1.8, 3.5, 7	80, 300
		ZORBAX 300 SB-C3		
L57	手性识别蛋白 (卵类粘蛋白), 化学键合到硅胶颗粒, 粒径 5 μm, 孔径 120Å	Ultron ES-OVM	5	120
L58	以钠形式存在的磺化交联的苯乙烯-二乙烯基苯共聚物组成的强阳离子交换树脂, 粒径 6 到 30 μm	Hi-Plex Na	10	N/A
		Hi-Plex Na (Octo)	8	N/A
L60	球形多孔硅胶, 10 μm, 表面用烷基酰胺进行了共价修饰和封端	Bonus-RP	1.8, 3.5, 4.6, 5	80
		Poroshell 120 Bonus-RP	2.7	120
		Polaris Amide-C18	3, 5	180
L68	糖谱分析色谱柱	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	2.7, 1.8	N/A

溶剂相溶性

对于液相色谱分析，了解各种溶剂的相溶性非常重要，因为，如果系统中使用不兼容的溶剂，可能会得到不可靠的色谱结果。相溶性是指一种溶液与另一种溶液按任意比例混合成为新的均匀溶液的能力。

对于有机化合物，溶剂的极性决定了什么类型的化合物可以溶解在其中，并可以与何种其它溶剂或液体化合物相溶。通常，极性溶剂最好溶解极性化合物，非极性溶剂最好溶解非极性化合物：“相似者相溶”。因此，水（强极性）和己烷（强非极性）不能彼此混溶，充分振摇以后也会迅速分成两层。

对于无机化合物，碳链长度常常决定其相对于同系物的相溶性。例如，在醇类中，乙醇有两个碳原子，可以与水混溶，而丁醇有四个碳原子，则不能与水混溶。

常用 HPLC 溶剂的性质

溶剂	粘度 (20°C 下 cP)	沸点 (°C)	UV 截止波长 (nm)	极性指数 (P')	相溶数 (M)
丙酮	0.36	56.29	330	5.1	15, 17
乙腈	0.38*	81.60	190	5.8	11, 17
乙酸正丁酯	0.74	126.11	254	4.0	22
正丁醇	2.98	117.50	215	3.9	15
正氯丁烷	0.45	78.44	220	1.0	
氯苯	0.80	131.69	287	2.7	21
氯仿	0.57	61.15	245	4.1	19
环己烷	1.00	80.72	200	0.2	28
环戊烷	0.44	49.26	198	0.1	
邻-二氯苯	1.32**	180.48	295	2.7	
二氯甲烷	0.44	39.75	233	3.1	20
二甲基乙酰胺	2.14	166.10	268	6.5	
N,N-二甲基甲酰胺	0.92	153.00	268	6.4	12
二甲基亚砷	2.24	189.00	268	7.2	9
1,4-二噁烷	1.37	101.32	215	4.8	17
乙酸乙酯	0.45	77.11	256	4.4	19
乙醇	1.10	78.32	210		
乙醚	0.24	34.55	215	2.8	23
二氯乙烯	0.79	83.48	228	3.5	
庚烷	0.42	98.43	200	0.1	29

表 14. 溶剂特性

转下页

常用 HPLC 溶剂的性质

溶剂	粘度 (20°C 下 cP)	沸点 (°C)	UV 截止波长 (nm)	极性指数 (P')	相溶数 (M)
己烷	0.31	68.70	195	0.1	29
异辛烷	0.50	99.24	215	0.1	29
异丁醇		107.70	220	4.0	15
异丙醇	2.40	82.26	205	3.9	15
十四酸异丙酯		192.60			
甲醇	0.59	64.70	205	5.1	12
甲基叔丁基醚	0.27	55.20	210	2.5	
甲乙酮	0.43	79.64	329	4.7	17
甲基异丁基酮	0.58	117.40	334	4.2	
N-甲基吡咯烷酮	1.67**	202.00	285	6.7	
戊烷	0.23	36.07	190	0.0	
石油醚				0.1	
正丙醇	2.30	97.20	210	4.0	
丙烯酸酯		241.70	220	6.1	
吡啶	0.95	115.25		5.3	16
四氢呋喃	0.55	66.00	212	4.0	17
甲苯	0.59	110.62	284	2.4	23
1, 2, 4-三氯苯		213.50	308		
三乙胺	0.36**	89.50			
三氟乙酸	0.93	71.80	210		
水	1.00	100.00	190	10.2	
邻-二甲苯	0.81	144.41	288	2.5	

* 15 °C下cP

** 25 °C下cP

缺失值表示没有检测数据

相溶 (M) 数:

1. M 数相差 15 个单位或以下的所有溶剂对，在 15 °C下能够以任意比例混溶
2. M 数相差 16 的每对溶剂在 25 到 75 °C之间，通常为 50 °C，形成临界溶液
3. 相差 17 或更多的溶剂不混溶，或在 75 °C 以上形成临界溶液

本图表由 Honeywell Burdick & Jackson 提供, www.honeywell.com/contactbandj

溶剂相溶性表

	丙酮	乙腈 (ACN)	正丁醇	氯仿	环己烷	二氯甲烷 (DCM)	N,N-二甲基酰胺	二甲基亚砷 (DMSO)	1,4-二噁烷	乙酸乙酯	乙醇	乙醚	二氯乙烯	庚烷	己烷	异辛烷	异丙醇 (IPA)	甲醇	甲基叔丁基醚	甲乙酮	戊烷	四氢呋喃 (THF)	甲苯	水	邻二甲苯
丙酮																									
乙腈 (ACN)																									
正丁醇																									
氯仿																									
环己烷																									
二氯甲烷 (DCM)																									
N,N-二甲基酰胺																									
二甲基亚砷 (DMSO)																									
1,4-二噁烷																									
乙酸乙酯																									
乙醇																									
乙醚																									
二氯乙烯																									
庚烷																									
正己烷																									
异辛烷																									
异丙醇 (IPA)																									
甲醇																									
甲基叔丁基醚																									
甲乙酮																									
戊烷																									
四氢呋喃 (THF)																									
甲苯																									
水																									
邻二甲苯																									

不相溶相溶

表 15. 溶剂相溶性

本表中将两种溶剂能以任意比例混合在一起不分层，归为相溶。表中信息由 Honeywell Burdick & Jackson 提供，如有问题请联系 B&J www.honeywell.com/contactbandj。

流动相改性剂的 UV 截止波长

流动相改性剂的选择需要达到各种需求之间的平衡。分析溶液的稳定 pH 是否在色谱柱的安全范围内，并且还能适当控制离子化（通过离子抑制、离子对或两者结合）？是否对检测器性能没有明显干扰，包括不同的挥发性、MS 离子抑制和 UV 透光性？现在的问题是符合要求的改性剂很少，要提高特定分析物的选择性，经常需要分析人员尝试各种固定相（除了常用的烷基键合固定相，如 C8 和 C18 之外，还有内嵌极性基团、烷基苯基、氟取代 RP 等）。

下表提供了常用 HPLC 流动相改性剂的 UV 截止波长。

	v/v	25 °C 下 pK _a	最大 pH 范围	UV 截止波长 (nm)
三氟醋酸(TFA)	0.1%	0.3		210
	0.05%	0.3		210
	0.01%	0.3		210
磷酸盐, pK ₁		2.1	1.1 – 3.1	< 200
磷酸盐, pK ₂		7.2	5.2 – 8.2	< 200
磷酸盐, pK ₃		12.3	11.3 – 13.3	< 200
柠檬酸盐, pK ₁		3.1	2.1 – 4.1	230
柠檬酸盐, pK ₂		4.7	3.7 – 5.7	230
柠檬酸盐, pK ₃		6.4	5.4 – 7.4	230
碳酸盐, pK ₁		6.1	5.1 – 7.1	< 200
碳酸盐, pK ₂		10.3	9.3 – 11.3	< 200
甲酸盐		3.8	2.8 – 4.8	210 (10 mM)
醋酸 (HAC)	1.0%	4.8	3.8 – 5.8	210
醋酸盐		4.8	3.8 – 5.8	210 (10 mM)
氨水		9.2	8.2 – 10.2	200 (10 mM)
硼酸盐		9.2	8.2 – 10.2	n/a
三乙胺 (TEA)		10.8	9.8 – 11.8	< 200
TRIS-HCl		8.3	7.3 – 9.3	205 (120 mM)

阴影部分表示 LC/MS 应用中常用的缓冲液。

表 16. 常用流动相改性剂的 UV 截止波长

固相萃取吸附剂



分离机理	典型固定相	结构
无机（吸附）	氧化铝	AlOH
	Florisil	Mg ₂ SiO ₃
正相（极性键合相 — 硅胶基）	硅胶	Si-OH
	氰基	-CN
	氨基	-NH ₂
	二醇	-CH(OH)-CH(OH)-
反相（非极性键合相 — 强疏水性 — 硅胶基）	十八烷基硅氧烷 (C18)	(-CH ₂ -) ¹⁷ CH ₃ ,
	辛基硅氧烷 (C8)	(-CH ₂ -) ₇ CH ₃
反相（非极性键合相 — 中等疏水性 — 硅胶基）	环己基	
	苯基	
反相（非极性键合相 — 弱疏水性 — 硅胶基）	乙基 (C2)	-C ₂ H ₅
	甲基 (C1)	-CH ₃
聚合物型反相（经亲水修饰）	PS-DVB	PS-DVB
	DVB	DVB
WAX（弱阴离子交换）	氨基	(-CH ₂ -) ₃ NH ₂
	1°, 2°-氨基	(-CH ₂ -) ₃ NHCH ₂ CH ₂ NH ₂
SAX（强阴离子交换）	季铵	(-CH ₂ -) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃
WCX（弱阳离子交换）	羧酸	(-CH ₂ -) ₃ COOH
SCX（强阳离子交换）	烷基磺酸	(-CH ₂ -) ₃ SO ₃ H
	芳香族磺酸	SO ₃ H

表 17. 固相萃取 (SPE) 固定相概况

SPE 吸附剂条件

分离机理	用于以下分析物:	载样溶剂	洗脱溶剂
无机 (吸附)	弱极性到中等极性	弱极性 (P'), 例如正己烷、 CHCl ₃	强极性 (P'), 例如甲醇、 乙醇
正相 (极性键合相 — 硅胶基)	中等极性到强极性	弱极性, 例如正己烷、 CHCl ₃	强极性, 例如甲醇、乙醇
反相 (非极性键合相 — 强疏水性 — 硅胶基)	疏水性 (完全非极性)	强极性, 例如 H ₂ O、 CH ₃ OH/H ₂ O、CH ₃ CN/H ₂ O	弱极性, 例如正己烷、 CHCl ₃
反相 (非极性键合相 — 中等疏水性 — 硅胶基)	中等非极性	强极性, 例如 H ₂ O、 CH ₃ OH/H ₂ O、CH ₃ CN/H ₂ O	中等极性, 例如二氯甲烷、 乙酸乙酯
反相 (非极性键合相 — 弱疏水性 — 硅胶基)	弱极性到中等非极性	强极性 (例如 H ₂ O) 到中 等极性 (例如乙酸乙酯)	强极性, 例如乙腈、甲醇
聚合物型反相 (经亲水修饰)	酸性、碱性、中性	水或缓冲液	强极性, 例如乙腈、甲醇
WAX (弱阴离子交换)	离子型 (可离子化)、 酸性	水或缓冲液 (pH 约为 1-2)	A. 碱性有机溶剂 B. 吸附剂为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液
SAX (强阴离子交换)	离子型 (可离子化)、 酸性	水或缓冲液 (pH = pK _a - 2)	A. 采用有机溶剂配制的缓 冲液 (pH = pK _a - 2) B. 分析物为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液
WCX (弱阳离子交换)	离子型 (可离子化)、 碱性	水或缓冲液 (pH 约为 6-7)	A. 酸性有机溶剂 B. 吸附剂或分析物为中性 时的 pH C. 高离子强度缓冲液
SCX (强阳离子交换)	离子型 (可离子化)、 碱性	水或缓冲液 (pH = pK _a + 2)	A. 采用有机溶剂配制的缓 冲液 (pH = pK _a + 2) B. 分析物为中性时的 pH 值 C. 高离子强度缓冲液

表 18. SPE 吸附剂条件指南

其它推荐的读物

色谱样品前处理的基本知识, 安捷伦科技公司 2013 年, 出版号 5991-3326CHCN

Snyder, Lloyd R, Kirkland, Joseph J. and Dolan, John W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (现代液相色谱导论), John Wiley & Sons Inc., 2010. 第三版。

An Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography (凝胶过滤色谱与体积排阻色谱导论), 安捷伦科技公司, 2011, 出版号 5990-6969EN。

Meyer, Veronika R., *Practical High-Performance Liquid Chromatography* (实用高效液相色谱法)。第四版, John Wiley & Sons, Inc., 1999。

Snyder, Lloyd R. and Dolan, John W., *High-Performance Gradient Elution* (高效梯度洗脱), John Wiley & Sons, Inc., 2007。

Snyder, Lloyd R. Kirkland, Joseph J. and Glajch, Joseph L., *Practical HPLC Method Development* (实用 HPLC 方法开发), John Wiley & Sons, Second Edition, 1997。

Cunico, Robert L.; Gooding, Karen M. and Wehr, Tim, *Basic HPLC and CE of Biomolecules* (生物分子的 HPLC 和 CE 分析基础导论), Bay Bio 分析柱 Laboratory, Inc., 1998。

Neue, Uwe D., *HPLC Columns: Theory, Technology and Practice* (HPLC 色谱柱: 理论、技术与实践), John Wiley & Sons, Inc., 1997。

其它安捷伦资源

以下介绍一些获取更多信息的好去处:

资源	详细介绍
液相色谱柱和样品前处理导航器	一款互动的在线工具, 可为您的应用提供最佳的液相色谱柱和样品制备产品建议。 www.agilent.com/chem/navigator
LC 方法转换器	这款在线工具帮助您在柱长、柱内径、系统流速等因素改变时, 快速计算方法中相应因子的调整。对准确调节梯度方法尤为有用。请访问 www.chem.agilent.com , 并搜索“LC Method Translator (LC 方法转换器)”。
LC 流速计算器应用程序	如果您有一部智能手机, 将可以在其中安装免费的应用程序, 让您根据方法的其他变化调整流速。登录 www.agilent.com/chem/lcapp 查找该应用程序。
Agilent CrossLab 选择工具	仅需要回答在线工具上的几个问题, 我们便可以针对您的非安捷伦仪器, 推荐最佳的消耗品。 www.agilent.com/chem/SelectCrosslab
样品瓶选择向导	产品选择如此之多, 要想为您的应用选择匹配的样品瓶、瓶盖、隔垫将费时又费力。使用该互动工具可使这一过程简单无比。 www.agilent.com/chem/SelectVials
注射式过滤器选择指南	使用该工具, 可快速简便地选择适合您应用的注射式过滤器。 www.agilent.com/chem/SelectFilters
www.agilent.com/chem/Ictroubleshooting	我们根据本指南制作了一系列视频说明其中某些要点, 过一段时间, 我们还将添加新的其它视频。

表 19. 其它安捷伦资源

词汇表

A

a: 见分离因子。

A solvent (溶剂 A): 通常指二元洗脱或梯度洗脱分离中较弱的溶剂。在反相液相色谱 (LC) 中, 溶剂 A 一般为水或含水量较大的混合物。

A term (A 项): van Deemter 方程中的第一项。参见涡流扩散项和 van Deemter 方程。

Accurate mass (精确质量): 在适当的准确度和精度水平下, 经实验测定而得的离子质量数, 可用于确定或限定离子对应的分子式。

Adapter (适配接头): 每端螺纹不同的两通接头; 通常用于将两种不同类型的管线连在一起。

Absorption (吸附): 保留的过程, 其中溶质分配到液体状态的表层中。

Activity (活性): 吸附色谱填料表面的相对强度。对硅胶来说, 硅醇基越多, 表面活性越强。可以通过加水或其它极性改性剂与活性位点发生氢键结合, 对活性进行控制, 使表面活性降低。

Additive (添加剂): 添加到流动相中改善分离或检测特征的物质; 例如, 掩蔽硅醇基作用的竞争性碱、封闭金属位点的螯合剂, 或用于间接光度检测的 UV 吸收化合物等。

Adjusted retention time (t_R') (调整保留时间 t_R'): 扣除滞留时间后的保留时间: $t_R' = t_R - t_M$, 其中 t_R 为保留时间, t_M 为滞留时间 (不保留的小分子化合物完全通过各孔隙从色谱柱中被洗脱出来所用的时间)。

Adjusted retention volume (V_R') (调整保留体积 V_R'): 扣除滞留体积后的保留体积: $V_R' = V_R - V_M$, 其中 V_R 为目标峰的保留体积, V_M 为滞留体积 (相对于色谱柱中流动相总体积的体积)。参见死体积和滞留体积。

Adsorbent (吸附剂): 吸附色谱所用的填料。硅胶和氧化铝是高效液相色谱 (HPLC) 中最常用的吸附剂。

Adsorption (吸附): 溶质与吸附剂表面发生相互作用的保留过程。其作用力可以是强作用力 (氢键) 或弱作用力 (范德华力)。对于硅胶, 硅醇基是吸附的驱动力, 任何溶质官能团都可以与该基团发生相互作用, 而保留在硅胶上。吸附主要发生在表面, 而不是渗透或嵌入到固定相涂层内部, 或键合到表面。

Adsorption chromatography (吸附色谱): 一种吸附发生在活性固体表面而影响分离的基本 LC 模式。硅胶和氧化铝是最常用的正相吸附剂, 分子通过其极性官能团与填料表面官能团的相互作用而被保留, 例如, 硅醇基。碳在反相模式中也被用作吸附剂。

Adsorption isotherm (吸附等温线): 吸附色谱中, 单位体积流动相中的样品浓度与单位重量固定相中的浓度之比。吸附等温线的形状可以决定溶质的色谱行为; 例如, 拖尾峰、前伸峰和色谱柱过载。

Aerogel (气凝胶): 在制备过程中, 从凝胶系统中去除分散溶剂后不会使硅胶结构塌陷的一种填料。体积排阻色谱 (SEC) 中使用的硅胶和玻璃珠即为气凝胶的实例, 即使在 HPLC 的高压下仍能保持其结构。可参见干凝胶。

Affinity chromatography (亲和色谱): 将特异性配体——比如酶、抗体或激素——与固体基体或载体偶联, 从而能够提供特异生物吸附的技术。这种固定配体只和能与之选择性结合的分子发生作用。未结合的分子将被不保留洗脱出去。然后保留的化合物将以纯化状态被洗脱。亲和色谱一般为一种开-关式分离技术。

Agarose (琼脂糖): 一种在生物色谱中作为分离介质的高分子量多糖。在凝胶过滤色谱中常以珠状形式存在, 使用水相流动相。

Alkoxysilane (硅氧烷): 化学键合相制备中使用的一种反应物。可与硅胶进行下列反应: $R_3SiOR + \equiv SiOH \rightarrow \equiv Si-OSiR_3 + ROH$, 其中 R 为烷基。

Alumina (氧化铝): 吸附色谱中使用的一种正相吸附剂。氧化铝为多孔吸附剂, 具有弱碱性表面; 也可以进行中性和酸性改性。碱性氧化铝比硅胶更有优势, 后者具有酸性表面。

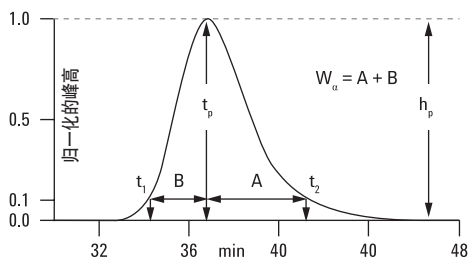


图 79. 拖尾峰实例 (经参考文献 3 允许进行修改)

Amino phase (氨基固定相): 正相键合相色谱中使用的丙胺基固定相。可与某些溶质分子 (如, 醛类) 或可与胺发生反应的流动相添加剂产生相互作用。氨基固定相有几种用途: 作为弱阴离子交换剂, 也可以用水-乙腈为流动相分离碳水化合物等。这是一种相对不稳定的固定相。

Amphoteric ion exchange resin (两性离子交换树脂): 既带阳离子基团又带阴离子基团的离子交换树脂。这类树脂主要用于离子阻滞, 所有离子型物质都可以从溶液中去除, 因为该树脂上同时存在阴离子和阳离子的功能基。

Analyte (分析物): 经由 HPLC 色谱柱进样并被洗脱的目标待测化合物。

分析柱 Column (分析柱): 用于定性和定量分析的 HPLC 色谱柱; 一般分析柱为 4.6 mm 内径 \times 50 - 250 cm (柱长), 但也有更窄内径 (低至 0.05 mm 内径) 的分析柱; 可用不锈钢、玻璃、玻璃内衬不锈钢、PEEK 和其它金属和非金属材料制成。

Anion exchange (阴离子交换): 分离阴离子的离子交换过程。合成树脂、键合相硅胶和其它金属氧化物都可以用于这种模式的分析。典型的阴离子交换功能基是四烷基季铵盐, 为强阴离子交换剂。而键合固定相上的氨基是弱阴离子交换的一个例子。

Asymmetry (不对称性): 描述色谱峰形的因子。色谱理论认为高斯分布的峰为对称峰。定量测定峰不对称因子, 在峰高 10% 处, 色谱峰顶点到色谱峰后沿的距离与峰顶点到色谱峰前沿的距离之比。不对称性还有其它常用测量方法, 特别是美国药典 (USP) 方法。见图 80, 还可参见 *Foley-Dorsey 方程*。

Asymmetry factor (不对称因子): 表示峰形的因子。不对称因子的计算方法是, 从色谱峰顶点作垂线, 与峰高 10% 处的水平线相交; 交点处沿水平线到峰尾的距离 (距离 B), 除以交点处沿水平线到峰前沿的距离 (距离 A), 得到的比值称为峰不对称因子 (见图 79)。该比值为 1 代表对称峰, 小于 1 为伸舌峰, 大于 1 为拖尾峰。该值越大, 峰的对称性越差, 大于 2 以上为不合格。

Atmosphere (atm) (大气压 (atm)): 通过 HPLC 柱的压力降数值; 1 atm = 14.7 lb/英寸² (psi)。可参见 *bar* 和 *pascals*。

Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) (大气压化学电离 (APCI)):

Atmospheric pressure photo ionization (APPI) (大气压光电离 (APPI)):

Atomic mass (原子质量): 原子的质量, 以 amu (原子质量单位) 测量, 该单位定义为基态碳-12 原子的质量的十二分之一。

B

β : 参见 *相比*。

B_0 : 参见 *渗透性*。

B solvent (B 溶剂): 通常指二元洗脱或梯度分离中较强的溶剂; 一般为反相 LC 中的有机改性剂或富含改性剂的二元混合物 (与水混合)。

B term (B 项): van Deemter 方程中的第二项。也可参见 *纵向扩散* 和 *分子扩散项*。

Backflushing (反冲): 一种柱切换技术, 在进样器和色谱柱之间有一个四通阀, 流动相可以向两个方向流动。使用反冲洗脱柱头上的强驻留化合物。可以对这些化合物进行分析, 也可以只是将其从色谱柱中除去。

Backpressure (反压): 同 *柱头压*、*柱压*。

Backpressure regulator (反压调节器): 置于检测器之后的在线设备, 其作用是使流通池保持正压, 最大限度地减少检测器中溶剂气泡溢出的问题。

Band (谱带): 指流经并最终洗脱出色谱柱的色谱峰。

C4, C8, C18, etc (C4, C8, C18 等): 指反相键合相的烷烃链长度。

Cs: 参见 *Langmuir* 等温线。

Capacity (容量): 参见 *样品容量*。

Capacity factor (k') (容量因子 k'): 色谱参数的旧术语是说明保留的参数。现在由 *国际提纯和应用化学联盟 (IUPAC)* 定义为保留因子(k)。参见 *保留因子* 的计算方法。

Capillary column (毛细管柱): 指内径小于 0.5 mm 的色谱柱。

Capillary electrochromatography (CEC) (毛细管电色谱 CEC): 在毛细管柱内填充色谱吸附剂, 由电渗流而不是压力驱动流动相流过色谱柱的一种混合技术; 该技术兼具有 HPLC 填料表面的选择性和毛细管电泳 (CE) 的高柱效。

Capillary LC (毛细管液相色谱): 一般指在石英管或其它类型毛细管中进行的 HPLC, 内径一般小于 0.5 mm, 也称微量 LC。

Capillary micellar electrochromatography (毛细管胶束电色谱): 毛细管胶束电色谱 (MEKC) 的 CEC 版。

Capillary tubing (毛细管管线): 连接色谱仪各部件并引导流动相流入适当部件的管线。HPLC 中使用的大多数毛细管管线内径小于 0.020 英寸。最窄的有用内径约为 0.004 英寸。

Capping (端基保护): 同 *封端*。

Carbon load (碳载量): 对于硅胶键合相来说, 该术语一般用来描述表面覆盖率或填料表面硅醇基已发生反应并被键合相取代的程度; 碳载量越高, 残留硅醇基数越少。碳载量通常用 % 碳表示 (比如, 12% 碳)。在反相 LC 中, 碳载量越高, 分析物保留越大。

Carrier (载体): 常在亲和色谱中使用的术语; 指结合活性配基 (通常通过共价键) 的支持剂; 也指其它色谱模式 (比如, 液相色谱) 中的支持剂。

Carrier gas (载气): 气象色谱 (GC) 中的流动相。

Cartridge column (卡套柱): 一种置于卡套中没有柱端接头的色谱柱。该柱由一根柱管和填料组成, 柱管两端有筛板。卡套柱易于更换, 比带柱端接头的常规色谱柱更经济、更方便。

Cation exchange chromatography (阳离子交换色谱): 离子交换色谱的一种, 使用带有分离阳离子官能团的树脂或填料。强阳离子官能团可以是磺酸, 弱阳离子交换官能团可以是羧酸。

CE: 毛细管电泳。

CEC: 参见 *毛细管电色谱*。

CGE: 参见 *毛细管凝胶电泳*。

CZE: 参见 *毛细管区带电泳*。

Chain length (碳链长度): 反相填料烷烃部分中的碳链长度。用碳原子数表示 (C8、C18 等)。不包括短链——一般为也能连接硅烷的甲基、异丙基和仲丁基。

Channeling (沟流): 发生于填料产生的空隙中, 使流动相及溶质的流速比平均流速移动更快, 从而导致谱带变宽。空隙产生的原因是填充不当, 或填充柱床损坏。

Check valve (单向阀): 插入到流动液体中的装置, 可以使液流只向一个方向流动, 常用于 HPLC 泵的入口和出口部分。

Chemisorption (化学吸附): 与填料发生化学反应引起的吸附。这种相互作用大多数都是不可逆的, 通常发生在带反应性官能团的填料上 (如, 硅醇基或键合氨基固定相)。化学吸附常见于有强 Lewis 酸位点的金属氧化物固定相。

Chiral recognition (手性识别): 手性固定相与两个对映体发生不同相互作用, 使其发生 HPLC 分离的能力。

Chiral stationary phases (手性固定相): 为分离对映体混合物而设计的固定相。固体支持剂可以键合或涂覆这种固定相, 在固体支持剂表面产生原位, 或存在于表面孔隙内, 均能与一种对映体结构发生特异性相互作用。

Chlorosilane (氯硅烷): 用于制备硅氧烷键合相的化学试剂, 反应能力依次为单氯硅烷 < 二氯硅烷 < 三氯硅烷。烷烃部分 (十八烷基、辛烷基等) 决定了所得键合相的疏水性, 也可以用烷氧基硅烷, 但反应活性较低。

Chromatogram (色谱图): 在色谱分离过程中, 时间对检测器输出信号或洗脱体积对样品浓度作图的曲线。

Chromatograph (色谱仪): 名词: 用于进行色谱分离的仪器。动词 (IUPAC): 通过色谱柱床进行洗脱分离的行为。

Chromatographic conditions (色谱条件): 描述如何进行分析的色谱方法参数。必须提供足够的信息, 从而使分析可以重复, 达到验证的目的。

Classification (分级): 筛分不同粒径填料的过程; 一般而言, 在 HPLC 中窄粒径分布由于没有细微颗粒, 能提供更好的柱效和更高的渗透性。可采用沉降、水析和离心等技术完成不同粒径填料的分级。

Column backpressure (色谱柱反压): 见柱头压。

Column chromatography (柱色谱): 采用色谱柱或柱管填充固定相的色谱形式。开管柱色谱、HPLC 和开管毛细管柱色谱, 都是柱色谱的形式。多数情况下是指用于制备级别的开管柱色谱。

Column dead time (色谱柱死时间): 死时间与死体积相关; 用死体积除以流速测定; 在反相液相色谱中, 常用尿嘧啶测量死体积和死时间。

Column length (L) (柱长, L): HPLC 或 CE 中用于进行液相分离的色谱柱或毛细管的长度。

Column packing (柱填料): 固体材料, 通常为多孔固体可具备或不具备化学活性表面的, 填充于色谱柱内, 用于有差异地保留分析物, 特指固定相。常用填料为未键合和键合硅胶、树脂、无机-有机混合物和石墨化炭黑。

Column performance (N) (色谱柱性能, N): 特指色谱柱柱效; 给定化合物的理论塔板数。

Column plate number (N) (色谱柱塔板数, N): 代表柱效, 塔板数越高, 该色谱柱的理论塔板数就越高。一般来讲, 用 $5/\mu m d_p$ 多孔填料填充良好的 $150 \times 4.6 \text{ mm}$ 色谱柱的塔板数应在 10000-12000 之间。

Column switching (柱切换): 将多根色谱柱通过切换阀连接在一起, 用于更好的色谱分离或样品净化。第一根色谱柱中流出的组分可以切换到两个或更多二级色谱柱上, 再依次被送入其它色谱柱或检测器。有时称为多维色谱。

Column volume (V_c) (柱体积, V_c): 未填充柱的体积; $V_c = A_c L$, 其中 A_c 和 L 分别为柱管截面积和柱管长度。

Competing base (竞争性碱): 在反相色谱流动相中添加少量碱性化合物, 如三乙胺或二甲基辛胺 (10 - 50 mM), 抑制碱性分析物与残留硅醇基的相互作用, 遵循质量作用定律, 因为竞争性碱的浓度远远大于分析物浓度。也可参见添加剂。

Comprehensive two-dimensional chromatography (全二维色谱): 用于各种组分分离的二维色谱。也可参见二维色谱。

Controlled surface porosity support (控制表面孔隙率支持剂): 同多孔层珠和薄壳型填料。

Counterion (平衡离子): 在离子交换过程中用于从离子位点上取代目标离子的溶液中离子。在离子对形成过程中, 加入流动相中的用于形成溶液中中性离子对的反电荷离子。

Coupled columns (结合柱): 柱切换的一种形式, 一根初级柱通过选择阀连接两根二级柱。从第一根色谱柱中流出的组分, 选择性地导入第二和第三根色谱柱进一步分离。该术语还用于表示将两根或更多色谱柱串联在一起, 增加塔板数。

Coverage (覆盖率): 指在键合相色谱中, 硅胶支持剂上键合相的量。覆盖率通常用每平方米微摩尔或碳百分含量 (w/w) 表示。

Critical micelle concentration (临界胶束浓度): 离子型表面活性剂聚集形成胶束的浓度; 胶束加入流动相中通过分配机制改善非离子型物质在 HPLC 和 CE (MEKC) 中的分离。

Cross-linking (交联): 在树脂形成三维基质的共聚过程中, 加入一种双功能基单体在相邻聚合物链之间形成交联键。交联的程度由反应中单体的加入量决定。例如, 二乙烯基苯是生产聚苯乙烯离子交换树脂常用的交联剂。树脂的溶胀和扩散性质由其交联度决定。

Cyano phase (氰基固定相): 一种末端带 -CN 基团的化学键合相, 可以作为一种中至极性的吸附剂用于正相分离, 也可以作为一种短链键合相用于反相分离。

Cyclodextrins (环糊精): 由几个 D-(+)-吡喃葡萄糖单元组成的环状低聚物, 用于手性 HPLC 和 CE 分离。常用的有 α 、 β 和 γ -环糊精; 具有短锥形结构、相对疏水的空腔, 在其两端有一级和二级羟基; 基于对映体不同的包含作用对其进行分离; 带衍生羟基的改性环糊精也可用于改变选择性。

D

Data acquisition rate (数据采集速率): 指检测器输出的样品采集速率。如需表征一个色谱峰必须至少采集 20 - 30 个数据点。数据采集速率通常用赫兹表示, 定义为当色谱峰通过检测器时, 每秒钟收集多少个数据点。对于快速色谱分析而言, 数据采集速率必须足够快, 以表征一个窄峰。现代检测器的数据采集速率可高达 80 Hz; 也称为数据速率和采样速率。

Dead volume (V_M) (死体积 V_M): 色谱柱死体积指小分子(可渗透入填料的所有孔隙)可通过的所有空间。包括空隙体积和空隙体积。用 V_M 表示。系统死体积包括连接进样器和检测器到色谱柱的管线体积。系统死体积一般通过进样基本不保留的小分子来测定。尿嘧啶、丙酮和硫脲是反相色谱中最常用的测试物质。也可参见**调整保留体积**、**滞留体积**和**空隙体积**。

DEAE: 参见**二乙氨基乙基**。

Degassing (脱气): 在使用前或使用中, 去除流动相中溶解气体的过程。溶解的气体可能在检测器流通池内从溶液中逸出, 引起基线尖峰和噪音。溶解的空气可以影响的检测器包括电化学(参与反应)或荧光(造成淬灭)检测器。溶解的气体还可能使泵损失性能。脱气的方式包括加热溶剂、氮气鼓泡或使用真空(用真空瓶)或用一种由可透气体的物质(聚四氟乙烯 PTFE)制成的管线在线抽真空。

Denaturing HPLC (变性 HPLC): 用反相 HPLC 研究 DNA 碱基对以分析基因突变。

Desalting (脱盐): 将低分子量盐和其它化合物从非离子化和高分子量化合物中去除的技术。一个实例是反相填料通过疏水作用保留样品化合物, 使盐不保留洗脱。另一个例子是使用 SEC 柱排除大分子, 保留较小分子量的盐。

Dextran (葡聚糖): 主要用于低压生物色谱的葡聚糖基质填料; 例如, Sephadex (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey)

Diethylaminoethyl (DEAE) (二乙氨基乙基, DEAE): 一种常用的弱阴离子交换功能基(通常连接在纤维素或 Sepharose [GE Healthcare] 上), 用于分离生物大分子。

Diffusion coefficient (D_M or D_S) (扩散系数, D_M 或 D_S): 分子在气体、溶液 (D_M) 或固定相 (D_S) 中的基本参数。用每秒平方厘米表示。 D_M 取决于溶质的分子量、温度、溶剂粘度和溶质的摩尔体积。100-Da 的分子在室温下反相色谱中扩散系数一般为 $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

Diol phase (二醇固定相): 一种正相和反相使用的亲水固定相。为二醇结构(在脂肪烃链相邻碳原子上有两个羟基)。在正相色谱中, 其极性比硅胶弱。在反相色谱中用于分离蛋白质和多肽。

Displacement chromatography (置换色谱): 一种色谱技术, 样品置于色谱柱头, 然后用一种比原混合物中化合物与固定相吸附更强的化合物进行置换。然后样品分子被彼此置换, 被强吸附化合物推动。其结果是洗脱的样品溶质区带可能很尖锐; 置换技术主要用于制备级 HPLC 应用。

Distribution constant (coefficient) (K_c) (分布常数 (系数) (K_c)): 在分配色谱中, 用固定相单位体积表述固定相中的样品浓度, 使用分配系数 K_c , 即 $V_R = V_M + K_c V_S$ 。在固体固定相中, 则用干燥固定相的单位质量(重量)表述固定相中的样品浓度, 即分配系数 K_V 。在吸附色谱中, 吸附剂的比表面积需是良好表征的已知值, 固体相中浓度用单位表面积表述。

Divert valve (分流阀): 用于将色谱柱液流导入废液瓶(而非质谱仪)的阀。

D_M : 见**扩散系数**。

d_p : 见**粒径**。

D_S : 见**扩散系数**。

Dwell time (驻留时间): 与滞留体积相当的时间; 由流速和滞留体积决定。

Dwell volume (驻留体积): 溶剂混合点 (通常在液相色谱仪的混合腔内或比例阀中) 与 LC 柱头之间的体积。在梯度洗脱或等度洗脱的溶剂组成改变时, 驻留体积对于使色谱柱在尽可能短的时间内完成流动相组成的变化非常重要。低压混合物系统的驻留体积一般比高压混合系统大。

Dynamic coating (动态涂层): 在流动相中添加一种物质, 可以吸附在填料上 (或吸附进填料中), 或管壁表面, 在 HPLC 中填料上或 CE 中毛细管壁上形成原位涂层。动态涂层的目的是生成新的固定相或去除填料或毛细管壁的活性, 避免发生不需要的相互作用。一个简单的例子是将流动相或分析缓冲液的 pH 调到 3 以下, 使硅醇基质子化并抑制其影响。另一个例子是用亲水聚合物材料对固定相进行涂层, 防止蛋白质的吸收。

Dynamic range (动态范围): 测定量的最大值与最小值之比。

E

E: 参见分离阻抗。

ϵ : 参见颗粒间孔隙率。

Eddy dispersion (diffusion) term (I) (涡流扩散项, λ): van Deemter 方程中的 A 项。由于填料粒径和形状及管壁作用造成了轴向流向不稳定, 决定因此影响了塔板高度: $A = 2 \lambda d_p$, 其中, λ 为色谱柱经验常数。填充良好的色谱柱其典型的 λ 值为 0.8-1.0。某些色谱理论认为, 与流速相关的塔板高度相当于这一过程的理论塔板高度 (HETP)。也称为涡流扩散, 流向不稳定导致峰变宽, 及多通项。也可参见 van Deemter 方程。

ϵ_e : 见 间隙孔隙率。

Effective plate height (H_{eff}) (有效塔板高度, H_{eff}): 柱长除以有效塔板数。

Effective theoretical plates (N_{eff}) (有效理论塔板数 N_{eff}): 同时也被 IUPAC 称为有效塔板数。色谱柱中的真实塔板数, 因为它用死体积校正了理论塔板数。 $N_{eff} = 16 / [(t_R' / w_b)^2]$, 其 t_R' 为调整 R_b 保留时间, w_b 为该色谱峰的带宽 (见 144 页图 80)。对于形状和相比差别很大的色谱柱而言, 这一指标比单纯的塔板数更有可比性。

Efficiency (N or H) (柱效, N 或 H): 一般为用方程 $N = 16 / (V_R / w_b)^2 = 16 / (t_R' / w_b)^2$ 计算产生的理论塔板数 (N), 其中 w_b 为色谱峰的基线宽度 (见 144 页图 80)。如果在半峰高处测量峰宽, 则使用下式计算: $N = 5.545 / (V_R / w_h)^2$ 。塔板高度 (H) 或 HETP 由 $H = L / N$ 测定。不对称峰的柱效最好用峰的距心和峰形方差进行计算。也可参见 Foley-Dorsey 方程。

Effluent (流出物): 从色谱柱流出的流动相; 同洗脱物。

ϵ_p : 见颗粒内孔隙率。

EIC: 提取离子色谱图。

Electrospray Ionization (ESI) (电喷雾电离 (ESI)): 电喷雾电离 (ESI) 是一种用于生成气相离子的软电离技术。

Eluate (洗脱物): 从色谱柱流出的流动相与溶质; 也称流出物。

Eluent (洗脱液): 用于进行分离的流动相。

Eluite (被洗脱物): 被洗脱的物质, 分析物, 或样品。

Elutropic series (洗脱序): 在液-固色谱或吸附色谱中, 按照溶剂强度增强的顺序排列的一系列常用溶剂 (洗脱液)。在正相色谱中, 非极性溶剂, 如戊烷应在序列的最低端, 中等极性溶剂, 如二氯甲烷, 应在序列的中间, 强极性溶剂, 如甲醇, 应接近序列的最高端。在反相色谱中, 强度顺序相反, 水最弱, 而乙腈最强。因此, 开发方法或运行梯度时, 洗脱序对溶剂的选择非常有用。也可参见 Snyder ϵ^o 。

Elute (洗脱): 通过洗脱进行色谱分离。洗脱一词在旧术语表中多指过展开。

Elution (洗脱过程): 流动相流经色谱柱, 将溶质洗出色谱柱的过程。

Elution chromatography (洗脱色谱): 最常用的色谱方法, 将样品以一条窄区带置于柱头, 各分析物被分离并从柱末端洗脱。可与置换色谱和迎头分析进行对比。

Elution volume (V_R) (洗脱体积 V_R): 指将溶质从色谱柱中洗脱需要的流动相体积。为一个对称峰从进样时算起到最大浓度 (顶点) 时的体积: $V_R = F t_R$, 其中 F 为流速, t_R 是目标峰的保留时间。

Elutriation (水析): 按斯托克沉淀速度不同使粒径大小不同的填料颗粒分离的技术。常用于分离需要窄粒径范围的离子交换树脂, 如氨基酸树脂。该技术是让水从下向上进入大圆管中, 把未筛分的颗粒加入水流中, 颗粒按密度和粒径不同沉淀在自己的层面上。然后取出特定层面。高纯度球形硅胶有时也用水析筛分。

Enantiomeric compound (对映体化合物): 具有手性活性的化合物; 这些化合物需要能拆分 R- 和 S- 对映体的分离机制, 特殊色谱柱才能进行这种分离。

Endcapping (封端): 用于去除在硅胶与大分子硅烷化试剂(如, 十八烷基三氯硅烷)反应后残留的硅醇基的技术。在小分子硅烷化试剂(如, 三甲基氯硅烷, 或二氯二甲基硅烷)键合硅胶填料表面残留的硅醇基之后, 可以认为该色谱柱已封端。最常用于反相填料, 以最大限度地减少对碱性、可离子化、离子型化合物的不必要吸附。封端反应也用于去除聚合物固定相的末端硅醇基。

Endfitting (柱端接头): 色谱柱柱端的接头, 可连接进样器或检测器。大多数 HPLC 柱端接头都有截留填料的筛板, 死体积小, 能最大限度地减小谱带变宽。通常用不锈钢制成, 但也可使用聚醚醚酮(PEEK)和其它聚合物材料。

ϵ_T : 见总孔隙率。

Exact mass (精确质量数): 使用单同位素质量数, 通过分子式计算而得的质量数。通过比较精确质量与精确质量数来确定元素组成。

Exchange capacity (交换容量): 见离子交换容量。

Excluded volume (排阻体积): 见间隙体积。

Exclusion chromatography (排阻色谱): 见离子排阻色谱和空间排阻色谱。

Exclusion limit (排阻限): 超出分子量(或体积)上限的分子将以相同保留体积被洗脱, 这一体积称为排阻体积。许多 SEC 填料的排阻限已知。例如, 多孔硅胶 105 柱将排阻分子量大于 100000 的分子(基于聚苯乙烯校正标样)。

Exclusion volume (V_0, V_{ei}) (排阻体积, V_0, V_{ei}): 一个分子在 SEC 填料上的最小保留体积, 在此填料中所有比最大孔隙大的分子都被完全排阻。这些分子不能进入到孔隙内, 直接通过色谱柱的间隙(颗粒间)被洗脱出来。

Exponentially modified Gaussian peak (指数修正的高斯峰): 高斯峰由于过慢通过检测器或体积过大将导致非对称峰。经常作为柱每秒所产生拖尾峰模型。Foley-Dorsey 方程的基础。也可参见 *Foley-Dorsey 方程*。

Extracolumn effects (柱外效应): 除色谱柱本身以外所有色谱系统部件的总谱带展宽效应。为保持柱效必须将柱外效应降至最低。谱带展宽的原因包括进样器设计、进样体积、连接管线、柱端接头、筛板、检测器池体积以及检测器内部管线。所有这些因素的不同都会导致谱带展宽的不同。

Extracolumn volume (柱外体积): 有效进样点到有效检测点之间排除色谱柱中包含固定相部分的体积。包括进样器、连接管线和筛板, 以及检测器的体积。它决定了柱外效应。

F

F: 参见流速。

F: 参见流量阻抗参数。

Fast LC (快速 LC): 使用填充了小粒径填料 (3 或 $5\mu m$ d_p) 的常规内径 (2-6 mm) HPLC 短柱进行分析。分离常在几分钟内, 甚至几秒内完成。

Fast protein LC (FPLC) (快速蛋白质 LC): 特指蛋白质分离的专用 HPLC 术语。FPLC 中通常使用玻璃柱、中等耐压和球形填料微粒。

Flow rate (F) (流速, F): 流动相流经 LC 柱的流量速率。常规 4.6 mm 内径 HPLC 柱的一般流速为 1-2 mL/min。

Flow resistance parameter (F) (流阻参数 Φ): $\Phi = d_p^2/B_0$, 其中 B_0 为渗透率。也可参见渗透率。

Fluoro phase (含氟固定相): 脂肪族和芳香族反相填料的一种, 其中键合相的重要成分是氟取代的。有时也称为含氟固定相或全氟固定相。一般这种固定相具有与烃类固定相不同的选择性。

Foley-Dorsey equation (Foley-Dorsey 方程): 对由于柱外体积造成的峰展宽所致拖尾峰的塔板数和保留时间的修正。见参考 3。

FPLC: 见快速蛋白质 LC。

Fractionation range (分离范围): 指 SEC 中凝胶或填料的操作范围。在该范围内, 填料可以按分子大小对其进行分离。此范围的上限, 是不能扩散到孔隙内而发生排阻的过大分子。此范围下限, 是可以扩散进入到所有孔隙内, 在填料中完全扩散的小分子, 需要渗透体积才能被洗脱(未分离)。

Frit (筛板): 在色谱柱两端截留柱填料的多孔配件。每根柱管的末端都要配置, 更常见的是置于柱端接头中。筛板可以是不锈钢或其它惰性金属或塑料的, 如, 多孔 PTFE 或聚丙烯。筛板的孔隙必须小于 HPLC 柱中的最小填料颗粒; 否则颗粒将通过筛板, 造成填料流失。

Frontal analysis (迎头分析): 一种将样品连续加到色谱柱上, 吸附最弱的化合物流动速度最快, 从而得到其最纯状态的色谱技术。在第一种洗脱的化合物之后被洗脱的是次弱吸附的化合物, 第一种和第二种化合物之后是第三弱吸附的化合物, 依次类推, 直到最初的样品从色谱柱出口洗脱。迎头分析很少使用, 主要是一种制备技术。

Frontal chromatography (迎头色谱): 同迎头分析。

Fronting (前伸峰): 在色谱图中峰前半部分(顶点之前)锥度超过后半部分的峰形; 即, 前半部分的坡度小于后半部分。该峰前沿呈不对称分布。前伸峰的不对称因子值小于 1。拖尾峰则与之相反。前伸峰可能是由于等温线中的正曲度及使用了填充柱较差造成的上样量过大引起的。

G

g: 障碍或曲度因子, 分子扩散项。也可参见曲度。

Gaussian curve (高斯曲线): 一种基于数学方程的标准误差曲线, 为对称的铃铛形谱带或峰。大多数色谱理论都认为色谱峰是高斯峰。用峰的最高位置测定保留时间, 前述柱效方程也假设色谱峰为高斯峰形。见 144 页图 80。

Gaussian peak (高斯峰): 峰形遵循下列方程的色谱峰:
$$C = C_{\max} \exp[-(t - t_R)^2 / 2\sigma^2]$$

Gel (凝胶): 凝胶色谱或凝胶渗透色谱(GPC)中使用的固体填料。凝胶包含两部分: 被分散介质(固体部分)和分散介质(溶剂)。也定义为胶状分散的固体和液体, 其中固体为连续相。

Gel filtration chromatography (GFC) (凝胶过滤色谱, GFC): 又称为水相体积排阻色谱。用水相流动相进行。一般指在软胶(葡聚糖)上进行的依据分子体积进行的分离, 但也可以使用高度交联的聚合物、硅胶和其它多孔介质。大多数凝胶过滤分离都应用于生物聚合物和水溶性聚合物——如聚丙烯酸——的分离。

Gel permeation chromatography (GPC) (凝胶渗透色谱, GPC): SEC 是用有机相作为流动相, 用于聚合物的分离和表征。使用水相流动相的 SEC 称为水相 GPC、GFC 或水相 SEC。

GFC: 参见凝胶过滤色谱。

Gigapores: 见灌注色谱。

GPC: 见凝胶渗透色谱。

Gradient (梯度): 溶剂强度随时间变化(一般是溶剂强度增强), 逐渐洗脱保留较强的分析物的过程。通常, 梯度可以是二元、三元和四元混合溶剂, 其中各种溶剂混合以达到适当强度。

Gradient delay volume (梯度延迟体积): 见驻留体积。

Gradient elution (梯度洗脱): 通过在色谱分离过程中逐渐增加流动相强度而缩短分离时间的技术。也称为溶剂编程。梯度可以是连续的, 也可以阶梯式的。HPLC 常用二元、三元和四元溶剂梯度。

Graphitized carbon (石墨化炭黑): 石墨化炭黑是由非石墨碳经石墨化加热处理后制备的多维或至少三维六角晶型序列石墨化碳; 这种填料对水相样品和水溶性的有机提取物中的极性化合物具有强亲和作用。常用于食品样品中的农药分析。

Graphitized carbon packing (石墨化炭黑填料): 一种由纯石墨化炭黑组成的反相填料。具有目标吸附特性, 如, 对邻、间和对位芳香化合物和顺反异构体等几何异构体的分离。

Guard column (保护柱): 安装于进样器和分析柱之间的小柱。可保护分析物不被样品颗粒和强保留物质污染。保护柱一般填充和分析柱相同的填料, 通常具有相同的内径。但它更短、更便宜, 一般在发生污染后丢弃即可。一体化的保护-分析柱系统与保护柱和分析柱分开的系统相比, 连接管线所带来的柱外效应更小。

H

h: 折合板高。定义为 $HETP/d_p$ ，其中 $HETP$ 相当于理论塔板数的塔板高度， d_p 是填料颗粒直径。也可参见**折合板高**。

H: 同 $HETP$ 。也可参见**柱效**。

η : 参见**粘度**。

Head pressure (Δp) (柱前压, Δp): 色谱柱入口和出口的压力之差，用每平方英寸磅表示。填充一般孔隙率 (0.5) 的球形填料色谱柱，其柱前压可由下列方程估算： $\Delta p = 3000L\eta/t_M d_p^2$ ，其中 L 是色谱柱的柱长（以厘米为单位）， η 为流动相的粘度（以厘泊为单位）， t_M 是色谱柱的滞留时间（以分钟为单位）， d_p 为填料直径（以微米为单位）。压力可以用每平方英寸磅、巴、大气压或帕斯卡表示。

Heart cutting (中心切割): 指在制备 LC 中，对色谱峰中心纯度最高的部分进行馏分收集。该术语也用于柱切换。

H_{eff}: 见**有效塔板高度**。

Helium sparging (氦气鼓泡): 见**脱气**。氦在大多数常用液体中的溶解度都非常低。

HETP: 理论塔板数对应的高度。来自于蒸馏理论；柱效的一种表达方式： $HETP = L/N$ ，其中 L 为柱长， N 是理论塔板数。对于 $5\ \mu\text{m}$ 粒径填充良好的 HPLC 柱，HETP 应为 $2-3\ d_p$ ，HETP（或 H）值一般在 $0.01-0.03\ \text{mm}$ 范围内。也可参见**柱效**和 h 。

High performance CE (高效毛细管电泳): 一种在小直径毛细管内、缓冲的电导液中、高电压下（可高达 30000 V）使用的，基于不同电泳淌度对离子型分子进行分离的技术。非离子型（中性）分子可以用 MEKC 分离。

High performance liquid chromatography (HPLC) (高效液相色谱 HPLC): 液相色谱技术的现代、全仪器化形式，采用小粒径填料和高压。有时称为高压 LC。

High pressure mixing (高压混合): 一种 HPLC 系统的配置，溶剂用多个泵（一般为 2 个）高压混合；这种系统与在单泵前用比例阀进行混合的低压混合系统相比，梯度延迟体积更低。

Holdup volume (V_M) (滞留体积, V_M): 柱内流动相总体积，无论其在哪里； $V_M = V_e + V_i$ ，其中 V_e 为间隙体积， V_i 为颗粒内体积。也称为色谱柱空隙体积。IUPAC 提出应将死体积这一术语从这个概念中删除。死体积的使用限于流动相系统没有流经的区域。进样可通过所有孔径的不保留物质对滞留体积进行测量。也可参见**间隙孔隙率**和**颗粒内孔隙率**。

HPLC: 见**高效液相色谱**。

Hybrid silica (杂化硅胶): 包含有机和无机两部分的硅胶，兼具聚合物填料和硅胶填料的性质。用含有机官能团的硅烷合成。与未加修饰或未涂层硅胶相比，具有不同的选择性和更高的 pH 稳定性。

Hydrodynamic volume (流体力学体积): 由分子在自由溶液中的有效半径决定的分子体积，其流体动力学半径由分子在溶液中以其中心轴旋转的半径决定。SEC 中使用该术语定义分子形状，解释为什么同样分子量的分子常具有不同的洗脱体积。用斯托克半径测定。

Hydrophilic (亲水的): 希腊语“亲水”。一般指完全与水兼容的固定相和水溶性分子。用于分离蛋白质的许多色谱柱——如离子交换、SEC 和亲和柱等——都具有亲水性，不会发生水相环境的蛋白质不可逆吸附或变性。

Hydrophilic interaction chromatography (亲水相互作用色谱): 反相 HPLC (RPC) 的一种替代技术，用于分离在 RPC 中可能只有微弱保留的强极性分析物，HILIC 需要高比例非极性流动相和极性固定相，与正相色谱 (NPC) 的需求相似。但不同的是，NPC 使用非极性溶剂（如，正己烷和二氯甲烷），其流动相不含水，而 HILIC 的流动相中需要含一定量水，以维持固定相表面与分析物可能有选择性分配的富水层。另外，使用与水相溶的有机溶剂而不是 NPC 中与水不相溶的溶剂。在 HILIC 中，使用的吸附剂包括未修饰硅胶、键合二醇和聚羟乙基天冬酰胺。极性分析物具有良好保留，按亲水性逐渐增大的顺序洗脱，与 RPLC 正好相反。

Hydrophobic (疏水的): 希腊语“恐水”。指与水不兼容的固定相或一般不与水亲和的分子。疏水分子基本上没有极性能团。大多数具有高含氢量（脂肪族和芳香族）官能团。

Hydrophobic interaction chromatography (疏水相互作用色谱): 使用弱极性（非烃类）填料通过其疏水部分的相互作用和填料表面的疏水位点对分子进行分离的技术。流动相使用高浓度盐溶液，通过改变盐浓度进行分离。该技术类似于从溶液中盐析分子。梯度洗脱为逐渐降低盐浓度。常用该技术分离在常规反相色谱的有机溶剂中极易变性的蛋白质。疏水相互作用色谱中一般很少使用或不使用有机溶剂。

Hydroxyapatite (羟磷灰石): 一种化学上类似于骨骼和牙齿的多孔羟基磷酸钙类固体。是分离核酸成分、单克隆抗体和蛋白质等的生物色谱的填料。

Hyphenated techniques (联用技术): 指以其首字母缩写而闻名的一系列技术，包括 LC-质谱 (MS)、LC-傅里叶变换 IR 光谱 (FTIR) 和 LC-MS-MS。也可参见**多维色谱**。

IC: 参见**离子色谱**。

Immobilized metal-affinity chromatography (固定金属亲和色谱): 参见**金属亲和色谱**。

Immunoaffinity chromatography (免疫亲和色谱): 一种将抗体键合或固定在 HPLC 支持材料表面的特殊分离形式。根据分子识别机制，被抗体作为特异性靶标的分析物，通过抗原-抗体相互作用被选择性地保留，而从复杂混合物中分离出来。洗脱干扰物之后，改变流动相条件，将强结合的分析物释放出来。

Imprinted phases (印迹固定相): 依据模板或印迹分子产生的聚合物和硅胶固定相。这种固定相能够提高对模板分子的选择性。

Included volume (渗入体积): 也称为全渗入体积。小分子完全进入到色谱柱的全部孔隙空间的洗脱体积。也可参见**体积排阻色谱**。

Indirect detection (间接检测): 用于检测没有紫外吸收或无荧光的分析物。将具有 UV 吸收的化合物或荧光化合物加入流动相中，保持高背景信号；当无吸收或无荧光的分析物洗脱时，背景被稀释，这样就检测到了分析物的负峰。当分析物表现为增加指示物浓度时，将产生一个正峰。检测到负信号时，检测器信号反向传送到输出设备。

Infinite diameter column effect (无限直径柱效应): 一定柱长下，进样到填充柱床中心的样品，按半径方向扩散展开，但不能触及柱管壁，管壁效应可能导致谱带变宽。John Knox 观察到一个现象，从色谱柱中心收集的样品峰比靠近管壁处收到的样品峰，柱效更高。无限直径效应取决于柱长、内径、粒径和流动相性质。在 HPLC 中很少应用。

Injection solvent (进样溶剂): 将样品进样到色谱柱所用的溶剂；溶剂应与流动相强度相当或略低，可防止使用较强溶剂时发生的延色谱柱过早的运动。

Inlet (入口): 溶剂和样品进入色谱柱的起始部位。入口筛板通常可以截留填料，某种情况下，对填充柱床起到保护作用。

Inlet/outlet check valves (入口/出口单向阀): LC 泵上的单向阀使流动相沿一个方向而不是相反方向流动。入口单向阀使流动相从溶剂瓶流入泵，出口单向阀使流动相从泵流入色谱柱。

Inlet filter (入口过滤器): 连接到泵的入口管路上的过滤装置，在溶剂达到泵之前去除流动相中的颗粒物；溶剂瓶过滤头是置于溶剂瓶中的一种入口过滤器。

Inline filter (在线过滤器): 一种防止颗粒物损坏色谱柱的装置。现代低体积、在线过滤器可以置于进样器和色谱柱之间，对谱带变宽没有大的影响。在这个位置上的过滤器可以防止样品颗粒进入柱床或柱入口筛板。

Interparticle porosity (ϵ_e) (颗粒间孔隙率, ϵ_e): 每单位柱体积的填充柱颗粒间体积； $\epsilon_e = V_e/V_c$ ，其中 V_e 为间隙体积， V_c 为总体积。也可参见**间隙孔隙率**。

Interparticle volume (V_o) (颗粒间体积, V_o): 在填料颗粒之外的流动相体积。

Interstitial porosity (ϵ_e) (间隙孔隙率, ϵ_e): 柱填料颗粒间（间隙）的体积比率； $\epsilon_e = V_o/V_c$ 。

Interstitial velocity (u_o) (间隙流速, u_o): 洗脱液流经色谱柱从填料颗粒周围流过的实际速度； $u_o = F/A_c\epsilon_e$ 。间隙流速是计算折合流速的基础。

Interstitial volume (V_o) (间隙体积): 填料颗粒之间的体积。不包括颗粒孔隙内的体积。也称为排阻体积(见 SEC)和颗粒间体积。通过进样不进入任何孔隙、不与填料表面发生相互所用的分子测得。在 SEC 中, 该体积用 V_o 表示。

Intraparticle porosity (ϵ_i) (颗粒内孔隙率, ϵ_i): 填料颗粒孔内的体积比率: $\epsilon_i = V_{\text{pore}}/V_{\text{particle}}$ 。

Intraparticle volume (V_i) (颗粒内体积, V_i): 填料颗粒孔内体积。也称内体积和渗入体积。可以用 BET 法或汞压入孔隙率法测定。

Ion chromatography (IC) (离子色谱, IC): 一种离子交换技术, 用低离子交换容量的离子交换剂和稀缓冲液, 测定低浓度有机和无机阴阳离子。常用电导检测器。IC 有两种操作形式: 抑制型 IC, 用第二根色谱柱或膜分离器去除分析物中的缓冲液反离子, 同时用氢离子或氢氧根离子置换, 将缓冲液转换成不带电荷的物质, 起到抑制背景、提高灵敏度的作用。在非抑制型 IC 中, 选择低浓度、弱电导的缓冲液, 所有洗脱物都流经检测器, 离子在背景信号之上被检测。

Ion exchange capacity (离子交换容量): 填料上能够参与离子交换过程的离子型位点数。离子交换容量用每克毫当量 (mequiv) 表示。典型的聚苯乙烯-二乙烯基苯强阴离子交换树脂的容量为 3-5 mequiv/g。IC 所用的交换剂容量非常低。弱阴离子和弱阳离子交换剂的容量随 pH 改变而发生显著变化。

Ion exchange chromatography (离子交换色谱): 在填料的阳离子或阴离子位点上分离离子型物质的一种色谱模式。样品离子, 通常带反离子, 与填料上已存在的离子基团发生交换。保留大小基于不同离子对该位点的亲和性, 以及其它溶液参数, 如, pH、离子强度和反离子类型等。离子色谱基本上是一种离子交换技术。

Ion exclusion (离子排斥): 用离子交换树脂使离子化溶质与非离子化或部分离子化溶质分离的过程。唐南电位使分离得以进行, 即, 离子型溶质在溶液中的浓度比在固定相中的更高, 而非离子型溶质则均匀分布在流动相和树脂之间。因此离子型溶质比非离子型溶质的通过色谱柱的速度更快。当用反相色谱在使硅醇基离子化的 pH 条件下分离阴离子时, 也存在离子排斥现象。

Ionic strength (离子强度): 离子强度是电解质溶液的特性。通常表示为电解质离子之间的平均静电相互作用。其与电解质浓度有关, 但离子强度与电解质浓度的主要区别在于, 如果某些离子带更高的电荷, 前者将更高。流动相的离子强度越高, 其对于离子分析物或吸附位点的竞争力就越强。

Ion-moderated partitioning chromatography (离子调节分配色谱): 一种用强阳离子交换填料(特殊的阳离子形态, 如, 钙、氢、银)分离碳水化合物的技术, 其分离机制是络合而不是离子交换。

Ion-pair chromatography (离子对色谱): 一种色谱形式, 溶液中的离子可以成对或被中性化, 以离子对的形式在反相柱上得到分离。离子对试剂一般为含烷烃链的离子型化合物, 具有一定疏水性, 因而形成的离子对可以在反相柱上保留。保留与烷烃链的长度和离子对添加剂的浓度成正比。正相色谱中也有离子对, 离子对的一部分是动态添加的吸附剂, 不过这项技术的应用不如反相色谱中普遍。也称为离子相互作用色谱或动态离子交换色谱, 要强调的是, 用户有时也不清楚添加剂是如何控制保留的确切机制细节。

Ion retardation (离子阻滞): 指使用两性离子交换树脂, 阻滞离子型分子, 并让非离子型分子或非电解质先洗脱。

Ion suppression (离子抑制): 水相流动相可以在特定 pH 下发生缓冲作用, 抑制溶质的离子化。例如, 弱羧酸的离子抑制是将 pH 调节到其 pK_a 值以下。在反相色谱中用于改善弱酸和弱碱的峰形。

Irregular packing (不规则填料): 指填料的形状。不规则填料有各种粒径。将碾碎的固体填料用分离机械按粒径筛分成窄范围填料颗粒。在分析型 HPLC 中球形填料比不规则填料更常用, 但在制备型 LC 中价格便宜的不规则填料仍有广泛用途。

Irreversible adsorption (不可逆吸附): 将把与吸附剂有极强亲和力的化合物进样到色谱柱上时, 将产生强烈吸附, 不能从柱上洗脱。样品与吸附剂表面之间发生化学反应, 就是不可逆吸附的一个例子。也可参见化学吸附。

Isocratic (等梯度): 在 LC 中洗脱剂组成不随时间而变。

Isotherm (等温线): 见吸附等温线。

Isothermal chromatography (等温色谱): 采用恒温条件。绝大多数 LC 都是在等温条件下进行的。

K

k: 见保留因子。

k': 旧术语已被 IUPAC 批准的术语保留因子 (*k*) 取代。

K: 见分配系数。

k_{A/B}: 见选择性系数。

Kc: 见分布常数 (系数)。

Kieselguhr (硅藻土): 柱色谱中使用的硅藻类土, 也可作为样品净化介质。只有弱吸附性, 可以用作液-液色谱的支持剂。HPLC 中很少使用。

Kinetic Plot (动力学曲线): 动力学曲线是表征柱效实际极限的方法, 根据压力限制的塔板数 (*N*) 对理论塔板 (*H*) 和分离阻抗 (*F*) 作图。动力学曲线保留了 van Deemter 曲线显示的信息, 但还包含了柱床渗透性的信息。参见 Poppe 曲线。

Knox equation (Knox 方程): John Knox 对 van Deemter 方程的改良, 其中 *A* 项为涡流扩散乘以 $u^{1/3}$, 其中 *u* 为间隙洗脱流速。一般用无因次或折合塔板高度 (*h*) 及折合流速 (*v*) 等表示, $h = Av^{1/3} + B/v + Cv$ 。也可参见 van Deemter 方程。

L

L: 见柱长。

Laminar flow (层流): 液体在粘滞力比惯性更强的条件下移动时, 产生的不随时间变化的平坦液流。层流用低雷诺数 (见雷诺数) 表征。在一个圆筒状管路中, 中心的液流比管壁的液流流动更快, 呈现以中心流速为顶点的抛物线形分布。在柱床中的这种间隙轴向流速不均性, 也是导致填充柱内峰变宽的原因。

Langmuir isotherm (Langmuir 等温式): 等温式的一种特殊形式: $C_S = NOC_M/(K_d + C_M)$, 其中 *C_S* 和 *C_M* 是溶质在固定相和流动相的平衡浓度, *N₀* 是可用的表面吸附位点数, *K_d* 是吸附结合常数。

LC: 见液相色谱。

Ligand (配位体): 在配位交换色谱中, 指固定相进行配位交换的分析物。在亲和色谱中, 指与支持剂偶联构成亲和柱的生物特异性物质 — 酶、抗原、或激素等。在键合相色谱中, 指与表面共价结合的部分。

Ligand exchange chromatography (配位交换色谱): 螯合配位体添加到流动相中, 被填料吸附的一种技术。这些被吸附的分子充当了特定溶质的螯合剂。例如, 可以将铜盐加入流动相中, 与氨基酸螯合并使其分离。螯合树脂具有类似的功能: 螯合基团与聚苯乙烯骨架化学键合。

Limit of detection (LOD) (检测限 (LOD)): 在本底噪音水平以上能够检测到的化合物的最小量。

Linear elution adsorption chromatography (线性洗脱吸附色谱): 指在吸附等温线的线性部分所进行的吸附色谱。由 Lloyd Snyder 创造术语。

Linear velocity (u) (线性流速, u): 流动相流经色谱柱时的流速。用厘米/秒表示。与色谱柱横截面积的流速有关。用柱长除以不保留化合物的保留时间测得。也可参见空隙时间。

Linearity (线性): 线性动态范围: 离子信号与分析物浓度呈线性关系的浓度范围。

Liquid chromatography (LC) (液相色谱, LC): 一种流动相为液体的分离技术。多数在色谱柱内进行。

Liquid-liquid chromatography (液-液色谱): 一种最早的 HPLC 分离模式, 在二十世纪七十年代初期化学键合相出现后即已不再使用。同分配色谱。

Liquid-solid chromatography (液-固色谱): 同吸附色谱。

Loadability (负载能力): 可以加载到色谱柱上的分析物最大量, 如果超过这个量就不能够达到分离所需纯度和回收率的要求; 在制备色谱中非常重要。

Loading (phase loading versus sample loading) (荷载体量, 固定相荷载体量与样品荷载体量): 涂层或键合在固体支持剂上的固定相量。在液-液色谱中, 液体固定相的量以毫克/克填料计。在键合相色谱中, 荷载体量可以用毫摩尔/平方米, 或碳百分含量 (w/w) 表示。也称为覆盖率或表面覆盖率。还有另一种不相关的概念, 即, 进样到分析柱或制备柱上的样品质量。制备柱经常在过载条件下操作, 以得到更高通量。

log k_w : $\log k$ 对反相 LC 中有机改性剂体积作图的外推截距。也可参见 S 。

Longitudinal diffusion (纵向扩散): 同分子扩散项。
van Deemter 方程中的 B 项。也可参见 *van Deemter 方程*。

Low pressure mixing (低压混合): 参见高压混合。

M

μ : 见电泳淌度。

Macroporous resin (macroreticular) (大孔树脂 (大网络树脂)): 具有分子级微孔或几百埃大孔的交联离子交换树脂。这种大孔树脂内表面积较大可让大分子进入。

Mass accuracy (质量准确度): 衡量分析物的测定质量与其精确质量数的接近程度的指标, 通常用 ppm 表示。

Mass defect (质量亏损): 标称质量与精确质量数之差。

Mass error (质量误差): 计算式: (精确质量数) - (精确质量)

Mass resolution (质量分辨率): 确保样品范围内的质量准确度。以 (离子质量)/(质谱峰宽) 衡量, $R = (m/z)/W_{1/2}$ 。还可表示为质量分辨率 = (离子质量)/(质谱峰分离度), $R = (m/z)/D_m$ 。解决特定分析问题所需的分辨率取决于样品和基质。

Mass spectrum (质谱): 质谱仪采集的数据, 代表离子的分布情况, 以离子信号对质荷比 (m/z) 作图而得。

Mass transfer (interphase) (传质 (相间)): 溶质在流动相和固定相之间运动的过程。van Deemter 方程的 C 项, 称为相间传质项。传质过程越快, 柱效越高。在 HPLC 中, 传质速率慢是影响柱效的最重要因素。可以通过使用小粒径填料、薄固定相层、低粘度流动相和高温, 提高传质速率。

Mean pore diameter (平均孔径): 多孔填料的平均孔径。最常用 BET 法测定, 假设为均匀的圆柱状孔, 可用 4 倍孔隙面积除以表面积 ($4V/A$) 计算得到。孔径的重要之处在于, 溶质分子必须能在孔内外自由扩散, 才能与固定相表面发生相互作用。另外, 孔之间必须贯通良好, 具有最少的闭塞点, 从而允许分子可以通过通道进入到孔内的任何部分。在 SEC 中, 填料有不同的孔径, 因此可以分离不同体积的分子。典型的物质, 如硅胶, 最常见的孔径是 60- 和 100Å。孔径大于 300Å 可用于生物分子的分离。孔隙一般分为微孔 (< 20Å)、中等孔 (20-500Å) 和大孔 (> 500 Å) 三个级别。

MECC: 参见胶束电动毛细管色谱。

Megapores: 参见灌注色谱。

MEKC: 参见胶束电动毛细管色谱。

Metal-affinity chromatography (金属亲和色谱): 一种特殊的配位交换色谱, 用特定金属离子 (一般为铜 (II)、锌 (II) 和铁 (III)) 的特殊亲和性分离生物聚合物。

Metalophile (嗜金属): 一种对硅胶表面活性酸性硅醇基有高亲和性的化合物。通常为强碱性胺或多功能羧酸酯或酚。

Method development (方法开发): 对包括样品预处理在内的分离过程进行优化, 以得到可重现的、耐用的分离方法。一般来说, 重点是筛选固定相、洗脱液和色谱柱温的组合, 提供足够的 (如果不是最优化的) 分离。

Method validation (方法认证): 对方法进行测试, 检查其保留时间、分离度以及对目标组分的定量是否能符合需求的准确度和精密度的过程。

Micellar chromatography (胶束色谱): 向流动相中加入胶束进行分离。胶束可以作为置换剂或分配剂, 为改变选择性提供另一个参数。胶束色谱和 MEKC 中使用的表面活性剂浓度大于其临界胶束浓度。

Micro-LC (微量 LC): 泛指分离所用色谱柱内径比常规柱窄的技术。在色谱柱内径小于 0.5 mm 的 HPLC 中常用微量 LC 这一术语; 在样品量有限的高灵敏度分析中, 以及当使用某种 LC-MS 电离技术, 需要进入离子源的溶剂体积必须尽可能小的时候, 也使用微量 LC。

Microbore (微径): 指在 HPLC 中使用的, 比常用内径更小的色谱柱。一般认为 2 mm 及以下的色谱柱为微径柱。0.5 mm 及更小的内径称为微量 LC 柱。

Microchip devices (微芯片装置): 基于硅、玻璃和其它类型的微加工芯片, 通过这一装置可以将实验微缩到单通道或多通道微液流环路中进行。这种装置可用于 CE 和 CEC。成本较低并且是一次性的。目前进行分离的微型装置还处于初级阶段, 今后其应用还将进一步扩展。

Microparticulate (微粒): HPLC 中使用的小颗粒填料。一般来说, 粒度小于 10 μm 的全多孔填料即为微粒。

Microporous resin (微孔树脂): 同微网状树脂。

Microreticular resin (微网状树脂): 具有与分子大小相符合的, 交联、合成的开口孔隙, 离子交换树脂。在窄孔内的扩散可能受影响, 存在离子交换率低和柱效差的问题, 尤其对于大分子而言。

Migration rate (迁移速率): 见电泳淌度。

Migration time (t_m) (迁移时间, t_m): 在毛细管电泳中, 带电荷分子从进样点移动到检测点所用的时间。与滞留时间不同 (t_R)。

Minimum plate height (最小塔板高度): van Deemter 曲线以 H 对 v 作图得到的最低值。该值代表从特定色谱柱和流动相系统得到的最大理论塔板数。一般出现在极低流速下。也称为最佳塔板高度。通常为良好填充色谱柱粒径的 2-3 倍。

Mixed-bed column (混合床色谱柱): 同一根柱子上填充了两种或更多固定相, 常用于 IEC (阴离子和阳离子混合树脂) 和 SEC (不同孔径填料的混合物) 中。在 IEC 中其优势是既去除了阳离子化合物, 也去除了阴离子化合物。在 SEC 使用是因为可以在同一根色谱柱上得到更宽的分子量范围。

Mixed-mode separation (混合模式分离): 在一根色谱柱上得到的, 由双重保留机制进行的具有不同保留和选择性的分离。例如, 在中到高 pH 下, 带硅醇基的反相柱, 可以利用离子化硅醇基的疏水相互作用和离子相互作用进行分离。有时, 混合模式分离对提高选择性 (谱带间隔) 很有帮助, 但可能会造成不对称峰, 如果需要在后续批次的填料中精确控制这些相互作用的平衡将会比较困难。

Mobile phase (流动相): 推动溶质流经色谱柱的溶剂。在 LC 中, 流动相与溶质和固定相同时发生相互作用, 因而对分离有重大影响。

Mobile phase strength (流动相强度): 参见溶剂强度。

Mobile phase velocity (u_M) (流动相流速, u_M): 流动相流经填料柱床的速度; $u_M = L/t_M$, 其中 L 为柱长, t_M 是滞留时间, 也可参见调整保留体积、滞留体积和死体积。

Mobility (淌度): 参见电泳淌度。

Modifier (改性剂): 改变流动相性质的添加剂。例如, 甲醇是反相中的强溶剂, 有时称为改性剂 (水是弱溶剂); 有时其它添加剂 — 竞争性碱, 如, 三乙胺, 或离子对试剂 — 也称为改性剂, 但称其为添加剂才更贴切。也可参见添加剂。

Molecular diffusion term (B term) (分子扩散项, B 项): 指 van Deemter 方程中的 B 项 (第二项)。也称纵向扩散项或轴向扩散项。它只在流速非常低 (在最小塔板高度以下) 时起主要作用, 此时各溶质可能在色谱柱上存在纵向 (纵深) 扩散。对 B 项的影响来自流动相中的扩散, 为 $2\gamma D_M$, 其中 γ 为障碍因子 (一般为 0.6-0.8), D_M 是扩散系数。也可参见 van Deemter 方程。

Molecular weight distribution (分子量分布): 聚合物样品分子的分子量分布。分布可以定义为重量平均值和数量平均值。分子印迹相: 参见印迹固定相。

Monodisperse particles (单分散填料颗粒): 粒径分布窄的填料颗粒。也可参见多分散颗粒。

Monomeric phase (单体固定相): 指单个分子键合到支持剂上的键合相。对于硅胶来说, 单体固定相是由一氯烷烃、芳烃或烷氧基硅烷制备而成的。聚合物固定相通常用二或三氯硅烷或烷氧基硅烷反应物, 在水存在下制备而成的。

Moving zone (移动区带): 与流动相不同, 移动区带指色谱柱中间隙部分的流动相部分。也可参见固定相。

Multidimensional chromatography (多维色谱): 使用两根或更多色谱柱或使用不同的色谱技术, 以获得更好的分离。用于样品净化、提高分离度、提高通量和增加峰容量。也可以在馏分收集, 重新进样到第二根色谱柱上离线使用, 或者通过切换阀在线使用。也称为双柱色谱、柱切换、多柱色谱和 boxcar 色谱。

N

n: 见峰容量。

N: 理论塔板数; $N = 16(t_R/w_b)^2$, 其中 t_R 为保留时间, w_b 是峰底宽。是说明色谱柱柱效的参数。有时按下式计算, $N = 5.54(t_R/w_h)^2$, 其中 w_h (或 $w_{1/2}$) 为半峰高处的峰宽。也可参见柱效和理论塔板。

n: 见折合流速。

NanoLC (纳升 LC): 采用内径小于 100 μm 的色谱柱进行的液相色谱分离; 一般需要特殊仪器; 常用于样品有限, 需要高灵敏度的蛋白质组学研究。

Narrow-bore column (窄径柱): HPLC 中使用的内径小于 2 mm 的色谱柱。也称微径。

N_{eff} : 参见有效理论塔板。

Noise (噪声): 参见基线噪声。

Non-aqueous reversed phase chromatography (非水相反相色谱): 指在反相填料上进行的不用水作为洗脱液成分的反相色谱。在化合物非极性很强, 用 100% 的甲醇或乙腈不能或很难将其洗脱下来时使用该方法。在这种情况下, 溶剂 A 应为乙腈, 溶剂 B 为更强的溶剂, 如, 四氢呋喃。反相规律适用于非水相反相色谱, 即, 分析物非极性越强, 其保留就越强。

Non-Polar (非极性): 非极性分子是电子分布更为对称, 相反方向没有大量电荷的分子。所有电荷都互相抵消。非极性化合物、溶剂或固定相易溶于有机溶剂, 如正己烷, 而不易溶于水。

Nonporous packing (非多孔填料): 填料颗粒类似于多孔层实心, 但粒径处于亚 $5\ \mu\text{m}$ 范围; 粒径经常在亚 $2\ \mu\text{m}$ d_p 范围。用于短柱的高速分离。常用的色谱柱缩写: NPS, 指非多孔硅胶; NPR, 指非多孔树脂; NPZ, 指非多孔氧化铝。

Nonporous particle (非多孔颗粒): 指作为多孔涂层或键合相支持剂的固体颗粒; 薄壳型填料颗粒是大粒径非多孔填料颗粒 ($\sim 40\ \mu\text{m}$)。粒径小于 $3\ \mu\text{m}$ 的非多孔硅胶和树脂一般是指带薄多孔涂层的硅胶、键合硅胶或聚合物固定相微球。

Normal phase chromatography (正相色谱): 一种固定相极性大于流动相的色谱模式。典型的正相系统是在硅胶或氧化铝上进行的吸附色谱, 用弱极性的洗脱液, 如己烷-二乙基醚作为流动相。也指极性键合相, 如氰基和氧化铝。

O

Octadecylsilane (十八烷基硅烷): HPLC 中使用最多的反相固定相。十八烷基硅烷固定相键合到硅胶或聚合物填料上。可以用单体键合, 也可以聚合键合。柱名称缩写为 C18 和 ODS。

Octylsilane (辛基硅烷): 反相色谱中的常用固定相。与更加常用的 C18 相比, 保留稍弱。可以用单体键合, 也可以聚合键合。柱名称缩写为 C8。

ODS: 见十八烷基硅烷。

On-column detection (柱上检测): 色谱柱本身作为 HPLC 或 CE-CEC 的流通池。通常, 该术语在石英毛细管应用中使用。剥离聚酰亚胺外层, 光束直接透过毛细管, 测量设备, 如光电倍增管置于该毛细管的另一侧。

Online preconcentration (在线预浓缩): 将预柱置于分离柱之前, 在分离前浓缩分析物。可用不同机制 — 疏水相互作用、吸附或酶反应 — 保留分析物。然后浓缩的分析物通过置换 (如, 溶剂洗脱或 pH 变化) 转移到分离柱上。

Open tubular columns (开管柱): 这是一种目前正在研究的用于 HPLC、超临界流体色谱 (SFC) 和 CE 的窄内径色谱柱 (小于 $100\ \mu\text{m}$)。固定相可以键合到小柱的内壁上。最常用的柱材料是石英管。在常规 HPLC 或 SFC 中很少使用, 但在 CE 中常用。

Optically active resin (光学活性树脂): 离子交换树脂中结合光学活性基团, 用于分离光学异构体。很少用于 HPLC 应用的该种商业树脂出售。

Organic modifier (有机改性剂): 在反相 HPLC 中, 加入到水相流动相中以获得分离的与水混溶有机溶剂。常用的有机改性剂有乙腈、甲醇、异丙醇和四氢呋喃。

Orthogonality (正交性): 在二维分离中, 可以对二维中的洗脱时间分别进行统计学处理。理想情况下, 二维应具有完全不同的保留机理(如, 反相和正相, 离子交换和反相)。

Outlet Check Valve (出口单向阀): 见单向阀。

Overload (过载): 在制备色谱中, 过载定义为进样到色谱上的最大样品量, 如果再继续增加上样量, 将开始影响其柱效和分离度。也可参见样品容量。

P

Δp : 见柱前压。

Pa: 见帕斯卡。

Packing (填料): HPLC 柱中使用的吸附剂, 凝胶或固体支持剂。最新的分析型 HPLC 填料平均直径小于 10 μm , 一般常用 5 μm 。

Paired-ion chromatography (配对离子色谱): 同离子对色谱。

Particle size (d_p) (粒径, d_p): LC 柱中填料的平均粒径。填料都不是单分散的, 因此一根 5 μm d_p 柱应填充具有一定粒径分布的填料颗粒。也可参见单分散颗粒、粒径分布和多分散颗粒。

Particle size distribution (粒径分布): 用于说明填充 LC 柱颗粒的分布的参数。在 HPLC 中, 窄粒径分布较为理想。如果平均 d_p 为 10 μm , 粒径度分布为 $d_p \pm 10\%$, 说明 90% 的颗粒都分布在 9 到 11 μm 的范围内。

Particulates (微粒): 通常指流动相中的小颗粒, 可能因为堵塞筛板引起反压问题; 也可以指 HPLC 柱中填充的小粒径填料。

Partition chromatography (分配色谱): 一种液相附着在固体支持剂上(固定相), 而另一种液相自由流过该色谱柱(流动相)的分离过程。溶质基于在两相中的分配系数在两相间自由分配。液-液色谱就是一个例子; 现代键合相色谱也可以看作是分配色谱的一种形式, 其中液相真正键合在固体支持剂上。而分配色谱意味着溶质至少部分地嵌入固定相内, 或浸渍、涂层或键合到该物质上。与之相反的是吸附过程, 在此过程中溶质不渗入保留表面或两相界面。

Partition coefficient (K) (分配系数, K): 溶质在固定相的平衡浓度与流动相中的平衡浓度之比。也称为分布系数, K_D , 和分布常数 (K_c)。

Pascal (Pa) (帕斯卡, Pa): 压力单位, 1 MPa 约等于 10 bar (atm) 或 150 psi。

PCDL: 个人化合物数据库与谱库。

Peak (峰): 分析化合物从色谱柱洗脱后经过检测器绘制的曲线; 通常用记录仪或打印机按检测器的电子响应绘出可见输出信号。

Peak area (峰面积): 色谱峰下的测量面积; 一般用积分仪或数据系统测量; 峰面积与色谱峰中洗脱物质的量有关。

Peak capacity (n) (峰容量, n): 一张色谱图从滞留时间到保留上限之间可以容纳分离良好的色谱峰的数量 (n)。当 $R = 1$ 时, n 大约为 $1 + 0.25[(N)/1/2 \ln(1 + k_n)]$, 其中 R 是分离度, N 是理论塔板数, k_n 为峰 n 的保留因子。

Peak dispersion (峰分散度): 见谱带展宽。

Peak doublet (双峰): 通常是由色谱柱空腔造成的分裂峰。也可作为距离很近的相邻洗脱化合物。

Peak height (峰高): 色谱峰从基线到峰顶点的测量高度; 峰高与色谱峰内洗脱物的量有关。

Peak shape (峰形): 对色谱峰形状的描述。理论上认为是高斯峰形(完全对称)。峰不对称因子用比率说明峰形。见 143 和 144 页图 79 和 80。也可参见不对称性。

Peak tracking (峰追踪): 一种比对方方法开发过程中用不同实验获得的含相同化合物色谱峰的方法。基于每个纯分析物的检测参数。二极管阵列检测器和质谱具有特异性, 因而是峰追踪所用的最好检测器。

Peak variance (σ^2) (峰畸变性, σ^2): 保留时间的第二中心力矩。对于高斯峰, 畸变性是控制峰宽的基本参数。见 144 页图 80。也可参见**高斯峰**。

Peak volume (峰体积): 当色谱峰通过检测器时的总体积: $V_R = F \times W_b$ 。见 144 页图 80。

Peak width (W_b) (峰宽, W_b): 同**带宽**。见 144 页图 80。

Pellicular packing (薄壳型填料): 见**多孔层微球**。

Percent B solvent (% B solvent) (溶剂 B 的百分比, %B 溶剂): 指二元溶剂混合物中的较强溶剂。% A 为较弱溶剂。

Perfusion chromatography (灌注色谱): 指用很大孔径 (4000-8000Å) 颗粒, 称为通孔 (巨孔), 进行的色谱分离。洗脱液在大孔之间流动, 经过颗粒的 300-1000Å 相贯通孔 (称为扩散孔)。最适合大分子的制备分离。

Permeability (B_o) (渗透性, B_o): 也称柱渗透性和特异性渗透性。是表示填充柱对流动相液流阻抗的参数。对填充柱来说, $B_o \approx d_p^2 \varepsilon^3 / [180(1-\varepsilon)^2] 5 d_p^2 / 1000$ 。渗透性高的色谱柱产生低压降。

Permeation (渗透): 指 SEC 的分离过程溶质随流动相进入填料孔径的过程。

Phase ratio (β') (相比, β'): 色谱柱中固定相与流动相的相对量。在分配色谱中, $\beta' = V_S / V_M$, 其中 V_S 和 V_M 分别为色谱柱中固定相和流动相的体积。保留因子是相比和分配系数的产物。

Phenyl phase (苯基键合相): 通过二甲苯基氯或烷氧基硅烷与硅胶反应制备的常用非极性键合相。对含芳香基团的化合物具有亲和性, 提供与烷基键合相不同的选择性。

Pirkle column (Pirkle 柱): 基于 3,5-二硝基苯甲酰苯基甘氨酸硅胶的手性、刷型固定相, 用于分离各种对映异构体。用其开发者, 伊利诺斯大学的 William Pirkle 的名字命名。

Planar chromatography (平板色谱): 一种固定相以平面存在或涂布在平面上的分离技术 (IUPAC)。典型形式有纸层析色谱和薄层层析色谱。

Plate height (H) (塔板高度, H): 见 **HETP**。

Plate number (塔板数): 见**色谱柱塔板数**。

Plate or plate number (塔板或塔板数): 指填充柱中的理论塔板数 (IUPAC)。也可参见**理论塔板数**。

Polar (极性): 化学极性是指一个分子的正电荷端与另一个分子或同一分子的负电荷端之间的偶极-偶极相互作用。分子的极性取决于化合物中原子间负电性的差异, 以及该化合物结构的不对称性。例如, 水是极性的, 因为其电子分布不均匀。但一般认为甲烷是非极性的, 因为其碳原子均衡分担了氢原子。

Polyacrylamide gel (聚丙烯酰胺凝胶): 水相 SEC 中使用的中性亲水聚合物型填料。通过丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺共聚制得。

Polydisperse particles (多分散颗粒): 具有各种内径的填料颗粒 (> 10%)。

Polyethyleneimine (聚乙烯亚胺): 一种用于涂覆或键合到硅胶或聚合物填料上的阴离子型固定相。常用于分离蛋白质和多肽。

Polymeric packings (聚合物型填料): 以聚合物为基质的填料, 通常为球形微粒。LC 中常用的聚合物为聚苯乙烯-二乙烯基苯 (PS-DVB)、聚二乙烯基苯、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸甲酯、聚环氧乙烯、葡萄糖和多糖。

Polymeric phase (聚合物固定相): 指将聚合物材料键合到硅胶颗粒上的化学键合相。

Polystyrene-divinylbenzene resin (PS-DVB) (聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂, PS-DVB): 离子交换色谱中最常用的基础聚合物。离子型基团可参与各种化学反应。中性 PS-DVB 微粒用于反相色谱。通过改变与 DVB 的交联程度可改变孔隙率和机械稳定性。

Poppe Plot (Poppe 曲线): 以荷兰阿姆斯特丹大学 Hans Poppe [J. Chromatogr. A 778, 3 (1997)] 教授的名字命名的一种动力学曲线, 其中, 以理论塔板数 (N) 为变量描述塔板时间 [$\log(t_0/N)$], 以评估柱效作为以粒度、柱压降等为参数的函数时的极限。

Pore diameter (孔径): 同**平均孔径**。

Pore size (孔隙大小): 多孔填料上一个孔隙的平均尺寸。其数值用埃或纳米表示。孔隙大小决定了分子是否能够在填料内外扩散。也可参见**平均孔径**。

Pore volume (孔隙体积): 多孔填料中孔隙体积的总和, 一般用毫升/克表示。更恰当的叫法应该是特异性孔隙体积。用氮吸附 BET 法或汞压入孔隙法(在高压下将汞泵入孔隙内)测定。

Porosity (孔隙率): 多孔物质颗粒孔隙的体积占该颗粒总体积的比率。孔隙体积(以毫升/克表示)是说明孔隙率的一个方面。

Porous-layer bead (多孔层微球): 用固定相薄层涂渍的小玻璃微球。薄层可以是吸附剂、树脂或化学键合在吸附剂上的固定相。该填料是首先应用在 HPLC 中的一种。其粒度为 20-40 μm , 比现在用的填料微粒大, 但容易填充, 并能提供满意的柱效。也称为控制表面孔隙率的支持剂和薄壳材料。

Porous particle (多孔颗粒): 指具有一定直径和体积, 互连孔隙的柱填料颗粒。在 HPLC 应用中, 分析人员一般使用直径小于 10 mm 的多孔颗粒。较大颗粒成本较低, 并具有较高的柱渗透性, 因而用于制备级色谱分离。

Porous polymer (多孔聚合物): 一种以有机聚合物或共聚物为基质的填料, 一般为球形。最常见的例子包括 PS-DVB、聚丙烯酸酯、葡聚糖、聚丙烯酰胺和聚丁二烯。

Precolumn (预柱): 置于泵和进样器之间的小柱。其作用是去除流动相中可能存在的颗粒, 用固定相或溶解性物质使流动相预饱和, 以防止分析柱中的固定相损失或溶解, 导致目标物的化学吸附, 从而干扰分离。其体积基本不影响等度洗脱, 但对梯度洗脱的梯度有延迟作用。

Precolumn Filter (预柱过滤器): 在进样器和色谱柱(或保护柱)之间使用的过滤器, 以防止不想要的样品组分进入色谱柱; 有时也称为在线过滤器, 偶尔称为进样口过滤器。

Preconcentration (预浓缩): 参见痕量富集。

Preparative chromatography (制备色谱): 指使用 LC 进行分离, 得到足以进行其它实验或满足其他功能需求的量的过程。在制药或生物技术纯化中, 使用内径几英尺的大柱进行几克级物质的分离。要分离几毫克宝贵的天然产物时, 可以使用 4.6 mm 内径的分析柱。根据色谱工作者的目的不同, 两种规格的色谱柱都可以作为制备色谱的选择。

Pressure (pressure drop) (Δp) (压力 (压降), Δp): 见柱前压。

Pressure injection (压力进样): CE 中的压力驱动进样。使用压力或真空将纳升级体积的样品注入毛细管柱。最适用于内径小于 10 μm 的窄径毛细管。流体静力学进样的一种形式。

Process-scale chromatography (生产规模色谱): 指在实验室外使用的工业规模的 LC。与实验室规模的 HPLC 相比, 一般需要特别设计的色谱柱(内径通常 > 5 cm), 可回收的溶剂、低成本填料(较大的不规则形状填料颗粒)和过载操作条件。

Programmed-temperature chromatography (程序温控色谱): 在色谱运行中改变温度。在 LC 中很少使用。

PS-DVB: 参见聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂。

Pulsating flow (脉动流): 往复泵产生的液流。通常情况下, 用脉冲阻尼器、电子压力反馈环路或主动阻尼器泵头抑制脉冲。电化学、示差折光等检测器受流量脉动的影响很大。

Q

Quaternary methyl amine (四甲基铵): 树脂填料中常用的强阴离子交换官能团。通常使用氯化物形式。

Quaternary mobile phase (四元流动相): 包含四种溶剂或缓冲液的流动相。

Quaternary-solvent mobile phase (四元溶剂流动相): 流动相包括四种分开的溶剂, 可以对流动相组成进行微调; 这种流动相最常用低压四元泵输送。

Q-TOF: 由四极杆和飞行时间质量分析器组成的混合型质谱仪。QTOF 质谱仪是一种高质量准确度、高分辨率的仪器。

R

r: 参见相对保留。

Radial compression (径向压缩): 对弹性壁色谱柱实施径向压缩, 以降低柱壁效应。

Radial diffusion-dispersion (径向扩散-分散): LC 柱径向的扩散-分散。如果样品恰好进样到色谱柱的中心, 它将不仅沿纵向移动通过色谱柱, 也将沿径向展开, 使溶质达到柱壁区域, 洗脱液的流速与柱中心处不同。

Re: 参见雷诺数。

Recovery (回收率): 从色谱柱洗脱出的溶质或样品量与进样量的比值。高回收率对良好定量、制备分离 (尤其是生物大分子), 以及良好峰形和分离度都非常重要。回收率不高的原因可能是溶质与填料、柱筛板和柱管上的活性位点发生了相互作用。化合物在分离过程中发生分解也可能影响回收率。

Recycling chromatography (循环色谱): 色谱柱洗脱液再循环到柱头以延长柱长。可以让洗脱液通过泵头在同一根色谱柱上进行循环。也可以使用两根色谱柱, 用切换阀连接, 一根柱子的洗脱液直接进入另一根柱子的柱头。HPLC 中很少使用, 只在排阻色谱中应用。

Reduced plate height (h) (折合塔板高度, h): 用于比较不同色谱柱的柱效: $h = H/d_p$, 其中 H 为理论塔板数的塔板高度, d_p 是粒径。最佳流速下 h 为 2 或更小, 表明 HPLC 柱填充良好。

Reduced velocity (v) (折合流速, v): 与折合塔板高度一起用于比较不同的填充色谱柱。与溶质在流动相中的扩散系数 (D_M) 和柱填料的粒径 (d_p) 有关, $v = u d_p / D_M$, 其中 u 为平均间隙流动相线速度。也可参见 Knox 方程。

Refractive index peak (折射峰): 常在死体积附近出现的假峰, 由吸收对折射率的敏感性和其它检测器引起。也可参见空白峰。

Regeneration (再生): 在梯度洗脱后, 使色谱柱中的填料恢复到初始状态。流动相以阶梯或连续梯度流经色谱柱。恢复固定相或充分溶剂化使其回到初始状态。在离子交换中, 再生包含用占据交换位点的原始离子置换在交换过程中被取代的离子。再生也可以指使色谱柱恢复到初始状态; 例如用强溶剂去除杂质。

Relative retention (r) (相对保留, r): 相对于标样的保留; $r = t_R' / t_{R(st)}' = k / k_{st}$, 其中 t_R' 是目标组分的调整保留时间, $t_{R(st)}'$ 是标样的调整保留时间, k 和 k_{st} 是相应的保留因子。对于两个相邻的色谱峰, 相对保留也称分离因子 (以前叫做选择性或选择性因子); 计算公式为 $\alpha = t_{R2}' / t_{R1}' = k_2 / k_1$, 其中 t_{R2}' 和 t_{R1}' 分别为峰 2 和峰 1 的调整保留时间, k_2 和 k_1 是相应的保留因子。

Residual silanols (残留硅醇基): 在填料表面进行化学键合后填料表面残留的硅醇基 ($-\text{Si}-\text{OH}$)。这些硅醇基一般存在于小孔隙内, 不能参与与大分子有机硅烷 (如, 十八烷基二甲基氯硅烷) 的反应, 但小分子极性化合物可以进入。去除它们的方法通常为用小分子有机硅烷 (如三甲基氯硅烷) 进行封端。也可参见封端。

Resin (树脂): 离子交换分离使用的固体聚合物填料。最常用的树脂是粒径小于 $10 \mu\text{m}$ 的 PS-DVB 共聚物。离子型官能团结合在树脂上。

Resolution (R_s) (分离度, R_s): 色谱柱分离色谱峰的能力。 $R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / [(w_{b1} + w_{b2}) / 2]$, 其中 t_{R2} 和 t_{R1} 是两个色谱峰的保留时间, w_b 是两峰峰底宽。分离度通常表示两峰分离程度。分离度为 1 时, 认为是最小的可测量分离, 可以进行良好定量。分离度为 0.6 时, 可以分辨两个等高的色谱峰。分离度为 1.5 时, 认为两个等高峰已达到足够的基线分离。分离度为 1.7 或以上, 一般为耐用方法的理想值。参见 144 页图 80。

Resolution equation (分离度方程): 也称一般分离度方程和 Purnell 方程; $R = 4N^{1/2} [(\alpha - 1) / \alpha] [k / (1 + k)]$, 其中 N 是柱效, α 是分离因子, k 是保留因子。

Retention factor (k) (保留因子, k): 样品组分滞留在固定相中的时间与其在流动相中的时间之比。用调整保留时间除以滞留时间计算; $k = (t_R - t_M) / t_M$, 其中 t_R 是样品峰的保留时间, t_M 是不保留峰的保留时间。(以前使用的是 k' , 称为容量因子或容量比)

Retention time (t_R) (保留时间, t_R): 也称总保留时间。从进样开始到出现某组色谱峰的最高点所经历的时间。总保留体积 (V_R) 用保留时间乘以流速测得。调整保留时间 (t_R') 则需减去色谱柱空隙体积; $t_R' = t_R - t_M$ 。一般测定从进样点到峰顶点的距离, 但应测定对称峰的重心。

Retention volume (V_R) (保留体积, V_R): 从色谱柱中洗脱一种物质需要的流动相体积; $V_R = F t_R$ 或 $V_R = V_M + K_D V_S$, 其中 V_M 是空隙体积, K_D 是分布系数, V_S 是固定相体积。也可参见保留时间。

Reversed phase chromatography (反相色谱): 最常用的 HPLC 模式。使用低极性填料, 如十八烷基-或辛基硅烷固定相键合到硅胶或中性聚合物微球上。流动相一般为水或与水混溶的有机溶剂, 如甲醇或乙腈。按照溶质的疏水性或亲油性进行洗脱。疏水性越强, 保留就越强。分析物的水溶性越大, 保留就越弱。该技术有许多可变因素, 各种流动相添加剂可造成不同的选择性。例如, 分析阴离子时加入缓冲液和四烷基铵盐, 形成离子对进行分离, 与离子交换色谱类似。90% 以上的 HPLC 分析人员使用反相色谱。

Reynolds number (Re) (雷诺数, Re): 流体粘滞力与惯性力的比值。在平滑的无填充管内测量流量; $Re = ud/(\eta/\rho)$, 其中 u 是平均流速 (用厘米/秒表示), d 是管径, η 是粘度 (用厘米秒/克表示), ρ 是密度 (用克/立方厘米表示)。低 Re 时, 粘滞摩擦主要控制着流体的运动, 使其缓慢而平稳。在空管中, Re 超过 4200 时, 流体完全呈湍流状态。在填充柱床上, u 用平均间隙流速取代, d 为平均粒度。在填充柱床内 Re 值大于 10 时流体为湍流, 但不是全湍流状态, 直到 Re 超过 100-200。

R_s : 参见分离度。

S

S: 反相色谱中的溶剂强度参数。以 $\log_{10} k$ 对有机改性剂体积作图, 曲线的斜率与溶质相关。 S 随改性剂类型、固定相和温度而变化。

SAX: 见强阴离子交换剂。

SCX: 见强阳离子交换剂。

σ^2 : 见峰畸变性。

Salting-out effect (盐析作用): 在流动相中使用高浓度盐缓冲液时, 导致低极性分析物在水中溶解性降低, 从而在溶液中沉淀或析出。最常用于蛋白质的疏水相互作用色谱, 蛋白质首先在高盐浓度下沉淀, 然后用反相梯度洗脱通过逐渐稀释使其洗脱。

Sample capacity (样品容量): 指进样不过载的最大样品量。一般用每克填料的样品克数表示。过载的定义是, 使柱效比正常值降低 10% 的进样样品质量; 有时称为样品负荷量。

Sampling Rate (采样速率): 参见数据采集速率。

Saturator column (饱和柱): 参见预柱。

Scalability (放大): 在从分析色谱过渡到制备色谱的过程中, 使用相同粒度和键合相, 在不同内径色谱柱上得到可重现的结果; 通常是使用较大内径的色谱柱以增加容量; 线性放大过程最大限度地缩短了优化制备分离的时间。

SEC: 见尺寸排阻色谱和立体排阻色谱。

Sedimentation (沉降): 用于筛分离离子交换色谱所用树脂的技术。在一个固定于固定平面的容器中加入溶剂, 通常为水, 后将宽分布的微球加入溶剂中。基于颗粒大小和密度, 微球将以不同速度下沉, 形成颗粒大小梯度, 即可取出感兴趣的馏分。通过沉降可以得到非常窄的颗粒粒径范围。

Selectivity or selectivity factor (α) (选择性或选择性因子, α): 已被分离因子取代的旧术语。有时称为相对保留。

Selectivity coefficient ($k_{A/B}$) (选择性系数, $k_{A/B}$): 在离子交换色谱中, 按离子交换剂的质量作用定律得到其平衡系数, 并用电渗流选择同一溶液中存在的两个离子表征离子交换剂的性能。例如, 用 Na^+ 交换 H^+ $k_{Na/H} = ([Na]_S [H]_M) / ([Na]_M [H]_S)$ 。

Semi-preparative chromatography (半制备色谱): 在分析柱 (4-5 mm 内径) 或略大的色谱柱 (6-10 mm 内径) 上进行的制备型 LC。进样量一般为毫克到低克级。

Sensitivity (灵敏度): 对特定量的分析物的信号响应, 被归一化为产生该响应的分析物的量, 通常由校准曲线的斜率来确定。

Separation factor (α) (分离因子, α): 测量两个组分相对保留的热力学因子。过去称为选择性或选择性因子。相对保留; $\alpha = t_{R2}'/t_{R1}' = k_2/k_1$, 其中 t_{R2}' 和 t_{R1}' 分别为峰 2 和峰的调整保留时间, k_2 和 k_1 是相应的保留因子。

Separation impedance (E) (分离阻抗, E): 由 John Knox 建立的一种性能指数, 用以比较两个色谱系统的柱效, 对分析时间和压力降进行归一化处理; $E = t_R \Delta p / N^2 \nu (1 + k)$, 其中 t_R 为保留时间, Δp 为压力降, N 为柱效, ν 是折合流速, k 是保留因子。E 值越低, 系统越好。

SFC: 参见超临界流体色谱。

Silanol (硅凝胶): 硅胶表面上的 Si-OH 基团。硅醇基在强度方面的变化, 与其位置、彼此间的联系以及硅胶的金属含量有关。最强的硅醇基为酸性, 在色谱过程中常与碱性化合物发生不良相互作用。

Silanophile (亲硅醇基化合物): 对硅胶表面的活性或酸性硅醇基具有强亲和性的化合物。通常为强碱性胶。

Silica gel (硅胶): 应用最广泛的 HPLC 填料。具有多孔、无定形结构, 由硅氧烷和硅醇基组成。可用于所有 LC 模式, 在吸附色谱作为填料、在液-液色谱或化学键合相中作为支持剂, 同时以其不同的孔径也可作为 SEC 的填料。HPLC 中使用的是平均粒径 3、5 和 10 μm 的微粒硅胶。与不规则硅胶相比, 现代分析 HPLC 柱更倾向于使用球形硅胶, 因为这种填料具有良好的重现性和较低的压力降。常称为硅胶。

Siloxane (硅氧烷): Si-O-Si 键。硅胶、硅烷化合物或键合相中的一种基本化学键。除在高 pH 下的条件下均较稳定。对 HPLC 分离几乎没有影响。

Silylation (硅烷化): 有机氯或有机硅烷与含反应基团的化合物发生反应的过程。在 LC 中, 指在色谱分离之前对溶质进行的衍生化过程, 使其可检测或防止与固定相发生有害相互作用。也可以指在固体支持剂上添加化学键合相或使填料去活以降低表面活性的过程。

Simulated moving bed (模拟移动床): 一种色谱系统, 用一系列色谱柱和阀设置, 模拟流动相和固定相的逆流移动, 能够连续取出产品, 并重复利用样品。制备级色谱中应用的一种复杂形式的循环色谱。

Size exclusion chromatography (SEC) (体积排阻色谱, SEC): 同立体排阻色谱。

Slurry packing (匀浆填充): 将微粒填充入 HPLC 色谱柱的最常用技术。填料悬浮在约 10% (w/v) 的匀浆中, 用特殊的高压泵快速泵入空柱管中。

Snyder ϵ' : 吸附色谱中的溶剂强度参数。溶剂占据的每单位表面积的溶剂吸附能量。

Soap chromatography (皂色谱): 离子对色谱的早期名称。将长链皂或表面活性剂作为流动相添加剂。

Sol gel (溶胶-凝胶法): 硅胶由硅溶胶聚集形成。得到的 B 型硅胶与较早的 A 型硅胶相比, 具有较低的表面酸性、较低痕量金属、较低比表面积和孔隙率, 以及更高的 pH 稳定性。

Solid phase extraction (SPE) (固相萃取, SPE): 将 20-40 μm dp 固相填料装填在小塑料卡套柱、膜盘或 96 孔板的孔中, 以此进行样品制备的技术。使用的固定相与 HPLC 填料一致。虽然与色谱相关, 但 SPE 的原理却不相同, 有时也称为数位式色谱。最常用的过程需要 4 步: 活化吸附剂、加入样品、洗去杂质, 然后用体积尽可能小的强溶剂洗脱样品。

Solid support (固体吸附剂): 同支持剂。

Solute (溶质): 也可参见分析物。

Solvent (溶剂): 用于溶解样品并注入 HPLC 柱或 CE 毛细管的液体。有时指使用的流动相。也可参见洗脱液。

Solvent demixing (溶剂分层): 使用两种强度区别非常大的溶剂时容易出现的现象 — A 为弱溶剂, B 是强溶剂 — 两者作为洗脱液用于未修饰硅胶或氧化铝。强溶剂 (B) 优先被固定相活性表面吸附, 直到饱和; 这种情况出现后, 弱溶剂 (A) 在流经色谱柱的过程中被富集或分层。最后, 整根柱子被溶剂 B 饱和, 流动相在起始强度时与溶剂 A 混合流出, 样品组成则随着溶剂强度的突然改变被洗脱。

Solvent selectivity (溶剂选择性): 溶剂影响选择性的能力。例如, 溶剂 B 从 5% 变到 10%, 或将反相色谱中的有机改性剂从甲醇换成乙腈, 将影响谱带间距。

Solvent-selectivity triangle (溶剂选择性三角形): 在不同溶剂中进行选择以改变谱带间距的有用指南。溶剂选择性取决于溶剂分子的偶极距、酸性和碱性。

Solvent strength (溶剂强度): 指溶剂从色谱柱中洗脱特定溶质或化合物的能力。Snyder 描述氧化铝和按洗脱顺序对溶剂定量分级的线性洗脱吸附色谱 (液-固色谱) 性质。在硅胶和活性炭吸附剂上应用不广泛。也可参见 Snyder ϵ' 。

Sorb (吸附): 当保留机制 — 吸附、吸收或分配 — 不明时, 被固定相保留的过程。

Sorbent (吸附剂): 指 LC 使用的填料。常用吸附剂为聚合物、硅胶、氧化铝、二氧化钛、二氧化锆和化学修饰材料。

SPE: 参见固相萃取。

Specific surface area (特定表面积): 用公认技术 (如, 氮吸附 BET 法) 测得的 LC 填料表面积。

Spherical packing (球形填料): 指球形的固体填料。在分析型 HPLC 中, 球形填料一般比不规则填料更受欢迎, 但不规则填料因其价格低廉常用制备色谱中。

Standards (标样): 含有已知量目标化合物的样品。通过相同条件下对比标准和样品的保留时间, 鉴别样品峰。在定量分析中, 以外标化合物的检测器输出 (峰面积或峰高) 对浓度作图绘制校正曲线; 将未知物的检测器输出带入校正曲线进行计算浓度。内标法是将已知浓度但保留时间不同的化合物加入到样品中, 通过对比内标物与未知物的相对响应值对未知物进行定量。

Stagnant mobile phase (滞留流动相): 填料颗粒孔隙中所含的流动相部分。

Stationary phase (固定相): 参与色谱过程的色谱保留性固定相。LC 中的固定相可以是固体、在固体支持剂上键合的、固定的或涂层相, 或涂壁相。固定相常代表 LC 模式的特征。例如, 硅胶用于吸附色谱, 十八烷基硅烷键合相用于反相色谱。

Stationary zone (固定区带): 与固定相不同。固定区带包括滞留流动相和具有色谱活性的固定相。

Stepwise elution (分段洗脱): 在色谱过程中使用不同组成的洗脱液。通过泵或选择器阀以分段形式改变洗脱液。而梯度洗脱是连续改变流动相的组成。

Steric exclusion chromatography (立体排阻色谱): LC 的一种主要模式, 其中样品基于其在溶液中的大小得到分离。也称体积排阻色谱、凝胶渗透色谱、凝胶过滤色谱和凝胶色谱。立体排阻色谱在聚合物分离和表征中最为常用。

Sterically protected bonded phase (立体保护键合相):

对大官能团进行立体保护的键合相, 如, 异丙基和异丁基环绕共价键合表面硅氧烷。防止硅氧键发生催化水解, 以及在 pH 3 以下条件下的键合相流失。

Straight phase chromatography: 同正相色谱。

Strong anion exchanger (强阴离子交换剂): 带强碱性离子基团 (如, 四烷基胺基团) 的阴离子交换填料。

Strong cation exchanger (强阳离子交换剂): 带强酸性离子基团 (如, 磺酸基) 的阳离子交换填料。

Strong solvent (强溶剂): 一般指对化合物溶解性良好的溶剂; 在色谱中, 指提供较高溶剂强度能使分析物快速从色谱柱中洗脱的流动相成分; 在反相色谱水和乙腈的二元溶剂系统中, 乙腈是强溶剂。

Sub-2 μm (亚 2 μm): 指平均直径 2 μm 以下的多孔填料; 目前的产品直径在 1.5 到 2.0 μm 之间。

Sulfonyl cation exchanger (磺酰基阳离子交换剂): 树脂类填料上的强阳离子交换官能团, 一般为丙基- SO_3H 。可能以阳离子形式存在, 如, 钠、铵、银和钙。

Supercritical fluid chromatography (SFC) (超临界流体色谱, SFC): 一种将超临界流体作为流动相的技术。该技术已用于不能使用 LC (因检测问题), 或 GC (因挥发性不足) 分析的物质的分离。应用实例包括甘油三酯、碳水化合物和脂肪酸。目前 SFC 已可以同时应用 HPLC 泵和 GC 检测器了。

Superficial velocity (us) (表面速度, us): 当相同色谱柱在未填充但流速相同的条件下操作, 假设的流动相流速; $us = F/A_c$, 其中 F 是流速, A_c 是柱管的横截面积。

Superficially porous packing (表面多孔填料): 同多孔层微球。

Support (支持剂): 指固体颗粒。在 HPLC 中, 支持剂可以是裸露的、覆盖涂层或带化学键合相。通常, 固体支持剂不参与色谱分离过程。

Suppressor column (抑制柱): 指置于离子交换柱后的色谱柱。其目的是去除或抑制缓冲离子的离子化, 从而使样品离子在电导检测器的弱电导背景下可以被检测到。有时用膜抑制器代替色谱柱。

Surface area (比表面积): 指吸附剂固体表面的总面积, 用公认的测量技术(如, 使用氮气吸附的 BET 法)测定。一般多孔吸附剂(如, 硅胶)的比表面积范围为 100 到 600 m²/g。

Surface coverage (表面覆盖率): 一般指键合在 LC 支持剂上的单位面积固定相的质量。常用毫摩尔/平方米表面积表示。有时也用碳百分比表示。

Swelling-shrinking (胀缩): 树脂和凝胶由于溶剂环境的改变而增加或减小其体积的过程。胀缩取决于交联度程度, 低交联度的树脂比高交联度树脂更容易胀缩。如果在填充柱中发生溶胀, 将使柱发生堵塞, 反压升高, 并影响柱效。

T

Tailing (拖尾): 正常高斯峰不对称因子大于 1 的现象。该色谱峰后缘延长。拖尾是由填料位点造成的, 溶质比正常保留更强, 并且具有解吸附更慢。拖尾现象的一个典型离子是在中等 pH 值下, 低覆盖率反相填料残留硅醇基对氨类的强吸附。造成拖尾的其它原因还包括, 进样量过大、色谱柱填充不当、柱外体积过大、不良接头、检测器体积过大, 以及检测器响应慢等。见 143 页图 79。

Tailing factor (拖尾因子): 美国药典对峰不对称性的描述, 指峰高 5% 处的峰宽除以距峰顶点峰宽处较短半峰宽两倍的值大于 1 的为拖尾峰。也可参见**不对称因子**。

Temperature programming (温度编程): 在分离过程中柱温随时间改变。在 HPLC 中很少使用, 主要用于分段洗脱方式。

Ternary mobile phase (三元流动相): 三种溶剂或缓冲液组成的流动相。

Theoretical plate (N) (理论塔板数, N): 由 Martin 和 Syngé 提出的一个概念。将色谱分离与蒸馏理论联系在一起。与这一概念有关的柱长称为高度, 相当于理论塔板。也可参见 **HETP**。塔板数用下式计算 $N = 16(V_R/w^b)^2 = 16/(t_R/w^b)^2$, 其中 V_R 是保留体积, w^b 是色谱峰峰底宽, t_R 是保留时间, 也可参见 N 。

Thermally tuned tandem column chromatography (热调谐串联柱色谱): 一种 LC 形式, 两根选择性完全不同的色谱柱串联在一起, 在两个温度下操作, 优化分离度或分析速度。两根色谱柱使用一种洗脱液, 所有样品都要通过两根色谱柱, 然后用同一检测器检测。这不是二维技术, 因为每个样品组分只有一个色谱峰。

Titania (二氧化钛): 一种吸附色谱中不太常用的吸附剂。

TIC: 总离子流色谱图。

t_m : 见**迁移时间**。

t_M : 见**滞留时间**。

TOF: 一种质量分析器, 在初始动能已知的情况下, 根据离子通过设定距离所需的时间来测量离子的质荷比。

Tortuosity or tortuosity factor (曲折度或曲折因子): 填充柱的一种性质, 当溶质沿色谱柱轴向扩散时, 控制其纵向扩散抑制程度。van Deemter 方程中 B 项与曲折度成正比。也可参见 B 项、 γ' 和**分子扩散项**。

Total mobile-phase volume (V_t) (流动相总体积, V_t): SEC 柱中的流动相总体积。也称为总渗入体积。同 V_M 。

Total permeation volume (V_p) (总渗透体积, V_p): SEC 填料的保留体积, 所有小于最小孔径的分子将被洗脱。换言之, 所有分子全部渗透到全部孔隙中, 以单一峰被洗脱。同 V_M 。

Total porosity (ϵ_T) (总孔隙率, ϵ_T): 色谱柱中流动相总体积与色谱柱总体积的比值; $\epsilon = V_M/V_c = \epsilon_o + \epsilon_i(1 - \epsilon_o)$; 其中 V_M 是流动相体积, V_c 是色谱柱体积; ϵ_o 是颗粒间孔隙率, ϵ_i 是颗粒内孔隙率。

Totally porous packing (全多孔填料): 固定相是多孔基质, 溶质渗透入多孔基质与固定相发生相互作用。

t_R : 见**保留时间**。

t_R' : 见**调整保留时间和保留时间**。

Trace enrichment (痕量富集): 用弱流动相或溶液洗脱时, 将痕量化合物保留在 HPLC 或预柱填料上, 然后再加入较强流动相, 使其以浓缩形式被洗脱下来, 这种技术称为痕量富集。该技术最成功的应用是对疏水化合物的痕量浓缩, 如, 用反相填料富集水中的多环芳烃。用强溶剂(如, 乙腈)洗脱富集的化合物。

Triethylamine (三乙胺): 用反相色谱分离碱性分析物时, 一种极为常用的屏蔽硅醇基的添加剂。

Trifluoroacetic acid (三氟乙酸): 使用反相色谱分离多肽和蛋白质时极为常见的添加剂。

Tryptic digestion (胰蛋白酶裂解): 一种有选择并可重复地切断蛋白质肽键的技术, 得到可以用反相 LC 梯度洗脱分析的, 原始蛋白质的较小特征单位。

Turbulence (湍流): 流体流速在某点上下随机波动的状态。也可参见雷诺数和湍流。

Turbulent flow (湍流): 一种流体运动形式, 随时间变化, 液流不再平稳, 而是变得无序而波动。其特征是压力降明显高于层流区获得同样体积流速产生的压力降。

Turbulent flow chromatography (紊流色谱): 在使用高雷诺数的条件下, 用大粒径填料以极高线性流速进行的色谱分离。在此条件下, 在 H 对 v 的曲线上, H 随 v 增加而减少。见 144 页图 80。

t_w : 见带宽。

Two-dimensional chromatography (二维色谱): 部分或全部分离样品组分继续进入另一个分离步骤的过程。可以将从第一根色谱柱洗脱的特定组分导入第二根色谱柱或具有不同分离特征的系统中。包括二维 TLC 等技术, 使用两种展开系统, 将薄层板旋转 90° , 再使用第二种展开剂。也包括 LC 再接 GC, 一种 LC 模式, 再接另一种不同的模式, 如, 反相色谱后面接 SEC。也可参见多维色谱。

Type A silica (A 型硅胶): 由胶化可溶性硅酸盐形成的硅胶。与 B 型硅胶相比, 通常具有较高的酸性、较高的比表面积和孔隙率、较多痕量金属, 较低的高 pH 稳定性。

Type B silica (B 型硅胶): 见溶胶-凝胶。

t_0 : 见空隙时间。

U

u : 参见线性流速和线速度。

u_0 : 参见间隙流速。

u_M : 参见流动相流速。

u_s : 参见表面流速。

u_z : 参见区域流速。

UHPLC: 指超高压液相色谱。泛指任何压力高于常规泵 (400 bar) 的分离, 原指在 20000 psi 以上进行的分离。

V

Vacancy chromatography (空穴色谱): 流动相添加剂造成检测器正输出信号的技术。一种溶质从色谱柱中洗脱时, 将使该信号稀释并产生负峰或空穴。这项技术起初用于单柱离子色谱, 其中柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液等流动相在 UV 区有吸收。当没有吸收的阴离子被洗脱时, 将稀释 UV 吸收背景, 产生一个负峰; 检测器的输出一般设为反向, 从而使色谱图看起来为正向。这一技术也已应用于 CE 检测中。

van Deemter equation (van Deemter 方程): 用于解释色谱中峰展宽的方程。该方程提出了理论塔板高度 (HETP) 的概念并由三项进行描述。A 项描述的是由轴向流速不均匀导致的涡流分散或扩散。B 项反映的是流经色谱柱的溶质分子扩散或纵向扩散对峰展宽的影响。C 项是固定相内传质对峰展宽的影响, 将溶质在固定相和流动相之间的有限速度考虑在内。其最简单的表达是, $h = A + B/v + Cv$ 。也可参见折合塔板高度和折合流速。

V_c : 参见柱体积。

V_d : 参见死体积。

V_0 : 参见间隙体积。

Velocity (u) (线速度): 同线速度。

v_{eo} : 参见电渗流。

V_i : 参见颗粒内体积。

Viscosity (η) (粘度, η): 也称为流动相粘度。流动相粘度随色谱柱温度而改变。低粘度流动相通常比粘度较差的流动相提供更高的柱效, 因为扩散因子与溶剂粘度呈负相关。例如, 反相色谱中, 使用乙腈作为改性剂比用异丙醇柱效高, 因为后者粘性更大。柱反压直接与溶剂粘度成正比。

V_M : 参见滞留体积。也可参见流动相体积。

Void (空隙): 通常是在柱头形成的空隙或间隙, 由柱填料沉降或溶解产生。色谱柱中的空隙导致了柱效降低和分离度损失。即便是小空隙, 对小粒径色谱柱也将是灾难性的。有时空隙可以用玻璃微球或色谱柱中使用的相同多孔填料填充。

Void time (t_0) (空隙时间, t_0): 不保留峰的洗脱时间; 也称死时间和滞留时间 (t_M)。空隙体积由空隙时间乘以流速测得。

Void volume (V_M) (空隙体积, V_M): 色谱柱中流动相的总体积; 色谱柱的其余部分为填料。该体积可以用进样不保留物质测定。也称死体积。常用符号 V_0 表示空隙体积。这只能用于填充非多孔填料的色谱柱。用 V_0 可以表示 SEC 中的排阻体积 (V_e)。

V_p : 参见总渗透体积。

V_R : 参见保留体积和洗脱体积。

V_R' : 参见调整保留时间。

V_t : 参见总流动相体积。

V_o : 参见排阻体积。

W

Wall effect (管壁效应): 刚性 HPLC 柱管壁附近填料密度松散造成引起的后果。由于局部渗透性增加, 流动相靠管壁附近的流速有稍微加快的趋势了。管壁附近的溶质分子比溶质峰的平均移动速度快, 因而造成峰变宽, 以及柱效损失。

WAX: 见弱阴离子交换剂。

w_b : 见峰宽。

WCX: 见弱阳离子交换剂。

Weak anion exchanger (弱阴离子交换剂): 带弱碱性离子基团的阴离子交换填料, 如氨基 DEAE。

Weak cation exchanger (弱阳离子交换剂): 带弱酸性离子基团 (如, 羧酸基) 的阳离子交换填料。

Weak solvent (弱溶剂): 通常指对化合物溶解性差的溶剂; 在色谱中, 指提供低溶剂强度使分析物从色谱柱中洗脱较慢的流动相组分, 在反相 LC 的水-乙腈二元溶剂系统中, 水被认为是弱溶剂。

Wilke-Chang equation (Wilke-Chang 方程): 用于估算扩散系数的半经验方程, 溶质分子大小和溶液粘度对液体的影响。

X

Xerogels (干凝胶): SEC 中使用的在不同溶剂中胀缩的凝胶。也指用可溶性硅酸盐酸化制备的硅胶基填料, 为无定形、高比表面积、高孔隙率的刚性颗粒。

Z

Zero dead volume (零死体积): 接头或组件没有洗脱液未及的体积。

Zirconia (二氧化锆): 多孔氧化锆。作为色谱吸附剂使用, 通常用聚合有机固定相覆盖或键合。

Zone: 参见谱带。

Zone velocity (u_z) (区带速度, u_z): 溶质区带移动的速度; $u_z = u_M / (1 + k) = L / t_R$, 其中 u_M 为流动相速度, k 为保留因子, L 为柱长, t_R 为保留时间。

Zwitterions (两性离子): 在溶液中既带正电荷又带负电荷的化合物。

词汇表参考文献

- 1:** R.E. Majors and P.W. Carr, LCGC 19 (2) 124-162 (2001).
- 2:** 'Nomenclature for Chromatography', Pure and Appl. Chem. 65 (4), 819-872 (1993).
- 3:** J.P. Foley and J.G. Dorsey, Anal. Chem. 55, 730 - 737 (1983)
- 4:** L.R. Snyder, P.W., Carr, and S.C. Rutan, J. Chromatogr. A 656, 537 (1993).

词汇表作者

Peter W. Carr: Peter W. Carr 是明尼苏达大学 (207 Pleasant Street SE, Minneapolis, MN 55455-0431) 化学系的化学教授, LCGC 的常务编委。

Ronald E. Majors: Ronald E. Majors 是 "Column Watch" 和 "Sample Prep Perspectives" 的主编。Ronald E. Majors 是安捷伦科技公司 (Wilmington, Delaware) 生命科学与化学分析部, 色谱柱与消耗品部门的资深化学家, 也是 LCGC 的常务编委。

致谢

特别感谢参与本书编撰的安捷伦色谱工作人员:

样品前处理产品经理 Paul Boguszewski

Aaron Boice, LC/Q-TOF 产品经理

LC 柱技术支持专家 William Champion

应用化学家 John W. Henderson

LC 柱市场战略经理 Maureen Joseph 博士

小分子 LC 柱产品经理 Jason Link 博士

大分子 LC 柱产品经理 Linda Lloyd 博士

LC 资深应用科学家 William Long 博士

Anne Mack, 小分子液相色谱柱应用科学家

资深科学家 Ron Majors 博士

Maggie Ostrowski, GC/MS 和 LC/MS 单四极杆产品经理

LC 柱技术支持专家 Rita Steed

Lester Taylor, 小分子制药市场经理

Martin Vollmer 博士, 分析型和制备型 HPLC 营销经理

LC 和 LC/MS 应用专家 Michael Woodman

索引

性能影响因素索引

保留

螯合化合物	52
保留因子	7
等度优化	79, 85-86
方法开发	65-67, 86
分离度	8
固定相改性	53, 68-71
故障排除	68, 76-79, 117-119, 121, 123-124
聚合物色谱柱	84
LC/MS	73
流动相选择	68
色谱柱老化	57
色谱柱选择	64
数据采集速率	46
梯度	54
梯度公式	10-11
梯度优化	82
UHPLC	29
USP 指定产品	130
优化色谱柱重新平衡	55-56
正相	93-94
滞后体积	49

泵

等度	15
二元	14
溶剂混合	14
四元	15
压力范围	13
延迟体积	16

方法转移

55, 87, 115

分离度

8-9

保护柱	115
保留因子	7
等度优化	80-81, 85
方法开发	60
固定相改性	69-71
固定相选择	66
故障排除	68, 74-78, 87, 120
LC/MS	31
色谱柱规格	35
色谱柱老化	57
梯度优化	83-84
填料粒径	34
UHPLC	13, 30, 113
USP 指定产品	126
药物应用	67
正相	93, 94
滞后体积	16, 51, 52, 119
柱外体积	16, 40

故障排除

120

保留	123-124
峰形	97
固定相改性剂	74, 76-77
基线	74-75, 124-125
流动相	68-69
压力	121

缓冲液（另请参见流动相） 56, 58-59, 68, 70, 71, 73, 74, 86, 102-103, 113, 135

检测

单四极杆质谱	99
二极管阵列	23, 25
飞行时间质谱	99
离子化	101
灵敏度	24, 97
溶剂/缓冲液选择	71, 102, 110
软件	106-107
三重四极杆质谱	99, 100
数据采集速率	25, 105

稀释剂强度	123	pH	53, 69-74, 76, 77, 84, 119
线性范围	24, 98	容量因子	7, 8, 57
效率	5-8, 10-11, 30	溶剂安全盖	185
在线过滤器	89, 157	溶剂效应	46, 123
质谱	22, 97	色谱柱	
柱外体积	16, 40, 48, 88	螯合	39, 52-53
紫外 (UV)	22-23, 24, 25, 71, 73, 97, 124	表面多孔	26, 30, 60
接头与连接		储存	115-117
A-Line Quick Connect 快速连接色谱柱接头	16	规格	27, 28, 35, 64, 78, 83, 123
不锈钢		老化	39, 57, 124
高压		平衡/重新平衡	55-56, 117, 118, 123
故障排除	116, 122, 124	维护	115
接头类型	44	选择	28, 62-63, 121
聚合物	43	延长寿命	36-37, 116
可重复使用	43	柱温箱	21
Parker	42	数据采集速率	25, 39, 46-47, 87, 105, 123
PEEK (聚酮)	43	梯度	
如何实现正确的接头连接	42	Agilent 1290 LC	89
Swagelok	88	安捷伦方法转换软件	46
死体积	28	操作	54-56
正确使用	42-45	多肽/蛋白质应用	75
进样	45	反相	84
故障排除	68, 76, 120-125	方法开发	61
交叉污染	20	固定相选择	65-66
缩放谱图 (梯度)	89	故障排除	74, 120-125
自动进样器	17-21	磺胺类药物应用	83
流动相		聚合物色谱柱	84
变化	68-69, 73	离子交换	95
故障排除	68-69	溶剂饱和	115
混合	13-15, 68, 69, 73, 119, 125	色谱柱清洗	57
LC/MS	71, 102-103	缩放谱图	89
强度	10, 78, 79	梯度公式	10-11
UHPLC	13, 113	优化	78, 82-83
选择改性剂/缓冲液	53, 71, 135	“无人值守”系统	81
选择溶剂	68, 102-103	正相	93
正相	93	滞后体积	48, 49, 51, 52, 119
毛细管	16, 22, 88, 105, 178, 181-182		

脱气	13-15, 69
USP 指定产品	126-131
选择性	
保留因子	7
等度优化	79-81, 85
方法重现性	118-119
方法转移	87
分离度	8
分离因子	7-8
固定相改性	69-70, 135
故障排除	76, 117, 120-123
聚合物色谱柱	84
LC/MS	72
流动相选择	68
色谱柱老化	57
色谱柱特性	33
色谱柱选择	64-66
梯度优化	82
效率	6
选择性公式	7-8
选择性因子	7-8
压力公式	9, 30, 121
延迟（滞后）体积	14-16, 18, 21, 49-50, 52, 89, 189
样品前处理	103, 109
van Deemter 曲线	10, 88

产品索引

C18 固定相	
Polaris Amide-C18	131
Polaris C18-A	127
Polaris C18-Ether	127
Poroshell 120 EC-C18	127
Poroshell 120 SB-C18	127

Pursuit C18	127
Pursuit XRs C18	127
SepTech ST150 C18	127
SepTech ST60 C18	127
ZORBAX 300SB-C18	127
ZORBAX Eclipse Extend-C18	
ZORBAX Eclipse Plus C18	76, 86, 104, 110, 127
ZORBAX Eclipse XDB-C18	92, 127
ZORBAX Extend-C18	77, 86, 122, 127
ZORBAX RRHD SB-C18	105
ZORBAX Rx-C18	127
ZORBAX SB-C18	46, 127

C3 固定相

ZORBAX 300SB-C3	75
ZORBAX SB-C3	131

C8 固定相

Polaris C8-A	128
Polaris C8-Ether	128
Poroshell 120 EC-C8	128
Pursuit C8	128
Pursuit XRs C8	128
ZORBAX C8	128
ZORBAX Eclipse Plus C8	128
ZORBAX Eclipse XDB-C8	128
ZORBAX Rx-C8	128
ZORBAX SB-C8	128
ZORBAX 快速分离 Eclipse XDB-C8	48

HILIC 色谱柱

ZORBAX Eclipse XDB-C18	92, 127
ZORBAX Rx-SIL	92, 127

HPLC 卡套柱

ChromSep	36
Dynamax 制备柱	37
Load & Lock 制备柱	37
PLRP-S	37
PL-SAX	37

PL-SCX 3.....	7	Bio SEC-5	130
ZORBAX RR	36	IonSpher C.....	131
ZORBAX RRHT.....	36	LiChrospher Diol.....	129
ZORBAX 半制备保护柱	37	PL aquagel-OH.....	130
ZORBAX 保护卡套柱	36	PLgel MIXED-D.....	96
LC/MS		PLgel.....	129
Agilent 溶剂节省柱.....	31	PLRP-S.....	33, 37, 67, 129
PLRP-S.....	33, 37, 67, 129	Polaris C18-A.....	127
ZORBAX Eclipse XDB-C18.....	92, 127	Polaris C18-Ether.....	127
ZORBAX 快速分离高通量卡套柱		Polaris C8-A.....	128
ZORBAX Rx-SIL 9	2, 127	Polaris C8-Ether.....	128
UHPLC		Polaris Si-A	127
Poroshell 120.....	30, 31	Poroshell 120 Bonus-RP.....	131
ZORBAX RRHD.....	30	Poroshell 120 EC-C18.....	127
ZORBAX RRHT.....	30	Poroshell 120 EC-C8.....	128
氨基固定相		Poroshell 120 PFP.....	130
Polaris Amide-C18.....	131	Poroshell 120 SB-C18	127
Polaris NH2	128	Poroshell 120.....	30, 31, 40, 66, 77, 84-88, 110
ZORBAX NH2	128	Poroshell 300.....	31
保护柱		Poroshell HPH-C18.....	127
ZORBAX 半制备保护柱		Poroshell HPH-C8.....	128
ZORBAX 保护卡套柱	36	ProSEC.....	130
苯基固定相		Pursuit C18	127
Pursuit Diphenyl	128	Pursuit C8	128
Pursuit PFP	130	Pursuit Diphenyl	128
Pursuit XRs Diphenyl	128	Pursuit PFP	130
ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl.....	128	Pursuit XRs C18.....	127
ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl		Pursuit XRs C8.....	128
ZORBAX Phenyl		Pursuit XRs Diphenyl	128
ZORBAX SB-Phenyl.....	53, 128	Pursuit XRs Si	127
灯	183	SepTech ST150 C18.....	127
反相色谱柱		SepTech ST60 C18.....	127
AdvanceBio 肽谱分析色谱柱.....	127	Ultron ES-OVM.....	131
AdvanceBio 糖谱分析色谱柱.....	131	ZORBAX 300SB-C18	66, 127
Bio SEC-3	130	ZORBAX 300SB-C3	75
		ZORBAX C8	128
		ZORBAX Eclipse Extend-C18	

ZORBAX Eclipse Plus C18.....	76, 86, 104, 110, 127
ZORBAX Eclipse Plus C8.....	128
ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl.....	128
ZORBAX Eclipse Plus.....	76, 85-86
ZORBAX Eclipse XDB Phenyl.....	128
ZORBAX Eclipse XDB.....	92
ZORBAX Eclipse XDB-C18.....	127
ZORBAX Eclipse XDB-C8.....	128
ZORBAX Extend-C18.....	77, 86, 122, 127
ZORBAX GF-250.....	130
ZORBAX GF-450.....	130
ZORBAX ODS 经典.....	127
ZORBAX ODS.....	127
ZORBAX Phenyl	
ZORBAX RRHD	
ZORBAX RRHD SB-C18.....	105
ZORBAX RRHT.....	67
ZORBAX Rx-C18.....	127
ZORBAX Rx-C8.....	128
ZORBAX SB-C18.....	45, 46, 127
ZORBAX SB-C3.....	131
ZORBAX SB-C8.....	55, 128
ZORBAX SB-Phenyl.....	53, 128
ZORBAX SIL.....	127
ZORBAX StableBond.....	76
ZORBAX TMS.....	129
ZORBAX 快速分离 Eclipse XDB-C8.....	48
Poroshell 300.....	31
Pursuit C18.....	127
Pursuit C8.....	128
Pursuit Diphenyl.....	128
Pursuit PFP.....	130
Pursuit XRs C18.....	127
Pursuit XRs C8.....	128
Pursuit XRs Diphenyl.....	128
Pursuit XRs Si.....	127
Ultron ES-OVM.....	131
ZORBAX 300SB-C18.....	66, 127
ZORBAX 300SB-C3.....	75
ZORBAX Bonus-RP	
ZORBAX C8.....	128
ZORBAX Eclipse Extend-C18	
ZORBAX Eclipse Plus C18.....	76, 86, 104, 110, 127
ZORBAX Eclipse Plus C8.....	128
ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl.....	128
ZORBAX Eclipse Plus.....	76, 85-86
ZORBAX Eclipse XDB.....	92
ZORBAX Eclipse XDB-C18.....	92, 127
ZORBAX Eclipse XDB-C8.....	128
ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl	
ZORBAX Extend-C18.....	77, 86, 122, 127
ZORBAX GF-250.....	130
ZORBAX GF-450.....	130
ZORBAX ODS 经典.....	127
ZORBAX ODS.....	127
ZORBAX RRHD SB-C18.....	105
ZORBAX RRHT.....	67
ZORBAX Rx-C18.....	127
ZORBAX Rx-C8.....	128
ZORBAX SB-C18.....	45, 46, 127
ZORBAX SB-C3.....	131
ZORBAX SB-C8.....	55, 128
ZORBAX SB-Phenyl.....	53, 128
ZORBAX SIL.....	127
ZORBAX StableBond.....	76

硅胶柱

IonSpher C.....	131
Polaris C18-A.....	127
Polaris C18-Ether.....	127
Polaris C8-A.....	128
Polaris C8-Ether.....	128
Polaris Si-A.....	127
Poroshell 120 EC-C18.....	127
Poroshell 120 EC-C8.....	128
Poroshell 120 SB-C18.....	128
Poroshell 120.....	30, 31, 40, 66, 77, 84-88, 110

ZORBAX TMS	129	Hi-Plex Pb	130
ZORBAX 快速分离 Eclipse XDB-C8	48	PL-SAX	37
过滤器		PL-SCX	37
1200 RRLC	114	ZORBAX 300SCX	130
1260 Infinity LC	188	ZORBAX SAX	129
1290 Infinity LC	114	ZORBAX SCX	128
HPLC 卡套柱	36	氰基固定相	
检测器		ZORBAX CN	128
1290 Infinity II 二极管阵列	25	ZORBAX Eclipse XDB-CN	128
6000 系列 LC/MS	99	ZORBAX SB-CN	128
聚合物色谱柱		筛板	
Bio SEC-3	130	Poroshell 120	30
Bio SEC-5	130	手性柱	
Hi-Plex Ca (Duo)	129	ChiraDex 手性柱	130
Hi-Plex Ca	129	体积排阻色谱柱	
Hi-Plex H	129	Bio SEC-3	130
Hi-Plex Na (Octo)	131	Bio SEC-5	130
Hi-Plex Na	131	PL aquagel-OH	130
Hi-Plex Pb	130	PLgel MIXED-D	96
PL aquagel-OH	130	PLgel	129
PLgel MIXED-D	96	ProSEC	130
PLgel	129	液相色谱仪	
PLRP-S	33, 37, 67, 129	1100 LC	93
PL-SAX	37	1200 RRLC	50, 114
PL-SCX	37	1200SL	52
ProSEC	130	1260 Infinity LC	188
SepTech ST150 C18	127	1290 Infinity II LC	13
SepTech ST60 C18	127	1290 Infinity LC	106, 114
卡套系统色谱柱		正相色谱柱	
离子交换色谱柱		Polaris Amide-C18	131
Bio SAX	131	Polaris NH2	128
Hi-Plex Ca (Duo)	129	ZORBAX CN	128
Hi-Plex Ca	129	ZORBAX Eclipse XDB-CN	128
Hi-Plex H	129	ZORBAX NH2	128
Hi-Plex Na (Octo)	131	ZORBAX Rx-SIL	92, 127
Hi-Plex Na	131	ZORBAX SB-CN	128

产品与订购信息

在下面几页中，我们选择了一些产品用以进行突出并提供给您快速参考部件号。

安捷伦液相色谱柱

Poroshell 120 色谱柱帮助您在任何高效液相色谱/超高压液相色谱上获得更高效率和分析速度。

参见 30-32 页获得更多信息。

Poroshell 120 - 粒径 2.7 µm						
	尺寸 (mm)	Eclipse Plus EC-C18 (USP L1)	Eclipse Plus EC-C8 (USP L7)	Eclipse Plus EC-CN	StableBond SB-C18 (USP L1)	StableBond SB-C8 (USP L7)
分析柱	4.6 x 150	693975-902	693975-906	693975-905	683975-902	683975-906
分析柱	4.6 x 100	695975-902	695975-906	695975-905	685975-902	685975-906
分析柱	4.6 x 75	697975-902	697975-906		687975-902	
分析柱	4.6 x 50	699975-902	699975-906	699975-905	689975-902	689975-906
分析柱	4.6 x 30	691975-902	691975-906		681975-902	
溶剂节省柱	3.0 x 150	693975-302	693975-306	693975-305	683975-302	683975-306
溶剂节省柱	3.0 x 100	695975-302	695975-306	695975-305	685975-302	685975-306
溶剂节省柱	3.0 x 75	697975-302	697975-306		687975-302	
溶剂节省柱	3.0 x 50	699975-302	699975-306	699975-305	689975-302	689975-306
溶剂节省柱	3.0 x 30	691975-302	691975-306		681975-302	
窄径柱	2.1 x 150	693775-902	693775-906	693775-905	683775-902	683775-906
窄径柱	2.1 x 100	695775-902	695775-906	695775-905	685775-902	685775-906
窄径柱	2.1 x 75	697775-902	697775-906		687775-902	
窄径柱	2.1 x 50	699775-902	699775-906	699775-905	689775-902	689775-906
窄径柱	2.1 x 30	691775-902	691775-906		681775-902	
Fast Guard	4.6 x 5	820750-911			820750-912	
Fast Guard	3.0 x 5	823750-911			823750-912	
Fast Guard	2.1 x 5	821725-911			821725-912	

转下页

Poroshell 120 — 粒径 2.7 μm					
	尺寸 (mm)	StableBond SB-Aq	Phenyl-Hexyl (USP L11)	Bonus-RP (USP L60)	HILIC
分析柱	4.6 x 150	683975-914	693975-912	693968-901	693975-901
分析柱	4.6 x 100	685975-914	695975-912	695968-901	695975-901
分析柱	4.6 x 50	689975-914	699975-912	699968-901	699975-901
溶剂节省柱	3.0 x 150	683975-314	693975-312	693968-301	693975-301
溶剂节省柱	3.0 x 100	685975-314	695975-312	695968-301	695975-301
溶剂节省柱	3.0 x 50	689975-314	699975-312	699968-301	699975-301
窄径柱	2.1 x 150	683775-914	693775-912	693768-901	693775-901
窄径柱	2.1 x 100	685775-914	695775-912	695768-901	695775-901
窄径柱	2.1 x 50	689775-914	699775-912	699768-901	699775-901

新型 Poroshell 120 — 粒径 2.7 μm				
	尺寸 (mm)	新型 HPH-C18	新型 HPH-C8	新型 PFP
分析柱	4.6 x 150	683975-702	693975-706	693975-408
分析柱	4.6 x 100	685975-702	695975-706	695975-408
分析柱	4.6 x 50	689975-702	699975-706	699975-408
溶剂节省柱	3.0 x 150	683975-702	693975-706	693975-408
溶剂节省柱	3.0 x 100	685975-702	695975-706	695975-408
溶剂节省柱	3.0 x 50	689975-702	699975-706	699975-408
窄径柱	2.1 x 150	683775-702	693775-706	693775-408
窄径柱	2.1 x 100	685775-702	695775-706	695775-408
窄径柱	2.1 x 50	689775-702	699775-706	699775-408

Poroshell 120 — 粒径 4 μm						
	尺寸 (mm)	EC-C18	EC-C8	PFP	Phenyl-Hexyl	HILIC
分析柱	4.6 x 250	690970-902	690970-906	690970-408	690970-912	690970-901
分析柱	4.6 x 150	693970-902	693970-906	693970-408	693970-912	693970-901
分析柱	4.6 x 100	695970-902	695970-906	695970-408	695970-912	695970-901
分析柱	4.6 x 50	699970-902	699970-906	699970-408	699970-912	699970-901
溶剂节省柱	3.0 x 250	690970-302	690970-306	690970-308	690970-312	690970-301
溶剂节省柱	3.0 x 150	693970-302	693970-306	693970-308	693970-312	693970-301
溶剂节省柱	3.0 x 100	695970-302	695970-306	695970-308	695970-312	695970-301
溶剂节省柱	3.0 x 50	699970-302	699970-306	699970-308	699970-312	699970-301

转下页

Poroshell 120 — 粒径 4 µm

	尺寸 (mm)	EC-C18	EC-C8	PFP	Phenyl-Hexyl	HILIC
窄径柱	2.1 x 250	650750-902	650750-906	650750-408	650750-912	650750-901
窄径柱	2.1 x 150	693770-902	693770-906	693770-408	693770-912	693770-901
窄径柱	2.1 x 100	695770-902	695770-906	695770-408	695770-912	695770-901
窄径柱	2.1 x 50	699770-902	699770-906	699770-408	699770-912	699770-901

Poroshell 120 保护柱 — 粒径 4 µm

描述	尺寸 (mm)	部件号
Poroshell 120 UHPLC 保护柱, EC-C18	4.6	820750-916
Poroshell 120 UHPLC 保护柱, EC-C18	3	823750-916
Poroshell 120 UHPLC 保护柱, EC-C18	2.1	821725-916

我们将继续开发更多 Poroshell 120 固定相。

如需完整列表, 请访问

www.agilent.com/chem/poroshell120

如需安捷伦色谱柱的完整产品清单, 请访问

www.agilent.com/chem/getguides 索取
最新的安捷伦色谱与光谱产品目录。

AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 — 粒径 2.7 µm

	尺寸 (mm)	AdvanceBio 色谱柱
分析柱	4.6 x 150	653950-902
溶剂节省柱	3.0 x 150	653950-302
窄径柱	2.1 x 250	651750-902
窄径柱	2.1 x 150	653750-902
窄径柱	2.1 x 100	655750-902
快速保护柱*	4.6	850750-911
快速保护柱*	3.0	853750-911
快速保护柱*	2.1	851725-911

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 — 粒径 2.7 µm — 表面多孔, 耐压达 600 bar

	尺寸 (mm)	AdvanceBio 色谱柱
分析柱	4.6 x 250	680975-913
分析柱	4.6 x 150	683975-913
分析柱	4.6 x 100	685975-913
窄径柱	2.1 x 250	651750-913
窄径柱	2.1 x 150	683775-913
窄径柱	2.1 x 100	685775-913
快速保护柱	2.7, 2.1	821725-906

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 — 粒径 1.8 µm — 耐压达 1200 bar

	尺寸 (mm)	AdvanceBio 色谱柱
窄径柱	2.1 x 150	859700-913
窄径柱	2.1 x 100	858700-913
快速保护柱	2.1, 1.8	821725-905

有关 Agilent Advanced Bio 的更多信息, 请访问 www.agilent.com/chem/AdvanceBio

安捷伦液相色谱色谱柱

ZORBAX 超高压快速高分辨 (RRHD) 柱, 在高达 1200 Bar 下稳定

	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse XDB-C18 (USP L1)	Extend-C18 (USP L1)
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 µm	959759-902	959759-906	981759-902	759700-902
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	959758-902	959758-906	981758-902	758700-902
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 µm	959757-902	959757-906	981757-902	757700-902
RRHD, 3.0 x 150 mm, 1.8 µm	959759-302	959759-306	981759-302	
RRHD 3.0 x 100 mm, 1.8 µm	959758-302	959758-306	981758-302	758700-302
RRHD 3.0 x 50 mm, 1.8 µm	959757-302	959757-306	981757-302	757700-302
	StableBond SB-C18 (USP L1)	StableBond SB-C8 (USP L7)	StableBond SB-Phenyl (USP L11)	StableBond SB-CN (USP L10)
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 µm	859700-902	859700-906	859700-912	859700-905
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	858700-902	858700-906	858700-912	858700-905
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 µm	857700-902	857700-906	857700-912	857700-905
RRHD 3.0 x 150 mm, 1.8 µm	859700-302	859700-306		
RRHD 3.0 x 100 mm, 1.8 µm	858700-302	858700-306	858700-312	858700-305
RRHD 3.0 x 50 mm, 1.8 µm	857700-302	857700-306	857700-312	857700-305
	Eclipse PAH (USP L1)	StableBond SB-Aq	HILIC Plus	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 µm	959759-918	859700-914	959759-901	959759-912
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	959758-918	858700-914	959758-901	959758-912
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 µm	959757-918	857700-914	959757-901	959757-912
RRHD 3.0 x 100 mm, 1.8 µm	959758-318	858700-314	959758-301	959758-312
RRHD 3.0 x 50 mm, 1.8 µm	959757-318	857700-314	959757-301	959757-312
	Bonus-RP			
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 µm	857768-901			
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	858768-901			
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 µm	859768-901			

我们还将继续开发更多 RRHD 固定相。
如需可提供部件号的全部列表,
请访问 www.agilent.com/chem/rrhd

用于蛋白质和多肽分析的 300Å 色谱柱

	StableBond 300SB-C18	StableBond 300SB-C8	StableBond 300SB-C3 (USP L56)	300-Diphenyl (USP L11)	300-HILIC
RRHD 2.1 x 50 mm, 1.8 µm			857750-909	857750-944	857750-901
RRHD 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	858750-902	858750-906	858750-909	858750-944	858750-901
RRHD 2.1 x 150 mm, 1.8 µm	857750-902	857750-906			

安捷伦液相色谱色谱柱

ZORBAX Eclipse Plus						
	尺寸 (mm)	粒径 (µm)	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (USP L11)	Eclipse Plus PAH (USP L1)
分析柱	4.6 x 250	5	959990-902	959990-906	959990-912	959990-918
分析柱	4.6 x 150	5	959993-902	959993-906	959993-912	959993-918
分析柱	4.6 x 100	5	959996-902	959996-906	959996-912	959996-918
分析柱	4.6 x 50	5	959946-902	959946-906		
快速分离柱	4.6 x 150	3.5	959963-902	959963-906	959963-912	959963-918
快速分离柱	4.6 x 100	3.5	959961-902	959961-906	959961-912	959961-918
快速分离柱	4.6 x 75	3.5	959933-902	959933-906	959933-902	
快速分离柱	4.6 x 50	3.5	959943-902	959943-906	959943-912	959943-918
快速分离柱	4.6 x 30	3.5	959936-902	959936-906	959936-912	
快速分离高通量柱, 600 bar	4.6 x 100	1.8	959964-902	959964-906	959964-912	959964-918
快速分离高通量柱, 600 bar	4.6 x 75	1.8	959951-902			
快速分离高通量柱, 600 bar	4.6 x 50	1.8	959941-902	959941-906	959941-912	959941-918
快速分离高通量柱, 600 bar	4.6 x 30	1.8	959931-902	959931-906	959931-912	959931-918
溶剂节省柱	3.0 x 250	5				959990-318
溶剂节省柱	3.0 x 150	5	959993-302	959993-306		
溶剂节省柱	3.0 x 150	3.5	959963-302	959963-306	959963-312	
溶剂节省柱	3.0 x 100	3.5	959961-302	959961-306	959961-312	
溶剂节省 RRHD 柱, 1200 bar	3.0 x 150	1.8	959759-302	959759-306		
溶剂节省 RRHD 柱, 1200 bar	3.0 x 100	1.8	959758-302	959758-306		
溶剂节省 RRHD 柱, 1200 bar	3.0 x 50	1.8	959757-302	959757-306		
溶剂节省高通量柱, 600 bar	3.0 x 100	1.8	959964-302	959964-306	959964-312	
溶剂节省高通量柱, 600 bar	3.0 x 50	1.8	959941-302	959941-306	959941-312	
窄径柱	2.1 x 250	5				959790-918
窄径柱	2.1 x 150	5	959701-902	959701-906	959701-912	959701-918
窄径柱	2.1 x 50	5	959746-902	959746-906		

转下页

安捷伦液相色谱色谱柱

ZORBAX Eclipse Plus						
	尺寸 (mm)	粒径 (µm)	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (USP L11)	Eclipse Plus PAH (USP L1)
窄径快速分离柱	2.1 x 150	3.5	959763-902	959763-906	959763-912	
窄径快速分离柱	2.1 x 100	3.5	959793-902	959793-906	959793-912	959793-918
窄径快速分离柱	2.1 x 50	3.5	959743-902	959743-906	959743-912	
窄径快速分离柱	2.1 x 30	3.5	959733-902	959733-906	959733-912	
窄径 RRHD 柱, 1200 Bar	2.1 x 150	1.8	959759-902	959759-906		
窄径 RRHD 柱, 1200 Bar	2.1 x 100	1.8	959758-902	959758-906		
窄径 RRHD 柱, 1200 Bar	2.1 x 50	1.8	959757-902	959757-906		
窄径 RRHT 柱, 600 Bar	2.1 x 100	1.8	959764-902	959764-906	959764-912	959764-918
窄径 RRHT 柱, 600 Bar	2.1 x 50	1.8	959741-902	959741-906	959741-912	959741-918
窄径 RRHT 柱, 600 Bar	2.1 x 30	1.8	959731-902	959731-906	959731-912	

ZORBAX Eclipse Plus: 保护柱卡套						
	尺寸 (mm)	粒径 (µm)	Eclipse Plus C18 (USP L1)	Eclipse Plus C8 (USP L7)	Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (USP L11)	Eclipse Plus PAH (USP L1)
保护柱卡套, 4/包	4.6 x 12.5	5	820950-936	820950-937	820950-938	820950-939
保护柱卡套, 4/包	2.1 x 12.5	5	821125-936	821125-937	821125-938	821125-939
保护柱硬件工具包			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901

以上只是固定相和色谱柱的部分列表。安捷伦具有一系列 BioHPLC 色谱柱, 可快速、准确的分离蛋白质和多肽。

如需可提供部件号的完整列表, 请访问 www.agilent.com/chem/getguides 索取最新的安捷伦色谱与光谱产品目录或 BioHPLC 色谱柱选择指南。

安捷伦毛细管和接头

为您的应用选择合适的毛细管

使用合适的毛细管对于得到最佳分析性能至关重要。下表是推荐用于传统高效液相色谱和超高压液相色谱系统的接头。

标准系统毛细管柱：1290 系列 - 1200 Bar								
起始端 (A)	结束端 (B)	材料	内径 (mm)	长度 (mm)	接头类型 起始端	接头类型 结束端	备注	部件号
泵	自动进样器	SS	0.17	300	S	S	A 和 B 上已预装配	5067-4657
泵	恒温自动进样器	SS	0.17	450	S	S	A 和 B 上已预装配	5067-4658
自动进样器	TCC	SS	0.12	340	S	S	A 上已预装配	5067-4659
色谱柱	DAD	SS	0.12	220	S	S	A 上已预装配	5067-4660
1290 系统	CTC 自动进样器	SS	0.17	600	S	SH	A 上已预装配	5067-4670
CTC 自动进样器	色谱柱	SS	0.12	600	S	S		5067-4669
检测器	废液容器	PTFE	0.8	5000*			不包括手紧接头 (0100-1516, 2/包)	5067-2462

材料	
缩写	描述
SS	不锈钢
S	Swagelok 内径 1.6 mm 接口
SH	Swagelok 内径 1.6 mm 接口, 长接头
SL	Swagelok 内径 1.6 mm 接口, 长接头
SLV	Swagelok 内径 1.6 mm 接口, 长接头, 1200 bar
SX	Swagelok 内径 1.6 mm 接口, 超长接头
M	Metric M4 内径 0.8 mm 接口

1290 阀头连接: 600 和 1200 Bar

起始端 (A)	结束端 (B)	材料	内径 (mm)	长度 (mm)	接头类型 起始端	接头类型 结束端	备注	阀信息	部件号
自动进样器	带 Swagelok 接口的阀	SS	0.12	340	S	SX	A 上已预装配		5067-4684
自动进样器	带 Swagelok 接口的阀	SS	0.12	340	S	SX	B 上已预装配	G4231A/B 2 位/6 通阀阀头, 600/1200 bar	5067-4647
自动进样器	带 M4 接口的阀	SS	0.12	340	SLV	M		G4232A 2 位/10 通微量阀阀头, 600 bar	5067-4744
自动进样器	带 M4 接口的阀	SS	0.12	500	SLV	M		G4234A/B 6 种色谱柱选择阀, 600/1200 bar	5067-4745
带 10/32 Swagelok 接口的阀	热交换器	SS	0.12	90	SX	S	A 和 B 上已预装配	G4231A/B 2 位/6 通阀阀头, 600/1200 bar	5067-4649
带 M4 接口的阀	热交换器	SS	0.12	90	M	SL	B 上已预装配	G4232A 2 位/10 通微量阀阀头, 600 bar	5067-5106
短色谱柱	带 M4 接口的阀	SS	0.12	130	SV	M		G4234A/B 6 种色谱柱选择阀, 600/1200 bar	5067-4735
短色谱柱	带 M4 接口的阀	SS	0.12	150	SV	M		G4232A 2 位/10 通微量阀阀头, 600 bar	5067-5104
长色谱柱	带 M4 接口的阀	SS	0.12	280	SV	M		G4232A 2 位/10 通微量阀阀头, 600 bar	5067-5107
短色谱柱	带 Swagelok 接口的阀	SS	0.12	150	SL	SX	B 上已预装配	G4231A/B 2 位/6 通阀阀头, 600/1200 bar	5067-4650
短色谱柱	带 10/32 Swagelok 接口的阀	SS	0.12	150	SL	SX		G4232B 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-4686
长色谱柱	带 Swagelok 接口的阀	SS	0.12	280	SL	SX	B 上已预装配	G4231A/B 2 位/6 通阀阀头, 600/1200 bar	5067-4651

转下页

1290 阀头连接：600 和 1200 bar

从 (A)	从 (B)	材料	ID (mm)	长度 (mm)	接头类型, 从	接头类型, 到	备注	阀信息	部件号
带 Swagelok 接口的阀	检测器	SS	0.12	200	SX	S	A 和 B 上已预装配	G4231A/B 2 位/6 通阀阀头, 600/1200 bar	5067-4653
长色谱柱	带 Swagelok 接口的阀	SS	0.12	280	SL	SX		G4232B 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-4687
带 Swagelok 接口的阀	检测器	SS	0.12	200	SX	S	A 上已预装备	G4232B 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-4689
带 M4 接口的阀	检测器	SS	0.12	250	M	SLV		G4232A 2 位/10 通微量阀阀头, 600 bar	5067-4746
热交换器	带 M4 接口的阀	SS	0.17	90	SL	M	A 上已预装备	G4232A 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-5109
色谱柱	带 M4 接口的阀	SS	0.17	90	SV	M		G4232A 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-5110
色谱柱	带 M4 接口的阀	SS	0.17	150	SV	M		G4232A 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-5111
色谱柱	带 M4 接口的阀	SS	0.17	280	SV	M		G4232A 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-5112
G4232A 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar		SS	0.17	250	SL	M	A 上已预装备	G4232A 2 位/10 通阀阀头, 1200 bar	5067-5113

接头

说明	缩写	包装	部件号
Swagelok 1.6 mm 不锈钢接头	S	10个/包	5062-2418
Swagelok 1.6 mm 不锈钢接头, 长螺栓	SL	10个/包	5065-4454
Swagelok 1.6 mm 不锈钢接头, 超长螺栓	SX	10个/包	5062-9967
Swagelok 1.6 mm 1200 bar 可拆卸接头	SV	1个/包	5067-4733
Swagelok 1.6 mm 1200 bar 可拆卸接头, 长螺栓	SLV	1个/包	5067-4738
Swagelok 1.6 mm 1200 bar 可拆卸接头, 超长螺栓	SXV	1个/包	5067-4739

A-Line Quick Connect Fittings 快速连接接头 — 组件*

适用范围	毛细管接头 长度 (mm)	部件号
色谱柱到检测器	0.12 x 280	5067-5960
色谱柱到检测器	0.12 x 220	5067-5959
热交换器到色谱柱	0.12 x 150	5067-5958
热交换器到色谱柱	0.12 x 105	5067-5957
热交换器到色谱柱	0.075 x 105	5067-5961



* 所有组件均包括一个连接到合适毛细管上的 Quick Connect 接头以及一个未装配的 Swagelok 接头（在另一端）。Quick Connect 接头只可用于该表给出的毛细管。

A-Line Quick Connect Fittings 快速连接接头 — 独立部件

描述	部件号
毛细管不锈钢 0.12 x 280 mm, 包括 1 个未装配的 Swagelok 接头	5500-1170
毛细管不锈钢 0.12 x 220 mm, 包括 1 个未装配的 Swagelok 接头	5500-1171
毛细管不锈钢 0.12 x 150 mm, 包括 1 个未装配的 Swagelok 接头	5500-1172
毛细管不锈钢 0.12 x 105 mm, 包括 1 个未装配的 Swagelok 接头	5500-1173
毛细管不锈钢 0.075 x 105 mm, 包括 1 个未装配的 Swagelok 接头	5500-1174
前密封垫圈	5043-0924
独立 Quick Connect 接头（与合适的毛细管配合使用, 用于系统设置）	5067-5965

更多有关 Agilent A-Line Quick Connect Fittings 快速连接接头的信息, 请访问
www.agilent.com/chem/A-Line

A-Line Quick Turn — 接头和密封垫圈

描述	部件号
Quick Turn UHPLC 接头	5067-5966
前密封垫圈	5043-0924

A-Line Quick Turn — 毛细管

描述	部件号
不锈钢, 0.17 × 500 mm, 带长套管	5500-1197
不锈钢, 0.17 × 280 mm, 带长套管	5500-1196
不锈钢, 0.17 × 200 mm, 带长套管	5500-1195
不锈钢, 0.17 × 150 mm, 带长套管	5500-1194
不锈钢, 0.17 × 105 mm, 带长套管	5500-1193
不锈钢, 0.12 × 500 mm, 带长套管	5500-1192
不锈钢, 0.12 × 280 mm, 带长套管	5500-1191
不锈钢, 0.12 × 200 mm, 带长套管	5500-1190
不锈钢, 0.12 × 150 mm, 带长套管	5500-1189
不锈钢, 0.12 × 105 mm, 带长套管	5500-1188
不锈钢, 0.075 × 105 mm, 带长套管	5500-1198

Quick Turn 接头需使用本表给出的毛细管。

更多有关 Agilent A-Line Quick Turn 接头的信息, 请访问 www.agilent.com/chem/A-Line



安捷伦液相色谱检测器光源

带给您持久的性能

使用非标准液相色谱灯可导致光强度不一致、基线噪音高、系统停机以及成本增加。为了确保液相色谱系统的准确性、重现性和可靠性，请使用严格按照 ISO 9001 标准制造的安捷伦认证氙灯。安捷伦氙灯与众不同之处在于：

- 性能最优 — 精准的操作电压、一致的光强度以及准直定位
- 使用寿命比其他产品长 50% — 可达 2000 小时
- 信噪比更高 — 发光孔径更窄，从而提高了光强度，降低了噪音
- 灵敏度更高 — 扩展了 1200 Infinity 系列和 6100 Series 四极杆质谱仪的检测能力，可运行任何现有 HPLC 或 RRLC 方法

二极管阵列检测器/多波长检测器		
检测器	灯描述	部件号
G1315A/B G1365A/B	长寿命氙灯	5182-1530
G4212A/B	长寿命 HIS 氙灯 (8 针)，带有 RFID 识别标签	5190-0917
G1315C/D G1365C/D	长寿命氙灯，带有 RFID 识别标签	2140-0820
G1315A/B/C/D G1365A/B/C/D	钨灯	G1103-60001

可变波长检测器		
检测器	灯描述	部件号
G1314D/E/F	长寿命氙灯，带有 RFID 识别标签	G1314-60101
G1314A/B/C 1120 Infinity 液相色谱 1220 Infinity 液相色谱	长寿命氙灯	G1314-60100

Agilent Captiva 优级注射式过滤器

样品在进入高效液相色谱、超高效液相色谱、气相色谱、气质联用系统或液质联用系统分析前进行过滤，对获取最佳系统性能起着决定性的作用。Agilent Captiva 增强型注射式过滤器拥有业内最高流速和载样量，使得进程比过去更快。请根据个人需求挑选不同的膜类型和孔径。

有关 Captiva 过滤产品的详细信息及其它产品信息，请访问 www.agilent.com/chem/filtration

优级注射式过滤器（100/包）

滤膜类型	直径/孔径					
	4 mm		15 mm		25 mm	
	0.2 μm	0.45 μm	0.2 μm	0.45 μm	0.2 μm	0.45 μm
PTFE	5190-5082	5190-5083	5190-5084	5190-5085	5190-5086	5190-5087
尼龙			5190-5090	5190-5091	5190-5092	5190-5093
PES	5190-5094	5190-5095	5190-5096	5190-5097	5190-5098	5190-5099
再生纤维素	5190-5106	5190-5107	5190-5108	5190-5109	5190-5110	5190-5111
醋酸纤维素					5190-5116*	5190-5117*
玻璃微纤维			5190-5120		5190-5122*	
深层过滤器：玻璃/PTFE			5190-5126	5190-5127	5190-5128	5190-5129
深层过滤器：玻璃/尼龙			5190-5132	5190-5133	5190-5134	5190-5135

备注：* 较大直径为 28 mm（并非 25 mm）。以蓝色显示的部件号产品经过 LC/MS 系统验证；其它产品均经过 LC/UV 系统验证。

安捷伦溶剂安全盖

提高实验室安全性

Agilent A-Line Stay Safe 溶剂瓶安全盖能够阻止 99.9% 的溶剂释放到空气中，从而保护您与同事的健康。溶剂的密度随着时间的延长可能会发生变化，从而影响您色谱分析的结果。使用气密性的 A-Line 溶剂瓶安全盖保存溶剂可以避免这个问题，确保溶剂稳定性以及色谱分析结果的准确性。A-Line 溶剂瓶安全盖带有一个时间标签，用于提醒您何时需要更换放空阀。

A-Line Stay Safe 溶剂瓶安全盖 GL45

描述	插口	放空阀	过滤器	废液
 1 个插口 1 个带时间标签的放空阀 (5043-1190)	1 x 3.2 mm	1		5043-1217
 2 个插口 1 个带时间标签的放空阀 (5043-1190)	2 x 3.2 mm	1		5043-1218
 3 个插口 1 个带时间标签的放空阀 (5043-1190)	3 x 3.2 mm	1		5043-1219
 4 个插口 1 个泄漏管	2 x 3.2 mm 1 x 2.3 mm 1 x 1.6 mm		1	1 5043-1220



更多有关 A-Line Stay Safe 溶剂瓶安全盖的信息，请访问

www.agilent.com/chem/A-Line

用于 NS29/32 磨口瓶**安全盖 II, 带 2 个插口- 用于 NS29/32** **5043-0221**

1 个基础瓶盖, 聚丙烯, 蓝色, 用于 NS29/32, 带 PTFE 锥, 2 个插口 内含

2 个一体接头, PFA 3.2 mm (1 蓝色, 1 红色) 内含

1 个 1 μ m 放空阀, PTFE 滤膜 内含**用于 GL 45 螺纹口溶剂瓶****安全盖 II, 带 2 个插口的 - 用于 GL 45** **5043-0222**

1 个基础盖, 聚丙烯, 蓝色, GL45, 带 PTFE 锥, 2 个接口 内含

2 个接头, PFA 3.2 mm (1 蓝色, 1 红色) 内含

1 个放空阀, 1 μ m, PTFE 滤膜 内含**安全盖 I, 带 1 个插口的- 用于 GL 45** **5043-0223**

1 个基础盖, 聚丙烯, 蓝色, GL45, 带 PTFE 锥, 1 个插口 内含

1 个一体接头, PFA, 3.2 mm, 黑色 内含

1 个放空阀, 1 μ m, PTFE 滤膜 内含**安全盖 II, 带 2 个关闭阀 - 用于 GL 45** **5043-0224**

1 个基础盖, 聚丙烯, 蓝色, GL45, 带 PTFE 锥, 2 个插口、2 个关闭阀 内含

2 个接头, PFA, 3.2 mm (1 蓝色, 1 红色) 内含

2 个接头, PTFE, 3.2 mm (白色) 内含

1 个放空阀, 1 μ m, PTFE 滤膜 内含**安全盖 I, 带 1 个关闭阀- 用于 GL45** **5043-0225**

1 个基础盖, 聚丙烯, 蓝色, GL45, 带 PTFE 锥, 1 个插口、1 个关闭阀 内含

1 个一体接头, PFA, 3.2 mm, 黑色 内含

1 个接头, PTFE, 3.2 mm (白色) 内含

1 个放空阀, 1 μ m, PTFE 滤膜 内含

安捷伦安全盖是能够自由旋转的 PTFE 和 PFA 螺口盖, 适用于实验室中高效液相色谱系统的所有溶剂瓶和废液瓶。最高可减少 70% 的溶剂排放, 并能有效防止可能改变色谱结果的溶剂泄漏和蒸发。瓶盖采用自由旋转设计, 更加便于溶剂的更换操作, 有助于避免容器更换过程中发生管路缠绕。

安捷伦在线过滤器

保护您的液相色谱系统

色谱柱进样口滤芯污染可能增大柱反压并降低柱效。由于进样口滤芯直径小，微径色谱柱堵塞成为一个值得关注的问题。为了防止堵塞，请始终在液相色谱系统中使用适当的过滤器。安捷伦有几种类型的高压在线过滤器工具包可用于任何高效液相色谱系统。

低扩散在线过滤器：直接置于色谱柱之前，可去除样品和进样系统中的微粒。由于过滤器具有直径仅 2.1 mm 的滤芯及锥形插件，从而使谱带展宽最小。此过滤器适用于任何微径、高速或标准的分析柱。

通用型在线过滤器：安装于液相色谱泵和进样器之间，去除溶剂中的颗粒，使用高容量过滤器。滤芯置于插件的锥形边缘之间，使溶剂能够均匀地分布于滤芯的表面上。

高效液相色谱在线过滤器					
说明	滤芯孔径 (μm)	滤芯入口内径 (mm)	注释	部件号	可更换的滤芯
RRLC 在线过滤器， 连接毛细管	0.2	4.6	最高耐压 600 bar	5067-1553	5067-1562, 10 个/包
RRLC 在线过滤器， 连接毛细管	0.2	2.1	最高耐压 600 bar	5067-1551	5067-1555, 10 个/包
低扩散在线过滤器， 包括两个滤芯	2	2.1	<1 mL/min.	01090-68702	280959-904, 10 个/包 (2 μm).
	0.5				280959-907, 10 个/包 (0.5 μm).
通用在线过滤器， 两个滤芯，带衬垫， 130 \times 0.25 mm 连接毛细管	2	4.8	1 – 5 mL/min.	01090-69703	01090-27609, 2 个/包
半制备过滤器	0.5	12.7	1 – 5 mL/min.	5064-8273	5022-2185
高压半制备过滤器	10	19	5 – 10 mL/min	5022-2165	5022-2166, 10 个/包
制备过滤器	10		10 – 100 mL/min	5065-4500	5065-9901, 可更换玻璃滤芯
G1311A 泵的在线过滤器	建议在盐溶度较高时使用			G1311-60006	
1290 Infinity 在线过滤器 (0.3 μm)	0.3	2.0	1200 bar	5067-4638	5023-0271, 5 个/包

Agilent 1200 Infinity 系列 液相色谱产品组合

Agilent 1200 Infinity 系列产品继承了安捷伦 40 年来开发和生产最高质量液相色谱仪的优良传统，迄今为止已销售 100 多万台仪器。在 1200 Infinity 系列与之前的 1100 或 1200 系列之间，安捷伦提供了无限制的组件和系统兼容性。安捷伦保值承诺可以让任何安捷伦液相色谱仪灵活地逐步升级——无论是现在还是未来！

无限超值

Agilent 1220 Infinity LC 是用于常规 HPLC 和先进的 UHPLC 分析的高质量集成系统，为您的投资带来最大的回报。

- 600 bar 的性能范围、最高达 5 mL/min 的流速和 80 Hz 的检测器速率——让您的实验室充分利用最新的液相色谱柱技术带来的优势
- 与 1200 Infinity 系列中的所有其他安捷伦检测器和 6100 系列四极杆质谱仪完全兼容
- 使用与 1260 Infinity 和 1290 Infinity II 液相色谱系统相同的技术和部件

无限信心

1260 Infinity 液相色谱仪建立了更高的性能标准，可提高结果的可信度。它兼顾 UHPLC 水平的分析效率、数据质量和稳定性——价格却仅仅相当于普通的 HPLC 系统。

- 具有 600 bar 的性能范围、最高达 10 mL/min 的流速、80 Hz 的检测器速率和提高了 10 倍的 UV 检测灵敏度——足以应对现在和未来的挑战
- 与您的所有 HPLC 方法完全兼容，确保无风险地完成对现有仪器的替换
- 以相同的预算获得更大价值——价格与以前的 1200 系列 HPLC 相当，却能提供 UHPLC 性能

无限高效

新的 1290 Infinity II LC 代表着 UHPLC 的未来发展趋势——拥有安捷伦提供的无与伦比的可靠性和稳定性，以及突破性的色谱性能和最高的效率。

- 最大化分析效率：无可比拟的分离和检测性能，可提供最高质量的分析数据，让您对结果充满信心
- 最大化仪器效率：最高的样品容量、最快的进样周期以及前所未有的可用性——使仪器在任何应用中均可实现最高的通量
- 最大化实验室效率：可与实验室现有架构无缝整合，从原有设备实现平稳、无干扰地的方法转移，从而获得最高的分析效率和最低的使用维护成本

随时了解来自安捷伦仪器的无限卓越的技术，请访问 www.agilent.com/chem/1200

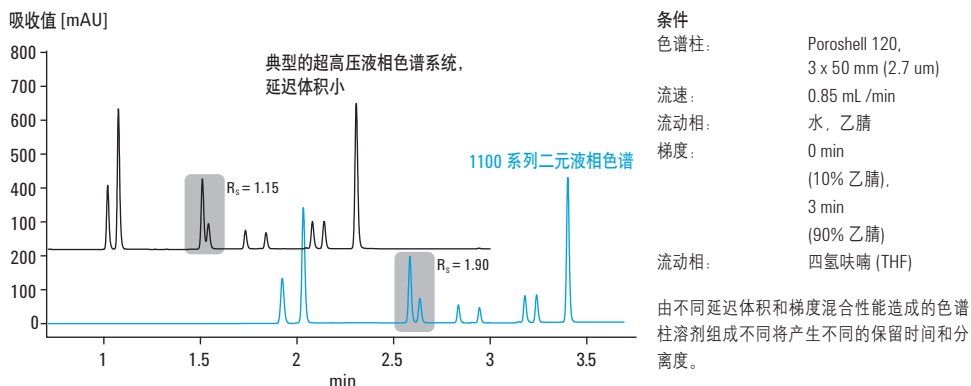
采用智能化系统模拟技术 (ISET) 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱

采用智能化系统模拟技术 (ISET) 解决不同液相色谱之间进行方法转换时的各种问题

不同液相色谱仪之间的设计差别 — 例如功能范围、延迟体积、混合性能、温度控制、柱外体积和检测器流通池设计等 — 都会影响从一个系统向另一系统的方法转换。因此，在不同液相色谱仪上使用相同的液相色谱方法可能会出现不同的保留时间和色谱分离度。

延迟体积和梯度混合的影响

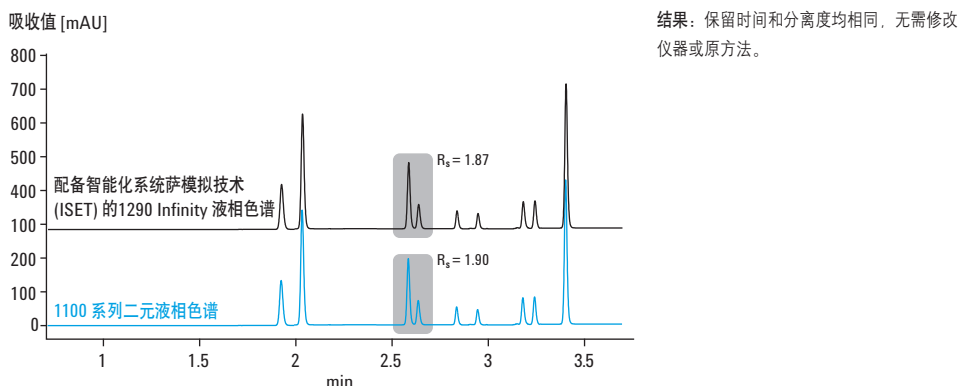
液相色谱系统的延迟（驻留）体积决定了混合溶剂多快能够到达色谱柱。而且，混合性能影响着梯度曲线。延迟/驻留体积和混合性能均由仪器的设计决定，方法转换将使得保留时间和分离度出现差异。



仪器间方法转换的解决方案：

配备智能化系统模拟技术 (ISET) 的 1290 Infinity II 液相色谱

智能化系统模拟技术使得 1290 Infinity II 液相色谱成为世界上第一台真正意义上的通用液相色谱系统，无需修改原方法或改动仪器硬件，即可运行任何传统的 HPLC 方法或最新的 UHPLC 方法，得到与原方法相同的色谱结果——仅需点击鼠标即可。



有效提高方法开发和质量控制 (QA/QC) 的效率，并降低成本

使用 1290 Infinity II 液相色谱和智能化系统模拟技术 (ISET) 可以利用超高效液相色谱性能加快方法开发的速度，然后通过模拟目标系统对方法进行微调——使方法更可靠地按预期方式运行。简单即可模拟开发原方法的液相色谱系统。使用智能化系统模拟技术 (ISET) 继续运行传统方法的同时还能够充分利用 1290 Infinity II 液相色谱的超高压液相色谱速度、分离度和灵敏度优势。有了智能化系统模拟技术 (ISET)，就无需再保留您的旧液相色谱系统了。

要了解有关此技术的更多信息，及时跟踪安捷伦仪器无限卓越的最新技术，请访问 www.agilent.com/chem/1290

备注

备注

备注

备注

Agilent CrossLab 集安捷伦科的创新实验室服务、软件和消耗品供应于一体，为您提供了与全球科学技术专家团队直接交流的途径，他们可针对不同层级的实验室环境提供重要且可执行见解，从而最大限度提高性能、降低实验室运作的复杂性，助力客户实现更高效的经济、运营与科学成果。



唯有 Agilent CrossLab 独特地结合了创新产品与全面解决方案，可确保实验室效率得到快速、持久的改善。我们愿与全球客户携手前行，不断探索实验室领域的新机遇。

如需了解更多信息，请访问 **www.agilent.de/crosslab**

了解更多信息：

www.agilent.com/chem/lccolumns

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

安捷伦科技大学：

<http://www.lscs-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

www.agilent.com/chem/accessagilent-cn

本文中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。安捷伦对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失不承担任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016 年 2 月 1 日，中国出版

出版号 5990-7595CHCN



Agilent Technologies