

液相色谱实用技术(一)

HPLC定量原理及方法



IT'S ALL IMPORTANT

Waters

液相色谱定量分析的基本原理

❁ 在定性的基础上定量, 需有纯物质作为标准物

❁ 液相色谱定量是相对定量的方法:

即由已知量的纯被测物标样推算混合物中被测物的量

❁ 液相色谱法定量的依据是:

✎ 被测组分的量与响应值(峰高或峰面积)成正比

✎ 由已知量的标样可求得定量校正因子

✎ 定量校正因子: 是定量计算公式中的比例常数, 其物理意义是单位响应值(峰面积)所代表的被测组分的量

✎ 测定未知组分的响应值, 通过定量校正因子即可求得其含量



液相色谱定量分析的基本步骤

- ❁ 开发一个适合定量分析的色谱方法:
 - 确认被检测组分峰,并达到分离度(R)大于1.5
 - 确定被测组分色谱峰的一致性
 - 确定方法的检测限及定量限;灵敏度及线性范围
- ❁ 用不同浓度的标准样品建立校正曲线
- ❁ 考查定量方法的准确度及精密度
- ❁ 用M32色谱管理系统实施样品采集,数据处理及报告结果



鉴别需定量的色谱峰(定性)

❁ 定性鉴别每个要定量的色谱峰

- ✍ 通过比较保留值(通常是保留时间)的方法,找到各色谱峰所对应的组份
- ✍ 大多数情况下用与标样比较保留时间来定性

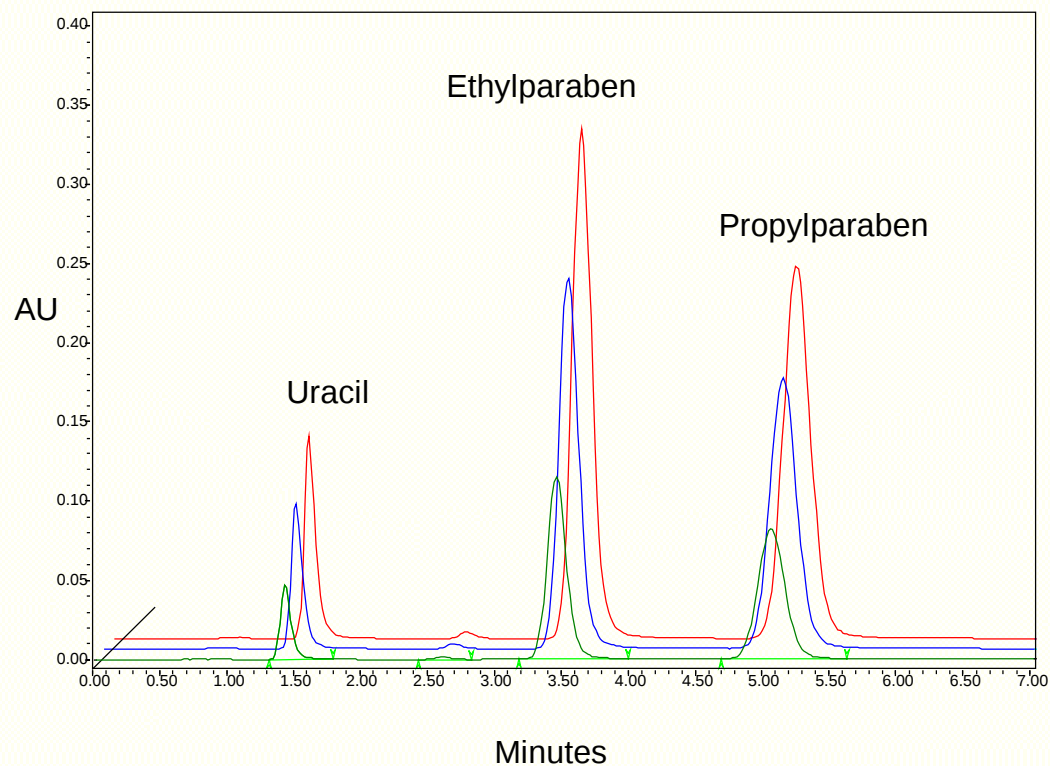
❁ 即所谓:

- ① 保留时间相同, 可能是同样的组份
- ② 保留时间不同, 肯定不是同样的组份



用保留时间定性

❁ 用“标样”的保留值定出被测组份的位置



IT'S ALL IMPORTANT

Waters

进一步的确认(定性)

✿ 标准加入

✿ 同时用其他方法

✍ 其他色谱方法（改变机理，如：用不同的色谱柱）

✍ 其他检测器

➡ PDA，光谱图比较、谱库检索

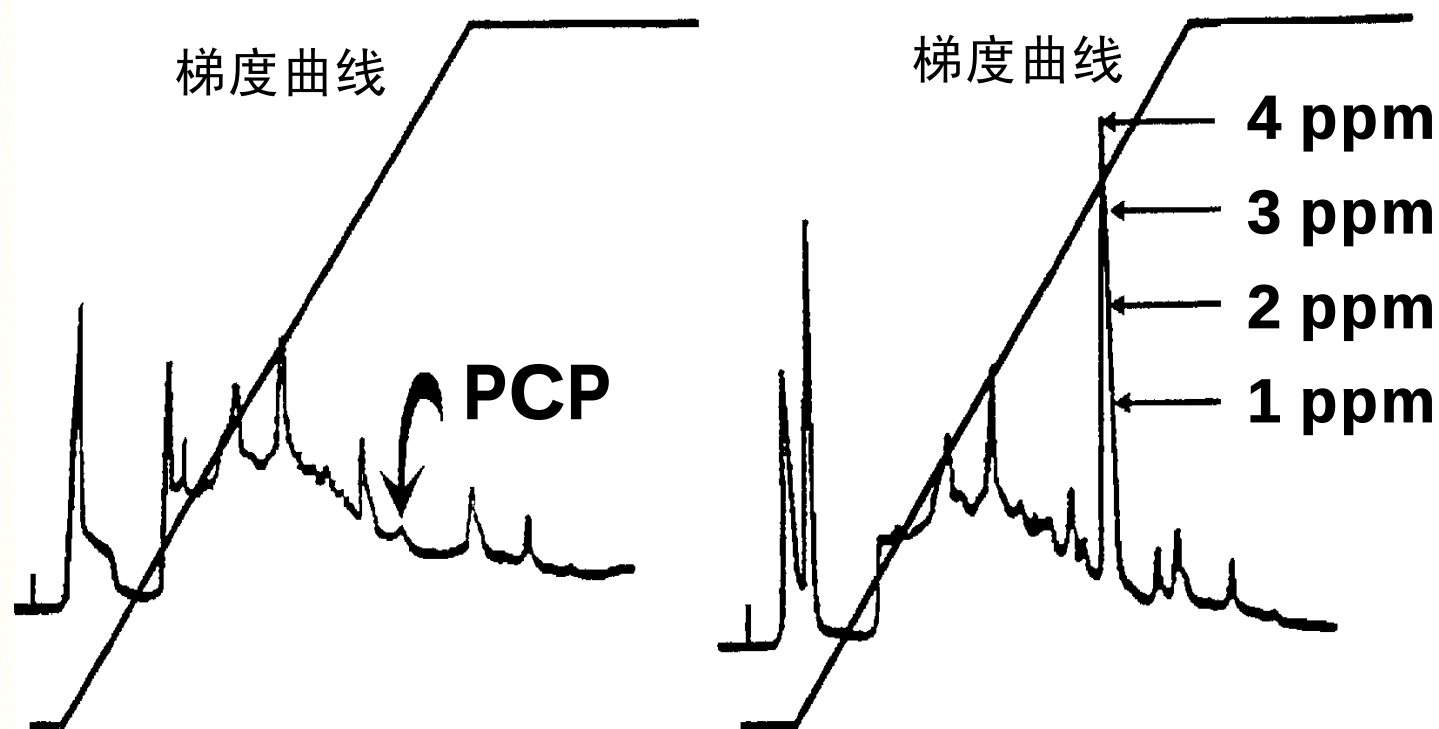
➡ MS，质谱图解析、谱库检索

✍ 其他仪器方法



标准加入法举例

❁ 废水样品中五氯苯（PCP）的分析



IT'S ALL IMPORTANT

Waters

确认定量峰的一致性

❁ 确认色谱峰的纯度

- ✍ 保证每个色谱峰下只有一个被测的组份
- ✍ 检查是否有共流出的物质（杂质）干扰

❁ 色谱峰纯度确认的方法

- ✍ 用光电二极管矩阵(PDA)检测器比较光谱图
- ✍ 峰纯度鉴定,2487双波长RatioPlot
- ✍ 996的纯度角理论



色谱峰定性中常见问题

❁ 鉴定色谱峰(定性)时常见问题如下:

- ✍ 被鉴定峰丢失
- ✍ 色谱图中出峰比预想的少
- ✍ 色谱图中出峰比预想的多(鬼峰)



色谱峰定性中常见问题分析

❁ 被鉴定峰丢失

- ✎ 保留时间改变
- ✎ 数据处理系统中输入值不正确

❁ 色谱图中出峰比预想的少

- ✎ 样品分解
- ✎ 色谱柱分辨率丧失
- ✎ 用错流动相
- ✎ 梯度洗脱时平衡不足(例如,过早将手动进样器扳至(Load)位置)



色谱峰定性中常见问题分析(续)

❁ 色谱图中出峰比预想的多(鬼峰):

- ✍ 样品分解或制样时导入了杂质
- ✍ 流动相被污染,或用错流动相
- ✍ 流动相中含有稳定剂或稳定剂发生变化
- ✍ 前次进样的后流出物(某些RT值特大的组分)
- ✍ 进样器被污染,洗针系统出问题或注射器脏
- ✍ 未充分平衡进样器Loop管
- ✍ 保护柱脏,色谱柱被污染,分辨率下降



HPLC定量分析的常用术语(1)

- ❁ 样品(Sample):含有待测物,供色谱分析的溶液
- ❁ 样品类型(Sample Type)分为标样和未知两种:
 - 标样(Standard): 浓度已知的纯品;
 - 未知样(Unknow):浓度待测的混合物
- ❁ 样品量(Sample Weight):待测样品的原始称样量
- ❁ 稀释度(Dilution):未知样品的稀释倍数
- ❁ 组分(Componance):欲做定量分析的色谱峰,即含量未知的被测物
- ❁ 组分的量(Amount):被测物质的含量(或浓度)



HPLC定量分析的常用术语(2)

- ❁ 积分(Integrity):由计算机对色谱峰进行峰面积测量的计算过程
- ❁ 定量限:可以准确定量的样品最低量,一般要求色谱峰的 $S/N > 10:1$
- ❁ 校正曲线(Calibration Curve):组分含量对响应值的线性曲线,由已知量的标准物建立,用于测定待测物的未知含量



常用的定量方法

❁ 标准曲线法,分为外标法和内标法:

❁ 外标法

✍ 在液相色谱中用得最多

❁ 内标法

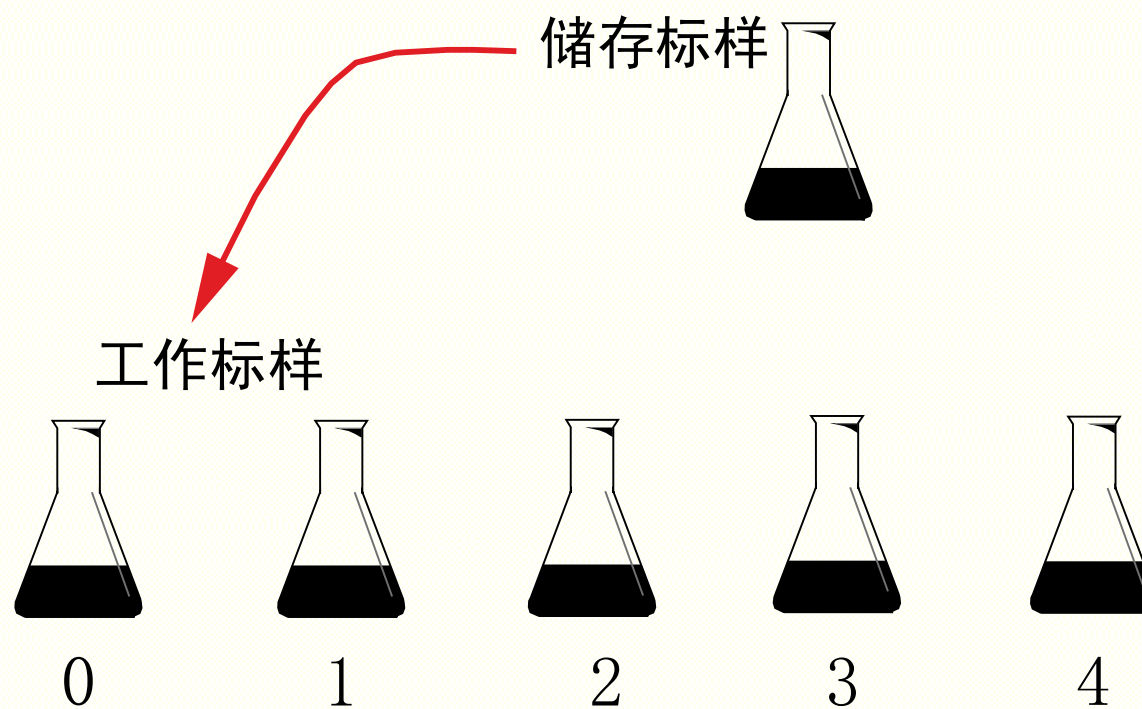
✍ 准确, 但是麻烦

✍ 在标准方法中用得最多



外标法定量

❁ 配制一系列已知浓度的标样

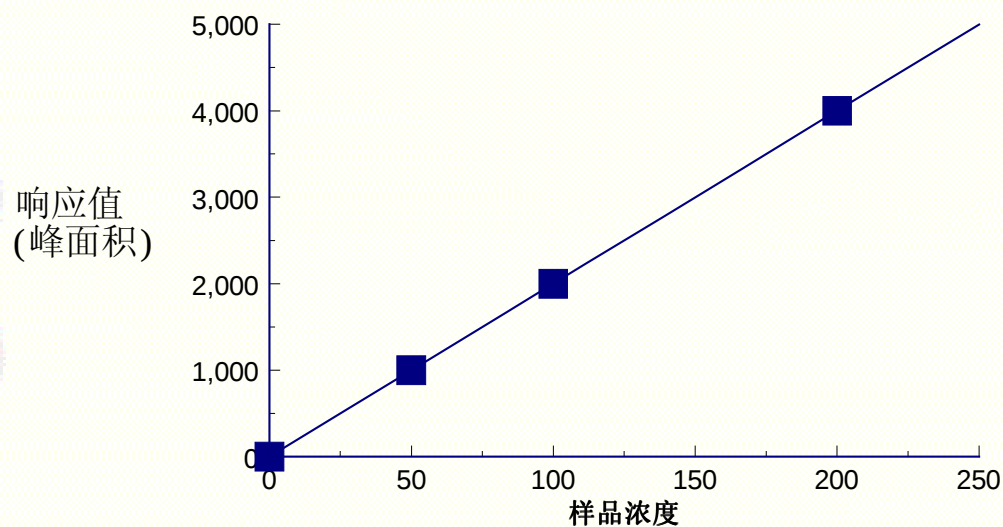
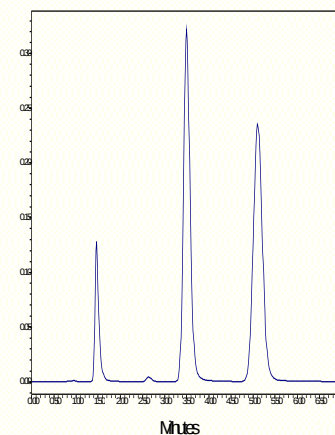
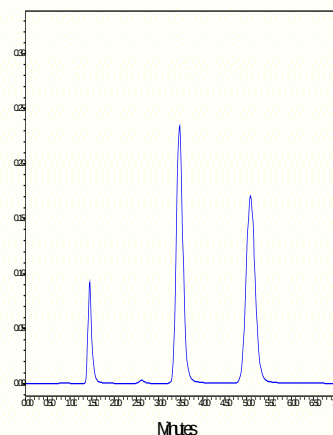
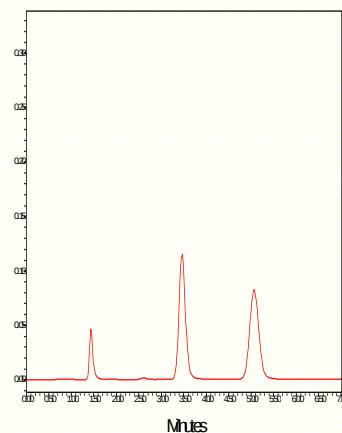


IT'S ALL IMPORTANT

Waters

外标法定量 (二)

- 采集不同浓度标样的色谱图
- 积分,按外标法定量计算,建立标准曲线



标准曲线

IT'S ALL IMPORTANT

Waters

外标法定量（三）

✿ 计算公式

$$\text{校正因子} : RF_{(X_i)} = \frac{\text{标样浓度} C(X_i)}{\text{标样响应值} R(X_i)}$$

$$\text{未知组分的浓度} : C_i = RF_{(X_i)} \times \text{样品响应值} A_i$$

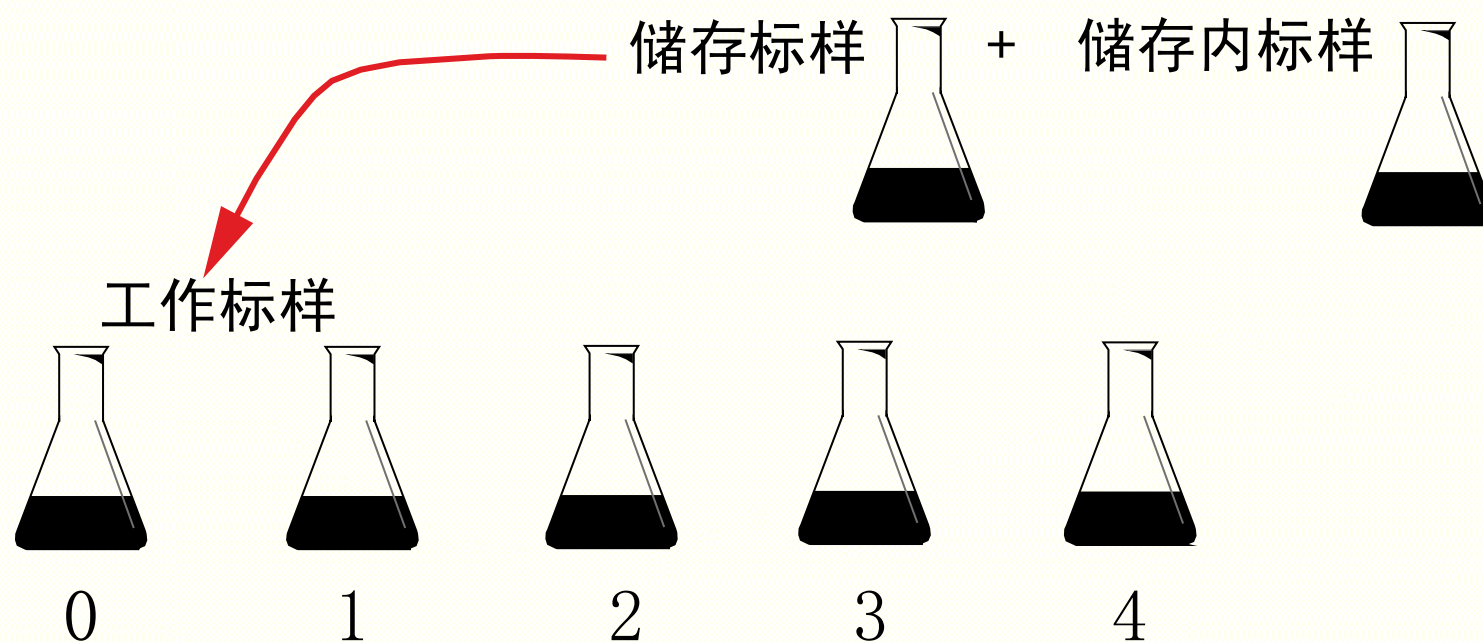
✿ 特点

- ✍ 无需各组份都被检出、洗脱
- ✍ 需要标样
- ✍ 标样及样品测定的条件要一致
- ✍ 进样体积要准确



内标法定量（一）

❁ 配制一系列浓度的标样，其中加有内标样

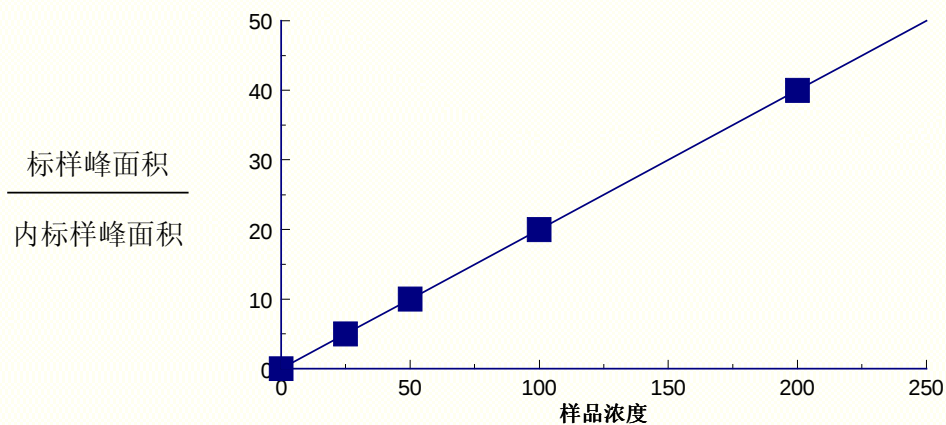
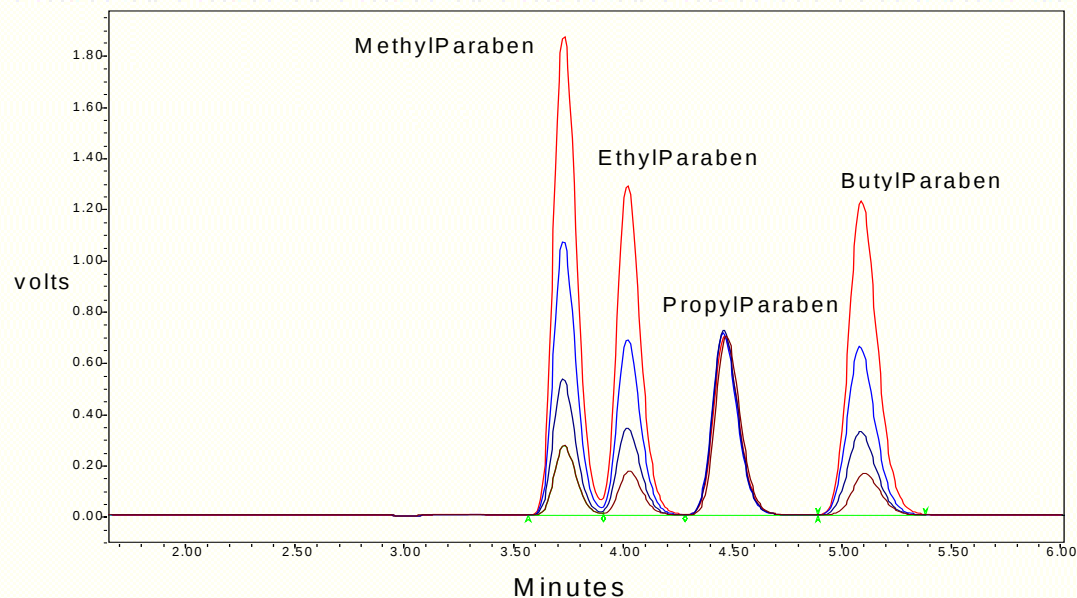


IT'S ALL IMPORTANT

Waters

内标法定量 (二)

- 采集不同浓度标样的色谱图
- 积分,按内标法定量计算,建立标准曲线



标准曲线

IT'S ALL IMPORTANT

Waters

内标法定量（三）

✿ 计算公式：

$$\text{校正因子} : RF_{(X_i)} = \frac{\text{内标样响应值} R(I.S)}{\text{标样响应值} R(X_i)} \times \text{标样浓度} C(X_i)$$

$$\text{未知组分的浓度} : C_i = RF_{(X_i)} \times \frac{\text{样品峰面积} A_i}{\text{内标峰面积} A_{i.s.}}$$

✿ 特点：

- ✍ 无需各组份都被检出、洗脱
- ✍ 需要标样，需要内标样
- ✍ 结果与进样体积无关



内标法定量（四）

❁ 对内标物的要求

- ✍ 化学结构与待测组分相似(同系物、异构体)
- ✍ 在样品中不存在
- ✍ 不与样品中组份发生任何化学反应
- ✍ 保留值与待测组分接近
- ✍ 浓度（响应值）与待测组分相当
- ✍ 其色谱峰与其它色谱峰分离好



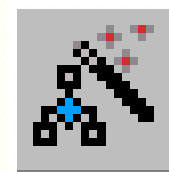
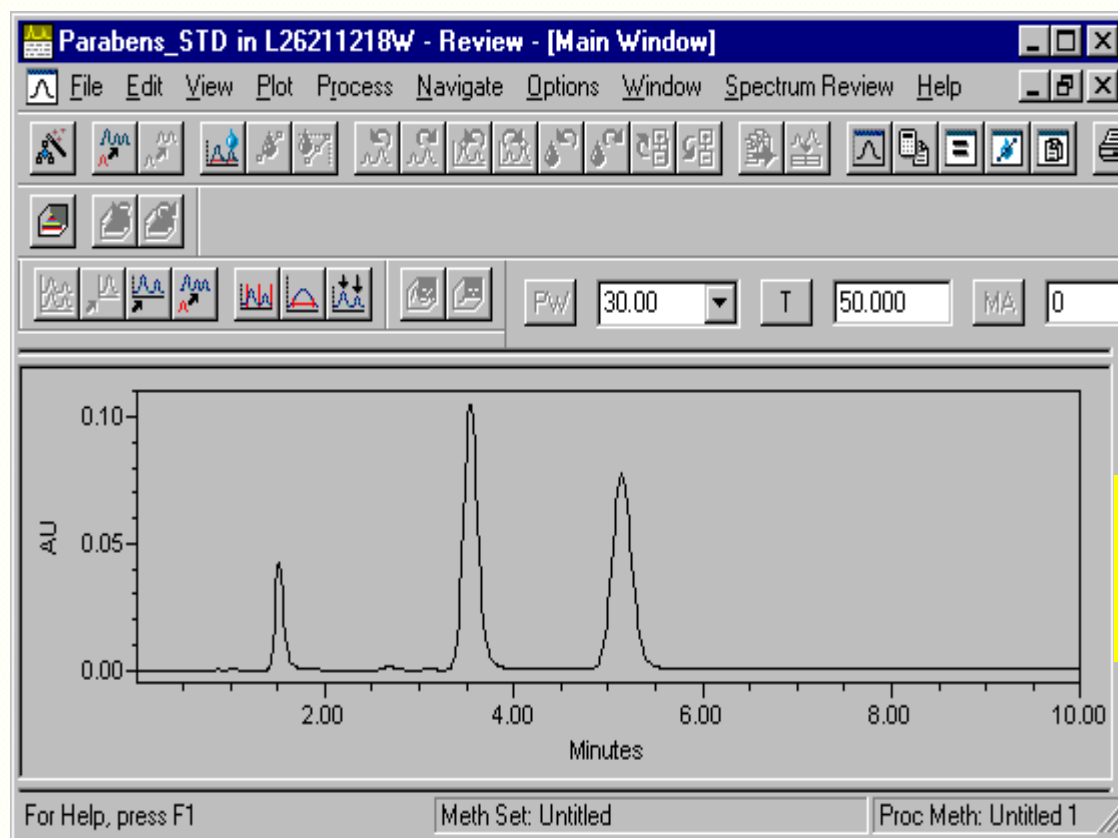
定量分析的数据处理方法

- ✿ Millennium³²包含外标和内标法计算的程序
- ✿ 处理结果自动存贮至Project的Result中
- ✿ M³²定量处理的程序如下：
 - ✍ 调用标样(Standard)的色谱图, 在“向导”(Wizard)的指引下建立一个处理方法(Processing Method), 将欲定量的峰填入组分表中
 - ✍ 在Project的Channal菜单中, 选中欲进行定量计算的有关数据文件(按标准standard在前, 未知Unknown在后的顺序), 给标样组分表中的各组分填入Amount值并存贮Save之
 - ✍ 按动工具条中的Process处理器, 则软件自动处理并保存结果



定量分析的数据处理方法(续)

打开一个最低浓度的标样(类型为Standard)色谱图, 建立处理方法(Processing Method)



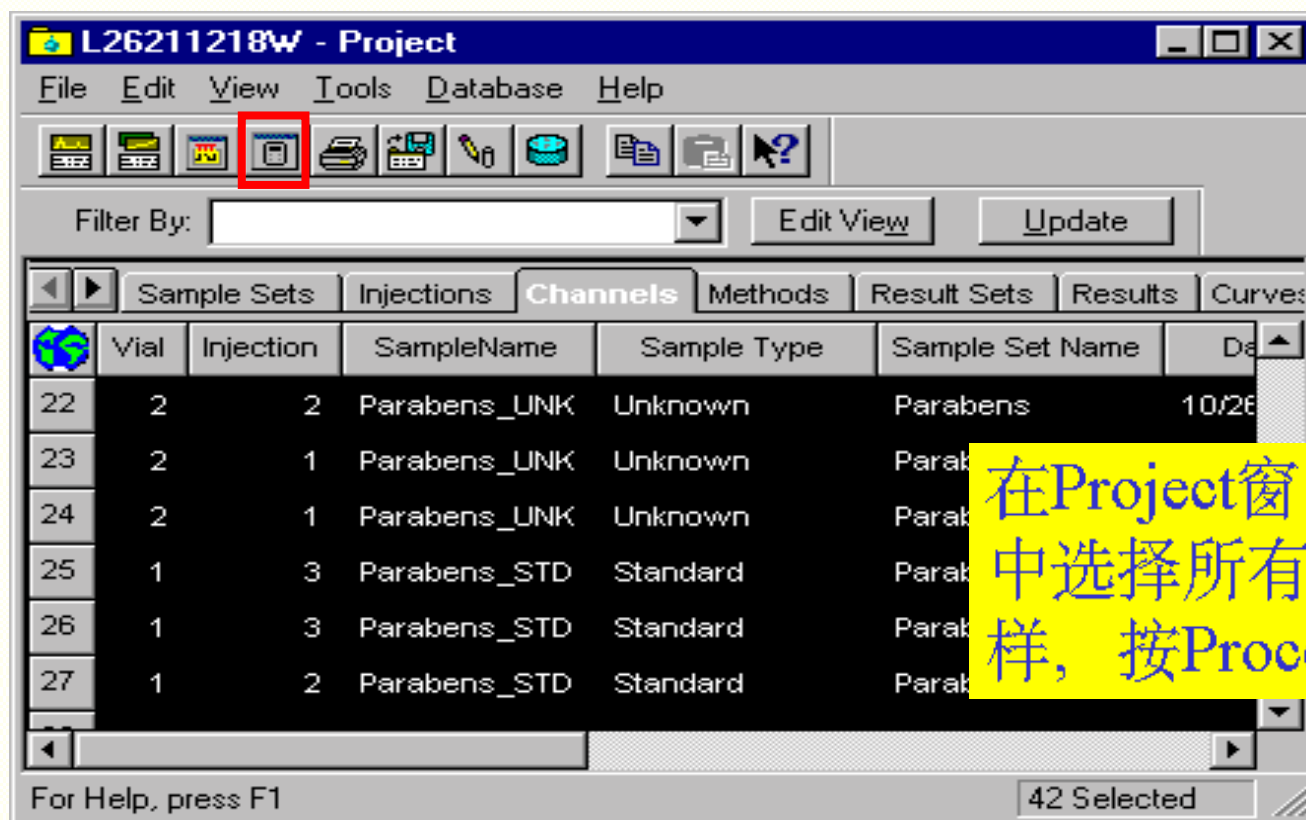
按处理方法向导按钮。

IT'S ALL IMPORTANT

Waters

定量分析的数据处理方法(续)

用建立的处理方法计算欲定量的样品

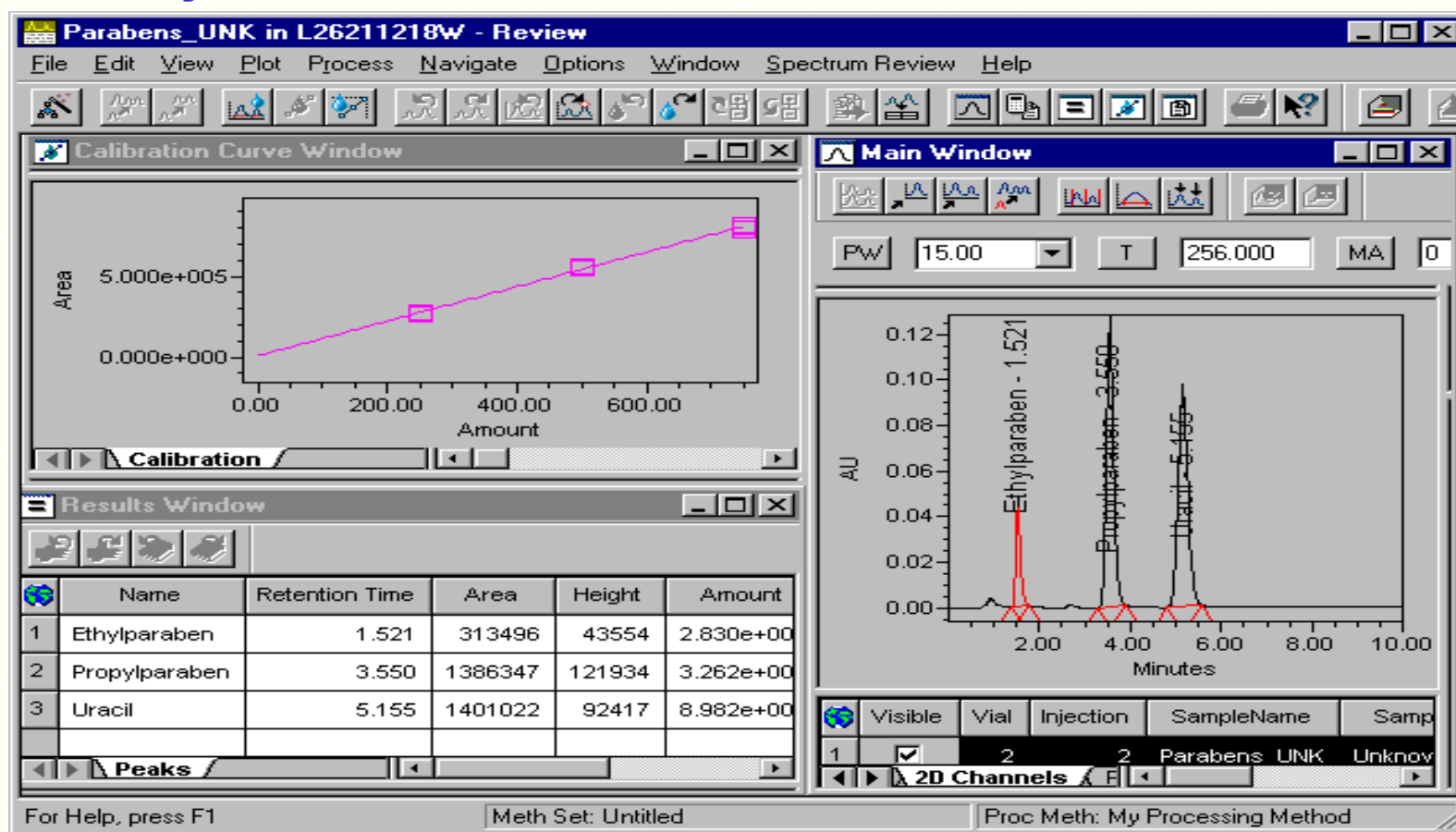


IT'S ALL IMPORTANT

Waters

定量分析的数据处理方法(续)

在Project的Result标签下, 观察并报告定量结果

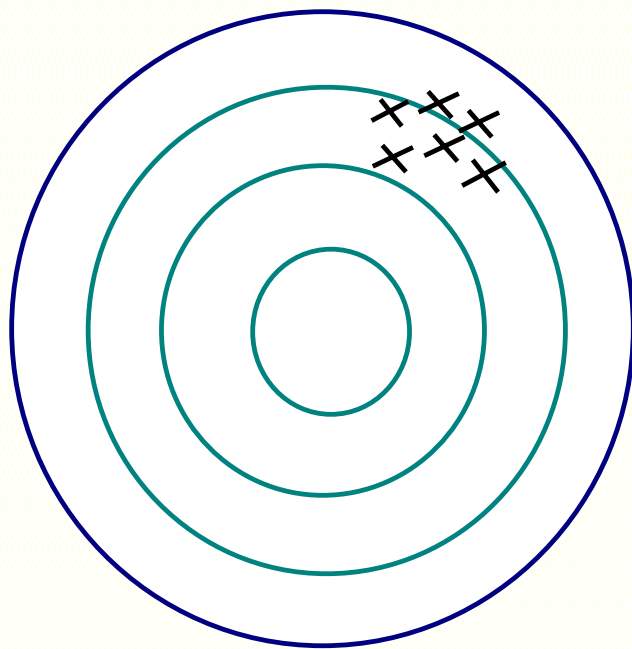


IT'S ALL IMPORTANT

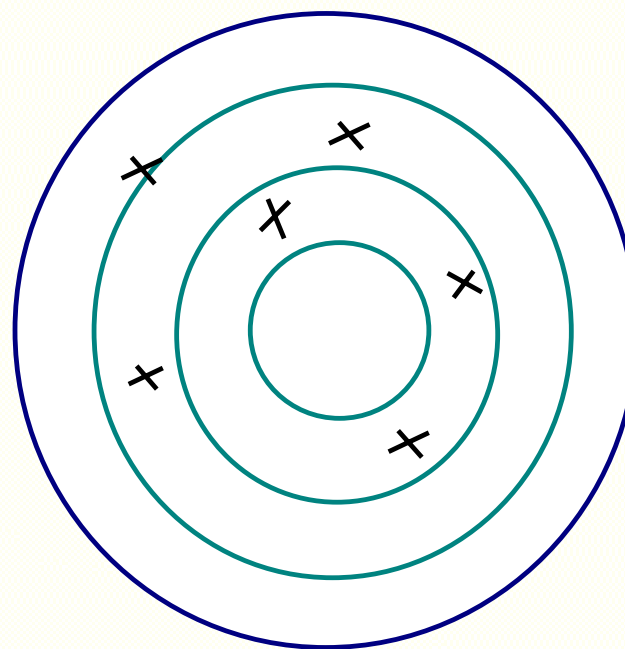
Waters

液相色谱定量的精密度

❁ 测量的精密度



好的精度



不好的精度

IT'S ALL IMPORTANT

Waters



精密度的衡量

❁ 测量精密度的计算

$$\text{平均值} : \bar{X} = \frac{\sum X_i}{N}$$

$$\text{标准偏差} : \sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

$$\text{变异系数} : CV\% = \frac{\sigma}{\bar{X}} (100)$$



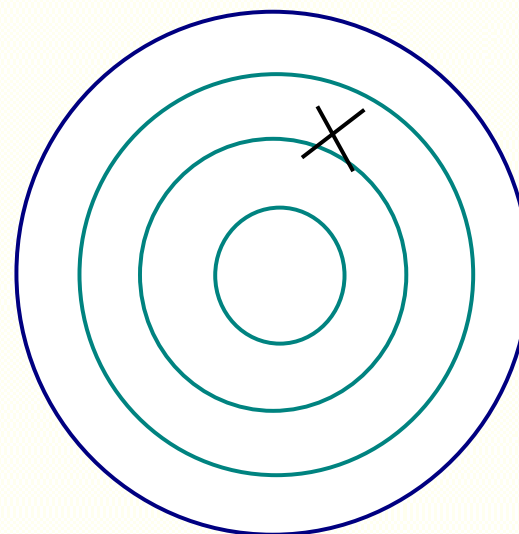
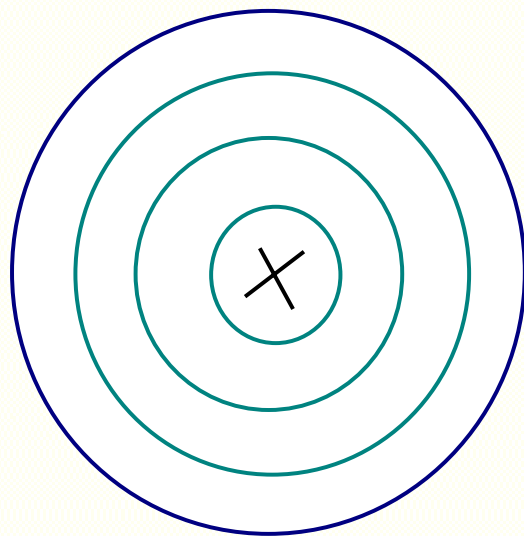
液相色谱定量的准确度

❁ 误差：

✍ $E = O - T$

➡ O：观测到的值

➡ T：真值



IT'S ALL IMPORTANT

Waters



准确度的衡量

- ❁ 色谱方法是相对定量方法，如不考虑损失及杂质干扰等因素，其结果同“标样”的准确程度密切相关
- ❁ 一般的衡量方法是做回收率实验或不同方法之间的比较：相关系数
- ❁ 相关系数：

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

➡ 其中，X及Y分别代表不同方法的实验值及平均值



准确度的影响因素

- ❁ 峰面积的测量精度(积分误差)
- ❁ 校正因子的测量精度(标准曲线的 r^2)
- ❁ 样品的稳定性和代表性,均匀性(样品是否溶于流动相)
- ❁ 进样器的准确度,进样技术
- ❁ 色谱方法的可靠性(保留时间的重现性)
- ❁ 色谱泵的精确度 (GPC的影响更大)
- ❁ 检测器的灵敏度,线性范围,检测限



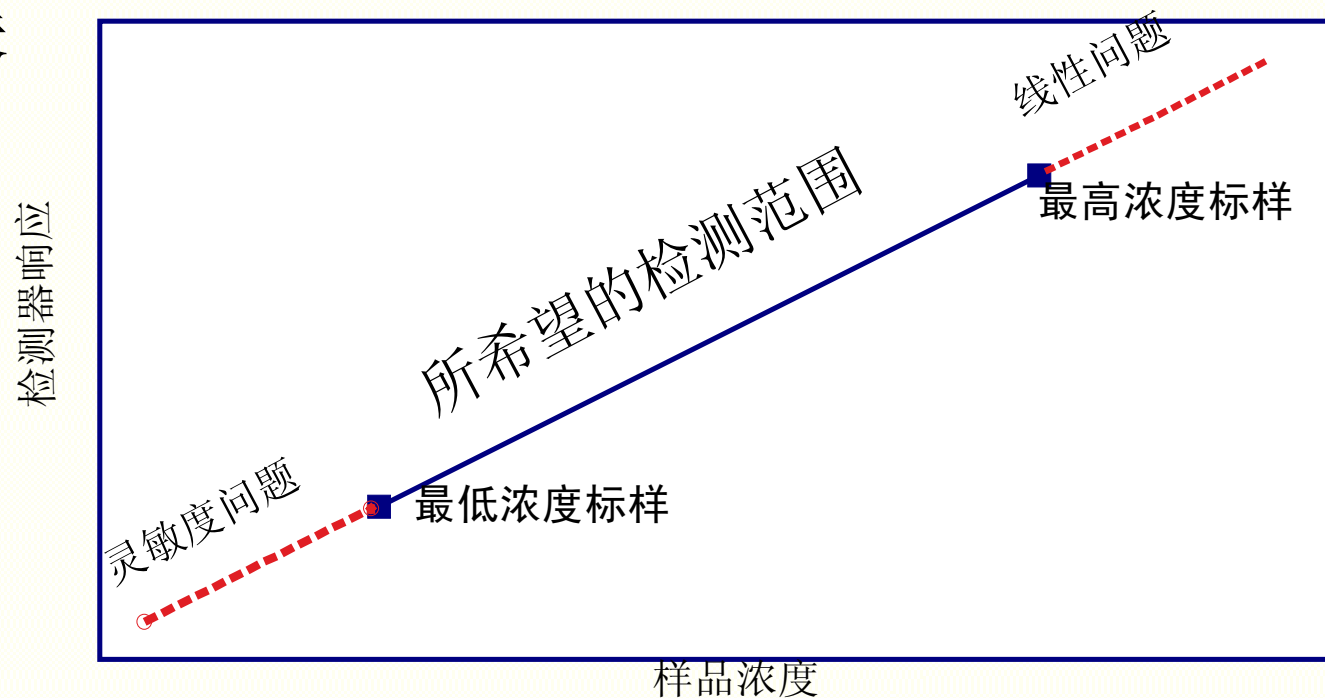
进样技术对定量结果的影响

- ❁ 固定体积定量管（loop）的进样器精度最好，其准确度取决于进样器的结构
- ❁ 可变体积进样器的精度取决于操作者的技术，准确度通常更高，因为进样用的注射器结构的准确度高，操作者的技术水平也有影响，但不大
- ❁ 717及2690自动进样器精确度及准确度都可达到定量管进样器的水平，因为其每一微升分27步以上。然而它又保留了可变体积进样器的优点



校正曲线的检测范围

- ✿ 校正曲线只有在建立这条曲线的浓度范围内有效，高或低于这些点都可能引起计算错误



IT'S ALL IMPORTANT

Waters

定量校正曲线

❁ 曲线A:

- ✎ 因在零浓度时仍有色谱峰，可能有杂质未分开

❁ 曲线B:

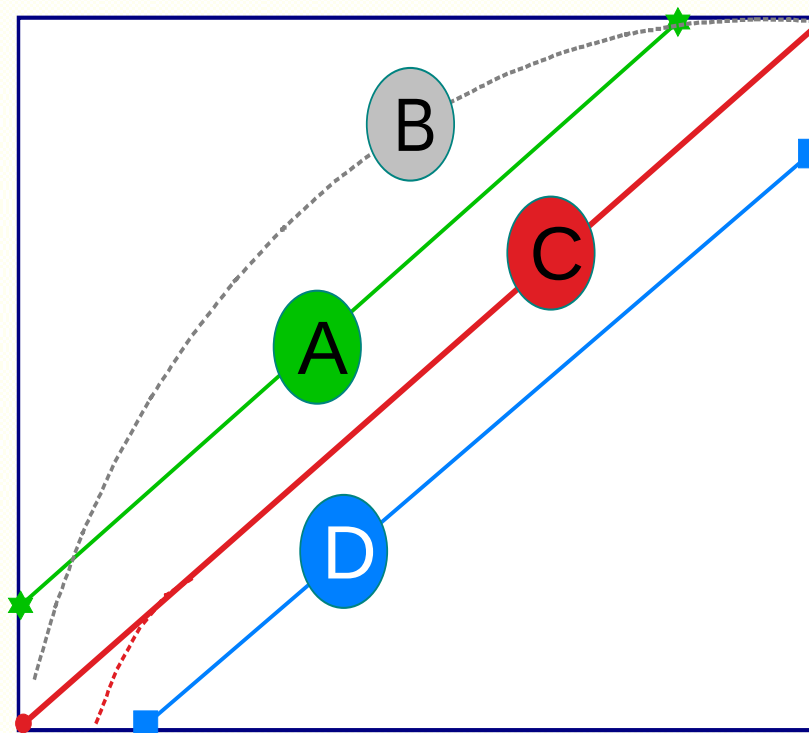
- ✎ 在此浓度内，检测器的响应值是非线性的

❁ 曲线C:

- ✎ 可接受的理想状态，实际情况应是：其延长线到零点

❁ 曲线D:

- ✎ 表明有样品的损失，可能是色谱柱的非特征吸附，也可能是样品制备时的损失



定量结果不正确的问题

❁ 定量结果不正确的问题主要表现为以下两个方面：

✓ 准确度不好

✓ 精密度不好



定量结果不正确的问题分析

❁ 准确度不好可能由下述原因造成:

- ✓ 峰面积积分不正确
- ✓ 样品分解或制样时导入杂质
- ✓ 样品瓶不密封,样品或溶剂挥发
- ✓ 制样不正确
- ✓ 进样问题
- ✓ 内标制备不正确



定量结果不正确的问题分析(续)

❁ 精密度不好可能的原因:

- ✓ 峰积分不正确
- ✓ 进样或进样器有问题
- ✓ 样品分解或制样时引入了杂质
- ✓ 色谱问题
- ✓ 检测器响应下降

