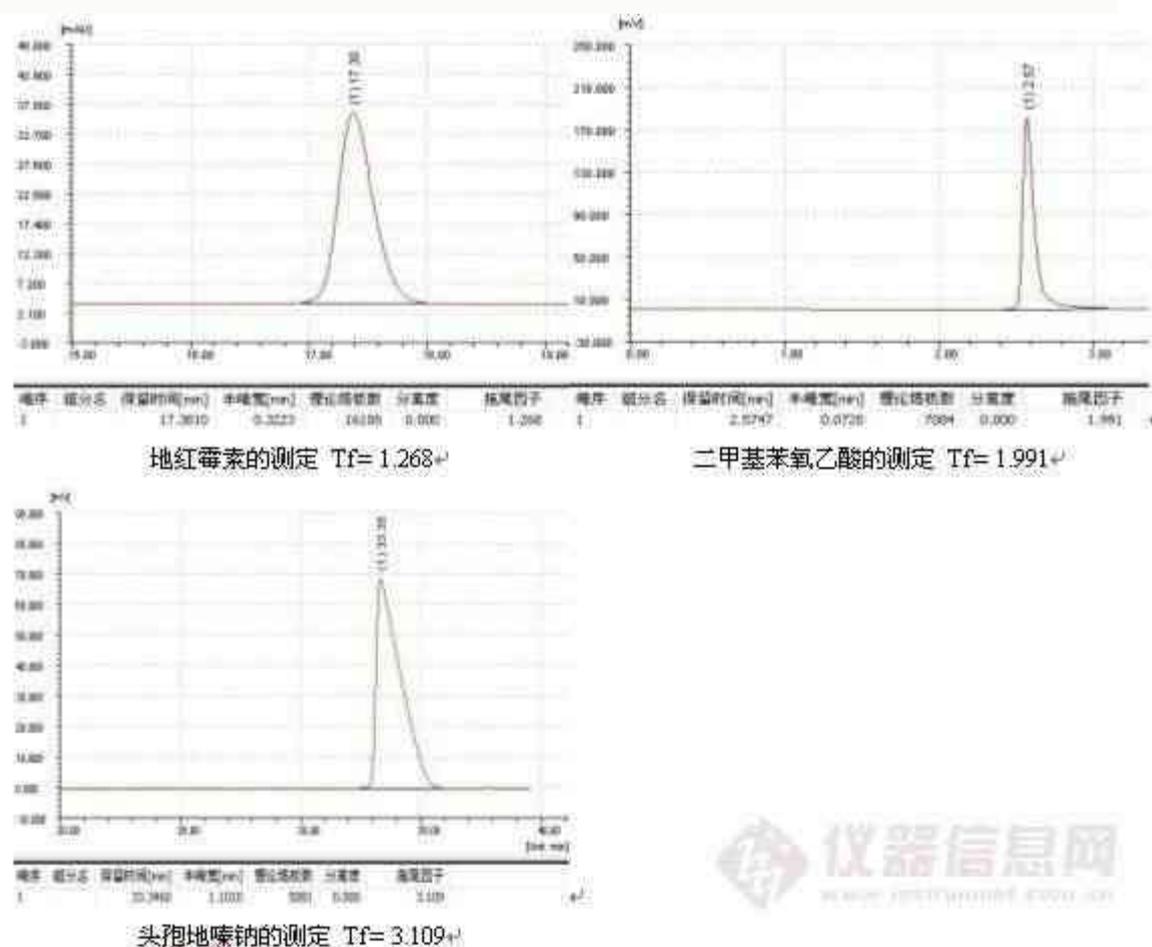


峰形后拖解决方案和实例

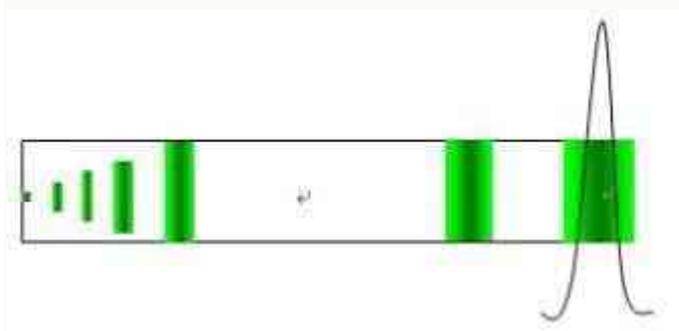
继上一篇《峰形前拖解决方案》，我们对峰形后拖的情况及其解决方案也进行了总结。与《峰形前拖解决方案》相同，在这里我们也同样的撇开所有的污染、塌陷、死体积等其它因素，假设系统是好的，柱子是新的、好的，单纯探讨液相方法与峰形后拖之间的关系，通过调整液相方法来解决峰形前拖的问题。这样有利于厘清拖尾产生的根本原因，对峰形拖尾的问题提供一些经验上解决方案。

首先让我们了解一下峰形后拖的几种常见形式，三种常见的拖尾如下：

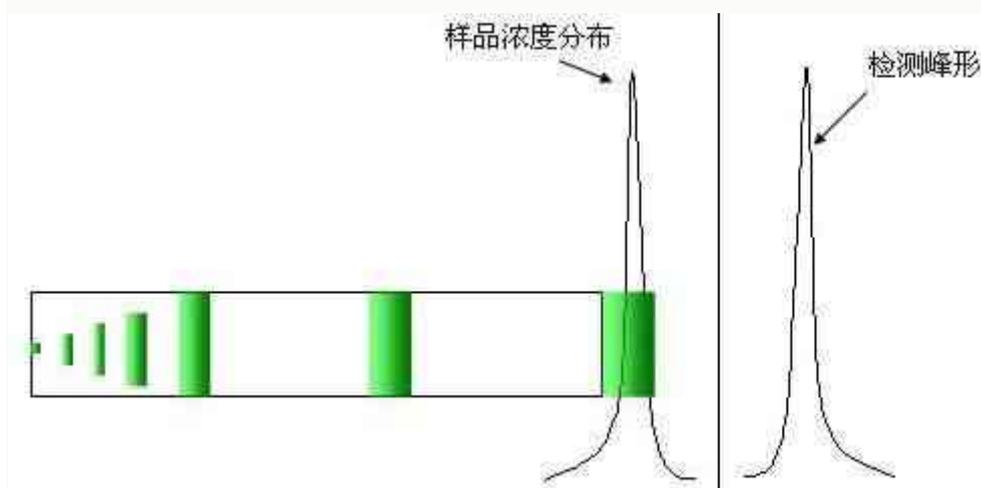


系统是好的，柱子是好的，为什么会产生后拖？我们还是回顾一下，色谱分离的一般过程，正常的峰形应该是样品在色谱柱上均匀前移的

情况下得到的，浓度分布在整个通过色谱柱柱床的过程中任何时候都呈正态分布，如下图所示：



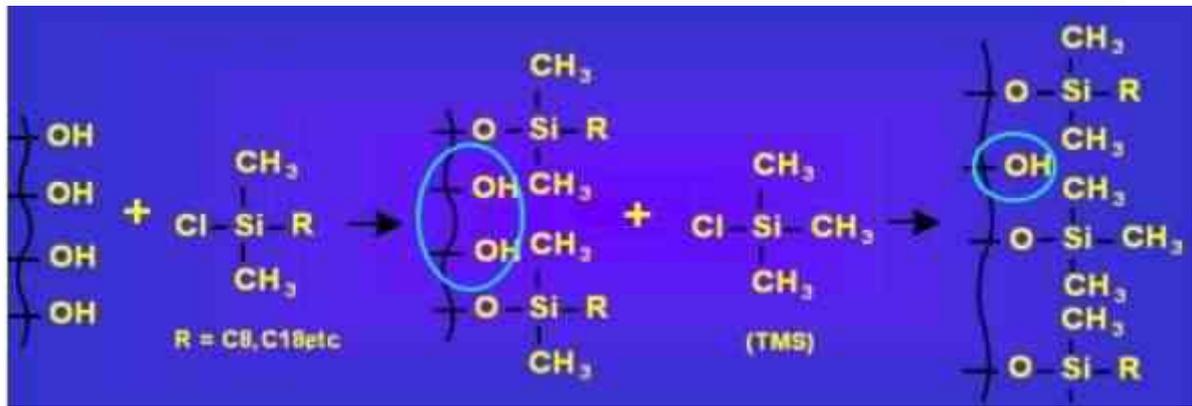
色谱分离是一个物理过程，样品分子经过在固定相与流动相之间的多次分配、吸附解吸，由于不同分子与固定相和流动相之间的相互作用力的差异而使它们在色谱柱中的移动速度不同，以此实现分离的目的。相同色谱条件下，有些化合物容易产生拖尾，有些则不产生拖尾，这说明拖尾的产生跟样品本身的性质是密切相关的，通常非极性和弱极性的化合物能获得良好的峰形，而带有一COOH、 -NH_2 、 -NHR 、 -NR_2 等极性基团的化合物则比较容易产生拖尾。



可以想象一下，样品分子在分析过程所处的环境，一是流动相，二是

固定相，流动相可以自由流动的，均一性比较好，因此可以认为样品分子四周都被相同组成的流动相所包围，其对每个样品分子的相互作用力也是均匀的、对称的，不应该是引起浓度分布发生变化的主要原因。考虑固定相，固定相中除了 C18 长链外还有填料键合时残余的硅羟基，由于 C18 长链是非极性的，其与样品分子的相互作用力也是很微弱的范德华力，而硅羟基则具有一定的极性 $\text{Si}-\text{O}\delta-\text{H}\delta+$ ，在 pH 一定的条件下甚至还会发生电离，形成 $-\text{Si}-\text{O}-$ 形式的离子态。 $\text{Si}-\text{O}\delta-\text{H}\delta+$ 和 $-\text{Si}-\text{O}-$ 对于极性化合物之间的作用力则是一种极性的静电作用力，这种作用力比范德华力强得多，同时，因为硅胶表面键合了 C18 长链，由于空间位阻作用，样品分子中能接触到残余硅羟基的机会不会很多，只有少部分的分子才能与残余硅羟基产生作用。这样，大多数的样品分子如非极性分子一样均匀前移，而少量的样品分子由于这种静电作用力的存在而被推迟洗脱出来，导致样品分子的浓度分布发生变化，产生后拖。拖尾严重的程度与样品分子极性大小和残余硅羟基的多少有着直接的关系。

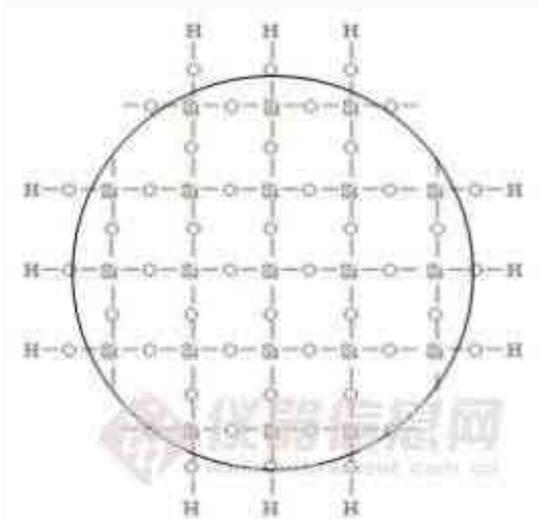
既然残余硅羟基对样品的次级保留效应是导致峰形后拖的主要原因，那我们先了解一下残余硅羟基是怎么回事。我们先借用一下 wsy18 的一个图来了解一下填料合成的整个过程：



以 C18 的填料合成为例，C18 的氯硅烷与硅胶表面的硅羟基发生反应，C18 硅烷基取代硅羟基中的氢原子在硅胶的表面键合上 C18 长链。完全硅羟化的硅胶表面硅羟基浓度为 $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，因为 C18 硅烷基的体积远比一个氢原子大得多，由于空间位阻的作用，通常与 C18 硅烷基发生反应的仅达 $2\sim 3.5\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，也就是说只有不到 50% 的硅羟基被反应掉，剩下的 50% 多的硅羟基残留在硅胶表面。由于硅羟基容易对样品分子产生次级保留效应引起拖尾，因此需要将硅羟基反应或屏蔽掉，去掉这个作用位点以消除次级保留效应，通常的办法是用小分子的硅烷跟硅羟基反应，如图解中的三甲基氯硅烷，使硅羟基中的氢变成了三甲基硅烷的一个惰性基团，反应掉了许多硅羟基，同时未能反应的许多硅羟基也被屏蔽掉，有效阻止了样品与硅羟基接触的机会，避免了次级保留效应的产生。但不管怎么样三甲基硅烷还是比氢原子大得多，同样由于空间位阻的作用不能将所有的残余硅羟基反应掉，既然存在就仍然有跟样品分子接触的机会，相同的样品在不同品牌的柱子上产生拖尾的严重性不同，主要的也就是接触硅羟基

的机会大小的问题，从填料合成的角度而言就是键合方式是否紧密、封尾是否彻底，紧密的键合和彻底的封尾能显著减少这种机会，因而改善峰形。美国 Welch 公司 Ulimate 品牌的 XB-C18、AQ-C18 和 Xtimate C18 采取的就是紧密键合和彻底的双峰尾工艺。

为什么残余硅羟基会引起拖尾？我们先了解一下硅羟基的结构：Si-O-H，硅胶基质上硅的四面都是氧原子，如下图：



在表面上连接有硅羟基的硅原子来说，其中一个键连接了一个羟基，其它三个键都与一个氧原子相连，由于氧的电负性比硅强，三个氧原子对硅原子产生了吸电子效应，因此对于硅上的羟基而言，这个硅原子对羟基是一个吸电子基团，使得硅羟基具有一定的酸性，其 pK_a 约为 4.5~4.7。根据电离规律，流动相的 $pH - pK_a > 2$ 即 $pH > 6.7$ 时，99% 以上的硅羟基应该是呈离子状态的，即 $Si-O^-$ ，而 $pK_a - pH > 2$ 即 $pH < 2.5$ 时，酸性环境抑制了硅羟基的电离，99% 以上的硅羟基应该是呈分子状态的，即 $Si-OH$ ，但其极性仍然存在，即 $Si-O\delta^- - H\delta^+$ 。

发现峰形后拖时，本人建议试试以下几种解决方案，以消除峰形后拖的状况、改善峰形。

1. 先检查一下是否是样品过载

样品过载，通常会引起峰形变差，导致前拖、后拖或平头峰，如果出现平头峰、峰高超过 2000mAU 或峰很高的同时又前拖、后拖得很厉害通常都认为是过载的，但这一点也并不绝对，因为不同化合物的吸收强度不一样，如果一种化合物在某一波长处有强吸收，即使出现了平头峰，样品也不一定过载，这与仪器和软件有关；相反如果吸收弱，则高浓度条件下峰也不见得有多高；所以样品是否过载应该结合浓度、进样体积和峰形一起来判断。通常认为峰高在 100mAU 左右比较合适，不至于因过载影响峰形。由于样品过载引起的峰形后拖不容易消除，也可能根本无法消除，继续采用以下的峰形改善措施可能不会有什么作用，而且在过载的情况下无法看清正常浓度时样品真实的分离状况和峰形，因此需要优先考虑是否过载，否则继续往下调整峰形的努力将无任何意义。

如果发现过载，需降低进样量（包括进样体积或浓度），但不管怎么样，减少进样量通常对改善峰形总是有益的，一般而言，进样量越小，峰形越好，例子如头孢尼西钠的测定：

色谱柱：Ultimate® XB—C18，5 μ m，4.6 \times 250mm；

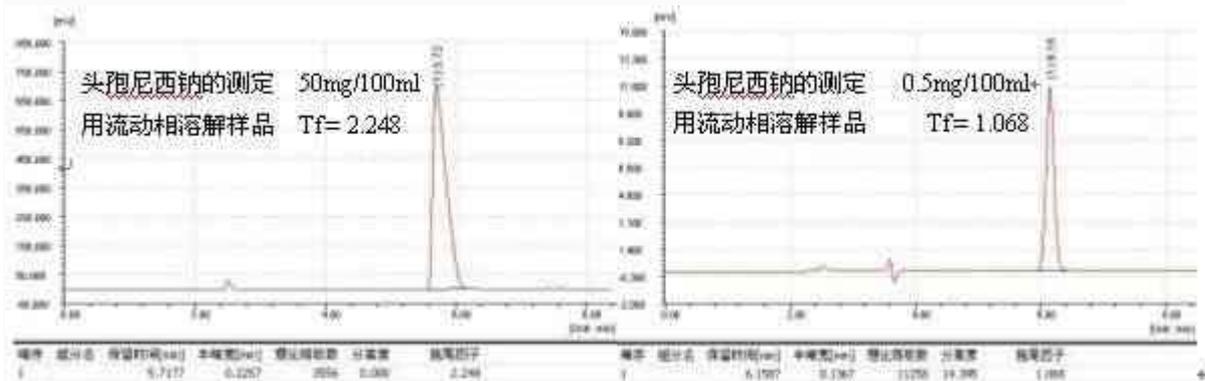
波 长：272nm；

流动相：0.01mol/L 磷酸二氢钾溶液（用磷酸调节 pH3.5）：乙腈=84：16；

温 度：室温 17℃；

流 速：1.0ml/min；

进样量：20ul；



2. 往流动相中加入酸

根据这一解释，往流动相中加酸将流动相的 pH 调至 2.5 以下有助于改善峰形，这种方式，主要用于改善对带羧基化合物的拖尾，例子如二甲基苯氧乙酸的测定：

色谱柱：Ultimate® XB-C18，5um，4.6×250mm；

波 长：280 nm；

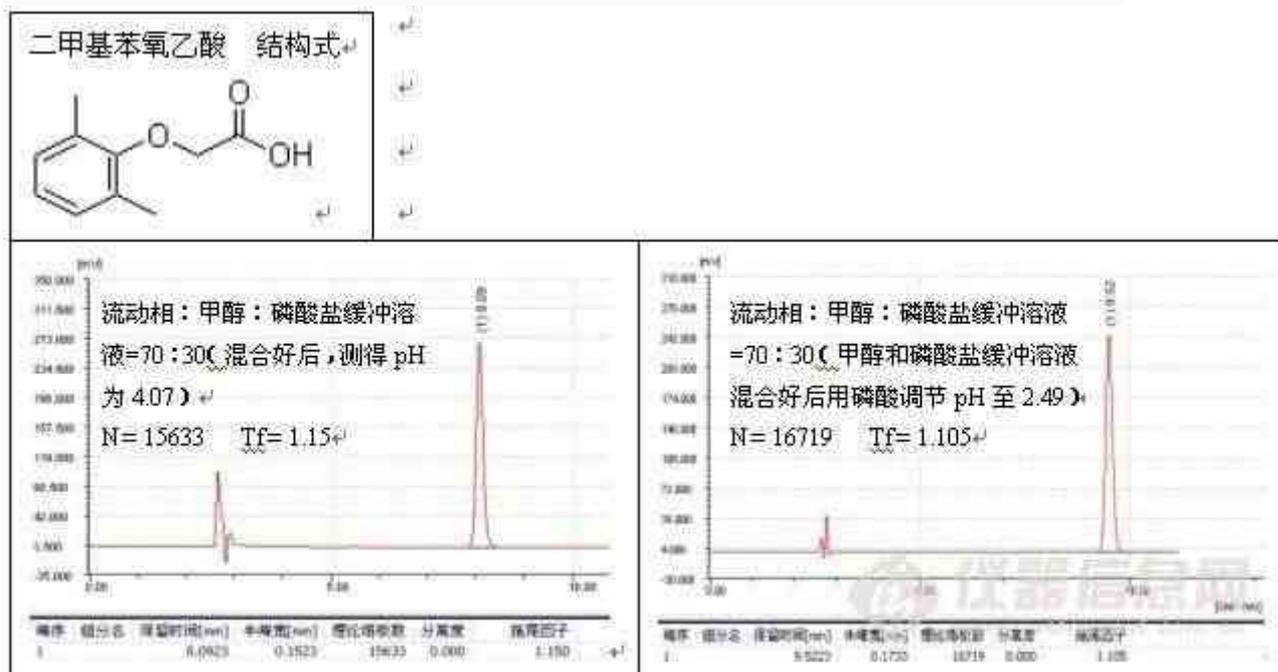
磷酸盐缓冲溶液的配制：准确称取磷酸二氢钠 7.8g 溶于 1000ml 水中，搅拌均匀，使之

溶解，用磷酸将 pH 值调至 2.50；

温 度：室温 26℃；

流 速：1.0ml/min；

进样量：20ul;



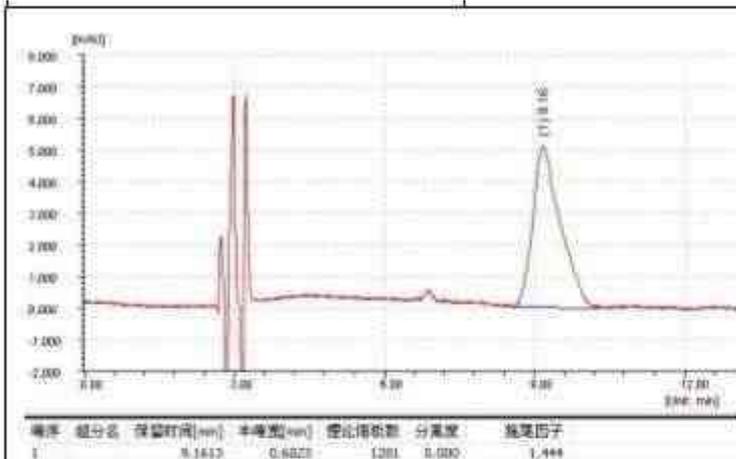
由谱图可以看出，分析二甲基苯氧乙酸时流动相中加酸调节 pH 至 2.49 改善了峰形，加入酸的作用是，一方面抑制了硅羟基的离子化，另一方面也抑制了有机酸的离子化，因而削弱了 -COO- 与 $\text{Si-O}\delta\text{-H}\delta\text{+}$ 的相互作用，减小了拖尾。

碱性化合物中，容易发生拖尾的化合物中通常包含着一 NH_2 、一 NHR 、一 NR_2 ，即伯、仲、叔三种富电荷的极性基团，它们的碱性强弱顺序为：一 $\text{NH}_2 < \text{-NHR} < \text{-NR}_2$ ，其碱性强弱跟与 N 原子直接相连的基团有关，吸电子基团会削弱这种碱性，供电子基团（如烷基）则使之增强。伯氨中甲胺的碱性最弱，以它为例更具有代表性，甲胺的 pK_a 为 10.64，那么在 $\text{pH} < 8.64$ 的时候它是完全呈离子态的，也就是一 $\text{NH}_3\text{+}$ ，那么 pH 在 2.5~8.64 时，特别是 $\text{pH} 6.7\sim 8.64$ 时，因为此时带氨基的化合物和硅羟基均以离子状态一 $\text{NH}_3\text{+}$ 和 Si-O- 形

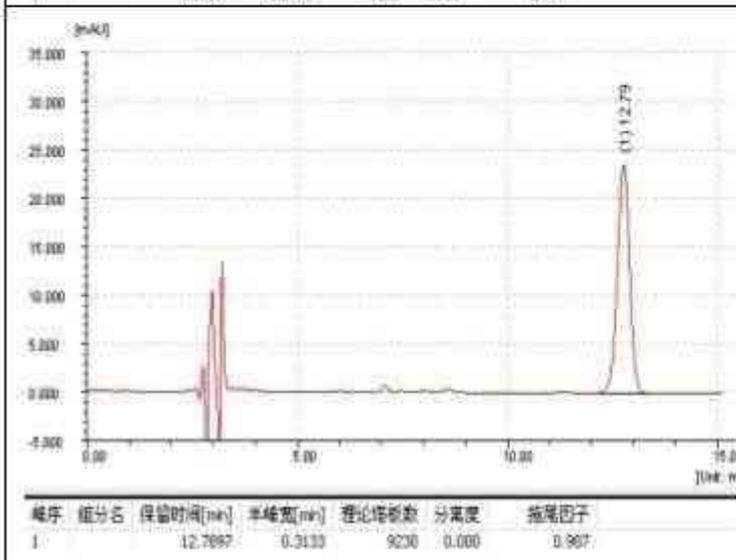
式存在的，它们之间相互吸引的静电作用导致后拖，这就是为什么很多碱性化合物在 pH 7.0 的条件下容易产生拖尾的原因，而很多色谱柱生产商也因此以阿米替林（含 $-N(CH_3)_2$ ，碱性比 $-NH_2$ 强）在 pH 7.0 的条件下来评价和比较不同色谱柱之间的优劣，该条件下的阿米替林的峰形越好说明封尾越好，封尾工艺成功的阻止了残余硅羟基与样品分子的接触。而在 $pH < 2.5$ 的条件下，也仍然后拖，是因为 $-NH_3^+$ 足够强，即使硅羟基以分子状态存在也仍能够与 $Si-O\delta-H\delta$ 中氧原子产生吸引作用，导致峰形拖尾。当 $pH > 12.64$ 的时候，甲胺完全以分子状态形式存在，不会引起拖尾。所以分析有些化合物，流动相的 pH 需要调至强碱性条件下峰形才会变好。

3. 增加缓冲盐或增大缓冲盐的浓度：

流动相中加入缓冲盐，增强了流动相的离子强度，在 $-NH_3^+$ 等极性基团和硅羟基 $Si-O-$ 之间存在着许多离子的干扰，减少了样品分子与硅羟基之间相互接触的机会，有助于削弱极性基团与硅羟基之间的相互作用，改善峰形。这种适合于碱性较弱（如氨基的 N 原子与强吸电子基相连），或碱性很强，但在刚性结构中，比较难以接近被 C₁₈ 长链和封尾试剂覆盖的硅羟基，例子如高乌甲素的测定：



色谱柱: Ultimate® XB-C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm⁺
 波 长: 252 nm⁺
 流动相: 甲醇:水=75:25⁺
 温 度: 室温 15°C⁺
 流 速: 1.0ml/min⁺
 进样量: 20 μ l⁺
 用流动相溶解样品⁺
 N=1281 Tf=1.444⁺



色谱柱: Ultimate® XB-C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm⁺
 波 长: 252 nm⁺
 流动相: 甲醇:50mmol/L 磷酸二氢钠溶液=75:25 (混合好后,用三乙胺调节 pH 至 8.40, 即 200ml 混合好的溶液中加入 75 μ l 三乙胺)⁺
 温 度: 室温 15°C⁺
 流 速: 1.0ml/min⁺
 进样量: 20 μ l⁺
 用流动相溶解样品⁺
 N=9230 Tf=0.987⁺

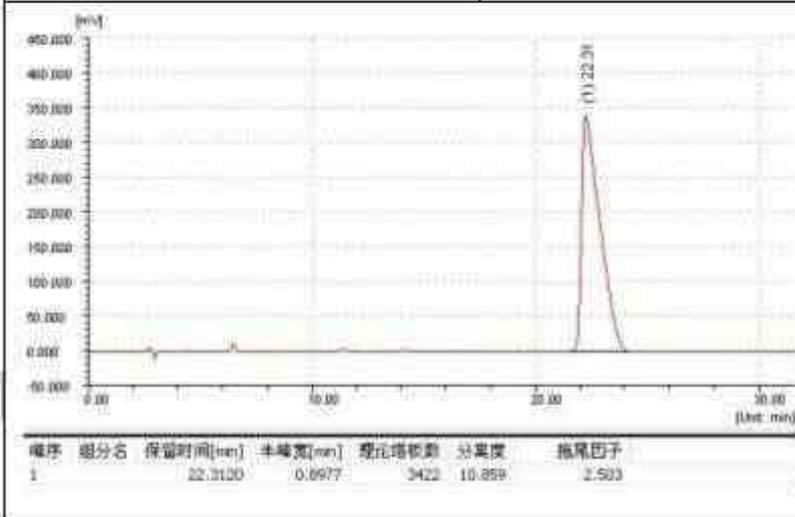
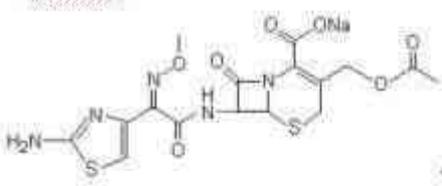
虽然加入了三乙胺, 但加入的量非常少, 200ml 混合好后的溶液中, 只加入了 75 μ l 滴用于调节 pH 的 (因为不调节 pH, 保留时间太短, 在 4.2min 出峰), 相对于 2% 的浓度的量而言 75 μ l 是非常少的, 几乎起不到屏蔽硅羟基的作用, 因此, 上图中峰形改善的原因, 主要的应归功于缓冲盐的加入。

4. 往流动相中加入三乙胺

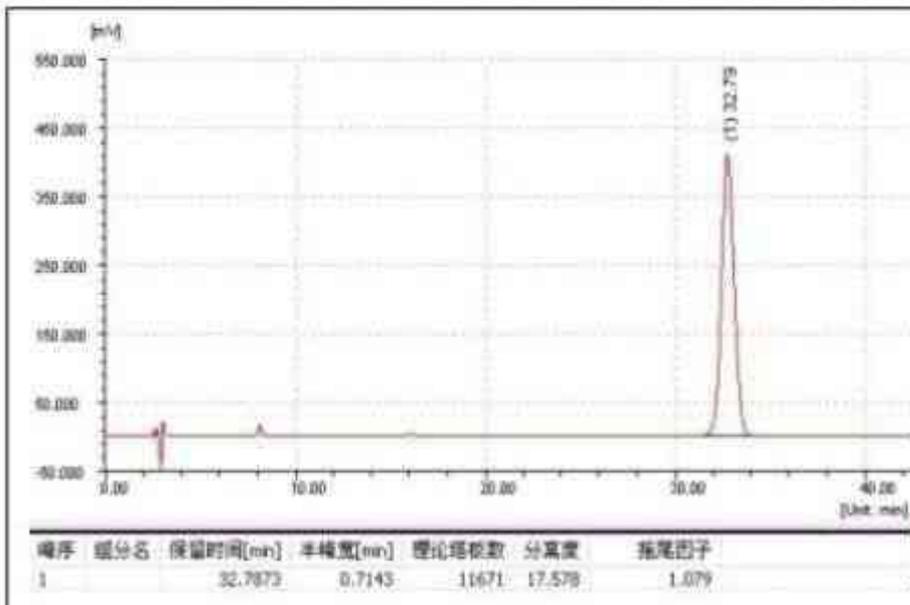
基于上面的解释，既然拖尾的产生是因为 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 与硅羟基发生静电作用引起的，那么阻碍它们之间静电作用的途径，应该有两种，一种是占据硅羟基这个作用位点，另一种是占据 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 这个作用位点。

在流动相中加入三乙胺，能显著的改善峰形，消除拖尾。其作用是屏蔽硅羟基，使碱性化合物在分离的过程中减少了和硅羟基相互接触的机会，失去了导致拖尾的作用位点。三乙胺的 pK_a 为 11.09，在 $\text{pH} < 11.09 - 2 = 9.09$ 的条件下是以离子状态 $\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 的形式存在的，因此 pH 在 2.5~8.64 硅羟基呈 $\text{Si}-\text{O}^-$ 离子态的情况下， $\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 容易与 $\text{Si}-\text{O}^-$ 形成相对较强的静电吸引力，流动相中加入了三乙胺后，平衡柱子的过程中已经优先占据了硅羟基的作用位点，而带氨基的样品分子虽然在该 pH 条件下也呈离子状态 $-\text{N}^+\text{H}_3$ 、 $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$ 或 $-\text{N}^+\text{HR}_2$ ，也能与 $\text{Si}-\text{O}^-$ 形成相对较强的静电吸引力，但三乙胺有先占住位点的优势，使样品分子与硅羟基的作用大大减弱，缓解了拖尾的产生；同时，流动相中存在的 $\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 仍然与样品分子中的极性基团与硅羟基的相互作用产生竞争，更进一步的削弱了样品分子与硅羟基的接触机会，改善峰形。例子如：头孢噻肟钠的测定：

头孢噻肟钠 结构式



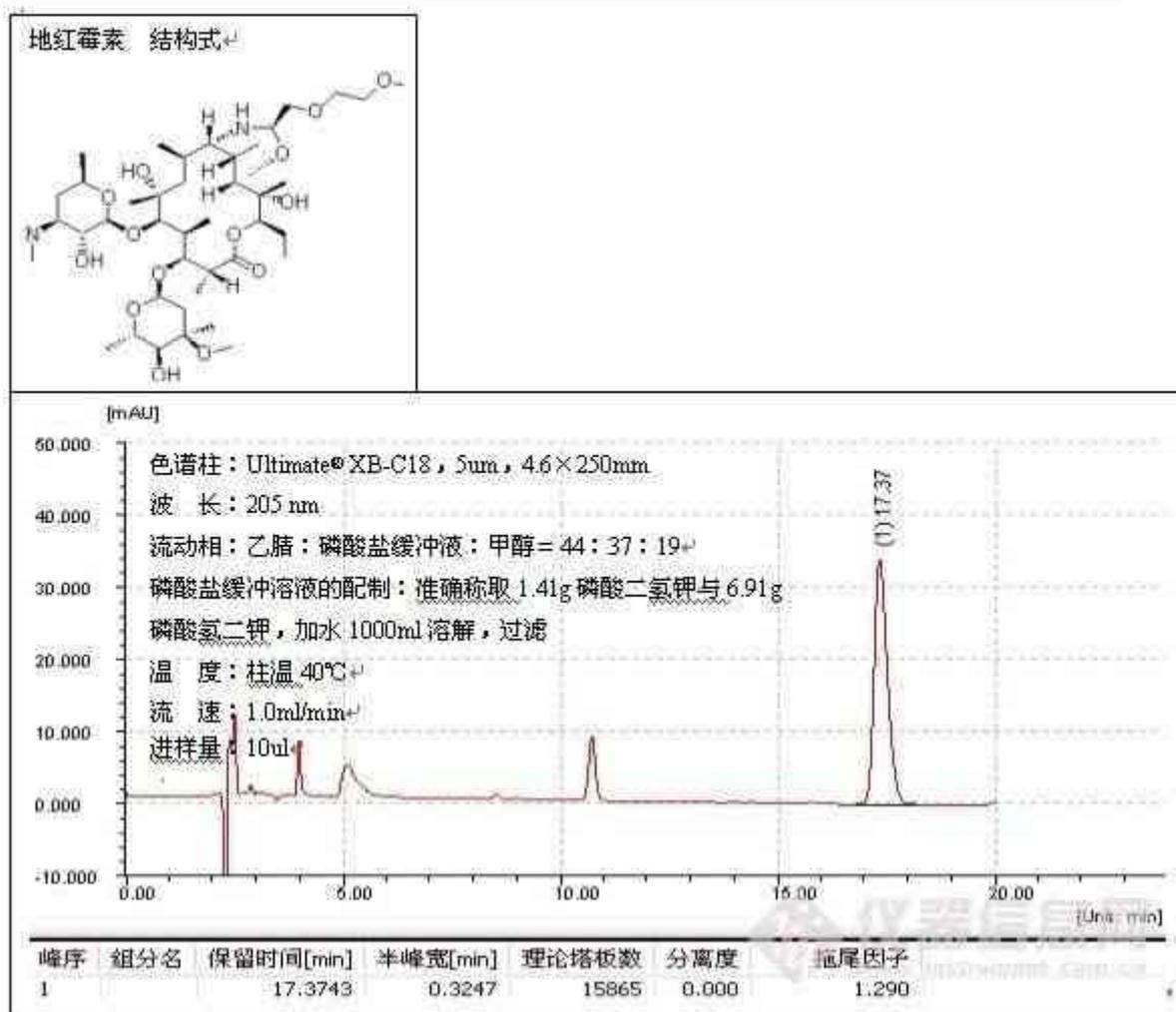
色谱柱：Ultimate® XB-C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm⁺
 波长：254nm⁺
 流动相：磷酸盐缓冲溶液：甲醇=80：20（混合好后，测得 pH 为 8.4）⁺
 缓冲盐的配制：准确称取 60mg 磷酸二氢钾和磷酸氢二钠 1.2g 溶于 1000ml 水中，搅拌均匀⁺
 柱温：室温 12°C⁺
 流速：1.0ml/min⁺
 进样量：20 μ l⁺
 N= 3422 Tf= 2.503⁺

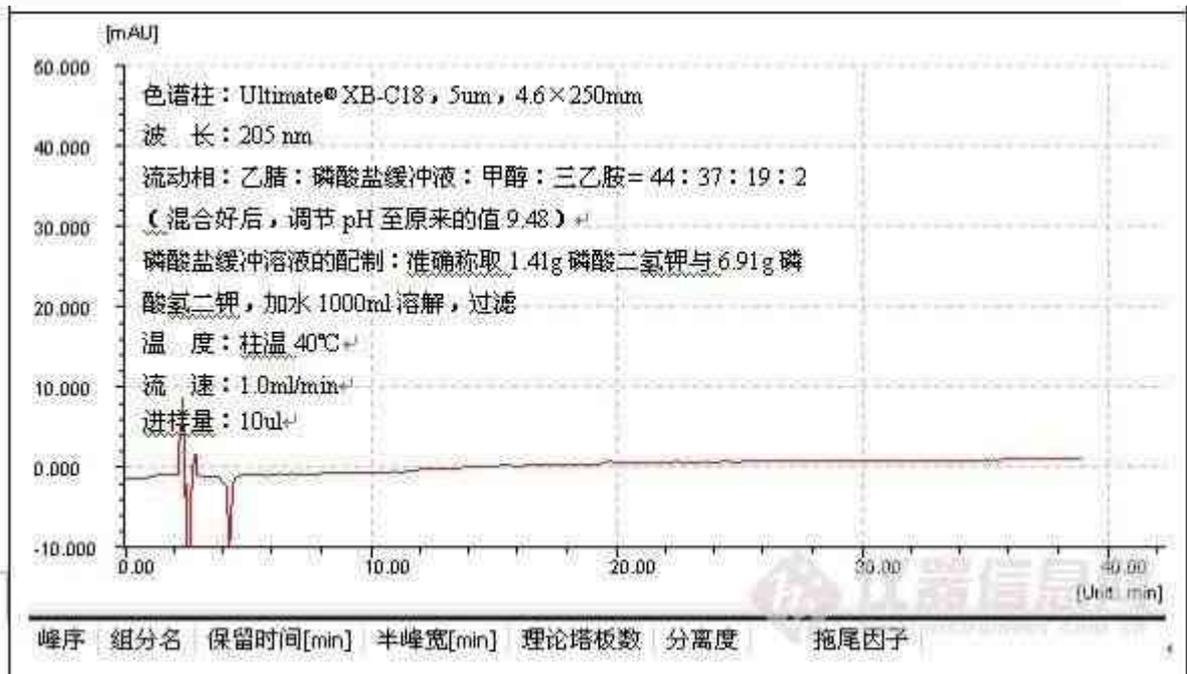


色谱柱：Ultimate® XB-C18, 5 μ m, 4.6 \times 250mm⁺
 波长：254nm⁺
 流动相：磷酸盐缓冲溶液：甲醇：三乙胺=80：20：2（混合好后，用磷酸调节至 pH 8.4）⁺
 缓冲盐的配制：准确称取 60mg 磷酸二氢钾和磷酸氢二钠 1.2g 溶于 1000ml 水中，搅拌均匀⁺
 柱温：室温 12°C⁺
 流速：1.0ml/min⁺
 进样量：20 μ l⁺

通常加入三乙胺的量约为 2% 即有显著的效果，如有需要可适当增大用量。加入三乙胺改善峰形的时候，有两点需要注意的：1) 三乙胺的碱性很强，加入三乙胺后流动相的 pH 可能超出色谱柱的使用范围，对色谱柱造成损伤，同时，pH 的改变也会导致出峰时间的显著变化，

为了避免保留时间变化太大而可能引起的其它问题，因此，建议流动相中加入三乙胺后回调至未加入前的 pH 值，但通常即使 pH 回调过也仍会引起保留时间的较大变化；2) 三乙胺在 210nm 处有比较强的吸收，如果液相方法中检测波长在 210nm 以下测定时需要谨慎使用，以免因加入三乙胺后本底上升，而引起峰高、峰面积下降，检测灵敏度严重降低，有些甚至看不到峰，例子如地红霉素的测定：





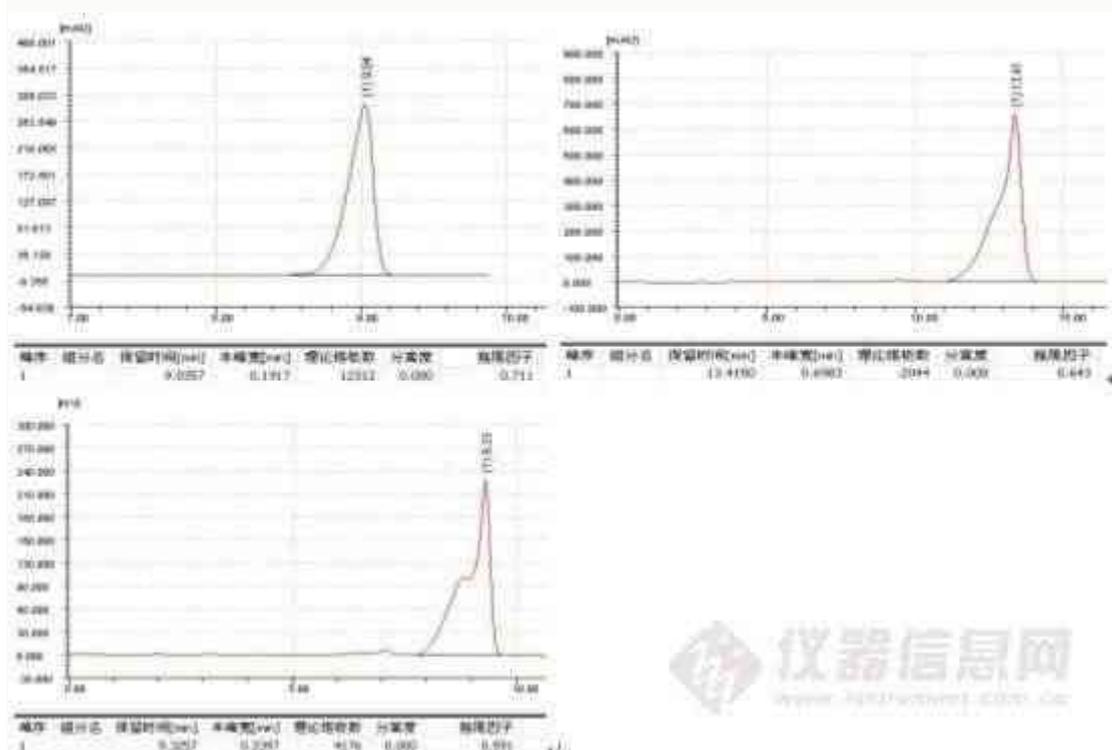
第二个图中连进了两针都没有峰出现，这种现象得到了重现性。由此可见，三乙胺用于改善峰形，其使用范围是有一定限制的。

峰形前拖解决方案和实例

峰形对称性的优劣对峰面积和分离度有很大的影响，从而影响分析结果的准确性，是色谱工作者不得不重视的问题，也是让大家最为头疼的问题之一。然而引起峰形异常的因素很多，如色谱柱本身装填不好、强保留化合物对色谱柱的污染、填料中残留硅羟基引起的次级保留效应、柱头塌陷、柱外死体积等等，针对不同的情况我们可以有不同的对策。在这里我们撇开所有的污染、塌陷、死体积等其它因素，假设系统是好的，柱子是新的、好的，单纯探讨液相方法与峰形前拖之间的关系，通过调整液相方法来解决峰形前拖的问题。

前拖峰在谱图上有几种表现形式，主要有以下 3 种，第一种比较明显一些，后两种，容易让人怀疑这个峰里面是不是有两种物质没有彻底

的分开，第三种前拖更是让人质疑是否是色谱柱受到了污染引起的肩峰。



发现峰形前拖时，本人建议按下面的步骤逐步排除可能的原因，然后找到相应的对策，消除峰形前拖的状况、改善峰形。

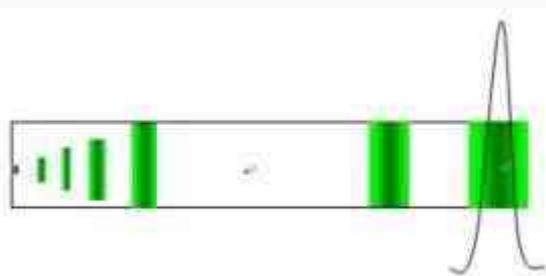
1) 先检查一下是否是样品过载

样品过载，通常会引引起峰形变差，导致前拖、后拖或平头峰，如果出现平头峰、峰高超过 2000mAU 或峰很高的同时又前拖、后拖得很厉害通常都认为是过载的，但这一点也并不绝对，因为不同化合物的吸收强度不一样，如果一种化合物在某一波长处有强吸收，即使出现了平头峰，样品也不一定过载；相反如果吸收弱，则高浓度条件下峰也不见得有多高；所以样品是否过载应该结合浓度、进样体积和峰形一起来判断。通常认为峰高在 100mAU 左右比较合适，不至于因过载

影响峰形。由于样品过载引起的峰形前拖不容易消除，也可能根本无法消除，继续采用以下的峰形改善措施可能不会有什么作用，而且在过载的情况下无法看清正常浓度时样品真实的分离状况和峰形，因此需要优先考虑是否过载，否则继续往下调整峰形的努力将无任何意义。

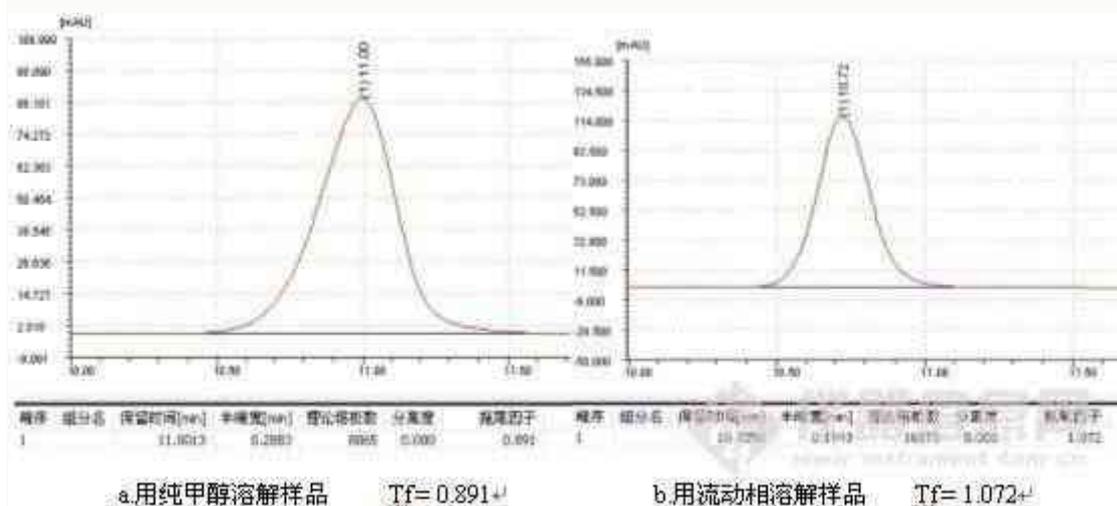
2) 检查是否是用流动相溶解样

不用流动相溶解样品容易在谱图上产生溶剂峰和前拖（上述的几种形状的前拖都有），这种情况通常是在溶解样品的溶剂（如纯甲醇）洗脱能力比流动相（如甲醇：0.4%磷酸溶液=38：62）强的情况下发生，如例 2，而溶剂洗脱能力比流动相相对较弱时，目前未见此现象；也有人说也会产生后拖，但本人做样以来并没有碰到过这种情况。正常的峰形应该是样品在色谱柱上均匀的前移的情况下得到的，浓度分布在通过色谱柱柱床的过程中任何时候都呈正态分布，如下图所示：

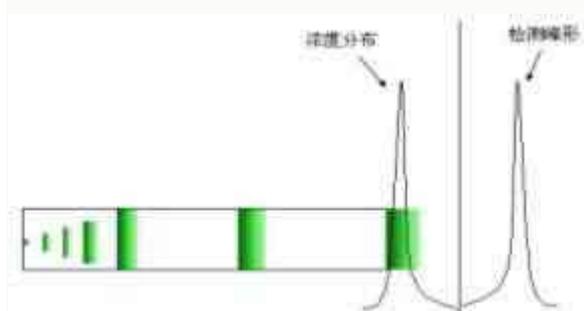


为什么用洗脱能力比流动相强的溶剂溶解样品会容易产生前拖？以“姜黄素标准品的测定”为例，样品溶剂是甲醇，流动相为乙腈：4%冰醋酸水溶液=48：52，直接进样时表现出前拖，如下图 a；用流动

相溶解样品后前拖消失，峰形对称，如下图 b:



一种可能的解释是，进针后，在流动相的推动下样品溶液很快到达色谱柱，此时样品溶液未能被流动相很快稀释，结果是，作为样品溶剂的局部浓度过大，由于甲醇的洗脱能力比流动相强，因此甲醇带着部分样品提前进入到了填料里面，而另一部分则还没来得及进入填料周围的环境就发生了变化——由甲醇变成了流动相，所以一部分样品提前被甲醇带出来而另一部分没有，导致样品谱带的浓度分布发生了变化，浓度中心偏离了正常峰时的位置。同时作为样品溶剂的甲醇毕竟有限，只有几十微升，因此只能带着很少一部分样品提前进入填料，形成前拖；



根据这一解释，出现这种前拖时，似乎样品只有在周围环境与流动相相同时才不会发生这种现象，如果用甲醇溶解的样品浓度为 10ug/ml

时出现前拖（此时样品周围环境与流动相不同），那么将 1000ug/ml 高浓度甲醇溶解的样品用流动相稀释至原来浓度的 1/100 倍（此时样品的浓度也为 10ug/ml，周围环境与流动相也不完全相同），是不是也会出现前拖呢？很显然不会，因为它和用流动相溶解已经没有什么区别，差异太小了，只有 1/100。也就是说不一定非得用流动相溶解样品才会消除这种因样品溶剂而引起的前拖，那么到底要与流动相差异多小才不会引起这种状况呢？在我们的实验过程中发现，只要用流动相将原样品稀释至原来浓度的 1/4 倍（体积比，原样品溶液：流动相=1：3 混合）就可以达到和用流动相溶解相似的效果，例子如下：

石杉碱甲标准品的测定

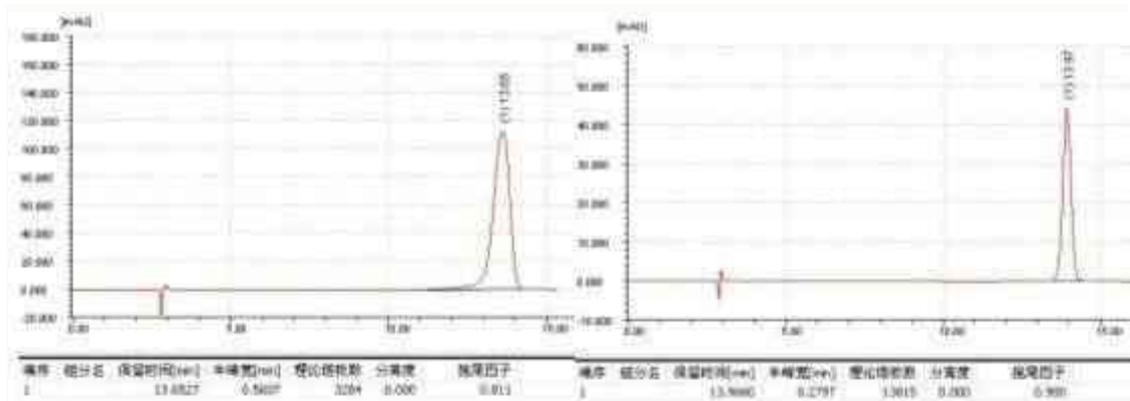
色谱柱： Ulitmate XB—C18， 4.6×250mm；

流动相： 甲醇： 缓冲盐溶液=25： 75；

缓冲盐溶液的配制：（配制 0.08M 醋酸铵水溶液，再用冰醋酸调节 P H 至 6.0）；

检测波长： 308nm； 温度： 室温 26 度；

流速： 1 ml/min； 进样量： 20ul；

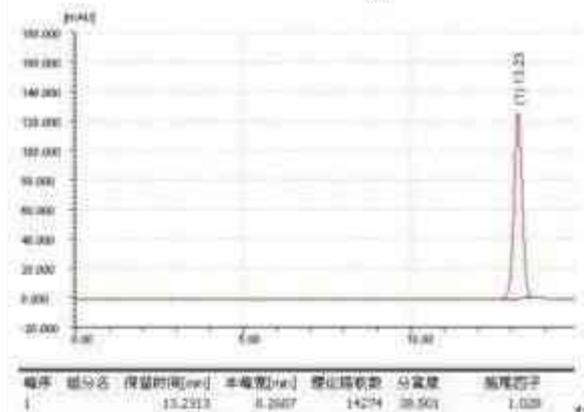


a.用纯甲醇溶解样品

Tf=0.811

b.将 a 图中的样品用流动相稀释至原来浓度的 1/4 倍

Tf=0.980



c.用流动相溶解样品

Tf=1.028



由此可以看出，不用流动相溶解样品对色谱峰形是有很大影响的，容易造成前拖，所以特别是开发方法的时候尽量使用流动相来溶解样品。当然，如果已经用了较强的溶剂溶解样品，得到了一个前拖峰，而重新用流动相配制样品又很麻烦时，那么可以用流动相将样品稀释至原来浓度的 1/4 倍，来粗略的考查一下，看是否是因未用流动相溶解引起的。事实上，一直以来我们在考查峰形前延引起的原因的时候经常用这种更便捷的方式，省了不少时间，非常管用。

有时候同样是用强溶剂溶解的在有些色谱柱中产生前拖，而另一些色谱柱中没有，我个人认为，这些填料可能是没有封尾的，从填料键合的角度，裸硅胶上键合上 C18 长链后仍然残留了大量的硅羟基，残

留的硅羟基对水分子具有很强的吸附能力，硅胶表面的吸附水对所进的样品溶液产生了一种稀释作用，使附带样品的甲醇失去了相对较强的洗脱能力，不再能很快带着部分样品进入填料，而是均匀的进到色谱填料中，样品在色谱柱中的浓度分布未能产生偏移，因而出来的是正常峰。

如果峰形仍然前拖则继续往下调整。

3) 增加流动相中缓冲盐的浓度

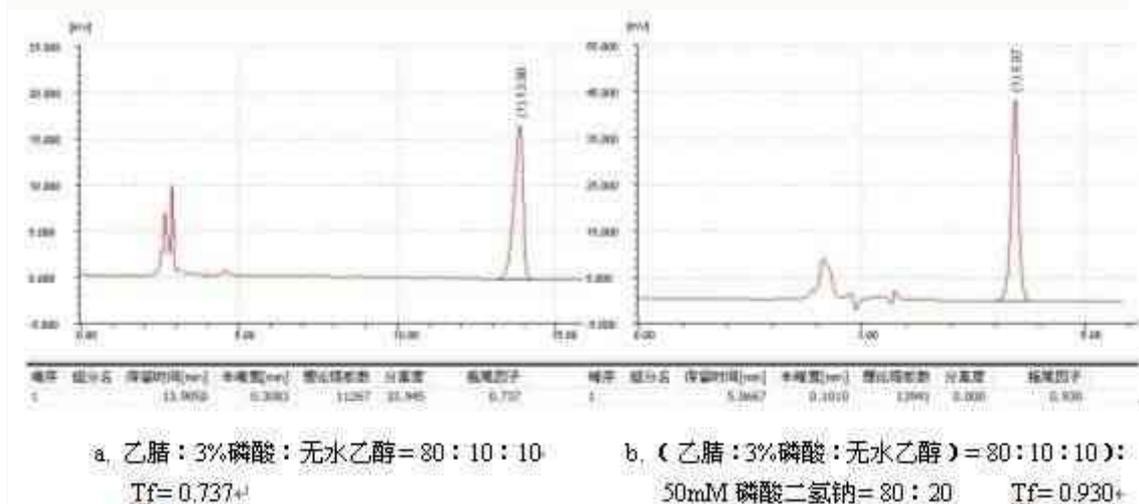
增加缓冲盐浓度可以增大流动相中的离子强度，减少因静电的作用（有可能存在于样品分子之间、也有可能存在于样品分子与填料表面之间）引起的前拖。例子如下：

注射用苦参碱的测定

色谱柱：Ultimate XB-NH2-2, 5 μ m, 4.6 \times 250mm;

柱温：室温 24 度； 流速：1.0ml/min;

检测波长：220nm； 进样量：20 μ l;



4) 流动相中加入适量的四氢呋喃

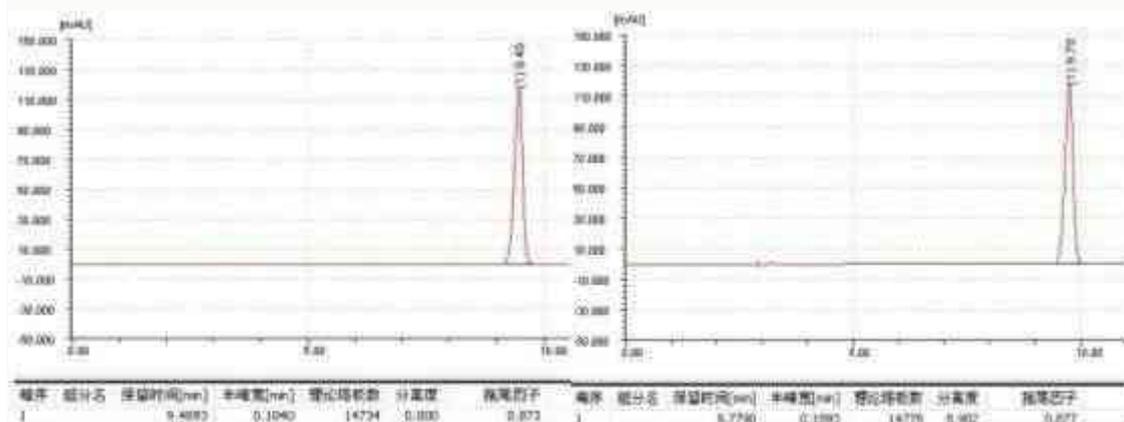
往流动相中加入少量的四氢呋喃有时可以改善峰形、增大分离度，很多色谱工作者都知道和使用，但其机理似乎少人提及。通常所加入的量在 5% 以内即可，需要的时候可以加入更大的量。例子如下：

阿莫西林胶囊的测定

色谱柱：Ultimate AQ-C18，5 μ m，4.6 \times 250mm；

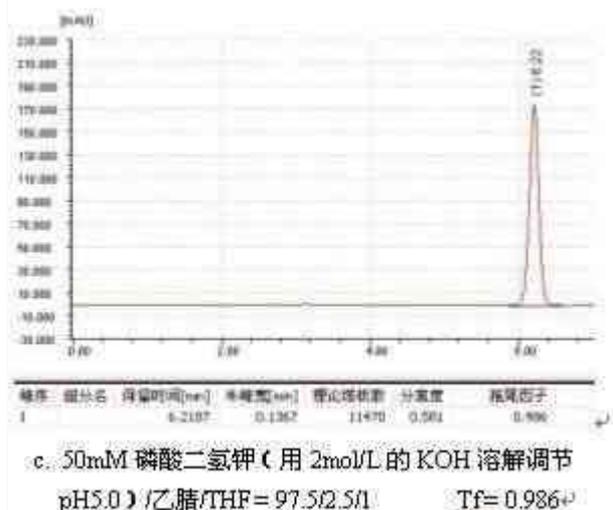
检测波长：254nm； 温度：室温 28 度；

流速：1.0ml/min； 进样量：20 μ l；



a. 50mM 磷酸二氢钾(用 2mol/L 的 KOH 溶解, 调节 pH5.0) / 乙腈=97.5/2.5 Tf=0.873

b. 100mM 磷酸二氢钾(用 2mol/L 的 KOH 溶解, 调节 pH5.0) / 乙腈=97.5/2.5 Tf=0.877
增大缓冲盐的浓度似乎对改善阿莫西林的峰形没有什么太大影响。



5) 升高柱温

升温有助于增加流动相传质速率，减少因静电作用引起的前拖，但温度不宜太高，温度太高容易损伤色谱柱，特别是含有离子对试剂的时候，最好不要超过 40 度。

高效液相色谱峰形前延分析及解决方案

怀化市药品检验所 唐勇

2010 年 10 月 21 日

峰形对称性的优劣对峰面积和分离度有很大的影响，从而影响分析结果的准确性。然而引起峰形前延异常的因素很多，如色谱柱本身装填不好、强保留化合物对色谱柱的污染、填料中残留硅羟基引起的次级保留效应、柱头塌陷、柱外死体积等等，针对不同的情况我们可以有不同的对策。撇开所有的污染、塌陷、死体积等其它因素，假设系统是好的，柱子是新的、好的，单纯探讨液相方法与峰形前延之间的关系，通过调整液相方法来解决峰形前拖的问题。

1、样品是否过载

降低进样浓度，看峰形是否有所改善。一般认为峰高在 100mAU 左右比较合适，不至于因过载影响峰形。

2、检查是否是用流动相溶解样品

溶解样品的溶剂（如纯甲醇）洗脱能力比流动相强会发生峰前延。具体机理是：正常的峰形应该是样品在色谱柱上均匀的前移的情况下得到的，浓度分布在通过色谱柱柱床的过程中任何时候都呈正态分布。样品溶液进样后到达色谱柱时间很短，应还未被流动相充分稀释，洗脱能力更强的样品溶剂的局部存在，将使部分样品被洗脱的速度加快，导致峰前延。

例如：梔子中梔子苷的测定。

3、增加流动相中缓冲盐的浓度

增加缓冲盐浓度可以增大流动相中的离子强度，减少因静电的作用（有可能存在于样品分子之间、也有可能存在于样品分子与填料表面之间）引起的前延。例如：注射用苦参碱的测定。

4、流动相中加入适量的四氢呋喃

往流动相中加入少量的四氢呋喃有时可以改善峰形、增大分离度，通常所加入的量在5%以内即可，需要的时候可以加入更大的量。例子如下：阿莫西林胶囊的测定。

5、升高柱温

升温有助于增加流动相传质速率，减少因静电作用引起的前拖，但温度不宜太高，温度太高容易损伤色谱柱，特别是含有离子对试剂的时候，最好不要超过 40 度

造成色谱峰（不对称）拖尾的原因

1. 色谱柱本身填装问题，筛板堵塞或填料塌陷；
2. 柱头有污染；
3. 样品超载；
4. 样品溶剂不合适；
5. 柱外效应；
6. 化学或二次保留（硅羟基）效应；
7. 缓冲容量不足或不合适；
8. 重金属污染。

如何解决峰形拖尾的问题

A. 与化学有关的拖尾问题

1. 流动相中，加入 30mM 的三乙胺（用与碱性化合物）或醋酸胺（用与酸性化合物），未知化合物加醋酸三乙胺；
2. 如仍然拖尾，将三乙胺换为二甲基辛胺（或醋酸二甲基辛胺）；
3. 降低进样量至<1ug。

B. 与色谱柱有关的拖尾问题

1. 如柱头处有强保留的样品组分积聚，反相柱可用 20 倍柱体积的 96%的二氯甲烷与 4%甲醇，加 1%氢氧化铵混合液冲洗，正向柱可用甲醇冲洗。
2. 使用保护柱

C. 与 HPLC 系统有关的峰拖尾和峰加宽

1. 进样体积过大，（通常 $\leq 25\mu\text{L}$ ）；
2. 进样阀与色谱柱及检测器之间的管路体积过大（最佳连接管应 $< 20\text{cm}$ ，内径为 $0.007''$ ）；
3. 检测器流通池的体积过大。

液相色谱柱使用问题解析

色谱柱 2010-08-26 17:01:09 阅读 3422 评论 4 字号：大中小 订阅

液相色谱柱使用疑难问题解析

就液相色谱柱的安装，使用和维护知识，以及各种柱压、峰形和色谱柱寿命等问题前来提问，也欢迎液相色谱方面的高手前来交流切磋。

内容提纲：

一、液相色谱柱的安装、启用和维护中的重点注意事项

- 1、柱头类型和不锈钢毛细管接头的匹配
- 2、溶剂的匹配转换
- 3、新柱使用前的平衡和老化
- 4、pH 使用范围
- 5、色谱柱的保存

二、柱压问题

- 1、填料破碎和使用后，有填料粉末生成
- 2、颗粒物堵塞引起柱压上升和对策
 - 1) 预防措施
 - 2) 故障排除
- 3、化学污染物引起柱压上升和对策
 - 1) 预防措施
 - 2) 故障排除

三、峰形问题

- 1、峰后拖
- 2、峰前延
- 3、其他峰形问题

四、保留时间问题

- 1、保留时间的重现性
- 2、保留时间漂移
- 3、柱与柱之间的重现性
- 4、批与批之间的重现性

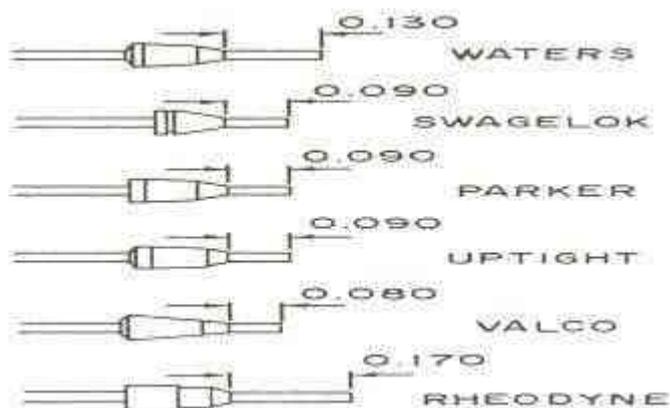
五、寿命问题

六、其他疑难的色谱技术问题

一. 安装、启用和维护中重点注意事项

色谱柱既是液相色谱仪的最核心部件，价格相对昂贵，请牢记它是高档仪器中的高档部件，给它以足够的尊重和关怀。如避免强烈的碰撞和震动，尽管色谱柱从 1 米高的实验台掉落到水泥地上不至于 100% 会损坏，但 50% 的可能损坏你也承受不起。另外不要让柱床变干，避免在严寒环境受冻等。

1. 柱头类型和不锈钢毛细管接头的匹配



色谱柱是消耗品，不是仪器原配的情况很多。上图表明柱连接的 6 种不同方式（数字单位是英寸），如果两者类型不匹配将会产生漏液或者死体积过大的现象。接头比柱头深度长，不易拧紧而漏液；接头比柱头深度短，柱头内留有空隙而产生死体积，使谱带展宽和峰拖尾。

2. 溶剂的匹配转换

色谱柱内存溶剂和仪器系统内存溶剂，如果和流动相不匹配，使用前需进行转换。特别是流动相含缓冲盐时，如保存溶剂是纯有机相或有机相比例高，直接将新柱接入使用，会导致缓冲盐在柱内结晶析出，最严重会将新柱永久不可逆地损坏。正相柱保存溶剂一般为正己烷，如果要转换成 HILIC 柱模式使用，由于正己烷和甲醇乙腈的互溶性不好，转换中间需用二氯甲烷或乙酸乙酯过渡。

3. 新柱使用前的平衡和老化

厂家出厂检验时一般都已进行过平衡，但色谱柱到最终用户时间不一，用户正式测定前最好对色谱柱再次平衡。最好的平衡兼老化一起进行的方法是运行几次完整的分析程序（包括进样），直到观察到峰形、保留时间和峰面积稳定为止。所谓“老化”是借用了气相的术语，目的是达到分析物在色谱柱以及整个液相系统流路中的吸附饱和。对某些特定的待测物，如分子量大于 1000 的，因扩散速度慢，老化时间相应要长，可采取大浓度进样或在同一个洗脱周期内连续进样多针的方式加快老化。

4. pH 使用范围

一般认为硅胶基质柱子的 pH 使用范围是 2-8，这是很粗略的。硅胶类型、使用温度、硅胶表面所键合的固定相类型以及缓冲盐的不同，对此均有影响。硅胶比孔径小、键合密度大的填料 pH 耐受范围要大一些，如月旭公司的 Ultimate XB-C18 色谱柱，选用的是高品质硅胶，加上高密度键合和双封尾，使 pH 耐受范围最大提高到 10。磷酸盐缓冲盐渗透力强，有加快硅胶溶解的副作用，它的存在会降低 pH 使用范围。有机杂化硅胶以及硅胶表面涂覆杂化层的硅胶填料，有机质的存在使 pH 使用范围能到 12 以上，月旭公司的 Xtimate 系列产品即属此类。

5. 色谱柱保存

短期保存(隔夜或隔周末)用所用的流动相(不含缓冲盐)保存为佳，以尽量减少下次使用的平衡时间。一般只建议在长期保存反相柱的时候用纯甲醇或乙腈，一方面纯有机相保存有最大限度减少键合相水解的作用，但纯甲醇(乙腈)又会将已水解而暂时吸附在柱内的键合相洗脱出去，使固定相流失进程加快，寿命缩短。纯有机相保存还有易挥发使柱床变干的缺点，使用 80% 左右有机相保存也属好的选择，且足以避免长菌。强烈建议在柱身上贴标签标明保存溶剂。

CN 基柱在有机极性溶剂中柱床不稳定（会导致柱床结构坍塌），适合在水相中低温保存。低温保存要确保不发生固定相冻结而损坏柱床。离子交换柱和水性 SEC 柱等适合保存在水溶液中的色谱柱，可加 0.05%叠氮化钠溶液防止长菌。

正相柱，无论是短期还是长期，都推荐保存在所用流动相中。

上面是基本色谱分离方程式，分离度 R 和柱效 (N)、选择因子 (α) 以及容量因子 k' 相关，和柱压无关。但柱压 (P) 仍不失为 HPLC 方法中的最重要参数之一，因为柱压反映了色谱柱的内部状况。现今能承受 400 bar 压力的 HPLC 泵很常见，色谱柱如在远低于上限的压力下正常运行，不需要我们重点关注；当柱压升高接近上限或者柱压有异常升高，往往意味着色谱柱出状况了，需及时进行维护和补救，严重时色谱柱就已报废了。本节将详细考察柱压问题并提出可行的解决方案。

柱压方程

$$\Delta P = \frac{\eta FL}{K_0 \pi r^2 d_p^2}$$

The diagram shows the equation $\Delta P = \frac{\eta FL}{K_0 \pi r^2 d_p^2}$ with arrows pointing to each variable and its corresponding label: η (viscosity), F (flow), L (length), K_0 (specific permeability), r (column radius), and d_p (particle diameter).

对填充色谱柱，柱压与黏度 (η)、柱长 (L) 和流速 (F) 成正比，与填料粒径 (d_p) 以及柱管半径 (r) 的平方成反比。 K_0 是比渗透性系数，对填充床，其值约为 0.001。通过此公式可近似计算出给定色谱条件下的理论柱压。只有当新柱实际测得的柱压和理论柱压相差很大，才能说柱压存在问题。

黏度 (η) 取决于流动相溶剂的选择，为降低柱压，反相色谱中倾向于选择低黏度的乙腈，而不是高黏度的异丙醇。当然选择时还需考虑溶剂强度、极性、分析物的溶解度以及和分析物兼容性等。柱长 (L) 增加可以提高分离度 (R)，流速 (F) 提高能加快分离，但都会导致柱压上升，选择确定这些运行参数时，需综合平衡和折中。

填料粒径对柱压影响极大， d_p 降低一倍，柱压将增加 4 倍。UHPLC 中采用的 sub-2 μm 填料，柱压超过普通 HPLC 泵的 400Bar 上限很多。提高柱温因可降低黏度 η ，相应降低柱压。在梯度洗脱时，黏度随流动相组成的变化而改变，柱压也会处在不断变化中。对水/甲醇流动相体系，在 55: 45 时，黏度和柱压有个极大值。

内径的影响同样很大 根据线流速相同柱压相同的原则 4.6mm 内径的色谱柱流速为 1ml/min 约相当于在 2.1mm 内径色谱柱上的 0.2ml/min 流速 在 10mm 半制备色谱柱上的 5ml/min，计算公式为 $v = 1.0\text{ml/min} \times (\text{内径 } r/4.6)^2$ 。所以在换不同内径色谱柱时，请及时调整流速，以免因高柱压损伤色谱系统。

柱压下降是仪器系统的连接有泄漏，柱压不稳定一般认为是流路中有气泡或空穴，和色谱柱相关的柱压问题是柱压上升。

色谱柱结构:

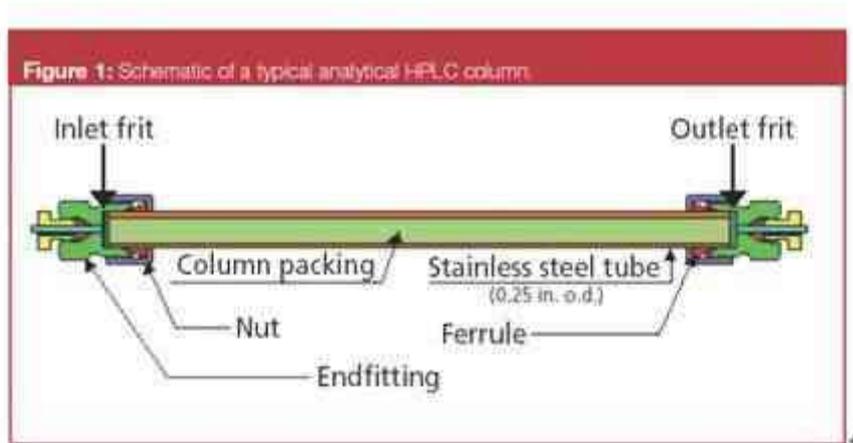


图 1. Compress 型不锈钢色谱柱的基本构造



图 2. Modular Column 基本构造

和柱压相关最大的是进口端筛板 (inlet frit) 以及其后面 1-2cm 长度的柱头填料。筛板上有比填料粒径小的小孔，筛板上的小孔或柱头填料的间隙被部分堵塞，是柱压上升的主要原因。有以下几类情况：

1. 填料破碎和使用后有填料粉末生成

填料破碎一般在装柱过程中发生，装柱压力过大或所选硅胶机械强度过低所致，设定柱压出厂标准可解决；流动相中高 pH 值缓冲盐使硅胶溶解并重新形成填料粉末，堵塞出口端筛板，这种情况下反冲不起作用，只有更换后筛板，不过打开承压的后筛板，对柱床会有不良影响。

2. 颗粒物堵塞引起柱压上升和对策

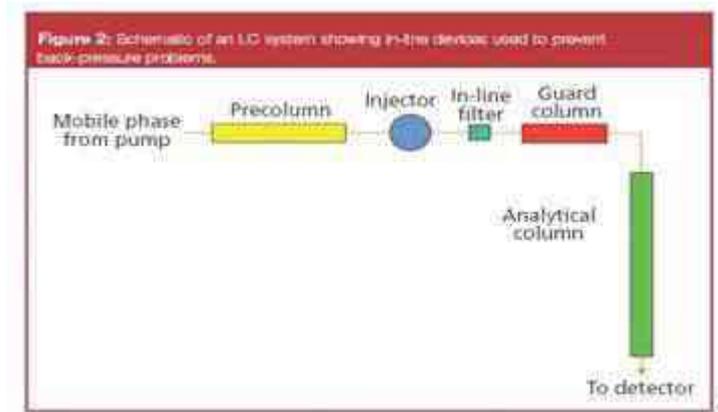
可能堵塞进口端筛板（前筛板）和柱头填料间隙的颗粒物来源有：样品（制样时灰尘和滤纸等带入）、进样阀密封圈磨损、流动相（溶剂本身含有和配制过程进入）、液相仪器中泵阀密封圈的磨损、缓冲盐析出（一般在梯度运行和进样时盐的溶剂环境改变导致）。

水和缓冲盐流动相内生长的细菌，也是颗粒物来源的一种，可堵塞筛板和填料间隙。应避免将这类流动相在室温下久放，可放入冰箱存放。

1) 预防措施

样品（甚至标准品）和流动相过滤，既预防了筛板、柱头和毛细管堵塞，又能减少进样阀、活塞杆和截止阀等仪器关键部件的磨损。普通用 0.45um 孔径滤膜过滤样品和流动相，对使用 2um 以下填料的超高压柱的，可用 0.20um 滤膜。滤膜材质有再生纤维素、聚四氟乙烯、尼龙、硝酸纤维和醋酸纤维等，须根据和样品溶剂及分析物的适应性慎重选择。

使用保护柱或在线过滤器，具体安装位置见下图：



在线过滤器内装有可更换的滤片，滤片孔径一般有 2 μ m 和 0.5 μ m 两种。安装位置有两个可选择，在进样器和色谱柱之间时，对样品和流动相中的颗粒物都有效；在泵和进样器之间，则只对流动相有过滤作用。

保护柱是缩小版的色谱柱，内含带填料的可更换的柱芯，安装在进样阀和色谱柱之间，用于防止色谱柱的化学污染为主，也有过滤颗粒物的作用。

2) 故障排除

反冲色谱柱：不连接检测器，直接将堵在前筛板上的颗粒物冲出排到废液瓶中。开始时反冲压力可低于正常使用压力，待颗粒物有冲出后，逐步提高冲洗压力。有时颗粒物已非常牢固嵌入到筛板内部，反冲不一定奏效，早反冲、勤反冲相对效果更好。有的厂商为避免堵塞，使用了较大孔径（2-5 μ m）的前筛板，这种情况反冲会将填料冲出。

换筛板：一般不建议这样做，因为换筛板会带走粘在筛板上的部分填料，使柱床的均一性受影响，导致柱效下降。不过如果反冲不能解决问题，也只能不得已而为之，要不然就要把色谱柱报废了。

如果系统中不接色谱柱，柱压仍然高，说明泵出口到色谱柱之间的其它部位，包括进样器、在线过滤器和保护柱等有堵塞，可逐一排查。为了减少死体积，毛细管都做得尽可能的细，也可能被堵。

3. 化学污染物引起柱压上升和对策

来源同样是样品、流动相和系统，不过来源于样品的污染最普遍，特别是对复杂基体样品未经前处理或前处理不够的时候。化学污染物主要有：分子量很大的化合物、盐类、脂质、蜡类、油脂、腐殖酸、蛋白质等其它生物来源的物质。

像盐类这样的保留能力极小的污染物会在死体积处很快从柱中洗脱出去，检测器一般对此类物质响应不大，有时表现为干扰峰、基线波动、斑点甚至负峰。

保留能力中等的污染物，会被慢慢洗出色谱柱，表现为宽峰、基线馒头形波动和基线缓慢漂移。

对强保留的污染物，一般流动相强度不足以将其从柱中洗出，会逐步在柱头累积。有时，累积在柱头的污染物可作为新固定相对分析物起作用，引起保留时间改变、峰拖尾和峰分叉等。污染物在柱头累积到一定程度，如果不采取措施，会堵塞填料间隙，引起柱压上升。最好的办法是选用合适的溶剂冲洗溶解这些物质，同时又不对填料本身有损害。如聚合物柱中累积的蛋白类污染物可用 pH13-14 的强碱溶液洗掉，但这种方法不适合硅胶基质色谱柱。

1) 预防措施：

- a. 制样时采用 SPE 固相萃取等方法，预先将色谱柱系手类的污染物清除掉；
- b. 连接保护柱。保护柱是分析柱的延伸，在填料类型和粒径上应于分析柱一致，才能最大限度起保护作用，又不影响色谱性能。一个设计和装填良好的保护柱，还可增加分析柱的分离效率。如果因某种原因需在保护柱中用不同的填料，也应选择比其所保护的的分析柱保留能力弱的固定相，这时的保护柱完全用于截住强保留物质，类似于 SPE 小柱的功效。当保护柱柱芯保护功能用尽时，也不能说不可再清洗后复用，但价格低不值得去花这个时间。
- c. 经常对分析柱进行冲洗维护：

2)故障排除：

已经累积很多污染物，用甲醇或乙腈简单冲洗不奏效，推荐使用下面方法清洗反相柱

100% 甲醇---100% 乙腈---75% 乙腈/25% 异丙醇---100% 异丙醇---100% 二氯甲烷---100% 正己烷

用每种溶剂冲洗至少 10 个柱体积，对于 250mm×4.6mm 的分析柱，合适的冲洗流速是 1~2ml/min。最后用 10 柱体积的异丙醇过渡，然后回到原来的流动相体系。

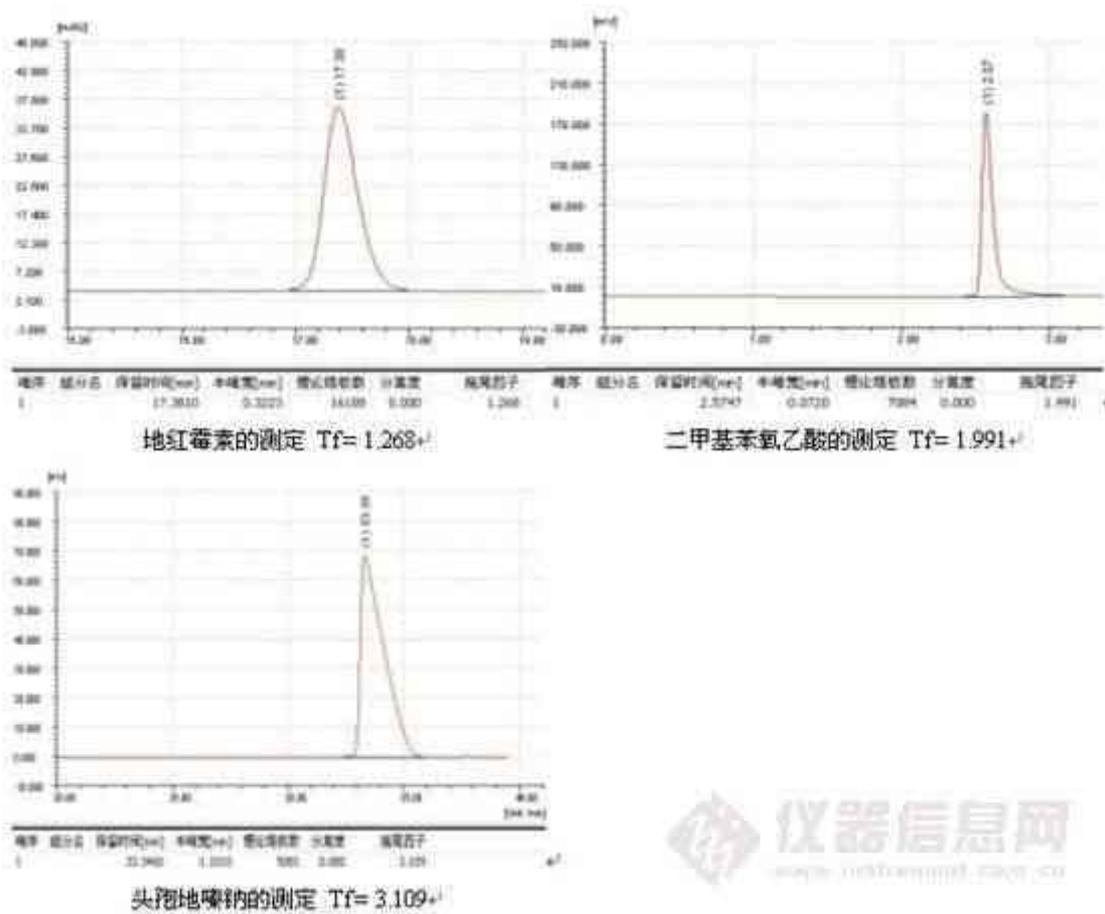
对受蛋白类污染的硅胶基质反相柱，纯有机溶剂如乙腈或甲醇不能溶解多肽和蛋白质。由有机溶剂、缓冲液和酸，有时还加上离子对试剂等组成的配方清洗效果极佳，譬如用三氟乙酸水溶液和三氟乙酸/丙醇溶液对柱子重复进行梯度洗来再生；Bhadwaj 和 Day 试验了在 250mm×4.6mm 的柱子中注入 100 μ L 的三氟乙醇，再生效果良好。

清洗硅胶、CN 和 Diol 等正相柱建议方法：先用 20 柱体积 50:50 正己烷/氯仿冲洗，然后用甲醇、二氯甲烷或者 100%醋酸乙酯冲洗。对油脂类物质，可用异丙醇清洗。

峰形对称性的优劣对峰面积和分离度有很大的影响，从而影响分析结果的准确性。引起峰形异常的因素很多，柱外死体积引起峰形异常有个特点：对先出的峰影响大，对后出峰影响小；柱头塌陷、柱头和筛板污染会引起所有的峰形都异常，而硅胶基次级保留只引起部分峰拖尾。相塌陷除了引起保留下降外，也会造成峰拖尾。色谱实践中，大部分的峰形问题都不是色谱柱的问题，仪器参数设定、色谱条件和方法正确与否对峰形有很大影响。

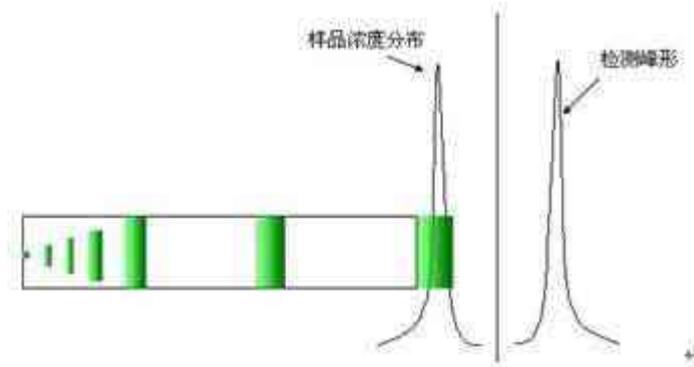
1. 峰后拖

常见的 3 种拖尾情况：



次级保留引起峰拖尾的机理解析：

反相色谱中，通常非极性和弱极性的化合物能获得良好的峰形，而带有一COOH、-NH₂、-NHR、-NR₂等极性基团的化合物则比较容易产生拖尾，原因是硅胶表面残留硅羟基对极性和碱性样品分子产生次级保留效应。



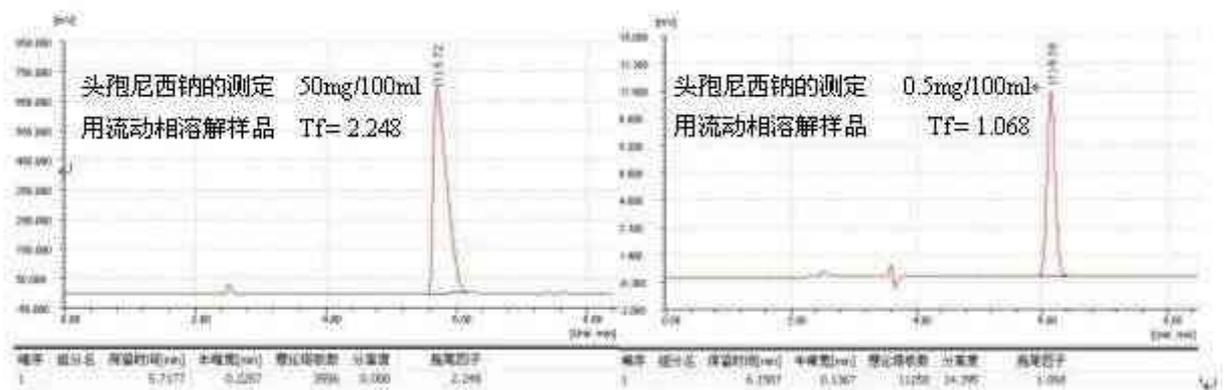
反相填料表面有残余的硅羟基，具有一定的酸性，其 pK_a 约为 4.5~4.7。根据电离规律，流动相的 $pH - pK_a > 2$ 即 $pH > 6.7$ 时，99% 以上的硅羟基应该是呈离子状态的，即 $Si-O^-$ ，而 $pK_a - pH > 2$ 即 $pH < 2.5$ 时，酸性环境抑制了硅羟基的电离，99% 以上的硅羟基应该是呈分子状态的，即 $Si-OH$ ，但其极性仍然存在，即 $Si-O\delta^- - H\delta^+$ 。 $Si-O\delta^- - H\delta^+$ 和 $-Si-O^-$ 对于极性化合物之间的作用力则是一种极性的静电作用力，这种作用力比范德华力要强得多。同时，因为硅胶表面键合了 C18 长链，由于空间位阻作用，样品分子中能接触到残余硅羟基的机会不多，只有少部分的分子才能与残余硅羟基产生强的静电作用而被推迟洗脱出来，产生后拖。拖尾严重的程度与样品分子极性大小和残余硅羟基的多少有着直接的关系。

上图是填料表面的示意图，完全硅烷化的硅胶表面硅羟基浓度为 8mol/m^2 。由于空间位阻的作用，通常与 C18 硅烷基发生反应的仅达 $2\sim 3.5\text{mol/m}^2$ ，需要再用小分子的硅烷跟硅羟基反应，如图中的三甲基氯硅烷，使硅羟基中的氢变成了三甲基硅烷的一个惰性基团。三甲基硅烷还是比氢原子大得多，还是不能将所有的残余硅羟基的活性封闭掉。

相同的样品在不同品牌的柱子上产生拖尾的严重性不同，从填料合成的角度而言就是键合密度是否高、封尾是否彻底，高密键合和彻底的封尾能显著减少这种机会，获得良好的峰形。Welch 公司 Ulimate 品牌的 XB-C18、AQ-C18 和 Xtimate C18 采取的就是高密键合和彻底的双峰尾工艺。

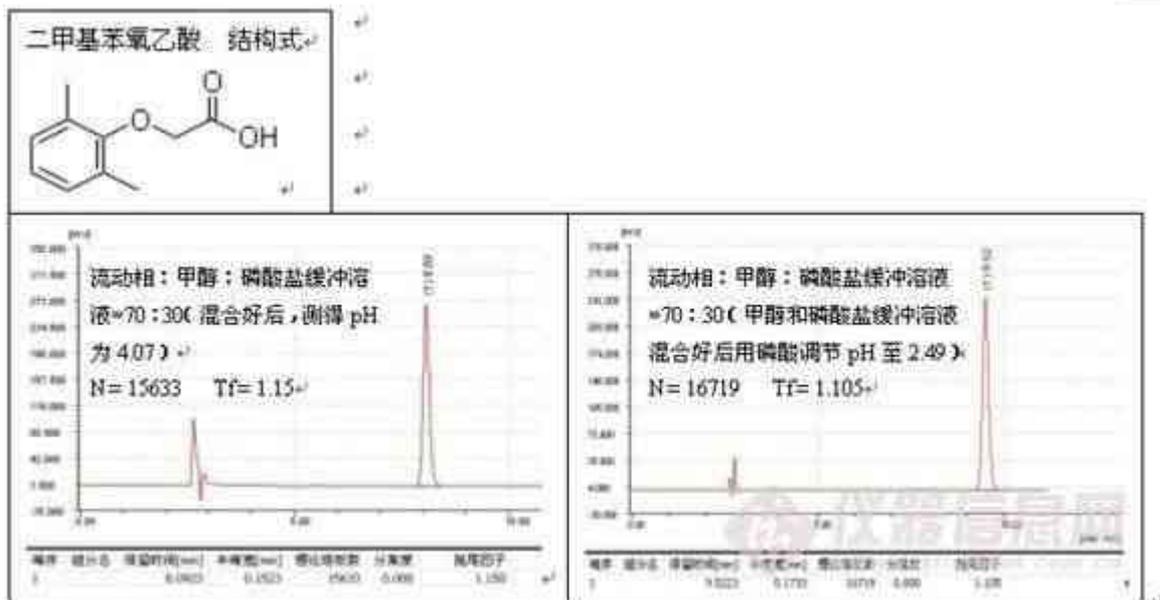
解决方案：

- 1) 先检查样品是否超载，由于样品超载引起的峰形后拖不能通过改变色谱条件消除。如果发现超载，需降低进样量（包括进样体积或浓度），进样量越小，峰形越好，例子如头孢尼西钠的测定：



2) 调节流动相 pH

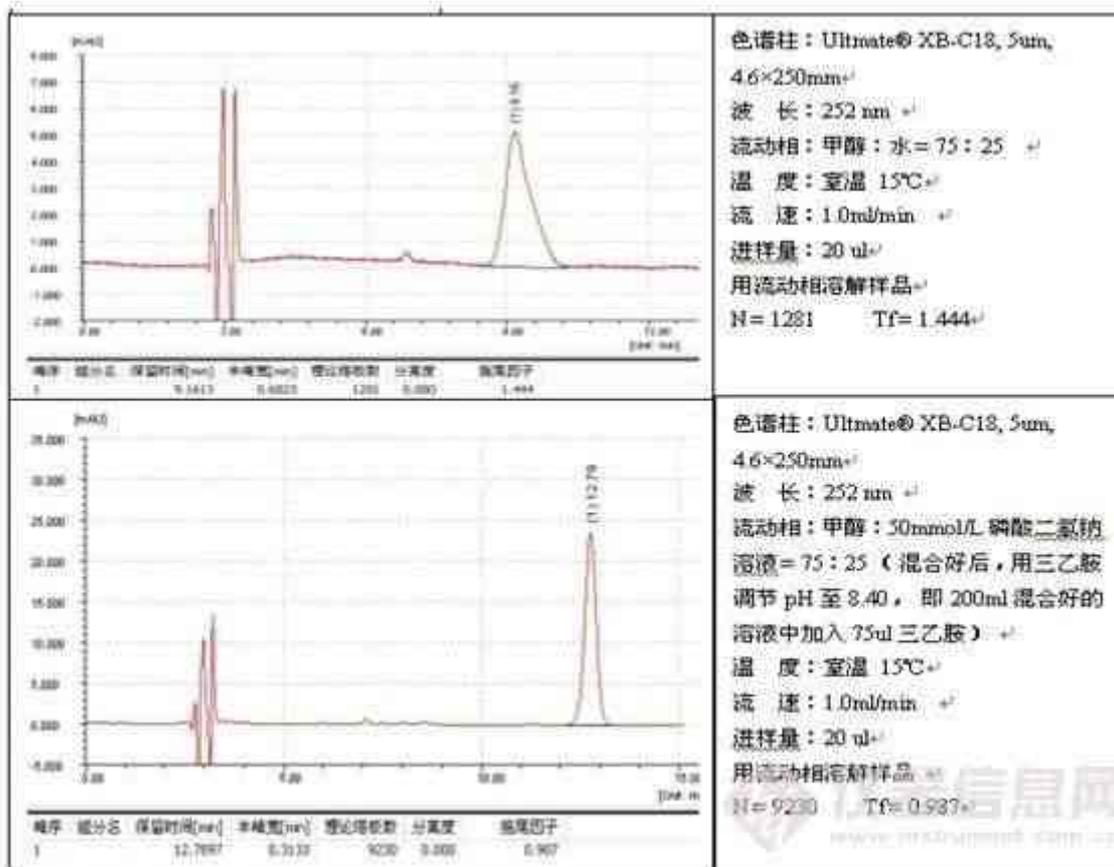
将流动相的 pH 调至比弱酸 pK_a 小 2 以上，比弱碱 pK_a 大 2 以上，可有效抑制易离子化待测物的电离，从而取得良好峰形。例子如二甲基苯氧乙酸的测定：



碱性化合物中，甲胺的 pK_a 为 10.64，那么在 $pH < 8.64$ 的时候它是完全呈离子态的，那么 pH 在 2.5~8.64 时，特别是 $pH 6.7 \sim 8.64$ 时，此时甲胺和硅羟基均以离子状态 $-NH_3^+$ 和 $Si-O^-$ 形式存在的，它们之间相互吸引的静电作用导致后拖，这就是为什么很多碱性化合物在 $pH 7.0$ 的条件下容易产生拖尾的原因。而很多色谱柱生产商也因此以阿米替林（含 $-N(CH_3)_2$ ，碱性比 $-NH_2$ 强）在 $pH 7.0$ 的条件下来评价和比较不同色谱柱之间的优劣，该条件下的阿米替林的峰形越好说明封尾越好。而在 $pH < 2.5$ 的条件下，也仍然后拖，是因为 $-NH_3^+$ 足够强，即使硅羟基以分子状态存在也仍能够与 $Si-OH$ 中氧原子产生吸引作用，导致峰形拖尾。当 $pH > 12.64$ ，大于 $pK_a 2$ 以上时，甲胺完全以分子状态形式存在，不会引起拖尾。

3) 增加缓冲盐或增大缓冲盐的浓度：

流动相中加入缓冲盐，增强了流动相的离子强度，在 $-NH_3^+$ 等极性基团和硅羟基 $Si-O^-$ 之间存在着许多离子的干扰，减少了样品分子与硅羟基之间相互接触的机会，有助于削弱极性基团与硅羟基之间的相互作用，改善峰形。这种适合于碱性较弱（如氨基的 N 原子与强吸电子基相连），或碱性很强，但在刚性结构中，比较难以接近被 C_{18} 长链和封尾试剂覆盖的硅羟基，例子如高乌甲素的测定：



4) 加入三乙胺、四丁基硫酸氢铵或辛烷磺酸钠等

拖尾的产生是因为 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 与硅羟基发生静电作用引起的，那么阻碍它们之间静电作用的途径，应该有两种，一种是占据硅羟基这个作用位点，另一种是占据 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、 $-NR_2$ 这个作用位点。

在流动相中加入三乙胺，能显著的改善峰形，消除拖尾，其作用是屏蔽硅羟基。三乙胺的 pK_a 为11.09，在 $pH < 11.09 - 2 = 9.09$ 的条件下是以离子状态 $N^+H(CH_2CH_3)_3$ 的形式存在的，因此 pH 在2.5~8.64硅羟基呈 $Si-O^-$ 离子态的情况下， $N^+H(CH_2CH_3)_3$ 容易与 $Si-O^-$ 形成相对较强的静电吸引力。

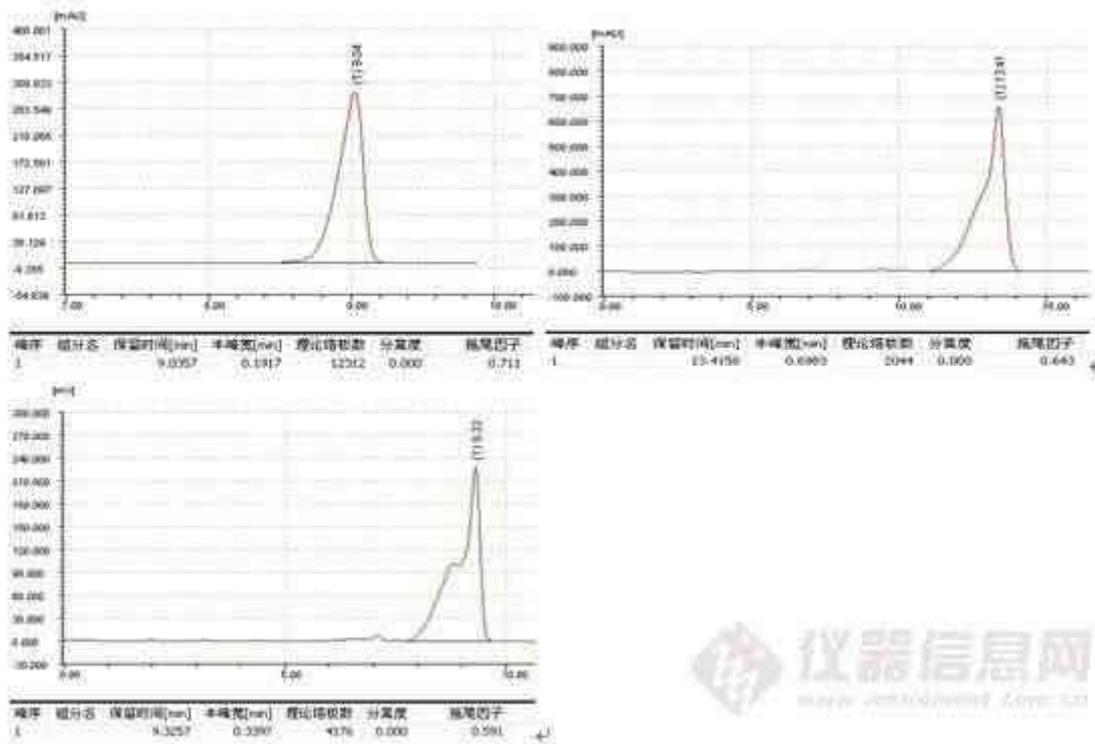
加入三乙胺改善峰形的时候，有两点需要注意：1) 三乙胺的碱性很强，加入三乙胺后流动相的 pH 可能超出色谱柱的使用范围，对色谱柱造成损伤。 pH 的改变也会导致出峰时间的显著变化，可能引起的其它问题，建议流动相中加入三乙胺后回调至未加入前的 pH 值。通常即使 pH 回调过后，由于三乙胺成为了固定相的一部分，保留时间也有较大变化；2) 三乙胺在210nm处有比较强的吸收，如果液相方法中检测波长在210nm以下测定时需要谨慎使用。

四烷基季铵盐（如四丁基硫酸氢铵、四丁基溴化铵、四丁基氢氧化铵等）在水中电离后，也形成了类似 $N^+H(CH_2CH_3)_3$ 的结构 $N^+(CH_2CH_2CH_2CH_3)_4$ ，这种结构也能有效的与 $Si-O^-$ 产生较强的静电作用，阻止氨基与硅羟基的接触，改善峰形。而且它还有一个不同于三乙胺的显著特点是，它在低波长范围的吸收比三乙胺弱。

流动相中加入辛烷磺酸钠等烷基磺酸盐离子对试剂也能很好的改善峰形，其作用机理与三乙胺和四丁基硫酸氢铵颇为不同，是通过与样品分子的作用来阻止样品分子与硅羟基的作用来改善峰形。

2. 峰前延

峰前延发生的概率比较小，下面是三种前拖峰的表现形式：



造成前延峰的原因有多种，我们可依次逐一排查：

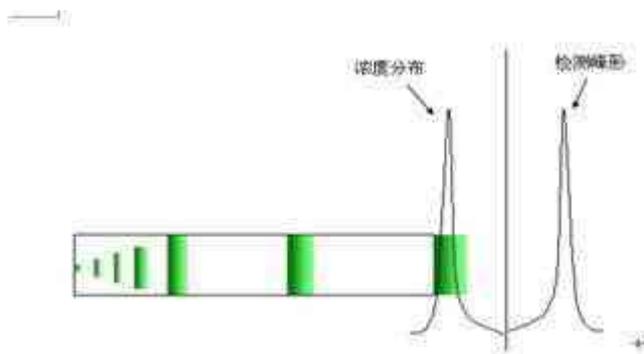
1) 样品是否过载

降低进样浓度，看峰形是否有所改善。一般认为峰高在 100mAU 左右比较合适，不至于因过载影响峰形。

2) 检查是否是用流动相溶解样品

溶解样品的溶剂（如纯甲醇）洗脱能力比流动相强会发生峰前延。具体机理是：

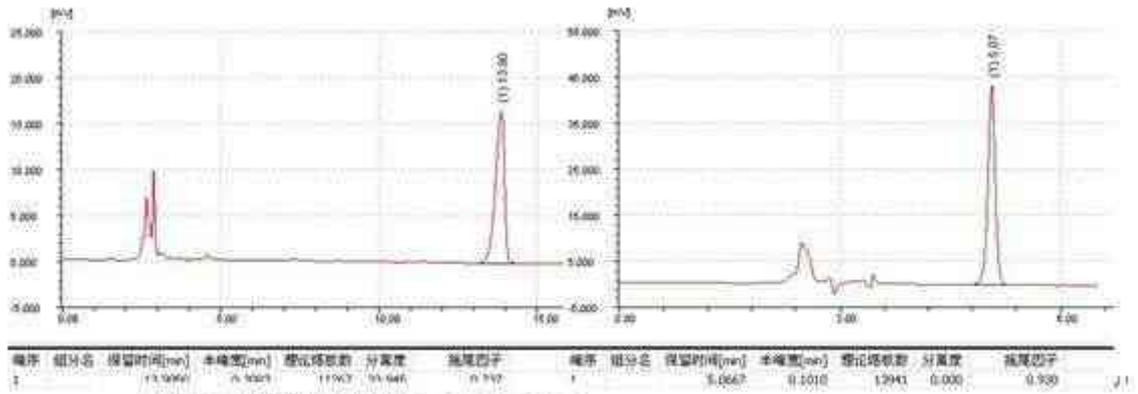
正常的峰形应该是样品在色谱柱上均匀的前移的情况下得到的，浓度分布在整个通过色谱柱床的过程中任何时候都呈正态分布。样品溶液进样后到达色谱柱时间很短，应还未被流动相充分稀释，洗脱能力更强的样品溶剂的局部存在，将使部分样品被洗脱的速度加快，导致峰前延。



3) 增加流动相中缓冲盐的浓度

增加缓冲盐浓度可以增大流动相中的离子强度，减少因静电的作用（有可能存在于样品分子之间、也有可能存在于样品分子与填料表面之间）引起的前延。

例如：注射用苦参碱的测定



a. 乙腈：3%磷酸：无水乙醇 = 80：10：10⁺

b. $T_f = 0.737$ ⁺

4) 流动相中加入适量的四氢呋喃

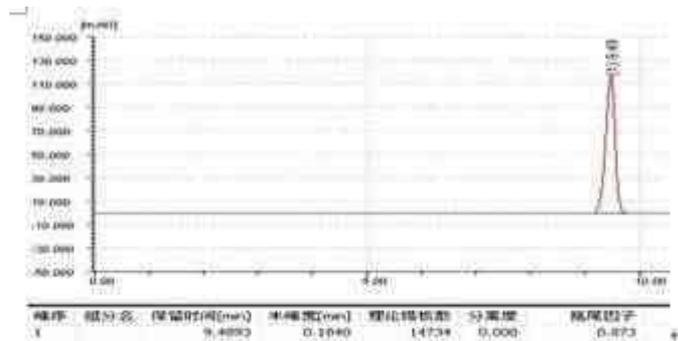
往流动相中加入少量的四氢呋喃有时可以改善峰形，增大分离度，很多色谱工作者都知道和使用，但其机理似乎少人提及。通常所加入的量在5%以内即可，需要的时候可以加入更大的量。例子如下：

阿莫西林胶囊的测定

色谱柱：Ultimate AQ-C18，5 μ m，4.6 \times 250mm；

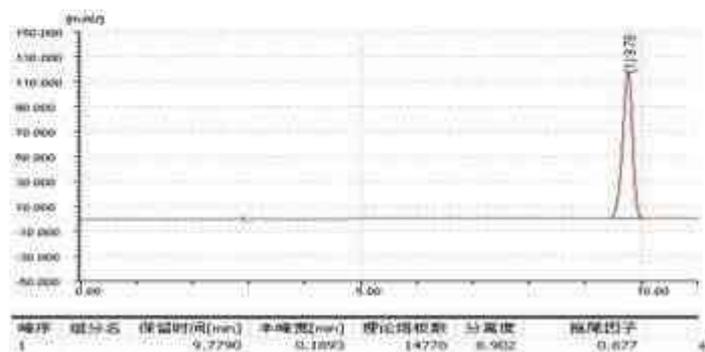
检测波长：254nm； 温度：室温 28度；

流速：1.0ml/min； 进样量：20 μ l；

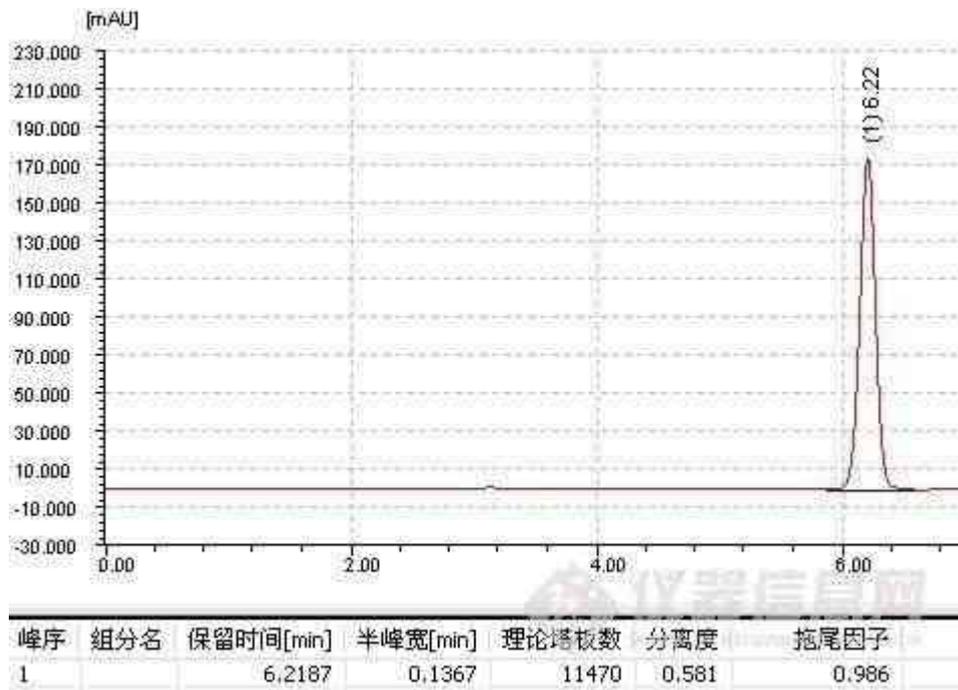


a. 50mM 磷酸二氢钾(用 2mol/L 的 KOH 溶解⁺

调节 pH5.0)/乙腈 = 97.5/2.5 $T_f = 0.873$ ⁺



b. 100mM 磷酸二氢钾(用 2mol/L 的 KOH 溶解调节 pH5.0)/乙腈 = 97.5/2.5 $T_f = 0.877$ ，增大缓冲盐的浓度似乎对改善阿莫西林的峰形没有什么太大影响⁺



5) 升高柱温

升温有助于增加流动相传质速率，减少因静电作用引起的前拖，但温度不宜太高，温度太高容易损伤色谱柱，特别是含有离子对试剂的时候，最好不要超过40度。

柱头污染和柱头塌陷都会造成裂峰，最常见的原因是筛板上颗粒物堵塞样品进入色谱柱不均一，只需反冲色谱柱将颗粒物除掉就可解决。

分保留时间重现性和保留时间单向漂移两类。

1. 保留时间的重现性

在色谱分析中最重要的是分离选择性，保留时间的重现性则是可简单通过用峰面积定量代替峰高定量来消除其对分析结果的影响。温度、流动相组成、pH、离子强度等的微小变化都会引起保留时间的改变。

10-20 柱体积流动相平衡是必须的。三乙胺等添加剂加入，平衡时间需加长。

固定相流失：

1) 在酸性条件下键合相碳链水解断裂流失；

2) 碱性条件下硅胶基质溶解导致在基质上键合固定相流失；

3) p H2-8 下，上述两种因素导致的流失仍会缓慢发生。多位键合比单点键合好，长链比短链键合牢固，用于封尾的键合相易流失；C18 链的稳定性比 CN

基链大三个数量级，一个是 3 个月会有明显流失，一个是 1 小时；用有机相洗柱子会加快流动相的流失。

柱污染：污染物作为固定相的一部分起保留作用，随着污染程度的逐步增加，保留时间发生趋向性的变化。

流动相组成变化：如甲醇等挥发引起保留时间逐步变大。

相塌陷：纯水条件下，C18 柱会发生固定相塌陷，引起保留时间逐步变小甚至失去保留能力。

3. 柱与柱之间的重现性

同一批填料生产出的不同柱子，装柱密度或柱体积的不同引起保留时间不一致。同样尺寸规格柱子，填料装得越结实，柱体积越小，保留时间越快。正常情况只有百分之几的差别。

平衡程度、老化程度、使用历史及污染程度的不一样都会导致两根同品牌同批次色谱柱之间的保留时间不一致。

4. 批与批之间的重现性

由于不同批次填料之间的差异性导致。主要是表面键合度（可负载碳量指标）和羟基活性方面的差异。可调整方法提高方法的适应性，或者让厂商备存足够的同批次的适应方法的填料。

色谱柱如果得到正确使用、维护和保养，寿命会很长。在使用保护柱的情况下，有寿命超过 1 万针的实例。如果不用保护柱，即便得到很好保养维护，一般能用到 2000 针左右就不错了。不过保护柱频繁换柱芯的成本也不低，而且使用装填不好的保护柱还会影响分离质量。

对硅胶基质色谱柱，流动相 pH 值和样品清洁程度对寿命影响较大。个人认为高柱温对寿命有影响，但不大，即使方法要求 70 摄氏的柱温，也没发现有显著的寿命缩短。进针前样品处理得越干净，色谱柱寿命当然越长。但样品前处理也是需要花钱的，需要在预处理成本、色谱柱成本和数据质量之间进行权衡。

色谱柱是高档仪器中的高档部件，表面看，一支只有和筷子一样大小的色谱柱，2000-5000 元价格算比较昂贵了，但色谱柱的使用成本占整个分析成本的比例却很低。因为色谱柱是耗材中可重复使用次数算多的，按平均用 2000 次计算，单次使用成本仅有 1-2 元人民币，与制样和试剂成本相比，几乎可忽略不计。制样用的 SPE 萃取小柱，过滤样品和流动相的滤膜，一次性用完之后，我们眼都不眨就扔掉了。因此，尽管通过本文中提到的很多再生清洗方法能延长使用寿命，但还需要权衡是否值得花时间这样做，一是清洗色谱柱用的试剂是需要成本的，二是再生修复的柱子毕竟不能完全恢复到新柱的性能，三是继续使用性能已经下降很多的色谱柱，万一造成分析项目失败，得不偿失。

建议每支色谱柱固定做一种分析方法。尽管一开始需要备的色谱柱多一些，但从长期来看，这样做和用一根色谱柱来回切换用于不同的样品分析相比，产生问题会更少，色谱柱花费的总体成本会更低。

六、其它疑难的色谱技术问题（问题集锦）

对一些经常问到的、具有普遍性的问题和实例进行剖析讲解，欢迎大家提问。

1、网上对柱子是否可以反冲一直有争论，那什么样的柱子可以反冲，什么不可以。反冲后是正着用，还是反着用。具体到各型号柱子不仅是 ODS 柱，其他如正向柱、氨基柱、离子交换柱等最好都有解释。

2、您那阿莫西林胶囊的测定的什么样品啊？咋就一个峰呢？标样？

3、对于一根常用的 c18 柱，拿到一根新柱的时候应该怎样进行活化及维护？为什么要这样做？

4、测定多肽，一般采用什么柱子？流动相是乙腈和水，还有微量的 TFA。特别是像类似三肽的短肽，应该怎么选择柱子？

5、氨基柱在进酸性样品时，很伤柱子，如使用一段时间后，柱效降低，峰形改变，如何恢复？

6、色谱柱的技术都有哪些？比如封尾等，这些技术在应用时都体现在哪里？

7、色谱柱技术的差距在哪里？

8、柱子在什么情况下可以清洗一下筛板呢？原来也讨论过这个问题，我也拆下来清洗过，但我看到柱前段的污染更甚，于是就用刀片刮了刮，然后把清洗好的筛板安装上去。问题解决了，但使用寿命会不会减少呢？

9、如果柱子取下来放置一段时间，需要做什么保护吗？

10、流动相中加入适量的四氢呋喃可以改善峰形的机理是什么？

11、关于色谱柱的填装问题！我个人认为现在色谱柱的填装一般有 3 种情况：1.国外生产填料并填装完成成品卖到国内；2.国外生产填料，国内填装销售；3.国内生产填料，国内填装销售。一般情况下，第 1 种情况卖的最贵，也质量最好！可是我就不明白了：如果是填料的生产很复杂的话，那么填装上国内也跟不上去吗？为什么换在国内填装就会出现或多或少的一些小问题呢？

12、国产色谱柱在市场上占有比例如何啊？

13、预柱或保护柱用还是不用的问题！原来分析中药品种时，我一直都是用保护柱。但来到新公司后，发现大家都没有使用，几个实验室连保护柱都没找到一个，也就是说大家从来都没有用过。后来问一个老员工，说是有可能影响药品分析。我就想问：安装保护柱后会影响样品分析吗？我们做的大多是头孢类的抗生素。

14、用的是四元梯度泵 A50%甲醇 B50% 水 经常出现停或进气泡这是什么原因？

15、资料显示：在正常条件下，填料粒度 $>20\mu\text{m}$ 时，干法填充制备柱较为合适；颗粒 $<20\mu\text{m}$ 时，湿法填充较为理想。填充方法一般有 4 种①高压匀浆法，多

用于分析柱和小规模制备柱的填充；②径向加压法，Waters 专利；③轴向加压法，主要用于装填大直径柱；④干法。柱填充的技术性很强，大多数实验室使用已填充好的商品柱。为什么以 20um 为分界点？填料方法的前三种都是湿法吗，能不能对四种填充方法做一个简短的说明？

16、我在用液相测定多肽样品时遇到下列问题 1) 流动相是 A1%三氟乙酸水溶液，B1%三氟乙酸乙腈溶液 波长 210 平衡时间太长基线波动很大是什么原因？怎么改善？2) 用过的 C18 柱怎么清洗比较好。

17、如果不使用不锈钢接头，而改用 PEEK 头，是否可以完全解决接头匹配问题？

18、有的厂商为避免堵塞，使用了较大孔径（2-5um）的前筛板，这种情况反冲会将填料冲出。那么，你们在使用说明书中会说明前后筛板的孔径吗？

19、我在做多肽药物时遇到下列问题：1) 基线不稳定波动大，流动相 A：1%TFA 水溶液 B:1%TFA 乙腈溶液 检测波长 210nm 流速 1.0ml/ml 什么原因？怎么解决？TFA 有什么作用？流动相中不加 TFA 见不到主峰，基线良好。2) 做完肽类样品时怎么冲洗 C18 比较好；3) 药典上介绍测定分子量大于 2000 的样品，选择柱子填料的孔径为 30nm，30nm 与 10nm 对结果有什么区别？

20、waters Atlantis C18 柱可以用较高比例的流动相，那麽用完后应该怎麽清洗？在什麼体系中保存比较合适？

21、我们公司有好多台 HPLC，但有一台总出问题，是走的液总跟设定的程序不一样，不知道是电脑原因还是机器原因？

22、磷酸盐缓冲液渗透力强，为什么，是因为与醋酸盐，枸橼酸盐相比，基团小吗，使用磷酸盐缓冲液与其它缓冲液相比，会使色谱柱寿命缩短多少？

23、反相离子对色谱法中，离子对是如何起作用的，是离子对试剂的非极性端溶解在填料的非极性端里，解离端伸向流动相，对含胺化合离子交换作用，还是样品与离子对生成紧密的结合物，离子对试剂掩藏化合物中的极性基团，还是这种结合物是在解离与结合的动态平衡之中？

24、四烷基季铵盐（如四丁基硫酸氢铵、四丁基溴化铵、四丁基氢氧化铵等）在水中电离后，也形成了类似 $N+(CH_2CH_2)_3$ 的结构 $N+(CH_2CH_2)_4$ ，这种结构也能有效的与 Si-O- 产生较强的静电作用，此类离子对用的比较少，但它的作用仅是掩藏 Si-O- 吗，它对物质的保留性能有何影响，实验中发现检测胺化物时，流动相中加入磷酸缓冲液有增加物质保留的趋势，而加入三乙胺则会降低物质的保留能力？

25、同一根色谱柱在分析完三聚氰胺后，再分析苯甲酸、山梨酸、糖精钠时为什么保留时间会提前？

26、HPLC 柱前衍生和柱后衍生的相关问题？1) 为什么要衍生？2) 衍生化的分类？3) 进行衍生，适用的化合物有哪些？4) 进行衍生化的要求有哪些？5) 柱前衍生和柱后衍生的优缺点？

27、多个样品不好不离的时候，请问该怎么通过选择合适的柱子来提高分离度？

28、苯基柱，氰基柱什么时候考虑用？

29、同样类型柱子还有长度，粒径等差异，这些该怎么去选择？

30、我前几天刚刚装上一个新的 C18 柱，在进样之前我用 100%的甲醇冲了半个多小时。刚才看到上面写的要活化什么的？不知道我只冲半小时就开始用对柱子有没有影响？对出峰什么的有没有影响呢？

31、现在色谱柱和仪器的接口还没有标准化吗，除了检测池的出入管较小外，色谱柱的接口与 PEEK 头不匹配的有哪个型号的色谱柱，以后使用的时候需要注意一点。同时发现使用过金属接头的色谱柱再换成 PEEK 头，常易漏液，这是因为金属头易使色谱柱接口变形吗？

32、普通的 C18 柱能作为正相色谱柱使用吗？正相色谱体系中最常用也最普通的是那种色谱柱。正相柱在使用过程中与反向柱相比有什么需要注意的地方？

33、色谱柱的柱头类型与不锈钢毛细管接头有 6 种连接方式（在讲义里面提到），那么我们用户一般是液相色谱仪是固定某一个厂家，而是根据样品检测需要更换不同类型的色谱柱，那么怎么判断我所购买的色谱柱是否与不锈钢毛细管是否匹配呢，我之前只是知道安捷伦和 waters 都有规定他们自己家的柱子与自己家的仪器配套是最合适的，而其他厂家的色谱柱都很少提及，在不知道的情况下，我们该怎么选择？月旭的色谱柱柱头类型属于哪一种类型呢？

34、相对于气相色谱，液相的优势在哪里？做防腐剂分析时，流动相加入乙酸铵才可以出峰，原理是什么？

35、您提到“磷酸盐缓冲液渗透力强，有加快硅胶溶解的副作用，它的存在会降低 pH 使用范围。”，既然如此，经常使用，柱子寿命是否也下降的快呀？

36、CN 柱的保存需要在低温条件，但是又不能太低，使固定相冻结，怎么控制这个温度？怎么判断固定相是否被冻结？固定相冻结后会是什么样的现象？

37、我们测试样品时，经常会关心柱压是否太高，但是在购买色谱柱时，并没有说每一根色谱柱的最大使用压力是多少？针对这样的情况，用户怎么判断柱压是否超过该柱的极限？

38、使用缓冲液不当，使硅胶溶解并重新形成粉末后，会出现什么样的异常情况？怎么处理？

39、今天才知道滤膜的材质分了这么几种：再生纤维素、聚四氟乙烯、硝酸纤维和醋酸纤维等，之前只知道有有机系和水系之分？各种不同材质的滤膜适合于什么样的样品？

40、我原来遇到个这样的问题，一直不知道原因。刚拿柱子做，色谱条件是成熟的，绝对没问题，但是该条件下保留的物质变的不被保留，比如本来保留时间 15 分钟却怎么调比例都是 2-3 分钟就出峰了，维护后，下次再使用又正常了，什么样原因啊？

41、UPLC 色谱柱可以反冲吗？hplc 的色谱柱可以简单反冲，但是，uplc 的色谱柱，也是一样的吗？如果压力偏高，该怎么办？

42、常规 LC 的柱子粒度小，柱效高，现在有 3.5um 的常规柱，不知道用 3.5um*250 的压力与 4.6um 的压力相差多少？

43、因为不知道流动相已走完，液相色谱柱空走了大概一晚上，请问这种情况下柱子还能用吗？如果可以应该如何再生？

44、在梯度洗脱的时候，如果整个时间程序越长，保留时间的重现性越差，尤其是后出的峰重现性差更明显，我估计是流量本身的误差引起的，但是怎么尽量避免这种情况的出现，使保留时间重现性更好？

[2010-8-9 16:08:16 Last edit by samanthalas]

提问汇总：

45、我对聚苯乙烯-二乙烯苯柱很有兴趣，主要是它耐高温、耐酸碱、但有关这方面的文献很少，但对于他的分离效能我一直心里没底，我的问题有三：1、分离效果与 ODS 比较，是相当呢，还是更胜一筹，或是更差？2、我原以为它是整体柱，但看过资料后发现也是颗粒的比如 5u，请问该类型的柱是否符合速率理论、是不是粒径越小分离效果会几何级的增加？3、问什么没有 1.7u 的这种柱出现呢？

46、我之前了解到贵公司也有手性色谱柱，之前买过大赛璐的手性柱，其手性柱价格相比普通反相色谱柱，要高出很多倍，不知道是本身柱子装填技术的难度大还是其他什么原因？它的主要技术关键在什么方面？

47、“样品与离子对生成紧密的结合物，离子对试剂掩蔽化合物中的极性基团”这句话是什么意思？离子对怎么样掩蔽化合物中极性基团？不就是通过静电引力的作用形成离子缔合物，来降低其极性的吗？

48、我们在用的氨基柱时，有时候峰型突然变宽，有拖尾，用一段时间就又好了，不明白是什么原因造成的，如果要再生氨基柱的时候应该怎么做呢？是像您先前回答的问题中提到的，用一定比例的氨水冲洗吗？氨基柱可以直接用纯水冲洗吗？记得当时买的氨基柱那个使用说明书上说不能用纯水冲？是这样的吗？

如果可以冲的话，一般冲多久？

49、采用国标用 C18 柱测定辣椒精辣度，将辣椒精中添加吐温系列乳化剂做成水溶辣椒精，请问乳化剂对 C18 柱是否有影响？

50、公司按照国标测定辣椒红色素中苏丹红含量，标品分离很好，峰也不错，但是辣椒红色素由于跟苏丹红性质很相似，且颜色较深，分离效果很差，收得率很低，测定结果偏差很大。该如何处理样品？色素是否会降低柱效？

51、通常我们在分析天然药物成分的时候结构复杂，无法考察组分的 PKa 值，哪我们如何去选择最合适的流动相或者是拖尾该怎么改善呢？

52、记得以前拿到 C18 柱，会用甲醇从小流量到大流量慢慢活化，这样做的目的是什么呢？是先溶剂活化吗？然后再用样品？还有测定短肽总是冲出来，该怎么解决呢？就是和溶剂峰出在一起，或者出在溶剂峰之前。

53、C18 柱如果之前曾有些天一直保存在酸性环境中，会对柱子有什么损坏吗？ph 在 2 左右。

54、色谱柱的安装有什么技巧吗？只要保证不漏就行了吗？还有所谓的死体积怎么测定呢？

55、测定多肽样品时，十几肽或者二十几肽时，有时峰前延的比较厉害，有时峰拖尾比较厉害，这是什么原因呢？是样品的问题还是柱子的问题？

56、柱子的平衡时间跟填料关系大吗？哪种最快，哪种最慢？因为我在做离子交换柱的时候平衡是相当的慢

57、关于配置流动相，有机相我们可以甲醇乙腈同时用，这个是基于什么考虑的？是不是根据甲醇乙腈选择性不同、样品在这个两者的溶解度的差异以及调节洗脱相脱能力来考虑的？

58、三乙胺磷酸盐缓冲液作流动相，柱压一天比一天高，该怎么样解决？

59、新出厂液相色谱柱，保护溶剂一般是什么？怎样进行平衡清洗比较好，一般要平衡多长时间比较好？

60、据说液相色谱柱柱压达到一定高度就不能使用了，请问一般达到多高，用甲醇和乙腈是不是一样？

61、柱塞板可不可拆下用超声波清洗，会有什么不良后果？

62、一般正常使用一个 C18 柱能用多长时间？

63、超高压快速高分离度色谱柱是不是未来液相色谱柱普及应用的一个发展趋势？

64、如果液相色谱谱图基线漂移很大是不是柱子的问题？波长越小的越大，270nm 的还不太能看出来，230nm 的就非常厉害了，有可能是什么原因造成的？

65、我们有一台 waters1525 色谱仪，最近基线总是呈现波浪形很有规律，波长越小越明显，梯度洗脱时向上飘逸而且后一段时间呈现波浪形，很影响分析，我想问一下，是不是柱子的原因，用的是 C18 上海安普的？

66、我是做农药残留分析的，用的是 UV2487 检测器，想问一下，C18 色谱柱用什么缓冲液比较好，我以前做三聚氰胺是用柠檬酸，辛酸磺酸钠，也用农药检测行不行？还有用 HLB 柱能不能去除蔬菜和水果中的杂质？

67、液相色谱柱一般使用寿命多长？不同类型的色谱柱是否寿命也不一样？液相色谱柱与气相的柱子有何区别呢？

68、1.“水相”指的是什么？纯水？2.我们实验室的 CN 基柱保存在 40% 的乙腈里面，这个有不良后果吗？

69、CN 基柱应该怎样维护才好呢？比如做完实验用什么流动相冲柱子、短期用什么溶剂保存、长期用什么溶剂保存等等。

70、月旭公司的液相色谱柱接头是大众的还是有自己的规格，我们是 waters 的分析仪，有月旭的产品可不可以？

71、色谱柱的接头，出口处用的是 peek 接头，请问都用 peek 接头不行么，为什么？

72、在做具有缓释的药剂制剂时，色谱柱用过不算长的一段时间后，峰形容易分叉，柱效降低，柱压力升高（柱前装有保护柱），除了按贵公司平时提供的方法清洗外，还有没有其他更好高效的方法来清洗色谱柱或再生，延长色谱柱的使用寿命。

73、我们的液相，为了节约成本我们自己填保护柱，用废的同型号柱子填。但填完以后做标样定量分析有所改变。请问其原因。

74、请问怎么测柱效？柱子填料是 SinoChrom ODS-BP 5um，规格 4.6mm*200mm

75、我用苯试了一下，峰性大大好，但是不知道理论塔板数，不知道怎么评价，感觉不大好，对称性不好，有点前延，柱子才用了四个月，是什么原因呢？是不是塌陷了呢？有什么补救的办法吗？

76、流动相里之前有酸的，做完后单纯用乙腈冲洗，能把酸冲洗干净吗？之前他们是这样冲的，现在怀疑柱子塌陷了，会不会是长时间在酸性环境中造成的呢？

77、我前一段时间做三聚氰胺用 C18 色谱响应值很小，几乎无法检测，可是检测标准就是用的 C18，后来我用 RP18 结果响应值很好，不知道什么原因，请问这两个柱子不都是反相色谱么？他俩之间有什么不同？

78、磺化交联的苯乙烯-二乙烯基共聚物为填充剂的色谱柱在储存过程未注意放在冰箱中，导致发霉后，柱效急剧下降，能何种方法将此色谱柱修复好？

79、我有一个标准的稳定性检测分析方法它是建立在某一供应商的碳 18 柱上我知道有另一个厂家生产同样的碳 18 柱但价钱是它的一半如果我更换柱子会不会影响到分析方法

80、请问我做一种药的分析查美国药典规定使用 100mm*40mm8μm 的色谱柱流速 3mL/min 可现在市场上已不容易找到这种规格的产品于是我按 USP 中色谱柱比较的数据库的指引选了一款选择性一致的等价色谱柱其规格是 100mm*46mm3μm 的色谱柱当选用 3mL/min 的流速时发现柱压超高请问我如何对方法进行调整以满足 USP 的要求？

1、磷酸盐缓冲液渗透力强，为什么，是因为与醋酸盐，枸橼酸盐相比，基团小吗，使用磷酸盐缓冲液与其它缓冲液相比，会使色谱柱寿命缩短多少？

2、离子对色谱法中，离子对是如何起作用的，是离子对试剂的非极性端溶解在填料的非极性端里，解离端伸向流动相，对含胺化合离子交换作用，还是样品与离子对生成紧密的结合物，离子对试剂掩蔽化合物中的极性基团，还是这种结合物是在解离与结合的动态平衡之中？

3、四烷基季铵盐（如四丁基硫酸氢铵、四丁基溴化铵、四丁基氢氧化铵等）在水中电离后，也形成了类似 $N^+(CH_2CH_3)_3$ 的结构 $N^+(CH_2CH_2CH_2CH_3)_4$ ，这种结构也能有效的与 Si-O- 产生较强的静电作用，此类离子对用的比较少，但它的作用仅是掩蔽 Si-O- 吗，它对物质的保留性能有何影响，实验中发现检测胺化物时，流动相中加入磷酸缓冲液有增加物质保留的趋势，而加入三乙胺则会降低物质的保留能力？

提问汇总：

81、最近我非常的沮丧，按照药典上的色谱条件和方法做某药物的分析，却始终得不到满意的结果。有人建议我对色谱条件，如进样量、流动相 pH 和温度等，进行微调以得到良好的峰形和分离效果，可按公司规定我不能这样做，怎么办？

82、请问下 Hibar RT250-4 这个柱子很特殊么？为什么很多药典中的药物分离都用它做柱子，因为才开始做药，不知道 hibar 的柱子特点是什么？

83、在碱性条件下硅胶溶解，又生成硅羟基的机理是什么？反应方程式如何写？

84、同样都是 C18 柱子，液相色谱柱和 SPE 他们之间有什么区别，能具体讲一下么？

85、我从上面了解到 RP18 和 C18 的区别是极性更强一些，能问一下他们在分析农药是可不可以通用？C18 适用于那些农药的分析？我查材料看到苯醚甲环唑都是用 C18 分析的，可我用 C18 分析发现响应值很小，没法分析能帮忙分析一下原因么？

86、我在用乙腈作流动相时，只要那个乙腈比例稍高一点，比如 20%，即使测量波长高于乙腈截止波长比较多，也会产生比较大的溶剂峰，这怎么回事？

87、我在做一个模拟胃内容物中药物反应试验，需要动态测定某药品含量变化。分析时碰到一个棘手问题，进样量同样用 20ul，用对照品进样时色谱峰形不错，进样品时却一直不能得到好的峰形。后来分析是模拟胃内容物样品的酸度过高的因素，可我通过稀释的方法让样品酸度和流动相近，虽然峰形没问题了，却发现因稀释导致分析物在样品中含量下降，低于最低检测限了，如何是好呢？

88、峰形后拖尾是什么原因造成的？

89、流动相与柱子如何才能做到匹配，达到最好的分离效果。目前我们实验室有购买好的色谱柱，可是对样品的分离效果不是很好。

90、我用的是 C18 柱，后面黑色的是我以前跑的图，前面是我现在跑的图形，完全一样的东西，只是流动相不是一批配的（流动相的成分没变），中间柱子别人用过了，峰型怎么发生了这么大的变化啊？可能的原因是什么啊？是不是柱子出了问题啊？

91、柱子的柱效影响大吗？一般柱子的柱效规定是多少的呀！理论塔板数一般要达到多少呢？主要有那些因素影响它。

92、流动相中加入四氢呋喃对柱子有损害吗？我现在分析一样品流动相中用到 20% 的四氢呋喃才能把峰分到基线，但柱子只能用一个星期分离效果就不好了。请问是四氢呋喃损坏了柱子吗？

93、在用液相色谱同时分离多种组分时，怎么通过条件色谱条件使各个峰达到比较理想的分离效果！

94、我有一根 C18 的长柱，买来时检测还好，检测完后冲洗保存在乙腈中，但过了几个月再来用时，不管检测什么样品均有前延，按工程师的方法处理过还是不见好。

95、是样品过载问题，按药典检测方法检验一些药品有关物质时，都要注入高浓度的供试液，这样往往使得柱过载而峰变形，按老师的方法减小浓度和注入量均是不

允许的,怎么处理这问题?

96、哪些原因会造成色谱峰变宽、峰高变低,有哪些解决办法?

97、我以前做苏丹红用的是安捷伦的 SB-C18 柱,峰形什么都很好,最近发现 4 个标样峰后都带有一个小峰,一开始以为是标样问题,后来换 XDB-C18 后标样又正常了。可是用 SB-C18 柱做其他用正常,不知怎么回事?还有,像这种 C18 柱如果压力过高能不能反冲,该如何冲洗?一般做兽残、农残什么的,而且感觉三聚氰胺做后压力更易增高,且容易引发进样器漏等问题,请问做完三聚氰胺需对系统做特殊清洗吗?

98、我是做农药残留分析的,不同的基质杂质含量是不同的,我用 C18 分析时有可能一次就污染了,我用高流速,和反向冲洗都解决不了,是不是这根柱子就废了,有没有其他的办法?

99、还有溶剂中的金属过滤头生锈了,会有什么影响?会不会影响到柱子的寿命,金属离子和柱子有没有什么反应?

100、如果在溶剂过滤时把水膜当成有机膜溶解了而且这样的溶剂又做有机相用了,造成 C18 柱压由 1000 升到 3000,流动相是乙腈和水,问一下这样的柱子还能用么?有没有什么补救方法?

101、保护柱和预柱的作用是不是一样的,如果不一样有什么区别么?保留时间漂移多少为可以接受的范围?

102、近期我们采购了十几根月旭柱子,可否将 Ultimate、XtimateT 等系列柱子的适用于何种分析,适用于何种流动相?详细解释一下,毕竟刚刚开始试用,还不是特别熟悉柱子的性能。象 cp 药典氯霉素、地塞米松磷酸钠、克拉霉素建议用什么柱子?如果流动相含有高氯酸钠建议试用什么系列的柱子?

103、四氢呋喃对柱子有损伤吗?我有一流动相四氢呋喃要用 20% 才能使峰分离到基线。可是每根柱子只用一个星期后分离效果就不好了。是四氢呋喃的原因吗?

104、正相硅胶柱一般保存在什么溶剂里面比较合适?

105、我在做方法开发的时候,用乙腈和水作为流动相,在调整梯度的时候发现,刚开始用 60% 乙腈,RT 为 2.5 分钟,调到 40% 乙腈,RT 没有变化,30% 也没有变化,一直调到 20% 的时候,RT 突然变到了约 13 分钟,请问这是什么原因?我用的是离子交换柱。

106、想请您具体说明一下反冲色谱柱的方法,是不连检测器吗?